

· 实验研究 ·

缺氧缺血性脑损伤发病中神经干细胞变化规律初探

巨容¹, 尹晓娟², 刘卫鹏¹, 封志纯¹

(1. 南方医科大学珠江医院儿科, 广东 广州 510280; 2. 第三军医大学西南医院儿科, 重庆 430000)

[摘要] 目的 探讨缺氧缺血性脑损伤后神经干细胞(NSCs)的变化规律。方法 取新生7日SD大鼠随机分为正常对照组、缺氧组和缺氧缺血组。每组再根据处死时间点随机分成3 h, 6 h, 1 d, 3 d, 7 d, 14 d, 21 d 7个亚组($n=10$)。缺氧缺血组大鼠分离并结扎左颈总动脉, 置于密闭缺氧箱2.5 h, 缺氧组不结扎血管, 仅缺氧2.5 h。免疫组织化学检测海马、皮层及纹状体区阳性NSCs数。结果 正常7日龄大鼠脑组织存在NSCs, 且呈明显的区域性分布, 在10日龄后数目逐渐减少。缺氧组及缺氧缺血组大鼠NSCs较正常组增多, 差异有显著性, 在缺氧后3 d(10日龄)时达高峰, 后逐渐减少, 缺氧组在缺氧后21 d(28日龄)时仍高于正常组。结论 HIBD发病中早期NSCs增殖; NSCs随着病情的演变开始减少; 早期采用NSCs干预治疗可能为临床治疗HIBD提供重要途径。

[中国当代儿科杂志, 2005, 7(6):517-519]

[关键词] 缺氧-缺血, 脑损伤; 神经干细胞; 大鼠, 新生

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2005)06-0517-03

Changes of neural stem cells following hypoxic-ischemic brain damage

Rong JU, Xiao-Juan YIN, Wei-Peng LIU, Zhi-Chun FENG. Department of Pediatrics, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China (Feng Z-C, Email: zhifengzc@sohu.com)

Abstract: Objective This study examined the changes of neural stem cells (NSCs) following hypoxic-ischemic brain damage (HIBD) in order to provide a basis for clinical use of NSCs. **Methods** Neonatal 7-day-old rats were randomly assigned into three groups; Normal control, Hypoxic and Hypoxic-ischemic groups. The Hypoxic-ischemic group was subjected to the left common carotid artery ligation followed by 8% oxygen exposure for 2.5 hrs. The Hypoxic group was exposed to 8% oxygen for 2.5 hrs but without the carotid artery ligation. The subjects were sacrificed at 3 and 6 hrs, and 1, 3, 7, 14 and 21 days after hypoxia/ischemia (10 rats at each time point). The number of NSCs from brain tissues of rats was detected with hematoxylin-eosin staining and immunohistochemistry. **Results** NSCs were presented in the normal brain tissues of neonatal rats and were reduced at 10 days postnatal. The NSCs in the Hypoxic and the Hypoxic-ischemic groups increased after hypoxia/ischemia and were significantly higher than that in the Normal control group at 6 hrs after hypoxia and at 1 day after hypoxia-ischemia. The NSCs number peaked at 3 days after hypoxia/ischemia and then decreased gradually but remained higher than that in the Normal control group at 21 days after hypoxia. **Conclusions** NSCs may proliferate in the early phase of HIBD but decrease while the damage is developing. Early NSCs intervention for the treatment of HIBD appears to be promising.

