

• 论著 •

粒细胞集落刺激因子动员骨髓干细胞治疗大鼠急性脑梗死

赵菁^{1,2}, 高波²

(1. 中国医学科学院, 北京协和医学院, 血液学研究所, 血液病医院, 天津 300020; 2. 天津市天和医院, 天津 300050)

【摘要】 目的:探讨粒细胞集落刺激因子(G-CSF)对大鼠脑梗死的治疗效果。**方法:**采用线栓法制备大鼠脑梗死模型,于术后 24 h 进行神经病学评分分级,入选 2 分及以上的大鼠共 20 只,被随机分为给药组和对照组,每组 10 只。给药组腹腔注射 G-CSF $10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$;对照组腹腔内注射等量生理盐水均连用 10 d。两组分别均于术前、术后 10、20 和 27 d 进行神经病学评分分级,于术前及术后 10 d 和 27 d 进行体重测定,并计算体重减轻率。术后 27 d,将大鼠麻醉后处死取脑,进行氯化三苯四唑(TTC)染色,计算脑梗死容积与全脑容积比值。**结果:**术前两组体重比较差异无统计学意义($P>0.05$);术后 10 d 和 27 d,给药组大鼠体重减轻率显著小于对照组 $[(-13.15 \pm 0.05)\% \text{ 比 } (-16.46 \pm 0.06)\%, (9.72 \pm 0.10)\% \text{ 比 } (-8.97 \pm 0.05)\%, P \text{ 均 } < 0.01]$;术后 10 d,两组神经病学评分比较差异无统计学意义($P>0.05$);术后 20 d 和 27 d,给药组神经病学评分 $[(1.30 \pm 0.48) \text{ 分和 } (0.60 \pm 0.52) \text{ 分}]$ 显著低于对照组 $[(2.20 \pm 0.92) \text{ 分和 } (1.70 \pm 0.68) \text{ 分}], P < 0.05 \text{ 和 } P < 0.01]$;术后 27 d,给药组脑梗死容积与全脑容积比值显著小于对照组 $[(12.99 \pm 3.55)\% \text{ 比 } (22.87 \pm 2.12)\%, P < 0.01]$ 。**结论:**脑梗死急性期 1~10 d 给予 G-CSF 可以有效减轻大鼠缺血性脑梗死程度,减少脑梗死体积,促进大脑神经功能的恢复。

【关键词】 粒细胞集落细胞刺激因子;骨髓干细胞;脑梗死,急性

中图分类号:R743.3;Q26 文献标识码:A 文章编号:1008-9691(2007)06-0374-04

Effects of granulocyte - colony stimulating factor mobilizing bone marrow stem cell on treatment of acute ischemic cerebral infarction in rats ZHAO Jing^{1,2}, GAO Bo². 1. Blood Diseases Hospital, Institute of Hematology, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 300020, China; 2. Tianjin Tianhe Hospital, Tianjin 300050, China

【Abstract】 Objective: To approach the therapeutic effect of granulocyte - colony stimulating factor (G-CSF) for treatment of rats with ischemic cerebral infarction. **Methods:** Twenty-four hours after ligating the left middle cerebral artery (MCA) and left common carotid artery (CCA) to induce cerebral infarction, Zeal Longa's neurological behavioral assessments were performed. There were 20 SD rats with scores equal to or more than 2 scores, and they were divided randomly into the G-CSF treatment group and the control group (each $n=10$). The G-CSF treatment group received daily abdominal cavity injection of G-CSF $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ from 1st day to 10th day; the control group received daily abdominal cavity injection of the same volume of saline from 1st day to 10th day. In the two groups, neurological behavioral assessments were performed before operation and 10, 20 and 27 days subsequent to the operation; the body weights were measured before operation and 10 and 27 days after the operation and the rate of loss in body weight was counted. Twenty-seven days after the operation, the rats were anesthetized and killed, and their cerebrums were taken out and stained by triphenyl tetrazolium chloride (TTC) to count the percentage of infarct volume to the total volume of the cerebrum. **Results:** Before ligating arteries, the body weight decrease rates were not significantly different between the two groups ($P>0.05$). On the 10th and the 27th day subsequent to ligation, the body weight decrease rate of the treatment group was much smaller than that of the control group $[(-13.15 \pm 0.05)\% \text{ vs. } (-16.46 \pm 0.06)\%; (9.72 \pm 0.10)\% \text{ vs. } (-8.97 \pm 0.05)\%, \text{ both } P < 0.01]$. On the 10th day after operation, the neurological behavioral assessments were not significantly different between the two groups ($P>0.05$). On the 20th day and the 27th day subsequent to ligation, the neurological behavioral assessments of the treatment group $[(1.30 \pm 0.48) \text{ score and } (0.60 \pm 0.52) \text{ score}]$ were much smaller than that of the control group $[(2.20 \pm 0.92) \text{ score and } (1.70 \pm 0.68) \text{ score}], P < 0.05 \text{ and } P < 0.01]$. On the 27th day after operation, the ratio of the infarction volume to the total cerebral volume of the treatment group was smaller than that of the control group $[(12.99 \pm 3.55)\% \text{ vs. } (22.87 \pm 2.12)\%, P < 0.01]$. **Conclusion:** Daily abdominal cavity injection of G-CSF $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ for 10 days in rats with acute ischemic cerebral infarction can relieve the ischemia degree, reduce the infarction volume and promote the recovery of cerebral functions.

