

回族药扎里奴思方对骨髓间充质干细胞 由血管迁移脑内的影响

任非非¹, 刘敬霞^{1*}, 俞维¹, 虎喜成¹, 刘会贤², 刘洋², 李娟²

(1. 宁夏医科大学 中医学学院, 银川 750004; 2. 宁夏医科大学 附属回医中医院, 宁夏 吴忠 751100)

[摘要] **目的:**观察扎里奴思方调控血脑屏障(BBB)通透性对骨髓间充质干细胞(BMSCs)经由血管迁移脑内的影响。**方法:**250只SD大鼠随机分为假手术组、模型组、扎方组、移植组和联合组,除假手术组10只外,其余各组15只,并采用线栓法制备大鼠大脑中动脉阻塞(MCAO)模型,体外全骨髓贴壁法培养及扩增BMSCs;大鼠ig给药($14.6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),BMSCs悬浮液经颈内动脉移植入脑($2\times 10^6/200\ \mu\text{L}$);移植后1,3,7,14 d取材,干湿重法检测脑含水量,TTC法检测脑梗死面积,荧光分光光度计法检测伊文思蓝(EB)含量。**结果:**模型组大鼠脑含水量、脑梗死面积及EB含量均较假手术组显著增加($P<0.01$);与模型组比较,扎方、移植及联合各3,7,14 d组脑含水量降低($P<0.01$),各时间点脑梗死面积减小($P<0.01, P<0.05$),扎方、联合各组及移植3,7 d组EB含量降低显著($P<0.01$);与移植组比较,扎方1 d组脑含水量降低($P<0.05$),1,7,14 d组EB含量降低($P<0.01, P<0.05$),联合各组脑含水量、脑梗死面积及EB含量均降低,以1,14 d降低明显($P<0.01$);扎方与联合组比较,联合各组上述指标均降低,以7,14 d组降低明显($P<0.01, P<0.05$);同组间比较,均以7 d组变化显著,呈先增后减趋势,14 d有明显改善($P<0.01$)。**结论:**脑缺血再灌注后7 d大鼠BBB损伤较1,3 d加重,14 d时有不同程度恢复;扎里奴思方可调控脑缺血再灌注损伤(CIRI)后BBB通透性,促进BMSCs经由血管进入脑内更好的发挥脑保护作用,两者联合作用显著,且促进作用随损伤时间延长呈增强趋势。

[关键词] 脑缺血再灌注; 扎里奴思方; 骨髓间充质干细胞; 血脑屏障; 通透性

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)02-0130-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015020130

Effect of Hui Medicine of Zhali Nusi Recipe on Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells from Vascular to Brain Tissue After Transplantation REN Fei-fei¹, LIU Jing-xia^{1*}, YU Wei¹, HU Xi-cheng¹, LIU Hui-xian², LIU Yang², LI Juan² (1. Traditional Chinese Medicine School of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2. Affiliated Hui Medicine & Chinese Medicine Hospital of Ningxia Medical University, Wuzhong 751100, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Zhali Nusi recipe (ZLNS) on regulating blood-brain barrier (BBB) permeability and promoting the grafting of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) from vascular to brain tissue after the transplantation. **Method:** SD rats were randomly divided into sham-operated group, model group, ZLNS, BMSCs transplantation group and ZLNS combined with BMSCs group. Middle cerebral artery occlusion (MCAO) model was duplicated with nylon thread. BMSCs were cultured and amplified by the whole bone marrow adherence method. The rats were intragastrically administrated with ZLNS ($14.6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), BMSCs suspension solution were transplanted into brain through carotid artery ($2\times 10^6/200\ \mu\text{L}$). Brain of rats was taken out at 1, 3, 7, 14 days after transplantation. Brain water content (BWC), brain infarct area ratio (BIAR) and Evans Blue (EB) leakage were detected by dry-weight assay, TTC and fluorescence spectrophotometry, respectively. **Result:** The BWC, BIAR and EB in model group increased obviously than the sham-operated group ($P<0.01$). Compared with the model group, the BWC at 3, 7, 14 days decreased

[收稿日期] 20140728(025)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260569)

