

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.01247

脂肪来源的神经干细胞移植对大鼠局灶性脑缺血后 VEGF 表达的影响

Effects of adipose tissue-derived neural stem cell transplantation on VEGF expression after focal cerebral ischemia in rats

刘斌^{1*}, 刘宁², 李建民³, 董静¹, 王瑞敏⁴, 张晋霞¹, 李世英¹, 陈贵良⁵

1. 华北煤炭医学院附属医院神经内一科, 唐山 063000

2. 华北煤炭医学院附属开滦医院, 唐山 063000

3. 华北煤炭医学院附属医院神经外科, 唐山 063000

4. 华北煤炭医学院实验中心, 唐山 063000

5. 华北煤炭医学院实验动物中心, 唐山 063000

[摘要] **目的** 观察人脂肪组织来源的神经干细胞移植对大鼠局灶性脑缺血后 VEGF 表达的影响, 探讨其治疗局灶性脑缺血的可能机制。**方法** 线栓法制作大鼠大脑中动脉缺血(MCAO) 2 h 再灌注模型。60 只健康雄性 SD 大鼠随机分为 4 组: 正常对照组(6 只), 假手术组(6 只), 缺血对照组(24 只)和移植治疗组(24 只)。后两组又各分 4 组: 缺血 2 h 再灌注 7、14、21、28 d 组(各 6 只)。体外培养脂肪基质细胞, 诱导分化为神经干细胞。造模成功后 24 h, 移植治疗组经尾静脉移植人脂肪组织来源的神经干细胞悬液(细胞密度为 2×10^6 /ml), 缺血对照组经尾静脉注射生理盐水, 假手术组不做任何处理。免疫组化法检测 VEGF 的表达, 原位杂交法检测 VEGF mRNA 的表达。**结果** 与缺血对照组比较, 移植治疗组各时间点(7、14、21、28 d)的 VEGF 染色阳性细胞数均增加(均 $P < 0.01$), VEGF mRNA 含量均增加(均 $P < 0.01$)。**结论** 脂肪组织来源的神经干细胞移植可促进内源性 VEGF 及 VEGF mRNA 的表达, 提高大鼠局灶性脑缺血后损伤局部 VEGF 及 VEGF mRNA 的含量, 对脑缺血再灌注损伤后的神经细胞起保护作用。

[关键词] 脂肪基质细胞; 神经干细胞; 细胞移植; 脑缺血; 血管内皮生长因子

[中图分类号] R 743.31 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2010)11-1247-04

细胞移植治疗脑缺血性疾病是近年来医学领域研究的一个热点, 由于干细胞具有高度的自我更新能力、高度未分化性和多向系分化潜能, 因此成为细胞移植的首选。有文献^[1]报道, 将脂肪来源的干细胞(adipose tissue-derived stromal cells, ADSC)注射入脑缺血大鼠侧脑室, 可减轻神经功能的缺损, 但具体作用机制还不清楚。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种内皮细胞特异的有丝分裂原, 能促进内皮细胞增殖, 加速新生血管形成, 利于损伤神经组织的修复及重建^[2]。本研究将人脂肪来源的神经干细胞(human adipose tissue-derived neural stem cells, huADNSCs)移植到大鼠局灶性脑缺血区, 观察其对大鼠局灶性脑缺血后 VEGF 及 VEGF mRNA 表达的影响, 以探讨人脂肪组织来源的神经干细胞治疗局灶性脑缺血的可能机制, 现报告如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物 清洁级健康雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠

60 只, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司(动物许可证号: 京 SCXK 2002-2003), 质量 250~350 g, 采取自然光照, 自由进食喂养, 喂养 1 周后制作大鼠中动脉阻断(middle cerebral artery occlusion, MCAO)再灌注模型。

1.2 主要试剂 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司); 胎牛血清(FBS, 天津血研所); 胰蛋白酶(天津血研所); I 型胶原酶(Sigma 公司); BrdU(Sigma 公司); 即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒、兔抗鼠 VEGF 多克隆抗体和 VEGF 原位杂交检测试剂盒(武汉博士德生物工程公司)。

1.3 组织来源 脂肪组织取自要求去除腹部多余脂肪的健康成人, 供体无传染性疾病和内分泌疾病, 签署知情同意书。

1.4 实验动物分组 随机分为 4 组: 正常对照组(6 只)、假手术组(6 只)、缺血对照组(24 只)和移植治疗组(24 只); 后两组又分为缺血 2 h 再灌注 7、14、21、28 d 组, 每组 6 只。

1.5 局灶性脑缺血再灌注模型的建立 对缺血对照组和移植治疗组大鼠采用改良的 Longa 法^[3]制作大鼠中动脉

[收稿日期] 2010-03-07 **[接受日期]** 2010-10-29

[基金项目] 河北省自然科学基金(C2008000994), 河北省优秀专家出国培训基金(2007), 唐山市科研基金(08130204a-1-21). Supported by Natural Science Foundation of Hebei Province (C2008000994), The Overseas Training Foundation for Outstanding Scholars of Hebei Province (2007), and Scientific Research Foundation of Tangshan(08130204a-1-21).

