

· 药理 ·

脑脉通对脑缺血大鼠骨髓间充质干细胞移植脑内 向血管内皮细胞分化的影响

刘轲¹, 李建生^{2*}, 刘敬霞³, 苏静¹, 赵跃武⁴, 李宁¹, 郭晓燕¹, 孙捷¹

(1. 河南中医学院第一附属医院, 郑州 450006; 2. 河南中医学院老年医学研究所, 郑州 450046;
3. 宁夏医科大学中医学学院, 银川 750004; 4. 河南省人民医院, 郑州 450003)

[摘要] 目的: 观察骨髓间充质干细胞(BMSCs)移植大鼠脑内的存活和向血管内皮细胞的分化, 以及脑脉通颗粒对其存活和分化的影响。方法: 大鼠体外全骨髓贴壁筛选培养和扩增 BMSCs; 大鼠随机分为假手术组、模型组、移植组、联合组; 线栓法制备(MCAO)模型; 术后 24 h 将 BMSCs 由同侧颈内动脉移植脑内; 电镜下观察 BMSCs 移植后脑组织微血管内皮细胞超微结构变化; 检测脑组织中 CD31⁺ 表达; 免疫组化双标法观察 Brdu/FVIII 双标细胞变化。结果: 与假手术组比较(49.23 ± 6.17), 各模型组大鼠脑组织 CD31⁺ 表达显著减弱(25.14 ± 5.47, 15.25 ± 4.50, 18.91 ± 3.25) ($P < 0.01$); 与模型组比较, 移植组 14, 28 d 的 CD31⁺ 表达增强(30.36 ± 5.74, 41.12 ± 6.71) ($P < 0.01$); 与移植组比较, 各联合组 CD31⁺ 表达显著增强, 以 28 d 尤为显著(56.42 ± 7.16) ($P < 0.01$)。移植组和联合组大鼠脑内有 Brdu 标记细胞存活; 联合组 14, 28 d 脑内 Brdu 标记细胞较移植组显著增多($P < 0.05$, $P < 0.01$)。各移植组与联合组大鼠脑内可见 Brdu/FVIII 双标细胞存活; 各联合组大鼠 Brdu/FVIII 双标细胞均较移植组增多($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论: BMSCs 存活的数量随移植脑内时间的延长而呈增加趋势; 脑脉通可使移植脑内的 BMSCs 成活增多。BMSCs 在脑内向血管内皮细胞的分化比率随移植后时间的延长呈先增强再减弱的变化趋势; 脑脉通可使 BMSCs 向血管内皮细胞分化和成血管样作用增强。

[关键词] 脑缺血; 脑脉通; 骨髓间充质干细胞; 血管内皮细胞; 分化

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)19-0187-06

[doi] 10.11653/syjf2013190187

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130807.1122.006.html>

[网络出版时间] 2013-08-07 11:22

Effect of Naomaitong on the Differentiation of Bone Mesenchymal Stem Cells into Vascular Endothelial Cells in Cerebral Ischemic Rat's Brain after Transplantation

LIU Ke¹, LI Jian-sheng^{2*}, LIU Jing-xia³, SU Jing¹, ZHAO Yue-wu⁴, LI Ning¹, GUO Xiao-yan¹, SUN Jie¹

(1. First Affiliated Hospital of Henan College of Traditional
Chinese Medicine (TCM), Zhengzhou 450006, China;

2. Geriatrics Department of Henan College of TCM, Zhengzhou 450046, China;

3. Traditional Chinese Medicine School of Ningxia Meicical University, Yinchuan 750004, China;

4. Henan Province People's Hospital, Zhengzhou 450003, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the survival and differentiation of bone mesenchymal stem cells

[收稿日期] 20130310(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973744)

[第一作者] 刘轲, 博士, 教授, 主任医师, 硕士研究生导师, 从事中医药防治缺血性脑血管疾病研究, Tel: 13592621856, E-mail: hnlktem@126.com

[通讯作者] * 李建生; 博士, 教授, 博士研究生导师, 从事中医药防治老年病研究, Tel: 13703717893, E-mail: li_js8@163.com

