

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2014.09.013

论著·实验研究

## 人脐带间充质干细胞移植对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤的保护作用

张德双<sup>1,2</sup> 白小红<sup>1</sup> 陈大鹏<sup>1</sup> 母得志<sup>1</sup> 陈娟<sup>1</sup>

(1. 四川大学华西第二医院新生儿科, 四川 成都 610041;  
2. 泸州医学院附属医院新生儿科, 四川 泸州 646000)

**[摘要]** **目的** 探讨人脐带间充质干细胞(hUC-MSCs)对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤(HIBD)的保护作用及可能机制。**方法** 10日龄Sprague-Dawley大鼠随机分为假手术组、HIBD组和MSCs组,建立新生大鼠HIBD模型,建模后24h MSCs组侧脑室注入hUC-MSCs。移植后24、48h应用TUNEL及Western blot分别检测细胞凋亡及Caspase-3的表达;移植后1、2、3周应用Longa评分评价大鼠的神经行为,免疫荧光观察hUC-MSCs的存活、分化情况。**结果** 移植后24、48h, MSCs组大鼠的细胞凋亡及Caspase-3的表达较HIBD组减少( $P<0.05$ );移植后2、3周, MSCs组Longa评分低于HIBD组( $P<0.05$ );移植后脑组织中可见BrdU阳性细胞;MSCs组胶质纤维酸性蛋白(GFAP)及神经元特异烯醇化酶(NSE)阳性表达高于HIBD组及假手术组( $P<0.05$ ),随时间延长其表达逐渐增强( $P<0.05$ )。**结论** hUC-MSCs移植治疗新生大鼠HIBD时,早期可抑制Caspase-3的表达,减少细胞凋亡;后期存活的hUC-MSCs可分化为神经样细胞,并促进内源性神经样细胞的分化,发挥脑保护作用。  
**[中国当代儿科杂志, 2014, 16(9): 927-932]**

**[关键词]** 人脐带间充质干细胞;移植;缺氧缺血性脑损伤;凋亡;新生大鼠

## Intracerebral transplantation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain damage: protective effect to injured brain

ZHANG De-Shuang, BAI Xiao-Hong, CHEN Da-Peng, MU De-Zhi, CHEN Juan. Department of Neonatology, West China Second University Hospital, Chengdu 610041, China (Chen J, Email: chenjuan2000@163.com)

**Abstract: Objective** To study the brain protection and the possible mechanism of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (hUC-MSCs) in neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain damage (HIBD). **Methods** Successfully establishing a neonatal rat model of HIBD, hUC-MSCs labeled with BrdU were transplanted into the lateral ventricle 24 hours after HIBD. The number of apoptotic cells and the expression of Caspase-3 were detected by TUNEL and Western blot respectively at 24 and 48 hours after transplantation. The neurological functions of HIBD rats were evaluated by Longa score, and the survival, differentiation and pro-differentiation effects of hUC-MSCs were identified by immunofluorescence at 1 to 3 weeks after transplantation. **Results** At 24 and 48 hours after transplantation, apoptotic cells and Caspase-3 expression in the MSCs group were less than in the HIBD group ( $P<0.05$ ). At 2 and 3 weeks after transplantation, the Longa score in the MSCs group was lower than in the HIBD group ( $P<0.05$ ). After transplantation, positive cells labeled with BrdU were seen in the brain tissue. The expression levels of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and neuron specific esterase (NSE) in the MSCs group were higher than in the HIBD and sham-operated control groups ( $P<0.05$ ), and increased gradually with the transplantation time ( $P<0.05$ ). **Conclusions** hUC-MSCs transplantation in HIBD rats can inhibit Caspase-3 expression and reduce apoptotic cells in the early stage, and in the later period, the survival hUC-MSCs can differentiate into neural-like cells and promote the differentiation of endogenous neural-like cells, providing protective effects to brain. **[Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(9): 927-932]**

**Key words:** Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell; Transplantation; Hypoxic-ischemic brain damage; Apoptosis; Neonatal rats

