

论著

文章编号:1000-5404(2012)12-1192-05

缺血性脑卒中大鼠模型骨髓干细胞的动员和神经修复作用

张兴秀¹, 郭慧娟¹, 李琳², 王健¹, 郑敏² (400010 重庆, 重庆医科大学附属第二医院神经内科¹, 400016 重庆, 重庆医科大学基础医学院组织学与胚胎学教研室²)

[摘要] 目的 研究粒细胞集落刺激因子(granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF)对卒中后骨髓干细胞的动员与血管再生和神经修复的影响。方法 线栓法制备大鼠大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型, 成功造模大鼠(60只)分为生理盐水对照组和G-CSF治疗组。治疗组皮下注射G-CSF[2、10、50、250 μg/(kg·d)], 对照组以等量生理盐水进行处理。治疗1、3、5、7 d后, 进行行为学评分并取外周血计数单个核细胞, 提取RNA进行RT-PCR检测单个核细胞CD31、CXCR4 mRNA的表达水平; 实验动物灌注固定后取脑组织切片检测G-CSF作用后脑组织中CD31、CD133及基质细胞衍生因子SDF-1表达。结果 与生理盐水对照组相比, G-CSF治疗组神经功能有明显的改善($P < 0.05$); G-CSF作用后外周血中单个核细胞数量明显增加; G-CSF低剂量作用组[2、10 μg/(kg·d)]外周血单个核细胞CD31及CXCR4 mRNA表达随着用药时间的延长而增强; 高剂量[50、250 μg/(kg·d)]在短时间(1、3 d), 外周血单个核细胞CD31、CXCR4 mRNA随着用药剂量的升高而增强, 250 μg/(kg·d)最强, 且随着用药时间的延长(5、7 d), G-CSF作用逐渐减弱; G-CSF作用后脑组织内皮细胞标志CD31、CD133及SDF-1阳性表达明显增加。结论 G-CSF能改善MCAO后大鼠症状, 其机制可能在于动员骨髓干细胞进入外周血并促进脑组织SDF-1表达以趋化干细胞, 继而促进脑组织的血管再生和神经修复。

[关键词] 卒中; G-CSF; 动员; 骨髓干细胞; 血管再生; 神经修复

[中图分类号] R-332; R363.22; R743.3

[文献标志码] A

Effects of G-CSF on nerve repair and mobilization of bone marrow stem cells in rat models of focal cerebral ischemic stroke

Zhang Xingxiu¹, Guo Huijuan¹, Li Lin², Wang Jian¹, Zheng Min² (¹Department of Neurology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010; ²Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect and mechanism of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) on mobilization of bone marrow stem cells, angiogenesis and nerve repair in infarct brain tissues of rats with focal cerebral ischemia. **Methods** The rat models of middle cerebral artery occlusion (MCAO) were constructed using filament occlusion method, and 60 MCAO model rats were randomly divided into a control group ($n = 12$) and a G-CSF group ($n = 48$). The rats of the G-CSF group were subcutaneously injected with G-CSF [2, 10, 50 and 250 μg/(kg·d)] for 1, 3, 5 and 7 d, and the rats of the control group were injected with the same amount of normal saline. The neurological scale was evaluated. The number of mononuclear cells (MNCs) in peripheral blood was counted. The mRNA expressions of CD31 and CXCR4 were detected by RT-PCR. The expressions of CD31, CD133 and stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) were detected by immunohistochemistry. **Results** Compared with the control group, the neurological function of the rats was improved significantly ($P < 0.05$), and the number of MNCs in peripheral blood increased significantly in the G-CSF group. The mRNA expression of CD31 and CXCR4 in MNCs increased in a time-dependent manner in the low-dose G-CSF groups [2 and 10 μg/(kg·d)]. In the high-dose G-CSF groups [50 and 250 μg/(kg·d)], the mRNA expression of CD31 and CXCR4 in MNCs increased in a dose-dependent manner in the first 3 d, but the increase was gradually weakened from the 4th to the 7th day. The expression of CD31, CD133 and SDF-1 in the brain tissues of the G-CSF group significantly increased as compared with those of the control group. **Conclusion** The symptoms of MCAO model rats can be relieved by G-CSF, which can induce the mobilization

[基金项目] 国家自然科学基金(31100985); 重庆市自然科学基金(CSTC2010BB5096)

[通信作者] 郑敏, E-mail: zmdwj625@gmail.com

of bone marrow stem cells in peripheral blood and upregulate the SDF-1 expression in brain tissues of MCAO model rats to promote angiogenesis and nerve repair.