(BMSCs) into vascular endothelial cells in brain of cerebral ischemic rats after transplantation and the effect of Naomaitong (NMT) on the survival and differentiation of BMSCs. **Method:** Rats whole bone marrow were cultivated and BMSCs were purified and increased by methods of adherence and selection *in vitro*. Rats were randomly divided into different groups. Middle cerebral artery occlusion (MCAO) model was duplicated with nylon thread. Rats of transplantation and combination groups were transplanted with BMSCs via carotid artery at 24 h after operation. Electron microscopic was used to observe the microvascular endothelial cell ultrastructure of brain tissue after BMSCs transplantation. CD31⁺ expression in brain tissue was detected in this experiment, and the changes of Brdu/FⅧ double labeled cells were observed by using the method of immunohistochemistry double labeling. **Result:** CD31⁺ expression was significant in brain of sham operation group, while the expression of CD31⁺ was significantly decreased in rats of each model group ($P < 0.01$). In brain of 14, 28 d transplantation groups, the expression of CD31⁺ increased obviously ($P < 0.01$). In comparison with that of transplantation group, CD31⁺ expression in brain of each combination groups enhanced significantly, especially in 28 d group ($P < 0.01$). In brain of transplantation and combination groups, survival of Brdu mark cells could be detected, and the cells increased obviously in brain of 14, 28 d combination groups compared with that of transplantation group. Survival of the transplanted cells being labeled doulely by Brdu (Brdu/FⅧ) was observed in transplantation and combination groups, and the cells increased obviously in brain of each combination group than that of transplantation group. **Conclusion:** It is showed the tendency that the survival of BMSCs in brain tissue increase following the extension of time after transplantation, and NMT could make more BMSCs survive. The ratio of BMSCs differentiating into vascular endothelial cells enhance firstly and then weaken with the trend of the time in rats' brain after transplantation. NMT could make the servival of BMSCs enhanced after transplantation and make the differentiation into vascular endothelial cells angiogenic effect increase.

[**Key words**] cerebral ischemia; Naomaitong; BMSCs; vascular endothelial cells; differentiation

骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 是骨髓中非造血实质细胞的干细胞, 具有多向分化潜能, 可分化为神经、血管内皮、肌肉等多种细胞。脑缺血损伤后, BMSCs 移植脑内可与宿主大脑细胞整合并长期存活, 并向神经元、星形胶质细胞及血管内皮细胞分化^[1-2]。因此, BMSCs 移植被认为是治疗脑缺血理想的新途径^[3-4]。BMSCs 移植治疗脑缺血损伤的研究报道渐多, 但 BMSCs 移植后在脑内的存活率和向血管内皮细胞分化的比率较低, 提高其存活率及向神经细胞和血管内皮细胞的分化比率已成为研究的热点。本实验基于前期对脑脉通及其与 BMSCs 移植联合保护脑缺血损伤的作用研究^[5-6], 通过观察脑内移植的 BMSCs (Brdu 标记细胞) 和分化的血管内皮细胞 (Brdu 性/FⅧ 双标细胞) 变化, 以明确 BMSCs 移植后在脑内的迁移和存活, 以及向血管内皮细胞分化和成血管内皮细胞 (CD31⁺) 的特点, 并从对上述变化的影响观察脑脉通对其存活和分化的作用。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠, SPF 级, 3~4 月龄, 145 只, 雌性 73 只, 雄性 72 只, 体重 (300 ± 50) g, 由河南省实

验动物中心提供, 合格证号 410117 号, 许可证号 SCXK(豫)2005-0001。

1.2 药品与试剂 培养基 D-MEM/F-12 (Gibco Invitrogen Corporation), 胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司, 批号 051126), 0.25% 胰酶 (Sigma-Aldrich Company, Ltd. 05401236)。兔抗大鼠 Brdu 抗体 (福州迈新生物技术开发有限公司, 批号 MS-1848); Brdu/FⅧ 免疫双标试剂盒 (批号 BA0599), 兔抗大鼠 CD31⁺ 抗体 (1:100) 试剂盒 (批号 BA0568), 羊抗大鼠 IgG-生物素 (批号 BA1005), 柠檬酸盐缓冲液 (批号 AR0024), 正常山羊血清封闭液 (批号 AR0009), DAB 显色试剂盒 (批号 AR1022), 均为武汉博士德生物工程有限公司。

