

间充质干细胞联合低强度经颅超声治疗对 TBI 大鼠的神经保护作用机制研究

姚欣雨^{1,2,3}, 李悦⁴, 陈燕生², 杜娟², 梁欣², 刘兰祥², 曹振东³

摘要 目的 探讨间充质干细胞(MSC)联合低强度经颅超声(LITUS)治疗对创伤性脑损伤(TBI)的神经保护作用。方法 将72只SD大鼠随机均分为4组,即对照组、TBI组、MSC组、联合治疗组。应用气压控制性皮质撞击仪建立TBI模型,术后24h内,采用原位注射移植MSC至损伤位点。使用超声刺激仪对损伤部位进行连续28d LITUS治疗。术后1、3、7、14、21、28d对各组大鼠进行改良神经功能评分(mNSS评分),HE染色检测损伤部位病理变化,免疫组化、Western blot和RT-PCR检测脑源性神经营养因子(BDNF)、生长相关蛋白-43(GAP-43)、突触后致密蛋白-95(PSD-95)和胶质纤维酸性蛋白(GFAP)的mRNA及蛋白表达。结果 与对照组相比,TBI组的mNSS评分增加($P < 0.05$),GAP-43、PSD-95表达降低,GFAP表达升高($P < 0.05$);与TBI组相比,MSC组的mNSS评分降低($P < 0.05$),BDNF、GAP-43、PSD-95表达升高,GFAP表达降低($P < 0.05$);与MSC组相比,联合治疗组的mNSS评分降低($P < 0.05$),BDNF、GAP-43、PSD-95表达升高,GFAP表达降低($P < 0.05$)。结论 MSC联合LITUS治疗TBI发挥神经保护作用的机制,可能与促进BDNF、GAP-43、PSD-95表达,减少GFAP表达有关。

关键词 创伤性脑损伤;低强度经颅超声;间充质干细胞;联合治疗;神经功能损伤

中图分类号 R 651.15

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)01-0073-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.01.013

创伤性脑损伤(trumatic brain injury, TBI)是导致死亡和致残的重要原因,全世界每年有超过500万人死于脑外伤^[1]。目前尚无有效方法治疗TBI导致的

神经损伤。近年来多项研究^[2]表明,间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)可以减轻神经变性、炎症反应,促进神经发生,是目前有效治疗TBI的方法之一。低强度经颅超声刺激(low-intensity transcranial ultrasound stimulation, LITUS)是一种物理刺激方法,对于TBI有着显著的疗效,并能够促进MSC的增殖、分化^[3-4]。课题组前期实验^[5]显示,LITUS能对TBI后脑组织发挥神经保护作用。因此,在MSC移植基础上加用LITUS进行干预,可能对TBI具有更好疗效。突触可塑性相关蛋白在TBI后的神经修复中起着重要调节作用,该研究通过检测突触可塑性相关蛋白脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、生长相关因子-43(growth-associated protein-43, GAP-43)、突触后致密蛋白-95(postsynaptic density protein-95, PSD-95),及胶质原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)的表达变化,探讨二者联合治疗对TBI所致的神经损伤是否具有协同作用及可能涉及的机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 实验动物及分组 72只6~8周龄,体质量220~250g的雄性SD大鼠,由北京维通利华实验动物中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2021-0006。根据治疗方式的不同,按照随机数字表法将TBI大鼠模型均分为4组:对照组、TBI组、MSC组、联合治疗组。

1.1.2 实验试剂 MSC(上海卡替生物技术有限公司);兔多克隆抗BDNF(批号SAB5700726)、兔多克隆抗GAP-43(批号AB5220)、兔多克隆抗PSD-95(批号AB9708)、兔多克隆抗GFAP抗体(批号HPA056030)(美国Sigma公司);羊抗兔IgG抗体(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号GB11002);兔多克隆 β -actin抗体(美国CST公司,批号4970S);TBST缓冲液(批号ST673)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(批号P0012S)(北京Beyotime公司);ECL蛋白印迹化学发光检测试剂盒(上海absin生

2022-09-14 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81871029)

作者单位:¹承德医学院研究生学院,承德 067000

²秦皇岛市第一医院核磁科,秦皇岛 066000

³承德医学院附属医院核磁科,承德 067000

⁴秦皇岛市第一医院骨科院区,秦皇岛 066000

作者简介:姚欣雨,女,硕士研究生;

刘兰祥,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:liulanxiang66@sina.com;

