

慢病毒介导 EPhrinB2 基因转染骨髓间充质干细胞对脑瘫大鼠脑损伤的保护作用

朱敏 张跃 汤健 杜森杰 华裕 傅大林 陆芬 李红英 赵晓科

【摘要】 目的 观察慢病毒介导 EPhrinB2 基因转染骨髓间充质干细胞(BMSCs)对脑瘫大鼠脑损伤的保护作用及相关机制。**方法** 从大鼠中分离、培养 BMSCs,以慢病毒为载体介导 EPhrinB2 转染 BMSCs。采用随机数字表法将 96 只大鼠分为假手术组、溶剂对照组(简称 PBS 组)、空载慢病毒组(简称 EGFP/BMSCs 组)及 EPhrinB2 重组慢病毒组(简称 EPhrinB2/BMSCs 组)。选用改良缺氧缺血性脑病(HIE)造模方法将 PBS 组、EGFP/BMSCs 组及 EPhrinB2/BMSCs 组大鼠制成脑瘫模型,于术后 7 d 时分别将 PBS 溶液、BMSCs 或慢病毒介导 EPhrinB2 基因转染 BMSCs 注射到 PBS 组、EGFP/BMSCs 组、EPhrinB2/BMSCs 组大鼠侧脑室内。于脑损伤 28 d 后采用免疫组织化学法检测各组大鼠海马组织 EPhrinB2 蛋白表达;采用 HE 染色方法观察细胞移植后大鼠海马 CA1 区神经元密度;采用 TUNEL 法检测大鼠海马神经元凋亡情况;采用免疫荧光法检测大鼠海马区 Nestin 及 CD31 表达水平。于脑损伤 28 d 后采用 Morris 水迷宫检测各组大鼠学习、记忆能力变化。**结果** 脑损伤 28 d 后,发现 EPhrinB2/BMSCs 组海马组织 EPhrinB2 蛋白表达均显著高于假手术组、PBS 组及 EGFP/BMSCs 组,组间差异均具有统计学意义($P<0.05$);另外 EPhrinB2/BMSCs 组海马 CA1 区病理改变明显轻于 PBS 组及 EGFP/BMSCs 组;EPhrinB2/BMSCs 组海马区神经元凋亡率明显低于其它各组($P<0.05$)。另外免疫荧光检查显示 EPhrinB2/BMSCs 组海马 Nestin 及 CD31 阳性率均显著高于其它各组。远期行为学测试结果显示 EPhrinB2/BMSCs 组 Morris 水迷宫实验平均潜伏期明显优于 PBS 组及 EGFP/BMSCs 组($P<0.05$)。**结论** 慢病毒介导 EPhrinB2 转染 BMSCs 移植到脑瘫大鼠侧脑室海马区能高效表达 EPhrinB2 基因,有助于神经元细胞分化及血管新生,抑制细胞凋亡,加速受损神经功能恢复。

【关键词】 EPhrinB2; 骨髓间充质干细胞; 神经元细胞; 脑瘫; 大鼠

基金项目:国家自然科学基金(81401864)

EPhrinB2-modified mesenchymal stem cells help repair brain injury in a rat model of cerebral palsy Zhu Min, Zhang Yue, Tang Jian, Du Senjie, Hua Yu, Fu Dalin, Lu Fen, Li Hongying, Zhao Xiaoke. Department of Rehabilitation, Children's Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210008, China
Corresponding author: Zhang Yue, Email: feiyuezhang@126.com

【Abstract】 Objective To investigate any protective effect of transplanting EPhrinB2-modified bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) with a rat model of cerebral palsy. **Methods** BMSCs were isolated and cultured, then further modified by lentivirus-mediated transfection of the EPhrinB2 gene. Ninety-six Sprague-Dawley rats were randomly divided into a sham group, a solvent control group (PBS group), an empty lentivirus group (EGFP group) and an EPhrinB2 recombinant lentivirus group (EPhrinB2 group), each of 24. A model of cerebral palsy was established in the rats of the PBS, EGFP and EPhrinB2 groups using hypoxic-ischemic encephalopathy. Seven days after the operation, the lateral ventricles of the PBS, EGFP and EPhrinB2 group mice were injected with phosphate-buffered saline solution, BMSCs or EPhrinB2-modified BMSCs respectively. EPhrinB2 protein expression in the hippocampus was detected using immunohistochemistry 28 days after the operation. The neuron density in the CA1 region of the hippocampus was observed using hematoxylin and eosin staining, and any apoptosis of hippocampal neurons was detected using terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling. The expression of nestin and CD31 in the hippocampus was observed using immunofluorescence assays. Morris water maze testing was also conducted to evaluate changes in learning and memory ability. **Results** Compared with the other 3 groups, a significant increase in the expression of protein EPhrinB2 was observed in the hippocampuses of the EPhrinB2 group rats. The pathological changes in the hippocampus among the EPhrinB2 group were significantly less severe than those in the PBS and

EGFP groups. The rate of apoptosis in the hippocampuses of the EphrinB2 group was significantly lower than that of the other groups. Immunofluorescence showed that nestin- and CD31-positive cells were significantly more numerous in the EphrinB2 group than in the others. In the water maze the average latency of the EphrinB2 group was significantly shorter than those of the other groups. **Conclusion** Lentiviral-mediated Ephrinb2 transfection of BMSCs into the hippocampus can promote EphrinB2 gene expression, promote angiogenesis and neuron differentiation, inhibit apoptosis and accelerate the repair of injured nerves.

