

- growth and resistance to apoptosis. *Oncol Rep*,2009,22(4):789 – 798
- 7 Meraldi P, Nigg EA. Centrosome cohesion is regulated by a balance of kinase and phosphatase activities. *J Cell Sci*,2001,114(Pt 20):3749 – 3757
 - 8 Fry AM, Mayor T, Meraldi P, *et al.* C – Nap1, a novel centrosomal coiled – coil protein and candidate substrate of the cell cycle – regulated protein kinase Nek2. *J Cell Biol*,1998,141(7):1563 – 1574
 - 9 Haren L, Remy MH, Bazin I, *et al.* NEDD1 – dependent recruitment of the gamma – tubulin ring complex to the centrosome is necessary for centriole duplication and spindle assembly. *J Cell Biol*,2006,172(4):505 – 515
 - 10 Casenghi M, Meraldi P, Weinhart U, *et al.* Polo – like kinase 1 regulates Nlp, a centrosome protein involved in microtubule nucleation. *Dev Cell*,2003,5(1):113 – 125
 - 11 Rapley J, Baxter JE, Blot J, *et al.* Coordinate regulation of the mother centriole component nlp by nek2 and plk1 protein kinases. *Mol Cell Biol*,2005,25(4):1309 – 1324
 - 12 Wang Y, Zhan Q. Cell cycle – dependent expression of centrosomal ninein – like protein in human cells is regulated by the anaphase – promoting complex. *J Biol Chem*,2007,282(24):17712 – 17719
 - 13 Song Y, Zhao C, Dong L, *et al.* Overexpression of cyclin B1 in human esophageal squamous cell carcinoma cells induces tumor cell invasive growth and metastasis. *Carcinogenesis*,2008,29(2):307 – 315

(收稿:2010 – 09 – 25)

(修回:2010 – 10 – 20)

小肠 RNA 对缺血再灌注条件下移植小型猪骨髓内皮祖细胞的体外干预效应观察

程 康 王海昌 周 祥 宗小娟 曾桂英

摘 要 **目的** 观察小肠 RNA 对小型猪骨髓内皮祖细胞(EPCs)生长的影响及适宜浓度,以及小肠 RNA 对缺血再灌注条件下移植 EPCs 的干预效应。**方法** 通过 Ficoll 方法分离,差速贴壁纯化,诱导生成猪 EPCs,分离提纯大鼠小肠 RNA。设立不同浓度 RNA 组,观察其对 EPCs 生长增生等细胞功能的影响;依据适宜浓度,设立小肠 RNA 预处理组、缺血再灌注后加小肠 RNA 组、单纯小肠 RNA 孵育组、单纯缺血再灌注组和正常对照组,观察细胞生长曲线和 LDH 变化,还原酶法测量 NO、NOS,观察 EPCs 的分泌功能。应用流式细胞仪观察 EPCs 凋亡情况,Western Blotting 观察 EPCs 表面 Flk – 1 的表达差异。**结果** 小肠 RNA 在 20 μg/ml 左右浓度促 EPCs 增生作用最明显;小肠 RNA 预处理组 EPCs 的 Flk – 1 水平上调,EPCs 凋亡较少,LDH 和 iNOS 生成明显低于单纯缺血再灌注组和缺血再灌注后添加小肠 RNA 组,但高于正常对照组和单纯小肠 RNA 处理组。**结论** 适宜浓度的小肠 RNA 可以促进 EPCs 的增生;小肠 RNA 预处理可以通过上调 EPCs 表面 Flk – 1 水平,减少凋亡和分泌不利因子等机制增强 EPCs 抵抗缺血再灌注后移植的微环境改变的不利影响。

关键词 内皮祖细胞 缺血再灌注损伤 小肠 RNA

Interfering Effect of Intestine RNA on Marrow – derived Endothelial Progenitor Cells of the Minipig Endured Ischemia and Reperfusion.

