

骨髓间充质干细胞旁分泌作用与脑缺血后的细胞凋亡**

程 峰, 李立新, 郝怀勇, 田和平, 代学良, 胡卫星

Paracrine action of bone marrow mesenchymal stem cells and cell apoptosis following cerebral ischemia

Cheng Feng, Li Li-xin, Hao Huai-yong, Tian He-ping, Dai Xue-liang, Hu Wei-xing

Abstract

BACKGROUND: One of mechanisms involved in treating cerebral ischemia with bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) implantation is paracrine action. However, few studies have reported this mechanism.

OBJECTIVE: To observe the inhibitory effect of BMMSCs paracrine action on apoptosis and its mechanism after cerebral ischemia.

METHODS: BMMSCs were isolated from rats with adherent culture. Rat cerebral ischemia model was established by the middle cerebral artery occlusion. A total of 24 rats were divided into 4 groups, with 6 animals in each group. Cell implantation medication group: rats were received U0126 medication after BMMSCs implantation; Non-implantation medication group: rats were received U0126 medication after PBS injection; Cell implantation control group: received solvent medication after BMMSCs implantation; Non-implantation control group: received solvent medication after PBS injection. At 7 days after operation, the expressions of vascular endothelial cell growth factor (VEGF) and p-ERK1/2 protein were measured by Western blot analysis, and the apoptosis cells in the area of ischemic penumbra and cortex were examined by TUNEL.

RESULTS AND CONCLUSION: The VEGF protein content in the brain tissue was significantly greater in the cell implantation groups than that of the non-implantation group, with increased p-ERK1/2 and decreased apoptosis cells. The expression of p-ERK1/2 was down-regulated in rats which were administrated U0126 while the number of the apoptosis cells was increased, but the VEGF protein expression had no statistical difference. It suggested that BMMSCs can paracrine VEGF in the striatum of brain and play an inhibitory effect on apoptosis in the ischemia area via activating ERK1/2.

Cheng F, Li LX, Hao HY, Tian HP, Dai XL, Hu WX. Paracrine action of bone marrow mesenchymal stem cells and cell apoptosis following cerebral ischemia. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(1): 1-5.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 骨髓间充质干细胞移植治疗脑缺血的机制之一是骨髓间充质干细胞的旁分泌作用, 而目前对于这一机制的研究报道较少。

目的: 观察骨髓间充质干细胞旁分泌作用对脑缺血后细胞凋亡的抑制作用并探索相关机制。

方法: 体外培养大鼠骨髓间充质干细胞, 建立大鼠大脑中动脉缺血模型。24只SD大鼠随机数字表法分为4组, 每组6只。细胞移植给药组: 大鼠纹状体内移植骨髓间充质干细胞后给予ERK1/2抑制剂U0126; 非移植给药组: 注射等量的PBS后给予U0126; 细胞移植对照组: 移植骨髓间充质干细胞后给予溶剂对照; 非移植对照组: 注射等量的PBS后给予溶剂对照。7d后通过Western blot检测血管内皮细胞生长因子、磷酸化ERK1/2蛋白的表达; TUNEL染色检测梗死区周围及皮质区细胞凋亡情况。

结果与结论: 细胞移植组较非移植组大鼠纹状体内血管内皮细胞生长因子蛋白的表达明显增高, 磷酸化ERK1/2表达增强, 细胞凋亡数明显减少; 经U0126处理后, 血管内皮细胞生长因子的表达没有变化, 而随着磷酸化ERK1/2的表达受到抑制, 细胞凋亡数明显增高。提示骨髓间充质干细胞在大脑纹状体内可以旁分泌血管内皮细胞生长因子, 并通过激活ERK1/2抑制了脑梗死区细胞的凋亡。

关键词: 旁分泌; 骨髓间充质干细胞; 血管内皮生长因子; 凋亡; 脑缺血

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.01.001

程峰, 李立新, 郝怀勇, 田和平, 代学良, 胡卫星. 骨髓间充质干细胞旁分泌作用与脑缺血后的细胞凋亡[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(1):1-5. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有很强的自我更新和跨胚层分化潜能, 在体外MSCs不仅可以分化为成骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞、心肌细胞及其他一些间质细胞系^[1-2], 而且在合适的条件下还可以分化为神经细胞^[3], 对移植治疗帕金森病、阿

尔茨海默病、脊髓损伤、脑卒中等神经系统疾病有着重要价值^[4-7]。MSCs移植后的自身分化作用可替代修复脑缺血等中枢神经损伤^[8]。另外, MSCs还具有分泌诸如表皮生长因子, 碱性成纤维细胞生长因子, 血管内皮细胞生长因子, 脑源性神经营养因子等神经营养因子的旁分泌作用^[9-11], 而这种旁分泌作用对于中枢神经系统损伤的修复作用和机制研究报道较少。

本实验在立体定向条件下将体外培养的大

Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China.

