

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.45.016 [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]
颜小华, 余珍, 刘伟, 徐昕, 周治清, 张丽娜. 脐血间充质干细胞移植修复缺氧缺血损伤新生大鼠的脑功能[J].
中国组织工程研究, 2012, 16(45):8445-8452.

脐血间充质干细胞移植修复缺氧缺血损伤新生大鼠的脑功能*☆

颜小华¹, 余珍², 刘伟³, 徐昕¹, 周治清¹, 张丽娜¹

文章亮点: ①采用7日龄的新生SD大鼠造模,7日龄大鼠处于脑发育高峰期,此时缺氧缺血造成的脑损伤类似于围产期窒息造成的足月儿脑损伤。②行为学测试是用于判断远期效果较好的指标,实验采用新的简单易行而有效的行为学检测方法评价模型的远期间辨别能力、学习记忆能力,为研究新生儿缺氧缺血性脑损伤保护措施提供方便的指标和实验依据。③在移植方式的选择上,选择创伤小、危险性低且移植剂量较颅内直接注射大的血管内注射方法。

关键词: 脐血间充质干细胞; 干细胞; 细胞移植; 脑损伤; 缺氧缺血; 新生大鼠; 行为学测试; T迷宫; 静脉移植; 细胞分化; 神经元

缩略语: 缺氧缺血性脑损伤: hypoxic-ischemic brain damaged, HIBD

摘要

背景: 课题计划从神经细胞替代、促进内源性神经干细胞增殖和分化、保护神经元、促进突触重建以及减轻脑白质损伤等方面来探讨脐血间充质干细胞系统移植对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤后神经功能的修复作用及其机制。

目的: 观察脐血间充质干细胞由静脉途径移植透过血脑屏障进入脑组织内,对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤后脑功能修复的影响。

方法: 7d龄SD新生鼠分为3组:假手术组仅分离出左侧颈总动脉而不结扎;缺氧缺血性脑损伤组制备缺氧缺血性脑损伤模型;细胞移植组在缺氧缺血性脑损伤后第8天尾静脉移植人脐血间充质干细胞,前两组尾静脉注射等量的生理盐水。

结果与结论: 免疫荧光观察显示移植后5周脐血间充质干细胞迁移到海马,Nissl染色结果显示脐血间充质干细胞移植后,左侧海马DG区锥体细胞尼氏小体明显增加,提示间充质干细胞移植后可分化为神经元。行为学测试结果显示:与假手术组相比,缺氧缺血性脑损伤组在T迷宫实验中,自发改变率下降,在放射形迷宫中觅水时间延长,错误次数及重复次数明显增加($P < 0.05$);脐血间充质干细胞静脉移植5周后,上述行为学指标均显著改善($P < 0.05$)。提示脐血间充质干细胞静脉移植治疗明显改善和提高了缺氧缺血性脑损伤大鼠远期的学习记忆和空间辨别能力。

Effects of intravenous transplantation of human umbilical blood mesenchymal stem cells on the improvement of brain function after hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats

Yan Xiao-hua¹, Yu Zhen², Liu Wei³, Xu Xin¹, Zhou Zhi-qing¹, Zhang Li-na¹

Abstract

BACKGROUND: We have explored the effect and the mechanism of human umbilical blood mesenchymal stem cells transplantation in repairing neural function after hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats from many aspects, such as the nerve cells replacement, promoting the proliferation and differentiation of endogenous neural stem cells, protecting the neurons, promoting the synaptic reconstruction and reducing the white matter damage.

OBJECTIVE: To transplant human umbilical blood mesenchymal stem cells *via* the vein across the blood-brain barrier and then into the brain tissue, to study the effects of intravenous transplantation of human umbilical blood mesenchymal stem cells in repairing the brain function after hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats.

METHODS: The 7 days Sprague-Dawley neonatal rats were divided into three groups: sham-operation group, hypoxic-ischemic brain damage group and transplantation group. In the sham-operation group, the left common carotid artery was isolated without ligation; rats in the hypoxic-ischemic brain damage group were used to establish the hypoxic-ischemic brain damage model; in the transplantation group, the human umbilical blood mesenchymal stem cells were transplanted *via* tail vein at 8 days after hypoxic-ischemic brain damage, and the rats in the sham-operation group and hypoxic-ischemic brain damage group received intravenous injection of normal saline in the same dose.

RESULTS AND CONCLUSION: Immunofluorescence observations showed that the human umbilical blood

¹南昌大学第一附属医院儿科,江西省南昌市330006;²吉安市永丰县妇幼保健院儿科,江西省永丰县331500;³江西省妇幼保健院,江西省南昌市330006

颜小华☆,男,1966年生,江西省萍乡市人,汉族,2004年中南大学湘雅医学院毕业,博士,副主任医师,副教授,主要从事小儿神经性疾病的研究。
yanxiaohua456@yahoo.com.cn

并列第一作者:余珍,女,1969年生,江西省吉安市人,汉族,1990年井冈山大学毕业,主治医师,主要从事儿童保健研究。
xymu2001phd2@yahoo.com

中图分类号:R394.2
文献标识码:B
文章编号:2095-4344(2012)45-08445-08

收稿日期:2012-02-01
修回日期:2012-05-16
(20110801004/N·C)

¹Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangsu Province, China; ²Department of Pediatrics, Yongfeng County Maternal and Child Health Hospital of Ji'an, Yongfeng County 331500, Jiangxi Province, China; ³Maternal and Child Health Hospital of Jiangxi Province, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Yan Xiao-hua[☆], Doctor, Associate chief physician, Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangsu Province, China
yanxiaohua456@yahoo.com.cn

Yu Zhen, Attending physician, Department of Pediatrics, Yongfeng County Maternal and Child Health Hospital of Ji'an, Yongfeng County 331500, Jiangxi Province, China
ymu2001phd2@yahoo.com

Yan Xiao-hua and Yu Zhen contributed equally to this work.

