

羊膜上皮细胞移植治疗脑缺血缺氧新生大鼠****

刘红敏, 陈旭东, 华新宇

Transplantation of human amniotic epithelial cells in treating neonatal rats with hypoxic-ischemic brain encephalopathy

Liu Hong-min, Chen Xu-dong, Hua Xin-yu

Abstract

BACKGROUND: The previous studies showed that transplantation of human amniotic epithelial cells (hAECs) could improve neurological function, but the mechanism is unclear.

OBJECTIVE: To explore the effects on neural stem cells and the expression of Neurogranin (Ng) of neonatal rats with hypoxic-ischemic encephalopathy, and the therapeutic effects of transplantation of human amniotic epithelial cells (hAECs).

METHODS: Forty-six rats were randomly divided into sham operation control, model group, transplantation group. The 1×10^{12} /L hAECs and PBS were respectively injected into the cerebral ventricle of the transplantation group and model group, and sham operation group did not treated.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with model group, the neurological function was significantly improved in the transplantation group, NSE positive cells were detected in the transplantation group rat brains at 3 weeks following transplantation, Ng proteins expression in the model group was significantly lower than the sham operation group and the transplantation group at 3 weeks following transplantation. nestin proteins expression in the model group was higher than that in the sham operation group and lower than that in the transplantation group. Results indicated that hAECs injected into the cerebral ventricles could reduce the hypoxic-ischemic injury to neurons and improve neurological function. The mechanism was maybe achieved by autogenous neural stem cell proliferation, differentiation and synaptic regeneration stimulated by hAECs and its secretion.

Liu HM, Chen XD, Hua XY. Transplantation of human amniotic epithelial cells in treating neonatal rats with hypoxic-ischemic brain encephalopathy. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(1): 95-98.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 研究表明移植羊膜上皮细胞可改善神经功能,但其作用机制尚不清楚。

目的: 观察缺氧缺血对新生大鼠神经干细胞和神经颗粒素表达的影响,及羊膜上皮细胞移植后对其治疗作用。

方法: 建立缺氧缺血性脑损伤模型,46只SD大鼠随机抽签法分为3组,移植组和模型组缺血缺氧后经侧脑室分别注入 $1 \times 10^{12} L^{-1}$ 人羊膜上皮细胞悬液和PBS治疗;假手术组注射等量的生理盐水。

结果与结论: 移植组大鼠神经功能较模型组明显改善,移植后第3周脑切片检出NSE阳性细胞存在,神经颗粒素在第3周的表达模型组低于假手术组,移植组较模型组增加;而nestin结果显示模型组较假手术组增加,移植组较模型组增加。提示羊膜上皮细胞移植入脑缺血缺氧大鼠脑内后,可减轻缺氧缺血后神经元的损伤,改善神经功能,其机制可能是注射入侧脑室的细胞促进自体神经干细胞的增殖分化和突触再生而实现的。

关键词: 人羊膜上皮细胞; 缺血缺氧性脑病; 神经颗粒素; 神经干细胞; 大鼠

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.01.020

刘红敏, 陈旭东, 华新宇. 羊膜上皮细胞移植治疗脑缺血缺氧新生大鼠[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(1):95-98.
[http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

新生儿缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)为足月儿在围产期缺氧窒息而导致脑的缺氧缺血损害(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD),往往引起新生儿死亡,脑性瘫痪,智力低下等,近年国内外研究证实羊膜上皮细胞移植治疗神经系统疾病有肯定的疗效^[1],但其作用机制尚未完全明确。

神经颗粒素(neurogranin, Ng)是突触可塑性相关分子之一,实验观察移植人羊膜上皮细

胞(human amniotic epithelial cells, hAECs)对脑缺血缺氧新生大鼠脑皮质nestin及Ng表达的影响,为hAECs应用于缺氧缺血性脑病的治疗提供理论依据。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2009-09/2010-12在漯河医专分子医学实验中心完成。

材料: 健康7 d龄SD大鼠46只,雌雄不拘,体质量12~14 g,由郑州大学实验动物中心提供。

Department of Histology and Embryology, Luohe Medical College, Luohe 462002, Henan Province, China

