

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00727

胚胎神经干细胞移植对大鼠脑创伤后认知功能障碍的影响

洪 军^{1*}, 崔建忠¹, 黎 洁², 周云涛², 刘兴宇¹

1. 河北医科大学附属唐山工人医院神经外科, 唐山 063000
2. 河北医科大学附属唐山工人医院中心实验室, 唐山 063000

[摘要] **目的** 探讨脑创伤后胚胎神经干细胞移植对大鼠认知功能障碍的影响。**方法** 成年雄性 SD 大鼠 80 只, 随机平均分成 4 组: 对照组、脑创伤组、脑创伤神经干细胞移植组和脑创伤 PBS 移植组。应用免疫组织化学方法观察伤后移植细胞在体内的分布和迁移, 同时检测海马局部脑组织中神经生长因子(NGF)、脑源性神经生长因子(BDNF)的表达; 采用 Morris 水迷宫实验评价大鼠伤后的空间学习记忆能力。**结果** 神经干细胞移植后 7、14、21 和 28 d, 移植区可检测到 BrdU 标记的阳性细胞。移植后 7、14 d 时神经干细胞移植组伤后海马及周边局部脑组织中 NGF 的光密度(IOD)值分别为 0.4954 ± 0.0134 、 0.5767 ± 0.0211 , BDNF 的 IOD 值分别为 0.4745 ± 0.0425 、 0.5563 ± 0.0321 , 较其他组增高($P < 0.05$); 神经干细胞移植组各时间点搜索安全岛逃避潜伏期较脑创伤组和 PBS 移植组有改善($P < 0.05$)。**结论** 胚胎神经干细胞移植后海马局部脑组织中神经营养因子表达发生改变, 对伤后认知功能障碍的恢复有着重要作用。

[关键词] 神经干细胞; 胚胎干细胞; 干细胞移植; 脑损伤; 认知功能

[中图分类号] R 651.15 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)07-0727-05

Influence of embryonic neural stem cell transplantation on cognitive dysfunction following traumatic brain injury in rats

HONG Jun^{1*}, CUI Jian-zhong¹, LI Jie², ZHOU Yun-tao¹, LIU Xing-yu¹

1. Department of Neurosurgery, Tangshan Worker's Hospital Affiliated to Hebei Medical University, Tangshan 063000, Hebei, China
2. Department of Central Laboratory, Tangshan Worker's Hospital Affiliated to Hebei Medical University, Tangshan 063000, Hebei, China

[Abstract] **Objective** To explore the influence of embryonic neural stem cell (ENSC) transplantation on learning and memory dysfunction after traumatic brain injury in rats. **Methods** A total of 80 adult male SD rats were randomly divided into control group, traumatic brain injury (TBI) group, traumatic brain injury and neural stem cell transplantation (TBI+NSC) group, traumatic brain injury and PBS transplantation (TBI+PBS) group. Immunohistochemistry was used to detect the distribution and migration of BrdU⁺ and the changes of nerve growth factor (NGF) and brain derived neurotrophic factor (BDNF) expression in the hippocampus following traumatic brain injury. The spatial cognitive functions of animals were examined by Morris water maze. **Results** ENSCs marked with BrdU were found in the hippocampus at 7, 14, 21, and 28 d after transplantation. Increased expression of NGF and BDNF proteins was found around the hippocampus in the TBI+NSC group, with the IOD values at day 7 being 0.4954 ± 0.0134 for NGF and 0.4745 ± 0.0425 for BDNF, and the values at day 14 being 0.5767 ± 0.0211 for NGF and 0.5563 ± 0.0321 for BDNF, which were significantly higher than those in other groups ($P < 0.05$). The escape latency of TBI+NSC group was significantly decreased compared with TBI and TBI+PBS groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Neurotrophic factors are changed in the hippocampus following transplantation of ENSCs, which is of great importance for the recovery of cognitive dysfunction following traumatic brain injury.

[Key words] neural stem cells; embryonic stem cells; stem cell transplantation; brain injuries; cognition

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(7): 727-731]

[收稿日期] 2012-06-03 **[接受日期]** 2012-07-01

[基金项目] 河北省科委指令项目(07276101D-49). Supported by the Mandatory Scientific Research Project of the Science and Technology Commission of Hebei Province(07276101D-49).

[作者简介] 洪 军, 博士, 副主任医师.