脑脉通颗粒 (方药组成: 大黄 9 g, 葛根 9 g, 人参 6 g, 川芎 6 g。河南中医学院第一附属医院制剂室提供, 批号 050407, 每 1 g 脑脉通含生药 3.75 g)。

1.3 仪器 Japan PM-10AD 型倒置相差显微镜 (Olympus optical Co. LTD), 二氧化碳培养箱 (Sheldon Manufactureing, Inc. 型号 T02323), 5W-CJ-1F 型超净工作台 (苏州净化仪器厂), 混纤维滤膜 (上海瑞丽分离仪器厂吴泾分厂), 细胞定量采集

管(江苏通州市平潮镇求新玻璃仪器厂),41N5100-44800型图像分析系统 Image-Proplus5.1(Media Cybernetics Inc,USA)。

2 方法

2.1 局灶性脑缺血动物模型 参照改良的 Longa 法线栓阻塞大鼠大脑中动脉制备局灶性脑缺血动物模型^[7]。10%水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠,颈前正中切口,左侧钝性分离颈总动脉(CCA);分离颈内外动脉,结扎翼颞动脉,颈外动脉近动脉分叉处剪口,栓线穿入颈内动脉,穿线成功后留出残断,缝合皮肤,并在切口处滴注射青霉素钠溶液,手术过程中保持大鼠肛温 37℃,术后 ip 青霉素钠盐,4 万 U/d,预防感染发生。

2.2 骨髓间充质干细胞的培养、扩增、标记与移植^[8]

2.2.1 骨髓间充质干细胞悬液制备^[8] 取 2 月龄(平均 250 g)的 SD 雄性大鼠,将大鼠断颈处死,无菌条件下取出股骨、胫骨,除去骨表面附着组织。用 D-MEM/F-12 培养液(含 1 万单位的肝素)10 mL 反复冲洗骨髓。充分吹打混匀后加入 5 mL D-MEM/F-12 培养基,重悬,收集骨髓细胞悬浮液。

2.2.2 骨髓间充质干细胞的培养、扩增与标记 于收集到的骨髓细胞悬浮液中加入含 10% FBS 的胎牛血清的 D-MEM/F-12 培养液,置于体积分数 0.05(即 5%)的 CO₂ 培养箱内,3 d 后半量换液,5 d 后全量换液,弃去未贴壁的细胞后继续培养,倒置显微镜下逐日观察细胞形态及生长,待细胞基本长满瓶底时(>80%)加入 0.25% 胰酶进行消化,胎牛血清终止消化,结束原代培养;移植前 48 h 对第 5 代细胞用终浓度为 10 μmol·L⁻¹ 的 Brdu 溶液进行标记。

2.2.3 骨髓间充质干细胞的重悬、计数与移植 移植前 48 h 对已标记的细胞进行离心,收集,用生理盐水漂洗 3 次,进行细胞计数,重悬,每 0.2 mL 生理盐水的细胞数为 2 × 10⁶ 个,单细胞悬液经颈内动脉移植入脑。

2.3 分组与用药 SD 大鼠按随机数字表法分为假手术组、模型组、BMSCs 移植组(简称移植组)、BMSCs 移植联合脑脉通组(简称联合组),假手术组 10 只大鼠,其余 4 组各 45 只大鼠又根据取材时间不同各分为 3 组,即 7,14,28 d 组。

术前 4 d 脑脉通组和联合组分别给予 10 mL·kg⁻¹ 脑脉通颗粒(405 mg·kg⁻¹·d⁻¹,40.5 g·L⁻¹) 10 mL·kg⁻¹ 灌胃,假手术组、模型组和移植组以同等体积的生理盐水灌胃,每日 1 次;术后 3 h 缓慢拔出栓

