

小鼠脑室内注射神经干细胞裂解液促进谷氨酸盐诱导的兴奋性神经元损伤的修复

于立坚^{1,4*} 马娟¹ 马润娣^{1,4*} 张永平¹ 房娟芝¹ 张霄瑜^{1,2,4} 于廷曦^{1,3,4*}

(¹广东海洋大学海洋药物重点实验室, 湛江 524025; ²Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, University of Maryland School of Medicine, MD 21228; ³Cell Biology Group, Department of Surgery, Department of Pathology, University of Maryland School of Medicine and Baltimore Veterans Affairs Medical Center, MD 21201; ⁴佛山德溥生物医药科技有限公司, 佛山 528231)

摘要 以前的研究已经证实, 阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液的无细胞滤液具有改善抑郁样模型大鼠的行为学障碍、上调其海马和大脑皮质神经生长因子(nerve growth factor, NGF)和脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)的表达、增加海马神经干细胞(neural stem cells, NSCs)/神经前体细胞(neural progenitor cells)增殖的效果。该研究的目的在于探讨神经干细胞裂解液的无细胞滤液(cell-free filtrate of neural stem cell lysates, FNSCL)脑室内注射促进谷氨酸盐诱导的成年小鼠兴奋性神经元损伤修复的可能性。成年小鼠谷氨酸单钠(monosodium glutamate, MSG, 2.0 g/(kg·d))灌胃, 连续10日, 造成兴奋性神经元损伤模型。自孕15 d的昆明种小鼠取胎脑, 分离、培养神经干细胞, 免疫细胞化学法检测巢蛋白(nestin)抗原, 制备神经干细胞裂解液的无细胞滤液。MSG+NSCs组动物在MSG灌胃后接收脑室内NSCs移植, MSG+FNSCL组动物在MSG灌胃后接受脑室内FNSCL注射。Y-迷宫分辨学习试验检测神经功能恢复情况; 组织病理学方法检查鼠脑形态结构变化。结果显示, 无论是神经干细胞裂解液无细胞滤液脑室内注射还是神经干细胞脑室内移植都同样能促进谷氨酸盐诱导的成年小鼠兴奋性毒性神经元损伤的修复。这一发现提示, 不仅神经干细胞, 而且神经干细胞裂解液的无细胞滤液也可以用于促进脑损伤的修复。

关键词 脑修复; 神经干细胞裂解液; 神经干细胞因子; 神经干细胞; 兴奋性毒性脑损伤; 小鼠

兴奋性氨基酸(excitatory amino acid, EAA)是广泛存在于哺乳类动物中枢神经系统的正常兴奋性神经递质, 参与突触兴奋传递, 学习记忆形成, 并与多种神经变性疾病有关。EAA包括谷氨酸(Glu)、天冬氨酸、N-甲基-D-天冬氨酸、亮氨酸等, 其中谷氨酸是中枢神经系统内含量最高的一种兴奋性氨基酸。正常情况下, EAA主要存在于神经末梢的突触囊泡内, 末梢去极化时释放到突触间隙, 作用于突触后膜的特异受体, 完成兴奋性突触传递及其它生理作用。释放入突触间隙的EAA刺激突触后膜的EAA受体发挥生理效应, 其绝大部分可经EAA能神经末梢重摄取而回收, 少部分可被胶质细胞所摄取。过量的谷氨酸对神经元有损伤作用, 即兴奋性毒性(excitotoxicity)^[1]。大量研究证实多种急慢性神经系统疾病, 如缺血及缺氧性脑损伤、帕金森氏病、亨

廷顿氏病、阿尔茨海默氏病、肌萎缩脊髓侧索硬化症等均与谷氨酸在神经系统内的堆积或过量释放有关^[2]。目前对这些神经系统损伤和疾病还没有令人满意的治疗方法。

神经干细胞是神经系统中能够增殖分化成神经元或胶质细胞的特定原始神经细胞, 它具有高度的自我更新能力、低免疫源性、多潜能分化、迁移功能及良好的组织融合性等特性。虽然这类细胞终身存在, 但限于绝对数量和局部微环境, 损伤神经组织自我修复作用微乎其微。我们以前的研究已经证

收稿日期: 2011-05-21 接受日期: 2011-07-06

广东海洋大学研究生基金资助项目

*通讯作者。Tel: 0759-2382424, E-mail: ywyj9578@sohu.com; Tel: 0759-2362480, E-mail: mard@gdou.edu.cn; Tel: 001-410-747-5062, E-mail: yutingxi@yahoo.com

实, 外源性的神经干细胞移植是治疗神经系统疾病最具前景的治疗方法之一^[3]; 我们最近的研究还证实, 阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液的无细胞滤液具有改善抑郁症样模型大鼠的行为学障碍, 上调其海马和大脑皮质NGF和BDNF的表达, 增加海马神经干细胞/神经前体细胞增殖的效果^[4]。本研究的目的在于探讨神经干细胞裂解液的无细胞滤液脑室内注射促进谷氨酸盐诱导的成年小鼠兴奋性毒性神经元损伤修复的可能性。

