

超声靶向微泡破坏技术调控星形胶质细胞联合神经干细胞移植对创伤性脑损伤小鼠神经功能修复的实验研究

黎清龙^{1,2}, 段茂¹, 巩寰¹, 李苇¹, 朱琼^{1,3}, 李海艳¹, 唐君辉⁴, 徐亚丽¹

摘要 目的 探讨超声靶向微泡破坏技术(UTMD)调控星形胶质细胞(AS)联合神经干细胞(NSCs)移植在创伤性脑损伤(TBI)小鼠神经功能修复中的应用价值及其作用机制。方法 将 50 只小鼠随机分为对照组、TBI 组、UTMD 组、UTMD+NSCs 组及 UTMD+NSCs+AS 组, 每组各 10 只, 其中对照组为正常小鼠且未进行任何处理; 其余各组小鼠使用改良 Feeney 法建立 TBI 模型, 建模 1 d 后进行分组治疗, 每 3 天治疗 1 次, 共治疗 3 次, 具体方法: TBI 组仅建模, UTMD 组接受 UTMD 开放血脑屏障, UTMD+NSCs 组接受 UTMD 开放血脑屏障联合 NSCs 移植, UTMD+NSCs+AS 组接受 UTMD 开放血脑屏障联合 NSCs 和 AS 移植。于治疗第 1、4、8、12 天采用改良神经功能损伤程度评分(mNSS)评估神经功能损伤程度; 于治疗第 12 天应用 MRI 检查各组小鼠脑组织水肿体积; 同时采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)、逆转录聚合酶链式反应法(RT-PCR)检测各组小鼠脑组织中神经保护因子[脑源性神经营养因子(BDNF)、胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)、神经生长因子(NGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)]和神经损伤因子[中枢神经系统特异性蛋白(S100B)、热休克蛋白 70(HSP70)、半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)]表达水平, 比较各组上述检查结果的差异。结果 治疗第 1、4、8、12 天, UTMD+NSCs+AS 组、UTMD+NSCs 组、UTMD 组、TBI 组 mNSS 评分均高于对照组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。治疗第 1、4 天, UTMD+NSCs+AS 组、UTMD+NSCs 组、UTMD 组、TBI 组 mNSS 评分两两比较差异均无统计学意义。治疗第 8 天, UTMD+NSCs+AS 组 mNSS 评分低于 UTMD 组、TBI 组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 其余组间两两比较差异均无统计学意义。治疗第 12 天, UTMD+NSCs+AS 组 mNSS 评分低于 UTMD+NSCs 组、UTMD 组、TBI 组, UTMD+NSCs 组 mNSS 评分低于 UTMD 组、TBI 组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); UTMD 组与 TBI 组比较差异无统计学意义。治疗第 12 天, TBI 组、UTMD 组、UTMD+NSCs 组、UTMD+NSCs+AS 组小鼠脑组织水肿体积分别为 $(8.38 \pm 0.50) \text{ mm}^3$ 、 $(7.47 \pm 0.28) \text{ mm}^3$ 、 $(5.56 \pm 1.45) \text{ mm}^3$ 、 $(1.68 \pm 0.14) \text{ mm}^3$, 呈逐渐降低趋势, 但各组比较差异无统计学意义。ELISA 检测结果显示, UTMD+NSCs+AS 组 BDNF、GDNF、NGF、bFGF 表达水平平均高于 UTMD+NSCs 组、UTMD 组、TBI 组, S100B、HSP70、Caspase-3 表达水平平均低于 UTMD+NSCs 组、UTMD 组、TBI 组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); RT-PCR 检测结果显示, UTMD+NSCs+AS 组 GDNF、NGF、bFGF 表达水平平均高于 UTMD+NSCs 组、UTMD 组、TBI 组, BDNF 表达水平高于 UTMD 组、TBI 组、对照组, S100B、HSP70 表达水平平均低于 UTMD+NSCs 组、UTMD 组、TBI 组, Caspase-3 表达水平低于 UTMD 组、TBI 组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结论 UTMD 调控 AS 联合 NSCs 移植能够显著改善 TBI 小鼠生化微环境, 通过上调神经保护因子表达并下调神经损伤因子表达, 可促进 TBI 小鼠神经功能修复。

关键词 超声靶向微泡破坏技术; 星形胶质细胞; 神经干细胞; 神经功能修复; 创伤性脑损伤, 小鼠

[中图分类号] R445.1

[文献标识码] A

Ultrasound-targeted microbubbles destruction technology-mediated astrocytes combined with neural stem cells transplantation for neurological function recovery in traumatic brain injury mice: an experimental study

LI Qinglong^{1,2}, DUAN Mao¹, GONG Huan¹, LI Wei¹, ZHU Qiong^{1,3}, LI Haiyan¹, TANG Junhui⁴, XU Yali¹

1. Department of Ultrasound, the Second Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400037, China. 2. Health

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81971774); 重庆市科技局自然科学基金项目(CSTB2022NSCQ-MSX0921)

作者单位: 1. 陆军军医大学第二附属医院超声科, 重庆 400037; 2. 武警河北省总队石家庄市支队卫生队, 河北 石家庄 050000; 3. 中国人民解放军

陆军第九五三医院超声科, 西藏自治区 日喀则 857000; 4. 中国人民解放军西藏军区总医院超声科, 西藏自治区 拉萨 850000

通讯作者: 徐亚丽, Email: xuyali1976@tmmu.edu.cn

Team of Shijiazhuang Branch of Hebei Provincial Armed Police Force, Shijiazhuang 050000, China.3.Department of Ultrasound, the Army 953 Hospital of PLA, Shigatse 857000, China.4.Department of Ultrasound, Tibet Military Command General Hospital of PLA, Lhasa 850000, China

