

# 局灶性脑缺血对内源性神经干细胞激活及迁移的影响\*

刘 罡<sup>1</sup> 吴 毅<sup>1,2</sup>

二十世纪最后十年, 神经科学的研究突飞猛进, 使得以损伤细胞再生为基础的治疗策略成为可能: 内源性神经干/神经祖细胞被发现长期存在于成年哺乳动物的室管膜下区(subventricular zone, SVZ)和海马齿状回(dentate gyrus, DG)亚颗粒细胞层(subgranular zone, SGZ)并在基础的水平上不断增殖分化为神经元和神经胶质, 这一发现也最终被证实<sup>[1-2]</sup>。其后陆续的研究在成年哺乳动物的大脑皮质和纹状体也发现了神经前体细胞<sup>[3]</sup>。另有研究表明, 在灵长类动物<sup>[4]</sup>和人类<sup>[5]</sup>中枢神经系统存在连续的神经发生, 这些研究使人们长久以来坚信的中枢神经系统不可再生的观点终于有所改变。

## 1 内源性干细胞在中枢的定位

目前认为, 成年哺乳动物大脑内的内源性神经干细胞主要存在于SVZ和DG区。SVZ区主要包含了4种细胞:A、B、C、E<sup>[6]</sup>, 其中B细胞, 亦即SVZ区的星形胶质细胞被认为是真正的神经干细胞。由他们分化而来的神经母细胞(A细胞)呈链状沿着吻状迁移流(rostral migratory stream, RMS)向嗅球迁移并分化为中间神经元<sup>[7]</sup>进而整合进皮质的气味分辨区和海马的记忆回路。神经母细胞的这一迁移趋势并不依赖于嗅球的存在与否, 从而表明迁移是神经干细胞固有的特性<sup>[8]</sup>。C细胞位于迁移链的基底部, 具有高增殖潜能, 因而被认为是介于A细胞和B细胞两者之间的过渡细胞形态。

在DG区, 神经祖细胞定位于颗粒细胞层下区, 这些细胞不断地增殖形成的新细胞并向颗粒细胞层(granular cell layer, GCL)迁移<sup>[9]</sup>。与SVZ区相类似, DG区的神经祖细胞也表达神经胶质原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)<sup>[10]</sup>, 因而也有可能是分娩后残余的放射状胶质细胞(放射状胶质细胞被认为是神经元和星形胶质细胞的前体细胞)。与SVZ区多向性和多能性的神经干细胞相比, DG区的细胞比较有限, 因而被认为更有可能是神经祖细胞。随着年龄的增长, DG区的神经干细胞增殖能力逐渐下降<sup>[11]</sup>, 表明他们并不具有终身自我更新的能力。就DG区产生的细胞的命运, 目前存在如下争论: 有研究表明, 绝大多数新生的DG区细胞在早期就会死亡, 因而不可能建立有效的突触联系<sup>[12]</sup>, 然而也有研究认为新生成的DG区神经元可以形成突触联系甚至具有电生理活性<sup>[13]</sup>成年哺乳动物脑内第三处具有增殖活性的区域是位于包绕海马的后侧脑室周边区(posterior periventricular, PPv)室管膜下层, 该区域被认为存在有能够更新海马神经元的神经干细胞<sup>[14]</sup>。

成年哺乳动物大脑内的这些具有进一步分化能力的细胞的存在意义, 有可能是通过持续的增殖、分化以补充大脑不断死亡丧失的细胞, 从而保持局部细胞总量的大致平衡。DG区颗粒细胞层的神经元持续地死亡, 而SGZ区的神经祖细胞有可能以和成熟神经元死亡同样的速度增殖产生新的

神经元, 以保持DG区神经元数目的平稳<sup>[15]</sup>。同样地, SVZ区新产生的细胞也可能用于不断补充嗅球丧失的神经元。另一个方面, 这些细胞的存在也可能作为中枢神经系统遭受急性损伤时的反应细胞, 在神经元因为损伤而死亡时被激活、增殖进而向损伤区迁移, 从而部分恢复损伤区的神经元数目的下降, 减少由损伤带来的神经功能的丧失。