[作者简介] 刘斌, 硕士, 教授、主任医师。

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 0315-3725963, E-mail: liubin919tsh@sina.com

(MCA)阻断 2 h 再灌注模型。以 10% 水合氯醛 (300 mg/kg) 腹腔内注射麻醉, 仰卧位, 于颈部皮肤行常规纵行切口 (约 25 mm), 暴露并钝性游离右侧颈总动脉 (CCA), 结扎同侧 CCA 近心端和颈外动脉 (ECA) 分叉部并反向拉直 ECA, 距 CCA 末端约 5 mm 处剪口, 用直径 0.26 mm 的鱼线沿颈内动脉 (ICA) 方向插入, 深度由分叉部算约计 (18.5 ± 0.5) mm, 于 ICA 近心端结扎该动脉, 全层缝合切口, 再灌注时抽出鱼线 10 mm, 术中室温保持 (22 ± 2) °C, 以大鼠清醒后无法向左侧转弯、左前肢不能伸展为入组标准。假手术组线栓插入深度不足 9 mm, 不闭塞 MCA。正常对照组不做任何处理。

1.6 移植细胞的搜集、鉴定 无菌条件下将脂肪抽吸术获取的人体腹部皮下脂肪组织, 参照 Zuk 等^[4]的方法进行分离培养, 并换液传代。参照 Safford 等^[5]的诱导方案, 用神经诱导培养基 (NIM) 进行诱导。移植前 2 d 将 10 μl BrdU 溶液 (BrdU 50 mg + 二甲亚砜 0.8 ml + 水 1.2 ml) 加入到人脂肪组织来源的神经干细胞培养基中, 37 °C 避光培养。于移植前将经 BrdU 标记人脂肪组织来源的神经干细胞离心后溶解于生理盐水中, 细胞密度调整为 2 × 10⁶/ml, 供细胞移植用。用免疫细胞化学方法体外鉴定人脂肪组织来源的神经干细胞^[6]。

1.7 移植方法 大鼠局灶性脑缺血再灌注模型造模成功后, 移植组于再灌注 24 h 后用 1 ml 注射器经尾静脉注入 1 ml 细胞悬液, 留针 5 min 后缓慢拔针。脑缺血对照组用同样方法给予等量生理盐水, 假手术组不做任何处理。动物清醒后送笼喂养观察。

1.8 脑组织标本制备 于以上各时相点, 对动物以 10% 水合氯醛 (0.3 ml/100 g) 腹腔注射进行深度麻醉。麻醉后的大鼠仰卧位固定于木板上进行开胸, 暴露心脏及主动脉, 用手术剪将右心房及右心室尖剪开, 用头皮针从左心室尖插入心室, 并进入主动脉, 将 37 °C 生理盐水从输液管滴入动物的体循环, 约持续 5~10 min (200 ml) 至右心房流出的液体基本无色, 将灌流液换为 4% 多聚甲醛 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH=7.4), 继续灌流 20 min (约 200 ml), 待大鼠全身僵硬

后, 断头取出脑组织, 取右侧大脑半球, 于视交叉后 2 mm 处取 2 mm 厚组织, 置于 4% 多聚甲醛后固定 24 h。取出固定液中脑组织标本, 修块后进行常规脱水、石蜡包埋。标本冠状面连续切片, 厚度约 3 μm, 40 °C 水浴展片, 用经粘片剂 (多聚赖氨酸) 处理过的载玻片捞片, 置于 60 °C 烤箱烘烤 1 h, 供 H-E 染色及免疫组化用。

1.9 VEGF 检测 采用免疫组化 SABC 法检测 VEGF 表达, 严格按照试剂说明书操作要求进行检测。VEGF 免疫组化阳性细胞免疫反应性的强弱用 Motic Med 6.0 数码医学图像分析系统分析其平均光密度 (D) 值的大小来表示, 并作为分析对象进行比较。