ABSTRACT Objective To explore the application value and mechanism of action of ultrasound-targeted microbubbles destruction technology(UTMD)-mediated astrocytes(AS) combined with neural stem cells(NSCs) transplantation on neurological function recovery in traumatic brain injury (TBI) mice.**Methods** A total of 50 mice were randomly divided into 5 groups: control group, TBI group, UTMD group, UTMD+NSCs group and UTMD+NSCs+AS group, with 10 mice in each group. The control group consisted of normal mice that didn't receive any treatment, while the remaining groups were subjected to TBI model using the modified Feeney method. 1 d after modeling, the mice were treated according to their respective groups, with treatments administered every 3 d for a total of 3 times. The TBI group only underwent modeling, the UTMD group underwent UTMD blood-brain barrier opening treatment, the UTMD+NSCs group underwent UTMD blood-brain barrier opening treatment combined with NSCs transplantation, and the UTMD+NSCs+AS group underwent UTMD blood-brain barrier opening treatment combined with NSCs and AS transplantation. Neurological dysfunction degree were assessed by the modified neurological severity score (mNSS) on the 1st, 4th, 8th and 12th after treatment. On the 12th day, MRI was used to measure brain edema volume of brain tissue in each group, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to measure neuroprotective factors, including brain-derived neurotrophic factor (BDNF), glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF), nerve growth factor (NGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF), and neurotoxic factors, including central nervous system-specific protein (S100B), heat shock protein 70 (HSP70) and cysteine protease-3 (caspase-3) expression levels in brain tissue in all groups. The differences in the above examination results among each group were compared. **Results** The mNSS scores of the UTMD+NSCs+AS group, UTMD+NSCs group, UTMD group and TBI group were higher than those of the control group on the 1st, 4th, 8th and 12th after treatment (all $P < 0.05$). There were no significant differences in mNSS scores among the UTMD+NSCs+AS group, UTMD+NSCs group, UTMD group and TBI group on the 1st and 4th day. On the 8th day, the mNSS score of the UTMD+NSCs+AS group was lower than that of the UTMD group and TBI group (both $P < 0.05$), there were no significant differences between the other groups. On the 12th day, the mNSS score of the UTMD+NSCs+AS group was lower than that of the UTMD+NSCs group, UTMD group and TBI group, and the mNSS score of the UTMD+NSCs group was lower than that of the UTMD group and TBI group (all $P < 0.05$), there was no significant difference between the UTMD group and TBI group. The brain edema volumes of mice in the TBI group, UTMD group, UTMD+NSCs group and UTMD+NSCs+AS group were $(8.38 \pm 0.50) \text{ mm}^3$, $(7.47 \pm 0.28) \text{ mm}^3$, $(5.56 \pm 1.45) \text{ mm}^3$ and $(1.68 \pm 0.14) \text{ mm}^3$, respectively on the 12th day, and there was no significant difference among the groups. ELISA results showed that BDNF, GDNF, NGF and bFGF expression levels of the UTMD+NSCs+AS group were higher than those of the UTMD+NSCs group, UTMD group and TBI group, and S100B, HSP70 and caspase-3 expression levels were lower than those of the UTMD+NSCs group, UTMD group and TBI group, and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). RT-PCR results showed that the GDNF, NGF and bFGF expression levels of the UTMD+NSCs+AS group were higher than those of the UTMD+NSCs group, UTMD group and TBI group, and BDNF expression level of the UTMD+NSCs+AS group were higher than that of the UTMD group, TBI group and control group, S100B and HSP70 expression levels of the UTMD+NSCs+AS group were lower than those of the UTMD+NSCs group, UTMD group and TBI group, and Caspase-3 expression level of the UTMD+NSCs+AS group were lower than that of the UTMD group and TBI group, and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). **Conclusion** UTMD-mediated AS combined with NSCs transplantation can significantly ameliorate the biochemical microenvironment in TBI mice, upregulates the expression of neuroprotective factors, downregulates the expression of neurotoxic factors, and can promote the neurological recovery function.

KEY WORDS Ultrasound-targeted microbubbles destruction technology; Astrocytes; Neural stem cells; Neurological function recovery; Traumatic brain injury, mice

创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 是全球医学界面临的重大挑战之一, TBI 后发生的继发性神经元坏死通过诱导神经炎症和氧化应激等病理级联反应, 可引发患者持续性神经功能损伤及认知功能障

碍^[1]。星形胶质细胞 (astrocytes, AS) 在 TBI 的病理生理过程中发挥双向调控作用, 其不仅在神经支持、血脑屏障维护和神经信号调节中发挥关键作用^[2], 还能够响应损伤信号, 分泌神经营养因子和细胞因子参与

炎症反应,促进生化微环境改善,为神经干细胞(neural stem cells, NSCs)提供有利的生存和分化条件^[3]。在TBI早期,虽然大脑皮质的AS会被激活,对损伤具有一定的修复作用,但随着激活的AS大量增生会形成胶质瘢痕,从而加重继发性脑损伤^[4]。TBI后自发性的神经功能修复有限,主要是由于炎症反应导致的细胞凋亡和进行性组织受损所致^[5-6]。因此,寻找替代神经元的再生疗法对于重建神经网络、促进神经功能修复具有重要意义。NSCs具有自我更新和多向分化的能力,已成为替代受损细胞、改善神经功能的有效方法^[7]。既往实验^[8]表明,AS与NSCs联合移植能够提高移植NSCs的存活率和增殖率。但仍需新的策略以增强AS与NSCs联合移植的有效性,以促进移植NSCs的存活和TBI小鼠神经功能修复。而低强度脉冲超声可以有效促进AS分泌神经营养因子,降低炎症水平,改善生化微环境^[9]。本课题组前期研究发现,以超声空化效应为主的生物学效应能有效调控体外AS,促进保护性神经营养因子表达,改善生化微环境。超声靶向微泡破坏技术(ultrasound-targeted microbubbles destruction technology, UTMD)作为一种新兴的生物物理刺激手段,能瞬时开放血脑屏障、增强神经营养因子和NSCs在创伤区域的富集,直接作用于创伤微环境,发挥神经保护及再生作用^[10]。基于此,本实验旨在探讨UTMD调控AS联合NSCs移植在TBI小鼠神经功能修复中的应用价值及其作用机制,为TBI治疗提供新的策略。