Cheng Kang, Wang Haichang, Zhou Xiang, Zong Xiaojuan, Zeng Guiying. Department of Cardiology, Xijing Hospital, Shanxi 710032, China

Abstract Objective To observe the growth and ideal content of marrow – derived endothelial progenitor cells (EPCs) of the minipig affected by intestine RNA, and study the interfering effect of intestine RNA on EPCs transplantation endured ischemia reperfusion injury (IRI). **Methods** We induced minipig EPCs by Ficoll separation method and purification based on different adherence rate, and separated the purified rat intestine RNA. We set different content of RNA groups to observe the effect on EPCs growth:group of intestine RNA pretreatment, group of adding intestine RNA after ischemia and reperfusion, group of incubation only with intestine RNA, group of simply ischemia and reperfusion, and normal control. The growth curve of the cells and content of LDH were detected. We measured NO, NOS with the deoxidize – enzyme methods to observe the secretion function of EPCs. Apoptosis situation was observed with flow cytometry, and Flk – 1 expression on the surface of EPCs with western blotting. **Results** The obviously stimulative effect of intestine RNA on EPCs growth was about 20 μg/ml. The expression of Flk – 1 was up – regulated in the group pretreated with intestine RNA, with less apoptosis of

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370581)

作者单位:710032 西安,第四军医大学西京医院心脏内科(程康、王海昌、周祥、曾桂英);放射医学教研室(宗小娟)

通讯作者:程康,电子信箱:chengkang2009@foxmail.com

EPCs. The amount of LDH and iNOS formation was significantly less than that in the simply ischemia and reperfusion group and treatment with adding intestine RNA after ischemia and reperfusion group, but higher than that in the normal control group and simply intestine RNA treatment group. **Conclusion** Ideal content of intestine RNA can promote the proliferation of EPCs. Intestine RNA pretreatment may protect EPCs by increasing the tolerance of EPCs to IRI and change of microenvironment by up-regulation of Flk-1, reducing apoptosis and down-regulation of bad factor formation.

Key words Endothelial progenitor cells; Ischemia-reperfusion injury; Intestine RNA

内皮祖细胞(EPCs)是胚胎发育早期参与血管发生(vasculogenesis)的最重要的干细胞。最新研究认为,微环境对于决定干细胞的命运比干细胞本身更重要,微环境改变对干细胞的定向分化可能起到关键性作用,但同时也可能对干细胞的生长增生和功能产生负面影响,这种“双面”效应尚未引起研究者的足够重视^[1]。还有的研究提示,心脏中存在固有的多能干细胞,并可能参与心脏损伤后的修复,这些细胞在心脏缺血再灌注(ischemia-reperfusion injury, IRI)中无疑将面临损伤及随后的微环境改变^[2,3]。结合前期实验中发现小肠RNA可以促进辐射损伤后肠道损伤修复的结果,本试验模拟心脏缺血再灌注后可能引起的局部微环境改变,进行小肠RNA对EPCs的药物干预效应观察,摸索EPCs在IRI患者中移植的临床应用方法。

材料与方法

1. 骨髓EPCs的分离、纯化与鉴定:选取6只健康雄性中国实验小型猪(体重20kg左右)髂后上棘,常规穿刺抽取骨髓,采用Ficoll密度梯度离心法分离出单个核细胞,计算存活细胞数,将其以 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 浓度接种在未包被的50ml塑料有机培养瓶(Gibco),瓶中含有10% FBS(Gibco)的DMEM培养基。贴壁4h后将培养液转入另一培养瓶中继续贴壁培养,绝大多数纤维细胞、巨噬细胞和成熟内皮细胞因黏附于前一培养瓶而被去除,剩下的细胞继续培养和诱导分化。24h后收集培养瓶中未贴壁细胞同样以 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 浓度接种另一个培养瓶,两组均加入专门的培养基DMEM(recombinant porcine VEGF, 10ng/ml, Australia TBDscience; recombinant porcine bFGF, 10ng/ml, Australia TBDscience)继续培养。3天更换1次培养液。另设24孔培养板铺设盖玻片后以 $1 \times 10^4/\text{ml}$ 同样分别接种两组细胞,处理与两组完全相同,于培养的7天分别取出盖玻片进行CD133+flk1, CD133+CD31, CD133+Ⅷ因子及DiI-acLDL+Flk-1激光共聚焦鉴定。