曹振东,男,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:czdcsh891@163.com

物科技有限公司,批号 abs920-2);逆转录试剂盒(辽宁大连 TaKaRa 公司,RR037A)。

1.1.3 实验仪器 标准型脑立体定位仪(68861N)、气压控制性皮层撞击仪(68099 II)、吸入式气体麻醉机(RWD510)(深圳瑞沃德生命科技有限公司);微型注射器(瑞士 Hamilton 公司,800N-84852);微型注射器泵(美国 stoelting 公司,QSI-GD030);超声刺激仪(石家庄渡康医疗器械有限公司,DK-102T);包埋机(金华市科迪仪器设备有限公司,KD-BM);石蜡切片机(美国 Thermo Fisher 公司,V11335);光学显微镜(日本 OLYMPUS 公司,BX43F);37 °C 温箱(LHS-150SC)、65 °C 温箱(LRH-250CA)(上海合恒仪器设备有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 TBI 动物模型制备 所有大鼠术前腹腔注射 2% 戊巴比妥钠麻醉,固定于脑立体定位仪上,采用 CCI 法制备 TBI 大鼠模型^[6]。头部去毛、消毒,于中点处切约 1.5 ~ 2.0 cm 切口,根据大鼠的脑立体定位图谱,于右侧顶叶(矢状线旁 2.5 mm,冠状线后 3.8 mm)磨钻去除一个直径约 5 mm 的骨瓣,保持硬脑膜完整且勿伤及重要血管。选用直径 5 mm 的打击头,以 5 m/s 的速度撞击,达到硬脑膜层下 2.5 mm 的深度,撞击时长 1 s。术后每日上午 9:00 腹腔注射青霉素 0.2 ml(青霉素溶于 0.9% NaCl 注射液,40 万单位/ml)抗感染,连续 3 d。对照组仅打开骨窗,但不施加撞击。

1.2.2 MSC 原位注射 造模后大鼠仍处于麻醉状态,立即进行 MSC 原位注射。将大鼠固定在脑立体定位仪上,将微型注射器用悬浮介质(生理盐水)回填、冲洗,然后连接到微型注射器泵。取 2 μ l 细胞悬液(2.5×10^7 个细胞/ml),靶向移植到损伤部位皮质区,注射部位为损伤中心(矢状线旁 2.5 mm,冠状线后 3.8 mm),深度为 2.5 mm,速度为 1 μ l/min。注射完成后,留针 5 min,缓慢退针,共移植 5×10^4 个细胞于损伤区域^[7]。对照组及 TBI 组按同样方法注射等体积生理盐水。

1.2.3 LITUS 治疗 联合治疗组大鼠在移植 MSC 后立即进行 LITUS 治疗。除造模当日外,每日上午 8:00 进行 LITUS 治疗,连续不间断治疗 28 d。吸入 4% 异氟烷诱导麻醉,在 2.5% 异氟烷维持麻醉状态下将大鼠固定在脑立体定位仪上,以保证 LITUS 治疗位置的准确性。将超声探头置于大鼠 TBI 区域并涂抹耦合剂,超声刺激仪模式设置为颅脑损伤模式①,超声刺激参数设置为 1.2 W/cm²,刺激时长为

10 min,治疗时密切观察大鼠的生命体征。对照组、TBI 组及 MSC 组以同样方法操作,但超声设备未开启。

1.2.4 大鼠改良神经功能评分(mNSS 评分) 每组随机取 6 只大鼠,造模前连续 7 d 进行运动、协调和平衡训练,造模后第 1、3、7、14、21、28 天上午 10:00 进行 mNSS 评分。评分范围为 0 ~ 18 分(正常 0 分,最大亏损分数为 18 分),得分越高,说明脑损伤越严重^[8]。两位研究人员对大鼠的神经行为进行了评分。

1.2.5 取材 神经功能评分后每组随机取 6 只大鼠,腹腔注射 2% 戊巴比妥钠麻醉,暴露心脏。灌注针插入左心室固定,切开右心耳,灌注生理盐水 150 ml,直至肝、肺颜色变白,右心房流出液澄清,再灌注 4% 多聚甲醛 250 ml,直至大鼠身体僵直,剥离脑组织,浸泡于 4% 多聚甲醛固定,置于 -4 °C 冰箱用于 HE 染色和免疫组化检测。每组剩余 12 只大鼠腹腔注射 2% 戊巴比妥钠麻醉,在冰上立即取出损伤区域周围皮层组织和损伤侧前额叶组织,置于 -80 °C 冰箱用于 Western blot 和 RT-PCR 检测。

1.2.6 HE 染色观察损伤部位病理变化 大鼠脑组织经 4% 多聚甲醛固定 48 h 后,进行石蜡固定、包埋、切片,在 65 °C 温箱内烘烤 1 h,二甲苯中脱蜡 5 ~ 10 min,梯度酒精脱水,用苏木精染料染色 5 ~ 15 min,分化数秒后,用分化液冲洗切片,用碱性促蓝溶液冲洗细胞核数秒后,再次冲洗,伊红染色数秒后,脱水、密封。最后,切片进行显微镜观察、拍照和存档。

