

清热化痰方联合缺氧预处理 MSCs 移植对脑缺血再灌注损伤大鼠 eNOS 表达的影响

胡跃强¹, 李强², 陈海峰², 梁妮¹, 陈伟¹, 甘业先² (1. 广西中医药大学第一附属医院, 广西南宁 530023; 2. 广西中医药大学, 广西南宁 530000)

摘要: 目的 探讨清热化痰方联合缺氧预处理骨髓间充质干细胞(MSCs)移植对脑缺血再灌注损伤大鼠内皮型一氧化氮合酶(eNOS)mRNA及其蛋白表达的影响。**方法** 将216只雄性SD大鼠,随机分为6组:假手术组(SO组)、模型组(MCAO组)、MSCs移植对照组(N-MSCs组)、经缺氧预处理后的MSCs移植组(HP-MSCs组)、MSCs移植联合清热化痰方组(MSCs+QRHY组)、HP-MSCs移植联合清热化痰方组(HP-MSCs+QRHY组),每组36只。按移植后取材时间点(7, 14, 28 d)各组又分3个亚组,每组12只。用线栓法制作大鼠脑缺血再灌注损伤动物模型,给予清热化痰颗粒灌胃及颈内动脉移植BMSCs;分别于术后7, 14, 28 d对各组大鼠进行神经功能缺损评分(NSS);RT-PCR及Western blot检测大鼠缺血半暗带区eNOS mRNA及其蛋白表达变化。结果 与模型组比较,各时间点N-MSCs组神经功能评分严重程度降低($P < 0.05$),各移植组中以HP+QRHY组神经功能改善最为显著($P < 0.05$)。假手术组eNOS mRNA及其蛋白呈现低水平表达,模型组及移植组其表达较假手术组明显增加($P < 0.05$);各组eNOS mRNA及其蛋白的表达均于7 d达到高峰,14, 28 d表达逐渐下降;同一时间点组间比较,HP-MSCs组、MSCs+QRHY组及HP-MSCs+QRHY组的表达均明显优于N-MSCs组($P < 0.05$),而以HP-MSCs+QRHY组增高最为明显($P < 0.05$)。结论 缺氧预处理MSCs移植能够显著提高脑缺血再灌注损伤大鼠eNOS的表达,清热化痰方能够进一步上调其的表达及改善脑缺血大鼠的神经功能,发挥其神经保护作用。

关键词: 清热化痰方; 脑缺血再灌注; 缺氧预处理; 骨髓间充质干细胞; 内皮型一氧化氮合酶

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2017)05-

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2017.05.

Effect of Combined Qingre Huayu Prescription with HP-BMSCs Transplantation on the Expression of eNOS after Cerebral Ischemia-reperfusion Injury in Rats

HU yue-qiang¹, LI qiang², CHEN Hai-feng², LIANG ni¹, CHEN wei¹, GAN ye-xian²*

(1. Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China; 2. Guangxi University of Chinese Medicine; Corresponding author: Nong Tang, E-mail: 347469604@qq.com)

Abstract: Objective: To observe the effect of Qingre Huayu Prescription combined with hypoxic preconditioned (HP) bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) transplantation on the expression of eNOS mRNA and protein in rats after cerebral ischemia-reperfusion. Methods: 216 male SD rats were randomly divided into 6 groups: sham in rats after cerebral ischemia-reperfusion. Methods: 216 male SD rats were randomly divided into 6 groups: sham (SO), middle cerebral artery occlusion group (MCAO), BMSCs transplantation group (N-BMSCs), hypoxic preconditioning BMSCs transplantation (HP-BMSCs), combined Qingre Huayu prescription with BMSCs transplantation group (BMSCs+QRHY), and hypoxic preconditioned BMSCs transplantation combined with Qingre

收稿日期: 2016-12-06

作者简介: 胡跃强,男,博士,医师,研究方向: 中医脑病学。Email: 347469604@qq.com。职称: 通信作者; 甘业先, Email: 347469604@qq.com。

基金项目: 广西自然科学基金(GXNSFAA139138); 广西中医基础理论重点实验室系统课题(KJ13076); 广西医学高层次人才“130”计划培养人资助项目。

