DOI:10.15972/j.cnki.43-1509/r.2018.06.009

·论著:心脑血管疾病专题·

骨髓间充质干细胞移植对脑动脉栓塞大鼠 VEGF165、Notch1 表达的影响

贺崇欣,汪 亮,曹光东,杜 进,杨 君
(池州市人民医院神经外科,安徽 池州 247000)

摘 要: 为探究骨髓间充质干细胞(BMSCs)移植对脑损伤大鼠的改善作用机制,本实验通过建立脑损伤大鼠模型,观察 BMSCs 移植对脑动脉栓塞大鼠血管内皮生长因子(VEGF) 165、Notch1 表达的影响。将 45 只 SD 大鼠随机分为假手术对照组、动脉栓塞(MCAO)组、BMSCs 移植组。检测脑组织栓塞区微血管数量,及各组大鼠 VEGF165、Notch1 蛋白和 mRNA 的表达。结果发现 MACO 组、BMSCs 移植组大鼠的脑组织中微血管数量明显多于假手术对照组;MACO 组和 BMSCs 移植组的 VEGF165 与 Notch1 的蛋白表达、VEGF165 与 Notch1 的 mRNA 表达均高于假手术对照组;BMSCs 移植组较 MACO 组更高。根据结果推测 BMSCs 移植可能通过激活 Notch 信号通路促进 VEGF165 的表达,而促进脑动脉栓塞区的血管新生。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 干细胞移植; 脑动脉栓塞; VEGF165; Notch1
中图分类号:R743 **文献标识码:**A

The effect of bone marrow mesenchymal stem cells transplantation on the expression of VEGF165 and Notch1 in rats with cerebral arterial embolization

HE Chongxin, WANG Liang, CAO Guangdong, DU Jin, YANG Jun
(*Department of Neurosursery, Chizhou People's Hospital, Chizhou* 572000 *Anhui*, *China*)

Abstract: In order to explore the mechanism of bone marrow mesenchymal stem cell (BMSCs) transplantation on improving brain injury in rats, the effect of BMSCs transplantation on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) 165 and Notch1 in rats with cerebral artery embolization was observed by establishing a rat model of brain injury. 45 SD rats were randomly divided into the sham operation control group, the middle cerebral artery occlusion (MACO) group and the BMSCs transplantation group. The number of microvessel in cerebral embolism area and the expression of VEGF165, Notch1 protein and mRNA in each group were detected. The number of microvessels in the brain tissue of the MACO group and the BMSCs transplantation group was significantly more than that in the sham control group. The protein expression of VEGF165 and Notch1, and the mRNA expression of VEGF165 and Notch1 in the group MACO and the BMSCs transplantation group were higher than those in the sham operation control group. The BMSCs group was higher than the MACO group. The conclusion is that BMSCs transplantation may promote the expression of VEGF165 by activating the Notch signaling pathway. Thus, it can promote the angiogenesis in the cerebral artery embolism area.

Key words: Bone marrow mesenchymal stem cells; stem cell transplantation; Cerebral artery embolism; VEGF165; Notch1

动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)是指栓子沿血液循环进入脑动脉系统,引起动脉管腔闭塞,致使该动脉供血区局部脑组织的坏死。MCAO 是威胁人类健康的一种疾病,近年来发现促进脑内血管生成是一种新的恢复脑梗死的治疗手段。骨髓间充质干细胞(Bone Mesenchymal Stem Cells,BMSCs)是具有自我更新能力的一种细胞,可以多向分化为机体的各种细胞,其在体外诱导可以分化为神经细胞[1],在组织工程、基因工程、

收稿日期:2018-05-08;**修回日期:**2018-06-25

* **通信作者,**E-mail:jgxhlm@163.com.