1.2.7 免疫组化检测损伤侧前额叶 BDNF 和损伤周围皮层 GAP-43、PSD-95、GFAP 蛋白表达 取浸泡于 4% 多聚甲醛中的脑组织,固定、包埋、切片,抗原修复,用 3% H₂O₂ 溶液阻断内源性过氧化物酶活性 10 min,血清封闭,滴加一抗在 4 °C 冰箱过夜。孵育二抗,滴加 DAB 显色液,然后将切片用 PBS 冲洗 3 次,苏木精浸泡 1 min,脱水、密封,光学显微镜进行图片拍摄。采用 Image-Pro Plus 5.1 软件评估免疫反应的平均光密度(average optical density, AOD),AOD = IOD 总和/Area 总和。

1.2.8 Western blot 法检测损伤侧前额叶 BDNF 和损伤周围皮层 GAP-43、PSD-95 蛋白表达 取置于 -80 °C 冰箱的 100 mg 样本,在 RIPA 裂解液中处理,在 4 °C 下 14 000 r/min 离心 15 min,提取上清液。使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白浓度检测。将蛋白质(50 μ g/L)煮沸、电泳,转膜,将膜

在室温下用5%的脱脂牛奶在TBST中阻断2 h,加入相应的抗体在4℃下孵育过夜。用TBST洗3次,每次10 min,加入HRP标记的羊抗兔IgG孵育1 h,用TBST洗3次,每次10 min。使用ECL蛋白印迹化学发光检测试剂盒进行显色,并在ChemiDOC™ XRS+与Image Lab™软件中曝光。

1.2.9 RT-PCR法检测损伤侧前额叶BDNF和损伤周围皮层GAP-43、PSD-95 mRNA表达 取存放于-80℃冰箱中的100 mg样本,按照说明书使用TRIzol试剂从组织中分离出总RNA,琼脂糖凝胶电泳检测RNA质量。依据逆转录试剂盒说明,进行单链cDNA的合成。PCR反应体系为20 μl,在每个反应中,3-磷酸甘油酯脱氢酶(GAPDH)作为内部对照同时扩增。PCR产物在含有10 ng/ml溴化乙锭的1.5%琼脂糖凝胶进行电泳分析,通过凝胶成像系统进行观察。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量法计算各组mRNA相对的表达水平,所有的引物对均从辽宁大连TaKaRa生物技术公司获得,引物序列见表1。

表1 RT-PCR引物序列

基因名称	引物序列
BDNF	F:5'-TCCCTGGCTGACACTTTT-3'
	R:5'-ATTGGGTAAGTTCGGCATT-3'
GAP-43	F:5'-CTCCAACGGAGACTGCAGAAA-3'
	R:5'-CCTGTCGGGCACCTTCCTT-3'
PSD-95	F:5'-GCAGGTTGAGATCGGAGAC-3'
	R:5'-ACTGATCTCATTTGCCAGGTGCT-3'
GAPDH	F:5'-CCTCGTCCCCTAGACAAAATG-3'
	R:5'-TGAGGTCAATGAAGGGTCTG-3'

1.3 统计学处理 采用SPSS v. 26软件进行数据统计分析,所得实验数据结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,通过Kolmogorov-Smirnov检验检查数据的正态性,平均值的比较通过单因素方差分析(ANOVA),方差齐性时,组间两两比较采用LSD检验;方差不齐时,组间两两比较采用Dunnnett's检验。mNSS评分差异采用重复测量方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 mNSS评分观察TBI后大鼠神经功能的变化

对照组为0分,其余各组的mNSS评分随着时间推移逐渐下降。自第14天起,各个时间点,MSC组及联合治疗组与TBI组相比,联合治疗组与MSC组相比,mNSS评分差异均有统计学意义(MSC组 vs TBI组 14 d, $P = 0.013$; 21 d, $P < 0.001$; 28 d, $P = 0.002$ 。联合治疗组 vs TBI组 14 d, $P < 0.001$; 21 d,

$P < 0.001$; 28 d, $P < 0.001$ 。联合治疗组 vs MSC组 14 d, $P = 0.046$; 21 d, $P = 0.038$; 28 d, $P = 0.021$), 见图1。

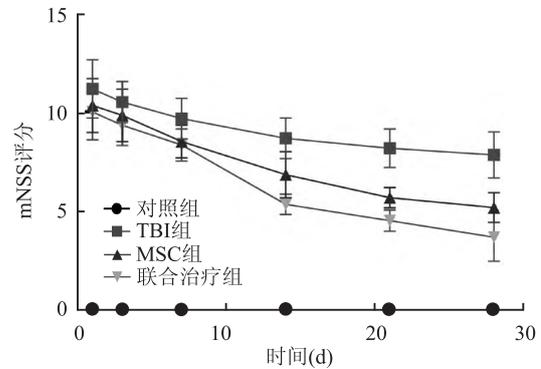


图1 各组大鼠mNSS评分变化

2.2 HE染色观察损伤区域的病理变化 HE染色结果显示,对照组的脑组织保持完整,细胞排列整齐,其余各组损伤周围皮层均见到不同程度的细胞排列紊乱和组织缺损,TBI组可见明显的空腔形成,MSC组及联合治疗组空腔面积明显缩小,其中联合治疗组损伤修复更加明显。

