

· 基础研究 ·

跑台运动训练促进脑梗死大鼠外源性移植的
神经干细胞迁移分化的实验研究*贾 杰¹ 胡永善^{1,3} 吴 毅¹ 刘 罡¹ 汪 洋²

摘要 目的:研究跑台运动训练促进移植到脑梗死大鼠纹状体内的神经干细胞存活、迁移和分化,以及神经功能障碍的康复。方法:选用大脑中动脉缺血大鼠模型,在缺血后第5天将培养的神经干细胞立体定向移植到缺血纹状体区。30只大鼠随机分为移植组、跑台运动训练组以及移植联合跑台运动训练组。移植组大鼠自由活动。分别在缺血前1天,缺血后第5、6、14和28天评测大鼠的神经行为学评分情况。免疫荧光染色观察神经干细胞在脑内的迁移、分化情况。结果:免疫荧光染色显示,运动训练的大鼠移植后的神经干细胞在宿主脑内存活、迁移分化情况较无运动训练而自由活动大鼠好。移植联合运动训练组大鼠的神经行为学评分较单纯移植和单纯运动组低($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:运动训练可以促进移植的神经干细胞迁移、分化,并提高移植细胞在脑梗死大鼠脑内的存活率,促进神经功能障碍的康复。

关键词 神经干细胞;运动训练;脑梗死

中图分类号:R493,R741,R743 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2008)-07-0594-04

Experimental study of the effects of treadmill training on promoting transplanted neural stem cell migration and differentiation in rat's brain after cerebral infarction/JIA Jie, HU Yongshan, WU Yi, et al./Chinese Journal Rehabilitation Medicine, 2008, 23(7): 594—597

Abstract Objective: To study the effects of treadmill training on promoting transplanted neural stem cell survival, migration and differentiation in rat's brain after cerebral infarction, and improving the neurological dysfunction rehabilitation. **Method:** Middle cerebral artery ischemia model was used. Cultured neural stem cells were transplanted into ischemic striatum with stereotactic on the 5th day. Thirty rats were randomly divided into three groups: transplantation group, treadmill training group and transplantation combined with treadmill training group. On the day before ischemia, as well as the 5th, 6th, 14th and 28th day after ischemia all rats were evaluated with neurobehavioral assessment. Immunofluorescence staining was used to detect neural migration and differentiation of stem cells in the brain. **Result:** Immunofluorescence staining showed the rates of survival, migration and differentiation of transplanted neural stem cells in host's brain after cerebral infarction in treadmill training rates were better than those in free activities and no treadmill training rats. The neurological behavioral scores in transplantation combined with treadmill training group were lower than those in transplantation alone and treadmill training alone groups respectively ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** Treadmill training can promote migration, differentiation and survival of the transplanted neural stem cell in the brain after cerebral infarction and improve the rehabilitation outcome for neurological dysfunction.

Author's address Department of Rehabilitation, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai, 200040

Key words neural stem cell; treadmill training; cerebral infarction

脑卒中后各种功能障碍的治疗是医学界的难点和研究热点之一。随着对干细胞研究的深入,给脑卒中患者功能障碍的康复带来了新的希望。但是,植入细胞存活较低,以及迁移和分化不足又困扰着干细胞治疗效果的提高。有学者通过将脑梗死大鼠放入丰富的生存环境中饲养发现^[1-2],丰富的环境增加了脑梗死大鼠脑室下区和海马神经干细胞数量,这些新生的神经干细胞更多地迁移到缺血的纹状体区。随后又有学者将移植有外源性神经干细胞的脑梗死大鼠也放入丰富的生存环境中饲养^[3],并给予每周1

次的滚笼训练,发现丰富的环境和一定的运动训练

* 基金项目:中国博士后基金(20070420597);复旦大学临床-基础交叉基金

1 复旦大学附属华山医院康复医学科,复旦大学神经生物学国家重点实验室,复旦大学上海医学院康复与运动医学系,上海乌鲁木齐中路12号,200040

2 复旦大学医学院解剖与组织胚胎学系

3 通讯作者:胡永善(复旦大学附属华山医院康复医学科,上海乌鲁木齐中路12号,200040, E-mail: drhys@sina.com)

作者简介:贾杰,女,副教授,硕士研究生导师,博士后

收稿日期:2008-05-14

可以使移植的神经干细胞存活增加, 并大多迁移至缺血部位。而且大鼠的神经功能比对照组明显改善。受此启发, 本研究对大脑中动脉缺血 5d 的大鼠进行神经干细胞移植后给予电动跑台运动训练, 观察植入的神经干细胞在脑内的存活和迁移情况, 并与大鼠的神经功能恢复情况进行对照研究。