【Key words】 Granulocyte - colony stimulating factor; bone marrow stem cell; acute ischemic cerebral infarction

脑梗死具有发病率高、致残率高、病死率高、复发率高的特点,目前传统的治疗手段不能修复或逆转已坏死的脑组织,也不能促进神经细胞再生及其功能恢复。近年研究发现,成年大脑神经干细胞和神经生成仍然存在^[1-3]。培养的干细胞和内源性干细胞均可生成神经元^[4-5]。骨髓干细胞包括造血干细胞(HSCs)、血管内皮祖细胞(EPCs)和间充质细胞(MSCs)3种,其具有自我更新和多向分化的能力,在适宜的体外培养中能生存、增殖并保存多向分化潜能,能产生和自己完全相同的子代细胞,同时还能分化成各种功能细胞^[6],可以演变为与其组织发育或其再生来源无关的多种组织的细胞^[7]。当脏器损伤发生后,骨髓会迅速动员多种干细胞迁移至病变处,产生自然的代偿性修复;而通过各种途径引入体内的外源性骨髓干细胞也会定向归巢至损伤处,发挥治疗作用。研究已发现,骨髓干细胞可以分化出神经细胞、神经胶质细胞、髓磷脂形成细胞等脑组织的几乎所有主要细胞,分化的神经细胞可以有效传导冲动;神经胶质细胞可以为神经细胞提供支持,髓磷脂形成细胞可以增强神经细胞的电冲动传导等^[8]。成体干细胞可以分化出能在脑组织中与其他神经细胞交流的神经细胞,并能形成正确的神经环路。骨髓干细胞移植有两种方法:一是先收集干细胞再将其直接注射;二是通过动员剂动员骨髓干细胞到血液循环再使干细胞定居。后一种方法因避免了外科手术过程及事先收集干细胞再回输的过程,故更有潜在临床应用价值^[9]。目前粒细胞集落刺激因子(G-CSF)是临床最常用的骨髓干细胞动员剂,应用G-CSF动员骨髓干细胞治疗急性脑梗死还处于研究的初始阶段。本研究旨在探讨G-CSF对大鼠脑梗死的治疗效果。

1 材料与方法

1.1 实验动物:体重250~320 g的健康雄性SD大鼠28只,购自中国医学科学院放射医学研究所动物中心。

1.2 实验材料:基因重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF,商品名惠而血),氯化三苯四唑(TTC)为美国Sigma公司产品;全自动图像分析仪。

1.3 大鼠缺血性脑梗死模型的制备:腹腔注射体积

分数为10%的水合氯醛(300 mg/kg)麻醉大鼠,取颈部正中切口,常规去毛消毒后,小心切开、分离暴露左侧颈总动脉至颈外动脉、颈内动脉分叉处。于分叉后结扎颈外动脉近心端,用动脉夹夹闭颈总动脉近心端和远心端,在颈总动脉近心端打一松结,离结扎部位约3 mm处剪一小口,插入直径0.24 mm、尖端用火烧圆的尼龙线,松开颈总动脉远心端动脉夹,轻推尼龙线尾端使之由颈总动脉通过分叉部进入颈内动脉,插入深度为 (18.1 ± 0.5) mm。扎紧颈总动脉近心端的松结,结扎颈总动脉远心端,除去动脉夹,剪去多余的尼龙线,缝合皮肤。

1.4 动物分组及处理:采用线栓法制备脑梗死模型成功后,术后24 h进行神经功能评分,入选2分及以上大鼠共20只。按随机数字表法分为给药组和对照组,每组10只。给药组:于脑梗死模型制备成功后给予G-CSF $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 腹腔内注射,共10 d;对照组:于同时间点腹腔内注射等量生理盐水。