线进行再灌注;再灌注后 24 h 移植组和联合组颈内动脉给予 BMSCs 悬浮液 200 μL,模型组、脑脉通组颈内动脉给予和 BMSCs 同等体积的生理盐水;移植后脑脉通组和联合组大鼠分别给予脑脉通灌胃,模型组和移植组大鼠给予同等体积的生理盐水灌胃,每周根据大鼠体重调整药量,每天 1 次,直至取材。

2.4 处理与取材 假手术组大鼠于术后 28 d 取材,模型组、移植组、联合组大鼠根据取材要求的时间点分别于颈总动脉用药后 7,14,28 d 麻醉大鼠,用 4% 的多聚甲醛溶液经升主动脉进行灌注固定,取出全脑,用 4℃ 生理盐水冲洗 3 次,除去积血,滤纸吸去表面水分,去除嗅球、小脑和脑干。冰盘上迅速分离大脑半球,弃去右侧大脑半球,取左侧半球,从额极向后冠状切取脑组织 1 mm,旁开 3 mm 切取 3 块 1 mm × 1 mm × 1 mm 标本用 4% 戊二醛溶液固定,待做电镜检测;依次向后冠状切取约 2 mm 厚的脑组织,置入 4% 多聚甲醛溶液(pH 7.40),待行 HE 染色和免疫组化测定。

2.5 指标测定

2.5.1 脑组织超微结构观察 处死动物在断血供后 2 min 之内选取在额极后 4.0 mm,中线旁开 4.0 mm 处的左侧皮层脑组织块 1 mm³,将样品放入 4% 戊二醛内进行前固定;24 h 后更换固定液,用 2.5% 戊二醛固定液再次前固定;0.1 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 10 min,3 次;1% 锇酸溶液后固定 2 h;乙醇梯度逐级脱水,丙酮再度脱水;不同比例的丙酮与树脂混合液浸透,纯树脂再浸透;样品放入盛有环氧树脂 812,815 包埋液的包埋板中包埋;置于不同梯度温度的烤箱中聚合;用 Leica 超薄切片机,将样品切成厚 50 nm 的超薄切片;醋酸铀和柠檬酸铅双重电子染色;日立 H-7500 型透射电子显微镜观察、照相,加速电压 80 kV。

2.5.2 脑组织 CD31⁺ 免疫组织化学染色及观察 染色步骤参照免疫组化操作过程。CD31⁺ 表达在血管上,阳性表达呈棕褐色,阴性呈蓝色;显微镜观察大鼠脑组织缺血侧 CD31⁺ 表达,随机选取缺血侧皮层 3 个视野;每组观察 6 张切片,合计 18 个视野;图像分析系统 Image-Proplus5.1 进行图像采集(显微镜 20 × 10 倍);每幅图像采用盲法进行分析测量,设定图像分析系统的最大灰度级为(C_{max})256,最大吸光度值(D_{max})为 2,阳性表达的灰度值与吸光度呈反函数,灰度值的大小与阳性表达呈负相关,即阳性表达的吸光度大小与细胞阳性表达的强弱呈正相关;测定阳性表达的面积密度(Area)和平均吸光度

(A), 计算整合吸光度 (IA), 计算公式 $IA = Area \times A$ (mean); 以每视野阳性细胞的 IA 进行数据统计; 阳性细胞个数越多、阳性反应的 IA 越大, 表示反应越强。

2.5.3 脑组织 Brdu 免疫组化染色及观察 参照 2.5.2 过程。一抗用兔抗大鼠 Brdu 抗体。观察 Brdu 细胞经动脉移植后在脑组织的数量变化、分布与迁移。Brdu 细胞免疫组化染色细胞显微镜下呈黑色或蓝黑色, 在脑组织缺血侧 Brdu 细胞丰富区域, 选取不重叠的 5 个视野进行观察, 对每个视野观察到的 Brdu 细胞进行计数; 每组观察 6 张切片, 合计 30 个视野。统计每张切片的 5 个视野下观察到的 Brdu 细胞个数, 取其均值 (单位: 个/视野), 或对 5 个视野的细胞总和纳入统计 (单位: 个/5 视野)。

