

· 实验研究 ·

高压氧对移植的外源性人神经干细胞体内神经元分化的影响

白洁<sup>1</sup>, 栾佐<sup>2</sup>, 周丛乐<sup>1</sup>, 屈素清<sup>2</sup>, 姜毅<sup>1</sup>, 汪兆艳<sup>2</sup>

(1. 北京大学第一医院儿科, 北京 100034; 2. 海军总医院儿科, 北京 100037)

[摘要] 目的 观察缺氧缺血性脑损伤(HIBD)新生大鼠移植人神经干细胞(hNSCs)后高压氧(HBO)对外源性hNSCs体内神经元分化的影响。方法 新生7d的SD大鼠HIBD模型制作后3d经脑室移植hNSCs,并分成移植组( $n=8$ )和移植+HBO组( $n=8$ )。移植+HBO组于移植后1h进行HBO治疗,每日1次,10d后断头取脑,应用免疫荧光方法检测植入细胞在皮层、海马神经元分化情况。结果 移植后10d,植入细胞分化形成神经元,分布以海马、皮层为主。统计学结果表明,在皮层,两组分化的神经元计数差异无显著性( $P>0.05$ );而在海马区,移植+HBO组神经元分化存活的数量较单纯移植组多,差异有显著性( $P<0.05$ )。结论 HIBD新生大鼠移植hNSCs后HBO促进海马区外源性hNSC向神经元的分化。 [中国当代儿科杂志,2008,10(2):195-198]

[关键词] 神经干细胞移植;高压氧;缺氧缺血性脑损伤;大鼠,新生

[中图分类号] R-33 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2008)02-0195-04

Effect of hyperbaric oxygenation on the differentiation of implanted human neural stem cells into neurons *in vivo*

BAI Jie, LUAN Zuo, ZHOU Cong-Le, QU Su-Qing, JIANG Yi, WANG Zhao-Yan. Department of Pediatrics, First Hospital of Peking University, Beijing 100034, China (Luan Z, Email: luanzuo@yahoo.com.cn)

**Abstract: Objective** To study the effect of hyperbaric oxygenation (HBO) on the differentiation of the implanted human neural stem cells (hNSCs) into neurons in neonatal rats following hypoxic-ischemic brain damage (HIBD). **Methods** HIBD model was prepared by ligation of the left common carotid artery, followed by 8% hypoxia exposure in 7-day-old Sprague-Dawley rat pups. Three days later, the rats received implantation of hNSCs into the left cerebral ventricles. Then the survived rats were randomly divided into two groups: transplantation alone and transplantation + HBO ( $n=8$  each). HBO treatment was administered (1.8 ATA, 1 hr once daily for 10 days) in the transplantation + HBO group 1 hr after hNSCs transplantation. Brains were removed 10 days after transplantation. Frozen coronal sections were prepared for immunofluorescence analysis to detect the neural differentiation of the transplanted cells in the cerebral cortex and hippocampus. **Results** Differentiated neurons of implanted cells distributed mainly in the cortex and the hippocampus of the injured side. There was no difference in the number of neurons in the cortex between the two groups, while the number of neurons in the hippocampus significantly increased in the transplantation + HBO group compared with that in the transplantation alone group ( $231.4 \pm 15.1$  vs  $162.6 \pm 5.6$ ;  $P<0.05$ ). **Conclusions** HBO treatment may promote the differentiation of implanted hNSCs into neurons in the hippocampus of neonatal rats following HIBD.

[Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10 (2):195-198]

**Key words:** Neural stem cells transplantation; Hyperbaric oxygenation; Hypoxia-ischemia brain damage; Neonatal rats

国内外研究证实高压氧(hyperbaric oxygenation, HBO)和神经干细胞(neural stem cells, NSCs)移植治疗新生动物缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)均具有一定疗效<sup>[1-3]</sup>。HBO可减少缺氧缺血后内源性NSCs的死亡<sup>[4]</sup>,而HBO治疗对移植的外源性人神经干细胞(human neural stem cells, hNSCs)的影响还未见报道。为此,本研究的目的是在较为合理的实验参数下,通过HBO辅助hNSCs移植治疗,观察比较移植后HBO

治疗对HIBD新生鼠脑内植入NSCs向神经元分化的影响。探讨HBO对移植的hNSCs在体内的分化可能产生的作用及其意义。

1 材料与方法

1.1 试剂与设备

一抗:特异性单克隆小鼠抗-人神经丝蛋白(neurofilament, NF70)<sup>[5]</sup>(Chemicon公司)稀释比

[收稿日期]2007-06-21;[修回日期]2007-08-01  
[作者简介]白洁,女,博士,医师。主攻方向:新生儿疾病。  
[通讯作者]栾佐,教授,北京海军总医院儿科,邮编:100037。

例1:100;多克隆兔抗-人巢蛋白 Nestin(稀释比例1:80,北京中杉金桥生物技术有限公司。

二抗:山羊抗小鼠 IgG-TRITC 稀释比例1:100;山羊抗兔 IgG-FITC(中杉金桥生物技术有限公司)。

江湾 I 型 C 立体定向仪;上海医用激光仪器厂 5  $\mu$ L 微量进样器;DWC150-300 型透明纯氧动物实验舱(上海七零一所杨园医用氧舱制造厂);荧光显微镜 BX61(Olympus);Q Imaging Retiga-SRV 数字照相机;Image-Pro Plus 6.0(Media Cybernetic)专业图像处理软件。

1.2 hNSCs 的制备与鉴定

经医院伦理委员会授权,孕妇知情同意下留取孕12周流产的人胎儿脑组织,在无菌条件下培养扩增并制备成 hNSCs 单细胞悬液,细胞悬液浓度为  $2 \times 10^4$ /mL。同时取样,以 Nestin - FITC 免疫荧光标记鉴定培养所获得的细胞具有 NSCs 特性。

1.3 HIBD 模型制作

新生第7天的 Sprague-Dawley (SD)大鼠20只(带母鼠)购自北京维通利华实验动物技术有限公司,清洁级,体重14~17 g,雌雄不限。HIBD 模型制作:首先以6%的水合氯醛(30 mg/kg)腹腔麻醉,颈部正中切口约1~2 cm,分离并结扎左颈总动脉,恢复2~4 h后,放入含8%氧气、92%氮气的容器中通气2.5 h,用水浴箱控制周围温度在34~35℃,待鼠苏醒后送回母鼠处。模型制作过程共死亡3只新生鼠。将存活动物随机分为移植+HBO组( $n=9$ )、移植组( $n=8$ )。

1.4 hNSCs 移植

两组动物在模型制作后第3天行 hNSCs 移植,准备移植的幼鼠(生后第10天,体重20~24 g)予6%水合氯醛腹腔麻醉后固定在立体定向仪上,头部常规被皮消毒,头皮正中切口,暴露较软颅骨,用注射针头在移植位点处轻轻剥离少许颅骨,以前囟为参照,选择前囟后(AP)=-1 mm,中线左侧(ML)=-1.5 mm,皮层向下垂直深度(DV)=-4.0 mm 为靶点,将制备好的 hNSCs(细胞浓度为  $2 \times 10^4$ / $\mu$ L)悬液5  $\mu$ L 匀速缓慢注入左侧(损伤侧)侧脑室。从针刺入颅骨有突破感开始计算注射时间约10 min,注射后留针5 min,然后缓慢退出,头皮缝合后送回母鼠处。移植前后动物未予免疫抑制剂。移植过程中移植+HBO组有1只新生鼠因麻醉死亡。

1.5 HBO 治疗

移植+HBO组动物在移植后1 h被放入高压氧舱内,给予HBO通气。开启进出气体阀门,并缓慢控制压力变化。升压及降压过程各15 min,达到压力

为1.8个绝对大气压(atmospheres absolute, ATA),缓慢关闭排气阀门,调整进气氧流量,保持压力不变。稳压60 min,每日1次连续10 d。HBO 通气过程顺利,没有动物死亡。

