

· 基础研究 ·

运动训练在缺血性脑梗死大鼠神经干细胞移植治疗中的作用

刘罡 贾杰 吴毅 胡永善 汪洋 于惠贤 张峰 Alastair I H Murchie

【摘要】目的 探讨运动训练对缺血性脑梗死大鼠神经干细胞移植后神经功能和缺血脑区超微结构的影响。**方法** 建立 Sprague-Dawley 大鼠大脑中动脉缺血/再灌注模型,随机分为脑缺血对照组(对照组)、电动跑台训练组(运动组)、神经干细胞移植组(移植组)、神经干细胞移植联合运动训练组(联合组),每组 6 或 10 只。术后第 5 天将超顺磁氧化铁(SPIO)标记的神经干细胞移植到缺血侧纹状体区。术后第 6 天开始,运动组和联合组大鼠给予定量的电动跑台运动训练,运动训练期间对 4 组大鼠进行定期的神经功能评估。运动 4 周后处死大鼠,透射电镜观察 SPIO 标记的神经干细胞在宿主脑内存活迁徙以及宿主脑区超微结构变化情况。**结果** 与对照组比较,运动训练 2 周后运动组和联合组的神经功能评分,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 0.01),移植组差异无统计学意义($P > 0.05$)。联合组可见 SPIO 标记的神经干细胞密度较大,迁徙也相对广泛,宿主缺血脑区超微结构优于其他各组。**结论** 运动训练可以促进神经干细胞移植对脑梗死大鼠的治疗作用,但其具体的机制还有待进一步研究。

【关键词】 跑台训练; 神经干细胞; 超微结构; 脑卒中

The role of treadmill training in rats of ischemic stroke in the treatment of neural stem cells transplantation

LIU Gang, JIA Jie, WU Yi, HU Yong-shan, WANG Yang, YU Hui-xian, ZHANG Feng, Alastair I H Murchie. Department of Rehabilitation, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China

Corresponding author: WU Yi, Email: wuyi3000@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To study the influence of treadmill training after neural stem cells transplantation on the neural function and cerebral ultrastructure of rats with focal cerebral ischemia. **Methods** The Sprague-Dawley rats with successful middle cerebral artery ischemia-reperfusion were used as subjects. The subjects are divided into a control group (subject to experimental ischemia only) and a treatment group (subject to ischemia and treadmill training, neural stem cells transplantation, and neural stem cells transplantation combined with treadmill training, respectively), each with 6 or 10 animals. Five days after operation, neural stem cells marked with superparamagnetic iron oxide (SPIO) were transplanted into ischemic striatum, and electric treadmill training was administered 6 days after operation. For all groups during 4 weeks of training, assessment of motor function were performed regularly. Four weeks after training, all the rats were sacrificed and SPIO marked neural stem cells were observed in terms of their survival and migration in the brain. Host ultrastructural changes were also observed. **Results** Compared with the control group, there was significant improvement in treadmill training group and combined group in terms of neurologic function ($P < 0.05$, $P < 0.01$) as reflected by the mNSS scores at 14 days after the training, while no significant improvement of mNSS score was observed in stem cells transplantation group ($P > 0.05$). In the combined group, the SPIO marked neural stem cells distributed in greater density and spread more extensively in the brain, and the cerebral ultrastructure were also better than other groups. **Conclusion** Treadmill training combined with neural stem cell transplantation is of potential benefit in the treatment of rats with cerebral infarction, but the underlying mechanism deserves further studies.

【Key words】 Treadmill training; Neural stem cells; Ultrastructure; Stroke

缺血性脑卒中是临床常见病、多发病,致残率极

高,而用神经干细胞(neural stem cells, NSC)移植治疗缺血性脑卒中所致神经损伤也受到了越来越多的关注^[1,2]。近年来,已经有研究者开始将康复手段应用在干细胞移植之后的联合治疗中^[3,4],期望能够提高干细胞移植治疗的效果。前期的研究也证明,电动跑台运动训练可以促进移植的 NSC 在宿主脑内存活并向缺血区迁徙,改良的神经功能评分(Modified Neurological Severity Score, mNSS)也明显优于单纯干细胞移