1 材料与方法

1.1 神经干细胞培养和鉴定

1.1.1 细胞培养: 选孕 12d SD 大鼠(复旦大学上海医学院动物管理中心提供), 经 10% 水合氯醛深度麻醉后, 常规消毒、开腹, 取出子宫, 并置于 4℃ Hank's 液中, 取出胎脑后, 于解剖显微镜下仔细分离出大脑皮质组织。消化: 采用机械消化法。将海马组织锐性切割成 1mm³ 大小, 转移至 10ml 离心管, 加 Hank's 液至 6ml, 小心吹打 16 次, 沉淀后弃去主要是脂肪成分的上清。再加 Hank's 液至 3ml, 反复小心吹打, 使组织块进一步减小直至形成单细胞悬液。1500r/min 离心 5min, 弃上清, 加 NSCs 全培养液[DMEM/F12 (Gibco 公司), 1% N2 (Gibco 公司), 2% B27 (Gibco 公司), EGF 20 ng/ml (Sigma 公司), bFGF 20ng/ml (Sigma 公司), 谷氨酰胺 4mmol/l]。细胞计数, 将浓度调整为 1×10⁶/ml, 转移入培养瓶中, 培养: 37℃, 5% CO₂ 细胞培养箱中培养。每日观察细胞代谢及生长速度, 2d 换液 1 次。50%神经球直径>10 个细胞时, 进行传代。传代: 将细胞悬液转移至 10ml 离心管中, 800r/min 离心 3min, 弃上清, 加入新全培养液, 反复均匀吹打, 直至形成单细胞悬液。细胞计数后转移至培养瓶中继续培养。细胞传代 4 次以上, 作单细胞克隆。单细胞克隆: 将传代后的神经球悬液转移至 10ml 离心管中, 机械消化直至形成单细胞悬液。稀释细胞悬液后转移至 96 孔板中, 观察并选择含有单个细胞的培养孔。置于 37℃, 5%CO₂ 培养箱中培养。

1.1.2 细胞鉴定: Nestin 标记: 将神经球吸出, 贴于经多聚赖氨酸涂层的玻片上, 经 Triton-X100 破膜后, 4%多聚甲醛固定。免疫荧光染色: 一抗为 nestin 抗体 (鼠抗、Sigma 公司), 二抗为羊抗鼠 IgM-FITC (Sigma 公司)。

1.1.3 细胞标记: NSCs 全培养液中去 EGF, bFGF, 加入 10%胎牛血清(Hyclone 公司), 相同环境中继续培养, 观察细胞分化情况, 并于 7d 后分别采用 β -tublin III、GFAP、Hoechst 抗体三标方法标记所培养细胞。将培养 3 周 NSC 取出, 0.01 PBS 冲洗 4min×3 次, 室温下用 4%多聚甲醛固定 30min, 冲洗 4min×3 次, 室温下用山羊血清封闭 1h 后, 弃封闭液

加一抗: 鼠抗 β -tublin III (Chemicon, 1:400) 及兔抗 GFAP (Chemicon, 1:400), 然后 4℃过夜。次日冲洗 4min×3 次, 加二抗山羊抗鼠 TRITC (北京中山, 1:50) 及山羊抗兔 FITC (北京中山, 1:50), 室温下避光 1h, PBS 冲洗, 封片, 荧光显微镜下观察照相。

1.2 大脑中动脉缺血模型复制及分组

参考 Zea Longa 等^[4]线栓法阻塞大鼠左侧大脑中动脉造成缺血。大鼠经 10%水合氯醛(400mg/kg, i. p.)麻醉后, 颈正中切开, 结扎颈外动脉下端, 用动脉夹分别夹住颈外动脉、颈内动脉的远端。在颈总动脉分叉处剪一小口, 将预先处理过的 4—0 尼龙线(北京沙东生物技术有限公司长 40mm, 线身直径 0.26mm, 线头直径 0.34±0.02mm)的圆钝端沿切口插入颈内动脉, 结扎颈总动脉分叉的插线处, 然后撤掉动脉夹, 将尼龙线缓缓送入, 直至大脑前动脉, 尼龙线插入深度平均为 18—20mm, 以阻断该侧大脑中动脉的血流, 最后缝合颈部切口。此时, 大鼠左眼虹膜颜色变浅。缺血 1.5h 实行再灌注。动物苏醒出现左侧 Horner 综合征, 左侧眼裂变小, 瞳孔缩小, 出现右侧偏瘫, 以右上肢为明显, 提尾悬拉出现右上肢蜷缩屈曲或被动性过度伸展, 同时出现向右侧转圈, 跌倒。大鼠复苏后在 20—25℃环境中饲养, 模型建立后 3d 内给予庆大霉素 2 万 U, 腹腔注射。3d 后大鼠进行神经损害严重程度评分 (neurological severity score, NSS)^[5], 主要观察其运动、感觉功能, 平衡能力及生理反射能力。

