

· 基础研究 ·

神经干细胞联合神经生长因子纳米粒海马移植对 APP/PS1 转基因小鼠行为学及海马突触素的影响

朱清 陈艳 胡楠 姜荣荣 路慧聪

广州医科大学附属第二医院康复医学科, 广州 510260

通信作者: 陈艳, Email: chenyaodoctor@163.com

【摘要】 目的 观察神经干细胞(NSCs)联合神经生长因子(NGF)纳米粒海马移植对 APP/PS1 双转基因小鼠行为学及海马突触素(SYP)的影响。方法 体外分离培养增强型绿色荧光蛋白(EGFP)转基因小鼠胚胎来源 NSCs, 24 只 12 月龄雄性 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠随机分入 NSCs 联合 NGF 纳米粒移植组(NSCs+NGF-NP 组)、NSCs 移植组(NSCs 组)和 AD 对照组(AD 组), 每组 8 只, 另选 8 只同月龄雄性野生型小鼠作为健康对照组(WT 组)。NSCs+NGF-NP 组和 NSCs 组分别行 NSCs 联合 NGF 纳米粒移植和 NSCs 移植, 其余两组均行等量磷酸盐缓冲液(PBS)注射, 移植部位为双侧海马区。移植 4 周后, 采用 Morris 水迷宫检测 4 组小鼠学习记忆功能, 用免疫荧光组化法检测移植细胞的迁移与分化, Western blot 检测 SYP 蛋白水平。结果 体外悬浮培养的神经球表达 EGFP 阳性, 免疫荧光显示 NSCs 特异性标志物 Nestin 阳性。移植 4 周后, 可见 EGFP 示踪的 NSCs 在海马注射移植部位存活并向胼胝体, 海马深部和齿状回迁移, 可分化为双皮质素(DCX)阳性神经元及胶质纤维酸性蛋白(GFAP)阳性胶质细胞, 并可见 NSCs+NGF-NP 组存活细胞数量较多, 突起较长, 穿越海马颗粒层。海马突触相关蛋白 SYP 检测显示, WT 组、NSCs 组和 NSCs+NGF-NP 组海马 SYP 蛋白水平较 AD 组明显增高($P<0.05$), NSCs+NGF-NP 组 SYP 蛋白水平明显高于 NSCs 组($P<0.05$), 且与 WT 组比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。水迷宫检测显示, 与 AD 组比较, WT 组、NSCs 组和 NSCs+NGF-NP 组在平台象限停留时间及穿越平台次数均增加($P<0.05$), NSCs+NGF-NP 组穿越平台的次数大于 NSCs 组($P<0.05$), 且与 WT 组比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 NSCs 联合 NGF 纳米粒海马移植治疗可能促进移植细胞在体内存活及成熟, 增加海马突触, 从而改善 AD 小鼠学习记忆功能。

【关键词】 阿尔茨海默病; 神经干细胞; 移植; 突触素

基金项目: 广东省科技发展专项基金(2017A030313907)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2020.08.001

The effect of combining transplanted neural stem cells with neural growth factors on synaptophysin levels and behavior

Zhu Qing, Chen Yan, Hu Nan, Jiang Rongrong, Lu Huicong

Department of Rehabilitation Medicine, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, China

Corresponding author: Chen Yan, Email: chenyaodoctor@163.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of transplanting neural stem cells (NSCs) and nerve growth factor (NGF) nanoparticles on hippocampal synaptophysin (SYN) levels in APP/PS1 double-transgenic mice and on their behavior. **Methods** NSCs from the brains of transgenic mouse fetuses were cultured in vitro. Twenty-four 12-month-old male APP/PS1 mice with Alzheimer's disease (AD) were randomly divided into an NSC combined with NGF transplantation group (NSCs+NGF-NP group), an NSC transplantation group (NSCs group) and an AD control group (AD group), each of 8. Another 8 healthy male counterparts formed a normal control group (WT group). The rats in the NSCs+NGF-NP and NSCs groups had NSCs combined with NGF nanoparticles or NSCs alone injected into their brains, while the bilateral hippocampi of the other two groups were injected with the same volume of phosphate buffer. Four weeks later the Morris water maze test was used to quantify the rats' learning and memory functioning. The migration and differentiation of the transplanted cells were measured using fluorescence immunohistochemistry, while the level of synaptophysin protein in the hippocampus was detected using western blotting. **Results** Neurospheres cultured in vitro showed positive expression of enhanced green fluorescent protein(EGFP) and nestin, which are specific markers of neural stem cells. Four weeks after the transplantation, cells traced using EGFP had survived and migrated to the corpus callosum and deep into the hippocampus and dentate gyrus. Transplanted cells had differentia-