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0315-3722241, E-mail: hong1968jun@hotmail.com

创伤性脑损伤(traumatic brain injury, TBI)及其后遗症一直是危害人类健康的主要因素之一,其中伤后学习记忆功能障碍对人类的影响最为普遍和持久,目前尚缺乏有效的治疗手段。研究表明,海马作为学习和记忆信息通路中的必要结构,其在学习记忆的巩固方面发挥着重要作用^[1]。同时,海马作为脑损伤后的选择性易损区,伤后出现的神经细胞延迟性死亡是长期影响个体学习和记忆功能的主要因素之一^[2]。对中枢神经系统损伤或病变实行细胞替代治疗是近年来发展起来的并已成为较具前景的神经系统疾病治疗策略。神经干细胞(neural stem cells, NSCs)由于其自我更新、多向分化的特性,成为当前最具潜力的移植种子细胞。本研究应用大鼠胚胎 NSCs 进行伤后海马区移植,观察移植 NSCs 对学习、记忆功能恢复的影响,并初步探讨其相关的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组 SPF 级成年雄性 SD 大鼠 80 只(中国医学科学院实验动物中心提供),体质量(300±30)g。以随机数字表法分成 4 组:对照组、脑创伤组(TBI)、脑创伤 PBS 移植组(TBI+PBS)和脑创伤神经干细胞移植组(TBI+NSCs)。根据伤后检测时间不同,每组又分为移植后 7、14、21 和 28 d 共 4 个时相组,每组每个时间点 5 只大鼠。

1.2 脑创伤模型建立 10%水合氯醛(3 ml/kg)腹腔内注射,采用 Marmarou 方法^[3],用质量为 450 g、直径为 18 mm 的铜棒由 1.5 m 高度自由落下,造成大鼠中型闭合性脑创伤。对照组仅给予相应麻醉、头皮切开及缝合,不致伤。

1.3 鼠胚胎 NSCs 的增殖培养、分化鉴定和移植 从孕 12~14 d 胎鼠(中国医学科学院实验动物中心提供)分离海马组织并剪碎,用 0.25%胰酶和 0.125%胶原酶消化 15 min, D-Hanks 液清洗 2 次,将沉淀细胞重悬于增殖培养液[含 DMEM/F12(1:1)(美国 Gibco BRL 公司),2% B27(美国 Sigma 公司),100 U/ml 青霉素和链霉素(华北制药股份有限公司),20 ng/ml 表皮生长因子(EGF;美国 Gibco BRL 公司),10 ng/ml 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF,美国 Sigma 公司)]中。调整细胞密度至 1×10^5 /ml,接种于 75 cm² 培养瓶(丹麦 Nalge NUNC 公司),于 37℃、5% CO₂ 条件下进行培养。将传至第三代的神经球,加入含 10% 胎牛血清(美国 Roche 公司)的 DMEM/F12 培养液(不含任何生长因子)中行诱导分化。细胞接种培养 3 d 行神经元特异性烯醇化酶(NSE)免疫细胞化学染色,接种培养 7 d 分别

行胶质纤维酸性蛋白(GFAP)和微管相关蛋白(MAP-2)免疫细胞化学染色。弃去培养液,0.4% Triton X-100/TBS(美国 Amresc 公司)室温 10 min,10%驴血清(中国医学科学院血液研究所)室温孵育 1 h,4℃孵育过夜。0.1% Triton-PBS 洗涤 3 次/5 min,加 FITC 标记的二抗室温孵育 1 h。通过观察巢蛋白(nestin)、NSE、GFAP 和 MAP-2 的表达情况鉴定 NSCs 的增殖与分化。于移植前 3 d,加入 50 μmol/L BrdU(美国 Sigma 公司)标记增殖细胞。机械分离 NSCs,制备 10^6 (10 μl)单细胞悬液^[4]。伤后 3 d,参照大鼠脑立体定向图谱^[5],立体定向双侧海马区(坐标:A-3.5 mm,R,L 3.0 mm,H 4.5 mm)分别注射 NSCs 或 PBS 10 μl,注射速度 1 μl/min,留针 10 min,缓慢拔针后用医用生物蛋白胶(广州倍特生物技术有限公司)封闭。

