

手术和肝脏代偿功能不佳的患者,微波消融治疗虽相对安全,但需考虑患者的基础疾病,对患者进行全面评估。

参考文献

- 1 Jemal A, Bray F, Center MM, *et al.* Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011,61(2):69-90
- 2 Chen JG, Zhang SW. Liver cancer epidemic in china: past, present and future[J]. *Semin Cancer Biol*, 2011,21(1):59-69
- 3 樊嘉,潘奇,史颖弘. 美国、亚太和中国肝癌共识比较[J]. *临床肝胆病杂志*, 2011,27(4):346-347
- 4 Dong BW, Zhang J, Liang P, *et al.* Sequential pathological and immunologic analysis of percutaneous microwave coagulation therapy of hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Hyperthermia*, 2003,19(2):119-133
- 5 Liang P, Wang Y. Treatment of malignant liver tumors with percutaneous microwave ablation; complications among a 1136 patients cohort[J]. *Radiology*, 2009,251(3):933-940
- 6 Liang P, Wang Y. Microwave ablation of hepatocellular carcinoma[J]. *Oncology*, 2007,72(Suppl1):124-131
- 7 Yu J, Liang P, Yu XL, *et al.* A comparison of microwave ablation and bipolar radiofrequency ablation both with an internally cooled probe; results in ex vivo and in vivo porcine livers[J]. *Eur J Radiol*, 2011,9(1):124-130
- 8 Liu FY, Yu XL, Liang P, *et al.* Contrast-enhanced ultrasound-guided microwave ablation for hepatocellular carcinoma inconspicuous on conventional ultrasound[J]. *Int J Hyperthermia*, 2011,27(6):555-562
- 9 Zheng SS, Liang TB, Wu YS. Primary liver cancer in senile people: a clinical analysis[J]. *Chin J Mult Organ Dis Elderly*, 2002,1(1):34-35
- 10 Singal A, Volk ML, Waljee A, *et al.* Meta-analysis: surveillance with ultrasound for early-stage hepatocellular carcinoma in patients with

cirrhosis[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2009,30(1):37-47

- 11 Lu MD, Xu HX, Xie XY, *et al.* Percutaneous microwave and radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: a retrospective comparative study[J]. *J Gastroenterol*, 2005,40(11):1054-1060
- 12 Wang Z, Liang P, Dong B, *et al.* Prognostic factors and recurrence of small hepatocellular carcinoma after hepatic resection or microwave ablation; a retrospective study[J]. *J Gastrointest Surg*, 2008,12(2):327-337
- 13 Liang P, Yu J, Yu XL, *et al.* Percutaneous cooled-tip microwave ablation under ultrasound guidance for primary liver cancer: a multi-centre analysis of 1363 treatment-naïve lesions in 1007 patients in China[J]. *Gut*, 2012,61(7):1100-1101
- 14 Wang XH, Yu J, Liang P, *et al.* Percutaneous cooled-tip microwave ablation under ultrasound guidance for primary liver cancer: analysis of major complications in 693 patients[J]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 2012,34(12):945-949
- 15 Dong WM, Wu BY. Primary liver carcinoma in elderly patients: an analysis of 176 cases[J]. *World Chinese Journal of Digestology*, 2009,17(7):729-732
- 16 Liang P, Dong BW, Yu XL, *et al.* Prognostic factors for survival in patients with hepatocellular carcinoma after percutaneous microwave ablation[J]. *Radiology*, 2005,235(1):299-307
- 17 Li M, Yu XL, Liang P, *et al.* Percutaneous microwave ablation for liver cancer adjacent to the diaphragm[J]. *Int J Hyperthermia*, 2012,28(3):218-226
- 18 Yu J, Liang P, Yu XL, *et al.* Needle track seeding after percutaneous microwave ablation of malignant liver tumors under ultrasound guidance: analysis of 14-year experience with 1462 patients at a single center[J]. *Eur J Radiol*, 2012,81(10):2495-2499

(收稿日期:2013-03-20)

(修回日期:2013-04-10)

