

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00678

• 短篇论著 •

# 神经干细胞移植抑制缺血再灌注大鼠脑内星形胶质细胞的激活和炎症反应

## Neural stem cell transplantation restrains astrocyte activation and inflammation in brain of rats with cerebral ischemia-reperfusion

赵宇<sup>1</sup>, 谢鹏<sup>1</sup>, 朱晓峰<sup>2</sup>, 蔡志友<sup>1</sup>

1. 重庆医科大学附属第一医院神经内科, 重庆 400016

2. 佳木斯大学神经科学研究所, 佳木斯 154007

**[摘要]** **目的** 观察神经干细胞(NSCs)移植对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织胶质纤维酸性蛋白(GFAP)和炎症因子(IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ )表达的影响,探讨其可能的作用机制。**方法** 大鼠随机分为脑组织缺血再灌注损伤模型组(MCAO组)和神经干细胞移植组(MCAO+NSCs组),每组16只,干细胞移植后进行神经功能损害评分(NSS),采用蛋白质免疫印迹法和免疫组织化学法检测脑组织GFAP表达,蛋白质免疫印迹法检测脑组织IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 的表达。**结果** 移植后2周、4周神经功能评分显示MCAO+NSCs组显著优于MCAO组( $P < 0.05$ );MCAO+NSCs组 Nestin、BrdU 阳性细胞数多于MCAO组( $P < 0.05$ ),GFAP 阳性细胞数显著少于MCAO组( $P < 0.05$ );MCAO+NSCs组 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  表达水平显著低于MCAO组( $P < 0.05$ )。**结论** NSCs移植可能通过抑制脑组织星形胶质细胞的激活、降低脑内炎症反应对大鼠缺血再灌注损伤脑组织发挥保护作用。

**[关键词]** 神经干细胞移植; 大脑中动脉阻塞; 胶质纤维酸性蛋白; 炎症

**[中图分类号]** R 743 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2010)06-0678-04

星形胶质细胞(astrocyte, AC)是中枢神经系统的免疫细胞,其被激活后会成为反应性AC,既具有保护神经元的作用<sup>[1]</sup>,也能分泌细胞毒因子、炎症因子、活性氧、活性氮等损害神经元<sup>[2-3]</sup>。炎症反应是缺血性脑组织损伤的主要病理机制,脑缺血损伤炎症反应早期出现的细胞因子是TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ ,抑制炎症是治疗脑血管疾病的主要策略之一。神经干细胞(neural stem cells, NSCs)具有一定的保护脑神经的功能,利用其替代受损的神经细胞具有重要的应用前景<sup>[4]</sup>。因此,本研究以脑缺血再灌注大鼠动物模型作为研究对象,观察NSCs移植对缺血再灌注脑损伤的影响,并探讨其可能的作用机制。

### 1 材料和方法

**1.1 主要仪器及试剂** TC2323型二氧化碳培养箱(美国Sheldon公司)、江湾IC型动物脑立体定向仪(上海奥尔科特生物有限公司)、CX-RFL-2 落射荧光显微镜(日本Olympus公司)、XSZ-D型倒置生物显微镜(重庆光学仪器厂)。DMEM/F-12、B<sub>27</sub>、D-Hanks液、胎牛血清购自美国Gibco公司;EGF、bFGF、NGF购自美国Sigma公司;多聚赖氨酸、小鼠抗BrdU、兔抗大鼠Nestin、免疫组化SABC试剂盒、DAB显色试剂盒、SABC-Cy3、SABC-FITC均购自武汉博士德生物工程有限公司。GFAP、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 多克隆抗体购自福建麦新生物科技有限公司。

**1.2 动物分组及处理** 新生24 h Wistar乳鼠、雄性Wistar大鼠(250~320 g)均购自佳木斯大学实验动物中心。雄性Wistar大鼠随机分为2组( $n=16$ ):脑组织缺血再灌注损伤模型组(MCAO组)和神经干细胞移植组(MCAO+NSCs