2.3 损伤侧前额叶BDNF、损伤周围皮层GAP-43、PSD-95、GFAP AOD变化 与对照组相比,TBI组PSD-95的AOD降低,GFAP的AOD增加($P < 0.001$, $P < 0.001$);与TBI组相比,MSC组BDNF、GAP-43、PSD-95的AOD增加,GFAP的AOD降低($P < 0.001$, $P < 0.001$, $P = 0.002$, $P = 0.001$);与MSC组相比,联合治疗组BDNF、GAP-43、PSD-95的AOD增加,GFAP的AOD降低($P = 0.004$, $P = 0.028$, $P = 0.040$, $P = 0.045$)。见表2、图3。

表2 各组大鼠前额叶BDNF、损伤周围皮层GAP-43、PSD-95、GFAP AOD($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	BDNF	GAP-43	PSD-95	GFAP
对照	0.205 ± 0.0108	0.112 ± 0.012	0.286 ± 0.038	0.146 ± 0.021
TBI	0.229 ± 0.028	0.135 ± 0.027	0.159 ± 0.026*	0.231 ± 0.018*
MSC	0.287 ± 0.029#	0.231 ± 0.015#	0.216 ± 0.007#	0.194 ± 0.016#
联合治疗	0.327 ± 0.012 [△]	0.260 ± 0.027 [△]	0.250 ± 0.027 [△]	0.172 ± 0.014 [△]
F值	39.301	67.472	24.125	25.718
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

与对照组比较: * $P < 0.05$;与TBI组比较: # $P < 0.05$;与MSC组比较: [△] $P < 0.05$

2.4 损伤侧前额叶BDNF、损伤周围皮层GAP-43、PSD-95蛋白表达变化 与对照组相比,TBI组PSD-95蛋白表达降低($P < 0.001$);与TBI组相比,MSC组BDNF、GAP-43、PSD-95蛋白表达增加($P <$