1.5 体重测定及神经病学分级:两组大鼠的饲养方式、喂养食物完全相同。均于术前及术后10 d和27 d进行体重测定,计算体重减轻率;术前及术后10、20和27 d对大鼠进行神经病学评分分级。根据Zeal Longa的5分制评分标准:无神经损伤症状为0分;不能完全伸直右侧前肢为1分;向外侧转圈为2分;向右侧倾倒入为3分;不能自行行走、意识丧失为4分。

1.6 脑梗死容积与全脑容积比测定:术后27 d随机将各组6只大鼠用10%水合氯醛(300 mg/kg)麻醉后开颅取脑,将脑组织标本置于 -20°C 冰箱中冰冻30 min,取出后从视交叉处开始连续做5个冠状位切片,其间隔为2 mm。再将脑切片浸入TTC液中,在 37°C 水浴箱中染色20 min。然后从TTC液中取出切片,置于体积分数为10%的甲醛溶液中固定保存。每个染色后的脑组织切片分别用柯达数码相机拍照取片,将数据图片输入电脑,应用全自动图像分析系统,进行图像分析,计算脑梗死容积与全脑容积比值。

1.7 统计学处理:实验所得数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,进行F检验和t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组治疗后体重的变化(表1):脑梗死模型制

作者简介:赵 菁(1973-),女(汉族),天津市人,硕士研究生,主治医师。

备术前两组体重差异无统计学意义($P>0.05$);术后 10 d 和 27 d, 给药组大鼠体重增加显著好于对照组(P 均 <0.01)。

表 1 两组大鼠治疗前后体重的变化($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Changes of body weight of rats before and after MCA ligation in two groups($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	术前体重 (g)	体重减轻率	
		术后 10 d	术后 27 d
给药组	284.50±24.34	-(13.15±0.05)%	(9.72±0.10)%
对照组	282.00±24.22	-(16.46±0.06)%	-(8.97±0.05)%
t 值	0.23	134.01	528.60
P 值	>0.05	<0.01	<0.01

注:与对照组比较: * $P<0.01$

2.2 两组治疗后神经病学分级评分的变化(表 2): 术后 10 d, 两组神经病学分级评分差异无统计学意义($P>0.05$); 术后 20 d 和 27 d, 给药组神经病学分级评分显著低于对照组($P<0.05$ 和 $P<0.01$)。

表 2 两组大鼠神经病学分级评分的变化($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Changes of neurologic scale of rats with cerebral infarction in two groups($\bar{x}\pm s, n=10$) 分

组别	术后 10 d	术后 20 d	术后 27 d
给药组	3.00±0.82	1.30±0.48	0.60±0.52
对照组	2.80±0.79	2.20±0.92	1.70±0.68
t 值	0.557	2.740	4.090
P 值	>0.05	<0.05	<0.01

2.3 两组脑梗死容积与全脑容积比值的比较: 术后 27 d, 给药组脑梗死容积与全脑容积比值 $[(12.99\pm 3.55)\%]$ 显著小于对照组 $[(22.87\pm 2.12)\%]$, 两组比较差异有统计学意义($t=13.1, P<0.01$)。

3 讨论

G-CSF 是分子质量约 19.6 ku 的一种蛋白, 可以动员骨髓中干细胞进入外周血。在生理状态下, 骨髓中的 HSCs 约占有核细胞的 0.1%~1.0%, 而在外周血中仅占 0.01%。有文献报导给予 G-CSF $10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 外周血 CD34⁺ 细胞数量在第 6 日可增加 20~30 倍^[10-11]。G-CSF 在动员 HSCs 的同时, 对 EPCs 和 MSCs 也有动员作用^[12]。G-CSF 对于骨髓干细胞的动员涉及细胞黏附分子、趋化因子和生长因子的相互调节反应, 改变骨髓干细胞与骨髓基质间的相互作用, 进而影响干细胞的黏附、迁移和定居特性, 使干细胞穿过基质膜和血管内皮层而进入循环血流, 导致循环池中干细胞数量增多^[13]。Kronenwett 等^[14]认为造血干/祖细胞与骨髓基质微环境间的黏附作用决定其定植或迁移骨髓的特性。造血干/祖细胞黏附分子属于几个不同细胞黏附分子的超家族, 包括整和素、免疫球蛋白和 L-选择素。在正常情况下, 骨髓 CD34⁺ 细胞黏附分子的表

