

骨髓间充质干细胞对血管性痴呆大鼠海马 CA1 区突触素表达的影响

金 善¹ 赵忠新¹ 邵福源¹

摘要 目的: 观察静脉注射同种异体骨髓间充质干细胞对血管性痴呆(VaD)模型大鼠海马 CA1 区突触素表达的影响。方法: 体外分离、扩增大鼠骨髓间充质干细胞(MSC), 并用 BrdU 标记。大鼠双侧颈总动脉结扎法制备血管性痴呆模型。1 周后经尾静脉注射 MSCs, 观察注射后 4 周大鼠海马 CA1 区突触素(SYN)表达的变化。结果: 4 周后 VaD 大鼠海马 CA1 区锥体细胞层内 SYN 表达较正常对照组减少, 差异有显著性($P < 0.01$); MSCs 注射后 4 周, 大鼠海马 CA1 区可见荧光标记的 MSCs, SYN 表达较未注射组增加, 差异有显著性($P < 0.01$)。结论: 静脉注射 MSCs 使 VaD 大鼠海马 CA1 区突触素表达增加。

关键词 间充质干细胞; 血管性痴呆; 突触素; 海马

中图分类号: R74, R49 文献标识码: A 文章编号: 1001-1242(2006)-08-0683-03

Synaptophysin expression in the CA1 region in hippocampus of vascular dementia rats after intravenous administration of bone marrow mesenchymal stem cells/JIN Shan, ZHAO Zhongxin, SHAO Fuyuan/Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006, 21(8):683-685

Abstract Objective: To explore the effects of intravenous injection of xeno-isotype bone marrow mesenchymal stem cells(MSCs) on synaptophysin expression in the CA1 region in hippocampus of VaD rats. **Method:** MSCs isolated and expanded in vitro were labelled with BrdU. Rats which received permanent bilateral carotid arteries ligation were intravenously injected 3×10^6 MSCs. Synaptophysin expression in the CA1 region in hippocampus was observed at 4 weeks after injection. **Result:** Synaptophysin expression was significantly decreased in the CA1 pyramidal cell layer of VaD rats compared with that of control group rats at 4 weeks after injection($P < 0.01$). BrdU-labelled MSCs were found in hippocampus at 4 weeks after intravenous injection, and synaptophysin expression was significantly increased compared with that of VaD rats($P < 0.01$). **Conclusion:** MSCs make synaptophysin expression increased in VaD rats.

Author's address Dept. of Neurology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai, 200003

Key words mesenchymal stem cell; vascular dementia; synaptophysin; hippocampus

血管性痴呆(vascular dementia, VaD)是指脑血管病所致的痴呆, 是老年期痴呆的主要类型之一。VaD 模型的病理学研究显示, 慢性低灌注导致脑内神经元缺失, 神经元缺失会导致突触数量减少, 这可能是出现学习记忆障碍的原因之一。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)是一类具有多向分化潜能的干细胞, 经静脉移植后的骨髓间充质干细胞在血管性痴呆大鼠海马等区域可以向神经元分化, 并且改善大鼠的学习记忆能力^[1], 但 MSCs 移植后是否对突触的数量产生影响, 目前尚未见相关报道。突触素(synaptophysin, SYN)是一种位于突触前囊泡膜上固有的钙结合蛋白, 其数量和分布密度可间接反映突触的数量和密度。本实验拟采用静脉注射同种异体骨髓间充质干细胞, 观察其对血管性痴呆模型大鼠海马 CA1 区 SYN 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要实验试剂和仪器: MesencultTM 间充质干细胞基础培养基(Stem Cell 公司)、间充质干细胞刺激添加剂(Stimulatory Supplements, Stem Cell 公司)、一抗(SYN 兔抗大鼠血清, 武汉博士德公司)、即用型 SABC 试剂盒(武汉博士德公司)、Y-迷宫(张家港生物医学仪器厂)。

1.1.2 实验动物: 健康雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠, 体重 250—300g 左右。体重 100g 左右的清洁级 SD 大鼠, 雌雄不限, 用于骨髓细胞的采集。