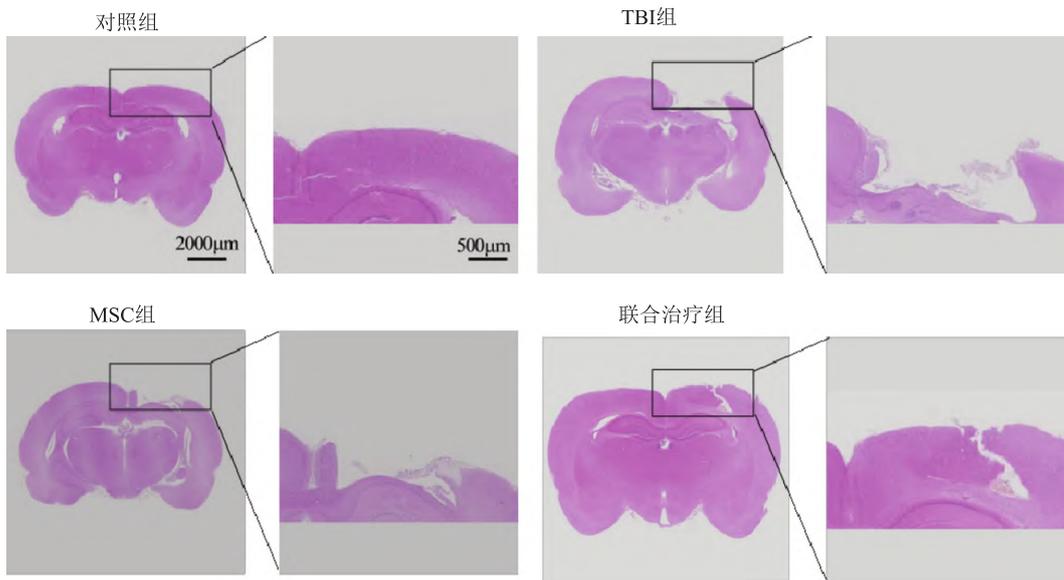


图2 各组大鼠 HE 染色结果 ×20

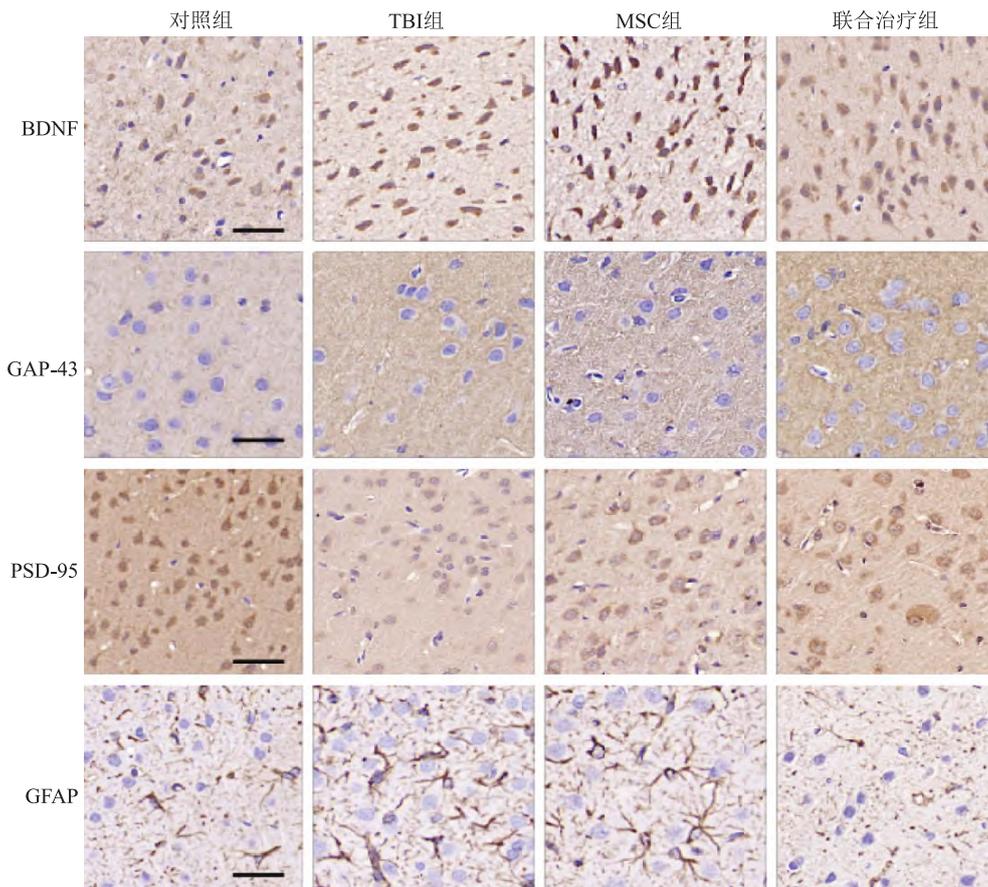


图3 各组大鼠海马前额叶 BDNF、损伤周围皮层 GAP-43、PSD-95、GFAP 的免疫组化染色 ×400

0.001, $P = 0.010$, $P < 0.001$); 与 MSC 组相比, 联合治疗组 BDNF、GAP-43、PSD-95 蛋白表达增加 ($P =$

0.002, $P = 0.020$, $P = 0.007$), 见表 3、图 4。

2.5 损伤侧前额叶 BDNF、损伤周围皮层 GAP-43、

表3 各组大鼠前额叶 BDNF、损伤周围皮层 GAP-43、PSD-95 蛋白相对表达量($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	BDNF	GAP-43	PSD-95
对照	0.412 ± 0.028	0.346 ± 0.055	0.702 ± 0.030
TBI	0.452 ± 0.033	0.382 ± 0.048	0.441 ± 0.031 [*]
MSC	0.548 ± 0.039 [#]	0.466 ± 0.046 [#]	0.556 ± 0.033 [#]
联合治疗	0.619 ± 0.038 [△]	0.541 ± 0.055 [△]	0.622 ± 0.051 [△]
F 值	42.996	17.418	52.135
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 TBI 组比较: # $P < 0.05$; 与 MSC 组比较: $\Delta P < 0.05$

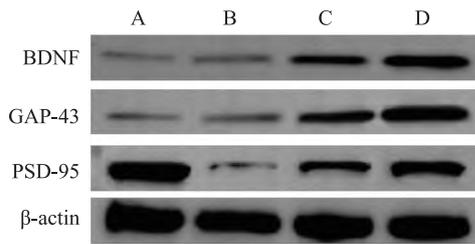


图4 Western blot 法检测各组大鼠前额叶 BDNF、海马区 GAP-43、PSD-95 的蛋白表达

A: 对照组; B: TBI 组; C: MSC 组; D: 联合治疗组

PSD-95 mRNA 表达变化 与对照组相比, TBI 组 PSD-95 mRNA 表达降低 ($P < 0.001$); 与 TBI 组相比, MSC 组 BDNF、GAP-43、PSD-95 mRNA 表达增加 ($P = 0.017, P = 0.0205, P = 0.014$); 与 MSC 组相比, 联合治疗组 BDNF、GAP-43、PSD-95 mRNA 表达增加 ($P = 0.029, P = 0.007, P = 0.004$)。见表 4。

