论著

文章编号:1000-5404(2010)15-1628-04

腺病毒介导的脑源性神经营养因子对大鼠脑出血后内源性神经干细胞分化的影响

余 震[1],陈莉芬[1],唐 玲[2],胡长林[1] (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院神经内科[1];402160 重庆,重庆市第二人民医院神经内科[2])

【摘要】 目的 观察腺病毒介导的脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor,BDNF)对大鼠脑出血后内源性神经干细胞(nerve stem cells,NSCs)分化的影响。方法 建立大鼠自体血脑出血(intracerebral hemorrhage,ICH)模型,将126只大鼠分为生理盐水组(NS组)、单纯腺病毒载体干预组(Ad组)和BDNF干预组(Ad-BDNF组),每组42只。模型制作后分别将NS、Ad、Ad-BDNF注射到出血侧血肿周围。BrdU标记内源性NSCs,于1、3、7、14、21、28 d进行神经缺失功能评分。免疫荧光单标法观察3组血肿周围GAP-43的表达。免疫荧光双标法观察脑出血大鼠28 d时NSCs的分化。结果 Ad-BDNF组在第7、14、21、28天神经缺失功能评分优于NS组和Ad组($P<0.01$)。GAP-43在脑出血出血同侧3 d时表达明显增加,7 d达高峰,以后逐渐减少。Ad-BDNF组在第3、7、14、21、28天的GAP-43表达明显增加,与NS、Ad组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。28 d时Ad-BDNF组BrdU/NeuN双标阳性细胞率为(39.69±17.45)%、BrdU/GFAP双标阳性细胞率为(63.53±21.68)%,与NS组、Ad组比较明显增加($P<0.05$)。结论 腺病毒介导的BDNF可促进脑出血后内源性NSCs的分化和轴突再生,有利于神经功能的恢复。

【关键词】 脑源性神经营养因子;神经干细胞;脑出血;大鼠
【中图法分类号】 R743.34;R341;R364.33 【文献标志码】 A

Effect of adenovirus-mediated brain-derived neurotrophic factor on differentiation of endogenetic nerve stem cells from rats after intracerebral hemorrhage

Yu Zhen[1], Chen LiFeng[1], Tang Ling[2], Hu Changlin[1] ([1]Department of Neurology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010; [2]Department of Neurology, Second People's Hospital of Chongqing, Chongqing, 402160, China)

【Abstract】 Objective To observe the effects of adenovirus-mediated brain-derived neurotrophic factor (Ad-BDNF) on differentiation of endogenetic nerve stem cells (NSCs) after intracerebral hemorrhage (ICH). Methods A rat ICH model was established by right intrastriatal administration of autologous whole blood. One hundred and twenty-six rats were divided into normal saline (NS) group, adenovirus interference group (Ad group) and Ad-BDNF interference group, 42 rats in each group. NS, Ad and Ad-BDNF were injected into the perihematomal area of rats, respectively. Expression of GAP-43 and differentiation of NSCs were observed with single immunofluorescence labeling method and double immunofluorescence labeling method, respectively in 4 weeks after establishment of ICH model. Results The score of NSC function was higher in Ad-BDNF interference group than in NS and Ad interference groups in 7, 14, 21 and 28 d after establishment of ICH model ($P<0.01$) with no significant difference between NS and Ad interference group ($P>0.05$). The expression level of GAP-43 was significantly higher in the perihematomal area of rats in 3 d after establishment of ICH model, reached its peak in 7 d after establishment of ICH model, and then gradually decreased, but no significant difference was found between NS and Ad interference groups ($P>0.05$). The expression level of GAP-43 was significantly higher in Ad-BDNF interference group than in NS group and Ad interference group in 3, 7, 14, 21 and 28 d after establishment of ICH model ($P<0.05$), but no significant difference was observed between NS and Ad interference groups ($P>0.05$). The differentiation rates of endogenetic NSCs [BrdU/NeuN = (39.69±17.45)% and BrdU/GFAP = (63.53±21.68)%] were significantly higher in Ad-BDNF interference group than in NS and Ad interference groups in 28 d after establishment of ICH model ($P<0.05$). Conclusion Ad-BDNF can increase the differentiation of endogenetic NSC and improve the recovery of nerve function after ICH.

