

人羊膜上皮细胞移植及基因治疗帕金森病大鼠

谢慧芳 刘天津 郭礼和*

(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

摘要 观察人羊膜上皮细胞(human amniotic epithelial cell, HAEC)及人脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)基因修饰的 HAEC 在帕金森病(Parkinson's disease, PD)模型大鼠脑内的长期存活和对旋转行为的治疗效果。用包装 BDNF cDNA 的慢病毒转染原代 HAEC (HAEC/BDNF), HAEC/BDNF 与 HAEC 分别植入 6-羟基多巴胺损伤的 PD 模型大鼠纹状体内, 观察动物的旋转行为, 用免疫组织化学方法鉴定移植细胞在体内的存活。结果表明, 治疗组 PD 大鼠的旋转行为改善明显达 14 周, HAEC/BDNF 组能使恢复时间提前。免疫组织化学方法发现移植细胞在 14 周后仍有少量存活且部分表达 BDNF、酪氨酸羟化酶, 纹状体内星形胶质细胞增生。实验结果说明, HAEC 和 BDNF 基因修饰的 HAEC 移植对 PD 模型大鼠的行为有一定改善, HAEC 可以作为一种治疗 PD 的供体细胞。

关键词 帕金森病; 人羊膜上皮细胞; 脑源性神经营养因子; 移植

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种原发于黑质-纹状体通路的中枢神经系统常见的神经变性疾病。我国 65 岁以上人群中发病率为 1.7%^[1], 且随年龄增长发病率升高。细胞治疗是一种获得实质性和持久功能改善的新方法, 对于晚期患者比药物治疗和外科手术治疗方法更具有独特的优势。

人羊膜上皮细胞(human amniotic epithelial cell, HAEC)起源于胚胎外胚层^[2], 由羊膜囊发育而来。作为移植细胞, HAEC 不具有引起免疫排斥反应和恶性侵袭宿主的能力。体外培养的 HAEC 具有表达酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)活性, 且可以合成和释放多巴胺(dopamine, DA)^[3]。HAEC 移植治疗大鼠 PD 模型的实验表明, HAEC 在脑内不仅可以存活并表达 TH, 还对模型大鼠的行为有一定改善^[4]。

脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)被认为是治疗 PD 的新一代药物。在 PD 动物实验研究中, 将 BDNF 注入纹状体可以减少纹状体 DA 神经末梢的丢失^[5]。本实验中, 用重组 BDNF cDNA 的慢病毒转染 HAEC, 将转基因 HAEC 植入 PD 大鼠脑内, 以期通过 BDNF 的营养功能和 HAEC 释放 DA 的补偿功能两方面治疗 PD 大鼠, 为 PD 治疗寻找新的方法和途径提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 组织及细胞株 羊膜来自上海国际和平妇幼保健院剖腹产后胎盘, 根据医院规定并经家属书面同意; 293T 细胞购自 ATCC。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清(PAA), RT-PCR 一步法试剂盒(上海华舜), 单抗 BDNF、HRP 标记的山羊抗兔 IgG、单克隆 TH 一抗均为 Chemicon 产品, GFAP 购自 Neuromarkers, 生物素化的马抗小鼠二抗、ABC 复合物购自 Vector, 胰蛋白酶、DMEM/F12、DAB、6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)、阿朴吗啡(apomorphine, APO)、Hoechst 33258 均购自 Sigma。

1.1.3 实验动物 成年雌性 Sprague-Dawley(SD)大鼠 100 只, 体重 180~220 g, 清洁级, 购自中国科学院上海生命科学研究院实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 人羊膜上皮细胞的分离和培养 取剖腹产弃置的胎盘, 将羊膜撕下, PBS 清洗除尽血迹, 剪成 1 cm² 左右的碎片, 0.25% 胰蛋白酶 37 °C 振荡消化两次, 每次 30 min, 筛网过滤, 离心收集解离下的羊膜上皮细胞, 台盼蓝染色计数活细胞, 调整活细胞密度为 1×10⁵ 个/cm², 培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12

收稿日期: 2006-06-13 接受日期: 2007-01-11

上海市科委重大科技攻关项目(No.05DZ19329)

