

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神经轴突再生的影响

刘敬霞^{1*}, 任非非¹, 刘会贤², 俞维¹, 黑长春³, 虎喜成¹, 刘抒雯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)大鼠神经轴突再生的影响,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($14.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),BMSCs经颈内动脉移植入脑;移植后1,3,7,14 d取材,蛋白质免疫印迹(Western blot)检测生长相关蛋白(GAP-43),神经微丝蛋白(NF-200),髓磷脂相关糖蛋白(MAG)和勿动蛋白-A(Nogo-A)蛋白表达。结果:模型组GAP-43, MAG及Nogo-A蛋白表达较假手术组明显增高($P < 0.01$),NF-200降低($P < 0.01$);与模型组比较,扎方3,14 d组、移植3,7,14 d组及联合各组GAP-43表达增高($P < 0.05$, $P < 0.01$),扎方、移植及联合各组NF-200表达增高($P < 0.01$),MAG及Nogo-A降低($P < 0.01$);与移植组比较,扎方14 d组GAP-43,7 d组NF-200及1,3,14 d组MAG表达降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),3 d组Nogo-A降低($P < 0.01$),7 d组增高($P < 0.05$),联合各组GAP-43及1,14 d组NF-200表达增高($P < 0.01$),MAG,Nogo-A及7 d组NF-200表达降低($P < 0.01$);扎方与联合组比较,联合3,7,14 d组GAP-43及14 d组NF-200表达增高($P < 0.01$),各组MAG及Nogo-A表达降低($P < 0.01$);同组间比较,模型7 d组GAP-43及MAG表达增高($P < 0.05$, $P < 0.01$),3 d组NF-200表达较1 d组增高($P < 0.01$),3 d组Nogo-A达高峰($P < 0.01$),扎方、移植及联合各14 d组GAP-43表达较7 d组增高($P < 0.01$),扎方及移植各7 d组NF-200表达较3,14 d组增高($P < 0.01$, $P < 0.05$),联合3 d组NF-200表达较低($P < 0.01$),后逐渐增高($P < 0.05$),扎方、移植及联合各组MAG及Nogo-A表达呈先增后减趋势。结论:扎方可显著促进脑缺血再灌注损伤BMSCs移植后神经轴突再生,以二者联合作用显著,其机制可能与干预损伤后GAP-43,NF-200及MAG,Nogo-A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; 轴突再生

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)12-0152-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016120152

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160426.1032.022.html>

[网络出版时间] 2016-04-26 10:32

Effect of Zhali Nusi Fang in Intervening Impact of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Transplantation on Neuronal Axons Regeneration in Rats After Cerebral Ischemia Reperfusion Injury

LIU Jing-xia^{1*}, REN Fei-fei¹, LIU Hui-xian², YU Wei¹, HEI Chang-chun³, HU Xi-cheng¹, LIU Shu-wen¹

(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 Hui medicine Zhali Nusi Fang (ZLNF) in intervening the impact of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) transplantation on neuronal axons regeneration in rats after cerebral ischemia reperfusion injury (CIRI). **Method:** SD rats were divided randomly into Sham-operated group, model group, ZLNF group, BMSCs transplantation group and ZLNF-BMSC combination group; middle

[收稿日期] 20150811(009)

