DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.09.001
第26卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 9
2004年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2004

文章编号:1000-5404(2004)09-0749-04

论著

移植诱导中脑NSCs分化的多巴胺能神经元对PD大鼠治疗作用的实验研究

余小强[1],阮怀珍[1],蔡文琴[1],范晓棠[1],姚忠祥[2],杨 辉[3] (第三军医大学:[1]基础医学部神经生物学教研室,[2]基础医学部组织胚胎学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038,[3]新桥医院神经外科,重庆 400037)

提 要:目的 研究移植诱导中脑神经干细胞分化出的多巴胺能神经元对PD大鼠的治疗作用。方法 利用纹状体提取液诱导大鼠胚胎中脑神经干细胞,使其部分分化为酪氨酸羟化酶(TH)阳性的多巴胺能神经元,继而把分化后的细胞移植到PD大鼠的纹状体内,免疫组化法证实移植细胞的存活并以诱发旋转行为的改善来观察其治疗作用。结果 纹状体提取液能够诱导中脑神经干细胞分化出多巴胺能神经元而且这种经诱导后产生的细胞能够在PD大鼠体内长期存活并改善阿叭吗啡诱导的旋转行为。结论 诱导中脑神经干细胞分化出的多巴胺能神经元对PD有一定的治疗作用。

关键词:帕金森病;神经干细胞;神经移植
中图法分类号:R322.81;R329.28;R745.7 文献标识码:A

Effects of dopaminergic neurons differentiated from mesencephalic NSCs induced by transplantation on treatment of Parkinson's disease in rats

YU Xiao-qiang[1], RUAN huai-zhen[1], CAI Wen-qin[1], FAN Xiao-tang[1], YAO Zhong-xiang[2], YANG Hui[3] ([1]Department of Neurobiology; [2]Department of Histology and Embryology, College of Medicine; [3]Department of Neurosurgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To evaluate the therapeutical effect of dopaminergic neurons induced by transplantation on Parkinson's disease (PD) rats. Methods Mesencephalic nerve stem cells (NSCs) were induced by striatal extracts to differentiate into tyroxine hydroxylase (TH) positive dopaminergic neurons. The differentiated cells were transplanted into the striatum of PD rats. The survived cells were detected by TH immunocytochemical staining. The therapeutical effect was observed using apomorphine-induced rotation. Results Mesencephalic NSCs could be induced to differentiate into dopaminergic neurons which could survive in the host for long time after cell transplantation, and could improve the apomorphine-induced rotation. Conclusion The induced mesencephalic NSCs have the obvious therapeutical effect on PD.

Key words: Parkinson's disease; neural stem cell; neural transplantation

在神经干细胞的研究中,如何在体外定向诱导其分化出足量的、有功能的、终末的多巴胺能神经元一直是人们关注的热点问题。使用各种细胞因子如GDNF、BDNF、IL-1、IL-11、白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)以及多巴胺、弗司扣林、潘生丁、N-乙酰半胱氨酸等作为诱导剂,在体外对NSCs进行诱导分化,能够得到多巴胺能神经元,这些神经元能够分泌DA,且在帕金森病(Parkinson's disease, PD)大鼠的细胞移植实验治疗中有很好的作用[1~5]。在前期的研究中,我们使用PD大鼠的纹状体提取液对体外培养的胚胎大鼠中脑神经干细胞进行诱导分化,得到了一定比例的多巴胺能神经元。在本实验中,我们利用诱导分化的神经元进行PD大鼠的细胞移植治疗,以了解其是否能在体存活,并发挥生物学功能。以探讨从神经干细胞所分化得到的多巴胺能神经元是否对帕金森病有潜在的治疗应用前景。

1 材料和方法

1.1 材料

Wistar孕大鼠及Wistar成年大鼠均由第三军医大学实验动物中心提供。DMEM/F12和B27均购自Gibco公司,6-OHDA、阿叭吗啡、bFGF均购自Sgima公司,抗Nestin IgG和抗NF-200IgG购自博士德公司,抗TH IgG购自晶美公司。

