

学校编码: 10384
学号: 24520141153513

分类号____ 密级____
UDC____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

亚低温下骨髓间充质干细胞保护大鼠脑缺血损伤的机制研究

Effects of Bone Mesenchymal Stem Cells Transplantation
Combined with Therapeutic Mild Hypothermia on Recovery
of Neurological Functions and Its Mechanisms in Cerebral
Ischemia Injury in Rats

汪嘉伟

指导教师名称: 童绶君 教授

专业名称: 神经病学

论文提交日期: 2017年04月

论文答辩日期: 2017年05月

学位授予日期: 2017年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2017年5月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

中英文缩略词	VI
摘要	VII
Abstract	IX
第一章 前 言	1
第二章 实验材料和方法	5
2.1 BMSCs 的提取和培养	5
2.2 大鼠 MCAO 模型的构建	7
2.3 筛选符合标准的 MCAO 模型	11
2.4 实施亚低温治疗	11
2.5 侧脑室移植 BMSCs	12
2.6 神经功能缺损评分	15
2.7 2, 3, 5-三苯基氯化四氮唑 (TTC) 染色	17
2.8 大鼠脑组织免疫荧光染色	18
2.9 数据统计	20
第三章 实验结果	21
3.1 BMSCs 的分离与培养结果	21
3.2 大鼠 MCAO 动物模型构建的鉴定	23
3.3 大鼠 mNSS 评分结果及变化趋势	24
3.4 TTC 染色结果	25
3.5 脑组织免疫荧光染色结果	27
第四章讨论	30
第五章结论	43
参考文献	44
致谢	50

Table of Contents

Abbreviation	VI
Abstract in Chinese	VII
Abstract in English	IX
PART 1 Preface	1
PART 2 Research Design and Methods	5
2.1 The extraction and culture of rat BMSCs.....	5
2.2 Establishment of MCAO models.....	7
2.3 Filtering established MCAO.....	11
2.4 The implementation of mild hypothermia treatment.....	11
2.5 Lateral cerebral ventricle injection of BMSCs	12
2.6 Evaluation of neurological function.....	15
2.7 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) staining.....	17
2.8 Immunofluorescence staining.....	18
2.9 Statistical analysis.....	20
PART 3 Results	21
3.1 Extraction and culture of BMSCs results	21
3.2 Identification of MCAO model	23
3.3 Results of mNSS scores	24
3.4 Results of TTC staining	25
3.5 Results of immunofluorescence staining	27
PART 4 Discussion	30
PART 5 Conclusion	43
References	44

Acknowledgement.....50

厦门大学博硕士论文摘要库

中英文缩略词

CNS	central nervous system	中枢神经系统
BMSCs	bone marrow mesenchymal stem cells	骨髓间充质干细胞
MSCs	mesenchymal stem cells	间充质干细胞
MCAO	middle cerebral artery occlusion	大脑中动脉阻塞
tMCAO	transient middle cerebral artery occlusion	短暂性大脑中动脉阻塞
pMCAO	permanent middle cerebral artery occlusion	永久性大脑中动脉阻塞
mNSS	modified Neurological Severity Score	改良神经功能缺失评分
GFAP	glial fibrillary acidic protein	神经胶质纤维酸性蛋白
AS	astrocyte	星形胶质细胞
VEGF	vascular endothelial growth factor	血管内皮生长因子
CCA	common carotid artery	颈总动脉
ECA	external carotid artery	颈外动脉
ICA	internal carotid artery	颈内动脉
MCA	middle cerebral artery	大脑中动脉
ACA	anterior cerebral artery	大脑前动脉
TTC	2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride	2, 3, 5-三苯基氯化四氮唑
SVZ	sub-ventricular zone	侧脑室下区
BBB	blood-brain barrier	血脑屏障
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
PBS	phosphate buffer solution	磷酸盐缓冲液
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole	4', 6-二脒基-2-苯吲哚
BDNF	brain-derived neurotrophic factor	脑源性神经营养因子
GDNF	glial-derived neurotrophic factor	胶质源性神经营养因子
MMPs	matrix metalloproteinase	基质金属蛋白酶
bFGF	basic fibroblast growth factor	碱性成纤维细胞生长因子
BrdU	5-bromodeoxyuridine	5-溴脱氧尿嘧啶核苷
ERK	extracellular regulating kinase	细胞外信号调节蛋白激

