

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2016)24-08-0788-05

骨髓间充质干细胞移植对大鼠脑缺血损伤和 IL-10、TGF- β 1 表达的影响

王芳¹, 汤永红², 杨科³, 朱梦霞¹, 郭东铭⁴, 唐志晗⁴

(南华大学 1. 外科学总论教研室, 2. 附属第二医院神经内科, 3. 诊断学教研室, 4. 心血管疾病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 骨髓间充质干细胞; 大脑中动脉闭塞模型; 白细胞介素 10; 转化生长因子 β 1

[摘要] 目的 观察骨髓间充质干细胞(BMSC)移植治疗缺血性脑卒中大鼠神经功能恢复情况,同时检测血清和脑组织中白细胞介素 10(IL-10)和转化生长因子 β 1(TGF- β 1)表达以探讨神经修复的可能机制。方法 36 只 SD 雄性大鼠,随机分为 3 组:空白组、模型组和实验组。采用改良线栓法制备大脑中动脉闭塞模型(MCAO),实验组缺血 24 小时后予以 BMSC 移植干预,模型组给予等量生理盐水,空白组不做处理。分别于移植后第 1、3、7、14 天不同时间点观察神经行为学评分,通过 TTC 染色测量脑梗死体积,ELISA 及 Western blot 的方法检测大鼠血清及脑组织中炎症因子 IL-10、TGF- β 1 的变化情况。结果 空白组低表达 IL-10、TGF- β 1;与空白组比较,模型组大鼠神经行为学评分明显升高,脑梗死体积增大($P < 0.01$),血清及脑组织中 IL-10、TGF- β 1 的表达明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,实验组大鼠脑梗死体积减小($P < 0.05$),3 天、7 天及 14 天中神经行为学评分明显降低($P < 0.05$),血清及脑组织中 IL-10、TGF- β 1 的表达明显升高($P < 0.01$),且随着 1、3、7、14 天的时间的推移,IL-10、TGF- β 1 表达逐渐下调。结论 骨髓间充质干细胞对缺血性脑损伤有修复作用,其机制可能与促进抗炎因子 IL-10、TGF- β 1 的分泌有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of BMSC Transplantation on the Expression of IL-10 and TGF- β 1 in Rats with Cerebral Ischemic Injury

WANG Fang¹, TANG Yong-Hong², YANG Ke³, ZHU Meng-Xia¹, GUO Dong-Ming⁴, and TANG Zhi-Han⁴

(1. Department of Operative Surgery; 2. Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital; 3. Department of Diagnostics; 4. Institute of Cardiovascular Disease, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Bone Aarrow Mesenchymal Stem Cells; Middle Cerebral Artery Occlusion(MCAO); IL-10; Transforming Grow Factor β 1(TGF- β 1)

[ABSTRACT] **Aim** To observe the protective effects of bone marrow mesenchymal stem cells transplantation for treatment of cerebral ischemia injury in rats, and investigates the expression of interleukin 10 (IL-10) and transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) to explore its possible mechanism of nerve repair. **Methods** 36 male SD rats were randomly divided into blank group, model group, and transplantation group. MCAO model was formed by suture occluded method. Rats intrasplantation group were given Bone marrow mesenchymal stem cells. Rats in model group were given the same dose of normal saline and nothing were given to blank group. Evaluate their condition by Bederson scoring at 1, 3, 7, 14 days after injured. Area of cerebral infarction was measured through brain tissue TTC staining. Detect the changes of inflammatory factors IL-10 and TGF- β 1 in serum and brain tissue of rats by ELISA and Western blot. **Results** The blank group had low expression of IL-10 and TGF- β 1. Compared with the blank group, both the volume of cerebral infarction of rats in the model group and the scores of the nervous function behavior were increased markedly ($P < 0.01$), the expression of IL-10 and TGF- β 1 in serum and brain tissue was significantly higher than that in the blank group ($P <$

[收稿日期] 2016-01-23

[修回日期] 2016-03-10

[基金项目] 湖南省研究生科研创新项目(2013SCX17);衡阳市科学技术发展计划项目(2015KJ21)

[作者简介] 王芳, 硕士, 助教, 研究方向为干细胞移植与脑血管疾病, E-mail 为 514894146@qq.com。杨科, 硕士, 讲师, 研究方向为肿瘤化学治疗, E-mail 为 38648174@qq.com。通讯作者汤永红, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为干细胞移植与脑血管疾病, E-mail 为 tang6246@tom.com。

0.05)。Compared with the model group, the cerebral infarct volume in the experimental group was decreased, the scores of the nervous function behavior of rats were significantly decreased at 3,7,14 days ($P<0.05$), the expression of IL-10 and TGF- β 1 in serum and brain tissue was significantly higher than that in the model group ($P<0.01$). With the passage of time, the expression of IL-10 and TGF- β 1 was gradually reduced. **Conclusions** BMSC transplantation is able to improve the recovery of the cerebral ischemic injury. The mechanism may be related to the secretion of anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- β 1.