1.10 VEGF mRNA 检测 采用地高辛标记的 VEGF mRNA 寡核苷酸探针 (5'-CAG CCT GGG ACC ACT TGG CAT GGT GGA GGT AGA GC-3'; 5'-CAC ATC TGC AAG TAC GTT CGT TTA ACT CAA GCT GC-3'; 5'-ATA TTA ACA TCA CGT CTT TGT CTC TAG AGC AGT TT-3'), 按照试剂盒说明进行原位杂交染色, DAB 显色, 苏木精复染, 阳性结果为胞质呈棕黄色。VEGF mRNA 原位杂交阳性细胞的杂交信号强弱亦使用 Motic Med 6.0 数码医学图像分析系统分析其 D 值的大小来表示, 其分析及计算方法同 VEGF 免疫组化。

1.11 统计学处理 所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 Excel 数据库整理后用 SPSS 13.0 统计软件包进行统计分析, 两组间同一时间点的比较采用 t 检验, 检验水平 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 各组大鼠脑组织 VEGF 表达结果 VEGF 在正常对照组及假手术组脑组织神经细胞胞质中呈弱阳性表达, 因数量极少故未进行统计学检验。缺血再灌注后 7、14、21、28 d, 缺血对照组和移植治疗组均可见 VEGF 阳性表达, VEGF 主要分布缺血周边区, 梗死灶中心仅见少量 VEGF 表达 (图 1A-D)。随着时间的延长, 缺血对照组和移植治疗组 VEGF 表达数逐渐减少, 但移植治疗组在各时间点 VEGF 表达数高于缺血对照组 (均 P < 0.01), 见表 1。

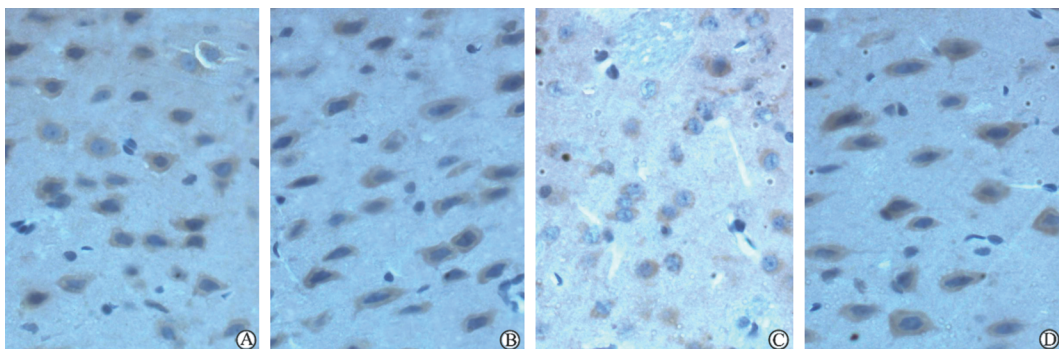


图 1 大鼠 MCAO 模型 VEGF 阳性表达结果 (SABC 法)

A, B: 7 d; C, D: 28 d; A, C: 缺血对照组; B, D: 移植治疗组. Original magnification: ×400

2.2 各组大鼠脑组织 VEGF mRNA 表达结果 VEGF mRNA 在正常对照组及假手术组神经细胞胞质中呈弱阳性表达, 因数量极少故未进行统计学检验。缺血再灌注后 7、14、21、28 d, 缺血对照组和移植治疗组均可见 VEGF mRNA 阳性表达, VEGF mRNA 阳性信号主要分布于缺血周边区, 梗死灶中心仅见少量 VEGF mRNA 表达。脑组织神

经细胞胞质中均可见深棕色的 VEGF mRNA 阳性信号 (DAB 染色)。随着时间的延长, 缺血对照组 VEGF mRNA 表达数逐渐减少, 在 21 d 和 28 d 时表达数较少; 移植治疗组 VEGF mRNA 表达数也逐渐减少, 但在 21、28 d 时表达数仍较强 (图 2A~2D)。移植治疗组在各时间点 VEGF mRNA 表达数均多于缺血对照组 ($P < 0.01$, 表 2)。

表 1 缺血对照组和移植治疗组大鼠脑缺血再灌注后不同时间点脑组织 VEGF 表达结果比较

(D 值, $n=6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	时间 t/d			
	7	14	21	28
缺血对照组	0.41 ± 0.06	0.35 ± 0.02	0.27 ± 0.07	0.16 ± 0.04
移植治疗组	0.58 ± 0.03**	0.51 ± 0.04**	0.50 ± 0.06**	0.50 ± 0.04**