达率存在很大差异, 包括高表达、中表达和低表达的黏附分子。Levi-Schaffer 等^[15]认为, G-CSF 具有下调造血干/祖细胞表面黏附分子和骨髓微环境基质细胞的黏附分子表达, 而促进 CD34⁺ 细胞由骨髓迁移至外周血。G-CSF 动员后使 CD34⁺ 细胞表达细胞表面受体(VLA-4)明显下降, 导致骨髓中骨髓基质、粘连蛋白、VLA-4 结合粘连蛋白丝氨酸的黏附作用明显降低, 使得骨髓中干细胞离开骨髓, 进入外周血。国外研究发现, 在 G-CSF 的动员过程中, 骨髓中大量增生的中性粒细胞释放两种丝氨酸蛋白水解酶, 它们可以水解血管细胞间黏附分子-1(VCAM-1), 减少骨髓基质细胞表面 VCAM-1 的表达, 进而减弱 CD34⁺ 细胞表面 VLA-4 与骨髓基质细胞 VCAM-1 的黏附作用, 促进 CD34⁺ 细胞进入血液循环。另外, G-CSF 可以特异性诱导粒系祖细胞分化、增殖, 抑制外周血 HSCs 凋亡; 还可诱导基质金属蛋白酶(MMPs)降解骨髓细胞外基质, 在骨髓干细胞的动员中也起到重要作用。

既往认为 G-CSF 受体(G-CSFR)仅存在于造血干/祖细胞、髓祖细胞、成熟粒细胞、髓性白血病细胞表面。现在发现脑内也存在 G-CSF 的相应受体, 免疫组化和逆转录-聚合酶链反应均检测到大脑中动脉闭塞(MCAO)大鼠梗死区有 G-CSFR 表达^[16]。G-CSFR 可以在星形胶质细胞表达^[17], 也可以在神经元上表达^[18]。G-CSF 的表达水平与脑缺血的时相相关。目前认为 G-CSF 是通过效应细胞表面的受体起作用。Jung 等^[19]研究证实, G-CSF 通过其受体调节, 可促进体外培养的人神经干细胞和成年鼠脑内神经祖细胞的增殖分化。动员的干细胞只有定向迁移到缺血区才可能完成对损伤的修复。多项研究证明, 骨髓干细胞有向缺血组织归巢的特征。缺血时骨髓干细胞的自身动员可能是机体对缺血损伤的反应, 而表现为一种自我修复功能, 但这种自我修复功能在生理或病理情况下非常微弱。

在本研究中, 脑梗死模型复制成功后, 早期大鼠出现行动功能障碍, 活动减少, 进食减少, 因而体重减轻。但随着病程的进展, 大鼠功能有不同程度的恢复, 进食、活动好转, 体重减轻率减少。给药组术后 10 d 和 27 d 体重增加, 明显高于对照组, 说明给予 G-CSF 治疗后进食、活动改善优于未给药。给药组术后 20 d 和 27 d 神经病学分级评分显著低于对照组, 且术后 27 d, 给药组脑梗死容积与全脑容积比值显著小于对照组。

脑梗死发生后, 缺血脑组织局部炎症反应、局部

微血管表达的黏附分子和血脑屏障的破坏,有助于自体干细胞迁移至脑缺血区^[20]。干细胞能经血液循环透过血脑屏障进入缺血脑组织,进而分化成为神经元和星形胶质细胞,促进脑组织功能损伤的修复^[21]。此时缺血脑组织微环境与骨髓微环境有相似之处,一方面介导炎性细胞的黏附;另一方面可能增加损伤处对干细胞的捕获,从而促进局部修复,这一系列微环境改变可能是干细胞归巢的始动因素, Helmuth 称之为“干细胞听到损伤组织的召唤”^[22]。我们在急性期给予大鼠腹腔内注射 G-CSF,循环中被动员的干细胞数量会明显增加,因而在缺血脑组织局部炎症反应的“呼唤作用”下,归巢的干细胞数量增多。而归巢干细胞的数量决定了大鼠脑梗死容积减小、功能改善进而体重增加。因此,脑梗死急性期利用 G-CSF 动员骨髓干细胞治疗,可以减少梗死容积,促进神经功能的改善和修复。

参考文献:

