文章编号:1000-5404(2007)10-0915-04

论著

小鼠胚胎神经干细胞海马移植对APP/PS1双转基因AD小鼠的治疗作用

武 强[1],李露斯[1],范文辉[1],宋 敏[2],杨 忠[3] (第三军医大学:[1]西南医院神经内科,[2]基础医学部医学遗传学教研室;[3]基础医学部神经生物学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 在APP/PS1双转基因阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)小鼠观察神经干细胞(nerual stem cells, NSCs)移植后细胞的存活、迁移以及对小鼠记忆功能的影响。**方法** 增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)质粒转染培养胚胎NSCs,小鼠海马内移植,水迷宫实验检测小鼠认知功能。**结果** EGFP转染NSCs海马内移植2个月后可观察到GFP阳性细胞,大部分分布在针道附近,部分向同侧皮层迁移,亦有部分通过胼胝体向对侧大脑迁移,同时小量细胞发出类似于神经元的长突起。AD小鼠的记忆功能明显改善。**结论** 胚胎NSCs海马内移植后能存活、迁移并分化为神经组织细胞,并能显著改善APP/PS1双转基因AD小鼠的认知功能障碍。

关键词: 阿尔茨海默病;胚胎神经干细胞;转基因小鼠;移植
中图法分类号: R329.2;R651.11;R749.160.5 **文献标识码:** A

Therapeutic effect of mouse embryonic neural stem cells replacement into hippocampus of APP/PS1 double transgenic mice of Alzheimer disease

WU Qiang[1], LI Lu-si[1], FAN Wen-hui[1], SONG Min[2], YANG Zhong[3] ([1]Department of Neurology, Southwest Hospital, [2]Department of Medical Genetics, [3]Department of Neurobiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the survival, migration and effect of mouse embryonic neural stem cells (NSCs) after NSCs transplantation into the hippocampus of APP/PS1 double transgenic mice of Alzheimer disease (AD). **Methods** EGFP gene was transfered into NSCs by Nucleofector™. The memory of mice was evaluated by Morris water maze test after NSCs transplantation into the hippocampus. **Results** Two months after NSCs transplantation, most of the GFP positive cells were found near the pin hole, and some migrated into the ipsilateral cortex as well as opposite side cortex through corpus callosum. Long processes were observed in a few positive cells. Hidden platform test showed the mean latency in transgenic mice transplanted with NSCs was markedly shortened. **Conclusion** Transplanted NSCs can survive, migrate and differentiate into nerve cells in the hippocampus of APP/PS1 double transgenic mice. The memory impairment of APP/PS1 double transgenic mice of Alzheimer disease was markedly relieved.

Key words: Alzheimer disease; embryonic neural stem cells; transgenic mice; transplantation

家族性阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)与β-淀粉样前体蛋白(β-amyloid precursor protein, APP)基因和早老素Ⅰ(presenilin Ⅰ, PS1)、早老素Ⅱ(presenilin Ⅱ, PS2)基因等突变有关。由于这些突变基因加上其他因素的作用,导致β-淀粉样蛋白(β-amyloid peptide, Aβ)大量产生并在脑内沉积、聚集和纤维化形成老年斑(senile plaques, SP),诱发AD患者脑内一系列的病理改变[1]。携带有突变APP和PS1基因的双转基因AD模型小鼠能够模拟AD患者脑内的一些主要的神经病理过程。

随年龄的增长皮层和海马等部位出现大量SP[2]、胆碱能神经元丢失[3]及学习记忆障碍等神经行为功能的改变[4]等,是目前研究AD较好的动物模型。目前对AD的治疗方法包括:抗氧化应激治疗、雌激素替代治疗、抗Aβ治疗等。这些治疗手段虽然能够减轻AD的症状,但无法补充大脑皮层和海马大量丢失的神经细胞,因而对于中晚期的AD患者疗效有限。神经移植被视为可解决这一矛盾的治疗策略[5]。早期研究表明,植入老年啮齿类动物脑内的神经元能在一定程度上和受体脑组织发生整合,并能提高老年动物

