

• 基础研究 •

神经干细胞脑脊液移植后存活及迁移规律研究

王力平 樊东升* 王荫华* 沈丽 王淑玲 王惠芳 宋红松 张俊

[摘要] 目的 观察神经干细胞(NSC)经侧脑室穿刺法移植入小鼠脑内脑脊液(CSF)循环后其存活、迁移规律及接受移植小鼠的生长发育状况。方法 将绿色荧光蛋白(GFP)标记的 1×10^5 新鲜人源胚胎 NSC 悬液经侧脑室穿刺法移植入小鼠 CSF 循环,观察移植后小鼠的生长发育情况,并在移植后 24 h、48 h、2 周及 10 周分别取脑行连续切片,通过荧光显微镜观察细胞存活及分布情况。结果 在移植后的不同时间点,脑室内均可见到大量 GFP 阳性细胞,部分移植细胞向脑实质迁移,穹窿海马伞、海马、胼胝体、隔区、室管膜下区及血管壁旁均可见到 GFP 阳性细胞。此外,在穿刺针道周围也可见 GFP 阳性细胞。所有接受 NSC 移植的小鼠的生长发育良好,未见任何行为学异常表现,经 10 周观察未发现移植的 NSC 有成瘤现象。结论 经侧脑室穿刺法移植的 NSC 可在宿主小鼠 CSF 循环良好存活,并具有向局部脑实质内迁移的能力。NSC 移植对小鼠的生长发育无明显影响,具有较好的安全性。

[关键词] 神经干细胞;脑脊液;移植;存活;迁移;小鼠

Survival and migration of neural stem cells in the brain of mice after ventricle transplantation WANG Li-ping, FAN Dong-sheng, WANG Yin-hua, et al. Department of Neurology, Peking University Third Hospital, Beijing 100083, China

[Abstract] **Objective** To investigate the survival and migration of the neural stem cells(NSC) in the cerebrospinal fluid(CSF) circle of mice after ventricle transplantation. **Methods** NSC labeled with green fluorescence protein(GFP) were implanted into the lateral cerebral ventricle of the mice. The mice were killed at time point of 24 h, 48 h, 2 weeks and 10 weeks after transplantation. The brain sections were observed and the behaviors of the mice were evaluated. **Results** GFP-positive cells were found in the lateral cerebral ventricle. Some of them migrated into the parenchyma and located in fimbria-fornix, hippocampus, corpus callosum, septum, subventricle zone and beside the blood vessels at the time point of 2 weeks and 10 weeks. There were no obvious complications occurred during operations which affected the outcome of growth and development. **Conclusion** NSC not only can survive, but also can migrate into the local parenchyma of the brain after ventricle transplantation. There were no obvious complications occurred after the transplantation of NSC.

[Key words] neural stem cell; cerebrospinal fluid; transplantation; survival; migration; mice

中图分类号:R741.05 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2005)05-0337-02

[本文著录格式] 王力平,樊东升,王荫华,等.神经干细胞脑脊液移植后存活及迁移规律研究[J].中国康复理论与实践,2005,11(5):337-338.

干细胞研究为神经系统变性病的治疗带来了新的希望。目前,国内外相关研究较多集中于干细胞立体定向注射法^[1-3],它对于病变部位明确而且局限的疾病较有意义,但对于诸如肌萎缩侧索硬化(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)、阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)等弥漫性变性疾病则有一定的使用限制。本研究旨在寻求一种新的细胞移植的治疗途径,将体外扩增并转染绿色荧光蛋白(GFP)^[4]的神经干细胞(NSC),采用侧脑室穿刺法注入 ICR 小鼠脑脊液循环内,研究了 NSC 在宿主脑内的存活、迁移以及移植

NSC 前后小鼠的生长发育情况,探讨这种细胞移植途径的有效性和安全性。

1 材料与方法

清洁级 ICR 小鼠 22 只(北京大学医学部动物实验中心提供),均为雄性,4 周龄,体重 (18 ± 2) g,随机分为 2 组:移植组 18 只,对照组 4 只。人源胚胎 NSC 细胞,绿色荧光蛋白(GFP)标记(北京大学干细胞中心提供)。

移植组小鼠以 2.5%戊巴比妥钠 100 mg/kg 麻醉后,置立体定向头架上,矢状缝右侧 1 mm,冠状缝后方 1 mm 颅骨钻孔,微型注射针穿刺右侧脑室。将 1×10^6 /ml 的 NSC 悬液 100 μ l 注入脑室,5 min 内缓慢撤出针头,骨蜡封闭骨孔,缝合切口。术后立即断头处死小鼠 2 只,取脑观察针道位置准确,符合预先设计要求。其余 16 只小鼠送回实验动物中心饲养。分别在移植后 24 h、48 h、2 周、10 周随机各取 4 只小鼠麻醉后,用 4%多聚甲醛灌注固定,取脑置 30%蔗糖溶液中过夜;连续冰冻切片,片厚 10 μ m,每间隔 5 片取 1 片,

基金项目:1. 国家 863 计划基金(2001 AA217161);2. 北京大学 211 工程基金资助课题。

作者单位:1. 100083 北京市,北京大学第三医院神经科(王力平、樊东升、王惠芳、宋红松、张俊);2. 100034 北京市,北京大学第一医院神经科(王荫华);3. 100083 北京市,北京大学干细胞中心(沈丽、王淑玲)。作者简介:王力平(1976-),女,北京市人,博士研究生,主要研究方向:运动神经元病的诊治。* 通讯作者:樊东升、王荫华。