基金项目:国家高技术研究发展计划(863 计划)(2007AA02Z48);复旦大学临床-基础交叉基金课题

作者单位:200040 上海,复旦大学附属华山医院康复医学科(刘罡、贾杰、吴毅、胡永善、于惠贤、张峰);复旦大学解剖与组织胚胎学系(汪洋);复旦大学生物医学研究院药物与结构生物学研究所(Alastair I H Murchie)

通讯作者:吴毅,Email: wuyi3000@yahoo.com.cn

植治疗大鼠^[5,6]。但是,关于 NSC 移植后联合运动训练对宿主缺血脑区超微结构的影响则鲜见报道。为此,本研究采用超顺磁氧化铁(super paramagnetic iron oxide, SPIO)标记 NSC,对大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型大鼠进行 NSC 移植后联合电动跑台运动训练,并采用透射电镜观察移植 4 周后 NSC 在宿主缺血脑区的分布、迁徙情况,以及宿主缺血脑区超微结构的变化,同时与大鼠 mNSS 评估情况进行对照分析,探索运动训练对 NSC 移植效果的影响及其可能机制。

材料与方法

一、实验动物与材料

实验动物:孕 10~12 d Sprague-Dawley (SD) 大鼠 5 只及成年雄性 SD 大鼠(清洁级)48 只,体重 250~300 g,购自中国科学院上海分院实验动物中心。

实验试剂:DMEM/F12 基础培养基、碱性成纤维细胞生长因子、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、N2 supplement、B27 supplement 购自 Gibco-BRL 公司;小鼠抗大鼠神经巢蛋白(Nestin)抗体购自 BD Pharmingen 公司;小鼠抗大鼠胶质纤维酸性蛋白(gilial fibrillary acidic protein, GFAP)抗体购自 Chemicon 公司;兔抗大鼠 β -tubulin III 抗体购自博士德公司;多聚赖氨酸(polylysine, PLL)购自 Sigma 公司;脂质体 Lipofectamine 购自 Invitrogen 公司;Feridex 购自 Advanced magnetic 公司。

实验仪器:微量注射器(Hamilton),SXP21 手术显微镜(上海医用光学仪器厂),荧光显微镜(LEICA-XSP),立体定向仪(KOFP),以上设备由复旦大学附属上海医学院解剖组胚胎教研室提供;JEM-1200EX 型透射电镜,由复旦大学附属上海医学院透射电镜室提供。

二、NSC 的培养

取孕龄 14~16 d 的大鼠胚胎,于无菌条件下分离大脑皮质组织,在显微镜下剥除脑膜及表面血管,剪碎后用滴管吹打,加大鼠 DMEM/F12 培养基,通过 200 目不锈钢滤网制成单细胞悬液。用基础培养基洗涤离心后,用 NSC 培养基重新悬浮细胞,调整活体细胞浓度至 5×10^5 个/ml,吸取 2 ml 接种于 50 ml 玻璃细胞培养瓶中,置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱中连续培养,2~3 d 半量换液。培养至第 7~10 天时,根据细胞的生长状况和密度,机械吹打 NSC 球,离心后重新用 NSC 培养基悬浮细胞,转入新的培养瓶中继续培养和传代。

三、胚胎 NSC 的鉴定及分化鉴定

对原代和传代培养的 NSC 行 Nestin 免疫荧光染色。吸取适量的 NSC 球,以 800 r/min 离心 5 min,重

悬后接种于涂有多聚赖氨酸盖玻片的培养皿中。培养 4 d 后用 PBS 洗 3 次,5 min/次;室温下用 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗 3 次,5 min/次;加 0.2% 的 Triton-X 100 作用 15 min, PBS 洗 3 次,5 min/次;用山羊血清封闭液在 37℃ 湿盒内封闭 30 min,加一抗 Nestin (1:400),4℃ 过夜, PBS 洗 2 次,5 min/次;加二抗(cy3 标记的羊抗小鼠 IgG),室温孵育 2 h, PBS 洗 3 次,5 min/次;然后封片,荧光显微镜下观察并拍照。对一次传代后培养 3 d 的 NSC,移入只含有 B27 和胎牛血清的培养基中进行诱导分化,在贴壁分化后第 7 天行 β -tubulin III、GFAP 免疫荧光双标, DAPI 复染细胞核。操作步骤同上。

