

大鼠脑损伤对移植人胚神经干细胞存活和分化的影响

张泽舜 万虹 历俊华 翟晶 韩富 王忠诚

[摘要] 目的 探讨大鼠脑液压冲击伤(FPI)后对植入的人胚神经干细胞(HNSCs)存活和分化的影响。方法 取8周龄人胎儿大脑皮层细胞,体外培养获得神经干细胞(NSCs),巢蛋白免疫荧光染色;SD大鼠制作FPI模型,于伤后24h在损伤区移植标有5'-溴脱氧尿嘧啶(BrdU)的HNSCs,1周和4周后处死大鼠,邻片行BrdU/微管相关蛋白-2(MAP-2)和BrdU/胶质纤维酸性蛋白(GFAP)免疫组织化学双染。结果 HNSCs移植后1周可见BrdU阳性细胞向周围迁移,且BrdU/MAP-2双阳性细胞多于BrdU/GFAP双阳性细胞;移植后4周BrdU阳性细胞迁移的范围更广,但细胞数量明显减少,脉络丛和微血管中可见BrdU阳性细胞,BrdU/GFAP双阳性细胞多于BrdU/MAP-2双阳性细胞。结论 HNSCs能存活于损伤区域,移植后逐渐分化为星形胶质细胞,且易被内皮吞噬细胞吞噬。

[关键词] 液压冲击伤(FPI);神经干细胞(NSC);分化

Effects of fluid percussion injury on survival and differentiation of human embryonic neural stem cells in rats ZHANG Ze-shun, WAN Hong, LI Jun-hua, et al. Neurosurgery Department of Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, Guangdong, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of fluid percussion injury(FPI) on survival and differentiation of transplanted human embryonic neural stem cells(HNSCs) in rats. **Methods** The HNSCs were separated from the cerebral cortex of the 8-week-old fetal and were cultured in DME M/ F12 combined with EGF, bFGF and LIF. The rat models of FPI were made with fluid percussion system. The HNSCs labeled with BrdU were transplanted into the injured zone 24 hours after brain injury, then the rats were killed at the 1st and 4th week post-transplanted stages, and the brain slices were stained with immunocytochemistry. The GFAP, MAP-2, and BrdU positive cells were investigated. **Results** The transplanted HNSCs migrated to the whole brain, and differentiated into GFAP and MAP-2 positive cells. MAP-2 positive cells were observed at 1 week post-transplanted stage, on the contrary, more GFAP positive cells were discovered 4 weeks after transplantation. Part of the HNSCs migrated to the choroids plexus of the lateral ventricle and microvessels. **Conclusion** The transplanted HNSCs survive in the injured zone, and differentiate into astrocytes gradually during the recovery. The host devours part of the HNSCs.

[Key words] fluid percussion injury(FPI); neural stem cells(NSCs); differentiation

中图分类号:R318.5,R651.1 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2004)01-0023-03

[本文标引格式] 张泽舜,万虹,历俊华,等.大鼠脑损伤对移植人胚神经干细胞存活和分化的影响[J].中国康复理论与实践,2004,10(1):23-25.

实验研究发现,神经干细胞(neural stem cells, NSCs)能存活于同种或者异种成年后的中枢神经系统,并能分化为神经细胞,起到一定的治疗作用^[1,2]。本实验采用大鼠脑液压冲击伤(fluid percussion injury, FPI)模型,观察脑损伤早期对移植人胚神经干细胞(human embryonic neural stem cells, HNSCs)分化的影响。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 DME M/ F12(Hyclone 公司),成纤维细胞生长因子(bFGF, Peprotech 公司),表皮细胞生长因子(EGF, Peprotech 公司),白血病抑制因子(LIF, Chemicon 公司),鼠抗5'-溴脱氧尿嘧啶(BrdU)单克隆抗体(Sigma 公司),兔抗巢蛋白(Nestin)多克隆抗体(Chemicon 公司),鼠抗微管相关蛋白-2(MAP-2)

单克隆抗体(Neomarkers 公司),兔抗胶质纤维酸性蛋白(GFAP)多克隆抗体(Biogenex 公司),FITC 标记的IgG二抗(北京中山生物技术有限公司),免疫组织化学双染试剂盒(北京中山生物技术有限公司),相差荧光显微镜ECLIPSE TE2000-U(Nikon 公司)。