【Key words】 EphrinB2; Bone marrow; Mesenchymal stem cells; Neurons; Cerebral palsy

Fund program: Natural Science Foundation of China (grant 81401864)

小儿脑性瘫痪(脑瘫)是由于胎儿或婴幼儿期脑非进行性损伤或缺陷所造成的运动障碍及姿势异常,可伴有智力低下,是导致儿童残障的主要疾病。传统神经修复理论认为小儿脑瘫损伤是不可逆转的;目前临床针对小儿脑瘫亦缺乏特效治疗方法^[1]。近年来干细胞移植作为脑瘫的一种新型治疗手段已逐渐成为神经科学领域焦点^[2]。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSCs)是存在于骨髓且有别于造血干细胞的一类前体细胞;相关研究发现,在特定环境下 BMSCs 能被诱导分化为神经细胞、血管内皮细胞等^[3-4];另外有动物实验证实 BMSCs 移植对脑缺血动物模型具有保护作用^[5-6]。携带外源基因的慢病毒载体(来源于人类免疫缺陷病毒-1)在慢病毒包装质粒辅助下,经病毒包装成为具有感染力的病毒颗粒,通过感染细胞实现外源基因在细胞内表达,经遗传修饰而携带基因的神经干细胞仍具有自我增殖及多向分化潜能,并能长期表达目的基因。

当前研究发现,红细胞生成素肝细胞受体(erythropoietin-producing hepatocellular receptor, EPh 受体)属于酪氨酸激酶受体家族,其配体主要表达于细胞表面,被命名为 Ephrin。EPh 受体与 Ephrin 配体相互作用后可被激活,促使受体的胞内酪氨酸残基磷酸化并引发信号转导,在神经系统发育、轴突生长导向、突触形成、细胞增殖、迁移及血管发生等方面发挥重要生理作用^[7];同时配体也可活化并产生双向信号转导,即 Ephrin 激活 EPh 的正向信号系统与 EPh 激活 Ephrin 的反向信号通路^[8]。EPhB4 受体只与 EphrinB2 配体高亲和力和结合,由于 EPhB4/EphrinB2 信号通路高度参与神经系统血管生成及修复过程而成为研究热点^[9]。有学者报道 EphrinB2 基因在胚胎期诱导神经元迁移及血管内皮细胞生成方面具有一定作用^[10];但关于 EPhB4/EphrinB2 在干细胞移植治疗脑瘫大鼠中的作用目前国内、外还鲜见报道。基于此,本研究于 2017 年 3 月至 2017 年 9 月期间采用改良缺氧缺血脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)造模方法制作脑瘫大鼠模型,将转染 EphrinB2 基因的 BMSCs 移植到脑瘫大鼠侧脑室内并观察 EphrinB2 表达情况,以探讨慢病毒介导 EphrinB2 基因转染 BMSCs 对脑瘫大

鼠脑损伤的保护作用及相关机制。

材料与方法

一、主要实验动物及试剂

选取清洁级健康 7 日龄 Sprague-Dawley (SD) 大鼠[生产许可证为 SCXK(宁)-2017-0001],由南京医科大学实验动物中心提供,雌雄不拘,体重 12.5~18.0 g,饲养于南京医科大学动物实验中心。本研究主要试剂包括 LV 重组载体系列(过表达大鼠 EphrinB2 慢病毒载体)和增强绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)(上海吉凯基因化学有限公司)、EphrinB2 单克隆抗体(英国 Abcam 公司)、大鼠巢蛋白(Nestin)单克隆抗体(英国 Abcam 公司)、TUNEL 原位细胞凋亡检测(DAB 显色法)试剂盒(美国罗氏公司)、大鼠 CD31 单克隆抗体(英国 Abcam 公司)、生物素标记山羊抗兔 IgG(英国 Abcam 公司)、L-多聚赖氨酸和噻唑蓝(美国 Sigma 公司)等。

二、动物实验

1. 动物分组:采用随机数字表法将 96 只 SD 大鼠分为 4 组,每组 24 只,分别是假手术组、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)对照组(简称 PBS 组)、空载慢病毒组(简称 EGFP/BMSCs 组)及 EphrinB2 重组慢病毒组(简称 EphrinB2/BMSCs 组)。

2. 动物模型制备:采用改良 HIE 造模方法将 PBS 组、EGFP/BMSCs 组及 EphrinB2/BMSCs 组大鼠制成脑瘫动物模型,主要制模步骤如下:大鼠经乙醚吸入麻醉后行颈部正中切口,钝性分离并结扎左侧颈总动脉,待其苏醒后回窝喂养 2 h。随后将大鼠置于自制有机玻璃缺氧舱内,舱内通以 92% 氮+8% 氧的氮氧标准混合气体,持续灌流 2.5 h,流速为 2 L/min,维持舱内温度(37.0±1.0)℃。继续保温 1 h 后采用 Longa 评分法进行神经行为学评定,得分为 2 分或 3 分的实验鼠视为造模成功,具体方法参见文献[11-13]。假手术组大鼠仅分离左侧颈总动脉,不予结扎,其它干预均同上。本研究造模过程中无大鼠死亡,动物模型制作成功率为 100%。