1.6 组织切片制备及免疫荧光

HBO 治疗10 d后(即移植后10 d),实验动物6%水合氯醛腹腔麻醉后,经常温生理盐水、预冷的4%多聚甲醛经心脏灌注后取脑,从嗅球根部后6 mm处(前囟后约1 mm)开始截取约6 mm长度的脑块,以包含以整个海马及部分脑室系统、额叶、顶叶、枕叶、颞叶皮层结构。将脑块先后放入4%多聚甲醛灌注液、30%蔗糖液中浸泡24 h和72 h后取出,经液氮冰冻后放入-80℃冰箱中保存待用。冰冻切片片厚25  $\mu$ m,每隔3张留取一张,用于免疫荧光法对植入细胞分化的神经元进行检测。

免疫荧光具体步骤:切片取出后室温下放置30 min,冰丙酮(4℃)固定30 min,PBS 冲洗10 min  $\times$ 3次,5%山羊血清封闭30 min,加入一抗后放入4℃冰箱过夜(反应20 h以上),PBS 冲洗5 min  $\times$ 3次,加入二抗室温下暗室中反应2.5 h,PBS 冲洗5 min  $\times$ 3次,90%甘油封片。阴性对照实验以抗体稀释液代替一抗。各抗体其稀释比例如前所述。在荧光显微镜下观察,植入细胞分化形成的神经元(经特异性抗-人 NF 及山羊抗小鼠 IgG-TRITC 标记)胞浆呈红色。

1.7 图像分析及细胞计数

从每组每只动物相应切片中随机抽取10张片子,荧光显微镜 $\times$ 20倍物镜视野下按“Z”字走向分别记录脑片中整个海马(包括CA1区、CA2区、CA3区、齿状回等)及皮层NF阳性细胞数,以比较两组分化的神经元在不同部位的存活情况。用专业的图像处理及计数软件<sup>[6]</sup>统计每组每张脑片中上述区域的阳性细胞平均数并进行统计学分析,结果以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )的形式表示。计量资料统计用 *t* 检验,以 SPSS10.0 软件行统计学处理。

2 结果

hNSCs 在植入脑室后10 d,可检测到NF标记阳性的神经元已具有较为成熟的细胞形态,形成较远距离的轴突投射(图1),其分布范围以室管膜下区(subventricular zone,SVZ)、脑室旁、海马、皮层及丘脑为主。皮层部位两组植入 hNSCs 分化的神经元数量上差异无显著性( $P>0.05$ ),细胞形态与宿主内源性细胞相似,如分化形成锥体细胞,排列上亦

无明显差别。但在海马各区,移植 + HBO 组神经元与宿主很好地整合,分化存活数量较单纯移植组多,差异有显著性( $P < 0.05$ ;表 1,图 2)。

| 表 1 两组植入 hNSCs 海马、皮层区神经元分化计量比较 |                               |                   |
|--------------------------------|-------------------------------|-------------------|
| (n = 8, $\bar{x} \pm s$ )      |                               |                   |
| 分组                             | 海马                            | 皮层                |
| 移植 + HBO 组                     | 231.4 $\pm$ 15.1 <sup>a</sup> | 676.2 $\pm$ 128.8 |
| 移植组                            | 162.6 $\pm$ 5.6               | 665.4 $\pm$ 66.4  |

a: 与皮层分化神经比较;  $t = -9.527, P < 0.01$

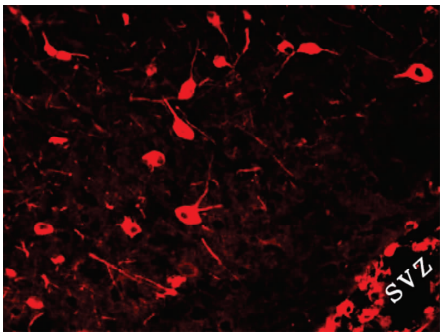


图 1 移植后 10 d,在 SVZ 及其周围可见 nNSCs 分化来的神经元 (NF 单标  $\times 20$ )

