

[文章编号] 1007-7669 (2020) 11-0693-05

[DOI 号] 10.14109/j.cnki.xyylc.2020.11.13

吡拉格雷联合骨髓间充质干细胞移植修复大鼠脑缺血再灌注损伤

张 沛^a, 卢宝全^a, 杨 洁^b

(唐山市工人医院 a. 神经内三科, b. 老年病一科, 河北 唐山 063000)

[关键词] 缺氧缺血, 脑; 再灌注损伤; 间质干细胞移植; 吡拉格雷

[摘要] 目的 比较单用骨髓间充质干细胞移植或联用吡拉格雷治疗大鼠脑缺血再灌注损伤的效果。方法 将 60 只 SD 大鼠随机分为假手术组、脑损伤组、干细胞干预组与联合干预组, 每组 15 只, 除假手术组外, 其余 3 组均采用线栓法建立脑缺血再灌注损伤模型, 90 min 后拔除线栓进行再灌注。造模后 24 h, 干细胞干预组与联合干预组脑室内注射骨髓间充质干细胞悬液 5 μ L (细胞数量 2×10^6), 假手术组与脑损伤组脑室内注射生理盐水 5 μ L; 联合干预组尾静脉注射吡拉格雷 ($45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 其余 3 组尾静脉注射生理盐水, 连续给药 6 d。末次给药 24 h 后, 评估大鼠神经学评分 (神经功能缺陷评分与姿势反射评分), TTC 染色分析脑梗死体积, 尼氏染色观察海马神经元结构, 检测脑组织内氧化应激与炎症反应情况。结果 与假手术组比较, 脑损伤组神经学评分显著升高 ($P < 0.05$), 脑梗死体积比增加 ($P < 0.05$), 脑组织超氧化物歧化酶 (SOD) 活性降低 ($P < 0.05$), 丙二醛 (MDA) 含量、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和白细胞介素 (IL)-1 β 水平增加 ($P < 0.05$)。与脑损伤组相比, 干细胞干预组和联合干预组神经学评分降低 ($P < 0.05$), 脑梗死体积比减小 ($P < 0.05$), SOD 活性升高, MDA 含量、TNF- α 和 IL-1 β 水平降低 ($P < 0.05$), 联合干预组各指标改变比干细胞干预组更为显著 ($P < 0.05$)。结论 吡拉格雷联合骨髓间充质干细胞移植可促进大鼠脑缺血再灌注损伤的修复, 且效果优于单用骨髓间充质干细胞移植。

[中图分类号] R971**[文献标志码]** A

Pyragrel combined with bone marrow mesenchymal stem cells transplantation to repair cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

ZHANG Pei^a, LU Bao-quan^a, YANG Jie^b

(a. Three Departments of Neurology, b. One Department of Geriatrics, Tangshan Workers Hospital, Tangshan HEBEI 063000, China)

[KEY WORDS] hypoxia-ischemia, brain; reperfusion injury; mesenchymal stem cell transplantation; pyragrel

[ABSTRACT] AIM To compare the effects of bone marrow mesenchymal stem cells transplantation alone or combined with pyragrel on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. METHODS Sixty SD rats were randomly divided into sham group, brain injury group, stem cell intervention group and combined intervention group, 15 rats in each group. In addition to the sham group, the cerebral ischemia-reperfusion injury model were established by the thread thrombus method in the other three groups, and the thread thrombus was removed 90 minutes later for reperfusion. Twenty-four hours after the model was established, 5 μ L of bone marrow mesenchymal stem cell suspension (cell numbers 2×10^6) was injected into the brain

