

·基础研究·

骨髓间充质干细胞移植对老年性痴呆大鼠空间学习记忆能力的影响

王金华¹ 王世民^{2,3} 孔繁明² 张文治² 唐帆² 张学斌² 苏心² 王新平²

摘要

目的:研究骨髓间充质干细胞(BMSCs)移植对淀粉样蛋白- β_{1-40} ($A\beta_{1-40}$)诱导的老年性痴呆(Alzheimer's disease, AD)模型大鼠行为学的影响,并探讨其治疗AD的可能机制。

方法:采用向大鼠双侧海马立体定向注射 $A\beta_{1-40}$ 诱导AD动物模型,造模后3周采用同样方法移植骨髓间充质干细胞,采用Morris水迷宫观察大鼠行为学变化。造模后2个月处死大鼠,观察海马组织有无溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)+神经元特异性烯醇化酶(NSE)、BrdU+胶质纤维酸性蛋白(GFAP)免疫组织化学双染阳性细胞,并且观察从侧脑室到海马是否存在神经元前体细胞(NPs)的标志——双皮素(DCX)的吻侧迁移流。

结果:模型组大鼠逃避潜伏期较对照组明显延长,移植治疗组大鼠逃避潜伏期较模型组缩短。移植组大鼠海马组织及其周围可见免疫组织化学双染阳性细胞,但未见从侧脑室到海马关于DCX的吻侧迁移流。

结论: BMSCs移植能够改善AD大鼠空间学习记忆能力,提示BMSCs移植可能成为治疗AD大鼠的一种方法。

关键词 老年性痴呆;水迷宫;骨髓间充质干细胞;立体定向移植

中图分类号: R749.16 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1242(2011)-03-0232-04

Effects of transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells on spacial learning-dysmnesin of Alzheimer's disease in rats/WANG Jinhua,WANG Shimin,KONG Fanming,et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,2011,26(3): 232—235

Abstract

Objective: To study the effects of transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) on learning and memory ability and its mechanism in rats with Alzheimer's disease induced by amyloid- β_{1-40} ($A\beta_{1-40}$) injection.

Method: AD model was induced by injecting $A\beta_{1-40}$ into bilateral hippocampus. Three weeks later, the bone marrow mesenchymal stem cells was implanted. The learning and memory abilities of rats were evaluated with Morris water maze. Rats were sacrificed after 2 months. Bromodeoxyuridine(BrdU)+neuron specific enolase(NSE), BrdU+glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunohistochemistry double-staining cells, and the migration of doublecortin (DCX, the neuron precursors marker) from subventricular zone to the damaged hippocampus were observed.

Result: The escape latency of hidden platform in AD group delayed significantly($P<0.05$), the escape latency in transplantation treatment group decreased obviously as compared with model group($P<0.05$). The immunohistochemistry double-staining cells could be found at the center of damaged site(bilateral hippocampus) and the surrounding sites in rats of transplantation group, the migration of doublecortin from subventricular zone to the damaged hippocampus wasn't observed.

Conclusion: The implantation of BMSCs maybe have the effect of improving spacial learning-dysmnesia of AD rats.

Author's address Postgraduate College, Tianjin Medical University, Tianjin, 300070

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2011.03.007

1 天津医科大学研究生院,天津,300070; 2 天津市环湖医院; 3 通讯作者

作者简介:王金华,男,在读硕士; 收稿日期:2010-09-22

Key word Alzheimer's disease;water maze;bone marrow mesenchymal stem cells;stereotypical transplantation

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD),即老年性痴呆,是一种以记忆力减退和严重认知功能下降为特征的渐进性中枢神经系统变性疾病,发病机制尚不十分明确,尚无有效治疗方法^[1]。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)具有多向分化潜能,是存在于骨髓中的一种非造血干细胞,与其他可用于移植的干细胞相比,具有取材方便、来源广泛、易于体外扩增、免疫排斥反应弱、可进行基因技术加工等优点。最近有研究表明,BMSCs在体外可以被诱导分化成为神经元样细胞,体内移植后可修复神经损伤^[2]。BMSCs移植为各类神经损伤的细胞治疗提供新的可能^[3]。本实验通过淀粉样蛋白- β_{1-40} (amyloid- β_{1-40} , $A\beta_{1-40}$)诱导急性AD动物模型,探讨BMSCs立体定向移植促进AD大鼠学习记忆能力恢复的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验仪器及主要试剂

