

[文章编号] 1000- 4718(2006)05- 0960- 04

高压氧对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤后在体神经干细胞的影响

余小河, 杨于嘉[△], 钟乐, 王霞
(中南大学湘雅医院儿科, 湖南长沙 410008)

[摘要] 目的: 新生鼠的神经生发区- 室管膜下区(SVZ) 和海马齿状回(DG) 聚集了多种不同发育阶段神经干细胞(NSCs), 它们可分化产生新的神经元和胶质细胞。本研究探讨缺氧缺血性脑损伤(HIBD) 对脑生发区 NSCs 的损伤及高压氧(HBO) 对此损伤的影响。从在体 NSCs 探讨 HBO 对新生大鼠 HIBD 的保护作用机制。方法: 新生 7 d 龄 SD 大鼠随机分为 4 组: ①正常对照组(CON, $n=16$); ②HIBD 模型组(HIBD, $n=16$); ③高压空气组(HBA, $n=16$); ④HBO 治疗组($n=16$)。Rice 法复制 HIBD 模型, 并予 HBA 或 HBO 治疗, 每天 1 次共 7 d。BrdU 免疫组化显示在体 NSCs。并取损伤侧脑 SVZ 区组织, 体外 NSCs 培养并进行神经干细胞球计数。结果: HIBD 组生发区在体 BrdU 阳性细胞和体外培养的神经干细胞球数目明显少于对照组。HBO 组 SVZ 区的 BrdU 阳性细胞增多; 体外培养的神经干细胞球增多。HBA 组增加不明显。结论: 新生大鼠 HIBD 后生发区 NSCs 减少, HBO 治疗可以减轻 HIBD 后 NSCs 的死亡。HBA 治疗无明显作用。

[关键词] 缺氧缺血, 脑; 脑损伤; 高压氧; 神经干细胞; 大鼠

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of hyperbaric oxygen on NSCs in the neonatal rat with hypoxic- ischemic brain damage

YU Xiao- he, YANG Yu- jia, ZHONG Le, WANG Xia

(Department of Pediatrics, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To discuss the mechanism of hyperbaric oxygen (HBO) therapy by assessing the changes of neural stem cells (NSCs), after hypoxic- ischemic brain damage (HIBD) in neonatal rats. **METHODS:** Seven- day- old SD rat pups were randomly divided into 4 groups: control group (CON, $n=16$), HIBD group ($n=16$), hyperbaric air group (HBA, $n=16$), and HBO group ($n=16$). The HIBD model was produced by permanent occlusion of left common carotid artery and was exposed to a mixture of 8% oxygen and 92% nitrogen for 2 h (at 37 °C). HBA and HBO treatment was administered by placing pups in a chamber (2 ATA for 1 h) 1 h after hypoxia exposure and performed once daily for 7 days. BrdU immunohistochemistry was used to assess how the insult had affected NSCs in the SVZ of the lateral ventricle and DG of the hippocampus. The NSCs from the ipsilateral SVZs were isolated at 3 weeks recovery from hypoxia- ischemia (HI). The number of spheres was then counted as an index of the number of NSCs residing within the SVZ. **RESULTS:** At 3 week survival, the SVZ of HIBD group was smaller and markedly less cellular than control group. BrdU- positive cells were dramatically decreased in the SVZ and DG of the affected hemisphere ($P < 0.01$) and by *in vitro* cell culture it contained less NSCs in the SVZ of the affected hemisphere, too. HBO resulted in weaker proliferation of BrdU- positive cells in the SVZ and DG. **CONCLUSION:** Hypoxia- ischemia depletes the rat NSCs in SVZ and DG, HBO can weak this depletion, but HBA has no effect.