## 2 缺血性脑卒中后的内源性神经再生

自内源性神经干细胞被发现以来, 众多的科研人员对中枢神经系统损伤后的神经再生进行了数目庞大的研究。大量研究表明, 各种中枢神经损伤都能够激活内源性的神经干/祖细胞的增殖, 如脑外伤<sup>[16]</sup>、癫痫发作<sup>[16]</sup>、局灶性和全脑性缺血<sup>[17]</sup>等。其中, 局灶性缺血性损伤后的神经再生研究得最多也最为深入。在缺血性损伤后的大脑, 内源性神经再生可以分为三个主要的步骤: 激活和增殖, 迁移, 向不同表型细胞分化。

### 2.1 内源性神经干细胞的激活

在局灶性脑缺血中, 大脑某一局限区域的血流供应被阻断, 造成局限性的脑组织损伤。在啮齿类实验动物中, 局灶性脑缺血可由阻塞大脑中动脉引发, 大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)也是用于研究局灶性脑缺血最常用的试验模型, 其损伤区域包括同侧的额顶叶皮质和纹状体。很多研究表明在大鼠和小鼠的MCAO导致的局灶性脑缺血都可以显著促进SVZ区和DG区内源性神经干/祖细胞的增殖<sup>[18]</sup>。在短暂的脑缺血后2d, 在双侧的SVZ和DG区就可以观察到有增强的神经祖细胞增生, 这一增生在缺血后1周左右达到高峰, 4周后恢复到正常水平<sup>[19]</sup>。缺血后神经祖细胞的增殖程度和MCAO的时间有一定关系: 与MCAO 30min的模型相比, MCAO 2h模型动物有着更为明显的神经前体细胞的增殖<sup>[20]</sup>; 而在MCAO 15min的模型动物, 没有任何的梗死区产生, 也没有引起神经母细胞的增殖<sup>[21]</sup>。

激活后的神经祖细胞在不同的增殖部位存在的时间也并不相同: 在DG区, 至少在缺血损伤后3周还可以观察到, 但在SVZ区在1周左右就会消失<sup>[18]</sup>。就向神经元分化而言, 激活后的神经干细胞(Sox2+/GFAP+)大致经过神经祖细胞(Sox2+/GFAP-)、神经母细胞(DCX+)、不成熟神经元(MAP-2+)和成熟神经元(NF200+)几个分化阶段。神经干细胞长期处于缓慢增殖状态, 但在激活后快速扩增为大量的神经祖细胞(一周左右), 并迅速向神经母细胞和不成熟的神经元转化<sup>[22]</sup>。

\* 基金项目: 国家高新技术计划(863计划)资助项目(2007AA02Z482)

1 复旦大学附属华山医院康复医学科, 复旦大学上海医学院康复与运动医学系, 上海市乌鲁木齐中路12号, 200040

2 通讯作者

作者简介: 刘罡, 男, 在读研究生

收稿日期: 2008-05-14

目前认为,SVZ区神经祖细胞的快速消失有两方面原因:一是快速的迁移,因为梗死后5周后可以在梗死周边区观察到BrdU+/DCX+细胞<sup>[23]</sup>;二是快速增殖的神经祖细胞大量的凋亡<sup>[24]</sup>。

## 2.2 激活的神经干细胞的迁移和分化

在对内源性神经干细胞迁移的研究中,神经母细胞具有重要的意义;其特异性表达DCX抗原。大部分DCX+细胞胞体较小,有着单极或双极的突起,因而被认为是正在迁移过程中的不成熟的神经前体细胞。在未损伤的大脑,SVZ区的神经祖细胞沿着RMS向嗅球迁移,然而在局灶性脑缺血后,一些该区新生的细胞离开RMS向损伤同侧的纹状体梗死区迁移,这些细胞中的一部分最终分化为纹状体成熟的神经元和星型胶质细胞<sup>[25]</sup>。也有研究报道,损伤同侧SVZ区的一些神经前体细胞向胼胝体和损伤区周边皮质迁移<sup>[26]</sup>。但是,几乎没有报道证明向皮质梗死区迁移的神经前体细胞最终分化为成熟的神经元NF200+。这也许是因为梗死区的微环境不利于神经前体细胞的存活或向神经元的分化<sup>[25]</sup>。