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054206);国家自然科学基金资助重点项目(30130110)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects)(G199905421); National Natural Science Foundation of China (30130110)
作者简介:余小强(1978-),男,湖北省黄梅县人,硕士研究生,主要从事神经干细胞与老年性疾病方面的研究。电话:(023) 68752232
通信作者:蔡文琴,电话:(023)68752233
收稿日期:2003-07-07;修回日期:2003-10-08

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2 方法

1.2.1 PD 大鼠模型制作 Wsitar 大鼠 27 只，雌雄不拘，180～220 g，常规喂养。用 6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine，6-OHDA)损毁大鼠左侧黑质区，术后用阿朴吗啡(Apomorphine)皮下注射诱发旋转行为。观察 20 min，平均转速大于 7 圈/min 者，视为成功模型。

1.2.2 纹状体提取液的制备及神经干细胞分离、培养及诱导分化 纹状体提取液的制备、中脑神经干细胞的培养、诱导分化及其结果鉴定见参考文献[6]。体外分离培养胚胎大鼠中脑神经干细胞，传 3～4 代后，用纹状体提取液 200 μl/ml 诱导其分化。

1.2.3 动物分组 A 组：中脑神经干细胞诱导后移植组(n=11)；B 组：中脑神经干细胞直接移植组(n=11)；C 组：对照组即假手术组(n=5)。

1.2.4 移植手术 取纹状体提取液诱导分化后 1 周的细胞群，用 0.2%的胰酶在 37 ℃的 CO_2 的孵箱里消化 20 min 后，收集于离心管内，小心吹打后终止消化反应。以无 bFGF 的神经干细胞条件培养液重新悬浮，调整细胞浓度为 1×10^6/μl 备用。取成功的 PD 动物模型，1%戊巴比妥钠按 30 mg/kg 腹腔注射麻醉，固定于立体定位仪上，将待移植细胞按每点大约(1～5)×10^6 个细胞注入毁损侧纹状体内；坐标为 A：＋1.8 mm，L：2.5 mm，V4.5 mm 及 A：＋0.6 mm，L：2.0 mm，V：4.2 mm。注射时间为 10 min，注射完毕留针 10 min，封闭骨窗后缝合头皮，术后常规喂养，腹腔注射青霉素 4×10^4 U/24 h，抗感染 3 d，假手术组仅在相同靶点注入等剂量的生理盐水。术后 3 d 内内 A 组死亡 3 只，B 组死亡 2 只。术前及术后 7、15、30、45 d 内分别于动物大腿内侧皮下注射阿朴吗啡 0.05 mg/kg，诱发动物的旋转行为，计数其 10～15 min 内旋转次数，以圈数/min 表示，并取旋转行为有改善动物作免疫组化染色。

1.2.5 免疫组化方法 大鼠灌注固定后取脑，取移植部位作冰冻切片，片厚 30 μm，以抗 TH 抗体检测细胞在移植部位存活情况，具体方法参照文献[7]。

1.3 统计学处理

行单因素方差分析及 t 检验。

2 结果

2.1 细胞培养及诱导分化生长情况

孕 14 d 的胚胎大鼠中脑神经干细胞在干细胞条件培养液中生长良好，传 3～4 代时，在培养液中可以见到悬浮生长的球形细胞克隆的存在，细胞增殖能力较强。利用纹状体提取液进行诱导分化后，可以见到干细胞团贴壁分化(图 1，2)。我们以前的研究表明[9]以分化出多巴胺能神经元。利用此细胞作为移植治疗之用。

