

· 扎里奴思方药理学研究专题 ·

扎里奴思方干预骨髓间充质干细胞移植对脑缺血再灌注损伤大鼠突触结构可塑性的影响

刘敬霞^{1*}, 任非非¹, 刘会贤², 俞维¹, 黑长春³, 刘洋², 虎喜成¹

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

[摘要] 目的:观察扎里奴思方(扎方)干预骨髓间充质干细胞(BMSCs)移植对大鼠中动脉阻塞(MCAO)模型大鼠突触结构可塑性的影响,并探讨其机制。方法:SD大鼠随机分为假手术组、模型组、扎方组、移植组和联合组;线栓法制备大鼠MCAO模型,体外全骨髓贴壁筛选法培养及扩增BMSCs;大鼠灌胃给药(14.6 g·kg⁻¹·d⁻¹),BMSCs悬浮液经颈内动脉移植入脑;移植后1,3,7,14 d取材,透射电镜观察神经元突触超微结构,蛋白质免疫印迹(Western blot)检测突触素(SYN),突触后致密蛋白-95(PSD-95)蛋白表达。结果:假手术组突触结构完整,前后膜轮廓及突触间隙清晰,可见多个突触小泡,均匀分布,模型各组突触数量减少,结构破坏,突触间隙模糊,突触小泡数量减少甚至消失。扎方组突触数量增多,结构接近正常,可见凹型及U型突触,3,7,14 d组突触小泡增多,14 d组突触间隙增宽。移植组突触超微结构变化与扎方组大致相同。联合组突触损伤明显减轻,突触数量增多,7,14 d可见多个凹型突触,突触小泡明显增多。模型各组SYN及PSD-95较假手术组减低($P < 0.01$);与模型组比较,联合各组及扎方、移植各7 d组SYN表达增高($P < 0.01$),扎方、移植各3,7,14 d组及联合各组PSD-95表达增高($P < 0.01$);与移植组比较,联合各组SYN,PSD-95表达增高($P < 0.01, P < 0.05$),扎方3 d组PSD-95表达减低($P < 0.01$);扎方与联合组比较,联合各组SYN,PSD-95表达增高($P < 0.01$);同组间比较,模型、扎方、移植及联合各3 d组SYN表达较其他组减低($P < 0.01$),各7 d组PSD-95表达达高峰($P < 0.01$),各14 d组PSD表达较3 d组增高($P < 0.01, P < 0.05$),扎方及移植各14 d组SYN表达较7 d组减低($P < 0.01$)。结论:扎方可显著提高脑缺血再灌注损伤BMSCs移植后神经元突触结构可塑性,以二者联合作用显著,其机制可能与干预损伤后SYN,PSD-95的动态表达有关。

[关键词] 脑缺血再灌注; 扎里奴思方; 骨髓间充质干细胞; 突触结构可塑性

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)12-0144-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016120144

Effect of Zhali Nusi Fang Intervening Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Transplantation on Synaptic Structural Plasticity in Rats After Cerebral Ischemia Reperfusion Injury

LIU Jing-xia^{1*}, REN Fei-fei¹, LIU Hui-xian², YU Wei¹, HEI Chang-chun³, LIU Yang², HU Xi-cheng¹

(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;

3. Basic Medical School of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Zhali Nusi Fang (ZLNF) intervening bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) transplantation on synaptic structural plasticity in rats after cerebral ischemia reperfusion injury (CIRI). **Method:** SD rats were randomly divided into sham-operated group, model group,

[收稿日期] 20150813(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260569)

