论著

文章编号:1000-5404(2007)02-0108-04

# ES细胞来源的神经前体细胞移植Aβ损伤大鼠海马后的分化及对学习记忆的改善

唐 军[1],徐海伟[1],周光纪[1],范晓棠[2],李达兵[1],杨 丽[1] (第三军医大学基础医学部:[1]生理学教研室,[2]神经生物学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

**提 要:目的** 观察来源于小鼠胚胎干细胞的神经前体细胞移植Aβ海马损伤大鼠后的存活、分化以及细胞移植对模型大鼠的治疗作用。**方法** 采用改良的无血清方法将表达绿色荧光的小鼠胚胎干细胞定向诱导为神经前体细胞,移植至单侧海马注射$A\beta_{1-40}$损伤模型大鼠注射处;免疫荧光双染观察移植细胞的存活、分化。**结果** 胚胎体在改良的$N_2$选择性培养基生长5 d后,90%以上的小鼠胚胎干细胞分化为nestin阳性神经前体细胞。移植到模型大鼠海马后神经前体细胞存活良好,EGFP荧光显示移植细胞呈集落生长,Cy3荧光显示大部分细胞分化为GFAP阳性细胞,移植区周围可见一定数量NF200阳性细胞,其中部分发出类似神经元的长突起。行为学结果显示移植大鼠记忆能力较对照组明显改善。**结论** 胚胎干细胞来源的神经前体细胞移植$A\beta_{1-40}$损伤模型大鼠海马后能有效存活,大部分移植细胞分化为胶质细胞,小部分分化为神经元,细胞移植能改善模型大鼠学习记忆功能障碍。

**关键词:** 胚胎干细胞;β淀粉样蛋白;细胞移植;分化;大鼠

**中图法分类号:** R329.2;R338.64;R749.160.5 **文献标识码:** A

# Differentiation of neural precursor cells derived from mouse embryonic stem cells after transplantation into Aβ injured rat hippocampus and the improvement in memory

TANG Jun[1], XU Hai-wei[1], ZHOU Guang-ji[1], FAN Xiao-tang[2], LI Da-bing[1], YANG Li[1] ([1] Department of Physiology, [2] Department of Neurobiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract: Objective** To observe the survival, differentiation and the therapeutic effect of neural precursor cells (NPCs) derived from mouse embryonic stem cells (ESc) after transplanted into Aβ-injured rat hippocampus. **Methods** NPCs were generated from mouse ESc expressing EGFP with modified serum-free methods and then transplanted into the hippocampus of Alzheimer's disease (AD) rat model developed by $A\beta_{1-40}$ microinjection. The survival and differentiation of transplanted NPCs were observed with immunofluorescence methods. The learning and memory ability of AD rats were investigated. **Results** About 90% of mouse ESc were differentiated into nestin-positive NPCs 5 d after the induction with modified $N_2$ serum-free medium. The grafted NPCs in the hippocampus of AD rats showed good survival rate and grew into GFP positive colonies, and mostly differentiated into GFAP-positive glia and some into NF200-positive neurons with long evection as to the neuron. The ability in learning and memory of AD rats was much improved after NPCs transplantation compared with that of control group. **Conclusion** The NPCs derived from ESc are survived and mostly differentiated into the glial cells and a few into neurons after grafted into the hippocampus of AD rats, and show therapeutic effect on AD as improved learning and memory abilities.

**Key words:** embryonic stem cell; β-amyloid protein; cell transplantation; differentiation; rats

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种中枢神经系统原发性退行性疾病,其特征性病理学改变主要为大脑细胞外淀粉样斑块成积、细胞内神经纤维缠结以及最终部分脑区神经元的选择性缺失[1]。临床症状主要表现为智力下降、记忆力与定向力障碍等认知功能损伤[2]。根据AD各种假说,人们探索了诸多治疗方法,包括抗炎症、抗氧化应激以及基因治疗等[3],而临床主要运用胆碱酯酶抑制剂来改善患者胆碱能神经系统的神经传递。上述研究手段虽能够改善