表4 各组大鼠前额叶 BDNF、损伤周围皮层 GAP-43、PSD-95 mRNA 表达($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	BDNF	GAP-43	PSD-95
对照	1.152 ± 0.159	1.193 ± 0.127	1.164 ± 0.169
TBI	1.335 ± 0.278	1.401 ± 0.142	0.447 ± 0.072 [*]
MSC	1.685 ± 0.207 [#]	1.669 ± 0.195 [#]	0.664 ± 0.146 [#]
联合治疗	2.003 ± 0.270 [△]	1.989 ± 0.244 [△]	0.926 ± 0.154 [△]
F 值	15.694	21.230	29.607
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 TBI 组比较: # $P < 0.05$; 与 MSC 组比较: $\Delta P < 0.05$

3 讨论

本研究表明 MSC 联合 LITUS 对治疗 TBI 导致的神经损伤具有协同作用。在整个实验周期内, 对各组大鼠进行了 mNSS 神经功能评分。正常的大鼠该项目评分总分为 0 分, 评分越高, 说明神经功能损伤越严重。各组大鼠的评分随时间推移下降, 差异逐渐明显, MSC 组及联合治疗组的评分明显低于 TBI 组, 并且联合治疗组评分低于 MSC 组。此外,

HE 染色显示创伤部位的空腔面积显示, 联合治疗组的损伤修复效果最佳。以上结果提示, MSC 联合 LITUS 对神经功能和组织的修复作用优于单独应用 MSC。TBI 导致的神经损伤与突触可塑性受损密切相关, 而 MSC 能够促进内源性神经再生与突触发生, 从而恢复神经功能^[2]。

本实验显示 MSC 原位注射能上调前额叶 BDNF 和损伤周围皮层 GAP-43、PSD-95 mRNA 和蛋白表达, 经 LITUS 联合治疗后, BDNF 及 GAP-43、PSD-95 mRNA 和蛋白表达进一步提高。说明 MSC 联合 LITUS 不仅在损伤区促进再生, 还能够在远隔的皮层区域促进神经营养因子的产生, 促进神经修复。超声刺激可促进神经元的存活与再生从而达到神经调控的效果^[9]。有研究^[10]发现 LITUS 可增强 BDNF 表达, 本研究结果与之一致。在损伤后的神经再生过程中, MSC 能够促进突触相关蛋白的表达^[11], GAP-43 通过与突触囊泡释放核心复合体之间相互作用, 调控突触囊泡向突触前膜移动、锚定, 并释放谷氨酸 (Glu) 等神经递质至突触间隙^[12], 位于突触后膜的 PSD-95 可通过不同的结构域将 Glu 受体锚定在细胞膜, 使神经递质激发的突触区粒子流与第二信使级联反应相结合, 促进突触后信号转导^[13]。结合本实验, MSC 联合 LITUS 产生协同作用的机制, 可能与 LITUS 进一步提高前额叶 BDNF 表达, 激活 GAP-43, 促进神经递质释放并作用于 PSD-95, 增强突触间信号转导, 促进突触发生, 最终发挥脑保护作用有关。

为进一步探索 MSC 联合 LITUS 促进神经功能修复的机制, 本实验显示 MSC 原位注射能下调损伤周围皮层星形胶质细胞 (astrocyte, Ast) 的 GFAP 蛋白表达, 经 LITUS 联合治疗后 GFAP 蛋白表达进一步下调。Ast 的足突与神经元突触前、后末端形成“三重突触”结构, 神经损伤可引起 Ast 过度增生、肿胀、形成胶质瘢痕阻碍神经元的轴突生长。LITUS 可通过产生微空化效应改变 Ast 膜上的 N 型 Ca^{2+} 通道和 Ca^{2+} 的流入量、胞内 Ca^{2+} 储存量, 促进中枢神经系统重建^[14]。此外有研究^[15]发现, LITUS 能改变 Ast 的功能使其发挥神经保护作用, 这可能与 BDNF 表达上调有关, 与本实验结果相符。结合本实验, MSC 联合 LITUS 治疗优于单独 MSC 治疗, 其机制可能与 LITUS 通过改变 Ast 功能, 进一步促进 BDNF 表达, 抑制胶质瘢痕形成有关。

本实验存在一定局限性, 首先, LITUS 干预的最佳参数和 MSC 原位移植最佳时机有待于进一步探

究。其次,由于实验条件的限制,突触可塑性改变研究不够深入,计划下一步采用透射电镜技术观察联合治疗后突触超微结构变化,从分子层面对其机制进一步研究。

综上所述,本研究表明,MSC 原位注射联合 LITUS 治疗对 TBI 后的神经损伤有保护作用,并且效果优于单独注射 MSC,这可能与上调 BDNF、GAP-43、PSD-95 表达、减少 GFAP 表达有关。这一发现可能为 TBI 患者提供新的临床治疗方案。

