基础研究 文章编号:0253-3626(2009)11-1487-04

间充质干细胞海马移植对糖尿病大鼠 PSA-NCAM 的影响

夏 丽,卢卫琴,赵柯湘,高 原,李 娟,肖 谦
(重庆医科大学附属第一医院老年科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨间充质干细胞在糖尿病大鼠海马的移植对多唾液酸-神经细胞粘附分子(Polysialylated acid-nural cell adhesion molecule,PSA-NCAM)的影响。方法:将 30 只 SD 大鼠随机分为正常对照组、糖尿病组、干细胞移植组。建立 STZ 糖尿病大鼠模型。原代培养大鼠骨髓间质干细胞,分离纯化鉴定后移植入糖尿病大鼠海马部位,杀鼠取海马,用 PSA-NCAM 单克隆抗体及采用 RT-PCR 的方法检测海马中 PSA-NCAM 的水平,并与糖尿病对照组及正常组加以比较。结果:移植组与糖尿病组比较,PSA-NCAM 蛋白和 mRNA(P=0.0137)表达均增加,但显著低于正常组(P=0.015)。结论:间充质干细胞海马移植增加海马中 PSA-NCAM 的表达。

【关键词】糖尿病;海马;间充质干细胞;多唾液酸-神经细胞粘附分子
【中国图书分类法分类号】R587.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-12-02

Effects of transplanting mesenchymal stem cells to hippocampus on PSA-NCAM in DM rats

XIA li, et al
(*Department of Geriatrics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the influence of transplantation with MSCs to hippocampus on PSA-NCAM in DM rats. *Methods*: 30 SD rats were divided into the normal control group, diabetic model group, and stem cells transplanted group. Streptozotocin-diabetic rat model was established. MSCs were separated from bone marrow of rats. After purified, they were transplanted to hippocampus of DM rats. Then, the rats were Secrificed, to get the hippocampus for detect in of the expression of PSA-NCAM by immunofluorescence and RT-PCR. the data of the three groups were Compared. *Results*: Compared with diabetic model group, the transplanted group showed a significant increase in the expression of PSA-NCAM protein and mRNA in hippocampus ($P<0.05$), butthey were significantly lower than those in normal control group ($P<0.05$). *Conclusion*: Transplantation with stem cells could increase the expression of PSA-NCAM in hippocampus of DM rats.

【Key words】Diabetes mellitus; Hippocampus; Bone marrow mesenchymal stem cells; Polysialylated acid-nural cell adhesion molecule

糖尿病认知障碍是近年来才被人们所认识的糖尿病中枢系统慢性并发症。在修复神经元损伤方面间充质干细胞(Mesenchymal-stem cells,MSCs)以其独特的自我复制能力及向多种细胞分化的能力而具有移植修复损伤的巨大潜力。本研究在原代培养间充质干细胞的基础上将其移植到糖尿病大鼠的海马部位,将与认知功能密切相关的可塑性蛋白多唾液酸-神经细胞粘附分子(Polysialylated acid-nural cell adhesion molecule,PSA-NCAM)的改变引入对移植效果的考察,希望探求移植所带来的对认知功能微观上的改变,从而为进一步研究间充质的海马移植对糖尿病大鼠的认知功能所产生的影响提供有价值的材料。

作者介绍:夏 丽(1970-),女,硕士,研究方向:老年内分泌。
通讯作者:肖 谦,男,教授,E-mail:xiaoqian1956@126.com。
基金项目:重庆市卫生局资助项目(0702078)。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

杜氏改良低糖型 F12 培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM/F12)(美国 Hyclone 公司),特级胎牛血清(Gibco 公司),胰酶(上海生物工程技术服务有限公司)。链脲佐菌素(STZ,Sigma 公司),PSA-NCAM 鼠抗人单克隆抗体(Santa Cruz 公司)RT-PCR kit(TaKaRa) TriZol RNasefree H_2O