脑血管病以高发病率、高死亡率、重致残率严重威胁着人类的生存与幸福,其中约 70%~80%为缺血性脑血管病(ischemic cerebral vascular disease, ICD)^[1],降低该病的死亡率和重残率具有重大社会意义。目前询证医学有确切疗效的只有溶栓和卒中单元,溶栓有时间限制性,另外抗凝治疗、早期使用阿司匹林也被认为有一定的作用,但都同时存在很大的局限性,因此亟待寻求新的治疗方法。近年,随着细胞免疫治疗领域的逐渐发展,多种干细胞系被用于脑血管疾病的临床前研究,并且取得了可喜的实验结果^[2-3],同时炎症免疫反应与缺血性脑损伤的关系受到越来越多关注。早期的炎症往往具有保护作用,持续强烈的炎症反应却是有害的,因此减轻炎症损伤成为治疗缺血性脑卒中的主要途径之一。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)可向受损部位迁移,并作用于炎症细胞,调节不同细胞因子的释放发挥抗炎作用^[4-6]。故本实验采用改良线栓法制备大脑中动脉闭塞模型,研究骨髓间充质细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)移植治疗缺血性脑卒中大鼠神经功能恢复情况及对血清及脑组织中 IL-10、转化生长因子 β ₁(transforming grow factor β ₁, TGF- β 1)表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性 SD 大鼠 36 只,280~320 g,由南华大学实验动物部提供;TTC 粉购自 Sigma 公司;IL-10 和 TGF- β 1 ELISA 试剂盒购于上海信帆生物科技有限公司;兔抗大鼠 IL-10 抗体(1:1 000, Sant cruz 公司),兔抗大鼠 TGF- β 1 抗体(1:1 000, Sant cruz 公司)。

1.2 动物分组

大鼠常规饲养 1 周,将 36 只 SD 雄性大鼠随机分为空白组(4 只)、模型组(16 只)、实验组(16 只),模型组与实验组大鼠各分为 4 小组(1、3、7、14 天组,每亚组 $n=4$)。空白组不予任何处理;模型组

造模成功 24 h 后予以等量生理盐水注射;实验组造模成功 24 h 后通过尾静脉注射予以 2×10^6 个 BMSC 移植干预。

1.3 动物模型制备

使用改良 Longe 线栓法建立大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型。

1.4 神经行为学评分

模型成功判断的标准:动物清醒后出现左肢瘫痪的表现,如提尾左侧前肢屈曲或爬行时向左侧划圈甚至倾倒。采用 Bederson 6 级 5 分评分标准进行,5 级 0 分:正常(无功能障碍);4 级 1 分:对侧上肢不能完全伸展;3 级 2 分:向对侧推时抵抗力下降;2 级 3 分:提尾时向对侧转圈;1 级 4 分:自动转圈;0 级 5 分:无自发性活动伴意识障碍。

各组大鼠于脑缺血 24 小时后进行神经功能缺损评分。剔除分数为 0 分、5 分、有蛛网膜下腔出血、术后死亡的大鼠,2-3 分最为理想,保证移植前各组神经功能缺损严重程度类似,模型纳入标准无差异。

1.5 样本处理

在大鼠模型成功后 1、3、7、14 天,每亚组大鼠 10%水合氯醛(0.35 mL/100 g)腹腔注射麻醉,一次性采血针取心脏血于采血管中(无肝素钠),静置 30 min,以 3 000 r/min 离心 25 min,收集上层血清行 ELISA。采血完成后,冰生理盐水经心快速灌注 250 mL,迅速断头取脑,用眼科剪在大鼠大脑中动脉梗死区(肉眼可见颜色较旁边组织白)剪下脑组织约 0.5 g, -80℃ 冰箱保存以备 WB 中提取蛋白用,余脑行 TTC 染色。

