

PKH26 荧光示踪剂在神经干细胞移植大鼠创伤性脑损伤中的应用

马海英 李 花 孔 力 喻 博 石玉秀

摘 要 **目的** 探讨神经干细胞移植创伤性脑损伤(TBI)过程中有效的示踪剂,并进一步观察移植后 NSCs 的自然存活与分化情况。**方法** Feeney 法制备大鼠 TBI 模型;将体外培养的 NSCs 进行 PKH26 荧光示踪剂标记,并于损伤后第 3 天移植入脑损伤灶区,对照组注射等量生理盐水。分别于移植后 1 天、4 天、7 天及 2 周、3 周、4 周、8 周取材,行全脑冷冻切片,观察 PKH26 标记的 NSC 的自然存活及分布情况;Nestin、 β Ⅲ-微管蛋白和 GFAP 免疫细胞化学染色观察移植后 NSCs 的分化。同时,于取材前采用 Corner 试验进行神经行为学检测。**结果** PKH26 标记 NSCs 的阳性率 >95%。移植后第 1 天、4 天,NSCs 主要分别于注射部位周围,细胞胞体较小,分布均匀,大部分仍为 Nestin 阳性表达细胞。移植后第 7 天,移植 NSCs 可迁移至嗅球、额叶及枕叶皮质等区域。针道及周围组织 NSCs 分化为神经元和神经胶质细胞的比例分别为 $12.3\% \pm 2.1\%$ 和 $37.2\% \pm 7.6\%$ 。移植后第 2 周,海马、脑桥、小脑普肯耶细胞层等广泛区域均可见移植细胞。移植后第 4~8 周,移植细胞存活数量呈减少趋势。移植细胞的 PKH26 染色未见明显减弱。同一时间段内,与对照组相比,NSCs 移植组动物的感觉运动功能均有明显改善。**结论** PKH26 荧光示踪剂可用于体外培养的 NSCs 脑内移植示踪观察。移植 NSC 于损伤灶区,可自然分化为神经元和神经胶质细胞,并可迁移至脑内多处远距离部位,能明显改善 TBI 动物的感觉运动功能。

关键词 PKH26 神经干细胞 移植 创伤性脑损伤

Neural Stem Cells Labeled by Exposure to the Fluorescent Dye PKH26 Delivery to the Damaged Cortical Areas in the Traumatically Injured Brain of Rats. Ma Haiying, Li Hua, Kong Li, Yu Bo, Shi Yuxiu. Department of Histology and Embryology, China Medical University, Liaoning 110000, China

Abstract **Objective** To determine if PKH26 could be used to serve as an effective tracer and observe the ability of transplanted neural stem cells to differentiate into neural cells and astrocytes during traumatic brain injury. **Methods** We transplanted NSCs labeled by exposure to the fluorescent dye PKH26 into the cortical areas at 3 days after traumatically injured brain survey. The brains of rats were collected at 1, 4, 7 days, 2, 3, 4 and 8 weeks after transplantation. The grafted cells were identified by their immunoreactivity to nestin for NSCs, β Ⅲ-tubulin for neuron and GFAP for astrocytes. We evaluated experimental neurology by corner test. **Results** The results revealed the positive ratio of cells labeled by PKH26 was more than 95%. The majority of the surviving cells were located within the implantation sites at 1, 4 days after transplantation. Most of these cells were nestin+. A small proportion of cells were β Ⅲ-tubulin+ ($12.3\% \pm 2.1\%$), and GFAP+ was detected in $37.2\% \pm 7.6\%$ of transplanted cells at 7 days after transplantation. Many transplanted NSCs migrated extensively outside the transplantation sites, including hippocampus, pons and Purkinje cell layer of cerebellum at 2 weeks after transplantation. From 4 weeks to 8 weeks after transplantation, the surviving NSCs were decreased, but PKH26 was nondiffusion. Transplanted NSCs improved sensorimotor function after experimental traumatic brain injury. **Conclusion** PKH26 fluorescent tracer can be used to observe NSCs transplanted into the brain. Transplanted NSCs can survive in the traumatically injured brain and differentiate into neurons and astrocytes, migrate away from the graft core, and improve sensorimotor function after experimental traumatic brain injury.

