

[文章编号] 1000-4718(2009)10-1936-05

转肝细胞生长因子的脐带间质干细胞移植 促进大鼠脑出血后髓鞘再生

刘安民¹, 罗 铭², 蔡望青¹, 李方成¹, 李 国³, 潘伟生³

(中山大学附属第二医院¹ 神经外科, ²肿瘤科, 广东 广州 510120; ³香港中文大学, 中国 香港)

[摘要] 目的: 研究转人肝细胞生长因子(hHGF)人脐带间质干细胞(hUCMSCs)移植对脑出血后脱髓鞘再生和神经功能恢复的影响。方法: SD大鼠60只, 随机分为3组: 脑出血+hUCMSCs-HGF组、脑出血+hUCMSCs组和脑出血+PBS组, 每组20只。胶原酶诱导建立脑出血模型, 据不同组别于术后7d立体定向下进行侧脑室相应的移植。分别于移植前1d和移植后1、7、14、21、28、35d利用mNSS(modified neurological severity scores)评分检测大鼠神经功能情况, 应用劳克坚牢蓝检测脑损伤区的神经纤维恢复情况, 利用免疫组化和Western blotting检测髓鞘碱性蛋白(MBP)的表达变化。结果: 脑出血模型大鼠术后3周(即移植术后2周)mNSS评分检测的神经功能, hUCMSCs-HGF组和hUCMSCs组的神经功能改善较PBS组明显提高($P < 0.05$), 而且hUCMSCs-HGF组较hUCMSCs组神经改善更加显著($P < 0.05$)。hUCMSCs-HGF组的神经纤维修复较其它组明显改善, 髓鞘碱性蛋白的表达较其它组亦明显提高($P < 0.01$)。结论: 转hHGF人脐带间质干细胞移植较单纯细胞移植能明显提高神经纤维髓鞘再生能力, 促进脑出血后神经功能缺失的修复。

[关键词] 间质干细胞; 肝细胞生长因子; 髓鞘再生; 脑出血; 大鼠

[中图分类号] R743.34 **[文献标识码]** A

Hepatocyte growth factor modified human umbilical cord mesenchymal stem cell therapy promotes remyelination after intracerebral hemorrhage in rats

LIU An-min¹, LUO Ming², CAI Wang-qing¹, LI Fang-cheng¹, LI Guo³, POON Wai-sang³

(¹Department of Neurosurgery, ²Department of Oncology, The Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China; ³Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, China. E-mail: docliuam@yahoo.com.cn)

[ABSTRACT] **AIM:** To study the effects of neurological improvement and remyelination after intracranial hemorrhage (ICH) in rats by a novel therapeutic strategy with hepatocyte growth factor (HGF) gene transfected human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs) by lentiviral vector. **METHODS:** ICH was induced in 60 adult male Sprague-Dawley rats by a stereotactically guided injection of bacterial type IV collagenase into the right internal capsule. Non-modified hUCMSCs, HGF-modified hUCMSCs with lentiviral vector or PBS were administered left intraventricularly 7 d after right internal capsule ICH. All rats underwent modified neurological severity scores for 35 d. Luxol fast blue staining, immunohistological staining and Western blotting assessments for myelin basic protein (MBP) were applied. **RESULTS:** The ICH rats receiving HGF-modified hUCMSCs demonstrated significant functional recovery, determined by modified neurological severity scores, compared to the other groups from 2 weeks after cell therapy. As indicated by Luxol fast blue staining, the percent area of demyelination was obviously reduced in the HGF-hUCMSC treatment group compared to the PBS control group and hUCMSC-only treatment group at 5 weeks after ICH. The expression of MBP detected by immunohistological staining and Western blotting was significantly higher in HGF-hUCMSCs treated brain than that in other groups ($P < 0.01$). **CONCLUSION:** Our data suggest that the HGF gene-modified hUCMSCs contribute to the remarkable functional recovery after ICH compared to hUCMSCs transplantation alone. The treatment promotes nerve fiber remyelination by

[收稿日期] 2009-03-30 [修回日期] 2009-08-21

Tel: 020-81332016; E-mail: docliuam@yahoo.com.cn

up - regulating the MBP after ICH in rats.