Supported by: a grant from Jiangxi Provincial Department of Science and Technology, No.2009BSB11209*

Received: 2012-02-01
Accepted: 2012-05-16

mesenchymal stem cells migrated to the hippocampus at 5 weeks after transplantation. Nissl staining showed the Nissl bodies of pyramidal cells in left hippocampal dentate gyrus area was increased significantly after transplantation, it indicated that the mesenchymal stem cells could differentiate into neurons after transplantation. Behavioral test results showed that when compared with the sham-operation group, rats in the hypoxic-ischemic brain damage group had a reduced spontaneous alternation rate in T-maze acquisition tests, the rats took more time in finding the three arms baited with water and had an increased number of working and reference memory errors in radial maze acquisition tests ($P < 0.05$); at 5 weeks after umbilical blood mesenchymal stem cells transplantation, the indicators above were improved ($P < 0.05$). Intravenous transplantation of human umbilical blood mesenchymal stem cells can improve and enhance the long-term learning and memory and spatial discrimination ability of hypoxic-ischemic brain damage rats.

Yan XH, Yu Z, Liu W, Xu X, Zhou ZQ, Zhang LN. Effects of intravenous transplantation of human umbilical blood mesenchymal stem cells on the improvement of brain function after hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2012;16(45):8445-8452.

0 引言

缺氧缺血性脑病是新生儿围产期最常见的脑损伤病因,其后遗症包括脑瘫、精神发育迟滞、学习障碍和癫痫等^[1]。目前对新生儿缺氧缺血性脑损伤(hypoxic ischemic brain damaged, HIBD)的治疗有了新的认识,不仅局限于以往的支持疗法,而要探索新的治疗方案以促进神经再生等有效治疗手段为研究的热点^[2-3],其中胚胎神经组织和干细胞移植治疗是使神经系统功能恢复最有希望的途径之一。近年来脐血库及干细胞工程的兴起为其治疗带来希望^[4],脐血间充质干细胞作为移植材料的优越性,不仅是因为其取材方便,来源广泛,而且与骨髓相比,其免疫原性更弱,植入反应更小,是一种新型、极好的细胞移植治疗和基因治疗种子来源^[5-6]。新近有研究表明,只要选择合适的移植窗口时间,脐血间充质干细胞经尾静脉移植治疗新生鼠HIBD,能有效透过血脑屏障,广泛分布并有机整合于缺氧缺血病灶脑组织中,通过神经替代或分泌神经生长因子等对HIBD起到近期和远期的共同治疗保护作用。然而,以往的研究结果多采用病理学和生化指标来反映神经元损伤得到减轻、受到保护的近期效果,但对远期功能进行评价,尤其是能改善脑损伤造成的远期功能改变的相关报道甚少。

为此,实验结合组织学、行为学方面探讨脐血间充质干细胞静脉移植治疗对新生大鼠HIBD脑功能恢复近期和远期的共同影响,为探寻一条脐血间充质干细胞移植治疗新生儿HIBD的新路提供理论依据。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2010年4月至2011年2月在南昌大学第一附属医院神经内科实验室完成。

材料:

实验动物: 清洁级7 d龄健康SD新生鼠65只,雌雄不拘,体质量12 g以上,由南昌大学医学院实验动物中心授权使用。

脐血: 由南昌大学第一附属医院妇产科提供,产妇身体健康,对实验知情同意。

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
DMEM/F12(1:1)培养基、B27	Gibco BRL 公司
胎牛血清	Hyclone 公司
bFGF、EGF	Pepro Tech EC 公司
神经特异性烯醇化酶(NSE)	NeoMarkers 公司
单克隆抗体(1:1 000)、微管相关蛋白 2(MAP-2)单克隆抗体(1:400)	
Cy2、Cy3 和 Poly-L-lysine、DAPI	Sigma
CO ₂ 培养箱(IKEMOTO RIRA 型)	Kogyo 公司
医用净化工作台(YJ-1450 型)	苏州净化设备厂
倒置相差显微镜(IX-70 型)、荧光显微镜(IX-70 型)	Olympus 公司
0.22 μm 微孔滤膜过滤器(Acrodisc 型)	Pall Gelman 公司
6 孔细胞培养板(Cellstar 型)	Greiner Labortechnik 公司
测氧仪(CY-12C)	杭州梅城电化分析仪器厂

实验方法:

人脐血间充质干细胞的分离与培养: 将采集的人脐血,以明胶沉降+密度梯度离心两步法分离

出脐血单个核细胞^[7], 置入含体积分数20%胎牛血清、谷氨酰胺、GM-CSF以及 SCF的DMEM细胞培养液的24孔板中, 于37 °C、体积分数5%CO₂饱和湿度孵箱内培养, 连续培养4周。当细胞长到80%融合时, 用胰蛋白酶和EDTA混合液消化, 再接种于传代培养瓶中进行脐血间充质干细胞的扩增培养。

脐血间充质干细胞体外荧光标记^[6,8]: 将体外稳定传代培养5代内的脐血间充质干细胞, 于移植使用前6-12 h加入2-4 mg/L的DAPI荧光标记物, 继续培养6-12 h后, 在荧光显微镜下可观察到脐血间充质干细胞细胞核发蓝色荧光。

间充质干细胞的收集: 将经DAPI标记好备移植用的脐血间充质干细胞, 行4%锥虫蓝细胞染色, 计数总细胞数, 活性细胞> 95%, 再调整活细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 供移植使用。