Cheng Feng★, Studying for master's degree, Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China chengf1215@hotmail.com

Correspondence to: Li Li-xin, Professor, Chief physician, Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China lilixin@njmu.edu.cn

Supported by: Grant of "Xing Wei Project" of Jiangsu Province, No. RC2007062*

Received: 2009-09-07 Accepted: 2009-11-24

南京医科大学第一附属医院神经外科, 江苏省南京市 210029

程 峰★, 男, 1983年生, 江苏省苏州市人, 汉族, 南京医科大学在读硕士, 主要从事中枢神经系统损伤与修复的研究。chengf1215@hotmail.com

通讯作者: 李立新, 教授, 主任医师, 南京医科大学第一附属医院神经外科, 江苏省南京市 210029 lilixin@njmu.edu.cn

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2010)01-00001-05

收稿日期: 2009-09-07
修回日期: 2009-11-24
(20090907015/WL-Z)

鼠MSCs植入缺血大鼠脑纹状体内, 观察骨髓MSCs的旁分泌作用及对抑制脑缺血后细胞凋亡的影响并探索相关机制。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2008-10/2009-05在南京医科大学药学院实验室完成。

材料:

实验动物: 雄性SD大鼠24只, 体质量250~280 g; 3或4周龄SD大鼠, 体质量80 g左右, 由南京医科大学动物中心提供(动物合格证号: SCXK(苏)2002-0031)。实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部2006年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准^[12]。

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
小鼠抗血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 单克隆抗体(1:500)、羊抗鼠 IgG-HRP(1:1 000)	santa cruz
小鼠抗p-ERK1/2单克隆抗体(1:1 000)	cell signal technology
兔抗β-actin多克隆抗体(1:400)	北京博奥森
羊抗兔IgG-HRP(1:2 000)	联科生物
TUNEL凋亡检测试剂盒	天津灏洋生物制品科技有限责任公司
U0126	Promega Corporation
Stoelting 单臂脑立体定位仪	美国Stoelting公司
倒置相差显微镜	尼康 TS100-F
NVSLM1 振动切片机	美国 WPI 公司
OLYMPUS CX21 正置显微镜	OLYMPUS 公司

实验过程:

骨髓MSCs的培养^[13]: 体质量80 g左右的SD大鼠, 无菌分离出两侧股骨, 置于培养皿中的灭菌PBS中, 浸泡5 min。用5 mL注射器吸引无血清的培养基反复吹出股骨中的骨髓组织, 直到股骨颜色由红变白, 用注射器反复吹打均匀后, 移入10 mL离心管, 1 000 r/min离心10 min, 细胞沉淀中加入含体积分数为10%胎牛血清, 1%青、链霉素的L-DMEM培养基, 按照 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 的密度接种在25 cm²培养瓶中。24 h后去除未贴壁的细胞, 并更换新培养液, 以后每3 d换液1次, 细胞达90%融合后消化传代, 进行扩增培养。

大鼠大脑中动脉缺血模型的建立: 用Longa线栓法建立大鼠中动脉闭塞再灌注模型^[14], 10%水合氯醛(3 mL/kg)麻醉大鼠, 固定后, 延颈部正中切开皮肤, 钝性分离皮

下组织, 暴露颈总动脉, 分离颈总、颈外、颈内动脉, 结扎颈外、颈总动脉。用眼科剪将颈总动脉剪一小口, 插入尼龙线栓, 深度为2.5 cm, 缺血90 min后, 拔出鱼线, 缝合皮肤并消毒。手术过程中予以照射灯保持体温在 $(37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 并监测肛温、呼吸及心率。

