

网络出版时间:2022-1-25 7:23 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220124.0938.002.html

◇基础医学研究◇

骨髓间充质干细胞在缺血性脑卒中的治疗作用

付丽环¹, 江小霞², 毛更生¹

摘要 目的 探讨骨髓间充质干细胞(BMSCs)对大鼠缺血性脑卒中的疗效和作用机制。方法 采用全骨髓贴壁法分离 BMSCs,用流式细胞术鉴定 BMSCs;制备大鼠中动脉闭塞(MCAO)大鼠模型,随机分为假手术组、MCAO 组和 BMSC 组;对各组大鼠进行 mNSS 评分和 TTC 染色,并采用免疫组织化学法、免疫荧光法和免疫印迹法检测各组脑组织梗死区及其周围关于 Caspase-3、MAP-2、GAP-43 及 GFAP 的阳性表达水平。结果 BMSCs 低表达 CD45,高表达 CD90、CD29;大鼠在移植 BMSCs 后第 3、7 和 14 天的 mNSS 评分和梗死体积百分比均降低,其梗死区的 Caspase-3 下降,MAP-2、GFAP 和 GAP-43 表达增强。结论 BMSCs 移植能够促进 MCAO 模型大鼠的神经功能恢复和减小脑梗死体积,可能是通过抑制细胞凋亡、轴突再生、神经再生细胞增殖等机制发挥其疗效。

关键词 骨髓间充质干细胞;缺血性脑卒中;尾静脉;神经修复

中图分类号 R 743.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)03-0337-08
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.03.001

脑卒中是全球第二大死亡原因,也是导致成人残疾的主要原因之一,随着老龄化到来,其发病率目前仍在增加^[1-2],其中缺血性脑卒中约占所有脑卒中的 85% 以上^[3]。组织型纤溶酶原激活剂(tissue plasminogen activator, t-PA)是目前治疗缺血性脑卒中的有效药物之一^[4],但缺血性脑卒中发作后脑细胞的快速损伤和死亡使得 t-PA 必须在发生缺血性脑卒中后 4.5 h 内使用,所以绝大多数患者得不到 t-PA 的及时救治^[5]。目前这种局限性无法改变,所以关于缺血性脑卒中的研究策略已转向神经修复疗法,尤其强调各种干细胞的再生治疗。在各种类型

的候选干细胞中,骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是修复缺血性脑卒中的一种很有前途的干细胞类型,移植 BMSCs 可直接或间接修复局灶性缺血区,促进神经功能改善^[6-7]。但 BMSCs 治疗缺血性脑卒中的机制目前还未完全明朗,亟需进一步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康雄性 SD 大鼠,SPF 级,10 只体质量 100~120 g 和 105 只体质量 250~280 g,从北京斯贝福公司购买,许可证号为 scxk(京)2019-0010。动物饲养在标准条件下(约 24℃ 温度和 48% 湿度),术前 12 h 禁食不禁水。

1.1.2 试剂与仪器 含 EDTA 的 0.25% 胰酶和 α -MEM 培养基购自美国 Gibco 公司;胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)购自澳大利亚 Bovogen 公司;FITC-CD90、PE-CD29、PE-CD45 抗大鼠流式抗体购自美国 Biotend 公司;抗微管相关蛋白-2(microtubule associated protein-2, MAP-2)、胶质纤维酸性蛋白(gial fibrillary acidic protein, GFAP)、生长相关蛋白-43(growth associated protein-43, GAP-43)和 Caspase-3 抗体均购自英国 Abcam 公司。日本 Ni-Kon 倒置荧光显微镜;美国 Bio-Rad ChemiDoc™ 成像系统、美国 Invitrogen 半干式快速转印系统、BD 流式细胞仪。

1.2 实验方法

1.2.1 BMSCs 的分离与鉴定 选取体质量 100~120 g 的 SD 大鼠,用颈椎脱臼法处死后立即用 75% 乙醇浸泡 10 min,分离出完整的股骨和胫骨,PBS 溶液冲洗后,再浸入完全培养基(10% FBS、 α -MEM 培养基、青-链霉素)中,剪去两端的干骺端,用无菌注射器吸取培养基反复冲洗骨髓腔,直到骨髓腔变白。离心、弃掉上清液,用完全培养基以 10^6 /ml 的细胞浓度接种于培养瓶中,置 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中静置培养。3 d 后半换液,5 d 后全换液,每隔 2 d 换一次液。当细胞生长达到 90% 融合时即

2021-08-30 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:31971285);北京市自然科学基金(编号:7202149)

作者单位:¹ 安徽医科大学临床学院,合肥 230032

² 军事医学科学院军事认知与脑科学研究所,北京 100850

作者简介:付丽环,女,硕士研究生;

毛更生,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: mclxmg@126.com

可传代,传至第3代用于后续实验。

1.2.2 流式细胞仪鉴定 BMSCs 选择生长达90%的P3代BMSCs,用PBS制成细胞浓度为 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 的单细胞悬液。从细胞悬液中分别吸取100 μl 至4支无菌EP管中,分别加入FITC-CD90、PE-CD29、PE-CD45流式抗体和PBS各1 μl ,各管混匀后在冰上避光孵育30 min;用PBS重悬,混匀后避光置于冰上,用流式细胞仪进行检测。