基金项目: 国家自然科学基金(30100058)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30100058)
作者简介: 武 强(1971-),男,河南省许昌市人,博士研究生,副主任医师,主要从事老年痴呆基础和临床方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)60608890
通讯作者: 范文辉,电话:13908362802
收稿日期: 2006-11-06;**修回日期:** 2006-12-20

的学习记忆和认知功能[6]。本研究将小鼠胚胎神经干细胞(nerual stem cells, NSCs)定点注射到 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠海马,观察移植细胞的存活、分化以及对 AD 双转基因小鼠学习记忆的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组处理

美国国立 Jackson 动物中心提供 B6C3-Tg(APPswe, PSEN1de9)85Dbo/J 品系双转基因小鼠杂合体种鼠 2 只,繁衍所产生后代,均为 10~11 月龄。小鼠使用前进行基因型检测,其中阳性的 APP/PS1 纯合子双转基因 AD 小鼠 24 只,阴性纯合子(野生型)30 只,分笼喂养于光照/黑暗为 12 h/12 h 的恒温环境,每笼 2 只,自由摄食和饮水。

1.2 主要试剂

人工脑脊液组成(mmol/L):NaCl 124.0, KCl 3.0, $MgSO_4$ 1.0, KH_2PO_4 1.2,葡萄糖 10.0, $NaHCO_3$ 25.0, $CaCl_2$ 1.0,pH 7.2~7.4。二级昆明孕小鼠(E12-13)由本校实验动物中心提供,DMEM/F12、胎牛血清、bFGG、B27(Gibco 公司),山羊抗小鼠 Nestin 抗体、兔抗小鼠 GFAP 抗体(Santa 公司),小鼠抗小鼠 MAP-2 抗体(Santa 公司),罗丹明标记山羊抗小鼠二抗、罗丹明标记山羊抗兔二抗、FITC 标记山羊抗兔二抗、罗丹明标记兔抗山羊二抗(中山公司),pEGFP 质粒由本校组织胚胎学教研室惠玲博士惠赠,电穿孔仪、小鼠神经干细胞转染试剂盒(amaxa 公司)。

1.3 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠的行为学检测

1.3.1 实验设置 Morris 水迷宫由直径 120 cm、高 47 cm 圆形水池及直径为 9 cm 的站台构成,液面高出站台 0.5 cm,水温维持在(25.0±0.5)℃。整个实验过程分为隐蔽平台获得实验(hidden-platform acquisition training)和空间搜索实验(probe trial testing)两部分。

1.3.2 隐蔽平台获得实验 用于测量动物在水迷宫中的学习和记忆能力。实验历时 6 d。实验前动物自由游泳 2 min。隐蔽平台放在一个象限的中央,在整个实验中平台的位置固定不变。在任何一个象限内轻轻地将每只小鼠放入水中,头朝外壁,并且靠近外壁。每次放小鼠的位置是随机性的。当小鼠爬到隐蔽平台上或到达 60 s 时,即停止实验。小鼠爬到隐蔽平台上后让其停留 10 s。如果 60 s 内小鼠没有找到平台,则实验者引导其爬到隐蔽平台上,并让其停留 10 s。正式实验每天训练 4 次,每次间隔 30 min。通过影像跟踪系统记录实验过程中小鼠寻找并爬上平台所需时间即逃避潜伏期(escape latency)。

1.3.3 空间搜索实验 用于测量动物对平台空间位置准确记忆,即记忆保持能力。第 7 天撤除平台,任选一个入水点将动物放入水中,动物在水中游泳 60 s,测量 60 s 内小鼠在目标象限(原平台所在象限)(target quadrant, TQ)和其他象限的游泳时间。

1.4 小鼠胚胎神经干细胞的培养及标记

1.4.1 小鼠胚胎神经干细胞的培养 将孕小鼠脱颈处死,立即置入 750 ml/L 乙醇浸泡 15 min,在无菌条件下剖腹取出胎鼠,胎头放入含有 3 ml 无血清 DMEM 培养液的培养皿中。随后在解剖显微镜下分离胎鼠大脑皮质并剥离胎膜及血管,用眼科剪将组织块进一步剪碎。其后将上述脑组织液用滴管吸入离心管中,反复吹打至肉眼下看不到组织块为止,并通过 200 目的筛网过滤,以去除黏连的组织纤维,将收集到的细胞悬液离心后,重悬于条件培养液(DMEM/F12 1∶1、bFGF 20 μg/L、B27 20 μg/L),使最终细胞浓度达 1×10^8/L,置入 37 ℃、50 ml/L CO_2 培养箱,6~7 d 传代 1 次,细胞传代:50 ml 培养瓶细胞数为 3×10^5 个,培养条件同前,6~7 d 传代 1 次。