ted into DCX-positive neurons and GFAP-positive glial cells. The samples from the NSCs+NGF-NP group showed a larger number of viable cells with longer protrusions, and some had crossed the hippocampal granular layer. The average synaptophysin levels in the WT, NSCs and NSCs+NGF-NP groups were significantly higher than that of the AD group. The average synaptophysin level of the NSCs+NGF-NP group was significantly higher than in the NSCs group but not significantly different from the WT group's average. The Morris water maze results showed that compared with the AD group the time in the platform quadrant and the platform crossing times increased significantly in the WT, NSCs and NSCs+NGF-NP groups. The average platform crossing time of the NSCs+NGF-NP group was greater than that of the NSCs group but not significantly different from the WT group's average. **Conclusion** Injecting NSCs combined with NGF nanoparticles can promote the survival and maturation of the transplanted cells in vivo, increase hippocampal synapses, and thus improve learning and memory, at least in AD mice.

【Key words】 Alzheimer's disease; Neural stem cells; Transplantation; Synaptophysin

Funding: Special Fund for Science and Technology Development of Guangdong Province (2017A030313907)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2020.08.001

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种起病隐匿且进行性发展的神经系统退行性疾病, 目前尚无有效的治疗方法。研究显示, AD 患者存在广泛的神经突触丢失, 早在发生认知功能障碍之前, 前额皮质、海马存在突触功能异常^[1], 突触损伤参与 AD 发生及发展的整个过程^[2]。神经干细胞 (neural stem cell, NSCs) 移植治疗是目前 AD 研究的热点之一, 如何提高 NSCs 移植入脑内的存活率及诱导定向分化仍是研究者们关注的焦点。研究表明, 神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 可在体内外促进 NSCs 增殖、存活及分化, 给予外源性 NGF 能够改善 AD 模型鼠的认知功能^[3], 但 NGF 作为一种大分子蛋白质, 难以透过血脑屏障, 反复脑内注射给药易导致感染等并发症。笔者前期研究证实, 复乳化溶剂扩散法制备 NGF 纳米粒有较好的缓释作用, 并在体外可促进神经干细胞分化为神经元^[4, 5]。本研究采用增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 示踪的 NSCs 联合 NGF 纳米粒海马移植, 观察 NSCs 迁移分化, 旨在探讨其对 AD 鼠行为学及海马突触素 (synaptophysin, SYP) 的影响, 为 AD 的细胞移植治疗提供参考。

材料与方 法

一、材料

1. 实验动物: 5 月龄雄性 APP/PS1 转基因 AD 小鼠 24 只 (实验动物合格证号 44007200038817), 由广东省实验动物中心提供, SPF 级饲养至 12 月龄; 同月龄雄性野生型小鼠 (wild type, WT) 8 只, 由广州中医药大学实验动物中心提供 (许可证号 SCXK 粤 2013-0034); 广泛表达 EGFP 的 C57BL/6-转基因小鼠 (3 只) 购自南京大学-南京生物医药研究院 (许可证号 SCXK 苏 2015-0001), 购回后交配育种, 实验中所使用的 NSCs 来自孕 12.5~14.5 d 的胎鼠脑。

2. 实验主要试剂: D-Hanks 平衡盐溶液、细胞消化

酶 (Accutase)、B27 添加剂、杜氏改良培养基 (Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM/F12)、神经基础培养基 (Neurobasal, Gibco 公司)、青-链霉素溶液 (Sigma 公司); 碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF)、NGF 由 PeproTech 公司提供; 甲基封端的聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸聚合物 (MePEG-PLGA) 由岱罡生物科技有限公司提供, 聚乙烯醇 (Sigma 公司)、二氯甲烷和丙酮 (国产分析纯); 小鼠抗巢蛋白 (Nestin) 抗体、小鼠抗胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 抗体 (Abcam 公司); 兔抗双皮质素 (doublecortin, DCX) 抗体、兔抗 SYP 抗体 (CST 公司); 辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase, HRP) 标记驴抗兔 IgG (Affinity Bioscience 公司)、羊抗小鼠 IgG-Alexa Fluor 568、驴抗兔 IgG-Alexa Fluor 594 (Thermo Fisher 公司)。