[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

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 were transplanted into rat brains through carotid artery; rat brains were taken out at 1, 3, 7, 14 days after transplantation; growth associated protein-43 (GAP-43), neurofilament protein-200 (NF-200), myelin associated glycoprotein (MAG) and Nogo-A protein expression were detected by Western blot. **Result:** The GAP-43, MAG, Nogo-A in the model groups were obviously increased than the sham-operated groups ($P < 0.01$), and with significant decrease in NF-200 ($P < 0.01$); compared with the model groups, the GAP-43 at 3, 14 days in the ZLNF group, at 3, 7, 14 days in the transplantation group and the combination group were increased ($P < 0.01$, $P < 0.05$), the NF-200 in the ZLNF group, the transplantation group and the combination group were increased ($P < 0.01$), but with decreases in MAG and Nogo-A ($P < 0.05$); compared with the transplantation groups, the GAP-43 at 14 day, the NF-200 at 7 day and MAG at 1, 3, 14 days in the ZLNF group were decreased ($P < 0.01$, $P < 0.05$), and the Nogo-A at 3 day in the ZLNF group was decreased ($P < 0.01$) but increased at 7 day ($P < 0.05$), the GAP-43 at 1, 14 days and the NF-200 in the combination group were increased ($P < 0.01$), the NF-200 at 7 day and MAG, Nogo-A in the combination group were decreased ($P < 0.01$); compared with the ZLNF group, the GAP-43 at 3, 7, 14 days and the NF-200 at 14 day in the combination group were increased ($P < 0.01$), the MAG, Nogo-A in all of the groups were decreased ($P < 0.01$); in the intra-group comparison, the GAP-43 and MAG at 7 day in the model group were increased compared with that at 3, 14 days ($P < 0.01$, $P < 0.05$), the NF-200 at 3 day in the model group was increased compared with that at 1 day, the Nogo-A at 3 day reached peak ($P < 0.01$), the GAP-43 at 14 day group in ZLNF, transplantation and combination groups were higher than that at 7 day ($P < 0.01$), the NF-200 at 7 day in ZLNF and transplantation groups were higher than that at 3, 14 days ($P < 0.01$, $P < 0.05$), the NF-200 at 3 day in the combination group was relatively low ($P < 0.01$) and later gradually higher ($P < 0.05$), the MAG, Nogo-A in ZLNF, transplantation and combination groups were increased first and then decreased. **Conclusion:** Hui medicine ZLNF can obviously promote the neuronal axons regeneration after the transplantation of BMSCs for cerebral ischemia reperfusion injury, with a significant effect in their combination, and its mechanism may be related to dynamic expressions of GAP-43, NF-200, MAG and Nogo-A after the intervention.

[**Key words**] cerebral ischemia reperfusion; Zhali Nusi Fang; bone marrow mesenchymal stem cells; neuronal axons regeneration

缺血性脑血管病以其高致死率和致残率成为危害健康的主要疾病之一,约占全部脑血管病的80%左右^[1]。目前大多认为治疗的关键在于挽救缺血半暗带区濒临死亡的神经细胞,促进损伤后神经功能恢复^[2]。而挽救半暗带区受损神经元的一个重要策略即促进缺血区域的神经再生。神经再生主要是神经轴突的再生^[3],即神经元轴突的出芽、生长、延伸并与靶细胞重建突触联系,形成神经再度支配,从而恢复神经功能。因此,促进脑缺血后神经轴突再生成为改善脑缺血损伤的重要途径。

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是骨髓内除造血干细胞之外的另一类非造血干细胞^[4],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脑缺血研究的热点^[5]。研究显示, BMSCs可分泌多种神经营养因子并下调多种神经轴突生长抑制因子表达,促进脑损

伤后轴突再生^[6-7]。但脑内血脑屏障(BBB)的存在限制了BMSCs进入脑内的数量,影响治疗作用的发挥^[8]。扎里奴思方出自《回回药方》,具有芳香开窍,补肾活血功效,前期研究显示,该方能调控脑缺血后BBB通透性,改善脑组织损伤程度^[9]。本研究拟观察脑缺血再灌注损伤(CIRI)大鼠BMSCs移植后脑内神经生长相关蛋白(growth associated protein 43, GAP-43),神经微丝蛋白(neurofilament protein 200, NF-200)和髓磷脂相关糖蛋白(myelin associated glycoprotein, MAG),勿动蛋白(Nogo-A)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轴突再生的作用。

1 材料

1.1 动物 雄性SD大鼠,250只,清洁级,体重(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。

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), 全蛋白抽提试剂盒 (批号 KGP250), Bradford 蛋白含量检测试剂盒 (批号 KGA801), 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 试剂盒 (批号 KGP113) 和蛋白质免疫印迹 (Western blot) 检测试剂盒 (批号 KGP1201) 均购自南京凯基生物科技发展有限公司, 兔抗 GAP43 抗体 (货号 BA0878) 和小鼠抗 NF200 抗体 (货号 BM-0100-2) 均购自武汉博士德生物有限公司, MAG 抗体 (货号 ab89780) 和 Nogo 抗体 (货号 ab62024) 均购自英国 Abcam 公司。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, 法忒刺撒里菜 (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, 膈膈脐 (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。所有药材均来自宁夏医科大学附属回医中医院中药房, 并由宁夏医科大学中医学院俞维高级实验师鉴定。制剂由宁夏医科大学附属回医中医院制剂室提供, 煎煮并浓缩药液至质量浓度为 $1.46 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 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), ST16R 型高速冷冻离心机 (美国 Thermo Sorvall 公司), XW-80A 型涡旋振荡器 (其林贝尔仪器制造有限公司), 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), 2 mL-组织匀浆器 (海门市爱苯德实验器材有限公司), 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^[10] 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, 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 $(18.0 \pm 0.5) \text{ mm}$; 插线成功后留出线栓残端约

