

缺血性损伤对未成熟脑脑室下区神经新生的影响

孙金峤,沙彬,周文浩,杨毅

(复旦大学附属儿科医院,上海 201102)

[摘要] 目的 观察3日龄新生大鼠脑缺血后脑室下区(subventricular zone, SVZ)神经干细胞增殖及其向少突胶质细胞分化的变化,了解未成熟脑缺血性损伤后SVZ的自身修复作用。方法 3日龄新生Sparuge-Dawley大鼠96只随机分为实验组和对照组,实验组结扎双侧颈总动脉,造成脑缺血模型。采用5-溴脱氧尿嘧啶(BrdU)腹腔注射标记新生细胞,免疫荧光双标记方法观察脑损伤后不同时间点SVZ新生细胞(BrdU⁺)、新生神经干细胞(BrdU⁺/Nestin⁺)及新生少突胶质细胞(BrdU⁺/O4⁺)的变化。结果 ①神经干细胞增殖变化:实验组缺血后SVZ BrdU⁺细胞增多,术后4 d达高峰(253.1±49.3),与同时点对照组(133.5±17.7)相比差异有非常显著性($P<0.01$);双标结果显示SVZ BrdU⁺细胞大多为神经干细胞(Nestin⁺细胞)。②神经干细胞分化变化:实验组缺血后35 d新生少突胶质细胞(BrdU⁺/O4⁺阳性细胞)数目增加,主要分布在胼胝体(56.0±7.2)、隔核(45.0±11.9)、纹状体(34.5±4.2)、嗅球(46.5±6.6),与对照组(17.0±6.4,20.5±5.0,14.5±5.8,23.5±8.4)相比差异有非常显著性意义($P<0.01$)。结论 ①缺血性损伤可激活SVZ神经干细胞增殖,并促进其向少突胶质细胞分化;②未成熟脑SVZ具有损伤后自身修复作用。 [中国当代儿科杂志,2009,11(5):397-400]

[关键词] 神经干细胞;缺血;脑;脑室下区;双侧颈动脉结扎;新生大鼠
[中图分类号] R-33 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2009)05-0397-04

Neurogenesis in the subventricular zone of neonatal rats after ischemic brain injury

SUN Jin-Qiao, SHA Bin, ZHOU Wen-Hao, YANG Yi. Children's Hospital of Fudan University, Shanghai 201102, China (Zhou W-H, Email: zhou_wenhao@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To study the proliferation and differentiation of neural stem cells in the subventricular zone (SVZ) in neonatal rats after bilateral common arteries occlusion. **Methods** Ninety-six 3-day-old Sparuge-Dawley rats were randomly divided into two groups: ischemia and control. Rats in the ischemia group were subjected to bilateral common arteries occlusion and the rats in the control group were sham-operated. All rats were administrated with 5-bromodeoxyuridine (BrdU) (50 mg/kg) via intraperitoneal injection. Rats were sacrificed and their brains were removed 1, 4, 7, 10, 14 and 35 days after ischemia. Using brain paraffin sections and immunofluorescence assays, the number of newborn cells in the SVZ was counted. Newborn neural stem cells and oligodendrocytes in the SVZ were observed, and then double marked with BrdU and nestin or osmium tetroxide (O4). **Results** The number of BrdU⁺ cells (neural stem cells) in the SVZ in the ischemia group was greater than in the control group 4, 7, 10 and 14 days after ischemia, and reached a peak at 4 days after ischemia (253.1±49.3 vs 133.5±17.7; $P<0.01$). By 35 days after ischemia, the number of BrdU⁺/O4⁺ cells (oligodendrocytes) in the corpus callosum (56.0±7.2 vs 17.0±6.4; $P<0.01$), the septal nuclei (45.0±11.9 vs 20.5±5.0; $P<0.01$), the striatum (34.5±4.2 vs 14.5±5.8; $P<0.01$) and the olfactory bulb (46.5±6.6 vs 23.5±8.4; $P<0.01$) in the ischemia group increased significantly as compared to the control group ($P<0.01$). **Conclusions** Brain ischemia can activate the proliferation of neural stem cells in the SVZ and promote neural stem cells differentiation into oligodendrocytes. The immature brain may have the capacity for self-repair after ischemic brain injury. [Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (5):397-400]