基金项目:国家自然科学基金(30100087, 30571770)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30100087, 30571770)

作者简介:唐 军(1978-),男,湖北省监利县人,硕士,讲师,主要从事老年神经系统退行性疾病方面的研究。电话:(023)68752254-288, E-mail: alextang@sohu.com

通讯作者:徐海伟,电话:(023)68752254-269

收稿日期:2005-10-27;修回日期:2006-08-20

组织与行为学症状，但终究无法弥补脑内大量丢失的神经元，不能对处于病变终末晚期的患者起到很好疗效。目前正处于实验研究阶段的细胞移植技术则被多数学者认为是解决这一难题的有效手段。有研究报道用富含胆碱能的基底前脑移植至海马或皮质，能显著改善 AD 模型学习记忆能力[4]。而神经细胞直接移植面临种属差异、种子细胞数量以及伦理学等问题。鉴于胚胎干细胞全能分化的独特生物特性，本研究中将小鼠 ES 细胞体外无血清诱导分化为神经前体细胞，定点注射至 AD 大鼠海马，观察移植细胞的存活、迁移和分化情况。

## 1　材料与方法

### 1.1　药品试剂材料

表达绿色荧光的小鼠 ES 细胞系 MESPU35（北京大学生命科学院）；高糖 DMEM、谷氨酰胺、$N_2$ supplement（Gibco）；β-巯基乙醇、丝裂霉素、纤维连接蛋白、多聚鸟氨酸、$A\beta_{1-40}$ 多肽及其抗体（Sigma）；重组人白血病抑制因子（human leukemia inhibitory factor，hLIF）（Chemicon）；其余试剂均为国产。

### 1.2　AD 大鼠模型的制备

Wistar 大鼠 40 只，第三军医大学实验动物中心提供，雌雄不拘，体质量（180 ± 20）g。$A\beta_{1-40}$ 溶于无菌 NS（2 μg/μl），37 ℃孵育 7 d 以上制备凝聚态[5]。常规麻醉大鼠，取右侧海马齿状回背侧细胞作为注射区域。坐标参考 Paxions 等方法：前囟后 3.0 mm、侧旁开 2.2 mm、颅骨下 3.1 mm。微量注射 $A\beta_{1-40}$ 溶液 5 μl，注射速度 1 μl/min，留针 10 min 以保证注射液充分弥散，而后缓慢退针。对照组大鼠同样方法给予等剂量无菌人工脑脊液。手术完毕后覆盖钻孔，缝合创面，数日腹腔给予抗生素处理预防感染。术后 2 周检测大鼠学习记忆能力以及组织病理学鉴定。

### 1.3　AD 大鼠行为学检测（Morris 水迷宫）

Morris 水迷宫：训练包括：①定位航行试验：历时 4.5 d，每半日为 1 段（block），每个段试验 4 次（trial），记录其逃逸潜伏期；②空间探索试验：第 5 日下午撤除平台，观察 120 s 内大鼠第 1 次穿越原平台坐标的时间、穿越平台次数、游泳路径等。测试完毕后大鼠常规麻醉、灌注和固定。

### 1.4　ES 细胞的培养与无血清诱导分化

参照本实验室 ES 培养改良的无血清诱导法[7,8]，ES 细胞置于细菌培养皿中，悬浮培养 4 d 形成胚胎体，再无血清培养 6 d，更换为含 bFGF 的 DMEM/$F_{12}$ 培养基以增殖神经前体细胞（neural precursor cells，NPCs），最后行 Nestin 免疫荧光染色进行细胞鉴定。

### 1.5　神经前体细胞移植 AD 大鼠海马

生长良好的 NPCs 消化后离心，PBS 稀释以制备浓度约为 $5\times10^6$/μl 的单细胞悬液。选取 Aβ 注射后 2 周大鼠模型 20 只实施 NPCs 海马移植。缓慢进针至海马 $A\beta_{1-40}$ 注射处，注射约 4 μl悬液，留针 10 ~ 15 min 后缓慢退针。移植术后 8 周行 Morris 水迷宫测试，再灌注固定行组织学检测。