3. 大鼠 BMSCs 分离、纯化及扩增:取 SD 大鼠经颈椎脱臼处死后,置入体积分数为 75% 乙醇中浸泡

5 min, 在无菌条件下分离大鼠双侧股骨及胫骨, 暴露骨髓腔, 用含胎牛血清(体积分数为 10%)的 DMEM (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM) 培养基缓慢反复冲洗骨髓腔直至发白, 收集骨髓液移至离心管中, 经 1500 r/min 离心 3 min 后弃上清, 用培养基重悬细胞并制成单细胞悬液, 按 1×10^8 个/L 细胞浓度接种于 25 cm² 无菌培养瓶中, 置于 37 ℃、体积分数为 5% CO₂ 恒温培养箱内培养, 48 h 后半量换液, 96 h 后完全换液, 之后每 3 天换液 1 次, 于倒置显微镜下动态观察骨髓间充质干细胞生长情况, 待贴壁细胞融合度达 80%~90% 时用 0.25% 胰蛋白酶+0.04% 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) 消化传代至 3 代以上备用。

4. EphrinB2 慢病毒载体构建及 BMSCs 培养与转染: 构建过表达大鼠 EphrinB2 慢病毒载体含有 EGFP 标记, 采用孔稀法测定产生的病毒液滴度, 最后将制备好的慢病毒载体置入 -80 ℃ 冰箱中冻存备用。选用第 3 代状态较好的 BMSCs 接种于 96 孔板中, 根据慢病毒的不同滴度及细胞数按照 20 的转染复数(multiplicity of infection, MOI) 分别加入 EphrinB2-EGFP-LV 和 EGFP-LV; 同时按病毒转染增强溶液体积加入 8 μg/ml 的促转染剂, 混匀后置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养; 8~12 h 观察细胞状态, 换完全培养基; 3~4 d 后通过荧光显微镜观察 BMSCs 中 EGFP 荧光表达情况。分别收集由 EphrinB2-EGFP-LV 和 EGFP-LV 转染的 2 组 BMSCs 细胞悬液, 采用流式细胞仪检测转染率, 收集转染效率最高的 BMSCs(转染后 72 h), 调整细胞浓度为 1.0×10^6 个/μl 用于后续动物实验。

5. BMSCs 移植: 采用 10% 水合氯醛腹腔麻醉大鼠后将其固定于立体定位仪上, 大鼠头部常规备皮消毒, 于头皮正中切开暴露颅骨, 选择前囟后 1 mm、中线左侧 1 mm、皮质垂直向下 4 mm 处作为靶点。假手术组大鼠采用微量加样器向左侧脑室内注入 PBS 液 5 μl, PBS 组亦注入 PBS 液 5 μl, EGFP/BMSCs 组则注入慢病毒转染 BMSCs 悬液 5 μl(细胞浓度为 1.0×10^6 个/μl), EphrinB2/BMSCs 组则注入携带 EphrinB2 的慢病毒转染 BMSCs 悬液 5 μl(细胞浓度为 1.0×10^6 个/μl), 微量加样器注入过程匀速、缓慢, 注射时间约需 10 min, 注射结束后留针 5 min 再缓慢退针、缝合头皮。

三、标本取材及检测

1. 免疫组化法检测 EphrinB2 表达: 于造模后第 28 天时各组随机取 8 只大鼠, 采用 10% 水合氯醛进行腹腔麻醉, 经心脏快速灌注生理盐水 300~400 ml 冲洗, 随后灌注 4% 多聚甲醛 100 ml, 固定 5 min 后处死大鼠并提取脑组织; 经常规脱水、石蜡包埋后选取损伤部位

行冠状位切片(片厚 4 μm), 切片经脱蜡至水、抗原修复、封闭后分别滴加兔抗鼠 EphrinB2 多克隆抗体, 37 ℃ 孵育 2 h, 随后参照二抗试剂盒(生物素标记山羊抗兔 IgG)说明书进行操作, 采用二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色、苏木素轻度复染、脱水、透明和封片, 于 100 倍普通光学显微镜下计数 5 个视野 EphrinB2 阳性细胞数量, 取其平均值。

2. 脑组织病理检查: 分别取各组大鼠脑切片(片厚 4 μm)行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色, 采用 Leica 图像分析系统计算大鼠左侧海马 CA1 区神经元密度。

3. 海马神经元凋亡计数: 应用脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(terminal-deoxynucleotidyltransferase mediated nick end labeling, TUNEL)检测细胞凋亡情况, 凋亡细胞核呈棕色, 最后经 DAB 显色、脱水、透明、封片, 所有操作步骤均按试剂盒说明书进行, 选取各组大鼠左侧脑海马组织, 于 100 倍普通光学显微镜下计数 5 个视野阳性细胞数量, 计算阳性细胞占细胞总数的百分比(即细胞凋亡率)。

4. 免疫荧光检测 Nestin/GFP 和 CD31 表达: 于造模后第 28 天时各组随机取 8 只大鼠, 采用 10% 水合氯醛腹腔麻醉大鼠, 经心脏快速灌注生理盐水 300~400 ml 冲洗, 随后灌注 4% 多聚甲醛 100 ml, 固定 5 min 后处死大鼠提取脑组织, 按 10 μm 厚度行冠状位切片后保存于 -80 ℃ 环境下备检。各组大鼠脑片破膜 30 min, 经羊血清封闭 2 h 后, 切片上分别滴加兔抗大鼠 Nestin 和兔抗大鼠 CD31 单克隆抗体, 置于 4 ℃ 冰箱内过夜; 第 2 天加含羊抗兔 IgG(FITC 标记, 1:500)的荧光二抗稀释液, 室温孵育 2 h; 经含 DAPI 封片剂封片, 最后采用荧光显微镜拍照, 计数 10 个 100 倍镜视野 Nestin/GFP 阳性细胞数量, 取平均值。采用 CD31 免疫荧光染色、荧光显微镜观察 CD31 阳性微血管数量, 每个脑组织取 5 张连续脑片用于分析, 每张脑片选取海马 4 个随机区域进行观察, 采用 Image-ProPlus 软件处理分析图像。