材料与方 法

一、实验动物、主要试剂及仪器

1. 实验动物: C57BL/6J 雄性小鼠 56 只[北京华卓康生物科技股份有限公司, 许可证号: SCXK(京)2019-0008], 周龄 6~8 周, 平均(7.00±0.58)周, 体质量 20~25 g, 平均(23.00±1.55)g; C57BL/6J 孕鼠 2 只(北京华卓康生物科技股份有限公司, 许可证号: SCXK(京)2019-0008), 周龄分别为 6⁺⁴、7⁺¹周, 孕 14 d, 体质量分别为 27 g、28 g。动物实验经陆军军医大学动物实验伦理委员会批准(批准号: AMUWEC20234973)。

2. 主要试剂及仪器: AS(C8-D1A, 武汉普诺赛生命科技有限公司); DMEM 高糖培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司); 小鼠 NSCs 培养基(NeuroCult™ Proliferation Kit, 加拿大 Stem Cell 公司); 1.25% 三溴乙醇(北京莱艾特科技发展有限公司); ELISA 试剂盒(江苏酶免实业有限公司); Trizol 试剂盒(美国 Invitrogen Corporation 公司); 数显脑立体定位仪(68025, 深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司); 超声空化仪(DCT-700,

深圳市威尔德医疗电子有限公司), KHT-0101 探头, 频率 1.2 MHz, 其余参数设置: 声压 1.0 kPa, 占空比 0.6%, 治疗时间 1 min; 一体化彩色多普勒超声诊疗仪(VINNO Ultimius 9E, 飞依诺科技股份有限公司), X4-12L 探头, 频率 3 MHz, 脉冲重复频率 100 Hz, 其余参数设置: 脉冲长度 26.0 cycle, 脉冲时间 0.6 s, 间隔时间 2 s, 持续时间 300 s, 深度 2 cm, 机械指数 0.8, 声功率 85%; 注射用全氟丁烷微球(Sonozoid®, 美国 GE Healthcare 公司); 小动物 MRI 仪(Biospec 70/20 USR, 美国 Bruker Corporation 公司), 参数设置: 重复时间 4000 ms, 回波时间 45 ms, 视野 25 mm×25 mm, 层厚 0.6 mm。

二、实验方法

1. NSCs 培养及悬液制备: 在超净工作台内, 从 2 只 C57BL/6J 孕鼠中分别取出胎鼠脑组织, 参考文献[11]中的方法分离 NSCs 并于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养, 每 7~10 天传代 1 次, 至第 3 代。选取生长良好的细胞, 体内治疗时经消化、离心和重悬, 制备成细胞悬液, 调整细胞浓度为 1×10⁶/ml 备用。

2. AS 培养及悬液制备: 于 37℃、含有 5%CO₂ 培养箱中培养 AS, 每 4~5 天传代 1 次, 至第 3 代。调整细胞浓度至 1×10⁶/ml, 每孔 200 μl 的细胞悬液接种于 6 孔板中继续培养。于体内治疗前 12 h 使用超声空化仪进行 UTMD 处理, 同时每孔加入 200 μl 浓度为 1×10⁶/ml 的 Sonozoid® 混悬液。体内治疗时经消化、离心和重悬, 制备成细胞悬液, 调整细胞浓度为 1×10⁶/ml 备用。

3. TBI 模型的建立及 UTMD 开放血脑屏障效果评估

(1) 使用改良 Feeney 法^[12]建立 TBI 模型, 具体方法为: 将 C57BL/6J 小鼠经腹腔注射 1.25% 三溴乙醇 0.1 ml/5 g 全身麻醉后固定于数显脑立体定位仪, 沿中线剪开头皮及皮下组织以显露颅骨, 于矢状缝与冠状缝交界处外各 2 mm 的位置使用颅骨钻制备一大小 3 mm×3 mm 骨窗, 将 20 g 砝码从 20 cm 垂直高度释放撞击骨窗造成局部脑组织损伤。随机选取 3 只小鼠通过上述方法建立 TBI 模型, 采用改良神经功能损伤程度评分(modified neurological severity score, mNSS)评估神经功能损伤程度, 应用 MRI 扫描脑组织观察其损伤情况, 并采集脑组织标本进行苏木精-伊红(HE)染色观察病理变化, 评估建模是否成功。mNSS 评分^[13]包括运动、感觉、反射和平衡 4 个方面, 总分 18 分, 其中 13~18 分为重度颅脑损伤, 7~12 分为中度颅脑损伤, 1~6 分为轻度颅脑损伤。

(2) 随机选取 3 只 C57BL/6J 小鼠通过上述方法建立 TBI 模型, 应用 UTMD 开放血脑屏障, 经尾静脉注入灭菌的 2% 伊文思蓝(0.1 ml/10 g), 观察其是否渗透脑

组织,评估 UTMD 开放血脑屏障效果。

4. 实验分组:将剩余的 50 只 C57BL/6J 小鼠随机分为 5 组:对照组、TBI 组、UTMD 组、UTMD+NSCs 组及 UTMD+NSCs+AS 组,每组各 10 只,其中对照组为正常小鼠且未进行任何处理,其余各组小鼠使用上述改良 Feeney 法建立 TBI 模型。UTMD 组、UTMD+NSCs 组及 UTMD+NSCs+AS 组建模后 1 d,建立尾静脉通道,使用一体化彩色多普勒超声诊疗仪,以小鼠眼耳连线中点作为声窗,同时将 200 μ l 浓度为 1×10^9 /ml 的 Sonozoid[®] 混悬液分 5 次经尾静脉注入小鼠体内开放血脑屏障^[14]。其中 UTMD 组仅接受 UTMD 开放血脑屏障;UTMD+NSCs 组在接受 UTMD 开放血脑屏障后经尾静脉注射 200 μ l 浓度为 1×10^6 /ml 的 NSCs 悬液;UTMD+NSCs+AS 组在接受 UTMD 开放血脑屏障后经尾静脉注射 200 μ l 浓度为 1×10^6 /ml 的 NSCs 悬液及 200 μ l 浓度为 1×10^6 /ml 经体外 UTMD 处理的 AS 悬液;每 3 天治疗 1 次,共治疗 3 次。TBI 组未进行任何处理。

5. 神经功能损伤程度评估:建模前,各组小鼠接受 3 d 的运动、协调和平衡训练。于治疗第 1、4、8、12 天分别从各组取 5 只小鼠,采用 mNSS 评估神经功能损伤程度,比较各组治疗第 1、4、8、12 天 mNSS 评分。

