基础研究 文章编号:0253-3626(2010)03-0346-04

GDNF 基因修饰的神经干细胞移植治疗大鼠局灶性脑缺血的实验研究

杜 杰[1],高小青[2],陈 波[2],杨朝鲜[2],先雄斌[2],袁琼兰[3]

(1. 四川省泸州市泸州医学院教务处,泸州 646000;2. 泸州医学院神经生物学研究室及解剖学教研室,泸州 646000;3. 同济大学解剖学教研室,上海 200029)

【摘 要】目的:观察转染胶质细胞源性神经营养因子(Glial cell derived neurotrophic factor,GDNF)基因的神经干细胞(Neural stem cells,NSCs)移植在脑缺血大鼠脑组织的分布,探讨其神经保护作用。方法:体外培养新生大鼠 NSCs,采用改良的线栓法制作脑缺血再灌注模型,3 d 后用脑立体定位仪分别经脑室移植生理盐水、NSCs 和 GDNF/NSCs。各组移植前及再灌注 1~7 周进行神经功能损伤程度评分(Neurological severity scores,NSS)。免疫组织化学方法观察移植后 NSCs 的存活及分布情况。结果:NSCs 经 GDNF 基因转染后 2 d 发绿色荧光,抗 nestin 免疫荧光检测呈阳性。GDNF/NSCs 组与 NSCs 组 NSS 评分比较,在再灌注 2 周和 3 周显著降低($P<0.05$)。移植的 NSCs 分布于缺血侧皮质、纹状体,移植后 3、5、7 周,阳性细胞数分别较 1、2 周显著增多($P<0.05$)。GDNF/NSCs 组与 NSCs 组比较,第 2、3、5、7 周纹状体、皮质阳性细胞数显著增多($P<0.05$)。从病理学上观察,GDNF/NSCs 组神经毡较 NSCs 移植组致密。结论:移植 GDNF 基因修饰的神经干细胞能改善脑缺血大鼠神经功能,对脑缺血所致的损伤具有一定修复作用。

【关键词】局灶性脑缺血;神经干细胞;GDNF;移植

【中国图书分类法分类号】R743.33 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-04-29

Experimental study of GDNF gene modified neural stem cell transplantation on the treatment of rat subjected to focal cerebral ischemia

DU Jie, et al

(*Dean's Office, Luzhou Medical College*)

【Abstract】*Objective*: To observe the distribution of grafted GDNF-modified neural stem cells in the rat brain with focal ischemia and to explore the neuroprotective effect. *Methods*: Neural stem cells (NSCs) of neonatal rat were cultured in vitro. The model of middle cerebral artery occlution (MCAO) and reperfusion was set up. Normal saline (NS), NSCs and GDNF/NSCs were transplanted into the lateral ventricle of MCAO model after reperfusion 3 days by stereotaxis instrument, Neurological severity score (NSS) tests were undertaken in all groups 1,2,3,5,7weeks respectively before and after transplantation. Immunohistochcmistry was used to check the survival and distribution of NSCs in vivo. *Results*: NSCs tranfected after 2 d with recombinant adenovirus containing GDNF gene launched green fluoresent and expressed nestin. NSS of GDNF/NSCs groups and NSCs groups was significantly decreased than control groups at 1 ~ 7 w after reperfusion ($P<0.05$). NSS of the GDNF/NSCs group was lower than that of the NSCs groups in 2 w and 3 w subgroup ($P<0.05$). Grafted cells were located in the cortex and striatum of the lesion side. More reactive cells were found in the cortex and striatum at 3rd, 5th and 7th week than at 2nd week ($P<0.05$). Compared with NSCs groups, the number of reactive cells in GDNF/NSCs groups were significantly increased at 2nd, 3rd, 5th and 7th week ($P<0.05$). In GDNF/NSCs groups, the neuropils were more dense and compact than in NSCs groups. *Conclusion*: GDNF transfected NSCs improved neural function and have a neuroprotective effect after being transplanted into brain of MCAO rats.