评分后随机分成细胞移植组、运动训练组、移植联合运动训练组, 每组各 10 只。

1.3 神经干细胞移植

在缺血后第 5 天, 立体定向移植 NSCs 10 μ l 到缺血纹状体区。移植前 NSCs 经 Brdu 10 μ mol/L (Sigma 公司)标记 3d, 再将其溶解于 PBS 中, 细胞浓度调整为 5×10⁷/ml。移植部位为左侧纹状体区, 即 A (前凶向后): -0.5, R (正中中线向右): 3.5, D (深度): 5.0mm。

1.4 电动跑台运动训练

各组跑台训练大鼠在手术前均经过跑台预训练 3d, 每天 30min。在缺血再灌注后第 6 天, 即 NSCs 移植后第 1 天予以电动跑台训练, 每天 30min, 每周 5d, 连续 4 周。跑台参数设置如下: 平板斜度: 0°。履带传送速度: 术前 3d: 12m/min, 术后第 6 天即 NSCs 移植后第 1 天: 4m/min, 术后第 7 天即 NSCs 移植后第 2 天: 8m/min, 术后第 8 天即 NSCs 移植后第 3 天至实验结束: 12m/min。每周训练 5d, 每天 30min, 共 4 周。

非运动组大鼠每天在静止的跑台内自由活动30min。

1.5 运动功能评分

分别于缺血前1天,缺血后第5、6、14和28天对各组动物进行神经损害评分(neurological severity score, NSS)^[8]。

1.6 免疫荧光分析

①3组实验大鼠在不同干预后4周分别经10%水合氯醛(0.32ml/100g)麻醉后,4%多聚甲醛灌注并取鼠脑固定。②于移植点附近作层厚10 μ m的冰冻切片。③加入0.1%Triton破膜30min。④0.01M PBS洗片3次。⑤加入2%BSA室温下封闭30min。⑥加一抗鼠抗BrdU抗体(Sigma公司),于40℃过夜。⑦0.01M PBS洗片3次,加荧光二抗羊抗鼠IgG-CY3。⑧室温下避光2h并晾干。⑨0.01MPBS洗片3次。⑩加入一抗鼠抗Neurofilament抗体(Sigma公司),37℃孵育2h。⑪0.01MPBS冲洗3次,加荧光二抗羊抗鼠IgM-FITC。⑫室温下避光2h并晾干。⑬荧光显微镜观察:BrdU阳性细胞的分布情况;BrdU阳性细胞的Neurofilament表达情况;BrdU(+)Neurofilament(+)双阳性细胞数/BrdU(+)细胞数。

1.7 统计学分析

NSS评分数据描述采用均数 $\pm$ 标准差表示, $P<0.05$ 表示差异有显著性意义。应用SPSS 13.0版统计软件进行分析,组间比较采用单因素方差分析 t 检验。

2 结果

2.1 培养神经干细胞的分化鉴定结果

从图1—2(见前置彩色插页5)可知,本实验培养的细胞具有神经干细胞标志。贴壁分化培养后可显示分化为神经元、神经胶质细胞,说明本实验大鼠移植的细胞具有神经干细胞本身的特性和多向分化潜能。

2.2 运动功能评分

经统计学分析,在缺血后的14d之前,各组神经功能均呈不同程度恢复,但各组间NSS评分无显著差异;缺血后第14—28天,定量运动训练组的NSS评分显著低于细胞移植组($P<0.05$);缺血后第28天时,运动训练组和干细胞移植组NSS评分较缺血后第14天时降低($P<0.05$);移植联合运动训练组的NSS评分显著低于细胞移植组和运动训练组($P<0.01$),表1,图3。

2.2 免疫荧光分析

神经干细胞移植后4周,单纯移植组大鼠,移植

表1 各组大鼠神经行为学评分 ($\bar{x}\pm s$)