6. 脑组织水肿程度评估:于治疗第 12 天分别从各组取 2 只小鼠,应用 MRI 扫描脑部,观察小鼠脑组织水肿程度;扫描序列包括轴位 T2W1 和轴位 T2W1 反转恢复序列,获取小鼠脑组织水肿层数和最大面积,使用 ITK-SNAP 软件对图像进行半自动分割、勾画,获得脑组织水肿立体三维图像并计算水肿体积,比较各组小鼠脑组织水肿体积的差异。

7. 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测小鼠脑组织神经相关因子表达水平:于治疗第 12 天分别从各组取 5 只小鼠,全身麻醉(方法同前)后取出脑组织,按照一定比例(脑组织重量:PBS 体积=1:9)加入预冷的 PBS 进行组织匀浆,离心取上清液,使用 ELISA 试剂盒和酶标仪严格按照说明书操作,检测脑源性神经营养因子(BDNF)、胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)、神经生长因子(NGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF),以及中枢神经系统特异性蛋白(S100B)、热休克蛋白 70(HSP70)、半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)表达水平,比较各组小鼠脑组织中上述神经相关因子表达水平的差异。

8. 逆转录聚合酶链式反应法(RT-PCR)检测小鼠脑组织神经相关因子表达水平:于治疗第 12 天将各组剩余的 5 只小鼠全身麻醉(方法同前)后取出脑组织,严格按照 Trizol 试剂使用说明从组织中分离出总

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,在 20 μ l 的聚合酶链式反应(PCR)体系中,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参基因进行扩增。PCR 产物在含有 10 ng/ml 溴化乙啶的 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 BDNF、GDNF、NGF、bFGF、S100B、HSP70、Caspase-3 mRNA 相对表达水平,比较各组小鼠脑组织中上述神经相关因子表达水平。引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列表

引物名称	序列
GDNF-F	TATGGGATGTCGTGGCTGTC
GDNF-R	GCCGCTTGTATTATCTGCTGA
NGF-F	GGCAGCATGGTGGAGTTT
NGF-R	GTGGGCTTCAGGGACAGA
bFGF-F	CTTCCCACCGCCACTT
bFGF-R	GCCGTCCATCTTCCTTCATA
HSP70-F	CAGCACAATCATCGGCACA
HSP70-R	CCC GCATCAGCACTGAGAAT
S100B-F	GCCCTCATTGATGCTCTCC
S100B-R	TCTTCGTCCAGCGTCTCC
Caspase-3-F	TCTGACTGGAAAGCCGAAAC
Caspase-3-R	CTGGATGAACCACGACCC
BDNF-F	TTATTTTCATACTTCGGTTGCA
BDNF-R	GTCTCAGCCACTGATCTCG
GAPDH-F	CCTTCCGTGTTCTCTAC
GAPDH-R	GACAACCTGGTCTCTCA

三、统计学处理

应用 SPSS 26.0 统计软件,采用 Kolmogorov-Smirnov 检验进行正态性检验,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组比较采用单因素方差分析,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非参数秩和检验。不符合正态分布的计量资料以 $M(Q_1, Q_3)$ 表示,采用非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、TBI 建模方法评估

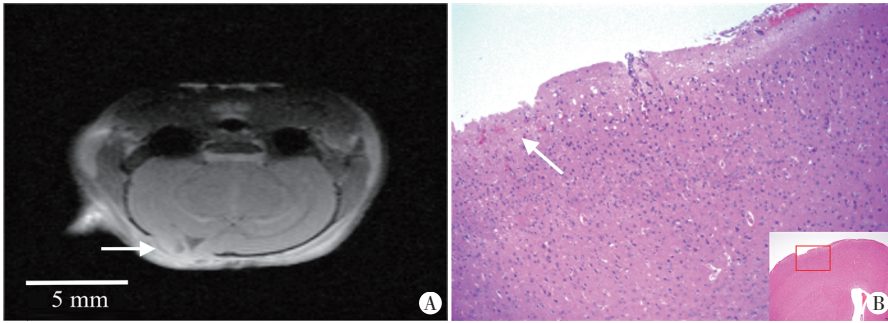
3 只 TBI 小鼠 mNSS 评分分别为 10、11、12 分,达到中度颅脑损伤程度;MRI 和 HE 染色检查结果显示小鼠创伤区脑组织水肿严重,红细胞渗出明显,表明模型均建立成功,该建模方法可行。见图 1。

二、UTMD 开放血脑屏障效果评估

TBI 小鼠脑组织大体标本显示伊文思蓝成功渗透脑组织,表明 UTMD 成功开放血脑屏障。见图 2。

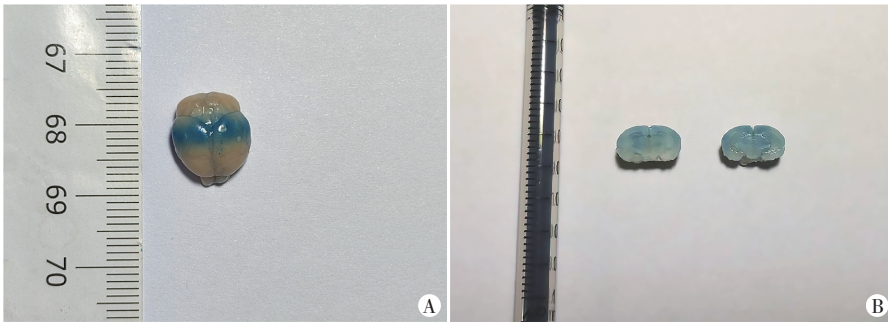
三、各组小鼠 mNSS 评分比较

治疗第 1、4、8、12 天,UTMD+NSCs+AS 组、UTMD+



A: MRI显示右侧颅顶创伤区脑组织明显水肿(箭头示);B:病理图示红细胞渗出,箭头示创伤区脑组织水肿(HE染色,×100)

