文章编号:1000-5404(2009)09-0805-04

论著

促红细胞生成素对血管性痴呆大鼠神经干细胞增殖分化的影响

黄 燕[1],王景周[1],张 涛[1],罗跃嘉[2] ([1]第三军医大学大坪医院野战外科研究所神经内科,重庆 400042;[2]中国科学院心理健康重点实验室,北京 100101)

摘 要:目的 探讨促红细胞生成素(erythropoietin,EPO)对血管性痴呆(vascular dementia,VD)大鼠神经干细胞(neural stem cell, NSC)增殖、分化及认知功能的影响。**方法** SD大鼠45只,按随机数字表法分为对照组、VD组和治疗组;改良2-VO+硝普钠法建立VD大鼠模型;治疗组腹腔注射EPO;采用穿梭箱系统检测大鼠认知功能;免疫组化法检测神经干细胞增殖分化情况。**结果** 行为学测试:VD组大鼠AAR比率显著低于对照组($P<0.01$);治疗组大鼠AAR比率显著高于VD组($P<0.01$),但仍显著低于对照组($P<0.01$)。免疫组化结果:BrdU(5-Bromodeoxyuridine)标记阳性细胞随时间推移从海马颗粒下层(the subgranular zone,SGZ)向颗粒细胞层(granule cell layer ,GCL)迁移。造模后1周,VD组BrdU标记阳性细胞数明显高于对照组($P<0.01$),低于治疗组($P<0.01$);治疗组大鼠BrdU+DCX(doublecortin)双标阳性细胞数明显高于VD组($P<0.01$)。造模后4周,各组BrdU标记阳性细胞数与造模后1周相比均有明显下降,其中VD组下降最明显。治疗组BrdU+NSE(neuron-specific-enolase)双标阳性细胞数明显多于VD组($P<0.01$)。各组大鼠各时相点BrdU标记阳性细胞数中神经元所占比例无统计学差异($P>0.05$)。**结论** 腹腔注射EPO可促进VD大鼠脑内NSC增殖,显著改善大鼠认知功能,但对NSC分化无明显影响。

关键词: 血管性痴呆;神经干细胞;促红细胞生成素;大鼠
中图法分类号: R329.28; R749.13; R977 **文献标识码:** A

Erythropoietin improves proliferation but not differentiation of neural stem cells in vascular dementia rats

HUANG Yan[1], WANG Jing-zhou[1], ZHANG Tao[1], LUO Yue-jia[2] ([1]Department of Neurology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042; [2]Key Laboratory of Mental Health, Institute of Psychology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Objective To explore the effects of erythropoietin (EPO) on the proliferation and differentiation of neural stem cells and on the cognition function of vascular dementia (VD) rats. **Methods** Totally 45 Sprague-Dawlev (SD) rats were randomly and equally divided into the sham control group, the VD group, and the treatment group. The VD rat model was established by performing cerebral ischemia/reperfusion repeatedly and given an intraperitoneal injection sodium nitroprusside. The rats from the treatment group received an introperitoneal injection of EPO after the establish of VD model, and the animals from the others were treated with normal saline. The learning-memory abilities were measured by using computerized shuttle-training case and the proliferation and differentiation of neural stem cells were detected by immunofluorescence staining. **Results** The active avoidance reaction (AAR) ratio in the VD group was significantly decreased compared with the sham control group ($P<0.01$), but that in the treatment group was higher than the VD group ($P<0.01$) though still lower than the sham group ($P<0.01$). During the 4 weeks we observed, BrdU labeled cells were migrated from the subgranular zone to granule cell layer. In 1 week after the model established, the number of BrdU labeled cells in the VD group was significantly larger than in the sham control group, but lower than that in the treatment group ($P<0.01$). Immunofluorescence staining showed that the number of BrdU and DCX double labeled cells in the treatment group was significantly larger than that in the VD group. In 4 weeks, the number

基金项目: 重庆市自然科学基金(2008AC5119);重庆市医学会神经病学专委会"步长杯"基金重点项目(2008)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (2008AC5119) and the Key Program of "Buchang Cup" Foundation of Chongqing Neurology Medical Association (2008)