2.5.4 脑组织 Brdu/VIII 免疫双标细胞染色及观察 Brdu/VIII 免疫双标细胞染色参照免疫双染法操作过程进行。通过 Brdu/VIII 双标细胞观察脑组织内骨髓间充质干细胞向血管内皮细胞的分化。VIII 阳性表达发生在微血管, 阳性染色呈红褐色, 如条索状; Brdu 染色在细胞核; 未分化的 Brdu 细胞显微镜下呈黑色或蓝黑色, 呈小圆形; 分化为血管内皮细胞 (Brdu/VIII 免疫双标细胞) 的染色特点为细胞核呈 Brdu 的黑色或蓝黑染色, 胞浆呈红褐色。在脑组织缺血侧 Brdu 和 Brdu/VIII 双标细胞丰富区域, 选取不重叠的 5 个视野进行观察, 对每个视野观察到的 Brdu 和 Brdu/VIII 双标细胞分别计数; 每组观察 6 张切片, 合计 30 个视野。统计每张切片的 5 个视野下观察到的 Brdu 和 Brdu/VIII 双标细胞个数, 对 5 个视野的 Brdu 和 Brdu/VIII 细胞分别计其总和, 计算 Brdu 细胞向神经胶质细胞的分化率, 分化率计算公式: 分化率 = (Brdu/VIII 双标细胞) / (Brdu + Brdu/VIII 双标细胞) $\times 100\%$ 。

2.6 统计学处理方法 用 SPSS 11.0 For Windows 软件进行统计处理。对数据资料进行正态分布检验, 符合正态分布者采用单因素方差分析, 不符合正态分布者进行数据转化后比较, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 一般观察 BMSCs 在脑内的分布随移植后时间的延长而增多, 移植后早期 (7 d), 大多 BMSCs 位于血管腔内, 脑实质内有少量散在的 BMSCs, 脑组织内的 Brdu 细胞大多未发生分化, 免疫双标 Brdu/VIII 少见; 移植后中期 (14 d), BMSCs 大多进入脑实质内, 并向缺血侧皮层迁移, 血管腔内可见到少数标

记的 BMSCs; 移植后期 (28 d), BMSCs 全部进入脑实质内存活, 血管腔内未见 Brdu 细胞, 表明移植脑内存活的 BMSCs 已全部由血管进入脑内, 并迁移至缺血侧皮层; 联合脑脉通可使存活的 BMSCs 数量明显增多。

3.2 脑组织微血管内皮细胞超微结构变化 假手术组大鼠脑皮质微血管结构完整, 内皮细胞胞浆正常, 无水肿, 内皮细胞表面伸出数个微绒毛向管腔突起。模型 7 d 组大鼠毛细血管官腔狭窄, 血管内皮细胞的粗面内质网有脱颗粒现象, 吞饮小泡数量减少; 模型 14 d 组大鼠血管内皮细胞吞饮小泡数量明显减少; 模型 28 d 组大鼠血管内皮细胞线粒体嵴和膜融合, 吞饮小泡数量减少。移植 7, 14 d 组大鼠血管内皮细胞微绒毛数量减少明显, 28 d 损伤减轻。各联合组大鼠的血管内皮细胞线粒体损伤程度减轻。

3.3 大鼠脑组织 Brdu 标记细胞变化 移植组、联合组大鼠 Brdu 标记细胞进入脑组织并存活 ($P < 0.01$)。联合组大鼠 14, 28 d 脑内 Brdu 标记细胞均较移植组显著增多 ($P < 0.05, P < 0.01$)。不同时间点比较, 移植组和联合组大鼠脑内 Brdu 标记细胞分别较其 7 d 组显著增加 ($P < 0.01$); 与 14 d 组比较, 移植组、联合组 28 d 的 Brdu 标记细胞变化无显著的统计学差异。表 1。