【Key words】 brain-derived neurotrophic factor; nerve stem cells; intracerebral hemorrhage; rat

Supported by the Key Project of Chongqing Municipal Health Bureau (06-01-020) and the Innovation Foundation of Chongqing Medical University (XBYB2008028). Corresponding author: Hu Changlin, Tel: 86-23-63693088, E-mail: hclcq023@gmail.com

【基金项目】 重庆市卫生局重点课题(06-01-020);重庆医科大学校级创新课题(XBYB2008028)
【通信作者】 胡长林,电话:(023)63693088,E-mail:hclcq023@gmail.com

脑出血的死亡率和致残率较高，临床上缺乏有效的治疗方法，如何减轻出血性脑损伤，改善预后，一直是神经科学研究的重点和难点。干细胞治疗是近年来研究的热点，为治愈脑出血提供了可能[1]。成年哺乳动物室下区和海马齿状回存在神经前体细胞。包括脑出血在内的各种脑损伤均可诱导神经再生[2-4]，但只有极少数的受损神经元能被新生神经元替代[5]。因此出血性脑损伤可通过自身内源性神经干细胞（nerve stem cells，NSCs）来修复，只是由于条件不足而没有足够的新生细胞，而内源性NSCs的激发成为治疗脑出血可能的新途径。脑源性神经营养因子（brain-derived neurotrophic factor，BDNF）对中枢神经系统神经元的发育、存活、分化和轴突再生发挥着重要作用，在帕金森病、阿茨海默病等的治疗中显示出广阔的应用前景。本研究采用大鼠自体血脑出血（intracerebral hemorrhage，ICH）模型，将腺病毒介导的BDNF注入大鼠出血侧血肿周围，观察其对脑出血后内源性NSCs分化的影响并探讨其治疗作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂

126只成年雄性SPF级SD大鼠，体质量270～320 g，由第三军医大学实验动物中心提供。GFAP购自Thermo scientific公司，NeuN购自Chemicon公司，BrdU和多聚赖氨酸购自Sigma公司，TRITC、FITC购自北京中杉金桥有限公司。

1.2 构建pAdEasy-1-pAdTrack CMV重组体

本课题组已构建大鼠BDNF基因的腺病毒重组体（pAdEasy-1-pAdTrack CMV-BDNF）。腺病毒重组质粒含有报告基因绿色荧光蛋白（green fluorescent protein，GFP）。pAdEasy-1-pAdTrack CMV-BDNF病毒滴度是1×10^9 PFU/ml，－80 ℃保存。

1.3 建立大鼠自体血脑出血模型[6]

大鼠麻醉后，固定于立体定向仪上，使上门齿钩平面比耳间线平面低2.4 mm。暴露前囟，于前囟前0.2 mm，中线右侧旁开3.5 mm处，在颅骨表面钻一直径约1 mm的孔。在距离大鼠尾巴末端约5 mm处剪断鼠尾，用微量进样器吸取新鲜血液50 μl，迅速将微量进样器固定在立体定位仪并沿颅骨钻孔进针，进针深度为5.5 mm，注血超过5 min，留针10 min后缓慢退针，骨蜡封闭创口，缝合头皮，局部消毒，防止感染。

1.4 立体定向注射

在大鼠脑出血血肿周围前后右右四点各旁开2 mm，硬膜下5.0 mm，用微量注射器向各点分别注入生理盐水、Ad、Ad-BDNF 2.5 μl，每点注射时间超过5 min，每只鼠共注射10 μl。术后用骨蜡封闭颅骨创口，缝合头皮，局部皮肤用碘酒消毒，防止感染。实验过程中严密监测大鼠的体温、心率和呼吸。

1.5 动物分组及处理

126只SD大鼠分为3组：生理盐水组（NS）、单纯腺病毒载体干预组（Ad组）和BDNF干预组（Ad-BDNF组），每组42只，每组下设1、3、7、14、21 d和28 d共6个时相点（$n=7$）。Ad-BDNF组：ICH后立即血肿周围注射Ad-BDNF 1×10^8 PTU/10 μl；Ad组：ICH后立即血肿周围注射Ad 1×10^8 PTU/10 μl；NS组：ICH后立即血肿周围注射NS 10 μl。

1.6 BrdU标记

将BrdU用生理盐水配制成5×10^3 g/L的溶液，大鼠脑出血后12 h开始，腹腔注射BrdU（50 mg/kg），每天定时注射2次，共注射10 d，末次注射结束18 d后处死（即大鼠脑出血28 d），用于检测新生细胞的分化状况。