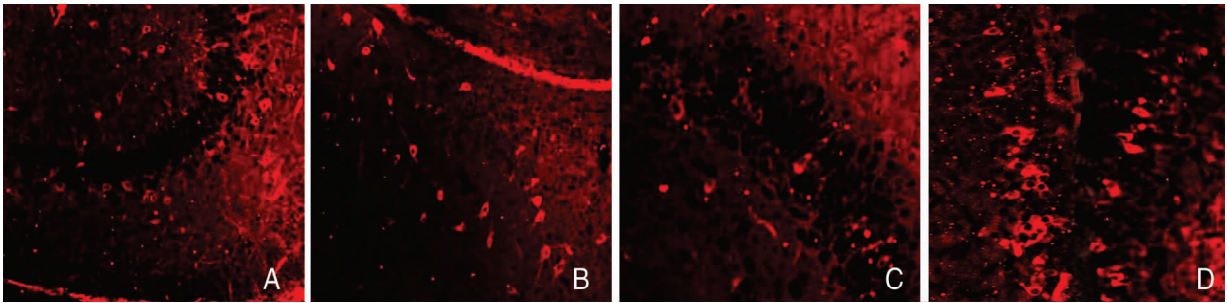


图 2 海马各区神经元表达 (NF 单标  $\times 20$ ) 移植后 10 d,两组在海马可见分化来的神经元,神经元分化存在数量,移植 + HBO 组明显多于移植组。A: 移植 + HBO 组 CA3 区;B: 移植组 CA3 区;C: 移植 + HBO 组齿状回;D: 移植 + HBO 组 CA1 区。

3 讨论

近年来,国内外学者对 NSCs 及其应用进行了广泛和深入的研究<sup>[7]</sup>,干细胞治疗是治疗围生期 HIBD、创伤及毒性脑损伤神经后遗症非常有希望的方法<sup>[8]</sup>。但目前的焦点问题是如何进一步采取措施改善移植效果。

尽管移植相关技术和方法已做了很多探索 and 改良<sup>[9]</sup>,神经保护药物的应用如神经营养因子、抗氧化自由基、钙通道拮抗剂等亦被证明可以显著提高植入细胞存活率<sup>[10]</sup>,保护细胞减少死亡,但仍未发展成为临床可选择的治疗策略,且尚不能实现对植入细胞的体内分化进行调控。HBO 治疗可以减少缺氧缺血所诱发的细胞凋亡<sup>[11]</sup>,减轻脑水肿<sup>[2]</sup>;此外,HBO 还可上调缺血后脑组织细胞因子神经营养因子 (neurotrophin, NT-3) 及碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 的表达<sup>[12, 13]</sup>,因而推测可进一步影响细胞周围微环境而激活内外源性 NSCs 的增殖和分化。有学者<sup>[4]</sup>在研究 HBO 对新生大鼠 HIBD 模型保护作用的机制时发现, HIBD 后 3 周,通过检测生发区 BrdU (5-溴脱氧核苷) 阳性细胞和 Nestin 的表达证明 HBO 对 HIBD 新生大鼠的神经保护作用可能是通过减少缺氧缺血后

生发区内源性 NSCs 的死亡而起到的。为此,本研究提出采用 HBO 治疗辅助 hNSCs 移植,以探索 HBO 对植入的外源性 hNSCs 可能产生的影响及其可能的神经保护作用。