- [1] Johansson C B, Momma S, Clarke D L, et al. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system [J]. Cell, 1999, 96(1): 25-34.
- [2] Doetsch F, Caille I, Lim D A, et al. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain [J]. Cell, 1999, 97(6): 703-716.
- [3] Eriksson P S, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus [J]. Nat Med, 1998, 4(11): 1313-1317.
- [4] Chen J, Zhang Z G, Li Y, et al. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats [J]. Circ Res, 2003, 92(6): 692-699.
- [5] Hill W D, Hess D C, Martin-Studdard A, et al. SDF-1 (CXCL12) is upregulated in the ischemic penumbra following stroke; association with bone marrow cell homing to injury [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2004, 63(1): 84-96.
- [6] 于少娟, 纪莉. 骨髓干细胞移植治疗缺血性心脏病的研究进展 [J]. 中国临床医学, 2006, 13(4): 564-565.
- [7] Wilke N M, Jerosch-Herold M, Zenovich A, et al. Magnetic resonance first pass myocardial perfusion imaging: clinical validation and future applications [J]. J Magn Reson Imaging, 1999, 10(5): 676-685.
- [8] 陈运贤, 陆英, 钟雪云, 等. 粒细胞集落刺激因子动员骨髓干细胞治疗大鼠缺血性脑梗死 [J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(4): 560-565.
- [9] 杜建平, 刘克强. 动员骨髓干细胞再生梗死心肌的治疗进展 [J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16(11): 699-702.
- [10] Platzbecker U, Bornhäuser M, Zimmer K, et al. Second donation of granulocyte-colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells: risk factors associated with a low yield of CD34⁺ cells [J]. Transfusion, 2005, 45(1): 11-15.
- [11] Tournilhac O, Cazin B, Leprêtre S, et al. Impact of frontline fludarabine and cyclophosphamide combined treatment on peripheral blood stem cell mobilization in B-cell chronic lymphocytic leukemia [J]. Blood, 2004, 103(1): 363-365.
- [12] Shargorodsky M, Leibovitz E, Lubimov L, et al. Prolonged treatment with the AT1 receptor blocker, valsartan, increases small and large artery compliance in uncomplicated essential hypertension [J]. Am J Hypertens, 2002, 15(12): 1087-1091.
- [13] 郑丽芳, 柳卫民, 梅元武. 骨髓干细胞动员治疗脑梗死 [J]. 国际脑血管病杂志, 2006, 14(5): 373-376.
- [14] Kronenwett R, Martin S, Haas R. The role of cytokines and adhesion molecules for mobilization of peripheral blood stem cells [J]. Stem Cells, 2000, 18(5): 320-330.
- [15] Levi-Schaffer F, Garbuzenko E, Rubin A, et al. Human eosinophils regulate human lung- and skin-derived fibroblast properties in vitro: a role for transforming growth factor beta (TGF-beta) [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(17): 9660-9665.
- [16] Schäbitz W R, Kollmar R, Schwaninger M, et al. Neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor after focal cerebral ischemia [J]. Stroke, 2003, 34(3): 745-751.
- [17] Malipiero U V, Frei K, Fontana A. Production of hemopoietic colony-stimulating factors by astrocytes [J]. J Immunol, 1990, 144(10): 3816-3821.
- [18] Hintzen R Q, Voormolen J, Sonneveld P, et al. Glioblastoma causing granulocytosis by secretion of granulocyte-colony-stimulating factor [J]. Neurology, 2000, 54(1): 259-261.
- [19] Jung K H, Chu K, Lee S T, et al. Granulocyte colony-stimulating factor stimulates neurogenesis via vascular endothelial growth factor with STAT activation [J]. Brain Res, 2006, 1073-1074: 190-201.
- [20] Ji J F, He B P, Dheen S T, et al. Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury [J]. Stem Cells, 2004, 22(3): 415-427.
- [21] Chen J, Li Y, Wang L, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats [J]. Stroke, 2001, 32(4): 1005-1011.
- [22] Helmuth L. Neuroscience, stem cells hear call of injured tissue [J]. Science, 2000, 290(5496): 1479-1481.

(收稿日期: 2007-09-06 修回日期: 2007-10-20)

(本文编辑: 李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

《中国中西医结合急救杂志》稿约说明

《中国中西医结合急救杂志》欢迎广大作者踊跃投稿, 同时欢迎全英文稿件(应同时附中文摘要 1 份)。投稿请严格按照杂志上所登稿约的要求。同时交付文稿 1 份、单位介绍信或文稿加盖公章、软盘(Word 排版)、审稿费(每篇 40 元)、课题批件复印件, 以利于稿件审稿过程, 提高稿件刊出速度。

本刊对所有来稿均采用同行审稿的方式进行公平、公正审定。

(本刊编辑部)