**[收稿日期]** 2013-11-24; **[接受日期]** 2014-04-09

**[作者简介]** 张德双,女,硕士,医师。

**[通信作者]** 陈娟,女,教授。

新生儿重度缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)为新生儿死亡及儿童致残的重要原因之一,目前仍无有效的根治性治疗措施。近10年来干细胞移植研究有了重大突破。其中,人脐带间充质干细胞(human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)是最新研究的热点之一。研究表明MSCs对大鼠缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)有保护作用,但其确切机制尚不清楚<sup>[1-2]</sup>。HIE发病机制复杂,其中,脑缺氧缺血所诱导的细胞凋亡是HIE病理改变及神经系统后遗症的重要原因<sup>[3]</sup>,而PI3K/Akt为经典的抗凋亡促存活信号通路<sup>[4]</sup>:神经营养因子激活酪氨酸激酶受体,通过一系列级联反应,最终抑制凋亡关键酶Caspase-3活化,从而阻断细胞凋亡。因此设想hUC-MSCs移植治疗新生大鼠HIBD可能主要通过释放神经营养因子,抑制Caspase-3活化进而减少细胞凋亡,发挥神经保护作用。本研究拟探讨hUC-MSCs通过Caspase-3对细胞凋亡的抑制调控、hUC-MSCs自分化及对内源性神经样细胞的促分化作用,从而揭示hUC-MSCs移植治疗新生大鼠HIBD的关键性机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

hUC-MSCs购自四川省干细胞库。其他材料包括5-溴脱氧嘧啶尿苷(BrdU, 中杉金桥), TUNEL原位细胞凋亡检测试剂盒(Roche), 小鼠抗人BrdU抗体(1:250, abcam), 兔抗大鼠GFAP抗体(1:1000, abcam), 兔抗大鼠NSE抗体(1:200, abcam), 山羊抗兔IgG/FITC(1:100, 中杉金桥), 山羊抗小鼠IgG/TRITC(1:100, 中杉金桥), 兔抗大鼠Caspase-3抗体(1:500, beyotime), 小鼠抗大鼠 $\beta$ -actin抗体(1:3000, 中杉金桥), 山羊抗兔IgG/辣根酶标记(1:3000, 中杉金桥), 山羊抗小鼠IgG/辣根酶标记(1:3000, 中杉金桥), DMI4000B倒置荧光显微镜, CM1900冰冻切片机, ULTRA·LUMTM凝胶成像系统等。

### 1.2 实验动物及分组

健康清洁级新生10日龄Sprague-Dawley(SD)大鼠182只,雌雄不限,平均出生体重 $16.6 \pm 2.8$  g,购自于成都达硕实验动物有限公司。

将SD大鼠随机分为假手术组(56只)、移植组(MSCs, 56只)及HIBD组(56只)。缺氧缺血后, MSCs组动物死亡6只, HIBD组动物死亡8只,随机补充大鼠14只,保证每组动物均为56只。将每组按5个时间点分为5个亚组,即移植后24、48 h及1、2、3周,其中,前2个时间点亚组动物数目为16只(8只用于TUNEL检测,8只用于Western blot检测),后3个时间点亚组动物数目为8只(均用于免疫荧光检测)。采用Rice法<sup>[5]</sup>制作HIBD模型:乙醚麻醉后常规消毒铺巾,颈部正中偏右作长约0.5 cm切口,分离并结扎右侧颈总动脉后缝合皮肤;1 h后置于92% N<sub>2</sub>和8% O<sub>2</sub>的缺氧舱中2.5 h,流量2 L/min。假手术组大鼠仅游离右侧颈总动脉,不作结扎及缺氧处理。

### 1.3 BrdU标记hUC-MSCs

细胞传代后,将BrdU以200  $\mu$ mol/L加入培养液中。48 h后,免疫荧光检测BrdU标记是否成功。将BrdU标记的hUC-MSCs用生理盐水制成浓度为 $4 \times 10^4/\mu$ L的单细胞混悬液备用。

### 1.4 侧脑室移植方法

MSCs组在HIBD建模后24 h,取hUC-MSCs悬液5  $\mu$ L注入动物右侧脑室内,注射部位为人字缝前3.0 mm,右1.8 mm,进针深度2.3 mm。注射时间5 min,注射后留针5 min。HIBD组及假手术组动物于同时间,以同部位、同方式注入等量生理盐水。

### 1.5 TUNEL检测移植后细胞的凋亡情况

于侧脑室移植24、48 h,将各组动物麻醉后断头取脑,包埋并置于-80℃冻存2 h以上,连续冠状切片后行TUNEL染色,观察凋亡情况。

### 1.6 Western blot检测移植后Caspase-3的表达

于侧脑室移植24、48 h后,将动物麻醉后断头取脑,Western blot检测Caspase-3的表达。凝胶成像分析软件测定Western blot所得条带的积分光密度值(IOD)。