作者简介: 黄 燕,女,重庆市人,硕士研究生,主要从事血管性痴呆方面的研究。E-mail:lucia_327@163.com
通信作者: 王景周,电话:(023)68757844,E-mail:Wangjzjm@163.com

收稿日期: 2008-12-01;**修回日期:** 2009-01-04

of BrdU labeled cell was decreased in each group, especially in the VD group, and the number of BrdU and NSE double labeled cells in the treatment group was significantly larger than that in the VD group. But the percentage of BrdU-labeled cells co-labeled with DCX/NSE had no significant difference. **Conclusion** EPO treatment enhances the proliferation of neural stem cells and improves the ability of learning and memory in VD rats, but has no obvious influence on the differentiation of the neural stem cells.

Key words: vascular dementia; neural stem cell; erythropoietin; rats

血管性痴呆(vascular dementia,VD)是指缺血性、出血性脑血管疾病引起的脑损伤痴呆综合征。现代医学在VD的发病机制及诊断方面取得了较大的进展,但临床治疗手段尚无重大突破。近年来神经干细胞(neural stem cell, NSC)研究进展迅速,已证实在成年哺乳动物侧脑室室管膜下区(subventricular zone, SVZ)、海马齿状回颗粒下区(the subgranular zone, SGZ)存在NSC。在一定条件下NSC能够增殖,并向特定方向分化[1],但增殖的细胞不能很好地修复脑部受损结构,对神经功能的恢复作用也很小[2]。因此,如何大量调动NSC供临床治疗使用已成为当今干细胞研究的热点和难点。某些神经营养因子能促进NSC增殖分化,在神经细胞的发育和再生过程中发挥不可替代的作用。近年研究表明,促红细胞生成素(erythropoietin,EPO)除可诱导红系祖细胞增殖分化来治疗贫血以外,还可作为一种神经营养物质,起到内源性神经保护作用,在一定条件下能促进NSC生长[3]。本研究对VD大鼠给予EPO治疗,通过观察大鼠海马区NSC增殖分化情况,探讨EPO治疗后对VD大鼠认知功能改善的机制,为临床治疗血管性痴呆提供新的方法和思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

选取清洁级2月龄SD大鼠(本所实验动物中心提供)45只,雄性,体质量250~300 g。将大鼠按随机数字表法分为对照组、VD组、治疗组。每组取造模后1、2、4周3个时相点,每个时相点5只大鼠。

1.2 主要试剂和器材

BrdU、小鼠抗BrdU抗体(美国Sigma公司),兔抗DCX抗体(英国Abcam公司),EPO(华北制药集团金坛生物技术开发有限公司,商品名济脉欣),兔抗NSE抗体、TRITC标记抗小鼠IgG、FITC标记抗兔IgG、S-P试剂盒等(北京中杉公司)。

1.3 VD大鼠模型制作

采用两血管阻断加硝普钠降压法制作VD动物模型[4]。

1.4 穿梭箱检测

采用本所第五研究室制作的穿梭箱系统测试大鼠认知功能[5]。该系统以灯光为条件刺激,电刺激为非条件刺激。每次实验进行20次光、电刺激。大鼠受刺激后能躲避至对侧暗箱为成功1次,光刺激大鼠即能完成穿梭动作为主动回避反应(active avoidance reaction,AAR)。大鼠的学习记忆能力用完成AAR的次数与测试总次数(20次)的比值即AAR比率表示。每只大鼠均连续进行7 d训练,AAR≥80%作为入选标准。

1.5 BrdU和EPO大鼠腹腔注射

造模后各组大鼠给予腹腔内注射BrdU(50 mg/kg),每天2次,连续7 d;治疗组腹腔内注射EPO(5 000 U/kg),每天1次,连续7 d,其余2组给予等量生理盐水腹腔注射。

1.6 大鼠脑灌注固定及取材

①取材:实验大鼠分别于造模后相应时相点断头取脑,以4%多聚甲醛固定24 h后,置于30%蔗糖PBS溶液中至标本沉底。②组织切片:脑组织冰冻切片机冠状面切片,片厚20 μm,切片贴片置于-20 ℃保存。