2. 小肠RNA的提取纯化及纯度鉴定:参照本实验室以往的小肠RNA改进提取法^[6],取SD大鼠2只,去头活杀后取小肠,分别加入变性液(盐酸胍194g加入去离子水约40ml,依次加入柠檬酸三钠2.16g, Sarcosine Na 1.44g, β -巯基乙醇2.3ml,磁力搅拌器充分混匀后,用去离子水定容至288ml;测pH=6.0),经NaAc,水饱和酚和氯仿-异戊醇反复抽提和离心后,获得小肠RNA悬液。以紫外分光光度计(Bio-RAD)

进行光密度扫描,测定其纯度和浓度。

3. 小肠RNA作用于EPCs的适宜浓度筛选:在以往的文献报道中认为小肠RNA可以促进细胞增生,小肠RNA作用于培养细胞的适宜浓度在 $10 \sim 30 \mu\text{g}/\text{ml}$ ^[7,8],故选择生长良好的一瓶细胞,消化重悬细胞后,以 $1 \times 10^3/\text{ml}$ 浓度接种于24孔板,依据测得小肠RNA浓度,分别按5、10、20、30、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度加入24孔板中,保持每孔总培养液量为500 μl ,设立正常对照组。依次每日取3孔,消化每块板中3个孔内的细胞并计数,待细胞长满时,停止计数,绘制生长曲线。

4. 实验分组及处理:选取生长良好的细胞消化重悬后以 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 接种于6孔板,分别设立①正常对照组;②单纯小肠RNA处理组;③IRI后添加小肠RNA组;④单纯IRI组;⑤小肠RNA预处理24h后IRI组。各组中小肠RNA的浓度依照前期实验获得的有效浓度 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 添加。缺血时间根据前期研究结果,均按3h进行,再灌注进行21h,然后送检^[9,10]。另以 $1 \times 10^4/\text{ml}$ 接种于24孔板,依照前面相同处理分5组,每组设立3个复孔,缺血开始24h后进行MTT实验观察,培养1周动态观察细胞生长曲线。

5. 各组培养液中NO、NOS和LDH含量的测量:完成IRI后24h,即从6孔板中各组取培养液400 μl ,分别以硝酸还原酶法和化学比色法,按照NO、NOS和LDH试剂盒(南京建成生物工程研究所)步骤进行检测及NOS分型。最后对所取培养液进行蛋白定量检测、校正后进行定量比较NO、NOS、LDH的含量。

6. 细胞凋亡的检测:进行各组培养液中NO、NOS和LDH含量检测后,将剩下的细胞进行消化,重悬至 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 浓度送流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

7. Western Blotting:收集细胞,经细胞裂解液裂解后,取总蛋白20 μg 经SDS-PAGE凝胶电泳分离后转移至PVDF膜,然后用含5%脱脂奶粉的PBST室温封闭1h,洗膜后分别加入小鼠多克隆一抗Flk-1(Santa Cruz, CA),于4℃孵育过夜。洗膜后加入HRP标记的兔抗鼠二抗(Zymed), 37℃摇床孵育1h,用免疫印迹化学发光试剂进行放射自显影。统计学处理:应用SPSS13.0软件进行数据处理,采用单因素方差分析,结果以均值 $\pm$ 标准($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为对比组之间差异有统计学意义。