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

ZLNF group, BMSCs transplantation group and ZLNF combined with BMSCs groups. Middle cerebral artery occlusion (MCAO) model was duplicated with nylon thread, BMSCs were cultured and amplified by the whole bone marrow adherence method. Drugs were given to the rats by intragastric administration ($14.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), BMSCs suspension solution was transplanted into rat brain through carotid artery. Brain was taken out at 1, 3, 7, 14 days after transplantation. The changes of neuronal synaptic ultrastructure were observed by transmission electron microscopy, synaptophysin (SYN) and postsynaptic density protein-95 (PSD-95) protein expressions were detected by Western blot. **Result:** The structure of synapses in sham-operated group was integrated, the presynaptic membrane and postsynaptic membrane were clear, the synaptic cleft was visible, and a lots of synaptic vesicles distributed equably. While in model group, the quantity of synapses were decreased, the structure was destroyed and the synaptic cleft was dim, the amount of synaptic vesicles was decreased and even disappeared. The quantity of synapses was increased, the structure was close to the normal, and the concave and U form synapses could be seen in ZLNF group, the synaptic vesicles were increased at 3, 7, 14 days in ZLNF group, the synaptic cleft became wider at 14 day in ZLNF group, the changes of neuronal synaptic ultrastructure in transplantation groups were in keeping with ZLNF group, the damage of synapses in combination groups was significantly lower, the synapses increased, and many concave synapses could be seen at 7, 14 days in combination groups, the synaptic vesicles were significantly increased. The SYN, PSD-95 expressions in model groups were obviously decreased when compared with the sham-operated group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the SYN expression was increased at 7 day group in ZLNF and transplantation and in all the combination groups ($P < 0.01$), the PSD-95 expression was increased at 3, 7, 14 days in ZLNF and transplantation and in all the combination groups ($P < 0.01$). Compared with the transplantation groups, the SYN, PSD-95 expressions were increased in all the combination groups ($P < 0.01$, $P < 0.05$), the PSD-95 expression was decreased at 3 day in ZLNF group ($P < 0.01$). Compared with the ZLNF group, the SYN, PSD-95 expressions were increased in all the combination groups ($P < 0.01$). Compared with the same time groups, the SYN expression at 3 day group in ZLNF, transplantation and combination groups was lower than other groups ($P < 0.01$), and the PSD-95 expression in all 7 day groups was higher than other groups ($P < 0.01$), the PSD-95 expression in all 14 day groups was higher than any 3 day group ($P < 0.01$, $P < 0.05$), the SYN expression at 14 day was lower than that at 7 day in ZLNF, transplantation group ($P < 0.01$). **Conclusion:** ZLNF could increase the synaptic structural plasticity obviously after the transplantation of BMSCs to CIRI, the effect was superior when using the combination of them, and its mechanism may be related to the regulation of the dynamic expressions of SYN and PSD-95.

[Key words] cerebral ischemia reperfusion; Zhali Nusi Fang; bone marrow mesenchymal stem cells; synaptic structural plasticity

神经元可塑性是神经系统的重要特性之一,存在于神经元整个生长、发育及分化过程中。其宏观上表现为脑的学习记忆功能、肢体运动功能及精神活动的改变,微观上则表现为神经元突触结构与功能的变化,即神经元突触的可塑性^[1]。当正常脑组织受到外界刺激时,相邻神经元间会发生原有突触变性、脱失,新突触的重塑及突触间传递效能的改变^[2]。研究显示脑缺血再灌注损伤(CIRI)后神经功能的恢复主要依赖于神经元间已受损突触的再生和未受损突触间新的神经回路的形成^[3],即突触结构可塑性发生变化。因此,如何有效促进脑缺血

后突触重塑成为改善脑缺血损伤的重要途径^[4]。

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是研究最深入的成体干细胞之一,来源于中胚层,是位于骨髓内的除造血干细胞之外的另一类非造血干细胞^[5]。研究显示 BMSCs 具有强大的增殖能力和多向分化潜能,这使得 BMSCs 成为干细胞移植治疗脑缺血理想的种子细胞^[6-7]。BMSCs 移植能有效促进脑缺血后突触素(synaptophysin, SYN)表达,促进损伤后突触重塑^[8]。但脑缺血后脑内血脑屏障(BBB)的存在限制了 BMSCs 进入脑内的数量,影响治疗作用的发

挥^[9]。扎里奴思方是《回回药方》中记载的治疗脑病的常用方剂,具有芳香开窍,补肾活血功效,能显著调控脑缺血后 BBB 通透性,改善脑组织损伤程度^[10]。本研究拟观察 CIRI 大鼠 BMSCs 移植后脑内神经元突触超微结构和 SYN、突触后致密蛋白-95 (postsynaptic density protein-95, PSD-95) 的表达及应用扎里奴思方干预对其表达的影响,探讨两者联合应用对神经元突触结构可塑性的作用及其机制。