四、远期行为学测试

于造模成功后 28 d 时采用经典 Morris 水迷宫检测各组大鼠定位航行及空间搜索能力, 在水迷宫任意 2 个象限的池壁做标记并作为大鼠入水点, 将大鼠面向池壁放入水中, 观察并记录大鼠寻找并爬上平台所需时间(即逃避潜伏期)。在每次实验中大鼠分别从 2 个不同入水点入水, 如大鼠在 120 s 内未找到平台则将其引至平台上并停留 10 s, 此时潜伏期记为 120 s, 每次训练间隔 60 s, 每只大鼠每天共训练 4 次, 该实验共持续 5 d, 取第 5 天的平均潜伏期数据纳入统计分析。

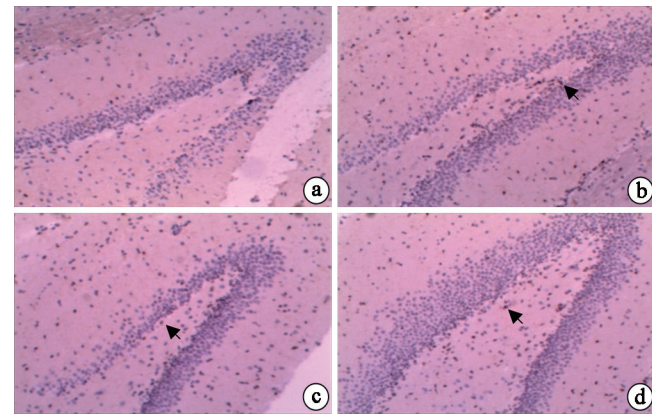
五、统计学分析

本研究所得计量数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用 SPSS 12.0 版统计学软件包进行数据分析,多组均数间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、各组大鼠 EPhrinB2 免疫组化检测结果比较

通过免疫组化检测发现, EPhrinB2 阳性细胞呈棕色(图 1)。计数 100 倍镜视野下阳性细胞数量,结果显示 PBS 组、EGFP/BMSCs 组和 EPhrinB2/BMSCs 组海马组织中 EPhrinB2 阳性细胞数量均较假手术组明显增多 ($P < 0.05$); 另外 EPhrinB2/BMSCs 组海马组织中 EPhrinB2 阳性细胞数量亦较 PBS 组及 EGFP/BMSCs 组明显增多, 组间差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。具体数据见表 1。



注: A 为假手术组; B 为 PBS 组; C 为 EGFP/BMSCs 组; D 为 EPhrinB2/BMSCs 组

图 1 各组大鼠海马组织 EPhrinB2 阳性细胞比较(免疫组化染色, $\times 100$)

表 1 各组大鼠海马 CA1 区 EPhrinB2 阳性细胞数、神经元密度及海马神经元凋亡情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

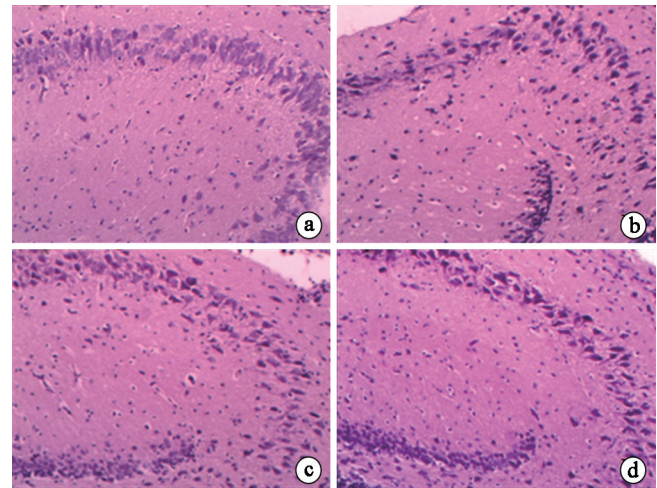
组别	只数	EPhrinB2 阳性细胞数 (个/ mm^2)	神经元密度 (个/ mm^2)	细胞凋亡率 (%)
假手术组	8	4.50 ± 2.45	210.75 ± 15.04	0
PBS 组	8	31.25 ± 6.22^a	95.87 ± 14.67^a	58.25 ± 7.74^a
EGFP/BMSCs 组	8	32.37 ± 3.50^a	135.62 ± 11.41^{ab}	43.75 ± 4.86^{ab}
EPhrinB2/BMSCs 组	8	55.87 ± 9.53^{abc}	170.37 ± 10.54^{abc}	27.87 ± 4.29^{abc}

注: 与假手术组比较, $^a P < 0.05$; 与 PBS 组比较, $^b P < 0.05$; 与 EGFP/BMSCs 组比较, $^c P < 0.05$

二、各组大鼠脑组织病理变化分析

通过光镜观察发现, 假手术组海马神经元排列规则、近圆形, 形态完整, 胞质淡染, 核仁清晰; PBS 组海马神经元排列紊乱, 胞核呈多边形或圆齿状、染色质浓缩多见, 细胞胞质嗜酸性呈不规则萎缩状; EGFP/BMSCs 组和 EPhrinB2/BMSCs 组海马神经元排列规

