

G-CSF 在缺血性脑卒中动物模型治疗中的研究进展

钟 华 毕 胜[△]

(哈尔滨医科大学附属第一医院神经内科三病房 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 粒细胞集落刺激因子(G-CSF)是细胞生长因子家族中的一员,主要功能是刺激细胞增殖分化降低细胞凋亡。近年来许多缺血性脑卒中的实验研究显示其能有效改善由于脑卒中中等枢神经系统疾病所致的神经功能缺损,G-CSF 用于缺血性脑卒中的治疗具有广阔的前景。文章从 G-CSF 在缺血性脑卒中的研究进展及其作用机制等方面进行综述。

关键词 粒细胞集落刺激因子 缺血性脑血管病 脑卒中模型

中图分类号 R743 **文献标识码** A **文章编号** :1673-6273(2012)09-1794-03

Advances of granulocyte-colony stimulating factor in the Treatment of Ischemic Cerebral Vascular Disease

ZHONG Hua, BI Sheng[△]

(Department of Neurology the first Hospital of Harbin Medical University, Harbin Heilongjiang Province 150001, China)

ABSTRACT: Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) is a member of the cytokine family of growth factors. G-CSF stimulates the proliferation, survival, and maturation of cells. Recent experimental studies on the G-CSF in the treatment of ischemic cerebral vascular disease have shown that G-CSF can improve neurologic impairment. G-CSF have broad prospects to be used in the treatment of ischemic cerebral vascular disease. This review focus on the use of G-CSF in ischemic cerebral vascular disease, and the mechanism of their action.

Key words: Granulocyte-colony stimulating factor(G-CSF); Ischemic cerebral vascular disease; Stroke model

Chinese Library Classification(CLC): R743 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)09-1794-03

前言

脑血管疾病以其高发病率、高病死率和高致残率严重影响着人们的生存及生活质量,是多数国家的三大致死疾病之一。因此脑血管病的治疗已成为全世界神经科学界关注的热点。在脑血管疾病患者中约 70%为脑梗死,目前用于临床治疗脑梗死的方法包括改善脑血循环、促进脑代谢、使用抗凝及脱水剂等药物均不能保证脑梗死后缺血区神经细胞的存活,溶栓疗法是近年缺血性卒中治疗上的一个重要进展,通过重建脑血流,使缺血区在产生不可逆性损伤前恢复供血,可以明显改善神经功能,但存在严格的时间限制及伴发而来的再灌注损伤,使接受治疗的患者较少也限制了急性卒中溶栓疗法的疗效。即使不进行溶栓治疗,自发的血栓或栓子溶解也可导致再灌注损伤。近年来许多学者致力于应用细胞移植治疗脑梗塞的研究,移植的细胞包括骨髓间质细胞、猪胚胎细胞、无限增殖细胞、干细胞等。移植的细胞选择性的迁移至缺血半球参与神经功能、血脑屏障及血流的恢复。骨髓间质细胞因为类似于自体移植能够避免移植后的排斥反应及移植后肿瘤生成等并发症而研究较多,但是它仍然存在操作技术复杂有很高的感染机率可能错过治疗最佳时间窗等弊端^[1-2]。现在许多研究发现 G-CSF 能通过提高干细胞向缺血组织归巢、抑制神经细胞凋亡、刺激产生

神经营养因子等保护神经功能。

1 G-CSF 的生物学作用

粒细胞集落刺激因子(G-CSF)是一种多肽链的细胞生长因子,可特异地调节粒系细胞的增殖与分化,并能增强成熟粒细胞的功能,对机体应激防御系统有重要意义。人类 G-CSF 由单个基因编码,其基因位于 17 号染色体的 q21-22 区,长约 2.5 kb,有 5 个外显子和 4 个内含子;其蛋白质由 174 氨基酸组成。天然的 G-CSF 含有糖基,糖基化位点位于 Thr 133,无 N-糖基位点,糖基对 G-CSF 的生物学活性没有贡献,在 *E.coli* 中表达的 G-CSF 无糖基,但其功能与天然 G-CSF 无明显差别。

G-CSF 功能的发挥有赖于与效应细胞表面的特异性受体的结合。G-CSF 主要作用于中性粒细胞系造血细胞的增殖、分化和活化。重组人粒细胞集落刺激因子作用于造血祖细胞,促进其增殖和分化,其重要作用是刺激粒、单核巨噬细胞成熟,促进成熟细胞向外周血释放,并能促进巨噬细胞及嗜酸性细胞的多种功能。