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 Life Technologies 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),全蛋白抽提试剂盒 Bradford 蛋白含量检测试剂盒,SDS-PAGE 凝胶电泳试剂盒及蛋白质免疫印迹(Western blot)检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司,批号分别为 KGP250, KGA801, KGP113, KGP1201),定影液及显色液(无锡市灵琦服务用品厂),Rabbit Anti-PSD95(美国 Bioss 公司,货号 bs-0179R),Anti-SY38 antibody(英国 Abcam 公司,货号 ab8049)。扎里奴思方组成为阿你松(安息香)3 g,法里公(小茴香)12 g,兀沙吉(乳香)12 g,法忒刺撒里荣(当归)12 g,木里(没药)12 g,撒法郎(红花)12 g,阿咱儿公(牡丹皮)9 g,拆不牙刺(芦荟)12 g,伯思八牙(水龙骨)12 g,祖伐(怀牛膝)24 g,撒的知(肉桂)6 g,膈脓脐(海狗肾)12 g,阿夫忒蒙(菟丝子)12 g,哈咱卜咱里刺(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 公司),BL21S 型分析天平(德国 Sartorius 公司),164-5051-PowerPac™ 型基础电泳仪电源(美国 Bio-Rad 公司),ST16R 型高速冷冻离心机(美国 Thermo Sorvall 公司),UV-2450 型紫外分光光度计(日本岛津公司),HY-4 型脱色摇床(江苏金

坛市正基仪器有限公司),HS-840U 型超净工作台(苏州净化设备有限公司),H7650 型透射式电子显微镜(日本日立公司),G:BOX Chemi XR5 型凝胶成像分析系统(美国 Syngene 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^[11]的改良线栓法制备大鼠大脑中动脉阻塞(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^[11]的 5 级 4 分法对模型进行评分为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 SD 大鼠断颈处死,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,磷酸盐缓冲液(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 个/L 细胞密度接种于 25 cm² 的培养瓶中,置于 37 °C,浓度为 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 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 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 P3 代细胞,如前法进行消化、离心及 PBS 漂洗 3 次,重悬并计数,调整细胞浓度至每 0.2 mL PBS 含细胞数为 2×10^6 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 大鼠按随机数字表法分为假手术组、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 $14.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,配成的混悬液质量浓度为 $1.46 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$),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 2×10^6 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;麻醉大鼠,4% 的多聚甲醛溶液进行灌注固定,断头取脑,用 4 $^{\circ}\text{C}$ 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,自距离额极 3 mm 处冠状切取 1 mm 厚脑组织,旁开 3 mm 切取 5 块 $1 \text{ mm} \times$

$1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ 大小的标本用预冷的 2.5% 磷酸缓冲戊二醛溶液固定,待作电镜检测;再向后 5 mm 厚脑组织,取皮质及半暗带组织 100 mg,置入液氮内保存,待作总蛋白提取,其余标本置于液氮内保存。

2.5 指标检测

2.5.1 透射电镜检测 取切取的 $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ 大小的标本用 2.5% 磷酸缓冲戊二醛固定液固定 48 h,再用 1% 锇酸固定 2 h;梯度乙醇脱水,丙酮置换,环氧树脂包埋;体视显微镜下修块,甲苯胺蓝染色定位,超薄切片,醋酸铀和柠檬酸铅双重电子染色,行透射电镜观察。

2.5.2 Western blot 检测 SYN, PSD-95 蛋白表达 取 100 mg 缺血侧脑组织剪碎,加入含磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的冷 Lysis Buffer 1 mL 匀浆,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 1 万 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min;取上清,Bradford 法进行蛋白定量;取蛋白样品适量进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜;5% 脱脂奶粉封闭 1 h, TBST 洗膜 3 次 $\times 10 \text{ min}$,加入一抗(SYN 1:500, PSD-95 1:100)或羊抗兔甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)孵育,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜静置过夜;吸弃一抗,洗涤后加入辣根酶标记山羊抗兔 IgG 二抗(1:200),室温孵育 2 h;吸弃二抗,充分洗涤,置于增强型化学发光试剂(ECL)中,显影,定影,蒸馏水冲洗终止,使用凝胶成像分析系统分析。目标蛋白水平用相应条带灰度与 GAPDH 的比值,以假手术组的比值作为 100% 进行标准化。