[第一作者] 任非非, 硕士, 从事中医药及回族医药防治脑病研究, Tel:13895393580, E-mail: rff19870518@163.com

[通讯作者] * 刘敬霞, 博士, 教授, 从事中医药及回族医药防治老年病研究, Tel:13519216687, E-mail: ljx199566@163.com

obviously, the EB leakage decreased at 3, 7 days in ZLNS, transplantation and combination groups ($P < 0.01$), the BIAR decreased in all groups ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Compared with the transplantation group, the BWC at 1 day and EB at 1, 7, 14 days in ZLNS groups decreased ($P < 0.01$, $P < 0.05$), all above indicators in combination groups decreased and the results were obvious at 1, 14 days ($P < 0.01$). Compared with the ZLNS groups, all above indicators decreased in combination group and the results were obvious at 7, 14 days ($P < 0.01$, $P < 0.05$). All changes were remarkably serious at 7 days and obviously improved at 14 days being increased firstly and then decreased after cerebral ischemia in each groups ($P < 0.01$). **Conclusion:** The injury at 7 days after cerebral ischemia reperfusion was serious than that at 1, 3 days, and there was some improvement at 14 days in rats after cerebral ischemia reperfusion. The ZLNS could regulate the permeability of BBB, promote the grafting of BMSCs from vascular to brain tissue after the transplantation. It would play a better role in brain protection by the combination ZLNS and BMSCs transplantation.

[**Key words**] cerebral ischemia reperfusion; Zhali Nusi recipe; bone marrow mesenchymal stem cells; blood-brain barrier; permeability

血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)是位于脑内血管与组织间的一个复杂的细胞系统,主要由微血管内皮细胞及其顶端的紧密连接、内皮细胞外连接的基底膜和周细胞以及基底膜下由星形胶质细胞终足构成的胶质膜组成^[1],是脑组织与周围环境进行物质交换的通道,对维持组织内环境稳态起着重要作用,有学者称其为存在于脑内的机体天然免疫屏障^[2]。BBB 特殊的结构基础使其在生理情况下处于不通透状态,严格控制非必须及有害物质进入脑内,起屏障保护作用,但同时也阻挡了很多药物进入脑内发挥治疗作用,成为影响疗效的主要因素^[3]。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是一类位于骨髓内的非造血干细胞^[4],来源于中胚层,具有强大的增殖和多向分化潜能,已成为应用干细胞移植治疗缺血性脑损伤研究的热点^[5]。扎里奴思方出自《回回药方》,具有芳香开窍,补肾活血功效,前期研究^[6]显示,该方能调控脑缺血后 BBB 通透性,改善脑组织损伤程度。本研究拟讨论扎里奴思方调控脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI)后 BBB 通透性对 BMSCs 由血管移植进入脑内发挥脑保护作用的影响,为临床应用提供实验基础。

1 材料

1.1 动物 雄性 SD 大鼠, 250 只, 清洁级, (350 ± 30) g, 由宁夏医科大学实验动物中心提供, 动物合格证号 SCXK(宁)2009-0001; 所有大鼠于同一动物房中饲养, 温度(26 ± 1) °C, 湿度(50 ± 10)%, 光暗周期 12 h/12 h, 自由进食和饮水; 常规环境适应性饲养 7 d 后进行实验。

1.2 药物及试剂 培养基 DMEM/F-12(美国生命

科技公司, 批号 1292607), 0.25% 胰酶(美国 HyClone 公司, 批号 J130020), 胎牛血清(FBS, 杭州四季青生物工程材料有限公司, 批号 051126), 青霉素、链霉素(美国 Solarbio 公司, 批号 20110726), 尼龙线栓(北京沙东生物科技有限公司, 批号 2636-4A), 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride, TTC, 美国 Amresco 公司, 批号 0765), 伊文思蓝(Evans Blue, 美国 Sigma 公司, 批号 E2129), 水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司, 批号 20100709), 氨苄青霉素钠(美国 Amresco 公司, 批号 0339), 甲酰胺(美国 Amresco 公司, 批号 CH3NO), 200 目细胞过滤筛(北京索莱宝科技有限公司)。扎里奴思方出自《回回药方》, 方药组成为: 阿你松(即安息香)3 g, 法里公(即小茴香)12 g, 兀沙吉(即乳香)12 g, 法忒刺撒里荣(即当归)12 g, 木里(即没药)12 g, 撒法郎(即红花)12 g, 阿咱儿公(即牡丹皮)9 g, 拆不牙刺(即芦荟)12 g, 伯思八牙(即水龙骨)12 g, 祖伐(即怀牛膝)24 g, 撒的知(即肉桂)6 g, 膈纳脐(即海狗肾)12 g, 阿夫忒蒙(即菟丝子)12 g, 哈咱卜咱里刺(即石菖蒲)12 g。制剂由宁夏医科大学附属回医中医院制剂室提供, 煎煮滤取并浓缩药液至生药质量浓度为 1.46 g·mL⁻¹, 4 °C 保存备用。