四、动物模型制作及分组

将大鼠麻醉后参照 Longa 等^[7]提出的线栓法栓塞左侧大脑中动脉,缺血时间 2 h,制成局灶性脑缺血再灌注模型。大鼠清醒后观察其行为学改变,按 Longa 等^[7]拟定的 5 级评分标准评定大鼠神经系统体征,1~3 级确定为成功模型(1 级为鼠在地面上自由行动时向瘫痪侧旋转;2 级为鼠在地面上活动时,拉其尾时向瘫痪侧旋转;3 级为将鼠置于软塑封纸上,拉住鼠尾,在其肩后轻轻侧推直至前肢侧滑数英寸,抵抗推力的能力下降)。成功模型随机分为 4 组:对照组和运动组(仅行运动训练)各 6 只、移植组(仅行 NSC 移植)和联合组(行 NSC 移植及运动训练干预)各 10 只。每组动物各取 6 只分别于实验结束时取材,应用透射电镜观察其脑组织超微结构;移植组和联合组剩余 4 只动物应用透射电镜观察 SPIO 标记 NSC 的存活和迁徙情况。

五、NSC 的 SPIO 标记

调节 SPIO 和 PLL 的浓度,将 50 μ g/ml SPIO、1.5 μ g/ml PLL 共同加入含 30 ml NSC 培养基的 75 cm³ 的培养瓶中,室温下振荡 30~60 min;将含 NSC 的培养基离心,加入 30 ml 新鲜培养基使细胞再次悬浮(调节细胞浓度为 2×10^6 个/ml);在培养瓶中加入同体积的含 SPIO-PLL 的培养液(此时 SPIO 和 PLL 浓度分别为 25 μ g/ml 和 0.75 μ g/ml);将培养瓶置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中共同培养 18 h;标记后使用亨氏液洗涤干细胞 3 次,洗去游离的 SPIO 颗粒,准备移植。

六、NSC 脑内立体定向移植

大鼠脑缺血再灌注第 5 天,麻醉后固定于立体定位仪上,切开头皮暴露颅骨,按纹状体定位坐标钻孔(前囟向后 0.3 mm,向左侧 3.0 mm,深度 5.0 mm);抽取 SPIO-PLL 标记的 NSC 悬液 20 μ l (2×10^5 个/ μ l),于 15 min 内缓慢匀速注入,留针 20 min,拔针后用明胶海绵封孔。

七、电动跑台运动训练

除对照组外,各组大鼠于术后第 6 天开始,按照文

献^[5]介绍的方法进行每周 5 d, 每天 30 min, 共计 4 周的运动训练, 不进行运动训练的大鼠则自由活动。

八、神经功能改善情况评价

分别于缺血再灌注术后第 1 天, 运动开始后第 1, 7, 14, 21 和 28 天由其他实验人员采用 mNSS 对动物进行神经功能缺损评估。mNSS 是一个综合的神经功能评估试验, 包括运动试验、感觉试验和主要反射试验, 可对运动、感觉及认知功能的损害程度作出评价^[6]。mNSS 总分为 18 分, 正常时为 0 分, 1~6 分为轻度损害, 7~12 分为中度损害, 13~18 分为重度损害。分数越高, 表示损伤越严重。

九、透射电镜标本制备

大鼠麻醉后, 迅速断头取脑, 在坏死周边区取 1 cm × 1 cm × 1 cm 大小的脑组织块 5 块; 用 2.5% 磷酸缓冲戊二醛固定液固定 48 h 及 1% 锇酸固定 2 h; 乙醇脱水, 丙酮置换, 环氧树脂包埋; 体视显微镜下修块, 甲苯胺蓝染色定位, 再修块并行超薄切片; 捞片置于 200 目铜网上, 用醋酸双氧铀和铅染色后蒸馏水洗涤, 自然干燥, 电镜下观察。