新生鼠HIBD模型制作^[9-10]: 参照Rice法制备新生大鼠缺氧缺血脑损伤模型, 除假手术组大鼠仅游离颈动脉, 不结扎, 不缺氧外, 其他各实验组大鼠均给予缺氧缺血处理。具体过程为: 将7 d龄SD新生鼠, 给予吸入七氟烷麻醉后, 仰卧位固定操作台上, 碘伏消毒颈部皮肤, 切开颈部正中皮肤, 切口长1.0-1.5 cm, 分离皮肤和皮下组织, 游离出左颈总动脉, 用无菌手术线于左侧颈动脉根部实施结扎, 缝合切口并再次消毒皮肤(整个过程不超过5 min), 回窝恢复2 h后, 置于密封箱内, 以1.5-2.5 L/min 速度持续输入含体积分数8%氧气、92%氮气的混合气体, 持续缺氧 2 h制成新生大鼠HIBD模型。

干预分组: 65只SD大鼠随机数字表法分为3组, 假手术组($n=16$)仅切开皮肤, 分离出左侧颈总动脉而不结扎, 再缝合皮肤; HIBD组($n=24$)制备HIBD模型, 以上2组在移植的相同时间由尾静脉注射相同量的生理盐水; 细胞移植组($n=25$)在HIBD后第8天(即日龄15 d)进行脐血间充质干细胞尾静脉移植。实验鼠21 d龄时断奶, 断奶后按性别分笼饲养。每组均在移植5周后随机选择数只鼠处死、取脑, 并取海马区相同部位的缺血脑组织切片, 用于脑组织病理形态学观察、DAPI阳性细胞分布和免疫组织化学检测。

脐血间充质干细胞大鼠尾静脉移植: 细胞移植组大鼠均于缺氧缺血后第8天进行脐血间充质干细胞尾静脉移植。首先按3-5 mL/kg腹腔注射10%水合氯醛, 5-10 min后大鼠处于麻醉状态或将动物固定在固定器内, 使尾巴外露, 尾部用45-50 °C的温水浸泡几分钟或用乙醇擦拭, 以达到消毒、血管扩张及软化表皮角质的目的。注射时, 先以左手拇指和食指捏住尾根部, 转动尾部使其

侧面朝上, 并使血管更加扩张, 尾静脉显得更清楚, 再以无名指和小指夹住尾根部, 以中指从下面夹起尾巴, 使尾巴固定, 右手持注射器, 使针头与静脉平行($< 30^\circ$), 从尾下1/4处进针。刺入后先缓注少量细胞悬液, 如无阻力表示针头已进入静脉, 可继续注入。一般按0.05-0.10 mL/s速度推进。一次注射量: SD大鼠5-10 mL/kg。实验将事先用DAPI标记好的脐血间充质干细胞, 其细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 吸入到1 mL注射器内, 每只鼠均由尾静脉注射, 复温苏醒后回笼饲养。

行为学测试: 使用盲法进行行为学测试。

T迷宫自发交替^[11-12]: 从28日龄(移植后2周)起开始进行检测。实验在T迷宫中进行, 自制的T迷宫, 用木块作成, 每臂长40 cm, 宽15 cm, 高15 cm, 将一个40 W的灯泡作为光源悬挂于T迷宫上, 起始臂末端15 cm处设有一闸门, 自发改变即检测实验鼠在T迷宫内连续测试中进入不同臂的几率。每只鼠连续测试3 d, 1次/d, 记录进入左右臂的次数, 同时计算自发交替的百分率=(实际的自发交替值/最大可能自发交替值) $\times 100\%$ 。

T迷宫强迫改变: 根据文献[13]方法, 从35日龄(移植后3周)起开始检测。实验仍在T迷宫中进行, 于T迷宫左右两臂的末端放置一个小器皿, 其内放有50 mg食物, 实验鼠在T迷宫内自由活动, 并适应觅食2 d后即开始进行实验。测试分为预测和测试两个阶段。在预测时, 随意选择迷宫的一臂, 用木闸门将其关闭, 实验鼠只能被迫进入开放的一臂, 将食物吃完后放入起始臂内, 关20 s后将闸门撤除开始实验, 此时, 如实验鼠的四肢进入任一臂即认为是选择有效, 不允许再后退。每只实验鼠均每天测试5次, 每次间隔时间为15 min, 连续4 d。

放射形迷宫觅水测试: 根据文献[14-15]方法, 从42日龄(移植后4周)起进行实验。自制的放射形迷宫, 四周为8个呈放射性对称分布的臂, 中间有个直径30 cm的平台, 每臂长50 cm, 宽15 cm, 其末端各有一小孔。实验鼠只允许在每日夜间饮水20 min时间, 如此禁水2 d。实验开始前2 d, 在每个臂的小孔内均放有水后, 将实验鼠放在迷宫内自由觅水。而在空间记忆能力测试时, 只有3个臂内有水, 其相邻臂的角度分别为 90° , 135° 和 135° , 每天测试5次, 以3个臂的水都被找到为结束, 每次间隔时间为2 min, 共连续测试3 d, 记录结果如下: 找到3个臂的水所花的时间、重复的次数以及记忆错误的次数。

组织切片制备: 移植后5周, 将实验大鼠用10%水合氯醛麻醉后, 用穿刺针插入左心室, 同时剪开右心耳,

注入生理盐水, 直至流出的液体变清后, 再灌注40 g/L多聚甲醛和PBS, 再断头取脑后固定8 h。待脑组织块下沉后, 再进行冠状位厚30 μm的冰冻连续切片。

尼氏(Nissl)染色: 将新鲜冰冻切片于室温下干后放入60 °C、0.1%甲苯胺蓝内作用3 min; 快速蒸馏水洗后再依次以体积分数70%乙醇洗1 min、体积分数80%乙醇洗1 min、体积分数为95%乙醇分色, 于显微镜下控制反应, 至背景无色而尼氏体蓝色时用无水乙醇脱水, 二甲苯透明及中性树脂封固。