1.4 免疫组化检测 于各时间点处死实验动物,经心灌流固定,分别行 BrdU、神经生长因子(nerve growth factor,NGF)、脑源性神经生长因子(brain-derived neurotrophic factor,BDNF)免疫组化检测(武汉博士德生物工程有限公司)。BrdU 阳性细胞核 DAB 染色呈棕褐色;NGF、BDNF 阳性 DAB 显色呈棕黄色。在高倍镜(×200)下每张切片随机计数 10 个视野 BrdU 阳性细胞数,计算阳性细胞密度;NGF、BDNF 阳性细胞镜检并照相,应用 Image-Pro-Puls 专业图像分析软件系统进行处理分析,测定其平均光密度(IOD)值^[6]。

1.5 行为学测试 Morris 水迷宫测试分成两个部分:(1)定位航行试验(place navigation):测试时大鼠从不同的象限入水,记录其寻找到平台所用的时间即为逃避潜伏期(escape latency),大鼠寻找到平台后休息 20 s,然后进行下一步测试。若大鼠在 180 s 内未能找到平台,则其逃避潜伏期记录为 180 s。(2)空间探索实验(probe trials):撤去水中平台,任选一个入水点将大鼠放入水中,记录大鼠在 90 s 内穿越原平台所在位置的次数,以在原平台所在象限停留的时间和搜索轨迹作为分析指标。

1.6 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 软件进行统计学分析。组间比较采用两独立样本双侧 *t* 检验,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 鼠胚胎 NSCs 的分离、分化和鉴定 取材分离的神经细胞呈圆球状,细胞饱满,折光性强,经原代培养至 7 d 左右传代。传代后部分细胞死亡,神经球数量逐渐增多,体积增大,细胞生长情况与原代相同,但成球速度明显加快。免疫组化染色显示神经

球中细胞多呈 nestin 染色阳性,为棕黄色,边缘整齐。体外诱导分化 7 d 后免疫荧光染色显示阳性分化细胞胞体及突起为绿色荧光。其中,NSE 阳性细

胞胞体较小、呈圆形,有 2~3 个细长突起;GFAP 阳性细胞胞体较大,形态不规则,突起较多;MAP-2 阳性细胞突起较少(图 1)。

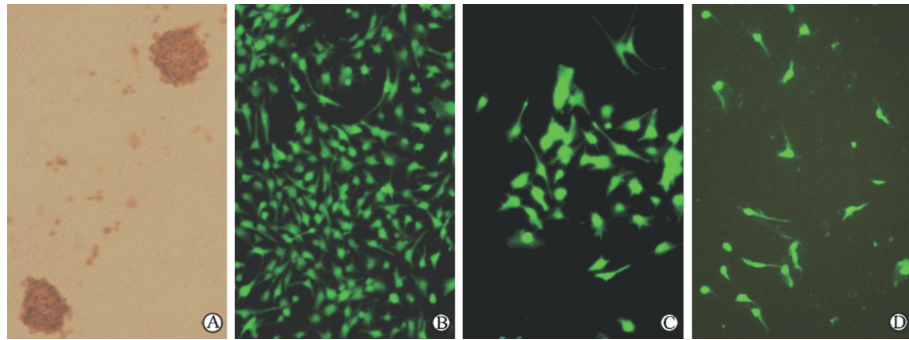


图 1 鼠胚胎 NSCs 的鉴定

Fig 1 Identification of mouse embryonic neural stem cells(NSCs)

A: *In vitro* cultured mouse embryonic neural stem cells showed positive expression of nestin (immunohistochemistry staining); B: Immunofluorescence staining shows a reaction of neuron specific enolase (NSE) *in vitro*; C: Immunofluorescence staining shows a reaction of glial fibrillary acidic protein (GFAP) *in vitro*; D: Immunofluorescence staining shows a reaction of microtubule-associated protein (MAP-2) *in vitro*. Original magnification: $\times 200$

2.2 免疫组化检测结果 对照组、TBI 组及 TBI+PBS 组未见 BrdU 阳性细胞。TBI+NSCs 组移植后 7、14、21 和 28 d 均可检测到 BrdU 阳性细胞(图 2),主要沿移植区和针道散在分布,随时间延长 BrdU 阳性细胞数逐渐减少(分别为 45.52 ± 2.51 、 38.64 ± 3.58 、 20.34 ± 3.23 、 15.65 ± 2.13),28 d 时可以观察到存活的 BrdU 阳性细胞向周围脑组织短距离迁移,与周围脑组织界限模糊。对照组仅有少量 NGF 和 BDNF 阳性表达;TBI 组和 TBI+PBS 组伤后可见 NGF 和 BDNF 表达增高,组间差异无统计学意义(表 1、表 2);TBI+NSCs 组与 TBI 组和 TBI+PBS 组比较,移植后 7 d 和 14 d 时 NGF 和 BDNF 阳性表达增高,组间差异有统计学意义($P < 0.05$,表 1、表 2)。