[Key words] stroke; G-CSF; mobilization; bone marrow stem cells; angiogenesis; nerve repair

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31100985) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2010BB5096). Corresponding author: Zheng Min, E-mail: zmdwj625@gmail.com

脑卒中的高致残率及死亡率,促使国内外学者重点研究急性脑梗死损伤后修复,愈加关注骨髓干细胞自体动员的研究^[1],因其无免疫源性及良好的组织融合性等优势而备受关注,目前仍对修复神经功能的骨髓干细胞亚型及作用机制,具有争议性。骨髓中寄居着趋化因子受体4(CXC chemokine receptor 4, CXCR4)^[2]阳性的组织定向干细胞,包括骨骼肌、心、肝及神经组织定向干细胞^[3],CXCR4是基质细胞衍生因子-1(stromalcell-derived factor-1, SDF-1)唯一受体^[4]。有研究提示,当中枢神经系统发生病变,引起SDF-1水平上调,趋化血液系统中的单核/巨噬细胞向损伤区迁移并发挥相应生物学效应。已证实粒细胞集落刺激因子(granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF)能动员多种骨髓干细胞^[5],经SDF1-CXCR4“归巢”向损伤部位迁移,刺激其增殖和分化;还能促进分泌各种营养因子治疗损伤,缩小坏死体积和促进功能恢复^[6]。已证明成年脑组织内脑缺血后存在内皮修复和血管新生^[7],骨髓来源的内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)经G-CSF动员后释放到外周血中,趋化到缺血区分化形成新生血管,改善局部血流灌注并促进脑功能恢复,其机制是为神经形成提供一个有利的富含血管的微环境^[8],通过EPC产生多种细胞因子,为神经生成提供有益环境加速神经生成^[9],Thored等^[10]发现神经干细胞都沿着新生的血管迁移。

本研究旨在研究G-CSF在脑梗死后自体骨髓细胞动员及发挥修复作用的机制,为更有效地发挥自体干细胞动员治疗奠定基础,为临床干细胞治疗提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

健康成年SD大鼠66只雌雄各半(由重庆医科大学实验动物中心提供,符合国家级动物标准),体质量200~220g,约7周龄。整个实验中处置动物符合伦理学标准。

1.2 药物与试剂

粒细胞集落刺激因子[G-CSF,商品名:特尔津,150 μ g(1200万IU)/支]购于厦门特宝生物工程股份有限公司。兔抗大鼠CD31抗体、兔抗大鼠CD133抗体、兔抗大鼠SDF-1抗体、荧光Cy3标记羊抗兔IgG抗体为武汉博士德生物工程有限公司产品。逆转录试剂盒及PCR试剂盒购于大连宝生物工程

有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 建立脑梗死动物模型 参考Longa等^[11]改良法建立大鼠大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型。大鼠常规去毛消毒,经腹腔注入3.5%水合氯醛(100mg/ml)麻醉大鼠,颈部正中切口,暴露右侧颈总动脉、颈内动脉和颈外动脉。在颈总动脉近心端打一活结,结扎颈总动脉远心端,距结扎部位3cm处剪一小口,插入直径为0.35mm的尼龙线(线端用火烧圆钝),轻推线尾端使其从颈总动脉经分叉部进入颈内动脉,插入深度约18.0cm。扎紧颈总动脉处的活结,剪去多余的尼龙线,缝合皮肤。

1.3.2 动物分组与处理 6只正常大鼠作为假手术组,60只MCAO模型大鼠分为生理盐水对照组(12只)与G-CSF治疗组(48只),G-CSF治疗分4组(每组12只),分别注射G-CSF[2、10、50、250 μ g/(kg·d)],连续给药1、3、5、7d;对照组注射等量生理盐水。

1.3.3 神经功能评分 参考Longa等^[11]5级4分制评分标准进行评分。0分:无神经损伤症状;1分:不能完全伸展对侧前爪;2分:向对侧转圈;3分:向对侧倾倒;4分:不能自发行走,意识障碍。动物评分1~4分之间为造模成功。