Key words PKH26; Neural stem cell; Transplantation; Traumatic brain injury (TBI)

当前社会生活中,各种灾害如矿难、建设施工、频

发的交通事故等原因造成的严重的脑损伤,致脑组织损坏,神经细胞坏死,致残率、病死率高,是成人致残的主要原因之一。治疗严重的脑损伤即使挽救了生命,但已经坏死的神经细胞和组织则无法再生恢复,给家庭与社会造成巨大的经济和精神负担^[1]。如何解决此问题,是国内外学者关注的热点。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30850001);辽宁省教育厅科学技术研究项目(2008851,2008779)

作者单位:110000 沈阳,中国医科大学组织胚胎学教研室(马海英、李花、石玉秀);大连医科大学组织胚胎学教研室(马海英、孔力);沈阳,中国医科大学附属盛京医院(喻博)

通讯作者:石玉秀,电子邮箱:shiyuxiu@163.com

近年来对神经干细胞(neural stem cells, NSCs)在

促分化因子的作用下可以在体外定向分化发育成神经元和神经胶质细胞的研究有了迅速发展,使中枢神经系统损伤修复出现了新的希望。国外实验研究证明,通过 NSCs 移植替代治疗可能实现修复中枢神经系统损伤或疾病引起的组织损伤并部分恢复由损伤引起的功能缺陷^[2~4]。如何有效地示踪 NSCs,并实现对其移植后全程观察是研究 NSCs 移植替代治疗中枢神经系统损伤的必要手段。本文采用荧光示踪剂 PKH26 标记 NSCs,移植于 TBI 模型大鼠脑内,观察其存活、分布、分化及对运动功能的恢复作用,寻找用于 NSCs 移植观察的有效示踪剂。

材料与方法

1. 材料及主要试剂: NSCs 源于 E14Wister 大鼠脑皮质,由大连市干细胞与组织工程研发中心提供,PKH26 和 DMEM/F12 培养基购自美国 sigma 公司,抗鼠 β III - 微管蛋白购自 SANTA CRUZ 公司。

2. NSCs 的培养与鉴定: 将原代培养的 NSCs 2×10^5 / ml 接种于 50 ml 培养瓶中,培养条件为 6ml DMEM/F12 培养基(含 B27、EGF、bFGF), 37℃, 5% CO₂, 每 6~7 天传代 1 次,传 10 代后备用。采用 Nestin 免疫细胞化学染色鉴定。

3. 急性脑损伤模型制备: 采用改良的 Feeney 法制备急性脑损伤模型^[5]。取 42 只成年 Wister 大鼠,体重 150~200g,以 10% 水合氯醛按 40mg/kg 剂量腹腔注射麻醉,麻醉后固定于立体定向仪上,切开头皮,分离皮下组织及骨膜。在前囟后 3mm,矢状缝左 3mm 处用颅钻钻取直径约为 3mm 的骨窗,保持硬脑膜的完整。采用改良的打击装置,以 10g 砝码从 30cm 高处自由坠落,撞击该处硬脑膜,造成颅脑挫裂伤。

4. PKH26 示踪剂标记 NSCs: 于移植前收集 NSCs,制备成单细胞悬液,进行 PKH26 示踪剂染色,操作方法按说明书进行,染色体系中 PKH26 示踪剂和 NSCs 的终浓度分别为 4×10^{-6} mol/L 和 1×10^7 / ml。台盼兰染色检测细胞毒性。

5. 动物分组与 NSCs 移植: 于造模后 72h,将动物再次麻醉,固定于立体定位仪上,暴露创伤灶,实验组及对照组各 21 只,实验组在创伤灶中心,用微量注射泵将 3 μ l 浓度为 1×10^8 / ml PKH26 标记的 NSCs 悬液注入硬脑膜下 3mm 处,注射 10min,停留 5min 后拔出注射器。对照组注射等量生理盐水。以后动物常规饲养。每组动物分别于移植后 1 天、4 天、7 天、2 周、3 周、4 周、8 周取材。

6. 组织学观察: 动物麻醉后,4% 多聚甲醛灌注固定,取全脑,后固定过夜,行全脑冷冻切片,于不同断面做 Nestin、 β III - 微管蛋白和 GFAP 免疫荧光染色。染色方法按说明书进行。于荧光显微镜下观察 NSCs 的存活和分化。200 倍物镜下,取针道及其附近区相互不重叠的 4 个视野,对 β III - 微管蛋白⁺、GFAP⁺、PKH26⁺ 计数。 β III - 微管蛋白、GFAP 分化比例 = β III - 微管蛋白⁺ 或 GFAP⁺ / PKH26⁺。