组)。

**1.3 MCAO模型的制备** 所有大鼠均参照文献<sup>[5-6]</sup>制备MCAO模型,将长6 cm,直径0.26 mm的尼龙鱼线一端于乙醇灯上加热成钝端,距此端19 mm处进行标记。在颈外动脉头端和颈总动脉近心端作结扎,在颈总动脉的近心端侧壁剪一小口,轻轻插入线栓向内向下经颈总动脉分叉处进入颈内动脉,插入17~19 mm,缺血2 h后退出线栓10 mm进行再灌注。大鼠清醒后,观察其体征:出现缺血同侧Horner征(同侧眼睑下垂、睑裂变小)和对侧神经功能缺损症状。神经功能缺损评分(neurological severity score, NSS)参照文献<sup>[7]</sup>:0分,无神经功能缺损症状;1分,不能伸展对侧前爪;2分,行走时向偏侧转圈;3分,行走时向偏侧倾倒;4分,不能自发行走,意识丧失。其中0分和4分者剔除,1、2、3分者为模型动物。动物完全苏醒后提尾悬空时梗死对侧前肢屈曲、内收,自主运动时身体向偏瘫侧转圈示意模型制备成功。术后广谱抗生素连用3 d,预防继发感染。

**1.4 脑内立体定向注射NSCs及神经功能情况评价** 体外分离、培养新生Wistar乳鼠海马NSCs, BrdU标记NSCs<sup>[8]</sup>。MCAO+NSCs组大鼠在MCAO制作24 h后进行NSCs移植治疗,10%水合氯醛麻醉,麻醉满意后将其置于立体定向架上,门齿固定器低于双耳水平(3.0 $\pm$ 0.3) mm,取10  $\mu$ l细胞悬液在立体定向下引导微量注射器向大鼠脑组织内匀速注射(1  $\mu$ l/min),注射部位:前囟右侧1.0 mm,前囟后方1.5 mm,微量注射器进针深度约5.6 mm,7 min后将微量注射器提高3.0 mm,继续注射3 min,停针15 min后缓慢拔出注射器。于移植后3 d及1、2、4周对各组动物进行NSS评分。

**[收稿日期]** 2009-11-17 **[接受日期]** 2010-03-31

**[作者简介]** 赵宇,博士,副主任医师. E-mail: wangpang0916@yahoo.com.cn

1.5 免疫组织化学染色 移植后第3天及1、2、4周分别分批处死各组动物,每次每组各4只。断头取脑,固定、梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋制成蜡块。视交叉后冠状位连续切片备用,片厚 $5\ \mu\text{m}$ 。将切片二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,将切片浸入 $0.01\ \text{mol/L}$ 枸橼酸盐缓冲液( $\text{pH}\ 6.0$ ),微波抗原修复后进行BrdU、Nestin、GFAP免疫组化检测。其中BrdU组将切片置于 $2\ \text{mol/L}$  HCl中室温浸泡60 min以使DNA变性暴露BrdU,一抗分别为 $1:200$ 的小鼠抗BrdU, $1:200$ 的兔抗Nestin, $1:200$ 的鼠抗GFAP。

1.6 蛋白免疫印迹检测 采用蛋白免疫印迹方法检测海马组织GFAP、IL- $1\beta$ 、TNF- $\alpha$ 蛋白含量。按 $10\ \text{ml/g}$ 的比例加入全细胞裂解液(Tris-HCl  $50\ \text{mmol/L}$ ,  $\text{pH}\ 7.5$ , EGTA  $2\ \text{mmol/L}$ , DTT  $2\ \text{mmol/L}$ , Na Pyrophosphate  $5\ \text{mmol/L}$ , KF  $50\ \text{mmol/L}$ , Okadaic acid  $5\times 10^5\ \text{nmol/L}$ ,  $0.5\%$  NP40,  $5\ \text{mg/L}$  each of leupeptin, aprotinin, pepstatin A, chymostatin),组织经匀浆、超声破碎后,用BCA法进行蛋白定量。 $10\%$ 的SDS-PAGE凝胶电泳,上样量为 $28\ \mu\text{g}$ 。电泳条件: $4^\circ\text{C}$ ,电流 $20\sim 30\ \text{mA}$ 。电泳结束后,进行蛋白转膜。转膜条件:采用孔径为 $0.22\ \mu\text{m}$ 的硝酸纤维素膜(NC), $4^\circ\text{C}$ ,电流 $400\ \text{mA}$ ,转膜3 h。杂交步骤如下: $10\%$ 脱脂牛奶封闭NC膜1 h, TYBS( $20\ \text{mmol/L}$  Tris-HCl,  $\text{pH}\ 7.5$ ;  $0.15\ \text{mmol/L}$  NaCl;  $0.05\%$  Tween 20)漂洗3次,每次10 min,然后室温下