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单因素方差分析,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。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠缺血侧脑组织突触超微结构的影响 假手术组可见多个突触结构,突触前后膜轮廓完整,突触间隙清晰可见,突触终末可见多个圆形清亮突触小泡,大小均等,密集分布。模型各组突触数量减少,突触结构欠清晰,突触间隙模糊不清,3 d 及 7 d 组突触前后膜可见融合,3 d 组突触小泡数量减少甚至消失,分布不均匀,7 d 及 14 d 组突触间隙可见,可见少量突触小泡。扎方各组突触数量增多,结构接近正常,可见凹型及 U 型突触,突触前后膜尚清晰,少数有融合,3,7,14 d 组突触终末突触小泡增多,14 d 组突触间隙增宽,突触后致密物质增

多。移植各组突触数量增多,突触前后膜轮廓完整,突触间隙大致正常,7 d 及 14 d 组突触小泡增多,分布均匀,14 d 可见少数凹型突触,且突触后致密物质增多。联合各组突触超微结构损伤明显

减轻,突触数量增多,形态尚清晰,对称分布,7,14 d 可见多个凹型突触,突触间隙增宽,突触后致密物质增多,突触终末突触小泡分布均匀,数量明显增多。见图 1。

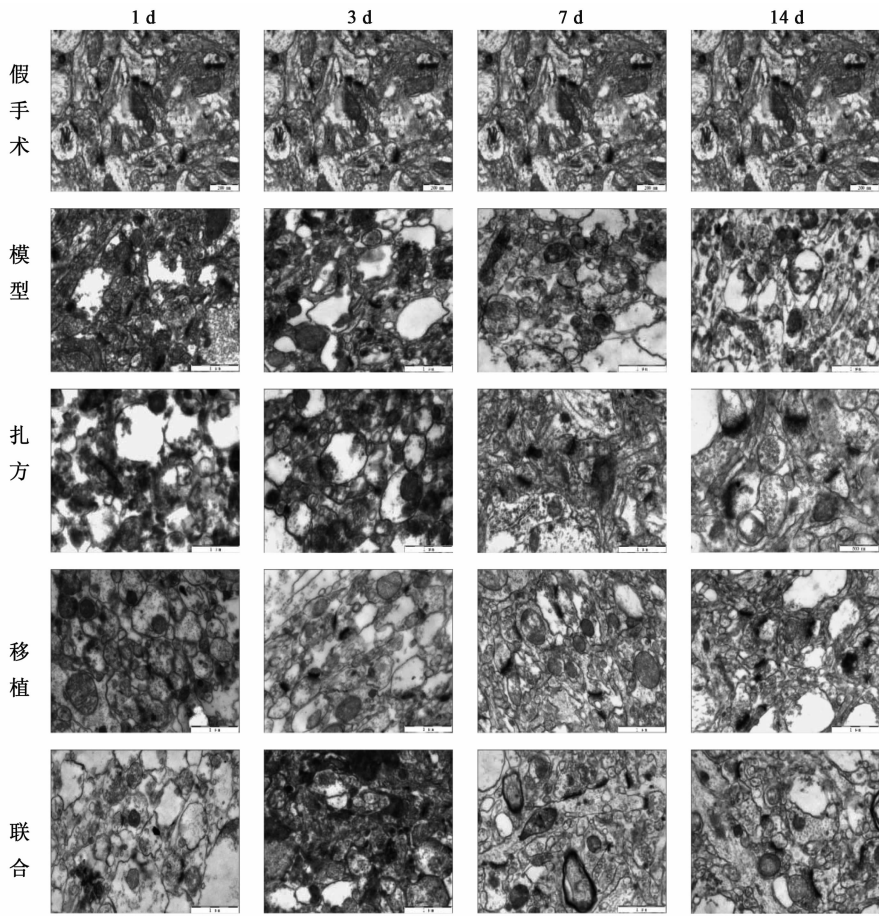
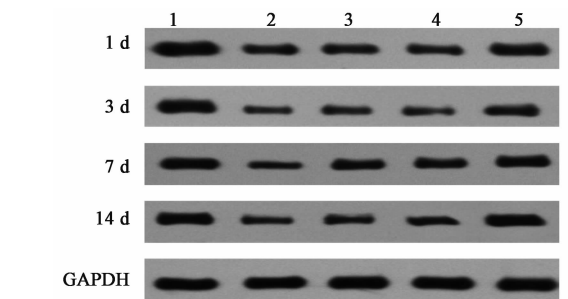