1 材料与方法

1.1 试剂

谷氨酸单钠购自上海伯奥生物技术有限公司; 胎牛血清购自杭州四季青生物材料有限公司; DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)为美国Gibco公司产品; 兔抗鼠nestin IgG和羊抗兔IgG-FITC购自博士德生物工程有限公司(武汉)。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 实验仪器

MG-3型Y-迷宫刺激器购自江苏省张家港市生物医学仪器厂。

1.3 实验动物

SPF级昆明种(KM)小鼠, 体重20~22 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司(长沙, 实验动物合格证号: SCXK(湘)2009-0004)。室温23 °C±1 °C, 12 h照明, 12 h黑暗。实验中严格遵守中华人民共和国科学技术部2006年颁发的实验动物福利和使用原则。

1.4 神经干细胞的分离

取8只未发情昆明雌鼠, 于下午3时左右注射孕马血清促性腺激素10 U, 48 h后注射人绒毛膜促性腺激素(HCG) 10 U, 雌雄2:1合笼。于当晚及次日晨观察阴道栓, 有阴道栓者记为孕1 d, 分笼饲养。

颈椎脱位法牺牲孕15 d小鼠。打开母鼠腹腔, 取出两个葫芦形孕子宫(注意不要刺破子宫和羊膜), 放入盛有D-Hanks氏液的消毒皿。打开子宫, 将鼠胚逐个取出, 放入盛有D-Hanks氏液的消毒皿。在冰台上用眼科镊挑开头皮和骨, 取出脑组织, 去脑膜和血管等组织, 放入盛有D-Hanks氏液的5 mL青霉素瓶中。D-Hanks氏液冲洗2次, 去除脑组织表面血液。用眼科剪剪成约1 mm³组织小块, 加入0.25%胰蛋白酶37 °C消化15 min, 然后加入含体积分数10%小牛血

清的DMEM培养基终止消化。250目不锈钢筛网过筛, 去除未分散的脑组织获得单细胞悬液。回收筛网上的脑组织再加入0.25%胰蛋白酶37 °C消化15 min, 重复上述过程, 获得单细胞悬液^[5]。合并两次获得的细胞悬液, 1 000 r/min, 离心10 min得到细胞团块沉淀。

1.5 神经干细胞的鉴定

巢蛋白是神经干细胞的特异性抗原。免疫细胞化学法检测巢蛋白抗原。将新取出的神经干细胞团块洗涤后悬浮于含15%胎牛血清的DMEM培养基中, 调整细胞浓度至 5.0×10^5 /mL。接种细胞于事先用多聚赖氨酸包被的六孔板培养24 h。轻轻倒出培养基, 冷PBS冲洗后, 4%甲醛溶液室温固定30 min。PBS液浸泡冲洗后以0.1%的牛血清白蛋白封闭非特异性抗原30 min。滴加1:100稀释的兔抗鼠nestin IgG溶液, 室温孵育2 h。PBS冲洗后滴加1:50稀释的羊抗兔IgG-FITC溶液, 使其完全覆盖标本, 避光室温孵育30 min。PBS避光冲洗后立即用荧光显微镜(DMIRB, Leica, Germany)观察。观察标本的特异性荧光强度: (-)无荧光; (±)极弱的可疑荧光; (+)荧光较弱, 但清晰可见; (++)荧光明亮; (+++, +++)荧光闪亮。待检标本特异性荧光强度达“++”以上, 而各对照荧光强度为(±)或(-), 即可判定为阳性。

1.6 神经干细胞裂解液无细胞滤液的制备

将调整好浓度的神经干细胞(巢蛋白阳性)置于冰浴条件下超声波破碎(200 W, 0 °C, 6 min), 直到镜检未见裂解液内有细胞存在。蛋白定量^[6], 针式滤器抽滤除菌, -80 °C保存备用。

1.7 动物模型

小鼠MSG (1.0, 2.0, 4.0 g/(kg·d))连续灌胃10 d, 第11 d对小鼠脑海马进行组织病理学检查。

1.8 实验程序

小鼠随机分为4组: 对照(control)组、模型(MSG)组、MSG+神经干细胞(MSG+NSCs)组、MSG+神经干细胞裂解液(MSG+FNSCL)组, 每组11~13只小鼠。小鼠MSG (2.0 g/(kg·d))连续灌胃10 d后第1 d和第10 d, MSG+NSCs和MSG+FNSCL组动物分别两次接受脑室内NSCs移植(10 μL细胞悬液, 约 1.0×10^5 细胞)或脑室内FNSCL注射(10 μL细胞裂解液的无细胞滤液, 约 1.0×10^5 细胞)。对照组和MSG组小鼠脑室内注射10 μL培养液以代替NSCs或FNSCL。脑室内NSCs移植或FNSCL注射后第12 d进行Y-迷宫分辨学习试验。之后行动物脑组织病理学检查, 研究谷氨