转铁蛋白靶向脂质体转导 SDF-1 治疗大鼠缺血性脑卒中

赵 浩 马建华 李运军 李文德 高进保 张鹏飞 于 斌 陈立华 魏 群 徐如祥

摘 要 目的 通过转铁蛋白靶向脂质体将外源性 SDF-1 基因跨血脑屏障转运至脑缺血大鼠脑内,观察 SDF-1 在脑缺血大鼠脑内的表达及对神经功能恢复的作用。**方法** 将脑缺血大鼠分为两组,分别注射 Tf-SDF-1-PLs 和生理盐水,观察 SDF-1 是否可以进入脑内实现高表达,并对新生血管、大鼠神经功能评分和脑血流量进行检测,评估 Tf-SDF-1-PLs 的治疗作用。**结果** 药物注射 24h 后,Tf-SDF-1-PLs 治疗组可见 SDF-1 mRNA 在脑内表达升高,而生理盐水注射组无 SDF-1 mRNA 表达。药物注射 48h 后,检测脑中 SDF-1 蛋白的表达,免疫荧光检测脑中 SDF-1 染色,提示 Tf-SDF-1-PLs 治疗组的

基金项目:国家自然科学基金资助项目(8110917)

作者单位:100700 北京军区总医院附属八一脑科医院

通讯作者:徐如祥,电子邮箱:zjxuruxiang@163.com

SDF-1 蛋白表达均高于生理盐水注射组 ($P < 0.05$)。药物注射 21 天后, Tf-SDF-1-PLs 治疗组的神经功能评分高于生理盐水注射组 ($P < 0.05$), 新生血管数量高于生理盐水注射组 ($P < 0.05$), 恢复的脑血流高于生理盐水注射组 ($P < 0.05$)。激光共聚焦结果提示 SDF-1 主要在胶质细胞中表达, Tf-SDF-1-PLs 治疗组脑缺血大鼠的体重恢复早于生理盐水注射组。**结论** Tf-SDF-1-PLs 可以将 SDF-1 基因转运到脑缺血大鼠脑内, 实现高表达。SDF-1 可以发挥促进血管新生的作用, 进而促进了脑血流量的恢复, 有助于脑缺血大鼠神经功能的改善。

关键词 转铁蛋白 脂质体 基质细胞衍生因子-1 缺血性脑卒中

Stromal Cell Derived Factor-1 Transferred by Transferrin Targeted Liposomes for Treating Ischemic Stroke of Rats. Zhao Hao, Ma Jianhua, Li Yunjun, Li Wende, Gao Jinbao, Zhang Pengfei, Yu Bin, Chen Lihua, Wei Qun, Xu Ruxiang. Bayi Brain Hospital Affiliated to the Military General Hospital of Beijing PLA, Beijing 100700, China

Abstract Objective Exogenous SDF-1 gene was delivered by transferrin targeted liposomes crossing the blood brain barrier into ischemic brain. The expression of SDF-1 in the ischemic brain was detected and the effect of promoting the recovery of neurological function was observed. **Methods** Cerebral ischemic rats were randomly divided into two groups, and were respectively injected Tf-SDF-1-PLs and saline. Whether SDF-1 could be delivered into brain and achieved high expression was observed. The effect of Tf-SDF-1-PLs was evaluated by vasculogenesis, neurological score and cerebral blood flow. **Results** After 24 hours of drug injection, SDF-1 mRNA was increased in Tf-SDF-1-PLs group, but no SDF-1 mRNA expression in saline group. After 48 hours of drug injection, the expression of SDF-1 protein in Tf-SDF-1-PLs group was higher than that in saline group ($P < 0.05$). The quantity of SDF-1 positive cells in Tf-SDF-1-PLs group was higher than that in saline group ($P < 0.05$). After 21 days of drug injection, the neurologic score in Tf-SDF-1-PLs group was much higher than that in saline group ($P < 0.05$), the quantity of neovascularization was more than that in saline group ($P < 0.05$), and the recovery of blood flow in Tf-SDF-1-PLs group was higher than that in saline group ($P < 0.05$). The result of confocal laser scanning demonstrated SDF-1 was mainly expressed in glial cells, and the rat weight in Tf-SDF-1-PLs group restored faster than that in saline group. **Conclusion** Exogenous SDF-1 gene could be delivered into ischemic brain by transferrin targeted liposomes. The high expression of SDF-1 gene in ischemic brain could promote angiogenesis, promote the recovery of cerebral blood flow and improve the neurologic function.