1 cm, 结扎 ECA 剪口处, 缝合皮肤。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。术后参考 Longa 等^[10] 的 5 级 4 分法对模型进行评分, 1~3 分者为成功模型。若术中意外死亡、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 6~8 周龄雄性 SD 大鼠 (250 g) 断颈处死, 全身浸泡于 75% 乙醇中消毒 10 min。无菌条件下取股骨、胫骨, 剔除表面组织, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗 3 次; 剪掉骨垢端, 露出骨髓腔, 用 DMEM/F-12 培养基反复冲洗, 过滤除渣, $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清; 加入含 10% FBS 的 DMEM/F-12 完全培养基 5 mL 吹打混匀, 重悬, 收集 BMSCs 单细胞悬液。

2.2.2 培养、扩增 将 BMSCs 单细胞悬液以 1×10^8 个/L 细胞密度接种于培养瓶中, 置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中培养; 3~4 d 换液 1 次, 弃去未贴壁细胞, 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, 加入 0.25% 胰酶 2 mL 消化并离心、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, 调整细胞密度至每 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 SD 大鼠随机分为假手术组、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 *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 。造模前 4 d 开始给扎方或生理盐水 ig ,每天 1 次,连用至取材。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 8 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 Western blot 检测 GAP-43, NF-200 和 MAG, Nogo-A 蛋白表达 取 100 mg 缺血侧脑组织剪碎,加入冷 Lysis Buffer 1 mL 匀浆,4 $^{\circ}\text{C}$, 1 万 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 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 (GAP-43 1:100, NF-200 1:50, MAG 1:1 000, Nogo-A 1:400) 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 G:BOX Chemi XR5 凝胶成像分析系统分析。目标蛋白水平为相应条带灰度与 GAPDH 比值,以对照组比值作为 100% 进行标准化。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 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,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠脑组织 GAP-43 蛋白表达的影响 模型组各时间点 GAP-43 表达较假手术组增高 ($P < 0.01$);与模型组比较,扎方 3,14 d 组、移植 3,7,14 d 组及联合各组 GAP-43 表达增高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与移植组比较,扎方 14 d 组 GAP-43 降低 ($P < 0.01$),联合 3,7,14 d 组增高 ($P < 0.01$);扎方

与联合组比较,联合 3,7,14 d 组 GAP-43 表达增高 ($P < 0.01$)。同组别不同时间点比较,模型 3 d 组 GAP-43 较 1,7 d 组降低 ($P < 0.01$),7 d 组较 14 d 组增高 ($P < 0.05$),扎方及移植各组 GAP-43 表达呈增加趋势,以 14 d 组显著 ($P < 0.01$),联合 3 d 组 GAP-43 较 1,7 d 组增高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),14 d 组较 7 d 组增高 ($P < 0.05$)。见表 1,图 1。

3.2 对大鼠脑组织 NF-200 蛋白表达的影响 模型组各时间点 NF-200 表达较假手术组降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,扎方、移植及联合各组 NF-200 表达增高 ($P < 0.01$);与移植组比较,扎方及联合 7 d 组 NF-200 降低 ($P < 0.01$),联合 1,14 d 组增高 ($P < 0.01$)。扎方与联合组比较,联合各组 NF-200 表达增高,以 14 d 显著 ($P < 0.01$)。同组别不同时间点比较,模型 3 d 组 NF-200 较 1 d 组增高 ($P < 0.01$),扎方 3 d 组 NF-200 较 1,7 d 组降低 ($P < 0.01$),14 d 组较 7 d 组降低 ($P < 0.05$),移植各组 NF-200 表达呈先增后减趋势,7 d 组达高峰 ($P < 0.01$),联合 3 d 组 NF-200 较 1,7 d 组降低 ($P < 0.01$),14 d 组较 7 d 组增高 ($P < 0.05$)。见表 1,图 2。

