

高压氧治疗促进 HIBD 新生大鼠内源性神经干细胞的迁移与分化

王晓莉, 杨于嘉, 谢岷, 王庆红, 余小河

(中南大学湘雅医院儿科, 湖南 长沙 410008)

[摘要] 目的 该研究探讨了高压氧(HBO)对缺氧缺血性脑损伤(HIBD)新生大鼠内源性神经干细胞(NSCs)的迁移与分化的影响。**方法** 7日龄 Sprague-Dawley 新生大鼠随机分为对照组, 模型组及 HBO 组。采用 Rice-Vannucci 方法制成 HIBD 模型。造模后 3 h 内行 HBO 治疗。分别于 HBO 治疗后 7 d、14 d、28 d, 采用 BrdU/DCX, BrdU/ β -tubulin, BrdU/GFAP 和 BrdU/ O_4 免疫荧光双标法, 用共聚焦显微镜动态检测侧脑室室管膜下区(sub-ventricular zone, SVZ)与大脑皮层内源性 NSCs 的迁移与分化。**结果** 治疗后 7 d, HBO 组损伤侧 SVZ 区 BrdU⁺DCX⁺细胞数(84 ± 21 个/ mm^2)增加, 多于对照组(39 ± 14 个/ mm^2)与模型组(68 ± 17 个/ mm^2) ($P < 0.05$); 治疗后 14 d, SVZ 区 BrdU⁺DCX⁺细胞数减少, 而皮层区 BrdU⁺DCX⁺细胞数增加, HBO 组明显多于对照组 ($P < 0.01$); 治疗后 28 d, 各组大脑皮层 BrdU⁺DCX⁺细胞数减少, 大脑皮层出现 BrdU⁺ β -tubulin⁺, BrdU⁺GFAP⁺, BrdU⁺ O_4 ⁺细胞。HBO 组 BrdU⁺ β -tubulin⁺与 BrdU⁺ O_4 ⁺细胞数显著高于对照组与模型组 ($P < 0.05$)。**结论** 高压氧可促进 HIBD 新生大鼠内源性 NSCs 迁移到大脑皮层并分化为成熟的神经细胞。 [中国当代儿科杂志, 2009, 11(9): 749-752]

[关键词] 缺氧缺血性脑损伤; 高压氧; 神经干细胞; 新生大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2009)09-0749-04

Hyperbaric oxygen promotes the migration and differentiation of endogenous neural stem cells in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage

WANG Xiao-Li, YANG Yu-Jia, XIE Min, YU Xiao-He, WANG Qing-Hong. Department of Pediatrics, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China (Yang Y-J, Email: yyjcjcp@163.com)

Abstract: Objective To explore the effects of hyperbaric oxygen (HBO) treatment on the migration and differentiation of endogenous neural stem cells (NSCs) in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage (HIBD). **Methods** Seven-day-old Sprague-Dawley rats were randomly divided into the normal control (CON), the HIBD model and the HBO groups (HBO treatment was administered at 2 ATA, once daily for 7 days within 3 hrs after HIBD). HIBD model was prepared according to the classic Rice-Vannucci method. BrdU/DCX, BrdU/ β -tubulin, BrdU/GFAP and BrdU/ O_4 immunofluorescence were examined by confocal microscopy in the subventricular zone (SVZ) and the cortex 7, 14 and 28 days after HBO treatment. **Results** The BrdU⁺DCX⁺ cells in the SVZ (84 ± 21 cells/ mm^2) in the HBO group were significantly higher than those in the CON group (39 ± 14 cells/ mm^2) ($P < 0.05$) and the HIBD model group (68 ± 17 cells/ mm^2) ($P < 0.05$) 7 days after HBO treatment. Fourteen days after HBO treatment, the BrdU⁺DCX⁺ cells decreased in the SVZ and more cells were observed in the cortex in the HBO group as compared with the CON group ($P < 0.01$). The BrdU⁺ β -tubulin⁺, BrdU⁺GFAP⁺ and BrdU⁺ O_4 ⁺ cells were observed in the cortex, and more BrdU⁺ β -tubulin⁺ and BrdU⁺ O_4 ⁺ cells were observed in the HBO group as compared with the CON and the HIBD model groups ($P < 0.05$) 28 days after HBO treatment. **Conclusions** HBO treatment may promote endogenous NSCs to migrate to the cortex and differentiate into mature neurocytes in neonatal rats with HIBD. [Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11(9): 749-752]