组别	缺血前1天	缺血后第5天	缺血后第6天	缺血后第14天	缺血后第28天
跑台运动训练组	7.29 $\pm$ 1.1	7.27 $\pm$ 1.1	6.21 $\pm$ 0.06	5.79 $\pm$ 0.9	4.22 $\pm$ 0.4
移植组	7.31 $\pm$ 1	7.3 $\pm$ 1.2	6.58 $\pm$ 0.9	6.21 $\pm$ 0.6	5.29 $\pm$ 0.6
移植联合运动训练组	7.24 $\pm$ 0.8	7.19 $\pm$ 0.9	6.19 $\pm$ 0.4	4.45 $\pm$ 0.8	2.31 $\pm$ 0.4

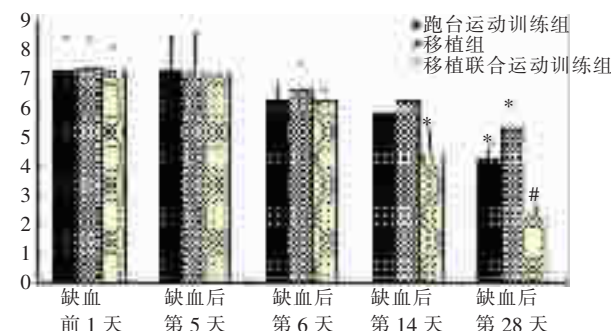


图3 各组大鼠神经行为学(NSS)评分

注:#表示与缺血前1天比较 $P<0.01$; *表示与缺血前1天比较 $P<0.05$

区附近可见到BrdU(+)细胞存在,而运动训练组大鼠BrdU(+)细胞数量较多(见图4,见前置彩色插页5)。这些细胞以移植点为中心向周围迁移,少数细胞呈BrdU/Neurofilament(NF)双阳性。每例动物BrdU(+)细胞不尽相同,其中单纯移植组4例细胞数较多,迁移范围相对较窄,其余6例较少;而运动训练组大鼠7例细胞数较多,并且迁移范围相对较广,其余3例较少。移植区BrdU,Neurofilament(NF)双阳性细胞数/BrdU(+)细胞数单纯移植组在2%—18%之间,而移植联合运动组在2%—30%之间,各动物之间差异较大(见图4,见前置彩色插页5)。说明,移植联合运动训练组大鼠被移植到缺血区的神经干细胞不仅在存活数量上多于单纯移植组大鼠,在移植的神经干细胞分化程度方面也优于单纯移植组大鼠。

3 讨论

本研究通过无血清法培养出了符合神经干细胞特征的原始未分化细胞克隆球。克隆化的细胞在无生长因子而含有血清的环境中逐渐分化成神经元(β -tubulin阳性)和胶质细胞(GFAP阳性)。本研究中细胞始终保持良好的增殖活性,经多次传代,子代细胞和母代细胞具有相同的细胞形态。

大鼠大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)是脑缺血研究的经典模型^[6],接近人类缺血性脑卒中的发病机制。研究中,我们将同种异体胚胎神经干细胞移植到MCAO大鼠的缺血纹状体区,通过定量跑台运动的参与,一方面利用荧光显微镜观察移植后4周缺血纹状体区移植细胞的迁

徙能力。另一方面,采用了包括运动试验、感觉试验和主要反射试验的 NSS 综合实验^[7],对 MCAO 后的神经功能从运动、感觉及认知功能等方面来全面、客观评价损害程度的恢复。研究中,细胞移植联合运动训练组大鼠缺血后第 14—28 天的 NSS 评分,较之细胞移植组和运动训练组大鼠表现出了显著性的差异。4 周后细胞移植区域荧光显微镜下脑组织中可见 BrdU 标记细胞,证明移植细胞存活于宿主,神经元特异性标记 β -tubulin 阳性,证明移植的细胞有神经元分化。

本实验室的同类研究显示^[8],移植的神经干细胞有助于神经功能恢复,但因缺血本身导致的局部血液供应不利,影响了神经干细胞的存活和迁移分化能力的发挥,使得神经干细胞参与结构和功能修复的时间推迟。虽然相关研究显示神经干细胞移植对脑缺血后的神经功能恢复有肯定的作用^[9],但神经干细胞在移植早期难以对宿主局部的病理改变产生积极影响,缺血早期半暗区中神经元和内皮细胞的坏死和凋亡无法得到缓解,这是单纯神经干细胞移植的缺陷^[8]。干细胞的自我更新、增殖和分化主要依赖于周围特殊的微环境,即小生境^[7,10]。Fukunaga 等^[11]将神经干细胞连同参与血管发育的胚胎间质组织一并向梗死区移植,发现有利于早期梗死区新生血管的形成。电刺激小脑顶核^[13]有利于移植入大脑中动脉缺血模型神经干细胞向神经元分化,且它和共移植组有协同作用。提示移植细胞需要能够改变局部微环境,或对细胞分化具有促进作用的因素参与移植细胞在宿主内发生积极的变化。运动训练对缺血性脑血管疾病有较好疗效^[12—13],相关研究^[14—18]提示:运动训练具有减小脑梗死体积,促进血管新生,增加局部脑血流量,调节释放神经递质的平衡等作用,这些均为神经干细胞的分化创造相对有利的环境,可以促进神经干细胞向神经元分化。