参考文献

- [1] O'leary R A, Nichol A D. Pathophysiology of severe traumatic brain injury[J]. *J Neurosurg Sci*, 2018, 62(5): 542-8.
- [2] Das M, Mayilsamy K, Mohapatra S S, et al. Mesenchymal stem cell therapy for the treatment of traumatic brain injury: progress and prospects[J]. *Rev Neurosci*, 2019, 30(8): 839-55.
- [3] Lai C H, Chen S C, Chiu L H, et al. Effects of low-intensity pulsed ultrasound, dexamethasone/TGF-beta1 and/or BMP-2 on the transcriptional expression of genes in human mesenchymal stem cells: chondrogenic vs osteogenic differentiation[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2010, 36(6): 1022-33.
- [4] Uddin S M, Qin Y X. Enhancement of osteogenic differentiation and proliferation in human mesenchymal stem cells by a modified low intensity ultrasound stimulation under simulated microgravity[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e73914.
- [5] Zheng T, Du J, Yuan Y, et al. Effect of low intensity transcranial ultrasound (LITUS) on post-traumatic brain edema in rats: evaluation by isotropic 3-dimensional T2 and multi-TE T2 weighted MRI[J]. *Front Neurol*, 2020, 11:578638.
- [6] Jacotte-Simancas A, Costa-Miserachs D, Coll-Andreu M, et al. Effects of voluntary physical exercise, citicoline, and combined treatment on object recognition memory, neurogenesis, and neuroprotection after traumatic brain injury in rats[J]. *J Neurotrauma*, 2015, 32(10):739-51.
- [7] Peruzzo S T, Andrews M M M, Al-Gharaibeh A, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells genetically engineered to overexpress interleukin-10 promotes alternative inflammatory response in rat model of traumatic brain injury[J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 2.
- [8] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84-91.
- [9] Huang S L, Chang C W, Lee Y H, et al. Protective effect of low-intensity pulsed ultrasound on memory impairment and brain damage in a rat model of vascular dementia[J]. *Radiology*, 2017, 282(1): 113-22.
- [10] Lin W T, Chen R C, Lu W W, et al. Protective effects of low-intensity pulsed ultrasound on aluminum-induced cerebral damage in Alzheimer's disease rat model[J]. *Sci Rep*, 2015, 15(5):9671.
- [11] 王晨亮. 新型负载 NGF 的可注射水凝胶复合骨髓间充质干细胞促进周围神经损伤修复的作用研究[D]. 锦州: 锦州医科大学, 2021.
- [12] DeGraan P N, Hens J J, Gispens W H. Presynaptic PKC substrate B-50 (GAP-43) and neurotransmitter release: studies with permeated synaptosomes[J]. *Neurotoxicology*, 1994, 15(1): 41-7.
- [13] 方向. 基于突触可塑性和 MAPK/ERK 信号通路的清热利胆解毒方对铜负荷大鼠学习记忆行为的干预机制研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2013.
- [14] Chen B, Tjahja J, Malla S, et al. Astrocyte viability and functionality in spatially confined microcavitation zone[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11(5): 4889-99.
- [15] Yang F Y, Lu W W, Lin W T, et al. Enhancement of neurotrophic factors in astrocyte for neuroprotective effects in brain disorders using low-intensity pulsed ultrasound stimulation[J]. *Brain Stimul*, 2015, 8(3): 465-73.

Study on the neuroprotective mechanism of mesenchymal stem cells combined with low-intensity transcranial ultrasound therapy in TBI rats

Yao Xinyu^{1,2,3}, Li Yue⁴, Chen Yansheng², Du Juan², Liang Xin², Liu Lanxiang², Cao Zhendong³

(¹Graduate School of Chengde Medical University, Chengde 067000; ²Dept of Magnetic Resonance Imaging, The First Hospital of Qinhuangdao, Qinhuangdao 066000; ³Dept of Magnetic Resonance Imaging, Affiliated Hospital of Chengde Medical University, Chengde 067000;

⁴Dept of Orthopedics, Qinhuangdao First Hospital, Qinhuangdao 066000)

Abstract Objective To investigate the neuroprotective effect of mesenchymal stem cells (MSC) combined with low-intensity transcranial ultrasound (LITUS) treatment on traumatic brain injury (TBI). **Methods** Seventy-two SD rats were randomly divided into four groups, namely, control group, TBI group, MSC injection group, and combined treatment group, with 18 rats in each group. TBI model was established by applying a pneumatic controlled cortical impingement instrument. Within 24 h after surgery, MSC was injected into the injury site by microinjector and microinjector pump using in situ injection. After injection, the injury site was treated with LITUS for