[KEY WORDS] Mesenchymal stem cells; Hepatocyte growth factor; Remyelination; Brain hemorrhage; Rats

自发性脑出血(intracranial hemorrhage, ICH)是一种临床常见病,其发病率、死亡率很高,即使生存者也往往留下明显的神经功能障碍。近些年来,随着干细胞研究的不断发展和深入,发现干细胞移植对脑出血后等神经系统功能的恢复具有治疗作用^[1]。但由于单纯干细胞移植效果的有限性,采取联合基因治疗为疾病的治疗创造了新的前景。而肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)不仅具有促肝再生作用,还可用来治疗神经系统等多种疾病^[2-5]。近来我们成功建立了脑出血模型和转肝细胞生长因子人脐带间质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs)^[6,7]。因此本研究建立 ICH 模型导致神经功能损害,将 HGF 修饰的 hUCMSCs 治疗脑出血模型,探讨其对脑出血后神经功能的影响及其机制,期待为脑损伤后的神经再生和修复治疗带来新的希望。

材 料 和 方 法

1 主要材料

SD 大鼠(香港中文大学实验动物中心提供),胶原酶 IV 型(Sigma)、鼠抗 MBP(髓鞘碱性蛋白)单克隆抗体和鼠抗 actin 多克隆抗体为 Santa Cruz 产品。主要仪器:立体定位仪为 David Kopf Instruments 产品,微型颅钻为日本 NSK Volvere GX,上海安亭微量进样器厂微量进样器,Rotarod test 测试仪由香港中文大学器械服务公司制作,Bio-Rad 电泳仪,Okamoto X3 自动 X 线显影仪,Bio-Rad Model GS-670 灰度分析扫描仪、Canon 照相机和 Zeiss 显微镜成像系统。

2 动物和分组

健康雄性 SD 大鼠 60 只,体重 220 g,鼠龄 10 周。实验随机分为脑出血 + PBS 组、脑出血 + hUCMSCs 和脑出血 + hUCMSCs - HGF 组 3 组,每组大鼠 20 只。

3 模型制作

内囊脑出血动物模型定位^[6]:模型的制作方法:腹腔注射麻醉后,俯卧位将大鼠头部固定在立体定位仪上,保持前囟和后囟在同一水平。于颅正中线上切开皮肤约 1.5 cm,据定位用颅钻钻一直径约 1mm 的骨孔,通过立体定位仪定位,利用微量进样器

将 0.21 CDU/1.5 μ L 胶原酶 IV 型缓慢推进脑内,注射时间维持 5 min,注射完后将针停留 5 min 后缓慢退针,再用骨蜡封闭骨孔、缝合头皮。

4 转 hHGF 基因 hUCMSC 的制备

我们已经成功完成了运用慢病毒载体系统进行转 hHGF 基因 hUCMSC 的制备,并获得重组人肝细胞生长因子在人脐带间质干细胞中高效表达,见参考文献^[7]。

5 细胞移植方法

大鼠左侧脑室模型定位^[8],颅骨背侧中线左旁 1.3 mm,前囟前 0.8 mm,深度为脑表面下 3.7 mm。操作步骤:操作步骤基本同模型制作,通过立体定位仪定位,利用微量进样器据不同组别将 $5 \times 10^6/6 \mu$ L PBS 的 hUCMSCs - HGF、hUCMSCs 和 PBS 缓慢推进 ICH 模型大鼠的左侧脑室内,注射时间维持 5 min,注射完后将针停留 5 min 再缓慢退针。

6 大鼠行为学检测

mNSS(modified Neurological Severity Scores)评分^[9]:mNSS 评分为 0 - 18 分(正常为 0 分,最大功能障碍为 18 分),该评分涉及运动、感觉、反射和平衡实验。分数越高表示神经功能受损更严重,1 - 6 分表示轻度受损,7 - 12 分表示中度受损,13 - 18 分表示重度受损。