酸盐引起的脑功能和形态学变化,以及脑室内注射FNSCL和移植NSCs对谷氨酸盐引起的兴奋性毒性脑损伤修复的影响(图1)。实验重复3次。

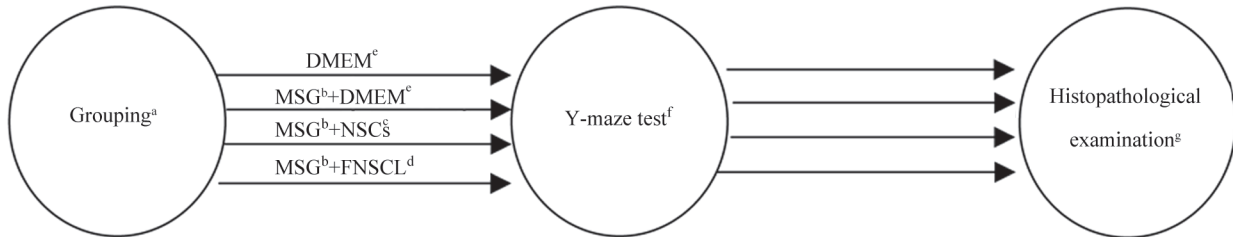
1.9 Y-迷宫分辨学习试验

末次脑室内FNSCL注射或NSCs移植后第12 d, 4组小鼠同时开始Y-迷宫试验^[7]。每日同一时间段进

行,实验时房间保持安静、黑暗,连续6 d,记录20次反应中的正确反应次数。末次脑室内FNSCL注射或NSCs移植后第27 d和第47 d分别重复1次。

1.10 组织病理学检查

组织病理学检查在Y-迷宫试验完成后1 d进行。每组任取4只小鼠腹腔注射戊巴比妥钠50 mg/kg (5 mg/mL)



a: 小鼠随机分为4组: 对照(control)组、模型(MSG)组、MSG+神经干细胞(MSG+NSCs)组、MSG+神经干细胞裂解液(MSG+FNSCL)组, 每组11~13只小鼠; b: 小鼠MSG (2.0 g/(kg·d))连续灌胃10 d; c,d: 在小鼠MSG灌胃后第1 d和第10 d, MSG+NSCs和MSG+FNSCL组动物分别两次接受脑室内NSCs移植(10 μL细胞悬液, 约 1.0×10^5 细胞)或脑室内FNSCL注射(10 μL细胞裂解液的无细胞滤液, 约 1.0×10^5 细胞); e: 对照组和MSG组小鼠脑室内注射10 μL培养液以代替NSCs或FNSCL; f: 小鼠末次脑室内NSCs移植或FNSCL注射后第12 d开始Y-迷宫试验, 第27 d和第47 d分别重复1次; g: Y-迷宫试验完成后第1 d牺牲动物, 取脑进行组织病理学检查。

a: the mice were assigned randomly into four groups ($n=11\sim13$ animals in each group): control, MSG, MSG+NSCs, MSG+FNSCL; b: the mice were exposed to MSG (2.0 g/(kg·d), ig) for 10 days; c,d: on day 1 and day 10 after the 10-day MSG exposure (2.0 g/(kg·d), ig), the animals in MSG+NSCs group received intracerebroventricular transplantation of 10 μL of NSC suspension, approximately 1.0×10^5 cells, and the animals in MSG+FNSCL group received intracerebroventricular injection of 10 μL of cell-free filtrate of lysates of 1.0×10^5 NSCs, respectively; e: the control mice without MSG exposure and the mice in MSG group were intracerebroventricularly administered with 10 μL of DMEM instead of NSCs or FNSCL; f: Y-maze test for 6 consecutive days started on day 12 after the last NSC transplantation or injection of FNSCL, and was repeated twice on day 27 and day 47; g: the histopathology changes of the animal brains were examined on day 1 after the completion of Y-maze test.

图1 实验流程图

Fig.1 Experimental flow chart

进行麻醉,10%中性福尔马林溶液心脏灌流牺牲动物。取脑,置10%中性福尔马林溶液中固定2~3 d。通过海马区全脑冠状面切片,片厚10 μm,常规HE染色。光镜下检查海马区组织病理学变化。

1.11 统计学分析

Y-迷宫试验数据以重复测量分析法[用非结构化的方差—协方差结构模型(an unstructured variance-covariance structure model)]处理。 $P < 0.05$ 被视为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经干细胞的鉴定

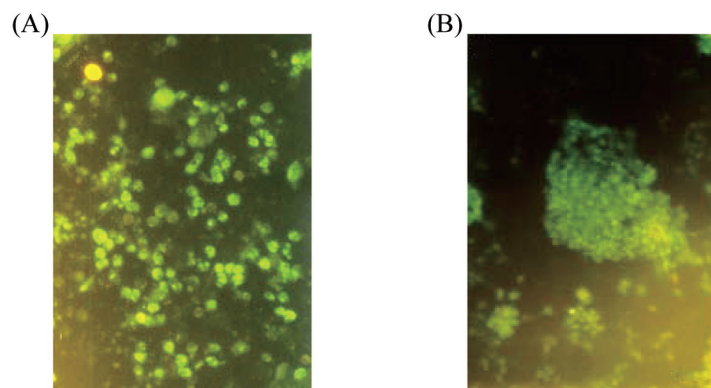
免疫细胞化学检测发现,细胞呈现明亮的黄绿色荧光,表明作为神经干细胞标记的巢蛋白nestin在细胞中有阳性表达(图2)。