免疫细胞化学和鉴定: 将新鲜冰冻脑组织切片浸泡于37 °C、2 mol/L的盐酸中作用30 min后, 加入0.04%胃蛋白酶室温下作用5 min, 再以PBS冲洗3遍; 滴加正常山羊血清室温封闭20后加入一抗, 神经元特异性烯醇化酶(NSE)单克隆抗体, 神经微管相关蛋白2(MAP-2)单克隆抗体和胶质纤维酸性蛋白(GFAP)抗体(1 : 500), 37 °C恒温水浴箱孵化1 h。用0.1 mol/L的Tris+PBS液漂洗2 min×3次; 分别加入二抗Cy3(发红色荧光)、Cy2(发绿色荧光)于37 °C恒温水浴箱蔽光孵化1 h。用蒸馏水适当洗涤。待脑组织切片干燥后, 用水溶性封片剂封固, 荧光显微镜下观察, 拍照。

主要观察指标: 观察移植后脐血间充质干细胞在脑组织中分化为神经元细胞和神经胶质细胞。

统计学分析: 由第一作者采用SPSS 17.0软件进行统计分析, 所有计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组比较用采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 两组之间均数比较用 t 检验, 总体率的比较用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

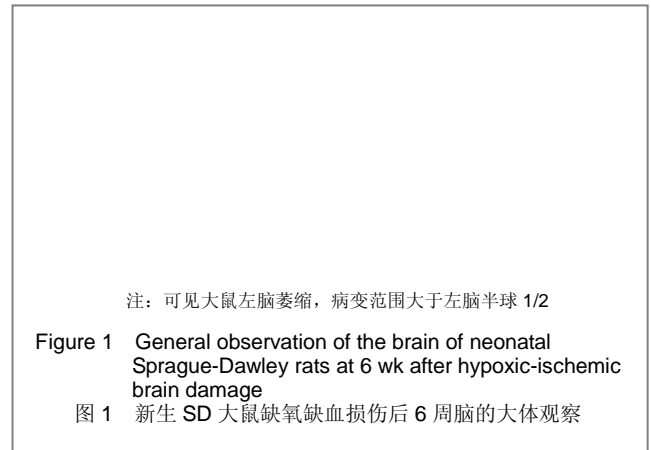
2 结果

2.1 实验动物数量分析 新生SD大鼠65只, 在HIBD模型制作过程中及制模后1周共死亡4只, 死亡率为9.2%, 其中假手术组死亡1只, HIBD组死亡2只, 细胞移植组死亡1只。

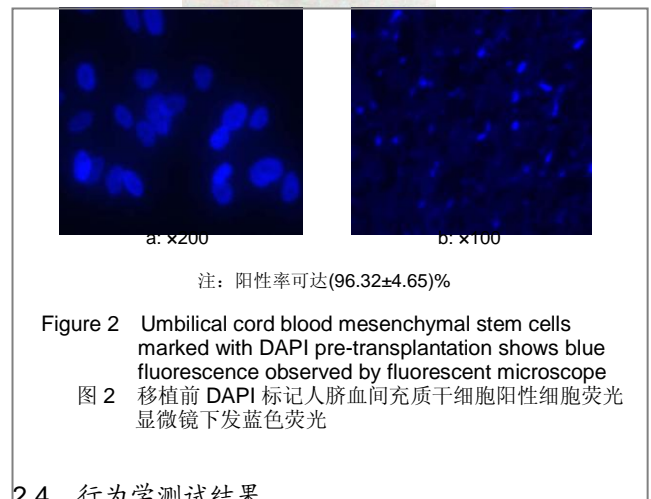
2.2 脑组织病理形态学观察 脐血间充质干细胞静脉移植治疗后5周, 取脑, 大体观察将脑病变分为正常、轻度及重度改变: 正常为大体无明显异常, 轻度指左脑病变范围小于其一半, 重度则是指左脑病变范围大于其一半, 见图1。

HIBD组18只中正常3只, 轻度脑病变10只, 重度脑病变5只, 脑病变率83%; 细胞移植组23只中正常13只, 轻度脑病变8只, 重度脑病变2只, 脑病变率43%; 细胞移植组脑病变率明显低于HIBD组, 差异有显著性意义

($P < 0.05$)。



2.3 脐血间充质干细胞体外染色标记 荧光显微镜下观察, 脐血间充质干细胞经DAPI标记后, 阳性率可达(96.32±4.65)%, 见图2。



2.4 行为学测试结果

2.4.1 T迷宫自发交替实验结果

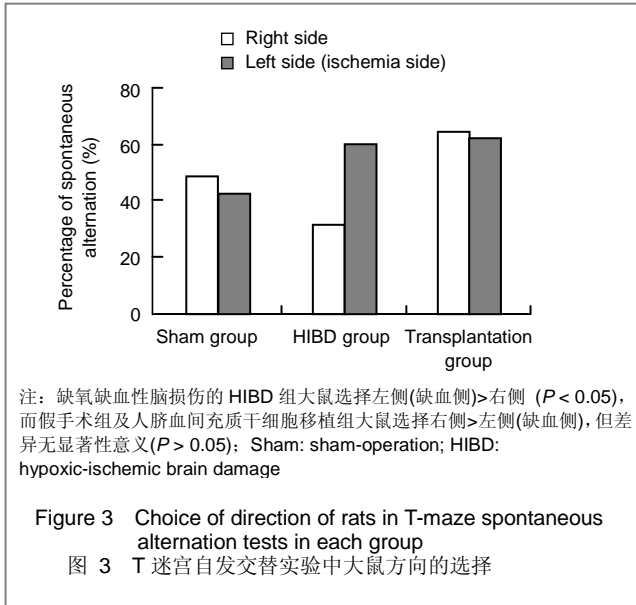
自发改变率的改变: HIBD组T迷宫中的改变率为(43.10±16.27)%, 较假手术组(78.20±19.49)%、细胞移植组(68.22±13.33)%下降, 差异有显著性意义($P < 0.05$); 细胞移植组的改变率较假手术下降, 但差异无显著性意义($P > 0.05$)。