7 标本处理、组织学染色和蛋白定量分析

行为学实验后处死大鼠,脑组织按常规处理,石蜡包埋固定,做层厚 5 μ m 切片,进行劳克坚牢蓝(Luxol fast blue)染色观察神经纤维情况和免疫组化染色观察 MBP。常规取脑组织,提取组织蛋白通过 Western blotting 测定 MBP 蛋白含量。

8 统计学处理

数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,运用 SPSS 13.0 统计软件、采用均数的 *t* 检验统计分析。

结 果

1 一般情况

所有动物术后均存活,无伤口感染、死亡等。术后脑出血模型大鼠均出现肢体偏瘫症状,再次手术进行细胞移植后大鼠均存活,无死亡例数。

2 术后神经功能评估

在 3 组的脑出血模型术后 1、7 和 14 d(移植术

后 7 d) 的 mNSS 评分无显著差异。而脑出血模型大鼠术后 3 周(即移植术后 2 周), hUCMSCs - HGF 组的 mNSS 评分较 hUCMSCs 和 PBS 组明显降低 ($P < 0.05$), hUCMSCs 和 PBS 组无显著差异 ($P > 0.05$)。脑出血模型大鼠术后 4、5 周(即移植术后 3、4 周), hUCMSCs - HGF 组和 hUCMSCs 组的 mNSS 评分较 PBS 组明显降低 ($P < 0.05$), 而且 hUCMSCs - HGF 组较 hUCMSCs 组神经改善更加显著 ($P < 0.05$), 见图 1。

3 劳克坚牢蓝(Luxol fast blue)染色

组织学染色有髓神经纤维呈鲜蓝色, 神经细胞胞体及尼氏体呈微紫色。在内囊区血肿周围, hUCMSCs - HGF 组和 hUCMSCs 组较 PBS 组的神经纤维损害的范围小, 而 hUCMSCs - HGF 组比 hUCMSCs 组损害范围更加明显减少, 见图 2。

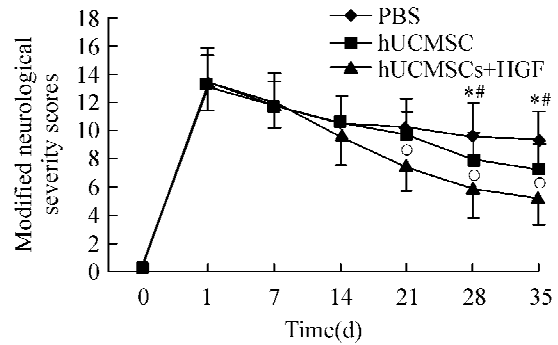


Fig 1 Results of mNSS test. hUCMSCs - HGF - transplanted group showed better performance from 21 d, and these benefits continued up to 35 d. $\bar{x} \pm s$. $n = 6$. * $P < 0.05$ vs hUCMSCs + HGF; # $P < 0.05$ vs hUCMSC; ○ $P < 0.05$ vs hUCMSCs.

图 1 各组细胞移植后 mNSS 结果比较

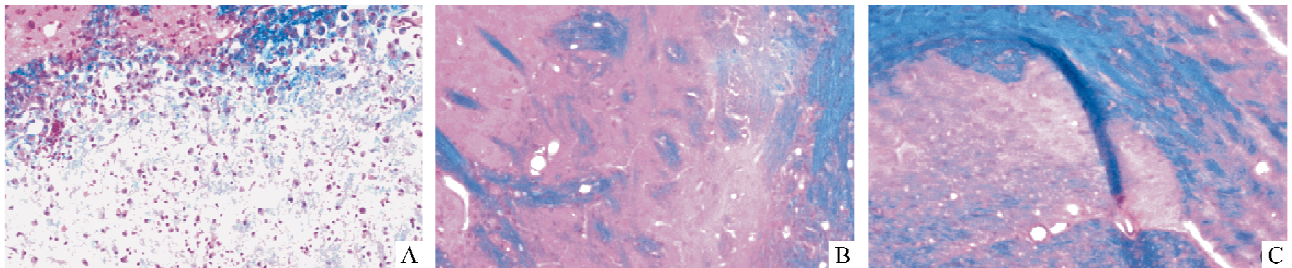


Fig 2 Representative images of the Luxol fast blue staining of myelin in coronal sections of the ipsilateral internal capsule of intracerebral hemorrhage for five weeks. A; remarkable demyelination in ICH rat with intracranial injection of saline; B; remyelination in ICH rat transplanted with non - transduced hUCMSCs; C; significant remyelination in ICH rat transplanted with HGF - transduced hUCMSCs ($\times 50$).