1.2 方法

1.2.1 骨髓间充质干细胞的培养扩增和标记: SD 大鼠腹腔注射 5-氟尿嘧啶(150mg/kg), 48h 后腹腔注

1 第二军医大学长征医院神经内科, 上海凤阳路 415 号, 200003

作者简介: 金善, 女, 主治医师

收稿日期: 2005-11-24

射麻醉(10%水合氯醛, 4mg/kg), 无菌截取股骨, 并以 MesencultTM 基础培养液冲洗骨髓腔, 获得骨髓液。按 2:1 比例加入 Ficoll 分离液(相对密度 1.077)行梯度离心(1500r/min, 20min), 取中间白膜的单核细胞层, PBS 冲洗后调整细胞浓度为 $5 \times 10^6/\text{ml}$, 接种于含有 MesencultTM 培养液(添加 Stimulatory Supplements)的 T25 培养瓶中, 37°C 、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱中孵育, 3 天换液 1 次, 去掉未贴壁细胞。待细胞融合率达 80% 时, 用 2.5g/L 的胰蛋白酶消化, 按 1:3 比例传代扩增。选取扩增后第 2 代的 MSCs, 加入 5-溴-2-脱氧尿苷 (5-Bromo-2-deoxy-uridine, BrdU), 终浓度为 $5 \mu\text{mol/L}$, 继续传代。收集扩增后第 5—7 代 MSCs, 胰蛋白酶消化, PBS 漂洗 3 次, 制成单细胞悬液, 台盼蓝染色计数。

1.2.2 VaD 模型的制备及动物分组: VaD 大鼠模型的制备: 采用双侧颈总动脉结扎法制作血管性痴呆模型。大鼠腹腔麻醉(10%水合氯醛, 4mg/kg), 颈部正中切口, 7 号手术线结扎双侧颈总动脉。大鼠进行 Y 迷宫训练 1 周, 取达到标准后的大鼠 30 只, 随机分为对照组、VaD 组和 MSCs 治疗组。对照组除不结扎颈总动脉外其余操作同 VaD 组。MSCs 组于颈总动脉结扎后 1 周经尾静脉注射 1ml MSCs, 细胞数量为 $3 \times 10^6/\text{ml}$ 。

1.2.3 大鼠脑组织取材及切片: 于 MSCs 注射后 4 周各组大鼠均以 4% 的多聚甲醛心脏灌注。取大鼠两侧的海马组织 20% 蔗糖溶液 4°C 浸置 24h, 冰冻后连续冠状切片, 片厚 $30 \mu\text{m}$ 。每隔 3 张选取切片 1 张。

1.2.4 免疫组织化学染色: BrdU 免疫荧光染色: 切片入 10% 山羊血清室温孵育 4h; 再入 1:10 稀释的小鼠抗 BrdU 单克隆抗体(Roche 公司), 37°C , 孵育 30min; PBS 洗片 3 次, 每次 3min; 再入 1:10 稀释的结合有 FITC 的山羊抗小鼠二抗(武汉博士德公司), 37°C , 孵育 30min; PBS 漂洗后中性甘油明胶缓冲液封片, 荧光显微镜下观察。

突触素免疫组织化学染色: 冰冻切片 PBS 漂洗后加入兔抗大鼠 SYN 抗体(1:100 稀释, 武汉博士德公司), 4°C 孵育 24h; PBS 漂洗 3 次, 每次 3—5min; 加入生物素标记二抗(1:100 稀释)室温孵育 1h; 链酶亲和素-抗生物素-过氧化物酶溶液, 室温孵育 10min; DAB 显色, 室温下 10—20min; (以上各步骤之后均经 PBS 漂洗 1 次)中性甘油明胶封片。光学显微镜下观察, 在 20×10 光镜下每张切片在海马 CA1 区锥体细胞层随机选取 5 个相邻视野, IDA-2000 型图像分析系统测定每个视野内阳性产物的