摘要

研究背景和目的:

缺血性脑卒中是导致人类高致死率和致残率的主要疾病之一,至今仍缺乏真正有效的治疗措施。研究表明,通过移植 BMSCs (bone marrow mesenchymal stem cell)可缩小梗死面积,促进神经功能修复。亚低温(32~35℃)治疗可减小梗死灶体积,促进血管再生,减轻脑水肿,促进神经功能恢复。因此,本课题组联合这两种治疗方案以期获得最大治疗效果,为临床上脑血管疾病的治疗提供丰富的理论依据。

研究内容和方法:

采用密度梯度离心法与全骨髓细胞贴壁法相结合,提取、培养、鉴定以及 DAPI 标记 BMSCs。线栓法制备大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型。MCAO 术后立即实施亚低温治疗,持续 3 小时。MCAO 术后 24 小时侧脑室移植。在 MCAO 造模前、移植前、移植后 1d、5d 和 10d 行改良神经功能缺损评分(modified Neurological Severity Score, mNSS)。断头取脑,冠状位脑切片行 TTC 染色,计算梗死面积百分比。免疫荧光染色检测蛋白 GFAP (glial fibrillary acidic protein) 和 VEGF (vascular endothelial growth factor) 的表达及变化趋势。

结果:

大鼠 MCAO 术后,神经功能缺失明显,左侧肢体不同程度瘫痪。BMSCs 移植联合亚低温治疗显著降低 mNSS 评分($P<0.01$),减小梗死面积($P<0.01$),改善脑缺血大鼠预后,优于单方案治疗。免疫荧光染色显示, BMSCs 移植联合亚低温治疗, DAPI⁺GFAP⁺和 DAPI⁺VEGF⁺双标阳性细胞数和蛋白 GFAP 和 VEGF 荧光强度均有不同程度增加,优于单方案治疗。

结论:

两种治疗方案的脑保护机制各有侧重但又相互补充,联合治疗能够充分发挥两种治疗方案的优点,进一步减小梗死面积,改善大鼠神经功能,治疗效果优

于单方案治疗。

关键词：干细胞；亚低温；MCAO；

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

Background and Purpose

Ischemia stroke is one of the main central nervous system (CNS) disease, which causes greatly high mortality rate and disability rate. Nevertheless, up till now, no proper and effective treatments have been figured out to promote the regeneration of nerve cells. Numerous studies have illustrated that BMSCs (Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells) transplantation could reduce infarction size and promote recovery of neurological function on rats with acute ischemia stroke. Mild hypothermia, where the brain temperature stays at 32–35⁰C, also has been proved to bear the functions of lessening infarction size, promote angiogenesis, reduce cerebral edema and ameliorate neurological outcomes. Therefore, this study aims to fully examine the impacts and protective mechanisms of BMSCs transplantation combined with therapeutic mild hypothermia after cerebral ischemia injury on rats, and provide the theoretical basis for clinical application.

Methods

BMSCs were isolated using density gradient centrifugation method combined with adherent screening method, followed by purification, culture, identification and labeling with DAPI. The middle cerebral artery occlusion (MCAO) model was established by suture method, followed by the implementation of mild hypothermia treatment for 3 hours. 24 hours after MCAO, lateral ventricle transplantation was operated. All rats were examined at five respective time-points: before MCAO, before transplantation, at 1 day, 5 day and 10 day time-point after transplantation operation for tests on neurological function by means of mNSS (modified Neurological Severity Score). The percentage of infarction size was calculated by TTC staining. Using immunofluorescence staining to detect the expression and variation tendency of protein GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) and VEGF (Vascular Endothelial

Growth Factor) under 400X microscope.

Results

After MCAO operation, the neurological deficits were obvious with the left limb paralysis in varying degrees. BMSCs transplantation combined with mild hypothermia treatment significantly decreased mNSS score ($P < 0.01$) and reduced infarction size ($P < 0.01$) better than single treatment. Immunofluorescence staining showed that the number of DAPI⁺GFAP⁺ and DAPI⁺VEGF⁺ double-labeled positive cells and the expression of GFAP and VEGF increased sharply in the combination therapy group, better than single treatment.