SGZ区的神经祖细胞在未损伤的大脑主要向GCL迁移,这一趋势即使在缺血性损伤后依然没有改变;TaNaKa等<sup>[27]</sup>向成年沙鼠DG内注射可表达增强型绿色荧光蛋白(EGFP)的反转录病毒以感染DG内处于分裂期的细胞,观察到了脑缺血后早期DG的中文NSCs迁移。第5d时,GCL的新生细胞开始增加,到第30d新生细胞中只有极少数仍位于SGZ,绝大多数最终移行到GCL,表达成熟神经元标志物,并具有和正常颗粒细胞相同的生长过程,能与周围环境进行整合。

## 3 缺血后内源性神经干细胞激活和迁移的机制

### 3.1 内源性神经干细胞激活/增殖的机制

因为脑缺血性损伤后会出现双侧SVZ和DG区的神经再生而并不仅局限于损伤一侧,因而内源性神经干细胞的活化机制首先很可能建立在某些弥散性的影响因素上,像生长因子、细胞因子、神经递质或调质等。在衡量某个因素是否为缺血性损伤后内源性神经再生的影响因素时,主要遵循以下几个筛选原则:①脑缺血性损伤发生后,该因素表达增加;②缺血后的神经干细胞/神经祖细胞上该影响因素的受体表达增加;③人为地增加该因素的局部或整体的表达,可以明显地促进脑缺血性损伤后神经干细胞的增殖;④人为地减少该因素的表达,缺血性损伤后的神经再生明显减弱。几乎所有的关于神经干细胞的激活和增殖的机制的研究都基于以上的原则,只是采取的方法各有不同。具体而言,常通过测定缺血后损伤局部基因的转录或蛋白的合成来判断某因素是否表达增加;通过局部注射或病毒转染目标基因的方法来观察该因素的表达增加是否促进缺血后神经再生;通过基因敲除或特异性抗体封闭的方法来观察该因素表达的减少是否抑制缺血后的神经再生等。按照以上原则,大量的试验筛选出了几种主要影响脑缺血性损伤后神经再生的因素<sup>[28]</sup>:①表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)、成纤维细胞生长因子-2(fibroblast growth factor-2,FGF-2);②脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor,BDNF)、胶质细胞源性神经营养因子<sup>[43]</sup>(glial cell line-derived neurotrophic

factor,GDNF);③促红细胞生成素(erythropoietin,EPO)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)、干细胞因子(stem cell factor,SCF);④胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1,IGF-1)⑤氧化亚氮(NO)。现以EGF和FGF-2为例,说明其在脑缺血性损伤后内源性神经干细胞的激活和增殖过程中的作用。有实验表明,在缺血性损伤后FGF-2的表达显著增加<sup>[29]</sup>。Yoshimura等<sup>[30]</sup>用表达FGF-2的反转录病毒在野生型和FGF-2缺乏的小鼠身上都观察到明显增强的缺血后神经祖细胞增殖;而在FGF-2基因敲除的小鼠局灶性脑缺血所引发的神经祖细胞的增殖明显受到抑制。同样地,Ninomiya等<sup>[31]</sup>的实验证实局灶性脑缺血可以使神经祖细胞表面的EGF受体表达增加,而注入EGF能够促进其增殖。Teramoto等<sup>[32]</sup>将EGF持续泵入脑缺血小鼠侧脑室(0.5 $\mu$ l/h),连续7d,发现与未注入EGF组相比,缺血区BrdU(+)细胞数显著增加,且其作用具有剂量依赖性。另有研究表明<sup>[33]</sup>,在侧脑室内混合注入FGF-2和EGF可以增加局灶性脑缺血成年大鼠DG和SVZ区神经祖细胞的增殖。