### 1.6　组织病理学检测

1.6.1　β 淀粉样蛋白刚果红染色　　梯度乙醇脱脂后入苏木精染液浸染 2 min，1% 盐酸乙醇溶液分化直至尼氏体清晰、背景干净；再刚果红浸染 2 min，0.2% 碱性乙醇分化直至橘红色淀粉样物质显现。

1.6.2　海马神经元尼氏染色　　玻片梯度乙醇脱脂后置于 50 ℃恒温的 1% 甲苯胺蓝染液中染色 20 min，$ddH_2O$ 冲洗干净后 70% 乙醇分化 1 min，再浸入 95% 乙醇分化，镜下控制分化直至尼氏小体清晰可见，再 100% 乙醇脱水后二甲苯透明，中性树胶封片。

1.6.3　AD 大鼠 NPCs 移植后免疫荧光显色　　常规 ABC 三步法，一抗分别为小鼠抗 NF200，兔抗 GFAP，三抗选用 Cy3 标记 - SABC。

### 1.7　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行双因素方差分析。

## 2　结果

### 2.1　AD 大鼠模型的组织病理学鉴定

2.1.1　β 淀粉样蛋白刚果红染色　　背景干净，视野清晰。注射处可见桔红色沉积物，呈斑片状。高倍镜下可见沉积物周围绕以蓝色细胞带，胞体小，为活化胶质细胞（图 1）。

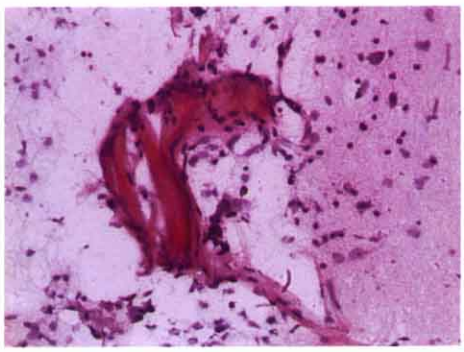
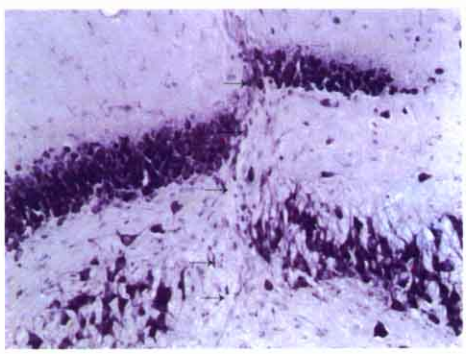


**图 1　AD 大鼠 $A\beta_{1-40}$ 损伤海马区组织阳性斑块及其周围活化胶质细胞**　（刚果红染色 ×100）

2.1.2　海马神经元尼氏染色　　海马 Aβ 注射区域，神经元细胞质尼氏体呈蓝色，色较浅。锥体细胞带出现断裂，其间有较多新生胶质细胞，胞体较小，尼氏染色浅，模糊。尼氏染色阳性神经元细胞数目显著减少，细胞丢失，密度降低，体积减小，尼氏体模糊（图 2）。



→：注射针道

**图 2　$A\beta_{1-40}$ 损伤大鼠海马 2 周后病损海马组织形态**（尼氏染色 ×200）

### 2.2 AD 大鼠模型及其 NPCs 移植术后的行为学检测

单侧海马注射 $A\beta_{1-40}$ 后 2 周，AD 大鼠行 Morris 水迷宫测试。NPCs 移植 AD 大鼠海马 8 周后行 Morris 水迷宫测试。在定位航行试验中，实验组与对照组大鼠的逃逸潜伏期均随训练次数的增加而下降，但是 AD 模型大鼠的平均逃逸潜伏期在每个训练日均显著长于对照组大鼠（$P<0.01$）；与移植前相比较，NPCs 移植大鼠逃逸潜伏期亦随训练次数的增加而下降，平均逃逸潜伏期与移植前比较有所下降（$P<0.05$）（图 3）。在空间探索试验中，对照组大鼠在 120 s 内穿越原平台位置的次数显著多于实验组模型大鼠（$P<0.01$），NPCs 移植大鼠穿越原平台位置次数较实验组 AD 大鼠增多（$P<0.05$）。