Conclusions

Two types of therapeutic mechanisms of cerebral protection have different emphases, but complementary, and the combination therapy can give full play to the advantages of two treatment programs to lessen the infarction size and improve neurological function further.

Key words: stem cells; mild hypothermia; middle cerebral artery occlusion;

第一章 前言

缺血性脑卒中是造成人类高致死率和致残率的主要疾病之一。急性脑梗死后,对应梗死灶区域内的神经细胞的损伤甚至坏死,至今仍缺乏足够有效的治疗措施促进神经细胞再生,从而导致了患者运动、感觉以及认知功能障碍等神经功能缺失的症状和体征^[1],给患者本人带来了偌大的精神苦楚,以及给患者家庭和社会增添了厚重的经济负担。溶栓治疗,可在疾病早期使阻塞的血管再通,重建阻断的血流,挽救位于缺血半暗带区域内濒临死亡的神经元和神经胶质细胞。国内外临床指南推荐的在时间窗内尽早给予重组组织型纤溶酶原激活剂(rt-PA)溶栓治疗方案,是针对急性缺血性脑梗死最为有效的治疗措施,然而此方案的临床疗效受时间窗严格限制^[2]。静脉溶栓推荐的时间窗是4.5h,动脉溶栓建议不超过6h,但很多患者不能在有限的时间窗内到达医院实施溶栓,即便溶栓,也有可能发生脑出血及其他部位的出血等严重并发症,进一步增加死亡率,从而极大的限制了其应用^[3]。而且,即使缺血区在溶栓治疗后血流可以完全恢复,但缺血中心区神经元的死亡往往不可避免,因而会遗留一定程度的神经功能缺失症状。因此,研究出一项全新的、高效的脑梗死治疗方案的意义极其重大。

缺血性脑卒中事件一旦发生,由于脑组织新陈代谢率高,对缺血缺氧极为敏感,脑组织线粒体形态发生肿胀,失去正常生理功能,细胞释放大量的兴奋性神经递质(如:谷氨酸)进入细胞间隙以致堆积,引起谷氨酸中毒;胞外的钙离子内流增加,导致钙超载介导的神经细胞变性、坏死;氧自由基生成增多,造成脑组织进一步损伤等一系列级联反应。这些级联损伤反应是导致脑缺血事件发生后神经元死亡的主要原因。在低灌注核心区域周边发生代谢障碍和离子代谢失衡,但这些区域仍能保持正常结构完整,这区域既所谓的缺血半暗带^[4]。在当前治疗方案中,如何干扰、阻断和逆转上述缺血半暗带区域内的损伤级联反应的进展尤为重要。

细胞治疗,通过一系列内在机制增强机体内源性神经修复,从而发挥改善神经功能功效。骨髓间充质干细胞(BMSCs)是一群比较原始的、能自我传代更新并具有向多胚层分化潜能的细胞,能在一定的适宜微环境条件下跨胚层分化为神经

元、神经胶质细胞及血管内皮细胞^[5]。目前,大量动物实验研究表明,大鼠发生急性脑梗死后移植 BMSCs 能够缩小梗死体积和促进神经功能修复^[6-8]。BMSCs 通过自身分泌生长因子和营养因子或者通过刺激机体内源性细胞释放营养因子而在脑缺血疾病的临床治疗和康复中发挥重要作用。BMSCs 这种在体外特定微环境条件下跨胚层横向分化为神经元以及神经胶质细胞的生物特性,可作为理想的种子细胞替代神经干细胞治疗脑缺血、帕金森病等中枢神经系统疾病,为脑血管疾病治疗提供理论依据和思路。BMSCs 作为脑缺血治疗的理想种子细胞具有如下几种特点: 1. 取材方便,提取自 SD 大鼠胫骨骨髓,通过密度梯度离心法和全骨髓细胞贴壁法等分离方法,可大量体外扩增,且能够诱导分化为神经元样以及神经胶质样细胞; 2. 可自体移植,不产生伦理争论; 3. 干细胞免疫原性较弱,不产生免疫排斥反应,进入机体内有足够数量移植细胞发挥移植效应; 4. 进入脑组织内,能够在脑缺血微环境下存活、迁移、分化为神经细胞; 5. BMSCs 能够转染和表达外源性基因,通过结合细胞治疗和基因治疗,更加有利于损伤的中枢神经系统修复; 6. BMSCs 能够分泌多种细胞因子,如 VEGF,在神经系统损伤修复进程中发挥举足轻重作用; 7. BMSCs 能够跨越血脑屏障 (BBB),进入缺血损伤处发挥治疗效应。因此, BMSCs 可作为较理想的种子细胞,用于治疗衰老和创伤导致的神经系统病变。