细胞移植方面有较好的临床应用前景,BMSCs 移植是治疗脑血管疾病一种新的治疗方法。本实验通过建立大鼠脑动脉栓塞模型,观察 BMSCs 移植后脑组织微血管密度(micro-vascular density, MVD)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)165、Notch1 的表达,来探究 BMSCs 促进血管新生的机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 实验动物:45 只健康雄性 SD 大鼠,体质量(260±20)g;10 只健康雄性 SD 大鼠,体质量(90±10)g,购自北京维通利华实验技术有限公司,许可证号 SCXK(京)2011-0011。

主要试剂:胎牛血清、DMEM 培养基、胰酶、双抗(Gibico,美国);兔抗鼠Ⅷ因子多克隆抗体(Preprotech,美国);小鼠抗大鼠 Notch1 抗体(Chemicon,美国);兔抗大鼠 VEGF 抗体(Preprotech,美国);辣根过氧化物标记的羊抗鼠 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司);组织蛋白提取试剂盒(北京索莱宝)。主要仪器:光学显微镜(OLYMPUS,日本);低温高速离心机(Thermo,美国);PCR 仪(ABI,美国);微量移液器、培养瓶、培养皿等。

1.2 BMSCs 的分离培养[2] 取体重为(90±10)g SD 大鼠,分离其两侧的股骨,以使骨髓腔充分暴露,用 DMEM 培养基反复冲洗后,将骨髓悬液过滤并离心,弃掉上清,将重悬的细胞移至培养瓶中于细胞培养箱中进行培养。培养 24 h 后弃掉没有贴壁的细胞,更换新的培养液。在此之后每 3 天进行 1 次换液,等到细胞生长融合达到 80%~90%时传代培养。取第 4 代的细胞用于本实验研究来进行移植。

1.3 MCAO 模型的建立 线栓法制作 MCAO 模型[3-4]。将大鼠按照 1 mL/100 g 腹腔注射 4%的水合氯醛麻醉。大鼠固定后,在颈部正中切口,分离暴露出右侧颈总、颈内和颈外动脉,结扎颈外动脉远心端、颈总动脉近心端,夹闭颈内动脉,在颈外动脉近心端剪一“V”形切口,将线栓插入距离颈总动脉 18 mm 处时固定,缝合皮下组织,1 个小时后拔线,缝合切口。大鼠即刻出现右侧 Horner 征即为模型成功。

1.4 MCAO 瘫痪程度评分 动物麻醉清醒后,参照 Zea Longa 方法[3],对神经功能缺损进行评分。1~3 分者为纳入本实验研究对象,对于神经损伤太重(4 分)或太轻(0 分)的老鼠弃之不用。

1.5 实验分组 BMSCs 移植组:模型制作成功 24 小时后,将第 4 代的 BMSCs 细胞 3×10^6 个混悬于 0.6 mL磷酸盐缓冲液(PBS),通过股静脉匀速注入。MACO 组,24 小时后股静脉匀速注入等量 PBS。假手术对照组,只切开颈部皮肤暴露动脉,不插线栓,24 小时后股静脉匀速注入等量 PBS。各组再按不同时间点随机分为 3 组,每组 5 只。BMSCs 移植后 4 天、7 天、14 天取材。

1.6 MVD 检测 随机选择各组各时间点脑组织冰冻切片 5 张,按照免疫荧光染色法Ⅷ因子检测法,每单个内皮细胞或内皮簇为一个血管计数,每个标本取 2~3 张切片,荧光显微镜下对微血管进行计数。用均值来作为微血管密度。

1.7 Western blot 检测 VEGF165、Notch1 蛋白表达 严格按照试剂盒说明书进行操作来提取各组大鼠脑组织中的总蛋白,并进行蛋白定量。分别制备浓缩胶与分离胶,加样后行蛋白电泳、电转移,5%脱脂奶粉封闭后,加入相应一抗兔抗大鼠 VEGF 抗体、小鼠抗大鼠 Notch1 抗体(稀释倍数为 1∶1 000),4 ℃孵育过夜、洗膜后加入二抗(稀释倍数为 1∶2 000)37 ℃孵育 2 h,清洗后于暗室中滴加化学发光液显影,于凝胶成像系统采集图像。以 β-actin 蛋白作为内参,各组目的条带灰度值与内参进行比值为蛋白的表达相对量。

1.8 RT-PCR 检测 VEGF165、Notch1 mRNA 表达 取大鼠脑组织提取总 RNA,于 PCR 仪中行逆转录,按照预先设定荧光定量 PCR 反应程序进行扩增,行琼脂凝胶电泳,用凝胶成像分析系统对电泳条带的吸光度(OD 值)半定量分析。结果以目的基因的 OD 值比上 β-actin 的 OD 值来表示。

