

# 帕金森病模型大鼠神经干细胞移植后的迁移

朱庆丰 马 骥 袁崇刚\*

(华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

**摘要** 首先分离培养E14胚胎SD (Sprague-Dawley)大鼠脑室下带区(subventricular zone, SVZ)神经干细胞, 用携带增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)基因的2型重组腺相关病毒(rAAV2)进行感染, 获得具有EGFP标记的神经干细胞。运用单侧损毁成年SD大鼠黑质多巴胺能神经元的帕金森病(Parkinson's disease, PD)动物模型, 将EGFP标记后的细胞分别移植到PD模型动物的纹状体或黑质内。在移植后120 d取移植大鼠全脑进行矢状和冠状连续冰冻切片观察细胞的迁移行为, 切片厚度30  $\mu\text{m}$ 。结果显示, 移植位点始终能检测到标记细胞, 移植到黑质的细胞在黑质部位迁移扩散, 移植到纹状体的细胞成条链式排列沿腹后内侧方向迁移到达黑质, 细胞迁移表现出明显的方向性。实验结果提示移植的神经干细胞具有向损伤的黑质区域迁移并长期稳定在黑质存活特性。

**关键词** 帕金森病; 神经干细胞; 移植; 迁移

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种发生于中老年期并且缓慢进展的神经系统退行性疾病, 主要病理改变为中脑黑质致密部(substantia nigra pars compacta, SNc)多巴胺能神经元变性死亡, 导致纹状体内来自黑质的多巴胺能神经末梢减少, 从而引起震颤、肌肉僵直、运动迟缓与体位不稳等一系列综合病症<sup>[1,2]</sup>。神经干细胞的发现为运用细胞替代疗法治疗神经系统损伤展示了良好的前景。Akerud等<sup>[3]</sup>研究发现干细胞移植能阻止黑质多巴胺能神经元丢失。但移植的神经干细胞是否向损伤的所有黑质区域迁移并能锚定于损伤部位, 是否能在黑质长期稳定存活是细胞移植治疗PD病的关键, 也是神经干细胞移植治疗神经系统疾病的基础性问题, 至今相关的研究报道较少。本研究把增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)标记的神经干细胞分别移植到PD动物模型的纹状体或黑质, 以求了解神经干细胞在宿主脑内的迁移和存活行为, 为神经干细胞移植治疗PD提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 成年雄性SD (Sprague-Dawley)大鼠(180~220 g)用作细胞移植受体, 胚胎14 d (E14)的SD胎鼠作为神经干细胞的来源, 所有大鼠购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 饲养于温度适宜、通风良好、严格控制光照的清洁级房间, 给予

充足的食物和饮水。

1.1.2 试剂和仪器 6-OHDA、阿扑吗啡(Apomorphine, APO)购自Sigma公司; 神经巢蛋白(Nestin)抗体、酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)抗体购自CHEMICON公司; 细胞培养基DMEM/F12、无血清培养添加剂B27、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)购自GIBCO公司; 腺相关病毒载体(rAAV<sub>2</sub>-EGFP)购自北京本元正阳基因技术股份有限公司; 江湾II型动物头颅立体定位仪(上海第二军医大学); 冰冻切片机(德国Leica公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 PD动物模型制作 实验运用单侧内侧前脑束(medial forebrain bundle, MFB)注射6-OHDA方法制备一侧黑质损毁PD动物模型。大鼠腹腔注射1.5%戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉后固定于脑立体定位仪。依据大鼠脑立体定位图谱<sup>[4]</sup>, 确定右侧MFB坐标(A-P: -2.6 mm; M-L: 1.7 mm; D-V: -7.8 mm)并钻孔。用微量注射器抽取新鲜配制的6-OHDA溶液(3.0 mg/ml 6-OHDA、0.2 mg/ml 抗坏血酸, 溶解于0.9%生理盐水中), 缓慢进针达预定深度, 注射速度1  $\mu\text{l}/\text{min}$ , 每只大鼠注射3.5  $\mu\text{l}$ 。注射完毕后留针10 min, 缓慢退针(1 mm/min), 用明胶海绵填充钻孔, 缝合伤口,