[Chin J Contemp Pediatr, 2005, 7(6):517-519]

Key words: Hypoxic-ischemic, brain damage; Neural stem cell; Rats, newborn

新生儿缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)是引起新生儿死亡、脑性瘫痪、癫痫以及智力低下的主要原因之一。深入研究HIBD的发病机制仍然是寻求该病有效治疗方法的根本途径。研究发现, 脑缺氧缺血造成永久性脑损伤的原因之一是室管膜下(subventricular zone, SVZ)的神经干细胞(neural stem cells, NSCs)缺氧缺血后发生凋亡、坏死^[1]。新生动物缺氧缺血性脑损伤后干细胞的变

化规律研究较少, 本研究探讨新生大鼠HIBD后NSCs的时相变化, 为临床应用NSCs治疗HIBD提供理论及实验依据。

1 对象与方法

1.1 实验动物及分组

新生7日SD大鼠210只, 体重10~12 g, 由第一

[收稿日期]2005-01-18; [修回日期]2005-05-20

[作者简介]巨容(1969-), 女, 硕士研究生, 主治医师。主攻方向: 新生儿疾病。

[通讯作者]封志纯, 南方医科大学珠江医院儿科, 邮编: 510280。

军医大学实验动物中心提供。随机分为正常对照组;缺氧组;缺氧缺血组3组,每组70只。每组又根据处死时间不同分为3 h,6 h,1 d,3 d,7 d,14 d,21 d 7个亚组,每亚组10只。缺氧缺血组大鼠建立 HIBD 模型^[2]:乙醚吸入麻醉,分离左颈总动脉,结扎剪断,休息2~3 h后放入37℃水浴密闭缺氧箱(容积10 L),持续充以8%氧氮混合气体,气流量0.5 L/min,维持2.5 h。缺氧组不结扎血管,仅缺氧2.5 h。正常对照组仅予分离血管,不结扎血管,不缺氧。

1.2 处死与取材

各组动物在相应处死时间点用乙醚麻醉后开胸暴露心脏,冷生理盐水灌注后取脑,观察脑外形及切面后,立即置于-20℃恒冷箱切片中平衡2 h后沿视交叉中点处连续冠状冰冻切片,片厚8 mm,每隔5张取2张,包含室管膜下区,并同时可见海马、皮层及纹状体区域。切片贴于多聚赖氨酸处理过的玻片上,丙酮固定后-20℃保存,分别行苏木精-伊红及 Nestin 免疫组织化学染色。

1.3 Nestin 免疫组织化学染色

冰冻切片在室温平衡后,依次加入3% H₂O₂,山羊封闭血清, Nestin 一抗(1:100, BD Biosciences), 37℃孵育2 h,亲和素化羊抗小鼠二抗室温30 min,生物素过氧化物酶室温15 min,显色。Nestin 蛋白阳性表达 NSCs 的定性定量标准:胞浆染成棕黄色者为 Nestin 阳性细胞,在400倍显微镜下进行细胞计数,每个样本观察5张切片,每张切片随机选择 SVZ 区的10个视野,计数每个样本的阳性细胞数。

1.4 统计学分析

所有实验数据以均数±标准差表示。采用 SPSS 10.0 统计软件进行分析,各组内部各时间点之间和同一时间点不同组别之间采用单因素方差分析并进行两两比较。

2 结果

2.1 各组组织学改变

正常对照组各亚组脑组织结构层次均清晰,细胞轮廓正常,胞浆呈淡红色,核居中,核仁清楚,尼氏体均匀分布于核周围。缺氧缺血组缺氧后24 h可见大脑皮质、海马、丘脑胞体显著肿胀,核浆分界不清,结构紊乱,细胞溶解、消失;3 d 病灶周围出现胶质细胞增生;7 d 病灶周围增生的星形胶质细胞增多,14 d、21 d 神经元大量丢失、胶质瘢痕形成。缺氧组改变类似于缺氧缺血组,但病变程度明显减轻。

2.2 各组 Nestin 阳性细胞数目比较

正常对照组大鼠脑组织存在 NSCs,且呈明显的区域性分布,多分布于脑室下带的背外侧角、外侧壁、海马处,在皮层、纹状体也能见到 NSCs。缺氧组及缺氧缺血组大鼠 NSCs 较正常组增多,两组差异有显著性,在缺氧后3 d(10日龄)时达高峰,后逐渐减少,缺氧组在缺氧后21 d(28日龄)时仍高于正常组(表1,图1)。