亚低温治疗,将大脑温度控制在 32~35℃的治疗方法,被证明能够在局灶性脑缺血的动物模型治疗中发挥脑保护效应。近数十年来,大量文献报道了亚低温对脑缺血导致的神经元损伤起保护作用^[9-11]。Schwab 等^[12]曾对脑梗死面积较大的患者实施全身性亚低温治疗,发现患者脑水肿症状减轻,而且患者临床预后得以改善。Clark 等^[13]报道了低温能减轻局灶性脑缺血后大鼠神经功能缺失症状,减少梗死灶体积,促进损伤后修复。亚低温能够在脑梗死急性期和亚急性期内发挥重要作用,通过降低脑部体温,减慢脑血流,氧合血红蛋白解离曲线发生左移,氧与血红蛋白结合紧密,组织利用氧减少,降低脑组织代谢率。通过降低大脑代谢,保存大脑代谢物质储备(如: ATP),低温治疗能够延缓无氧代谢,防止乳酸生成增加,维持机体内环境 PH 稳定,从而降低酸中毒的可能。同时,低温能够促进离子保持稳态,并且阻断或减慢多种破坏性神经兴奋性级联反应进程,比如钙内流、谷氨酸堆积以及其共同受体激动剂甘氨酸的释放^[14,15]。而且,低温治疗

还能够脑缺血发生后早期阶段阻断细胞凋亡^[16]。实施亚低温治疗的优势：1. 非侵入性操作，不会破坏脑组织；2. 非药物性治疗，后遗副作用小；3. 可操作性强，通过体外控制温度，即可调控机体内部大体温度。因此，亚低温对治疗脑血管意外具有一定的保护作用。

脑梗死后多种细胞及细胞因子直接或间接参与脑组织缺血后的炎症反应及神经修复过程，在梗死后急性期和亚急性期时间内的一些与神经系统修复过程相关蛋白及细胞因子的变化规律仍在进一步研究中。梗死灶以及缺血半暗带区域内的组织和细胞在病理及形态上将发生一系列的改变，如脑组织变的疏松，神经细胞肿胀变性、凋亡甚至直接死亡，梗死面积发生变化。

GFAP，系神经胶质纤维酸性蛋白，是星形胶质细胞（astrocyte, AS）特异性生物标志物，是一种III型中间丝状蛋白，参与构成细胞骨架并维持其张力强度。中枢神经系统（CNS）主要是由神经元和神经胶质细胞构成。AS 数量庞大，是神经元数量的 5 倍之多，为 CNS 提供充足营养物质，维持神经细胞的物质代谢，调节神经突触活动，维持突触间的稳态。当发生脑缺血事件后，AS 可保护神经元免遭氧化应激损伤。当脑缺血损伤时，内源性 AS 可活化并增生，其可通过摄取兴奋性毒性神经递质谷氨酸盐，参与神经系统的重构，也可促进血管再生，改善血脑屏障通透性，从而促进神经功能恢复，发挥脑保护效应。在脑缺血急性期内，反应性 AS 开始增生，形成隔断谷氨酸释放的机械屏障，维持缺血半暗带区域的离子浓度动态平衡，从而可保护缺血半暗带区域内的神经细胞免遭凋亡，从而利于神经功能恢复。