表 1 脑脉通对脑缺血大鼠 BMSCs 脑内移植对脑组织 Brdu 标记细胞和 Brdu/VIII 双标细胞的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$) 个/视野

组别	时间 /d	剂量 /g·kg ⁻¹	Brdu 标记细胞	Brdu/VIII 双标细胞
移植 ⁵⁾	7	-	25.50 \pm 5.54	2.67 \pm 0.52
	14	-	33.83 \pm 3.19 ³⁾	8.00 \pm 0.67 ³⁾
	28	-	33.17 \pm 1.72 ³⁾	6.67 \pm 0.82 ^{3,4)}
移植 + 脑脉通	7	0.405	27.83 \pm 4.17	6.37 \pm 0.52 ²⁾
	14	0.405	38.67 \pm 4.46 ^{1,3)}	19.50 \pm 3.02 ^{2,3)}
	28	0.40	35.50 \pm 2.59 ^{1,3)}	10.67 \pm 1.33 ^{2,3,4)}

注: 与移植组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 同一剂量组内与 7 d 组比较³⁾ $P < 0.01$; 同一剂量组内与 14 d 组比较⁴⁾ $P < 0.01$, ⁵⁾ BMSCs 2×10^6 个细胞经颈内动脉移植入脑。

3.4 各组大鼠脑组织 Brdu/VIII 双标细胞变化 移植组与联合组大鼠各时间点 Brdu/VIII 双标细胞在脑组织内存活 ($P < 0.01$)。各联合组大鼠脑内 Brdu/VIII 双标细胞数量均较移植组增多 ($P < 0.05, P < 0.01$)。不同时间点比较, 移植组、联合组大鼠脑内 14, 28 d 的 Brdu/VIII 双标细胞数量均较 7 d 增加,

28 d较14 d减少($P < 0.01$)。表1。

3.5 各组大鼠脑组织 CD31⁺表达变化 假手术组脑组织 CD31⁺表达明显;各模型组大鼠 CD31⁺表达较假手术组显著减弱($P < 0.01$);与模型组比较,移植组14,28 d的 CD31⁺表达增强($P < 0.01$);与移

植组比较,各联合组 CD31⁺表达显著增强,以28 d尤为显著($P < 0.01$)。不同时间点组比较,模型组14,28 d的 CD31⁺表达均较7 d组减弱,移植组和联合组14,28 d较其7,28 d较14 d的表达增强($P < 0.01$)。表2。

表2 脑脉通对脑缺血大鼠 BMSCs 脑内移植脑组织 CD31⁺表达 (IA) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

$\times 10^{-4}$

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	CD31 ⁺		
		7 d	14 d	28 d
假手术	-	49.23 ± 6.17	49.23 ± 5.17	49.23 ± 5.17
模型	-	25.14 ± 5.47 ¹⁾	15.25 ± 4.50 ^{1,4)}	18.91 ± 3.25 ^{1,4)}
移植 ⁶⁾	-	27.58 ± 4.14	30.36 ± 5.74 ^{2,4)}	41.12 ± 6.71 ^{2,4,5)}
移植+脑脉通 ⁶⁾	0.405	31.58 ± 5.31 ^{2,3)}	40.24 ± 6.02 ^{2,3,4)}	56.42 ± 7.16 ^{2,3,4,5)}

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与移植组比较³⁾ $P < 0.01$;与同组内7 d组比较⁴⁾ $P < 0.01$,与14 d组比较⁵⁾ $P < 0.01$;⁶⁾BMSCs 2×10^6 个细胞经颈内动脉移植入脑。