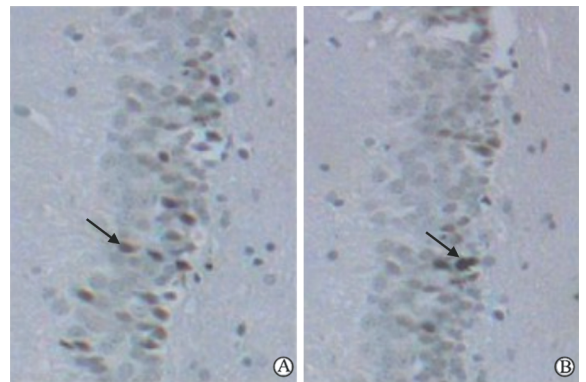


图 2 TBI+NSCs 组移植后 7 d(A)和 14 d(B)海马区 BrdU 阳性细胞

Fig 2 BrdU-labeled rat embryonic NSCs in the hippocampus of rats at 7 d (A) and 14 d (B) after transplantation

Arrows indicate neural stem cells (NSCs). Original magnification: $\times 200$

表 1 各组不同时间点海马区 NGF 的 IOD 值和阳性细胞数

Tab 1 NGF IOD and number of NGF positive cells in each group after transplantation

$n=5, \bar{x} \pm s$

Group	IOD			
	7 d	14 d	21 d	28 d
TBI	0.3168 ± 0.0118	0.4367 ± 0.0136	0.3016 ± 0.0141	0.2135 ± 0.0104
TBI+PBS	0.3053 ± 0.0127	0.4158 ± 0.0197	0.2939 ± 0.0133	0.2078 ± 0.0131
TBI+NSCs	$0.4954 \pm 0.0134^*$	$0.5767 \pm 0.0211^*$	0.3271 ± 0.0147	0.2645 ± 0.0156
Group	Positive number			
	7 d	14 d	21 d	28 d
TBI	69.3 ± 3.4	75.2 ± 3.7	68.0 ± 4.2	58.3 ± 4.6
TBI+PBS	67.5 ± 3.8	74.2 ± 4.3	67.7 ± 4.5	57.5 ± 5.2
TBI+NSCs	$85.0 \pm 6.5^*$	$97.5 \pm 10.6^*$	70.8 ± 5.0	60.4 ± 3.8

TBI: Traumatic brain injury; NSC: Neural stem cell; IOD: Integral optical density. * $P < 0.05$ vs TBI or TBI+PBS group

表 2 各组不同时间点海马区 BDNF 的 IOD 值和阳性细胞数

Tab 2 BDNF IOD and number of BDNF positive cells in each group after transplantation

$n=5, \bar{x} \pm s$

Group	IOD			
	7 d	14 d	21 d	28 d
TBI	0.275 2±0.013 9	0.365 7±0.018 2	0.234 1±0.015 7	0.186 9±0.012 8
TBI+PBS	0.283 4±0.014 7	0.382 6±0.021 7	0.242 3±0.017 9	0.198 1±0.011 3
TBI+NSCs	0.474 5±0.042 5*	0.546 3±0.032 1*	0.276 8±0.024 1	0.221 3±0.015 2

Group	Positive number			
	7 d	14 d	21 d	28 d
TBI	63.0±1.2	70.7±3.7	58.0±5.7	46.5±3.5
TBI+PBS	64.0±1.5	70.8±5.2	58.8±6.8	47.2±2.5
TBI+NSCs	80.5±4.5*	93.7±3.5*	60.0±7.5	50.0±4.6

TBI: Traumatic brain injury; NSC: Neural stem cell; IOD: Integral optical density. * $P<0.05$ vs TBI or TBI+PBS group

2.3 行为学检测结果 移植后 14、21 及 28 d, TBI 组和 TBI+PBS 组搜索安全岛逃避潜伏期较对照组明显延长, 组间比较差异有统计学意义 ($P<0.05$, 表 3); 探索路径显示, TBI 组和 TBI+PBS 组随时间的延长在搜索策略的改变上较对照组也不够理想, 表明大鼠伤后存在有空间学习记忆功能的损害。TBI+NSCs 组各时间点搜索安全岛逃避潜伏期较 TBI 组和 TBI+PBS 组有明显改善, 组间比较差异有统计学意义 ($P<0.05$, 表 3)。