二、研究方法

1. NGF 纳米粒制备: 参照课题组优化处方及方法^[5], 以 MePEG-PLGA 作为药物载体, 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 浓度为 200 mg/ml、聚乙二醇-聚乳酸聚乙醇酸共聚物 (poly ethyleneglycol-poly lactic-co-glycolic acid, PEG-PLGA) 为 180 mg/ml、聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol, PVA) 为 3%; 超声时间 7 min, 内水相体积 50 μ L, NGF 5 μ g。制备 NGF 纳米粒 (nerve growth factor - nanoparticles, NGF-NP), 平均粒径为 312.5 nm, 分散指数 0.221, 粒径分布呈单峰曲线。冻干后, 4 $^{\circ}$ C 环境下冷藏备用。

2. NSCs 的分离培养与鉴定: 将 2 只孕 12.5~14.5 d 的 EGFP 转基因小鼠断颈处死, 75% 酒精消毒子宫及胎鼠, 预冷 D-Hanks 平衡盐溶液中取出胎鼠头部, 剥离脑膜及血管, 眼科剪剪碎脑组织后转入试管中, 吸管轻柔吹打至肉眼不可见组织块, 经 200 目无菌滤网过滤后离心 5 min 收集细胞 (1000 r/min, 离心半径 10 cm),

DMEM/F12 培养液清洗 1 次,去上清加入 NSCs 增殖培养基(DMEM/F12 基础培养液+2% B27+20 ng/ml EGF+20 ng/ml bFGF+1%青-链霉素溶液)重悬,调整细胞浓度为 $1 \times 10^5/\text{ml}$,加入到培养瓶中,放入 37°C 5% CO_2 培养箱中培养。根据细胞生长状态 2~3 d 半量换液,5~6 d 传代,按传代次数依次记为 P1、P2 代,取 P2 代神经球进行 NSCs 特异性标志物 Nestin 染色。具体操作如下。

P2 代神经球离心重悬,接种于多聚赖氨酸包被的 24 孔板中,待神经球贴壁牢固行 Nestin 染色。细胞去除培养基经磷酸盐缓冲液(phosphate buffer, PBS)清洗后,4%多聚甲醛溶液室温固定 15 min,其余步骤同组织切片的荧光染色(除贴片步骤外),一抗为小鼠抗 Nestin 抗体,4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色 15 min,清洗后荧光显微镜下观察拍照。

3. 实验分组及 NSCs 移植:24 只 12 月龄雄性 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠按随机数字表法分为 NSCs 联合 NGF 纳米粒移植组(NSCs+NGF-NP 组)、NSCs 移植组(NSCs 组)和 AD 对照组(AD 组),每组 8 只,另 8 只同月龄雄性野生型小鼠作为健康对照组(WT 组)。P2 代神经球经 Accutase 酶消化为单细胞后,清洗一遍,分为 2 管,一管用 PBS 重悬细胞,另一管用 PBS 溶液溶解的 NGF 纳米粒悬液(最终 NGF 纳米粒悬液浓度 50 ng/ml)重悬细胞。0.4%台盼蓝显微镜下计数调整活细胞密度为 $1 \times 10^5/\mu\text{l}$ 。NSCs 组和 NSCs+NGF-NP 组分别移植 5 μl 新鲜配置的 NSCs 悬液和 NGF 纳米粒重悬的 NSCs 悬液,AD 组和 WT 组分别注射等量的 PBS;移植部位为双侧海马区,根据小鼠脑立体定位图谱,双侧海马位点为前囟后 2.06 mm,旁开 1.85 mm,进针深度为 2.50 mm。手术后的鼠单笼饲养,自由进食饮水。

4. Morris 水迷宫检测学习记忆功能:干细胞移植 4 周后,采用 Morris 水迷宫对各组小鼠进行学习记忆功能检测。所用 Morris 水迷宫为直径 120 cm、高 50 cm 的圆形水池,水温保持在 $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$,池内水面下约 1.5 cm 设有圆形固定平台,水池被分成 4 个相等的象限,4 个象限贴有不同形状标记物,视频采集系统同步记录小鼠在整个水池内的运行轨迹。

定位航行实验历时 5 d,每只小鼠每天分别从不同的象限面向池壁入水,视频分析软件同步记录小鼠在 60 s 内的运行轨迹。若小鼠在 60 s 内找到隐藏在水下的平台,并在平台停留 ≥ 2 s,则录像停止;若 60 s 内未找到平台,则将小鼠指引至平台停留 10 s,帮助其建立空间记忆,此时逃避潜伏期记录为 60 s。每只小鼠每天的逃避潜伏期为 4 个象限逃避潜伏期的平均值。

空间探索实验是在 5 d 的定位航行实验结束后随即撤除平台,在平台对侧象限将小鼠面向池壁入水,记录小鼠在 60 s 内穿越平台的次数以及在目标象限(原平台所在象限)活动的时间。