* 通讯作者。Tel: 021-54921392, Fax: 021-54921391, E-mail:

guolihe@celstar.com.cn

培养液中,置于 37 °C、5%CO₂、饱和湿度培养箱静置培养,隔天换液。

1.2.2 转 BDNF cDNA 羊膜上皮细胞的制备 磷酸钙法将携带 BDNF cDNA 的慢病毒载体 L-BDNF 转染 293T 细胞,培养 28 h 后,超速离心上清液,收集病毒沉淀, -80 °C 保存。采用 HeLa 细胞测定病毒滴度,大约在 (0.1~1)×10⁹ TU/ml 之间。取原代培养的 HAEC 进行病毒液的感染,培养 5 天,得到转基因细胞,命名为 HAEC/BDNF。

1.2.3 RT-PCR 和 Western 印迹鉴定 BDNF 在 HAEC 中的表达 用一步法试剂盒抽取感染 5 天的 HAEC 和 HAEC/BDNF 细胞总 RNA,逆转录后用引物扩增,上游: 5'-CGGATCCGTGATGACCATCCT-3', 下游: 5'-GGTCGACTCCACTATCTTCCC-3', 片段长度为 744 bp, PCR 反应条件为 95 °C 45 s, 65 °C 45 s, 72 °C 60 s, 25 个循环。同时,抽提细胞总蛋白,用 10% 的 SDS-PAGE 胶分离蛋白质,蛋白质转膜后进行 Western 印迹检测,一抗为单抗 BDNF(1:1 000),二抗为 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(1:5 000),ECL 试剂显色,压片,显影,定影。

1.2.4 培养的 HAEC 和 HAEC/BDNF 的 TH 免疫细胞化学反应 取培养的羊膜上皮细胞和转基因细胞,用含 4% 多聚甲醛的磷酸缓冲液固定 20 min, 0.3% H₂O₂ 处理 30 min, 5% 马血清封闭过夜,单克隆 TH 一抗(1:300)4 °C 温育 2 天,生物素化的马抗小鼠二抗(1:200)37 °C 1 h, ABC 复合物(1:100)37 °C 1 h, DAB 显色。光镜下随机选择 8 个非重叠视野(100×),计算 TH 阳性细胞占总细胞数的比例。

1.2.5 偏侧 PD 模型鼠的制备 SD 大鼠腹腔注射水合氯醛(400 mg/kg)麻醉,借助脑立体定位仪固定头部。依据大鼠脑立体定位图谱^[6],用微量注射器向右侧前脑内侧束(medial forebrain bundle, MFB)注射 4 μg/μl 6-OHDA,坐标为:前囟后 -4.4 mm,中线旁开 -1.2 mm,脑表面下 -8.0 mm。注射速度 1 μl/min,留针 10 min,退针 1 mm/min。术后 2 周 APO 皮下注射(0.25 mg/kg)诱发实验鼠向左侧旋转,记录 30 min 内的旋转次数,每周一次,连续 4 周,取稳定的且平均每分钟 7 转以上者为合格的 PD 鼠模型。

1.2.6 转基因 HAEC 大鼠脑内移植及行为学检测 (1) 细胞准备 移植前一天,细胞用含 1 μg/ml Hoechst 33258 培养液过夜。移植时用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞,台盼蓝计数活力大于 95%,调整活细胞密度为 5×10⁴ 个/μl。(2) 移植手术 PD 大鼠随机分

成 3 组,移植 HAEC/BDNF 组 15 只,HAEC 组 15 只,PBS 空白组 10 只。向右侧纹状体两点注射细胞,每点移植 3 μl,坐标为:前囟后 -0.7 mm,中线旁开 -2.3 mm 和 -3.2 mm,脑表面下 -6.5 mm,注射速度 1 μl/min,留针 10 min,退针 1 mm/min。(3) 行为学检测 3 组动物术后 1 周作 APO 诱导旋转,每周一次,8 周后两周一次,持续 5 个月,根据有效样本数对前 14 周数据作统计学处理。

1.2.7 Hoechst 33258 荧光观测 术后 2 周、4 周、8 周、12 周、14 周、18 周、22 周后,各组取两只大鼠用水合氯醛麻醉,含 4% 多聚甲醛的磷酸缓冲液灌流固定,鼠脑取出后用 25% 蔗糖脱水至沉底,将移植区脑组织作连续冰冻冠状切片,片厚 30 μm,取部分切片作 Hoechst 33258 荧光观察。