实验鼠在方向选择上的差异: 本实验观察到HIBD组大鼠选择左侧(缺血侧)的次数要多于右侧, 差异有显著性意义($P < 0.05$), 而假手术组及细胞移植组大鼠则选择右侧的次数要多于左侧, 但差异无显著性意义($P > 0.05$), 见图3。

T迷宫强迫改变结果: 随着移植时间的延长, 细胞移植组实验鼠在T迷宫中的正确率日渐增加, 而HIBD组正确率上升不明显, 说明移植鼠学习能力逐渐得到改善; HIBD组T迷宫中的正确率较假手术组和细胞移植组下

降, 差异有显著性意义($P < 0.05$), 各组在连续4 d的实验中正确率见图4。

重复次数虽较假手术组稍有增多, 但差异无显著性意义($P > 0.05$)。见表1。



T迷宫强迫改变: 各组在连续4 d的实验中, 正确率见图4。

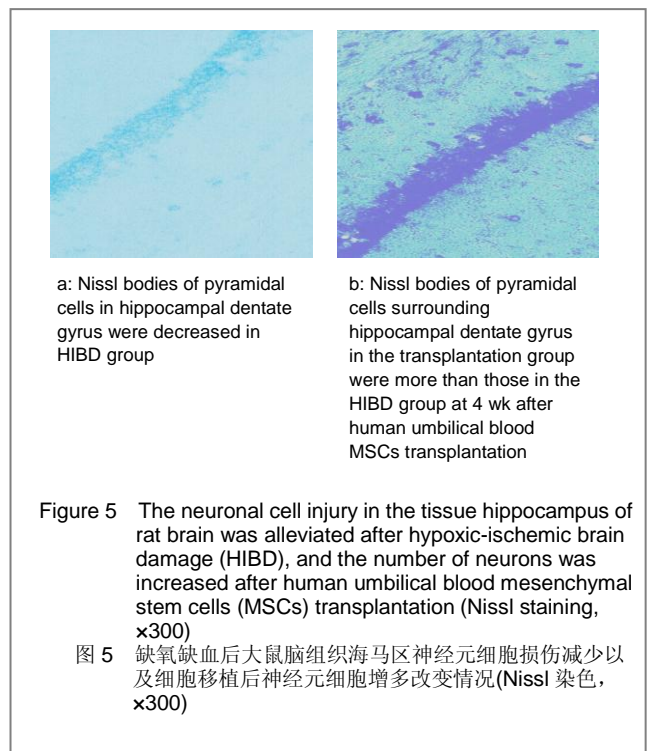
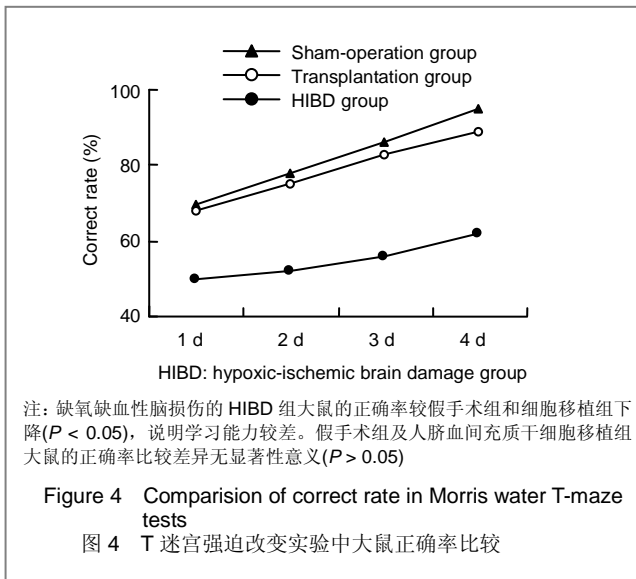
表 1 假手术组、缺氧缺血性脑损伤组及人脐血间充质干细胞移植组大鼠放射形迷宫实验结果比较

Table 1 Results of radial maze tests in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Seeking water time (s)	Number of errors (n)	Number of repetitions (n)
Sham-operation	14	52.45±24.20	2.35±0.56	0.22±0.13
HIBD	18	87.31±30.62 ^a	3.92±0.34 ^a	0.85±0.48 ^a
Transplantation	23	61.41±24.81 ^b	2.65±0.57 ^b	0.35±0.42 ^b

^a $P < 0.05$, vs. sham-operation group, ^b $P < 0.05$, vs. HIBD group; HIBD: hypoxic-ischemic brain damage group
注: 脐血间充质干细胞静脉移植治疗明显改善和提高了缺氧缺血脑损伤大鼠远期的学习记忆和空间辨别能力

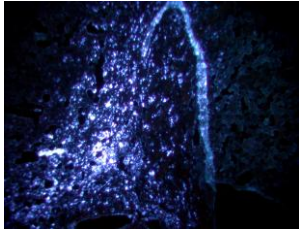
2.5 光镜观察各组大鼠脑组织神经细胞变化 于缺氧缺血性脑损伤后6周(即移植后5周)将HIBD大鼠脑组织切片Nissl染色显微镜下观察结果显示, 其左侧海马齿状回区锥体细胞尼氏小体仍有明显减少, 且细胞排列紊乱, 见图5a; 而细胞移植组海马部位脑组织病变情况较HIBD组均有不同程度改善, 见图5b。