十、统计学分析

mNSS 评分数据采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。应用 SPSS 13.0 版统计软件进行分析, 组间比较采用单因素方差分析及 t 检验。

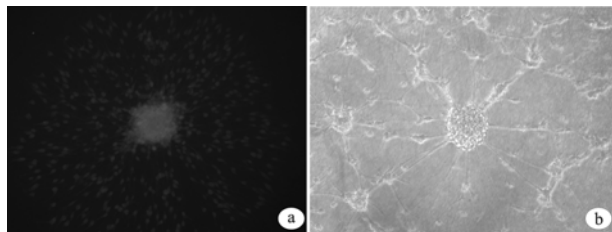
结 果

一、培养 NSC 的鉴定及分化鉴定

NSC 在培养液中呈悬浮生长, 细胞透亮, 形成规则的神经球。NSC 球贴壁固定后, 巢蛋白染色呈强阳性 (图 1a)。分化鉴定结果显示 NSC 在分化培养基中 2 h 开始贴壁生长; 1 d 后开始分化, 并向四周迁徙; 3 d 后见 NSC 分化成不同形态的贴壁细胞, 部分分化后细胞伸出长突起, 使神经球之间形成连接 (图 1b); 7 d 后这些细胞经免疫荧光染色分别呈 β -tublin III (图 2b) 和 GFAP (图 2c) 阳性。见图 2。

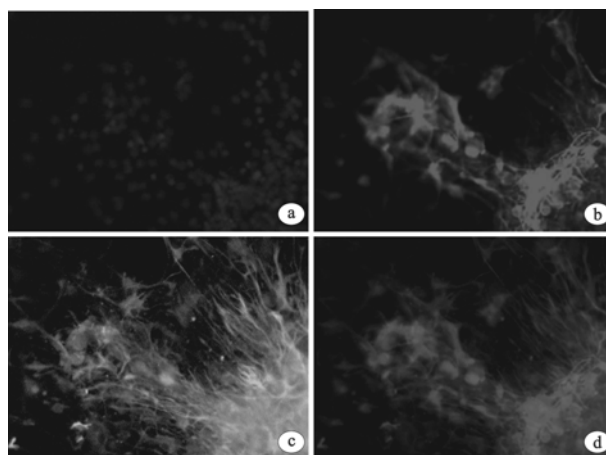
二、神经功能改善情况评价

缺血术后第 1 天, 各组大鼠 mNSS 评分为 (10.27 ± 1.54) 分, 属于中度缺血损害范围 (7~12 分)。



注: a 为 Nestin (Cy3), b 为贴壁培养第 3 天

图 1 NSC 体外培养鉴定



注: a 标记细胞核, b 标记神经元, c 标记胶质细胞, d 三者重叠

图 2 培养 NSC 的分化鉴定

缺血术后至动物处死前, 各组动物均有神经功能的不同程度恢复, 其中运动开始后第 1 天 (缺血术后第 7 天) 时, 各组大鼠 mNSS 评分下降至 (8.67 ± 1.54) 分, 但组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

运动第 7 天时, 运动组与其余 3 组比较, mNSS 评分下降, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

运动第 14 天时, 运动组评分低于联合组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 联合组评分与移植组和对照组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 移植组的 mNSS 评分略高于对照组, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

运动第 28 天时, 与对照组相比, 移植组的 mNSS 评分开始下降, 但仍高于运动组和联合组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 而运动组 [(0.93 ± 0.78) 分] 和联合组 [(1.21 ± 0.85) 分] 比较, 虽然差异无统计学意义, 但是从评分上可以看出, 运动训练组优于联合组, 见图 3。