Key words: Hypoxic-ischemic brain damage; Hyperbaric oxygen; Neural stem cell; Neonatal rats

随着围产医学的发展,危重新生儿(包括早产儿和低出生体重儿)的存活率不断提高,而新生儿获得性脑损伤治疗,特别是新生儿缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)^[1]的治疗尚无有效治疗方案。高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)用于治疗新生儿 HIE 已有多年的历史,但由于缺乏科学的理论依据,其临床应用受到很大限制。近来我们研究发现 HBO 可以促进内源性神经干细

[收稿日期]2009-04-01; [修回日期]2009-05-04
[基金项目] 国家自然科学基金(30672240); 潍坊医学院博士启动基金(KB200802)。
[作者简介] 王晓莉,女,博士,副教授。现在潍坊医学院医学影像学系分子影像学研究中心,邮编 261042。
[通讯作者] 杨于嘉,男,教授,中南大学湘雅医院儿科,邮编:410008。

胞(neural stem cells, NSCs)的增殖^[2,3],这为 HBO 治疗 HIE 的应用提供了理论依据。但这些增殖的 NSCs 是否可以存活并迁移到脑损伤区,分化为成熟的神经元,从而修复损伤的脑组织,目前尚不清楚。本研究采用共聚焦显微镜动态观察 HBO 治疗后不同时间点侧脑室室管膜下区(subventricular zone, SVZ)和大脑皮层 NSCs 的迁移与分化,以期为 HBO 治疗缺氧缺血性脑损伤(HIBD)的临床应用提供更多的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验分组及模型制作

健康 7 日龄 Sprague-Dawley 新生大鼠 90 只,雌雄不限,体重为 12.1 ~ 15.5 g,随机分为 3 组:①正常对照组(对照组);②模型组;③HBO 治疗组。各组又根据 HBO 治疗后的时间(治疗后 7 d,14 d,28 d)随机分为 3 个亚组($n = 10$)。采用 Rice-Vannucci 经典方法^[4]制成 HIBD 模型。简述之,乙醚吸入麻醉,分离并结扎左侧颈总动脉,剪断,将动物放入 8% (7% ~ 9%)低氧舱内缺氧 2 h。

1.2 HBO 治疗

氧舱型号 YLC 0.5/1A,中国船舶工业总公司 701 所制造。HIBD 后 3 h 内开始给予 HBO 治疗。每日 1 次,连续 7 d。步骤如下:洗舱 15 min,用纯氧,流量 10 L/min,使舱内氧浓度达到 70% 以上;增压,氧流量 3.5 L/min 左右,在 20 ~ 30 min 内使压力升至 2 ATA(0.1 mPa);稳压 60 min,舱内氧浓度要求达到 90% 以上;减压,在 20 ~ 30 min 内将舱内压力降至与舱外一致。

1.3 BrdU 标记与标本的制备

各组大鼠在 HBO 治疗前 24 h 开始腹腔注射 5-溴-2-脱氧尿苷(5-bromodeoxyuridine, BrdU, 每次 50 mg/kg, Sigma 公司),每日 2 次,连续 6 d^[5,6]。各组分别在 HBO 治疗后 7,14,28 d 腹腔麻醉,左心灌注后,断头取脑,4% 多聚甲醛后固定过夜,常规方法制成 4 μ m 的石蜡切片。