5. 免疫荧光组化染色:干细胞经移植 4 周行为学检测之后,每组取 4 只小鼠,对各组小鼠海马进行免疫荧光检测。小鼠经 1%戊巴比妥钠麻醉后,先用生理盐水灌注,后用预冷 4%的多聚甲醛灌注固定,断头取脑,将脑组织置于 4%的多聚甲醛溶液中后固定(4°C ,过夜),然后分别在 10%、20%、30%的蔗糖溶液中梯度脱水。用最佳切片温度(optimal cutting temperature, OCT)包埋剂包埋脑组织并行海马连续冠状面切片,片厚 30 μm 。利用漂片法对海马脑片进行免疫荧光组化染色。具体操作如下。

PBS 洗 3 次(5 min/次),0.3% Triton X-100 室温孵育 15 min,PBS 洗 3 次(5 min/次);5%的 BSA 室温封闭 2 h,吸弃 BSA 后直接加入 GFAP 和 DCX 一抗工作液(1:300)用于标记胶质细胞和神经元, 4°C 孵育过夜,次日取出室温恢复 30 min,PBS 洗 3 次(10 min/次),加入相应荧光二抗工作液(1:500),室温孵育 1.5 h(后续步骤需避光),PBS 洗 3 次(10 min/次),贴片并滴加抗荧光衰减封片剂(含 DAPI),封片后待稍微干燥,荧光显微镜下观察并拍照。

6. Western Blot 蛋白检测:干细胞经移植 4 周行为学检测之后,每组余 4 只小鼠,颈椎脱臼法处死小鼠,快速断头取脑,分离海马,并提取总蛋白,配平各组中蛋白浓度,蛋白经高温变性后,保存于 -80°C 冰箱中备用。①聚丙烯酰胺凝胶电泳——按照配方配制 10%分离胶和 5%浓缩胶,各组取等量蛋白样品加入电泳槽中浓缩胶样本孔内,80 V 电泳 120 min 左右;②转膜——将蛋白转印于 PVDF 膜上,276 mA 恒流,转膜 100 min;③免疫反应——5%脱脂奶粉封闭 1~2 h,稍清洗后加入 SYP 一抗工作液, 4°C 摇床孵育过夜;次日洗膜后加入 HRP 抗兔二抗,室温孵育 1 h,洗膜 3 次(10 min/次);④化学显影成像——将 PVDF 膜条带平铺于显影机面板上,加入显影剂(现配现用)后放入 GeneGnome 成像分析系统检测蛋白条带。

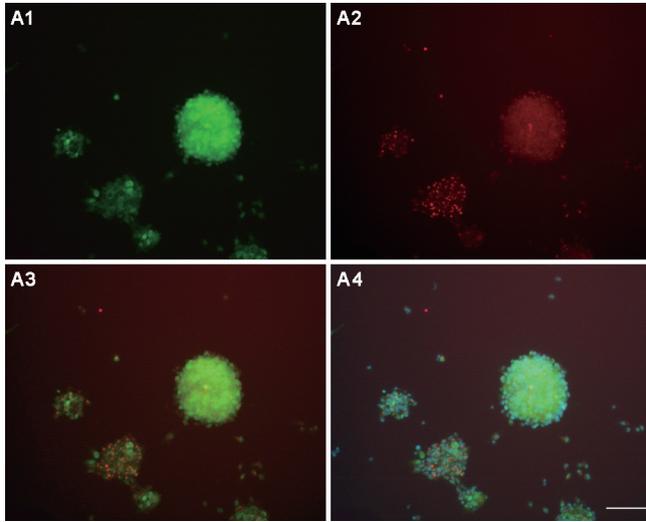
三、统计学方法

使用 SPSS 16.0 版统计软件对所得数据进行统计学分析处理,数据经正态性和方差齐性检验,两均数间比较采用独立样本 t 检验,多组均数间比较采用单因素方差分析,所得数据均数标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结 果

一、EGFP 阳性 NSCs 的分离培养及鉴定

体外分离培养的表达 EGFP 的 NSCs, 培养 2 d 时, 有少量松散的细胞团块悬浮在培养液中; 3 d 时, 悬浮的细胞团逐渐增多, 变大; 5~6 d 时, 悬浮的细胞团更多, 且较前增大, 折光性强, 细胞团周围可见明显的锯齿状边缘, 荧光显微镜下观察这些细胞团广泛表达增强的绿色荧光, 取 P2 代神经球进行 NSCs 特异性记 Nestin 染色, 可见神经球表达 Nestin 阳性(红色)和 EGFP 阳性(绿色), 如图 1 所示。