3 讨论

本研究对 HIBD 发病中 NSCs 的数量变化特点进行了初步探讨,发现3组大鼠的脑组织中均存在 NSCs。正常对照组在1周内,脑组织中的 NSCs 增殖随年龄的增加而增加,1周后则呈现出随年龄增大而减少的趋势,这与文献^[3]的研究结果相一致。在1 d以后的不同时间点,缺氧组 NSCs 高于对照组及缺氧缺血组,因此低氧有利于 NSCs 的增殖。

现已基本达成共识:可从成年脑和胚胎中获得神经干细胞。至少在成年哺乳动物海马齿状回和 SVZ 区仍有高密度的具有分化潜能的干细胞^[4],它们通常

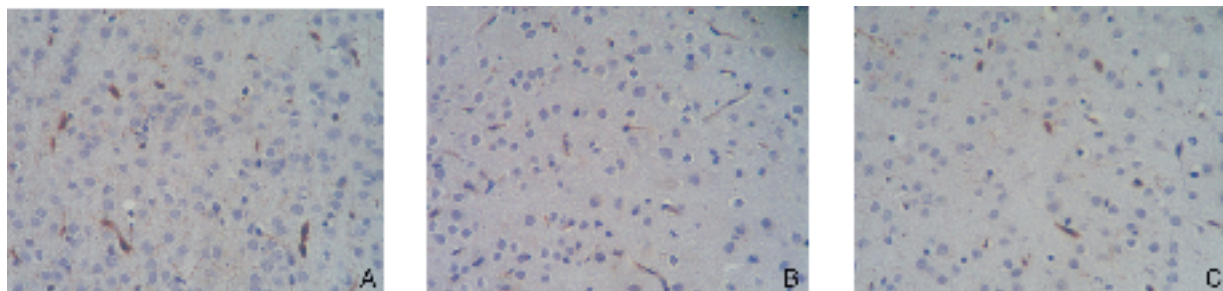


图1 SVZ区6h时间点 Nestin 免疫组化染色。A. 缺氧组;B. 缺氧缺血组;C. 正常对照组(黄色 DAB 显色,×400)。阳性表达呈棕黄色,Nestin 阳性细胞核呈圆形,胞浆呈黄色、棕黄色,细胞呈大小不等的圆形、梭形。

表1 各组 SVZ 区 Nestin 阳性细胞数目比较

(n = 10, $\bar{x} \pm s$)

	3 h	6 h	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d
正常对照组	90 ± 7	92 ± 7	92 ± 10	95 ± 6 ^e	80 ± 9 ^e	62 ± 7	59 ± 9
缺氧组	94 ± 11	95 ± 12 ^b	99 ± 8 ^a	105 ± 6 ^{a,e}	92 ± 13 ^a	77 ± 10 ^{a,f}	67 ± 7 ^{b,f}
缺氧缺血组	93 ± 9	94 ± 7	95 ± 13 ^{b,c}	99 ± 9 ^{a,d,f}	86 ± 1 ^{b,c,e}	69 ± 13 ^{b,f}	63 ± 8 ^d
F	0.108	0.037	4.545	13.542	9.022	3.212	6.224

同一时间点与正常对照组比较 a P < 0.01, b P < 0.05; 同一时间点与缺氧组比较 c P < 0.01, d P < 0.05; 同一组内不同时间点与前一时间点比较 e P < 0.01, f P < 0.05;

处于“静止”状态,只在某些因素激活后才重新进入细胞增殖周期,并进一步分化为特定功能的神经细胞^[5]。缺氧组及缺氧缺血组 NSCs 高于对照组可能是低浓度氧对 NSCs 增殖有上调作用^[6],刺激体内静止或不活跃的 NSCs 增殖;而缺氧缺血组低于缺氧组可能是因缺氧缺血的双重作用,使 SVZ 的部分 NSCs 相继凋亡、坏死^[7]。在缺氧缺血早期(3 d 前) NSCs 数量随时间的推移而增多,但 1 周后则随时间的延长而减少,可能在早期激活体内静止或不活跃的 NSCs 增殖^[8],但 NSCs 耐受缺氧缺血是受时间和程度限制的,且随着时间的增长成体干细胞数逐渐减少,病变组织中的 NSCs 相继凋亡、坏死,最后以胶质疤痕修复病变组织或形成空洞。