Key words: Neural stem cell; Ischemia, brain; Subventricular zone; Bilateral common arteries occlusion; Neonatal rats

随着早产儿的存活率不断提高,早产儿脑损伤成为愈来愈突出的医学问题。早产儿脑损伤可造成神经系统发育障碍,其中包括永久性伤残^[1],如脑性瘫痪,给家庭、社会带来沉重负担。研究证实,早

[收稿日期]2008-09-01;[修回日期]2008-10-10
[基金项目]国家自然科学基金(30571963);复旦大学研究生创新基金(EYF156004)
[作者简介]孙金峤,男,博士,主治医师。主攻方向:早产儿脑损伤的治疗和研究。
[通讯作者]周文浩,男,副教授,复旦大学附属儿科医院,邮编:201102。

产儿脑损伤主要为脑白质损伤,缺血是主要原因^[2]。目前对早产儿脑损伤仍缺乏有效的治疗,激活内源性神经干细胞修复损伤已成为早产儿脑损伤最具潜力的治疗方向^[3]。本研究采用 3 日龄新生大鼠脑缺血模型,观察脑缺血对脑室下区(subventricular, SVZ)神经干细胞增殖及其向少突胶质细胞分化的影响,了解脑损伤后 SVZ 的自身修复作用,为早产儿脑损伤的干预提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组与模型制作

清洁级 3 日龄新生 Sparuge-Dawley (SD) 大鼠 96 只,体重 8.5 ~ 9.4 g,雌雄不限,随机分为实验组和对照组。实验组:无水乙醚麻醉,固定四肢及头部,颈部正中切口,逐层分离出两侧颈总动脉,用 9-0 丝线完全结扎。术后在 37℃ 水浴箱内至体温和活动恢复正常,返回母鼠笼中饲养;对照组:分离出两侧颈总动脉但不结扎,其余过程与实验组相同。两组大鼠分别于术后 1,4,7,10,14,35 d 处死,每组每时点 8 只。

1.2 5-溴脱氧尿嘧啶标记 (BrdU)

脉冲标记:检测细胞增殖的动物于处死前 24 h 给予 BrdU (德国宝灵曼公司)腹腔注射,每次 50 mg/kg,每 4 h 1 次,共 3 次,最后 1 次注射后 12 h 处死取脑。检测细胞增殖的动物分为术后 1,4,7,10,14 d 五个时间点,此法用于检测 SVZ 细胞增殖。

累积标记:检测细胞分化的动物于术后 5 d 给予 BrdU 腹腔注射,每次 50 mg/kg,每天 1 次,共 3 次,最后 1 次注射后 28 d (即术后 35 d)处死取脑,此法用于检测细胞分化。

1.3 脑组织标本处理

于相应时点,动物乙醚麻醉后,切开腹部皮肤,依次打开腹腔、横膈、胸腔,暴露心脏,经左心室灌注,先肝素化生理盐水继以含 4% 多聚甲醛的 0.1 MPBS 灌注固定 10 min,断头取脑,4% 多聚甲醛室温固定 24 h,梯度酒精脱水,石蜡包埋,进行冠状位切片,片厚 4 mm,取 SVZ 进行免疫荧光染色。

1.4 免疫荧光染色

BrdU 及 Nestin 双标细胞的检测:①切片常规脱蜡至水;②透膜:滴加 3% 曲拉通,室温 10 min;③抗原修复:0.01 M 枸橼酸盐缓冲液中,微波修复 (中低火,10 min,自然冷却 30 ~ 60 min);④封闭:山羊血清封闭 30 min,37℃;⑤滴加 BrdU 一抗 (德国宝灵曼公司,1:100),4℃ 过夜 (以下每步皆须避光);⑥滴加山羊抗小鼠 IgG-TRITC (Chemicon,1:100),室温 2 h;⑦滴加 Nestin 一抗 (武汉博士德生物公司,1:150),4℃ 过夜;⑧滴加山羊抗兔 IgG-FITC (武汉博士德生物公司,1:100),37℃ 30 min;以上各步之间除山羊血清封闭外均用 0.1 MPBS 漂洗 10 min × 3 次;⑨DAPI 封片;⑩Leica 荧光显微镜观察。每组每时点 8 只大鼠,每只取 SVZ 连续 5 张切片,高倍视野下 (×400),计数 5 个视野,取平均值。