注:图 A1 示体外培养的神神经球, 表达 EGFP 阳性(绿色); 图 A2 示神经球表达 Nestin 阳性(红色); 图 A3 示 EGFP(绿色)与 Nestin(红色)融合图像; 图 A4 示细胞核 DAPI(蓝色)+EGFP(绿色)+Nestin(红色)融合图像; 比例尺(scale bar)= 100 μm

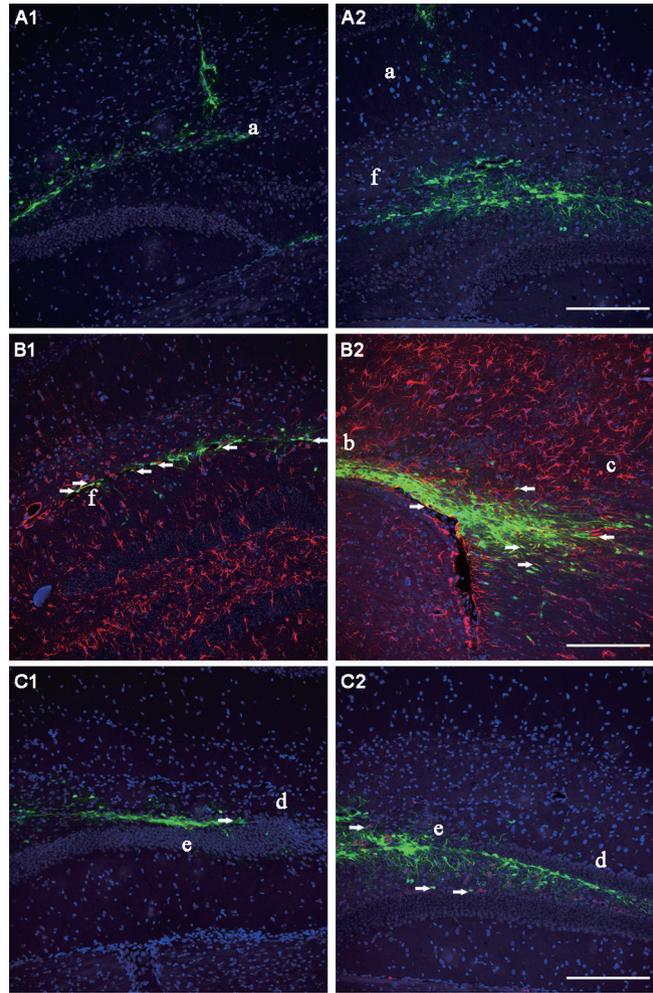
图 1 NSCs 的培养及干细胞特性 Nestin 鉴定(免疫荧光染色, ×200)

二、EGFP 阳性 NSCs 在 AD 鼠脑内的存活及迁移和分化

移植 4 周后, 可见 EGFP 阳性 NSCs 存活, 并广泛迁移至胼胝体、深部海马及齿状回, 海马内部更易沿着海马沟和齿状回迁移, 并未见细胞向基底前脑迁移。移植细胞可分化为 GFAP 阳性胶质细胞(图 2B, 箭头所示)和 DCX 阳性神经元(图 2C, 箭头所示)。NSCs+NGF-NP 组的细胞存活数较 NSCs 组多(图 2), 且细胞形态较为复杂, 显示粗大、较长的突起, 迁移至颗粒层的细胞有更多类似于成熟颗粒细胞形态的 NSC。NSCs 组和 NSCs+NGF-NP 组移植细胞在体内的相对存活数如图 3 所示。

三、NSCs 联合载 NGF 纳米粒移植对 APP/PS1 转基因鼠行为学的影响

1. 定位航行实验: 各组小鼠的逃避潜伏期有逐渐缩短趋势, 训练第 5 天时, WT 组、NSCs 组和 NSCs+NGF-NP 组的逃避潜伏期均显著短于 AD 组, 差异有统计学意义($P<0.05$), 如图 4 所示。