Key words Transferrin; Liposome; Stromal cell derived factor-1; Ischemic stroke

脑缺血是致死、致残的主要原因之一, 而脑缺血的发生多是由于血栓、栓子和系统低灌注而导致的急性病理性损伤。缺血发生时诱导氧自由基和炎症因子的产生, 从而导致炎症反应。在炎症反应过程中, 趋化因子可以趋化炎症细胞迁移到脑缺血部位。SDF-1 是趋化因子家族中的一员, 其可以与 G 蛋白偶联的受体 CXCR4 相结合, 调整细胞的迁移、增殖和分化。脑缺血发生后, 可导致 SDF-1 高表达, 对血管再生、神经功能恢复发挥作用。但是由于血脑屏障的存在, 使基因等小分子物质很难进入血脑屏障, 成为制约基因治疗脑部疾病的瓶颈。运用血脑屏障上的受体介导的转运系统进行低分子物质的转运已有广泛应用。脑缺血发作后, 血脑屏障上的转铁蛋白受体出现高表达, 因此利用血脑屏障上的转铁蛋白受体介导的转运系统, 将外源基因跨血脑屏障转运至脑内成为可能。在本研究中, 笔者利用转铁蛋白靶向脂质体, 通过尾静脉注射的方式, 将 SDF-1 基因转运至脑缺血大鼠脑内, 观察 SDF-1 在大鼠脑内的表达及对脑缺血症状的改善作用。

材料与方法

1. 材料: 主要试剂: pCMV-LacZ 质粒由本实验室保存, GFAP-LacZ 质粒由上海吉凯基因公司合成; 胆固醇氯甲酸酯 (上海晶纯试剂有限公司); N,N-二甲基乙二胺 (日照力德士化工有限公司); 转铁蛋白 (Transferrin, Tf, 美国 Sigma 公司); 2-亚氨基氯化硫醇 Traut's 试剂盒 (Pierce 公司); DSPE-PEG-MAL、POPC、DSPE-PEG2000、DSPE (Creative PEGWorks); PicoGreen 核酸定量试剂盒、NanoOrange 蛋白定量试剂盒 (Invitrogen 公司); 琼脂糖 Sepharose CL-4B、葡聚糖 Sephadex G-25 (北京/东凯生物); 质粒大提试剂盒 Maxiprep (Qiagen, Chatworth, CA); LacZ Detection Kit for Tissues (Invivogen 公司), RNeasy Mini 试剂盒和 Beta-Glo Assay System 试剂盒 (Promega 公司), BCA 蛋白检测试剂盒 (Pierce 公司)。

2. 转铁蛋白靶向脂质体 (Tf-PLs) 的制备: pGFAP 启动子启动的 SDF-1 表达质粒 pGFAP-SDF-1 质粒的构建与提纯由上海吉凯基因化学技术有限公司完成。转铁蛋白靶向脂质体制备过程详见本实验室以前发表文献^[1]。

3. 动物分组: SPF 级 SD 雄性大鼠 (体重 250 ~ 280g) 购自北京维通利华实验动物技术有限公司 (实验动物许可证号: 京 ICP 备 05076685 号)。无菌手术在北京军区总医院动物实验中心屏障动物实验设施进行, 并按实验动物使用的 3R 原则给

予人道的关怀。将大鼠行大脑中动脉阻断制备大鼠脑缺血模型,选取 mNSS 评分在 10~12 分的大鼠模型作为实验对象,随机分为两组。制备模型 48h 后,分别自尾静脉注射 Tf-SDF-1-PLs 和 Tf-PLs。

4. 实时定量 PCR 检测 SDF-1 mRNA:药物注射 24h 后,每组随机选取 8 只大鼠过量麻醉处死,断头取脑及周围器官,迅速放入冻存管液氮中保存。提取各组脑组织总 RNA 并通过 RNeasy Mini 试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA,设计上下游 PCR 引物, SDF-1 基因上游引物为 5'-GAGGAGGTGAAG-GCAGTGGCGG-3',下游引物为 5'-CAGTGTGTGTGT-GGGGTGGGC-3', β -actin 上游引物为 5'-CATTGCTGA-CAGGATGCAGAAG-3',下游引物为 5'-GAGCCACCAATC-CACACAGAGT-3'。利用 ABI7900HT 定量 PCR 仪,进行实时定量 PCR 实验。SDS2.2 软件对数据进行分析处理,并导出文件及图像。利用管家基因 β -actin 对目的基因的表达进行校正,得到相对定量结果。