与APP一抗( $1:3\ 000$ )杂交反应3 h, TTBS漂洗同前。再将NC膜与辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗( $1:5\ 000$ )杂交反应1 h。最后用TTBS漂洗NC膜3次,每次10 min,加入ECL试剂反应5 min,保鲜膜包裹,暗室进行X线胶片曝光、显影和定影。然后同一张NC膜再与 $\beta\text{-actin}$ ( $1:1\ 000$ )进行杂交反应,并获得蛋白印迹结果。条带经Gel-doc凝胶成像分析系统扫描处理,计算单位光密度值和条带面积,将各实验点的总光密度值与对照组比较,得到相对百分数。

1.7 统计学处理 计算染色后BrdU、Nestin阳性细胞的数目,每个动物自视交叉后随机取4张切片,每张染片随机计数10个非重叠视野( $\times 400$ )下的阳性细胞数;采用SPSS 13.0软件,各组数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析(one-way ANOVA)比较组间差异。

## 2 结果

2.1 移植前后NSS评分 结果(表1)表明:移植前各组NSS评分无统计学差异,MCAO模型所致的运动功能损害基本一致;细胞移植后3 d、1周,各组神经功能均有不同程度恢复,但组间NSS评分无统计学差异;移植后2周、4周,MCAO+NSCs组评分明显低于MCAO组,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。

表1 NSCs移植前后不同时间的NSS评分比较

组别	$(n=4, \bar{x}\pm s)$				
	0 d	3 d	1周	2周	4周
MCAO组	$6.9\pm 1.2$	$6.4\pm 1.0$	$5.6\pm 0.9$	$5.4\pm 0.8$	$5.3\pm 0.7$
MCAO+NSCs组	$6.9\pm 1.4$	$6.2\pm 1.2$	$5.5\pm 1.0$	$3.6\pm 0.5^*$	$3.5\pm 0.4^*$

\*  $P<0.05$ 与MCAO组相比

2.2 GFAP检测结果 蛋白免疫印迹检测结果(图1)表明:经过NSCs移植后,GFAP水平显著降低,从MCAO组的 $2.53\pm 0.25$ 降至MCAO+NSCs组的 $1.51\pm 0.27$ ( $P<0.001$ )。免疫组织化学染色结果(图2)表明:经过NSCs移植后,GFAP水平

显著降低,从MCAO组的 $4.72\pm 0.38$ 降至MCAO+NSCs组的 $2.52\pm 0.22$ ( $P<0.001$ );MCAO+NSCs组与MCAO组同时相点比较GFAP表达显著降低( $P<0.01$ )。模型组星形胶质细胞明显增生,NSCs移植后增生细胞数目显著减少。