[KEY WORDS] Hypoxia- ischemia, brain; Brain injuries; Hyperbaric oxygenation; Neural stem cells; Neonatal; Rats

在哺乳动物的室管膜下区(sub- ventricle zone, SVZ) 和海马齿状回(dentate gyrus, DG) 存在神经干细胞(neural stem cells, NSCs), 缺氧缺血性脑损伤(hypoxic- ischemic brain damage, HIBD) 由于微循环障碍可导致细胞能量供应短缺, 也通过兴奋性氨基酸毒

性作用导致细胞损伤。Levison 等^[1]发现新生鼠 HIBD 使 SVZ 区的少突胶质祖细胞数目明显减少; NSCs 也损失近 3/4。以上结果提示 HIBD 在引起成熟神经细胞死亡的同时, 有可能损伤了新生鼠的神经生发基质。已有报道, 高压氧(hyperbaric oxygen,

[收稿日期] 2005- 07- 15

[修回日期] 2005- 11- 04

[△]通讯作者 E- mail: yuxiaohel8@yahoo.com.cn

HBO)可改善脑缺氧,对 HIBD 有保护作用^[2], HBO 还可上调神经营养因子-3 (neurotrophin-3, NT-3) 碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)的表达^[3,4],而这些因子浓度的改变能影响细胞周围微环境而激活 NSCs 增殖和分化^[5]。因此我们推测 HBO 有可能影响 HIBD 后 NSCs 的损伤反应。本实验通过观察 HIBD 对在体 SVZ 和 DG 区 NSCs 数量的影响,以及 HBO 的治疗作用,从在体 NSCs 着手探讨 HBO 的神经保护作用机制。

材 料 和 方 法

1 试剂

DMEM/F12(1:1)培养基、B27 为 Gibco-BRL 公司产品。胎牛血清(FCS)为 Hyclone 公司产品。bFGF、EGF 为 Pepro Tech EC 公司产品。Poly-L-lysine、山羊抗小鼠 IgG-Cy3 为 Sigma 产品。胰蛋白酶(1:300)、L-谷氨酰胺、HEPES、Triton X-100、甘油等均为 Amresco 产品。小鼠抗大鼠 nestin (Mab) 为 Chemicon 公司产品。小鼠抗大鼠 BrdU 单克隆抗体、山羊抗小鼠 IgG-FITC、水溶性封片剂购自武汉博士德公司。BrdU 粉剂为 Sigma 公司产品。青霉素、链霉素为华北制药股份有限公司产品。其余生化试剂均为进口分装或国产分析纯。

2 方法

2.1 动物分组与模型复制 健康新生 7 d Sprague-Dawley 新生大鼠(中南大学湘雅医学院实验动物中心提供),6 窝共 64 只,雌雄不限,体重 11.2-16.5 g,平均(14.6 ± 1.5) g,随机分为 4 组:正常对照组(CON, n=16);HIBD 组(HIBD, n=16);高压空气组(HBA, n=16);HBO 治疗组(HBO, n=16)。正常对照组不做任何处理。采用 Rice 法制成 HIBD 模型^[6]。HBO 组在 HIBD 造模后立即给予 HBO 治疗;压力为 2.0 ata, 升压及降压各为 20-30 min, 稳压 120 min, 每日 1 次,共 7 d。HBA 组在 HIBD 造模后,立即给予空气处理,压力、时间和疗程同 HBO 组。

2.2 BrdU 给药方法和标本制备 HIBD 后第 19-21 d 各组随机选取 8 只大鼠,腹腔注射 BrdU(每次 50 mg/kg, Sigma) 8 h 1 次,共 5 次。最后一次注射后 4 h 处死大鼠。水合氯醛麻醉下,4% 多聚甲醛灌注、固定后断头取脑。固定、脱水后,冰冻切片机冠状位连续切片,片厚 30 μm,隔 5 取 1,收集待用。

2.3 BrdU 免疫组织化学方法 新鲜冰冻切片置于 2 mol/L 的盐酸中,37 °C,30 min;0.04% 胃蛋白酶室温作用 6 min;PBS 洗 3 次 × 5 min;正常山羊血清室温封闭 1 h;加入 I 抗:小鼠抗大鼠 BrdU 单克隆抗体