1.3.4 分离单个核细胞 3.5%水合氯醛麻醉大鼠后开胸从左心室取血5ml,收集于无菌EDTA抗凝管,摇匀后转移至15ml无菌离心管,加入等体积PBS稀释摇匀;另取一只30ml无菌离心管预先加入淋巴细胞分离液5ml,倾斜离心管,近液面约1cm处,沿管壁小心将稀释后的血液加到分离液上面;离心,2000r/min,20min,18~20 $^{\circ}$ C;取出离心管见内容物分为4层,在上、中层液面之间可见薄薄的乳白色浑浊,即为白膜层(单个核细胞层);用毛吸管轻插入白膜层,沿管壁周缘吸取白膜,移入另一离心管中;加入5mlRPMI1640混匀洗涤2次,依次以1500、1000r/min离心10min,吸弃上清;用含有10%小牛血清的RPMI1640重悬细胞;取部分置入96孔板中计数细胞,剩余细胞悬液离心1000r/min3min,吸弃上清。

1.3.5 RT-PCR 3.5%水合氯醛麻醉大鼠后开胸从左心室取血5ml,用Ficoll密度梯度离心法分离外周血单个核细胞,计数后取 5×10^6 个单个核细胞以Trizol-Plus1ml打匀提取RNA,检测CXCR4、CD31mRNA的表达。引物序列为: CXCR4:正义链5'-CGTCTATGTGGGTCTCTGGAT-3',反义链5'-AAGGATGACCGTAGTCTTGAGG-3',扩增片段268bp; CD31:正义链5'-CTTCGTCATTCTCAGTCTCG-3',反义链5'-ACTAACAGGTG-GTCTTGCTCCTCC-3',扩增片段327bp; GAPDH正义链5'-GT-GCTGAGTATGTCGTGGAGTCT-3',反义链5'-GTGGAAGAATGG-GAGTTGCTGT-3',扩增片段610bp。

1.3.6 免疫组化染色 40g/L多聚甲醛固定脑组织,取出脑组织置入40g/L多聚甲醛过夜固定,30%蔗糖液过夜脱水;

第2天行冰冻冠状切片,片厚4 μm及16 μm,载玻片裱片后,立即用电吹风吹干;将16 μm切片置入预先装有(PBS+0.1% Triton)的染色缸中于摇床上洗5 min×3次;取出玻片,擦净水分,滴加正常山羊血清封闭2 h,37℃;加一抗孵育,4℃过夜;PBS摇床上洗5 min×3次;加二抗孵育2 h,37℃;PBS摇床上洗5 min×3次;50%甘油封片,荧光显微镜下观察CD31、CD133。4 μm切片行免疫组化染色。

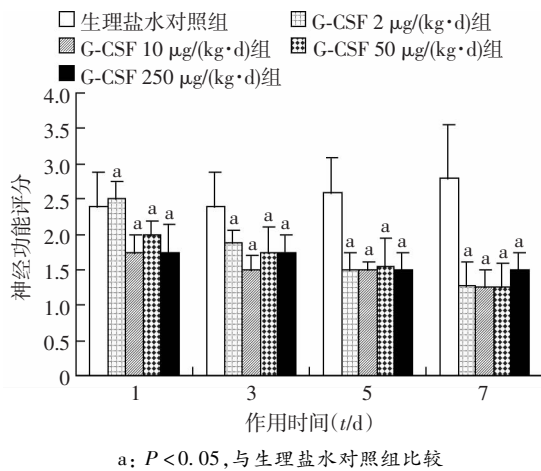
1.4 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 17.0统计软件进行析因分析及方差分析。

2 结果

2.1 MCAO模型建立

假手术组(即正常对照组)评分0分;成功模型1~4分。G-CSF连续给药组神经功能评分较生理盐水对照组明显降低($P < 0.05$,图1)。

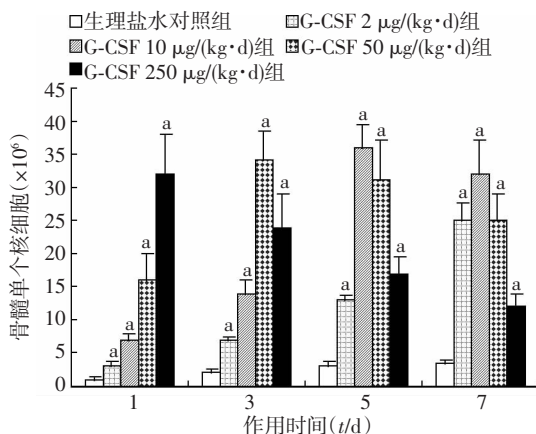


a: $P < 0.05$,与生理盐水对照组比较

图1 大鼠神经功能评分

2.2 外周血单个核细胞数量变化

大鼠MCAO造模后1 d起外周血中单个核细胞数量增加,G-CSF作用后,单个核细胞数量明显增高,其作用以G-CSF 10 μg/(kg·d)作用5 d或50 μg/(kg·d)作用3 d为明显,较生理盐水对照组数量增加了约35倍(图2)。

