

DOI:10.7499/j.issn.1008-8830.2013.09.016

论著·实验研究

脐血单个核细胞移植对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠促红细胞生成素蛋白及少突胶质祖细胞的影响

季加芬¹ 张金萍³ 王晓莉² 牟青杰⁴ 范蒙蒙¹ 陈玉玺²

(潍坊医学院临床学院 1. 儿科; 4. 血液科, 山东 潍坊 261031;

2. 潍坊医学院医学影像学系, 山东 潍坊 261053;

3. 寒亭区固堤街道泊子卫生院, 山东 潍坊 261107)

[摘要] 目的 探讨脐血单个核细胞(UCBMC)移植对缺氧缺血性脑损伤(HIBD)新生大鼠脑促红细胞生成素(EPO)蛋白及少突胶质祖细胞的影响。方法 7日龄健康 Sprague-Dawley 新生大鼠40只随机分为正常对照组、HI组、UCBMC对照组和HI+UCBMC组,每组10只。采用经典 Rice 法制成 HIBD 模型,造模24 h后,正常对照组和 HI 组经侧脑室注入 2 μ L PBS, UCBMC 对照组和 HI+UCBMC 组经侧脑室注入 3×10^6 UCBMC。移植后7d,采用 EPO/DAPI 与 NG2/DAPI 免疫荧光双标法观察损伤侧室管膜下区(SVZ) EPO 蛋白及少突胶质祖细胞的变化,并进行相关性分析。结果 移植后7d, HI+UCBMC 组 NG2⁺DAPI⁺ 及 EPO⁺DAPI⁺ 细胞数均显著高于 UCBMC 对照组(均 $P < 0.05$)、HI 组及正常对照组(均 $P < 0.01$), UCBMC 对照组 NG2⁺DAPI⁺ 及 EPO⁺DAPI⁺ 细胞数均显著高于正常对照组和 HI 组(均 $P < 0.01$), 正常对照组 NG2⁺DAPI⁺ 细胞数显著高于 HI 组($P < 0.01$)。HI+UCBMC 组 NG2⁺DAPI⁺ 细胞数与 EPO⁺DAPI⁺ 细胞数呈正相关($r=0.898$)及直线回归($\beta=1.4604$, $P < 0.01$)。结论 UCBMC 可促进 HIBD 新生大鼠少突胶质祖细胞的表达,其机制与 EPO 蛋白的表达增加相关,从而修复脑白质损伤。
[中国当代儿科杂志, 2013, 15(9): 775-778]

[关键词] 脐血单个核细胞; 缺氧缺血性脑损伤; 促红细胞生成素; 少突胶质祖细胞; 新生大鼠

Effects of umbilical cord blood monocytes transplantation on EPO protein and oligodendrocyte progenitors in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage

Ji Jia-Fen, ZHANG Jin-Ping, WANG Xiao-Li, MU Qing-Jie, FAN Meng-Meng, CHEN Yu-Xi. Department of Pediatrics, Clinical college, Weifang Medical University, Weifang, Shandong 261031, China (Wang X-L, Email: wxlpine@163.com)

Abstract: Objective To study the effects of umbilical cord blood monocytes (UCBMC) transplantation on erythropoietin (EPO) protein and oligodendrocyte progenitor cells in hypoxia-ischemia (HI) neonatal rats. **Methods** Forty seven-day-old Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal control (N), HI, UCBMC and HI+UCBMC groups ($n=10$ each). Hypoxic-ischemic brain damage (HIBD) model was prepared according to the Rice method. Twenty-four hours after hypoxia, the N and HI groups were injected with 2 μ L phosphate buffered saline (PBS), and the UCBMC and HI+UCBMC groups were injected with 3×10^6 UCBMC via the lateral ventricle. EPO protein and oligodendrocyte progenitor cells in the subventricular zone of the injured brain were observed by EPO/DAPI and NG2/DAPI immunofluorescence double staining, and their correlation was analyzed. **Results** Seven days after transplantation, there were more NG2⁺DAPI⁺ and EPO⁺DAPI⁺ cells in the HI+UCBMC group than in the UCBMC ($P < 0.05$), N and HI groups ($P < 0.01$). More NG2⁺DAPI⁺ and EPO⁺DAPI⁺ cells were observed in the UCBMC group compared with the N and HI groups ($P < 0.01$). There were more NG2⁺DAPI⁺ cells in the N group than in the HI group ($P < 0.01$). The number of NG2⁺DAPI⁺ cells was correlated with the number of EPO⁺DAPI⁺ cells in the HI+UCBMC group ($r=0.898$, $\beta=1.4604$, $P < 0.01$). **Conclusions** UCBMC can promote expression of oligodendrocyte progenitor cells, which is correlated with an increase in EPO protein and thus repairs brain white matter damage in neonatal rats with HIBD.

[Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(9): 775-778]

Key words: Umbilical cord blood monocyte; Hypoxic-ischemic brain damage; Erythropoietin; Oligodendrocyte progenitor cell; Neonatal rats

[收稿日期] 2013-03-16; [修回日期] 2013-05-24

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81000268); 山东省自然科学基金项目(ZR2010HQ037); 山东省教育厅课题(J11LF72)。

[作者简介] 季加芬, 女, 硕士研究生, 讲师。

[通信作者] 王晓莉, 副教授。

新生儿缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)是新生儿科常见的疾病,可导致少突胶质细胞祖细胞凋亡、坏死^[1-2],常伴有脑白质损伤(white matter damage, WMD),出现髓鞘损害和轴突病变等病理学改变^[3],导致发育障碍、认知及行为异常等神经系统后遗症,但目前HIBD的治疗仍以对症支持治疗为主,尚缺乏行之有效的治疗方案。近年来脐血库及干细胞工程的兴起为HIBD的治疗带来了希望,近日研究发现脐血单个核细胞(umbilical cord blood monocytes, UCBMC)脑内移植可以减轻脑白质损伤^[4],并可促进其远期行为学与组织学的恢复^[5],但机制不清。有研究还发现促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)可抑制少突胶质祖细胞的凋亡^[6],并可促进少突胶质祖细胞的再生^[7],UCBMC能否促进EPO的表达,修复少突胶质祖细胞,从而减轻脑白质损伤,目前尚不清楚。故本研究观察分离UCBMC移植对EPO蛋白及少突胶质祖细胞的影响,并探讨二者的相关性,以期UCBMC的临床应用提供科学的理论依据。

1 资料与方法

1.1 动物分组及模型的建立

7日龄Sprague-Dawley新生大鼠(清洁级,购自山东中医药大学实验动物中心并授权使用),随机分为正常对照组(正常大鼠侧脑室注入2 μ L PBS)、HI组(HI后24 h, HIBD大鼠侧脑室注入2 μ L PBS)、UCBMC对照组(正常大鼠侧脑室注入 3×10^6 UCBMC)、HI+UCBMC组(HI后24 h, HIBD大鼠侧脑室注入 3×10^6 UCBMC),每组10只。采用经典的Rice法^[8]制成HIBD模型,即分离左侧颈总动脉,双线结扎并中间剪断,放入常压动物氧舱(DWY-II型,中国船舶重工集团公司第701研究所,武汉,中国)内,按一定比例输入氧气与氮气,测氧仪监测氧浓度在 $8\% \pm 0.1\%$,缺氧2 h,舱内温度控制在 $36 \pm 2^\circ\text{C}$ 。

1.2 脐血单个核细胞的采集与分离

无菌条件下穿刺脐静脉,肝素抗凝,收集脐血,加入0.01 mol/L PBS(pH 7.4)等体积稀释,离心管中先加入人单个核细胞分离液后,缓慢加入上稀释血,2 000 r/min离心20 min,吸取白膜界面层的单个核细胞。PBS缓冲液洗涤2次后弃上清,制成单个核细胞悬液,4%台盼蓝染色行细胞计数,活细胞数>95%,调整活细胞为 $1.5 \times 10^6/\mu\text{L}$,置冰上备用。