1.4 脑组织 BrdU/DCX, BrdU/ β -tubulin, BrdU/GFAP 及 BrdU/ O_4 免疫荧光双标

石蜡切片脱蜡,微波修复抗原,加入 2 M HCL 37 $^{\circ}$ C,30 min。0.04% 胃蛋白酶室温下 6 min,行 DNA 变性后,5% BSA 血清封闭 1 h,分别加入抗体 BrdU (1:200, Santa Cruz, USA),DCX (doublecortin, 1:200, CST)或 β -tubulin (1:50, CST),GFAP (1:100, 北京中杉生物试剂有限公司), O_4 (1:100,

chemicon),4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。0.01 M PBS 冲洗,滴加 TRITC 标记的山羊抗大鼠 IgG (1:100,北京中杉试剂公司)和 FITC 标记的山羊抗兔 IgG (1:100,北京中杉试剂公司),37 $^{\circ}$ C 避光孵育 60 min,冲洗后滴加缓冲甘油封片,激光扫描共聚焦显微镜下 (LSM 510, Zeiss)观察,每只大鼠取 4 ~ 5 非连续的脑片计数。

1.5 细胞计数

用计算机图像分析系统软件 (image tool version 1.0) 计数 SVZ 区与大脑皮层 HBO 治疗后 7,14,28 d BrdU⁺DCX⁺细胞数及 HBO 治疗后 28 d 大脑皮层 BrdU⁺ β -tubulin⁺,BrdU⁺GFAP⁺及 BrdU⁺ O_4 ⁺细胞数。

1.6 统计学分析方法

所有计量数据用均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,全部资料应用 SPSS 11.5 软件与 Excel 7.0 软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 不同时间点各组左侧脑室 SVZ 区与大脑皮层 BrdU/DCX 免疫荧光双标结果

HBO 治疗后 7 d,各组左侧脑室 SVZ 区均可见 BrdU⁺DCX⁺细胞,主要位于背外侧角,HBO 组 BrdU⁺DCX⁺细胞密集(84 ± 21 个/ mm^2),明显高于对照组(39 ± 14 个/ mm^2)与模型组(68 ± 17 个/ mm^2) ($P < 0.05$),并沿胼胝体腹侧形成长尾状 BrdU⁺DCX⁺细胞链,见图 1,图 4 上排。HBO 治疗后 14 d,各组左侧 SVZ 区 BrdU⁺DCX⁺数减少,HBO 治疗组仍多于对照组 ($P < 0.05$,图 1),同时 HBO 组大脑皮层出现较多 BrdU⁺DCX⁺ (25 ± 9 个/ mm^2),明显高于对照组 (7 ± 4 个/ mm^2) 与模型组 (9 ± 6 个/ mm^2 , $P < 0.01$),见图 2、图 4 中排。HBO 治疗后 28 d,各组左侧 SVZ 区与大脑皮层仍可见 BrdU⁺DCX⁺细胞,但数量开始减少,差别均无显著性,见图 1、图 2。

2.2 BrdU/ β -tubulin, BrdU/GFAP, BrdU/ O_4 免疫荧光双标结果

HBO 治疗后 28 d,各组左侧大脑皮层开始出现 BrdU⁺ β -tubulin⁺,BrdU⁺GFAP⁺,BrdU⁺ O_4 ⁺细胞,远早于成年大鼠损伤后新生神经元出现的时间。HBO 组 BrdU⁺ β -tubulin⁺细胞数 (22 ± 4 个/ mm^2) 显著多于对照组 (5 ± 2 个/ mm^2) 与模型组 (7 ± 3 个/ mm^2) ($P < 0.01$),BrdU⁺GFAP⁺细胞数明显多于对照组 ($P < 0.05$),BrdU⁺ O_4 ⁺细胞数显著多于对照组与模型组 ($P < 0.05$),见图 3,图 4 下排。