1.4.2 增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)转染神经干细胞 收集第 3 代的神经干细胞数目为(4~5)$\times10^6$,800 r/min 离心 5 min,去上清,依次加入 100 μl 小鼠神经干细胞转染液和 5 μg EGFP 质粒,Nucleofector 转染仪转染,使用 A-33 程序,成功后种植于 6 孔培养板,每孔种植 1×10^6 个细胞,G418(300~500 mg/L)筛选 5 d。

1.5 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠海马的神经干细胞移植

小鼠分为以下 3 组:①NSCs 移植组(移植后 2 个月):选取 APP+/PS1+ 双转基因 AD 小鼠 8 只、APP-/PS1- 双转基因 AD 小鼠 10 只实施 NSCs 移植,海马注射坐标:后囟前 2.0 mm,旁开 3.5 mm,进针 3 mm,缓慢进针,注射速度 1 μl/min,注毕留针 15 min,缓慢退针(1 mm/min),移植细胞剂量为 5 μl[细胞计数为(1~2)$\times10^5$]。②人工脑脊液移植组(移植后 2 个月):选取 APP+/PS1+ 双转基因 AD 小鼠 8 只、APP-/PS1- 双转基因 AD 小鼠 10 只实施人工脑脊液移植,移植细胞剂量为 5 μl。以上两组术后 53~59 d 水迷宫检测行为学改变,术后 60 d 按常规麻醉、灌注和固定。③空白对照组:选取 APP+/PS1+ 双转基因 AD 小鼠 8 只、APP-/PS1- 双转基因 AD 小鼠 10 只仅进行水迷宫记忆测试后按常规麻醉、灌注和固定。

1.6 细胞免疫荧光染色方法及组织荧光标记观察

将培养第 3 代的神经干细胞滴在多聚赖氨酸处理过的盖玻片上,950 ml/L 乙醇固定 1 h 后,0.1 mol/L PBS 冲洗,30 ml/L H_2O_2 灭活内源性酶,正常兔血清封闭。加入 Nestin 单抗(1∶200),室温 1 h,4 ℃过夜,用 PBS 漂洗后,其余步骤按免疫荧光方法常规操作。传至第 3 代的神经干细胞加入含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液(无 bFGF、B27),使其诱导分化为神经细胞,其中神经元、星形胶质细胞则分别用抗 MAP-2 单抗、抗 GFAP 单抗来标记。所采用的荧光抗体为罗丹明标记山羊抗小鼠二抗、罗丹明标记山羊抗兔二抗、FITC 标记山羊抗兔二抗。

小鼠按常规进行组织灌注、固定、取出脑组织进行冰冻切片(35 μm)。PBS 漂洗后封片,荧光显微镜下观察。

1.7 统计学处理

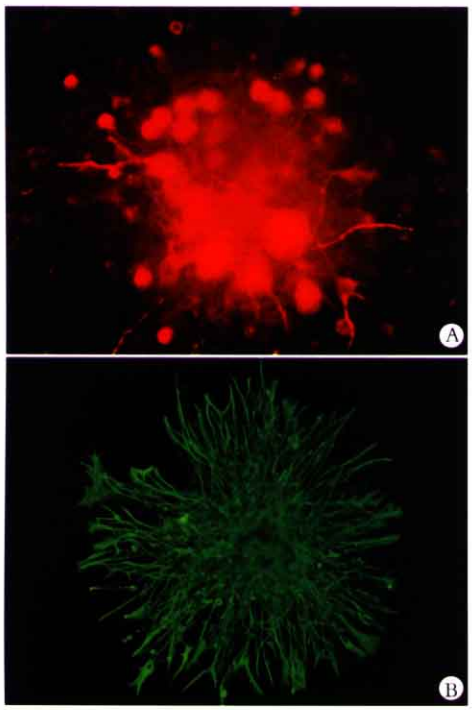
数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行双因素方差分析。