1.6 TTC 染色并计算梗死体积

将剩余脑组织在 -20℃ 冰箱中速冻 20 min 左右,便于切片,一般将脑组织切成 5~6 片,每隔 2 mm 切一片,将切好的脑片置于 6 孔板中,每孔加入已温热的 TTC 溶液 4~5 mL,放入 37℃ 恒温水浴锅中,注意避光水浴,每隔 10 min 左右翻动脑片,总耗时约半小时,取出后可看到梗死区成白色,未梗死区为红色。选取用 TTC 染色确定梗死的老鼠纳入实验组跟模型鼠。TTC 染色后的脑组织立刻置于

4℃ 4%多聚甲醛中固定 24 h,利用 LuxeF 图象分析仪测每个脑片的梗死体积,根据公式 $V=t(A_1+A_2+\dots+A_n)-(A_1+A_n)t/2$ 计算梗死体积,其中 t 为切片厚度, A 为梗死面积。

1.7 大鼠血清 IL-10 和 TGF- β 1 浓度测定

用 ELISA 酶联免疫法检测 IL-10 和 TGF- β 1 水平,操作按试剂盒说明进行。

1.8 Western blot 检测大鼠脑组织 IL-10 和 TGF- β 1 蛋白表达

取脑组织于 EP 管中,用眼科镊尽量夹碎(低温进行),用预冷的无菌 PBS(含 PMSF)洗涤后,加入 RIPA 裂解液(含 PMSF)裂解 30 min,冰上匀浆离心后吸取上清,BCA 法测定蛋白浓度。各泳道取等量蛋白提取物加入等体积的 2×SDS 上样缓冲液于沸水浴中加热 5 min,行 15%的 SDS-PAGE 电泳分离。随后转印至 PVDF 膜上。并用含 5%脱脂牛奶的 TBST 封闭 1h,再与一抗(1:1000)4℃冰箱孵育过夜,室温下 TBST 洗涤后用 HRP 标记的二抗(1:1000)室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次后行 ECL 化学发光显影,分析结果。

1.9 图像分析和统计学处理

数据均使用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析。组间比较用方差分析, $P<0.05$ 认为差异有显著性意义。统计图的绘制采用 Graphpad Prism 软件。

2 结果

2.1 TTC 染色测量脑梗死体积的比较

TTC 染色测量脑梗死体积,1、3、7、14 天,组间比较,实验组大鼠脑梗死体积明显低于模型组大鼠,差异有统计学意义($P<0.05$);组内比较,实验组与模型组组内脑梗死体积差异无显著性($P>0.05$);表 1 和图 1)。

表 1. TTC 染色测量脑梗死体积的比较($\bar{x}\pm s$,分)

Table 1. The Comparison of cerebral infarct volumes measured by TTC staining($\bar{x}\pm s$,Score)

分组	n	1 天	3 天	7 天	14 天
实验组	4	156.0 \pm 2.13 ^{ab}	164.0 \pm 4.98 ^{ab}	158.0 \pm 3.13 ^{ab}	161 \pm 5.33 ^{ab}
模型组	4	208.3 \pm 3.36 ^b	211.3 \pm 5.88 ^b	212.3 \pm 4.17 ^b	209.3 \pm 4.86 ^b
空白组	4	-	-	-	0 \pm 0.00

a 为 $P<0.05$,与模型组比较; b 为 $P<0.01$,与空白组比较。

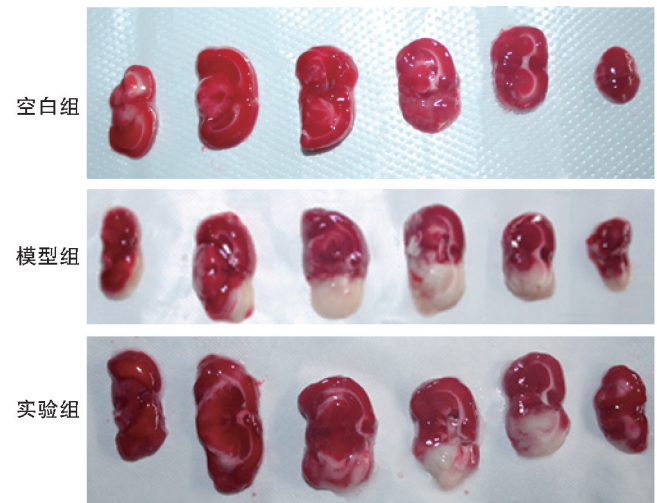


图 1. TTC 染色测量脑组织体积

Figure 1. Measurement of cerebral infarction volume by TTC staining

2.2 神经行为学评分

模型组及实验组大鼠随着天数的增加,评分逐渐降低;BMSC 移植干预 1 天后,模型组和实验组神经行为学评分无明显统计学差异($P>0.05$);移植干预 3 天、7 天、14 天后,实验组大鼠神经行为学评分明显低于模型组大鼠,神经功能恢复好,差异有统计学意义($P<0.05$);表 2 和图 2)。