** $P < 0.01$ 与缺血对照组比较

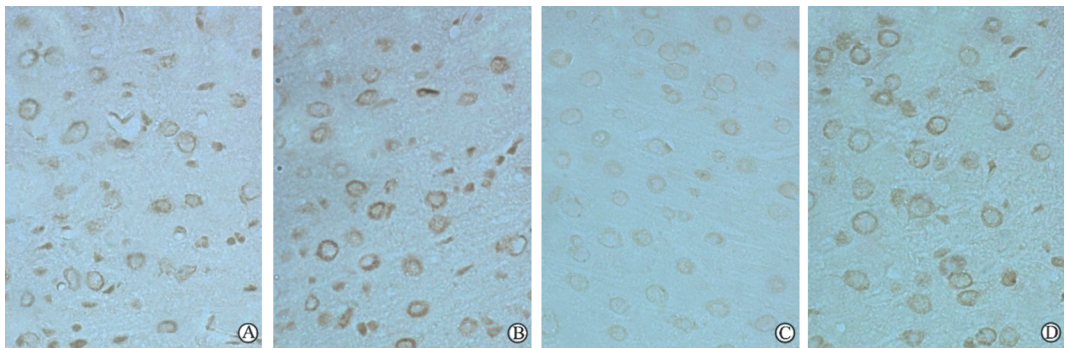


图 2 大鼠 MCAO 模型 mRNA 阳性表达结果 (原位杂交染色)

A, B: 7 d; C, D: 28 d; A, C: 缺血对照组; B, D: 移植治疗组. Original magnification: $\times 400$

表 2 缺血对照组和移植治疗组大鼠脑缺血再灌注后不同时间点脑组织 VEGF mRNA 表达结果比较

(D 值, $n=6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	时间 t/d			
	7	14	21	28
缺血对照组	0.44 ± 0.06	0.38 ± 0.02	0.29 ± 0.04	0.21 ± 0.04
移植治疗组	0.60 ± 0.03**	0.54 ± 0.04**	0.50 ± 0.04**	0.48 ± 0.05**

** $P < 0.01$ 与缺血对照组比较

3 讨论

研究表明, 来源于人脂肪组织的基质细胞 (ADSC) 是一种具有多向分化潜能的成年干细胞, 它不仅可以在体外分化为脂肪细胞、成骨细胞、软骨细胞和成肌细胞等中胚层来源的细胞^[7-8], 而且具有跨胚层分化的能力, 可以横向分化为神经细胞和神经胶质细胞^[9-11]。人脂肪干细胞具有自我更新和分化潜能, 作为原始未分化细胞, 又有低免疫源性特点^[12]。本实验是异种异体移植, 在整个实验过程中, 未使用免疫抑制剂, ADSC 移植治疗组大鼠均未发现免疫排斥反应。

干细胞异体移植治疗脑缺血的途径有: 直接植入缺血部位, 植入缺血半暗带区, 缺血侧脑室注射移植和静脉注射移植。Willin 等^[13]将静脉移植与缺血部位移植的疗效进行了比较, 发现静脉移植的疗效优于缺血部位移植。在本实验中, 采用静脉注射移植的方法, 移植治疗组可见 BrdU 标记的

脂肪组织来源的神经干细胞, 证明了脂肪组织来源的神经干细胞在脑内存活, 移植的细胞可以选择性地通过血脑屏障进入靶组织, 改善神经功能的恢复。静脉移植具有疗效肯定, 损伤小, 操作方便等优点。

Kang 等^[1]将 ADSC 注射入脑缺血侧脑室, 证实 ADSC 移植具有促进缺血性脑损伤大鼠神经功能恢复的作用, 但具体作用机制还不清楚。本研究在体外完成人脂肪基质细胞的原代培养并诱导分化为神经干细胞的基础上, 建立脑缺血再灌注动物模型, 经尾静脉将人脂肪组织来源的神经干细胞移植至模型大鼠体内, 观察大鼠局灶性脑缺血后 VEGF 及 VEGF mRNA 表达的动态变化, 探讨 huADNSCs 移植治疗局灶性脑缺血的可能机制。实验结果显示, 缺血对照组和移植治疗组在不同时间点皮质缺血区脑组织均可见 VEGF 及 VEGF mRNA 的表达, 随着时间的延长, 缺血对照组和移植治疗组 VEGF 及 VEGF mRNA 的表达数均逐渐减少, 但移植