1.3 仪器 PM-10AD 型倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司), T02323 型二氧化碳培养箱(美国 Sheldon Plumbing), YP1201N 型电子天平(上海精科天平仪器厂), TGL-10C 型高速台式离心机(上海精科实业有限公司), MDF-U7386S 型超低温冰箱(日本三洋公司), CU-420 型电热恒温水槽(上海恒科技公司), HS-840U 型超净工作台(苏州净化设备有

限公司), GZX-DH·500-BS 型电热恒温干燥箱(上海昕仪仪器仪表有限公司), YY0088-92 型微量进样器(江苏省金坛市欣悦玻璃仪器有限公司), F-4600 型荧光分光光度计(日本 Hitachi 公司), Image-Pro Plus Version 6.0 图像分析系统(美国 Media Cybernetics 公司)。

2 方法

2.1 局造性脑缺血再灌注大鼠模型制备 参照 Longa 等^[7]的改良线栓法制备大鼠大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型。10%水合氯醛 *ip* 麻醉大鼠,待麻醉完全后,仰卧位固定大鼠,常规消毒手术视野区皮肤,颈前正中切开皮肤,钝性分离左侧颈总动脉(CCA);分离颈内(ICA)、颈外(ECA)动脉,穿线备用;结扎 ECA 近心端和远心端,将 ECA 从中间剪断;结扎翼腭动脉(PA),于 ECA 近 CCA 分叉处剪一小口,将线栓通过小口穿入 ICA 并缓慢前向推进,直至有阻力感为止,线栓插入深度约为(18.0 ± 0.5) mm;插线成功后留出线栓残端约 1 cm,结扎 ECA 剪口处,缝合皮肤,并在切口处滴注青霉素钠溶液,以防感染。缺血 2 h 后拆线并缓慢拔出线栓(但未全部拔出 ECA)以进行缺血再灌注,后缝合皮肤。假手术组只分离 CCA, ICA 及 ECA,不插入线栓。手术过程中保持大鼠肛温(37.0 ± 0.5) °C,保持室温(26 ± 1) °C。术后参考 Longa 等^[7]的 5 级 4 分法对模型进行评分:①0 分,正常,无神经功能缺损症状;②1 分,不能完全伸展病变对侧上肢;③2 分,出现 Horner 征,行走时向病变对侧旋转;④3 分,行走时向病变对侧倾倒;⑤4 分,无自发活动伴意识降低。1 ~ 3 分者为成功模型。若术中意外死亡、缺血再灌注 24 h 内死亡、线栓插入过深造成蛛网膜下腔出血的大鼠被剔除。

2.2 BMSCs 的培养、扩增和移植

2.2.1 悬液收集 将 2 月龄雄性 SD 大鼠(250 g)断颈处死,全身浸泡于 75% 乙醇中消毒 10 min。无菌条件下取出股骨、胫骨,剔除表面附着的组织, PBS 清洗 3 次;剪掉股骨、胫骨的骨垢端,露出骨髓腔,用 DMEM/F-12 培养基(含肝素及青、链霉素) 10 mL 反复冲洗骨髓腔,反复吹打后用 200 目细胞过滤筛过滤, 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,弃上清;加入含 10% FBS 的 DMEM/F-12 完全培养基 5 mL 吹打混匀,重悬,收集 BMSCs 单细胞悬液。