表 2. 神经功能缺损评分($\bar{x}\pm s$,分)

Table 2. The score of nerve function defect($\bar{x}\pm s$,Score)

分组	n	1 天	3 天	7 天	14 天
实验组	4	3.21 \pm 0.57 ^b	3.01 \pm 0.35 ^{ab}	2.72 \pm 0.34 ^{ab}	2.31 \pm 0.24 ^{ab}
模型组	4	3.50 \pm 0.27 ^b	3.45 \pm 0.45 ^b	3.21 \pm 0.25 ^b	2.83 \pm 0.52 ^b
空白组	4	-	-	-	0 \pm 0.00

a 为 $P<0.05$,与模型组比较; b 为 $P<0.01$,与空白组比较。

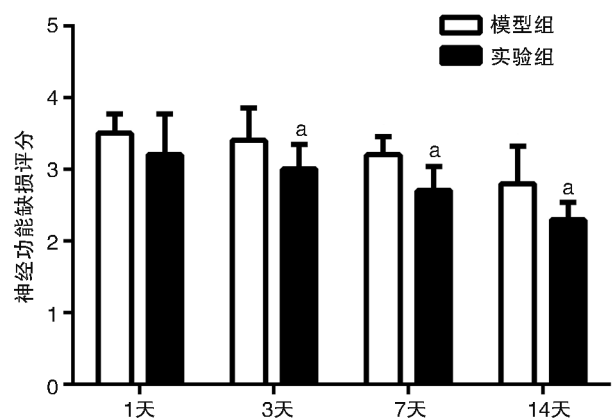


图 2. 各组神经功能缺损评分 a 为 $P<0.05$,与模型组比较。

Figure 2. The score of nerve function defect

2.3 ELISA 检测大鼠血清内 IL-10 和 TGF-β1 的表达

MCAO 大鼠血清 IL-10、TGF-β1 水平明显高于正常对照组大鼠 ($P < 0.01$),而在模型组和实验组大鼠检测血清 IL-10、TGF-β1 的表达,可见均逐渐下调,但实验组大鼠的血清 IL-10、TGF-β1 水平明显高于模型组大鼠,差异有统计学意义 ($P < 0.01$;表 3)。

2.4 大鼠脑组织 IL-10 和 TGF-β1 蛋白表达

MCAO 大鼠脑组织中 IL-10、TGF-β1 的表达明显高于正常对照组大鼠 ($P < 0.01$),实验组和模型组大鼠脑组织 IL-10 和 TGF-β1 的表达随着时间的推移逐渐下调,但模型组大鼠 IL-10、TGF-β1 的下调较实验组大鼠更加明显(图 3)。

表 3. 各组血清 IL-10、TGF-β1 的表达 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/L}$)

Table 3. The expression of IL-10 and TGF-β1 in serum of different groups ($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/L}$)

时间	TGF-β1			IL-10		
	空白组	模型组	实验组	空白组	模型组	实验组
1 天	-	69.21±1.25 ^b	88.38±0.67 ^{ab}	-	35.23±1.27 ^b	55.51±2.51 ^{ab}
3 天	-	52.32±1.24 ^b	73.77±1.02 ^{ab}	-	28.82±0.78 ^b	46.55±0.91 ^{ab}
7 天	-	42.71±0.54 ^b	54.62±1.72 ^{ab}	-	25.18±0.53 ^b	37.12±1.38 ^{ab}
14 天	16.00±0.81	33.32±1.24 ^b	40.72±0.99 ^{ab}	10.11±0.55	16.09±1.26 ^b	28.43±0.62 ^{ab}