70%酒精 氯仿 异丙醇 TBE buffer DL2000 marker gel 核酸染料。

1.2 实验动物分组

健康雄性 S-D 大鼠 30 只,体重 200~250 g,随机分为:①对照组(n=10);②糖尿病组(n=10);③干细胞移植组(n=10)。实验终点糖尿病组和干细胞移植组各死亡 2 只。

1.3 糖尿病模型的制作

将 STZ 用 0.1 mol/L 无菌枸橼酸钠缓冲液新鲜配制成 1%溶液,调节 pH 至 4.2,滤菌器过滤除菌。将上述糖尿病组和移植组大鼠禁食 10 h 按 55 mg/kg 体重腹腔内注射 STZ 溶液,24 h 内血糖大于等于 16.7 mmol/L, 对照组注射等容积缓冲液。稳定 5 d 即可作为成功模型。

1.4 MSCs 分离、纯化及培养鉴定

动物引颈处死,无菌条件下取出双侧股骨,用不含血清的 DMEM 培养基反复冲洗骨髓腔,将冲洗获得的细胞悬液转入离心管,1 200 r/min 离心 5 min,弃上清,细胞沉淀中加入适量含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中,小心吹打成细胞悬液,种入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中,转入 25 cm^2 培养瓶,37℃、5%CO_2 培养箱中培养,每 3 d 换液 1 次,细胞铺满瓶底时按 1:2 传代,每周 1 代。细胞培养至第 3 代冻存备用。

鉴定:细胞形态观察:约 80%~90%贴壁细胞爬满培养瓶底时,用 0.25%胰酶消化后制备细胞悬液,并调整细胞密度为 10^4 个 /ml 密度传代接种后第 5 d、第 7 d、传代前照相记录。

细胞表面抗原检测:取生长旺盛的第 3 代细胞,0.25%胰酶消化收获细胞,经 PBS 洗涤后制成 1.0×10^6 个 /ml 的单细胞悬液,分别加入 CD44(FITC 标记)、CD45(PE 标记)、CD29(FITC 标记)抗体及同型阴性对照鼠抗鼠 IgG1—FITC,室温孵育 30 min,流式细胞仪检测细胞表面标记,并绘图。

1.5 MSCs 在糖尿病大鼠海马的移植

用 10%水合氯醛腹腔注射(0.3~0.33 ml/100 g)麻醉大鼠。将头部固定在大鼠脑立体定位仪上,剪毛消毒,在头背中部纵向切口,暴露颅骨,参照《大鼠脑立体定位图谱》,前后:1.8 mm、外侧:±2.5 mm、腹侧 5.5 mm,进针,在两侧海马注射 2 μl(含细胞量 2×10^5 个),注射量分 3 次注射完,中间间隔 5 min。

1.6 移植后海马组织的免疫荧光细胞化学(Immunocyte-fluorescence)鉴定

细胞移植第 10 d,将各组动物用水合氯醛腹腔注射麻醉,左心室灌流生理盐水冲洗,4%多聚甲醛固定,取脑组织石蜡包埋,切片。脱蜡,入水等常规步骤后,滴加稀释后封闭用正常山羊血清室温孵育,滴加适当比例稀释的一抗:鼠抗人多聚唾液酸—神经细胞粘附分子(PSA-NCAM,1:100 稀释),室温孵育过夜。PBS 冲洗,2 min×3 次。滴加 PBS 稀释的生物素化二抗,室温孵育 30 min。PBS 冲洗,2 min×3 次。滴加 1:80 稀释的 SABC-FITC,室温孵育 30 min 洗涤。重复用 PBS 冲洗后,吸干多余水分,滴加一滴缓冲甘油,再覆以盖玻片,荧光显微镜高倍视野下观察海马部位的荧光表达,照相记录。

1.7 移植后海马组织的 RT-PCR 检测

1.7.1 组织总 RNA 的提取 将海马组织在低温下研磨成粉,再以 50~100 mg 组织加入 1 ml Trizol 液研磨,室温放置后按比例加入氯仿,震荡,加入异丙醇,室温放置 10 min,离心,弃上清,按每 ml Trizol 加入 1 ml 的比例加入 75% 乙醇,涡旋混匀,离心弃上清,干燥 10 min。