1.7 神经功能改善状况评价

参照神经损害评分量表（NSS）[7]，分别于注射后1、3、7、14、21、28 d对各组进行NSS评分。

1.8 组织切片制备

各时间点SD大鼠10%水合氯醛溶液麻醉，打开胸腔暴露心脏，快速灌注生理盐水200 ml，继而灌注4 ℃的4%多聚甲醛300 ml，开颅取脑放入多聚甲醛固定液中4 ℃固定48 h，30%蔗糖4 ℃沉底。取出脑组织PBS洗1次，快速将其平放在冻过固定头上，用OCT包埋剂将组织包上放入冰冻切片机内切取以视交叉前缘向前3 mm，向后5 mm，大脑中动脉供血区的脑皮质和尾壳核组织块，冰冻冠状切片，片厚16 μm。

1.9 免疫荧光单标染色

①PBS漂洗组织切片，5 min×3次；②加入0.1% Triton破膜30 min；③PBS漂洗5 min×3次；④滴加正常羊血清封闭30 min；⑤加入GAP-43鼠抗（1∶500）后4 ℃过夜；⑥PBS漂洗5 min×3次，加荧光二抗羊抗鼠TRITC（1∶100），37 ℃避光孵育1 h并晾干；⑦荧光显微镜观察，阴性对照采用PBS代替一抗，其余步骤不变。

1.10 免疫荧光双标检测

①PBS漂洗组织切片，5 min×3次；②加入0.1% Triton破膜30 min；③PBS漂洗5 min×3次；④滴加正常羊血清封闭30 min；⑤加入一抗鼠抗BrdU（1∶500）后4 ℃过夜；⑥PBS漂洗5 min×3次；⑦加荧光二抗羊抗鼠TRITC（1∶100），37 ℃避光孵育1 h；⑧PBS漂洗5 min×3次；⑨加入一抗兔抗NeuN（1∶200）或兔抗GFAP（1∶200），37 ℃避光孵育1 h；⑩PBS漂洗5 min×3次，加荧光二抗羊抗兔FITC（1∶100）室温下避光，荧光显微镜观察；阴性对照采用PBS代替一抗，其余步骤不变。

1.11 结果观察及统计学处理

每只大鼠随机抽取10张不同的脑片（每组3只大鼠），在200倍显微镜下每张选5个视野计数细胞。实验数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 11.5统计软件，组间比较进行单因素方差分析，同一时间点之间的两两比较行t检验。

2 结果

2.1 神经功能缺失评分

脑出血后1 d和3 d Ad-BDNF组与Ad组、NS组神经功能评分比较无统计学差异（$P>0.05$），而7～28 d，Ad-BDNF组与Ad组和NS组比较，差异有统计学意义（$P<0.01$），NS组和Ad组之间无统计学差异（$P>0.05$，表1）。

表1 各组大鼠神经功能缺失评分比较（$n=7$，$\bar{x}\pm s$）

组别	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d
NS组	10.15±1.33	9.47±1.02	8.59±0.97	6.91±0.94	5.70±0.85	4.98±0.93
Ad组	10.37±1.24	9.55±0.98	8.43±0.95	6.79±0.91	5.66±1.02	4.64±0.96
Ad-BDNF组	10.58±1.29	8.93±0.95	6.77±0.90[ab]	5.23±0.97[ab]	3.54±0.93[ab]	2.28±0.89[ab]

a：$P<0.01$，与NS组比较；b：$P<0.01$，与Ad组比较

2.2 GAP-43 免疫荧光结果

GAP-43 免疫阳性细胞在荧光显影后，发红色荧光，细胞质着色，主要位于出血同侧血肿周围（图1），在脑出血第1天少量增加，第3天明显增加，第7天达到高峰，第14天开始减少。Ad-BDNF 组较 NS 组和 Ad 组 3、7、14、21、28 d 差异有统计学意义（$P<0.05$），NS 组和 Ad 组之间无统计学差异（$P>0.05$，表2）。