1.2.3 大鼠大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型的建立 改良的Zea Longa线栓法建立MCAO模型:大鼠腹腔麻醉,切开颈动脉中线,显露左侧的颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈内动脉(internal carotid artery, ICA)和颈外动脉(external carotid artery, ECA),剥离动脉鞘,仔细分离CCA、ICA与迷走神经;用动脉夹短暂阻断CCA和ICA,并结扎ECA远端,在ECA近端留一活结,在两线之间的血管上做一切口,将线栓插进ECA中后进入CCA,剪断ECA上的切口,轻轻地将ECA残端拉与ICA相平行,顺势插入ICA中,当达到栓线标记点时,固定住线栓。缺血2 h后拔除线栓,缝合伤口。术中保持大鼠肛温恒定在37 $^{\circ}\text{C}$ 左右。假手术组不插入线栓,其余操作与模型组相同。

1.2.4 动物分组与移植程序 5分制法:0分:无神经损伤症状;1分:不能完全伸展对侧前爪;2分:向对侧转圈;3分:向对侧倾倒;4分:不能自发行走,意识丧失。再灌注24 h后进行评分,将评分为2~3分的大鼠纳入接下来的实验。动物分为假手术组(尾静脉注射PBS 1 ml)、MCAO组(尾静脉注射PBS 1 ml)、BMSC组(尾静脉注射含 3×10^6 个BMSCs的PBS 1 ml),每组又分别在移植后的第3、7和14天进行神经功能评分和取材。所有注射均在MCAO模型构建术后24 h后进行,尾静脉缓慢注射。

1.2.5 神经功能评分 采用mNSS评分法对移植后第3、7和14天的三组动物的运动、感觉、平衡和反射功能进行评分,如果得分的分值越高则说明神经功能的损伤情况越严重。

1.2.6 TTC染色 麻醉后,取出完整脑组织,将脑组织按照2 mm厚切出6片冠状切片,将切片浸泡在2% TTC溶液中,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育箱中避光孵育20 min,切片需定期翻转,以确保每片脑组织均匀暴露在染色溶液中,染色后将切片用4%多聚甲醛固定24 h,拍照。用ImageJ软件计算梗死体积。梗死体积百分率(%) = (正常侧脑组织体积 - 梗死侧正常脑组织体积) / 正常侧脑组织体积 $\times 100\%$ 。

1.2.7 免疫组织化学染色 心脏灌注取脑后,进行固定和脱水后将其进行包埋,制备出脑组织厚度为8 μm 的冰冻切片。先后用1% Triton X-100和3%过氧化氢溶液处理脑片,再用血清封闭液封闭30 min,甩干;将切片在4 $^{\circ}\text{C}$ 下与GFAP抗体(兔抗,1:800)孵育过夜,PBS洗涤后滴加二抗孵育1 h,PBS洗涤后用DAB显色剂孵育5 min,水洗;苏木精复染、脱水、透明,最后用中性树脂封片;光学显微镜下观察各组脑组织梗死区及周围的GFAP。

1.2.8 免疫荧光染色 用1% Triton X-100、3%过氧化氢溶液和血清封闭液处理切片,再将切片在4 $^{\circ}\text{C}$ 下分别与GFAP抗体(兔抗,1:800)、MAP-2抗体(兔抗,1:800)、Caspase-3(兔抗,1:500)和GAP-43(兔抗,1:800)孵育过夜,用PBS洗涤后分别选择FITC-山羊抗兔IgG和Cy3-山羊抗兔IgG避光孵育1 h,洗涤后用内含DAPI的封片液进行封片,用显微镜观察阳性细胞的表达。

1.2.9 Western blot 试验 取缺血区脑组织50 mg,匀浆在500 μl 含蛋白酶抑制剂的蛋白提取液中,冰上研磨后孵育30 min,离心取上清液进行蛋白定量检测。制备聚丙烯酰胺凝胶,进行电泳和PVDF转膜,转膜完成后,用5%脱脂牛奶封闭1 h,再分别将膜置于一抗(GFAP、MAP-2、GAP-43、Caspase-3和GADPH)中,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBST洗膜,室温孵育二抗1 h。再次洗膜后显影。

1.3 统计学处理 采用SPSS 21.0软件进行分析,数据表示为 $\bar{x} \pm s$,单因素方差分析(ANOVA)用于比较多组数据,如果方差齐性且差异有统计学意义,则采用LSD检验进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异统计学意义。

2 结果

2.1 BMSCs培养过程中的细胞形态的变化 BMSCs原代培养在第3天半换液后,可见有大量的红细胞和其他造血细胞漂浮在培养基中,隐约可见部分BMSCs贴壁生长(图1A)。在第5天全换液后,可见大量细胞集落式贴壁生长,以梭形细胞为主,呈放射状排列,伸出长短不一、粗细不均的突起(图1B)。在第7~8天左右,BMSCs不断增殖分化,细胞逐渐融合(图1C);在第10~12天左右,细胞排列紧密,呈现漩涡式生长,达90%以上的融合度,达到传代标准(图1D)。