图1 TBI小鼠脑部MRI图和创伤区脑组织病理图



A、B:小鼠脑组织大体图示伊文思蓝成功渗透脑组织

图2 UTMD开放TBI小鼠血脑屏障效果评估

NSCs组、UTMD组、TBI组 mNSS 评分均高于对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。治疗第 1、4 天,UTMD+NSCs+AS 组、UTMD+NSCs 组、UTMD 组、TBI 组 mNSS 评分两两比较差异均无统计学意义。治疗第 8 天,UTMD+NSCs+AS 组 mNSS 评分低于 UTMD 组、TBI 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);其余各组两两比较差异均无统计学意义。治疗第 12 天,UTMD+NSCs+AS 组 mNSS 评分低于 UTMD+NSCs 组、UTMD 组、TBI 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);UTMD 组与 TBI 组比较差异无统计学意义。见表 2。

四、各组小鼠脑组织水肿体积比较

治疗第 12 天 MRI 检查显示,UTMD+NSCs+AS 组

表 2 各组小鼠 mNSS 评分比较($\bar{x} \pm s$) 分

组别	第1天	第4天	第8天	第12天
对照组	1.40±1.14	1.20±1.30	1.00±1.00	0.80±0.84
TBI组	11.00±1.00*	10.20±0.84*	9.20±0.84*	8.00±1.00*
UTMD组	10.80±0.84*	10.00±0.71*	9.00±0.71*	7.20±1.30*
UTMD+NSCs组	10.60±1.14*	9.20±0.84*	8.20±0.84*	5.80±0.84*¥*
UTMD+NSCs+AS组	10.20±1.48*	9.00±1.00*	7.40±1.14*¥**	4.40±1.14*¥**△
F 值	66.154	78.109	69.095	37.259
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 UTMD 组比较, ** $P < 0.05$;与 UTMD+NSCs 组比较,△ $P < 0.05$

脑组织水肿体积层面(红色区域,3 层)少于 TBI 组(6 层)、UTMD 组(5 层)、UTMD+NSCs 组(4 层),水肿最大层面面积小于其他各组,见图 3。TBI 组、UTMD 组、UTMD+NSCs 组、UTMD+NSCs+AS 组小鼠脑组织水肿体积分别为(8.38±0.50)mm³、(7.47±0.28)mm³、(5.56±1.45)mm³、(1.68±0.14)mm³,呈逐渐降低趋势,但各组比较差异无统计学意义。见图 4。

五、ELISA 检测各组小鼠脑组织神经相关因子表达水平比较

UTMD+NSCs+AS 组、UTMD+NSCs 组、UTMD 组、TBI 组 BDNF、GDNF、NGF、bFGF 表达水平均低于对照组,S100B、HSP70、Caspase-3 表达水平均高于对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);UTMD+NSCs+AS 组 BDNF、GDNF、NGF、bFGF 表达水平均高于 UTMD+NSCs 组、

UTMD 组、TBI 组,S100B、HSP70、Caspase-3 表达水平均低于 TBI 组、UTMD 组、UTMD+NSCs 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);其余各组 BDNF、GDNF、NGF、bFGF、S100B、HSP70、Caspase-3 表达水平两两比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见表 3。

六、RT-PCR 检测各组小鼠脑组织神经相关因子水平比较

UTMD+NSCs+AS 组 GDNF、NGF、bFGF 表达水平均高于 UTMD+NSCs 组、UTMD 组、TBI 组,BDNF 表达水平高于 UTMD 组、TBI 组、对照组,S100B、HSP70 表达水平均低于 UTMD+NSCs 组、UTMD 组、TBI 组,Caspase-3 表达水平低于 UTMD 组、TBI 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。UTMD+NSCs 组 BDNF 表达水平高于 UTMD 组、TBI 组,GDNF、bFGF 表达水平均高于 TBI 组,NGF 表达水平低于对照组,S100B 表达水平低于 UTMD 组,HSP70 表达水平低于 TBI 组,Caspase-3 表达水平高于对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);UTMD 组、TBI 组 GDNF、NGF、bFGF 表达水平均低于对照组,S100B、HSP70、Caspase-3 表达水平均高于对照组,TBI 组 BDNF 表达水平低于对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);其余各组 BDNF、GDNF、NGF、bFGF、S100B、HSP70、Caspase-3 表达水平两两比较差异均无统计学意义。见表 4。