[收稿日期] 2019-12-02**[接受日期]** 2020-06-16**[基金项目]** 河北省科技计划项目 (14277791D)**[作者简介]** 张 沛, 女, 主治医师, 硕士, 主要从事脑血管病的研究, E-mail: bens211@126.com**[责任作者]** 卢宝全, E-mail: vital2010@126.com

chamber of the stem cell intervention group and the combined intervention group, and 5 μL of normal saline was injected into the brain chamber of the sham group and the brain injury group. Pyragrel was injected into the tail vein of the combined intervention group, and normal saline was injected of the other three groups for 6 days. Twenty-four hours after the last administration, the neurological deficit score and postural reflex score of rats were evaluated, the volume of cerebral infarction was analyzed by TTC staining, the structure of hippocampal neurons was observed by Nissl staining, and the oxidative stress and inflammatory reaction in brain tissue were detected. RESULTS Compared with the sham operation group, the neurological score was significantly higher in the brain injury group ($P < 0.05$), the ratio of cerebral infarction volume was increased ($P < 0.05$), the activity of superoxide dismutase (SOD) was decreased ($P < 0.05$), the malondialdehyde (MDA) content was increased ($P < 0.05$), and the concentrations of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin (IL)-1 β were increased ($P < 0.05$). Compared with the brain injury group, the neurological scores of the stem cell intervention group and the combined intervention group were significantly reduced ($P < 0.05$), the ratio of cerebral infarction volume was decreased ($P < 0.05$), SOD activity was increased ($P < 0.05$), MDA content and the concentration of TNF- α and IL-1 β were significantly decreased ($P < 0.05$). And the changes of various indexes in the combined intervention group were more significant than those in the stem cell intervention group ($P < 0.05$). CONCLUSION Pyragrel combined with bone marrow mesenchymal stem cells transplantation can promote the repair of cerebral ischemia-reperfusion injury in rats, and the effects is better than bone marrow mesenchymal stem cells transplantation alone.

目前急性脑梗死早期治疗主要以溶栓及血管内治疗为主,但少部分患者经该治疗后出现脑缺血再灌注损伤,可能引起脑出血影响患者预后。动物实验已证实,骨髓间充质干细胞移植可显著促进脑缺血再灌注损伤后神经组织结构与功能的恢复^[1,2]。吡拉格雷 (pyragrel) 是一种新型的化合物,其结构基本骨架为中药活性成分川芎嗪和阿魏酸,对大鼠脑缺血再灌注损伤和神经功能有改善作用^[3]。预实验中分别使用吡拉格雷与骨髓间充质干细胞移植治疗大鼠脑缺血再灌注损伤,结果显示两者单独应用均可降低脑缺血再灌注损伤大鼠的脑梗死体积,抑制脑组织内氧化应激与炎症反应,减轻海马神经元结构损害,发挥脑保护作用,且两者的治疗效果相当。本研究设计吡拉格雷联合骨髓间充质干细胞移植治疗脑缺血再灌注损伤,观察两者联用可否进一步改善缺血再灌注损伤程度。

材料与方 法

实验动物 健康雄性 SD 大鼠,8 周龄,SPF 级,体重 (230 ± 19) g,用于制备脑损伤模型;健康雄性 SD 大鼠,4 周龄,SPF 级,体重 (96 ± 12) g,用于提取骨髓间充质干细胞。所有动物饲养环境温度 (23 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 50%~60%,自由饮食。严格按照实验动物伦理与福利对待与处理动物。

药品、试剂和仪器 吡拉格雷 (纯度 99.3%,批号: 20170616) 购自合肥医工医药有限公司。水合氯醛购自宝鸡市国康生物科技有限公司,低糖 DMEM 培养液购自北京华夏远洋科技有限公司,CD44-FITC、CD90-

FITC、CD29-PE 和 CD45-PE 抗体购自上海瑞齐生物技术有限公司,成脂诱导分化培养基、成骨诱导分化培养基购自广州沛瑜生物制品有限公司,肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 与白细胞介素-1 β (IL-1 β) 检测试剂盒购自南京卡米洛生物工程有限公司。流式细胞仪 (BD FACS Calibur) 购自昆山市赛特科学仪器有限公司。