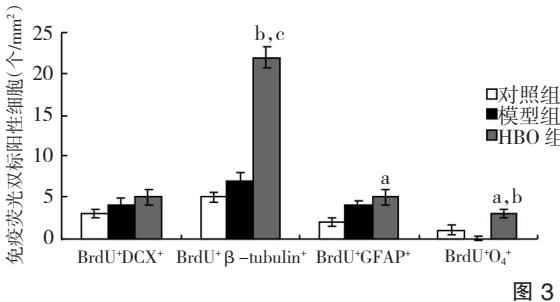
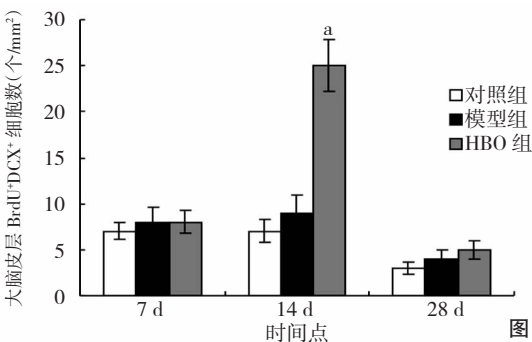
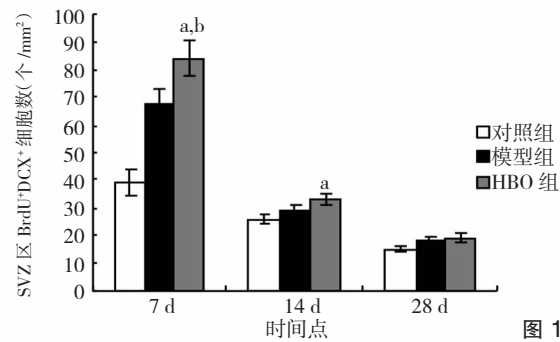


图1 各组不同时间点 SVZ 区 BrdU⁺DCX⁺ 细胞数比较 HBO 治疗后 7 d,HBO 组 BrdU⁺DCX⁺ 细胞数最多,HBO 治疗后 14 d,HBO 组 BrdU⁺DCX⁺ 细胞数减少,仍多于对照组。a:与对照组相比,b:与模型组相比, $P < 0.05$ 。

图2 各组不同时间点大脑皮层 BrdU⁺DCX⁺ 细胞数比较 HBO 治疗后 14 d,HBO 组大脑皮层 BrdU⁺DCX⁺ 细胞数最多。a:与对照和模型组相比, $P < 0.01$ 。

图3 HBO 治疗后 28 d 各组大脑皮层免疫荧光双标结果比较 HBO 治疗后 28 d,各组 BrdU⁺DCX⁺ 细胞数减少,开始出现 BrdU⁺β-tubulin⁺ 细胞、BrdU⁺GFAP⁺ 细胞及 BrdU⁺O₄⁺ 细胞,其中,HBO 组 BrdU⁺β-tubulin⁺ 细胞数、BrdU⁺O₄⁺ 细胞数最多。a:与对照组相比, $P < 0.05$;b:与模型组相比, $P < 0.01$;c:与对照组相比, $P < 0.01$ 。