2.2 PD 大鼠旋转行为的改善情况

如表 1 可见，C 组动物旋转行为无改善，A 组和 B 组与 C 比较，在 30 d 和 45 d 时，有显著改善($P<0.01$)，而 A 组在 15 d 时就能观察到动物的运动障碍有明显改善。就 A、B 组比较而言，A 组在 30 d 和 45 d 时比 B 组有明显改善($P<0.05$)，这说明移植诱导细胞及干细胞均能在一定程度上改善动物的运动障碍，而诱导分化组疗效要略好于直接干细胞移植组。

表 1 大鼠的旋转行为变化情况($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Changes of apomorphine-induced rotation of rats ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Before transplantation	After transplantation (d)			
			7	15	30	45
Differential cells (A)	8	18.36±4.35	15.79±3.45	12.64±4.26*	8.58±2.21*	6.43±3.87*
NSCs (B)	9	19.14±3.91	16.67±4.02	15.54±3.78	11.01±3.53*#	7.93±2.42*#
Control (C)	5	18.78±3.62	18.61±4.10	19.56±2.92	18.89±3.03	18.63±4.37

*：$P<0.01$，*vs* B；#：$P<0.05$，*vs* B

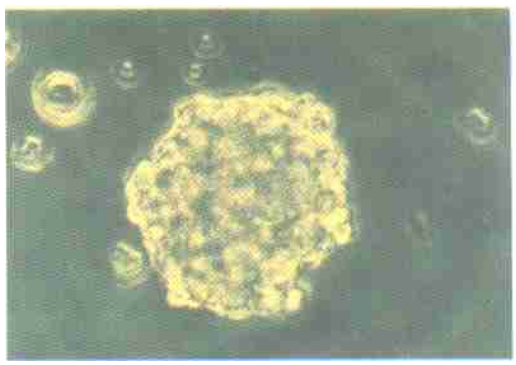


图 1 相差显微镜下大鼠中脑神经干细胞集落 (×400)

Fig 1 Colonies of mesencephalic NSCs from fetal rats under the phase contrast microscope (×400)

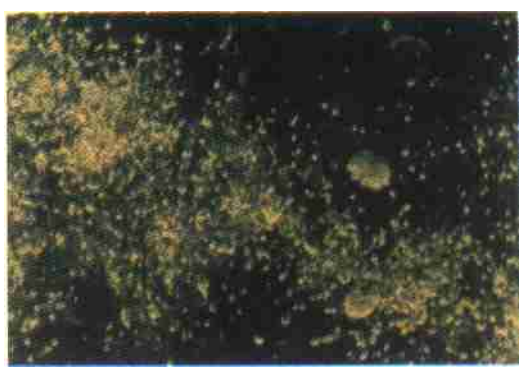


图 2 相差显微镜下纹状体提取液诱导分化的神经干细胞集落 (×40)

Fig 2 Colonies of mesencephalic NSCs induced by striatal extracts under the phase contrast microscope (×40)

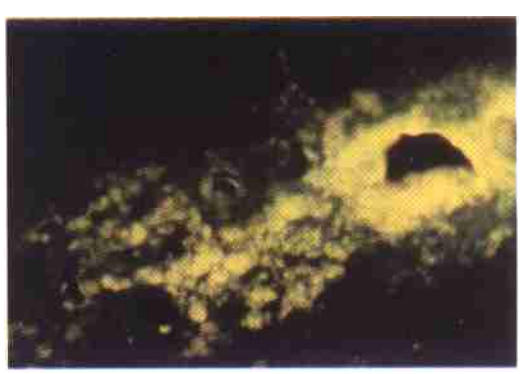


图 3 移植诱导细胞两周，移植区 TH 免疫组化染色 (SABC×200)

Fig 3 TH positive cells in the grafted region in group A 2 weeks after transplantation (SABC×200)

