DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.01.040

胚胎脑细胞移植促进脑损伤修复的基础研究*

论文摘要

Intracerebral Transplantation of Fetal Cerebral Suspension Enhanced the Restoration of Brain Injury

王传松 蔡文琴 (第三军医大学基础部组织胚胎学教研室) 630038

目前对胚胎脑细胞移植促进脑损伤修复的基础理论尚缺乏充分了解,本文在脑损伤移植胚胎脑细胞后,做了宿主脑细胞周期分析和生长相关蛋白(growth associated protein,GAP-43)阳性神经元分布的研究。在细胞周期的研究方面,首先证实了流式细胞计(flow cytometry,FCM)可用于神经科学的研究,然后,用FCM做了细胞周期分析;在GAP-43的研究方面,用免疫细胞化学的方法先研究了GAP-43阳性神经元在正常成年大鼠脑内的分布,然后,观察了脑损伤移植胚胎脑细胞后阳性神经元分布的变化。结果如下:

1 FCM在神经科学研究上的应用

胚胎16 d、18 d、20 d、新生和成年Wistar大鼠各5只,所有大鼠取大脑、小脑、中脑、脑桥、延髓和脊髓组织制成细胞悬液,涂片在倒置显微镜下观察细胞形态,发现绝大部分细胞呈现为圆形,极少数有突起的细胞经悬浮培养数小时突起回缩,细胞变圆后可顺利通过FCM上的喷嘴(Φ:70 μm),首次证实了FCM可用于神经科学的研究。细胞悬液经固定和RNase的消化,用荧光染料碘化丙啶对细胞内的DNA进行特异性染色,经200目尼龙网过滤,用$FACS_{tar}^{PLUS}$FCM测量了细胞经激光激发后发出的荧光强度,由此得出细胞内DNA的相对含量和细胞所处的细胞周期时相,每个样品测10 000个细胞,统计出10 000个细胞中处于G_0/G_1期、S期和G_2/M期的细胞数,所得数据用计算机做统计处理。由于G_2/M期细胞数代表了正在分裂和即将分裂的细胞数,重点对G_2/M期细胞数的变化做了分析。结果:胚胎16 d时大脑G_2/M期细胞数(4775个)明显高于小脑(1428个),18 d时二者达高峰(分别是5952个和5376个),20 d时略有减少;中脑、桥脑、延髓、脊髓G_2/M期细胞数大大低于同期的大、小脑;新生脑各部G_2/M期细胞数急剧降低,成年与新生比无显著差异。根据G_2/M期细胞数,大脑移植的最佳胚龄约在胚胎16 d。

2 胚胎脑细胞移植对宿主脑细胞周期的影响

成年Wistar大鼠20只,按每组5只分成以下4组:(1)正常对照组;(2)左侧顶叶损伤组;(3)左侧顶叶损伤后移植孔径0.8 μm微孔滤膜制成的圆筒组;(4)伤后移植装有16 d胚胎大脑细胞悬液的微孔滤膜圆筒组。所有大鼠术后第4天取损伤灶周围的顶叶皮质,用FCM做细胞周期分析,结果:损伤、移植微孔滤膜、移植胚胎16 d大脑细胞悬液都可使宿主顶叶皮质G_2/M期细胞数增多,胚胎16 d大脑细胞悬液的作用尤其明显;由于胚胎脑细胞被装在微孔滤膜圆筒内,它可能通过分泌某些物质透出微孔滤膜发挥作用。胚胎16 d大脑细胞悬液移植4 d后G_2/M期细胞数降低到仅为正常体内发育4 d(即胚胎20 d时)G_2/M期细胞数的约1/10,与体外培养4 d无显著差异。

3 GAP-43在正常成年大鼠脑内的分布

15只正常成年Wistar大鼠,灌注固定,取脑及脊髓颈段,做冰冻冠状连续切片(厚50 μm),每5片取一片,用ABC法做GAP-43的免疫细胞化学研究,GAP-43为Boehringer公司产品,ABC试剂盒为Vector公司产品,对照实验用制备GAP-43抗体的同种小鼠(Balb/c)正常血清替代GAP-43抗体。结果:对照切片均为阴性。GAP-43阳性神经元出现于纹状皮质、海马、小脑浦肯野细胞、三叉神经运动核、上橄榄核,纹状皮质内偶见胞体、顶树突及其主要分支、基树突及主要分支、轴突都呈现阳性的锥体细胞。成年时呈现GAP-43阳性的神经元可能与其可塑性和功能状态有关。

4 胚胎脑细胞移植对GAP-43的影响及形态观察

成年Wistar大鼠20只,按第二部分的方法分成4组,动物术后2个月取材做GAP-43的免疫细胞化学及光镜、电镜研究。结果:顶叶损伤移植胚胎16 d大脑细胞悬液组,在原无GAP-43阳性神经元的顶叶皮质出现了较多的GAP-43阳性神经元,阳性神经元分布在移植腔的周围。移植的胚胎16 d大脑细胞可能通过分泌某些物质,透出微孔滤膜作用于宿主神经元,使GAP-43的含量增加。由于神经组织损伤后神经元内GAP-43的增加与轴突再生密切相关,提示出现GAP-43阳性的神经元可能有轴突再生。光镜、电镜下见大量增生的星形胶质细胞、成纤维细胞、巨噬细胞,近年发现,星形胶质细胞可分泌NGF、bFGF、LN、FN、apoE,成纤维细胞可分泌大量的FN,巨噬细胞可分泌IL-1等,以上这些物质都有利于神经细胞的生长、轴突的再生,因此,星形胶质细胞、成纤维细胞、巨噬细胞可能通过分泌以上生物活性物质,有促进神经元损伤修复的作用。

以上结果从脑损伤移植胚胎脑细胞后,促进宿主脑细胞分裂和神经元内GAP-43含量增加二个方面为胚胎脑细胞移植促进脑损伤修复提供了新的证据;同时,FCM可用于神经科学研究的发现,为神经科学的研究提供了新的手段;用FCM对脑各部发育过程中细胞周期分布的研究,也为发育神经生物学提供了宝贵的资料。

关键词 脑损伤;流式细胞计;胚胎脑细胞;细胞周期;脑内移植;修复;生长相关蛋白(GAP-43);免疫细胞化学

中图法分类号 R651.15

* 全军"八五"攻关课题

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