图 1 扎里奴思方对大鼠缺血侧脑组织突触超微结构的影响(电镜扫描,×6 000)

Fig.1 Effects of Zhali Nusi Fang on ischemia side synaptic ultrastructure of brain tissue in rats(scanning electron microscope, ×6 000)

3.2 对大鼠脑组织 SYN 蛋白表达的影响 模型组各时间点 SYN 蛋白表达较假手术组减低 ($P < 0.01$)。与模型组比较,扎方各组及移植 3,7,14 d 组 SYN 表达增高,以扎方及移植 7 d 组明显 ($P < 0.01$),联合各组 SYN 表达增高 ($P < 0.01$)。与移植组比较,联合各组 SYN 表达增高 ($P < 0.01$),扎方 1,3,7 d 组有增高趋势。扎方与联合组比较,联合各组 SYN 表达增高 ($P < 0.01$)。同组别不同时间点比较,模型、扎方、移植及联合各 3 d 组 SYN 表达较 1,7,14 d 组减低 ($P < 0.01$),模型及联合 14 d 较 7 d 组有增高趋势,扎方及移植各 14 d 较 7 d 组减低 ($P < 0.01$)。见图 2,表 1。

3.3 对大鼠脑组织 PSD-95 蛋白表达的影响 模型组各时间点 PSD-95 蛋白表达较假手术组减低 ($P < 0.01$)。与模型组比较,联合各组及扎方、移植各 3,



1. 假手术组;2. 模型组;3. 扎里奴思方组;4. BMSCs 移植组;5. 联合组(图 3 同)

图 2 扎里奴思方对大鼠脑组织 SYN 蛋白表达的影响

Fig.2 Effects of Zhali Nusi Fang on expression of SYN protein in rat brain tissue

7,14 d 组 PSD-95 表达增高 ($P < 0.01$)。与移植组比较,扎方 3 d 组 PSD-95 表达减低 ($P < 0.01$),联合

表 1 扎里奴思方对大鼠脑组织 SYN 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of Zhali Nusi Fang on expression of SYN protein in rat brain tissue ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	时间点 /d	SYN 蛋白
假手术	10	-	14	0.667 ± 0.066
模型	15	-	1	0.285 ± 0.066 ^{2,12)}
			3	0.168 ± 0.044 ^{2,10,14)}
			7	0.296 ± 0.040 ^{2,12)}
			14	0.307 ± 0.041 ^{2,12)}
扎方	15	14.6	1	0.305 ± 0.047 ^{12,14)}
			3	0.199 ± 0.028 ^{10,14)}
			7	0.484 ± 0.058 ^{4,10,12)}
			14	0.324 ± 0.062 ^{12,14)}
移植	15	-	1	0.281 ± 0.056 ^{12,14)}
			3	0.191 ± 0.049 ^{10,14)}
			7	0.461 ± 0.059 ^{4,10,12)}
			14	0.326 ± 0.062 ^{12,14)}
联合	15	14.6	1	0.449 ± 0.083 ^{4,6,8,12,14)}
			3	0.339 ± 0.070 ^{4,6,8,10,14)}
			7	0.604 ± 0.094 ^{4,6,8,10,12)}
			14	0.637 ± 0.079 ^{4,6,8,10,12)}

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 同)。

各组 PSD-95 表达增高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。扎方与联合组比较,联合各组 PSD-95 表达增高 ($P < 0.01$)。同组别不同时间点比较,模型、扎方、移植及联合各 7 d 组 PSD-95 表达达高峰 ($P < 0.01$),各 14 d 组 PSD-95 表达较 3 d 组增高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。见表 2,图 3。

4 讨论

突触是神经元之间信息传递的关键结构,有学者称在脑和脊髓组织中,整个神经元表面积大部分被突触所占据^[4,12]。

突触可塑性分为突触结构的可塑性和突触功能的可塑性^[13]。突触结构可塑性主要体现在突触数量、突触间隙宽度、突触后致密物质、突触界面曲率及树突形成等方面。研究显示脑缺血时脑内突触结构破坏,突触密度降低,突触后致密物质减少,突触界面曲率降低,而给予外界干预后以上指标均明显改善,提示 CIRI 后脑内突触结构可塑性发生变化,