(1:1 000),室温振摇 1 h 后转入 4 °C 冰箱过夜;PBS 洗 3 次 × 5 min;加入 II 抗,山羊抗小鼠 IgG-cy3 (1:1 000),室温振摇 1 h;PBS 洗 3 次 × 5 min;荧光显微镜下观察,拍照。或在 I 抗过夜经 PBS 洗涤后加生物素化羊抗鼠 IgG 37 °C 20 min;PBS 洗涤后加 SABC 37 °C 20 min, PBS 洗涤 4 次,每次 5 min;DAB 显色,脱水透明,中型树胶封片。每只大鼠均另取一套切片按上述方法不加 I 抗作为空白对照。高倍光镜下观察大鼠 DG 区以及 SVZ 区 BrdU 阳性细胞数,每只大鼠随机选取 4-5 个非连续的脑片进行计数。

2.4 脑 SVZ 区 NSCs 分离取材及培养 HIBD 后 3 周(28 d)处死,10% 水合氯醛腹腔麻醉,2% 碘酒、75% 乙醇消毒,断头剪去头皮和脑膜,无菌分离脑,置于冷 PBS 中,解剖显微镜下用剪刀分离 SVZ 区,剪碎,用 D-Hanks 液漂洗 2 次,移入无菌小瓶,D-Hanks 液冲洗 2 次,加入 0.25% 胰蛋白酶 37 °C 下消化 15 min,用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基终止消化,并反复吹打制成单细胞悬液。200 目滤网过滤,200 × g 离心 5 min,弃上清液后,用含 10 μg/L bFGF 和 20 μg/L EGF 的 DMEM/F12 培养基(另含 B27 20 mL/L, HEPES 10 mmol/L, 谷氨酸 2 mmol/L, 胰岛素 4 U/L, 青霉素 10⁵ U/L, 链霉素 100 mg/L)洗涤细胞 2 次,重复离心。取 1/3 细胞悬液加入适量的培养液,再次小心吹打制成细胞悬液,然后接种至培养瓶。在 37 °C、饱和湿度 5% CO₂、95% 空气的 CO₂ 培养箱中培养,每 2-3 d 半量换液 1 次。5 d 后计数神经干细胞球的数目。

2.5 NSCs 标志物巢蛋白(nestin)间接免疫荧光 取细胞悬液滴在由多聚赖氨酸包被的载玻片上,培养 2 h,待细胞贴壁后取出,PBS 漂洗 3 次,4% 的多聚甲醛固定 30 min,PBS 漂洗 3 次,以 0.1% 的 Triton X-100 处理 30 min。PBS 洗 3 次,之后滴加正常山羊血清,在湿盒内 37 °C 保温 30 min,以消除非特异性染色。弃去山羊血清后,滴加小鼠抗大鼠 nestin 抗体(1:100),4 °C 过夜。PBS 洗 3 次,然后滴加山羊抗小鼠 IgG-FITC(1:50),在湿盒内 37 °C 保温 30 min,PBS 洗 3 次,水溶性封片剂封片,荧光显微镜下观察、照相。

3 统计学处理

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,全部资料用 SPSS 11.0 软件包及 Excel 7.0 分析统计软件处理。多组之间均数比较用方差分析,两组之间均数比较用 *t* 检验。