治疗组在各时间点 VEGF 及 VEGF mRNA 的表达数均高于缺血对照组 ($P < 0.01$)。上述结果表明, huADNSCs 移植治疗局灶性脑缺血可增加缺血区脑组织 VEGF 及 VEGF mRNA 的表达, 这与王杰华等^[14]的结果一致。

脑损伤的修复, 既包括神经元的修复, 也包括受损血管的修复。以往的研究多集中于前者, 有关血管的修复报道较少。VEGF 由 Ferrara 等^[15]在牛垂体滤泡星状细胞体外培养液中首先纯化出来, 是一种内皮细胞特异的有丝分裂原。VEGF 在缺血性脑血管病中有促进内皮细胞增殖、促新生血管形成、保护神经、亲神经特性及增加脑血管通透性等生物学作用^[16]。在本实验中, 于各观察时间点, 移植治疗组 VEGF 及 VEGF mRNA 的表达数均显著高于缺血对照组, 表明 huADNSCs 移植可促进内源性 VEGF 及 VEGF mRNA 的表达数, 提高大鼠局灶性脑缺血后损伤局部 VEGF 及 VEGF mRNA 的含量, 进而可增加血管生成, 改善损伤区血液供应, 有利于脑损伤的修复。由此推测 huADNSCs 移植的脑保护作用部分是通过促进 VEGF 及 VEGF mRNA 的表达而发挥作用。

[参考文献]

- [1] Kang S K, Lee D H, Bae Y C, Kim H K, Baik S Y, Jung J S. Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats [J]. *Exp Neurol*, 2003, 183: 355-366.
- [2] Sun Y, Jin K, Xie L, Childs J, Mao X O, Logvinova A, et al. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia [J]. *J Clin Invest*, 2003, 111: 1843-1851.
- [3] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20: 84-91.
- [4] Zuk P A, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell J W, Katz A J, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies [J]. *Tissue Eng*, 2001, 7: 211-228.
- [5] Safford K M, Safford S D, Gimble J M, Shetty A K, Rice H E. Characterization of neuronal/glial differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells [J]. *Exp Neurol*, 2004, 187: 319-328.
- [6] 刘 斌, 吴孟海, 张晋霞, 张 强. 人脂肪组织来源的酪氨酸羧化酶、胆碱乙酰转移酶、谷氨酸脱羧酶表达 [J]. *中国康复医学杂志*, 2007, 22: 691-701.
- [7] Ogawa R, Mizuno H, Watanabe A, Migita M, Shimada T, Hyakusoku H. Osteogenic and chondrogenic differentiation by adipose-derived stem cells harvested from GFP transgenic mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 313: 871-877.
- [8] Rodriguez A M, Elabd C, Delteil F, Astier J, Vernochet C, Saint Marc P, et al. Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 315: 255-263.
- [9] Rodriguez A M, Elabd C, Amri E Z, Ailhaud G, Dani C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells [J]. *Biochimie*, 2005, 87: 125-128.
- [10] 刘 斌, 吴孟海, 董 静, 刘 宁, 李建民, 张晋霞, 等. 脂肪基质细胞诱导分化为神经元细胞的实验 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14: 15-18.
- [11] 张迅铁, 作敏娟, 刘厚奇. 人皮下脂肪来源脂肪干细胞的分离培养及鉴定 [J]. *第二军医大学学报*, 2007, 28: 813-816.
Zhang X Y, Wu M J, Liu H Q. Isolation, culture and identification of adipose derived stem cells from human subcutaneous adipose tissues [J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2007, 28: 813-816.
- [12] 董 静, 刘 斌. 脂肪组织来源的基质细胞向神经细胞分化及其在脑缺血疾病治疗中的应用进展 [J]. *中国康复医学杂志*, 2007, 22: 1050-1053.
- [13] Willing A E, Lixian J, Milliken M, Poulos S, Zigova T, Song S, et al. Intravenous versus intrastriatal cord blood administration in a rodent model of stroke [J]. *Neurosci Res*, 2003, 73: 296-307.
- [14] 王杰华, 刘 楠, 杜厚伟, 翁金森, 陈荣华, 肖迎春, 等. 脂肪来源的干细胞移植对大鼠脑缺血后微血管生成及 bFGF 和 VEGF 表达的影响 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2008, 24: 958-965.
- [15] Ferrara N, Henzel W J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, 161: 851-858.
- [16] Chen X, Katakowski M, Li Y, Lu D, Wang L, Zhang L, et al. Human bone marrow stromal cell cultures conditioned by traumatic brain tissue extracts: growth factor production [J]. *J Neurosci Res*, 2002, 69: 687-691.

[本文编辑] 尹 茶