【Key words】Focal cerebral ischemia; NSC; GDNF; Transplant

神经干细胞(Neural stem cells, NSCs)是一类具有自我复制、多向分化潜能的细胞,具有迁徙及低免疫性的特点,为细胞移植治疗缺血性脑损伤提供了可能。胶质细胞源性神经营养因子(Glial cell derived neurotrophic factor,GDNF)是一种强有力的神经营养因子,对中枢神经系统细胞的分化、发育、生长和存活具有重要的作用。本实验通过在生长旺盛的 NSCs

作者介绍:杜 杰(1975-),男,实验师,研究方向:缺血性脑损伤研究。

通讯作者:袁琼兰,女,教授,E-mail:yqiongl@263.net。

基金项目:四川省教育厅重大培育项目(编号:07ZZ013)。

中加入 GDNF 基因重组腺病毒的上清液转染 NSCs，并将转染的 NSCs 移植入大鼠局灶性脑缺血的脑组织，研究移植 NSCs 的迁移、分布，为脑缺血的细胞治疗与基因治疗的临床应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

成年 SD 大鼠 75 只，雌雄不拘，体重 250～300 g，新生 1 d 大鼠 10 只，由泸州医学院实验动物中心提供。抗 GFP 多克隆抗体购自 Santa cruz biotechnology 公司，抗 Brdu 单克隆抗体和抗 nestin 抗体够于武汉博士德。胶质细胞源性神经营养因子重组腺病毒载体(pAdEasy-1-pAdTrack-CMV-GDNF)，带有绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein，GFP)由本研究室构建。

1.2 大鼠局灶性脑缺血动物模型制备

局灶性脑缺血模型按照袁琼兰等[1]的线栓法进行制作。

1.3 新生大鼠 NSCs 的培养、鉴定及 GDNF 基因的转染

根据高小青[2]报道的方法进行体外新生大鼠 NSCs 的培养，用兔抗巢蛋白(Nestin)行免疫荧光化学染色，二抗为羊抗兔 IgG-Cy3。取第 2 代细胞吹打成单细胞悬液，调整细胞浓度为 1×10^6 个 /ml，接种于 24 孔培养板，每孔加 200 μl 细胞悬液及 5 μl pAdEasy-1-pAdTrack CMV-GDNF 重组腺病毒液(1×10^9 PFU/ml)，培养 2 h 后，各孔再添加培养基 300 μl，培养 48 h。将转染 48 h 的 NSCs 接种于 10%小牛血清培养基 2 d 使其分化。

1.4 实验分组

将具有神经功能缺失症状的大鼠随机分为 3 组：(1)生理盐水移植组(NS 组)；(2)神经干细胞移植组(NSCs 组)；(3)转染 GDNF 基因的神经干细胞移植组(GDNF/NSCs 组)。每组 25 只，按照再灌注时间(1、2、3、5、7 周)不同分为 5 个亚组，每个时间点 5 只。

1.5 移植细胞悬液制备和细胞移植

GDNF/NSCs 组细胞的准备：移植前，收集 2 孔细胞，离心弃上清，加入 20 μl 培养基，移植细胞数量为 5×10^5 个。NSCs 组细胞的准备：移植前将细胞用 10 μmol/L 的 BrdU 连续标记 3 d，调整细胞浓度为 2.5×10^7 个 /ml，取 20 μl 细胞悬液移植，移植细胞数量为 5×10^5 个。

利用大鼠脑立体定位仪进行脑室内移植，移植时间为再灌注 3 d，移植部位为右侧脑室(前囟后 0.8～1.0 mm，头尾正中线右侧旁开 1.8～2.0 mm，深度 4.0～5.0 mm)，1 组移植生理盐水 20 μl/只，2 组和 3 组移植细胞悬液 20 μl/只，移植速度为 5 μl/min，移植完后停针 5 min，缓慢退针，速度为 1 mm/min，用骨腊封住颅骨表面针口。

1.6 移植后神经功能损伤程度评价

在再灌注 3 d(移植前)以及再灌注 1～7 周对各组动物进行神经功能损伤程度评分(Neurological severity scores，NSS)，评分标准参照 Chen 等[3]方法，主要观察运动、感觉功能、平衡能力及生理反射能力；总分为 18 分，正常为 0 分，分值越高其神经损害程度越严重。采用 SPSS13.0 软件进行配伍设计方差分析，$P<0.05$ 定为有统计学差异。

1.7 标本采集

实验大鼠在再灌注 1 周、2 周、3 周、5 周、7 周末麻醉处死大鼠。脑组织用生理盐水和 4%多聚甲醛先后经心脏灌注固定，石蜡包埋，冠状切片(片厚 5 μm)。

1.8 免疫组织化学染色

切片脱蜡至水，抗原经 3%过氧化氢室温 10 min、0.3% Triton X-100 37℃ 30 min、2N 盐酸 37℃ 1 h、复合消化液 37℃ 30 min、10%封闭羊血清 37℃ 1 h、兔抗 GFP 多克隆抗体(1:100)或鼠抗 BrdU 单克隆抗体(1:100)4℃过夜，生物素化羊抗兔或小鼠二抗 37℃ 30 min、HRP-Streptavidin 37℃ 30 min。以上各步骤结束时用 0.01 mol/L 磷酸缓冲液冲洗 3 次。DAB 显色 5～10 min。阴性对照除不加一抗，其余处理相同。