5. Western blot 检测 SDF-1 蛋白的表达:药物注射 48h 后,通过 Western blot 的方法检测 SDF-1 蛋白在脑内的表达。将提取的脑组织蛋白(30 μ g)加 2 $\times$ SDS 上样缓冲液(总体积为 20 μ l)经 95 $^{\circ}$ C 变性 10min;上样于 8% SDS 聚丙烯酰胺(美国 Sigma 公司)凝胶中电泳 2h;用电转膜仪(Bio-Rad 公司)将蛋白转印到硝酸纤维素膜(美国 Sigma 公司)上,约 75min;10%的脱脂奶粉溶液于室温封闭 1h,TBST 漂洗 3 次 $\times$ 10min;加入一抗 SDF-1 抗体(美国 Abcam 公司)室温孵育 2h 后 4 $^{\circ}$ C 过夜,TBST 漂洗 3 次 $\times$ 10min;加入 HRP-抗兔 IgG(1:4000,美国 Sigma 公司)室温孵育 1h,TBST 漂洗 3 次 $\times$ 10min;膜上加 ECL 荧光显影剂,在暗室内压片(Kodak 公司);用洗脱缓冲液 50 $^{\circ}$ C 洗涤硝酸纤维素 30min。用同法显示 β -actin 条带,以此作为加样的内参照。

6. 神经功能评分:在药物注射 1、3、7、14、21 天分别对两组脑缺血模型进行改良的神经功能评分^[2],共 18 分,分数越高说明大鼠神经功能缺失越重,9~12 分表示造模成功。观察大鼠肢体运动功能和感觉功能的恢复情况。

7. FITC-葡聚糖染色:为进一步明确脑缺血发生后,SDF-1 对新生血管的促进作用,行 FITC-葡聚糖染色,明确新生血管增殖情况。脑缺血模型注射药物 21 天,每组 6 只动物麻醉后,在取脑前 1min 经左心室注射 5% FITC-葡聚糖溶液(4ml/kg)。取脑后将标本固定于 4% 多聚甲醛 4 $^{\circ}$ C 48h。以恒冷冰冻切片片机由嘴侧向尾侧行冠状位冷冻连续切片,切片厚度 50 μ m,将脑片用毛笔铺于多聚赖氨酸包被的载玻片上,以 50% 甘油/PBS 混合液封片。在荧光显微镜下观察 FITC-葡聚糖在脑缺血中心区及周围区微血管显影情况,分别进行显微图像采集。将 FITC-葡聚糖微血管成像结果输入 IPP 图像处理系统,测量各样本中 AOI 单位面积(mm²)内微血管显影所占的面积(μ m²),客观反应缺血周围区微血管密度。

8. 大鼠局部脑血流测定:为明确新生血管发生后,是否有利于局部脑血流量的增加,参考既往文献应用激光多普勒

血流系统(LDF)于注射药物前和注射药物后第 21 天进行局部脑血流(CBF)测定^[3]。方法简述如下:大鼠麻醉后,立体定位仪固定大鼠头部。常规消毒后,沿顶部正中切口分离至暴露的颅骨。药物注射之前以下列坐标点 a、b(前囟点为原点)为中心:[a(L2mm,A1mm);b(L2mm,P1mm)]。脑缺血注射脂质体后 21 d 以下列坐标点 c、d(前囟点为原点)为中心:[c(R2mm,A1mm);d(R2mm,P1mm)]。用磨钻由前向后依次磨开 3 个直径约为 1mm 的骨窗。将激光多普勒血流测量仪的专用探头固定在立体定位仪上,并将探头插入测量点硬膜下 1mm。待用专用软件记录并分析脑表面血流变化。测量过程中用红外线灯控制大鼠肛温在(37 $\pm$ 0.5) $^{\circ}$ C 左右,使激光反射率始终控制在 50% 左右。待脑血流描记线稳定以后每个大鼠持续测量 10min。取其 10min 内的血流平均值作为最终血流量。然后两次数值的比值作为血流量的相对值。

9. 统计学方法:全部资料采用 SPSS 11.5 统计软件包进行统计学分析。各组数据均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 One-way ANOVA 统计分析方法中的 Bonferroni's post hoc 分析法对两组动物同项数据进行差异性分析检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 转铁蛋白靶向脂质体的特性:合成的脂质体通过光散射的方法测定平均粒径为 100nm,计算得到的脂质体包封率为 70.23%~86.24%,平均包封率 78.23%。Tf 偶联率平均为 69%。脂质体的 Zeta 电位为 30.2mV。