结 果

1 BrdU 免疫组织化学结果

各组大鼠生发区均有 BrdU 阳性细胞广泛分布,

侧脑室背外侧角阳性细胞密集成片分布,并沿胼胝体腹侧形成长尾状的阳性细胞链,可能是室管膜下区细胞迁移形成的。海马 DG 区阳性细胞多,集中分布在多形细胞层、锥体细胞层,有时可见 6-8 个以上 BrdU 标记阳性细胞“丛集”于一处。大脑纵裂两侧的皮质区可见少量阳性细胞,主要分布在颗粒层和锥体细胞层。每只大鼠不加 I 抗空白对照脑片海马 DG 区和 SVZ 区均无阳性结果。高倍镜下观察正常对照组大鼠 SVZ 和 DG 区阳性细胞数量分别为 (345.75 ± 85.10) 和 (238.75 ± 44.86) 个(见图 1-1、1-5),HIBD 组和 HBA 组阳性细胞数量较对照组均减少(见表 1,图 1-2、1-3、1-6、1-7),两组分别与正常对照组比较差异显著 ($P < 0.05$);HBO 组 SVZ 和 DG 区阳性细胞均较 HIBD 组增加(见图 1-4、1-8),DG 区与 HIBD 组和 HBA 组比较差异显著 ($P < 0.05$)。但在 SVZ 区,HBO 组与 HIBD 组比较无明显差异 ($P > 0.05$)。

表 1 新生大鼠脑缺血缺氧缺血 3 周时生发区 BrdU 阳性细胞结果比较

Tab 1 Comparison of numbers of BrdU positive cells in SVZ and DG in different groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Group	BrdU positive cells in SVZ	BrdU positive cells in DG
Control	345.75 ± 85.10	238.75 ± 44.86
HIBD	172.50 ± 26.05 [△]	153.75 ± 37.01 [△]
HBA	185.00 ± 35.06 [△]	146.25 ± 31.14 [△]
HBO	207.86 ± 40.19	193.75 ± 38.89 [▲]

[△] $P < 0.01$ vs control group; [▲] $P < 0.05$ vs HIBD group.

2 体外培养的结果

倒置显微镜下观察,发现原代培养细胞在无血清培养基中悬浮生长,24 h 内部分细胞就可以很快聚集或分裂形成由 2-3 个细胞组成的小细胞团,即原代克隆,随培养时间的增加,细胞团逐渐增大、增多,5 d 时生长为数十个到数百个细胞的克隆,呈球形悬浮生长,形态规则,折光性强,无突起生长。Nestin 免疫组化阳性。各组培养均有神经干细胞球生长,各组间神经干细胞球数目有显著性差异 ($F_{3,8} = 6.703, P < 0.01$),HIBD 组神经干细胞球数目明显少于对照组,HBO 组数目多于 HIBD 组,HBA 组增加不明显。见表 2。

讨 论

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)是指存在于神经系统中能够增殖分化成为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的神经前体细胞。BrdU 是一种胸腺嘧啶脱氧核苷类似物,在细胞增殖周期的 S 期嵌

表 2 体外培养的各组神经干细胞球数目的比较

Tab 2 Comparison of numbers of NSCs spheres *in vitro* cell culture in different groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