1.7 大鼠脑标本BrdU标记及免疫荧光双标

鼠脑切片进行BrdU免疫组化染色,DCX+BrdU、NSE+BrdU免疫荧光双标染色。以正常山羊血清替代第1抗体作为阴性对照。染色标本显微镜下观察并照片。

1.8 数据处理及统计学分析

每个鼠脑切片分4组,间隔120 μm取1张计数,每组7~9张切片。显微镜下观察海马区BrdU、DCX+BrdU、NSE+BrdU阳性细胞并计数,得出各组阳性细胞数平均值。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 13.0统计软件进行单因素方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠穿梭箱测试结果比较

造模后各时相点VD组大鼠AAR比率均显著低于对照组($P<0.01$),治疗组显著高于VD组($P<0.01$),但显著低于对照组($P<0.01$)。见表1。

表1 各组大鼠造模前后不同时相点AAR比率结果(%,$\bar{x} \pm s$)

组别	n	造模前	造模后		
			1周	2周	4周
对照组	5	92.0±5.7	87.0±5.7	89.0±6.5	89.0±6.5
VD组	5	89.0±6.5	43.0±4.5[a]	47.0±5.7[a]	48.0±5.7[a]
治疗组	5	91.0±6.5	62.0±5.7[ab]	70.0±6.1[ab]	72.0±5.7[ab]

a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.01$,与VD组比较

2.2 各组大鼠海马区NSC增殖的变化

造模后1周,BrdU标记阳性细胞主要分布在SGZ,形状不规则,紧密排列,成簇出现。VD组BrdU标记阳性细胞明显多于对照组($P<0.01$),低于治疗组($P<0.01$)。造模后4周,对照组大鼠BrdU标记阳性细胞无明显变化;VD组和治疗组BrdU标记阳性细胞主要分布在SGZ和GCL,且细胞数量较造模后1周明显减少($P<0.01$),VD组下降明显,与对照组无统计学差异($P>0.05$),治疗组下降幅度最小,细胞数量明显多于其余2组($P<0.01$)。见图1,表2。

2.3　各组大鼠海马区 NSC 分化的变化

造模后 1 周,治疗组 BrdU + DCX 免疫荧光双标阳性细胞数明显高于 VD 组($P<0.01$),2 组间 BrdU + DCX 阳性细胞与 BrdU 阳性细胞数的比例无统计学差异($P>0.05$);造模后 4 周,治疗组大鼠 BrdU + NSE 免疫荧光双标阳性细胞数明显高于 VD 组($P<0.01$),2 组间 BrdU + NSE 阳性细胞与 BrdU 阳性细胞数的比例无统计学差异($P>0.05$)。见图 2,表 3。

表 2　各组大鼠造模后不同时相点 BrdU 标记阳性细胞数

(个/切片,$\bar{x}\pm s$)

组别	1 周	2 周	4 周
对照组	8.2 ± 2.9	7.9 ± 2.8	7.0 ± 3.0
VD 组	28.1 ± 3.5[a]	18.7 ± 3.3[a]	7.8 ± 2.9[c]
治疗组	77.1 ± 3.6[ab]	42.6 ± 3.4[ab]	38.1 ± 3.1[abc]