2 结果

2.1 神经干细胞的培养与转染

采用上述分离方法所获得的胚胎小鼠神经干细胞培养 6~7 d 后见细胞集落以球形或卵圆形居多,还可见桑椹状,这些克隆呈悬浮生长,经 Nestin 免疫荧光染色呈强阳性,整个克隆呈亮红色。在加入含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液(无 bF-

GF、B27）12 h 后可见多数细胞克隆贴壁，2 d 后见少数细胞分化成有突起的细胞，3～4 d 后分化细胞显著增加，以克隆球为中心向外围呈放射状排列。10～14 d 后克隆球基本消失，取之为形态各异的分化细胞。对诱导 2～4 d 的细胞分别进行了 GFAP、MAP-2 免疫荧光染色，部分细胞呈阳性表达（图 1）。培养的小鼠胚胎神经干细胞转染 EGFP 约 4 h 后发出绿色荧光，48 h 达到高峰，G418（300～500 mg/L）筛选 5 d，移植备用。

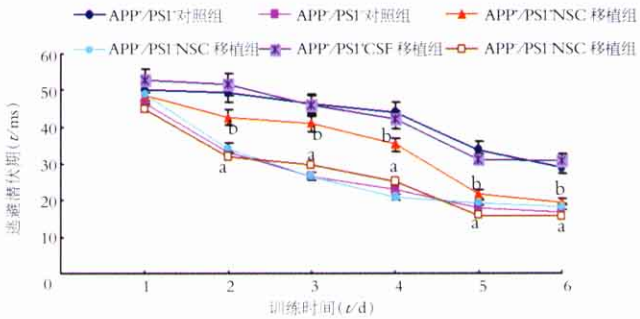


A：GFAP；B：MAP-2

图 1　GFAP 和 MAP-2 免疫组织化学标记的神经干细胞　（荧光相差显微镜 ×200）

2.2　APP/PS1 双转基因 AD 小鼠的水迷宫实验

空白对照组中 APP＋/PS1＋ 双转基因 AD 小鼠水迷宫测试潜伏期高于 APP-/PS1- 双转基因 AD 小鼠（$P<0.05$），在探索实验中，APP＋/PS1＋ 双转基因 AD 小鼠在目标象限停留时间比例与 APP-/PS1- 双转基因 AD 小鼠无明显差异（$P>0.05$）。NSCs 移植组：NSCs 移植术后 53～58 d，APP＋/PS1＋ 双转基因 AD 小鼠水迷宫测试潜伏期高于 APP-/PS1- 双转基因 AD 小鼠（$P<0.05$）；移植术后 59 d，在探索实验中 APP＋/PS1＋ 双转基因 AD 小鼠在目标象限停留时间比例亦少于 APP-/PS1- 双转基因 AD 小鼠，但无统计学意义（$P>0.05$）。人工脑脊液移植组：人工脑脊液移植术后 53～58 d，APP＋/PS1＋ 双转基因 AD 小鼠水迷宫测试潜伏期高于 APP-/PS1- 双转基因 AD 小鼠（$P<0.05$）；移植术后 59 d，在探索实验中 APP＋/PS1＋ 双转基因 AD 小鼠在目标象限停留时间比例少于 APP-/PS1- 双转基因 AD 小鼠，但无统计学意义（$P>0.05$）。而在组间比较中，海马移植 NSCs 后 53～58 d，APP＋/PS1＋ 双转基因 AD 小鼠水迷宫测试潜伏期明显短于海马移植人工脑脊液 53～58 d 的 APP＋/PS1＋ 双转基因 AD 小鼠及空白 APP＋/PS1＋ 双转基因 AD 小鼠（$P<0.05$）；移植术后 59 d 的探索实验中，移植 NSCs 的 APP＋/PS1＋ 双转基因 AD 小鼠在目标象限停留时间比例与移植人工脑脊液的 APP＋/PS1＋ 双转基因 AD 小鼠及空白 APP＋/PS1＋ 双转基因 AD 小鼠无显著性差异（$P>0.05$）（图 2）。



a：$P<0.05$，与 $APP^-/PS1^-$ AD 各组比较；b：$P<0.05$，$APP^+/PS1^+$ AD 干细胞移植组与 $APP^+/PS1^+$ AD 对照组及人工脑脊液移植组比较