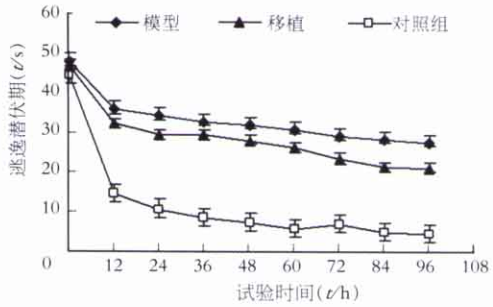
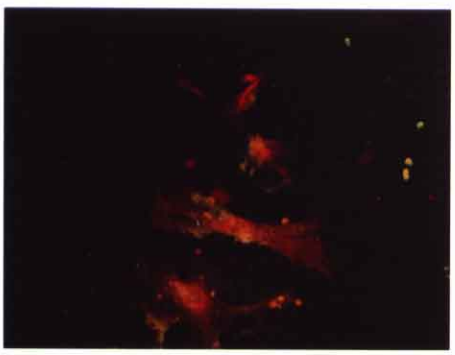



**图 3 Morris 水迷宫定位航行试验逃逸潜伏期的变化**

### 2.3 ES 细胞培养及其诱导分化为 NPCs

ES 细胞在细菌培养皿中培养 4 d 后形成了胚胎体，由数百个细胞组成，似球形，表面有突起。更换成无血清培养液后，72 h内细胞大量死亡，从底壁脱落。其形态多数变为细长形，有较为明显的突起，细胞间可有突起联系交织。取细胞作 nestin 免疫荧光双标染色，大部分绿色荧光的细胞为 nestin 阳性（Cy3 红色荧光素），见图 4。

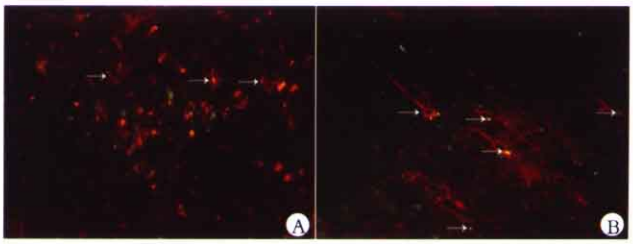


绿色与红色阳性细胞叠加后呈现桔红色

**图 4 EGFP/NPCs 的 nestin 免疫荧光** （Cy3 ×100）

### 2.4 移植 NPCs 在 Aβ 注射损毁模型大鼠海马的分布、存活与分化

NPCs 移植 AD 大鼠海马 8 周后，EGFP 自身表达呈绿色荧光，移植细胞呈集落生长，分布较为密集，主要分布在注射处，并沿针道远端扩散。移植术后 8 周，扩散分布的 NPCs 多数分化为 GFAP 阳性细胞（Cy3 红色荧光染色），其胞体较大，突起少而短小，少数 NPCs 分化为 NF200 阳性神经元，胞体较大，多数可以发出长达胞体数倍的突起，突起具有一定的朝向性。色彩重叠呈橘黄色（图 5）。




→：NPCs 分化的新生细胞

A：GFAP 免疫荧光染色；B：NF200 免疫荧光染色

**图 5 NPCs 细胞移植 8 周后在体分化情况** （Cy3 ×200）

## 3 讨论

AD 主要病理特征为老年斑和神经纤维缠结。近年来研究证实，老年斑、血管淀粉样变性及神经纤维缠结等病理改变均与 β-淀粉样蛋白有关。研究表明 AD 发病可能是通过 Aβ 激发了神经元细胞的凋亡进程而引发的[9]。凝聚态 $A\beta_{1-40}$ 的神经毒性在 AD 发病机制中起重要作用，它由 Kowall 等[10]首次报道并认为 $A\beta_{1-40}$ 诱导神经元丢失与变性可作为 AD 研究的在体模型。McDonald 等[11]亦表明大鼠海马注射 $A\beta_{1-40}$ 可诱导动物学习记忆障碍。海马定位给予老化 Aβ 注射，通过其细胞外神经毒性而建立学习记忆障碍模型，这种模型空间学习记忆能力行为改变明显，损伤部位明确，神经元丢失明显，这就有利于细胞定位移植，替代丢失神经元。