BrdU 及 O4 双标细胞的检测:除步骤⑦为滴加 O4 一抗 (Chemicon,1:150),4℃ 过夜外,其余步骤同前。

2 结果

2.1 神经干细胞增殖变化

SVZ BrdU⁺细胞缺血后增多,术后 4 d 达高峰,术后 4,7,10,14 d 与对照组相比差异有显著性意义 ($P < 0.01$) (表 1,图 1A,B)。双标结果显示 SVZ BrdU⁺细胞大多为神经干细胞 (Nestin⁺细胞), (图 1C)。

表 1 3 日龄 SD 大鼠术后 SVZ 新生细胞的增殖变化 ($\bar{x} \pm s$, 个/视野)

	鼠数	第 1 天	第 4 天	第 7 天	第 10 天	第 14 天
对照组	8	129.5 ± 15.7	133.5 ± 17.7	128.6 ± 13.7	89 ± 11.7	93 ± 11.4
实验组	8	132.0 ± 19.0	253.1 ± 49.3 ^a	214.9 ± 13.5 ^a	186.4 ± 18.2 ^a	159.5 ± 17.7 ^a

a: 与对照组比较, $P < 0.01$

2.2 神经干细胞分化变化

实验组缺血后 35 d 新生少突胶质细胞 (BrdU⁺/O4⁺阳性细胞)数目增加,主要分布在胼胝体、隔核、纹状体、嗅球 (定位颗粒细胞层),实验组与对照组相比差异有显著性意义 ($P < 0.01$), (表 2,图 2A,B)。

表 2 3 日龄 SD 大鼠术后 35 d 新生少突胶质细胞的变化及分布 ($\bar{x} \pm s$, 个/视野)

	鼠数	胼胝体	隔核	纹状体	嗅球
对照组	8	17.0 ± 6.4	20.5 ± 5.0	14.5 ± 5.8	23.5 ± 8.4
实验组	8	56.0 ± 7.2 ^a	45.0 ± 11.9 ^a	34.5 ± 4.2 ^a	46.5 ± 6.6 ^a

a: 与对照组比较, $P < 0.01$

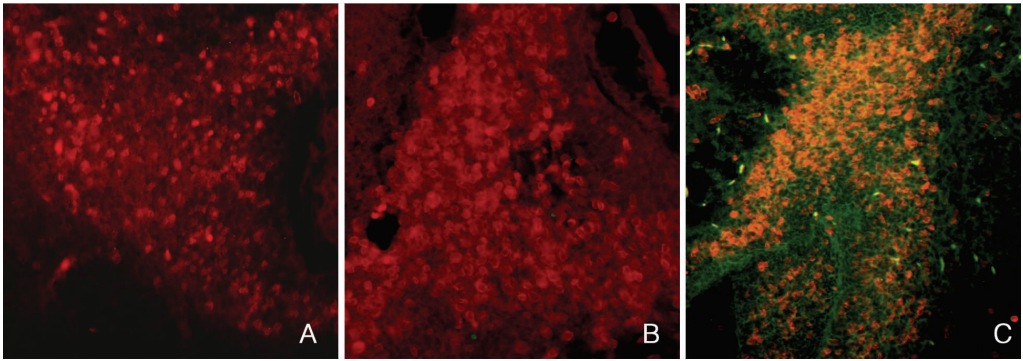


图1 神经干细胞增殖变化(SABC, ×40) A:对照术后4 d BrdU⁺细胞; B:实验组术后4 d BrdU⁺细胞; C:实验组术后4 d SVZ BrdU⁺/Nestin⁺细胞。图中红色细胞为 BrdU⁺细胞,实验组较对照明显增多,黄色为 BrdU⁺/Nestin⁺细胞,表示新生神经干细胞。