1.2.8 免疫组织化学检测 其余切片分 3 组检测纹状体和移植 TH、BDNF、胶质原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)抗原表达。方法见 1.2.4,不同在于,TH 和 BDNF 用马血清封闭和马抗小鼠二抗,GFAP(1:200)用山羊血清封闭和羊抗兔二抗。免疫组化染色后用焦油紫复染。

1.2.9 统计学分析 所有数据以均值±标准误表示,采用 SPSS 13.0 统计软件包进行单因素方差分析和 *t* 检验, *P*<0.05 为差异,有显著性意义。

2 结果

2.1 BDNF 的表达

RT-PCR(图 1)和 Western 印迹(图 2)结果显示,原代 HAEC 有低水平 BDNF 的 mRNA 和全长蛋白(35 kDa)和前体蛋白(18 kDa)表达,慢病毒转染 BDNF cDNA 后,HAEC 表达 BDNF 的能力明显增强。

2.2 培养 HAEC 表达 TH

TH 免疫细胞化学染色显示,培养细胞中有棕色的 TH 免疫阳性细胞,经计数,HAEC/BDNF 中 TH 阳

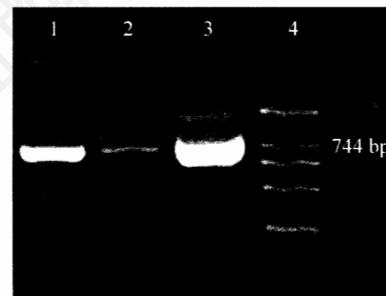


图 1 RT-PCR 检测 BDNF mRNA 表达的结果
1: HAEC/BDNF; 2: HAEC; 3: L-BDNF 载体; 4: marker。

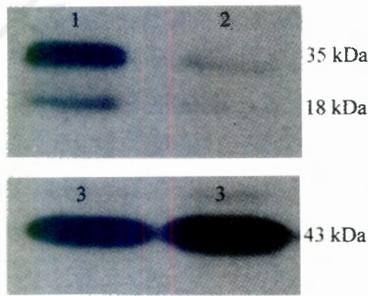


图2 Western 印迹检测 BDNF 表达的结果
1: HAEC/BDNF; 2: HAEC; 3: GAPDH。

性细胞占细胞总数的(8.04±0.40)%, HAEC 中 TH 阳性细胞百分比为(8.14±0.29)%, 经 *t* 检验, $P>0.05$, 说明转基因后, TH 阳性细胞比例没有变化。

2.3 形态学结果

2.3.1 荧光标记 Hoechst 33258 标记的细胞在荧光显微镜下细胞核呈蓝色, 胞质不显色。荧光标记的细胞在针道处与宿主整合良好, 无异常增生。在 4 周左右, 针道处细胞大量存活(图 3A)。随移植后时间的延长, 存活细胞数目递减, 但在移植 5 个月的大鼠脑的冰冻切片中, 每张切片仍旧有 20~30 个荧光标记的细胞, 细胞相互分散。

2.3.2 免疫组织化学结果 HAEC/BDNF 组针道处有大量细胞呈 BDNF 免疫阳性(图 3B), 细胞密集, 而 HAEC 组较少。

HAEC/BDNF 组和 HAEC 组针道处均有 TH 阳性细胞, 阳性细胞分散于针道内(图 3C)。直至第 14 周, 针道处仍有阳性细胞存在, 数量更少, 每张切片仅为 3~5 个。在个别切片中, 偏离针道的纹状体内发现了多极型 TH 阳性细胞(图 3D), 细胞呈圆形, 核空染, 胞质薄, 有多个突起。部分治疗组脑片当中, 针道附近有少量 TH 阳性纤维表达(图 3E), 而 PBS 组针道附近及远离针道的纹状体内极少表达阳性纤维, 背景空白(图 3F)。

HAEC/BDNF 组和 HAEC 组纹状体内均有 GFAP 阳性细胞增生(图 3G), 它们密集于针道两旁, 向两边分散, 治疗组与 PBS 组(图 3H)相比, 星形胶质细胞的胞体更为肿大, 突起更粗, 且增生范围更广, 更为密集。随术后时间延长, 增生的细胞数量减少。

2.4 行为学结果

PD 大鼠旋转行为改善情况见图 4。将大鼠术后旋转数与建模时平均旋转数相比, 得到转数比率。发现第二周时, HAEC/BDNF 组较 HAEC 组转数比率显著降低($P<0.05$), 之后二者没有差异。第 14 周时