1.2 人胎儿来源 人工流产8周龄左右胎儿大脑,流产过程中B超监测胎儿的存活状况。

1.3 实验动物 SD雌性大鼠24只,体重(250±10)g,购自中国医学科学院实验动物研究所。

1.4 人胚神经干细胞的体外培养 见参考文献^[3]。

1.5 FPI模型 根据大鼠脑立体定位图谱^[4],大鼠大脑皮质运动感觉区骨窗位置为:以前囟为0点,向后2.5mm,中线右3mm。液压冲击参数:冲击压力0.3MPa,冲击时间25ms。10%的水合氯醛腹腔注射麻醉,大鼠脑固定于立体定位架,用牙钻磨直径3mm骨窗,保留完整硬膜;将直径3mm的硬质塑料管一端固定于硬膜外,另一端接于液压冲击仪上,牙托粉固定,管内充满液体石蜡防止硬膜干燥;待大鼠水合氯醛麻醉完全清醒后行乙醚吸入浅麻醉,按触发按钮1次;清

作者单位:1.510000 广东广州市,广东省中医院神经外科(张泽舜,韩富);2.100050 北京市,北京市神经外科研究所(万虹,历俊华,翟晶,王忠诚)。作者简介:张泽舜(1973-),男,土家族,湖北巴东县人,硕士,主要研究方向:脑损伤修复。

理创面,无活动性出血后缝合头皮。

1.6 HNSCs 移植 SD 大鼠脑液压冲击伤后 24 h 移植 HNSCs。细胞移植前加 BrdU ($10 \mu\text{mol/L}$) 共培养 72 h,将神经球吹打为单细胞和神经微球, 0.1 M PBS 清洗、离心,反复 3 次,细胞终浓度为 $(1.5-2.0) \times 10^5/\mu\text{l}$ 。将 SD 大鼠麻醉后固定于立体定位架上,微量注射法在损伤区植入细胞,深度为硬脑膜下 $3.0-3.2 \text{ mm}$,留针 10 min,缓慢退针,缝合头皮。

1.7 免疫组织化学及免疫荧光染色 移植 HNSCs 后 1 周和 4 周,大鼠 10%水合氯醛腹腔注射麻醉,打开胸腔,经心脏先后用肝素化生理盐水和 4%多聚甲醛灌注固定(颈部、四肢和尾部僵硬,肝脏变白为有效灌注),取脑组织,同一固定液室温下固定过夜。常规脱水、浸蜡、包埋、切片(厚 $5 \mu\text{m}$)。先行 BrdU 免疫组织化学染色,镜下确定 BrdU 阳性细胞后,其邻片行 MAP-2 和 GFAP 免疫组织化学染色。3%过氧化氢孵育,柠檬酸缓冲液中微波加热抗原修复 10 min,5%正常羊血清室温孵育 30 min,加抗 BrdU(1:100)、Nestin(1:200)、MAP-2(1:800)、GalC(1:100)和 GFAP(1:50)抗体,4℃过夜。 0.01 M PBS 冲洗,加生物素化二抗,室温孵育 30 min;加过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液(HIGH-SABC),室温孵育 15 min;DAB 显色。双标染色时,严格按试剂使用说明书操作。

2 结果

一定浓度的 HNSCs 单细胞 48 h 后聚球悬浮生长,细胞连续传代 3-4 代,撤去神经生长因子,10%胎牛血清诱导贴壁 3 d,行人 Nestin 免疫荧光染色,可见绿色荧光的阳性细胞聚集成球,球周围也见散在的阳性细胞(中插图 6.1)。

HNSCs 移植后不同时间处死动物,免疫组织化学染色显示,BrdU 阳性细胞为椭圆形棕褐色。移植后 1 周和 4 周都可见阳性细胞,有明显迁移。移植 4 周后脑实质中 BrdU 阳性细胞数明显减少,但侧脑室脉络丛和脑表面微血管可见大量的 BrdU 阳性细胞聚集(中插图 6.2、中插图 6.3)。