1.9 统计学分析 实验所得数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,用 SPSS19.0 进行统计处理,两组间比较采用独立样本 t 检验;多组间比较采用重复测量方差分析,组间两两比较用 LSD-t 检验,$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 BMSCs 形态学变化 原代培养的细胞呈圆形,1 天后即开始贴壁生长,3 天后可见细胞呈成纤维样,5 天时细胞生长增加,10 天左右细胞生长达到 80%~90%融合,细胞呈长梭形。传代后,细胞增殖速度加快,随着传代代数的增加,细胞形态多逐渐趋于一致较均一为长梭形,并呈漩涡或束状排列生长(图 1)。

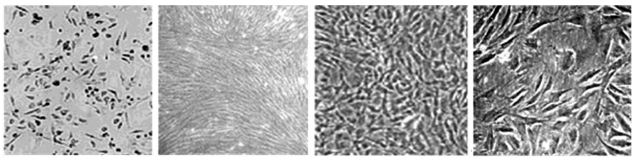


图 1　骨髓间充质干细胞的形态学观察(200×)

A:原代培养的细胞;B:呈成纤维样生长的贴壁干细胞;C:细胞生长达到 80%~90%;D:第 4 代干细胞

2.2　**各个不同时间点大鼠脑组织 MVD 分析**　在假手术组微血管计数几乎很少,MCAO 组、BMSCs 组微血管数量显著高于假手术组($P<0.05$),BMSCs 移植后新生血管数量明显增多($P<0.05$,表 1)。

表 1　大鼠脑组织不同时间微血管计数

分组	n	4 天	7 天	14 天
假手术对照组	5	2.831±0.310	2.852±0.303	2.943±0.318
MCAO 组	5	6.852±0.465[a]	7.266±0.467[a]	6.968±0.617[a]
BMSCs 组	5	10.253±0.762[ab]	13.858±0.856[ab]	10.899±0.623[ab]

与假手术对照组,[a]$P<0.05$;与 MCAO 组,[b]$P<0.05$

2.3　**Wsternblot 检测 VEGF165、Notch1 蛋白的表达**　MCAO 组、BMSCs 组在各个时间点 VEGF165、Notch1 蛋白表达均明显高于假手术对照组($P<0.05$),BMSCs 移植后,表达更高($P<0.05$),在第 14 天各组蛋白表达开始下降(图 2、表 2)。

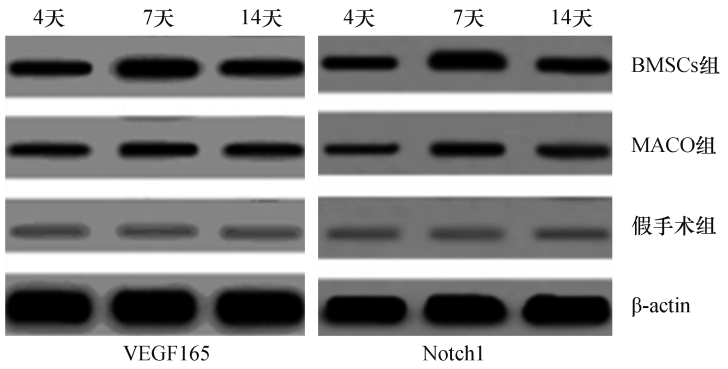


图 2　各组大鼠不同时间点 VEGF165、Notch1 蛋白的表达

表 2　各组大鼠不同时间点脑组织 VEGF165、Notch1 蛋白的表达($n=5$)

分组	VEGF165			Notch1		
	4 天	7 天	14 天	4 天	7 天	14 天
假手术对照组	0.019±0.002	0.019±0.003	0.018±0.003	0.014±0.002	0.014±0.004	0.016±0.003
MCAO 组	0.156±0.007[a]	0.189±0.011[a]	0.121±0.007[a]	0.145±0.008[a]	0.186±0.010[a]	0.130±0.007[a]
BMSCs 组	0.214±0.013[ab]	0.298±0.014[ab]	0.175±0.006[ab]	0.202±0.012[ab]	0.345±0.014[ab]	0.183±0.008[ab]

与假手术对照组,[a]$P<0.05$;与 MCAO 组,[b]$P<0.05$

2.4　**RT-PCR 检测 VEGF165、Notch1 mRNA 的表达**　MCAO 组、BMSCs 组 VEGF165、Notch1 mRNA 表达均明显高于假手术对照组($P<0.05$),BMSCs 移植后表达更高($P<0.05$,表 3)。