### 1.7 神经行为学评价

于侧脑室移植后1、2、3周,运用Longa评分法<sup>[6]</sup>对各组大鼠进行神经行为学评价。其分值越高,表明其神经功能异常程度越重。

### 1.8 免疫荧光检测胶质纤维酸性蛋白、神经元特异烯醇化酶

于侧脑室移植后1、2、3周,将各组动物

麻醉后断头取脑，包埋并置于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冻存2 h以上，连续冠状切片后行BrdU及胶质纤维酸性蛋白(GFAP)或神经元特异烯醇化酶(NSE)双标染色，荧光显微镜下观察移植细胞的存活、迁徙、分化情况。每只动物随机选取10个视野运用Image-Pro plus软件计算GFAP、NSE的免疫荧光强度。

### 1.9 统计学分析

运用SPSS 17.0统计软件进行统计学分析，各组数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示，组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)， $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 BrdU标记hUC-MSCs的鉴定

BrdU标记hUC-MSCs，荧光显微镜下可见红色荧光(图1A)，而对照组为阴性(图1B)。

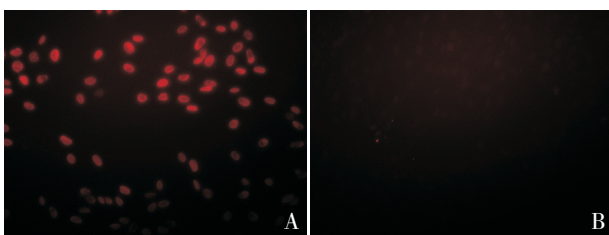


图1 免疫荧光鉴定BrdU标记的hUC-MSCs( $\times 200$ )  
A: BrdU标记的hUC-MSCs可见红色荧光; B: 阴性对照。

### 2.2 各组细胞的凋亡情况

移植后48 h进行凋亡检测，每组随机选取10个视野，细胞核呈绿色的为TUNEL阳性细胞，计算阳性细胞百分率作为凋亡指数。其中，假手术组细胞凋亡数较少，HIBD组的凋亡数最为明显，MSCs组较HIBD组明显减少。见表1。

### 2.3 各组Caspase-3的表达情况

移植后24、48 h，HIBD组的表达量最为明显，MSCs组较HIBD组减少，而较假手术组增高( $P<0.05$ )(图2)。

表1 移植后3组大鼠细胞凋亡指数比较( $\bar{x}\pm s$ , %)

| 组别    | n | 细胞凋亡指数              |                     |
|-------|---|---------------------|---------------------|
|       |   | 24 h                | 48 h                |
| 假手术组  | 8 | $1.9\pm 1.5$        | $1.8\pm 2.1$        |
| HIBD组 | 8 | $40.1\pm 3.1^a$     | $17.6\pm 3.2^a$     |
| MSCs组 | 8 | $35.3\pm 3.2^{a,b}$ | $13.3\pm 2.8^{a,b}$ |
| F值    |   | 471.1               | 72.4                |
| P值    |   | $<0.01$             | $<0.01$             |

注: a示与假手术组比较,  $P<0.01$ ; b示与HIBD组比较,  $P<0.01$ 。

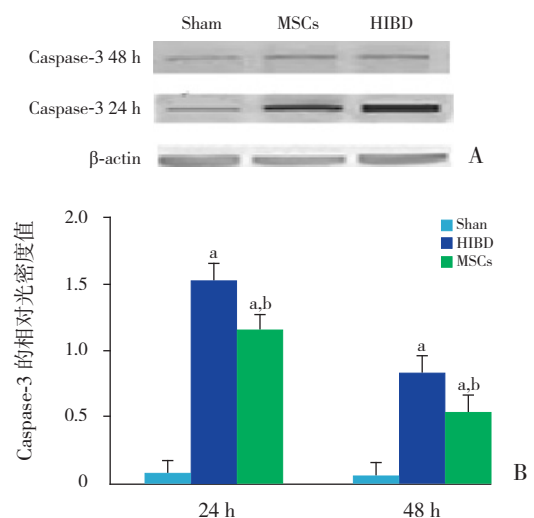


图2 Caspase-3的表达( $n=8$ ) 图A、B分别为Western blot检测和定量分析Caspase-3的表达。a示与假手术组比较,  $P<0.05$ ; b示与HIBD组比较,  $P<0.05$ (Sham: 假手术组; MSCs: MSCs组; HIBD: HIBD组)。