干预分组: 体质量250~280 g的24只SD大鼠随机数字表法分为4组, 每组6只。细胞移植给药组: 大鼠纹状体内移植骨髓MSCs后给予U0126; 非移植给药组: 注射等量的PBS后给予U0126; 细胞移植对照组: 移植骨髓MSCs后给予溶剂对照; 非移植对照组: 注射等量的PBS后给予溶剂对照。

细胞移植: 大鼠中动脉缺血2 d后进行细胞移植。将大鼠麻醉后, 固定在立体定位仪上, 定位大鼠缺血侧纹状体: 前囟后方0.5 mm, 前囟向右旁开中线3.5 mm, 硬膜下4 mm。微量注射器吸取10 μL细胞悬液, 使细胞总数达到 5×10^5 。缓慢注射, 在10 min内注射完毕, 留针10 min后缓慢拔针, 缝合头皮。

U0126的给药方法: 在细胞移植前30 min取细胞移植组与非移植组动物各6只给予U0126。U0126(Promega Corporation, US)是高效的丝裂原激活蛋白激酶(MEK)的阻滞剂。以1 nmol/只进行侧脑室注射。侧脑室注射方法: 水合氯醛麻醉后用立体定位仪固定大鼠, 以其前囟门为基准, 向后-0.8 mm, 左右-1.5/+1.5 mm; 向下-3.5 mm进针, 待U0126注射完后留针5 min使其充分吸收, 缓慢退针使注射器5 min后出颅^[15]。

Western blot检测VEGF、p-ERK1/2蛋白的表达: 细胞移植后7 d大鼠麻醉后断头并迅速取出脑组织, 标本中提取蛋白并定量。取35 μg样本加注于15%分离胶/4%浓缩胶上, 室温下100 V电泳2 h后再在300 mA恒流条件下进行转膜。转膜后5%牛奶封闭2 h后将该膜与一抗4℃下孵育过夜, 再将其与二抗室温下反应120 min, 最后将膜曝光显色, 用Quantity One(Bio-RAD)软件进行数据分析。

细胞凋亡TUNEL检测: 4℃生理盐水灌洗, 排除血液, 再用40 g/L多聚甲醛行心脏灌注。振荡切片机制取40 μm厚的切片。按照TUNEL凋亡检测试剂盒说明进行TUNEL染色。划定缺血半暗区及皮质区域, 每个区域选定5个视野进行阳性细胞计数。

主要观察指标: Western blot检测各实验组VEGF、ERK1/2蛋白的表达。TUNEL染色检测梗死区周围及皮质区细胞凋亡情况。

设计、实施、评估者: 第一、二作者设计、实施, 全部作者进行结果评估。均经过系统培训, 未采用盲法评估。

统计学处理: 由第一作者采用SPSS 11.0软件完成统计处理, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, Western blot、TUNEL结果采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 骨髓MSCs的培养 原代培养的MSCs接种24 h后开始有细胞贴壁, 贴壁细胞有伪足伸出, 呈现多个细胞聚集样表现。经过3代纯化扩增后得到的间充质样干细胞形态为长梭形, 成纤维样细胞, 完全融合后类似形成漩涡状结构。传代后第1~3天, 细胞基本处于潜伏期, 第三四天开始细胞数量大量增加, 进入对数生长期, 第六七天时细胞数量达到顶点, 细胞生长开始进入平台期。培养的细胞可以稳定传代。传至第3代时细胞增殖迅速, 几乎全部贴壁生长, 以长梭形为主, 体积小, 核浆比大, 呈明显的同向性改变, 漩涡状盘旋排列, 见图1。

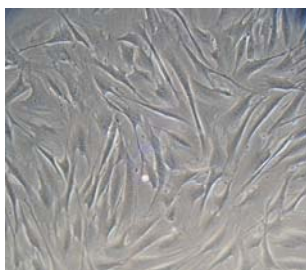


Figure 1 Cell colony of bone marrow mesenchymal stem cells after cultured for the 3rd passage (Inverted phase contrast microscope, $\times 200$)

图1 骨髓MSCs培养第3代形成的细胞集落(倒置相差显微镜, $\times 200$)