Liu Hong-min★, Master, Associate professor, Department of Histology and Embryology, Luohe Medical College, Luohe 462002, Henan Province, China
lhliuhongmin@yahoo.com.cn

Supported by: the Health Bureau of Henan Province, No. 2010C310003*; Program of Luohe Medical College, No. 2009-LMC-S08*; the Foundation for University Key Teacher of Henan Province, No. 2010GGJS-289*

Received: 2011-05-17
Accepted: 2011-07-08

漯河医学高等专科学校组织胚胎学教研室,河南省漯河市 462000

刘红敏★,女,1972年生,河南省禹州市人,汉族,河南大学生物专业毕业,硕士,副教授,主要从事发育神经生物学研究。
lhliuhongmin@yahoo.com.cn

中图分类号:R394.2
文献标识码:B
文章编号:1673-8225 (2012)01-00095-04

收稿日期:2011-05-17
修回日期:2011-07-08
(20110317024/NVL·W)

主要试剂:

试剂	来源
hAECs WISH 细胞株	中国科学院上海生命科学研究所
兔抗鼠 Neurogranin	Santa Cruz Biotechnology
兔抗鼠 nestin	北京博奥森
胎牛血清	杭州四季青生物工程材料有限公司
胰酶	Sigma 公司
MEM 培养基	美国 Gibico 公司
小鼠抗人 NSE、兔抗鼠 SP-Kit 检测试剂盒、羊抗兔 SP-Kit 检测试剂盒、DAB 显色试剂盒(棕黄色)	北京中杉金桥生物工程公司

实验方法:

动物模型的制作和细胞移植: 参照Rice法^[2-3], 建立缺血缺血性脑损伤模型, 46只SD大鼠随机抽签法分为3组, 移植组($n=18$): 缺血缺氧后3 d, hAECs悬液5 μL (浓度 $1 \times 10^{12} \text{ L}^{-1}$)注入缺血缺血侧脑室(注射坐标: 前囟后方0.8 mm, 左侧旁开1.0~1.5 mm, 颅骨水平以下3.5~4.0 mm)。模型组($n=18$): 结扎左侧颈总动脉并结合低氧(体积分数8%氧), 侧脑室注射5 μL PBS。假手术组($n=10$): 分离左侧颈总动脉不结扎不做缺氧处理, 予脑室注射等量生理盐水。

行为学评价: 分别于移植前、移植后每周进行1次行为学评价, 直到3周。行为评分参考Zea Longa的5分制评分标准: ①0分: 正常, 无神经损伤症状。②1分: 对侧前爪部分屈曲或完全屈曲。③2分: 向偏瘫侧转圈。④3分: 向偏瘫侧倾倒。⑤4分: 不能自发行走, 意识丧失。

免疫组织化学检测、结果分析与判断: 移植后3周经40 g/L多聚甲醛灌注固定取材。对脑组织进行修块, 常规石蜡包埋, 以海马为观察点, 保证各组标本选取的位置一致, 经海马冠状切面切片(片厚4 μm), 各切片作抗人NSE、抗鼠Ng、抗鼠nestin免疫组织化学染色。在400倍显微镜下观察海马齿状回, 前脑皮质区取3个7 $\text{cm} \times 5 \text{ cm}$ 大小的不同视野用ImagePro-Plus6.0(IPP6.0)图像分析软件进行分析, 取其平均值, 作为该切片的数值, IPP6.0软件图像分析。

主要观察指标: 移植前后大鼠神经行为变化; 免疫组织化学法检测脑NSE阳性细胞、Ng、nestin的表达。

统计学分析: 由第二作者采用SPSS 11.0软件完成统计处理, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 纳入SD新生大鼠46只, 因手术失败, 10只造模后死亡, 其中移植组死亡4只, 模型组死亡5只, 假手术组死亡1只, 其余36只完成实验过程。