3.3 对大鼠脑组织 MAG 和 Nogo-A 蛋白表达 模型组各时间点 MAG 和 Nogo-A 表达较假手术组增高 ($P < 0.01$)。与模型组比较,扎方、移植及联合各组 MAG 和 Nogo-A 表达均降低 ($P < 0.01$)。与移植组比较,扎方 1,3,14 d 组 MAG 及 3 d 组 Nogo-A 表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),扎方 7 d 组 Nogo-A 表达增高 ($P < 0.05$),联合各组 MAG 和 Nogo-A 表达降低 ($P < 0.01$)。扎方与联合组比较,联合各组 MAG 及 Nogo-A 表达均降低 ($P < 0.01$)。同组别不同时间点比较,各组 MAG 及 Nogo-A 表达均呈先增后减趋势,模型、扎方及联合各组 MAG 于 7 d 达高峰,移植各组 MAG 于 3 d 达高峰,各 14 d 组 MAG 较 7 d 组降低 ($P < 0.01$),各组 Nogo-A 表达于 3 d 达高峰 ($P < 0.01$),各 14 d 组 Nogo-A 较 7 d 组降低,以扎方及移植 14 d 组降低明显 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 2,图 3,4。

4 讨论

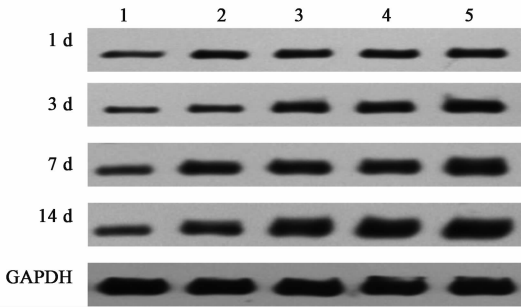
成年哺乳动物中枢神经系统损伤后,神经轴突再生障碍是神经功能难以恢复的主要原因^[11]。研究表明,正常成熟的中枢神经系统不再产生新的神经元,已有的神经元具有形成新的突起和突触连接并形成新的神经元的潜能,即具有神经可塑性^[12]。当脑损伤时神经可塑性被激活,神经元之间形成新

表 1 扎里奴思方对大鼠脑组织 GAP-43 和 NF-200 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of Zhali Nusi Fang on expression of GAP-43 and NF-200 protein in rat brain tissue ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	时间/d	GAP-43 蛋白	NF-200 蛋白
假手术	10	-	14	0.180 ± 0.028	0.541 ± 0.049
模型	15	-	1	0.349 ± 0.033 ^{2,12,14)}	0.190 ± 0.041 ^{2,12,14)}
			3	0.263 ± 0.038 ^{2,10,14)}	0.292 ± 0.042 ^{2,10)}
			7	0.470 ± 0.041 ^{2,10,12)}	0.281 ± 0.033 ^{2,10)}
			14	0.419 ± 0.022 ^{2,10,12,13)}	0.290 ± 0.026 ^{2,10)}
扎方	15	14.6	1	0.362 ± 0.041 ^{12,14)}	0.489 ± 0.051 ^{4,12)}
			3	0.474 ± 0.044 ^{4,10)}	0.415 ± 0.050 ^{4,10,14)}
			7	0.481 ± 0.040 ¹⁰⁾	0.500 ± 0.043 ^{4,6,12)}
			14	0.601 ± 0.026 ^{4,6,10,12,14)}	0.452 ± 0.034 ^{4,13)}
移植	15	-	1	0.388 ± 0.036 ^{12,14)}	0.432 ± 0.065 ^{4,14)}
			3	0.508 ± 0.072 ^{4,10)}	0.448 ± 0.068 ^{4,14)}
			7	0.517 ± 0.069 ^{3,10)}	0.571 ± 0.066 ^{4,10,12)}
			14	0.668 ± 0.053 ^{4,10,12,14)}	0.444 ± 0.061 ^{4,14)}
联合	15	14.6	1	0.396 ± 0.045 ^{3,12,14)}	0.518 ± 0.056 ^{4,6,12)}
			3	0.729 ± 0.035 ^{4,6,8,10,13)}	0.419 ± 0.032 ^{4,10,14)}
			7	0.688 ± 0.057 ^{4,6,8,10,11)}	0.501 ± 0.033 ^{4,6,12)}
			14	0.735 ± 0.049 ^{4,6,8,10,13)}	0.660 ± 0.048 ^{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 同)。



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 2~4 同)

图 1 扎里奴思方对大鼠脑组织 GAP-43 蛋白表达的影响

Fig.1 Effects of Zhali Nusi Fang on expression of GAP-43 protein in rat brain tissue