2.2 流式检测 BMSCs 表面标记物 流式细胞仪检测第3代大鼠BMSCs结果显示,它们高表达

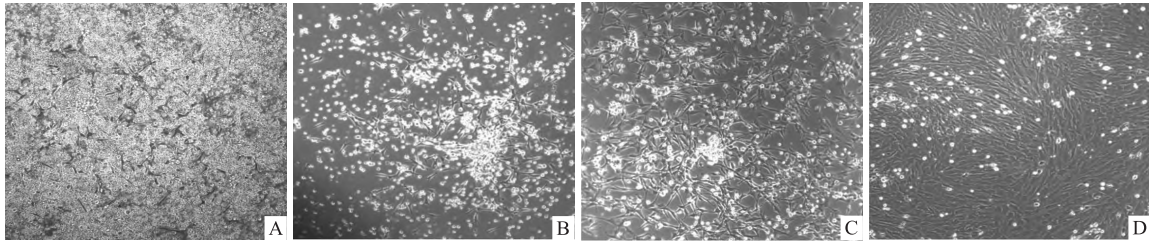


图1 大鼠 BMSCs 原代细胞的生长情况 ×100

A: 原代细胞第3天形态; B: 原代细胞第5天形态; C: 原代细胞第7天形态; D: 原代细胞第10天形态

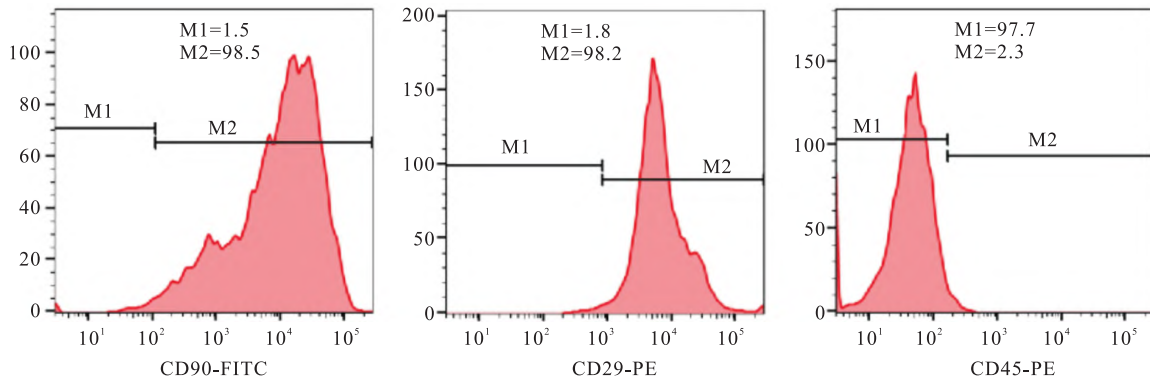


图2 P3代 BMSCs 的表面抗原鉴定

CD29(+)、CD90(+), 低表达 CD45(-)。见图2。

2.3 大鼠神经功能评分 移植前和移植后第3、7和14天的mNSS评分, 假手术组均为0分, BMSC组[(13.0±0.7)、(9.8±0.8)、(8.0±0.7)、(5.2±0.5)分]与MCAO组[(13.4±0.6)、(12.2±0.8)、(10.0±0.7)、(8.2±0.8)分]比较, 移植前分数最高且差异无统计学意义, 而移植后均降低($F=77.65, P<0.01$), MCAO组和BMSC组移植后的mNSS评分与移植前比较, 分值均下降, 且随着移植时间的延长, mNSS评分逐渐降低, 说明神经功能恢复越好。见图3。

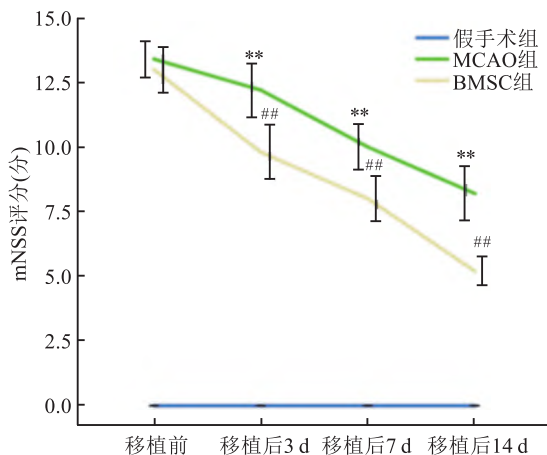


图3 各组大鼠的mNSS评分

与假手术组比较: ** $P<0.01$; 与MCAO组比较: ## $P<0.01$

2.4 大鼠的脑梗死体积 采用TTC染液对脑组织进行染色, 肉眼观假手术组整个脑组织未显现出苍白区, MCAO组脑组织可见梗死侧大面积出现白色, BMSC组较少局部可见白色(图4A), 白色即梗死区域。MCAO组移植后第3、7和14天的大鼠脑组织梗死体积百分比分别为(44.9±1.2)%、(38.5±0.7)%、(28.2±0.8)%, 与假手术组比较显著增高($P<0.01$), 而BMSC组移植后第3、7和14天的大鼠脑组织梗死体积百分比分别为(42.0±0.8)%、(33.4±0.9)%、(19.5±0.6)%, 较MCAO组降低($F=623.79, P<0.01$), 且随着移植时间的延长, 梗死体积逐渐缩小(图4B)。

2.5 免疫组化染色检测GFAP的表达 各组移植后第7天脑组织的GFAP免疫组化染色结果见图5。GFAP组化学染色呈现放射状的形态(图5D), 在假手术组大鼠皮层区脑组织中GFAP阳性细胞数为(2.0±0.7)个, MCAO组为(6.0±1.0)个, BMSC组为(13.2±0.8)个, 与MCAO组比较, BMSC组缺血区的GFAP阳性细胞增多, 差异有统计学意义($F=219.64, P<0.01$, 图5E)。