结 果

1. EPCs表面生物学标志的荧光标记及激光共聚焦检测:照片中绿染的分别是FITC标记的Flk-1, CD31和Ⅷ因子,红染的分别是若丹明标记的CD133

和 DiI - acLDL。4 组照片均为培养 7 天时,EPCs 双标后激光共聚焦(400 倍)检测阳性结果(图 1)。

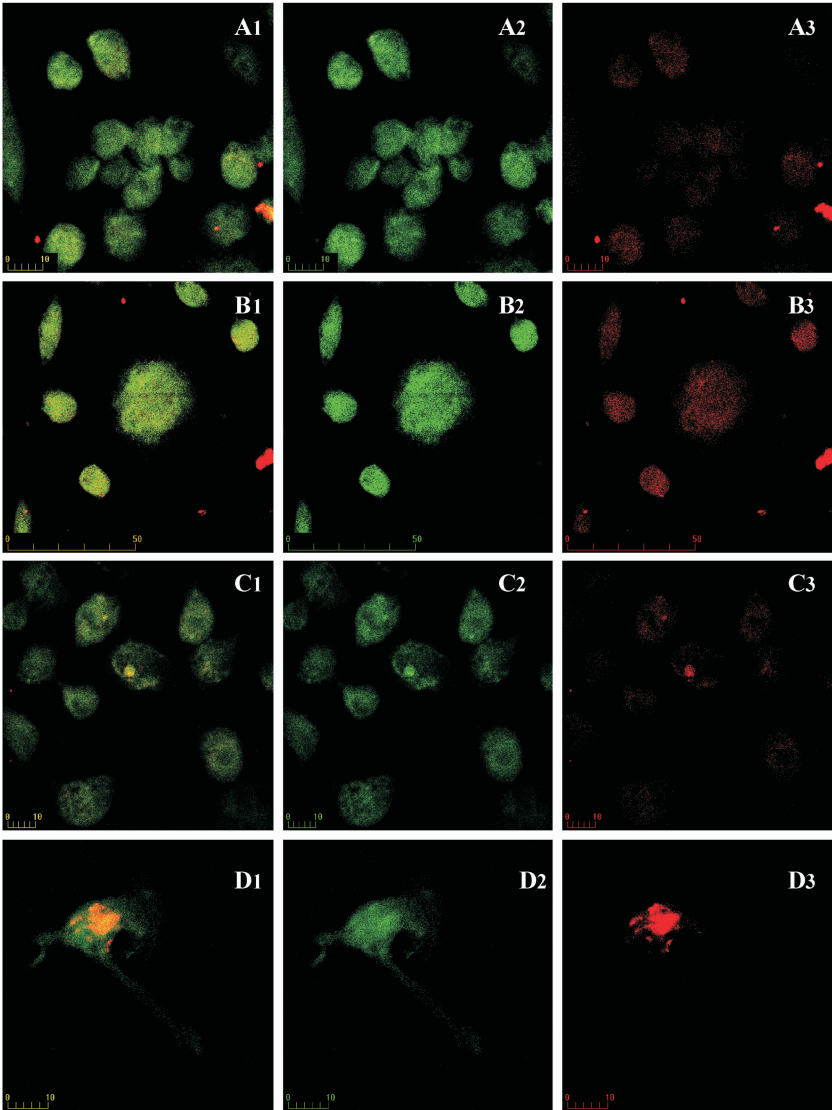


图 1 培养 7 天时 EPCs 表面生物学标志激光共聚焦检测结果
A1. CD133 + VIII 双标; A2. 标记; A3. CD133 标记; B1. CD133 + flk1 双标; B2. flk1 标记; B3. CD133 标记;
C1. CD133 + CD31 双标; C2. CD31 标记; C3. CD133 标记; D1. DiI - acLDL + CD31 双标; D2. FLK1 标记;
D3. DiI - acLDL 标记. A、B、C、D. 7 天培养(HE × 400)

2. 小肠 RNA 纯度及浓度:提取的小肠 RNA 经无菌生理盐水稀释后,用 SmartSpecTM3000 紫外分光光度计(Bio - RAD)进行光密度扫描,呈典型的核酸吸收光谱,在 260nm 处有最大吸收峰,测得 A260/A280 = 2.05,表明所提取的小肠 RNA 不含蛋白质和 DNA,纯度较高。按公式计算样品实际浓度为 1.0821 μ g/ml(表 1)。

3. 小肠 RNA 适宜浓度的筛选:本实验结果中细胞生长曲线结果显示 RNA 浓度为 20 μ g/ml 时,对

表 1 小肠 RNA 浓度测定结果					
项目	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	测量浓度 (μ g/ml)	实际浓度 (μ g/ml)
小肠 RNA	0.541	0.264	2.05	21.6411	1.0821

EPCs 细胞增生促进作用最明显,其他组依次为 10 μ g/ml、30 μ g/ml 和 5 μ g/ml,而 40 μ g/ml 对 EPCs 生长产生明显的抑制作用(图 2)。