### 3.2 内源性神经干细胞迁移的机制

相对于内源性神经干细胞的激活,有关细胞激活后向坏死区迁移机制的研究较少。目前的主要观点认为缺血性坏死区,梗死及梗死周边区有大量的吞噬细胞的浸润,小胶质细胞的激活和星形胶质细胞的反应性增多,这些细胞可以表达与新生的神经母细胞迁移有关的细胞因子和趋化因子,使得神经母细胞向损伤区迁移。尽管对引起神经母细胞迁移的确切机制不是很清楚,但是有几种因子被认为参与了缺血后新生细胞的迁移过程:①基质细胞源性因子 $\alpha$ (SDF1- $\alpha$ )及其受体(CXCR);Mille等<sup>[34]</sup>认为SDF1- $\alpha$ 由反应性增生的胶质细胞产生,在其调节下,缺血后新生的神经母细胞迁移的持续时间长达4个月。Robin等<sup>[35]</sup>用中和性抗体阻断其受体CXCR后,缺血所引起的神经母细胞的迁移受到显著抑制。②基质金属蛋白酶(MMPs);MMPs主要由血管内皮细胞产生,在基质金属蛋白酶家族中,MMP-2和MMP-9被认为和神经母细胞的迁移有关。Lee等<sup>[36]</sup>发现缺血性损伤后,MMP9与由SVZ区迁移而来的BrdU+/DCX+细胞共同出现于损伤同侧纹状体内,而阻断MMP的作用则神经母细胞向纹状体区的迁移明显下降。③血管内皮生长因子(VEGF);VEGF除了可以在局灶性脑缺血后促进神经祖细胞的增殖外,另有研究表明其还可以促进神经母细胞的迁移并有可能参与缺血性损伤后期的功能恢复过程<sup>[37]</sup>。

## 4 缺血后新生神经细胞的整合

尽管很多实验证明大脑缺血性损伤后激活的神经母细胞可以迁移至梗死灶及其周边区域,但由神经母细胞分化来的细胞是否能转化为具有功能的神经元,并和梗死周边区残存的神经元建立联系,目前这方面的报道并不乐观。相对于纹状体梗死区,梗死的皮质似乎更不利于神经母细胞的存活和向成熟神经组织的分化。Yamashita等<sup>[38]</sup>报道,缺血后由SVZ区迁移而来的神经母细胞在纹状体坏死部位的周边区可以进一步分化为纹状体区成熟的神经元(Meis2+);向星形胶质细胞的分化也有报道<sup>[39]</sup>;但迁移至梗死皮质的神经母

胞很少分化成表达成熟神经元标志物的细胞。Arvidsson 等<sup>[25]</sup>认为脑缺血后内源性神经再生在缺血性损伤所引起的功能障碍恢复过程中的作用可能不是很大,因为在 MCAO 模型中,纹状体坏死区丧失的神经元只有不到 2%被新生的神经元替换;在坏死皮质,这一比例更小。造成这一现象的原因很有可能是因为新生的神经母细胞或不成熟神经元的大量凋亡;Bingham 等<sup>[30]</sup>发现,在含有 Brdu+细胞的区域内,大量的细胞表达 Caspase-3。

目前认为,仅由缺血性损伤自身所引发的神经再生远远不足以抵消缺血所带来的严重功能丧失。因此,寻找能够促进缺血性卒中后神经再生的因素变得尤为重要。Zhang 等<sup>[40]</sup>发现成年大鼠脑内 Bcl-2 的高表达可以明显减少纹状体新生细胞的凋亡,使其向 GABA 能神经元分化,从而促进缺血后神经再生。一些细胞因子也可能在促进内源性神经细胞的存活和功能整合过程中发挥作用,如最近有研究发现,向 MCAO 大鼠侧脑室注射 BMP-7 可以促进神经组细胞的增殖、向纹状体坏死区和梗死皮质迁移、并明显改善功能的恢复<sup>[41]</sup>。另外,运动训练和丰富环境被证实可以改善缺血性卒中后功能障碍,这些干预手段的机制也很有可能包括促进缺血性损伤后的神经再生和新生神经元的功能整合<sup>[42]</sup>,因而也需要进一步的研究。