平均光密度值 OD。

1.3 统计学分析

上述结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析(SPSS11.5 软件)。

2 结果

2.1 免疫荧光染色结果

大鼠海马内可以见到被绿荧光标记的 MSCs(图 1, 见前置彩色插页 7), 证实经静脉移植的 MSCs 越过血脑屏障迁移至大鼠脑内。

2.2 突触素免疫组化染色结果

对照组突触素免疫反应阳性产物为棕黄色点状或颗粒状沉积, 主要分布于神经元周围, 衬托出神经元胞体的轮廓; 颗粒大小不一, 白质、血管及胶质细胞不着色(图 2, 见前置彩色插页 7); VaD 组在 4 周后, 海马锥体细胞层内阳性产物出现部分脱失, 阳性产物连续性、神经元胞体的轮廓被破坏(图 3, 见前置彩色插页 7); 而在 MSCs 治疗组海马锥体细胞层内阳性产物脱失明显减轻, 连续性、神经元胞体的轮廓保持相对较好(图 4, 见前置彩色插页 7)。

注射后 4 周各组海马锥体细胞层 SYN 表达水平的比较显示, VaD 组和 MSCs 治疗组 SYN 阳性产物平均光密度值均低于对照组($P < 0.01$); MSCs 治疗组的平均光密度值较 VaD 组升高, 差异有显著性($P < 0.01$), 见图 5。

图 5 MSCs 注射后 4 周大鼠海马 CA1 区 SYN 阳性产物的平均光密度值

①与对照组比较 $P < 0.01$; ②与 VaD 组比较 $P < 0.01$

3 讨论

SYN 是一种位于突触前囊泡膜上固有的分子量为 38kDa 的钙结合蛋白。1985 年由德国研究人员在牛脑中发现并提纯, 将其命名为 synaptophysin。国内译为突触素或突触囊泡蛋白、突触生长素和突触体素等。在胚胎发育中, 突触素的表达和突触的形成是一致的, 显示突触素是突触发生的一个标志。SYN 作为突触前囊泡膜的组成成份, 参与钙离子依赖性的神经递质释放过程, 并且与其他囊泡蛋白共同参与短时程及长时程突触可塑性的调节。突触素作为突触囊泡的一种特异性标志蛋白, 其数量和分

布密度可间接反映突触的密度。因此, SYN 的表达可以作为突触前终末的特异性标记物, 用来检测突触的数量和分布^[1]。大量研究表明, 学习记忆与中枢神经系统突触的结构和功能的可塑性密切相关。在衰老及其他病理情况下, 长时程增强(long term potential, LTP)的能力下降, 突触的含量及囊泡数量也逐渐减少。有研究者发现学习记忆减退大鼠较记忆正常大鼠和青年大鼠海马 CA1 区突触数量及密度明显减少, 单个突触平均面积明显增大, 且与行为损害显著相关^[2]。我们在实验中也发现 VaD 大鼠于术后 4 周与学习记忆密切相关的海马区 SYN 表达较正常对照组减少, 提示存在突触的丢失, VaD 大鼠突触素的减少可能与下列原因有关: ①VaD 大鼠发生缺血性脑损害导致海马内各层传入纤维发生逆行性退变, 由于轴突在缺血损害后发生了跨突触的变性或由于突触后神经元的缺失导致功能性突触前成分减少所致; ②由于缺血导致神经元物质代谢和蛋白质合成能力下降, 轴浆运输障碍, 从而对损伤的突触重建产生影响。缺血所致的突触丢失可能是 VaD 大鼠学习记忆障碍的机制之一。

