文章编号:1000-5404(2007)07-0565-03

论著

静脉内移植骨髓间充质干细胞在脑缺血大鼠脑内的分布及其对学习和记忆的影响

徐 炎,郑 健,周竹娟 (第三军医大学新桥医院神经内科,重庆 400037)

提 要:目的 观察骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)经静脉注射移植后在脑缺血大鼠脑内的存活和分布情况,以及对学习记忆的影响。**方法** 体外培养和扩增成年雄性SD大鼠BMSC,以"四管阻断法"制作大鼠前脑缺血再灌注模型,造模后3 d通过尾静脉注射Hoechst 33342标记的BMSC(2×10^6/ml),另设对照组通过尾静脉注射载体溶液,于注射后3周采用Morris水迷宫观察大鼠学习记忆功能,于注射后4周处死大鼠,取脑组织切片,于荧光显微镜下观察BMSC在脑内存活及分布情况。**结果** BMSC移植大鼠逃避潜伏期、穿环次数和原象限时间与对照组相比有显著性差异($P<0.05$),其中,逃避潜伏期显著短于对照组,穿环次数和原象限时间显著高于对照组。**结论** 静脉注射移植BMSC能够进入大鼠脑内存活,主要分布在缺血性损伤部位,可改善脑缺血大鼠学习记忆能力。

关键词:骨髓间充质干细胞;静脉移植;脑缺血;学习记忆
中国法分类号:R322.8-33;R329.24;R817.1 **文献标识码**:A

Distribution of intravenously transplanted bone mesenchymal stem cells in ischemic brain and their effects on learning and memory in rats

XU Yan, ZHENG Jian, ZHOU Zhu-juan (Department of Neurology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the distribution and migration of bone mesenchymal stem cells (BMSCs) in the brain after intravenous injection into brain-ischemic rats and to explore the effects on the learning and memory in rats. **Methods** Bone mesenchymal stem cells from adult rats were cultured *in vitro*. Then the cells were labeled by Hoechst 33342 and infused into the adult rats on day 3 after the ischemia/reperfusion model was established by cerebral artery occlusion. Morris water maze test was used to explore the effects on learning and memory function of the rats at 3 weeks after transplantation. Fluorescence microscope was used to identify BMSCs in rat brains at 4 weeks after transplantation. **Results** All indices in Morris water maze test were significantly different from those of control group at 3 weeks BMSCs transplantation ($P<0.05$). BMSCs survived and localized to the ipsilateral ischemic hemisphere. **Conclusion** BMSCs are able to survive and migrate to ischemic brain tissue through intravenous transplantation and improve the learning and memory function of rats.

Key words: bone mesenchymal stem cells; intravenous transplantation; brain ischemia; learning and memory

缺血性脑损伤后,因脑内神经再生及组织修复极其困难,所以往往遗留永久性神经功能障碍。因此,针对脑损伤后组织修复和功能重建的研究具有重要的实际意义。近年来的研究表明,骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)具有多能分化潜能,能够在体外培养条件下增殖,并被诱导分化为神经元细胞及神经胶质细胞[1]。为了评价BMSC静脉移植治疗缺血性脑损伤的可能性,本研究建立前脑缺血再灌注大鼠模型,观察了静脉注射移植BMSC在脑内的存活和分布情况,以及对大鼠学习和记忆能力的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、器材

DMEM培养基(Gibco公司,美国)、胎牛血清(四季青公司,中国)、PBS平衡液、Hoechst 33342(Sigma公司,美国)、荧光显微镜(DMIRB-100,Leica公司,德国)、Morris水迷宫(3.1,中国医学科学院,北京)。

基金项目:国家自然科学基金(30270490)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30270490)
作者简介:徐 炎(1979-),男,江西省南昌市人,硕士研究生,医师,主要从事细胞移植治疗脑血管疾病的实验方面的研究。电话:13108921340, E-mail:xuzaijan@265.com
通讯作者:郑 健,E-mail: xuzaijan@265.com
收稿日期:2006-12-18;修回日期:2007-01-05