2.2 脑室内注射神经干细胞裂解液促进兴奋性中毒小鼠Y-迷宫分辨学习能力损伤的修复

MSG组小鼠的分辨学习能力明显低于对照组($P=0.0002$)、MSG+FNSCL组($P=0.0005$)和MSG+NSCs组($P=0.0005$);MSG+FNSCL组、MSG+NSCs组小鼠的分辨学习能力接近于对照组($P=0.6236$, $P=0.6020$);而MSG+FNSCL和MSG+NSCs两组小鼠的分辨学习能力则十分接近($P=0.9744$) (图3)。这一结果提示MSG灌胃对小鼠分辨学习能力造成明显的损伤,无论是脑室内注射FNSCL还是移植NSCs都对谷氨酸盐引起的小鼠分辨学习能力的损伤有明显的修复作用。

2.3 脑室内注射神经干细胞裂解液促进小鼠兴奋性中毒脑损伤的修复

众所周知,对损伤最敏感的脑区是在学习记忆活动中起重要作用的海马区。谷氨酸盐引起的海马区神经组织损伤以神经细胞水肿、变性、坏死及细胞增生为特征(图4和图5B)。然而,在MSG+FNSCL和MSG+NSCs组小鼠的海马区神经组织却未发现明显的神经元损伤(图5C和图5D)。这一结果提示,过

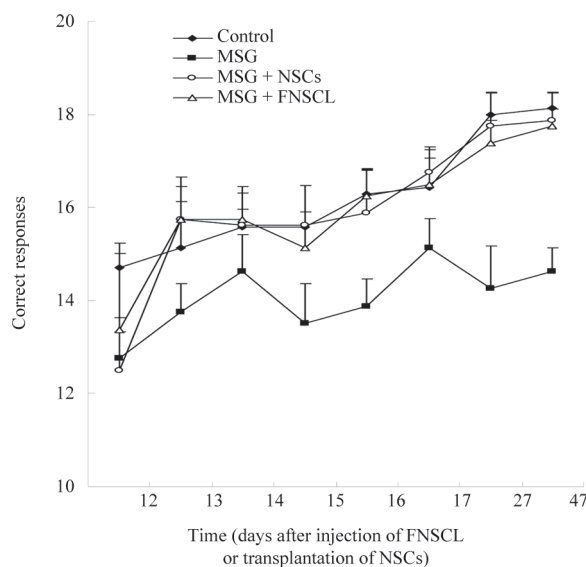


细胞置于事先用多聚赖氨酸包被的六孔板培养24 h。4%甲醛溶液室温固定30 min。免疫细胞化学技术检测特殊抗原巢蛋白的表达: 一抗为1:100稀释的兔抗鼠nestin IgG; 二抗为1:50稀释的羊抗兔IgG-FITC溶液。荧光显微镜观察标本的特异性荧光强度。A: 巢蛋白阳性表达的细胞(100×); B: 巢蛋白阳性表达细胞的增殖(100×)。

The cells were incubated on a poly-L-lysine-coated glass slide for 24 h, then fixed with 4% polyoxymethylene solution for 30 min at room temperature. The expression of the special antigen nestin was detected by immunocytochemical technique, with the primary anti-nestin antibody diluted to 1:100 and the secondary IgG-FITC antibody diluted to 1:50. Immunoreaction was observed under a DMIRB fluorescence microscope and photographs were taken. A: nestin-expressed cells (100×); B: proliferation of nestin-expressed cells (100×).

图2 神经干细胞的鉴定

Fig.2 Identification of neural stem cells



每组11~13只小鼠。MSG组小鼠MSG (2.0 g/(kg·d))连续灌胃10 d。在小鼠MSG灌胃后第1 d和第10 d, MSG+NSCs和MSG+FNSCL组动物分别两次接受脑室内NSCs移植(10 μ L细胞悬液, 约 1.0×10^5 个细胞)或脑室内FNSCL注射(10 μ L细胞裂解液的无细胞滤液, 约 1.0×10^5 细胞)。对照组和MSG组小鼠脑室内注射10 μ L培养液以代替NSCs或FNSCL。小鼠末次脑室内NSCs移植或FNSCL注射后第12 d开始Y-迷宫试验。垂直误差棒代表标准误。以重复测量分析法(用非结构化的方差-协方差结构模型)处理从Y-迷宫试验得到的数据。