表 3 各组不同时间点 Morris 水迷宫测试逃避潜伏期值

Tab 3 Escape latencies in Morris water maze test at different time points in each group

$n=5, \bar{x} \pm s, t/s$

Group	Time after transplantation t/d		
	14	21	28
Control	52.27±1.54	23.04±3.23	20.93±1.61
TBI	99.31±0.97*△	72.86±2.57*△	52.35±1.72*△
TBI+PBS	98.72±0.81*△	70.44±2.16*△	48.27±1.71*△
TBI+NSCs	67.65±1.31*	49.20±0.12*	39.86±1.58*

TBI: Traumatic brain injury; NSC: Neural stem cell. * $P<0.05$ vs control group; △ $P<0.05$ vs TBI+NSCs group

3 讨论

脑创伤常常造成程度不同的神经功能障碍, 临床上主要表现为运动功能降低以及学习记忆能力减退, 其中认知功能的损害是伤后最为常见的脑神经功能障碍。本实验中, 大鼠移植后 14 d 时表现出有空间学习记忆能力的下降, 28 d 时与对照组差异仍有统计学意义 ($P<0.05$), 表明这种功能障碍在伤后存有长期的病理基础。研究证实, 脑创伤后兴奋性氨基酸过度释放、钙离子超载、生长因子剥夺以及即早基因 c-fos 的过度表达等均可引发神经细胞的延迟性缺失, 该过程涉及多种病理生理改变并可导

致长期的神经功能障碍^[7-8]。

目前脑创伤后期治疗主要包括神经功能康复训练以及神经营养药物的应用, 虽然显示了一定的效果, 但是作用甚微, 很难达到修复受损神经元、恢复突触联系的目的。NSCs 具有能够长期保持自我分裂、分化的能力以及对环境变化产生反应的特性, 为其中枢神经系统损伤治疗中的应用提供了理论依据。创伤性脑损伤可以激活内源性 NSCs 进行增殖和分化。但是, 由于 NSCs 自身数量以及伤后调节迁移、分化、成活、轴突延伸和突触形成细胞因子的不足, 内源性的修复作用十分有限。因此, 外源性 NSCs 移植以及移植后能否在宿主内长期存活成为研究的重点。有研究表明, 创伤后 2 d 是脑组织炎症反应的高峰阶段, 该反应在损伤灶及损伤区周边表现最为明显^[9]。此外, 伤后早期炎症反应后伴随的脑内巨噬细胞浸润、星形胶质细胞增殖也阻碍了移植细胞的生存、迁移和分化^[10]。本实验中, 我们选择伤后 3 d 进行 NSCs 脑内移植, 认为这一时机既可以避免急性期炎症反应对移植体的过度破坏, 又可以减轻随之的脑内胶质细胞增殖对移植 NSCs 的影响。NSCs 移植 7 d 后, 我们检测到 BrdU 阳性细胞, 主要位于海马移植区并沿针道散在分布。BrdU 阳性细胞数量随时间呈现逐渐下降的趋势, 这可能与移植后期细胞的吞噬以及细胞分裂后标记的减弱有关。此外, 28 d 时可以观察到存活的 BrdU 阳性细胞出现短距离迁移, 与周围脑组织界限模糊, 该结果与 Boockvar 等^[11]的研究相符, 表明脑创伤后移植 NSCs 能够度过机体的急性期反应而在受体长期存活, 并且与移植部位脑组织形成一定联系。

神经营养因子 NGF、BDNF 在神经细胞的存活、分化、可塑性、突触形成以及损伤后的再生、修复等方面发挥着重要作用^[12]。研究证实 NGF、BDNF 能够抑制脑创伤后神经细胞的延迟性坏死和凋亡,