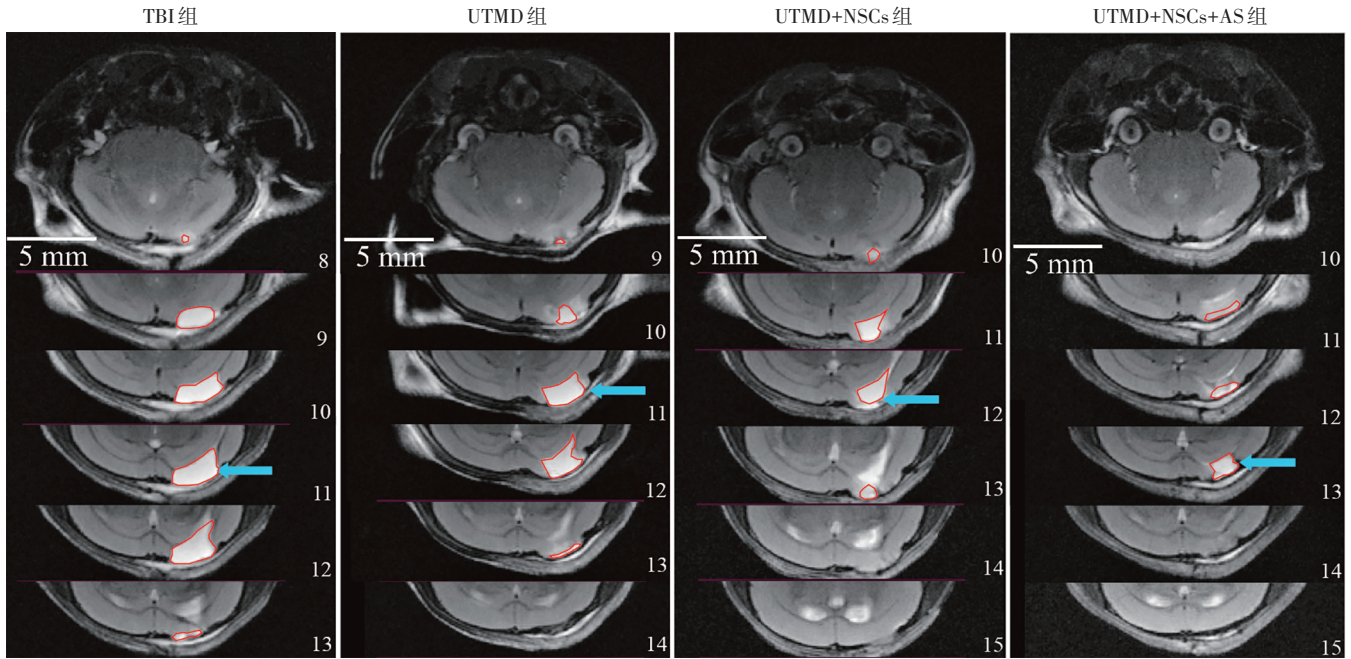


图3 各组治疗第12天小鼠脑组织水肿MRI二维层面图(箭头示水肿最大层面)

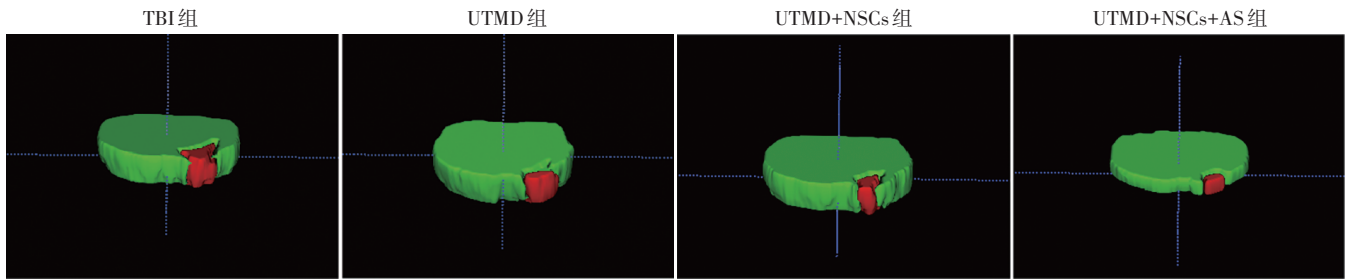


图4 各组治疗第12天小鼠脑组织水肿体积MRI三维重建图

表3 ELISA 检测各组小鼠脑组织神经相关因子表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	BDNF	GDNF	NGF	bFGF	S100B	HSP70	Caspase-3	ng/L
对照组	1108.82±72.08	352.98±14.11	8.18±0.31	58.15±1.92	80.10±10.37	1.16±0.10	12.15±0.88	
TBI组	373.11±47.77*	117.83±4.96*	2.01±0.21*	16.06±1.47*	311.11±6.77*	3.99±0.05*	40.85±0.97*	
UTMD组	547.28±55.01 [¥]	158.66±6.94 [¥]	3.77±0.27 [¥]	26.33±1.23 [¥]	231.95±7.29 [¥]	2.88±0.11 [¥]	28.21±0.91 [¥]	
UTMD+NSCs组	639.45±44.27 ^{¥**}	182.50±8.35 ^{¥**}	4.69±0.19 ^{¥**}	36.13±1.55 ^{¥**}	178.09±3.39 ^{¥**}	1.93±0.07 ^{¥**}	22.63±1.17 ^{¥**}	
UTMD+NSCs+AS组	834.72±58.58 ^{¥**△}	290.73±13.62 ^{¥**△}	6.81±0.21 ^{¥**△}	47.95±2.10 ^{¥**△}	130.70±7.78 ^{¥**△}	1.64±0.10 ^{¥**△}	15.70±0.73 ^{¥**△}	
F值	125.48	454.18	514.71	494.27	720.07	769.13	723.23	
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<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UTMD组比较,^{**} $P<0.05$;与UTMD+NSCs组比较,[△] $P<0.05$ 。BDNF:脑源性神经营养因子;GDNF:胶质细胞源性神经营养因子;NGF:神经生长因子;bFGF:碱性成纤维细胞生长因子;S100B:中枢神经系统特异性蛋白;HSP70:热休克蛋白70;Caspase-3:半胱氨酸蛋白酶-3

表4 RT-PCR 检测各组小鼠脑组织神经相关因子表达水平比较[$M(Q_1, Q_3)$]

组别	BDNF	GDNF	NGF	bFGF	S100B	HSP70	Caspase-3	ng/L
对照组	0.99(0.98, 1.02)	0.92(0.89, 1.22)	1.04(0.93, 1.05)	0.98(0.96, 1.05)	1.00(0.97, 1.02)	1.02(0.92, 1.06)	1.00(0.93, 1.06)	
TBI组	0.58(0.57, 0.64)*	0.15(0.15, 0.29)*	0.51(0.47, 0.52)*	0.34(0.33, 0.64)*	1.74(1.71, 1.78)*	1.84(1.75, 1.93)*	1.66(1.58, 1.71)*	
UTMD组	0.68(0.51, 0.70)	0.21(0.18, 0.33)*	0.45(0.44, 0.47)*	0.47(0.44, 0.87)*	1.77(1.69, 1.86)*	1.66(1.49, 1.73)*	1.73(1.60, 1.86)*	
UTMD+NSCs组	1.26(1.02, 1.31) ^{¥**}	0.84(0.62, 0.87) [¥]	0.53(0.48, 0.56)*	0.87(0.86, 0.89) [¥]	1.37(1.23, 1.47) ^{**}	1.24(1.09, 1.55) [¥]	1.46(1.29, 1.55)*	
UTMD+NSCs+AS组	2.18(2.11, 2.34) ^{¥**}	1.49(1.34, 1.59) ^{¥**△}	1.18(1.10, 1.21) ^{¥**△}	1.46(1.42, 1.75) ^{¥**△}	0.85(0.80, 0.90) ^{¥**△}	0.84(0.77, 0.86) ^{¥**△}	1.21(1.09, 1.25) ^{¥**}	
H值	66.32	68.29	59.23	64.55	63.32	63.37	57.34	
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<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UTMD组比较,^{**} $P<0.05$;与UTMD+NSCs组比较,[△] $P<0.05$ 。BDNF:脑源性神经营养因子;GDNF:胶质细胞源性神经营养因子;NGF:神经生长因子;bFGF:碱性成纤维细胞生长因子;S100B:中枢神经系统特异性蛋白;HSP70:热休克蛋白70;Caspase-3:半胱氨酸蛋白酶-3