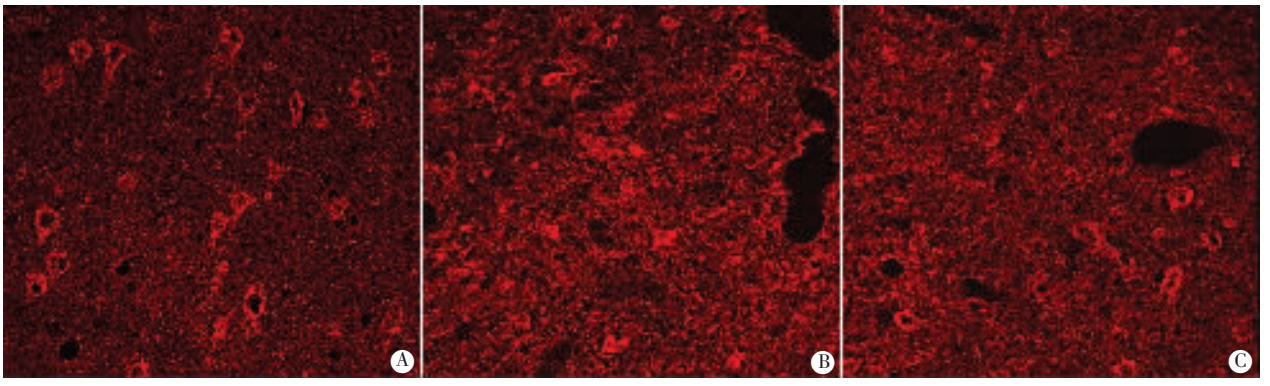
2.3 BrdU/NeuN、BrdU/GFAP 免疫双标结果

脑出血后 28 d，Ad-BDNF 组、NS 组和 Ad 组 BrdU/NeuN 双标阳性细胞率分别为（39.69±17.45）%、（12.63±6.85）%、（13.36±7.28）%；Ad-BDNF 组、NS 组和 Ad 组 BrdU/GFAP 双标阳性细胞率分别为（63.53±21.68）%、（54.32±9.67）% 和（53.78±10.03）%；Ad-BDNF 组与 NS 组和 Ad 组相比明显增加（$P<0.05$）。见图2、3。

表2 各组脑出血血肿周围区 GAP-43 平均光密度值比较（$n=42$，$\bar{x}\pm s$）

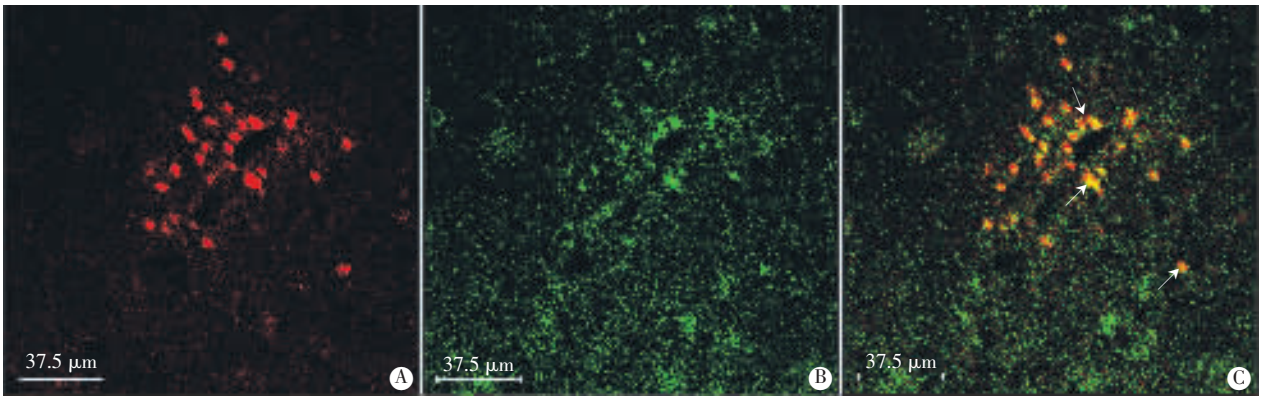
组别	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d
NS 组	0.227±0.026	0.372±0.069	0.541±0.079	0.318±0.034	0.185±0.031	0.123±0.022
Ad 组	0.223±0.035	0.366±0.076	0.552±0.064	0.320±0.046	0.182±0.048	0.127±0.027
Ad-BDNF 组	0.242±0.061	0.455±0.094^{ab}	0.785±0.129^{ab}	0.417±0.057^{ab}	0.243±0.065^{ab}	0.192±0.041^{ab}