2. SDF-1 mRNA 在脑内的表达:药物注射 24h 后,实时定量 PCR 检测脑缺血大鼠脑内 SDF-1 mRNA 的表达情况。结果如图 1 所示,Tf-SDF-1-PLs 注射组可以在脑内检测到 SDF-1 mRNA 的表达,生理盐水注射组在脑实质中未检测到 SDF-1 mRNA 的表达,两者比较具有显著性差异($P<0.05$)。

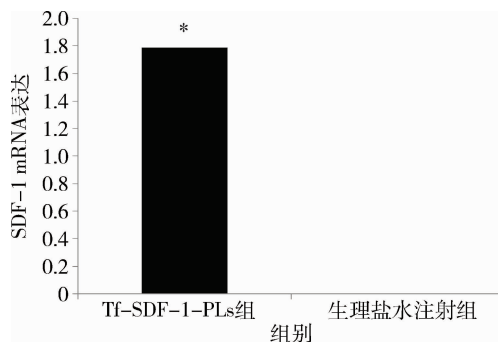


图 1 SDF-1 mRNA 在大鼠脑内的表达

与生理盐水注射组比较,* $P<0.05$

3. SDF-1 蛋白在脑内的表达:药物注射 48h

后,对两组大鼠脑组织进行 SDF - 1 蛋白鉴定。结果如图 2 所示,Tf - SDF - 1 - PLs 注射组 SDF - 1 蛋白表达量明显高于生理盐水注射组,两者比较具有显著性差异($P < 0.05$)。

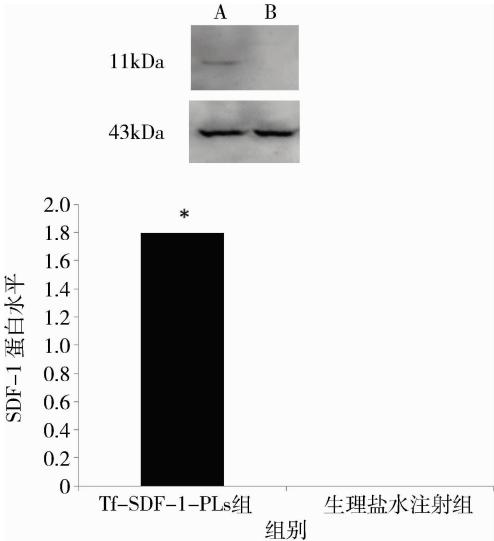


图 2 SDF - 1 蛋白 48h 后在脑缺血大鼠脑内的表达

A. 生理盐水注射组;B. Tf - SDF - 1 - PLs 注射组;与生理盐水注射组比较,* $P < 0.05$

4. SDF - 1 促进神经功能的恢复:如图 3 所示,在注射药物后 1、3、7 天两组大鼠神经功能评分无明显差异,注射药物 14 天后,Tf - SDF - 1 - PLs 注射组大鼠神经功能逐渐较生理盐水注射组改善,主要表现为肢体运动功能的恢复,感觉功能较生理盐水注射组无明显改善。注射药物 21 天后,Tf - SDF - 1 - PLs 注射组大鼠神经功能评分明显优于生理盐水注射组,两组比较具有显著性差异($P < 0.05$)。此外,Tf - SDF - 1 - PLs 注射组大鼠体重较对照组恢复要早(图 4),大约在注射药物 7 天后体重开始回升,是神经功能逐渐好转的标志之一。