1.3 脐血单个核细胞侧脑室移植

造模后24 h, HI+UCBMC组及UCBMC对照组大鼠低温麻醉,固定于立体定位仪,移植位点:AP: -0.5 mm, ML: -2 mm, DV: -2 mm,穿刺针穿刺,回抽脑脊液,确定穿刺针进入侧脑室^[9-10]后,注入UCBMC悬液,共 3×10^6 个活细胞/2 μ L,缝合头皮,复温苏醒后回笼饲养;HI+PBS组及正常对照组于造模后24 h,采用上述相同方法注入等量PBS 2 μ L。

1.4 脑组织NG2/DAPI、EPO/DAPI免疫荧光双标染色

各组大鼠在移植后7 d行腹腔麻醉,4%多聚甲醛(用0.1 mol/L的PBS配制,pH值7.4)心脏灌注,断头取脑,前囟处以美蓝标记,取前囟后-1.0~-0.8 mm(前囟前1.0到前囟后0.8)脑组织,常规石蜡包埋,4 μ m冠状切片,每隔5片取1片,每个蜡块取6张切片,石蜡切片脱蜡至水,微波修复抗原,正常山羊血清封闭1 h(37 $^\circ\text{C}$),分别加入兔抗大鼠NG2(1:200, abcam),兔抗大鼠EPO(1:100, 武汉博士德生物工程有限公司),4 $^\circ\text{C}$ 冰箱过夜,磷酸盐缓冲液冲洗,滴加TRITC标记的山羊抗兔IgG(1:100, 北京中杉金桥生物试剂有限公司),37 $^\circ\text{C}$ 避光孵育1 h,冲洗后,甘油缓冲液封片,正置荧光显微镜(BX-51, OLYMPUS, 日本)下观察,每张切片取5个视野,采用计算机图像分析系统软件(image tool version 1.0)计数损伤侧室管膜下区(subventricular zone, SVZ)NG2⁺DAPI⁺及EPO⁺DAPI⁺细胞数(个/ mm^2),再统计每个样本NG2⁺DAPI⁺及EPO⁺DAPI⁺的平均细胞数。

1.5 统计学分析

应用SPSS 18.0软件对数据进行统计学分析,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 UCBMC移植对SVZ区少突胶质祖细胞的影响

NG2是少突胶质祖细胞的标记物,NG2/DAPI用来标记少突胶质祖细胞。UCBMC移植后7 d,各组大鼠SVZ区均可见NG2⁺DAPI⁺细胞,胞浆着色,染为红色,细胞核染成蓝色。HI+UCBMC组大鼠左侧侧脑室SVZ区NG2⁺DAPI⁺细胞数显著高于UCBMC对照组($P < 0.05$)、HI组及正常对照组(均

$P<0.01$)；UCBMC 对照组 NG2⁺DAPI⁺ 细胞数显著多于正常对照组和 HI 组 (均 $P<0.01$)；正常对照组 NG2⁺DAPI⁺ 细胞数显著高于 HI 组 ($P<0.01$)。见图 1、图 3。

2.2 UCBMC 移植对 SVZ 区 EPO 蛋白的影响

移植后 7d，正常对照组左侧侧脑室 SVZ 区仅可见少量 EPO⁺DAPI⁺ 细胞，细胞膜与细胞浆被染为红色，细胞核染成蓝色；UCBMC 对照组左侧侧脑室 SVZ 区可见许多 EPO⁺DAPI⁺ 细胞，显著高于正常对照组和 HI 组 (均 $P<0.01$)；HI+UCBMC 组左侧侧脑室 SVZ 区亦可见大量 EPO⁺DAPI⁺ 细胞，显著高于 UCBMC 对照组 ($P<0.05$)、正常对照组

及 HI 组 (均 $P<0.01$)；HI 组与正常对照组比较，差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 2~3。

2.3 EPO⁺DAPI⁺ 细胞数与 NG2⁺DAPI⁺ 细胞数的相关性分析

移植后 7d，将 HI+UCBMC 组 EPO⁺DAPI⁺ 细胞数与 NG2⁺DAPI⁺ 细胞数制成散点图，相关性分析发现 NG2⁺DAPI⁺ 细胞数与 EPO⁺DAPI⁺ 细胞数呈正相关 ($r=0.898$, $P<0.01$)，直线回归分析发现 EPO⁺DAPI⁺ 细胞数与 NG2⁺DAPI⁺ 细胞数呈直线回归 ($\beta=1.4604$, $P<0.01$)，即 SVZ 区少突胶质祖细胞与 EPO 蛋白表达呈正相关。见图 4。