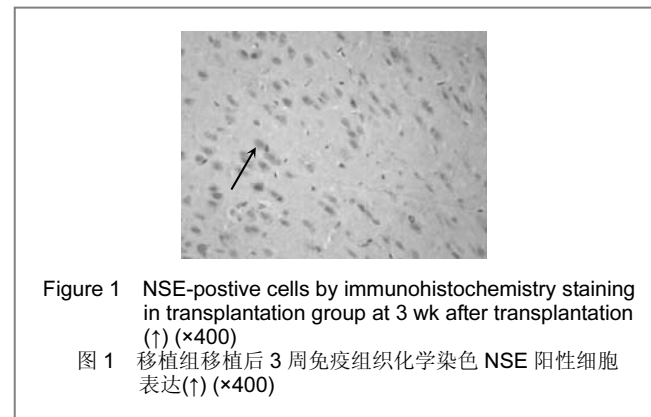
2.2 各组大鼠神经功能比较 移植前各组大鼠神经功能评分0分, 移植后大鼠神经评分(1.90 ± 0.58)分, $P < 0.05$, 示造模成功。移植后第3周神经评分与相应模型组相比明显减少, 差异有显著性意义($P < 0.05$), 见表1。

表 1 各组大鼠不同时间神经行为功能评分比较
Table 1 Neurobehavioral function scores of rats in each group at different time points ($\bar{x} \pm s$, score)

Group	n	1 wk	2 wk	3 wk
Sham operation	9	0	0	0
Model	13	1.97 ± 0.51	1.81 ± 1.10	1.69 ± 0.62
Transplantation	14	1.90 ± 2.11	1.46 ± 1.14^a	0.82 ± 2.20^a

^a $P < 0.05$, vs. model group

2.3 NSE免疫组织化学检测 移植组3周抗人NSE免疫组织化学染色见少数胞质染色呈黄褐色, 主要散在病变区脑组织, 见图1。



2.4 nestin和Ng蛋白免疫组织化学检测 nestin和Ng均为胞浆着色, Ng为胞浆轴突着色, 呈棕黄色, 移植组和假手术组脑皮质Ng蛋白阳性表达均高于模型组, 细胞染色增强, 数量增多, 见图2。

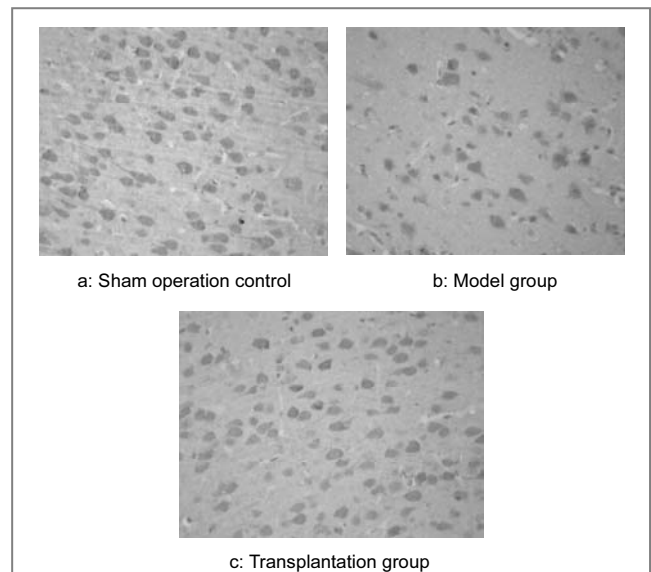


Figure 2 Expression of neurogranin by immunohistochemistry staining in each group ($\times 400$)
图 2 免疫组织化学检测各组 Ng 阳性表达($\times 400$)