2.6 GFAP、MAP-2、Caspase-3和GAP-43的荧光表达 三组大鼠移植后第7天的脑组织切片, 用GFAP、MAP-2、Caspase-3、GAP-43分别与DAPI共染, 结果发现: ①GFAP阳性细胞呈现星型状, 关于

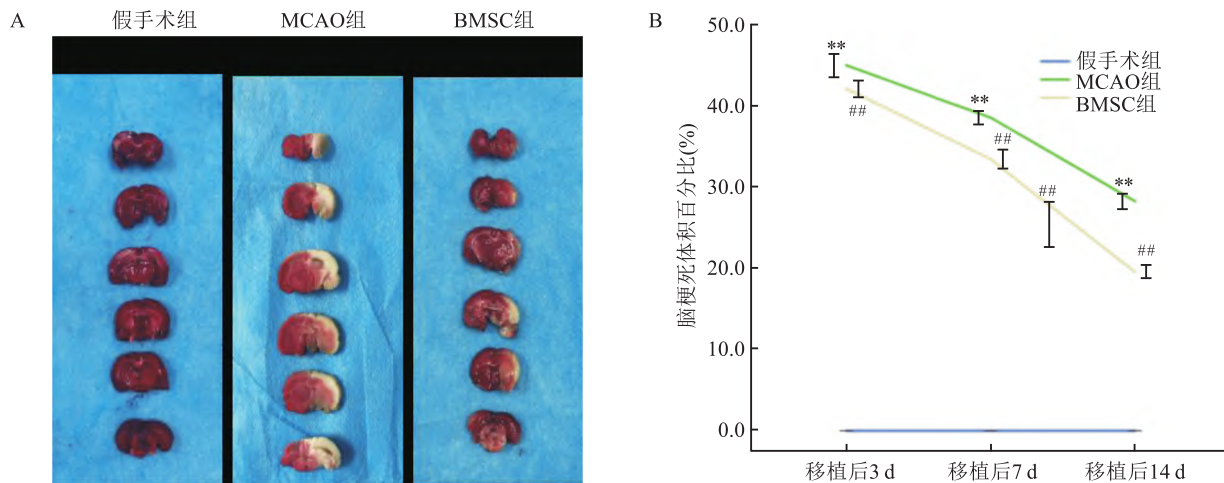


图4 各组大鼠的TTC染色和梗死体积百分比
与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与MCAO组比较: ## $P < 0.01$

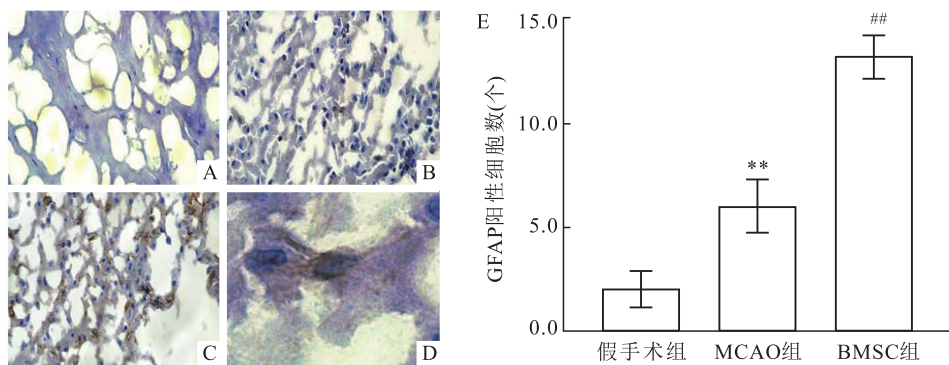


图5 各组移植后第7天脑组织的GFAP免疫组化染色

A: 假手术组 $\times 400$; B: MCAO组 $\times 400$; C: BMSC组 $\times 400$; D: GFAP阳性细胞形态(油镜); E: 与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与MCAO组比较: ## $P < 0.01$

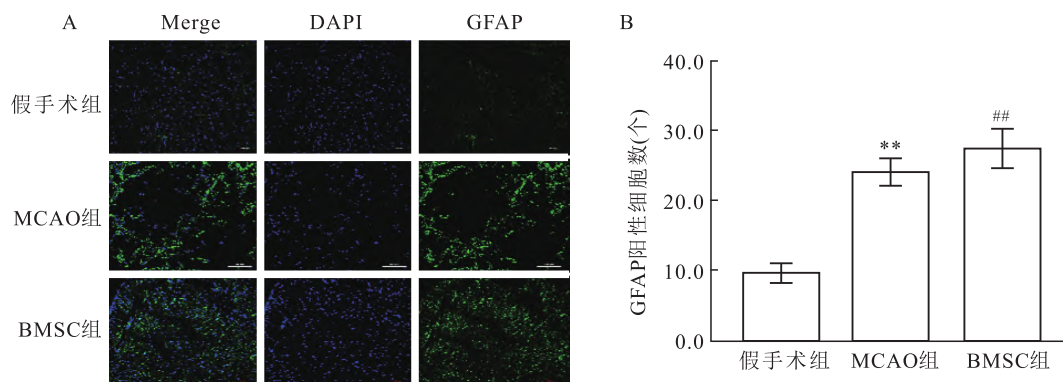


图6 三组大鼠移植后第7天脑组织的GFAP免疫荧光染色

A: GFAP的荧光染色图 $\times 200$; B: 三组中的GFAP阳性细胞数; 与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与MCAO组比较: ## $P < 0.01$

大鼠脑组织缺血及周围区的GFAP阳性细胞数,假手术组中为 (9.6 ± 1.1) 个, MCAO组为 (24.0 ± 1.6) 个, BMSC组为 (27.4 ± 2.2) 个, MCAO组高于假手术组, BMSC组高于MCAO组 ($F = 155.74, P < 0.01$, 图6); ② MAP-2阳性细胞在MCAO组 [9.2