### 2.4 各组神经行为学评价

移植后，随日龄增加，MSCs组新生大鼠在精神状态、反应能力、运动功能等各方面较HIBD组逐渐改善。移植后2、3周，MSCs组Longa评分较HIBD组明显降低( $P<0.05$ )，见表2。

### 2.5 MSCs在脑组织内的存活、迁徙及分化情况

MSCs组在移植后1、2、3周，免疫荧光可见BrdU阳性细胞表达，主要分布于损伤侧海马区域及大脑皮质，部分hUC-MSCs胞浆内GFAP或NSE染色同时呈阳性反应(图3)，随时间延长，BrdU阳性细胞数量逐渐减少。MSCs组GFAP、NSE阳性表达明显高于HIBD组( $P<0.05$ )，且随时间延长其表达逐渐增强( $P<0.05$ )(图4~7)。

表 2 3 组大鼠不同时间点 Longa 评分比较 ( $\bar{x} \pm s$ , 分)

| 组别     | n | Longa 评分        |                     |                     |
|--------|---|-----------------|---------------------|---------------------|
|        |   | 1 周             | 2 周                 | 3 周                 |
| 假手术组   | 8 | 0               | 0                   | 0                   |
| HIBD 组 | 8 | $3.5 \pm 0.8^a$ | $3.4 \pm 0.5^a$     | $2.9 \pm 0.6^a$     |
| MSCs 组 | 8 | $3.1 \pm 0.6^a$ | $2.6 \pm 0.5^{a,b}$ | $1.8 \pm 0.5^{a,c}$ |
| F 值    |   | 90.2            | 140.7               | 80.6                |
| P 值    |   | <0.01           | <0.01               | <0.01               |

注: a 示与假手术组比较,  $P < 0.01$ ; b 示与 HIBD 组比较,  $P < 0.05$ ; c 示与 HIBD 组比较,  $P < 0.01$

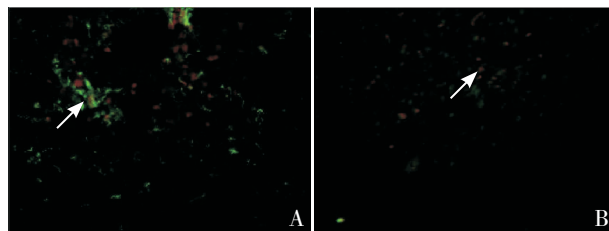


图 3 移植后 1 周 MSCs 组大鼠脑组织内的 hUC-MSCs 表达 (免疫荧光,  $\times 400$ ) A: BrdU 阳性细胞同时有 GFAP 阳性表达 (箭头所示); B: BrdU 阳性细胞同时有 NSE 阳性表达 (箭头所示)。