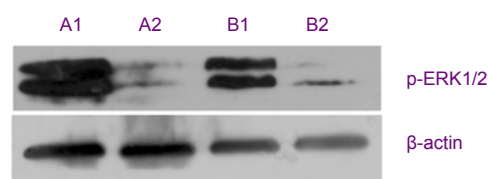
2.2 Western blot检测各组VEGF、ERK1/2蛋白的表达 VEGF、P-ERK1/2、 β -actin的相对分子质量分别为23 000, 44 000/42 000、42 000。经骨髓MSCs移植后, 细胞移植对照组VEGF蛋白的表达量增高, 与非移植对照组相比, 差异有非常显著性意义($P < 0.01$)。而细胞移植给药组和细胞移植对照组以及非移植给药组和非移植对照组间VEGF蛋白的表达量差异无显著性意义 ($P_1=0.55$, $P_2=0.06$)。细胞移植对照组磷酸化ERK1/2表达明显高于非移植对照组($P < 0.01$)。经U0126处理后, 无论是细胞移植组还是非移植组磷酸化ERK1/2的表达都较未经U0126处理组(细胞移植对照组、非移植对照组)受到明显抑制(P 均 < 0.01), 见表1, 图2, 图3。

2.3 TUNEL染色检测梗死区周围及皮质区细胞凋亡情况 在缺血梗死区周围及皮质区域可见TUNEL阳性细胞, 细胞移植对照组TUNEL阳性细胞数明显少于非移植对照组($P < 0.05$), 而在细胞移植给药组TUNEL阳性细胞数较细胞移植对照组增多, 差异具有显著性意义($P < 0.05$), 见表2, 图4。

表1 Western blot 检测各组 VEGF、ERK1/2 蛋白的表达
Table 1 Expression of VEGF and ERK1/2 in each group detected by western blot ($\bar{x} \pm s$, $n=6$, A)

Group	ERK1/2/ β -actin	VEGF/ β -actin
Cell implantation control	15.36 $\pm$ 0.75	3.18 $\pm$ 0.07
Cell implantation medication	0.62 $\pm$ 0.03 ^a	3.00 $\pm$ 0.11
Non-implantation control	2.99 $\pm$ 0.11 ^a	2.50 $\pm$ 0.14 ^a
Non-implantation medication	0.83 $\pm$ 0.61 ^b	2.11 $\pm$ 0.20

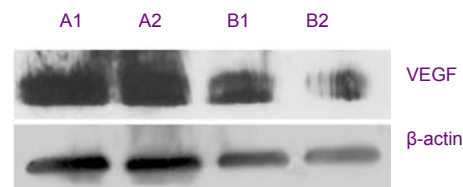
VEGF: vascular endothelial cell growth factor; ^a $P < 0.01$, vs. cell implantation control group; ^b $P < 0.01$, vs. non-implantation control group



A1: cell implantation control group; A2: cell implantation medication group; B1: non-implantation control group; B2: non-implantation medication group

Figure 2 p-ERK1/2 expression in each group detected by western blot

图2 Western bolt 检测各组 p-ERK1/2 蛋白的表达



A1: cell implantation control group; A2: cell implantation medication group; B1: non-implantation control group; B2: non-implantation medication group

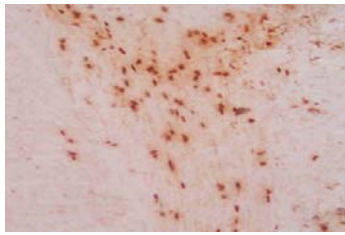
Figure 3 Vascular endothelial cell growth factor expression in each group detected by western blot

图3 Western bolt 检测各组 VEGF 蛋白的表达

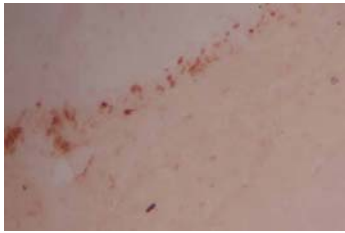
表2 TUNEL 阳性细胞数比较
Table 2 Comparison of the number of TUNEL positive cells ($\bar{x} \pm s$, number/field)

Group	TUNEL positive cells
Cell implantation control	56.50 $\pm$ 9.50
Cell implantation medication	87.50 $\pm$ 3.53 ^a
Non-implantation control	114.00 $\pm$ 9.40 ^a

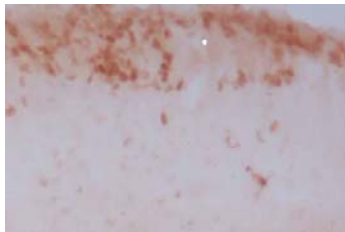
^a $P < 0.01$, vs. cell implantation control group



a: Non-implantation control group



b: Cell implantation control group



c: Cell implantation medication group

Figure 4 Apoptosis positive cells in each group detected by TUNEL staining (DAB staining, ×100)
图4 TUNEL染色检测各组凋亡阳性细胞(DAB染色, ×100)