a：$P<0.05$，与 NS 组比较；b：$P<0.05$，与 Ad 组比较



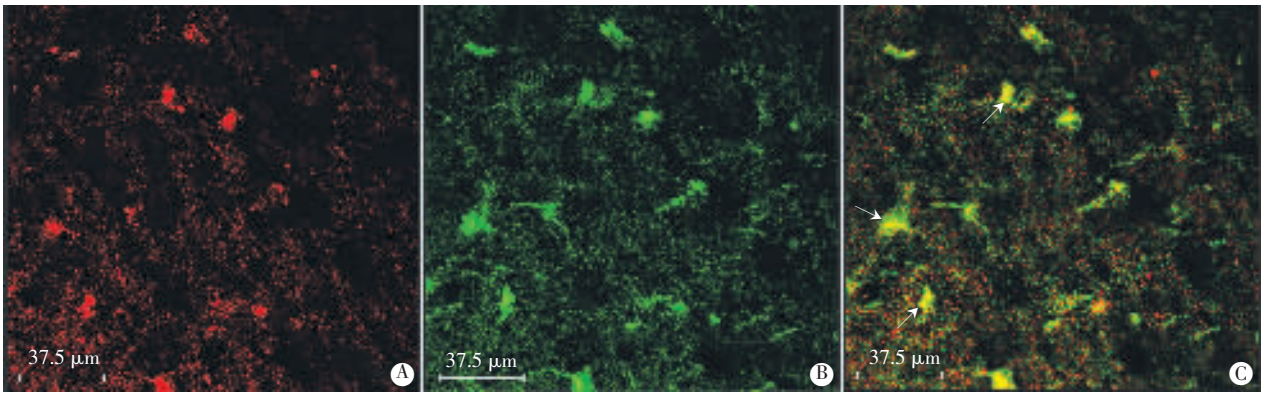
A：Ad-BDNF 组；B：Ad 组；C：NS 组

图1 激光共聚焦显微镜下观察脑出血后 7 d 时 GAP-43 阳性细胞（红色为 GAP-43 阳性细胞，细胞质着色，标尺 50 μm）



A：BrdU；B：NeuN；C：Merge（↑：BrdU/NeuN 阳性细胞）

图2 激光共聚焦显微镜下观察 Ad-BDNF 组 28 d 时 BrdU/NeuN 免疫荧光双标阳性细胞



A：BrdU；B：GFAP；C：Merge（↑：BrdU/GFAP 阳性细胞）

图3 激光共聚焦显微镜下观察 Ad-BDNF 组 28 d BrdU/GFAP 免疫荧光双标阳性细胞

3 讨论

BDNF 作为神经营养因子家族中的一个重要成员,在中枢神经系统广泛表达,能够对抗神经毒性物质、局部缺血和氧化等各种损伤,防止细胞凋亡[8]。Nagahara 等[9]认为脑损伤后引起的 BDNF 表达的增加为神经损伤提供了一种保护性机制并且能刺激受损的神经细胞进行芽生和突触塑造。Pencea 等[10]将BDNF 融入成年小鼠的侧脑室中,结果在纹状体、丘脑和下丘脑等脑实质中神经细胞的数目明显增加。这些研究表明 BDNF 对神经细胞的新生有促进作用。许多研究[11-13]表明在多种脑损伤均有脑内 BDNF 表达的增加。但是,内源性 BDNF 表达量少,作用时间短,不足以保护受损伤的大脑,外周给予 BDNF 仅能部分地通过血脑屏障,很难达到有效的脑内血药浓度,腺病毒介导的 BDNF 脑内注射能够维持血肿周围脑组织 BDNF 高表达,对脑出血显示出治疗作用。

GAP-43 是一种神经系统特异性快速轴突转运胞膜磷酸蛋白,与神经发育、轴突再生、突触重建密切相关,是神经发育和再生的一个内在决定因子,在神经系统尤其是神经元中特异性表达[14],GAP-43 在发育的神经元中沿整个轴突表达,在生长锥表达尤其丰富;机体成年后中枢神经系统中的表达水平很低,但在中枢神经损伤后 GAP-43 的表达明显增高,GAP-43 高表达被认为是神经再生的典型特征[15]。