在实验方案设计时,考虑到关于对 HBO 治疗 HIBD 效果的争议,原因之一可能与研究者应用 HBO 的实验条件等不同有关。一些实验显示<sup>[2]</sup>如果给氧压力过高或持续时间过长就有可能产生中枢神经系统毒性或氧毒性,产生氧自由基,使脂质过氧化产物增加,酶的抗氧化作用发生改变,进而造成细胞死亡。有文献提出<sup>[14]</sup> HBO 条件过高,会减少脑血流、甚至导致惊厥,而通常在这些情况中应用氧压力都超过 3 ~ 4 ATA 并且将动物反复暴露于氧气中。因此,应在合理的实验条件 (如给氧压力、时间等) 下应用 HBO 以减少氧自由基的生成,避免氧化应激反应。本实验应用 HBO 辅助 hNSCs 移植,结合了国内有关 HBO 治疗新生动物实验研究设计及儿童临床治疗实施 HBO 多采用的治疗方案<sup>[3, 4, 15, 16]</sup>,即稳压控制在 1.4 ~ 2 ATA,通气时间为 1 ~ 2 h/d,疗程为 7 ~ 10 d,并最终采用 HBO 通气稳压在 1.8 ATA,通气时间 1 h/d,疗程为 10 d 的治疗方案。而在治疗时间窗的选择上,本研究进行 HBO 治疗选择在移植后 1 h 实施。其原因为:既往神经移植研究发现,移植的胚胎多巴胺神经元在移植后 90% 以

上会死亡,多数神经元在移植前和移植后1周即死亡。为此,本试验采用移植后早期进行HBO治疗旨在发挥HBO可能的神经保护作用以减少移植细胞凋亡。

实验证实,HBO治疗可减轻内源性神经元损伤的进展,减少内源性神经细胞的凋亡<sup>[2]</sup>,减轻新生大鼠HIBD。本实验结果显示:将体外培养的人胎脑来源的hNSCs移植至缺氧缺血性损伤的新生鼠脑后在HBO辅助治疗作用下,海马区神经元分化存活数量较单纯移植组多。结合文献报道<sup>[4]</sup>的HBO可减少HIBD后海马齿状回区内源性NSCs的死亡,我们推测这一结果可能与HBO对缺氧缺血性脑损伤后内环境的调节,上调细胞因子NT-3及bFGF并有助于NSCs向神经元分化的作用有关。

本研究未发现两组细胞在皮层神经元的分化情况存在差异。

本实验在移植前后未予免疫抑制剂治疗,从是否应用免疫抑制剂对植入细胞的影响来看,有研究表明将人来源的NSCs植入新生鼠脑中,移植后1年余时间未应用免疫抑制剂环孢素,但并未监测到免疫排斥反应的发生或肿瘤的形成,且移植细胞在宿主体内长期存活,其原因可能与NSCs较少表达MHC等免疫原性分子有关<sup>[17]</sup>。但仍不排除因慢性排斥反应导致晚期细胞存活率的下降<sup>[5]</sup>。实验表明<sup>[1]</sup>,将人来源的NSCs植入脑损伤后的新生鼠模型中,未应用免疫抑制剂,移植细胞可以存活并分化成神经元及胶质细胞,但远期疗效还需实验进一步观察。同样有学者也支持这种观点,认为这种免疫耐受并非绝对,在一部分移植动物中仍可见到远期排斥反应的发生。国内也有学者<sup>[7]</sup>研究指出移植后1~2周移植细胞可迁移至损伤区并增殖分化,移植后4周植入细胞则明显减少,推测后期发生免疫排斥的可能性大。本试验因观察时间为移植后10 d,故未应用免疫抑制剂,实验动物中未发现肿瘤形成。

众多研究显示HBO治疗新生儿HIBD有效<sup>[15,16,18]</sup>。本研究显示HIBD新生大鼠移植hNSCs后HBO促进海马区外源性hNSCs向神经元的分化,为临床HBO辅助及联合神经干细胞移植治疗新生儿HIBD提供了一定的实验室依据。

【参 考 文 献】

[1] Mueller D, Shambloott MJ, Fox HE, Gearhart JD, Martin LJ. Transplanted human embryonic germ cell-derived neural stem cells replace neurons and oligodendrocytes in the forebrain of neonatal mice with excitotoxic brain damage [J]. J Neurosci Res,

2005, 82(5): 592-608.