1.7.2 RT-PCR 逆转录 按下列组成配制反转录反应液:$MgCl_2$ 2 μl,10XRT buffer 1 μl,Rnase free H_2O 1.75 μl,dNTP mixture(each 10 mmol/L) 1 μl,脱氧核糖核酸酶抑制剂 0.25 μl,AMV 逆转录酶 0.5 μl,Random 9 mers 0.5 μl,RNA 3 μl,Total 10 μl/ sample,放入反应体系,按以下条件进行反转录反应:30℃ 10 min,42℃ 30 min,99℃ 5 min,5℃ 5 min。

1.7.3 PCR 根据 GenBank 中 PSA-NCAM mRNA 序列,应用 Prime premier 5.0 软件设计引物,由重庆升博公司合成。序列上游引物:5'-ATCCAAGGCAGCTCACTTC-3' 下游引物:5'-CCGTTCGGACCTCTACAAT-3'。反应总体积 40 μl,94℃ 预变性 2 min,然后 94℃30 s,56℃ 30 s,72℃ 1 min,将退火温度升至 94℃,29 个循环,最后 72℃延伸 10 min,对所得 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,照相记录。

1.8 统计学处理

数据均采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,2 组间比较采用 t 检验,$P\leq0.05$ 为有统计学差异。统计软件采用 SPSS10.0 统计软件包。

2 结 果

2.1 细胞形态观察

倒置相差显微镜观察显示,原代细胞接种后 24 h 内多数具有单个核的细胞完成贴壁,贴壁细胞开始分裂增殖,呈现圆形或短梭型,有细胞质突起,偶尔可见梭型不典型细胞,随着换液悬浮细胞被逐渐清除,72 h 完全换液后可见贴壁细胞分裂增殖(图1)。第 7 d 左右细胞进入快速增殖期,细胞密度及形成集落的数目、大小明显增加,细胞逐渐融合成片,呈旋涡状或辐射状(图 2),培养至第 13 d 左右时细胞融合达 80%~90%(图 3)。传代至第 4 代后,从整体上讲细胞增长速度减慢,形态改变,折光度减弱,细胞质内开始出现小的空泡,提示细胞老化。

2.2 流式细胞仪检测结果

细胞表面标记结果显示,92.22%的细胞 CD29 表达阳性,CD45 的表达阳性率为 8.28%,CD44 表达为阳性,阳性率为 90.97%,见图 4。

2.3 免疫荧光组织化学染色结果

免疫荧光染色结果显示:正常组大鼠齿状回区域有大量细胞显色荧光强阳性;在糖尿病组大鼠海马 CA3 部位表现

阴性，未见明显染色阳性细胞；移植组海马 CA3 区有较多细胞显色较强的绿色荧光，数量和荧光强度较移植组明显减弱，见图 5~7，表2。

2.4 RT-PCR 结果

移植组 PSA-NCAM 表达量较正常对照组降低，移植组较糖尿病组升高，有统计学差异，见表 2。

3 讨 论

1999 年，Kopen 等[1]将骨髓基质干细胞注入新生小鼠侧脑室，观察到基质细胞分布于小脑和前脑内并有部分分化为星形胶质细胞。Mezey 等[2]进一步证实了干细胞在神经增殖中的作用，他们将雄性小鼠的造血干细胞移植到免疫缺陷的磁性小鼠体内，再对大脑检测含有 Y 染色体的细胞，发现这些细胞表达神经元的特有蛋白和抗体，提示 BMSCs 可转化为神经元，且有移植后分化为神经元的趋势。骨髓间质干细胞相比胚胎干细胞具有许多优点，既不存在数量有限、取材难的问题，也不会存在伦理道德问题，此外，骨髓干细胞在体外培养后能大量扩增，这些优点为干细胞移植应用于临床提供了有利条件。干细胞移植已经被很多实验证明了对 Parkinson 病具有保护作用[1]，将其移植到 Alzheimer 病模型中能分化为神经元和胶质