MSCs 是一类具有多向分化潜能的干细胞, 近年来的研究表明体外培养的 MSCs 不仅可以向中胚层的骨、成骨、脂肪、肌肉细胞分化, 还可以跨胚层向外胚层的神经细胞分化^[3-4]。体内研究也证实, 在一定条件下 MSCs 可以迁移至脑内, 在脑内存活并向神经细胞分化。Kopen 等^[5]首次将提纯的骨髓间充质干细胞注入新生胎鼠的侧脑室内, 发现骨髓间充质干细胞迁移至前脑和小脑, 分布于 Calleja 岛、嗅球及小脑内颗粒层等神经元密集区域和小脑外颗粒层。这一分布与胎儿早期的发育过程十分相似, 提示骨髓间充质干细胞具有与神经祖细胞相似的行为。Chen 等^[6]将同种异体 BMSCs 移植给一侧大脑中动脉缺血/再灌注模型大鼠, 发现 MSCs 迁移至缺血部位, 存活并表达神经细胞的表面标志, 细胞移植后缺血大鼠的运动功能得到改善。国内高唱等^[7]在 VaD 大鼠模型的体内研究中也证实 MSCs 在脑内存活并分化为神经元及神经胶质细胞, 并且改善了大鼠的学习记忆功能。我们的实验同样也发现 BrdU 标记的 MSCs 经静脉移植后迁移至海马区域, 但移植后 VaD 大鼠脑内的突触数量是否发生了变化, 目前尚未见相关报道。本实验以突触素的表达作为观察指标, 间接反映突触的密度和数量, 同时选取学习记忆的关键部位, 同时也是缺血的敏感区域——海马作为观察目标, 结果显示 MSCs 移植后海马 CA1 区锥体细胞层内突触素表达较 VaD 组大鼠明显增强, 提

示 MSCs 使突触的数量增加。

外源性的 MSCs 使 VaD 大鼠海马突触数量增加的原因可能是 MSCs 在缺血大鼠脑内存活并分化为新生的神经元, 这些新生的神经元可能替代受损及缺失的神经元, 并且与宿主细胞建立了突触联系, 然而目前的研究尚缺乏充足的证据来证实外源性干细胞能够与宿主细胞建立突触联系。有研究发现体外培养的 MSCs 能够分泌白介素 (IL)-6、IL-7、IL-8、IL-11、IL-12、IL-14、IL-15, 巨噬细胞克隆刺激因子, Flt-3 配体以及干细胞因子等^[6,9], 这些细胞因子可以促进鼠类海马神经前体细胞的生存、生长及分化, MSCs 还含有儿茶酚胺类物质, 可以释放某些特定的神经递质^[8]。体内实验显示 MSCs 还可以增加脑源性神经营养因子、神经生长因子、血管内皮生长因子的分泌^[9]。因此 MSCs 移植后使突触数量增加的原因更可能是这些营养因子的作用, 有可能是这些营养因子促使缺血脑组织内原有的神经干细胞/或神经前体细胞向成熟神经元分化, 新生的神经元之间或与周围的神经元建立了新的突触联系, 从而使突触素表达增加。至于 MSCs 如何跨越血脑屏障, 分化后的 MSCs 是否完全具备成熟神经元的功能, 是否与宿主细胞建立了突触联系, 仍有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Calhoun ME, Juck M, Martin LJ, et al. Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses [J]. J Neurocyt, 1996, 25: 821—828.
- [2] 洪岸, 姚志斌. 老年大鼠学习记忆减退与海马结构的突触素改变[J]. 解剖学报, 1996, 27(2): 164—167.
- [3] Sanchez RJ, Song S, Cardozo PF, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro [J]. Exp Neurol, 2000, 164(2): 247—256.
- [4] Dale W, Emily JS, Darwin J, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons [J]. J Neuro Sci Res, 2000, 61: 364—370.
- [5] Kopen GC, Prochop DJ, Phinney DG, et al. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(19): 10711—10716.
- [6] Chen J, Li Y, Wang L, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats [J]. Stroke, 2001, 32(4): 1005—1011.
- [7] 高唱, 王景周, 范文辉, 等. 静脉注射骨髓间充质干细胞对血管性痴呆模型大鼠认知障碍的影响 [J]. 中华老年医学杂志, 2004, 23: 808—812.
- [8] Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells [J]. Exp Biol Med, 2001, 226 (6): 507—520.
- [9] Li Y, Chen J, Chen XG, et al. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: Neurotrophins and functional recovery [J]. Neurology, 2002, 59: 514—523.