而nestin结果显示模型组较假手术组增加, 移植组较模型组增加, 见图3, 各组阳性细胞值见表2。

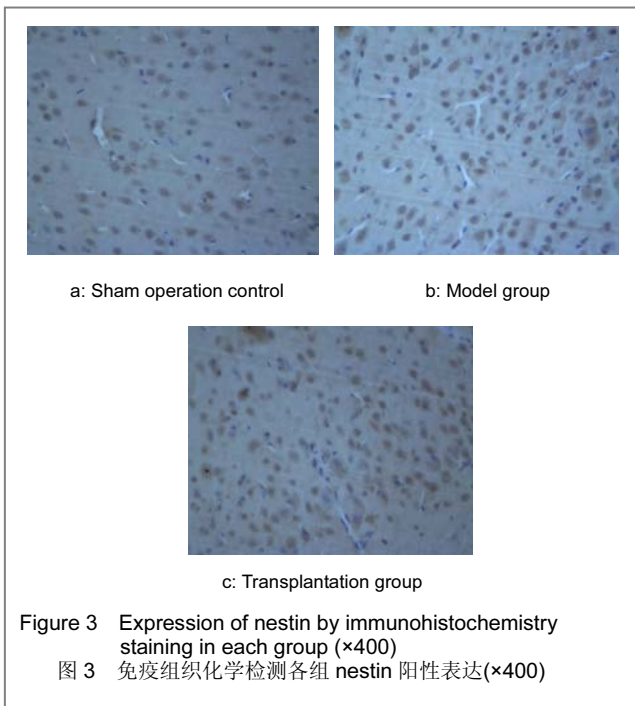


表2 各组 nestin、Ng 免疫组织化学阳性细胞表达
Table 2 Integral absorbance (IA) of nestin and neurogranin expression in the cytoplasm of positive cells in each group by immunohistochemistry staining ($\bar{x} \pm s$, IA)

Group	nestin	Neurogranin
Sham operation	13.52 \pm 1.59	21.61 \pm 2.56
Model	16.20 \pm 1.36 ^a	13.52 \pm 1.97 ^a
Transplantation	19.13 \pm 1.87 ^b	17.39 \pm 2.23 ^b

^a $P < 0.05$, vs. sham operation group; ^b $P < 0.05$, vs. model group

3 讨论

近年来研究证明hAECs具有部分胚胎干细胞特性^[4-5], 可分化为3个胚层不同类型的细胞^[6-11], 且有足够细胞数量, 因此hAECs可作为移植的前体细胞来源。人羊膜WISH细胞来源于正常足月妊娠的hAECs, 对研究hAECs的生物学特性有重要作用^[12], 也是体外研究羊膜上皮细胞生物特性及其功能调节的有效实验模型。

蔡哲等^[13]研究表明羊膜组织中存在神经干细胞特异性标记蛋白Nestin表达阳性细胞, 而且其中存在已分化的神经元和胶质细胞; 课题前期研究中观察到羊膜上皮细胞经诱导后大部分分化为神经元样细胞, 实验中观察到移植组鼠脑组织抗人NSE阳性物质的存在, 提示hAECs移植入鼠脑后能存活, 并可分化为神经元, 但移植的羊膜细胞是否具有神经细胞的生理功能, 能否合成分泌神经递质, 与其他细胞和组织建立突触联系, 传递和接受神经冲动从而具有神经细胞的生理功能, 目前正

进行此研究。

已有研究表明, 神经干细胞增殖分化受自身和外来信号两种机制的影响^[14-15], 神经系统对缺血缺氧最为敏感, 脑缺血缺氧必然影响神经干细胞的增殖分化, 神经干细胞的增殖分化是神经系统损伤修复的关键步骤。实验结果显示模型组nestin的表达较假手术组增多, 移植组nestin的表达较模型组增加。说明移植hAECs后缺氧缺血性脑损伤大鼠脑皮质自身神经干细胞增生, 这与前期的研究结果缺氧导致神经干细胞增殖结果一致^[16]。