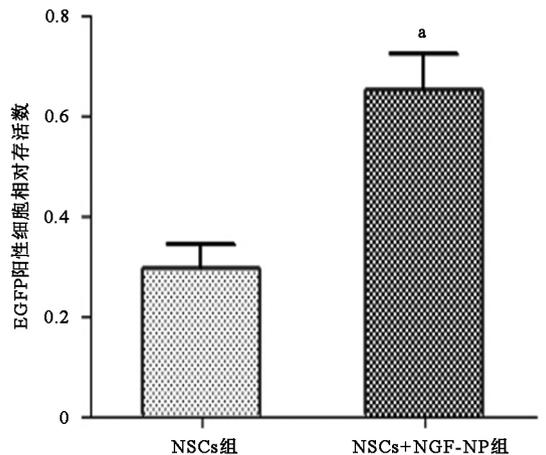


NSCs 组

NSCs+NGF-NP 组

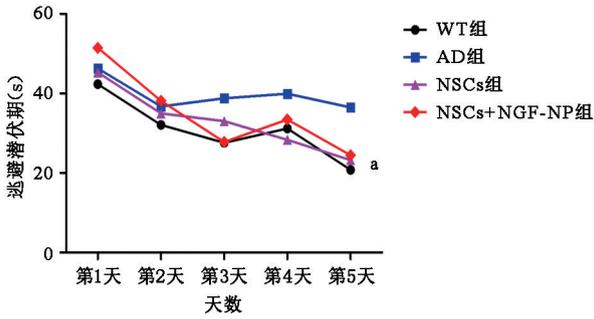
注:图 A 示两组移植细胞的存活及迁移情况; 图 B 示两组移植细胞分化为 GFAP 阳性胶质细胞情况(箭头所示为 EGFP 阳性+GFAP 阳性); 图 C 示两组移植细胞分化为 DCX 阳性神经元情况(箭头所示为 EGFP 阳性+DCX 阳性); 比例尺为 200 μm; 图中 a 示海马内, b 示胼胝体, c 示脑皮质, d 示齿状回, e 示齿状回颗粒层, f 示齿状回分子层

图 2 EGFP 移植细胞(绿色)在脑内的存活及迁移和分化(免疫荧光染色, ×100)



注:与 NSCs 组比较, ^a $P<0.05$

图 3 移植 4 周 NSCs 组和 NSCs+NGF-NP 组的 EGFP 阳性细胞相对存活数比较



注:与 AD 组比较,^a $P < 0.05$
图 4 各组小鼠的逃避潜伏期比较

2.空间探索实验:AD 组小鼠的游泳路径显示较为分散,其余 3 组游泳路径相对集中,如图 5 所示。

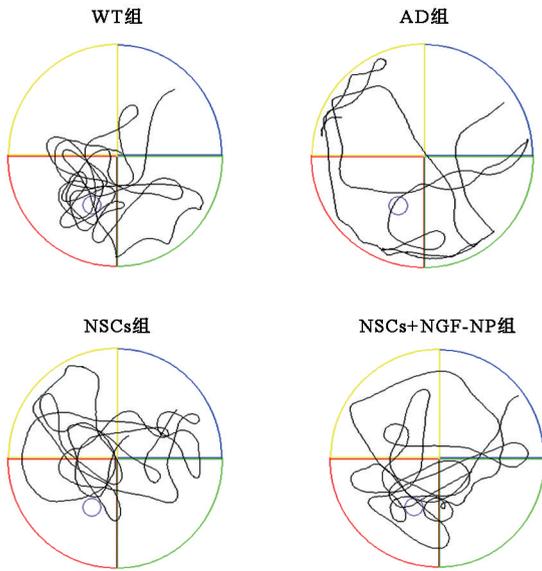
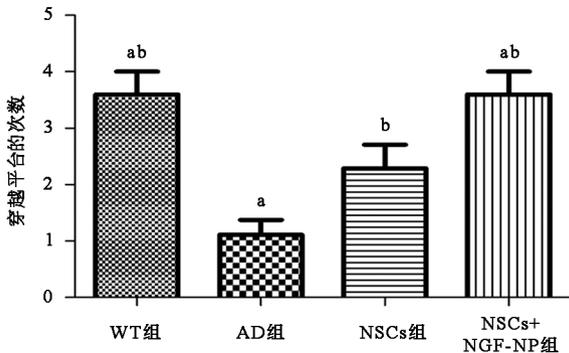


图 5 空间探索试验中各组小鼠的游泳路径

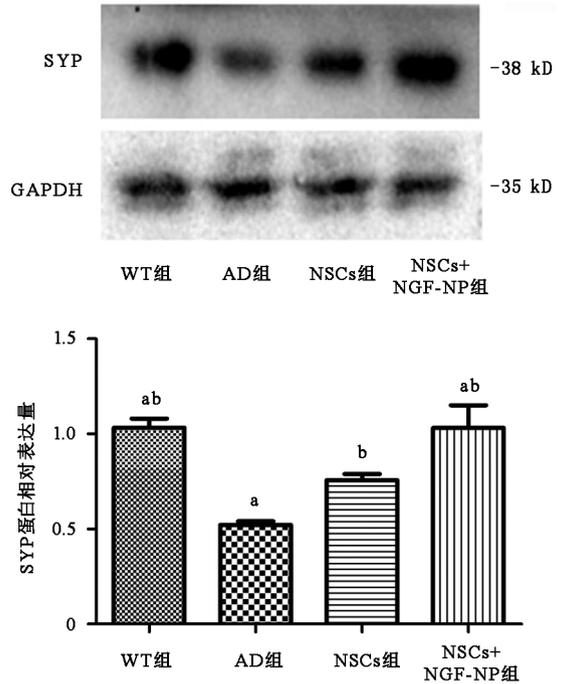
WT 组、NSCs 移植组和 NSCs+NGF-NP 组小鼠的穿越平台次数均明显多于 AD 组 ($P < 0.05$); NSCs+NGF-NP 组小鼠穿越平台的次数亦明显多于 NSCs 组 ($P < 0.05$),且与 WT 组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