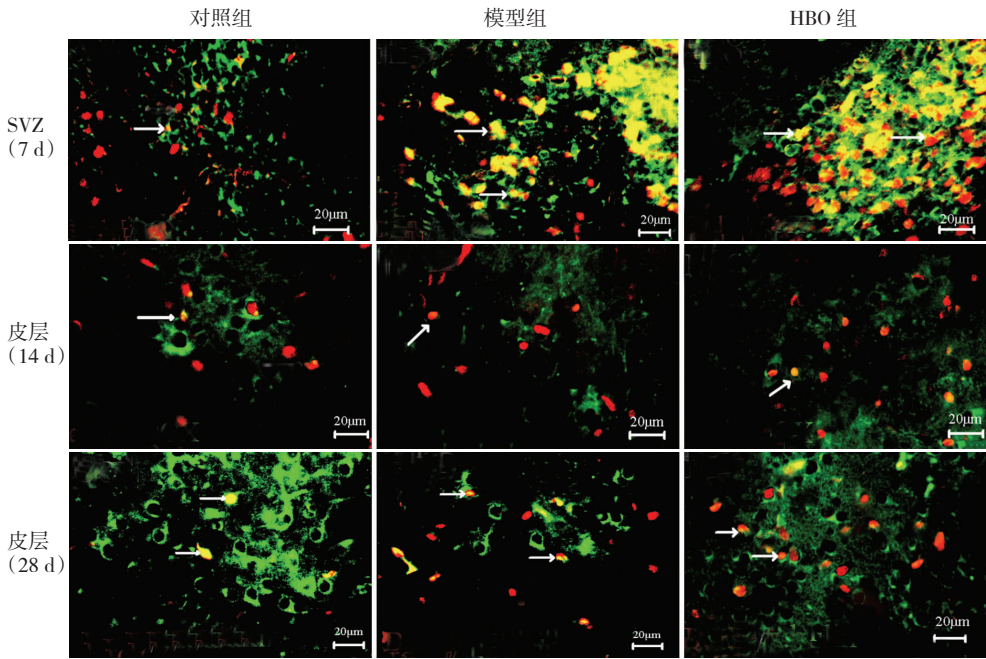


图4 HBO 治疗后大脑 SVZ 和皮层区免疫荧光双标染色共聚焦显微镜照片 上排照片示 HBO 治疗后 7 d 时 SVZ 区 BrdU/DCX 阳性细胞(箭头所指)。BrdU 标记增殖细胞,细胞核呈红色;DCX 标记迁移的未成熟神经元,胞浆呈绿色。可见 BrdU/DCX 阳性细胞 HBO 组最多,其次为模型组,对照组最少。中排照片示 HBO 治疗后 14 d 时皮层 BrdU/DCX 阳性细胞(箭头所指),HBO 组最多,其次为模型组,对照组最少。下排照片示 HBO 治疗后 28 d 时皮层 BrdU/β-tubulin 阳性细胞(箭头所指),β-tubulin 标记阳性细胞胞浆呈绿色。可见 BrdU/β-tubulin 阳性细胞 HBO 组最多,其次为模型组,对照组最少。

3 讨论

BrdU 是一种胸腺嘧啶脱氧核苷类似物,在细胞增殖周期的 S 期嵌入细胞核的 DNA,因而 BrdU 表

达阳性细胞被看作是具有增殖活性的细胞^[7]。由于 BrdU 随着增殖细胞的分裂而进入新的细胞,故也常用来标记新增生的细胞^[8]。DCX 是未成熟神经元或神经前体细胞的标记物,随着 NSCs 的迁移与分化而在相应的脑区表达,故应用 BrdU/DCX 双

标记可显示新生成的迁移的未成熟神经元^[9,10]。在正常发育过程中,迁移的神经元沿喙侧迁移流迁移到嗅球,而在外伤、缺血等状态下,内源性神经元前体细胞在SVZ区大量产生,以类似“链式”迁移的方式迁移到缺血灶,并具有与死亡神经元相类似的形态特征,具体迁移的机制可能与损伤部位的微环境信号有关^[11]。该研究中发现HBO治疗后7 d,HBO组损伤侧SVZ区BrdU⁺DCX⁺细胞较多,显著多于模型组及对照组;HBO治疗后14 d,HBO组损伤侧SVZ区BrdU⁺DCX⁺细胞减少,同时在大脑皮层发现BrdU⁺DCX⁺细胞,显著高于对照组与模型组,说明增殖的NSCs于HBO治疗后14 d,开始向大脑皮层迁移并开始向神经元分化,提示HBO治疗可以促进增殖的NSCs迁移到损伤侧大脑皮层并向神经元分化。