4. 各组 IRI 后生长曲线和 IRI 后 MTT 结果:小肠

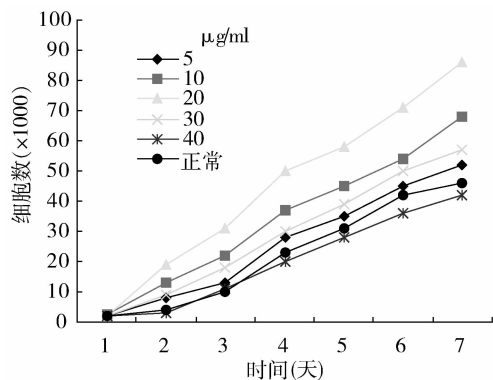


图2 小肠 RNA 适宜浓度筛选

RNA 可以在一定程度上促进 EPCs 增生,单纯添加小肠 RNA 组增生能力在短期内与正常组相似,培养 1 周左右开始高于正常对照组 ($P < 0.05$);EPCs 经历 IRI 后,小肠 RNA 预处理组的 EPCs 增生能力明显好于 IRI 后添加 RNA 组和单纯 IRI 组,但明显低于正常组 ($P < 0.01$,图 3、图 4)。在 IRI 后的第 1 天,添加小肠 RNA 组的细胞增生是各组中最低的,以后才慢慢恢复。

5. NO, NOS, LDH 结果: NO: 处理后各组 NO 明显高于正常对照组 ($P < 0.01$), 小肠 RNA 预处理组 NO 明显高于其他各组 ($P < 0.01$)。TNOS: RNA 预处理组明显高于 IRI 后添加 RNA 组,但明显低于单纯 IRI 组 ($P < 0.01$), 单纯 IRI 组高于其他各组 ($P < 0.01$)。iNOS 及 iNOS/TNOS: 各组间 iNOS 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 小肠 RNA 预处理组 iNOS/TNOS 明显低于 IRI 后添加 RNA 组,但高于正常对照组和单纯

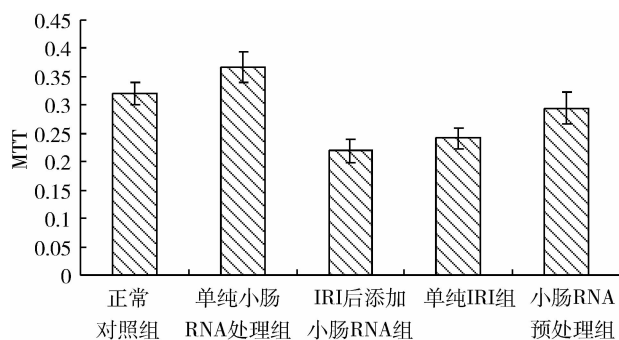


图3 各组 MTT 结果

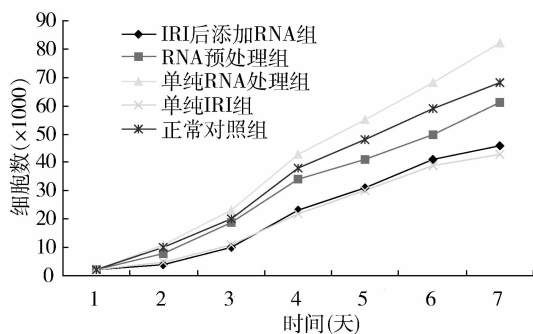


图4 各组细胞生长曲线

添加 RNA 组 ($P < 0.01$), 而 IRI 后添加小肠 RNA 组该比值是最高的 ($P < 0.01$)。LDH: 小肠 RNA 预处理组 LDH 低于单纯 IRI 组和 IRI 后添加小肠 RNA 组 ($P < 0.01$), 但高于单纯小肠 RNA 组和正常对照组 ($P < 0.01$); 例外的是 IRI 后添加 RNA 组的 LDH 水平高于单纯 IRI 组 ($P < 0.01$, 表 2)。

表2 IRI 对 EPCs 功能的影响及小肠 RNA 干预效应 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