讨 论

TBI是指头部受到撞击或外力冲击导致正常脑功能或结构的获得性破坏^[15]。其发生后,局部和全身的炎症反应被迅速激活,导致大量炎症因子和凋亡因子释放,继而在生化微环境中形成了一个有害生态,不仅直接加剧了NSCs损伤,抑制其增殖和分化,还通过激活细胞凋亡途径,降低了移植NSCs的存活率^[16],从而影响TBI小鼠的神经功能修复。本实验将UTMD调控AS联合NSCs移植至TBI小鼠体内,探索其在改善TBI小鼠生化微环境、促进神经功能修复中的作用。本实验采用改良Feeney法建立TBI模型,通过模拟头部受到撞击的物理过程,成功建立了具有典型病理学特征和神经功能损伤的TBI模型^[17],本研究MRI和HE染色检查结果显示小鼠创伤区脑组织水肿严重,红细胞渗出明显,表明该建模方法可行。此外,为了提高细胞和营养因子在损伤区域的富集,本实验采用UTMD开放血脑屏障,经尾静脉注入灭菌的2%伊文思蓝评估血脑屏障开放效果,结果显示UTMD成功开放血脑屏障。本实验通过上述方法不仅成功建立了小鼠TBI模型,还提高了血脑屏障的通透性,以及神经营养因子和NSCs在创伤区域的富集,从而增强治疗效果,为后续的治疗研究提供了可靠的实验基础。

TBI后的炎症反应是一个复杂且持续的动态过程,通常在损伤后的数秒到数分钟内即刻启动,并可能持续数小时、数天、数月甚至数年,进而导致进行性神经变性和延迟性细胞死亡,从而加重原发性损伤,同时TBI后的原发性和继发性损伤会促使损伤区域炎性细胞因子和趋化因子的释放,这些因子能够破坏血脑屏障的完整性,致使蛋白质液体渗透到组织间隙,引发组织缺血缺氧,从而导致毛细血管通透性增加和血管扩张,最终形成血管源性脑水肿^[18-19]。研究^[20]显示,AS可通过分泌可溶性因子GDNF、bFGF表达继而诱导内皮细胞紧密连接蛋白的表达,对血脑屏障的修复和功能稳定起到至关重要的调控作用。同时,TBI后1~7 d AS于病灶周围增殖,且其数量在损伤后3 d达到峰值^[21],而早期炎症反应通常在损伤后3~7 d达到高峰^[22]。此外,移植NSCs在体内能够存活3 d以上^[10],且BDNF、GDNF、NGF、bFGF等因子在神经损伤后的神经元存活、轴突再生、突触形成和功能修复过程中通常展现出协同作用^[23-24]。基于上述研究,本实验选择在TBI后7 d这一时间窗内连续治疗3次并观察效果。结果显示,UTMD+NSCs+AS组mNSS评分低

于UTMD+NSCs组、UTMD组、TBI组,UTMD+NSCs组mNSS评分均低于UTMD组、TBI组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),表明通过UTMD调控AS联合NSCs移植在神经功能损伤评分方面均优于UTMD+NSCs组、UTMD组、TBI组;MRI检查进一步显示,TBI组、UTMD组、UTMD+NSCs组、UTMD+NSCs+AS组小鼠脑组织水肿体积呈逐渐降低趋势,尤以UTMD+NSCs+AS组降低最为显著,表明通过UTMD调控AS联合NSCs可以更显著改善生化微环境,为NSCs提供更长时间的有利条件,从而促进神经功能修复,同时在修复血脑屏障、减轻脑组织水肿方面可能较单独使用NSCs治疗更为有效。但本实验中各组小鼠脑组织水肿体积比较差异无统计学意义,分析原因为样本量较小。

在TBI生化微环境中,S100B、HSP70常被用于评估其严重程度和预后,其水平在损伤早期达到峰值,以响应细胞损伤和应激状态,并随着损伤的修复和细胞应激状态的缓解而逐渐下降;Caspase-3在细胞凋亡中扮演关键角色,在TBI早期被迅速激活,并参与细胞死亡和炎症反应^[25-27]。为了进一步探讨UTMD调控AS联合NSCs移植对TBI生化微环境中神经保护因子和神经损伤因子表达水平的影响,本实验采用ELISA和RT-PCR两种方法检测神经相关因子表达水平,ELISA因其高灵敏度和特异度,适用于检测特定的蛋白质标志物,提供了蛋白质层面的直接证据,而RT-PCR则能够精确测量mRNA水平的变化信息,揭示基因表达的调控变化,从分子层面补充了蛋白质水平数据,两种方法同时检测,相互验证,确保了实验结果的准确性。本实验结果显示,UTMD+NSCs+AS组BDNF、GDNF、NGF、bFGF表达水平均高于UTMD+NSCs组、UTMD组、TBI组,S100B、HSP70、Caspase-3表达水平均低于UTMD+NSCs组、UTMD组、TBI组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),表明通过UTMD调控AS联合NSCs移植可以使TBI应激状态和损伤程度得到有效缓解,明显改善生化微环境。同时,ELISA结果显示TBI组、UTMD组、UTMD+NSCs组BDNF、GDNF、NGF、bFGF、S100B、HSP70、Caspase-3表达水平两两比较差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),表明单独UTMD或UTMD联合NSCs移植也能够一定程度上改善TBI应激状态和创伤微环境,尤以UTMD调控AS联合NSCs移植效果最为显著,提示通过UTMD调控AS联合NSCs移植可显著改善TBI生化微环境中神经相关因子表达,减轻细胞损伤和凋亡,促进NSCs的存活、再生和功能修复。