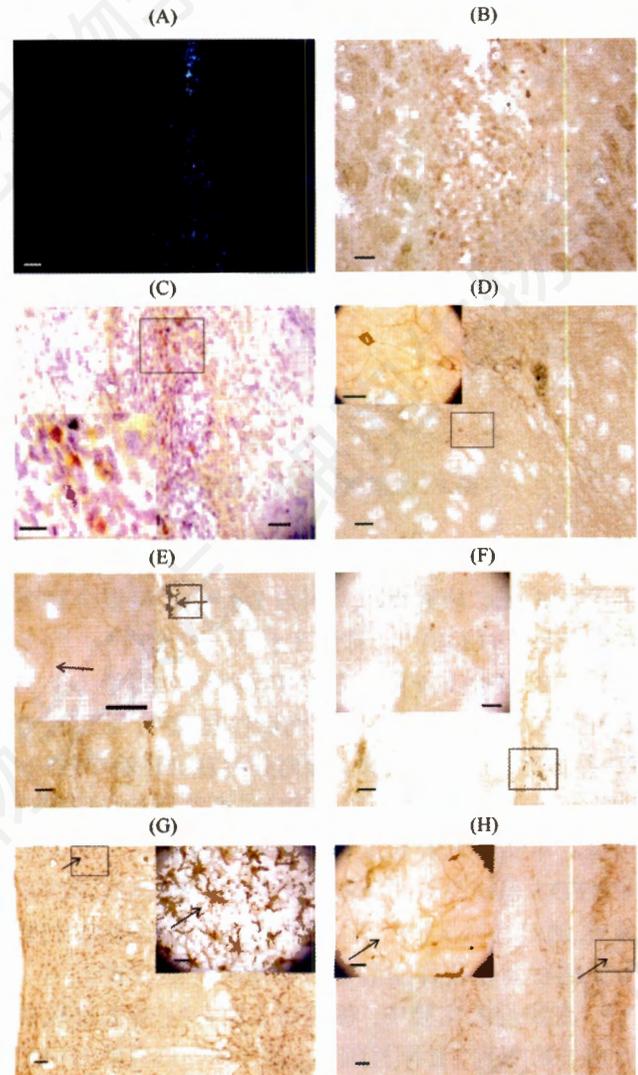


图3 HAEC/BDNF 移植形态学结果

A: 4 周 HAEC/BDNF 组针道 Hoechst 33258 荧光表达; B: 4 周 HAEC/BDNF 组针道 BDNF 免疫组化染色; C: 4 周 HAEC/BDNF 组针道 TH 免疫组化染色, 小图中红棕色细胞为 TH 阳性细胞; D: HAEC/BDNF 组移植后 22 周的针道附近的 TH 阳性细胞, 小图为相应区域放大; E: HAEC/BDNF 组移植后 22 周的针道旁的 TH 阳性纤维, 小图为相应区域放大; F: PBS 组移植后 14 周针道旁无 TH 阳性纤维, 小图为相应区域放大; G: 2 周 HAEC/BDNF 组针道 GFAP 免疫组化染色, 小图为相应区域放大; H: 2 周 PBS 组针道 GFAP 免疫组化染色, 小图为相应区域放大。大图 bar=50 μ m, 小图 bar=20 μ m, HAEC 组 TH、GFAP 结果相似于 HAEC/BDNF 组结果。