骨髓间充质干细胞的分离培养与鉴定^[4] 取 4 周龄 SD 大鼠 3 只,给予 10% 水合氯醛 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 麻醉后脱臼处死,75% 乙醇消毒,取大鼠胫骨与股骨,去除两端关节与周围肌肉及其他组织后置于 Hanks 液中清洗;剪开一端髓腔,将 DMEM 培养液从另一端髓腔注入反复冲刷骨髓腔,当骨髓腔冲洗颜色发白后停止;将冲洗液吹打均匀后 200 目不锈钢网过滤,密度梯度离心法分离单个核细胞,加入低糖 DMEM 培养液 (含 10% 胎牛血清) 10 mL 轻轻吹打,调整细胞浓度为 $2 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$,接种于细胞培养瓶内,置于 37°C 含 5% CO_2 的培养箱内培养。观察细胞融合达到 85% 时进行传代培养。选择第 3 代细胞以培养液重悬,进行后续实验。

间充质干细胞表达间质细胞、内皮细胞与表皮细胞的表面标记物 (CD44、CD90 和 CD29 等),不表达造血细胞的表面标记物 (CD45);经成骨诱导后可形成钙结节,分化为成骨细胞;经成脂诱导后可形成脂滴,分化为脂肪细胞。间充质干细胞鉴定包括: (1) 表面标记物检测。胰酶消化第 3 代骨髓间充质干细胞,制成单细胞悬液后分装于 EP 管内,向管内分别加入 CD44-FITC、CD90-FITC、CD29-PE 和 CD45-PE 抗体,置于流式细胞仪中检测细胞表面标记物表达。 (2) 成

骨诱导分化。在第 3 代骨髓间充质干细胞中加入成骨诱导分化培养基诱导 3 周,茜素红染色观察钙化结节形成情况。(3)成脂诱导分化。在第 3 代骨髓间充质干细胞中加入成脂诱导分化培养基诱导 2 周,油红 O 染色观察脂滴形成情况。

分组与制模^[5] 取 60 只 8 周龄 SD 大鼠,简单随机抽样(抓阄法)分为 4 组,分别为假手术组、脑损伤组、干细胞干预组与联合干预组,每组 15 只。腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉大鼠,固定于手术台上,颈前区去毛并消毒,以颈部正中稍偏右侧切开皮肤,分离右侧颈总动脉、颈内动脉与颈外动脉。结扎右侧颈总动脉近心端与右侧颈外动脉近心端,利用动脉夹夹闭右侧颈内动脉,将线栓由右侧颈总动脉切口处插入,松开动脉夹,向右侧颈内动脉方向插入线栓 16 mm,将线栓以结扎线固定于右侧颈总动脉上,逐层缝合,90 min 后拔除线栓;假手术组仅暴露颈总动脉,不进行结扎。大鼠清醒后出现右侧 Horner 征和左侧以上肢为重的偏瘫判定造模成功,对于造模失败的动物予以剔除,并进行动物补充。

干细胞干预与给药 造模后 24 h,麻醉 4 组大鼠后固定在小型动物脑立体定位仪上,沿大鼠头皮矢状线剪开皮肤,暴露前囟,设置进针点为前囟后约 1.2 mm,前囟左侧约 1.4 mm,进针深度约为 3.5 mm,干细胞干预组与联合干预组每只大鼠注射第 3 代骨髓间充质干细胞悬液 5 μL ,约含细胞数量 2×10^6 个,假手术组、脑损伤组每只大鼠注射生理盐水 5 μL ^[6]。干细胞移植后,联合干预组立即尾静脉注射吡拉格雷 $45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($4.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),其余 3 组尾静脉注射 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的生理盐水,每日 1 次,连续注射 6 d,注射间隔时间为 24 h。

观察指标

1 神经评分^[3] 末次给药 24 h 后进行神经功能缺陷评分与姿势反射评分。神经功能缺陷评分:无神经缺陷为 0 分,左肢体不能完全伸展为 1 分,行走时向右侧转圈为 2 分,行走时向右侧倾倒为 3 分,不能自发行走为 4 分,死亡为 5 分。姿势反射评分:两前肢完