1.2 实验动物及分组

成年雄性SD大鼠24只，体质量200～250 g，由第三军医大学实验动物中心提供，分为2组，每组12只。

BMSC移植组：于前脑缺血再灌注后3 d接受移植。载体溶液静脉注射对照组：于前脑缺血再灌注后3 d接受载体溶液静脉注射移植。

1.3 大鼠前脑缺血再灌注模型的制备

采用"四管阻断法"制作前脑缺血再灌注模型[2]，即烧灼阻断大鼠双侧椎动脉血流，再于24 h后夹闭双侧颈总动脉20 min，造成大鼠前脑缺血再灌注损伤。

1.4 骨髓间充质干细胞的分离、培养及扩增

参照Azizi等[3]的方法，分离大鼠皮肤及肌肉，取股骨，用注射器以含糖无菌PBS缓冲液（含葡萄糖0.35 g/100 ml）冲洗骨髓腔，直至冲洗液色泽变淡后收集洗出液，离心，1 000 r/min，5 min，留取沉淀细胞，以含10%血清DMEM培养基在5% CO_2 的37 ℃培养箱进行培养，于4 h换液1次，去掉未贴壁的细胞，24 h后再换液1次，以后每3～4天换液1次。待细胞长满瓶底约90%时，以0.25%胰酶消化3 min左右，后以1∶3比例进行传代，每周1次，反复进行约3～4次，取传至第4～5代的细胞进行荧光标记，做移植用。

1.5 细胞标记及移植

细胞移植前24 h在培养基中加入2 μg/ml Hoechst 33342共同培养过夜，以标记细胞核，在移植前用荧光显微镜进行观察，确认标记成功并进行照相。

移植前吸出培养液，加入0.25%胰酶，消化3～4 min，于倒置显微镜下观察细胞变圆并将近脱落时，加入培养液，以吸管吹打，制成细胞悬液，然后加入少量胎牛血清灭活胰蛋白酶，1 000 r/min离心5 min。离心后弃上清，加含糖无菌PBS缓冲液，吹散后再次离心（1 000 r/min，5 min）。以含糖无菌PBS缓冲液重新悬浮细胞，调节细胞浓度为 2×10^6/ml。

前脑缺血再灌注模型制作成功后，实验组通过尾静脉缓慢注射1 ml细胞悬液，对照组则缓慢注射1 ml含糖无菌PBS缓冲液。

1.6 行为学评价

实验于造模后3周进行，分为2个部分。

1.6.1 定位航行实验　共进行5 d，每天分上下午2个时间段，每一时间段每只鼠训练4次。将大鼠面向池壁由4个入水点放入池中，测其60 s内成功进驻平台（大鼠找到平台并滞留其上5 s为成功进驻）所需时间（即逃避潜伏期）。如在60 s内大鼠不能成功进驻平台，则实验者将其引上平台并令其停留10 s，记录逃避潜伏期为60 s，每次训练间隔时间为60 s。

1.6.2 空间探索试验　实验最后1 d，撤除平台，从原平台象限对侧池壁中点将大鼠放入水中，记录60 s内大鼠在原平台象限的游泳时间和游泳轨迹，计算大鼠穿环次数及各象限游泳时间占总时间百分比。

1.7 组织学观察

在大鼠接受移植后4周，以1%戊巴比妥钠麻醉，经左心以4%多聚甲醛充分灌注固定，取前脑部分组织常规固定、脱水、浸蜡包埋制成蜡块，切片后常规脱蜡至水后，于荧光显微镜下观察照像。

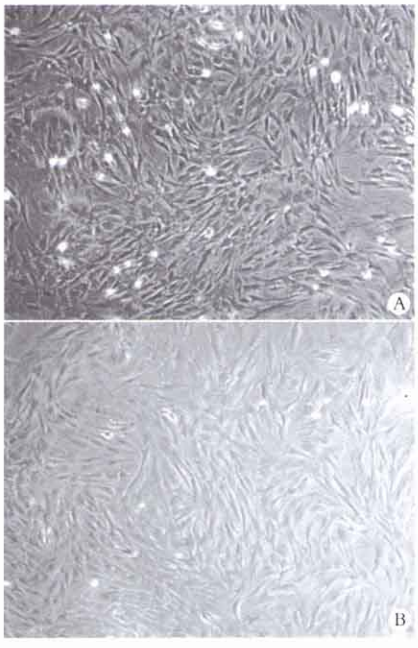
1.8 统计学分析

水迷宫结果数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，均采用 t 检验方法，由SPSS 12.0软件分析结果。