Haayu Prescription group (HP-MSCs+QRHY), 36 rats in each. Each group was further divided into 7 days group, 14 days, 28 days groups, 12 for every subgroups. The MCAO models were made in order to evaluate neurologic impairment scores at different time points after ischemia and reperfusion by the modified Neurological Severity Scores (mNSS) and observe the expression changes of mRNA and protein of eNOS after gavaging with Qingre Huayu prescription and injecting BMSCs or HP-BMSCs into rats' internal carotid artery for different groups. Results: Compared with the model group, the Neurological Severity Scores of transplantation groups were significantly lower ($P < 0.05$), and the improvement of neurologic function of HP-MSCs+QRHY group was the most significant ($P < 0.05$), in each times. ② The expressions of eNOS mRNA and protein in the penumbra region all reached the peak at 7d, then decreased gradually with the time of 14d and 28d. In HP-MSCs, MSCs+ QRHY and HP-MSCs+QRHY, comparison between groups at the same time point, all increased significantly compared with N-MSCs ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), and the changing trend of HP-MSCs+QRHY group was the most obvious. Conclusions: Qingre Huayu prescription combined with HP-BMSCs can improve the neurologic function of ischemia reperfusion injury in rats, which may be related to up-regulate the expression of eNOS.

Key words: Qingre Huayu Prescription; Cerebral ischemia reperfusion; Hypoxia preconditioning; MSCs; eNOS

脑缺血所造成的神经功能损伤一直为临床治疗的难点。干细胞的移植、分化研究是当今神经科学领域研究的热点,也为神经损伤的修复提供了一种新的治疗策略。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells transplantation, BMSCs)是从骨髓中分离出的一组具有干细胞特性的成体干细胞,已有研究^[1-3]表明其具有参与修复缺损的神经功能作用。但是,大量的证据表明 MSCs 移植对神经功能的改善是轻中度的^[4],其中很关键的因素是 MSCs 移植后大部分细胞不能在移植局部存活。因此,提高干细胞移植疗效的关键在于提高移植细胞的存活率。缺氧预处理(hypoxic preconditioning, HP)在其他许多细胞系中已被作为一种保护细胞凋亡和刺激血管新生的有力工具,已有诸多体外实验证实经 HP 处理的 NSCs 同样具有类似的保护作用^[5-8]。HP 是通过非致命性的低氧刺激激活内源性的保护反应,包括保护性蛋白的激活,从而提高细胞或机体的抗凋亡能力。本实验通过研究 HP-MSCs 移植后大鼠内皮型一氧化氮合酶(eNOS)表达的变化,阐明其对脑缺血再灌注(I/R)损伤大鼠中的神经保护作用机制,并观察清热化痰方对 HP-MSCs 移植后大鼠 eNOS 表达的影响。

1 材料和方法

1.1 动物与分组 健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 216 只,3 月龄,质量(250±50)g,广西医科大学动物实验中心,动物许可证号:SCXK(桂)2014-0002。适应性饲

养 1 周后按随机数字表进行分为 6 组,每组 36 只,依据取材时间点(7, 14, 28 d)每组再分为 3 个亚组,每个亚组 12 只。

1.2 药物、仪器及试剂 清热化痰方单味中药浓缩颗粒剂(水牛角 30 g、丹参 15 g、赤芍 15 g、地龙 10 g、石菖蒲 10 g、川芎 10 g、郁金 10 g、酒大黄 6 g、天竺黄 10 g,江苏江阴天江药业有限公司,批号:1406033); L-DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司),淋巴细胞分离液、优质胎牛血清(天津源洋生物技术有限公司); TRIZOL 试剂盒(美国 Invitrogen 公司); PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser, SYBR® Premix Ex Taq™ II (大连宝生物公司);兔抗 eNOS(博士德公司),批号:GR252439-8。

1.3 MSCs 的培养、鉴定、缺氧预处理

1.3.1 MSCs 培养 无菌条件下,采用全骨髓贴壁法获得 3 周龄 SD 大鼠 MSCs,于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱内培养。7~12 d 时细胞呈长梭形并达到 80%以上单层融合,以 0.25%胰酶消化,按 1:3 的比例传代培养。收集第 4 代细胞,调整细胞浓度至 10⁴·mL⁻¹,预备移植。