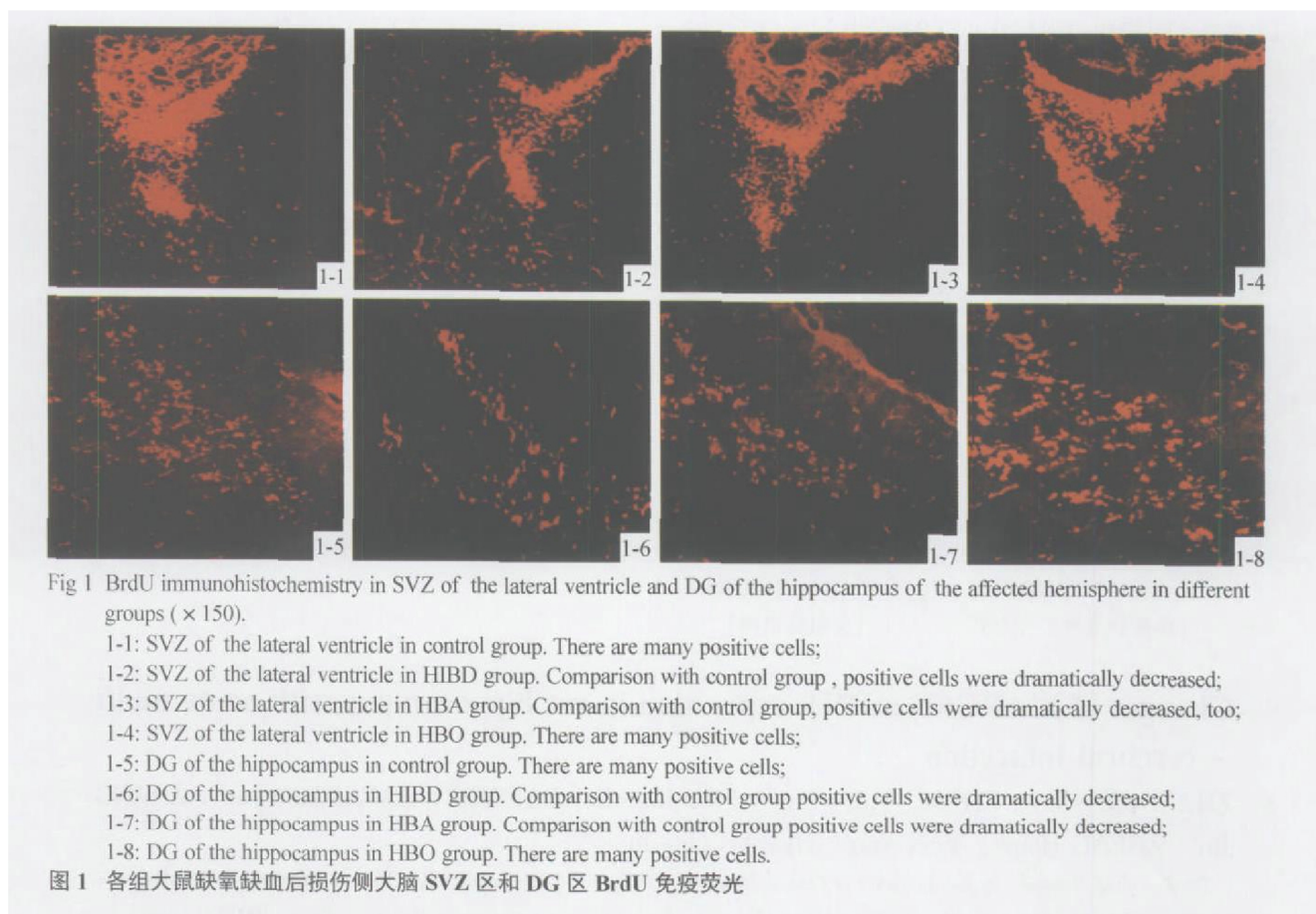
Group	Numbers of NSCs spheres
Control	61.3 ± 22.5
HIBD	19.3 ± 8.0*
HBA	21.7 ± 2.1*
HBO	45.3 ± 12.1 [#]

* $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs HIBD group.

入细胞核 DNA 中,因而是 NSCs 的一种间接标志^[7]。本实验中各组大鼠 SVZ 和 DG 区均有 BrdU 阳性细胞广泛分布,侧脑室背外侧角沿胼胝体腹侧形成长尾状的阳性细胞链,可能是室管膜下区细胞迁移形成的。海马 DG 区阳性细胞多,集中分布在多形细胞层、锥体细胞层。大脑纵裂两侧的皮质区也可见少量阳性细胞,主要分布在颗粒层和锥体细胞层。提示新生大鼠脑内有大量 NSCs 存在,并保持高密度的细胞分裂。