全伸展为 0 分;左前肢贴在胸部,右前肢伸展,轻度异常为 1 分;左前肢贴在胸前,上半身卷曲,严重异常为 2 分。

2 脑梗死体积比 完成神经评分后,每组随机选取 5 只大鼠麻醉后处死,取大脑,去除脑膜、小脑与脑干等,PBS 清洗,置于 -20°C 冰箱中 10 min 后取出,制备 2 mm 厚度冠状位脑片,置于 37°C TTC 染液中 20 min,计算各组脑梗死体积比(%)。

3 海马神经元形态学 完成神经评分后,每组随机选取 5 只大鼠麻醉后处死,取大脑,沿丘脑中 1/3 平面冠状面取脑组织制作石蜡切片,切片厚度约 $5 \mu\text{m}$,脱蜡至水,置于甲苯胺蓝染液中 5 min,水洗、冰醋酸分化,置于二甲苯中透明后晾干,中性树脂封固后显微镜下观察。

4 脑组织氧化应激与炎性反应 完成神经评分后,每组随机选取 5 只大鼠麻醉后处死,取大脑。于冰上切取病变脑组织约 20 mg,放入匀浆器内,加入预冷的生理盐水后 $1\,500 \times g$ 离心 15 min,吸取上清液,采用黄嘌呤氧化酶法检测超氧化物歧化酶(SOD)活性,硫代巴比妥酸法检测丙二醛(MDA)浓度。取部分脑组织,去除小脑、脑干、脉络丛级脑膜等,切碎皮质,加入一定量的 PBS 制备匀浆液, $1\,000 \times g$ 离心 15 min,吸取上清液,采用 ELISA 法检测 TNF- α 与 IL-1 β 浓度。严格依照试剂盒说明书操作。

统计学方法 利用 SPSS 20.0 软件处理数据,计量资料以均数 $\pm$ 标准差的形式表达,采用方差分析进行组间比较,对于方差齐性的检验进行 LSD 分析,方差不齐进行 Dunnett's T3 分析, $P < 0.05$ 为有显著差异。

结 果

骨髓间充质干细胞的培养及鉴定 培养 72 h 后可见少量的细胞贴壁,细胞形态不规则;接种 7 d 后细胞呈旋涡状生长,形态呈短梭形;此后细胞迅速生长,形态多呈长梭形,第 3 代细胞呈长梭形贴壁生长。流式细胞仪检测显示,细胞高表达 CD44、CD90 和 CD29 表面标记物,低表达 CD45 表面标记物,符合间充质干细胞表面标记物表达特征。见图 1。