G-CSF 临床主要用于预防和治疗肿瘤放疗或化疗后引起的白细胞减少症、治疗骨髓造血机能障碍及骨髓异常增生综合症、预防白细胞减少可能潜在的感染并发症、以及使感染引起的中性粒细胞减少的恢复加快。随着人们对 G-CSF 作用机制的深入研究,国内外有关 G-CSF 治疗脑血管疾病的研究也取得了一些进展^[3-5]。

2 G-CSF 治疗脑梗死的研究

作者简介 钟华,女,硕士研究生,Tel:15245124059,

E-mail:zhongjinglianok@163.com

△通讯作者 毕胜,E-mail: bisheng98@hotmail.com

(收稿日期 2011-08-24 接受日期 2011-09-21)

脑血管疾病严重影响着人们的生存及生活质量,目前临床治疗脑梗死的改善脑血循环、促进脑代谢等药物治疗效果一直不能令人满意,随着人们对 G-CSF 功能的了解,国内外有关 G-CSF 治疗脑梗塞的研究也取得了一些进展。Shyu 等将 G-CSF 皮下注射到脑梗死大鼠体内,结果显示,治疗后的大鼠神经功能损伤显著降低,梗死面积显著减小,在缺血侧脑室下区检测到 52 溴 222 脱氧尿嘧啶核苷(52bromo222deoxyuridine, BrdU)阳性的细胞,研究表明 G-CSF 能刺激 HSCs 迁移到脑缺血区, G-CSF 的神经保护作用可能与 HSCs 细胞分泌神经营养因子及抑制炎症因子 IL-1 等的生成有关^[1]。

Kawada 等制造绿色荧光蛋白 (Greenfluorescent protein, GFP) 标记骨髓细胞的转基因脑梗塞小鼠模型后,应用 G-CSF 治疗 4 周后检测小鼠运动功能较未应用组好,在梗塞区能检测到来源于造血干细胞的 GFP+CD45+ 的细胞,在缺血周围区域能检测到 GFP+Neu-N+ 的星形、网状或形态不规则的起源于 BM 的神经细胞, G-CSF 能增加 GFP-BrdU+ 的细胞数说明能刺激神经系统固有的干细胞增殖^[4]。

ZHANG 等建立鼠脑缺血模型后,应用 G-CSF 治疗 3 天在 1,7,14 天,应用免疫组织化学等方法发现 G-CSF 能通过 STAT3 途径抑制细胞凋亡^[5]。

史建军等用 G-CSF 治疗脑梗死大鼠,分别在 1、4、7、10 d 测定各组神经学功能、梗塞区神经细胞形态、脑梗塞的体积、S-100 β 蛋白的量及缺血区新生血管情况发现提示 G-CSF 能减少具神经毒作用的介质产生,抑制细胞凋亡,刺激新生血管生成,发挥脑保护作用^[6]。期间许多研究者做了类似的研究,他们尝试用不同的标记物、不同的应用时间都证实了 G-CSF 能抑制细胞凋亡等改善缺血后的神经功能恢复^[7-9]。

综上所述, G-CSF 在脑缺血后神经功能恢复方面发挥了重要作用,但目前研究开始将焦点集中于与脑梗死密切相关的干细胞移植相联合,因为有研究证实干细胞能通过损坏的血脑屏障进入梗塞部位,有多向分化潜能,促进血管生成突触发生等,而 G-CSF 作为生长因子可以刺激干细胞增殖分化^[10]。

3 G-CSF 治疗脑缺血的可行性

①在数十年以来, G-CSF 被广泛应用于临床治疗粒细胞减少,证明药物应用于人体是安全的。②G-CSFR 广泛存在于包括神经细胞和神经胶质细胞的脑组织中,并于组织损伤时表达增加^[5]。③在以前,神经细胞被认为在胚胎期以后就不能再生,但近二十年的研究发现即使成人的神经系统神依然存在神经干细胞,它们在损伤发生时也能分化增殖^[4,11]。

4 G-CSF 治疗脑缺血的可能作用机制

4.1 抗细胞凋亡

G-CSFR 存在于中枢神经系统神经细胞及神经胶质细胞的细胞膜上, G-CSF 与 G-CSFR 结合后激活细胞内的信号传导途径,导致 STAT 二磷酸化后进入细胞核内, STAT3 是被 G-CSFR 活化的主要的 STAT 蛋白, STAT3 通过激活 Bcl-2 转录抑制细胞凋亡,保护神经细胞免受兴奋性氨基酸的毒性作用^[3,5]。