± 0.8 个] 低于假手术组 [(22.8 ± 1.6) 个], BMSC组 [(18.8 ± 1.3) 个] 与MCAO组相比较, 表达上调 ($F = 143.69, P < 0.01$, 图7); ③ Caspase-3阳性细胞在假手术组、MCAO组、BMSC组的表达分别为 (3.4 ± 1.1) 、 (27.4 ± 2.1) 和 (7.2 ± 1.9) 个, 在假手

术组中少见,在 MCAO 组中增多,BMSC 组中其表达低于 MCAO 组,且差异有统计学意义($F=268.41, P<0.01$,图 8);④ GAP-43 阳性细胞在 MCAO 组

[(33.8±1.3)个]中多于假手术组[(24.4±1.1)个],而 BMSC 组[(44.4±1.1)个]中其表达上调,且差异有统计学意义($F=349.26, P<0.01$,图 9)。

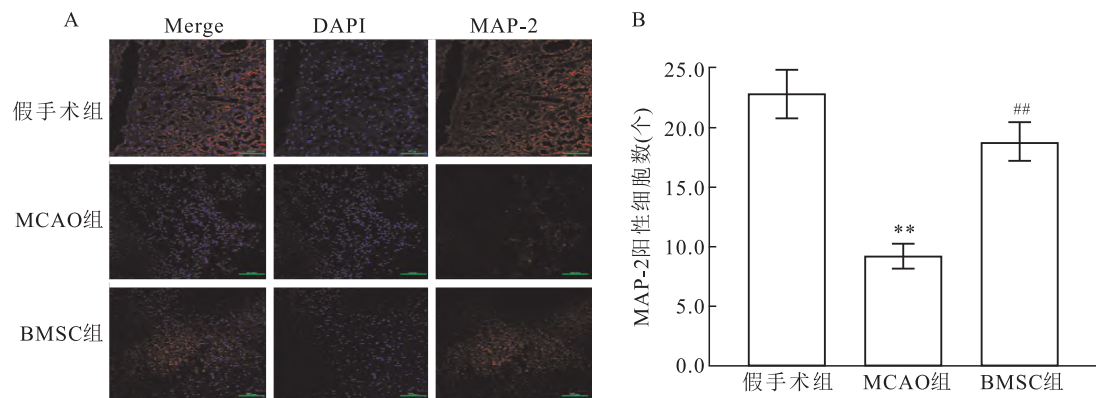


图7 三组大鼠移植后第7天脑组织的 MAP-2 免疫荧光染色

A:MAP-2 的荧光染色图 ×200;B:三组中的 MAP-2 阳性细胞数;与假手术组比较:** $P<0.01$;与 MCAO 组比较:## $P<0.01$

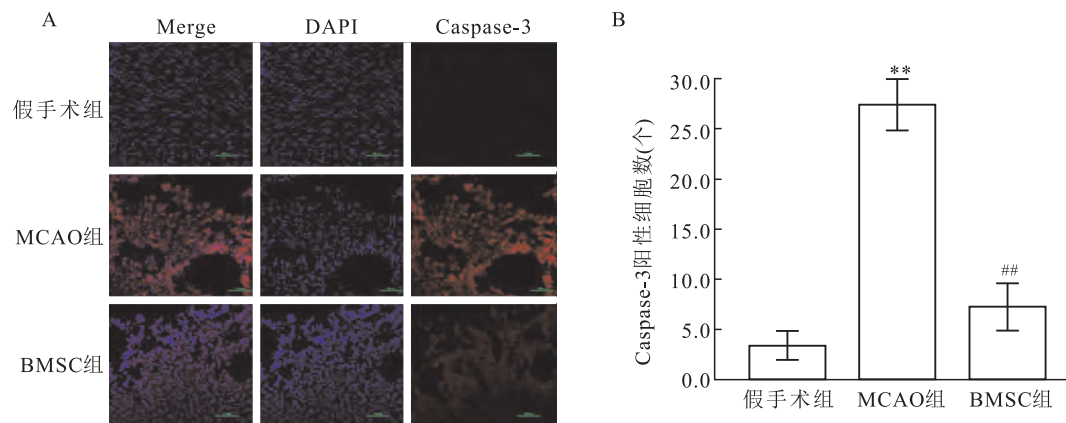


图8 三组大鼠移植后第7天脑组织的 Caspase-3 免疫荧光染色

A:Caspase-3 的荧光染色图 ×200;B:三组中的 Caspase-3 阳性细胞数;与假手术组比较:** $P<0.01$;与 MCAO 组比较:## $P<0.01$