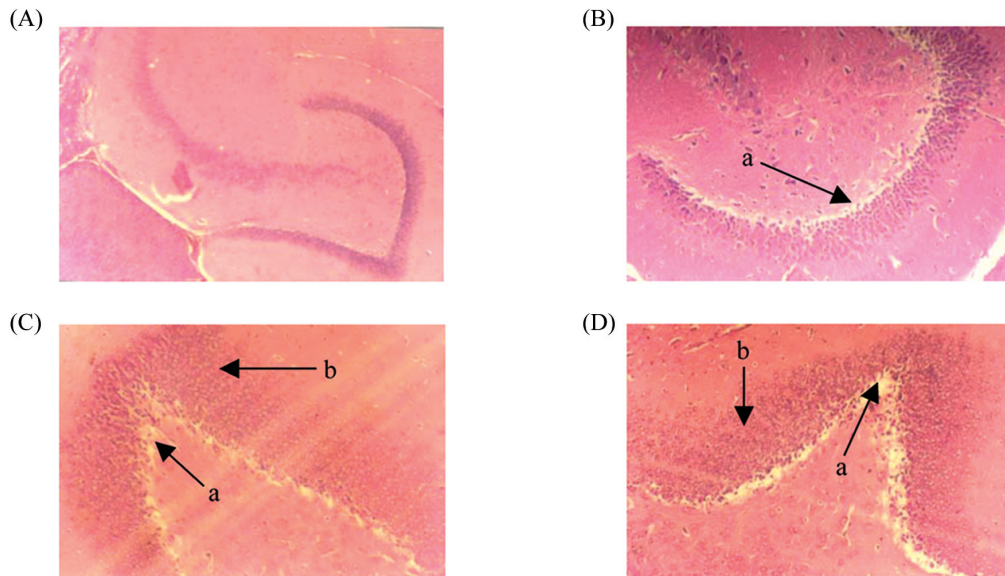
Eleven to thirteen mice were used in each group. The animals in the MSG group received ig administration of MSG (2.0 g/kg per day, for 10 days), the animals in the MSG+NSCs and the MSG+FNSCL groups received intracerebroventricular transplantation of 10 μ L of NSC suspension (approximately 1.0×10^5 cells) or injection of FNSCL (approximately 1.0×10^5 cells) separately on day 1 and day 10 after the 10 d of MSG exposure. The mice in control and MSG groups received intracerebroventricular injection of 10 μ L of DMEM instead of NSCs or FNSCL. The Y-maze test was performed on day 12 after the last NSC transplantation or injection of FNSCL. Vertical error bars represent SEM. The repeated-measures analysis with an unstructured variance-covariance structure model was used to analyze the data from Y-maze test.

图3 脑室内注射神经干细胞裂解液促进兴奋性中毒小鼠Y-迷宫分辨学习能力损伤的修复

Fig.3 Injection of FNSCL improves glutamate-induced lesion of Y-maze discrimination learning capacities in mice

量MSG灌胃可明显损伤小鼠海马区神经组织, 而无论是脑室内注射FNSCL还是移植NSCs都对谷氨酸

盐引起的小鼠海马区神经组织的损伤有明显的修复作用。

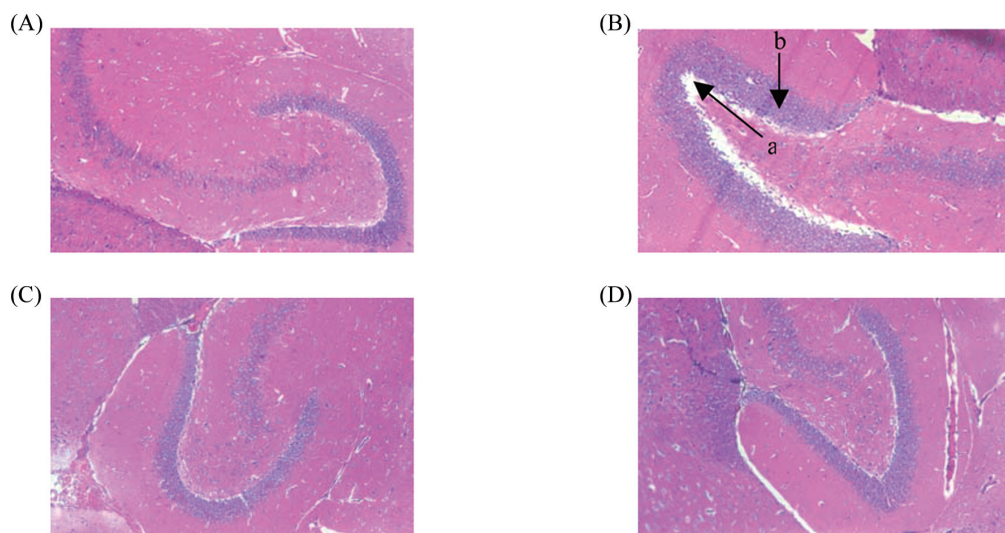


小鼠MSG (1.0 g/(kg·d)、2.0 g/(kg·d)、4.0 g/(kg·d))连续灌胃10 d, 第11 d对小鼠脑海马进行组织病理学检查。A: 对照; B: MSG (1.0 g/(kg·d)); C: MSG (2.0 g/(kg·d)); D: MSG (4.0 g/(kg·d))。箭头: a, 神经细胞变性坏死; b, 细胞内水肿。

The histopathology of the animal hippocampi was studied on day 1 after the treatment of MSG (1.0, 2.0, 4.0 g/(kg·d)) for 10 days. A: control; B: MSG (1.0 g/(kg·d)); C: MSG (2.0 g/(kg·d)); D: MSG (4.0 g/(kg·d)). Arrows: a, degeneration and necrosis of neurons; b, intracellular edema.