大鼠脑立体定位仪(西安),Morris水迷宫(中国医学科学院药物所制造); $A\beta_{1-40}$ 、兔抗人神经元特异性烯醇化酶(neuron specific enolase, NSE)多克隆抗体、兔抗大鼠双皮素(doublecortine, DCX)单克隆抗体(北京);鼠抗人5'-溴脱氧尿嘧啶(BrdU)单克隆抗体、兔抗人胶原纤维酸性蛋白(glia fibrillary acidic protein, GFAP)多克隆抗体、Polymer双染检测试剂盒,均为浓缩型(北京)。

1.2 实验动物分组与动物模型的建立

健康成年SD雄性大鼠30只,体重250—300g,购于天津市实验动物中心,动物质量合格证号:SCXK(京)2005-0001。分为假手术组(对照组)、模型组、骨髓间充质干细胞移植组,每组10只。另取1月龄清洁级SD大鼠6只,用于骨髓间质干细胞的分离培养,由北京康蓝生物技术有限公司提供,动物质量合格证号:SCXK(京)2009-0004。

大鼠以10%水合氯醛(3 μ l/g)腹腔注射麻醉,立体定位仪耳杆固定头部。颅顶区备皮消毒后作2cm左右切口。分离骨膜暴露头骨。于前囟向后3.0mm,分别向中线左、右各旁开2.2mm处,用牙科钻开颅骨。用微量进样器针垂直进2.8mm,在两侧

海马处于5min内分别缓慢注入聚集状态的 $A\beta_{1-40}$ 溶液(2 μ g/ μ l)5 μ l,并留针5min使溶液充分弥散。假手术对照组注射等量生理盐水后消毒并缝合。

1.3 BMSCs的分离、培养与脑内移植

由天津市环湖医院神经外科研究所细胞室完成,具体步骤见参考文献[4]。

治疗组在造模后3周行BMSCs移植。用10 μ l微量注射器,将BMSCs细胞悬液10 μ l(1×10^6 个细胞/ μ l)立体定位注入动物双侧海马区,每侧移植细胞数为 5×10^6 (体积5 μ l)。模型组不做处理,假手术组注入5 μ l生理盐水,注射部位及操作步骤同前。

1.4 大鼠行为学测试

分别于造模后2周和细胞移植后2周用Morris水迷宫测试大鼠学习记忆能力。Morris水迷宫测试包括定位航行试验和空间探索试验:①定位航行试验(place navigation test):连续训练5d,训练前一天先让大鼠自由泳2min以熟悉环境,训练时撤掉池中平台。观察大鼠游泳速度,剔除游泳能力比较差的大鼠。从第1天开始,每天训练4次,按照表1中^[5]每天训练的次序作为入水点将大鼠面向池壁放入水中,记录大鼠在水中寻找并爬上平台的时间,即逃避潜伏期。设定大鼠在平台上停留2s为找到平台。如果大鼠在120s内未找到平台,则将其引导到平台,并停留15s以便熟悉环境及平台位置,此时逃避潜伏期记为120s。②空间探索试验(spatial probe test):第5天最后一次训练完后撤去平台,于NE位置入水点将大鼠面向池壁放入水中,记录大鼠在120s内穿越平台的次数。

1.5 移植干细胞分化及迁移情况观察

造模后60d,将移植组大鼠经左心室4%多聚甲醛灌注,断头取脑放入4%多聚甲醛后固定后,依次酒精脱水,二甲苯透明,浸蜡,包埋,切片(厚5 μ m),

表1 水迷宫定位航行和空间探索方案

天数	实验1	实验2	实验3	实验4
第1天	N	E	SE	NW
第2天	SE	N	NW	E
第3天	NW	SE	E	N
第4天	E	NW	N	SE
第5天	N	SE	E	NW
第5天(Probe)	NE			

N:北; E:东; NE:东北; SE:东南;NW:西北

脱蜡,水化,过氧化氢去除内源性过氧化酶,抗原修复,正常山羊血清封闭。加 BrdU 和 NSE 混合 I 抗, BrdU 和 GFAP 混合 I 抗(浓度均为 1:50)4℃过夜,复温,加入预混 II 抗作用 30min,胞浆经 DAB 显色,胞核经 AP-Red 显色后复染胞核,脱水,封片,镜下观察损伤海马部位是否有 BrdU+NSE、BrdU+GFAP 免疫组织化学双染阳性细胞,加 I 抗 4℃过夜,II 抗作用 30min,经 DAB 显色后复染胞核,脱水,封片,镜下观察是否存在从侧脑室向海马的神经干细胞吻侧迁移流。

1.6 统计学分析

应用 SPSS 16.0 统计软件,进行单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 Morris 水迷宫实验结果