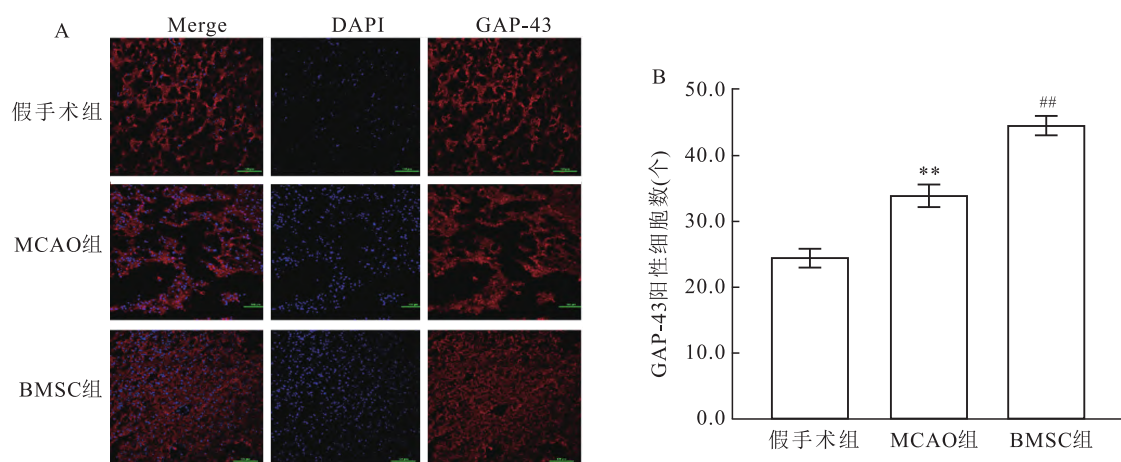


图9 三组大鼠移植后第7天脑组织的 GAP-43 免疫荧光染色

A:GAP-43 的荧光染色图 ×200;B:三组中的 GAP-43 阳性细胞数;与假手术组比较:** $P<0.01$;与 MCAO 组比较:## $P<0.01$

2.7 Western blot 检测 Caspase-3、GAP-43、GFAP 和 MAP-2 蛋白的表达 Western blot 结果分析:①与假手术组比较,MCAO 组脑组织高表达 Caspase-3,而 BMSC 组在移植第 7 天和第 14 天时 Caspase-3 表达比 MCAO 组同时段下调,且差异有统计学意义($F = 249.05, P < 0.05$),而第 3 天未出现下调(图 10A、B);②与假手术组比较,MCAO 组 GAP-43 的表达上调,BMSC 组较 MCAO 组也增高,差异有统计

学意义($F = 158.07, P < 0.05$),在移植 BMSCs 后的第 7 天表达最高(图 10A、C);③与假手术组比较,MCAO 组 GFAP 的表达增强,BMSC 组较 MCAO 组也增强,差异有统计学意义($F = 474.84, P < 0.05$,图 10A、D);④与假手术组比较,MCAO 组 MAP-2 表达降低,而 BMSC 组脑组织在移植后第 3、7 和 14 天表达均出现上调趋势,差异均有统计学意义($F = 160.25, P < 0.05$,图 10A、E)。