注:与 NSCs 组比较,^a $P < 0.05$;与 AD 组比较,^b $P < 0.05$
图 6 各组小鼠穿越平台的次数

四、NSCs 联合 NGF 纳米粒移植对 SYP 的影响

各组海马 SYP 蛋白检测显示,12 月龄的 APP/PS1 转基因 AD 鼠海马中 SYP 水平明显降低 ($P < 0.05$); NSCs 移植及 NSCs 联合 NGF-NP 移植均能够促进海马 SYP 的表达, NSCs+NGF-NP 组 SYP 蛋白水平明显高于 NSCs 组 ($P < 0.05$),且与 WT 组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。详见图 7。



注:与 NSCs 组比较,^a $P < 0.05$;与 AD 组比较,^b $P < 0.05$

图 7 各组小鼠海马区 SYP 蛋白表达

讨 论

有研究指出,AD 典型症状的出现与突触数量减少和突触功能的改变密切相关^[1,6]。体内外研究表明 NGF 可促进 NSCs 增值分化及改善 AD 鼠学习记忆能力^[7-9], NGF-NP 体外具有良好的生物学活性,可体外诱导 PC12 细胞向神经元样细胞分化^[5]。本研究采用 NSCs 联合 NGF 纳米粒移植,观察联合移植中 NSCs 迁移及分化命运,以及对 AD 鼠海马 SYP 蛋白与学习记忆能力的影响。

本研究中,经移植治疗 4 周后,EGFP 阳性 NSCs 表达较强绿色荧光,移植的 NSCs 能够存活,广泛迁移到皮质,胼胝体和深部海马,海马内部更易在齿状回腹侧至背侧迁移,但并未见到迁移至基底前脑。提示无论是单纯的 NSCs,还是 NSCs 联合 NGF 纳米粒移植,并没有对基底前脑胆碱能神经元的丢失产生直接的细胞替代作用。但本研究中,NSCs 联合 NGF 纳米粒移植组细胞存活数较 NSCs 移植组更多,细胞形态上也有差别,联合移植组颗粒层的细胞形态类似于成熟颗

粒细胞形态,呈单一长突起并跨越了整个颗粒层;海马其它部位则长出粗大复杂的突起交织成网。而以往有文献报道,内源性及外源性 NSCs 的存活和成熟受 AD 脑内病理微环境的影响^[10]。本研究中,NSCs 联合 NGF 纳米粒移植,可能通过纳米粒缓慢释放 NGF,NGF 被突触末端摄取,逆行转运至神经元胞体,从而对移植细胞发挥营养和保护作用,促进移植细胞突触发生与成熟。此外,NGF 还可能改善移植细胞的微环境,对移植细胞及神经突触发挥保护作用^[11]。

海马突触的损伤及基底前脑胆碱能神经元的丢失与 AD 鼠学习记忆能力密切相关。SYP 是一种与突触可塑性密切相关的突触囊泡蛋白,SYP 基因敲除小鼠突触可塑性受损,显示学习迟缓和记忆减退^[12]。有研究显示,内源性 NGF 密切控制新皮质胆碱能突触数目使其维持稳定状态^[13],NGF 能促进 AD 模型鼠学习记忆能力的恢复和海马内突触重建^[14]。本研究中,海马移植 4 周后并未见到移植 NSCs 直接补充基底前脑细胞丢失,但行为学检测发现,NSCs 联合 NGF 纳米粒移植学习记忆能力改善优于单纯 NSCs 移植。因此,行为学检测后,本研究还检测了各组小鼠海马 SYP 蛋白的表达情况。结果显示,AD 转基因鼠 SYP 蛋白水平降低,NSCs 移植以及 NSCs 联合 NGF 纳米粒移植可以显著提高海马 SYP 蛋白水平,且联合 NGF 纳米粒移植效果明显优于单纯的 NSC 移植,说明联合移植 NGF 纳米粒组可能通过缓慢释放 NGF,模拟内源性 NGF 的连续供给,促进神经元分化,促进海马突触的发生与成熟,通过增加长时程增强效应^[15]等,从而改善 AD 鼠认知功能。