整, 胞核、胞仁清晰, 散在分布浓染、皱缩的病变形态神经元(图 2)。PBS 组海马 CA1 区神经元密度明显低于假手术组、EGFP/BMSCs 组和 EPhrinB2/BMSCs 组 ($P < 0.05$); 另外 EPhrinB2/BMSCs 组海马 CA1 区神经元密度显著高于 EGFP/BMSCs 组, 但仍显著低于假手术组 ($P < 0.05$)。具体情况见表 1。

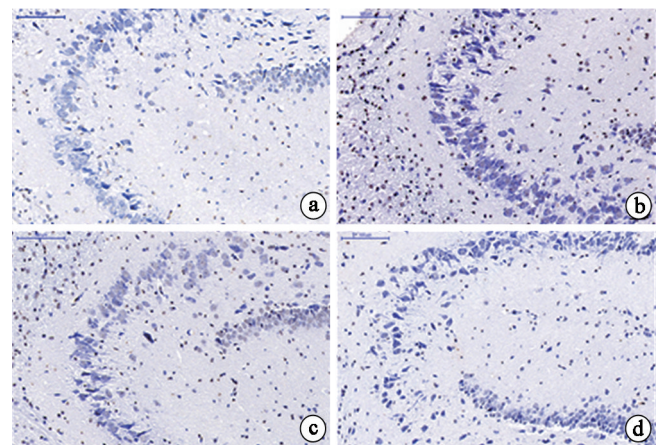


注: A 为假手术组; B 为 PBS 组; C 为 EGFP/BMSCs 组; D 为 EPhrinB2/BMSCs 组

图 2 各组大鼠左侧海马组织神经元细胞比较(HE 染色, $\times 100$)

三、各组大鼠细胞凋亡(TUNEL 法)情况比较

通过光镜观察发现, 胞核中有棕色颗粒细胞即为阳性凋亡细胞(图 3); PBS 组海马区神经元细胞凋亡率明显高于假手术组 ($P < 0.05$), 同时也明显高于 EGFP/BMSCs 组及 EPhrinB2/BMSCs 组 ($P < 0.05$); 而 EPhrinB2/BMSCs 组海马区神经元凋亡率明显低于 EGFP/BMSCs 组, 组间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。具体数据见表 1。

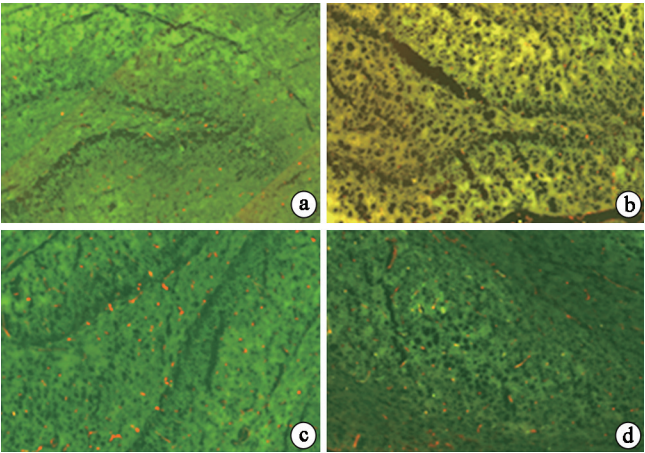


注: A 为假手术组; B 为 PBS 组; C 为 EGFP/BMSCs 组; D 为 EPhrinB2/BMSCs 组

图 3 各组大鼠左侧海马区神经元凋亡情况比较(TUNEL 及 DAB 染色, $\times 100$)

四、各组大鼠 Nestin 阳性细胞计数比较

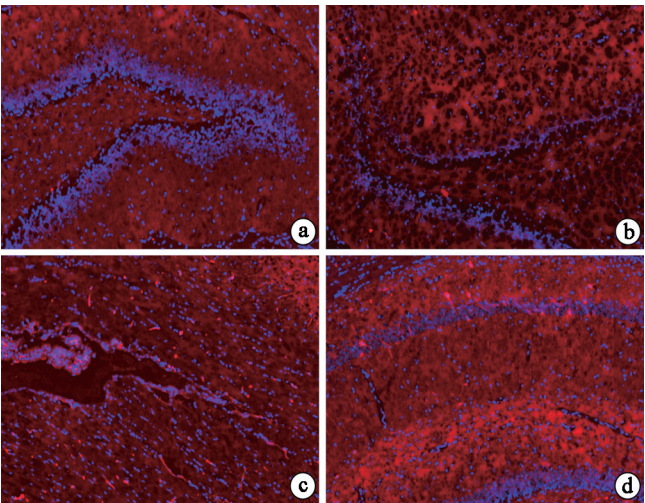
经免疫荧光检测发现,Nestin 阳性细胞呈红色,GFP 阳性细胞呈绿色荧光(图 4),计数 10 个 100 倍镜视野下 Nestin/GFP 阳性细胞数量,结果显示 EGFP/BMSCs 组、EPhrinB2/BMSCs 组 Nestin/GFP 阳性细胞数量均较假手术组及 PBS 组明显增多($P<0.05$);另外 EPhrinB2/BMSCs 组 Nestin/GFP 阳性细胞数量亦显著多于 EGFP/BMSCs 组,组间差异均具有统计学意义($P<0.05$)。具体数据见表 2。