4.2 抗炎

缺血 1h 即可诱导产生炎症因子 TNF- α 等炎症因子, TNF-

α 、IL-1 是细胞表面粘附分子表达的强诱导剂。大量白细胞通过:①粘附阻塞微血管造成无复流,幸存组织细胞得不到有效的灌注而最终死亡。②粘附后穿越内皮细胞进入缺血局灶区,释放蛋白水解酶及炎症介质等机制在脑缺血损伤中起重要作用。

G-CSF 也能通过 STAT 途径减少缺血区肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-1 β (IL-1 β)、IL-2、IL-6、IL-8 的释放,进而减低中性粒细胞的激活起到抗炎作用^[3,12]。

4.3 血管生成

G-CSF 促进血管生成的可能机制:①动员 CD34+ 的骨髓干细胞(包括骨髓干细胞起源的内皮祖细胞)进入到末梢血中。内皮祖细胞(EPCs)能迁移至脑梗塞部位参与新生血管生成。②G-CSF 直接活化脑血管内皮细胞促进新血管形成。③G-CSF 能作用于缺血区脑组织使 eNOS 和 Ang-2 含量增加。eNOS(一氧化氮合酶)能刺激产生 NO 促进血管舒张, Ang-2(血管生成素-2)已被证实能够刺激毛细血管扩张、血管基底层重建、新血管生长。新生成的微血管能提高缺血半暗带区域组织的血灌注促进神经功能恢复^[1,2]。

4.4 神经保护

G-CSF 可诱导产生神经营养因子或生长因子给缺血区神经细胞提供营养支持,刺激神经突触发生和损伤区的修复^[12,13]。

5 G-CSF 治疗应注意的问题

5.1 治疗量

G-CSF 的最佳给药剂量目前尚无定论也缺少相关研究。有研究显示在一定范围内 G-CSF 的作用随着剂量的增加相应增加,但剂量一旦达到 10 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,其量效关系消失^[14]。也有许多有关研究证实应用剂量在 10-300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重时没有副作用,而且大剂量应用 G-CSF 治疗脑梗塞是有利的^[13]。

5.2 治疗的时间窗

G-CSF 动员骨髓干细胞治疗脑梗死的最佳临床时间窗仍存在争议。一些研究认为急性期存在严重的炎症反应,同时产生很多炎症因子和酶,对于脑组织具有神经毒性。归巢的干细胞很可能参与到急性炎症反应过程中,或者被炎症反应损伤,或者被吞噬细胞吞噬。而亚急性期,炎症反应消退,伴随各种生长因子和神经营养因子水平增加,有利于 G-CSF 诱导骨髓干细胞向神经元的转化^[4]。

部分研究显示,急性期给药组治疗优于亚急性期给药组,给药组治疗优于未给药组。缺血脑组织发生炎症反应血脑屏障破坏,自体干细胞迁移至脑缺血区,从而促进局部修复。应用激素阻断心肌梗死大鼠的炎症反应发现急性期炎症反应消退,对于干细胞归巢的"呼唤作用"明显减弱。在急性期给予大鼠腹腔内注射 G-CSF,在缺血脑组织局部炎症反应的"呼唤作用"下,归巢的干细胞数量会较亚急性期多,其中归巢的血管内皮祖细胞(EPCs)较其他组亦增多。在亚急性期归巢的干细胞虽然避开了急性期炎症反应,"存活"的干细胞数量的相对值较急性期高,但归巢的干细胞数量的绝对值较急性期少。由此也有人认为,归巢干细胞的绝对数量是决定大鼠梗死脑容积减小、缺血区新生血管再生、神经功能改善进而质量增加的决定因素

之一,所以脑梗死急性期是动员骨髓干细胞治疗脑梗死的最佳时间窗^[15]。

也有研究证实延长 G-CSF 的应用时间能明显提高脑缺血损伤小鼠的神经功能恢复^[16]。

6 展望

G-CSF 具有细胞生长因子的特点,可促进干细胞迁移、增殖、分化、抑制细胞凋亡。G-CSF 对脑缺血的动物研究已证明它能改善神经功能缺失症状,这为脑梗死的治疗开辟了一条新的途径,对它的研究和开发已成为当今生命科学的热点。目前主要研究焦点在于:①G-CSF 治疗量和治疗时间窗;②对 G-CSF 治疗脑梗塞的疗效和安全评定。以上研究还需进一步探索,因此将 G-CSF 应用于临床还有一段时间,但我们相信对脑梗死进行神经功能修复和重建已不再是梦想。

参考文献(References)