促进相应运动及学习、记忆功能障碍的恢复^[13]。在新生大鼠脊髓损伤后植入神经前体细胞,通过体外培养能够分泌 NGF、神经营养因子 3(neurotrophin-3, NT-3)和 BDNF,并且促进皮质脊髓束神经纤维的结构重建^[14]。正常脑组织中 NGF 和 BDNF 表达很少,但在缺血和创伤等病理条件下,表达明显增加^[15]。本实验中,NSCs 移植组 7、14 d 海马结构附近脑组织 NGF 和 BDNF 的表达与对照组比较增强,推测损伤脑组织周边及移植 NSCs 自身可能存在某些细胞因子的旁分泌或自分泌作用,在损伤局部的微环境条件下促进了神经营养因子的表达。NSCs 移植组于 14、21 和 28 d 时空间学习记忆能力的恢复要好于创伤组($P < 0.05$)。我们的前期工作^[2,8]发现学习记忆功能的恢复要先于海马损伤脑组织解剖结构的恢复,该机制与伤后早期神经营养因子的保护作用包括上调部分与学习、记忆相关的即早基因如 c-fos 基因的表达有着密切关系,而在损伤后期功能的恢复则可能主要依赖于海马区缺失神经细胞数目的补充以及与周围神经组织的细胞整合。

本研究结果表明,脑创伤后胚胎 NSCs 可以在移植部位存活,局部微环境中的神经营养因子 NGF 和 BDNF 在 NSCs 移植后表达的改变对伤后大鼠学习、记忆功能的恢复有着重要作用,有关机制尚需进一步明确。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Da Silva W C, Bonini J S, Bevilaqua L R, Medina J H, Izquierdo I, Cammarota M. Inhibition of mRNA synthesis in the hippocampus impairs consolidation and reconsolidation of spatial memory[J]. *Hippocampus*, 2008, 18: 29-39.
- [2] Hong J, Cui J Z, Zhou Y T, Gao J L. Study on cognition disorder and morphologic change of neurons in hippocampus area following traumatic brain injury in rats[J]. *Chin J Trauma*, 2002, 5: 36-39.
- [3] Marmarou A, Foda M A, van den Brink W, Campbell J, Kita H, Demetriadou K. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics[J]. *J Neurosurg*, 1994, 80: 291-300.
- [4] An Y H, Wang H Y, Gao Z X, Wang Z C. Differentiation of rat neural stem cells and its relationship with environment[J]. *Biomed Environ Sci*, 2004, 17: 1-7.
- [5] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates; hard cover edition[M]. 6th ed. New York: Academic Press, 2007: 167-180.
- [6] Stanzel R D, Lourenssen S, Blennerhassett M G. Inflammation causes expression of NGF in epithelial cells of the rat colon[J]. *Exp Neurol*, 2008, 211: 203-213.
- [7] Tweedie D, Milman A, Holloway H W, Li Y, Harvey B K, Shen H, et al. Apoptotic and behavioral sequelae of mild brain trauma in mice[J]. *J Neurosci Res*, 2007, 85: 805-815.
- [8] 周云涛,洪军,崔建忠,高俊玲.海马区 c-fos 基因表达在大鼠脑创伤后认知功能障碍中的作用[J]. *中华创伤杂志*, 2009, 25: 988-991.
- [9] Shah S K, Jimenez F, Walker P A. Neural progenitor cells for traumatic brain and spinal cord injury: endogenous cell rescue versus replacement mechanisms[M]//Cox C S. *Stem cell biology and regenerative medicine: progenitor cell therapy for neurological injury*. Totowa: Humana Press Inc. 2011: 69-95.
- [10] Molcanyi M, Riess P, Bentz K, Maegele M, Hescheler J, Schäfer B, et al. Trauma-associated inflammatory response impairs embryonic stem cell survival and integration after implantation into injured rat brain[J]. *J Neurotrauma*, 2007, 24: 625-637.
- [11] Boockvar J A, Schouten J, Royo N, Millard M, Spangler Z, Castelbuono D, et al. Experimental traumatic brain injury modulates the survival, migration, and terminal phenotype of transplanted epidermal growth factor receptor-activated neural stem cells[J]. *Neurosurgery*, 2005, 56: 163-171.
- [12] Nagahara A H, Tuszynski M H. Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, 10: 209-219.
- [13] Kim H J, Lee J H, Kim S H. Therapeutic effects of human mesenchymal stem cells on traumatic brain injury in rats: secretion of neurotrophic factors and inhibition of apoptosis[J]. *J Neurotrauma*, 2010, 27: 131-138.
- [14] Kamei N, Tanaka N, Oishi Y, Hamasaki T, Nakanishi K, Sakai N, et al. BDNF, NT-3, and NGF released from transplanted neural progenitor cells promote corticospinal axon growth in organotypic cocultures[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2007, 32: 1272-1278.
- [15] 李国彰. *神经生理学*[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 202-205.

[本文编辑] 商素芳