随天数的增加, 假手术组和细胞移植组T迷宫中的正确率日渐增加, 而HIBD组正确率上升不明显, 说明学习能力较差。HIBD组T迷宫中的正确率较假手术组和细胞移植组下降, 差异有显著性意义($P < 0.05$); 细胞移植组的正确率较正常组下降, 但差异无显著性意义($P > 0.05$)。

2.6 间充质干细胞移植后的定位检测 用DAPI可标记出移植的细胞, 荧光显微镜下可见DAPI阳性细胞发蓝色荧光。在脐血间充质干细胞移植到HIBD体内, 5周后大鼠脑内可见发蓝色荧光的DAPI阳性细胞沿针道样分布, 密集分布于缺氧缺血性损伤脑组织周围, 在海马组织内也可见标记的荧光细胞迁移, 聚集于齿状回, 与宿主脑组织整合, 界限不明显的, 见图6。

2.4.2 放射形迷宫觅水实验结果 HIBD组在放射形迷宫实验中无论在觅水时间还是错误次数、重复次数均较假手术组和细胞移植组明显增多, 差异有显著性意义($P < 0.05$); 而细胞移植组大鼠的觅水时间、错误次数、

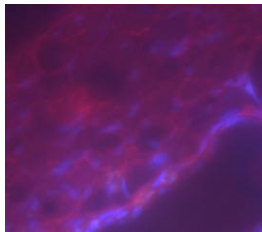


注: DAPI 阳性细胞分布于海马齿状回, 宿主与脑整合, 没有明显的界限

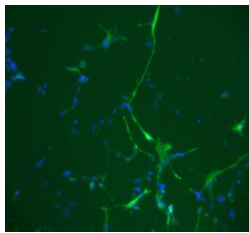
Figure 6 Orientation test of the cells after hypoxic-ischemic brain damage at 5 wk after human umbilical blood mesenchymal stem cells transplantation (fluorescence microscope, $\times 100$)

图6 缺氧缺血大鼠脐血间充质干细胞移植5周后细胞的定位检测 (荧光显微镜, $\times 100$)

2.7 间充质干细胞移植后的分化情况 DAPI和NSE、MAP-2的免疫荧光观察显示脑海马组织部分DAPI阳性细胞同时也表达NSE和MAP-2, 在荧光显微镜下分别发红色荧光和绿色荧光, 提示脐血间充质干细胞移植到大鼠脑内4周后可分化为神经元样细胞, 见图7。



a: Some DAPI positive cells can express neural stem cells in the hippocampus and appear red ($\times 200$)



b: Some DAPI positive cells can express microtubule-associated protein 2 in the hippocampus and appear green ($\times 100$)

Figure 7 Differentiation of human umbilical blood mesenchymal stem cells in the hippocampus at 5 wk after transplantation

图7 脐血间充质干细胞移植5周后在大鼠脑海马组织中的分化

3 讨论

本文第一作者近年来的相关研究表明, 将脐血间充质干细胞从新生鼠尾静脉注射进入HIBD模型, 能顺利通过已被缺氧缺血损伤的血脑屏障, 在相对的时间里对HIBD新生鼠具有一定的疗效, 具体表现在病

理学和生化指标的改善方面^[16], 且其机制可能与脐血间充质干细胞分泌的多种细胞因子和神经替代有关; 以往有报道, 将骨髓间充质干细胞通过立体定位的方式, 直接注入到损伤脑组织中, 发现移植细胞可以移行并与受损脑组织有机整合在一起, 且存活下来, 在新的微环境中可能受某种信号的刺激而作出反应, 并“随机应变”性被诱导分化、发育成形态和功能与周围宿主神经细胞类似的细胞类型^[17-18]。因而, 有理由相信, 对于未成熟脑的中枢神经系统, 组织的修复和代偿机制会更加活跃, 以至于更能影响其损伤的远期脑功能的修复。

本实验采用7日龄的新生SD大鼠在低氧环境下造成的脑损伤与围产期窒息造成的足月儿脑损伤相似, 是目前研究新生儿缺氧缺血性脑病损伤机制和保护因素的常用经典的动物模型^[19]。缺氧缺血后数天反映病理损伤程度和生物化学改变的指标为近期指标, 而中枢神经系统具有高度可塑性, 尤其是未成熟脑的可塑性更强, 具有很强的潜在适应能力^[20-21], 因此, 实验将反映HIBD后数天的病理形态学和生物化学改变的近期指标同反映远期疗效的行为学检查方法结合在一起, 得出的实验结果会更为客观、可信。HIBD是一个持续的、弥漫性的脑损伤过程, 可以造成整个缺血侧的脑皮质、纹状体和海马等重要脑功能区域的大面积损伤, 包括一些与空间认知和学习记忆有关的海马组织的损伤^[22]。然而, 目前有关于评估新生期大鼠缺氧缺血脑损伤后远期的学习记忆、空间认知能力的报道很少, 应用于其发育阶段和成年阶段的行为学检查手段和方法, 国内也研究不多, 方法甚少。为此, 实验参照Balduini和Bona的行为学测试方法^[23-24], 略作修改, 该行为学检测方法相对简单易行, 用以研究HIBD大鼠发育阶段和成年阶段在T迷宫、放射形迷宫测试中的行为学改变^[25], 评估其远期空间辨别能力、学习记忆能力。