1.3.2 MSCs 鉴定 取第 4 代 MSC 消化,以 PBS 平衡盐缓冲液制备单细胞悬液,以流式细胞学检测细胞表面标志 CD34-PE、CD45-FITC、CD90-PE。

1.3.3 缺氧预处理 细胞按 1:3 传代,培养至细胞融合达到 80%时,换液后进行缺氧预处理。将细胞置于能精确调控氧浓度的 ProOx-C-chamber 系统

(Biospherix, Redfield, NY, USA)中, 设定缺氧浓度为0.5%, 缺氧时间为24 h。

1.4 动物模型的制备及药物干预方法 SD大鼠随机分为6组(每组36只), 依据取材时间点(7, 14, 28 d)每组又再分为3个亚组(每组12只)。采用大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型, 参照Longa's的线栓法并加以改良^[8]。在复制动物模型及细胞移植后7, 14, 28 d处死大鼠取标本。

各组处理方法: 假手术组(SO组): 线栓只插入颈内动脉9 mm; 模型组(MCAO组): 线栓法造模, 缺血后2 h拔出栓线进行缺血后再灌注; MSCs移植对照组(N-MSCs组): 再灌注后24 h由颈内动脉给予MSCs悬浮液200 μ L, 细胞数为 2×10^6 个, 并给予同等体积的生理盐水灌胃, 每日1次, 直至取材为止; 经HP处理后的MSCs移植组(HP-MSCs组): 再灌注后24 h由颈内动脉给予HP后的MSCs悬浮液200 μ L, 细胞数为 2×10^6 个, 并给予同等体积的生理盐水灌胃, 每日1次, 直至取材为止; MSCs移植联合清热化痰方组(MSCs+QRHY组): 再灌注前4 d开始给予清热化痰方灌胃, 每日1次, 再灌注后24 h由颈内动脉给予MSCs悬浮液200 μ L, 细胞数为 2×10^6 个, 待动物清醒后继予清热化痰方灌胃, 每日1次, 直至取材为止; HP-MSCs移植联合清热化痰方组(HP-MSCs+QRHY组): 再灌注前4 d开始给予清热化痰方灌胃, 每日1次, 再灌注后24 h由颈内动脉给予HP后的MSCs悬浮液200 μ L, 细胞数为 2×10^6 个, 待动物清醒后继予清热化痰方灌胃, 每日1次, 直至取材为止。清热化痰方按等效剂量体表面积换算, 剂量为 $8.28 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 为生药量, 给药容积为 $1.4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

1.5 指标观察

1.5.1 大鼠神经功能评估 MCAO大鼠神经功能评分: 按改良神经功能评分法(NSS)^[9]在动处死前评分。神经功能按受损严重程度分为0~18分, 0分为正常, 18分为最严重神经功能缺失, 评分越高, 表明神经功能损害越严重。

1.5.2 荧光定量PCR检测缺血半暗带eNOS mRNA表达 大鼠10%水合氯醛腹腔麻醉后, 迅速断头处死取脑, 冰上切取缺血侧半暗带区大脑皮质约100 mg(半暗带的范围定义为冠状面距额极7~11 mm, 缺血侧大脑纵裂到大脑外侧沟皮层上1/3并去除纵裂内切1 mm的组织区域)。荧光定量PCR检测大鼠缺血半暗带eNOS mRNA表达。①总RNA提取: 按总RNA

提取试剂盒说明书操作; ②总RNA纯度浓度测定: 使用Thermo Scientific Nano Drop 2000e测定每组RNA样品260, 280 nm的吸光度(OD值), 依据其OD值评估样品RNA的纯度, 要求纯度在1.8~2.0; ③引物合成: eNOS和 β -Actin引物序列如下: eNOS, 上游: 5'-CAGGTGTTCTTCTGGGTAGGC3'; 下游: 5'-CACGAGGACATTTTCGGACT-3'; β -actin, 上游: 5'-TCAGGTTCATCACTCGGCAAT-3'; 下游: 5'-AAAGAAAGGGTGTAAACGCA-3'。④反应体系及条件: 反应体系均为25 μ L, 其中TaKaRa SYBR® Premix Ex Taq™ II 12.5 μ L, cDNA模板2.0 μ L, 2种基因上下游引物(10 pmol· μ L⁻¹)各1 μ L, 加无RNA酶的水8.5 μ L。使用BIO-RAD DNA Engine Opticon™ 2进行扩增反应。反应条件: 94℃预变性30 s, 95℃变性30 s, 60℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 40个循环。⑤结果计算: 同一cDNA样本设置4个复孔, 求其循环数(cycle threshold, Ct)值的均值, 并以同一样本中的 β -actin的Ct值作为内参, 按照公式计算各组样品的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值。