分组	正常对照组	单纯 RNA 处理组	IRI 后添加 RNA 组	单纯 IRI 组	RNA 预处理后 IRI 组
LDH (U/ml)	1997 $\pm$ 117 ^b	2041 $\pm$ 83 ^b	3133 $\pm$ 91 ^b	2782 $\pm$ 127 ^b	2456 $\pm$ 70
NO (μ mol/L)	29.70 $\pm$ 3.68 ^b	50.93 $\pm$ 3.06 ^b	62.10 $\pm$ 3.85 ^b	59.26 $\pm$ 3.80 ^b	91.67 $\pm$ 3.40
TNOS (U/ml)	15.30 $\pm$ 1.23	13.41 $\pm$ 1.08	9.48 $\pm$ 1.21 ^b	19.75 $\pm$ 1.35 ^b	14.47 $\pm$ 0.79
iNOS (U/ml)	1.72 $\pm$ 0.68 ^b	3.22 $\pm$ 0.89 ^b	8.18 $\pm$ 1.08 ^a	13.09 $\pm$ 1.32 ^b	10.27 $\pm$ 0.98
eNOS (U/ml)	13.58 $\pm$ 0.97 ^b	10.19 $\pm$ 1.54 ^b	1.32 $\pm$ 0.51 ^b	6.66 $\pm$ 0.97 ^a	4.2 $\pm$ 0.91
iNOS/TNOS (%)	11.12 $\pm$ 3.95 ^b	24.28 $\pm$ 7.74 ^b	86.32 $\pm$ 5.25 ^b	66.27 $\pm$ 4.73	70.99 $\pm$ 5.89

与 RNA 预处理组相比, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

6. 细胞凋亡 (图 5): 结果提示, 单纯小肠 RNA 处理组细胞凋亡与正常对照组无明显差异, 但明显少于 IRI 干预的各组; 小肠 RNA 预处理组细胞凋亡明显低于单纯 IRI 组, 略少于 IRI 后添加小肠 RNA 组, 说明小肠 RNA 预处理可以减少 IRI 导致的细胞凋亡, 保持 EPCs 的生存数量; 但 IRI 后添加小肠 RNA

组 1 天内的细胞凋亡率却是所有组中最高的。

7. 蛋白质印迹法 (western blotting): 单纯添加 RNA 的组比正常组条带要浓; RNA 预处理组条带比 IRI 后添加 RNA 组和单纯 IRI 组表达强度要高。结果提示: RNA 预处理可以上调 EPCs 表面 Flk-1 (KDR) (图 6)。

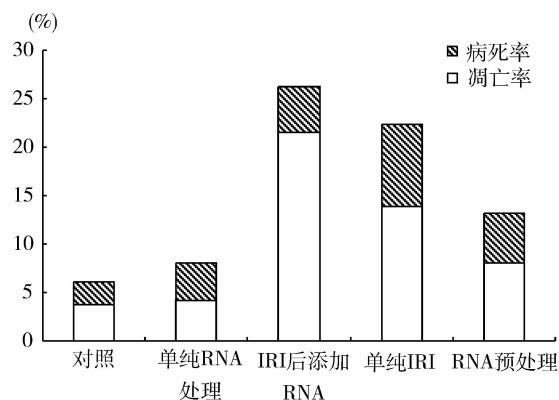


图 5 流式细胞仪检测小肠 RNA 干预研究的 EPCs 凋亡率与病死率

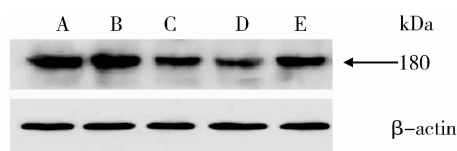


图 6 蛋白质印迹法结果

A. 正常对照组; B. 单纯小肠 RNA 处理组;
C. IRI 后添加小肠 RNA 组; D. 单纯 IRI 组;
E. 小肠 RNA 预处理后 IRI 组

讨 论

EPCs 在出生后血管新生中发挥了重要的作用而引起细胞移植学者的重视,最近的研究认为骨髓来源的 EPCs 可能更多的是发挥了其分泌作用间接参与了损伤局部的修复,而非直接融合到靶部位。还有的学者大胆地提出心脏内存在固有的多能干细胞,在损伤后可多方向分化进行修复工作^[2,3]。许多基因被认为与心血管疾病发生有关, RNAi 技术被认为能够针对性地缄默致病基因,封闭基因表达,能抑制与疾病发生直接相关基因表达的 RNA,可用来治疗由基因突变或过度表达导致的疾病。笔者前期的实验发现小肠 RNA 对肠道辐射损伤的修复有促进作用,因此,尝试在心血管疾病中观察其作用效果。心脏中固有的干细胞和移植到心肌中的 EPCs 无疑将面临 IRI 后的微环境改变,由此涉及到细胞移植时机选择的问题,以及细胞移植配合临床药物治疗的问题,即通过临床药物干预和适当移植时机的选择获得最佳的移植效果和最小的不利影响。因此,临床遇到急性心肌梗死的患者,应尤为重视 4h 内的介入手术或药物溶栓再通血管,不仅可以挽救更多的心肌,同时可能挽救更多的多能干细胞,并可以减少 iNOS, LDH 等有害物质的分泌,降低微环境的改变对干细胞的影响。另