T迷宫中自发改变结果显示, HIBD组大鼠在T迷宫中自发改变率较细胞移植组和假手术组明显下降, 说明缺氧缺血性脑损伤导致了实验鼠进入损伤脑同侧臂的趋势明显, T迷宫自发改变反映纹状体功能^[26], HIBD损伤可能导致了纹状体D1、D2多巴胺能受体减少, 因而在T迷宫中实验鼠肌肉运动不协调、不对称运动的增加, 这表明脐血间充质干细胞静脉移植能一定程度改善HIBD后纹状体功能。

T迷宫强迫改变和放射形迷宫觅水实验主要测试学习记忆和空间能力, 海马属于脑边缘系统, 与学习和记忆有密切的关系, 它不仅在记忆形成的早期阶段有重要

作用, 而且在记忆的保存和再现中也起重要作用。Fleischer等^[27]在研究不同脑区在空间学习记忆中的作用时, 用损毁的方法观察到只要海马系统完好, 实验鼠即可精确地完成各种空间迷宫任务; Yan等^[28]用电生理学方法记录到大鼠在空间学习时, 海马各个区域均有明显的单细胞放电现象, 说明海马可能是大鼠空间学习记忆的中枢。本实验结果显示, HIBD实验鼠在强迫改变测试中的正确率明显下降; 在放射形迷宫中的觅水时间明显延长, 错误及重复次数也明显增多, 而以上各项测试结果与细胞移植组和假手术组相比, 差异均有显著性意义($P < 0.05$)。

新生大鼠HIBD是一种多病灶的、广泛的甚至是缺血侧全脑的病理改变, 广泛累及大脑皮质、海马及纹状体, 本实验结果证实HIBD后导致大鼠海马受损明显, 海马组织锥体细胞尼氏小体明显减少, 因而在T迷宫强迫改变和放射形迷宫觅水测试中成绩较细胞移植组和假手术组明显下降, 证实了脐血间充质干细胞静脉移植治疗新生鼠HIBD无论在近期的病理形态和生化指标抑或在新生期HIBD后的大鼠在发育阶段和成年阶段行为学指标均有明显改善。

本实验在移植方式的选择上, 选择系统移植法, 即由实验动物周围静脉注入移植细胞, 避免了既往颅内直接注射移植细胞, 从而减少了由此造成的局部脑组织的二次创伤, 本文第一作者在以往的相关研究中证实了它一种有效、简便而快捷的移植途径。

本实验移植时间的选择上, 选择在HIBD 1周后进行移植基于以下理由: ①HIBD后1周处于脑损伤的亚急性期, 此时急性期的兴奋性毒性神经递质、自由基和促炎症递质的释放已有一定程度缓解, 且脑组织血脑屏障正处于开放状态, 此时移植脐血间充质干细胞更有利于其存活^[29-31]。②生后2周, 是空间学习、记忆以及感觉运动皮质发育最快的时期, 此期如脑损伤未能及时修复, 对成年后的影响很大。因此, 实验选择HIBD后1周开始进行移植治疗, 实验结果更能客观实际反映新生期HIBD后的大鼠在发育阶段和成年阶段行为学改变意义。

综合以上实验结果, 从脑组织病理损伤和生物化学的近期疗效指标, 以及判断移植治疗行为学功能远期指标证实脐血间充质干细胞静脉移植治疗新生鼠HIBD不仅能存活, 还能很好地与宿主脑组织整合并迁移, 广泛分布于缺氧缺血病灶脑组织周围, 分化为神经元细胞, 起到神经替代作用, 从而改善和提高了HIBD大鼠远期的学习记忆和空间辨别能力, 为临床应用脐血间充质干细胞静脉移植治疗HIBD提供了较充分的理论

和实验依据, 为新生儿HIBD的治疗提供了一条崭新的治疗途径。

4 参考文献

- [1] Anthonioz C, Loisel D, Delorme B, et al. MRI aspects of anoxic-ischemic encephalopathy of the term and premature newborn. *J Radiol.* 2006;87(11 Pt 1):1651-1670.
- [2] Alonso-Alconada D, Alvarez A, Hilario E. Cannabinoid as a neuroprotective strategy in perinatal hypoxic-ischemic injury. *Neurosci Bull.* 2011;27(4):275-285.
- [3] Hossain MA. Hypoxic-ischemic injury in neonatal brain: involvement of a novel neuronal molecule in neuronal cell death and potential target for neuroprotection. *Int J Dev Neurosci.* 2008;26(1):93-101.
- [4] Kim JY, Jeon HB, Yang YS, et al. Application of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in disease models. *World J Stem Cells.* 2010;2(2):34-38.
- [5] Bieback K, Klüter H. Mesenchymal stromal cells from umbilical cord blood. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2007;2(4):310-323.
- [6] Pereira WC, Khushnooma I, Madkaikar M, et al. Reproducible methodology for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord and its potential for cardiomyocyte generation. *Tissue Eng Regen Med.* 2008;2(7):394-399.
- [7] Zhao LR, Duan WM, Reyes M, et al. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol.* 2002;174(1):11-20.
- [8] Dimitri P. Fluorescent in situ hybridization with transposable element probes to mitotic chromosomal heterochromatin of *Drosophila*. *Methods Mol Biol.* 2004;260(1):29-40.
- [9] Wang XL, Zhao YS, Yang YJ, et al. Therapeutic window of hyperbaric oxygen therapy for hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats. *Brain Res.* 2008;1222:87-94.
- [10] Xie M, Yang YJ, Liu CT, et al. Differentiation of rat bone marrow stromal cells into neural cells induced by hypoxic-ischemic brain tissue extracts in neonate rats. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2007;32(4):557-562.
- [11] McAuliffe JJ, Miles L, Vorhees CV. Adult neurological function following neonatal hypoxia-ischemia in a mouse model of the term neonate: water maze performance is dependent on separable cognitive and motor components. *Brain Res.* 2006;1118(1):208-221.
- [12] Derrick M, Drobyshevsky A, Ji X, et al. Hypoxia-ischemia causes persistent movement deficits in a perinatal rabbit model of cerebral palsy: assessed by a new swim test. *Int J Dev Neurosci.* 2009;27(6):549-557.
- [13] Gonzalez FF, Miller SP. Does perinatal asphyxia impair cognitive function without cerebral palsy? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2006;91(6):F454-459.
- [14] Van der Staay FJ, Rutten K, Erb C, et al. Effects of the cognition impairer MK-801 on learning and memory in mice and rats. *Behav Brain Res.* 2011;220(1):215-229.
- [15] Kovacic P, Somanathan R. Clinical physiology and mechanism of dizocilpine (MK-801): electron transfer, radicals, redox metabolites and bioactivity. *Oxid Med Cell Longev.* 2010;3(1):13-22.