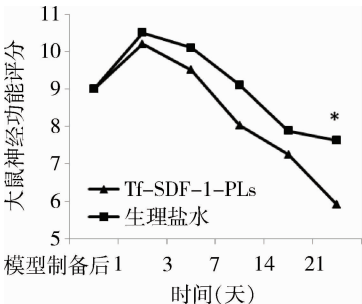


图 3 脑缺血大鼠神经功能评分与生理盐水注射组比较,* $P < 0.05$

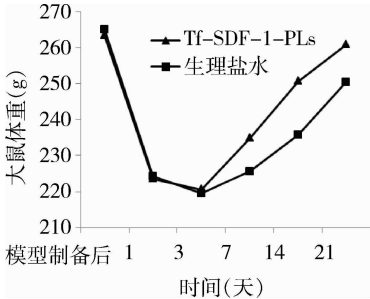


图 4 脑缺血大鼠体重变化

5. SDF - 1 促进新生血管生成:通过 FITC - 葡聚糖染色检测微血管密度,比较两组血管新生的水平。如图 5 所示,Tf - SDF - 1 - PLs 注射组微血管密度明显高于对照组($P < 0.05$),提示 SDF - 1 有利于促进新生血管的生成,而新生血管的生成意味着脑血流的恢复,从而进一步促进神经功能的恢复。

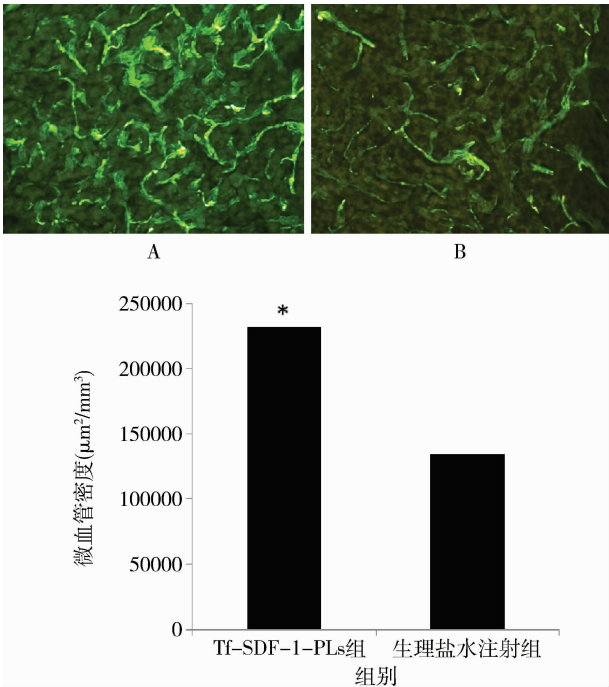


图 5 脑缺血大鼠脑内新生血管

A. Tf - SDF - 1 - PLs 组;B. 生理盐水注射组;与生理盐水注射组比较,* $P < 0.05$

6. SDF - 1 促进局部脑血流的恢复:通过超声多普勒对脑缺血大鼠脑皮质不同区域进行检测,通过药物注射前和注射后 21 天进行比较,明确新生血管生成后,是否促进了局部脑血流的恢复。结果如图 6 所示,在药物注射前,两组大鼠模型的脑血流量无显著差异,注射药物 21 天后,Tf - SDF - 1 - PLs 注射组脑

血流量较生理盐水注射组明显恢复,两者比较具有显著性差异。

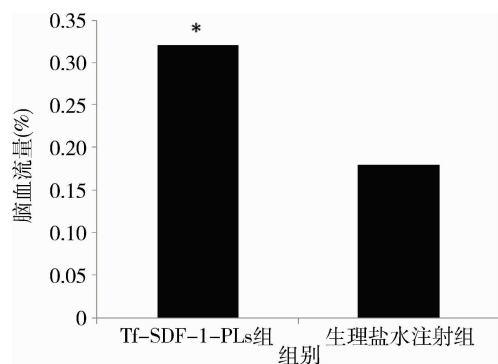


图6 脑缺血大鼠超声多普勒测定脑血流量与生理盐水注射组比较, * $P < 0.05$

讨 论

在本项研究中通过转铁蛋白靶向脂质体成功将外源性 SDF-1 转送至脑缺血大鼠脑内,实现了 SDF-1 在脑内的高表达。通过 SDF-1 发挥的促进新生血管生成的作用,增加了脑缺血局部的脑血流量,促进了脑缺血大鼠神经功能的恢复,为外源基因跨血脑屏障的转运及 SDF-1 促进血管生成的机制研究奠定了基础。