模型组逃避潜伏期较对照组明显延长($P<0.05$)。BMSCs 移植后 2 周,移植组大鼠与治疗前相比,逃避潜伏期明显缩短($P<0.05$),模型组没有明显变化($P>0.05$),逃避潜伏期模型组长于移植组,移植组长于对照组($P<0.05$)。移植组大鼠与模型组大鼠比较,跨越平台次数明显增多($P<0.05$),但未达到对照组水平($P<0.05$)。见表 2。

2.2 免疫组织化学染色结果

在移植组损伤中心(海马移植部位)及其周围可见细胞核呈红色、细胞浆呈棕黄色的 BrdU+ NSE 免疫组织化学双染阳性细胞和细胞核呈红色、细胞浆呈棕黄色的 BrdU+ GFAP 免疫组织化学双染阳性细胞(图 1—2),但未见从侧脑室向海马的神经干细胞吻侧迁移流。

表 2 BMSCs 移植对大鼠 Morris 水迷宫行为学的影响 ($\bar{x}\pm s$)

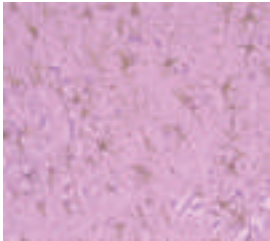
组别	鼠数	平均逃避潜伏期		治疗后 跨越平台次数
		造模后逃避 潜伏期(s)	治疗后逃避 潜伏期(s)	
对照组	10	41.35±6.34	21.55±3.33	7.7±2.11
模型组	10	57.12±6.43 ^①	52.95±4.86 ^①	1.8±0.92 ^①
移植组	10	58.76±6.11 ^①	35.56±4.29 ^{①②}	5.5±1.84 ^{①②}

①与对照组相比 $P<0.05$;②与模型组相比 $P<0.05$

3 讨论

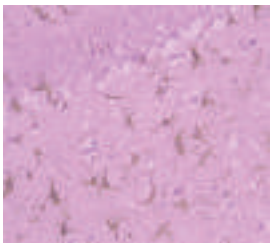
AD 是一种与年龄相关的,以记忆缺失和严重认

图 1 移植组大鼠海马组织 (×200)



BrdU+ NSE 免疫组织化学染色

图 2 移植组大鼠海马组织 (×200)



BrdU+ GFAP 免疫组织化学染色

知功能下降为特征的渐进性神经系统变性疾病,当有 Aβ 存在时小胶质细胞分泌高水平的细胞因子、神经毒素,从而激发神经凋亡^[6-7]。有学者研究表明,Aβ 引起神经细胞凋亡导致 AD 患者脑内神经细胞和突触丢失,从而引起痴呆^[8]。因此,Aβ 诱发的神经细胞凋亡可能是 AD 认知功能障碍的主要病理基础。

骨髓间充质干细胞具有多向分化潜能,在体外可诱导分化成为神经元样细胞,体内移植后可以存活、迁移、分化为神经细胞,且可在一定程度上促进损伤神经系统功能的恢复^[9-10],本实验通过骨髓间充质干细胞立体定向移植治疗 Aβ 诱导的 AD 大鼠,我们发现治疗后大鼠的学习记忆能力明显提高,免疫组化结果显示在海马移植部位及其周围可见 BrdU+NSE、BrdU+GFAP 免疫组织化学双染阳性细胞,说明移植的细胞在损伤部位及其周围分化为神经元样及神经胶质样细胞,与 Cho 等^[11]的研究一致。移植细胞通过分化为神经细胞,重建局部神经回路,代偿了损伤细胞的功能^[12]。但本实验未见从侧脑室到海马关于 DCX 的吻侧迁移流,说明没有启动内源性干细胞的迁移分化,与 Mila^[13]等的结果不同,且我们观察到的双染阳性细胞较少,所以我们认为 BMSCs 促进 AD 大鼠学习记忆能力恢复还存在其他机制。

神经生长因子如碱性成纤维细胞生长因子、脑源性神经生长因子等通过刺激血管生成和神经元的增殖、分化,提高神经元的生物活性,促进神经再生,拮抗兴奋性氨基酸等多种有害物质对神经元的毒性等机制,从而起到神经保护作用。BMSCs移植后可提高神经营养因子的表达,增加受损神经细胞的存活并促进神经组织再生^[14]。许多研究表明BMSCs可分化为神经细胞和分泌营养因子如生长因子、细胞因子等促进神经元的存活和生长,并能减少炎症应答和空腔形成^[15]。已经证实A β 在AD的发病过程中起到了病原学的、关键性的作用^[16],因此海马A β 的减少可能预防和治疗AD^[17]。Malm TM等^[18]发现小胶质细胞通过分泌神经营养因子从而起到神经保护作用,通过吞噬作用消除A β 。Lee JK^[18]等发现,将BMSCs移植到AD大鼠海马的齿状回附近,结果显示与假移植和对照组相比,移植组的A β 水平下降,并且A β 沉积的减少伴随着小胶质细胞的激活,小胶质细胞在A β 沉积的附近,它们的形态由分支状变成了代表小胶质细胞吞噬作用的阿米巴样,此研究表明BMSCs具有清除A β 沉积和/或阻断A β 沉积形成的作用,小胶质细胞的聚集反应可能参与此过程,说明BMSCs对A β 沉积的减少有治疗性的效果。