#### 参考文献

- [1] Lois C, Alvarezbuylia A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia[J]. Proc Natl Acad Sci,1993,90(5):2074—2077.
- [2] Gage, FH. Mammalian neural stem cells [J]. Science,2000,287(5457):1433—1438.
- [3] Gould E, Reeves AJ, Graziano MSA, et al. Neurogenesis in the neocortex of adult primates [J].Science, 1999,286(5439):548—552.
- [4] Gould E, Reeves AJ, Fallah M, et al. Hippocampal neurogenesis in Old World primates [J].Proc Natl Acad Sci, 1999,96(9):5263—5267.
- [5] Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork -Eriksson T, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus [J].Nat Med, 1998,4(11):1313—1317.
- [6] Garcia-Verdugo J, Doetsch F, Wichterle H, et al. Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells[J]. Neurobiol,1998,36(2):234—248.
- [7] Shapiro EM, Gonzalez -Perez O, Garcia -Verdugo JM, et al. Magnetic resonance imaging of the migration of neuronal precursors generated in the adult rodent brain [J]. Neuroimage, 2006,32(3): 1150—1157.
- [8] Kirschenbaum B, Doetsch F, Lois C, et al. Adult subventricular zone neuronal precursors continue to proliferate and migrate in the absence of the olfactory bulb[J]. Neurosci,1999,19(6):2171—2180.
- [9] Cameron HA, McKay RDC. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus [J]. Comp Neurol, 2001,435(4):406—417.
- [10] Namba T, Mochizuki H, Onodera M, et al. The fate of neural progenitor cells expressing astrocytic and radial glial markers in the postnatal rat dentate gyrus [J]. Neurosci,2005,22(8): 1928—1941.
- [11] Kuhn HG, DickinsonAnson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age -related decrease of neuronal progenitor proliferation[J]. Neurosci,1996,16(6):2027—2033.
- [12] Gould E, Vail N, Wagers M, et al Adult -generated hippocampal and neocortical neurons in macaques have a transient existence [J].Proc Natl Acad Sci,2001,98(19):10910—10917.
- [13] Schinder AF, Christie BR. Functional neurogenesis in the adult hippocampus[J].Nature,2002,415(6875): 1030—1034.
- [14] Seaberg RM, van der Kooy D. Adult rodent neurogenic regions: the ventricular subependyma contains neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors[J]. Neurosci,2002,22(5): 1784—1793.
- [15] Dash PK, Mach SA, Moore AN. Enhanced neurogenesis in the rodent hippocampus following traumatic brain injury [J]. Neurosci Res,2001,63(4):313—319.
- [16] Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT,et al. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus [J]. Neurosci,1997,17(10): 3727—3738.
- [17] Gu WG, Brannstrom T, Wester P. Cortical neurogenesis in adult rats after reversible photothrombotic stroke [J]. Cereb Blood Flow Metab,2000,20(8):1166—1173.
- [18] Dempsey RJ, Sailor KA, Bowen KK, et al. Stroke -induced progenitor cell proliferation in adult spontaneously hypertensive rat brain: effect of exogenous IGF -1 and GDNF [J]. Neurochem,2003,87(3): 586—597.
- [19] Zhang R, Zhang ZG, Zhang L,et al. Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia[J].Neuroscience,2001,105(1):33—41.
- [20] Arvidsson A, Kokaia Z, Lindvall O. N -methyl -D -aspartate receptor mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke[J]. Eur Neurosci,2001,14(1):10—18.
- [21] Naylor M, Bowen KK, Sailor KA,et al. Preconditioning - induced ischemic tolerance stimulates growth factor expression and neurogenesis in adult rat hippocampus [J]. Neurochem Int, 2005,47(8):565—572.
- [22] Alvarez -Buylla A, Lim DA. For the long run; maintaining germinal niches in the adult brain [J]. Neuron, 2004,41(5): 683—686.
- [23] 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.
- [24] Kuan CY, Schloemer AJ, Burns KA,et al. Hypoxia -ischemia induces DNA synthesis without cell proliferation in dying neurons in adult rodent[J].Neurosci,2004,24(47):10763—10772.
- [25] Arvidsson A, Collin T, Kirik D,et al. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke[J]. Nat.Med,2002,8(9):963—970.
- [26] Jin K, Sun Y, Xie L, et al. Directed migration of neuronal precursors into the ischemic cerebral cortex and striatum[J]. Molecular and Cellular Neuroscience,2003,24(1):171—189.
- [27] Tanaka R, Yamashiro K, Mochizuki H, et al.Neurogenesis after transient global ischemia in the adult hippocampus visualized by improved retroviral vector [J]. Stroke,2004,35(6): 1454—9.
- [28] Wiltout C, Lang B, Yan YP,et al.Repairing brain after stroke: A review on post -ischemic neurogenesis [J]. Neurochemistry International,2007,50(7):1028—1041.
- [29] Lin TN, Lee M, Sun GY,et al. Induction of basic fibroblast growth factor (bFGF) expression following focal cerebral ischemia[J]. Brain Res Mol Brain Res,1997,49(1):255—265.
- [30] Yoshimura S, Takagi Y, Harada J,et al. FGF-2 regulation of neurogenesis in adult hippocampus after brain injury [J]. Proc