Ng作为一种神经元特异性蛋白, 主要在前脑皮质、海马CA1和CA3区、齿状回、纹状体和杏仁核中高表达, 并常见于这些区域的神经元胞体和树突^[17-18]。Ng基因高表达的这些部位是学习和记忆功能重要的脑结构基础, Ng基因主要在树突棘中表达则表明它可能参与突触可塑性的调节, 学习记忆与突触可塑性有关。Li等^[19]研究表明大鼠大脑中动脉阻塞可导致同侧大脑半球广泛性的Ng染色缺失。上述结果提示, Ng是外伤性和缺血性脑组织损害等多种中枢神经系统疾病引起大脑病理改变所涉及的物质基础之一。实验结果显示移植组大鼠神经功能评分较模型组大鼠减少, 说明移植hAECs后缺氧缺血性脑损伤大鼠神经功能有明显改善, 日本学者Sakuragawa等研究发现在一定的培养条件下, hAECs可合成释放神经营养因子3、神经生长因子、脑源性神经营养因子、IF-1、IF-4、IF-6等多种因子, 这些因子可调节神经干细胞的增殖、分化^[20-21]。其中碱性成纤维细胞生长因子、神经生长因子、脑源性神经营养因子等神经营养因子可以减少脑缺血后缺血半影区神经细胞丢失^[22]。课题前期的研究显示脑缺血缺氧可导致新生鼠脑海马区神经元的丢失, 而移植羊膜上皮细胞可对神经元起到保护作用, 推测移植的羊膜上皮细胞可能通过分泌营养因子对神经细胞起到保护作用, 实验结果显示, 与假手术组相比, 模型组脑皮质区Ng阳性细胞数明显减少, 与Li的研究结果一致, 移植组脑Ng阳性物质表达比模型组明显增多, 提示hAECs对缺血缺氧后脑起到保护作用。可能因为经过羊膜细胞治疗后Ng的表达呈高水平状态, 促进轴突的再生, 以恢复突触的正常传递功能, 以致神经细胞之间形成的突触联系也增多(因为Ng在神经突触的形成中发挥重要作用^[23]), 从而改善了神经功能。

4 参考文献

- [1] Li XD, Hui GZ, Wu ZY, et al. Zhonghua Shenjing Waike Zazhi. 2007;23(2):149-152.
李向东, 惠国祯, 吴智远, 等. 人羊膜上皮细胞移植治疗灵长类动物脊髓损伤的实验研究[J]. 中华神经外科杂志, 2007, 23(2):149-152.
- [2] Vannucci RC, Conner JR, Mnager DT, et al. Ratmodelofperinatal hypoxic-ischemic brain damage. J Neurosci Res. 1999;55(2):158-163.
- [3] Lian JL, Yu Q, Wang Y. Xiandai Zhongxiyi Jiehe Zazhi. 2007;16(27): 3947-3950.
连俊兰, 余勤, 王艳. 幼年大鼠缺氧缺血性脑病动物模型的研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2007, 16(27):3947-3950.