表 3　各组大鼠不同时间点脑组织 VEGF165、Notch1 mRNA 的表达($n=5$)

分组	VEGF165			Notch1		
	4 天	7 天	14 天	4 天	7 天	14 天
假手术对照组	0.401±0.046	0.406±0.038	0.397±0.036	0.135±0.024	0.148±0.029	0.156±0.027
MCAO 组	0.700±0.040[a]	0.732±0.034[a]	0.688±0.041[a]	0.329±0.035[a]	0.458±0.033[a]	0.331±0.028[a]
BMSCs 组	0.901±0.042[ab]	1.313±0.047[ab]	1.005±0.043[ab]	0.587±0.038[ab]	0.712±0.041[ab]	0.603±0.026[ab]

与假手术对照组比较,[a]$P<0.05$;与 MCAO 组比较,[b]$P<0.05$

3 讨 论

脑栓塞有较高的发病率及致死率,会导致神经功能损害,随着对干细胞移植这一领域的研究越来越多,为治疗脑动脉栓塞提供了新的治疗手段。BMSCs 来源充足,生物特性稳定,易于传代培养,可以分泌大量促血管生长因子[5]。BMSCs 移植可以通过组织渗透、减少细胞凋亡、分泌细胞因子、减少炎症反应等许多途径而作用于神经系统,对受损组织发挥修复与保护的作用[6]。BMSCs 具有多向分化的功能,有研究表明 BMSCs 移植可以迁移到病变部位,分化为神经细胞,改善脑梗死模型大鼠的神经功能[7]。BMSCs 移植对脑缺血损伤具有恢复、保护作用,其作用机理可能是通过增加神经细胞数量与神经因子表达来实现[8]。

血管新生是指血管内皮细胞在血管生成因子的作用下形成新生血管,血管发生密度改变决定了脑梗死后神经元存活与否,同时也是干细胞移植成功与否的关键性因素[9]。本实验通过股静脉注射将 BMSCs 移植到 MCAO 大鼠模型体内,通过促进栓塞区血管新生降低神经功能的损失。本研究发现栓塞区脑组织血管新生明显多于对照组,BMSCs 组有大量微血管生成,提示可能是 VEGF 表达上调,随着时间延长,数量增加,在第 14 天时数量开始下降,进一步 Westernblot、PCR 实验也证明了这一推论。

目前广大学者认为与血管新生密切有关的是 VEGF 和 Notch 信号通路。病理条件下,Notch 信号通路与血管形成密切相关,而 VEGF 可以通过 Notch 信号通路发挥生理作用,促进血管生成[10-11]。VEGF 是特异性促血管生成因子,对血管新生的起始具有关键性作用,其中 VEGF165 的作用最明显。MACO 动物模型显示,MACO 后 24 小时血管内皮细胞开始明显增生[12],在本实验中,BMSCs 移植到脑栓塞大鼠体内后发现 VEGF165 蛋白、mRNA 相较于假手术对照组明显升高,说明 BMSCs 移植能够通过增加 VEGF165 的表达从而促进血管新生。

研究发现,许多信号通路参与了血管新生的过程,其中 Notch 信号的调节作用尤为突出[13],另外,Notch 信号激活可以促进 BMSCs 移植作用,使心肌梗死区 BMSCs 向内皮细胞分化,促进缺血心肌中毛细血管新生[14],此外还对一些组织的血管生成具有调控作用[15]。在本实验中,BMSCs 移植到脑栓塞大鼠体内后发现 Notch1 蛋白、mRNA 相较于假手术对照组明显升高,表明 BMSCs 移植后可能通过激活 Notch 信号通路而促进脑动脉栓塞组织中 VEGF165 的表达,从而促进形成新生的血管[2]。

组织器官缺血后 VEGF 和 Notch 信号通路均与血管新生有着密切关系。VEGF 能刺激血管的新生,是血管生成的重要因素,VEGF 表达增加激活 Notch 信号通路。本实验检测了脑栓塞组织区的 VEGF165 蛋白、mRNA 与 Notch1 蛋白、mRNA,结果显示,MCAO 组、BMSCs 组 VEGF165 蛋白、mRNA 与 Notch1 蛋白、mRNA 表达较假手术对照组明显升高。表明 Notch 信号通路可以促进 BMSCs 分化,提示 VEGF 调控血管生成过程中,Notch 信号通路也参与血管新生,起着重要调控作用。