2.3 移植细胞鉴定

在不同的时间内，进行 TH 免疫组化染色以了解分化出的多

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

巴胺能神经元在脑内的生存情况, 大鼠纹状体原无多巴胺能神经元, 移植细胞到纹状体是希望其能够分泌多巴胺从而改善运动障碍。如果在移植部位能够检测到 TH 阳性细胞的存在, 说明移植细胞能够在宿主脑内存活。结果表明: A 组和 B 组两组均存在着 TH 阳性细胞, 在 C 组未见纹状体内存在 TH 阳性细胞。在移植区边缘, 可以见到细胞形态稍好的阳性细胞, 在偏离移植区稍远, 染色未显示出有 TH 阳性细胞的出现(图 3~6)。

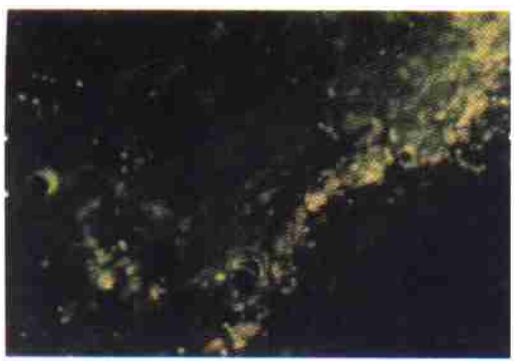


图 4　移植干细胞两周, 移植区 **TH** 免疫组化染色　(SABC× 200)

Fig 4　TH positive cells in the grafted region in group B 2 weeks after transplantation　(SABC× 200)

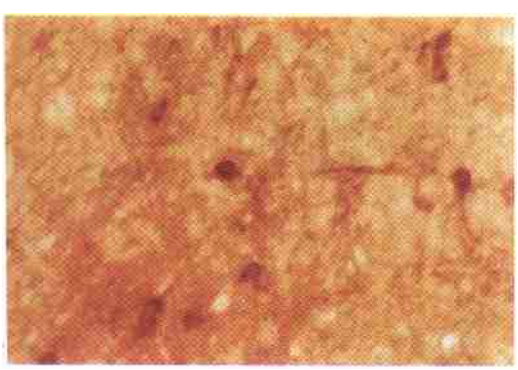


图 5　移植诱导细胞两周, 移植区周围 **TH** 免疫组化染色　(SABC× 400)

Fig 5　TH positive cells in the grafted region in group A 2 weeks after transplantation　(SABC× 400)

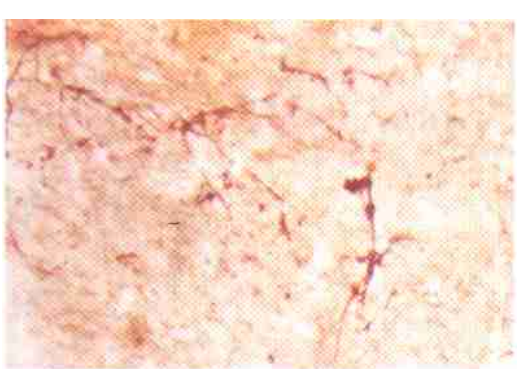


图 6　移植诱导细胞四周, 移植区 **TH** 免疫组化染色　(SABC× 200)

Fig 6　TH positive cells in the grafted region in group A 4 weeks after transplantation　(SABC× 200)

3　讨论

在神经变性疾病中, PD 由于其主要病理变化明确定位于中脑黑质, 移植手术的靶点纹状体也是定位明确并易于达到, 并且有良好的啮齿类和灵长类动物 PD 模型, 可以在其实验研究基础上预期不同的治疗方法对人类 PD 患者的治疗效果而成为细胞移植治疗的首选。神经干细胞的定向诱导分化是干细胞研究领域的一个难点和热点。NSCs 的分化存在细胞自身基因调控和外来信号调控这两种机制[8]。如何选择合适的外面诱导因子与诱导环境, 对于其分化结果是很关键的问题。