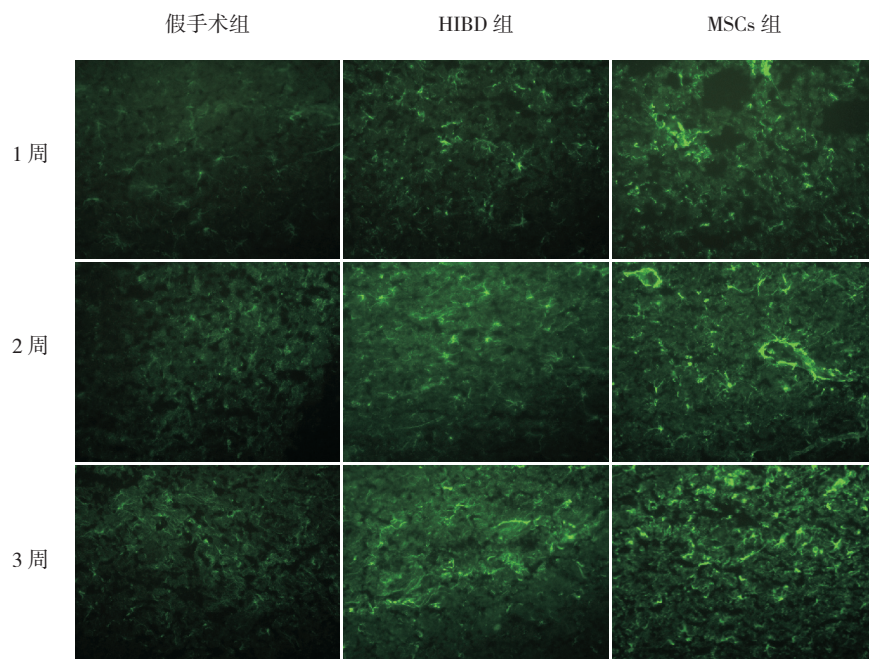


图 4 3 组大鼠 GFAP 的表达 (免疫荧光,  $\times 400$ ) MSCs 组 GFAP 阳性表达明显高于 HIBD 组, 且随着时间延长其表达逐渐增强。

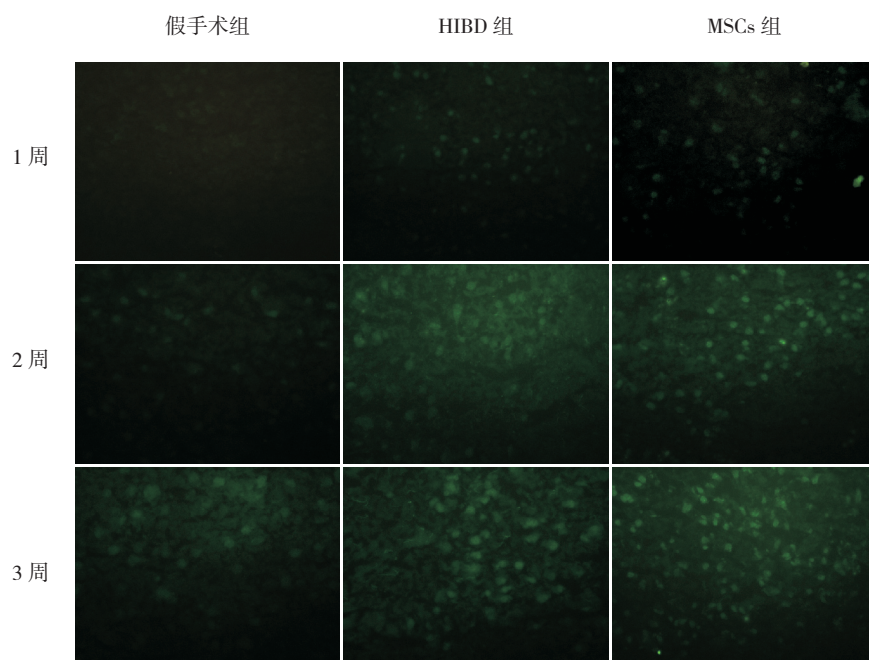


图 5 3 组大鼠 NSE 的表达 (免疫荧光,  $\times 400$ ) MSCs 组 NSE 阳性表达明显高于 HIBD 组, 且随着时间的延长其表达逐渐增强。

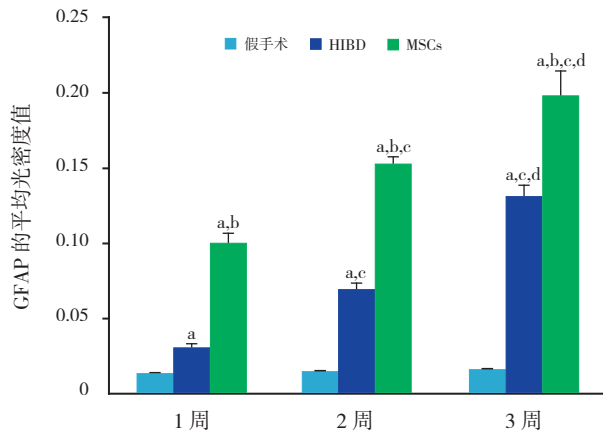


图6 定量分析 GFAP 的平均荧光强度 a 示与假手术组比较,  $P<0.05$ ; b 示与 HIBD 组比较,  $P<0.05$ ; c 示与同组 1 周时比较,  $P<0.05$ ; d 示与同组 2 周时比较,  $P<0.05$ 。