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[Ct(\text{实验组}) - Ct(\text{对照}) - (Ct(\text{实验组}) - Ct(\text{对照}))]}$$

1.5.3 Western blot检测缺血半暗带eNOS蛋白表达 提取各组大鼠缺血侧皮层组织蛋白, 分装保存于-20℃冰箱备用。BCA法测定各组蛋白含量, 并将各组蛋白稀释至相同浓度, 上样20 μ L, 经电泳分离(80 V, 30 min, 100 V, 1 h), 依据蛋白分子量, 转至PVDF膜(转膜45 min), 于室温条件下封闭1 h, 经洗膜液漂洗后, 分别加入一抗eNOS(1:1000)、 β -actin(1:1000), 置于4℃摇床孵育过夜, 次日经漂洗后加入二抗室温震荡孵育1 h; 再次漂洗后加入ECL化学发光剂进行显色孵育, 暗室下行X胶片显影定影; 采用Image-J图像分析软件对条带进行灰度分析; 以目的条带与内参 β -actin的灰度比值表示eNOS蛋白表达水平。

1.6 统计学方法 所有数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用SPSS17.0统计软件, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用LSD-t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠NSS神经功能评分 SO组未见明显神经功能缺损, 其余各组大鼠在I/R后第7, 14, 28天均出现一定程度的神经功能缺损。在相同时间点, 与MCAO组比较, N-MSCs组神经功能评分显著减少

($P < 0.05$)；与 N-MSCs 组比较，HP-MSCs 组和 HP-MSCs+QRHY 组神经功能评分明显减少($P < 0.05$)，而且 HP-MSCs+QRHY 组有进一步减少的趋势；与 HP-MSCs 移植组比较，HP-MSCs+QRHY 组神经功能评分明显减少($P < 0.05$)，表明 HP-MSCs+QRHY 组大鼠神经功能恢复优于 HP-MSCs 组。

表 1 各组神经功能缺损评分($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Table 1 ischemia and reperfusion by the modified Neurological Severity Scores (mNSS)

组别	t/d		
	7	14	28
SO 组	0	0	0
MACO 组	9.83 ± 0.72	7.17 ± 1.03	5.00 ± 0.95
N-MSCs 组	8.81 ± 0.93 ^a	6.08 ± 0.79 ^a	3.83 ± 0.83 ^a
HP-MSCs 组	8.00 ± 0.73 ^b	5.17 ± 0.90 ^a	3.00 ± 0.60 ^a
MSCs+QRHY 组	7.67 ± 1.23 ^b	4.67 ± 0.65 ^b	2.58 ± 0.51 ^b
HP-MSCs+QRHY 组	6.67 ± 0.88 ^c	3.83 ± 0.57 ^c	1.25 ± 0.75 ^c

注：与 MACO 组比较，^a $P < 0.05$ ；与 N-MSCs 组比，^b $P < 0.05$ ；与 HP-MSCs 移植组比，^c $P < 0.05$ 。

2.2 各组大鼠缺血半暗带 eNOS mRNA 表达的比较
各组 eNOS mRNA 表达均于第 7 天达到峰值，第 14、28 天表达逐渐下降。在相同时间点，与 MACO 组相比，N-MSCs 组 eNOS mRNA 表达量明显升高($P < 0.05$)；与 N-MSCs 组比较，MSCs+QRHY 组和 HP-MSCs 组 eNOS mRNA 表达量明显升高($P < 0.05$)；与 HP-MSCs 组比较，HP-MSCs+QRHY 组 eNOS mRNA 表达量升高显著($P < 0.05$)，说明缺氧预处理 MSCs 可提高 mRNA 表达量，而在清热化痰方的干预下，mRNA 的表达更加显著，见表 2。