表 2 扎里奴思方联合 BMSCs 对大鼠脑组织 PSD-95 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of Zhali Nusi Fang combined with BMSCs on expression of PSD-95 protein in rat brain tissue ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	时间点 /d	PSD-95 蛋白
假手术	10	-	14	1.090 ± 0.100
模型	15	-	1	0.261 ± 0.063 ^{2,12,14)}
			3	0.091 ± 0.033 ^{2,10,14)}
			7	0.363 ± 0.062 ^{2,10,12)}
			14	0.209 ± 0.066 ^{2,12,14)}
扎方	15	14.6	1	0.298 ± 0.098 ^{11,14)}
			3	0.372 ± 0.050 ^{4,6,9,14)}
			7	0.808 ± 0.103 ^{4,10,12)}
			14	0.580 ± 0.062 ^{4,10,12,14)}
移植	15	-	1	0.310 ± 0.047 ^{12,14)}
			3	0.489 ± 0.076 ^{4,10,14)}
			7	0.841 ± 0.067 ^{4,10,12)}
			14	0.573 ± 0.069 ^{4,10,11,14)}
联合	15	14.6	1	0.403 ± 0.103 ^{4,6,8,12,14)}
			3	0.571 ± 0.061 ^{4,5,8,10,14)}
			7	0.949 ± 0.118 ^{4,6,8,10,12)}
			14	0.883 ± 0.106 ^{4,6,8,10,12)}

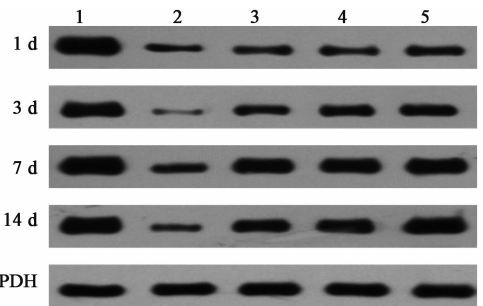


图 3 扎里奴思方联合 BMSCs 对大鼠脑组织 PSD-95 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effects of Zhali Nusi Fang combined with BMSCs on expression of PSD-95 protein in rat brain tissue

促进突触重塑可明显改善脑损伤程度^[14]。

影响突触结构可塑性的蛋白有很多种,其中 SYN 和 PSD-95 是 2 种分别存在于突触前膜和突触后膜上与突触可塑性密切相关的蛋白^[15]。研究显示 SYN 的定位与定量可准确反映神经突触的分布与密度,常作为突触重塑的分子标记物^[16]。Brewer 等^[17]研究发现,在连续培养的大鼠海马神经元发育过程中,SYN 标记的突触密度呈线性增长,而树突则呈指数型增长,认为脑组织发育过程中处理能力

的增强有赖于突触传递效能的增加。这就提示了, SYN 不仅与突触结构可塑性有关, 也与突触功能可塑性, 即突触传递效能的改变有关。李逸尘等^[18] 研究发现, 在 CIRI 后 24 h 时 SYN 表达增高, 至 48 h 时达高峰, 后逐渐下降, 提示 SYP 表达的增高有助于减轻缺血半暗带损伤, 推测其可能和损伤后突触重塑有关。PSD-95 是膜相关的鸟苷酸激酶家族的一员, 是最先发现的突触后致密区含量最丰富的蛋白^[19]。PSD-95 在突触后膜受体定位及信号转导通路中发挥重要作用。刘洋等^[20] 研究发现, 脑缺血时脑内 PSD-95 和 SYN-I 显著减少, 且以脑内 CA1 区、皮层减少明显, 随缺血时间延长, 两者表达增高, 提示两种蛋白参与了缺血后突触重塑的过程, 与损伤后神经修复密切相关。