2 结果

2.1 骨髓间充质干细胞的培养及标记

培养的第1、2代骨髓间充质干细胞形态多样，可见梭形、多角形、类圆形等细胞克隆。传代至第3、4代后，细胞形态逐渐单一，呈梭形细胞集中生长（图1）。取4代细胞与Hoechst 33342共同培养过夜后，于荧光显微镜下观察可见所有细胞细胞核均被标记（图2）。



A：第1代培养细胞；B：第4代培养细胞

图1 培养不同时期的骨髓间充质干细胞形态特征（倒置显微镜×200）

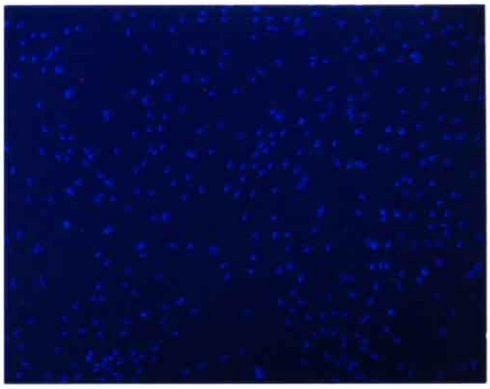


图2 Hoechst 33342标记培养的骨髓间充质干细胞形态特征（荧光显微镜×200）

2.2 骨髓间充质干细胞移植对动物认知行为的影响

造模后3周，BMSC静脉注射移植组与载体溶液静脉注射对照组相比，逃避潜伏期、穿环次数、原象限时间均有显著性差

异[分别为(32.8 ± 1.89 s)、(2.33 ± 0.23)、(11.11 ± 0.65 s) *vs* (43.6 ± 1.18 s)、(1.29 ± 0.13)、(9.47 ± 0.56 s)，$P < 0.05$]，其中逃避潜伏期显著低于对照组($P < 0.05$)，穿环次数、原象限时间显著高于对照组($P < 0.05$)。

2.3　移植骨髓间充质干细胞在脑内的分布

Hoechst 33342 标记的 BMSC 静脉注射移植后 4 周，取接受细胞移植的动物的脑组织制备切片，HE 染色后可在光学显微镜下观察到海马 CA1 区锥体细胞排列紊乱，部分锥体细胞体积缩小，细胞核固缩，呈三角形(图 3)。而在荧光显微镜下观察到脑内存在较多发蓝色荧光的细胞(Hoechst 33342 标记)，主要分布在海马结构，即缺血选择性易损区(图 4)。

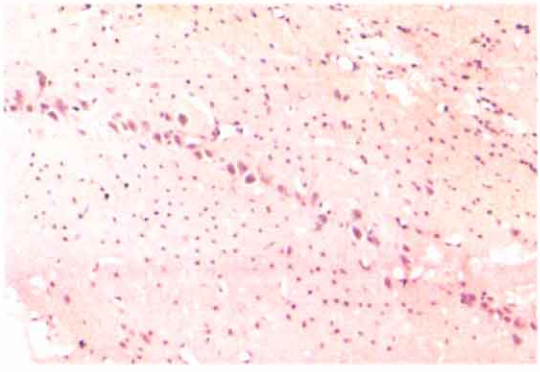
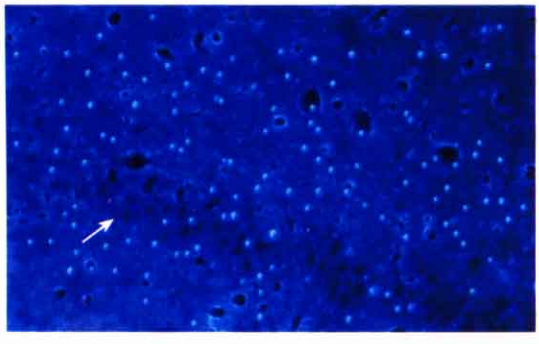