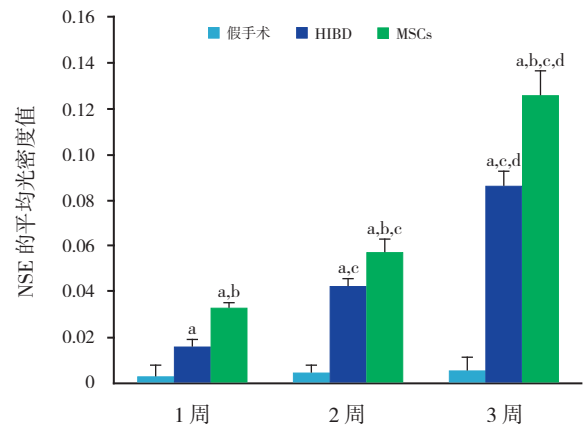


图7 定量分析 NSE 的平均荧光强度 a 示与假手术组比较,  $P<0.05$ ; b 示与 HIBD 组比较,  $P<0.05$ ; c 示与同组 1 周时比较,  $P<0.05$ ; d 示与同组 2 周时比较,  $P<0.05$ 。

### 3 讨论

HIE 是由一系列细胞因子及信号通路共同参与的复杂连锁反应的结果, 其中, 最关键的环节是迟发性细胞损伤所导致的细胞凋亡阶段<sup>[7]</sup>, 于缺氧缺血后 24~48 h 达高峰, 而 Caspase-3 为细胞凋亡级联反应中最关键的凋亡效应蛋白酶<sup>[8]</sup>。有研究表明, 神经营养因子可以激活酪氨酸激酶受体, 进而启动经典的抗凋亡促存活信号通路 PI3K/Akt, 最终通过抑制凋亡关键酶 Caspase-3 的活化, 阻断细胞凋亡<sup>[4]</sup>。另有文献报道, MSCs 可以通过释放神经营养因子减少细胞凋亡, 从而促进濒临死亡的自体神经元存活<sup>[9]</sup>, 发挥神经保护与修复作用。

本研究根据文献选择 HIBD 后 24 h 作为移植时间点, 将 5  $\mu$ L hUC-MSCs 悬液 ( $4 \times 10^4/\mu$ L) 经侧脑室移植, 对 HIBD 新生大鼠脑组织进行相关检测。由于 HIBD 后 24~48 h, 细胞凋亡达高峰, 因此, 本研究以侧脑室移植后 24 h 即 HIBD 后 48 h 作为初始检测时间点, 对细胞凋亡数量及 Caspase-3 的表达进行测定。结果表明: 侧脑室移植 48 h 后, MSCs 组的细胞凋亡数量以及 Caspase-3 的表达量低于 HIBD 组, 推测 hUC-MSCs 移植治疗新生大鼠 HIBD 时, 借助于多种神经营养因子的释放, 早期可通过抑制 Caspase-3 的表达, 减少细胞凋亡, 从而发挥神经保护作用。

新生大鼠 HIBD 的主要损伤部位为海马区域及大脑皮层。本研究将 BrdU 标记的 hUC-MSCs 移植入 HIBD 新生大鼠脑组织内, 观察到移植后 1、2、

3 周脑组织切片上均可见标记物 BrdU 阳性细胞表达, 其表达量随时间推移而逐渐减少。BrdU 阳性细胞主要分布于损伤侧海马区域及大脑皮质, 偶见于对侧脑组织, 部分移植细胞同时有 GFAP 或 NSE 的阳性表达。MSCs 组 GFAP 及 NSE 阳性表达明显高于 HIBD 组, 而且 MSCs 组移植后 1、2、3 周 GFAP 及 NSE 阳性表达逐渐增强。上述结果表明, 外源性植入 hUC-MSCs 可于脑组织内存活, 并可定向迁徙到受损的海马区域及大脑皮质, 可能与受损脑组织分泌的特异性细胞因子或化学趋化因子有关<sup>[10-11]</sup>。本研究还发现, 植入的 hUC-MSCs 可同时表达 GFAP 或 NSE, 表明植入细胞可向神经元及神经胶质细胞分化, 与国内外研究结果相一致<sup>[1,12]</sup>。有学者认为, hUC-MSCs 参与神经系统功能的恢复与植入细胞整合入宿主脑内重建神经与突触网, 发挥直接替代作用有关<sup>[13-14]</sup>。本研究尚没有足够证据表明 hUC-MSCs 可直接整合入宿主脑组织内参与神经环路的组建。本研究结果显示, 移植的 hUC-MSCs 的数量随移植后时间的延长逐渐减少, 而神经样细胞则逐渐增多, 推测 HIBD 新生大鼠神经功能的修复主要与除 hUC-MSCs 早期抑制 Caspase-3 的表达, 减少神经细胞凋亡有关外<sup>[15]</sup>, 更重要的是与 hUC-MSCs 的存活、迁徙、自身分化为神经样细胞以及后期 hUC-MSCs 促进内源性神经样细胞的分化均有关。本研究结果显示, BrdU 标记的阳性细胞越来越少, 可推测移植细胞的直接替代作用可能会较小<sup>[16]</sup>, 其具体机制尚有待于进一步的研究。