干细胞(stem cells, SC)是一类具有自我更新能力、高度未分化及多向分化潜能的细胞, 包括胚胎干细胞、脐血干细胞、神经干细胞和 BMSCs 等多种细胞类型^[21]。已有研究证实干细胞移植治疗能显著促进脑缺血后神经功能恢复和突触重建^[22-23]。BMSCs 来源于骨髓, 具有多向分化潜能和强大的增殖能力, 且免疫原性低, 是目前最受关注的一类成体干细胞^[24]。研究显示其能分化为神经细胞, 促进脑缺血后运动、感觉功能恢复及改善神经功能障碍^[25]。罗开源等^[26] 研究证明, BMSCs 经侧脑室移植可显著促进脑缺血大鼠脑组织海马齿状回突触形成, 上调 SYN 表达。郝鑫等^[27] 研究也表明 BMSCs 移植对自发性老年性痴呆大鼠神经元突触重建具有明显的修复作用。因此推测 BMSCs 移植可提高脑缺血损伤后突触结构可塑性, 发挥脑保护作用。本研究显示, 脑缺血后, 脑内神经元突触超微结构明显受损, 突触结构欠清, 突触间隙模糊, 部分突触前后膜融合, 突触小泡减少或消失, 提示脑缺血后突触结构和功能受损, 而研究中 7 d 和 14 d 突触间隙略增宽, 可见少量突触小泡, 提示脑损伤可激活自身突触结构可塑性, 代偿性发挥突触重塑作用。同时, 脑缺血后 SYN 及 PSD-95 表达减低, 且于损伤后 3 d 明显, 提示脑缺血后 3 d 突触结构损伤程度最重。BMSCs 移植可显著改善脑内突触结构受损情况, 表现为突触数量增多, 突触间隙增宽, 突触小泡增多, 且以 7 d 和 14 d 明显。需注意的是, BMSCs 移植组出现凹型突触, 与正常平直型突触比较, 凹型突触可增加突触界面曲率, 使突触面积增大, 相应功能也会增强。同时, BMSCs 移植能显著上调 SYN 及 PSD-95 蛋白表达, 促进损伤后突触重塑。

回族医药学是我国传统医药的重要组成部分, 理论体系相对独立, 尤其在脑系疾病的防治方面, 具有独特的理论基础和丰富的治疗经验^[28]。扎里奴思方出自《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、石菖蒲等药组成, 原书^[29] 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、补肾活血之功效, 其配方中的“香药”应用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。前期研究已显示, 其能有效调控脑缺血后 BBB 通透性, 发挥脑保护作用。因此, 推测该方能促进 BMSCs 透过 BBB 进入脑内发挥作用。本研究显示, 扎方可明显改善脑缺血后神经元突触结构损伤, 其作用与 BMSCs 基本一致, 同时可明显上调 SYN 及 PSD-95 表达, 提高神经元可塑性, 且对 SYN 促进作用优于 BMSCs 移植。扎方和 BMSCs 联合后可明显促进脑缺血突触结构损伤的恢复, 表现为突触数量增多, 形态结构尚清晰, 呈对称分布, 7 d 和 14 d 组可见多个凹型突触, 突触小泡明显增多, 分布均匀, 突触后致密物质厚度增加。同时, 二者联合可明显提高 SYN 及 PSD-95 蛋白表达, 且作用明显优于二者单独应用。同组间比较, 均显示促进作用以损伤后 7, 14 d 显著, 提示二者联合促进作用随用药时间延长逐渐增强。

综上所述, 本研究结果表明, 应用扎里奴思方可显著提高脑缺血再灌注损伤 BMSCs 移植后神经元突触结构可塑性, 减轻突触损伤, 其机制可能与干预损伤后 SYN, PSD-95 的动态表达有关。

[参考文献]