综上所述,采用 EGFP 阳性 NSCs 植入双侧海马,移植的 NSCs 能够存活、迁移并分化为神经元及胶质细胞,并不能直接补充基底前脑胆碱能神经元的丢失;NSCs 联合 NGF 纳米粒移植可能通过 NGF 纳米粒缓慢释放 NGF,促进移植 NSCs 存活与成熟,进而缓解神经突触损伤,改善 AD 小鼠学习记忆功能。

志谢 特别感谢华中科技大学同济医学院附属协和医院康复医学科王刚教授对本论文的修改提出的宝贵意见,使论文结构更加完整

参 考 文 献

- [1] Lista S, Hampel H. Synaptic degeneration and neurogranin in the pathophysiology of Alzheimer's disease[J]. *Expert Rev Neurother*, 2017, 17(1):47-57. DOI:10.1080/14737175.2016.1204234.
- [2] Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, et al. Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment[J]. *Neurology*, 2007, 68(18):1501-1508. DOI:10.1212/01.wnl.0000260698.

- 46517.8f.
- [3] De Rosa R, Garcia AA, Braschi C, et al. Intranasal administration of nerve growth factor (NGF) rescues recognition memory deficits in AD11 anti-NGF transgenic mice[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(10):3811-3816. DOI:10.1073/pnas.0500195102.
- [4] 陈艳,包国庆,刘菲菲,等.载神经生长因子纳米粒诱导神经干细胞分化为神经元及 PI3K/Akt 通路的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(28):4576-4581. DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.28.027.
- [5] 包国庆,龙大宏,陈艳,等.载神经生长因子纳米药物体外诱导 PC12 细胞的药效[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(16):2891-2898. DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.16.006.
- [6] Li K, Wei Q, Liu FF, et al. Synaptic dysfunction in Alzheimer's disease: A β , Tau, and epigenetic alterations[J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(4):3021-3032. DOI:10.1007/s12035-017-0533-3.
- [7] Zhang Q, Liu Y, Yang N, et al. Nasal administration of cholera toxin B subunit-nerve growth factor improves the space learning and memory abilities in beta-amyloid protein (25-35)-induced amnesic mice[J]. *Neuroscience*, 2008, 155(1):234-240. DOI:10.1016/j.neuroscience.2008.05.040.
- [8] Wang Q, Song YH, Tang Z, et al. Effects of ganglioside GM1 and neural growth factor on neural stem cell proliferation and differentiation[J]. *Genet Mol Res*, 2016, 15(3):138-145. DOI:10.4238/gmr.15038376.
- [9] Han Z, Wang CP, Cong N, et al. Therapeutic value of nerve growth factor in promoting neural stem cell survival and differentiation and protecting against neuronal hearing loss[J]. *Mol Cell Biochem*, 2017, 428(1-2):149-159. DOI:10.1007/s11010-016-2925-5.
- [10] Mu Y, Gage FH. Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease[J]. *Mol Neurodegener*, 2011, 6(1):85-89. DOI:10.1186/1750-1326-6-85.
- [11] Marsh S E, Blurton-Jones M. Neural stem cell therapy for neurodegenerative disorders; the role of neurotrophic support[J]. *Neurochemistry International*, 2017, 106(1):94-100. DOI:10.1016/j.neuint.2017.02.006.
- [12] Schmitt U, Tanimoto N, Seeliger M, et al. Detection of behavioral alterations and learning deficits in mice lacking synaptophysin[J]. *Neuroscience*, 2009, 162(2):234-243. DOI:10.1016/j.neuroscience.2009.04.046.
- [13] Isaev NK, Stelmashook EV, Genrikhs EE. Role of nerve growth factor in plasticity of forebrain cholinergic neurons[J]. *Biochemistry*, 2017, 82(3):291-300. DOI:10.1134/S0006297917030075.
- [14] 龙大宏,姚志彬,何蕴韶,等.神经生长因子促进老年痴呆鼠学习记忆恢复和海马突触重建[J]. *神经解剖学杂志*, 1996, 12(2):131-136.
- [15] Ivanov AD, Tukhbatova GR, Salozhin SV, et al. NGF but not BDNF overexpression protects hippocampal LTP from beta-amyloid-induced impairment[J]. *Neuroscience*, 2015, 289:114-122. DOI:10.1016/j.neuroscience.2014.12.063.

(修回日期:2020-07-23)

(本文编辑:汪 玲)