图 2 各组 Luxol fast blue 染色结果

4 髓鞘碱性蛋白(MBP)的变化

免疫组织化学染色显示, MBP 主要位于胼胝体和白质的神经细胞的细胞浆内; hUCMSCs - HGF 和 hUCMSCs 移植大鼠的脑损伤周围的 MBP 表达较

PBS 组高, 见图 3。经 Western blotting 蛋白定量分析, MBP 的含量在 hUCMSCs - HGF 组高于 hUCMSCs 和 PBS 组, 而 hUCMSCs 移植组高于 PBS 组, 差异显著 ($P < 0.01$), 见图 4。

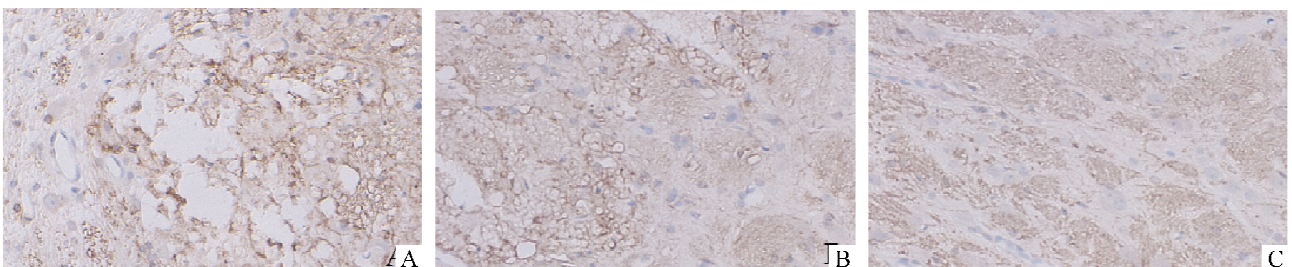


Fig 3 Representative images of immunohistochemical staining of myelin basic protein (dark brown) in coronal sections of the ipsilateral internal capsule of intracerebral hemorrhage (ICH) for five weeks. A; ICH rat with intracranial injection of saline; B; ICH rat transplanted with non - transduced hUCMSCs; C; ICH rat transplanted with HGF - transduced hUCMSCs ($\times 100$).

图 3 各组 MBP 免疫组化结果

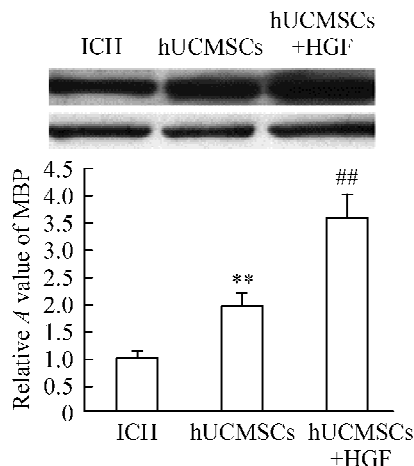


Fig 4 Western blotting for myelin basic protein (MBP) extracted from the ipsilateral thalamuses of rats for five weeks. $\bar{x} \pm s$. $n = 6$. ** $P < 0.01$ vs ICH group; ## $P < 0.01$ vs hUCMSCs group. ICH: intracerebral hemorrhage group.