3 讨论

BMSCs 治疗脑卒中的作用机制可能是多方面的,有学者提出^[9],治疗的不同阶段,移植的细胞发挥着不同作用,在早期阶段,可能主要与细胞产生的营养因子有关;晚期阶段,则主要是由 BMSCs 移植后分化为神经细胞和血管内皮细胞,以促进神经细胞修复和血管再生,发挥神经功能重建作用。其中 BMSCs 促进缺血区血管新生的途径可能与其向血管内皮细胞分化有关^[10-12]。本实验采用双标法观察 BMSCs 移植后在脑内的存活、迁移与分化,发现移植脑内的 Brdu 阳性标记细胞呈黑色或蓝黑色;随着移植后时间的延长, BMSCs 穿过血管,向缺血皮层迁移并聚集;移植后7 d约有少数细胞在缺血侧脑组织内存活,而未受损侧脑组织内少见 Brdu 标记细胞,多数细胞聚集在皮层血管,并贴附血管内在管腔内存活,这与已有的报道一致^[13-14]。本实验结果表明,移植后14 d,大多 Brdu 细胞在缺血侧脑实质内存活,主要分布在皮层,血管内可见到少数 Brdu 标记细胞,该结果与许予明等^[15]报道一致。可见, BMSCs 存活的数量随移植脑内时间的延长而呈增加趋势;移植28 d后, Brdu 标记细胞全部由血管进入脑内;脑脉通可使移植脑内的 BMSCs 成活增多。

本实验通过观察 VIII 因子抗体变化,以明确 BMSCs 向血管内皮细胞的分化情况。移植后7、14、28 d, BMSCs 向血管内皮细胞分化比率呈先增强再减弱的趋势,移植后14 d向血管内皮细胞的分化率达到峰值,此后逐渐下降; BMSCs 在脑内向血管内皮细胞的分化比率随移植后时间的延长出现先增强后减弱的变化趋势;脑脉通可使 BMSCs 向血管内皮

细胞分化的作用增强。此外, CD31 等阳性细胞是成熟的内皮细胞的特异性标志,表明分化的血管内皮细胞形成了血管样结构。本实验结果显示,脑脉通可使 BMSCs 向血管内皮细胞分化的比率增高,并使其成血管样作用明显增强,其确切的作用机制有待更为深入的研究。

[参考文献]

[1] Choong P F, Mok P L, Cheong S K, et al. Generating neuron-like cells from BM-derived mesenchymal stromal cells *in vitro* [J]. *Cytherapy*, 2007, 9(2):170.

[2] 冯海燕,刘瑞凤,张开明. 人骨髓间充质干细胞体外分离培养及向血管内皮样细胞分化的研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2010, 26(1):70.

[3] Alberti E, Los M, Garcia R, et al. Prolonged survival and expression of neural markers by bone marrow-derived stem cells transplanted into brain lesions [J]. *Med Sci Monit*, 2009, 15(2):47.

[4] Chen J R, Cheng G Y, Sheu C C, et al. Transplanted bone marrow stromal cells migrate, differentiate and improve motor function in rats with experimentally induced cerebral stroke [J]. *J Anat*, 2008, 213(3):249.

[5] 刘敬霞,李建生,赵跃武,等. 脑脉通联合骨髓间充质干细胞经动脉移植保护大鼠脑缺血损伤的研究[J]. *中医研究*, 2007, 6(6):12.

[6] 王明航,李建生,刘轲,等. 脑脉通对老龄大鼠脑缺血再灌注血-脑脊液屏障损伤的保护作用[J]. *中国老年学杂志*, 2006, 26(9):1211.

[7] 曹勇军,程彦斌. 线栓法建立大鼠局灶性脑缺血/再灌注模型的改进与探讨[J]. *中国应用生理学杂志*, 2001, 17(2):198.

覆盆子有效部位改善肾阳虚型痴呆大鼠 学习记忆作用机制研究

黄丽萍,熊玉洁,赵梦岚,龚嘉华,谢一辉*
(江西中医药大学,南昌 330004)