在没有任何体外因素干预或者说诱导的情况下, 神经干细胞自然分化为多巴胺能神经元的比例很低, 大约只占细胞总数的 0.5%~5%[9], 不能达到治疗的作用。因此人们使用各种诱导因子或转基因的方法, 得到足量的神经元后再进行移植。在前期的研究中, 我们利用纹状体提取液对体外培养的条件下的胚胎大鼠中脑来源的神经干细胞进行诱导分化, 得到了多巴胺能神经元, 比例占总数的 20%左右[9]。在此实验中, 我们把从神经干细胞所得到的多巴胺能神经元移植到 PD 大鼠的纹状体内, 术后检测阿朴吗啡诱导的旋转行为有了明显的改善, 持续时间达 6 周。旋转次数由术前的 17 圈/min 下降到术后的 6 圈/min, 与空白对照组有显著的差异($P<0.01$)。Nishino 等[10] 利用在体的微环境, 直接把神经干细胞移植到 PD 大鼠的纹状体内, 也能分化出一定量的多巴胺能神经元, 具有一定的疗效。但是, 由于干细胞的多向分化潜能, 直接移植有很大的危险性。我们在移植诱导分化后的细胞同时, 对它与直接干细胞移植的疗效进行了比较。结果显示, 直接移植也有一定的疗效, 但是在术后的 4 周和 6 周, 诱导细胞组与直接移植组相比, 疗效也有明显差异($P<0.05$)。说明先经诱导后再进行移植有比较良好的治疗作用。

不同的时相点进行移植区的免疫组化显色显示, 在针道周边, 有 TH 阳性细胞出现, 在移植后 2 周到 4 周时较为明显, 可能由于细胞前期的处理会对其造成一定的损伤, 在 2 周内, 可以见到移植区有大量的 TH 阳性细胞, 但无明显突起(图 1, 2, 3)。在针道与纹状体实质的交界处, 有散在的阳性细胞的表达。而在 4 周时, 在针道周边, 即可以见到较长突起的 TH 阳性神经元(图 4)。直接干细胞移植组也能分化出少量的 TH 阳性的多巴胺能神经元。与直接中脑 NSCs 移植组比, 诱导分化后的细胞不仅在疗效上要略好干细胞移植组且更安全。

在对 PD 的干细胞治疗研究中, 究竟是选择神经干细胞移植还是经定向诱导的多巴胺神经元移植更有效可行还是一个处在探讨中的问题。李凌松等[11] 对

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

人胚胎中脑来源的神经干细胞和经其定向诱导分化产生的多巴胺神经元移植治疗帕金森病进行了比较研究，将离体培养的人神经干细胞球和经定向诱导分化的细胞混合物（主要是TH阳性神经元，还有星形胶质细胞和一些未分化的神经干细胞、少量少突胶质细胞）分别移植到帕金森病大鼠模型的纹状体。

用抗人细胞核抗体检测到两组移植细胞在脑内存活达到20周之久。但是只有移植诱导分化产物的大鼠旋转行为有显著改善，疗效接近移植原代分离的人胚胎中脑多巴胺神经元者，且人源细胞能与宿主神经系统整合。而移植神经干细胞组大鼠行为学虽有一定程度的恢复，但没有统计学意义。因此作者认为，只有移植诱导分化的多巴胺神经元才能在纹状体尽早提供多巴胺递质，缓解帕金森病的症状。我们利用纹状体提取液诱导大鼠来源的中脑NSCs，将其分化后的混合细胞移植，也发现疗效要好于直接干细胞移植。这表明，经诱导后再移植，细胞能够有更好的存活率和释放多巴胺的能力，可能是一种相对更好的移植治疗策略。

虽然神经干细胞移植治疗帕金森病等神经系统变性疾病已经在动物实验和初期临床实验中取得良好的结果，但是要将神经干细胞真正应用于临床治疗并取得稳定的疗效还有很多问题有待解决。我们的研究从一个方面说明了诱导分化干细胞移植治疗的可能，也说明纹状体提取液可以作为一种有效的诱导剂，其作用机制值得继续探讨和关注。

参考文献：

[1] Carvey P M, Ling Z D, Sortwell C E, *et al*. A clonal line of mesencephalic progenitor cells converted to dopamine neurons by hematopoietic cytokines: a source of cells for transplantation in Parkinson's disease[J]. Exp Neurol, 2001, 171(1): 98—108.