- [1] 朱镛连. 神经康复学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2001: 3-12.
- [2] 季力, 崔晓. 丰富环境对脑神经可塑性的影响[J]. 神经病学与神经康复学杂志, 2013, 10(2): 99-101.
- [3] Hoang S, Liauw J, Choi M, et al. Netrin-4 enhances angiogenesis and neurologic outcome after cerebral ischemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2009, 29(2): 385-397.
- [4] 陈伟恒, 陶长路, 时美玉, 等. 突触可塑性与脑疾病的神经发育基础[J]. 生命科学, 2014, 26(6): 99-101.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 董学君, 孙荷, 张国荣, 等. 骨髓间充质干细胞的多向分化潜能研究进展[J]. *中国细胞生物学学报*, 2010, 32(1): 49-55.
- [8] 翁金森, 刘楠, 杜厚伟, 等. 骨髓间充质干细胞移植对脑梗塞大鼠神经功能恢复及突触素表达的影响[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2008, 24(1): 34-37.
- [9] 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(3): 435093-435100.
- [10] 李娟, 刘洋, 刘会贤, 等. 扎里奴思方对局造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.
- [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] Gillick B T, Zirpel L. Neuroplasticity: an appreciation from synapse to system[J]. *Arch Phys Med Rehabil*, 2012, 93(10): 1846-1855.
- [13] 陈燕. 神经元的突触可塑性与学习和记忆[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2008, 35(6): 610-619.
- [14] Luo Y, Xu N G, Yi W, et al. Study on the correlation between synaptic reconstruction and astrocyte after ischemia and the influence of electroacupuncture on rats [J]. *Chin J Integr Med*, 2011, 17(10): 750-757.
- [15] 郭敏, 李刚. 突触可塑性相关蛋白的研究进展[J]. *神经药理学报*, 2013, 3(6): 57-64.
- [16] 王琳, 许能贵. 针刺对脑缺血后大脑可塑性促进作用的研究进展[J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(8): 2548-2550.
- [17] Brewer G J, Boehler M D, Pearson R A, et al. Neuron network activity scales exponentially with synapse density[J]. *J Neural Eng*, 2009, 6(1): 14001-14007.
- [18] 李逸尘, 姜信诚, 景玉宏, 等. 大鼠脑缺血再灌注后海马 CA1 区血管内皮细胞生长因子与突触素的关系[J]. *兰州大学学报: 医学版*, 2010, 36(1): 9-12.
- [19] 张永杰, 唐冬梅, 徐桂萍. 突触可塑性分子机制的相关研究[J]. *医学综述*, 2012, 18(8): 1141-1143.
- [20] 刘洋, 孙建宁, 董世芬, 等. 永久性局灶性中动脉阻断脑缺血(pMCAO)模型大鼠脑内突触相关蛋白表达的免疫组织化学观察[J]. *中国比较医学杂志*, 2012, 22(8): 43-47.
- [21] 郭燕宁, 王雪笠. 不同干细胞移植途径治疗脑缺血的示踪及效果评定[J]. *脑与神经疾病杂志*, 2013, 21(4): 316-318.
- [22] Gutiérrez F M, Rodríguez F B, Ramos C J, et al. Stem cells for brain repair and recovery after stroke [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2013, 13(11): 1479-1483.
- [23] Chen J, Venkat P, Zacharek A, et al. Neurorestorative therapy for stroke [J]. *Front Hum Neurosci*, 2014, 8(8): 382-391.
- [24] 罗庆, 张晨, 宋关斌, 等. 骨髓间充质干细胞旁分泌作用在组织损伤修复中的研究进展[J]. *生物医学工程学杂志*, 2012, 29(5): 999-1002.
- [25] 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.
- [26] 罗开源, 钟小明, 余鸿. 骨髓基质细胞植入对脑缺血大鼠海马齿状回突触形成及记忆能力的影响[J]. *中国康复理论与实践*, 2014, 20(12): 1122-1125.
- [27] 郝鑫, 宋彬彬, 赵富生, 等. BMSCs 移植对自发性 AD 鼠神经元及突触变化影响机制的研究[J]. *牡丹江医学院学报*, 2014, 35(6): 5-8.
- [28] 冯彩琴, 贾孟辉, 贺晓慧, 等. 《回回药方》防治脑系疾病的剂型及用药规律探析[J]. *宁夏医科大学学报*, 2011, 33(2): 103-104.
- [29] 宋岷. 《回回药方》考释[M]. 北京: 中华书局出版社, 2007: 1607.

[责任编辑 周冰冰]

[专栏介绍] 以传统中医药在缺血性脑损伤治疗方面的优势为依托,应用现代分子生物学技术,将具有“芳香开窍、起闭回苏”的回族医“香药”与干细胞移植相结合,重点探索药物促进干细胞向损伤区域的迁徙、分化作用及机制。扎里奴思方出自《回回药方》,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、补肾活血之功效,其配方中的“香药”应用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。本课题以 SD 大鼠为研究对象,利用经典的改良线栓法制备脑缺血再灌注损伤模型,并将培养并鉴定的骨髓间充质干细胞经颈内动脉移植入脑,观察其对脑缺血损伤后神经功能、炎症损伤、神经细胞再生修复的作用及机制,旨在探讨扎里奴思方在脑缺血损伤方面的优势,为防治缺血性脑病提供参考,也为民族医药在重大疾病防治中的优势探索提供依据。