2.2.2 培养、扩增 将收集到的 BMSCs 单细胞悬液以 1 × 10⁸/L 细胞密度接种于 25 cm² 的培养瓶

中,置于 37 °C,质量分数为 5% 的 CO₂,饱和湿度的培养箱中培养;3 ~ 4 d 换液 1 次,弃去未贴壁细胞后继续培养,倒置显微镜下逐日观察细胞形态及生长;待瓶底贴壁细胞达 80% ~ 90% 时,弃去瓶内培养基, PBS 缓慢洗涤细胞,以清除培养瓶内混杂细胞;加入 0.25% 胰酶 2 mL 消化,于倒置显微镜下观察,待贴壁细胞明显收缩,间隙变大,大部分细胞形态变圆并开始脱落时,加入完全培养基终止消化,结束原代培养;反复吹打培养基,收集细胞悬液至 15 mL 离心管中, 1 000 r·min⁻¹,离心 5 min,弃上清,加入含 10% FBS 的 DMEM/F-12 完全培养基重悬,按 1:2 比例进行传代培养。逐日观察细胞生长状态。

2.2.3 重悬、计数 收集第 3 代细胞,如前法进行消化、离心及 PBS 漂洗 3 次,进行细胞重悬并计数,调整细胞密度至每 0.2 mL PBS 含细胞数为 2 × 10⁶ 个备用。

2.2.4 移植 建立 MCAO 模型 24 h 后,拆线并将剩余线栓残端全部拔出 ECA,沿 ECA 切口将直径 0.7 mm 密闭式静脉留置针管缓慢插入 ECA,缓慢向前推进至 ICA 前端并结扎;用微量移液器抽取 BMSCs 单细胞悬液 200 μL,对移植组和联合组大鼠经留置针管由缺血同侧的颈内动脉缓慢移植入脑,后拔出留置针,彻底结扎 ECA 残端,缝合皮肤。

2.3 分组与用药

2.3.1 分组 大鼠按随机分为假手术组、模型组、扎里奴思方组(简称扎方组)、BMSCs 移植组(简称移植组)、BMSCs 移植联合扎里奴思方组(简称联合组);后 4 组根据取材时间点不同又各分为 1, 3, 7, 14 d,每个时间点组大鼠 15 只,假手术组 10 只大鼠。

2.3.2 用药 假手术组及模型组以同等体积生理盐水 *ig*;模型组颈内动脉给予和移植组同等体积的生理盐水;扎方组于术前 4 d *ig*(大鼠 *ig* 用药的剂量根据人与大鼠等效剂量换算公式计算,*ig* 体积按照 100 g 大鼠 *ig* 1 mL 计算,生药用量为 14.6 g·kg⁻¹·d⁻¹,配成的混悬液质量浓度为 1.46 g·mL⁻¹),再灌注后 24 h 颈动脉给予生理盐水 200 μL;移植组于术前 4 d 给予和扎方组同等体积的生理盐水 *ig*,再灌注后 24 h 颈内动脉给予 BMSCs 悬浮液 200 μL(细胞数为 2 × 10⁶ 个);联合组于术前 4 d 给予扎里奴思方 *ig*,再灌注后 24 h 颈内动脉给予 BMSCs 悬浮液 200 μL。大鼠于术前 12 h 禁食,不禁水。

2.4 取材 假手术组于术后 14 d 取材,其余各组

根据时间点分别于颈内动脉用药后 1, 3, 7, 14 d 取材; 各组大鼠均于取材前 1 h 经尾 *iv* 2% 伊文思蓝 (EB) 溶液 ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); 麻醉大鼠, 4% 的多聚甲醛溶液进行灌注固定, 断头取脑, 用 4 °C 生理盐水冲洗 3 次。于冰盘上迅速分离大脑半球, 取左侧半球, 自额极向后冠状切取 3 mm 厚脑组织, 待测脑组织含水量; 再向后冠状切取约 1 mm 厚脑组织用 2% 的 TTC 染色, 待测脑梗死面积; 其余标本置于甲醛液内, 待测脑组织 EB 含量。