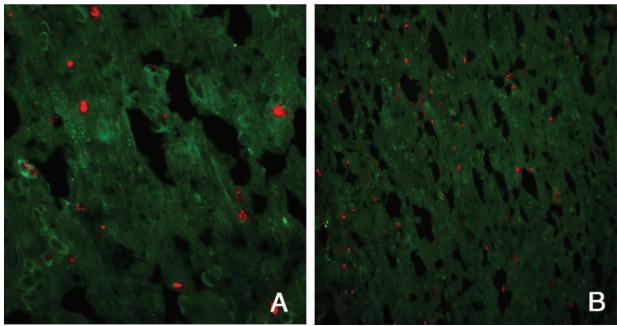


图2 神经干细胞分化变化(×40) A:对照术后35 d SVZ BrdU⁺/O4⁺细胞; B:实验组术后35 d SVZ BrdU⁺/O4⁺细胞。图中红色细胞为 BrdU⁺/O4⁺细胞,实验组较对照明显增多,表示新生少突胶质细胞。

3 讨论

神经干细胞治疗早产儿缺血性脑损伤是目前最有前途的治疗方法之一,但尚缺乏缺血性脑损伤后神经干细胞增殖和分化方面的研究。众所周知,无论在未成熟还是成年脑内,神经干细胞主要存在于SVZ和海马齿状回(hippocampal subgranular zone, SGZ),这两个区域之外的细胞增殖主要产生胶质细胞而不是神经元^[4]。本研究通过结扎双侧颈总动脉制作缺血性脑损伤模型,选择SVZ观察神经干细胞在缺血性损伤后的变化。选用3日龄大鼠是因为2~4日龄新生大鼠脑发育程度相当于人胎龄28~32周的大脑发育程度,能够更好地模拟早产儿缺血性脑损伤的病理改变。

脱氧胸腺嘧啶核苷同型物 BrdU 在细胞周期的S期进入DNA,故可被用来观察细胞增殖。理论上,在损伤后用BrdU标记增殖细胞可能被进入凋亡细胞的BrdU及参与DNA修复的BrdU混淆,但Moore等^[5]研究发现BrdU仅在神经发生时检出,在DNA

的修复峰期不能检出。故本研究选用BrdU观察新生细胞增殖的变化。

围生期脑室下区神经发生持续存在,大鼠在生后1~2周SVZ细胞增殖达高峰^[6],其后则增殖减少。此在本研究的对照组中得到证实:对照组SVZ细胞增殖在术后4 d,即生后7 d达高峰。本研究发现3日龄新生大鼠慢性脑缺血后,SVZ增殖细胞数在术后4 d达高峰,在损伤10 d后SVZ细胞增殖下降明显;本研究同时发现大多数新生细胞Nestin表达阳性,即增殖细胞大多为神经干细胞,此研究结果表明慢性脑缺血可以促进SVZ神经干细胞自我更新,细胞增殖增加。

SVZ为灰质及白质少突胶质细胞的主要来源^[7,8],SVZ含有神经干细胞,神经干细胞分化为少突胶质祖细胞,少突胶质祖细胞分化为髓鞘形成及非髓鞘形成少突胶质细胞,生后第2天SVZ产生的细胞主要定位于灰质:约80%移行至新皮质,10%至白质,其余细胞迁移至纹状体或至边缘地带(白质与新皮质或白质与纹状体);而生后第14天SVZ细胞主要定位于白质:80%的标记细胞定位于白质,其余细胞移行至纹状体或边缘地带,不迁移至新皮质。此与生后第14天放射性胶质细胞转为星形胶质细胞,不再提供SVZ细胞迁移至皮质的放射性胶质细胞有关。本模型在术后第5~7天注射BrdU标记(生后8~10 d),故术后由SVZ迁移至胼胝体的少突胶质细胞最多,至纹状体、隔核的少突胶质细胞相对较少,迁移至皮质的通路减少致皮质新生少突胶质细胞数量少。因未成熟脑白质内含有早期少突胶质细胞祖细胞,因此,新生的少突胶质细胞可能不完全来自于SVZ,本研究发现胼胝体、纹状体、隔核及嗅球新生少突胶质细胞明显增多,不仅进一步证实了SVZ为少突胶质细胞的主要来源,而且发现

缺血性损伤可促进神经干细胞向少突胶质细胞分化,表明 SVZ 在未成熟脑缺血性损伤后可以通过神经干细胞的增殖及其分化为少突胶质细胞来修复损伤,为激活内源性神经干细胞修复损伤提供了依据。但是脑缺血性损伤后神经干细胞的增殖及分化机制尚不明确,可能包括炎症反应、兴奋性氨基酸的毒性作用,有待进一步研究^[9~12]。

[参 考 文 献]

[1] Hintz SR, O'Shea M. Neuroimaging and neurodevelopmental outcomes in preterm infants[J]. *Semin Perinatol*, 2008, 32 (1):11-19.