图4 各组 MBP 的 Western blotting 结果比较

讨 论

长期以来,中枢神经系统的损伤与再生一直是困扰人类健康的难题,也是科学家们研究的焦点。因此越来越多的研究目的在于如何提高神经系统损伤患者的生存质量。在大多数情况下,内源性干细胞产生的神经组织不足以替代损伤后缺失的神经组织^[6]。ICH 后运动功能损伤的机制十分复杂,近期的研究发现 ICH 后神经功能的缺损是由于神经通路受损而引起^[10]。因此,科学家现在着重于神经功能的再建,把脑出血后神经纤维脱髓鞘变作为主要的治疗目标。

近来 Seyfried 等^[1]运用 MSCs 静脉移植治疗脑出血大鼠进行研究,发现骨髓间质干细胞移植能提高局部骨髓间质干细胞的聚集、神经元的迁徙等,改善 ICH 的神经功能障碍。本实验结果也显示,脐带间质干细胞移植能一定程度地促进脑损伤后神经纤维的再生,进而改善脑出血后的神经功能缺损。研究表明,MSCs 可以自身分化为神经细胞,具有分泌营养因子、抗凋亡等作用,而 MSCs 的移植效果取决于移植细胞的数量^[11],但往往由于移植 MSCs 的活性相对较低而导致治疗效果有限,MSCs 移植后神经系统功能只能得到一定程度的恢复^[12];所以寻找增强移植 MSCs 治疗效果的新方法是当前科学家面临的重要课题。

越来越多的研究证实,HGF 可作为神经营养因子,在神经系统发育和损伤后再生过程中发挥神经

保护作用,可用于治疗神经组织损伤。Shimamura 等^[3]通过基因转染将人 HGF 基因注入大鼠中动脉闭塞动物模型蛛网膜下隙,发现 HGF 基因过度表达,脑梗死体积缩小、大脑皮质毛细血管密度增加、血脑屏障破坏减少,而脑水肿减轻。Shimamura 等^[4]进一步研究发现转 HGF 基因治疗能有效改善脑梗死后大鼠的学习和记忆功能。Tsuizuki 等^[5]的实验表明,HGF 可使梗死灶的面积减少、凋亡细胞减少、血管生成增加,其机制可能是 HGF 的抗神经元凋亡和促血管形成的作用。

近来研究发现,HGF 作为神经营养因子,在神经系统发育和损伤后对神经元的发育、存活和轴突生长及导向,对周围神经损伤后神经元的保护、轴突侧促生长及神经纤维的修复等均起重要作用^[2]。本研究利用 HGF 基因修饰的 MSCs 移植入 ICH 大鼠模型,发现联合治疗组大鼠的神经纤维再生和神经功能的恢复较单纯细胞移植的效果明显增强;劳克坚牢蓝染色发现在内囊区血肿周围,hUCMSCs - HGF 组较 hUCMSCs 组的神经纤维损害范围缩小,免疫组化和蛋白印迹检测髓鞘碱性蛋白(MBP)的含量也明显升高。Ebens 等^[13]的研究发现,在脊髓运动神经元发生的后期阶段 HGF 是一种化学诱导物及神经营养因子;HGF 可以促进大鼠脊后根神经节的轴突生长和感觉神经元的存活。研究发现,HGF 能调节出生后早期树突的形态及增强轴突的生长;给以外源性 HGF 能促进皮质第 2 层锥体细胞神经元的树突生长和分支,而抗 HGF 抗体可阻断内源性 HGF,导致神经元树突形态及复杂程度显著下降^[14],而且 HGF 能提高 NGF 的神经营养活性,增强依赖于 NGF 存活的感觉及交感神经元等的存活效应,促进依赖于 NGF 的感觉神经元轴突外向生长^[15]。以上结果结合本研究表明,HGF 能促进作为神经髓鞘重要结构的髓鞘蛋白的增加,从而促进神经纤维的再生和修复。HGF 对神经系统具有较强的保护作用,通过促进髓鞘再生是其发挥保护作用的机制之一,将 HGF 的基因对 MSC 进行修饰用于组织损伤性疾病的修复治疗具有广泛的前景。

[参 考 文 献]

[1] Seyfried D, Ding J, Han Y, et al. Effects of intravenous administration of human bone marrow stromal cells after intracerebral hemorrhage in rats[J]. J Neurosurg, 2006, 104(2):313 - 318.