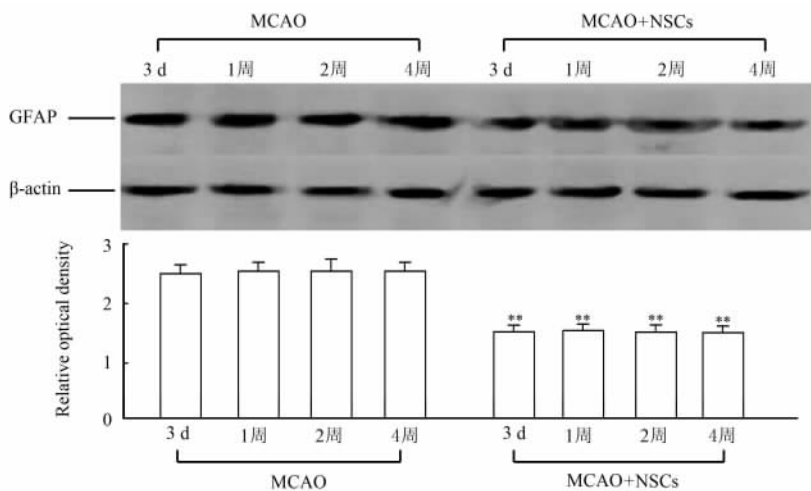


图1 蛋白免疫印迹检测GFAP表达

\*\*  $P<0.01$ 与同时时间点MCAO组相比; $n=4, \bar{x}\pm s$

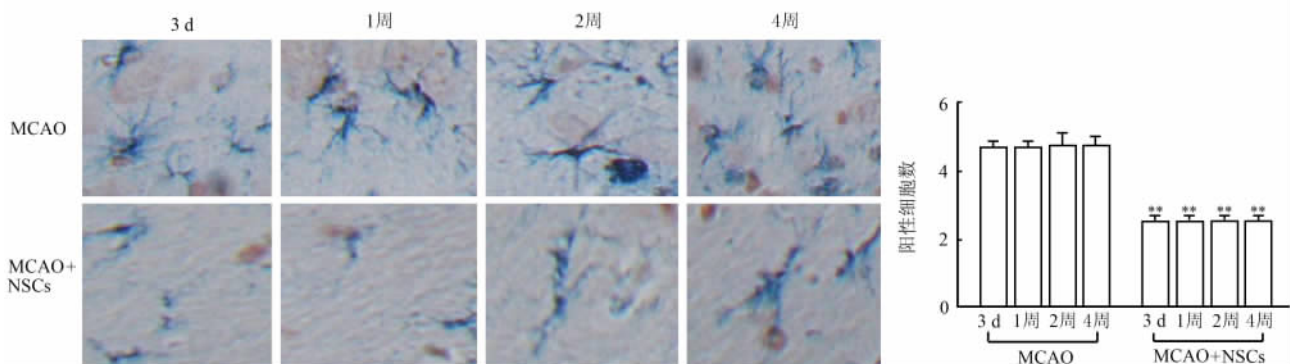


图 2 免疫组织化学法检测 GFAP 的表达

\*\*  $P < 0.01$  与同时时间点 MCAO 组相比;  $n = 4, \bar{x} \pm s$ . Original magnification:  $\times 400$

2.3 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的检测结果 蛋白免疫印迹检测结果 (图 3) 表明: NSCs 移植后, 海马组织 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平显著降低, IL-1 $\beta$  从 MCAO 组的  $2.48 \pm 0.21$  降至 MCAO+NSCs 组的  $1.63 \pm 0.24$  ( $P < 0.001$ ); TNF- $\alpha$  从 MCAO 组  $2.50 \pm$

$0.22$  降至 MCAO+NSCs 组  $1.48 \pm 0.23$  ( $P < 0.001$ ); MCAO+NSCs 组与 MCAO 组同时时间点比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