总之,本实验提示BMSCs脑内移植可以分化为神经元样及神经胶质样细胞,提高AD大鼠学习记忆能力。但BMSCs移植对慢性所致AD模型是否有效,以及BMSCs脑内移植改善AD大鼠学习记忆能力的机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 孙治坤,陈生弟.阿尔茨海默病的治疗[J].上海交通大学学报,2008,28(5):596—599.
- [2] Ronsyn MW, Daans J, Spaepen G, et al. Plasmid-based genetic modification of human bone marrow-derived stromal cells: analysis of cell survival and transgene expression after transplantation in rat spinal cord[J]. BMC Biotechnol, 2007, 7:90.
- [3] 袁章,杨拯,徐艳,等.骨髓间充质干细胞向神经元样细胞分化及其在神经修复中的应用[J].中国康复医学杂志,2009,24(8):766—769.
- [4] Guan YL, Kong FM, Wang SM, et al. Stereotaxic transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells in treatment of spinal cord injury in rats[J]. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu, 2010, 14(14):2549—2555.
- [5] Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory[J]. Nat Protoc, 2006, 1(2):848—858.
- [6] Kim SU, de Vellis J. Microglia in health and disease[J]. J Neurosci Res, 2005, 81(3):302—313.
- [7] Walker DG, Lue LF. Investigations with cultured human microglia on pathogenic mechanisms of Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases[J]. J Neurosci Res, 2005, 81(3):412—425.
- [8] Biswas SC, Shi Y, Vonsattel JP, et al. Bim is elevated in Alzheimer's disease neurons and is required for beta-amyloid-induced neuronal apoptosis[J]. J Neurosci, 2007, 27(4):893—900.
- [9] Cho JS, Park HW, Park SK, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells enhances axonal outgrowth and cell survival in an organotypic spinal cord slice culture[J]. Neurosci Lett, 2009, 454(1):43—48.
- [10] 黄洁萍,翁金森,王锋,等.骨髓间充质干细胞移植对急性脊髓损伤大鼠神经功能恢复及Nogo-A表达的影响[J].中国康复医学杂志,2009,24(7):582—586.
- [11] Cho SR, Kim YR, Kang HS, et al. Functional recovery after the transplantation of neurally differentiated mesenchymal stem cells derived from bone marrow in a rat model of spinal cord injury[J]. Cell Transplant, 2009, 18(12):1359—1368.
- [12] Kitada M, Dezawa M. Induction system of neural and muscle lineage cells from bone marrow stromal cells: a new strategy for tissue reconstruction in degenerative diseases[J]. Histol Histopathol, 2009, 24(5):631—642.
- [13] Komitova M, Mattsson B, Johansson BB, et al. Enriched environment increase neural stem/progenitor cell proliferation and neurogenesis in the subventricular zone of stroke-lesioned adult rats[J]. Stroke, 2005, 36(6):1278—1282.
- [14] Gu W, Zhang F, Xue Q, et al. Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells reduces lesion volume and induces axonal regrowth of injured spinal cord[J]. Neuropathology, 2010, 30(3):205—217.
- [15] 董锋,林建华,吴朝阳,等.骨髓间充质干细胞经静脉注射移植对大鼠脊髓损伤BDNF、NGF mRNA表达的影响[J].中国康复医学杂志,2008,23(5):416—419.
- [16] Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics[J]. Science, 2002, 297(5580):353—356.
- [17] Wang YJ, Zhou HD, Zhou XF. Clearance of amyloid-beta in Alzheimer's disease: progress, problems and perspectives[J]. Drug Discov Today, 2006, 11(19—20):931—938.
- [18] Malm TM, Koistinaho M, Parepalo M, et al. Bone-marrow-derived cells contribute to the recruitment of microglial cells in response to beta-amyloid deposition in APP/PS1 double transgenic Alzheimer mice[J]. Neurobiol Dis, 2005, 18(1):134—142.
- [19] Lee JK, Jin HK, Bae JS. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduce brain amyloid-beta deposition and accelerate the activation of microglia in an acutely induced Alzheimer's disease mouse model[J]. Neurosci Lett, 2009, 450(2):136—141.