1.9 细胞计数与统计学处理

每只动物取距前囟头侧 0.2～1.6 mm、尾侧 2.6～4.0 mm 范围的冠状切面各一张，在 400 倍视野下分别对纹状体、皮质进行细胞计数，每个区域随机测定 5 个阳性视野。所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示，单因素方差分析组内差异，独立样本 t 检验组间差异，$P<0.05$ 定为有统计学差异。

2 结 果

2.1 新生大鼠 NSCs 的体外培养、鉴定及 GDNF 基因转染

从新生大鼠脑组织培养的 NSCs，第 5 d 成细胞球，经 pAdEasy-1-pAdTrack-CMV-GDNF 重组腺病毒液转染后 2 d，荧光显微镜下观察细胞球呈绿色荧光(图 1)，将转染成功的 NSCs 分化，分化细胞的胞核及胞浆均呈绿色荧光(图 2)。用巢蛋白抗体行免疫荧光检测，细胞球呈红色，染色阳性(图 3)。

2.2 各组移植后各时间点 NSS 比较

再灌注 1 周后各时间点，各组 NSS 评分降低，与移植时间点相比有显著差异($P<0.05$)，在再灌注 2 周后各时间点，各组 NSS 评分与再灌注 1 周相比显著降低($P<0.05$)。在移植时间点，各组大鼠 NSS 评分无显著差异，在再灌注 1 周后各时间点，GDNF/NSCs 组和 NSCs 组的 NSS 评分比对照组显著降低($P<0.05$)，在再灌注 2 周和 3 周，GDNF/NSCs 组 NSS 评分比 NSCs 组显著降低($P<0.05$)(表 1)。

2.3 移植 NSCs 在宿主脑内的分布

GDNF/NSCs 组与 NSCs 组，分别用 GFP 抗体和 BrdU 抗体免疫组化法标记移植 NSCs，前者免疫反应在细胞胞浆和胞核(图 4)，后者在细胞核(图 5)。GDNF/NSCs 组和 NSCs 组在移植后 1 周，侧脑室内有大量 NSCs，缺血区皮质、纹状体内有少量 NSCs。移植后 2 周，阳性细胞沿胼胝体向缺血侧纹状体、皮质迁徙增多。在移植后第 3、5、7 周，纹状体、皮质阳

性细胞数分别较 1、2 周显著增多（$P<0.05$），而第 3、5、7 周之间无显著性（$P>0.05$）（图 6、7）。从病理学上观察，前 3 周组织结构疏松，缺损严重，阳性细胞多聚集在缺损部位，而第 5、7 周组织结构较前 3 周完整、致密，阳性细胞多散在分布。GDNF/NSCs 组与 NSCs 组比较，第 2、3、5、7 周纹状体、皮质阳性细胞数显著增多（$P<0.05$）（图 6、7）。从病理学上观察，GDNF/NSCs 组织结构较 NSCs 组完整，致密。

3　讨　论

缺血性脑中风是最为常见的中枢神经系统疾病之一，至今尚无有效的治疗手段。神经干细胞的发现为缺血性脑中风的组织重建和神经功能恢复提供了一新的途径。近来的研究发现，脑缺血后，移植的 NSCs 在宿主体内存活，并向缺血灶迁移，分化为神经元及神经胶质细胞，同时，动物的神经功能改善[4~6]。

GDNF 对纹状体多巴胺能神经元、皮质运动神经元具有强效营养、神经保护作用。外源性脑室或脑实质内直接给予 GDNF 蛋白或腺病毒介导的 GDNF 基因，脑中风大鼠的运动、感觉和认知功能显著改善，减轻脑水肿，神经元凋亡、脑梗塞体积减少，纹状体神经元再生增加[7-9]。进一步研究发现，GDNF 通过抑制 caspase-3，增加 bcl-2 和 bcl-XL、减少 NO

表 1　各移植组各时间点 NSS 比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	3 d(移植点)	1 周	2 周	3 周	5 周	7 周
GDNF/NSCs 组	11.4 ± 1.5	3.8 ± 0.8[ac]	1.8 ± 0.5[abcd]	1.6 ± 0.6[abcd]	1.4 ± 0.5[abc]	0.8 ± 0.5[abc]
NSCs	10.6 ± 1.5	4.4 ± 0.6[ac]	3.2 ± 0.5[abc]	3.0 ± 1.0[abc]	1.6 ± 0.9[abc]	1.0 ± 0.8[abc]
对照组	10.0 ± 0.7	8.2 ± 0.8[a]	6.8 ± 0.4[ab]	4.4 ± 0.9[ab]	3.2 ± 0.8[ab]	1.6 ± 0.5[ab]

a:与移植点比较，$P<0.05$；b:与再灌注 1 周比较，$P<0.05$；c:与对照组比较，$P<0.05$；d:与 NSCs 组 2～3 周比较，$P<0.05$