图4 兴奋性毒性小鼠海马损伤的组织病理学检查(50×)

Fig.4 Histopathological examination of hippocampal injury following exposure to glutamate in mice (50×)



Y-迷宫试验完成后第1 d牺牲动物, 取脑, 通过海马区全脑冠状面切片, 常规HE染色。光镜下检查海马区组织病理学变化。A: 对照; B: MSG (2.0 g/(kg·d), 连续10 d); C: MSG (2.0 g/(kg·d), 连续10 d)+神经干细胞; D: MSG (2.0 g/(kg·d), 连续10 d)+神经干细胞裂解液。箭头: a, 神经细胞变性坏死; b, 细胞增生。

The histopathology of the animal hippocampi was studied on day 1 after the completion of Y-maze test. The hippocampal region of each animal was sectioned at 10 μ m and stained with hematoxylin and eosin. The sections across hippocampus region were examined by light microscopy. A: control; B: MSG (2.0 g/(kg·d) for 10 d); C: MSG (2.0 g/(kg·d) for 10 d)+NSCs; D: MSG (2.0 g/(kg·d) for 10 d)+FNSCL. Arrows: a, degeneration and necrosis of neurons; b, hyperplasia.

图5 脑室内注射神经干细胞裂解液促进兴奋性中毒小鼠海马组织病理学损伤的修复(20×)

Fig.5 Intracerebroventricular injection of FNSCL improves MSG-induced histopathological lesions (20×)

3 讨论

缺血、缺氧、创伤、中毒等因素触发中枢神经系统的EAA过度兴奋,在能量代谢失衡的基础上异常堆积,促进具有细胞毒性的反应性氮中间产物、反应性氧中间产物形成,促使细胞外的Ca²⁺大量内流,激活磷酸酯酶、蛋白酶、一氧化氮合酶等,引起神经细胞的坏死或凋亡。EAAs造成神经毒性作用主要有两个过程:一是作用于非NMDA受体,引起Na⁺、Cl⁻、H₂O的内流,造成以神经元急性水肿为特征的急性损伤过程,此过程在刺激因素去除后可以恢复;二是通过激活EAAs受体,直接或间接启动Ca²⁺通道, Ca²⁺大量内流, Na⁺-Ca²⁺交换减弱,细胞内Ca²⁺超载造成迟发性神经元变性坏死的迟发性损伤过程^[8-9]。

在成年哺乳类动物中,中枢神经系统的大部分神经元系终末分化。但是,有证据表明神经元的小种群继续在脑室区、嗅觉系统和海马出生。因此,部分受损的神经细胞在适当条件下可能会恢复。中枢神经系统的神经发生按顺序可划分为三个阶段:(1)增殖,产生新细胞;(2)向目标地区迁移^[10];(3)终末分化成不同表型的神经细胞。

本研究的结果表明,无论是脑室内注射神经干细胞裂解液的无细胞滤液还是移植神经干细胞都对谷氨酸盐引起的小鼠海马区神经组织的损伤具有明显的修复作用,提示神经干细胞内的某些因素有助于修复谷氨酸盐引起的兴奋性毒性脑损伤。我们推测,神经干细胞裂解液的无细胞滤液中包含一些已知和未知的细胞因子,比如神经生长因子、脑源性神经营养因子、表皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子等,这些已知和未知的细胞因子刺激和修复受损神经细胞,并赋予细胞增殖、迁移和分化的能力。

中枢神经修复一直是困扰神经科学界的一大难题。与外周神经组织或某些胚胎期神经元不同,成年哺乳类中枢神经轴突在损伤后多难以再生;但有研究提示损伤的中枢神经元轴突再生困难并不是由于内在再生能力的缺乏,倘若创造适当的生长环境,受损中枢神经轴突的生长修复也是可能的。近十年来的研究显示,可能是几类因素共同构成了中枢神经再生困难的神经微环境,包括再生后神经营养因子的逐步减少,损伤后胶质瘢痕的形成,髓鞘相关轴突生长抑制因子以及排斥性导向分子的存在等^[11]。

神经营养因子是选择性调节周围神经和中枢神经系统神经生长和存活的一类蛋白质。NGF和BDNF是神经系统重要的营养因子,是多功能性生长因子,其表达主要在神经系统,不仅可促进神经细胞的生长、分化,而且对免疫、炎症细胞有确切的趋化、增殖活性。目前已经明确NGF和BDNF能够促进神经元存活、分化并在神经损伤后再修复过程中发挥作用^[12-13]。

自Levi-Montalcini等^[14]发现NGF以来,科学家们对其进行了大量的研究。NGF是生物活性蛋白,它广泛存在于中枢神经系统,对神经元的存活、发育和分化有重要意义^[13]。内源性的NGF缺乏能引起脑缺血损伤区的迟发性神经元死亡,侧脑室注入NGF则可以延迟并预防胆碱能神经末梢损伤及预防迟发性神经元死亡^[15-17]。NGF能保护海马及皮质神经元免受低氧、低糖和谷氨酸毒性损害^[18-19]。因此,NGF在保护神经元、抑制神经元死亡方面也有重要作用。