2.5 指标检测

2.5.1 脑组织含水量测定 断头取材后, 切取的脑组织迅速用电子天平称取湿重, 后放入电热恒温干燥箱 (100 ± 2) °C 中干燥 24 h, 称取干重。按如下公式计算。

$$\text{脑组织含水量} = (\text{脑湿重} - \text{脑干重}) / \text{脑湿重} \times 100\%$$

2.5.2 脑梗死面积测定 将所取材料放入含 2% TTC 溶液的棕色小瓶内, 37 °C 水浴锅避光孵育 30 min, 期间每隔 10 min 轻轻晃动小瓶, 以保证充分接触; 后放入 10% 多聚甲醛溶液固定 10 min; 取出脑组织, 数码相机拍照, 计算机图像分析系统测定脑梗死面积。按如下公式计算。

$$\text{脑梗死面积} = \text{梗死面积} / \text{总面积} \times 100\%$$

2.5.3 脑组织 EB 含量测定 按照 Sarah A 等^[8]方法以 EB 作为示踪剂, 用荧光分光光度计法检测 BBB 通透性。分别于取材前 1 h 经尾 *iv* 2% EB 溶液 ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 1 h 后断头取脑, 称量后放入 4 mL

甲酰胺溶液中, 于 50 °C 电热恒温水槽中孵育 72 h, $18\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心 30 min, 取上清液于荧光分光光度计下测量其吸光度 *A*, 波长为 620 nm。根据倍比稀释法制作 EB 标准回归曲线, 根据回归方程计算 EB 含量, 结果以“ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ”湿脑组织表示。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对数据进行正态分布检验, 符合正态分布且方差齐性资料比较采用 one-factor ANOVA 分析, 多个样本均数间的多重比较采用 SNK-*q* 法检验; 不符合正态分布且方差不齐的资料采用秩转换的非参数检验。*P* < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 脑组织含水量 与假手术组比较, 模型组各时间点脑组织含水量增加 (*P* < 0.01)。与模型组比较, 扎方、移植和联合各 3, 7, 14 d 组脑组织含水量降低 (*P* < 0.01)。与移植组比较, 扎方 1 d 组脑组织含水量降低 (*P* < 0.05), 其余各组变化无统计学意义; 联合各组脑组织含水量降低, 以 1, 14 d 组降低显著 (*P* < 0.05, *P* < 0.01)。扎方组与联合组比较, 联合各组脑组织含水量降低, 以 7, 14 d 组降低显著 (*P* < 0.05, *P* < 0.01)。同组别不同时间点比较, 模型、扎方、移植及联合各 7 d 组脑组织含水量均较 1, 3, 14 d 组增加 (*P* < 0.01), 模型、联合各 14 d 组较 1, 3 d 组有显著性差异 (*P* < 0.05, *P* < 0.01), 扎方 14 d 组较 1 d 组降低 (*P* < 0.01), 移植 14 d 组较 1, 3 d 组变化无统计学意义。见表 1。

表 1 扎里奴思方联合 BMSCs 对大鼠脑组织含水量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of ZLNS combined with BMSCs on brain water content ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	脑组织含水量/%			
			1 d	3 d	7 d	14 d
假手术	10	-	54.09 ± 2.69	54.09 ± 2.69	54.09 ± 2.69	54.09 ± 2.69
模型	15	-	58.46 ± 0.82 ^{2,12,14)}	60.70 ± 1.13 ^{2,10,14)}	65.01 ± 0.92 ^{2,10,12)}	59.70 ± 0.88 ^{2,9,11,14)}
扎方	15	14.6	57.60 ± 0.60 ^{3,5,12,14)}	58.80 ± 0.56 ^{4,10,14)}	62.66 ± 0.59 ^{4,10,12)}	57.39 ± 0.48 ^{4,12,14)}
移植	15	-	58.59 ± 0.50 ¹⁴⁾	58.72 ± 0.60 ^{4,14)}	62.24 ± 0.57 ^{4,10,12)}	58.16 ± 0.39 ^{4,14)}
联合	15	14.6	57.54 ± 0.49 ^{3,5,14)}	58.31 ± 0.33 ^{4,14)}	61.63 ± 0.47 ^{4,7,10,12)}	55.86 ± 0.36 ^{4,6,8,10,12,14)}