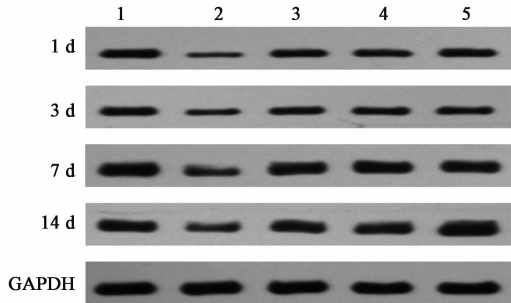


图 2 扎里奴思方对大鼠脑组织 NF-200 蛋白表达的影响

Fig.2 Effects of Zhali Nusi Fang on expression of NF-200 protein in rat brain tissue

方面。Murphy 等^[14] 研究发现,脑缺血急性期存在一段以大量的神经轴突发芽为特点的时间窗,即缺血病灶远侧区或半暗带区神经元通过轴突发芽向损伤组织或其他神经元延伸,形成新的突触,促进神经重塑和功能修复。因此,CIRI 后神经轴突再生是神经元结构和功能恢复的重要基础。

影响神经轴突再生的因素可概括为内外两方面。内在因素即神经元自身的生长能力,外在因素即神经元所处的微环境。内在因素受生长相关蛋白及多个神经营养因子的影响,外在因素则受星形胶质细胞过度增生产生的胶质瘢痕、存在于少突胶质细胞髓鞘中的轴突生长抑制因子及细胞内信号转导通路等影响^[15]。

GAP-43 是表达于发育或再生轴突生长锥末端的胞膜磷酸蛋白^[16],是启动生长锥的形成、促进神经递质释放的关键蛋白,对轴突再生至关重要。Dubroff 等^[17]对 GAP-43 基因敲除小鼠研究发现,缺乏 GAP-43 的小鼠脑内神经元轴突生长导向异常,突触功能受损。神经微丝蛋白(NF)是神经元骨架蛋白,特异性分布于神经元轴突及胞体内,通过轴浆运输至轴突,参与神经轴突形成,其水平反映轴突损伤及再生情况^[18]。正常情况下,NF200 只存在于轴索中。当脑组织损伤时,NF200 合成增多,参与轴突再生^[19]。MAG 和 Nogo-A 均是少突胶质细胞髓鞘中抑制神经轴突再生的物质。其中,MAG 分布于髓鞘的轴突周围,Nogo-A 分布于少突胶质细胞的内质网。

的轴突分支及突触连接,重建神经功能。CIRI 引起神经可塑性改变包括神经元结构和功能的改变^[13]。神经元结构可塑性变化表现在轴突和突触结构变化

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

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

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	时间/d	MAG 蛋白	Nogo-A 蛋白
假手术	10	-	14	0.129 ± 0.032	0.111 ± 0.038
模型	15	-	1	0.576 ± 0.036 ^{2,12,14)}	0.783 ± 0.040 ^{2,12,14)}
			3	0.702 ± 0.046 ^{2,10,14)}	0.982 ± 0.073 ^{2,10,14)}
			7	0.922 ± 0.050 ^{2,10,12)}	0.477 ± 0.055 ^{2,10,12)}
			14	0.670 ± 0.040 ^{2,10,14)}	0.434 ± 0.067 ^{2,10,12)}
扎方	15	14.6	1	0.249 ± 0.038 ^{4,5,12,14)}	0.531 ± 0.073 ^{4,12,14)}
			3	0.563 ± 0.048 ^{4,5,10)}	0.654 ± 0.081 ^{4,6,10,14)}
			7	0.574 ± 0.035 ^{4,10)}	0.397 ± 0.059 ^{4,5,10,12)}
			14	0.367 ± 0.044 ^{4,5,10,12,14)}	0.314 ± 0.081 ^{4,10,12,14)}
移植	15	-	1	0.291 ± 0.044 ^{4,12,14)}	0.550 ± 0.063 ^{4,12,14)}
			3	0.607 ± 0.054 ^{4,10)}	0.748 ± 0.082 ^{4,10,14)}
			7	0.590 ± 0.059 ^{4,10)}	0.334 ± 0.059 ^{4,10,12)}
			14	0.418 ± 0.035 ^{4,10,12,14)}	0.268 ± 0.058 ^{4,10,12,13)}
联合	15	14.6	1	0.152 ± 0.043 ^{4,6,8,12,14)}	0.240 ± 0.057 ^{4,6,8,12,14)}
			3	0.354 ± 0.054 ^{4,6,8,10)}	0.403 ± 0.051 ^{4,6,8,10,14)}
			7	0.358 ± 0.034 ^{4,6,8,10)}	0.134 ± 0.044 ^{4,6,8,10,12)}
			14	0.282 ± 0.055 ^{4,6,8,10,12,14)}	0.115 ± 0.023 ^{4,6,8,10,12)}