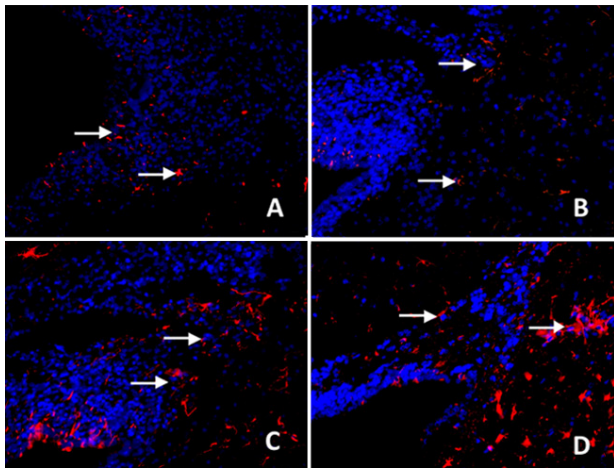


图 1 脑 NG2/DAPI 免疫荧光双标染色结果 ($\times 400$)

A：正常对照组，可见少量 NG2⁺DAPI⁺ 细胞表达；B：HI 组，可见极少量 NG2⁺DAPI⁺ 细胞表达；C：UCBMC 对照组，可见许多 NG2⁺DAPI⁺ 细胞表达；D：HI+UCBMC 组，可见大量 NG2⁺DAPI⁺ 细胞表达。NG2 标记少突胶质祖细胞，胞浆染为红色；DAPI 标记细胞核，染色呈蓝色。图中箭头所指为 NG2⁺DAPI⁺ 细胞，即少突胶质祖细胞。

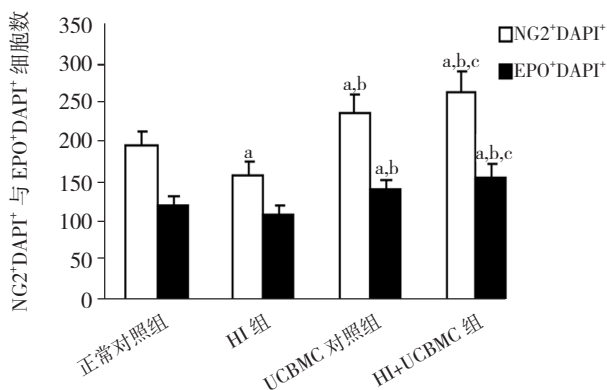


图 3 UCBMC 移植后各组少突胶质祖细胞及 EPO 蛋白表达的变化 ($n=10$) a：与正常对照组比较， $P<0.01$ ；b：与 HI 组比较， $P<0.01$ ；c：与 UCBMC 对照组比较， $P<0.05$ 。

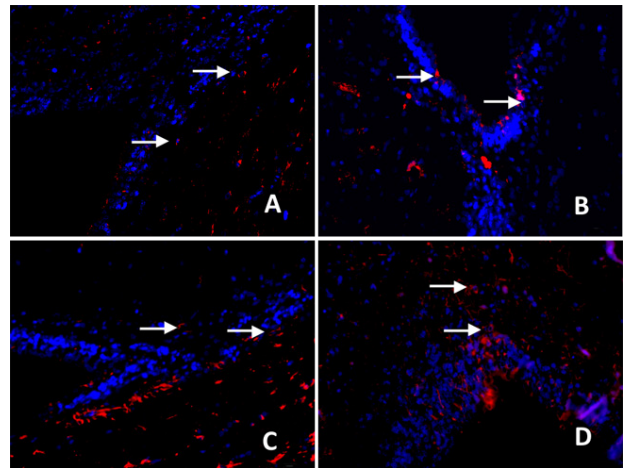


图 2 脑 EPO/DAPI 免疫荧光双标染色结果 ($\times 400$)