图 1　被 GDNF 转染 2 d 后的细胞球（×200）

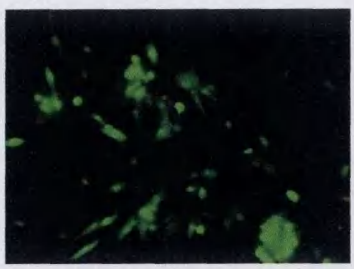


图 2　转染 GDNF 的细胞球体外分化 2 d（×100）



图 3　细胞球抗 nestin 免疫荧光染色阳性（×200）

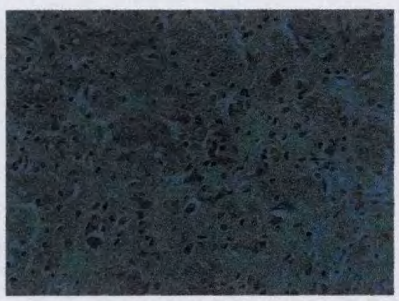


图 4　缺血脑组织抗 GFP 染色阳性的 NSCs(DAB×200)

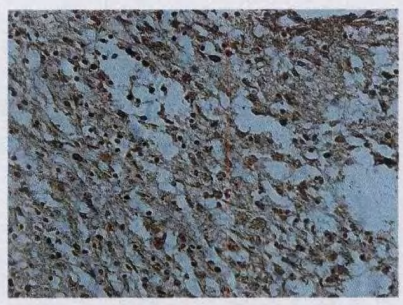
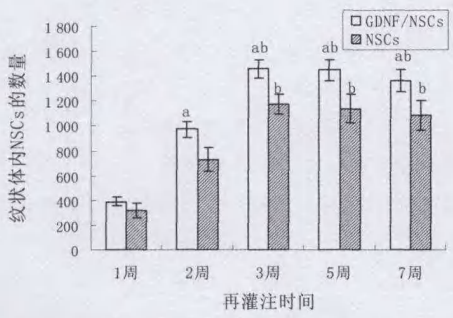
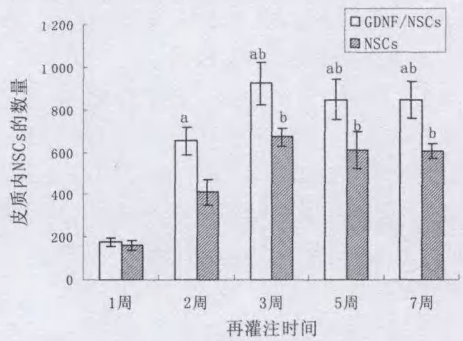


图 5　缺血脑组织抗 BrdU 染色阳性的 NSCs(DAB×200)



a. 与 NSCs 组比较，$P<0.05$；b. 与同一组 2 周比较，$P<0.05$

图 6　大鼠脑缺血再灌注后纹状体 GFP/BrdU 标记阳性细胞数（$\bar{x}\pm s$）



a. 与 NSCs 组比较，$P<0.05$；b. 与同一组 2 周比较，$P<0.05$

图 7　大鼠脑缺血再灌注后皮质 GFP/BrdU 标记阳性细胞数（$\bar{x}\pm s$）

和热休克蛋白的形成，减少脑梗塞体积和凋亡神经元的数量；此外，GDNF 增加谷胱苷肽过氧化物酶、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶对抗反应性氧介质、自由基损伤；GDNF 活化有丝分裂原蛋白激酶通路，减少谷氨酸受体 NMDA 引起的钙内流，因此，GDNF 通过抑制自由基和兴奋性毒性对缺血性脑损伤起保护作用[10,11]。上述研究表明，GDNF 作用于缺血性脑损伤的多个病理生理环节，抑制缺血性脑损伤的进行发展，对脑缺血具有强效的神经保护作用。