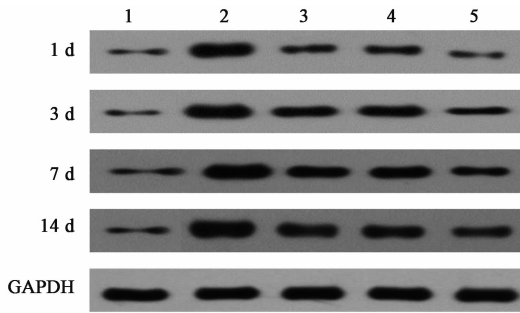


图 3 扎里奴思方对大鼠脑组织 MAG 蛋白表达的影响
Fig.3 Effects of Zhali Nusi Fang on expression of MAG protein in rat brain tissue

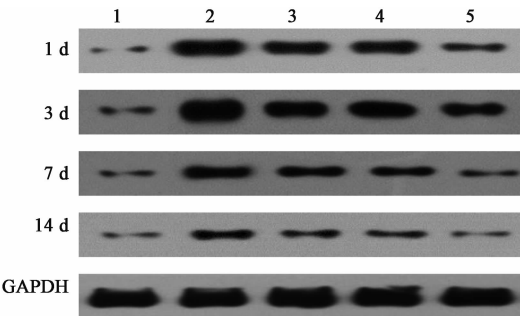


图 4 扎里奴思方对大鼠脑组织 Nogo-A 蛋白表达的影响
Fig.4 Effects of Zhali Nusi Fang on expression of Nogo-A protein in rat brain tissue

MAG 与 Nogo-A 均可与神经元轴突膜上的 NgR 受体结合,启动抑制信号的跨膜转导,激活 RhoA 信号通路,导致生长锥瓦解,抑制神经再生^[20]。

BMSCs 是存在于骨髓网状间质中的非造血干细胞,具有高度自我更新能力和多向分化潜能,能分化成神经细胞,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^[21]。同时,BMSCs 自

身分泌多种生长因子,促进损伤后神经轴突再生^[22]。研究显示,BMSCs 能上调 CIRC 后梗死灶周围 GAP-43 的表达,促进神经轴突再生^[23]。本研究表明,GAP-43 表达于 CIRC 后 24 h 上调,7 d 达高峰,14 d 时仍维持较高水平,提示 CIRC 后 GAP-43 代偿性增高有助于受损神经元轴突再生,这与石旺清等^[24]研究结果一致。NF-200 表达于 CIRC 后 24 h 降低,后逐渐增加,提示 CIRC 后神经轴突受损,机体自身可发挥损伤修复作用,但修复能力有限。MAG 和 Nogo-A 表达均于 CIRC 后 24 h 增加,MAG 7 d 达高峰,Nogo-A 3 d 达高峰,提示 CIRC 后脑损伤与 MAG 和 Nogo-A 表达有关,二者开始增加即神经轴突被抑制的起点。BMSCs 移植可显著上调 GAP-43 和 NF-200 表达,降低 MAG 及 Nogo-A 表达,提示 BMSCs 移植可促进脑缺血后神经轴突再生,抑制阻碍轴突再生相关因子表达,促进神经功能恢复。需注意的是,BMSCs 组 MAG 表达于 3 d 即达高峰,提示 BMSCs 降低 MAG 的作用优于扎方组。

以芳香开窍、补肾活血功效为特点的扎里奴思方出自《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”,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^[25]。前期研究显示,该方能有效促进脑缺血后神经功能恢复,减轻脑水肿,发挥 BBB 调控作用^[9]。本研究表明,该方能显著促进 CIRC 后 GAP-43 和 NF-200 表达,降低 MAG 及 Nogo-A 含量,提示该方能显著促进 CIRC 后的神经轴突再生。另外,本研究还发现,扎方干预后