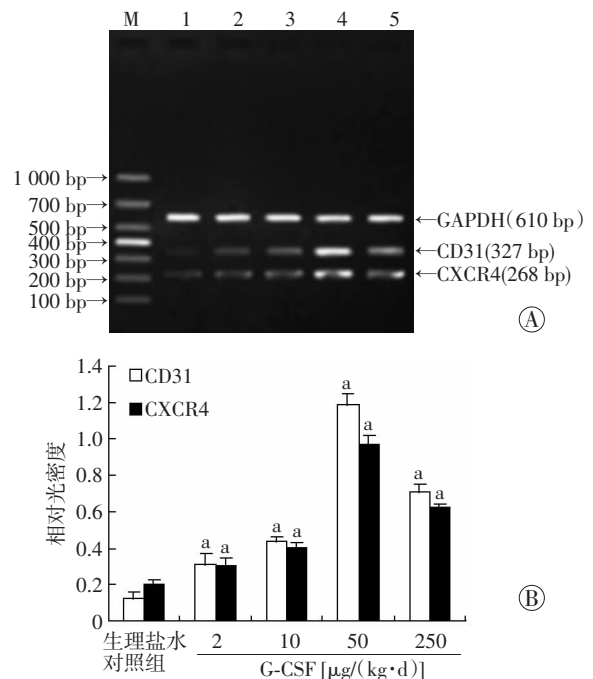


a: $P < 0.05$,与生理盐水对照组比较

图2 G-CSF作用后MCAO大鼠外周血单个核细胞数量变化

2.3 外周血单个核细胞CD31、CXCR4 mRNA表达变化

MCAO大鼠模型外周血单个核细胞CD31、CXCR4 mRNA表达极低,G-CSF作用后外周血中单个核细胞数量明显增加;G-CSF低剂量作用组[2、10 μg/(kg·d)]外周血单个核细胞CD31及CXCR4 mRNA表达随着用药时间的延长而增强;高剂量[50、250 μg/(kg·d)]在短时间内(1、3 d),外周血单个核细胞CD31、CXCR4 mRNA随着用药剂量的升高而增强,250 μg/(kg·d) 1 d组及50 μg/(kg·d) 3 d组最强(图3),且随着用药时间的延长(5、7 d),G-CSF作用逐渐减弱。



A: RT-PCR检测结果 M: 标准;1: 生理盐水对照组;2: G-CSF 2 μg/(kg·d)组;3: G-CSF 10 μg/(kg·d)组;4: G-CSF 50 μg/(kg·d)组;5: G-CSF 250 μg/(kg·d)组; B: 半定量分析结果 a: $P < 0.05$,与生理盐水对照组比较

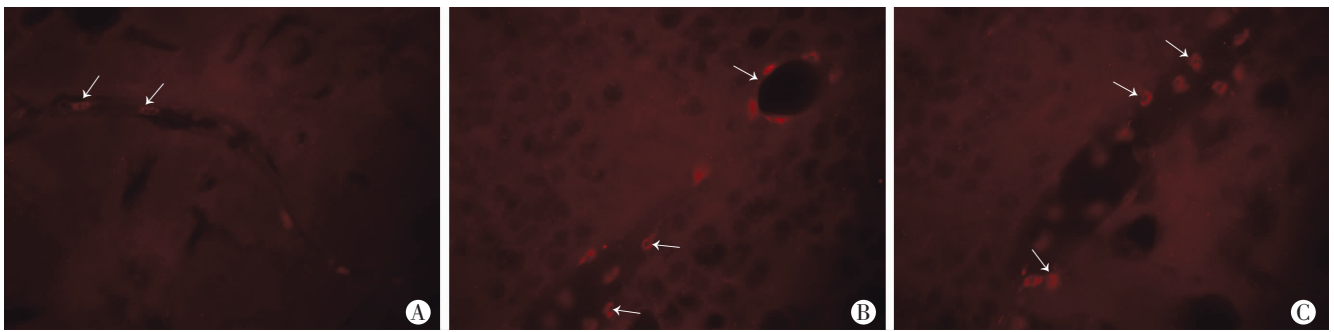
图3 G-CSF作用3 d MCAO大鼠外周血单个核细胞CD31、CXCR4 mRNA表达变化