收稿日期: 2008-11-15 接受日期: 2009-03-06

2008年度华东师范大学优秀博士研究生培养基金项目(No.20080034)

资助

\* 通讯作者。Tel: 021-62232729, Fax: 021-62232729, E-mail: cgyuan@bio.ecnu.edu.cn

外用复方磺胺甲基异噁唑预防感染。术后大鼠于保暖环境中观察,清醒后置笼喂养。4周后腹腔注射0.01%阿朴吗啡(0.5 mg/kg),以诱发大鼠健侧单向旋转。注射吗啡10 min后,开始记录,共记录30 min旋转圈数。身体首尾相接、恒定左转且旋转圈数超过210圈(7 r/min)的大鼠视为成功的PD模型。

**1.2.2 神经干细胞的取材、培养** 取怀孕14 d的大鼠,用1.5%戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉。腹部皮肤分别用碘酒消毒和75%酒精脱碘,在无菌室超净台无菌环境下,剖开腹腔,快速取出胎鼠并放入冰冷的D-Hanks缓冲液中。在解剖镜下用眼科镊去除硬脑膜,打开胎鼠的大脑半球,剔除脉络丛,从脑室下带区(subventricular zone, SVZ)夹取1 mm<sup>3</sup>大小的组织块。轻轻吹打成单细胞悬液,离心(1 000 r/m, 5 min),弃上清液,用空白培养基DMEM/F12(1:1)重悬,以2×10<sup>5</sup>个/ml的密度接种到75 ml培养瓶,加入无血清神经干细胞培养基(DMEM/F12、B27、20 ng/ml EGF、10 ng/ml bFGF),置于37℃、5% CO<sub>2</sub>和饱和湿度的恒温培养箱中培养。

**1.2.3 神经干细胞的EGFP标记** 感染前36 h,选取生长状态良好的细胞,以5×10<sup>5</sup>个/ml的密度接种到96孔板中培养,把携带增强型绿色荧光蛋白基因的rAAV<sub>2</sub>悬液掺入细胞培养基中,用适当病毒滴度的培养液感染细胞。4 h后用正常无血清培养基替换感染培养基,随着EGFP的表达,在荧光显微镜下检测神经干细胞中标记的绿色荧光蛋白。

**1.2.4 神经干细胞的移植** 经EGFP标记良好的神经干细胞作为供体细胞进行移植。PD模型大鼠腹腔注射1.5%戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉后固定于脑立体定位仪。根据大鼠脑立体定位图谱<sup>[4]</sup>,确定纹状体移植位点的三维坐标(A-P: -0.2 mm; M-L: 3.5 mm; D-V: -5.5 mm)和黑质移植位点的三维坐标(A-P: -5.2 mm; M-L: 1.8 mm; D-V: -7.8 mm)并分别进行移植。切开颅顶部皮肤,用颅骨钻钻开一直径为1.0 mm的颅骨孔。用微量进样器把细胞悬液(1×10<sup>4</sup>个/μl)以1 μl/min的速率注射到大鼠纹状体或者黑质内,每只大鼠共注射5 μl。注射后留针10 min,缓慢退出微量进样器,缝合创口,外用复方磺胺甲基异噁唑预防感染,保暖,清醒后置笼喂养。

**1.2.5 Nestin免疫组织化学检测** 将培养3~4 d生长出的球团细胞,种植于含有多聚赖氨酸包被盖玻片的24孔板中,10%胎牛血清基本培养基培养4 h。4%多聚甲醛溶液固定细胞30 min,0.01 mol/L PBS

摇床漂洗3次,每次5 min,封闭剂封闭,37℃,20 min。吸掉封闭剂勿洗,加入稀释的抗Nestin抗体,4℃冰箱过夜。0.01 mol/L PBS摇床漂洗3次,每次5 min。加入按比例稀释的抗小鼠FITC-IgG,37℃湿盒温育45 min。0.01 mol/L PBS摇床漂洗3次,每次5 min,水溶性封片剂封片,荧光显微镜下观察拍照。