注:A 为假手术组;B 为 PBS 组;C 为 EGFP/BMSCs 组;D 为 EPhrinB2/BMSCs 组
图 4 各组大鼠左侧海马组织 Nestin/GFP 阳性细胞比较(免疫荧光染色,×100)

五、各组大鼠 CD31 阳性细胞计数比较

经免疫组化染色发现,小血管 CD31 阳性内皮细胞膜呈红色(图 5)。计数 10 个 100 倍镜视野下小血管数量,结果显示 PBS 组、EGFP/BMSCs 组及



注:A 为假手术组;B 为 PBS 组;C 为 EGFP/BMSCs 组;D 为 EPhrinB2/BMSCs 组
图 5 各组大鼠左侧海马 CD31/DAPI 阳性细胞比较(免疫荧光染色,×100)

EPhrinB2/BMSCs 组海马组织微血管密度均较假手术组明显增大,组间差异均具有统计学意义($P<0.05$);另外 EPhrinB2/BMSCs 组海马组织微血管密度亦较 PBS 组及 EGFP/BMSCs 组明显增大,组间差异均具有统计学意义($P<0.05$)。具体数据见表 2。

表 2 各组大鼠海马 Nestin 及 CD31 阳性细胞计数比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	Nestin/GFP 阳性细胞计数 (个/100 倍镜视野)	MVD (个/mm ²)
假手术组	8	2.87±1.24	6.25±1.66
PBS 组	8	3.50±0.93	11.55±3.21 ^a
EGFP/BMSCs 组	8	27.62±11.2 ^{ab}	33.50±3.81 ^{ab}
EPhrinB2/BMSCs 组	8	56.00±4.34 ^{abc}	41.87±3.79 ^{abc}

注:与假手术组比较,^a $P<0.05$;与 PBS 组比较,^b $P<0.05$;与 EGFP/BMSCs 组比较,^c $P<0.05$

六、各组大鼠远期行为学变化比较

于脑损伤 28 d 后采用经典 Morris 水迷宫检测大鼠定位航行及空间搜索能力,在 5 d 实验过程中发现假手术组、PBS 组、EGFP/BMSCs 组及 EPhrinB2/BMSCs 组大鼠均随着训练天数增加,其找到平台所用时间均逐渐缩短;实验结束时发现 PBS 组、EGFP/BMSCs 组及 EPhrinB2/BMSCs 组找到平台所用时间均较假手术组明显延长,组间差异均具有统计学意义($P<0.05$),提示脑瘫大鼠学习记忆能力下降、远期行为异常。通过进一步比较发现,PBS 组大鼠逃避潜伏期明显长于 EGFP/BMSCs 组和 EPhrinB2/BMSCs 组($P<0.05$),EGFP/BMSCs 组逃避潜伏期明显长于 EPhrinB2/BMSCs 组($P<0.05$),提示侧脑室注射 BMSCs 可明显改善缺氧缺血脑损伤对新生大鼠远期脑功能的影响;并且 EPhrinB2/BMSCs 与 GFP/BMSCs 对脑瘫大鼠脑损伤的保护作用具有明显差异($P<0.05$)。具体数据见表 3。

表 3 各组大鼠 Morris 水迷宫实验逃避潜伏期比较($s, \bar{x}\pm s$)

组别	只数	逃避潜伏期
假手术组	8	21.00±3.46
PBS 组	8	76.70±2.43 ^a
EGFP/BMSCs 组	8	41.87±3.09 ^{ab}
EPhrinB2/BMSCs 组	8	32.75±2.76 ^{abc}

注:与假手术组比较,^a $P<0.05$;与 PBS 组比较,^b $P<0.05$;与 EGFP/BMSCs 组比较,^c $P<0.05$

讨 论

近年来人们不断探索应用干细胞移植治疗脑瘫患儿,但干细胞移植治疗小儿脑瘫的确切机制目前还未明了,其神经修复机制可能包括:①替代作用;②诱导

作用;③营养作用;④增加轴突纤维密度,加速突触及髓鞘形成;⑤干细胞不仅能产生必要的细胞因子环境,促进血管生成,分泌促血管生成因子,还具有分化成血管内皮细胞的能力等^[13]。

BMSCs 来源丰富,其自我更新能力、增殖能力强,能整合于宿主细胞中,长期稳定表达外源性基因且相较于胚胎干细胞,其伦理学限制较少,是中枢神经病基因治疗较为理想的载体细胞,具有广泛应用前景。目前研究发现 EPh 受体是最大的酪氨酸激酶受体家族,其配体 EPhrin 主要表达于细胞表面。当神经损伤后, EPh/EPhrin 各种亚型表达在神经系统中均有不同程度上调^[14]。在神经功能受损情况下, EPh/EPhrin 可通过激活 N-甲基-D-天冬氨酸 (N-methyl-D-aspartic acid, NMDA)、调节树突棘、突触可塑性相关蛋白等途径促进神经功能恢复;还可通过激活趋化因子或黏附分子等促进外源性或内源性神经干细胞增殖、分化、迁徙等。比较特殊的是 EPhB4 受体只与 EPhrinB2 高亲和力结合,且相关研究发现 EPhB4/EPhrinB2 信号通路高度参与神经系统血管生成^[15]。体外研究发现 EPhB4 受体与 EPhrinB2 配体相互作用可能导致受体与配体两者同时发生酪氨酸磷酸化,从而介导双向信号传递,即 EPhrinB2 配体具有与受体类似的结构兼具受体样信号分子功能,一旦与 EPhB4 受体结合则其胞质内酪氨酸残基磷酸化,从而发生反式信号传递调节细胞反应。当 EPh 受体激活后发生自身磷酸化,然后磷酸化激活 Ras、Ras 相关蛋白、Rho、Rap1 及粘着斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK) 等信号分子,进而通过下游信号通路调节细胞生物学效应,因此 EPh/EPhrin 信号通路有可能成为脑损伤后进行干预的重要环节之一。