一方面,如果细胞移植后再次出现移植区血管梗塞,应在 4h 之内进行血管再通,才能有利于保护移植 EPCs 的增生和分泌等方面的能力。心肌梗死患者 IRI 的时间与心功能的恢复正相关也许与心脏中固有多能干细胞受 IRI 和微环境改变影响移植 EPCs 的程度有关。

小肠 RNA 在缺血性心脏病治疗中的应用越来越广泛,研究中发现单纯添加小肠 RNA 组增生能力短期内与正常组相似,培养 1 周左右开始高于正常对照组,这点与小肠 RNA 可能通过促进 EPCs 的 VEGF 分泌的机制有关。而将其应用于 IRI 后移植细胞的保护性研究是一种新的尝试。研究发现:缺血再灌注可能诱导 EPCs 死亡和凋亡、增生能力下降,产生 iNOS 增加,分泌有害的 NO 增加,从而可能影响移植效果。小肠 RNA 预处理可以在一定程度上减少 EPCs 分泌 iNOS, LDH 等有害物质的产生,降低微环境改变对干细胞的不良影响。其作用机制可能是通过上调 EPCs 表面 Flk-1 水平,减少细胞凋亡,抑制 iNOS 的生成等,凭此提高 EPCs 抗 IRI 的耐受性,保持细胞的增生能力和正常的分泌等细胞功能。IRI 后添加小肠 RNA 组短期内的细胞增生能力反而是各研究组中最低的,细胞死亡和凋亡程度更严重, TNOS 含量稍低可能与该组死亡细胞较多有关,但 iNOS 的比例却是最高,而且 LDH 含量也是各组中最高的,这提示我们小肠 RNA 预处理的效果要明显好于 IRI 后添加组,且后添加组不仅不能起到保护作用,反而在短期内可能有害,这可能与 IRI 后急性期微环境改变对 EPCs 产生一定的负面影响的同时,添加小肠 RNA 未能选择性地促进有益物质的释放和 mRNA 合成,反而促进了有害物质的生成,进而影响到细胞增生和生存有关,具体机制有待进一步研究。拟在下一步实验中,对提取的小肠 RNA 进行测序和详细分类,观察不同序列的 RNA 片段所产生作用效果的差异,寻找有效的 RNA 片段以对抗 IRI 对 EPCs 造成的不利影响。

综上所述, EPCs 对缺血再灌注的耐受时限约为 4h, 缺血再灌注后添加小肠 RNA 可以通过上调 EPCs 表面 Flk-1 水平、减少 EPCs 凋亡、有害的 iNOS 生成,进而减少有害 NO 的分泌及减少 LDH 生成,促进细胞增生能力和分泌等细胞功能的恢复实现保护 EPCs 的作用,进而可能促进心脏功能的恢复和减少心血管事件发生。

参考文献

- 1 Song X, Zhu C, Doan C, *et al.* Germline stem cells anchored by adherens junctions in the drosophila ovary niches. *Science*, 2002; 296: 1855 - 1857
- 2 Nadal - Ginard B, Anversa P, Kajstura J, Leri A. Cardiac stem cells and myocardial regeneration. *Novartis found Symp*, 2005; 265: 142 - 154; discussion: 155 - 157, 204 - 211
- 3 Urbanek K, Torella D, Sheikh F, *et al.* Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(24): 8692 - 8697
- 4 Michael Kindermann, Christoph Maack, Susanne Schaller, *et al.* Carvedilol but Not Metoprolol Reduces ? - Adrenergic Responsiveness After Complete Elimination From Plasma In Vivo. *Circulation*, 2004, 109: 3182 - 3190
- 5 Marrick L Kukin, Jill Kalman, Robert H Charney, *et al.* Prospective, Randomized Comparison of Effect of Long - Term Treatment With Metoprolol or Carvedilol on Symptoms, Exercise, Ejection Fraction, and Oxidative Stress in Heart Failure. *Circulation*, 1999, 99: 2645 - 2651
- 6 曾桂英, 程康, 任东青, 等. 小肠 RNA 对受照小鼠粒系和巨核细胞系损伤的恢复作用, *中华放射医学与防护杂志*, 2004, 24(6): 513 - 516
- 7 Bulte JW, Kraitchman DL. Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR Biomed*, 2004, 17(7): 484 - 499
- 8 Arbab AS, Wilson LB, Ashari P, *et al.* A model of lysosomal metabolism of dextran coated superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles: implications for cellular magnetic resonance imaging. *NMR Biomed*, 2005, 18(6): 383 - 389
- 9 Esumi, K, M. Nishida, D. Shaw, *et al.* NADH measurements in adult rat myocytes during simulated ischaemia. *Am J Physiol*, 1991, 259: H1743 - H1752
- 10 程康, 贾国良, 王海昌, 等. 美托洛尔对小型猪缺血再灌注损伤后移植内皮祖细胞的保护效应. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(28): 5561 - 5565 (收稿: 2010 - 08 - 23)