作为一组切片,在荧光显微镜下观察 GFP⁺ 细胞的分布。

接受干细胞移植的小鼠与未接受移植的 4 只小鼠在相同环境中相同饲料喂养,过程中严密观察伤口愈合情况,进食、进水情况,活动状态及体重变化。

2 结果

操作过程中及操作完成后,所有小鼠一般状态良好,麻醉复苏后进食、进水正常,四肢活动正常。移植后 24 h 及 48 h 断头取脑,仅可在穿刺针道及脑室内见到大量 GFP⁺ NSC,未见移植细胞的明显迁移。移植 2 周后,除在穿刺针道及脑室内见到 GFP⁺ NSC 之外,还可见部分移植细胞向局部脑实质内迁移,主要发生在侧脑室和穿刺刺道周围。移植 10 周后,在穿刺针道及脑室内见到大量 GFP⁺ NSC,部分移植细胞向脑实质迁移,在穿刺刺道周围、穹隆海马伞、海马、胼胝体、隔区、室管膜下区及血管壁旁均可见到 GFP⁺ NSC(图 1)。

经 10 周观察,未发现移植的 NSC 在健康 ICR 小鼠脑内的成瘤现象。接受 NSC 移植的小鼠的生长发育情况同未接受移植的小鼠相比未见明显差异,其伤

口愈合好,进食、进水好,体重增加与对照组比较无显著性差异(图 2)。

3 讨论 NSC 是指具有分化为神经元、星型胶质细胞和少突胶质细胞的能力,能够自我更新并能够形成神经组织的细胞。本研究显示,NSC 可以在宿主小鼠脑室内较好地存活,并具有向脑实质内迁移的能力。

经侧脑室穿刺法移植的 NSC 由于直接突破血脑屏障,本研究显示可以进一步迁徙至脑实质中,并与宿主细胞在形态和功能上形成良好的整合,因此是一个干细胞移植的有效途径。经腰椎穿刺法移植 NSC 在理论上具有同样的效果,而后者可能是将来临床干细胞移植更为实用、简洁的有效途径。中枢神经系统变性疾病中,对于存在着广泛性病理改变而没有明确定位区域的疾病,NSC 所具有的这种迁徙能力使它得以通过直接移植到脑脊液循环中,在进一步迁徙整合过程中参与神经结构和功能的修复与重建。NSC 具有的免疫豁免性、良好的融合和迁徙能力,决定了其在移植后可能长期存活^[5]。本实验证实神经干细胞移植对

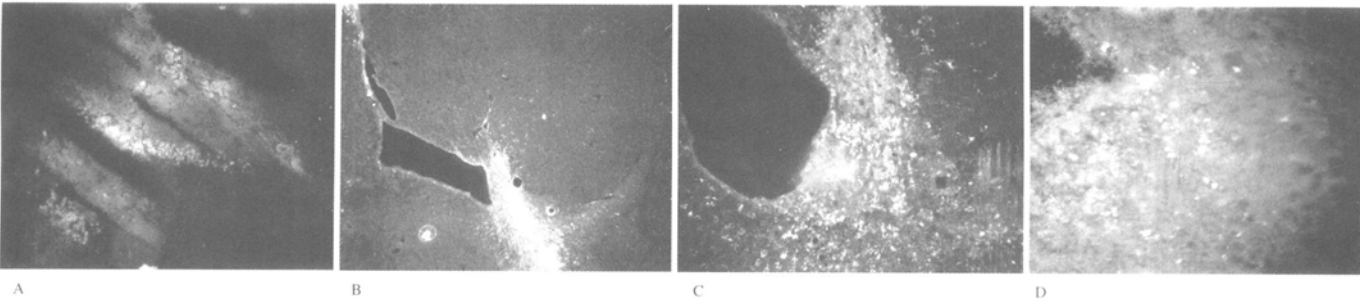
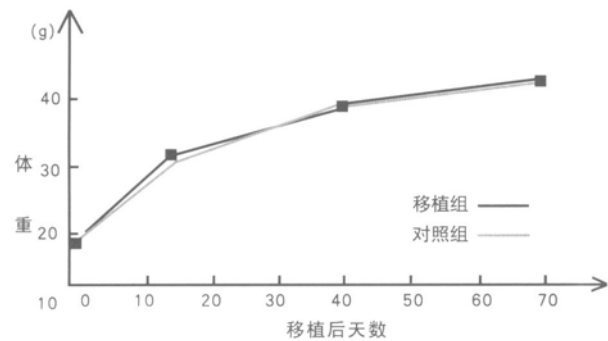


图 2 移植组及对照组小鼠体重增长曲线(移植后 2 周(4×);C:移植后 10 周(10×);D:移植后 10 周(20×)。



+ 细胞分布

[1]徐迎胜,樊东升.神经干细胞及其临床应用前景[J].神经疾病与精神卫生,2002,2:2-4.

[2]陈红,刘登华,张苏明.胚胎干细胞与再生医学:中枢神经系统疾病的展望[J].卒中与神经疾病,2004,2:125-127.

[3]Bjorkhrnd LM, Sanchez-Pernaute R, Chung S, et al. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99 (4):2344-2349.

[4]关云谦,陈彪,刘平等.干细胞脑内移植有效标记研究:绿色荧光蛋白标记的应用价值[J].中国临床康复,2004,13:2506-2508.

[5]Hori J, Ng TF, Shatos M, et al. Neural progenitor cells lack immunogenicity and resist destruction as allografts[J]. Stem Cells, 2003, 21(4):405-416.

(收稿日期:2005-01-13)