- [2] Zhao MZ, Nonoguchi N, Ikeda N, et al. Novel therapeutic strategy for stroke in rats by bone marrow stromal cells and *ex vivo* HGF gene transfer with HSV - 1 vector [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2006, 26(9) :1176 - 1188.
- [3] Shimamura M, Sato N, Oshima K, et al. Novel therapeutic strategy to treat brain ischemia: Overexpression of hepatocyte growth factor gene reduced ischemic injury without cerebral edema in rat model [J]. *Circulation*, 2004, 109(3) :424 - 431.
- [4] Shimamura M, Sato N, Waguri S, et al. Gene transfer of hepatocyte growth factor gene improves learning and memory in the chronic stage of cerebral infarction [J]. *Hypertension*, 2006, 47(4) :742 - 751.
- [5] Tsuzuki N, Miyazawa T, Matsumoto K, et al. Hepatocyte growth factor reduces the infarct volume after transient focal cerebral ischemia in rats [J]. *Neurol Res*, 2001, 23(4) :417 - 424.
- [6] 刘安民, 蔡望青, 麦荣康, 等. 大鼠脑出血后内源性神经干细胞激活和增殖的实验研究 [J]. *中华神经医学杂志*, 2008, 7(10) :997 - 1000.
- [7] 刘安民, 罗 铭, 李 国, 等. 重组人肝细胞生长因子在人脐带间质干细胞中高效表达 [J]. *中国病理生理杂志*, 2008, 24(12) :2450 - 2454.
- [8] Jin K, Sun Y, Xie L, et al. Comparison of ischemia - directed migration of neural precursor cells after intrastriatal, intraventricular, or intravenous transplantation in the rat [J]. *Neurobiol Dis*, 2005, 18(2) :366 - 374.
- [9] Chen J, Sanberg PR, Li Y, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats [J]. *Stroke*, 2001, 32(11) :2682 - 2688.
- [10] Karibe H, Shimizu H, Tominaga T, et al. Diffusion - weighted magnetic resonance imaging in the early evaluation of corticospinal tract injury to predict functional motor outcome in patients with deep intracerebral hemorrhage [J]. *J Neurosurg*, 2000, 92(1) :58 - 63.
- [11] Chen J, Li Y, Wang L, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats [J]. *Stroke*, 2001, 32(4) :1005 - 1011.
- [12] Mangi AA, Noisieux N, Kong D, et al. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts [J]. *Nat Med*, 2003, 9(9) :1195 - 1201.
- [13] Ebens A, Brose K, Leonardo ED, et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor is an axonal chemoattractant and a neurotrophic factor for spinal motor neurons [J]. *Neuron*, 1996, 17(6) :1157 - 1172.
- [14] Gutierrez F, Dolcet X, Tolcos M, et al. HGF regulates the development of cortical pyramidal dendrites [J]. *Development*, 2004, 131(15) :3717 - 3726.
- [15] Maina F, Hilton MC, Andres R, et al. Multiple role for hepatocyte growth factor in sympathetic neuron development [J]. *Neuron*, 1998, 20(5) :835 - 846.

一种可阻断致癌蛋白 EW - FLI1 与 RNA 解螺旋酶 A 相互作用抑制尤文氏肉瘤生长的小分子

许多肉瘤和白血病带有非随机的染色体转位,这些转位位点编码肿瘤特异的变异融合转录因子。尤文氏肉瘤家族肿瘤 (Ewing's sarcoma family tumors, ESFTs) 含有一个致癌融合蛋白 EWS - FLI1 表达的特征性 t(11;22) 转位。由于 EWS - FLI1 是一个错位蛋白,无法使用常规基于结构的方法设计小分子抑制剂。鉴于 EWS - FLI1 与 RNA 解螺旋酶 A (RNA helicase A, RHA) 的结合对其致癌功能十分重要,美国科学家使用表面电浆子共振筛查 (surface plasmon resonance screening) 的方法筛选能与 EWS - FLI1 结合并能阻断其与 RHA 相互作用的小分子化合物。其中 YK - 4 - 279 是在筛查中获得的有效先导化合物,能阻断 RHA 与 EWS - FLI1 的结合,诱导 ESFT 细胞凋亡并使 ESFT 的原位移植生长受限。实验结果证实该化合物能抑制变异的肿瘤特异转录因子与致癌效应所需的细胞成分相结合,同时提供了一种寻找特异性抗肿瘤有效成分的新方法。