- [1] Woei-Cherng Shyu, Shinn-Zong Lin, Hung Li, et al. Functional Recovery of Stroke Rats Induced by Granulocyte Colony-Stimulating Factor-Stimulated Stem Cells [J]. *Circulation*, 2004, 110: 1847-1854
- [2] Zhao Yanqing, Luo Yu-Min, Qiao Jian, et al. Fibronectin and neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor in focal cerebral ischemia [J]. *Brain Research*, 2006, 1098: 161-169
- [3] W.-R. Schäbitz, R. Kollmar, M. Schwaninger, et al. Neuroprotective Effect of Granulocyte Colony-Stimulating Factor After Focal Cerebral Ischemia [J]. *Stroke*, 2003, 34: 745-751
- [4] Hiroshi Kawada, Shunya Takizawa, Tomomi Takanashi, et al. Administration of Hematopoietic Cytokines in the Subacute Phase After Cerebral Infarction Is Effective for Functional Recovery Facilitating Proliferation of Intrinsic Neural Stem/Progenitor Cells and Transition of Bone Marrow-Derived Neuronal Cells [J]. *Circulation*, 2006, 113: 701-710
- [5] I. Solaroglu, T. Tsubokawa, J. H. ZHANG, et al. Anti-Apoptotic Effect Of Granulocyte Colony-Stimulating Factor After Focal Cerebral Ischemia In The Rat [J]. *Neuroscience*, 2006, 143: 965-974
- [6] 史建军, 付宏亮, 张汉伟, 等. 粒细胞集落刺激因子对大鼠急性缺血性脑梗死的神经保护作用 [J]. *中国药物与临床*, 2009, 9(5): 372-374
Hi Jian-jun, Fu Hong-liang, Zhang Han-wei, et al. Neuro-protective effects of rhG-CSF on focal cerebral infarction in rats [J]. *Chinese Remedies and Clinics*, 2009, 9(5): 372-374
- [7] Yoshihide Sehara, Takeshi Hayashi, Kentaro Deguchi, et al. G-CSF enhances stem cell proliferation in rat hippocampus after transient middle cerebral artery occlusion [J]. *Neuroscience Letters*, 2007, 418: 248-252
- [8] Xifa Lan, Hua Qu, Wenxiu Yao, et al. Granulocyte Colony-Stimulating Factor Inhibits Neuronal Apoptosis in a Rat Model of Diabetic Cerebral Ischemia [J]. *Tohoku J. Exp. Med.*, 2008, 216(2): 117-126
- [9] Ana-Marla Buga, A. Popa-Wagner, L. Mogoanta, et al. Strategies to improve post-stroke behavioral recovery in aged subjects [J]. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 2009, 50(4): 559-582
- [10] Masaaki Hokari, Satoshi Kuroda, Yasuhiro Chiba, et al. Synergistic effects of granulocyte-colony stimulating factor on bone marrow stromal cell transplantation for mice cerebral infarct [J]. *Cytokine*, 2009, 46: 260-266
- [11] Bo Zhang, Ren-zhi Wang, Zhi-gang Lian, et al. Neurogenesis by Activation of Inherent Neural Stem Cells in the Rat Hippocampus after Cerebral Infarction [J]. *Chinese Medical Sciences Journal*, 2009, 24(1): 41-45
- [12] Claire L Gibson, Philip MW Bath, Sean P Murphy. G-CSF administration is neuroprotective following transient cerebral ischemia even in the absence of a functional NOS-2 gene [J]. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2010, 30: 739-743
- [13] Jan-Kolja Strecker, Sevgi Sevimli, Matthias Schilling, et al. Effects of G-CSF treatment on neutrophil mobilization and neurological outcome after transient focal ischemia [J]. *Experimental Neurology*, 2010, 222: 108-113
- [14] Platzbecker U, Bornhauser M, Zimmer K, et al. Second donation of granulocyte -colony -stimulating factor -mobilized peripheral blood progenitor cells: risk factor associated with a low yield of CD34+ cells [J]. *Transfusion*, 2005, 45(1): 11-15
- [15] 赵菁, 高波, 张志明, 等. 粒细胞集落刺激因子动员骨髓干细胞治疗脑梗死时间窗的研究 [J]. *天津医药*, 2009, 37(5): 396-399
Hao Jing, Gao Bo, Zhang Zhi-ming, et al. Study on the Optimal Administrative Time of Granulocyte Colony Stimulating Factor for Mobilizing Marrow Stem Cell to Treat Ischemic Cerebral Infarction in Rats [J]. *Tianjin Med J*, 2009, 37(5): 396-399
- [16] Armin Schneider, Rainer Wysocki, Claudia Pitzer, et al. An extended window of opportunity for G-CSF treatment in Cerebral ischemia [J]. *BMC Biology*, 2006, 4: 36-43