基质细胞衍生因子(SDF-1)是一种趋化蛋白,其可以趋化白细胞的迁移^[4]。SDF-1 的受体为 CXCR4,其可以在成熟神经细胞中表达,包括交感神经节、背根神经节、中脑以及小脑的颗粒细胞层。研究表明,在脑损伤发生时,如脑出血、脑缺血以及炎症时,SDF-1 在血管内皮细胞中表达上调。因此笔者认为 SDF-1 在脑损伤发生后对于新生血管的生成可以起到促进作用,此外,如果能够实现外源的 SDF-1 基因在脑内的高表达,那么可以在更大程度上发挥促进血管新生的作用。但是由于血脑屏障的存在,其抵挡了大部分大分子物质和细菌进入脑内,而且在血液系统中存在巨噬细胞系统可以吞噬外来的异物,因此如果将 SDF-1 基因直接注射至静脉系统,很快就会被巨噬细胞所吞噬,无法发挥应有的作用。脑内外的大分子物质的交换主要依靠血脑屏障上的载体转运系统和受体转运系统,而血脑屏障上表达丰富的转铁蛋白受体。因此在本实验中,笔者利用了血脑屏障上转铁蛋白受体介导的转运系统,将构建有 SDF-1 基因的质粒包裹到脂质体内部,然后将转铁蛋白与脂质体偶联,形成转铁蛋白靶向的脂质体,实现 SDF

-1 基因的脑内转运。

应用脂质体作为载体具有以下优点^[5]:①成熟的制备工艺;②工艺的可控性高;③可以转运较大的蛋白分子;④低免疫原性反应。笔者合成的转铁蛋白靶向脂质体粒径在 100nm 左右,包封率平均为 78.23%,Tf 偶联率平均为 69%。Rivest 等^[6]报道,合成的脂质体的包封率为 $71\% \pm 14\%$,抗体偶联率为 $65\% \pm 5\%$ 。运用转铁蛋白靶向脂质体进行跨血脑屏障的转运在以往文献中已有报道,本课题组在前期实验中,运用转铁蛋白靶向脂质体成功将 VEGF 转入至脑缺血大鼠脑内,实现了 VEGF 在脑内的表达^[3]。截止到目前为止,运用转铁蛋白靶向脂质体转运 SDF-1 在国内外文献中尚无报道。

笔者将 Tf-SDF-1-PLs 通过尾静脉注射至脑缺血大鼠体内,24h 后提取脑组织的总 RNA,利用实时荧光定量 PCR 对脑实质中外源 SDF-1 的 mRNA 进行检测。结果表明,在 Tf-SDF-1-PLs 组脑中,有外源 SDF-1 mRNA 的高表达,说明 Tf-SDF-1-PLs 成功地 SDF-1 跨过血脑屏障转送至脑内。为了进一步证实 SDF-1 的表达,48h 后我们通过 Western blot 的方法对 SDF-1 蛋白进行了检测,结果表明在 Tf-SDF-1-PLs 注射组 SDF-1 蛋白的表达量高于生理盐水注射组。

在本实验中,通过比较两组脑缺血模型在药物注射后 1、3、7、14 和 21 天的神经功能评分,发现在药物注射后第 1 天,两组大鼠模型评分无明显差异,随着时间的推移,两组的评分开始出现差异,尤其在 21 天时,两组差异最为显著。两组大鼠的运动功能要较感觉功能恢复的快,具体原因在相关文献中尚无报道。另外,脑缺血恢复阶段,大鼠体重的逐渐恢复时神经功能逐渐恢复的标志之一,往往体重恢复的越早,神经功能恢复的越快,因此认为大鼠的营养和体质也是影响神经功能评分的影响因素之一。

神经功能的恢复离不开血管再生后养分的供应,笔者通过 FITC-葡聚糖进行微血管染色,在显微镜下进行微血管密度计数,发现 Tf-SDF-1-PLs 注射组的微血管密度高于生理盐水注射组,这与前面所述 SDF-1 可以促进新生血管发生有关。为了检测新生血管是否具有增加脑血流量的作用,笔者用多普勒超声对脑皮质的血流进行检测,结果提示 21 天时 Tf-SDF-1-PLs 注射组的脑血流量高于生理盐水注射组,说明 SDF-1 促进新生血管生成,并形成了能够提供有效脑血流的血管网。

SDF-1 具有促进血管新生的作用。从发生学和组织的观点来看,血管新生大致可以分为血管发生和血管新生两种不同类型的过程。血管发生需要前体细胞自骨髓向损伤部位的迁移,并对初级血管网进行重塑^[7]。SDF-1 对于内皮前体细胞的募集作用在文献中已有广泛报道,其中内皮前体细胞表面表达的 CXCR4 在细胞向损伤部位的迁移过程中起到了非常重要的作用^[8]。体外实验表明^[9],SDF-1 有利于内皮前体细胞的增殖和迁移,抑制前体细胞的凋亡,增强 MMP-2 和 MMP-9 的表达。研究结果表明,SDF-1 通过调节血管前体细胞的迁移和募集促进了血管发生。