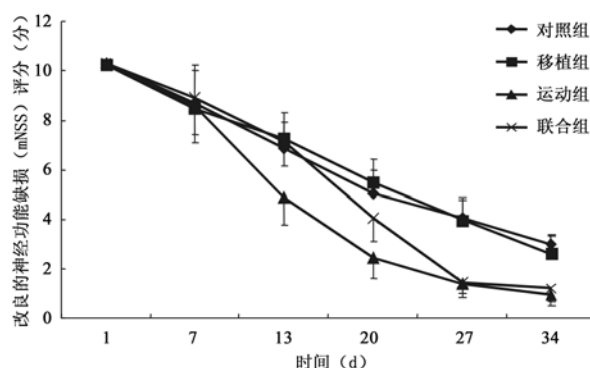
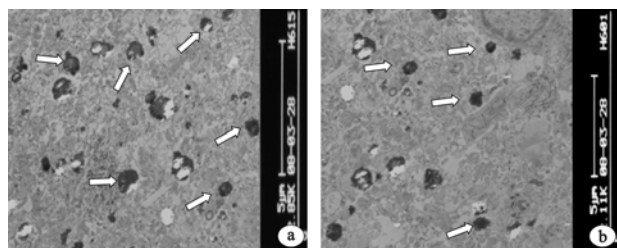


图 3 术后不同时间点各组 mNSS 评分比较

三、移植细胞在宿主缺血脑区内的存活和迁移情况

透射电镜下可见, 缺血纹状体区有 SPIO 标记的 NSC 存在, 联合组的 SPIO 标记细胞密度、迁移范围均

高于移植组,见图 4。



注:A 为联合组,B 为移植组

图 4 运动 4 周后透射电镜下显示纹状体 SPIO 标记的 NSC(箭头所指)

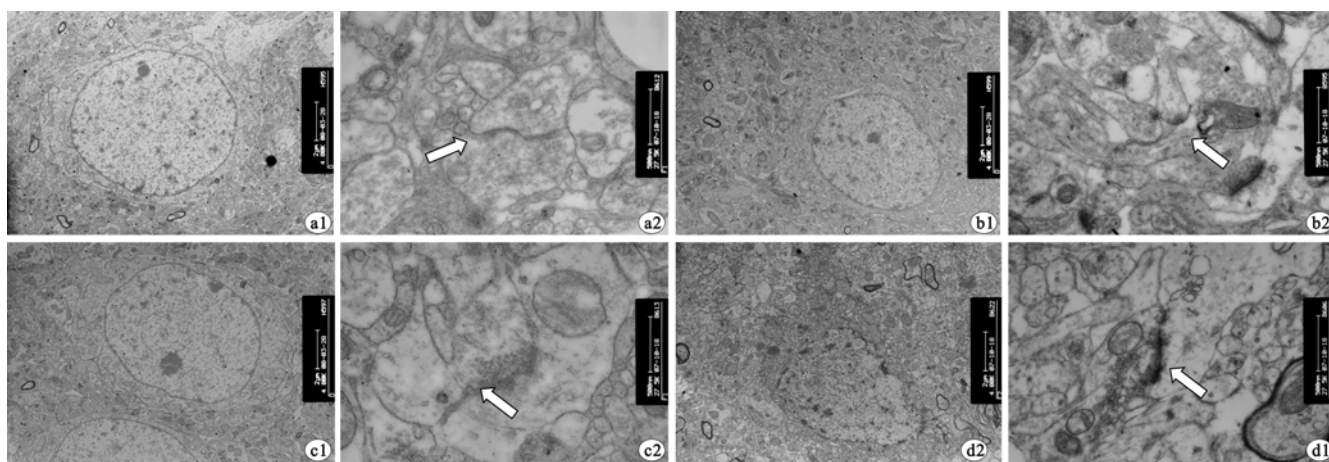
四、宿主缺血区脑超微结构变化

联合组大鼠神经细胞核膜完整,核下凝集的染色质稀少;胞浆内细胞器丰富,线粒体数量增多,有少数线粒体呈现肿胀病变,嵴稍模糊,但无轴浆空化表现;粗面内质网表面核糖体丰富,细胞水肿基本消失。突触数量较对照组明显增多,较移植组和运动组也有增多,但仍未达到正常状态,突触形态大部分接近正常(图 5 a1, a2)。