图 2　各组小鼠在隐蔽平台实验 1～6 d 的平均逃避潜伏期

2.3　移植 NSCs 在 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠脑内的分布、存活和迁移

小鼠胚胎 NSCs 转染 EGFP 后发出亮绿色荧光，移植到 AD 小鼠海马 2 个月后 NSCs 分布在针道附近并发出亮绿色荧光（图 3），有部分细胞迁移到同侧大脑皮层（图 4），并有沿着胼胝体向对侧大脑迁移的趋势。移植的 NSCs 部分分化为神经样细胞（图 5）。而注射人工脑脊液组在 AD 小鼠脑内未见转染 EGFP 的阳性细胞。

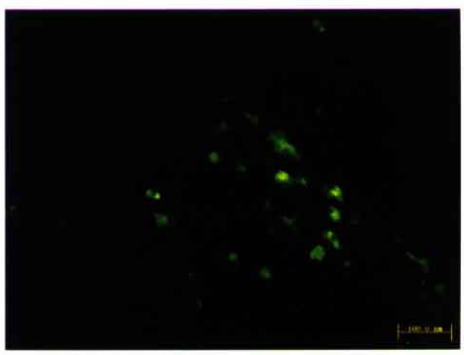


图 3　转染 pEGFP 的神经干细胞移植后（荧光相差显微镜 ×200）

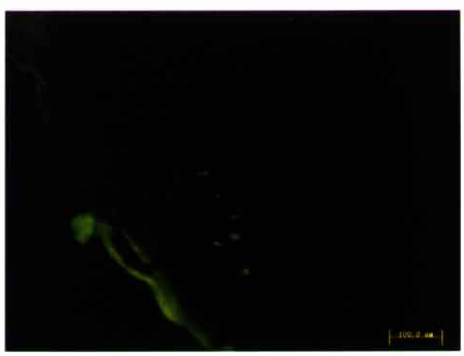


图 4　转染 pEGFP 的神经干细胞移植后（荧光相差显微镜 ×200）

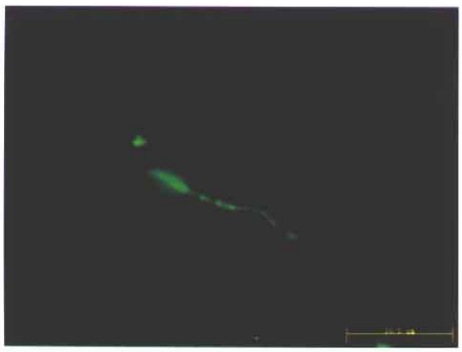


图5 转染 pEGFP 的神经干细胞移植后
（荧光相差显微镜×400）

3 讨论

AD 转基因小鼠为研究 AD 的病理过程及 AD 的防治提供了理想的工具。目前常用的转基因 AD 模型小鼠主要有 APP 单转基因和 APP/PS1 双转基因模型小鼠。相对来说 APP/PS1 双转基因小鼠不仅脑内出现 Aβ 沉积形成 SP 的时间早，而且 Aβ 的量多并伴有突触丢失以及与年龄有关的神经行为功能障碍等，是研究 AD 病理改变较好的模型[2]。Jackson 动物中心提供的 APP/PS1 双转基因小鼠 9 个月时在皮层和海马内可见明显 Aβ 斑块形成，围绕在 Aβ 斑块周围的小胶质细胞和星形胶质细胞处于活化状态，形成典型的老年斑结构[7]。