3 讨论

骨髓MSCs是来源于骨髓的非造血干细胞,是中胚层发育的早期间质干细胞^[16-17],具有很强的自我更新和多向分化潜能,在适宜条件下可以跨胚层分化为神经细胞^[18]。Lee等^[19]将标记二苯甲亚胺的小鼠骨髓MSCs于24 h后经立体定向移植入小鼠脑梗死区,移植4周后大量移植细胞在紧邻移植部位的正常脑组织中存活,表达神经元标志物神经元特异性核蛋白,微管相关蛋白2。尽管很多研究证实了MSCs与神经修复有密切关系,但是有研究结果显示,移植入脑的MSCs只有很少部分(少于10%)表达了神经细胞标志物^[20];况且神经系统特有的标记物如神经元特异性烯醇化酶、神经丝、神经元特异性核蛋白及胶质纤维酸性蛋白等在没有分化的骨髓MSCs上也能检测到^[21]。因此, MSCs向神经细胞定向分化从而替代梗死区损伤神经细胞的修复机制存在一定争议。

研究表明,骨髓MSCs治疗脑缺血梗死另一重要机制是它可以旁分泌神经营养等细胞因子从而对梗死半

暗区起到营养支持、抑制细胞凋亡作用^[22]。MSCs在体外可以旁分泌VEGF^[23], VEGF是目前所知惟一作用于血管内皮的生长因子,它在血管生成的突出作用是促进内皮细胞增殖、加速新生血管形成^[24-25];同时可以抑制脑缺血早期神经细胞的凋亡^[26]。

Western blot检测结果显示细胞移植组脑梗死区VEGF蛋白的表达明显高于非移植组($P < 0.05$),说明MSCs在体内可以旁分泌VEGF。TUNEL结果显示细胞移植组梗死区周围细胞凋亡数明显少于非移植组,并且细胞移植组的磷酸化ERK1/2水平高于非移植组;使用ERK1/2抑制剂U0126处理后,随着p-ERK1/2表达的抑制,细胞移植组脑梗死半暗区细胞凋亡数逐渐增高,而VEGF蛋白的表达没有变化,提示ERK1/2信号通路介导了VEGF对于脑缺血后细胞凋亡的抑制作用。

ERK1/2是促细胞分裂剂激活性蛋白激酶家族(MAPK)中最重要的一员,它介导了细胞的代谢、分裂、炎症以及抗凋亡等重要生理病理过程^[27-29]。ERK1/2可以被各类损害性刺激因素诸如缺血缺氧、高糖环境等激活,非移植对照组p-ERK1/2表达的增高正是由于局灶性脑缺血所引起,而这种自身损害性因子激活p-ERK1/2表达的增高并不能抑制缺血引起的细胞凋亡,所以尽管非移植对照组p-ERK1/2的表达高于经过U0126处理的细胞移植给药组,但是非移植对照组的细胞凋亡数依然多于细胞移植给药组(见图4,表2);同时, ERK1/2还可以被VEGF、TGF等各类生长因子激活^[30-31],此激活状态下的ERK1/2主要通过两条途径抑制细胞凋亡,第一条途径, ERK1/2的激活引起MSKs激活, MSKs的激活抑制了Bad蛋白活化,而Bad蛋白是一种促凋亡蛋白,可以引起细胞的程序性坏死;第二条途径, ERK1/2的激活引起了核内CREB的活化, CREB的活化激活了抗凋亡重要蛋白Bcl-2的表达^[32],从而抑制了细胞凋亡。

脑缺血引起的梗死区神经细胞凋亡高峰出现在第1~5天,并可持续4周左右,凋亡区域主要位于半暗带区,如不能及时纠正,半暗带区将不可避免地成为永久性梗死灶的一部分^[33]。因此,减少缺血早期梗死半暗区病理性细胞凋亡有利于脑缺血梗死后中枢神经细胞的修复再生。

实验结果提示骨髓MSCs具有旁分泌VEGF等神经营养因子的功能,旁分泌的VEGF抑制了脑梗死半暗区神经细胞的凋亡, ERK1/2信号通路介导了VEGF的抗凋亡机制,这为自体骨髓MSCs移植治疗脑缺血等中枢神经损伤提供了新的依据和思路。

4 参考文献

- [1] Li TS, Komota T, Ohshima M, et al. TGF-beta induces the differentiation of bone marrow stem cells into immature cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;366(4): 1074-1080.