2.4 梗死区脑组织中CD31、CD133表达

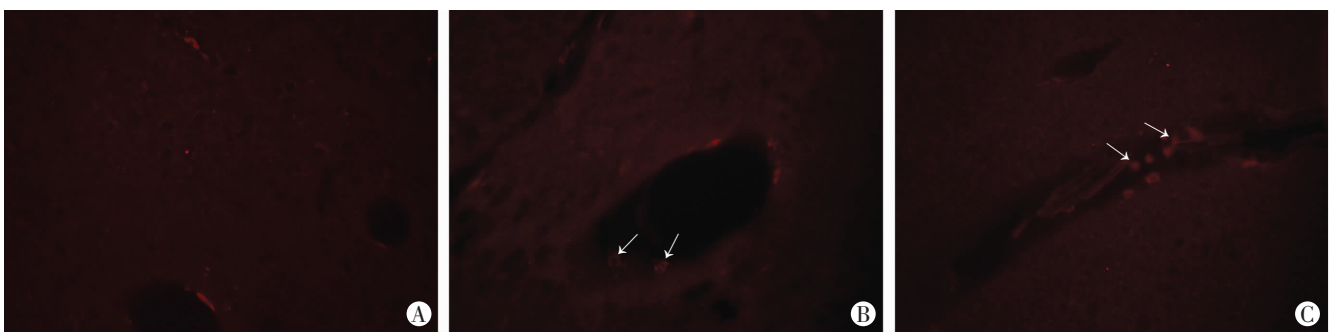
正常大鼠脑组织中CD31阳性细胞主要表达于血管内皮细胞,而CD133阳性细胞几乎未见;MCAO大鼠生理盐水对照组梗死边缘区脑组织中可见血管内有CD31、CD133阳性细胞表达,而G-CSF组中阳性细胞及表达强度明显增加,在血管内CD31、CD133阳性细胞较多见,提示G-CSF能动员骨髓EPC释放并趋化到脑梗死边缘区,通过受损内皮组织的再内皮化,维持血管稳定性而达到修复功能(图4、5)。

2.5 梗死区脑组织中SDF-1表达

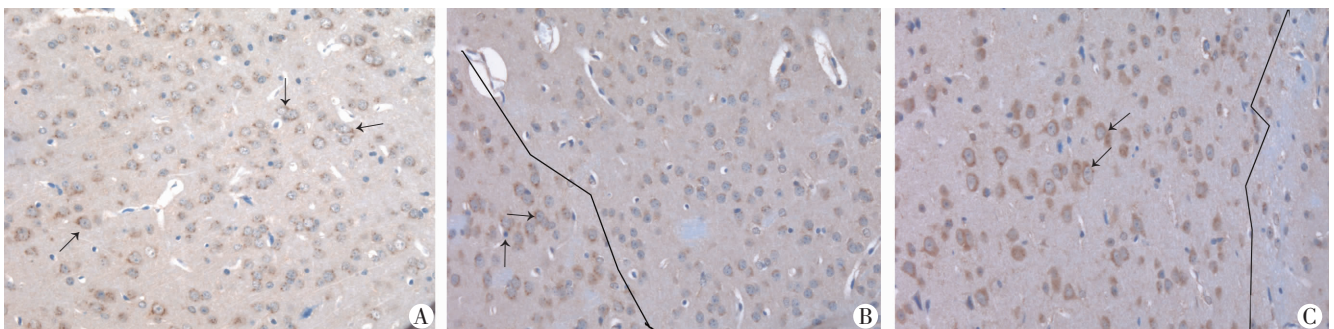
图6示脑梗死边缘区表达SDF-1阳性细胞,可见胞膜及胞质均黄染,假手术组SDF-1阳性表达较低,生理盐水对照组阳性表达高于假手术组,G-CSF 50 μg/(kg·d) 3 d作用组阳性细胞、表达强度明显高于生理盐水对照组($P < 0.05$,图7),提示G-CSF能使梗死边缘区SDF-1的表达明显上调,这与RT-PCR实验中外周血单个核CXCR4 mRNA表达量增加相符,说明通过SDF-1-CXCR4水平上调,对损伤部位发挥修复功能。