综上所述,笔者合成的 Tf-SDF-1-PLs 可以成功的将 SDF-1 通过静脉注射的方式转运至缺血脑内,实现脑内的表达。SDF-1 可以在 SDF-1/CXCR4 轴的作用下,促进新生血管的发生,构建成熟的血管网,为脑缺血区域提供血流,促进神经功能的恢复。

参考文献

- 1 赵浩,李运军,陈立华,等.基因导入途径与脑内表达的关系研究[J].医学研究杂志,2012,10:26-29
- 2 赵浩,李永宁,王任直,等.大鼠局灶性脑缺血模型的有效制备[J].中国实验动物学报,2009,6:432-436
- 3 Zhao H, Bao XJ, Wang RZ, *et al.* Postacute ischemia vascular

- endothelial growth factor transfer by transferrin-targeted liposomes attenuates ischemic brain injury after experimental stroke in rats[J]. Human gene therapy, 2011,22(2):207-215
- 4 Shyu WC, Lin SZ, Yen PS, *et al.* Stromal cell-derived factor-1 alpha promotes neuroprotection, angiogenesis, and mobilization/homing of bone marrow-derived cells in stroke rats[J]. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2008, 324(2):834-849
 - 5 Zhao YZ, Lu CT. Increasing the entrapment of protein-loaded liposomes with a modified freeze-thaw technique: a preliminary experimental study[J]. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2009, 35(2):165-171
 - 6 Rivest V, Phivilay A, Julien C, *et al.* Novel liposomal formulation for targeted gene delivery[J]. Pharmaceutical Research, 2007,24(5):981-990
 - 7 Zhao BQ, Tejima E, Lo EH. Neurovascular proteases in brain injury, hemorrhage and remodeling after stroke[J]. Stroke; a journal of cerebral circulation, 2007, 38(Suppl 2):748-752
 - 8 Shao H, Tan Y, Eton D, *et al.* Statin and stromal cell-derived factor-1 additively promote angiogenesis by enhancement of progenitor cells incorporation into new vessels[J]. Stem Cells, 2008, 26(5):1376-1384
 - 9 Mirabella T, Poggi A, Scaranari M, *et al.* Recruitment of host's progenitor cells to sites of human amniotic fluid stem cells implantation[J]. Biomaterials, 2011, 32(18):4218-4227

(收稿日期:2013-04-01)

(修回日期:2013-04-12)

不同血清微环境培养的施万细胞增殖状况比较

林 兰 郑亚琳 李鸣镝 黄 达

摘 要 目的 将不同浓度大鼠血清、10% 胎牛血清培养以及无血清培养的大鼠原代施万细胞的增殖状况进行比较,探讨适合施万细胞生长的血清微环境。**方法** 将所培养的原代施万细胞分成 5% 大鼠血清组、10% 大鼠血清组、15% 大鼠血清组、20% 大鼠血清组、10% 胎牛血清组、无血清组,另设不含细胞的空白对照组。采用 CCK-8 细胞增殖试剂,分别于培养后 24、48、72、96、120h 对各组的细胞增殖情况进行测定。**结果** 5% 大鼠血清组的细胞在 96h 内的生长状况与 10% 胎牛血清组相比无显著差异。**结论** 在 96h 内,5% 的大鼠血清浓度最适合该细胞生长。

关键词 施万细胞 血清微环境 细胞增殖

Comparison of Schwann Cell's Proliferation in Different Serum Microenvironment Mediums. Lin Lan, Zheng Yalin, Li Mingdi, Huang Da. China Academy of Traditional Chinese Medicine Guanganmen Hospital, Beijing 100053, China

Abstract Objective To compare the generation of rat Schwann cells's proliferation in different Serum microenvironment mediums, include different concentrations of rat serum, 10% fetal bovine serum and serum free, to explore suitable for schwann cells growth of

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81173445)

作者单位:100053 北京,中国中医科学院广安门医院

通讯作者:李鸣镝,副主任医师,电子信箱:mdlee2009@126.com