a: $P<0.01$, 与对照组比较; b: $P<0.01$, 与 VD 组比较; c: $P<0.01$, 与 1 周比较

表 3　大鼠造模后各时相点海马区免疫荧光双标细胞表达结果

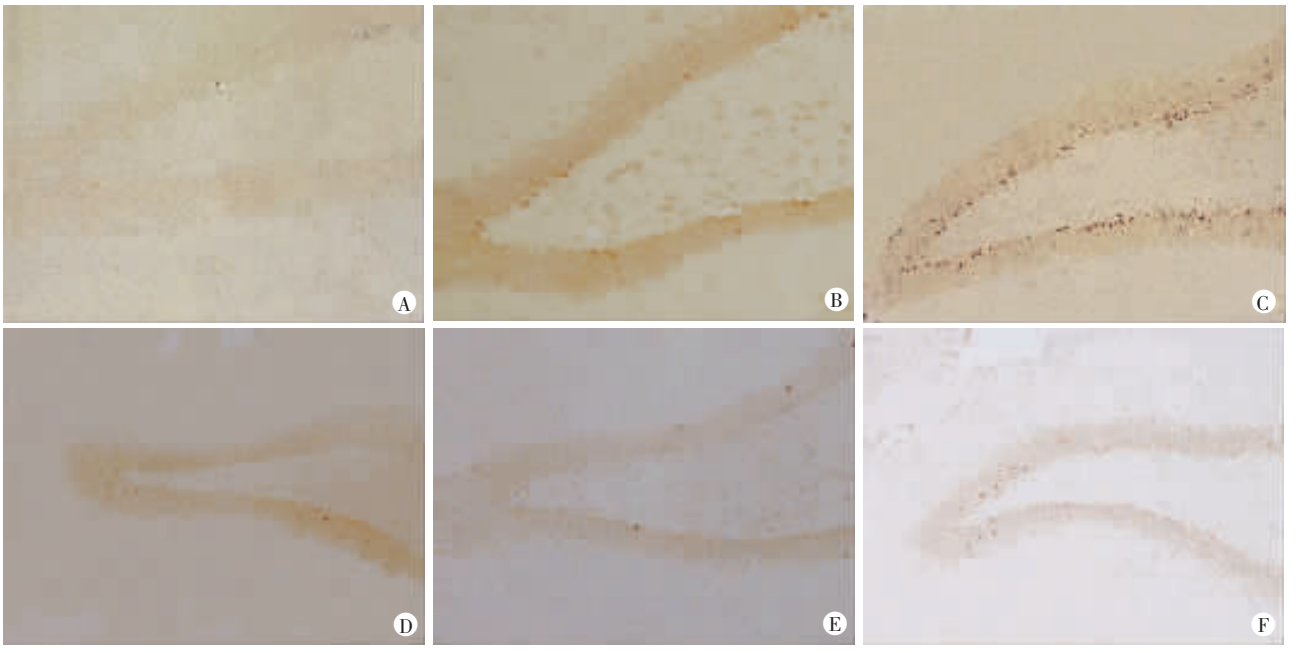
($\bar{x}\pm s$)

组别	1 周		4 周	
	DCX + BrdU (个/切片)	(DCX + BrdU)/BrdU (%)	NSE + BrdU (个/切片)	(NSE + BrdU)/BrdU (%)
VD 组	20.7 ± 4.4	73.3 ± 9.2	5.5 ± 1.8	71.9 ± 7.9
治疗组	58.2 ± 5.4[a]	75.7 ± 7.8	27.5 ± 1.7[a]	72.4 ± 6.2