网络出版时间:2022-12-26 17:04:30 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail//34.1065.R.20221226.1522.014.html

莱菔硫烷对人肾癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响及作用机制

赵余祥,吴旺宇,虞舟廷,钱伟伟,于德新,张涛

摘要 目的 探讨莱菔硫烷(SFN)对人肾癌细胞的增殖、迁移和侵袭的影响及作用机制。**方法** 体外培养人肾癌细胞786-O,并将其分为4组:空白对照组、SFN低浓度组(5 $\mu\text{mol/L}$)、SFN中浓度组(10 $\mu\text{mol/L}$)、SFN高浓度组(20 $\mu\text{mol/L}$),用CCK-8检测肾癌细胞786-O增殖活化的情况;分别用细胞划痕、Transwell迁移实验观察SFN对肾癌细胞786-O迁移能力的影响;用Transwell侵袭实验观察SFN对肾癌细胞786-O侵袭能力的影响;运用Western blot和qRT-PCR方法检测SFN对上皮间质转化(EMT)相关蛋白和mRNA表达的影响;用Western blot检测SFN对NF- κ B信号通路相关蛋白表达的影响。**结果** SFN处理24、48、72 h后,肾癌细胞786-O的增殖活性随着SFN浓度的升高而下降;与对照组相比,SFN处理组的肾癌细胞迁移和侵袭能力均显著降低;此外,随着SFN浓度的升高,肾癌细胞786-O中E-cadherin的mRNA及蛋白表达水平逐渐升高,而N-cadherin、Vimentin的mRNA及蛋白表达水平随之降低;NF- κ B信号通路

相关蛋白磷酸化的p65和磷酸化的I κ B α 的蛋白水平随SFN浓度增加而降低。**结论** SFN能够显著抑制人肾癌细胞的增殖、迁移和侵袭的能力,其可能通过抑制NF- κ B信号通路进而阻碍肾癌的EMT进程来发挥抗肿瘤作用。

关键词 莱菔硫烷;肾癌细胞;上皮间质转化;核因子- κ B

中图分类号 R 737.11

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)01-0079-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.01.014

在泌尿系统中,肾癌是一种常见的恶性肿瘤,肾癌的治疗一直是泌尿系统肿瘤研究的热点和难点^[1-2]。莱菔硫烷(sulforaphane, SFN)作为一种天然植物化合物,主要存在于十字花科蔬菜中,具有抗氧化、抗炎作用,能诱导细胞周期停滞和凋亡^[3]。研究^[4]显示植物来源的SFN能够诱导多种肿瘤细胞的凋亡如肺癌、肝癌、胃癌等,进而发挥抗肿瘤作用。SFN最近还被宣布为靶向癌症干细胞的“五大”植物化学物质之一^[5]。然而SFN对肾癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力的影响以及其相关的潜在机制尚无报道。研究^[6]表明,在癌症中上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)与肿瘤的发生、迁移、侵袭和耐药能力有关。文献^[7]报道,核因子- κ B(Nuclear factor-kappa B, NF- κ B)在许多癌症

2022-09-05 接收

基金项目:安徽医科大学第二附属医院博士科研启动基金(编号:2018BSJJ012);安徽省自然科学基金(编号:2008085MH290)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院泌尿外科,合肥 230601

作者简介:赵余祥,男,硕士研究生;

张涛,男,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: zhangtao@ahmu.edu.cn

28 consecutive days using an ultrasound stimulator. The modified neurological functioning score (mNSS) was performed on rats in each group at 1, 3, 7, 14, 21 and 28 days postoperatively, and then the brains were extracted to detect pathological changes at the injury site and the mRNA and protein expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), growth associated protein-43 (GAP-43), postsynaptic density protein-95 (PSD-95) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) by HE staining, immunohistochemistry, Western blot and RT-PCR. **Results** Compared with the control group, the mNSS score increased in the TBI group ($P < 0.05$), the expression of GAP-43 and PSD-95 decreased, and the expression of GFAP increased ($P < 0.05$); Compared with the TBI group, the mNSS score of MSC group was lower ($P < 0.05$), the expression of BDNF, GAP-43, PSD-95 increased, and the expression of GFAP decreased ($P < 0.05$); mNSS scores were lower in the combined treatment group than those in the MSC group ($P < 0.05$), the expression of BDNF, GAP-43, PSD-95 increased, and the expression of GFAP decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** The mechanism by which MSC combined with LITUS exerts neuroprotective effects in TBI may be related to the promotion of BDNF, GAP-43, and PSD-95 expression and reduction of GFAP expression.

Key words traumatic brain injury; low-intensity transcranial ultrasound; mesenchymal stem cells; combined therapy; neurological impairment