综上所述,BMSCs 移植可对脑动脉栓塞大鼠有很好的治疗效果,能够使 BMSCs 在栓塞区存活,加快促进血管新生,提高 VEGF、Notch 表达,激活 VEGF/Notch 通路,促进受损神经功能的恢复,在一定程度上保护了脑组织,为临床治疗脑栓塞提供了新的治疗方法。但 VEGF/Notch 通路在 BMSCs 移植促进脑微血管形成中的具体机制需要广大学者的进一步探索。

参考文献:

[1] ZHOU J, TIAN GP, WANG JE, et al. In vitro differentiation of adipose-derived stem cells and bone marrow-derived stromal stem cells into neuronal-like cells[J]. Neural Regen Res, 2011, 6(19): 1467-82.

[2] CHANG HK, KIM PH, CHO HM, et al. Inducible HGF-secreting human umbilical cord blood-derived MSCs produced via TALEN-mediated genome editing promoted angiogenesis[J]. Mol Ther, 2016, 24(9): 1644-54.

[3] LONGA EZ, WEINSTEIN PR, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.

[4] 王桥生,符辉,曾红科. 线栓法大鼠局灶脑缺血模型的改进与评价[J]. 中南医学科学杂志, 2012, 40(3): 291-4.

[5] QIAN D, WEI G, XU C, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) repair? acute? necrotized pancreatitis by secreting microRNA-9 to target the NF-κB1/p50 gene in rats[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 581.

[6] SHI R, HU C, YUAN Q, et al. Involvement of vascular peroxidase 1 in angiotensin Ⅱ-induced vascular smooth muscle cell proliferation[J]. Cardiovasc Res, 2011, 91(1): 27-36.

[7] 彭凤玲,莫中成,龙双涟.血管紧张素Ⅱ2 型受体与缺血性脑卒中的研究进展[J]. 中南医学科学杂志, 2016, 44(6): 696-700.

[8] MARTA E, CASTRO-MANRREZA, JUAN J. Immunoregulation by mesenchymal stem cells: Biological aspects and clinical applications[J]. J Immunol Res, 2015, 2015(2): 394917.

(下转第 620 页)