7. 神经行为学检查: 采用 Corner 试验^[6],实验装置为由两

块 30cm $\times$ 20cm $\times$ 1cm 的平板构成 30° 的夹角。移植后第 1 天、4 天、7 天、14 天、21 天,于各组大鼠处死前用 Corner 实验装置进行行为学检测,每只重复 3 次。不对称分值 = (向损伤侧作“站立转身”的次数/总的“站立转身”的次数) $\times$ 100%,正常基线为 50%,分值越高,反映损伤越严重。

8. 统计学分析: 采用 SPSS 11.0 统计软件分析,计量数据以均数 $\pm$ 标准差表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. NSCs 培养与鉴定: 在完全培养基中, NSCs 呈球团状生长, Nestin 表达阳性(第 140 页彩图 1、彩图 2)。

2. PKH26 标记 NSCs: 荧光显微镜下, PKH26 标记的 NSCs 被激发出红光, PKH26 标记 NSC 的阳性率 $> 95\%$ (第 140 页彩图 3)。台盼蓝染色观察细胞存活率为 100%。

3. NSCs 移植后在脑内的存活及分化: 移植后第 1 天、4 天, NSCs 主要分别于移植灶周围,细胞胞体较小,圆形,分布均匀,大部分细胞呈 Nestin 阳性表达(第 140 页彩图 4)。移植后第 7 天,移植 NSCs 可迁移至嗅球、额叶皮质、枕叶皮质等区域,可见从胞体伸出突起。NSCs 向损伤灶周边皮质颗粒层迁移现象明显,具有方向性(第 140 页彩图 5)。NSCs 分化为 β III - 微管蛋白⁺ 和 GFAP⁺ 细胞的比例分别为 $7.3\% \pm 2.1\%$ 和 $45.2\% \pm 7.6\%$ (第 140 页彩图 6)。移植后第 2 周,海马、脑桥、小脑普肯耶细胞层等广泛区域均可见移植细胞。移植后第 4~8 周,移植细胞存活数量呈减少趋势。移植细胞的 PKH26 染色未见明显减弱。

4. Corner 试验: 移植后第 1 天,移植组和对照组大鼠均呈现出高度的不对称分值,之后不对称分值随时间逐渐降低,但移植组一直低于对照组,差异有显著性意义(图 1)。

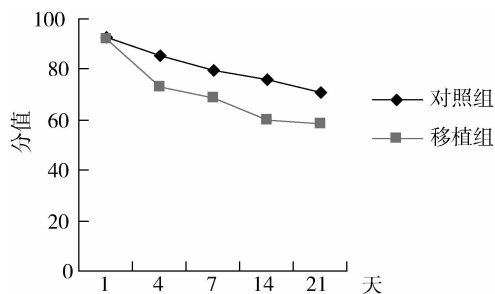


图 1 移植组与对照组大鼠不同时间行为学检查

讨 论

NSCs 被认为是神经系统中的神经前体细胞,具有很强的增生能力和自我更新能力,能够分化为神经

元、星型胶质细胞、少突胶质细胞,在神经系统的发育中起重要作用。NSCs 的发现打破了神经元不会再生的传统观念,为神经系统损伤的修复提供了巨大的治疗前景。研究表明,外源性 NSCs 移植能够调节中枢神经系统损伤的修复,但其机制尚不完全明确^[7-9]。在 NSCs 移植治疗中枢神经系统损伤的实验研究中,有效的监测和追踪 NSCs 迁移、增生和分化,有助于我们了解 NSCs 移植促进神经功能恢复的真正机制,从而选择最优的移植策略,将对其在动物实验研究和临床应用方面起到促进作用。目前,用于体内示踪的主要手段有光、电镜观察细胞标志物和无创伤性神经影像学手段。目前,无创性神经影像学不能很好地从细胞水平显示移植后的细胞在活体内生存、凋亡、增生和分化等情况。利用光镜及电镜技术观察移植物存活情况及移植植物与受体脑建立神经纤维联系情况可以为移植植物存活提供了客观依据^[10]。