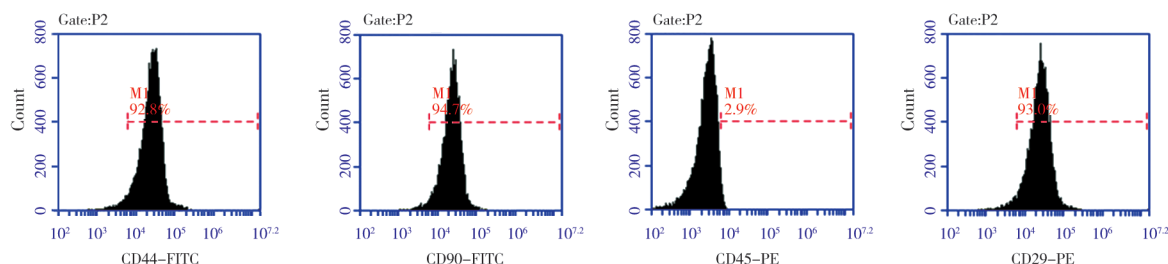


图 1 骨髓间充质干细胞表面标记物鉴定

茜素红染色显示成骨诱导分化 3 周后可见钙化结节; 油红 O 染色显示成脂诱导分化 2 周后可见脂滴形成。见图 2。

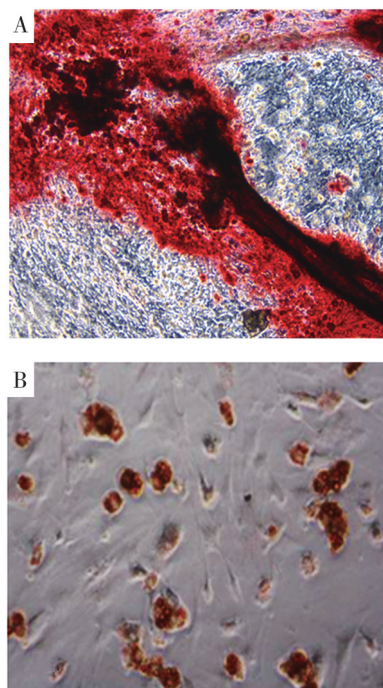


图 2 骨髓间充质干细胞的诱导分化 ($\times 100$) A: 成骨诱导分化 (茜素红染色), B: 成脂诱导分化 (油红 O 染色)

神经评分 与假手术组比较, 脑损伤组神经功能缺陷评分与姿势反射评分升高 ($P < 0.05$); 与脑损伤组比较, 干细胞干预组和联合干预组的神经功能缺陷评分与姿势反射评分均降低 ($P < 0.05$), 且联合干预组的降低趋势更显著 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠神经评分比较 $n = 15$

组别	神经功能缺陷评分	姿势反射评分
假手术	0	0
脑损伤	2.8 ± 0.2^b	2.0 ± 0.0^b
干细胞干预	2.0 ± 0.1^a	1.7 ± 0.0^a
联合干预	1.4 ± 0.0^{ab}	1.0 ± 0.0^{ab}

经单因素方差分析: 与假手术组比较, $^bP < 0.05$; 与脑损伤组比较, $^aP < 0.05$; 与干细胞干预组比较, $^bP < 0.05$

脑梗死体积比 脑损伤组、干细胞干预组和联合干预组脑梗死体积比分别为 $(39.1 \pm 3.1)\%$ 、 $(24.2 \pm 2.5)\%$

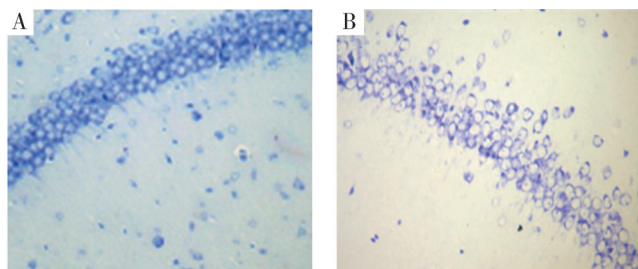


图 4 各组大鼠脑海马区神经元结构 (尼氏染色, $\times 400$)

和 $(16.3 \pm 2.2)\%$, 干细胞干预组和联合干预组小于脑损伤组 ($P < 0.05$), 联合干预组小于干细胞干预组 ($P < 0.05$)。见图 3。

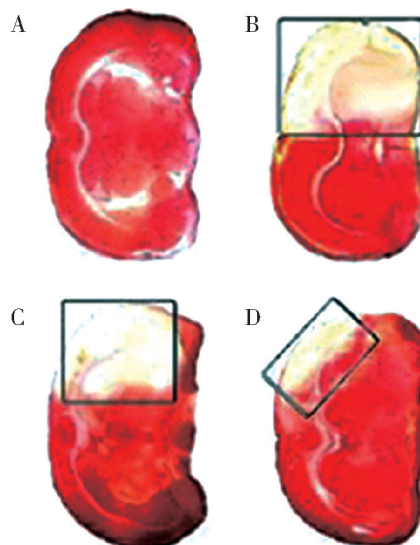


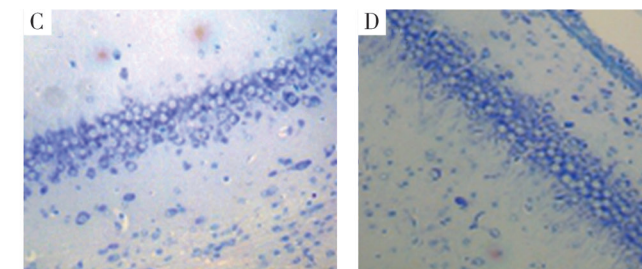
图 3 各组大鼠脑梗死典型图片 A: 假手术组, B: 脑损伤组, C: 干细胞干预组, D: 联合干预组