移植组核下仍有少量染色质凝集,胞浆内可见肿胀的线粒体、高尔基体和粗面内质网,形态多不规则;轴浆空化明显;突触数量少,形态未恢复正常(图 5 b1, b2)。

运动组神经细胞核膜模糊,轴浆空化病变基本消失;线粒体数目增多,但肿胀仍存在,部分线粒体空泡样化尚未恢复;正常突触数量较对照组稍有增多,形态尚未恢复正常(图 5 c1, c2)。

对照组可见大部分神经细胞核固缩,胞浆细胞器少,粗面内质网扩张,线粒体嵴断裂、溶解、消失,核糖体脱落。神经毡内突触减少(与其余各组相比),结构模糊,前后界膜不清,突触小泡数量减少甚至消失,典型的突触结构已遭破坏(图 5 d1, d2)。



注:a 为联合组,b 为移植组,c 为运动组,d 为对照组;其中 a1, b1, c1, d1 为脑区图(2 微米 80k);a2, b2, c2, d2 为突触结构图(500 纳米 27k)

图 5 运动 4 周后透射电镜下显示缺血脑区超微结构

讨 论

NSC 移植虽已成为治疗缺血性脑梗死的热门手段之一,但对 NSC 能否起到替代作用的不利证据也逐步增多^[8]。而且,目前尚缺乏监测和评估 NSC 移植后在脑内存活和迁徙情况的有效手段。通过 MRI 示踪 SPIO 标记的 NSC,虽然可以了解其在宿主脑内的生物分布和迁徙分化情况,但是不能提供 NSC 分化为神经元及参与形成突触联系并发挥功能的证据,对缺血脑区超微结构的变化也不能判断。尽管多方报道显示 NSC 移植对脑缺血后的神经功能恢复有肯定的作用^[9-11],但 NSC 在移植早期难以对宿主局部的病理改变产生积极影响。缺血早期缺血半暗带区的神经元和血管内皮细胞的坏死和凋亡无法得到缓解,这是单纯移植 NSC 的缺陷。而对于这一问题的解决,在早期的运动治疗中已经被逐步证实^[12],从而为 NSC 移植联合运动治疗提供了依据。

本研究的目的是为了从微观结构上观察 NSC 移植与运动训练联合治疗是否能够提高 MCAO 大鼠的治疗效果。透射电镜结果显示,联合组大鼠 SPIO 标记的 NSC 在宿主脑内的存活和迁徙程度优于移植组;而且在实验的 4 周之内,联合组大鼠的 mNSS 评分低于移植组,证明了 NSC 移植后联合运动训练的作用优于单纯 NSC 移植治疗。此外,本实验通过透射电镜对宿主缺血脑区超微结构的观察发现,联合组大鼠神经细胞核膜完整,核下凝集的染色质稀少;胞浆内细胞器丰富,线粒体数量增多,有少数线粒体呈现肿胀病变,嵴稍模糊,但无轴浆空化表现;粗面内质网表面核糖体丰富,细胞水肿基本消失;突触数量较对照组明显增多,较移植组和运动组也有增多,虽仍未达到正常状态,但突触形态大部分接近正常。同类的研究中,Kim 等^[4]采用人骨髓间充质干细胞对 MCAO 模型鼠进行细胞

移植,移植后联合跑台训练治疗,结果显示联合治疗在改善神经行为和减小脑梗死体积方面具有积极作用,但在这两方面的影响并不比单纯跑台训练明显。Hicks 等^[3]将来自 SVZ 区的神经前体细胞移植到 MCAO 术后第 7 天的大鼠特定脑区后,在丰富的生存环境中饲养,并给予每周 1 次的跑步训练。研究结果提示,丰富的生存环境可能是促进移植细胞存活、迁移、分化并改善肢体运动功能的有利因素。