**1.2.6 TH免疫组织化学检测** 取成功的PD模型大鼠,腹腔注射1.5%戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉。经左心室灌注0.01 mol/L PBS将血水冲洗后,再用250 ml的4%多聚甲醛灌注固定,断头取脑。4℃后固定4 h,梯度蔗糖脱水(20%、30%)至其沉底,取出放-80℃超低温冰箱备用。冰冻切片机切取30 μm厚冠状脑片。脑片经PBS振荡漂洗,于含0.5%牛血清白蛋白和1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的PBS中室温下封阻1 h。加入抗TH抗体,4℃温育24 h;加入生物素化二抗,室温下温育1 h;加入ABC复合物,室温下温育30 min,上述各步骤间均用PBS漂洗脑片(每次5 min,共3次)。最后用新鲜配制的0.05%二氨基联苯胺和0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>混合液显色,常规脱水,封片,显微镜下观察拍照。

## 2 结果

### 2.1 神经干细胞中Nestin的检测及感染后EGFP的检测

Nestin存在于神经外胚层上皮干细胞中,在中枢神经系统的发育过程中短暂表达,常作为神经干细胞的特异性标志之一。将传代培养的神经干细胞球团贴壁培养4 h后,进行Nestin的免疫荧光染色,结果显示细胞球团呈现Nestin抗原阳性(图1)。将体外培养的神经干细胞经rAAV<sub>2</sub>-EGFP感染后,用含10%小牛血清的DMEM/F12培养基诱导神经干细胞球团分化,分化后的细胞显现绿色荧光,有的可显示出细胞的整体形态(图2)。

### 2.2 模型大鼠黑质区DA神经元的比较

运用6-OHDA注射大鼠一侧黑质区域后,TH免疫反应阳性细胞较健侧明显减少,经显微镜下观察计数,减少量达90%以上,提示黑质多巴胺细胞大量损伤或死亡(图3),符合建立PD模型的要求。

### 2.3 细胞移植前后动物旋转行为的检测

6-OHDA注入内侧前脑束4周后,阿朴吗啡可诱发大鼠健侧单向旋转,记录30 min的旋转圈数,选择成功的PD模型大鼠进行黑质或纹状体细胞移植。4个月后各组行为学检测数据与移植前进行配对t检

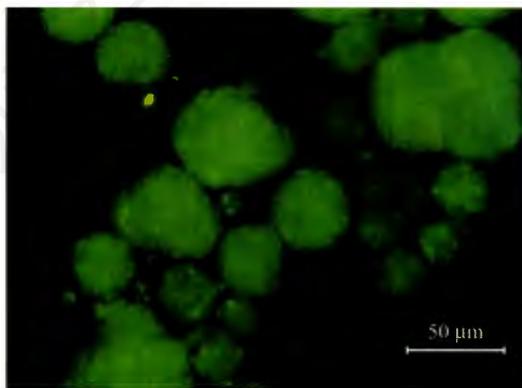


Fig.1 Fluorescent photomicrograph of Nestin—— positive neurospheres from SVZ (Scale bar: 50 μm)

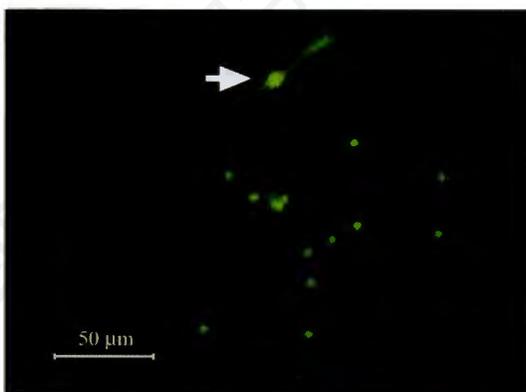


Fig.2 Neural stem cells express EGFP after infected by rAAV2 (Scale bar: 50 μm)