本研究对神经干细胞移植后的大脑中动脉闭塞致缺血大鼠进行了为期 4 周的电动跑台康复运动训练,发现康复运动训练对移植细胞的存活、迁移均有一定的影响,对神经行为学改善也有一定的促进作用。至于引起此种改变的内在机制,以及采用顺磁氧化铁标记神经干细胞,利用 MRI 进行活体追踪等有待进一步研究。

参考文献

- [1] Komitova M, Mattsson B, Johansson BB, et al. Enriched Environment Increases Neural Stem/Progenitor Cell Proliferation and Neurogenesis in the Subventricular Zone of Stroke - Lesioned Adult Rats[J]. Stroke, 2005,36(6): 1278—1282.
- [2] Nygren J, Wieloch T, Pesic J, et al. Enriched environment attenuates cell genesis in subventricular zone after focal ischemia in mice and decreases migration of newborn cells to the striatum[J]. Stroke, 2006,37(11):2824—2829.
- [3] Hicks AU, Hewlett K, Windle V, et al. Enriched environment enhance transplanted subventricular zone stem cell migration and functional recovery after stroke [J]. Neuroscience,2007,146(1):31.
- [4] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1):84.
- [5] Shapira Y, Lam AM, Calvin CC, et al. Therapeutic time window and dose response of the beneficial effects of ketamine in experimental head injury[J]. Stroke, 1994, 25(8): 1637.
- [6] Zhao W, Belayev L, Cinsberg. Transient middle cerebral artery occlusion by intraluminal suture: II. Neuological deficits and pixel-based correlation of histopathology with local blood flow and glucose utilization [J]. J Cereb Blood Flow Metab,1997,17(4): 1281—129.
- [7] Ohab JJ, Fleming S, Blesch A. A neurovascular niche for neurogenesis after stroke[J]. Neurosci,2006,26(50):13007.
- [8] 朱巍,周良辅,汪洋,等.神经干细胞移植治疗暂时性脑缺血的实验研究[J].中国临床神经科学,2003,11(4):338.
- [9] Toda H, Takahashi J, Iwakami N, et al. Grafting neural stem cells improved the impaired spatial recognition in ischemic rats [J]. Neurosci Lett, 2001, 316(1):9.
- [10] Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cell and their niche[J]. Cell, 2004,116(6):769.
- [11] Fukunaga A, Uchida K, Hara K, et al. Differentiation and angiogenesis of central nervous system stem cells implanted with mesenchyme into ischemia rat brain [J]. Cell Transplant, 1999,8(2):435.
- [12] 胡永善.运动疗法在脑血管疾病康复中的应用[J].中国康复医学杂志, 2007, 22 (12): 1122.
- [13] 范文可,胡永善,吴毅等.规范三级康复治疗对脑组中偏瘫患者运动功能康复的影响[J].中国康复医学杂志,2006,21(6):484.
- [14] 金玉玲,吴盛华,朱晓峰.电刺激小脑顶核联合神经干细胞共移植体治疗大鼠局灶性脑缺血[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(20):3956.
- [15] 郑庆平,胡永善,白玉龙,等.康复训练对脑血损伤大鼠血管生成素的影响[J].中国康复医学杂志, 2007, 22(3):193.
- [16] Wang RW, Yu SM, Yang YR, et al. Treadmill Training Effects in Different Age Groups following Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats[J]. Gerontology, 2005, 51(3):161.
- [17] 徐丽丽,白玉龙,胡永善,等.运动训练改善脑缺血大鼠梗死体积与神经行为能力的实验研究 [J]. 中国康复医学杂志, 2008, 23(2):100.
- [18] 李红岭,曹慧芳,田苗,等.运动训练对大鼠实验性脑出血后血肿周围组织细胞凋亡的影响[J].中国康复医学杂志, 2008, 23 (2): 103.