NPCs 具有终末神经细胞所不具备的自我更新能力，在生长因子、营养因子、细胞因子等刺激作用下能够自主分化为神经细胞，并表现出足够的可塑性，参与不同脑区的神经发生过程[12]。因此可以作为细胞移植的种子细胞，在体分化为功能细胞。通过 NPCs 细胞在体分化为功能神经元的特性，修复替代局部变性坏死缺失的神经元，在组织结构与功能上达到初步的治疗效果。而且移植的 NPCs 对于 Aβ 损毁区域具有靶向性的自主追踪迁移特性，为研究 AD 提供全新的思路与方法。

我们选择海马进行 $A\beta_{1-40}$ 微量注射建立 AD 模型，病理学观察显示注射区的中心为刚果红染色阳性淀粉样沉积物，其外是受损的神经元伴大量小胶质细胞浸润，最外层为反应性星形胶质细胞包绕。这与典型老年斑构成基本一致。Morris 水迷宫检测显示模型大鼠的学习、记忆能力明显减退。该模型制作简单，而且较好地模拟出 AD 学习及记忆障碍、局部神经元损伤、胶

质细胞反应等行为学和病理学方面的特征。

本实验运用已经建立的无血清培养法[8]体外诱导小鼠 ES 细胞为 NPCs,并进行 AD 模型大鼠海马齿回区移植。本实验显示,带绿色荧光蛋白标记的 NPCs 细胞在移植早期呈团块聚集;到移植后第 4 周,可见团块周围散在分布许多小细胞集落,并开始出现细胞分化现象,免疫荧光显示部分细胞分化为 GFAP 和 NF200 阳性细胞,细胞突起短小。到移植第 8 周,分化为 NF200 阳性细胞的数目更多,突起显著增长达胞体数倍长度,提示 NPCs 正逐步向终末神经细胞分化;同时细胞迁移现象提示宿主大鼠大脑对小鼠移植细胞的免疫排斥较低,使得迁移能较顺利进行;也揭示移植细胞与宿主细胞具有良好的整合作用。Morris 水迷宫测试显示,在 NPCs 移植第 8 周,模型大鼠空间学习记忆能力有所改善。至于远期形态与行为学效果需要进一步研究。

宿主的微环境对分化定向起重要作用,大鼠海马齿状回在成年期仍存在 NSC[13],这些细胞主要分化成神经元,以补充齿状回颗粒细胞[14]。外源性 NSC 移植入海马内,受其内环境影响,亦部分分化成神经元。而皮质、穹窿伞和胼胝体损伤后,受损伤内环境影响,会引起星形胶质细胞反应性增生,外源性 NSC 移植入这些区域后,则会被诱导分化成星形胶质细胞。已有研究报道认为 hES 来源的 NPCs 在移植部位分化为神经元和星形胶质细胞,而没有成熟少突胶质细胞,而且分化的神经元广泛迁移分布与增殖;移植细胞甚至迁移至对侧皮质并分化为神经元和星形胶质细胞[15]。NPCs 在体分化神经元还是胶质细胞系取决于内外诸多因素,其中已知的重要因素中,日本学者[16]认为糖蛋白 gp130 刺激细胞因子非常关键,它主要包括 LIF,IL-6、11,睫状神经营养因子 CNTF 等。通过 gp130 信号通路,移植的 NPC 可较多地分化为胶质细胞系,而神经细胞比例较少。

本实验中移植细胞的数量虽较大,但细胞存活率不是很高,直接影响了细胞的分化有效性与迁移距离,这可能与移植部位局部微环境有限的生长因子、营养因子、细胞因子等刺激因素有关。因此如何提高移植细胞的存活率及其分化比率是关键问题。阮奕文等[17]研究报道将 NGF/GDNF 基因修饰的 NPCs 移植经单侧穹隆海马伞切断的 AD 模型侧脑室,观察发现 NPCs 不仅存活率高,而且能够不同程度地促进海马胆碱能纤维网的重建。说明基因修饰 NPCs 更有利于移植细胞在体存活与分化,有利于组织结构与功能的修复。但是基因修饰细胞移植入脑内,能否表达外源基因以及表达时间的长短是判断基因治疗疗效的重要指标。

**参考文献:**


[1] Selkoe D J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy[J]. Physiol Rev, 2001, 81(2): 741 - 766.