[2] Storch A, Paul G, Csete M, *et al*. Long-term proliferation and dopaminergic differentiation of human mesencephalic neural precursor cells[J]. Exp Neurol, 2001, 170(2): 317—325.

[3] Rodriguez-Pallares J, Caruncho H J. Dipyridamole-induced increase in production of rat dopaminergic neurons from mesencephalic precursors[J]. Neurosci Lett, 2002, 320(1-2): 65—68.

[4] Riaz S S, Jauniaux E, Stern G M, *et al*. The controlled conversion of human neural progenitor cells derived from foetal ventral mesencephalon into dopaminergic neurons *in vitro*[J]. Brain Res Dev Brain Res, 2002, 136(1): 27—34.

[5] Potter E D, Carvey P M, Ling Z D. Cytokine-induced conversion of mesencephalic-derived progenitor cells into dopamine neurons[J]. Cell Tissue Res, 1999, 296(2): 235—246.

[6] 余小强，阮怀珍，蔡文琴. 纹状体提取液诱导中脑神经干细胞分化为多巴胺能神经元的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2004，26(1)：18—21.

[7] 蔡文琴，王伯?云. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交[M]. 成都：四川科学技术出版社，1994. 78—80.

[8] Martinez S, Anders B. Immortalized neural progenitor cells for CNS gene tansfer and repair[J]. Trends Neurosci, 1997, 20(11): 530—538.

[9] Vescovi A L, Snyder E Y. Establishment and properties of neural stem cell clones: plasticity in vitro and in vivo[J]. Brain Pathol, 1999, 9(3): 569—598.

[10] Nishino H, Hida H, Takei N, *et al*. Mesencephalic neural stem (progenitor) cells develop to dopaminergic neurons more strongly in dopamine-depleted striatum than in intact striatum[J]. Exp Neurol, 2000, 164(1): 209—214.

[11] 李凌松. 神经干细胞及帕金森病的细胞治疗[J]. 北京大学学报（医学版），2002，34(5)：378—381.

（编辑 陈聪连）

第三届全国中医药临床学术研究科技论坛征文

中华中医药学会拟于今年秋季在黄山举办“第三届全国中医药临床学术研究科技论坛”，现向全国中医药临床工作者征文。

征文内容：①在对病因不明性和多因素性疾病的诊治等；②循证医学、DME、GCP等方法在中医药临床研究中的具体运用，中医药临床研究的科研设计、评价、质量控制等方面的分析研究；③中医药临床各科的现状、问题、对策、未来预测和设想及发展战略，临床各种常见病、多发病的诊治经验、应用体会和新认识、新方法、新技术、新成果、新进展；④中医药临床人才培养的途径和方法，中医药人才资源的开发利用；⑤中药复方、各类中药新药和制剂的临床研究、药理实验、疗效分析评价以及老药新用介绍；⑥中药不良反应等安全性问题的临床分析和研究，药剂师走向临床的实践和探讨。⑦计算机在中医药临床诊疗和科研设计中的应用。**截稿日期**：2004年6月30日。稿件请注明“临床征文”字样。每篇征文收取审稿费30元，入选论文将在中华中医药学会系列期刊《中医药临床杂志》(ISSN1672—7134 CN34—1268/R)上发表。具体参会事宜另行通知。

地 址：合肥市大通路明光小区5幢《中医药临床杂志》编辑部 邮 编：230011

联系人：黄 晖 E-mail：cjtcm@163.com

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net