- Natl Acad Sci USA,2001,98(10):5874—5879.
- [31] Ninomiya M, Yamashita T, Araki N, et al. Enhanced neurogenesis in the ischemic striatum following EGF-induced expansion of transit-amplifying cells in the subventricular zone [J]. *Neurosci Lett*,2006,403(1):63—67.
- [32] Teramoto T, Qiu J, Plumier JC, et al. EGF amplifies the replacement of parvalbumin-expressing striatal interneurons after ischemia[J].*Clin Invest*,2003,111(8):1125—1132.
- [33] Tureyen K, Vemuganti R, Bowen KK, et al. EGF and FGF-2 infusion increases post-ischemic neural progenitor cell proliferation in the adult rat brain[J]. *Neurosurgery*,2005,57(6):1254—1263.
- [34] Miller JT, Bartley JH, Wimborne HJ, et al. The neuroblast and angioblast chemotactic factor SDF-1 CXCL12. expression is briefly up regulated by reactive astrocytes in brain following neonatal hypoxic-ischemic injury [J].*BMC Neurosci*, 2005,6:63.
- [35] Robin AM, Zhang ZG, Wang L, et al. Stromal cell-derived factor 1alpha mediates neural progenitor cell motility after focal cerebral ischemia[J]. *Cereb Blood Flow Metab*,2006,26(1):125—134.
- [36] Lee SR, Kim HY, Rogowska J, et al. Involvement of matrix metalloproteinase in neuroblast cell migration from the subventricular zone after stroke[J]. *Neurosci*,2006,26(13):3491—3495.
- [37] Wang YQ, Guo X, Qiu MH, et al. VEGF overexpression enhances striatal neurogenesis in brain of adult rat after a transient middle cerebral artery occlusion [J]. *Neurosci Res*, 2007,85(1):73—82.
- [38] Yamashita T, Ninomiya M, Sunabori T, et al. Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum [J]. *Neurosci*,2006,26(24):6627—6636.
- [39] Bingham B, Liu D, Wood A, et al. Ischemia-stimulated neurogenesis is regulated by proliferation, migration, differentiation and caspase activation of hippocampal precursor cells[J]. *Brain Res*,2005,1058(1):167—177.
- [40] Zhang R, Xue YY, Lu SD, et al. Bcl-2 enhances neurogenesis and inhibits apoptosis of newborn neurons in adult rat brain following a transient middle cerebral artery occlusion [J]. *Neurobiol Dis*,2006,24(2):345—356.
- [41] Chou J, Harvey BK, Shen H, et al. Neuroregenerative effects of BMP7 after stroke in rats[J]. *Neuro Sci*,2006,240:21—29.
- [42] Pereira LO, Arteni NS, Petersen RC, et al. Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat [J]. *Neurobiol Learn Mem*,2007, 87(1):101—108.
- [43] 丁继固,丁文杰,李光,等.胶质源性神经营养因子体外诱导小鼠胚胎中脑神经干细胞分化的研究 [J]. *中国康复医学杂志*, 2008,23(4):341—343.