海马神经元形态学 假手术组海马区神经元结构清晰且完整, 排列规则、紧密, 可见丰富的尼氏小体。脑损伤组海马区神经元排列紊乱, 结构模糊不清, 彼此间隙较大, 尼氏小体较假手术组显著减少。干细胞干预组海马神经元排列较脑损伤组规则, 结构较清晰, 尼氏小体增加。联合干预组海马神经元排列规则整齐, 结构完整, 尼氏体丰富, 接近假手术组表现。见图 4。

氧化应激与炎症反应 与假手术组相比, 脑损伤组 SOD 活性降低 ($P < 0.05$), MDA 含量、TNF- α 和 IL-1 β 水平升高 ($P < 0.05$)。与脑损伤组相比, 干细胞干预组、联合干预组 SOD 活性升高 ($P < 0.05$), MDA 含量、TNF- α 和 IL-1 β 水平降低 ($P < 0.05$), 且联合干预组改变更明显 ($P < 0.05$)。见表 2。

讨 论

研究已证实骨髓间充质干细胞移植在治疗脑缺血



A: 假手术组, B: 脑损伤组, C: 干细胞干预组, D: 联合干预组

表 2 各组氧化应激和炎症反应指标比较

n = 15

组别	超氧化物歧化酶 /U · mg ⁻¹	丙二醛 /μmol · g ⁻¹	肿瘤坏死因子 -α /μg · L ⁻¹	白细胞介素 -1β /μg · L ⁻¹
假手术	188.65 ± 10.23	2.09 ± 0.25	3.18 ± 0.36	10.28 ± 4.33
脑损伤	52.13 ± 5.67 ^b	7.66 ± 1.24 ^b	8.97 ± 1.21 ^b	42.75 ± 12.29 ^b
干细胞干预	129.36 ± 11.45 ^c	5.19 ± 1.07 ^c	6.11 ± 1.76 ^c	29.69 ± 8.76 ^c
联合干预	173.09 ± 15.61 ^{ch}	3.79 ± 0.98 ^{ch}	4.27 ± 0.67 ^{ch}	17.13 ± 6.99 ^{ch}

经单因素方差分析: 与假手术组比较, ^bP < 0.05; 与脑损伤组比较, ^cP < 0.05; 与干细胞干预组比较, ^hP < 0.05

再灌注损伤中发挥着重要作用^[7], 在脑损伤修复中具有巨大的应用前景, 其主要机制为: 移植的骨髓间充质干细胞在脑组织内存活并分化为神经元细胞与神经胶质细胞, 替代损伤坏死或凋亡的细胞, 进而改善动物的神经功能^[8,9]; 移植的骨髓间充质干细胞分泌神经营养因子, 改善神经细胞的营养与代谢, 促进动物的神经功能恢复^[10]; 通过某些机制激活动物体内内源性神经干细胞, 为神经细胞与神经胶质细胞的再生提供基础, 促进神经功能的恢复; 在脑组织损伤微环境下分泌营养因子, 抑制神经细胞的凋亡, 促进脑组织内血管内皮生长细胞与前体细胞的增生。本实验结果显示, 骨髓间充质干细胞移植可降低脑缺血再灌注损伤大鼠的神经功能缺陷评分与姿势反射评分, 减少脑梗死体积, 改善脑组织海马神经元损伤与脑组织氧化应激反应、炎症反应, 从而发挥神经保护作用, 获得了与以往研究^[11,12]一致的结论。

研究发现, 吡拉格雷的基本骨架川芎嗪和阿魏酸均可抗脑缺血再灌注损伤, 具有神经保护作用^[13,14]。孙翔等^[3]将不同剂量的吡拉格雷 (20、30、45 mg · kg⁻¹) 应用于大鼠脑缺血再灌注损伤模型中, 发现吡拉格雷呈剂量依赖性改善大鼠神经学评分、脑梗死体积与脑损伤, 因此本研究选择了 45 mg · kg⁻¹ 作为吡拉格雷的干预剂量。本研究发现, 在骨髓间充质干细胞移植治疗的基础上, 吡拉格雷能进一步降低脑缺血再灌注损伤大鼠的神经功能缺陷评分与姿势反射评分, 减少脑梗死体积, 改善脑组织海马神经元损伤与脑组织氧化应激反应、炎症反应, 提示吡拉格雷联合骨髓间充质干细胞移植可促进大鼠脑缺血再灌注损伤的修复。