邻片行 BrdU/ MAP-2 和 BrdU/ GFAP 免疫组织化学双染。结果显示,移植后 1 周,皮质颗粒层和皮层下均见较多的 BrdU 阳性细胞,BrdU/ MAP-2 双阳性细胞多于 BrdU/ GFAP 双阳性细胞;移植后 4 周,可见移植区域的 BrdU 阳性细胞数明显减少,且 BrdU/ GFAP 双阳性细胞多于 BrdU/ MAP-2 双阳性细胞(中插图 6.4、中插图 6.5)。

3 讨论

本实验显示,HNSCs 移植后 1 周,移植的细胞存活并向周围扩散,同时可见部分 HNSCs 定向分化为神经细胞,部分细胞处于未分化状态(Nestin 染色阳性),

胶质细胞相对较少。而移植后 4 周,分化的神经细胞较少,神经胶质细胞较多。我们认为,这与脑损伤后不同时间病理变化不同有关。

Dekosky 等研究发现,创伤性脑损伤中 NGF 蛋白在大脑皮质明显增加,其 mRNA 于伤后 1 d 约增加 5 倍^[5]。Holmin 等认为,脑损伤后 NGF 增高,可能与反应性基因激活,炎症因子上调有关^[6]。脑损伤后,同侧脑室内注入外源性 NGF 可以防止内隔核胆碱能神经元的死亡,并明显减轻隔、海马胆碱乙酰化酶降低的程度^[7]。

文献报道,在神经细胞发育分化早期,神经干细胞既可向神经元分化,又可向神经胶质细胞分化^[8-9]。Yang 等报道,大鼠中枢神经系统损伤后 1-2 d 起,星形胶质细胞和神经元中 bFGF 含量急剧升高,4-7 d 达高峰,2 周后降至正常水平^[10]。体外培养 NSCs 的实验证明,bFGF 能提高 NSCs 体外存活能力,并能促进 NSCs 分裂增殖。脑损伤后脑内 bFGF 增加也将有利于 NSCs 的存活。脑损伤后局部 IL 等细胞因子增加,体外实验证明,IL、BDNF 等能诱导中脑祖细胞向多巴胺能神经细胞分化^[11]。

脑损伤晚期,促进脑修复的细胞因子减少或消失,脑局部的组织间液类似于血清成分,诱导存活的 HNSCs 向神经胶质细胞分化。本实验中移植后 4 周 HNSCs 主要分化成神经胶质细胞,这可能与血清的诱导作用有关。我们在体外实验中发现,在剔除细胞因子 EGF、bFGF 和 LIF 时,HNSCs 经血清诱导主要分化为胶质细胞。

脑损伤晚期,移植的 HNSCs 多数分化为胶质细胞也可能与不同脑区自身的差别有关。Catapano 等将永生细胞株 HiB5(E16 海马前体细胞)移植到成年大鼠的皮层、胼胝体和纹状体,结果提示,纹状体的 HiB5 向神经元方向分化,且靠近中线的室周纹状体区比偏外侧的纹状体区更支持向神经元分化^[12]。Gage 等将细胞球注入成年脑组织某个脑区后观察到,迁移到嗅球和齿状回的神经前体细胞分化成该部位的特异性神经元,在这些脑区之外或注射损伤的局部,注入的神经前体细胞均分化成胶质细胞^[13]。

HNSCs 移植 4 周后,损伤区 BrdU 阳性细胞数量明显减少,且脑室脉络丛和脑微血管中集聚 BrdU 阳性细胞。实验过程中,脑组织经生理盐水灌注,BrdU 阳性细胞位于血管内皮细胞中。这说明大鼠的内皮吞噬系统对植入 HNSCs 存在排斥反应。

可以肯定,HNSCs 能存活于脑损伤环境中,分化为神经细胞和星形胶质细胞,且部分细胞被吞噬。但总的说来,脑损伤环境更有利于神经干细胞分化为胶质细胞。如何得到更多的神经细胞还需更积极的干预

因素和进一步的研究。

[参考文献]