注: 与假手术组比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01; 与模型组比较³⁾ *P* < 0.05, ⁴⁾ *P* < 0.01; 与移植组比较⁵⁾ *P* < 0.05, ⁶⁾ *P* < 0.01; 扎方组与联合组比较⁷⁾ *P* < 0.05, ⁸⁾ *P* < 0.01; 与同组别 1 d 组比较⁹⁾ *P* < 0.05, ¹⁰⁾ *P* < 0.01; 与同组别 3 d 组比较¹¹⁾ *P* < 0.05, ¹²⁾ *P* < 0.01; 与同组别 7 d 组比较¹³⁾ *P* < 0.05, ¹⁴⁾ *P* < 0.01 (表 2 ~ 3 同)。

3.2 脑梗死面积 与假手术组比较, 模型组各时间点脑梗死面积明显增大 (*P* < 0.01)。与模型组比较, 扎方、移植及联合各组脑梗死面积均减小 (*P* < 0.05, *P* < 0.01)。与移植组比较, 扎方 1, 3, 7 d 组脑梗死面积减小, 14 d 组增大, 但变化均无统计学意

义; 联合组各时间点脑梗死面积减小 (*P* < 0.01)。扎方组与联合组比较, 联合各组脑梗死面积减小, 以 3, 7, 14 d 减小显著 (*P* < 0.01)。同组别不同时间点比较, 模型、移植、扎方及联合各 7 d 组脑梗死面积均较各 1, 3, 14 d 组增大 (*P* < 0.01, *P* < 0.05), 模型、联

合各 14 d 组较 1, 3 d 组有显著性差异 ($P < 0.01$), 扎方 14 d 组脑梗死面积较 1, 3 d 组增加, 以 1 d 组增加

显著 ($P < 0.01$), 移植 14 d 组较 1 d 组增加 ($P < 0.01$), 与 3 d 组比较无统计学意义。见表 2。

表 2 扎里奴思方联合 BMSCs 对大鼠脑梗死面积的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of ZLNS combined with BMSCs on brain infarct area ratio ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	脑梗死面积/%			
			1 d	3 d	7 d	14 d
假手术	10	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
模型	15	-	16.45 ± 0.64 ^{2,12,14)}	17.55 ± 0.34 ^{2,10,14)}	19.83 ± 0.99 ^{2,10,12)}	18.71 ± 0.30 ^{2,10,12,14)}
扎方	15	14.6	15.48 ± 0.49 ^{4,12,14)}	16.32 ± 0.47 ^{4,10,14)}	17.48 ± 0.32 ^{4,10,12)}	16.92 ± 0.40 ^{4,10,11,13)}
移植	15	-	15.90 ± 0.54 ^{3,12,14)}	16.72 ± 0.42 ^{4,10,14)}	17.50 ± 0.62 ^{4,10,12)}	16.56 ± 0.64 ^{4,10,14)}
联合	15	14.6	15.18 ± 0.42 ^{4,6,14)}	15.37 ± 0.17 ^{4,6,8,14)}	16.01 ± 0.62 ^{4,6,8,10,12)}	14.03 ± 0.58 ^{4,6,8,10,12,14)}

3.3 脑组织 EB 含量 与假手术组比较, 模型组各时间点脑组织 EB 含量显著增加 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 扎方、联合各组及移植 3, 7 d 组脑组织 EB 含量显著降低 ($P < 0.01$), 移植 1, 14 d 组降低无统计学意义。与移植组比较, 联合各组及扎方 1, 7, 14 d 组脑组织 EB 含量降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 扎