平均转数比率为 46.4%(HAEC/BDNF)和 54.5%(HAEC), 同 PBS 组的 101.1% 相比有显著差异($P<0.05$)。

3 讨论

细胞移植治疗 PD 的各种方法中, 除了供体细胞释放 DA 这一途径外, 由供体分泌或引发的营养因子

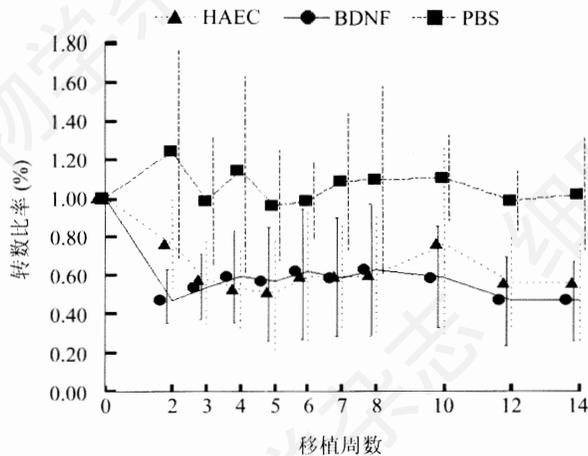


图4 大鼠旋转行为改善情况

对黑质-纹状体系统的保护、修复也是一个重要的手段。HAEC能够合成并释放DA^[3],还可以分泌表皮生长因子(EGF)^[7]、肿瘤生长因子(TGF)^[8]、胰岛素样生长因子(IGF)^[9]、BDNF、神经营养素(NT-3)和神经生长因子(NGF)等生物活性物质^[10],可以作为PD移植治疗的细胞选择。国内外用HAEC治疗PD的动物实验很少,用转基因HAEC长期移植治疗的更无报道。本实验选择长期饲养条件下体重变化不大的雌性PD大鼠作为模型动物,进行HAEC和HAEC/BDNF移植,通过行为学和形态学方法来检测移植细胞对PD大鼠的行为恢复作用和进行初步的机制分析。

在我们的实验中,移植后2周、14周都可以在针道处检测到TH阳性细胞,而且体外培养的HAEC(8%左右)表达DA合成的限速酶——TH,因此推测,针道处的TH阳性细胞可能为HAEC,HAEC通过分泌DA,部分补偿纹状体内减少的DA,尤其在初期,在细胞大量存活的情况下,该性状可以改善PD临床症状。

Kakishita等^[4]证明HAEC纹状体移植可以改善PD大鼠的旋转行为,但仅进行了2周的行为观察,本实验中,移植后14周,PD大鼠的旋转行为的改善仍然明显,下降达40%~50%。对治疗组大鼠第14周至22周的APO检测中,我们发现转数变化并不明显(无统计学意义),但其大脑切片的Hoechst 33258荧光显色表明,仅有少量荧光细胞存在(20~30个/张),针道处TH和BDNF阳性细胞更少,说明移植的HAEC不断地在脑内凋亡。当细胞大量凋亡后,残余的少量细胞对PD大鼠的行为改善不能起主要作用,尤其是后期更为明显,则后期PD症状改善尚有其他原因。

GFAP免疫组化发现,治疗组增生的星形胶质细胞较PBS组明显,推测移植植物通过两种方式活化星形

胶质细胞:(1)引发炎症反应从而活化星形胶质细胞;(2)HAEC分泌的多种活性因子在脑内扩散促使星形胶质细胞活化,或者可能促进脑内神经干细胞分化为星形胶质细胞,如HAEC分泌的EGF可以促进纹状体内神经干细胞增殖,并更多的向胶质细胞分化^[11]。增生的星形胶质细胞又释放炎症因子^[12]和营养因子^[13],如白介素-6(IL-6)、BDNF、NGF、胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、睫状神经营养因子(CNTF)等,起神经损伤和保护的双重作用。结合治疗组行为改善的结果,可能是星形胶质细胞分泌营养因子和HAEC分泌活性因子共同加速纹状体修复,抗衡炎症反应带来的负面作用。

HAEC表达神经元、星形胶质细胞、神经干细胞标记蛋白,如NF、MAP-2、GFAP^[14],nestin^[15],提示羊膜中可能有神经干细胞。有研究表明,PD模型大鼠受损纹状体内有增生表达的TH阳性细胞^[16],形态为胞质薄核深染,而我们在纹状体偏离针道处找到的有突起的TH阳性细胞,形态为胞质薄但核空染,与文献报道的纹状体内TH阳性细胞形态不同。因此,这种TH阳性细胞到底是HAEC促使了纹状体内源的TH阳性细胞增生变形,还是HAEC中潜在的神经干细胞分化而来,尚需进一步鉴定。

BDNF可以诱导损伤纹状体的TH纤维长芽^[17],我们在部分脑切片的针道附近找到少量TH阳性纤维,这些纤维对于行为改善可能有一定作用。BDNF能提高DA能神经元释放和重摄取DA的水平^[18],本文中,HAEC/BDNF组大鼠的行为恢复较HAEC组提前,而培养细胞的TH阳性细胞百分比在两组中相近,两组分泌DA的能力相当,则症状提前恢复与过量表达的BDNF有关。BDNF可能通过纹状体残余的末梢逆轴突转运到黑质极少数残存的DA细胞,促使其上调DA分泌,加速行为恢复。