本实验结果显示,联合组移植的 NSC 能够在宿主体内存活、迁移,改善缺血局部的脑超微结构,治疗效果较移植组有所提高,说明运动训练在脑卒中后 NSC 移植的治疗中扮演了积极作用。通过透射电镜我们还观察到,部分 SPIO 标记的 NSC 移植到脑内 4 周后,表现为神经元样细胞结构,如核大、有丰富的高尔基体、核糖体以及胞体周围的神经毡。这表明移植的 NSC 在体内有向成熟神经元转化的潜能。然而,透射电镜观察未发现 SPIO 标记的 NSC 与宿主细胞产生突触联系^[13,14],因此,对转化的神经元样细胞的功能评估还需要进一步的研究。而且,本研究在观察中发现,在神经功能缺损修复方面,单纯 NSC 移植治疗并未见到明显促进作用,即使联合了运动训练,mNSS 评分也没有明显优于单纯运动训练。这可能是因为本研究中这种联合干预的观察时间仅有 4 周,不足以抵消移植手术带来的二次脑损伤的影响,因此,还需要延长实验观察的时间。另外,对这种联合效果产生的内部机制,以及运动训练介入的时间窗等问题都还需深入研究。同时,也需要更多的证据来证明,在缺血性脑卒中的治疗中,运动训练和 NSC 移植具有协同作用。

参 考 文 献

- [1] Haas S, Weidner N, Winkler J. Adult stem cell therapy in stroke. *Curr Opin Neurol*, 2005, 18: 59-64.
- [2] Olstorn H, Moe MC, Roste GK, et al. Transplantation of stem cells from the adult human brain to the adult rat brain. *Neurosurgery*, 2007, 60: 1089-1098.
- [3] Hicks AU, Hewlett K, Windle V, et al. Enriched environment enhances transplanted subventricular zone stem cell migration and functional recovery after stroke. *Neuroscience*, 2007, 146: 31-40.
- [4] Kim DY, Park SH, Lee SU, et al. Effect of human embryonic stem cell-derived neuronal precursor cell transplantation into the cerebral infarct model of rat with exercise. *Neurosci Res*, 2007, 58: 164-175.
- [5] 贾杰, 胡永善, 吴毅, 等. 运动训练促进脑梗死大鼠外源性神经干细胞迁移分化的实验研究. *中国康复医学杂志*, 2008, 23: 594-597.
- [6] Chen J, Sanberg PR, Li Y, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke*, 2001, 32: 2682-2688.
- [7] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20: 84-91.
- [8] Lim HC, Lee ST, Chu K, et al. Neuroprotective effect of neural stem cell-conditioned media in *in vitro* model of Huntington's disease. *Neurosci Lett*, 2008, 435: 175-180.
- [9] Toda H, Takahashi J, Iwakami N, et al. Grafting neural stem cells improved the impaired spatial recognition in ischemic rats. *Neurosci Lett*, 2001, 316: 9-12.
- [10] Zhang RL, 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. *Neuroscience*, 2001, 105: 33-41.
- [11] Yagita Y, Kitagawa K, Ohtsuki T, et al. Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus. *Stroke*, 2001, 32: 1890-1896.
- [12] 郑庆平, 胡永善, 白玉龙, 等. 局灶性脑缺血大鼠康复训练干预时间的研究. *复旦学报(医学版)*, 2007, 34: 895-897.
- [13] Wislet-Gendebien G, Hans P, Leprince J M, et al. Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. *Stem Cell*, 2005, 23: 392-402.
- [14] Zhao LX, Zhang J, Cao F, et al. Modification of the brain-derived neurotrophic factor gene: a portal to transform mesenchymal stem cells into advantageous engineering cells for neuroregeneration and neuroprotection. *Exp Neurol*, 2004, 190: 396-406.

(收稿日期: 2008-10-15)

(本文编辑: 吴 倩)

· 消息 ·

全国理疗康复大专《专业证书》班招生简章

受卫生部委托,全国理疗康复医师培训部继续举办第二十八届全国理疗康复医师进修班及第十四届全国高等教育理疗康复针推大专专业证书班。于 2009 年 3 月开学,学制一年,学费 3 200 元,含住宿费、实习费、书费。本班面向全国医疗单位、部队及个体诊所招生,学习期满考试合格,由国家卫生部及辽宁中医药职业技术学院颁发大专专业证书。

联系地址:辽宁省鞍山市汤岗子医院全国理疗康复医师培训部;邮编:114048;联系电话:(0412)2410228;联系人:王先生、唐女士。

辽宁中医学院职业技术学院
全国理疗康复医师培训部