HBO治疗后,内源性NSCs增殖并迁移到大脑皮层,但这些新生的神经元前体细胞是否可以分化为成熟的神经元?有研究发现,脑损伤后新迁移的细胞仅少部分得以存活,大部分未来得及分化即已死亡,即选择性存活,其具体机制可能是新生神经细胞的存活与一些细胞因子或神经营养因子,如脑源性神经营养因子、类固醇激素等及一些信号通路,如Wnt/ β -catenin信号通路等有关^[12]。HBO能否提供这些细胞因子或激活其他信号途径促进内源性NSCs分化为成熟的神经细胞,对此我们进行了深入的研究。 β -tubulin是成熟神经元的标记物,GFAP是星形神经胶质细胞的标记物,O₄见于增殖的少突胶质细胞,是未成熟的少突胶质细胞的标记物,BrdU用来标记新生成的细胞,故BrdU/ β -tubulin,BrdU/GFAP,BrdU/O₄分别用来标记新生成的成熟神经元、星形胶质细胞及少突胶质细胞^[13]。研究发现,HBO治疗后28 d HBO组损伤侧大脑皮层BrdU⁺DCX⁺细胞减少,并出现一些新增生的成熟神经元及少突胶质细胞,远高于模型组及对照组,说明HBO可以促进增殖的NSCs分化为成熟的神经元、星形胶质细胞及少突胶质细胞,其中以神经元为主。这些新增生的神经元是否可以形成突触,从而与周围神经系统形成新的神经网络,正在进一步验证过程中。

[参 考 文 献]

[1] Verklan MT. The chilling details: hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. J Perinat Neonatal Nurs, 2009, 23(1):59-68.

[2] 余小河, 杨于嘉, 王霞, 王庆红, 谢岷, 祁伯祥, 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.

[3] 王晓莉, 杨于嘉, 王庆红, 谢岷, 余小河, 刘沉涛, 等. 高压氧促HIBD新生大鼠内源性神经干细胞增殖过程中Wnt-3蛋白的变化[J]. 中国当代儿科杂志, 2007, 9(3):241-246.

[4] Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat[J]. Ann Neurol, 1981, 9(4):131-141.

[5] Sugiura S, Kitagawa K, Tanaka S, Todo K, Omura-Matsuoka E, Sasaki T, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor enhances neurogenesis and angiogenesis after focal cerebral ischemia in rats[J]. Stroke, 2005, 36(4):859-864.

[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] Ma YP, Ma MM, Cheng SM, Ma HH, Yi XM, Xu GL, et al. Intranasal bFGF-induced progenitor cell proliferation and neuroprotection after transient focal cerebral ischemia[J]. Neurosci Lett, 2008, 437(2):93-97.

[8] Ma M, Ma Y, Yi X, Guo R, Zhu W, Fan X, et al. Intranasal delivery of transforming growth factor-beta1 in mice after stroke reduces infarct volume and increases neurogenesis in the subventricular zone[J]. BMC Neurosci, 2008, 9:117.

[9] Lee JH, Shin HK, Park SY, Kim CD, Lee WS, Hong KW. Cilostazol preserves CA1 hippocampus and enhances generation of immature neuroblasts in dentate gyrus after transient forebrain ischemia in rats[J]. Exp Neurol, 2009, 215(1):87-94.

[10] Peng J, Xie L, Jin K, Greenberg DA, Andersen JK. Fibroblast growth factor 2 enhances striatal and nigral neurogenesis in the acute 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetra-hydropyridine model of Parkinson's disease[J]. Neuroscience, 2008, 153(3):664-670.

[11] Imitola J, Raddassi K, Park KI, Mueller FJ, Nieto M, Teng YD, et al. Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1alpha/CXC chemokine receptor 4 pathway[J]. Proc Natl Acad Sci, 2004, 101(52):18117-18122.

[12] Hayashi T, Iwai M, Ikeda T, Jin G, Deguchi K, Nagotani S, et al. Neural precursor cells division and migration in neonatal rat brain after ischemic/hypoxic injury[J]. Brain Res, 2005, 1038(1):41-49.

[13] Ye M, Wang XJ, Zhang YH, Lu GQ, Liang L, Xu JY, et al. Therapeutic effects of differentiated bone marrow stromal cell transplantation on rat models of Parkinson's disease[J]. Parkinsonism Relat Disord, 2007, 13(1):44-49.

(本文编辑:徐福兰)