[2] Vaccarino FM, Ment LR. Injury and repair in developing brain [J]. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 2004, 89 (3):F190-192.

[3] Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche[J]. *Cell*, 2004, 116(6):769-778.

[4] Bonfanti L, Peretto P. Radial glial origin of the adult neural stem cells in the subventricular zone [J]. *Prog Neurobiol*, 2007, 83 (1):24-36.

[5] Moore N, Okocha F, Cui JK, Liu PK. Homogeneous repair of nu-

clear genes after experimental stroke [J]. *J Neurochem*, 2002, 80 (1):111-118.

[6] Yang Z, Levison SW. Hypoxia/ischemia expands the regenerative capacity of progenitors in the perinatal subventricular zone [J]. *Neuroscience*, 2006, 139 (2):555-564.

[7] Polito A, Reynolds R. NG2-expressing cells as oligodendrocyte progenitors in the normal and demyelinated adult central nervous system[J]. *J Anat*, 2005, 207(6):707-716.

[8] Brazel CY, Romanko MJ, Rothstein RP, Levison SW. Roles of the mammalian subventricular zone in brain development[J]. *Prog Neurobiol*, 2003, 69(1):49-69.

[9] 余小河,杨于嘉,王霞,王庆红,谢岷,刘沉涛,等. 高压氧对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠内源性神经干细胞和髓鞘的保护作用[J]. *中国当代儿科杂志*, 2006, 8(1):33-37.

[10] 孟淑珍,韩晓华,韩玉昆. 新生鼠缺氧缺血损伤后神经细胞再生增加[J]. *中国当代儿科杂志*, 2005, 7(5):393-397.

[11] Aarum J, Sandberg K, Haerberlein SL, Persson MA. Migration and differentiation of neural precursor cells can be directed by microglia [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(26):15983-15988.

[12] Brazel CY, Nuñez JL, Yang Z, Levison SW. Glutamate enhances survival and proliferation of neural progenitors derived from the subventricular zone [J]. *Neuroscience*, 2005, 131(1):55-65.

(本文编辑:吉耕中)

· 消息 ·

欢迎订阅 2009 年《中国当代儿科杂志》

《中国当代儿科杂志》是由中华人民共和国教育部主管,中南大学主办的国家级儿科专业学术期刊。本刊为国家科学技术部中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),中国科学引文数据库(CSCD)收录期刊,北京大学图书馆中文核心期刊和国际权威检索机构美国 MEDLINE、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、美国《化学文摘》(CA)和荷兰《医学文摘》(EM)收录期刊,同时被中国学术期刊(光盘版)、中国科学院文献情报中心、中国社会科学院文献信息中心评定为《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊,并被《中国期刊网》、《中国学术期刊(光盘版)》全文收录。

本刊内容以儿科临床与基础研究并重,反映我国当代儿科领域的最新进展与最新动态。辟有英文论著、中文论著(临床研究、实验研究、儿童保健、疑难病研究)、临床经验、病例讨论、病例报告、社区医师园地、专家讲座、综述等栏目。读者对象主要为从事儿科及相关学科的临床、教学和科研工作者。

本刊 2009 年起改为月刊,每月 15 日出版,向国内外公开发行人。中国标准刊号:ISSN 1008-8830, CN 43-1301/R。欢迎全国各高等医学院校,各省、市、自治区、县医院和基层医疗单位,各级图书馆(室)、科技情报研究所及广大医务人员和医学科技人员订阅。每期定价 12 元,全年 144 元。邮发代号:国内 42-188;国外 3856(BM)。可通过全国各地邮局订阅或直接来函与本刊编辑部联系订阅。向本刊投稿一律通过网上稿件远程处理系统,免审稿费,审稿周期 3~6 周。欲浏览本刊或投稿,请登录本刊网站。

联系地址:湖南省长沙市湘雅路 87 号《中国当代儿科杂志》编辑部 邮编:410008
电话:0731-4327402 传真:0731-4327922 Email:ddk7402@163.com
网址:[http:// www. cjcp. org](http://www.cjcp.org)