本实验观察到 $APP^+/PS1^+$ 双转基因 AD 小鼠在水迷宫测试潜伏期与 $APP^-/PS1^-$ 双转基因 AD 小鼠有统计学差异，但在探索实验中却无差异，这也与 Ewers[4] 的结果基本一致。Ewers 等认为随着 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠年龄的增长，其神经行为学损害进行性加重，其中水迷宫潜伏期测试实验具有很好的敏感性，而探索实验缺乏敏感性。另外本实验观察到移植 NSCs 后 $APP^+/PS1^+$ 双转基因 AD 小鼠在水迷宫测试潜伏期明显缩短，AD 小鼠脑片结果也表明：标记 EGFP 的 NSCs 移植到 $APP^+/PS1^+$ 双转基因 AD 小鼠海马内 2 个月后可见到 NSCs 仍然存活，大部分分布在针道附近，部分细胞向同侧皮层迁移，亦有部分 NSCs 通过胼胝体向对侧大脑迁移。提示移植神经干细胞可以提高 $APP^+/PS1^+$ 双转基因 AD 转基因小鼠的学习和记忆能力。考虑可能是因为移植后的神经干细胞在局部微环境的作用下，分化成为胆碱能神经元和其他一些神经支持细胞，从而提高了 AD 的行为学结果。国外 Tate 等[8] 的研究发现注射到对侧脑室的小鼠 NSCs 能够迁移并包围另一侧的 Aβ 注射区，对转基因 AD 小鼠的研究结果也类似。这也与本实验显示 NSCs 的迁移现象基本一致，提示外源性 NSCs 具有 Aβ 损伤区的自主追踪性迁移。

我们既往的研究表明[9]，体外培养的小鼠胚胎神经干细胞能够在适宜的条件下长期生长，转染了 EGFP 的神经干细胞在体外经多次传代后仍能检测到 EGFP 的表达，能进一步分化为神经元和神经胶质细胞。本研究表明将标记了 EGFP 的 NSCs 作为种子细胞，移植了 NSCs 的 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠记忆功能有所改变。移植的 NSCs 在脑内呈克隆样生长，这一生长方式类似于 NSCs 在体外的神经球生长方式。我们同时观察到部分 NSCs 可向移植同侧的皮层及对侧大脑迁移，且部分 NSCs 发出长突起，提示移植的 NSCs 具有迁移及终末分化的能力。

综上所述，本实验证明移植的 NSCs 可以在小鼠脑内存活、迁移并使 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠记忆功能有所改善。今后通过对 NSCs 在脑内定向分化及功能整合等的深入研究，将可能阐明 NSCs 改善 AD 小鼠认知功能的神经机制。

参考文献：

[1] Parihar M S, Hemnani T. Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions[J]. J Clin Neurosci, 2004, 11(5): 456-467.

[2] Garcia-Alloza M, Robbins E M, Zhang-Nunes S X, *et al*. Characterization of amyloid deposition in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer disease[J]. Neurobiol Dis, 2006, 24(3): 516-524.

[3] Valla J, Schneider L, Reiman E M. Age- and transgene-related changes in regional, cerebral metabolism in PSAPP mice[J]. Brain Res, 2006, 1116(1): 194-200.

[4] Ewers M, Morgan D G, Gordon M N, *et al*. Associative and motor learning in 12-month-old transgenic APP + PS1 mice[J]. Neurobiol Aging, 2006, 27(8): 1118-1128.

[5] 武 强，李露斯，范文辉. 阿尔茨海默病的神经干细胞治疗进展[J]. 中国康复医学杂志，2006, 21(8): 757-759.

[6] Dunnett S. Cholinergic grafts, memory and ageing[J]. Trends Neurosci, 1991, 14(8): 371-376.

[7] 宋 敏，唐 军，李达兵，等. PS1/APP 双转基因阿尔茨海默病模型传代小鼠的基因型鉴定及其组织学分析[J]. 第三军医大学学报，2006, 28(14): 1453-1456.

[8] Tate B A, Werzanski D, Marciniack A, *et al*. Migration of neural stem cells to Alzheimer-like lesions in an animal model of AD[J]. Soc Neurosci Abstr, 2000, 26(1): 496-497.

[9] 武 强，李露斯，范文辉，等. 小鼠胚胎神经干细胞的体外培养及增强型绿色荧光蛋白基因转染研究[J]. 中国康复医学杂志，2006, 21(10): 877-878, 892.

（编辑 汪勤俭）