在成年鼠脑缺血模型中,缺血后生发区神经干细胞数目明显增多,以缺血后 1-2 周明显。并渐分化为特异的神经元,代偿损伤神经元的功能,启动内源性的修复^[5,7]。但本实验发现新生鼠 HIBD 后 3 周,缺血侧 BrdU 阳性细胞数量明显减少。提示新生鼠 HIBD 与成年鼠脑缺血模型在发病和修复机制上可能有所不同。因为体内无特异性的 NSCs 标记方法,而在体外 NSCs 可以分裂增殖形成特异性的干细胞球,表达神经干细胞的标志-巢蛋白(nestin)。为进一步了解 HIBD 对体内 NSCs 数量的影响,本实验将大鼠脑 SVZ 区组织取出,进行体外 NSCs 培养。结果也发现 HIBD 后 NSCs 球的数目较对照组明显减少,进一步证实了新生鼠 HIBD 可导致脑内 NSCs 的死亡,与 Levison 等^[1]报道一致。本研究还显示 HBO 组大鼠 SVZ 区和 DG 区 BrdU 阳性细胞数量明显高于 HIBD 组,体外培养 HBO 组 NSCs 球也较 HIBD 组增多,与体内实验结果一致。说明 HBO 可减少缺氧后生发区 NSCs 的死亡或促进脑缺血后 NSCs 的增殖。但 HBA 组无明显改变,说明 HBO 的作用主要可能是氧的作用。

SVZ 区新生的细胞沿一条限定的途径(头向迁徙流,rostral migratory stream, RMS)迁徙到嗅球,然后再到各部位脑实质中,分化为神经细胞^[9]。DG 区 NSCs 的子代细胞则迁徙到颗粒细胞层,分化为海马神经元^[7]。Dobbing 等^[10]报道人脑中约有 2/3 的神经细胞是生后产生的。HIBD 导致生发区 NSCs 死亡必然导致 SVZ 区源源不断产生的新皮层神经元和 DG 区产生的海马神经元减少。这也可能是生长期 HIBD 后出现永久性认知和运动功能障碍的原因之



一。HBO 的神经保护可能是通过减少 HIBD 后生发区 NSCs 死亡而起到作用的。

[参 考 文 献]

- [1] Levison SW, Rothstein RP, Romanko MJ, et al. Hypoxia/ ischemia depletes the rat perinatal subventricular zone of oligodendrocyte progenitors and neural stem cells[J]. *Dev Neurosci*, 2001, 23(3): 234- 247.
- [2] Calvert JW, Yin W, Patel M, et al. Hyperbaric oxygenation prevented brain injury induced by hypoxia- ischemia in a neonatal rat model[J]. *Brain Res*, 2002, 951(1): 1- 8.
- [3] Yang JT, Chang CN, Lee TH, et al. Hyperbaric oxygen treatment decreases post- ischemic neurotrophin- 3 mRNA down- regulation in the rat hippocampus[J]. *Neuroreport*, 2001, 12(16): 3589- 3592.
- [4] 余海, 田润兰, 潘小雯, 等. 高压氧治疗在神经修复与再生过程中的作用及分子学机制[J]. *现代康复*, 2001, 5(3): 48- 49.
- [5] Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, et al. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors[J]. *Cell*, 2002, 110(4): 429- 441.
- [6] Rice JE 3rd, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic- ischemic brain damage in the rat[J]. *Ann Neurol*, 1981, 9(2): 131- 141.
- [7] Cameron HA, McKay RD. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus[J]. *J Comp Neurol*, 2001, 435(4): 406- 417.
- [8] Liu Y, Silverstein FS, Skoff R, et al. Hypoxic- ischemic oligodendroglial injury in neonatal rat brain[J]. *Pediatr Res*, 2002, 51(1): 25- 33.
- [9] Pencea V, Luskin MB. Prenatal development of the rodent rostral migratory stream[J]. *J Comp Neurol*, 2003, 463(4): 402- 418.
- [10] Dobbing J, Sands J. Quantitative growth development of human brain[J]. *Arch Dis Child*, 1973, 48(10): 757- 767.