a 为 $P < 0.01$,与模型组比较;b 为 $P < 0.01$,与空白组比较。

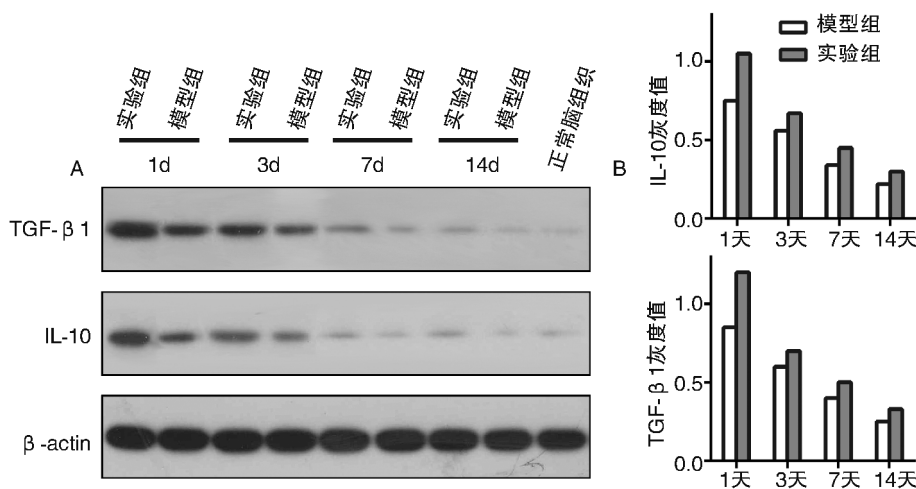


图 3. Western blot 检测脑组织中 IL-10、TGF-β1 蛋白的表达

Figure 3. Western blot showed the expression of IL-10, TGF-β1 among various groups

3 讨 论

目前研究已证实干细胞移植能够促进受损脑神经功能的恢复,但其具体机制尚不十分明确,大部分学者一致认为干细胞促进脑损伤恢复的机制是相互关联的^[7-8],与分泌神经营养因子,诱导分化为神经元样细胞^[9-11],诱导缺血区新生血管的生成,激活内源性的神经干细胞^[12],中和缺血后产生的自由基、钙离子,抑制促炎因子的表达,促进抗炎因子的分泌等皆有关。近年来炎症反应与缺血性脑损伤的关系越来越受到关注。大多数的炎症介质在

正常中枢神经系统中低剂量表达,组织损伤后可大量分泌,进一步造成组织的破坏和细胞凋亡,炎症反应已经成为脑缺血病理变化的一部分。而 MSC 都被认为有免疫调节^[13-14],主要通过细胞间直接接触和分泌可溶性细胞因子来发挥作用的。

在炎症因子中,TGF-β1、IL-10 是经典的抗炎因子。TGF-β1 功能多样,在炎症、损伤、肿瘤等多种病理过程中发挥着不可替代的作用。缺血性脑损伤中 TGF-β1 能抑制 NOS 的表达;清除毒性谷氨酰胺,减少对神经的毒性;调节炎症反应,减少促炎因子的产生,促进抗炎因子的分泌等;IL-10 具有多种生

物学活性,是重要的抗炎因子,可抑制 T1 细胞的功能;抑制巨噬细胞抗原递呈能力;减少缺血区中性粒细胞的浸润,增加脑血流量;减少 NO 的合成、分泌及氧自由基的生产,由此降低神经细胞的死亡率。

本实验采用尾静脉移植 BMSC 治疗缺血性脑卒中大鼠,由于相关因素限制,未进行免疫荧光标记跟踪 BMSC 的生长分化,但是已有大量实验证实静脉移植是一种相对成熟可靠的移植方式,其作用效果肯定^[15-16]。在实验中我们发现 MCAO 模型鼠高表达 IL-10、TGF- β 1,两因子表达 24 小时达到高峰,3 天、7 天、14 天逐渐降低,14 天仍高于空白组。本研究两个因子均是 24 小时左右达到高峰,可能与此时血脑屏障被破坏,外周血白细胞渗出透过血脑屏障到缺血损伤区,激活次级炎症反应有关,另外缺血缺氧也可促进两因子表达的上调。而后逐渐降低与人体自身免疫调节是分不开的,且随着时间的延长,缺血缺氧有所改善,但不可能短期内完全恢复,这也是为什么 14 天组蛋白仍高于空白组的原因。细胞移植组 IL-10、TGF- β 1 蛋白表达的含量在 24 小时达到最高峰,随着时间的推移,表达量逐渐下调,但与同组的模型组对比表达量升高,表明 BMSC 移植治疗 MCAO 模型鼠可以上调 IL-10、TGF- β 1 两抗炎因子而发挥免疫调节作用。随着时间的推移,3 天、7 天、14 天两因子表达量逐渐下调,是因为组织逐渐被修复,各类刺激炎症反应的介质逐渐消耗,同时自身免疫调节,抗炎和促炎达到一个新的平衡。另外生成的 IL-10、TGF- β 1 发生了内源性消耗,并且超过了生成的。移植的 BMSC 在缺氧的环境中发生了细胞凋亡,其数量的减少必然导致免疫调节效应的减弱,所以随着时间的推移表达量呈下调趋势。