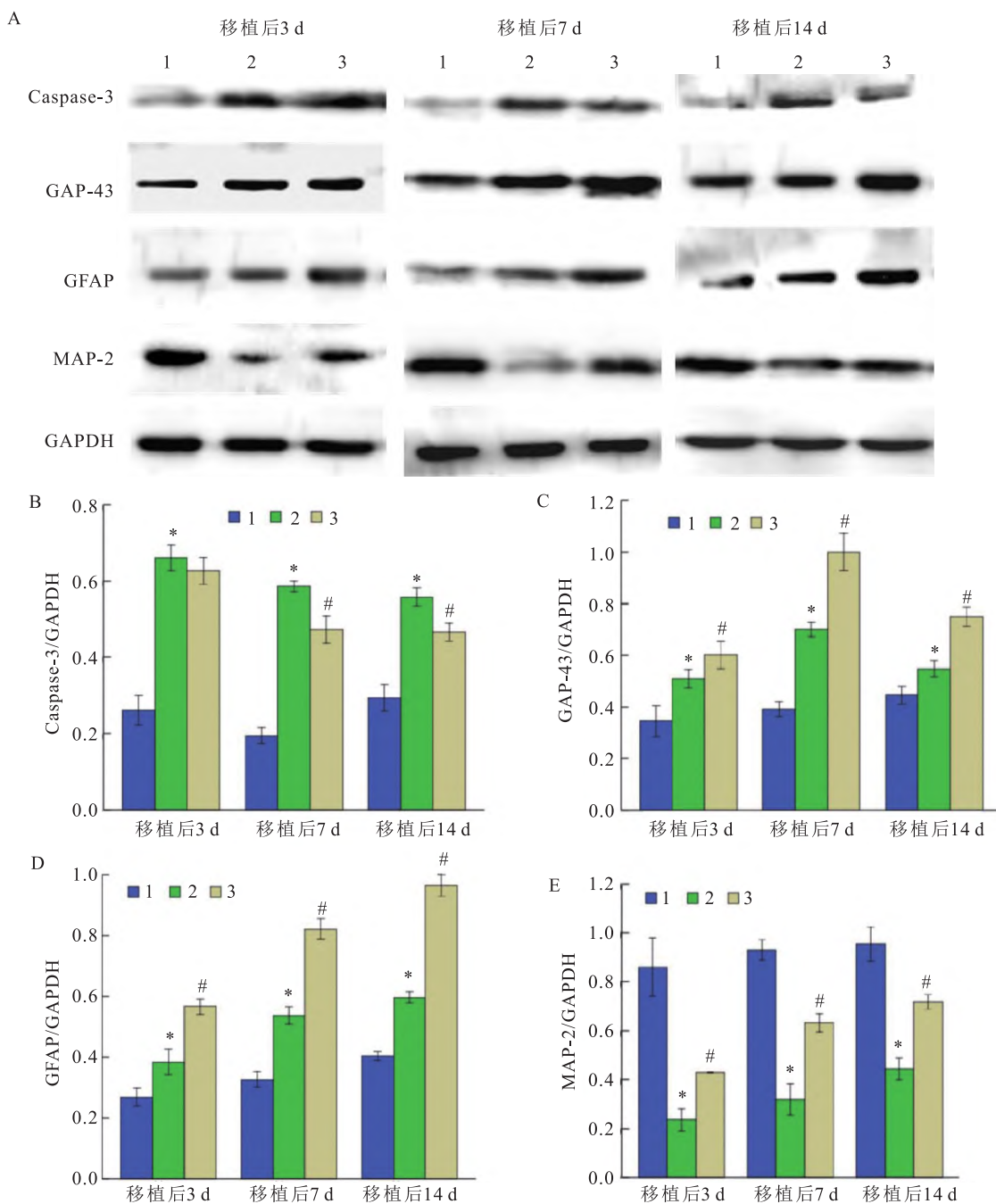


图 10 Caspase-3、GAP-43、GFAP 和 MAP-2 在三组脑组织中不同时间点的表达

A: Caspase-3、GAP-43、GFAP 和 MAP-2 在三组脑组织中表达的条带图; B: Caspase-3/GAPDH 灰度值比; C: GAP-43/GAPDH 灰度值比; D: GFAP/GAPDH 灰度值比; E: MAP-2/GAPDH 灰度值比; 1: 假手术组; 2: MCAO 组; 3: BMSC 组; 与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与 MCAO 组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

BMSCs 普遍高表达 CD29 和 CD90,低表达造血干细胞标记物 CD45,这与大鼠骨髓间充质干细胞的细胞表面标志物图谱相一致^[8]。BMSCs 有在非造血组织中自我更新的能力,也具有向各种组织分化的多能性,即分化为脂肪细胞、软骨细胞和骨细胞等中胚层细胞,除了中胚层系外,BMSCs 还被证明了向神经细胞等神经外胚层谱系和肝细胞、胰腺细胞等内胚层谱系的转分化潜能,正是这种独特的分化为靶细胞的能力,突出了 BMSCs 在再生医学背景下的重要性。

本研究过程中发现 BMSC 组的大鼠的 mNSS 评分和脑梗死面积均低于 MCAO 组,说明 BMSCs 对脑梗死带来的神经功能损害有一定的治疗作用。另外发现梗死过程中可能存在一定的自我修复作用,因为随着时间的延长,脑卒中大鼠的神经功能得到了改善。MAP-2 存在神经元的胞体和树突中,它对于脑缺血反应比较敏感^[9]。在本研究中,脑缺血时 MAP-2 表达减少,BMSCs 移植后使其表达增强,这说明神经元系统的生长与修复的过程中,BMSCs 可以通过增强 MAP-2 对缺血性脑卒中中进行神经修复。星形胶质细胞一种标志性的特征就是 GFAP 蛋白,GFAP 能够有效的参与到细胞骨架形成的过程中,并能够平衡张力^[10]。脑缺血会使得星形胶质细胞的表达情况增强,并出现细胞增生的情况^[11]。本研究中 GFAP 呈现星型或放射状,在脑缺血时高表达,且出现在缺血区周围,可能是在 GFAP 在脑缺血时反应性增多,参与自我修复过程。GAP-43 是一种神经特异性的蛋白质,它维持突触稳定性和促进轴突再生的启动^[12]。脑缺血时 GAP-43 表达增加,在缺血早期它处于病变的中心,随后在半影区表达,这表明 GAP-43 在组织的拯救和再生中起着早期的作用^[13],而 BMSCs 移植后其表达上调,说明 BMSCs 有可能是通过调节 GAP-43 来修复缺血组织的。Caspase-3 的激活在神经元凋亡中起着极其重要的作用,是一种促凋亡蛋白^[14]。MCAO 大鼠患侧梗死区脑组织大面积组织溶解和细胞坏死,呈现缺血区的凋亡趋势,MCAO 大鼠 Caspase-3 表达较假手术组上调,荧光染色可见 Caspase-3 阳性细胞数增多,这些均说明缺血性脑卒中梗死区出现神经细胞的凋亡,而 BMSC 组的梗死区 Caspase-3 阳性细胞数减少,说明 BMSCs 移植具有抑制神经细胞凋亡的作用。

综上所述,BMSCs 治疗缺血性脑卒中有成效,表现在梗死面积减小、神经行为改善、凋亡细胞受到抑制、局部轴突再生和神经胶质细胞增生等。本研究仅为临床上治疗缺血性脑卒中提供了理论依据,要想完全阐明其神经修复机制,还需进一步研究。