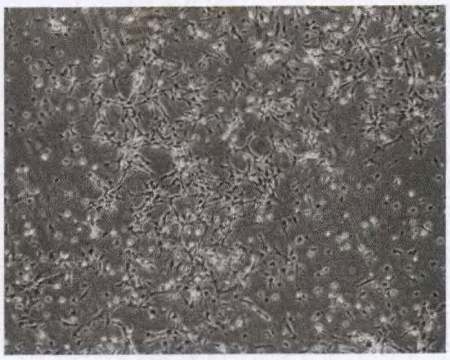


图 1 鼠骨髓间质干细胞 72 h(×40)

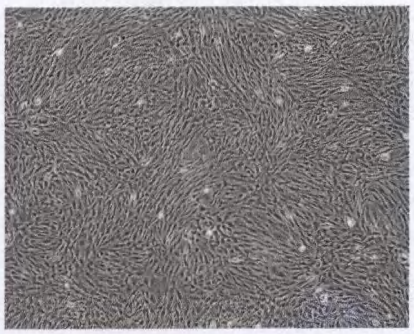


图 3 鼠骨髓间质干细胞 传代前 (×40)

表 1 各组细胞 PSA-NCAM m 蛋白表达结果($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	PSA-NCAM m 蛋白
对照组	10	强阳性
糖尿病组	8	阴性
移植组	8	弱阳性



图 2 鼠骨髓间质干细胞 7 d(×40)

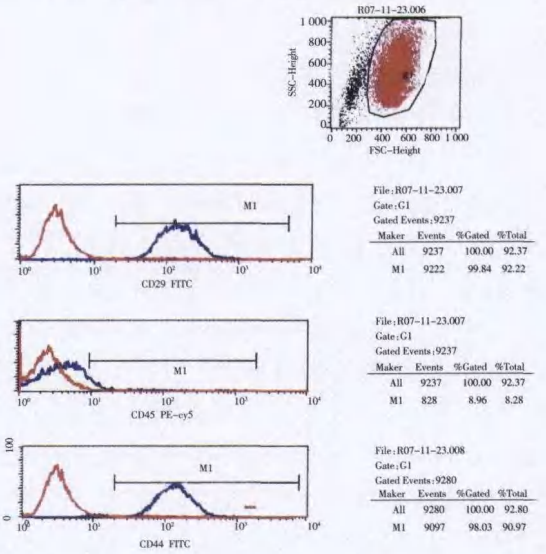


图 4 MSCs 表面标志流式细胞图



图 5 正常组大鼠海马齿状回区(×100)



图 6 干细胞移植组大鼠海马 CA3 区(×100)

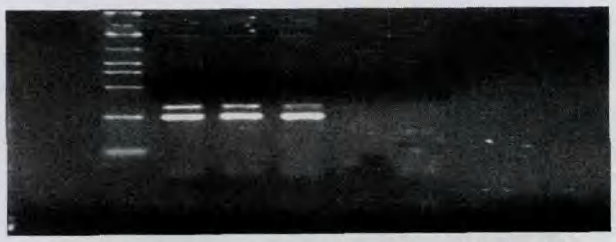


图 7 糖尿病组大鼠海马 CA3 区(×100)

表 2 各组细胞 PSA-NCAM mRNA 表达结果($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	PSA-NCAM/β -actin mRNA
对照组	10	0.503 1 ± 0.018 4
糖尿病组	8	0. 324 8 ± 0.009 6
移植组	8	0.405 7 ± 0.006 5[ab]