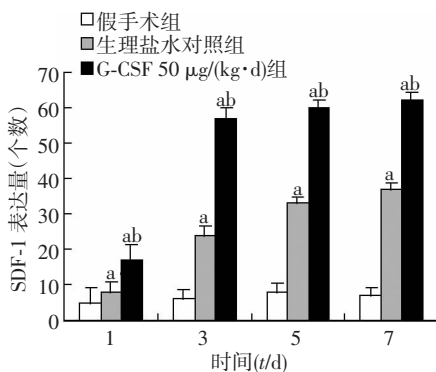
A:假手术组;B:生理盐水对照组;C: G-CSF 50 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 3 d 组 \uparrow :CD31 阳性表达的细胞
图4 G-CSF 作用后 MCAO 大鼠脑梗死区脑组织 CD31 表达变化 (免疫荧光 $\times 400$)



A:假手术组;B:生理盐水对照组;C: G-CSF 50 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 3 d 组 \uparrow :CD133 阳性表达的细胞
图5 G-CSF 作用后 MCAO 大鼠脑梗死区脑组织 CD133 表达变化 (免疫荧光 $\times 400$)



A:假手术组;B:生理盐水对照组;C:G-CSF 50 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 3 d 组;“—”以左:梗死区域; \uparrow :SDF-1 阳性表达细胞
图6 大鼠脑组织缺血边缘带 SDF-1 的表达 (免疫组织化学 $\times 400$)



a: $P < 0.05$, 与假手术组比较; b: $P < 0.05$, 与生理盐水对照组比较

图7 各组大鼠不同时间点 SDF-1 水平变化

3 讨论

骨髓、血液中干细胞因其来源于自体,具有很强的自我增殖能力、扩增迅速并有多潜能分化、无免疫源性 & 良好的组织融合性并且有明确的动员效应受到广泛关注。骨髓衍生的干细胞在各种组织损伤后能够相应的分化成脑、肝、肾、肺、心等组织^[12]。骨髓干细胞包含多种干细胞,如造血干细胞、血管内皮祖细胞、骨髓间质干细胞、多潜能成体祖细胞等^[13]。目前关于急性脑梗死后骨髓干细胞的动员及其修复受损组织的机制研究报道尚少。

G-CSF 是动员骨髓造血干细胞的黄金标准药物,是一种相对分子质量约 19.6×10^3 的蛋白。G-CSF 作用时,骨髓中聚集活化的中性蛋白酶,下调血管细胞黏附分子及干细胞因子受体;并切割骨髓祖细胞表面 CXCR4 的 N 末端,促使骨髓干细胞释放迁移至外周^[14]。我们建立脑缺血动物模型后给大鼠注射 G-CSF,连续给药 1、3、5、7 d,结果显示 G-CSF 治疗组大鼠的神经学行为优于对照组,提示 G-CSF 对急性脑梗死后神经修复有良好作用,但是 G-CSF 的作用机制并不清楚。通过检测大鼠脑梗死后 1、3、5、7 d 时外周血中单个核细胞数量变化,我们发现 G-CSF 作用后单个核细胞数量明显增高,其作用以 G-CSF $10 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 作用 5 d 或 $50 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 作用 3 d 最为明显,较对照组数量增加了约 35 倍。对照组外周血单个核细胞 CXCR4/CD31 mRNA 表达极低,经 G-CSF 动员后,其表达不同程度增高,CD31 mRNA 的表达增强尤其明显。G-CSF 作用在低剂量 [$2、10 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$] 时随着用药时间的延长而增强;高浓度组 $250 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 在短时间内(1、3 d)作用时 CXCR4/CD31 mRNA 增强最强;随着用药时间的延长(5、7 d),作用有所减弱。通过免疫荧光法检测梗死区脑组织 CD31、CD133 表达,我们发现生理盐水对照组大鼠脑组织中 CD31 阳性细胞主要位于血管壁,血管腔内阳性细胞较少,CD133 几乎不表达,而 G-CSF 治疗组大鼠的阳性细胞(CD31、CD133)表达明显强于对照组,主要位于侧脑室及血管腔内和腔周,阳性细胞及表达强度明显增加。这与 RT-PCR 法测定的骨髓干细胞被动员后释放到外周血的单个核细胞含量水平的结果相符合。提示 G-CSF 作用后对血管再生的作用较强。