EPhrinB2 主要表达于中枢神经系统神经元、星形胶质细胞中,参与神经系统发育,如轴突导向、突触可塑性及促进血管发育等,而且在成年后对神经干细胞分化、迁移可能具有重要调节作用。既往研究表明缺氧缺血诱导的脑白质损伤大鼠模型其 EPhrinB2 水平上调^[14],从而推测 EPhrinB2 与 EPhB4 异常表达可能参与多种脑疾病病理过程。本研究通过免疫组化染色发现 EPhrinB2 在假手术组中表达稀少,但各脑瘫组大鼠海马组织中 EPhrinB2 表达均显著上调,与上述研究结果基本一致;另外 EPhrinB2/BMSCs 组 EPhrinB2 蛋白表达水平明显增加,提示该组大鼠成功移植携带有 EPhrinB2 基因的 BMSCs。既往研究表明,新生大鼠发生缺氧、缺血性脑损伤后其海马区神经元密度较假手术组明显减小,海马神经元凋亡率较假手术组明显增加^[16]。本研究中 EGFP/BMSCs 组和 EPhrinB2/BMSCs 组海马区神经元密度均较 PBS 组明显增大,并且

EPhrinB2/BMSCs 组神经元密度亦显著优于 EGFP/BMSCs 组;另外 EGFP/BMSCs 组和 EPhrinB2/BMSCs 组海马区细胞凋亡数量均较 PBS 组明显减少,并且 EPhrinB2/BMSCs 组细胞凋亡数量亦明显优于 EGFP/BMSCs 组。上述结果提示, BMSCs 移植可降低脑瘫大鼠神经元凋亡指数,加速受损神经功能恢复,对脑瘫大鼠 HIE 损伤具有治疗作用,并以移植携带有 EPhrinB2 基因的 BMSCs 治疗效果更佳。

以 EPhrinB2 为受体的信号传导在诱导神经干细胞分化为神经元的过程中具有正向调控作用。如 Conover 等^[17]报道,侧脑室旁具有分化功能的神经干细胞能表达 EPhrinB2, EPhrinB2 信号传导可能在突触水平对神经干细胞分化过程进行调控,采用 EPhrinB2 持续灌注侧脑室 3 d 可改善神经干细胞增殖。上述研究表明 EPhrinB2 基因可能直接或间接调节侧脑室下区神经干细胞增殖、分化及迁徙。本研究采用 Nestin 免疫荧光法检测 BMSCs 分化为神经干细胞后在脑组织中的表达分布,结果显示实验进行 28 d 时 EPhrinB2/BMSCs 组 Nestin/GFP 阳性细胞数量明显多于 EGFP/BMSCs 组,表明 BMSCs 经 EPhrinB2 修饰后能加速分化为神经干细胞并在受损脑组织中表达,从而促进受损神经功能恢复。另外,本研究通过免疫荧光染色发现 EPhrinB2/BMSCs 组微血管密度明显优于其它各组,提示 EPhrinB2 作为促血管生成因子,能通过促进新生血管形成进而利于神经元存活,防止及减少脑细胞继发性损伤,抑制神经元细胞凋亡。

海马组织在机体学习及记忆中均发挥重要作用,脑缺氧、缺血后海马结构遭到破坏容易诱发认知障碍。Ikeda 等^[18]对缺氧缺血新生大鼠损伤 4~18 周后进行行为学观察,发现缺氧、缺血损伤可选择性导致永久性学习及记忆功能受损。本研究采用水迷宫逃逸潜伏期实验观察各组大鼠行为学改变,发现 EGFP/BMSCs 组和 EPhrinB2/BMSCs 组逃逸潜伏期均显著短于 PBS 组,并且 EPhrinB2/BMSCs 组逃逸潜伏期亦较 EGFP/BMSCs 组显著缩短,进一步证实 BMSCs 移植治疗可改善缺氧缺血对新生大鼠远期行为功能的影响,并且以移植经 EPhrinB2 修饰的 BMSCs 对大鼠远期异常行为的改善作用更显著。

综上所述,本研究结果表明,移植经 EPhrinB2 修饰后的 BMSCs 有助于大鼠受损脑组织神经功能恢复,其作用机制可能包括 BMSCs 能较好存活于大鼠受损脑内,并能抑制受损脑组织神经元凋亡,促进神经干细胞增殖及新生血管生成,从而加速受损神经功能恢复,其确切作用机制还有待后续研究进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Chan G, Miller F. Assessment and treatment of children with cerebral