动物神经行为学的研究是对精神状态、运动中枢及神经功能的综合评估,可全面反映动物的整体状态。本研究发现 MSCs 组新生大鼠神经行为较 HIBD 组有所改善, MSCs 组 Longa 评分低于 HIBD 组,而且随时间的推移这种改善更加明显,说明 MSCs 随着移植时间的延长可有效促进 HIBD 大鼠神经功能的恢复,这与植入 MSCs 促进神经样细胞分化的时间基本吻合。由此可见, hUC-MSCs 移植治疗 HIBD 新生大鼠时,可通过早期抑制神经细胞凋亡,后期定向分化为神经样细胞并促进内源性神经样细胞的分化,修复损伤脑组织,从而有效改善 HIBD 新生大鼠的神经行为,为临床应用 hUC-MSCs 移植治疗新生儿 HIE 提供了一定的理论依据。

#### [参 考 文 献]

- [1] Xia G, Hong X, Chen X, et al. Intracerebral transplantation of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood alleviates hypoxic ischemic brain injury in rat neonates[J]. *J Perinat Med*, 2010, 38(2): 215-221.
- [2] Wei X, Du Z, Zhao L, et al. IFATS collection: The conditioned media of adipose stromal cells protect against hypoxia-ischemia-induced brain damage in neonatal rats[J]. *Stem Cells*, 2009, 27(2): 478-488.
- [3] Nakajima W, Ishida A, Lange MS, et al. Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat[J]. *J Neurosci*, 2000, 20(21): 7994-8004.
- [4] Zhao H, Sapolsky RM, Steinberg GK. Phosphoinositide-3-kinase/akt survival signal pathways are implicated in neuronal survival after stroke[J]. *Mol Neurobiol*, 2006, 34(3): 249-270.
- [5] Rice JE 3rd, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat[J]. *Ann Neurol*, 1981, 9(2): 131-141.
- [6] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [7] Nakka VP, Gusain A, Mehta SL, et al. Molecular mechanisms of apoptosis in cerebral ischemia: multiple neuroprotective opportunities[J]. *Mol Neurobiol*, 2008, 37(1): 7-38.
- [8] Muñoz-Pinedo C. Signaling pathways that regulate life and cell death: evolution of apoptosis in the context of self-defense[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 738: 124-143.
- [9] Neuhoff S, Moers J, Rieks M, et al. Proliferation, differentiation and cytokin secretion of human umbilical cord blood-derived mononuclear cells in vitro[J]. *Exp Hematol*, 2007, 35(7): 1119-1131.
- [10] Bona E, Andersson AL, Blomgren K, et al. Chemokine and inflammatory cell response to hypoxia-ischemia in immature rats[J]. *Pediatr Res*, 1999, 45(4 Pt 1): 500-509.
- [11] Levenberg S, Burdick JA, Kraehenbuehl T, et al. Neurotrophin-induced differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymeric scaffolds[J]. *Tissue Eng*, 2005, 11(3-4): 506-512.
- [12] Pimentel-Coelho PM, Magalhães ES, Lopes LM, et al. Human cord blood transplantation in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain damage: functional outcome related to neuroprotection in the striatum[J]. *Stem Cells Dev*, 2010, 19(3): 351-358.
- [13] Zheng T, Rossignol C, Leibovici A, et al. Transplantation of multipotent astrocytic stem cells into a rat model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. *Brain Res*, 2006, 1112(1): 99-105.
- [14] Kitada M, Dezawa M. Induction system of neural and muscle lineage cells from bone marrow stromal cells; a new strategy for tissue reconstruction in degenerative diseases[J]. *Histol Histopathol*, 2009, 24(5): 631-642.
- [15] Chopp M, Li Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells[J]. *Lancet Neurol*, 2002, 1(2): 92-100.
- [16] 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.

(本文编辑: 王庆红)