A：正常对照组，可见少量 EPO⁺DAPI⁺ 细胞表达；B：HI 组，可见极少量 EPO⁺DAPI⁺ 细胞表达；C：UCBMC 对照组，可见许多 EPO⁺DAPI⁺ 细胞表达；D：HI+UCBMC 组，可见大量 EPO⁺DAPI⁺ 细胞表达。EPO 标记 EPO 蛋白，胞浆染为红色；DAPI 标记细胞核，染色呈蓝色。图中箭头所指为 EPO⁺DAPI⁺ 细胞。

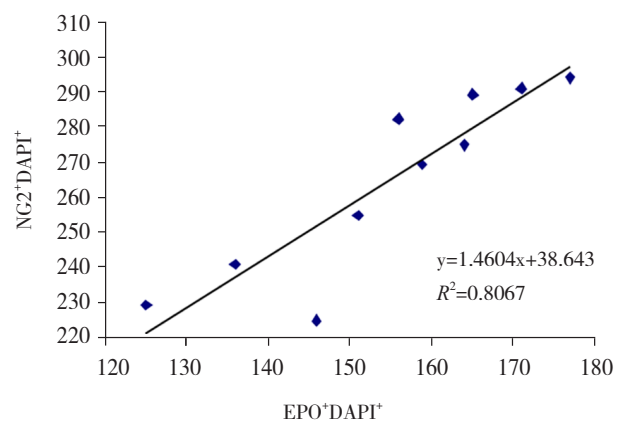


图 4 UCBMC 移植后 EPO 蛋白与少突胶质祖细胞数的线性回归分析图

3 讨论

少突胶质祖细胞起源于胚胎神经管的神经上皮细胞,由神经干细胞分化而来,主要存在于侧脑室SVZ区,可分化成少突胶质细胞,修复髓鞘损伤,如果侧脑室SVZ区少突胶质祖细胞减少,分化而成的少突胶质细胞亦减少,将会导致脑白质损伤;研究还发现围生期的少突胶质祖细胞较成年期少突胶质祖细胞具有更强的增殖与分化能力^[11],因此,新生儿HIBD后,保护少突胶质祖细胞,促进其再生,对脑白质损伤的防治具有重要意义。本研究发现,UCBMC移植后7d,HI组少突胶质祖细胞数显著少于正常对照组,提示缺氧缺血导致HIBD新生大鼠少突胶质祖细胞减少,这与文献报道一致^[12];UCBMC对照组少突胶质祖细胞显著高于正常对照组,说明UCBMC可促进正常新生大鼠少突胶质祖细胞的表达增加;HI+UCBMC组少突胶质祖细胞数显著高于HI组与UCBMC对照组,提示UCBMC移植不仅对HIBD新生大鼠少突胶质祖细胞具有神经保护作用,而且更易在缺氧缺血微环境中促进少突胶质祖细胞的表达增加,其具体机制有待于进一步研究。

EPO是一种受多种因素调控的糖蛋白,不仅可调控机体的供氧状况,而且抑制少突胶质祖细胞的凋亡,促进少突胶质祖细胞再生,对少突胶质祖细胞具有神经保护作用。EPO的合成与释放受多种因素调控,大量实验表明脑内应激反应可导致脑内微环境的改变,上调EPO的表达,保护损伤脑组织的神经细胞^[13],因此,如能激活内源性EPO蛋白的表达,调动其神经保护作用,将改善HIBD大鼠的脑白质损伤。UCBMC脑内移植可改善脑内微环境,促进其分泌多种神经营养因子,这些营养因子能否上调EPO的表达呢?本研究发现,UCBMC移植后7d,正常对照组与HI组左侧侧脑室SVZ区仅见少量EPO⁺DAPI⁺细胞,说明正常新生大鼠与HIBD新生大鼠侧脑室SVZ区仅有少量EPO表达,而UCBMC对照组EPO⁺DAPI⁺细胞数显著高于正常对照组,提示UCBMC可促进HIBD新生大鼠左侧侧脑室SVZ区EPO蛋白的表达;HI+UCBMC组EPO⁺DAPI⁺细胞数显著高于UCBMC对照组与HI组,说明UCBMC移植促进HIBD新生大鼠损伤侧SVZ区EPO蛋白的表达。UCBMC促进HIBD新生大鼠少突胶质祖细胞表达增加,是否与EPO蛋白的表达增加有关呢?本研究进行了统计学相关性分析及直线回归分析,发现UCBMC移植后7d,左侧侧脑室SVZ区EPO⁺DAPI⁺细胞数与少突胶质