- palsy[J]. Orthop Clin North Am, 2014, 45(3): 313-325. DOI: 10.1016/j.ocl.2014.03.003.
- [2] Kiasatdolatabadi A, Lotfibakhshaiesh N, Yazdankhah M, et al. The role of stem cells in the treatment of cerebral palsy: a review[J]. Mol Neurobiol, 2017, 54(7): 4963-4972. DOI: 10.1007/s12035-016-0030-0.
- [3] 朱敏, 徐运, 张跃, 等. 慢病毒介导的 EphrinB2 基因转染大鼠骨髓间充质干细胞表达的实验研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2017, 34(6): 508-511.
- [4] Zhang Q, Chen ZW, Zhao YH, et al. Bone marrow stromal cells combined with sodium ferulate and n-butylidenephthalide promote the effect of therapeutic angiogenesis via advancing astrocyte-derived trophic factors after ischemic stroke[J]. Cell Transplant, 2017, 26(2): 229-242. DOI: 10.3727/096368916X693536.
- [5] Zong X, Wu S, Li F, et al. Transplantation of VEGF-mediated bone marrow mesenchymal stem cells promotes functional improvement in a rat acute cerebral infarction model[J]. Brain Res, 2017, 1676: 9-18. DOI: 10.1016/j.brainres.2017.08.006.
- [6] Chang F, Xiong W, Wang D, et al. Facilitation of ultrasonic microvesicles on homing and molecular mechanism of bone marrow mesenchymal stem cells in cerebral infarction patients[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(17): 3916-3923.
- [7] Yang JS, Wei HX, Chen PP. Roles of Eph/ephrin bidirectional signaling in central nervous system injury and recovery[J]. Exp Ther Med, 2018, 15(3): 2219-2227. DOI: 10.3892/etm.2018.5702.
- [8] Klein R. Bidirectional modulation of synaptic functions by Eph/Ephrin signaling[J]. Nat Neurosci, 2009, 12(1): 15-20. DOI: 10.1038/nn.2231.
- [9] Ghorri A, Freimann FB, Nieminen-Kelhä M, et al. EphrinB2 activation enhances vascular repair mechanisms and reduces brain swelling after mild cerebral ischemia[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017, 37(5): 867-878. DOI: 10.1161/ATVBAHA.116.308620.
- [10] Sentürk A, Pfennig S, Weiss A, et al. Ephrin Bs are essential components of the Reelin pathway to regulate neuronal migration[J]. Nature, 2011, 472(7343): 356-360. DOI: 10.1038/nature09874.
- [11] Derrick M, Drobyshevsky A, Ji X, et al. A model of cerebral palsy from fetal hypoxia-ischemia[J]. Stroke, 2007, 38(S2): 731-735.
- [12] Wilson MD. Animal models of cerebral palsy: hypoxic brain injury in the newborn[J]. Iran J Child Neurol, 2015, 9(2): 9-16.
- [13] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [14] Castillo-Melendez M, Yawno T, Jenkin G, et al. Stem cell therapy to protect and repair the developing brain: a review of mechanisms of action of cord blood and amnion epithelial derived cells[J]. Front Neurosci, 2013, 7: 194. DOI: 10.3389/fnins.2013.00194.
- [15] Zhu L, Qian L, Wang S, et al. Expression of EphrinB2 and EphB4 in a neonatal rat model of periventricular white matter damage[J]. J Perinat Med, 2015, 3(3): 367-371. DOI: 10.1515/jpm-2014-0096.
- [16] Ghorri A, Freimann FB, Nieminen-Kelhä M, et al. EphrinB2 activation enhances vascular repair mechanisms and reduces brain swelling after mild cerebral ischemia[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017, 37(5): 867-878. DOI: 10.1161/ATVBAHA.116.308620.
- [17] 朱敏, 张跃, 汤健, 等. 高压氧处理时间窗对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2012, 34(7): 493-497. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2012.07.004.
- [18] Conover JC, Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, et al. Disruption of Eph/Ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone[J]. Nat Neurosci, 2000, 3(11): 1091-1097.
- [19] Ikeda T, Mishima K, Yoshikawa T, et al. Selective and long-term learning impairment following neonatal hypoxic-ischemic brain insult in rats[J]. Behav Brain Res, 2001, 118(1): 17-25.

(修回日期: 2018-09-20)

(本文编辑: 易 浩)

· 外刊撷英 ·

Risk factors for hamstring injury in professional soccer

BACKGROUND AND OBJECTIVE In elite soccer play, hamstring injuries are the most common noncontact injury. As the evidence supporting the use of stretching exercises for the prevention of these injuries is limited, this study examined the relationship between hamstring injuries and the flexibility of the hamstring and ankle.

METHODS Over two consecutive soccer seasons, players in all 18 teams in the Qatar Stars league were assessed for injuries. Data collected also included age, playing season, team, leg dominance, playing position, ethnicity, body mass index, as well as ankle and knee range of motion. Hamstring injury was defined as acute pain in the posterior thigh, occurring during training or match play, and resulting in an immediate cessation of participation.

RESULTS Of the 438 players completing the study, 78 sustained an index hamstring injury. Goalkeepers were significantly less likely to sustain a hamstring injury than were other players. In addition, injured players were, on average, 18 months older than the uninjured. A multivariate regression analysis revealed that age ($P=0.002$), player position ($P=0.02$), passive knee extension test results ($P=0.008$) and dorsiflexion lunge test results ($P=0.02$) were significantly related to hamstring injury.

CONCLUSION This prospective study of professional soccer players found that modifiable factors related to an increased risk of hamstring injury are decreased knee extension and ankle dorsiflexion passive range of motion.

【摘自: van Dyk N, Farooq A, Bahr R, et al. Hamstring and ankle flexibility deficits are weak risk factors for hamstring injury in professional soccer players: a prospective, cohort study of 438 players, including 78 injuries. Am J Sport Med, 2018, 46(9): 2203-2210.】