SDF-1 对表达 CXCR4 的骨髓干细胞有极强的吸引作用^[15]。本研究发现,实验组缺血脑组织 SDF-1 阳性细胞的表达水平增高,且 G-CSF 治疗组显著高于生理盐水对照组。缺血区正调节表达 SDF-1,从而打破骨髓、血浆和缺血区 SDF-1 原有的浓度梯度平衡,利于骨髓干细胞动员到外周并迁移至脑缺血区,实现损伤修复。

本研究显示,动员骨髓干细胞和上调梗死边缘区 SDF-1 的表达可能与脑梗死后 G-CSF 对缺血脑组织的损伤修复作用有关。G-CSF 动员骨髓干细胞到外周循环,外周血单个核细胞数量增加,经 SDF1-CXCR4 生物轴趋化作用移至脑梗死周边区促进脑组织的修复。但如何更有效动员骨髓干细胞及动员后的功能修复机制还需要进一步研究。

参考文献:

- [1] Vose J M, Ho A D, Coiffier B, *et al.* Advances in mobilization for the optimization of autologous stem cell transplantation[J]. *Leuk Lymphoma*, 2009, 50(9): 1412–1421.
- [2] Blum A, Childs R W, Smith A, *et al.* Targeted antagonism of CXCR4 mobilizes progenitor cells under investigation for cardiovascular disease [J]. *Cytotherapy*, 2009, 11(8): 1016–1019.
- [3] Paczkowska E, Dabkowska E, Nowacki P, *et al.* Stem cell-based therapy in central nervous system diseases [J]. *Neurol Neurochir Pol*, 2009, 43(6): 550–558.
- [4] Stumm R K, Rummel J, Junker V, *et al.* A dual role for the SDF-1/CXCR4 chemokine receptor system in adult brain: isoform-selective regulation of SDF-1 expression modulates CXCR4-dependent neuronal plasticity and cerebral leukocyte recruitment after focal ischemia[J]. *J Neurosci*, 2002, 22(14): 5865–5878.
- [5] Shyu W C, Lin S Z, Yang H I, *et al.* Functional recovery of stroke rats induced by granulocyte colony-stimulating factor-stimulated stem cells [J]. *Circulation*, 2004, 110(13): 1847–1854.
- [6] Shi Q, Hodara V, Butler S D, *et al.* Differential bone marrow stem cell mobilization by G-CSF injection or arterial ligation in baboons[J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(8B): 1896–1906.
- [7] 陈立云, Chen A F, 王拥军, 等. 内皮祖细胞与卒中[J]. *中国卒中杂志*, 2009, 4(2): 159–162.
- [8] Ward N L, Lamanna J C. The neurovascular unit and its growth factors: coordinated response in the vascular and nervous systems [J]. *Neurol Res*, 2004, 26(8): 870–883.
- [9] 赵洪雯, 余荣杰, 彭侃夫, 等. VEGF165 基因转染 EPCs 移植对大鼠阿霉素肾病组织学的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2008, 30(2): 93–97.
- [10] Thored P, Wood J, Arvidsson A, *et al.* Long-term neuroblast migration along blood vessels in an area with transient angiogenesis and increased vascularization after stroke [J]. *Stroke*, 2007, 38(11): 3032–3039.
- [11] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84–91.
- [12] Verfaillie C M, Schwartz R, Reyes M, *et al.* Unexpected potential of adult stem cells [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2003, 996: 231–234.
- [13] Kucia M, Ratajczak J, Ratajczak M Z. Bone marrow as a source of circulating CXCR4⁺ tissue-committed stem cells [J]. *Biol Cell*, 2005, 97(2): 133–146.
- [14] Christopherson K W 2nd, Cooper S, Broxmeyer H E. Cell surface peptidase CD26/DPPIV mediates G-CSF mobilization of mouse progenitor cells [J]. *Blood*, 2003, 101(12): 4680–4686.
- [15] Gieryng A, Bogunia-Kubik K. The role of the SDF-1-CXCR4 axis in hematopoiesis and the mobilization of hematopoietic stem cells to peripheral blood [J]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2007, 61: 369–383.

(收稿:2011-11-14;修回:2012-02-05)

(编辑 王小寒)