参考文献

- [1] Diener H, Hankey G J. Primary and secondary prevention of ischemic stroke and cerebral hemorrhage[J]. J Am Coll Cardiol, 2020, 75(15):1804-18.
- [2] Donkor E S. Stroke in the 21st century: A snapshot of the burden, epidemiology, and quality of life[J]. Stroke Res Treat, 2018, 2018:1-10.
- [3] Song S, Liang L, Fonarow G C, et al. Comparison of clinical care and in-hospital outcomes of Asian American and white patients with acute ischemic stroke[J]. JAMA Neurol, 2019, 76(4):430-9.
- [4] Chrostek M R, Fellows E G, Crane A T, et al. Efficacy of stem cell-based therapies for stroke[J]. Brain Res, 2019, 1722:146362.
- [5] Mizuma A, Yenari M A. Clinical perspectives on ischemic stroke[J]. Exp Neurol, 2021, 338:113599.
- [6] Li Z, Ye H, Cai X, et al. Bone marrow-mesenchymal stem cells modulate microglial activation in the peri-infarct area in rats during the acute phase of stroke[J]. Brain Res Bull, 2019, 153:324-33.
- [7] Yu X, Wu H, Zhao Y, et al. Bone marrow mesenchymal stromal cells alleviate brain white matter injury via the enhanced proliferation of oligodendrocyte progenitor cells in focal cerebral ischemic rats[J]. Brain Res, 2018, 1680:127-36.
- [8] Xiang S, Gao W, Peng H, et al. Standards of clinical-grade mesenchymal stromal cell preparation and quality control (2020 China Version)[J]. J Neurorestoratology, 2020, 8(4):197-216.
- [9] Gao X, Wu D, Dou L, et al. Protective effects of mesenchymal stem cells overexpressing extracellular regulating kinase 1/2 against stroke in rats[J]. Brain Res Bull, 2019, 149:42-52.
- [10] Wu X, Ni J, An H, et al. Effect of cluster needling at scalp acupoints on differential protein expression in rat brain tissue after acute focal cerebral ischemia[J]. J Tradit Chin Med Sci, 2020, 7(3):316-24.
- [11] 花向阳, 卞尔保, 张正伟, 等. 局灶性脑缺血再灌注损伤对小鼠脑组织 SUV39H1、H3K9 及 GFAP 表达的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(2):205-9.
- [12] Wang A, Hu M, Zhang Z, et al. Fastigial nucleus electrostimulation promotes axonal regeneration after experimental stroke via cAMP/PKA pathway[J]. Neurosci Lett, 2019, 699:177-83.
- [13] Abdullahi A, Truijen S, Saeyns W. Neurobiology of recovery of motor function after stroke: The central nervous system biomarker effects of constraint-induced movement therapy[J]. Neural Plast, 2020, 2020:1-12.
- [14] Lossi L, Castagna C, Merighi A. Caspase-3 mediated cell death in the normal development of the mammalian cerebellum[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(12):3999.

网络出版时间:2022-1-25 8:57 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220124.0938.001.html

大鼠 Sesn2/AMPK 信号介导肝脏的自噬在间歇低氧和复氧致糖代谢异常中的作用

陈新洁¹, 刘宏飞¹, 田稼芸¹, 靳欢欢¹, 吕云辉², 韩芳³, 魏翠英¹

摘要 目的 探讨大鼠 Sesn2/AMPK 信号介导肝脏的自噬在间歇低氧和复氧致糖代谢异常中的作用。方法 48 只大鼠随机分为对照组(NC)与慢性间歇低氧(CIH)组,每组 24 只,CIH 组置于间歇低氧舱 8 h/d,持续 8 周,随后予常氧饲养 4 周;NC 组始终常氧饲养。两组大鼠分别在基线、间歇低氧 8 周、复氧 4 周时检测空腹血糖(FBG)、空腹胰岛素(FINS)、胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)、肝脏 Sesn2、AMPK、p-AMPK 蛋白及 mTOR、LC3 mRNA 水平。结果 基线时,两组上述指标差异无统计学意义($P > 0.05$);间歇低氧 8 周时,

与 NC 组比较,CIH 组 FBG、FINS、HOMA-IR、mTOR 水平增高,Sesn2、p-AMPK/AMPK、LC3 水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);复氧 4 周后,两组上述指标差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 慢性间歇低氧可以导致大鼠 FBG、FINS 增高,可能是通过抑制 Sesn2/AMPK 介导肝脏的自噬引起胰岛素抵抗。

关键词 慢性间歇低氧;血糖;Sesn2;AMPK;自噬

中图分类号 R 587.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)03-0344-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.03.002

2021-10-08 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81660020);内蒙古自然科学基金(编号:2019MS08192)

作者单位:¹ 内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院内分泌科,包头 014010

² 云南省人民医院呼吸科,昆明 655034

³ 北京大学人民医院呼吸科,北京 100044

作者简介:陈新洁,女,硕士研究生;

魏翠英,女,副教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:weicuiying9@163.com

2 型糖尿病(type 2 diabetes, T₂DM)患者中阻塞性睡眠呼吸暂停综合征(obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome, OSAHS)的患病率高达 23.8%~53.0%,它们之间存在明显关联^[1]。OSAHS 的主要特征是慢性间歇低氧,这会激活氧化应激,释放炎症因子,影响糖脂代谢,进而导致胰岛素抵抗的发生。上述均依赖于单磷酸腺苷激活蛋白激酶(AMP-

The therapeutic effect of bone marrow mesenchymal stem cells in ischemic stroke

Fu Lihuan¹, Jiang Xiaoxia², Mao Gengsheng¹

(¹ Clinical College of Anhui Medical University, Hefei 230032; ² Institute of Military Cognition and Brain Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850)

Abstract Objective To explore the therapeutic effect and mechanism of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) on ischemic stroke in rats. **Methods** BMSCs were isolated by whole bone marrow adherence method and identified by flow cytometry. The rat model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) was established and randomly divided into sham operation group, MCAO group and BMSC group. The rats in each group were scored by mNSS and stained with TTC. Immunohistochemistry, immunofluorescence and Western blot were used to detect the positive expression levels of Caspase-3, MAP-2, GAP-43 and GFAP in the infarct area and surrounding areas of the brain tissues of each group. **Results** Flow cytometry detected that BMSCs expressed low CD45 and high expression of CD90 and CD29; The mNSS score and the percentage of infarct volume of rats on the 3rd, 7th and 14th day after transplantation of BMSCs all decreased; The Caspase-3 in the infarct area decreased, and the expression of MAP-2, GFAP and GAP-43 increased. **Conclusion** BMSCs transplantation can promote the recovery of neurological function and reduce the volume of cerebral infarction in MCAO model rats, possibly through mechanisms such as nerve regeneration cell proliferation, inhibition of cell apoptosis, and axon regeneration.

Key words bone marrow mesenchymal stem cells; ischemic stroke; tail vein; nerve repair