a: $P<0.01$, 与 VD 组比较

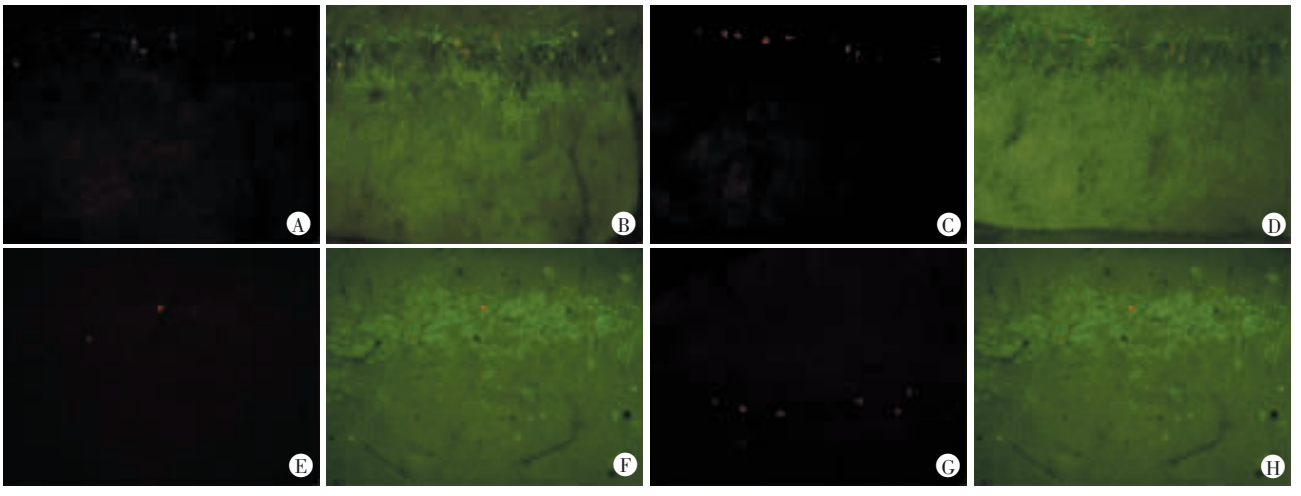
3　讨论

VD 记忆能力障碍是痴呆的第 3 位常见病因,随着社会人口老龄化,VD 的发病率不断增加。近年研究表明 EPO 是一种内源性细胞因子,通过自分泌和旁分泌的方式来影响神经元的活动,具有神经保护作用。Lu 等[6] 研究表明在脑缺血大鼠模型缺血后 1 d 给予



A、D: 对照组; B、E: VD 组; C、F: 治疗组; A、B、C: 造模 1 周; D、E、F: 造模 4 周

图 1　各时相点大鼠海马区 BrdU 免疫组化染色观察　(S-P ×200)



A、B: VD 组 BrdU、BrdU + DCX 标记阳性细胞; C、D: 治疗组 BrdU、BrdU + DCX 标记阳性细胞; E、F: VD 组 BrdU、BrdU + NSE 标记阳性细胞; G、H: 治疗组 BrdU、BrdU + NSE 标记阳性细胞

图 2　各时相点大鼠海马区免疫荧光染色观察　(×400)

EPO 治疗,能够减轻认知功能缺失并促进神经干细胞增殖。而敲除 EPOR 基因或注射 EPO 抗体后,脑内神经发生明显减弱[7]。然而目前国内外尚少见 EPO 对 VD 动物神经干细胞影响的报道。本实验采用电脑控制穿梭箱系统检测 EPO 对 VD 大鼠认知功能的影响。结果显示 VD 组大鼠 AAR 比率显著低于对照组及治疗组,学习记忆能力障碍最大。治疗组 AAR 比率显著高于 VD 组,且随时间的推移治疗组 AAR 比率逐步提高,证实 EPO 治疗有助于 VD 大鼠认知功能恢复。

BrdU 为胸腺嘧啶的衍生物,在细胞 S 期 DNA 合成时被当做胸苷掺入到新合成的 DNA 双链中。组织内无内源性 BrdU 存在,一旦掺入 DNA 双链后,BrdU 将永久标记在细胞内。利用其特性建立的定性定量检测细胞增殖和分化的方法被看作是研究神经发生的经典方法。BrdU 还可与不同的细胞特异性标记物联合应用,这一优点使 BrdU 非常适合于确定细胞类型。免疫组化检测显示 BrdU 标记阳性细胞主要集中在海马周围,大部分位于 SGZ,形状不规则,体积较小,排列紧密,随着时间的推移,逐步向 GCL 迁移,且形态越接近颗粒细胞。证实新生的神经干细胞产生于 SGZ,在迁移的过程中逐渐分化成熟。对照组大鼠表达低水平的 BrdU 阳性细胞,且数量并未随时间的推移发生明显变化,证实正常成年大鼠脑内存在具有分化潜能的神经干细胞,但其数量极低并处于静息状态,与既往文献报道一致[1]。VD 组大鼠 BrdU 阳性细胞数初期明显高于对照组,但随着时间的推移,细胞数量明显减少,造模后 4 周时与对照组已无统计学差异;治疗组 BrdU 阳性细胞数量在各时相点均明显多于其余 2 组。说明 VD 组的神经干细胞增殖能力较对照组强而较治疗组弱,并随着时间的推移神经干细胞增殖能力逐渐减弱,给予 EPO 治疗后神经干细胞增殖能力进一步增强且并未随时间的推移而减弱。说明 EPO 有促进 VD 大鼠脑内神经干细胞增殖的能力。