因此,我们推测HAEC对于6-OHDA损毁的PD大鼠的治疗机制主要是,一方面HAEC分泌补充纹状体缺失的DA,另一方面释放各种活性因子,可能促进受损纹状体内的神经干细胞增殖分化和星形胶质细胞活化,增生的星形胶质细胞又分泌众多的营养因子与生长因子,两种细胞共同的营养作用为纹状体内TH阳性纤维恢复、神经干细胞增生分化以及损伤神经细胞复元提供有利的环境,而恢复的少量TH阳性纤维对于PD鼠行为复苏有一定作用。另外,我们尚不能排除旋转行为改善的另一种可能,即HAEC分

泌的活性因子抑制了突触后膜 DA 受体的超敏, 降低了 APO 对损毁侧受体的激动作用, 从而减低旋转行为^[19]。

综上所述, HAEC 改善 PD 鼠旋转行为, 体内表达 TH、BDNF, 可以作为细胞移植治疗 PD 的供体细胞选择之一。

参考文献(References)

- [1] Zhang ZX *et al. Lancet*, 2005, **365**: 595
- [2] Casey ML *et al. Biol Reprod*, 1996, **55**: 1253
- [3] Elwan MA *et al. Neuroreport*, 1997, **8**: 3435
- [4] Kakishita K *et al. Exp Neurol*, 2000, **165**: 27
- [5] Shults CW *et al. Neuroreport*, 1995, **6**: 1109
- [6] 包新民等。大鼠脑立体定位图谱, 北京: 人民卫生出版社, 1991, 31
- [7] Kniss DA *et al. Am J Obstet Gynecol*, 1990, **163**: 1883
- [8] Pelton RW *et al. Development*, 1990, **110**: 609
- [9] Hill DJ *et al. Placenta*, 1993, **14**: 1
- [10] Uchida S *et al. J Neurosci Res*, 2000, **62**: 585
- [11] 姬西团等。中华神经外科疾病研究杂志, 2006, **5**: 9
- [12] 张琳等。解剖科学进展, 2006, **12**: 182
- [13] 张思源等。医学综述, 2004, **10**: 739
- [14] Sakuragawa N *et al. Neurosci Lett*, 1996, **209**: 9
- [15] Okawa H *et al. Neuroreport*, 2001, **12**: 4003
- [16] Meredith GE *et al. Eur J Neurosci*, 1999, **11**: 3585
- [17] Batchelor PE *et al. Eur J Neurosci*, 2000, **12**: 3462
- [18] Blochl A *et al. J Biol Chem*, 1996, **271**: 21100
- [19] Pezzoli G *et al. Brain Res*, 1988, **459**: 398

Transplantation of Human Amniotic Epithelial Cells and Genetically Modified Cells for the Treatment of Parkinsonian Rats

Hui-Fang Xie, Tian-Jin Liu, Li-He Guo*

(Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract To investigate the long-term graft survival and the improvement of motor abnormalities after the intracerebral transplantation of the human amniotic epithelial cells (HAEC) and HAECs modified with human brain-derived neurotrophic factor (BDNF) cDNA in the rat model of Parkinson's disease (PD). Primary HAECs and BDNF genetically modified HAECs (HAECs/BDNF) transferred with lentiviral vectors were transplanted into the striatum of rats after the 6-hydroxydopamine lesion. We observed the rotational behavior and detected the graft survival by immunohistochemistry. The result showed that the asymmetric rotational behavior of transplanted PD rats significantly improved for 14 weeks while the initial recovery time of HAECs/BDNF group was shorter than that of HAECs group. A few cells could survive for 14 weeks *in vivo*, and some were BDNF, TH positive. In addition, the reactivity of astrocytes increased in the rat striatum of treatment groups. This study indicated that the behavioral amelioration of PD model rats can be achieved by transplanting HAECs and BDNF genetically modified HAECs. HAECs may be used as effective donor cells for the treatment of PD.

Key words Parkinson's disease; human amniotic epithelial cell; BDNF; transplantation

Received: June 13, 2006 Accepted: January 11, 2007

This work was supported by the Science and Technology Committee of Shanghai (No.05DZ19329)

*Corresponding author. Tel: 86-21-54921392, Fax: 86-21-54921391, E-mail: guolihe@celstar.com.cn