- [2] Matsushima A, Kotobuki N, Tadokoro M, et al. In vivo osteogenic capability of human mesenchymal cells cultured on hydroxyapatite and on beta-tricalcium phosphate. *Artif Organs*. 2009;33(6):474-481.
- [3] Croft AP, Przyborski SA. Mesenchymal stem cells expressing neural antigens instruct a neurogenic cell fate on neural stem cells. *Exp Neurol*. 2009;216(2):329-341.
- [4] Cho JS, Park HW, Park SK, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells enhances axonal outgrowth and cell survival in an organotypic spinal cord slice culture. *Neurosci Lett*. 2009;454(1):43-48.
- [5] Nadri S, Soleimani M, Mobarra Z, et al. Expression of dopamine-associated genes on conjunctiva stromal-derived human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;377(2):423-428.
- [6] Li LY, Li JT, Wu QY, et al. Transplantation of NGF-gene-modified bone marrow stromal cells into a rat model of Alzheimer' disease. *J Mol Neurosci*. 2008;34(2):157-163.
- [7] Zhang J, Li Y, Zhang ZG, et al. Bone marrow stromal cells increase oligodendrogenesis after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2009;29(6):1166-1174.
- [8] Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, et al. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*. 2000;290(5497):1775-1779.
- [9] Xu YX, Chen L, Hou WK, et al. Mesenchymal stem cells treated with rat pancreatic extract secrete cytokines that improve the glycometabolism of diabetic rats. *Transplant Proc*. 2009;41(5):1878-1884.
- [10] Chen J, Li Y, Katakowski M, et al. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *J Neurosci Res*. 2003;73(6):778-786.
- [11] Sadan O, Shemesh N, Cohen Y, et al. Adult neurotrophic factor-secreting stem cells: a potential novel therapy for neurodegenerative diseases. *Isr Med Assoc J*. 2009;11(4):201-204.
- [12] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance suggestion of caring laboratory animals. 2006-09-30.
中华人民共和国科学技术部.关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [13] Zhuang SB, Liu Y, Chen KM, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2007;11(20):3886-3891.
庄淑波, 刘毅, 陈克明, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞体外分离、纯化与培养适宜条件的筛选[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(20): 3886-3891.
- [14] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989;20(1):84-91.
- [15] Tian HP, Gu B, Cheng F, et al. Zhongguo Linchuang Yaolixue yu Zhilixue. 2009;14(1):32-37.
田和平, 顾斌, 程峰, 等. 尼莫地平抑制缺血再灌注后成年大鼠脑内神经发生[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2009, 14(1): 32-37.
- [16] Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues. *Science*. 1997;276(5309):71-74.
- [17] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002;418(6893):41-49.
- [18] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-147.
- [19] Lee J, Kuroda S, Shichinohe H, et al. Migration and differentiation of nuclear fluorescence-labeled bone marrow stromal cells after transplantation into cerebral infarct and spinal cord injury in mice. *Neuropathology*. 2003;23(3):169-180.
- [20] Chen J, Li Y, Wang L, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 2001;32(4):1005-1011.
- [21] Corti S, Locatelli F, Strazzer S, et al. Neuronal generation from somatic stem cells: current knowledge and perspectives on the treatment of acquired and degenerative central nervous system disorders. *Curr Gene Ther*. 2003;3(3):247-272.
- [22] Li N, Li XR, Yuan JQ. Effects of bone-marrow mesenchymal stem cells transplanted into vitreous cavity of rat injured by ischemia/reperfusion. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2009;247(4):503-514.
- [23] Wang M, Zhang W, Crisostomo P, et al. STAT3 mediates bone marrow mesenchymal stem cell VEGF production. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;42(6):1009-1015.
- [24] Connolly DT. Vascular permeability factor: a unique regulator of blood vessel function. *J Cell Biochem*. 1991;47(3):219-223.
- [25] Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, et al. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J Clin Invest*. 2000;106(7):829-838.
- [26] Zhang ZG, Zhang L, Tsang W, et al. Correlation of VEGF and angiopoietin expression with disruption of blood-brain barrier and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002;22(4):379-392.
- [27] Wang ZQ, Wu DC, Huang FP, et al. Inhibition of MEK/ERK 1/2 pathway reduces pro-inflammatory cytokine interleukin-1 expression in focal cerebral ischemia. *Brain Res*. 2004;996(1):55-66.
- [28] Purcell JE, Lenhard SC, White RF, et al. Strain-dependent response to cerebral ischemic preconditioning: differences between spontaneously hypertensive and stroke prone spontaneously hypertensive rats. *Neurosci Lett*. 2003;339(2):151-155.
- [29] Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004;68(2):320-344.
- [30] Grummer MA, Sullivan JA, Magness RR, et al. Vascular endothelial growth factor acts through novel, pregnancy-enhanced receptor signalling pathways to stimulate endothelial nitric oxide synthase activity in uterine artery endothelial cells. *Biochem J*. 2009;417(2):501-511.
- [31] Zhu Y, Yang GY, Ahlemeyer B, et al. Transforming growth factor-beta 1 increases bad phosphorylation and protects neurons against damage. *J Neurosci*. 2002;22(10):3898-3909.
- [32] Mo JH, Zheng XJ, Yang XF. Zhonghua Chuangshang Zazhi. 2004;20(7):432-433.
莫纪华, 郑秀珏, 杨小峰. 大鼠严重脑损伤后细胞凋亡状态及相关基因Bcl-2、Bax的表达[J]. 中华创伤杂志, 2004, 20(7): 432-433.
- [33] Chu ZH, Wu JM, Liu FD. Linchuang Shenjingbingxue. 2000; 13(3): 134-136.
储照虎, 吴家幕, 刘富东. 大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤神经细胞凋亡及其调控基因的表达[J]. 临床神经病学, 2000, 13(3): 134-136.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 江苏省“兴卫工程”医学重点人才基金资助项目(RC2007062)。