的研究进展[J].中国动脉硬化杂志,2016,24(8):850-4.
[7] 王俊,唐琳梅,梅永,等.高龄胆胰疾病患者治疗性内镜逆行胰胆管造影的临床特点及并发症分析[J].中国内镜杂志,2018,24(5):7-11.
[8] 邵长周.慢性阻塞性肺疾病的临床表型个体化治疗[J].中南医学科学杂志,2017,45(6):541-3.
[9] JARENO-ESTEBAN JJ, MUNOZ-LUCAS MA, GOMEZ-MARTIN O, et al. Study of 5 volatile organic compounds in exhaled breath in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Arch Bronconeumol, 2017, 53 (5): 251-6.
[10] BESA V, TESCHLER H, KURTH I, et al. Exhaled volatile organic compounds discriminate patients with chronic obstructive pulmonary disease from healthy subjects [J]. Int J Chronic Obstr Pulm Dis, 2015, 10: 399-406.
[11] ANDERS C, JESPER RD, INGRID T, et al. A systematic review of breath analysis and detection of volatile organic compounds in COPD [J]. J Breath Res, 2016, 10 (3): 034002.
[12] VAN BERKEL J, DALLINGA JW, MOLLER GM, et al. A profile of volatile organic compounds in breath discriminates COPD patients from controls [J]. Respir Med, 2010, 104 (4): 557-63.
[13] CRISTESCU SM, GIETEMA HA, BLANCHET L, et al. Screening for emphysema via exhaled volatile organic compounds [J]. J Breath Res, 2011, 5 (4): 046009.
[14] PHILLIPS CO, SYED Y, MAC PARTHALAIN N, et al. Machine learning methods on exhaled volatile organic compounds for distinguishing COPD patients from healthy controls [J]. J Breath Res, 2012, 6 (3): 036003.
[15] GAIDA A, HOLZ O, NELL C, et al. A dual center study to compare breath volatile organic compounds from smokers and non-smokers with and without COPD [J]. J Breath Res, 2016, 10 (2): 026006.
[16] ALLERS M, LANGEJUERGEN J, GAIDA A, et al. Measurement of exhaled volatile organic compounds from patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) using closed gas loop GC-IMS and GC-APCI-MS [J]. J Breath Res, 2016, 10 (2): 026004.
[17] SINUES PML, MEIER L, BERCHTOLD C, et al. Breath analysis in real time by mass spectrometry in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Respiration, 2014, 87 (4): 301-10.
[18] BASANTA M, IBRAHIM B, DOCKRY R, et al. Exhaled volatile organic compounds for phenotyping chronic obstructive pulmonary disease: a cross-sectional study [J]. Respir Res, 2012, 13 (72): 1-9.
[19] RABE KF, HURD S, ANZUETO A, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2007, 176 (6): 532-55.
[20] MUELLER M, MIKOVINY T, JUD W, et al. A new software tool for the analysis of high resolution PTR-TOF mass spectra [J]. Chemom Intell Lab Syst, 2013, 127: 158-65.
[21] STOCKWELL CE, VERES PR, WILLIAMS J, et al. Characterization of biomass burning emissions from cooking fires, peat, crop residue, and other fuels with high-resolution proton-transfer-reaction time-of-flight mass spectrometry [J]. Atmos Chem Phys, 2015, 15 (2): 845-65.
[22] DE GOUW JA, GOLDAN PD, WARNEKE C, et al. Validation of proton transfer reaction-mass spectrometry (PTR-MS) measurements of gas-phase organic compounds in the atmosphere during the New England Air Quality Study (NEAQS) in 2002 [J]. J Geophys Res Atmos, 2003, 108 (D21): 4682.
[23] SARKAR C, SINHA V, KUMAR V, et al. Overview of VOC emissions and chemistry from PTR-TOF-MS measurements during the SusKat-ABC campaign: high acetaldehyde, isoprene and isocyanic acid in wintertime air of the Kathmandu Valley [J]. Atmos Chem Phys, 2016, 16 (6): 3979-4003.
[24] RABE KF, WATZ H. Chronic obstructive pulmonary disease [J]. Lancet, 2017, 389 (10082): 1931-40.

(本文编辑:蒋湘莲)

(上接第 596 页)

[9] ANSEN TM, MOSSA J, BRINDLEN P. Vascular endothelial growth factor and angiopoietins in neurovascular regeneration and Protection following stroke[J]. Curr Neurovasc Res, 2008, 5(4): 236-45.
[10] PARK SS, MOISSEIEV E, BAUER G, et al. Advances in bone marrow stem cell therapy for retinal dysfunction [J]. Prog Retin Eye Res, 2016, 56(1): 148-65.
[11] XIANG BX, LIU TT, SUN FL, et al. Advances in research on VEGF-related signaling pathways in angiogenesis [J]. Chin J Comp Med, 2015, 25(12): 81-5.
[12] FUNAHSSHI Y, SHAWBER CJ, SHARMA A, et al. Notch modulates VEGF action in endothelial cells by inducing Matrix Metalloprotease activity[J]. Vascular Cell, 2011, 3(1): 2-8.
[13] TSAII JL, LEE YM, PAN CY, et al. The novel VEGF121-VEGF165 fusion attenuates angiogenesis and drug resistance via targeting VEGFR2-HIF-1α-VEGF165/L on signaling through PI3K-AKT-m TOR pathway[J]. Curr Cancer Drug Targ, 2016, 16(3) : 275-86.
[14] YE X, ABOU-RAYYAH Y, BISCHOFF J, et al. Altered ratios of pro- and anti-angiogenic VEGF-A variants and pericyte expression of DLL4 disrupt vascular maturation in infantile haemangioma [J]. Journal of Pathology, 2016, 239(2): 139-51.
[15] NEDVETSKY PI, ZHAO X, MATHIVET T, et al. cAMP-dependent protein kinaseA(PKA) regulates angiogenesis by modulating tip cell behavior in aNotch-independent manner[J]. Development, 2016, 143(19): 3582-90.

(本文编辑:蒋湘莲)