表 2 各组 eNOS mRNA 表达的比较($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

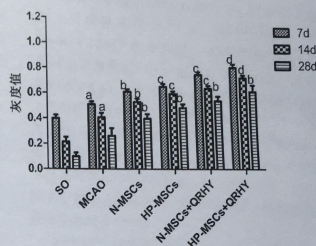
Table 2 The expressions of eNOS mRNA

组别	t/d		
	7	14	28
SO 组	0.17 ± 0.17	0.10 ± 0.13	0.07 ± 0.08
MACO 组	0.31 ± 0.14 ^a	0.21 ± 0.14 ^a	0.15 ± 0.08 ^a
N-MSCs 组	0.38 ± 0.15 ^a	0.27 ± 0.14 ^a	0.19 ± 0.07 ^a
HP-MSCs 组	0.43 ± 0.11 ^a	0.34 ± 0.12 ^a	0.27 ± 0.12 ^a
MSCs+QRHY 组	0.51 ± 0.10 ^a	0.41 ± 0.14 ^a	0.30 ± 0.10 ^a
HP-MSCs+QRHY 组	0.60 ± 0.14 ^a	0.49 ± 0.12 ^a	0.41 ± 0.10 ^a

注：与 SO 组比较，^a $P < 0.05$ ；与模型组比，^b $P < 0.05$ ；与 N-MSCs 组比，^c $P < 0.05$ ；与 HP-MSCs 移植组比，^d $P < 0.05$ 。

2.3 各组缺血半暗带 eNOS 蛋白的表达比较
各组 eNOS 蛋白表达均于第 7 天达到峰值，第 14、28 天表达逐渐下降。在相同时间点比较，与 MACO 组相

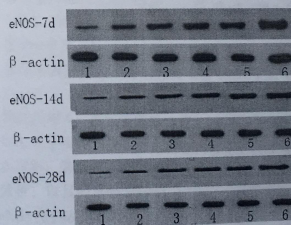
比，N-MSCs 组 eNOS 蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$)；与 N-MSCs 组比较，MSCs+QRHY 组和 HP-MSCs 组 eNOS 蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$)，与 HP-MSCs 组比较，HP-MSCs+QRHY 组蛋白表达水平升高显著($P < 0.05$)，说明缺氧预处理 MSCs 可使 eNOS 的蛋白表达增高，而在清热化痰方的干预后，eNOS 的表达增高更为显著，见图 1、图 2。



注：与 SO 组比较，^a $P < 0.05$ ；与模型组比，^b $P < 0.05$ ；与 N-MSCs 组比，^c $P < 0.05$ ；与 HP-MSCs 移植组比，^d $P < 0.05$ 。

图 1 各组大鼠 eNOS 蛋白表达比较

Figure 1 Comparison of eNOS protein expression in groups of rats



注：1-6 道分别代表 SO 组、MACO 组、N-MSCs 组、HP-MSCs 组、MSCs+QRHY、HP-MSCs+QRHY 组

图 2 各组大鼠 eNOS 蛋白表达电泳图

Figure 2 Electrophoresis of eNOS protein expression in groups of rats

3 讨论

MSCs 是一种多能干细胞，在微环境中可分化为神经干细胞和血管内皮细胞，同时可以释放促进血管生成和抗凋亡的因子，如血管内皮生长因子(VEGF)等，从而激活内源性的修复机制。然而

本研究发现脑缺血再灌注损伤大鼠经移植干细胞后,其eNOS的表达于移植后7 d表达明显并达到高峰,14 d、28 d表达逐渐下降,HP能够显著提高eNOS的表达,清热化痰方能够进一步上调eNOS mRNA的表达,促进eNOS的增殖,改善脑缺血大鼠的神经功能,发挥其神经保护作用。清热化痰方根据“损脑络”的病机设计,为脑梗死急性期有确切治疗作用的中药复方制剂,实验表明^[20-22]可抑制Ca²⁺的过度内流,上调Bcl-2、BDNF等的表达;下调脑缺血后Fas/FasL的表达而减轻再缺血后神经元凋亡,促进脑梗死区内源性VEGF以及移植后MSCs的增殖,提高细胞的成活率,具有良好的神经保护作用。本研究首次尝试以清热解毒和化痰通络相结合的清热化痰方联合HP后MSCs移植来治疗急性脑梗死。为中医药防治缺血性脑血管病等重大疾病提供可供借鉴的思路和方法。

[1] WANG L, ZHANG Z, WANG Y, et al. Treatment of stroke with

- 修改：林业资