## · 综述 ·

# 单细胞凝胶电泳技术在运动医学中的应用\*

刘晓莉<sup>1</sup> 苏美华<sup>1</sup> 侯金芸<sup>1</sup>

单细胞凝胶电泳 (single cell gel electrophoresis, SCGE) 又称彗星实验 (comet assay), 是近年来发展起来的一种在单细胞水平上检测 DNA 损伤与修复的新技术。SCGE 实验最初由 Rydbery 和 Johanson (1978) 提出, 以后经 Ostling 和 Johanson<sup>[1]</sup>(1984) 及 Singh<sup>[2]</sup>(1988) 等对实验条件进行改良, 使其具有简便快速、灵敏度高、重复性好、无需放射性标记等优点, 目前已被广泛应用于临床药物筛选、肿瘤诊断与治疗、衰老和细胞凋亡机制的探讨以及遗传毒理学和生物监测等研究领域<sup>[3-5]</sup>。随着 SCGE 技术的不断成熟和完善, 国外一些学者已将 SCGE 技术运用于运动员的训练监控和运动性伤病的早期诊断等方面, 本文就 SCGE 技术在运动医学领域的应用做简要综述。

## 1 SCGE 的检测原理

SCGE 是一种在单细胞水平上检测真核细胞 DNA 单、双链断裂和碱性不稳定位点的方法。该技术的原理是包埋于琼脂糖中的细胞在细胞裂解液的作用下, 细胞膜、核膜及其他膜结构被破坏, 核基质也被溶解、抽提, 胞内蛋白质、RNA 及其他成分均可进入凝胶而扩散至裂解液中, 而核 DNA 分子量很高, 不能进入凝胶, 只能留于原位。当各种 DNA 损伤因

子诱发细胞 DNA 链断裂时, 正常的 DNA 超螺旋结构变得松弛, DNA 环向外伸展, 链缺口暴露了负电荷, 且 pH>13 的强碱性条件促使 DNA 变性和解螺旋。电泳时分子量较小、本身带负电荷的 DNA 断片离开主核向阳极迁移, 经荧光染料染色后, 荧光标记的 DNA 形成彗星状图像中的彗尾, 故又名彗星实验。细胞受损越严重, 断片越多, 含 DNA 链缺口越多, 则进入尾部的 DNA 越多, 表现为尾长和尾部荧光强度增加。未损伤细胞在电泳中 DNA 仍停留于核中, 形成圆形荧光团, 而无彗星样尾部。

## 2 SCGE 实验方法

SCGE 实验主要是根据 Singh 等的方法<sup>[2]</sup>, 不同实验室结合各自不同的实验条件略加修改<sup>[6]</sup>。通常的实验步骤如下:

### 2.1 细胞准备

在体外实验中, 将对数期生长的细胞用胰蛋白酶消化,

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30771050); 北京市自然科学基金资助项目(5072024)

<sup>1</sup> 北京师范大学体育与运动学院, 北京, 100875

作者简介: 刘晓莉, 女, 教授, 博士

收稿日期: 2007-10-08