BDNF是从猪脑中分离纯化出的一种碱性蛋白,分子量为12.3 kDa^[20]。作为脑组织含量最丰富的神经营养因子,BDNF在中枢神经系统内合成并广泛存在于脑组织,包括大脑皮层、海马、基底前脑、纹状体、下丘脑和小脑,其中以海马和皮层中含量最高。BDNF促进神经元的发育、损伤后的修复和再生及维持其存活^[21],防止胆碱能神经元的减少和神经功能的缺失^[13]。BDNF通过其特异性受体酪氨酸激酶TrkB参与细胞的分化、粘着、增殖与成熟等重要的生物学过程。

神经干细胞裂解液全面地含有比例适当、种类众多的细胞因子,这些天然的人们已知和未知的细胞因子共同构成适合中枢神经细胞存活、再生的神经微环境。缺血、缺氧、创伤、中毒等因素造成神经细胞损伤和神经细胞所处的微环境平衡失调的情况下,外源性地引入神经干细胞裂解液可恢复神经微环境的平衡,协同、协调地刺激和修复受损的神经细胞,赋予神经细胞更强地存活、增殖、迁移和分化的能力。我们推测,神经干细胞裂解液的这种综合作用可能是单一或几种细胞因子所代替不了的。

脑室内移植神经干细胞(细胞替换)以重建受损的中枢神经系统组织是一个以干细胞为基础的神经保护和神经康复策略^[22],其对成年小鼠兴奋性毒性脑损伤的修复作用是可以理解,而且已经证实了的^[3]。不仅如此,人们还希望神经干细胞移植是一种有助

于治疗阿尔茨海默病、帕金森氏症、亨廷顿氏症、多发性硬化、肌萎缩性脊髓侧索硬化症、青光眼、脑瘫和截瘫等疾病的新疗法。我们相信,随着社会的进步和科学的发展,人胚胎干细胞研究引发的有关道德伦理的争议、诱导多能干细胞(iPS)的应用会引起组织排异这些问题都会一一解决,细胞替换疗法的应用前景一片光明。即便如此,神经干细胞裂解液这一无细胞材料在“修复”受损的中枢神经系统方面的应用前景和发展空间仍是值得期待的。

参考文献 (References)

- 1 Yu TX, Zhao Y, Shi WC, Ma RD, Yu LJ. Effects of maternal oral administration of monosodium glutamate at a late stage of pregnancy on developing mouse fetal brain. *Brain Res* 1997; 747(2): 195-206.
- 2 Lipton SA, Rosenberg RA. Mechanisms of disease: Excitatory amino acids as a final common pathway in neurologic disorders. *N Engl J Med* 1994; 330(9): 613-22.
- 3 Ma J, Yu LJ, Ma RD, Zhang YP, Fang JZ, Zhang XY, *et al.* Brain repair following glutamate-induced excitotoxic neuronal damage mediated by intracerebroventricular transplantation of neural stem cells in adult mice. *Neuroscience Bull* 2007; 23(4): 209-14.
- 4 廖铭能, 于立坚, 张永平, 马润娣, 张霄瑜, 于廷曦. 阿魏酸钠诱导分化的PC12细胞裂解液的无细胞滤液的抗抑郁样效果. *中国细胞生物学报* 2011; 33(6): 608-21.
- 5 潘 灏, 章 翔, 刘卫平, 姬西团, 梁景文, 王西玲. 神经干细胞移植治疗小鼠机械性脑损伤的实验研究. *中国现代神经疾病杂志* 2004; 4(6): 350-4.
- 6 Markwell, MA, Haas SH, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 1978; 87(1): 206-10.
- 7 Yu LJ, Zhang YP, Ma RD, Bao L, Fang JZ, Yu TX. Potent protection of ferulic acid against excitotoxic effects of maternal intragastric administration of monosodium glutamate at a late stage of pregnancy on developing mouse fetal brain. *Eur Neuropsychopharmacol* 2006; 16(3): 170-7.
- 8 徐仁泗. 兴奋性氨基酸与脑缺血损伤的研究概况. *国外医学·神经病学神经外科学分册* 1998; 25(2): 62-4.
- 9 Rothman SM, Olney JW. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann Neuro* 1986; 19(2): 105-11.
- 10 Sun L, Lee J, Fine HA. Neuronally expressed stem cell factor induces neural stem cell migration to areas of brain injury. *J Clin Invest* 2004; 113(9): 1364-74.
- 11 蔡文琴. 发育神经生物学. 北京: 科学出版社, 2007: 322-4.
- 12 王 晶, 路 毅, 邢秀荣, 秦 俭, 王 蓉, 盛树力. APP17肽对心肺复苏大鼠海马神经元NGF、BDNF表达的影响. *中国药理学通报* 2007; 23(5): 582-5.
- 13 张 卓, 王廷华, 朱榆红, 冯忠堂, 孙 冰, 胡艳丽. NGF、BDNF和INT3在AD大鼠海马中的分布及表达变化. *四川大学学报: 医学版* 2005; 36(6): 789-91.
- 14 Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science* 1987; 237(4819): 1154-62.
- 15 Shigeno T, Mima T, Takakura K, Graham DI, Kato G, Hashimoto Y, *et al.* Amelioration of delayed neuronal death in hippocampus by nerve growth factor. *J Neurosci* 1991; 11(9): 2914-9.
- 16 Garofalo L, Ribeiro-da-silva A, Cuello AC. Nerve growth factor-induced synaptogenesis and hypertrophy of cortical cholinergic terminals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 2639-43.
- 17 Ishimaru H, Takahashi A, Ikarashi Y, Maruyama Y. NGF delays rather than prevents the cholinergic terminal damage and delayed neuronal death in the hippocampus after ischemia. *Brain Res* 1998; 789(2): 194-200.
- 18 Cheng B, Mattson MP. NGF and bFGF protect rat hippocampal and human cortical neurons against hypoglycemic damage by stabilizing calcium homeostasis. *Neuron* 1991; 7(6): 1031-41.
- 19 Shimohama S, Ogawa N, Tamura Y, Akaike A, Tsukahara T, Iwata H, *et al.* Protective effect of nerve growth factor against glutamate-induced neurotoxicity in cultured cortical neurons. *Brain Res* 1993; 632(1/2): 296-302.
- 20 Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J* 1982; 1(5): 549-53.
- 21 王堰婷, 陆佩华. 神经营养素与免疫细胞的关系. *细胞与分子免疫学杂志* 2001; 17(1): 95-7.
- 22 Hung CW, Liou YJ, Lu SW, Tseng LM, Kao CL, Chen SJ, *et al.* Stem cell-based neuroprotective and neurorestorative strategies. *Int J Mol Sci* 2010; 11(5): 2039-55.