利益冲突: 没有其他利益冲突。

课题的创新点: 课题主要观察骨髓间充质干细胞对于脑缺血性疾病移植治疗的疗效及机制。大量研究报道骨髓间充质干细胞具有定向分化为神经细胞的潜能,并且在体外体内实验中都已经得到证实。但是,目前对于骨髓间充质干细胞治疗神经系统损伤性疾病的另一重要机制,即骨髓间充质干细胞旁分泌作用的研究报道不多。实验的创新点就是对骨髓间充质干细胞的旁分泌作用对于脑缺血后细胞凋亡的抑制及其机制进行初步研究。

课题评估的“金标准”: 蛋白检测的主要评价“金标准”为: Western blot 和 ELISA 检测,实验采用 western blot 检测蛋白表达。细胞凋亡检测没有明确的“金标准”,目前常用的检测手段包括: TUNEL 检测,凋亡相关蛋白,如 caspase-3, caspase-9 等的表达检测, DNA 梯度分析, Annexin V 联合 PI 法等, Annexin V 联合 PI 染色法检测早期细胞凋亡较 TUNEL 法更为灵敏,是目前最为理想的检测细胞凋亡的方法。但是, TUNEL 法更普遍的应用于组织切片细胞凋亡的检测。

课题的偏倚与不足: 实验只选择了一种神经营养因子作为观察对象,并且仅对骨髓间充质干细胞移植后对于脑缺血早期神经细胞凋亡的抑制作用及机制进行了探讨。在后续实验中应该增加神经营养因子的研究种类,延长细胞移植后的观察时间,研究骨髓间充质干细胞在体内的存活情况以及旁分泌作用的时程变化,并由此产生的中枢神经系统损伤后的行为学变化情况。

提供临床借鉴的价值: 文章探讨了干细胞移植后对脑缺血后神经细胞的凋亡有何影响,实验结果显示骨髓间充质干细胞移植通过 ERK 信号通路的确可以抑制脑缺血后神经细胞的凋亡,提示骨髓间充质干细胞移植后的旁分泌作用对脑缺血后神经细胞凋亡的抑制作用可能会成为未来治疗临床脑缺血疾病的干预靶点。未来可以通过基因转染过表达各类神经营养因子或者调节 ERK 信号通路蛋白,抑制脑缺血后神经细胞凋亡的发生。