[摘要] 目的:考察覆盆子有效部位对 *D*-半乳糖联合氢化可的松造成肾阳虚型痴呆大鼠的影响,初步阐明覆盆子有效部位改善肾阳虚型痴呆大鼠学习记忆的作用机制。**方法:**大鼠 ip *D*-半乳糖 125 mg·kg⁻¹,连续 6 周,后 2 周 im 氢化可的松混悬液 25 mg·kg⁻¹,造成肾阳虚痴呆模型,空白组和模型组灌胃生理盐水,其余各组每天均预防性灌胃覆盆子氯仿部位或乙酸乙酯部位高、低剂量(均按生药量计为 24,12 g·kg⁻¹),连续 4 周。进行历时 5 d 的 Morris 水迷宫实验后,取大鼠皮层进行乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AchE)和胆碱乙酰化转移酶(choline acyltransferase, ChAT)活性检测,取海马 CA1 区进行 HE 染色和 tau 蛋白免疫组织化学检测。**结果:**与空白组相比,模型组学习记忆能力下降,皮层 AchE 活性显著升高,ChAT 活性显著降低,海马 CA1 区 Pser404-tau 阳性细胞明显增加;与模型组比较,覆盆子氯仿部位高、低剂量组、覆盆子乙酸乙酯部位高、低剂量组均能不同程度改善痴呆大鼠学习记忆能力,降低皮层 AchE 活性,升高 ChAT 活性;增加海马 CA1 区细胞总数,减少坏死细胞数,降低细胞坏死率;减少海马 CA1 区 Pser404-tau 阳性细胞数。**结论:**覆盆子有效部位可能通过降低 AchE 活性,升高 ChAT 活性,保护海马 CA1 区神经元,减少 tau 蛋白表达而起到改善肾阳虚型痴呆大鼠学习记忆。

[关键词] 覆盆子; 痴呆; 胆碱能功能; 神经元保护; tau 蛋白磷酸化

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)19-0192-05

[doi] 10.11653/syjf2013190192

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130807.1119.001.html>

[网络出版时间] 2013-08-07 11:19

Mechanism of *Rubus chingii* Effective Position on Learning and Memory Abilities in Kidney-yang Deficiency AD Rats*

HUANG Li-ping, XIONG Yu-jie, ZHAO Meng-lan, GONG Jia-hua, XIE Yi-hui*
(Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[收稿日期] 20130121(012)

[基金项目] 国家自然科学基金课题(30960496)

[第一作者] 黄丽萍,博士,教授,硕士生导师,从事中药药理学研究,Tel:0791-87118919,E-mail:jxnchlp@163.com

[通讯作者] *谢一辉,教授,硕士生导师,从事中药活性成分分析研究,Tel:0791-87118917,E-mail:xieyh6152003@yahoo.com.cn

- [8] 黄谦,吴涛,梁杰,等. 全骨髓培养法和密度梯度离心法分离 hBMSCs 的比较研究[J]. 中国修复重建外科杂志,2009,23(11):1360.
- [9] Wang L, Li Y, Lu D, et al. Neurotrophins promote bone marrow stromal cells (MSCs) to express neural proteins *in vitro*[J]. Stroke, 2011,32(2):334.
- [10] 王莹,李文媛,李明秋,等. 黄芪皂甙 IV 联合骨髓间充质干细胞对脑缺血再灌注大鼠血管生成的影响[J]. 解剖学研究,2011,33(5):323.
- [11] Yin Y Y, Li W P, Gong H L. Protective effect of astragaloside on focal cerebral ischemia reperfusion injury in rats[J]. Am J Chin Med,2010,38(3):517.
- [12] 何凤璞,汪黎明,陈文,等. 大鼠骨髓间充质干细胞体外诱导分化为血管平滑肌样细胞的实验研究[J]. 中国胸心血管外科临床杂志,2011,18(3):236.
- [13] 张琳,刘广义. 骨髓间充质干细胞移植在脑缺血损伤中的作用与生长相关蛋白-43 表达的相关性[J]. 中国康复,2011,26(3):167.
- [14] 冯念苹,曲福军,梁松岚,等. 骨髓间充质干细胞移植治疗大鼠脑缺血的实验研究[J]. 哈尔滨医科大学学报,2011,45(1):10.
- [15] 黄月,许予明,宋波,等. 骨髓间充质干细胞移植对缺血性脑损伤大鼠的作用及其机制研究[J]. 医药论坛杂志,2006,27(17):1.

[责任编辑 聂淑琴]