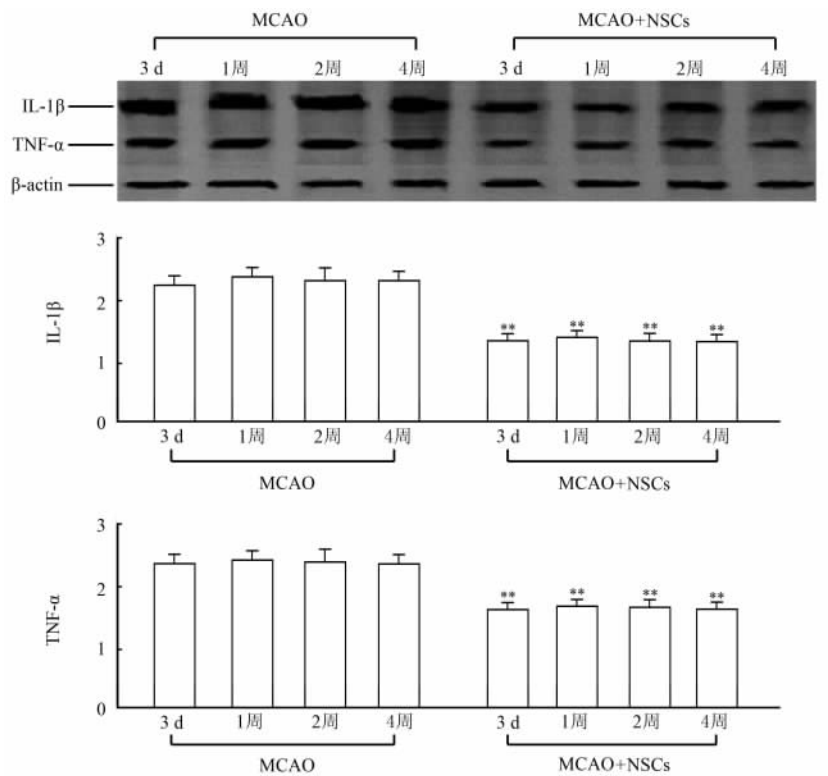


图 3 蛋白免疫印迹检测 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的表达

\*\*  $P < 0.01$  与同时时间点 MCAO 组相比;  $n = 4, \bar{x} \pm s$

### 3 讨论

GFAP 是星形胶质细胞中的一种标志蛋白, 参与神经元内环境的维持和血脑屏障。脑损伤的炎症中会出现以胶质纤维酸性蛋白为特征的纤维化<sup>[9]</sup>。本研究检测脑缺血再灌注损伤大鼠海马内 GFAP 的表达, 结果提示 NSCs 移植后, 与单纯模型组相比, GFAP 表达显著降低, 星形胶质细胞数目减少, 表明 NSCs 移植后可抑制星形胶质细胞的激活。

激活的星形胶质细胞能够释放炎症因子, 脑缺血再灌注脑内也有神经炎症的发生, 本研究检测脑缺血再灌注大鼠海马内炎症因子 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的表达, 结果提示 NSCs 移植后, 与 MCAO 组相比, IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的表达显著降低, 表明 NSCs 移植不仅可以抑制星形胶质细胞的激活, 还可抑制脑缺血再灌注大鼠脑内炎症。这与 NSCs 移植能够抑制脑缺血再灌注后神经炎症的发生相吻合。通过 NSCs 移植后, 与 MCAO 组相比, IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的表达显著降低, 表明 NSCs 移植对脑缺

血再灌注的脑保护作用可能是通过抑制星形胶质细胞的激活,抑制脑缺血再灌注大鼠脑内炎症这一途径实现的。

体外培养的 NSCs 移植到脑内后能够迁移分化为特定部位的神经细胞,其分化方向与所处的微环境密切相关,是由局部环境而不是 NSCs 自身的内在特性决定了移植细胞的最終命运,同时局部环境决定了移植细胞的分化表达<sup>[10]</sup>。利用 NSCs 进行临床治疗的实验已初步展开,将体外扩增的人类 NSCs 注射到老龄大鼠的侧脑室,数周后实验组 Morris 水迷宫测试认知能力得分明显高于对照组,表明外源性 NSCs 改善了老龄大鼠的认知能力<sup>[11]</sup>。神经功能评分也证实了 NSCs 移植可以明显改善神经缺损功能<sup>[12-13]</sup>。本研究通过神经功能评分也证实了 NSCs 移植后可以明显改善神经缺损功能,并且可以抑制 AC 激活和脑内炎症反应。

目前神经干细胞用于治疗中枢神经系统疾病仍处于研究的初级阶段,就神经干细胞的来源、分离、培养及鉴定还有许多工作要做,神经干细胞诱导、分化及迁移机制也有待进一步研究。相信随着对神经干细胞研究的进展和神经疾病发病机制的阐明,神经干细胞基因治疗一定有更好的应用前景。