[2] Calvert JW, Yin W, Patel M, Badr A, Mychaskiw G, Parent AD, et al. Hyperbaric oxygenation prevented brain injury induced by hypoxia-ischemia in a neonatal rat model [J]. Brain Res, 2002, 951(1): 1-8.

[3] 刘玲, 杨于嘉, 文秋生, 王鸿娟, 王多德. 高压氧治疗对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤模型的保护作用[J]. 实用儿科临床杂志, 2005, 20(6): 531-532.

[4] 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.

[5] Englund U, Fricker-Gates RA, Lundberg C, Bjorklund A, Wictorin K. Transplantation of human neural progenitor cells into the neonatal rat brain: extensive migration and differentiation with long-distance axonal projections [J]. Exp Neurol, 2002, 173(1): 1-21.

[6] Jeong SW, Chu K, Jung KH, Kim SU, Kim M, Roh JK. Human neural stem cell transplantation promotes functional recovery in rats with experimental intracerebral hemorrhage [J]. Stroke, 2003, 34(9): 2258-2263.

[7] 屈素清, 栾佐, 尹国才, 郭万里, 胡晓红, 吴南海, 等. 新生鼠缺氧缺血性脑损伤后经脑室神经干细胞移植的实验研究[J]. 中华儿科杂志, 2005, 43(8): 576-579.

[8] Kennea NL, Mehmet H. Perinatal applications of neural stem cells [J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2004, 18(6): 977-994.

[9] Messina DJ, Alder L, Tresco PA. Comparison of pure and mixed populations of human fetal-derived neural progenitors transplanted into intact adult rat brain [J]. Exp Neurol, 2003, 184(2): 816-829.

[10] Schumm MA, Castellanos DA, Frydel BR, Sagen J. Enhanced viability and neuronal differentiation of neural progenitors by chromaffin cell co-culture [J]. Brain Res Dev Brain Res, 2002, 137(2): 115-125.

[11] Calvert JW, Zhou C, Nanda A, Zhang JH. Effect of hyperbaric oxygen on apoptosis in neonatal hypoxia-ischemia rat model [J]. J Appl Physiol, 2003, 95(5): 2072-2080.

[12] Yang JT, Chang CN, Lee TH, Lin TN, Hsu JC, Hsu YH, et al. Hyperbaric oxygen treatment decreases post-ischemic neurotrophin-3 mRNA down-regulation in the rat hippocampus [J]. Neuroreport, 2001, 12(16): 3589-3592.

[13] 余海, 田润兰, 潘小雯, 栾佐, 宋连文. 高压氧治疗在神经修复与再生过程中的作用与分子学机制[J]. 现代康复, 2001, 5(3): 48-49.

[14] Yin D, Zhou C, Kusaka I, Calvert JW, Parent AD, Nanda A, et al. Inhibition of apoptosis by hyperbaric oxygen in a rat focal cerebral ischemic model [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2003, 23(7): 855-864.

[15] 姜红, 孙若鹏. 高压氧促进重度缺氧缺血性脑病新生儿智能康复的疗效观察[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2006, 28(1): 46-48.

[16] 刘于嫣, 尹华英, 崔文波, 朱明哲, 初丽娜, 于翠英. 高压氧治疗新生儿缺氧缺血性脑病远期疗效分析[J]. 中华航海医学与高气压医学杂志, 2004, 11(2): 87-90.

[17] Modo M, Stroemer RP, Tang E, Patel S, Hodges H. Effects of implantation site of stem cell grafts on behavioral recovery from stroke damage[J]. Stroke, 2002, 33(9): 2270-2278.

[18] 王秀娟, 刘建军, 尹莉, 王秀梅, 郎卓英, 庞志珍. 高压氧治疗新生儿缺氧缺血性脑病的近期效果及对预后的影响[J]. 中国当代儿科杂志, 2001, 3(3): 273-274.

(本文编辑:吉耕中)