Repair Following Glutamate-induced Excitotoxic Neuronal Damage Mediated by Intracerebroventricular Injection of Cell-free Filtrate of Neural Stem Cell Lysates in Adult Mice

Yu Lijian^{1,4*}, Ma Juan¹, Ma Rundi^{1,4*}, Zhang Yongping¹,
Fang Juanzhi¹, Zhang Xiaoyu^{1,3,4}, Yu Tingxi^{1,2,4*}

¹Key Laboratory of Marine Materia Medica, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China; ²Cell Biology Group, Department of Surgery, Department of Pathology, University of Maryland School of Medicine and Baltimore Veterans Affairs Medical Center, Baltimore, MD 21201, USA; ³Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD 21228, USA; ⁴Depu Biomedical Technology Co., Ltd, Foshan 528231, China)

Abstract Our previous study demonstrated that cell-free filtrate of sodium ferulate-induced and differentiated PC12 cell lysates significantly attenuated chronic mild stress-induced depression-like behavioural disorders, up-regulated hippocampal and cerebral cortex expressions of nerve growth factor (NGF) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF), and increased hippocampal number of neural stem cells (NSC)/neural progenitor cells in mice. The present study was undertaken to investigate the possibility of the repair following glutamate (monosodium glutamate, MSG)-induced excitotoxic brain injury mediated by intracerebroventricular injection of cell-free filtrate of neural stem cell lysates (FNSCL) in adult mice. Mouse NSCs were isolated from the brains of embryos at 15 day postcoitum (dpc). The expression of nestin, a special antigen for NSC, was detected by immunocytochemistry. Cell-free filtrate of NSCs was prepared from the NSC lysates. The animals in the MSG group received intragastric (ig) administration of MSG (2.0 g/(kg.d) for 10 days), the animals in the MSG+NSCs group received intracerebroventricular transplantation of NSCs (approximately 1.0×10^5 cells), and the animals in the MSG+FNSCL group received intracerebroventricular injection of 10 μ L of FNSCL (approximately 1.0×10^5 cells) separately on day 1 and day 10 after 10-d MSG exposure. The mice in control and MSG groups received intracerebroventricular injection of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) instead of NSCs or FNSCL. On 12 day after the last intracerebroventricular injection of FNSCL or transplantation of NSCs, Y-maze test was performed, and then the histopathology of animal brains was studied to analyze MSG-induced functional and morphological changes and the effects of intracerebroventricular injection of FNSCL and transplantation of NSCs on the repair of MSG-induced excitotoxic brain injury. The results showed that both intracerebroventricular injection of FNSCL and intracerebroventricular transplantation of NSCs facilitated the brain repair following glutamate-induced excitotoxic injury in adult mice equally, suggesting that there are certain NSC factors inside NSCs which are effective in repairing glutamate-induced excitotoxic brain injury. Actually, the finding suggests that not only intracerebroventricular transplantation of NSCs but also intracerebroventricular administration of FNSCL may be applied to repairing brain injury.

Key words brain repair; filtrate of neural stem cell lysates; neural stem cell factors; neural stem cells; excitotoxic brain injury; mice

Received: May 21, 2011 Accepted: July 6, 2011

This work was supported by the Graduate Funded Project of Guangdong Ocean University

*Corresponding authors. Tel: 86-759-2362424, E-mail: ywyj9578@sohu.com; Tel: 86-759-2362480, E-mail: mard@gdou.edu.cn; Tel: 001-410-747-5062, E-mail: yutingxi@yahoo.com