VEGF, 系一种血管内皮生长因子，能够促进血管再生和神经发育^[17]。梗死灶内的血管再生被认为在调节梗死后神经元的存活及再生中起重要作用。梗死灶区域内的血管不仅仅是简单的运输营养物质的工具，更重要的是其在损伤反应中扮演重要角色，如介导炎症反应等。VEGF 在脑组织内具有较强促血管再生功能，促进新生血管成熟，在脑组织内产生神经营养作用，发挥脑保护效应。脑缺血损伤本身可刺激脑组织内源性血管再生，改善神经功能，但仍不足以改善临床预后。既往研究表明，BMSCs 在体外培养可分泌 VEGF 和血管生成素-1（Ang-1）^[18,19]。据此，BMSCs 移植可通过自身分泌 VEGF 及促进宿主细胞分泌 VEGF 发挥促血管再生作用，进而产生脑保护效应。

大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA)是颈内动脉(internal carotid artery, ICA)在颅内段的直接延续,是 ICA 的所有分支中直径最粗大的一支,呈水平位向前外横越前穿质,进入大脑外侧裂,接受通过 ICA 达 80%的血流。因此,大多数进入颅内的栓子易栓塞在大脑中动脉系统内。ICA 供血区的脑组织在功能上极其重要,一旦发生栓塞便可引起严重的临床症状,如“三偏”。因此,对大脑中动脉栓塞的研究极为重要,是如今脑血管意外的重点研究方向。通过构建大鼠 MCAO 模型,可为研究脑血管缺血性疾病提供临床模型,为研究脑缺血疾病病理生理变化提供实体,更为寻找最佳治疗脑血管疾病方法提供合适“病人”。

鉴于此, BMSCs 移植和亚低温治疗都能通过各自的治疗机制而在脑缺血的治疗中发挥举足轻重的作用,因此,我们猜想可否联合这两种治疗方案以获得最大治疗效果,以最大程度的改善脑缺血患者的预后。

本实验根据 BMSCs 贴壁生长等生物特性,应用全骨髓细胞贴壁法与密度梯度离心法相结合方法体外分离、培养以及传代培养大量 BMSCs。本实验还通过构建大鼠 MCAO 模型,术后立即实施亚低温治疗 3h,将 BMSCs 制成单细胞悬液,于 MCAO 术后 24h 侧脑室移植入大鼠脑组织内,通过 mNSS 评分量表、TTC 染色和免疫荧光染色等检测方法,观察 BMSCs 移植联合亚低温治疗对大鼠神经功能影响、梗死面积变化以及 BMSCs 在脑组织内的存活、迁移和分化情况,探索联合治疗的治疗效果及其可能的保护机制,为临床应用提供理论依据。

第二章 材料和方法

一 BMSCs 的提取和培养

1 实验材料与仪器

1.1 实验材料

- (1) DMEM/F12 培养基: GIBCO (美国) 公司;
- (2) 胎牛血清: GIBCO (美国) 公司;
- (3) CD29-PE 抗体: ebio, 12-0291;
- (4) CD105-PE 抗体: ebio, 17-1051;
- (5) CD45-PE 抗体: ebio, 8012-9459;
- (6) 青霉素、链霉素 (双抗): Gibco (美国) 公司;

1.2 实验仪器

- (1) 二氧化碳培养箱: 3111 型, Thermo 公司;
- (2) 流式细胞仪: Accuri C6 型, BD 公司;
- (3) 台式低速离心机: 80-2 型, 上海医疗器械 (集团) 有限公司;
- (4) 细胞培养皿: Fisher Scientific (美国) 公司;

2 原代 BMSCs 的分离提取

- (1) 取数只约两周龄大小的 Sprague-Dawley(SD)大鼠颈椎脱臼处死后, 立即用浓度为 75%的酒精浸泡 10 min;
- (2) 在无菌条件下, 迅速切开大鼠的下肢皮肤, 逐层分离皮下组织、肌肉、筋膜至骨, 取大鼠双侧股骨及胫骨;
- (3) 将取下的股骨及胫骨移至无菌小盘中 (置于冰盒上), 去除表面鼠毛和附着的残余肌肉组织, 再用无菌无血清低糖 DMEM/F12 培养基反复冲洗数次;
- (4) 用剪刀剪去股骨及胫骨的两侧骨骺, 暴露出骨髓腔, 用 20ml 注射器吸取无血清低糖 DMEM/F12 培养液冲洗骨髓腔, 从骨髓腔两端冲洗数次, 直至股

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库