除低氧外,抗过氧化物酶、热休克蛋白、脑红蛋白及与缺氧缺血性损伤有关的离子通道的开闭或/和蛋白质的表达等因素均参与缺氧缺血性脑损伤的保护机制^[9,10],有利于干细胞的激活;生长因子对 NSCs 的存活和增殖也有着不可缺少的重要作用,对内源性 NSCs 的状态也有一定影响^[11]。谷氨酸能神经的传入阻滞可明显提高神经细胞的再生,谷氨酸受体拮抗剂 MK-801 则可促进干细胞增殖^[12]。另外,外源神经干细胞移植及分子生物学等技术的应用,对缺氧缺血性脑损伤神经元的保护及修复作用也正在研究中。因此,探讨 HIBD 发病中的 NSCs 变化规律,有利于临床进行早期干预治疗,促进 NSCs 增殖,减少神经系统后遗症,使 HIBD 有一个更好的治疗前景及预后。

[参 考 文 献]

[1] Levison SW, Rothstein RP, Romanko MJ, Snyder MJ, Meyers RL, Vannucci SJ. Hypoxia/ischemia depletes the rat perinatal subven-

tricular zone of oligodendrocyte progenitors and neural stem cells [J]. Dev Neurosci, 2001, 23(3):234-247.

[2] 胡志兵,陆雪芬,郑德枢,邓平. 神经节苷脂 GM1 对缺氧缺血后脑中 HSP70 表达的影响[J]. 卒中与神经疾病, 2001, 8(5):278-281.

[3] 肖新莉,刘勇,徐曦,丁海燕. 大鼠脑发育过程中神经干细胞分布的免疫组织化学研究[J]. 西安医科大学学报, 2002, 23(2):114-116.

[4] Plane JM, Liu R, Wang TW, Silverstein FS, Parent JM. Neonatal hypoxic-ischemic injury increases forebrain subventricular zone neurogenesis in the mouse[J]. Neurobiol Dis, 2004, 16(3):585-595.

[5] Weiss S, Reynolds BA, Vescovi AL, Morshead C, Craiy CG, vander Kooy D. Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain? [J]. Trends Neurosci, 1996, 19(9):387-393.

[6] Romanko MJ, Rothstein RP, Levison SW. Neural stem cells in the subventricular zone are resilient to hypoxia/ischemia whereas progenitors are vulnerable [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2004, 24(7):814-825.

[7] Seisjoe BK, Kristian T, Katsura KI. Overview of bioenergetic failure and metabolic cascades in brain ischemia. In: Ginsberg MD, Bogouslavsky J, eds, Cerebrovascular Disease [M]. Blackwell: Oxford, 1998, 3-13.

[8] 姜传涛,杨秋慧,苏玉金,赵春礼,杨慧,徐群渊. 胎儿脑组织体外保存获取神经干细胞的时限[J]. 解剖学报, 2002, 33(5):449-452.

[9] Bondarenko A, Svichar N, Chesler M. Role of Na⁺-H⁺ and Na⁺-Ca²⁺ exchange in hypoxia-related acute astrocyte death [J]. Glia, 2005, 49(1):143-152.

[10] Yasuoka N, Nakajima W, Ishida A, Takada G. Neuroprotection of edaravone on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats [J]. Brain Res Dev Brain Res, 2004, 151(1-2):129-139.

[11] Craig CG, Tropepe V, Morshead CM. In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell population in the adult mouse brain [J]. J Neurosci, 1996, 16(6):2649-2653.

[12] Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation [J]. J Neurosci, 1997, 17(7):2492-2498.

(本文编辑:钟乐)