方 3 d 组变化无统计学意义。扎方组与联合组比较, 联合 3, 7, 14 d 组脑组织 EB 含量降低 ($P < 0.01$)。同组别不同时间点比较, 模型、扎方、移植及联合各组 EB 含量均呈先增高后减低趋势, 其各 7 d 组脑组织 EB 含量均较 1, 3, 14 d 组增加 ($P < 0.01$), 其各 14 d 组均较 3 d 组降低 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 扎里奴思方联合 BMSCs 对大鼠脑组织 EB 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of ZLNS combined with BMSCs on Evans Blue leakage ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	EB 含量/μg·g ⁻¹			
			1 d	3 d	7 d	14 d
假手术	10	-	5.96 ± 0.39	5.96 ± 0.39	5.96 ± 0.39	5.96 ± 0.39
模型	15	-	12.03 ± 0.65 ^{2,12,14)}	15.44 ± 0.71 ^{2,10,14)}	18.50 ± 0.61 ^{2,10,12)}	13.85 ± 0.64 ^{2,10,12,14)}
扎方	15	14.6	10.79 ± 0.55 ^{4,6,12,14)}	14.55 ± 0.50 ^{4,10,14)}	16.30 ± 0.34 ^{4,6,10,12)}	13.05 ± 0.55 ^{4,5,10,12,14)}
移植	15	-	11.73 ± 0.42 ^{12,14)}	14.53 ± 0.42 ^{4,10,14)}	16.99 ± 0.51 ^{4,10,12)}	13.53 ± 0.41 ^{10,12,14)}
联合	15	14.6	11.06 ± 0.45 ^{4,6,8,12,14)}	13.91 ± 0.36 ^{4,5,8,10,14)}	14.58 ± 0.61 ^{4,6,8,10,12)}	11.73 ± 0.79 ^{4,6,8,10,12,14)}

4 讨论

缺血性脑血管病 (ischemic cerebrovascular disease, ICVD) 以其高死亡率和致残率成为威胁人类健康的主要疾病之一, 约占全部脑血管病的 80% 左右^[9-10]。CIRI 是继发于 ICVD 溶栓过程中的一种损伤程度更重的病理变化, 是多种机制参与的复杂的酶促级联反应。在 CIRI 引起的诸多病理变化中, BBB 通透性改变是重要的病理基础^[11]。EB 是一种偶氮染料制剂, 是经典的 BBB 示踪剂, 入血后能立即与血浆白蛋白结合, 形成伊文思蓝-白蛋白复合物 (Evans blue-albumin, ESA), 并能在血液中持续存在数小时。由于 BBB 的屏障功能, 正常情况下 ESA 不能通过 BBB, 但脑损伤时, BBB 通透性改变, ESA 通过 BBB 进入脑组织, 且含量随损伤加重而增多。同时, 因 BBB 受损, 血管通透性增加, 脑组织水肿明显, 进一步加重脑梗死程度。因此, 检测 CIRI 后脑

组织 EB 含量、脑组织含水量及脑梗死面积成为判断 BBB 通透性改变的重要指标。本研究发现, CIRI 后随时间延长, 模型大鼠脑组织含水量、脑梗死面积、EB 含量均呈现先增后减趋势, 且以损伤后 7 d 达高峰, 提示 CIRI 后 7 d, BBB 损伤严重, 通透性改变最明显。后随损伤时间延长, 通透性逐渐减小, BBB 损伤呈逐渐恢复趋势。

BMSCs 是一类存在于骨髓网状间质中的非造血干细胞, 具有多向分化潜能, 不仅能分化成脂肪、骨及软骨细胞, 也能分化成神经元, 促进脑缺血后运动、感觉功能的恢复及改善损伤后的认知功能障碍^[12]。同时, BMSCs 自身分泌多种神经营养因子, 发挥神经保护作用^[13]。因此, BMSCs 被认为是干细胞中治疗脑缺血损伤理想的种子细胞, 利用 BMSCs 移植成为促进损伤后神经元结构和功能恢复的有效途径^[14]。本研究结果显示, BMSCs 移植组大鼠脑组

织含水量、EB含量均较模型组降低,尤以3,7 d明显,各时间点脑梗死面积均较模型组减小,提示BMSCs移植能减轻损伤后脑组织水肿程度,减小脑梗死面积,保护受损脑组织。