本实验移植 GDNF 基因转染的 NSCs 治疗大鼠脑缺血，表明移植后 2～3 周，神经功能损害程度评分较 NSCs 组低，神经功能有显著改善。从移植 2 周后 GDNF/NSCs 组迁徙到缺血区的细胞数量显著多于 NSCs 组（$P<0.05$）。从病理改变来看，GDNF/NSCs 组的神经组织结构明显好于单纯 NSCs 组。本实验结果与 Kameda 等[12]的实验相似，Kameda 将 GDNF 基因修饰的神经干细胞和前体细胞（NSPC-GDNF）于缺血损伤后 3 d 移植入缺血边缘带，移植后 7 d，与 NSPC 组比较，NSPC-GDNF 组大鼠神经功能显著改善，脑梗死体积减小，更多 NSPC-GDNF 细胞迁徙到缺血灶，并且更多的移植细胞分化为成熟神经元，用 ELISA 检测分泌更多的 GDNF。

综合比较本实验 GDNF 基因转染的 NSCs 与单纯 NSCs 移植治疗脑缺血的结果，可以看出前者的治疗效果优于后者。其原因可能是：(1)NSCs 作为原始未分化细胞，并不具备足够的营养因子分泌能力，因而在移植早期对脑缺血局部病理改变产生的积极影响较小，缺血早期半影区中神经元坏死和凋亡无法得到缓解，加上宿主有害的微坏境影响 NSCs 的迁徙、存活和最后分化。(2)将 GDNF 基因转染至 NSCs 内，移植的 NSCs 分泌 GDNF，改善了缺血微环境，可能有利于移植细胞的存活及迁移，促进移植细胞分化为新的神经元和胶质细胞，弥补内源性 NSCs 的不足，同时促进受损神经元恢复，防止其坏死或凋亡，并参与宿主神经组织结构的修复与改建而达到神经保护作用。

综上所述，局灶性脑缺血后，移植 GDNF 基因转染的 NSCs，有利于移植 NSCs 的存活与迁徙，并促进神经组织结构修复与改建。后续的实验尚需观察移植神经干细胞的分化，并进一步研究移植的神经干细胞是否形成功能性神经元，整合到宿主的神经环路。

参 考 文 献

[1] 袁琼兰，李瑞祥，羊惠君，等，改良的短暂局灶性大鼠脑缺血模型[J].四川解剖学杂志，1998，6(12)：65-67.

[2] 高小青，袁琼兰，杜 杰，等，新生大鼠神经干细胞培养过程中加入相关因子对其生长特性的影响[J].中国临床康复，2005，9(30)：58-59.

[3] Chen JL，Yi Li，Wang L，et al.Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats[J].Stroke，2001，189(1-2)：49-57.

[4] Chu K，Kim M，Park K，et al.Human neural stem cells improve sensorimotor deficits in the adult rat brain with experimental focal ischemia[J].Brain Res，2004，1016(2)：145-153.

[5] Kim SU.Human neural stem cells genetically modified for brain repair in neurological disorders[J].Neuropathology，2004，24(3)：159-171.

[6] Chu K，Kim M，Jeong SW，et al.Human neural stem cells can migrate，differentiate，and integrate after intravenous transplantation in adult rats with transient forebrain ischemia[J].Neurosci Lett，2003，343(2)：129-133.

[7] Kitagawa H，Hayashi T，Mitsumoto Y，et al.Reduction of ischemic brain injury by topical application of glial cell line-derived neurotrophic factor after permanent middle cerebral artery occlusion in rats[J].Stroke，1998，29(7)：1417-1422.

[8] Kobayashi T，Ahlenius H，Thored P，et al.Intracerebral infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor promotes striatal neurogenesis after stroke in adult rats[J].Stroke，2006，37(9)：2361-2367.

[9] Kitagawa H，Sasa K，Sakai K，et al.Adenovirus-mediated gene transfer of glial cell-derived neurotrophic factor prevents ischemic brain injury after transient middle cerebral artery occlusion in rats[J].J.Cereb Blood Flow Metab，1999，19(12)：1336-1344.

[10] Nicole O，Ali C，Docagne F，et al.Neuroprotection mediated by glial cell line-derived neurotrophic factor：involvement of a reduction of NMDA-induced calcium influx by the mitogen-activated protein kinase pathway[J].J Neurosci，2001，21(9)：3024-3038.

[11] Jin G，Omori N，Li F，et al.Protection against ischemic brain damage by GDNF affecting cell survival and death signals[J].Neurol Res，2003，25(3)：249-253.

[12] Kameda M，Shingo T，Takahashi K，et al.Adult neural stem and progenitor cells modified to secrete GDNF can protect，migrate and integrate after intracerebral transplantation in rats with transient forebrain ischemia[J].Eur J Neurosci，2007，26(6)：1462-1478.

（责任编辑：关蕴良）