- [16] Yan XH, Huang RB. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008;12(25):4975-4978.
颜小华, 黄瑞滨. 脐血间充质干细胞静脉移植治疗缺氧缺血性脑损伤的时效性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(25): 4975-4978.
- [17] Li Y, Chen J, Chen XG, et al. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat. Neurology, 2002;59(4): 514-523.
- [18] Guan XQ, Yu JL, Li LQ, et al. Study on mesenchymal stem cells entering the brain through the blood-brain barrier. Zhonghua Er Ke Za Zhi. 2004;42(12):920-923.
- [19] Yasuhara T, Hara K, Maki M, et al. Intravenous grafts recapitulate the neurorestoration afforded by intracerebrally delivered multipotent adult progenitor cells in neonatal hypoxic-ischemic rats. Cereb Blood Flow Metab. 2008; 28(11):1804-1810.
- [20] Chen W, Ma Q, Suzuki H, et al. Osteopontin reduced hypoxia-ischemia neonatal brain injury by suppression of apoptosis in a rat pup model. Stroke. 2011;42(3):764-769.
- [21] Alkan T, Gören B, Vatanserver E, et al. Effects of hypoxic preconditioning in antioxidant enzyme activities in hypoxic-ischemic brain damage in immature rats. Turk Neurosurg. 2008;18(2):165-171.
- [22] Balduini W, Carloni S, Mazzoni E, et al. New therapeutic strategies in perinatal stroke. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord. 2004;3(4):315-323.
- [23] Bona E, Johansson BB, Hagberg H. Sensorimotor function and neuropathology five to six weeks after hypoxia-ischemia in seven-day-old rats. Pediatr Res. 1997;42(5):678-683.
- [24] Balduini W, Mazzoni E, Carloni S, et al. Prophylactic but not delayed administration of simvastatin protects against long-lasting cognitive and morphological consequences of neonatal hypoxic-ischemic brain injury, reduces interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha mRNA induction, and does not affect endothelial nitric oxide synthase expression. Stroke. 2003;34(8):2007-2012.
- [25] Zhong L, Wang X, Yu XH, et al. Zhongguo Dangdai Erke Zazhi. 2005; 7(3):245-248.
钟乐, 王霞, 余小河, 等. 新生大鼠缺氧缺血性脑损伤后的远期行为学测试[J]. 中国当代儿科杂志, 2005, 7(3):245-248.
- [26] Leclere N, Andreeva N, Fuchs J, et al. Hypoxia-induced long-term increase of dopamine and tyrosine hydroxylase mRNA levels. Prague Med Rep. 2004;105(3):291-300.
- [27] Fleischer JG, Gally JA, Edelman GM, et al. Retrospective and prospective responses arising in a modeled hippocampus during maze navigation by a brain-based device. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(9):3556-3561.
- [28] Yan J, Zhang Y, Roder J, et al. Aging effects on spatial tuning of hippocampal place cells in mice. Exp Brain Res. 2003;150(2): 184-193.
- [29] Li Y, Chopp M, Chen J, et al. Intraatrial transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice. J Cereb Blood Flow Metab. 2000;20(9):1311-1319.
- [30] Hsieh WY, Hsieh YL, Liu DD, et al. Neural progenitor cells resist excitatory amino acid-induced neurotoxicity. J Neurosci Res. 2003;71(2):272-278.
- [31] Liao W, Xie J, Zhong J, et al. Therapeutic effect of human umbilical cord multipotent mesenchymal stromal cells in a rat model of stroke. Transplantation. 2009;87(3):350-359.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 江西省科技厅支撑计划课题基金资助项目(2009BSB11209)。

作者贡献: 第一、二作者进行实验设计, 实验实施为第三、四、五、六作者完成, 实验评估为第一、二、三作者, 资料收集为二、三作者, 第三作者成文, 第一作者审校, 第一、二作者对文章负责。

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。

伦理要求: 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。产妇对将脐血用于科学实验完全知情同意。

本文创新性: 课题从神经细胞替代、保护神经元、减轻缺氧缺血性与记忆和智能学习有关的海马脑组织损伤、促进突触重建以及减轻脑白质损伤, 并从移植后组织学、行为学功能恢复和改善等方面来研究脐血间充质干细胞系统移植对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤神经功能的修复作用及其机制, 证明脐血间充质干细胞移植能促进新生大鼠缺氧缺血性脑损伤后脑功能的修复; 证明体外诱导脐血间充质干细胞分化的神经元具有功能(膜片钳、激光共聚焦显微镜、电镜); 证明脐血间充质干细胞移植能促进缺氧缺血性脑损伤新生鼠内源性神经干细胞增殖分化、减少海马等脑组织神经元损伤, 促进突触重建、减轻脑白质损伤, 无论在方法、技术及理论上都具有创新性, 从而得到省科技厅支撑计划课题基金的大力资助, 并为下一步申报国家级课题打好基础, 创造好条件。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。