注:与对照组比较 [a]P=0.015,与糖尿病组比较 [b]P=0.013 7



第 1~3 泳道依次为:1.正常组; 2.移植组; 3.糖尿病对照组

图 8 RT-PCR 产物琼脂糖电泳图

细胞并具有胆碱能神经元表型[3],此外还有研究证明了干细胞的移植对于Alzheimer 病能明显提高学习和记忆成绩,改善认知功能[4]。

糖尿病认知障碍是近来研究较多的一个领域。有研究发现 12 周糖尿病大鼠出现明显的与突触结构可塑性相关的空间认知功能障碍[5]。国内外研究发现引发糖尿病认知障碍发病的核心为脑神经元受损,且病程的长短与损伤程度正相关。糖尿病认知功能障碍在中枢目前没有发现特征性的改变,一般表现为在长期患糖尿病的患者脑部海马等与学习和记忆相关的部位出现结构和功能的改变,主要是神经元突触和神经环路的变化, 即可塑性的变化,海马的可塑性包括 3 突触回路,LTP(长时程增强)现象等。伴随可塑性变化的有很多蛋白物质的改变,其中比较重要的一种是 PSA-NCAM,它是目前公认的反映可塑性的指标之一,作为一种反映可塑性的糖蛋白分子在中枢神经疾病中具有重要意义:Nait-Oumesmar 等[6]对大鼠造成脱髓鞘损伤时,随再生的过程出现 PSA-NCAM 的表达,且这种表达随髓鞘再生的完成而减弱直至消失。Kasper[7]对敲除了 PSA-NCAM 基因的小鼠进行研究时发现由于缺乏 PSA-NCAM,神经细胞的迁移受到干扰,海马超微结构出现紊乱,小鼠的学习和记忆成绩受到影响。以往的实验证实海马突触前后膜上存在大量 PSA-NCAM,在持续性突触生成和可塑性脑区均有特征性 PSA-NCAM 表达,这种表达在成年动物中是低水平的,但在大鼠神经元损伤后,损伤远端的 PSA-NCAM 含量增加,而一旦未损伤神经元的侧芽与周围形成新的突触,NCAM 会再次下调,PSA-NCAM 的含量与神经元的修复过程具有平行关系[8]。

本研究通过骨髓间质干细胞移植后对海马 PSA-NCAM 表达的检测发现:海马中 PSA-NCAM 蛋白荧光阳性细胞显著增加,但与正常组相比仍低。移植组 PSA-NCAM mRNA 表达比糖尿病组显著增加,但较正常组低,提示干细胞在移植后 10d 内已有效提高糖尿病大鼠海马中 PSA-NCAM 的表达但未能使之修复达正常水平。

综上所述,研究结果显示干细胞移植能显著增加糖尿病大鼠海马中 PSA-NCAM 的表达,这一发现为研究干细胞移植和海马可塑性的关系提供了实验室依据,并为进一步研究骨髓间质干细胞移植对糖尿病认知功能障碍的治疗作用进行了有益的探索。

参 考 文 献

[1] 刘卫国,陈生弟,陆国强,等.Neurturin 基因转染 c17.2 神经干细胞移植保护帕金森病大鼠模型的实验研究[J].中华神经科杂志,2006,39:184-188.

[2] Mezey E.Turning blood into brain:cell bearing neuronal antigens generated in vivo from bone barrow[J]. Science,2000,290(5497):1779-1782.

[3] Doering L C, Snyder E Y. Cholinergic expression by a neural stem cell line grafted to the adult medial septum/diagonal band complex[J].J Neurosci Res,2000,61:597-604.

[4] 吴树亮,金连弘,李竹英,等.阿尔茨海默病动物模型的建立及神经干细胞对阿尔茨海默病的治疗作用[J].中国临床康复,2004,8:3734-3736.

[5] 高 原,赵柯湘,肖 谦,等.尼莫地平对糖尿病大鼠海马突触素蛋白和 mRNA 表达的影响[J].重庆医科大学学报,2007,32:257-260.

[6] Nait-Oumesmar B, Decker L, Lachapelle F,et al. Progenitor cells of the adult mouse subventricular zone proliferate,migrate and differentiate into oligodendrocytes after demyelinetion [J].Eur J Neuralsci,1999,11(12):4357-4366.

[7] Kasper C, Rasmussen H, Kastrup J S, et al. Structural basis of cell-cell adhesion by NCAM[J]. Nat Struct Biol,2000,7(5):389-393.

[8] Alexander D,Galina D,Vladimir S, et al, Polysialylated Neural Cell Adhesion Molecule Promotes Remodeling and Formation of Hippocampal Synapses[J]. The Journal of Neuroscience, 2004,24(42):9372-9382.

(责任编辑:冉明会)