同时,移植入脑的BMSCs需通过BBB向受损部位迁徙和归巢,而BBB的天然屏障作用限制了BMSCs进入脑内的数量,影响治疗作用的发挥^[15]。扎里奴思方出自回医经典著作《回回药方》,由安息香、小茴香、乳香、当归、没药、红花、牡丹皮、芦荟、水龙骨、怀牛膝、肉桂、海狗肾、菟丝子、石菖蒲等组成,原书论其“可开窍,净其浑身厚浊风痰,治疗痰盛弱病”,具有芳香开窍、补肾活血功效,其配方中的“香药”更是切中中风后邪蒙清窍、风痰阻窍的病机变化,是回族医学治疗脑梗死的常用方剂之一^[16]。已有研究显示,该方能促进脑缺血后神经功能恢复,减轻脑水肿,降低IgG表达,发挥BBB调控作用^[5]。本研究显示,扎方与BMSCs联合应用,联合1,14 d组大鼠脑组织含水量较移植组降低,联合7,14 d组较扎方组降低,联合各组脑梗死面积及EB含量均较该两组减少,以3,7,14 d作用明显。提示扎方联合BMSCs治疗效果优于单独的BMSCs移植,且扎方组EB含量、脑组织含水量均较模型组降低,说明该方能有效调控CIRI后BBB通透性,促进BMSCs移植进入脑内发挥脑保护作用,两者联合作用明显,且以脑缺血中后期(7,14 d)作用显著。因此认为,回药扎里奴思方可调控脑缺血后BBB通透性促进BMSCs经由血管进入脑内,为BMSCs更好发挥脑保护作用提供前提和基础,但两者联合作用的具体机制尚未清楚,有待进一步探究。

[参考文献]

[1] Nico B, Ribatti D. Morphofunctional aspects of the blood-brain barrier[J]. *Curr Drug Metab*, 2012, 13(1): 50-60.
[2] 马金柱, 王化磊, 郑学星, 等. 天然免疫屏障-血脑屏障调节的研究进展[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2013, 29(8): 885-888.
[3] Tajas M, Ramos F E, Weng J X, et al. The blood-brain barrier: Structure, function and therapeutic approaches to cross it[J]. *Mol Membr Biol*, 2014, 31(5): 152-167.
[4] Sharma R R, Pollock K, Hubel A, et al. Mesenchymal

stem or stromal cells; a review of clinical applications and manufacturing practices [J]. *Transfusion*, 2014, 54(5): 1418-1437.
[5] Tsai M J, Tsai S K, Hu B R, et al. Recovery of neurological function of ischemic stroke by application of conditioned medium of bone marrow mesenchymal stem cells derived from normal and cerebral ischemia rats [J]. *J Biomed Sci*, 2014, 21(5): 2-14.
[6] 李娟, 刘洋, 刘会贤, 等. 扎里奴思方对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠血脑屏障通透性的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(3): 114-117.
[7] 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.
[8] Figley S A, Khosravi R, Legasto J M, et al. Characterization of vascular disruption and blood-spinal cord barrier permeability following traumatic spinal cord injury [J]. *J Neurotrauma*, 2014, 31(6): 541-552.
[9] Sveinsson O A, Kjartansson O, Valdimarsson E M. Cerebral ischemia/infarction-epidemiology, causes and symptoms [J]. *Laeknabladid*, 2014, 100(5): 271-279.
[10] Wan H, Li F, Zhu L, et al. Update on therapeutic mechanism for bone marrow stromal cells in ischemic stroke [J]. *J Mol Neurosci*, 2014, 52(2): 177-185.
[11] 张春丽, 孟强. 缺血性脑血管病血脑屏障研究进展 [J]. *医学综述*, 2013, 19(11): 1935-1937.
[12] 王苏平, 孙鑫, 李深. 骨髓间充质干细胞治疗缺血性脑卒中研究进展 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2014, 31(3): 280-282.
[13] Teixeira F G, Carvalho M M, Sousa N, et al. Mesenchymal stem cells secretome: a new paradigm for central nervous system regeneration? [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(20): 3871-3882.
[14] 杨国强, 范学慧, 萧洪文. 骨髓间充质干细胞移植治疗缺血性脑损伤的最新研究进展 [J]. *四川解剖学杂志*, 2013, 21(3): 32-35.
[15] Liu L, Eckert M A, Riazifar H, et al. From blood to the brain: can systemically transplanted mesenchymal stem cells cross the blood-brain barrier? [J]. *Stem cells Int*, 2013, 2013: 435093.
[16] 宋岷. 《回回药方》考释. 12卷 [M]. 北京: 中华书局出版社. 2007: 1607-1609.

[责任编辑 周冰冰]