- [1] Veizovic T, Beech JS, Stroemer RP, et al. Resolution of stroke deficits following contralateral grafts of conditionally immortal neuroepithelial stem cells[J]. Stroke, 2001, 32: 1012—1019.
- [2] Philips MF, Mattiasson G, Wieloch T, et al. Neuroprotective and behavioral efficacy of nerve growth factor transfected hippocampal progenitor cell transplants after experimental traumatic brain injury[J]. J Neurosurg, 2001, 94: 765—774.
- [3] 张泽舜, 历俊华, 张亚卓, 等. 神经干细胞接种密度对增殖和分化的影响[J]. 首都医科大学学报, 2003, 24: 201—204.
- [4] 包新民, 舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991.
- [5] Dekosky ST, Goss JR, Miller PD, et al. Up regulation of nerve growth factor following cortical trauma[J]. Exp Neurol, 1994, 130(2): 173—177.
- [6] Holmin S, Schalling M, Hojebery B, et al. Delayed cytokine expression in rat brain following experimental contusion[J]. J Neurosurg, 1997, 86(3): 493—504.
- [7] Lu D, Li Y, Wang L, et al. Intraarterial administration of marrow stromal cells in a rat model of traumatic brain injury[J]. J Neurotrau-

ma, 2001, 18(8): 813—819.

- [8] Schwab JM, Beschoner R, Nguyen TD, et al. Differential cellular accumulation of connective tissue growth factor defines a subset of reactive astrocytes, invading fibroblasts, and endothelial cells following central nervous system injury in rats and humans[J]. J Neurotrauma, 2001, 18(4): 377—388.
- [9] Sahin Kaya S, Mahmood A, Li Y, et al. Expression of nestin after traumatic brain injury in rat brain[J]. Brain Res, 1999, 840(1—2): 153—157.
- [10] Yang SY, Cui JZ. Expression of the basic fibroblast growth factor gene in mild and more severe head injury in the rat[J]. J Neurosurg, 1998, 89: 297—302.
- [11] Ling ZD, Potter ED, Lipton JW, et al. Differentiation of mesencephalic progenitor cells into dopaminergic neurons by cytokines[J]. Exp Neurol, 1998, 149: 411—423.
- [12] Catapano LA, Sheen VL, Leavitt BR, et al. Differentiation of transplanted neural precursors varies regionally in adult striatum[J]. Neuroreport, 1999, 10: 3971—3977.
- [13] Gage FH, Coates PW, Palmer TD, et al. Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 11879—11883.

(收稿日期: 2003-12-12)

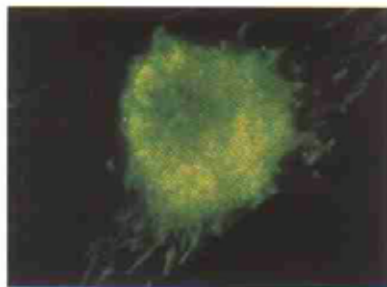


图 6.1 体外培养 3 天
Nestin 免疫荧光染色(FITC, 200 ×)



图 6.2 移植后 1 周
BrdU 免疫组化染色(400 ×)

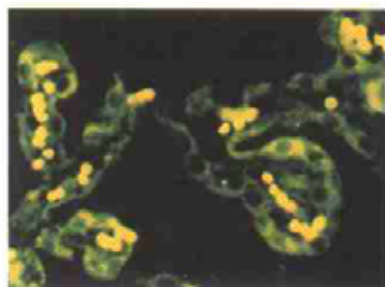


图 6.3 脉络丛中的 BrdU 阳性细胞
(FITC, 200 ×)



图 6.4 移植后 4 周
MAP-2/BrdU 双阳性细胞

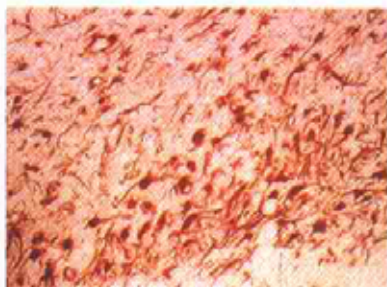


图 6.5 移植后 4 周
GFAP/BrdU 双阳性细胞



图 7.1 术后 7 天, 治疗组
(Nissl 染色)