祖细胞数呈正相关,且呈直线回归,提示UCBMC移植后,HIBD新生大鼠少突胶质祖细胞增多可能与EPO蛋白表达增加有关。

总之,UCBMC移植可促进HIBD新生大鼠少突胶质祖细胞的表达,其机制可能与EPO蛋白的表达增加相关,从而修复脑白质损伤。

[参考文献]

- [1] Rothstein RP, Levison SW. Gray matter oligodendrocyte progenitors and neurons die caspase-3 mediated deaths subsequent to mild perinatal hypoxic/ischemic insults[J]. Dev Neurosci, 2005, 27(2-4): 149-159.
- [2] Dizon M, Szele F, Kessler JA. Hypoxia-ischemia induces an endogenous reparative response by local neural progenitors in the postnatal mouse telencephalon[J]. Dev Neurosci, 2010, 32(3):173-183.
- [3] Petersson KH, Pinar H, Stopa EG, Faris RA, Sadowska GB, Hanumara RC, et al. White matter injury after cerebral ischemia in ovine fetuses[J]. Pediatr Res, 2002, 51(6): 768-776.
- [4] 郭媛媛, 窦泉玲, 陈玉玺, 董鹏, 王晓莉, 孙业全, 等. 脐血单个核细胞移植对HIBD大鼠脑白质损伤的影响[J]. 潍坊医学院学报, 2012, 33(5): 333-336.
- [5] 胡明英, 邓进巍, 王晓莉, 王庆红, 刘沉涛, 王霞, 等. 脐血单个核细胞移植后缺氧缺血性脑损伤新生鼠组织学及远期行为学的改善[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(34): 6648-6652.
- [6] Fan X, Heijnen CJ, van der KOOIJ MA, Groenendaal F, van Bel F. Beneficial effect of erythropoietin on sensorimotor function and white matter after hypoxia-ischemia in neonatal mice[J]. Pediatr Res, 2011, 69(1): 56-61.
- [7] Kako E, Kaneko N, Aoyama M, Hida H, Takebayashi H, Ikenaka K, et al. Subventricular zone-derived oligodendrogenesis in injured neonatal white matter in mice enhanced by a nonerythropoietic erythropoietin derivative[J]. Stem Cells, 2012, 30(10): 2234-2247.
- [8] Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat[J]. Ann Neurol, 1981, 9(2): 131-141.
- [9] 王晓莉, 赵岩松, 徐敏, 李耀武. 脐血单个核细胞移植对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠内源性神经干细胞的影响[J]. 中华小儿外科杂志, 2010, 31(1): 63-65.
- [10] 谢岷, 杨于嘉, 王晓莉, 王庆红, 刘沉涛, 王霞, 等. 骨髓基质细胞移植治疗新生大鼠缺氧缺血性脑损伤时间窗探讨[J]. 中华儿科杂志, 2007, 45(10): 396-397.
- [11] McTigue DM, Tripathi RB. The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS. J Neurochem[J], 2008, 107(1): 1-19.
- [12] Dizon ML, Maa T, Kessler JA. The bone morphogenetic protein antagonist noggin protects white matter after perinatal hypoxia-ischemia[J]. Neurobiol Dis, 2011, 42(3): 318-326.
- [13] Kato S, Aoyama M, Kakita H, Hida H, Kato I, Ito T, et al. Endogenous erythropoietin from astrocyte protects the oligodendrocyte precursor cell against hypoxic and reoxygenation injury[J]. J Neurosci Res, 2011, 89(10):1566-1574.

(本文编辑: 万静)