PKH26 是一种亲脂性荧光染料,可与细胞膜发生不可逆性结合,随着细胞的分裂,标记的荧光染料也几乎均等地分配到两个子细胞,但子细胞的荧光强度可能减弱,移植后可以利用荧光显微镜观察荧光标记的 NSCs 的存活和迁移情况。Flax 等人在研究中发现 PKH26 标记 NSCs 移植后,甚至不能从死亡或凋亡的细胞释放出来,因此能够很好地区分移植细胞和宿主细胞。本研究应用 PKH26 标记 NSC,并于损伤灶区移植入 TBI 大鼠脑内,发现 PKH26 体外标记 NSCs 的阳性率大于 95%,浓度为 4×10^{-6} mol/L 的 PKH26 对 NSCs 没有明显毒性作用。细胞着色均匀,明亮,移植后能够很好地观察移植的 NSCs 的存活和分布。移植后第 2 周,可见 NSCs 迁移于全脑多处远隔部位,并可分化为神经元和神经胶质细胞,移植后第 8 周,PKH26 标记的 NSCs 被激发的红光未见明显减弱。

微管是细胞骨架中最粗的一种纤维丝,是细胞内囊泡、细胞器和蛋白质交通运输的轨道。 β III - 微管蛋白是未成熟神经元的标志蛋白。体外研究表明, β III - 微管蛋白在 NSCs 定向分化为神经元过程中发生了表达的变化,微管蛋白的分布位置变化与神经元的细胞形态由幼稚到成熟的变化密切相关^[11]。GFAP 是胶质丝的主要成分,是星型胶质细胞的标志性蛋白。星型胶质细胞在神经病理及脑的发育再生中具有重要的作用。我们发现 PKH26 标记的 NSCs 移植大鼠创伤性脑外伤后第 7 天,NSCs 可以分化为神经元和神经胶质细胞。

corner 试验是被国外学者广泛使用的神经行为

学实验,主要用以检测大鼠“不对称感觉运动功能障碍”^[6]。当实验动物进入夹角 (corner) 深部,双侧的触须将受到刺激,继而小鼠将站立并转身面向夹角的开口端。正常小鼠向左向右转身的概率基本相等,而一侧脑损伤的小鼠则以向脑损伤同侧转身为主。本文采用 corner 试验发现 NSCs 移植能明显改善颅脑损伤后大鼠的感觉运动行为。

总之,PKH26 标记 NSCs 移植于 TBI 大鼠损害区能够存活、迁移,并分化为神经元和神经胶质细胞,改善脑损伤大鼠的感觉运动功能。PKH26 标记 NSCs,准确性高、标记率高、方法简便、未见明显毒性,提示在适当的条件下,PKH26 可作为一种有效的体内示踪剂对移植 NSCs 进行示踪观察。

参考文献

- Meairs, S, wahlgren, N, Dimagl, U, *et al.* Stroke research priorities for the next decade - A representative view of the European scientific community[J]. *Cerebrovasc. Dis*, 2006, 22: 75 - 82
- Bjorklund A, Lindvall O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders[J]. *Nat Neurosci*, 2000, 3: 537 - 544
- Gray JA, Hodges H, Sinden J. Prospects for the clinical application of neural transplantation with the use of conditionally immortalized neuroepithelial stem cells[J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1999, 354: 1407 - 1421
- Storch A, Schwarz J. Neural stem cells and neurodegeneration[J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2002, 3: 774 - 781
- Feeney DM, Boyeson MG, Linn RT, *et al.* Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat[J]. *Brain Res*, 1981, 211(1): 67 - 77
- LI Z, Schallert T, ZHENG GZ, *et al.* A test for detecting long - term sensorimotor dysfunction in the mouse after focal cerebral ischemia [J]. *J Neurosci Methods*, 2002, 117: 207 - 2141
- Dario O, Fauza, Russell W., *et al.* Neural stem cell delivery to the spinal cord in an ovine model of fetal surgery for spina bifida[J], *Surgery*, 2008, 144: 367 - 373
- Kadiombo Bantubungi, David Blum, Laetitia Cuvelier, *et al.* Stem cell factor and mesenchymal and neural stem cell transplantation in a rat model of Huntington's disease[J]. *Mol. Cell. Neurosci*, 2008, 37: 454 - 470
- Vladimer Darsalia, There'se Kallur, Zaal Kokaia. Survival, migration and neuronal differentiation of human fetal striatal and cortical neural stem cells grafted in stroke - damaged rat striatum[J]. *European Journal of Neuroscience*, 2007, 26: 605 - 614
- 杨志军,徐如祥. 神经干细胞标记及活体示踪的研究现状及前景[J]. *中华神经医学杂志*, 2005, 4(2): 109 - 114
- 沈雪莉,李莹杰,石玉秀. 神经干细胞分化过程中微管蛋白表达变化的光电镜观察[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2006, 15(1): 13 - 17

(收稿: 2010 - 04 - 09)

(修回: 2010 - 05 - 10)