- [4] Miki T, Lehmann T, Hongbo C, et al. Stem Cell Characteristics of Amniotic Epithelial Cells. *Stem Cells*. 2005;23(10):1549-1559.
- [5] Ilancheran S, Michalska A, Peh G, et al. Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. *Biol Reprod*. 2007;77(3):577-588.
- [6] Kakishita K, Elwan MA, Nakao N, et al. Human amniotic epithelial cells produce dopamine and survive after implantation into the striatum of a rat model of Parkinson's disease: a potential source of donor for transplantation therapy. *Exp Neurol*. 2000;165(1):27-34.
- [7] Wei JP, Zhang TS, Kawa S, et al. Human amnion-isolated cells normalize blood glucose in streptozotocin-induced diabetic mice. *Cell Transplant*. 2003;12(5):545-552.
- [8] Takashima S, Ise H, Zhao P, et al. Human amniotic epithelial cells possess hepatocyte-like characteristics and functions. *Cell Struct Funct*. 2004;29(3):73-84.
- [9] Zhang L, Fang N, Chen DX, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008;12(3):401-405. 张路, 方宁, 陈代雄, 等. 人羊膜细胞有向心肌样细胞分化的特性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(3):401-405.
- [10] Lu Y, Hui GZ, Wu ZY, et al. Transformation of human amniotic epithelial cells into neuron-like cells in the microenvironment of traumatic brain injury in vivo and in vitro. *Neural Regen Res*. 2011;6(10):744-749.
- [11] Xue SR, Yang XX, Dong WL, et al. Monoamine alterations and rotational asymmetry in a rat model of Parkinson's disease following lateral ventricle transplantation of human amniotic epithelial cells. *Neural Regen Res*. 2009;4(12):1007-1012.
- [12] Rosenstein JM, Mani N, Khaibullina A, et al. Neurotrophic effects of vascular endothelial growth factor on organotypic cortical explants and primary cortical neurons. *J Neurosci*. 2003;23(35):11036-11044.
- [13] Cai Z, Shu J, Pan L, et al. Zhongguo Kangfu Yixue Zazhi. 2008; 23(12):1077-1081. 蔡哲, 舒峻, 潘琳, 等. 人羊膜组织细胞的神经干细胞特性形态学研究[J]. 中国康复医学杂志, 2008, 23(12):1077-1081.
- [14] Pietras A, Gisselsson D, Ora I, et al. High levels of HIF-2alpha highlight an immature neural crest-like neuroblastoma cell cohort located in a perivascular niche. *J Pathol*. 2008;214(4):482-488.
- [15] Bourdeaut F, Ribeiro A, Paris R, et al. In neuroblastic tumours, Schwann cells do not harbour the genetic alterations of neuroblasts but may nevertheless share the same clonal origin. *Oncogene*. 2008;27(21):3066-3071.
- [16] Chen XD, Zhao SM, Hua XY, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(27):5050-5053. 陈旭东, 赵四敏, 华新宇, 等. 当归对宫内缺氧新生大鼠神经干细胞增殖、分化的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14 (27): 5050-5053.
- [17] Neuner-Jehle M, Denizot JP, Mallet J. Neurogranin is locally concentrated in rat cortical and hippocampal neurons. *Brain Res*. 1996;733(1):149-154.
- [18] Johansson BB. Brain plasticity and stroke rehabilitation. *Stroke*. 2000;31(1):223-239.
- [19] Li GL, Farooque M, Lewen A, et al. MAP2 and neurogranin as markers for dendritic lesions in CNS injury. An immunohistochemical study in the rat. *APMIS*. 2000;108(2): 98-106.
- [20] Munoz JR, Stoutenger BR, Robinson AP, et al. Human stem/progenitor cells from bone marrow promote neurogenesis of endogenous neural stem cells in the hippocampus of mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(50):18171-18176.
- [21] Zhang C, Li Y, Chen J, et al. Bone marrow stromal cells upregulate expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4, gap junction protein connexin-43 and synaptophysin after stroke in rats. *Neuroscience*. 2006;141(2):687-695.
- [22] Lee J, Duan W, Mattson MP. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem*. 2002; 82(6):1367-1375.
- [23] Huang KP, Huang FL, Jager T, et al. Neurogranin/RC3 enhances long-term potentiation and learning by promoting calcium-mediated signaling. *J Neurosci*. 2004;24(47):10660-10669.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 河南省教育厅项目(2010C310003); 漯河医学高等专科学校项目(2009-LMC-S08); 河南省高等专科学校青年骨干教师资助项目(2010GGJS-289)。

作者贡献: 第一、二作者进行实验设计, 实验实施为第二、三作者, 实验评估为第二作者, 资料收集为第三作者, 第二作者成文, 第一作者审校, 第一作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

本文创新性: 于 2010-10 检索 ScienceDirect 数据库, 检索关键词: human amniotic epithelial cells, hypoxic-ischemic encephalopathy, neurogranin, NSCs. 发现近年国内外研究证实羊膜上皮细胞移植治疗神经系统疾病有肯定的疗效, 但其作用机制尚未完全明确。

实验着重研究了羊膜上皮细胞移植后存活分化情况, 移植物对内源性神经干细胞增殖及突触可塑性相关分子之一神经颗粒(neurogranin, Ng)的影响, 探讨神经保护机制, 发现羊膜上皮细胞移植入脑缺血缺氧大鼠脑内后, 可减轻缺血缺氧后神经元的损伤, 改善神经功能, 其机制可能是注入侧脑室的细胞促进自体神经干细胞的增殖分化和突触再生而实现的。