[2] Stackman R W, Eckenstein F, Frei B, *et al*. Prevention of age-related spatial memory deficits in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by chronic Ginkgo biloba treatment[J]. Exp Neurol, 2003, 184(1): 510 - 520.

[3] Trabace L, Coluccia A, Gaetani S, *et al*. *In vivo* neurochemical effects of the acetylcholinesterase inhibitor ENA713 in rat hippocampus[J]. Brain Res, 2000, 865(2): 268 - 271.

[4] Fujisawa M, Itano T, Miyamoto O, *et al*. Mutual interaction between host and graft tissues in embryonic neural transplantation[J]. Neuroreport, 1994, 5(7): 805 - 808.

[5] Giovannelli L, Casamenti F, Scali C, *et al*. Differential effects of amyloid peptides beta-(1-40) and beta-(25-35) injections into the rat nucleus basalis[J]. Neuroscience, 1995, 66(4): 781 - 792.

[6] Paxions G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates[M]. 2nd ed. New York: Academic press, 1986.

[7] Xu H, Fan X, Wu X, *et al*. Neural precursor cells differentiated from mouse embryonic stem cells relieve symptomatic motor behavior in a rat model of Parkinson's disease[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 326(1): 115 - 122.

[8] Xu H, Fan X, Tang J, *et al*. A modified method for generation of neural precursor cells from cultured mouse embryonic stem cells [J]. Brain Res Brain Res Protoc, 2005, 15(1): 52 - 58.

[9] Cotman C W, Anderson A J. A potential role for apoptosis in neurodegeneration and Alzheimer's disease[J]. Mol Neurobiol, 1995, 10(1): 19 - 45.

[10] Kowall N W, Mckee A C, Yankner B A, *et al*. *In vivo* neurotoxicity of beta-amyloid [beta(1-40)] and the beta(25-35) fragment[J]. Neurobiol Aging, 1991, 13(5): 537 - 542.

[11] Mcdonald M P, DAHL E E, OVERMIER J B, *et al*. Effects of an exogenous beta-amyloid peptide on retention for spatial learning[J]. Behav Neural Biol, 1994, 62(1): 60 - 67.

[12] Grisolia J S. CNS stem cell transplantation: clinical and ethical perspectives[J]. Brain Res Bull, 2002, 57(6): 823 - 826.

[13] Gage F H, Kempermann G, Palmer T D, *et al*. Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus[J]. J Neurobiol, 1998, 36(2): 249 - 266.

[14] Eriksson P S, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, *et al*. Neurogenesis in the adult human hippocampus[J]. Nat Med, 1998, 4(11): 1313 - 1317.

[15] Wennersten A, Meier X, Holmin S, *et al*. Proliferation, migration, and differentiation of human neural stem/progenitor cells after transplantation into a rat model of traumatic brain injury[J]. J Neurosurg, 2004, 100(1): 88 - 96.

[16] Mawatari Y, Fukushima M, Inoue T, *et al*. Preferential differentiation of neural progenitor cells into the glial lineage through gp130 signaling in N-methyl-D- aspartate-treated retinas[J]. Brain Res, 2005, 1055(1 - 2): 7 - 14.

[17] 阮奕文,王传恩,徐　杰,等. 神经生长因子/胶源性神经营养因子基因修饰神经前体细胞单独和联合移植促进阿尔茨海默病模型鼠海马胆碱能纤维网的重建[J]. 解剖学杂志, 2001, 24(2): 101 - 105.


(编辑　薛国文)