本实验的局限性:①由于小动物 MRI 需要预约, 每组仅有部分样本进行 MRI 检查, 虽然在影像学检测大体观上 UTMD+NSCs+AS 组小鼠脑组织水肿体积相较于其他组明显降低, 但各组比较差异无统计学意义, 限制了对实验结果更深度和广度的评估; ②ELISA 检测的是上清液中蛋白质含量, RT-PCR 检测的是 RNA 水平的特定序列, 两种方法在检测原理、灵敏度、特异性、操作复杂度、检测内容、样本处理及可能的误差方面存在差异, 导致二者所测 BDNF、Caspase-3 表达水平比较结果不一致, 限制了结果解读的一致性。

综上所述, UTMD 调控 AS 联合 NSCs 移植能够显著改善 TBI 小鼠生化微环境, 通过上调神经保护因子表达并下调神经损伤因子表达, 可促进 TBI 小鼠神经功能修复。

参考文献

- [1] Bailes JE, Borlongan CV. Traumatic brain injury [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2020, 26(6): 593-594.
- [2] Yuan M, Wu H. Astrocytes in the traumatic brain injury: the good and the bad [J]. *Exp Neurol*, 2022, 348: 113943.
- [3] Michinaga S, Koyama Y. Pathophysiological responses and roles of astrocytes in traumatic brain injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(12): 6418.
- [4] Cieri MB, Ramos AJ. Astrocytes, reactive astrogliosis, and glial scar formation in traumatic brain injury [J]. *Neural Regen Res*, 2025, 20(4): 973-989.
- [5] Takada S, Sakakima H, Matsuyama T, et al. Disruption of midkine gene reduces traumatic brain injury through the modulation of neuroinflammation [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 40.
- [6] Kalra S, Malik R, Singh G, et al. Pathogenesis and management of traumatic brain injury (TBI): role of neuroinflammation and anti-inflammatory drugs [J]. *Inflammopharmacology*, 2022, 30(4): 1153-1166.
- [7] Zhao L, Liu JW, Shi HY, et al. Neural stem cell therapy for brain disease [J]. *World J Stem Cells*, 2021, 13(9): 1278-1292.
- [8] Luo L, Guo K, Fan W, et al. Niche astrocytes promote the survival, proliferation and neuronal differentiation of co-transplanted neural stem cells following ischemic stroke in rats [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(2): 645-650.
- [9] Yang FY, Lu WW, Lin WT, 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): 465-473.
- [10] Zhu Q, Xu X, Chen B, et al. Ultrasound-targeted microbubbles destruction assists dual delivery of beta-amyloid antibody and neural stem cells to restore neural function in transgenic mice of Alzheimer's disease [J]. *Med Phys*, 2022, 49(3): 1357-1367.
- [11] 朱琼, 皋月娟, 高顺记, 等. 神经干细胞的培养鉴定及分化 [J]. *中国组织工程研究*, 2017, 21(17): 2708-2713.
- [12] 高思淼, 吴晓光, 韩雪, 等. 改良 Feeney 自由落体法建立大鼠创伤性脑损伤模型 [J]. *中国组织工程研究*, 2024, 28(26): 4164-4169.
- [13] Zhai QY, Ren YQ, Ni QS, et al. Transplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells-derived neural stem cells pretreated with neuregulin1 β ameliorate cerebral ischemic reperfusion injury in rats [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(3): 428.
- [14] Xu Y, Cui H, Zhu Q, et al. Unilateral opening of rat blood-brain barrier assisted by diagnostic ultrasound targeted microbubbles destruction [J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 4759750.
- [15] Lipsky RH, Witkin JM, Shafique H, et al. Traumatic brain injury: molecular biomarkers, genetics, secondary consequences, and medical management [J]. *Front Neurosci*, 2024, 18: 1446076.
- [16] Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Current understanding of neuroinflammation after traumatic brain injury and cell-based therapeutic opportunities [J]. *Chin J Traumatol*, 2018, 21(3): 137-151.
- [17] 宋宇, 宋明明, 魏志玄, 等. 灯盏花乙素调节 cGAS/STING 信号通路对创伤性脑损伤大鼠神经炎症的影响 [J]. *中国药房*, 2023, 34(17): 2107-2112.
- [18] 王焕茹, 马四清. 颅脑损伤的炎症反应 [J]. *临床医学进展*, 2022, 12(4): 3500-3505.
- [19] 朱雨峰, 林圣武, 韩培, 等. 创伤性脑水肿的形成机制和治疗 [J]. *临床医学进展*, 2022, 12(2): 1186-1194.
- [20] 杨茗惠, 刘辉, 佟湃舸, 等. 星形胶质细胞在血脑屏障发育与稳态维持中的作用机制 [J]. *生命科学*, 2023, 35(12): 1669-1677.
- [21] Chen X, Zhang L, Hua F, et al. EphA4 obstructs spinal cord neuron regeneration by promoting excessive activation of astrocytes [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2022, 42(5): 1557-1568.
- [22] 白威, 张欣, 苏鑫洪, 等. 创伤性脑损伤激活 miR-124-3p/Notch 通路促进大鼠神经干细胞增殖和分化 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2020, 36(1): 49-55.
- [23] Chen SQ, Cai Q, Shen YY, et al. Combined use of NGF/BDNF/bFGF promotes proliferation and differentiation of neural stem cells in vitro [J]. *Int J Dev Neurosci*, 2014, 38: 74-78.
- [24] Allen SJ, Watson JJ, Shoemark DK, et al. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration [J]. *Pharmacol Ther*, 2013, 138(2): 155-175.
- [25] Abboud T, Rohde V, Mielke D. Mini review: current status and perspective of S100B protein as a biomarker in daily clinical practice for diagnosis and prognosticating of clinical outcome in patients with neurological diseases with focus on acute brain injury [J]. *BMC Neurosci*, 2023, 24(1): 38.
- [26] Negahdary M, Hirata MH, Sakata SK, et al. Sandwich-like electrochemical aptasensing of heat shock protein 70 kDa (HSP70): application in diagnosis/prognosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19) [J]. *Anal Chim Acta*, 2023, 1242: 340716.
- [27] Unnisa A, Greig NH, Kamal MA. Inhibition of Caspase 3 and Caspase 9 mediated apoptosis: a multimodal therapeutic target in traumatic brain injury [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2023, 21(4): 1001-1012.

(收稿日期: 2024-11-29)