BDA 神经示踪研究证实大鼠纹状体神经通路连接

刘冰冰 穆淑花 欧阳丽斯 朱亚西 李可一 詹玛利 刘宗伟 贾 钰 雷万龙

摘 要 目的 为了观察证实纹状体神经元的形态定位和突触连接,以及由此证实神经示踪技术在此领域的实用性和有效性。**方法** 实验借助示踪剂立体定位注射,并结合免疫组化和免疫电镜超微结构技术,实验数据以 SPSS10.0 软件统计处理。**结果** (1)神经示踪剂 BDA 显示较好的定向运送特性,具有敏感和理想的标记效果。借助示踪剂 BDA 注射的逆行单标记实验结果显示纹状体 - SNr 和 - GPe 两类投射神经元的胞体大小和分支数量无明显的形态学差异,在免疫电镜下明显可见阳性树突和树突棘及其所形成的兴奋性突触连接。光镜下可见 BDA 顺行标记的 PF_n 神经元的轴突终末密集分布于纹状体,并在电镜下清晰可见这些阳性终末与纹状体神经元之间的突触连接。(2)神经示踪结合免疫组化双标记显示纹状体 - SNr 和 - GPe 神经元均较少定位于 Patch 间区,而且均与纹状体 Parv 中间神经元之间无明显定性关系,但可见中脑 TH 阳性纤维的密集分布。在电镜超微结构水平可见 BDA 顺行标记的 PF_n 阳性终末分别与纹状体 - 直接通路和纹状体 - 间接通路神经元形成典型的兴奋性突触连接,但与两者之间,及其所属的树突和树突棘之间的突触连接百分率均没有明显的统计学差异($P > 0.05$, $P > 0.05$)。(3)荧光双标记结果显示 BDA 标记的 PF_n 阳性终末和 VGlut2 抗体的免疫标记的背侧丘脑 - 纹状体阳性终末,在纹状体内呈现 95.4% 的共存率,而且后者标记更充分。同时也证实纹状体 - SNr 和 - GPe 两类投射神经元相互之间不显示可见的共存关系。**结论** BDA 为高度敏感的神经示踪剂,能够较为方便和充分地标记目的神经元和突触结构。纹状体 - SNr 和 - GPe 两类投射神经元的形态结构、分布形式无明显的差异。中脑和背侧丘脑神经元均与纹状体神经元之间存在形态学联系,尤其是背侧丘脑神经元与纹状体 - 直接通路和纹状体 - 间接通路神经元之间形成典型的兴奋性突触连接,提示其对纹状体神经元可能具有广泛的兴奋作用。

关键词 神经示踪 免疫组化 免疫电镜

Confirmation of Neural Pathway Connections by BDA Neural Tracing in Rat Striatum. Liu Bingbing, Mu Shuhua, Ouyang Lisi, Zhan Mali, Liu Zongwei, Jia Yu, Lei Wanlong. *Department of Anatomy, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat - sen University, Guangdong 510080, China*

Abstract Objective To observe and confirm morphologic localization and synaptic contact with striatal neurons, and to confirm the

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30770679、20831006、30570572)

作者单位:510080 广州,中山大学中山医学院人体解剖学教研室

通讯作者:雷万龙,电子信箱:leiwl@mail.sysu.edu.cn