#### [参考文献]

- [1] Li L, Lundkvist A, Andersson D, Wilhelmsson U, Nagai N, Parado A C, et al. Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2008, 28: 468-4681.
- [2] Hirko A C, Dallsen R, Jomura S, Xu Y. Modulation of inflammatory responses after global ischemia by transplanted umbilical cord matrix stem cells[J]. *Stem Cells*, 2008, 26: 2893-2901.
- [3] Wang L P, Cheung G, Kronenberg G, Gertz K, Ji S, Kempermann G, et al. Mild brain ischemia induces unique physiological properties in striatal astrocytes[J]. *Glia*, 2008, 56: 925-934.
- [4] Takahashi K, Yasuhara T, Shingo T, Muraoka K, Kameda M, Takeuchi A, et al. Embryonic neural stem cells transplanted in middle cerebral artery occlusion model of rats demonstrated potent therapeutic effects, compared to adult neural stem cells

[J]. *Brain Res*, 2008, 1234: 172-182.

- [5] Kawamura S, Li Y, Shirasawa M, Yasui N, Fukasawa H. Reversible middle cerebral artery occlusion in rats using an intraluminal thread technique[J]. *Surg Neurol*, 1994, 41: 368-373.
- [6] Renolleau S, Aggoun-Zouaoui D, Ben-Ari Y, Charriaut-Marlangue C. A model of transient unilateral focal ischemia with reperfusion in the P7 neonatal rat: morphological changes indicative of apoptosis[J]. *Stroke*, 1998, 29: 1454-1460.
- [7] Pereira B M, Weinstein P R, Zea-Longa E, el-Fiki M. Effect of blood flow rate and donor vessel diameter on the patency of carotid venous bypass grafts in dogs[J]. *Surg Neurol*, 1989, 31: 195-199.
- [8] 赵宇, 谢鹏, 朱晓峰, 蔡志友. 神经干细胞和神经生长因子联合移植对大脑中动脉阻塞大鼠的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2008, 28: 1123-1126.
- [9] Sizonenko S V, Camm E J, Dayer A, Kiss J Z. Glial responses to neonatal hypoxic-ischemic injury in the rat cerebral cortex[J]. *Int J Dev Neurosci*, 2008, 26: 37-45.
- [10] Qu T, Brannen C L, Kim H M, Sugaya K. Human neural stem cells improve cognitive function of aged brain[J]. *Neuroreport*, 2001, 12: 1127-1132.
- [11] Martinez-Serrano A, Fischer W, Söderström S, Ebendal T, Björklund A. Long-term functional recovery from age-induced spatial memory impairments by nerve growth factor gene transfer to the rat basal forebrain[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 6355-6360.
- [12] Capone C, Frigerio S, Fumagalli S, Gelati M, Principato M C, Storini C, et al. Neurosphere-derived cells exert a neuroprotective action by changing the ischemic microenvironment[J]. *PLoS One*, 2007, 2: e373.
- [13] 孙金娇, 曹云涛, 刘华庆, 邓卫安. 碱性成纤维细胞生长因子对新生鼠缺氧缺血性脑损伤的保护作用[J]. *中华儿科杂志*, 2007, 45: 354-359.

[本文编辑] 贾泽军

#### · 书 讯 ·

### 《中国药学年鉴 2009》已出版

本书由彭司勋主编,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-5481-0012-6,16开,定价:240.00元。

本书是我国唯一药理学专业年鉴,由全国著名药学专家、教授组成的编委负责编纂,中国工程院院士彭司勋教授任主编。本书对从事医药教学、科研、生产、使用、经营、管理的药学工作者有良好的参考价值。

该书由第二军医大学出版社出版发行科发行,全国各大书店均有销售。

通讯地址:上海市翔殷路800号,邮编:200433

邮购电话:021-65344595,65493093

<http://www.smmup.com>