DCX 是在迁移和分化中的神经元上表达的一种微管相关蛋白,只短暂表达于增殖的神经前体细胞中,并可对其定量标记以反映神经发生水平的高低[8],常被用来与 BrdU 联合标记增殖细胞中未分化成熟的神经元;NSE 是一种神经系统特异性蛋白质,被认为是成熟神经元的标志物之一。本实验分别将 DCX 与 BrdU、NSE 与 BrdU 联合双标检测增殖的神经干细胞分化为神经元的能力。结果显示治疗组大鼠 BrdU + DCX、BrdU + NSE 双标阳性细胞数明显高于 VD 组,但 2 组大鼠各时相点 BrdU 标记阳性细胞数中神经元所占比例无统计学差异。提示 EPO 可促进 VD 大鼠海马齿状回神经干细胞增殖,但对其分化影响尚不明显。

本实验证实脑缺血导致的血管性痴呆可使海马等缺血易损区域的 NSC 激活,发生增殖、分化,但其后持续存在的病理生理因素使得大部分新生细胞难以与周围建立联系,最终导致迟发性凋亡,影响神经功能重建。给予 EPO 治疗对 NSC 的增殖产生了放大效应,导致最终分化为成熟神经元的神经干细胞增多,并显著改善 VD 大鼠的学习记忆能力。提示增殖的细胞可能在海马与周围组织中的神经细胞建立了具有生物功能的突触联系,对神经突触传递和认知功能改善起到了积极的作用。至于 EPO 改善神经元功能重建的分子机制,目前尚不明确。现有观点认为 EPO 可促进脑内某些神经营养因子的分泌,如脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等[9],这些细胞因子可明显促进血管增生并促进新生神经细胞向神经元分化。并且 EPO 能降低神经元在缺氧和谷氨酸毒性作用下的死亡率,减轻神经元损伤和功能障碍[10,11]。

总之,本研究证实 EPO 可显著促进 VD 大鼠神经干细胞增殖,改善 VD 大鼠认知功能,为 VD 的临床治疗提供了实验依据。但 EPO 促进 VD 大鼠 NSC 增殖的具体分子机制尚不清楚,有待进一步研究。

参考文献:

[1] Iwai M, Sato K, Omori N, *et al*. Three steps of neural stem cells development in gerbil dentate gyrus after transient ischemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2002, 22(4): 411 - 419.

[2] Thored P, Arvidsson A, Cacci E, *et al*. Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke[J]. Stem Cells, 2006, 24(3): 739 - 747.

[3] Catania M A, Marciano M C, Parisi A, *et al*. Erythropoietin preventscognition impairment induced by transient brain ischemia in gerbils [J]. Eur J Pharmacol, 2002, 437: 147 - 150.

[4] 王 蕊, 杨秦飞, 唐一鹏, 等. 大鼠拟"血管性痴呆"模型的改进[J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16(10): 914 - 916.

[5] 卓 豫, 吴宝明, 王景周, 等. 一种全程控的大鼠穿梭箱主动回避反应实验系统及其应用[J]. 重庆医学, 2006, 35(10): 926 - 927.

[6] Lu D, Mahmood A, Qu C, *et al*. Erythropoietin enhances neurogenesis and restores spatial memory in rats after traumatic brain injury[J]. J Neurotrauma, 2005, 22(9): 1011 - 1017.

[7] Tsai P, Ohab J, Kertesz N, *et al*. A critical role of erythropoietin receptor in neurogenesis and post-stroke recovery[J]. J Neurosci, 2006, 26(4): 1269 - 1274.

[8] Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, *et al*. Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis[J]. Eur J Neurosci, 2005, 21(1): 1 - 14.

[9] Wang Y Q, Guo X, Qiu M H, *et al*. VEGF overexpression enhances striatal neurogenesis in brain of adult rat after a transient middle cerebral artery occlusion[J]. J Neurosci Res, 2007, 85(1): 73 - 82.

[10] Villa P, Bigini P, Mennini T, *et al*. Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis[J]. J Exp Med, 2003, 198(6): 971 - 975.

[11] 娄季宇, 曾志磊, 杨霄鹏. 不同剂量促红细胞生成素对大鼠脑缺血再灌注损伤后神经细胞凋亡的影响[J]. 郑州大学学报:医学版, 2006, 41(2): 316 - 318.

(编辑 龙 亮)