MAG, Nogo-A 降低较 GAP-43 和 NF-200 增高明显,提示扎方对轴突再生抑制性蛋白的作用更显著,即主要通过反向调节促进轴突再生。本实验将扎方与 BMSCs 联合应用,结果显示联合组 GAP-43 和 NF-200 表达较单独的扎方、移植组明显上调,且以损伤后 14 d 明显,二者联合可显著降低轴突生长相关抑制因子 MAG 及 Nogo-A 表达,作用优于单独扎方组及移植组,提示两者联合可产生协同作用,扎方可显著促进脑缺血再灌注损伤 BMSCs 移植后的神经轴突再生,为解决因 BBB 存在而使 BMSCs 透过不足的问题提供参考。

综上所述,本研究结果表明,应用扎里奴思方可显著促进脑缺血再灌注损伤 BMSCs 移植后神经轴突再生,减轻轴突损伤,其机制可能与干预损伤后 GAP-43、NF-200 及 MAG、Nogo-A 的动态表达有关。

[参考文献]

[1] Sveinsson O A, Kjartansson O, Valdimarsson E M. Cerebral ischemia/infarction-epidemiology, causes and symptoms[J]. *Laeknabladid*, 2014, 100(5):271-279.

[2] 丁利静,石京山,李菲,等.缺血性脑损伤治疗新策略:促进血管新生和神经再生[J]. *中国新药与临床杂志*, 2013, 32(6):426-432.

[3] 王义周,寇爽,刘妍,等.中医药促进中枢神经再生的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(12):197-201.

[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] 马晓伟,马芹颖,王彦永,等.骨髓间充质干细胞分泌的蛋白及其功能[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(14):2763-2766.

[7] 梁松岚,郝光,杨风刚,等.骨髓间充质干细胞移植治疗对大鼠脑梗死后神经再生抑制因素的影响[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2011, 28(9):781-785.

[8] 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(6):310-318.

[9] 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.

[10] 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.

[11] 张燕虹,李长清,牛陵川.精氨酸酶 I 参与环腺苷酸促进脑缺血再灌注大鼠的轴突再生[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2014, 30(4):369-376.

[12] 何志勇,胡艳兵.针刺对神经可塑性影响的研究进展[J]. *中国医药导报*, 2013, 10(21):50-52.

[13] Pekna M, Pekny M, Nilsson M. Modulation of neural plasticity as a basis for stroke rehabilitation[J]. *Stroke*, 2012, 43(10):2819-2828.

[14] Murphy T H, Corbett D. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2009, 10(12):861-872.

[15] 任斐,彭婉舒,贡时雨,等.神经再生机制的研究进展[J]. *中国药物与临床*, 2014, 14(4):473-476.

[16] 刘健,杨小玉,杨茂光,等.中枢神经损伤后 GAP-43 蛋白对神经再生及轴突导向作用及其机制的研究进展[J]. *吉林大学学报:医学版*, 2013, 39(1):180-183.

[17] Dubroff J G, Stevens R T, Hitt J, et al. Anomalous functional organization of barrel cortex in GAP-43 deficient mice [J]. *Neuroimage*, 2006, 29(4):1040-1048.

[18] 陶涛,秦新月,徐广会.养血清脑颗粒对大鼠脑缺血再灌注损伤后轴突再生及 RGMa 表达的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2013, 35(7):635-638.

[19] 闫峰,刘向荣,赵海苹,等.长期远隔后适应对脑缺血再灌注大鼠脑组织神经中丝 200 表达的影响[J]. *首都医科大学学报*, 2012, 33(6):766-770.

[20] Cao Z, Gao Y, Deng K, et al. Receptors for myelin inhibitors: Structures and therapeutic opportunities [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2010, 43(1):1-14.

[21] 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.

[22] Teixeira F G, Carvalho M M, Sousa N, et al. Mesenchymal stem cells secrete: a new paradigm for central nervous system regeneration? [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(20):3871-3882.

[23] 游辉,彭玉,全巧云,等.骨髓基质干细胞移植对脑梗死大鼠生长相关蛋白 43 表达的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(40):7893-7897.

[24] 石旺清,郑关毅,陈晓东,等.大鼠脑缺血/再灌注后 bFGF 和 GAP-43 的表达与神经再生[J]. *中国应用生理学杂志*, 2013, 29(1):63-67.

[25] 宋岷.《回回药方》考释[M].北京:中华书局出版社, 2007, 1607-1609.

[责任编辑 周冰冰]