图 3　接受骨髓间充质干细胞移植的动物海马 CA1 区　(HE × 100)



可见较多 Hoechst 33342 标记(蓝色荧光)的移植细胞；↑：锥体细胞层

图 4　接受骨髓间充质干细胞移植的动物海马 CA1 区
(荧光显微镜 × 100)

3　讨论

研究表明，BMSC 具有多分化潜能，在体外可分化成为神经元样和神经胶质样细胞，所以成为细胞移植治疗脑血管疾病的研究热点。在本实验中，我们应用 BMSC 经尾静脉注射移植治疗大鼠前脑缺血再灌注损伤，移植后 4 周于脑切片观察可见大量存活的 BMSC，且主要集中于脑损伤区域，表明移植的 BMSC 能够于宿主脑内较长时期存活，并迁移至缺血区域，提示脑缺血区域的微环境能够促进 BMSC 迁移和存活。其机制可能与该区域增加表达的神经营养因子有密切联系[4,5]。

Morris 水迷宫实验结果显示，BMSC 移植组大鼠学习和记忆功能较对照组大鼠有显著的改善。接受 BMSC 移植的大鼠学习和记忆功能改善的具体机制尚不清楚，推测可能与以下因素有关系：①植入的 BMSC 在脑缺血局部微环境的影响下，分化为神经元样细胞及神经胶质样细胞，替代坏死的神经细胞的功能[6]。②植入的 BMSC 在脑缺血区域分泌多种神经营养因子，如：脑源性神经营养因子(BDNF)和胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)，对局部损伤起到保护作用[7]。③植入的 BMSC 通过各种因素促进了脑缺血损伤区域的自身修复，促进神经功能恢复。

BMSC 可取自宿主、体外扩增后移植，克服了诸如伦理、免疫排斥等方面的困难，具有很好的应用前景。但是，还有下列问题亟需进一步探讨：①如何控制细胞进入脑内后的迁移和定向分化。②BMSC 移植治疗缺血性脑损伤的生物安全性的确定[8,9]。

参考文献：

[1] Hofstetter C P, Schwarz E J, Hess D, *et al*. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(4): 2199 - 2204.

[2] 赵卫东，王子灿，李麟仙，等. 大鼠脑缺血再灌注综合征模型初探[J]. 中国神经精神疾病杂志，1987，13(4)：193.

[3] Azizi S A, Stokes D, Augelli B J, *et al*. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats similarities to astrocyte grafts [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(7): 3908 - 3913.

[4] Chen X, Katakowski M, Li Y, *et al*. Human bone marrow stromal cell cultures conditioned by traumatic brain tissue extracts: growth factor production [J]. J Neurosci Res, 2002, 69(5): 687 - 691.

[5] Liu Y, Kim D, Himes B T, *et al*. Transplants of fibroblasts genetically modified to express BDNF promote regeneration of adult rat rubrospinal axons and recovery of forelimb function [J]. J Neurosci, 1999, 19(11): 4370 - 4387.

[6] Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, *et al*. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors [J]. Cell, 2002, 110(4): 429 - 441.

[7] McTigue D M, Horner P J, Stokes B T, *et al*. Neurotrophin-3 and brain-derived neurotrophic factor induce oligodendrocyte proliferation and myelination of regenerating axons in the contused adult rat spinal cord [J]. J Neurosci, 1998, 18(14): 5354 - 5365.

[8] Kopen G C, Prockop D J, Phinney D G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(19): 10711 - 10716.

[9] 李国梁，祝　勇，赤仁杰，等. 骨髓间充质干细胞移植大鼠脊髓损伤区脑源性神经营养因子的表达[J]. 中国临床康复，2006，10(17)：10 - 11.

(编辑　张大春)