实验组脑梗死体积明显低于模型组,神经功能评分在移植干预 3 天、7 天及 14 天后明显低于模型组,且实验组血清及脑组织中 IL-10、TGF- β 1 蛋白含量均明显高于模型组,表明 BMSC 对缺血性脑损伤有修复作用,而修复神经损伤的机制可能与促进抗炎因子 TGF- β 1、IL-10 的分泌,减轻炎症反应有关。但是 BMSC 移植促进 IL-10、TGF- β 1 生成的具体机制还需要我们进一步的探讨。

[参考文献]

- [1] Rosamond W, Flegal K, Friday G, et al. Heart disease and stroke statistics-2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee[J]. Circulation, 2007, 115(5): 169-171.
- [2] Ding DC, Shyu WC, Chiang MF, et al. Enhancement of neuro plasticity through up regulation of beta1-integrin in human umbilical cord-derived stromal cell implanted stroke model [J]. Neurobiol Dis, 2007, 27(3): 339-353.
- [3] Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production[J]. Nat Med, 2009, 15(1): 42-49.
- [4] Klinker MW, Wei CH. Mesenchymal stem cells in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases in experimental animal models[J]. World J Stem Cells, 2015, 7(3): 556-67.
- [5] MacFarlane RJ, Graham SM, Davies PS, et al. Anti-inflammatory role and immunomodulation of mesenchymal stem cells in systemic joint diseases: potential for treatment [J]. Expert Opin Ther Targets, 2013, 17(3): 243-254.
- [6] English K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation[J]. Immunol Cell Biol, 2013, 91: 19-26.
- [7] Lei Hao, Zhongmin Zou, Hong Tian, et al. Stem Cell-Based Therapies for Ischemic Stroke[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014(2014): 468 748-468 748.
- [8] Mark A Eckert, Quynh Vu, Kate Xie, et al. Evidence for high translational potential of mesenchymal stromal cell therapy to improve recovery from ischemic stroke [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2013, 33(9): 1 322-334.
- [9] Li J, Zhu H, Lu S, et al. Migration and differentiation of human mesenchymal stem cells in the normal rat brain [J]. Neurol Res, 2010, 6(2): 134-143.
- [10] Lin YC, Ko TL, Shih YH, et al. Human umbilical mesenchymal stem cells promote recovery after ischemic stroke[J]. Stroke, 2011, 42(7): 2 045-053.
- [11] 周琼, 汤永红, 赵书鹤, 等. 神经生长因子体外诱导人骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2007, 34(5): 397-401.
- [12] Shen LH, LI Y, Chen J, et al. Intracarotid transplantation of bone marrow stromal cells increase axon-myelin remodeling after stroke [J]. Neuroscience, 2006, 137(2): 393-399.
- [13] Bassi ÊJ, Moraes-Vieira PM, Moreira-Sá CS, et al. Immune regulatory properties of allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells in the treatment of experimental autoimmune diabetes [J]. Diabetes, 2012, 61: 2 534-545.
- [14] Kehoe O, Cartwright A, Askari A, et al. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells leads to reduced inflammation and cartilage damage in murine antigen-induced arthritis [J]. J Transl Med, 2014, 12(1): 145-146.
- [15] Xu C, Michael C, Alex Z, et al. Chemokine, vascular and the rapetic effects of combination Simvastatin and BMSC treatment of stroke[J]. Neurobiology of Disease, 2009, 36: 35-41.
- [16] Yoshinori O, Osamu H, Kuniaki H, et al. Optimizati on of a therapeutic protocol for intravenous injection of human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia in adult rats[J]. Brain Research, 2008, 1 236: 30-38.

(此文编辑 李小红)