综上, 吡拉格雷联合骨髓间充质干细胞移植可促进大鼠脑缺血再灌注损伤的修复, 但本实验观察周期较短, 其长期效果还有待进一步的观察。

[参考文献]

- [1] WEI W, WU D, DUAN Y, *et al.* Neuroprotection by mesenchymal stem cell (MSC) administration is enhanced by local cooling infusion (LCI) in ischemia [J]. Brain Res, 2019, 1724: 146406.
- [2] VAHIDINIA Z, AZAMI TAMEH A, NEJATI M, *et al.* The

protective effect of bone marrow mesenchymal stem cells in a rat model of ischemic stroke via reducing the C-Jun N-terminal kinase expression [J]. Pathol Res Pract, 2019, 215 (9) : 152519.

- [3] 孙 翔, 李庆林. 吡拉格雷钠对脑缺血再灌注损伤模型大鼠神经功能的改善作用及机制研究 [J]. 中国药房, 2019, 30 (7) : 889-895.
- [4] 李德芳, 江增鑫, 曾庆敏, 等. 猪髓核基质成分诱导骨髓间充质干细胞分化为脊索样细胞 [J]. 中国组织工程研究, 2019, 23 (33) : 5366-5371.
- [5] 徐珊珊, 王文杰, 章玲玲, 等. 牛蒡苷元对脑缺血再灌注大鼠的保护作用 [J]. 中国现代应用药学, 2020, 37 (15) : 1830-1834.
- [6] 郝 磊, 刘 磊, 董岸莺, 等. 大鼠缺血再灌注损伤脑内骨髓间充质干细胞移植抑制 TNF-α 表达的上调促进 TGFβ1 表达的上调 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2017, 26 (4) : 327-335.
- [7] 卞合涛, 郝 楼, 黄 卫. NT-3 基因修饰骨髓间充质干细胞移植治疗脑梗死及其机制研究 [J]. 中华神经医学杂志, 2017, 16 (9) : 906-910.
- [8] 姚 奕. BMSCs-GFP 移植治疗小鼠创伤性脑损伤的研究 [D]. 蚌埠: 蚌埠医学院, 2016.
- [9] 李加美, 朱 华, 姚志刚, 等. hBMSCs 幼年食蟹猴脑内移植的安全评价、迁移及分布 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26 (9) : 7-12.
- [10] 李晓波, 邹海强, 赵春松, 等. 脑梗死大鼠早期静脉移植 BMSCs 可诱导皮层梗死区表达 BDNF 的 Iba-1⁺ 小胶质细胞显著增加 [J]. 中华神经医学杂志, 2019, 18 (5) : 433-441.
- [11] BAO C, WANG Y, MIN H, *et al.* Combination of ginsenoside Rg1 and bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in the treatment of cerebral ischemia reperfusion injury in rats [J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 37 (3) : 901-910.
- [12] ABOUTALEB N, FAEZI M, NASSERI MALEKI S, *et al.* Conditioned medium obtained from mesenchymal stem cells attenuates focal cerebral ischemia reperfusion injury through activation of ERK1/ERK2-BDNF signaling pathway [J]. J Chem Neuroanat, 2019, 97: 87-98.
- [13] 高长越, 周华东, 邓 娟, 等. 川芎嗪对脑缺血 - 再灌注损伤后细胞间黏附作用的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2002, 9 (3) : 135-136.
- [14] 满玉红, 李立森, 于挺敏. 阿魏酸钠对反复前脑缺血再灌注大鼠海马及额叶胶质纤维酸性蛋白表达的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2010, 30 (2) : 192-193.

(编辑: 王 茜)