本实验结果表明,脑出血后 1 d 血肿周围区 GAP-43 少量增加,3 d 明显增加,7 d 达到高峰,以后逐渐减少。从大鼠患肢功能恢复的情况来看,GAP-43 升高与患肢功能恢复同步进行,提示 GAP-43 参与了神经组织的重建。脑出血后 GAP-43 的表达,随时间发生动态变化,由此推测神经元再塑能力也发生相应变化。同理,能促使 GAP-43 表达增强和表达时间延长的治疗措施,将有助于中枢神经系统损伤后的再生和修复。Ad-BDNF 能显著提高 GAP-43 的表达,由此推断外源性 BDNF 对受损的中枢神经系统再生可能具有一定促进作用。

本实验为了解 BDNF 对内源性 NSCs 分化的影响,采用 BrdU 累积标记方法进行检测。结果显示,Ad-BDNF 组大鼠脑出血 28 d 后,BrdU/NeuN 和 BrdU/GFAP 双标细胞的比例分别为(39.69 ± 17.45)% 和(63.53 ± 21.68)%,与 NS 组及 Ad 组相比明显增加,表明 Ad-BDNF 促进了内源性 NSCs 的定向分化。

由此说明将腺病毒介导的 BDNF 导入脑内,一方面提高脑内 BDNF 含量,加强对神经元的营养作用,有利于脑出血后受损伤神经元的保护;另一方面可以改善脑出血后脑内微环境,BDNF 有利于内源性 NSCs 的定向分化,补充丢失的神经元,从而促进脑出血大鼠神经功能的恢复。因此,脑出血后给予外源性 BDNF 可能是治疗出血性脑损伤的重要途径之一。

参考文献:

[1] Andres R H, Guzman R, Ducray A D, *et al*. Cell replacement therapy for intracerebral hemorrhage[J]. Neurosurg Focus, 2008, 24(3/4):E16.

[2] Ahmed A I, Shtaya A, Gray W P, *et al*. A novel model to study neurogenesis following Traumatic Brain Injury in mice[J]. Br J Neurosurg, 2009, 23(3):237-269.

[3] Zhang R L, Zhang Z G, Chopp M. Ischemic stroke and neurogenesis in the subventricular zone[J]. Neuropharmacology, 2008, 55(3):345-352.

[4] Shen J, Xie L, Mao X, *et al*. Neurogenesis after primary intracerebral hemorrhage in adult human brain[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2008, 28(8):1460-1468.

[5] Sugiura S, Kitagawa K, Tanaka S, *et al*. Adenovirus-mediated gene transfer of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor enhances neurogenesis and angiogenesis after focal cerebral ischemia in rats[J]. Stroke, 2005, 36(4):859-864.

[6] He Y, Wan S, Hua Y, *et al*. Autophagy after experimental intracerebral hemorrhage[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2008, 28(5):897-905.

[7] Chen J, Li Y, Chopp M. Intracerebral transplantation of bone marrow with BDNF after MCAO in rat[J]. Neuropharmacology, 2000, 39(5):711-716.

[8] Lu P, Tuszynski M H. Growth factors and combinatorial therapies for CNS regeneration[J]. Exp Neurol, 2008, 209(2):313-320.

[9] Nagahara A H, Merrill D A, Coppola G, *et al*. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease[J]. Nat Med, 2009, 15(3):331-337.

[10] Pencea V, Bingaman K D, Wiegand S J, *et al*. Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus[J]. J Neurosci, 2001, 21(17):6706-6717.

[11] Sato Y, Chin Y, Kato T, *et al*. White matter activated glial cells produce BDNF in a stroke model of monkeys[J]. Neurosci Res, 2009, 69(1):71-78.

[12] Murray K D, Hayes V Y, Gall C M, *et al*. Attenuation of the seizure-induced expression of BDNF mRNA in adult rat brain by an inhibitor of calcium/calmodulin-dependent protein kinases[J]. Eur J Neurosci, 2009, 10(1):377-387.

[13] 尹烈虎, 李学成, 陆地, 等. 抑郁模型大鼠脑脊液、海马和皮层组织脑源性神经营养因子的变化[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(3):230-232.

[14] Gupta S K, Meiri K F, Mahfooz K, *et al*. Coordination between extrinsic extracellular matrix cues and intrinsic responses to orient the centrosome in polarizing cerebellar granule neurons[J]. J Neurosci, 2010, 30(7):2755-2766.

[15] Jin K, Minami M, Lan J Q, *et al*. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(8):4710-4715.

(收稿 2010-04-13 修回 2010-05-28)

(编辑 王小宴)