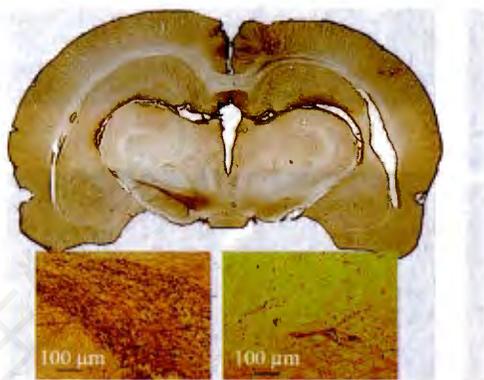


Fig.3 The immunohistochemistry analysis for TH neurons in PD model rat (Scale bar: 100 μm)

验。模型组大鼠在4个月后行为检测数据与移植前没有显著变化( $P>0.05$ )。细胞移植到黑质致密部的大鼠4个月后旋转圈数明显减少,与移植前比较具有极显著差异( $P<0.001$ )。细胞移植到纹状体大鼠4个月后旋转圈数也明显减少,与移植前比较具有显著差异( $P<0.05$ ),见表1。

## 2.4 EGFP 标记的神经干细胞在 PD 模型大鼠脑内的迁移与分布

### 2.4.1 移植到 PD 模型大鼠黑质的 EGFP 标记细胞的迁移与分布

神经干细胞移植到 PD 模型大鼠黑质致密部4个月后,在移植位点清晰可见 EGFP 标记的细胞,在黑质部位的连续冠状切片中,可见移植的细胞从移植位点向黑质致密部前后左右各方位迁移,并稳定存活于黑质部位(图4),同时也观察到有少量细胞迁移至较远的黑质区域。

### 2.4.2 移植到 PD 模型大鼠纹状体的 EGFP 标记细胞的迁移与分布

神经干细胞移植到 PD 模型大鼠纹状体4个月后,在移植位点清晰可见 EGFP 标记的细胞。荧光显微镜下 EGFP 标记的细胞产生黄绿色荧光,其胞体为圆形或卵圆形,容易与宿主中的神经细胞相区别。在同一冠状切面上,可见部分细胞从移植位点向下迁移(图5A)。在不同大鼠的冠状和矢状切面上,可见神经干细胞的迁移表现出一定的方向性。细胞朝向移植位点腹后内侧长距离迁移,前后相继排列(图5B、图5C)。在连续矢状切片中,清晰可见 EGFP 标记的细胞呈条索状排列,从移植位点向腹后内侧黑质部位长距离迁移(图5D、图5E、图5H),在黑质致密部可见大量 EGFP 标记的细胞(图5F、图5G)。在其它脑区未见具有 EGFP 标记的迁移细胞。结果表明,移植到纹状体的神经干细胞表现出向损伤黑质迁移的特性。

## 3 讨论

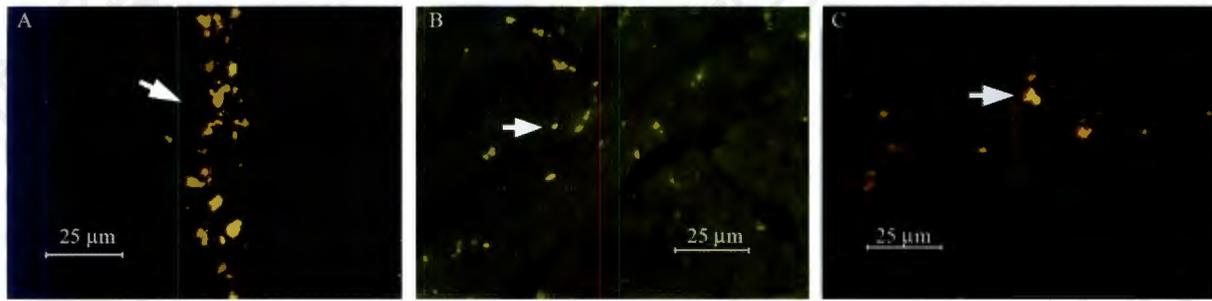
### 3.1 PD 模型动物的制作和移植后行为学检测

PD在动物中没有自发的倾向,进行PD实验研究需要建立适当的动物模型<sup>[5]</sup>。6-OHDA 作为选择性 DA 神经元化学损毁剂,实验运用 6-OHDA 选择性注

Table 1 Number of rotation pre-transplantation and 4 months after transplantaion

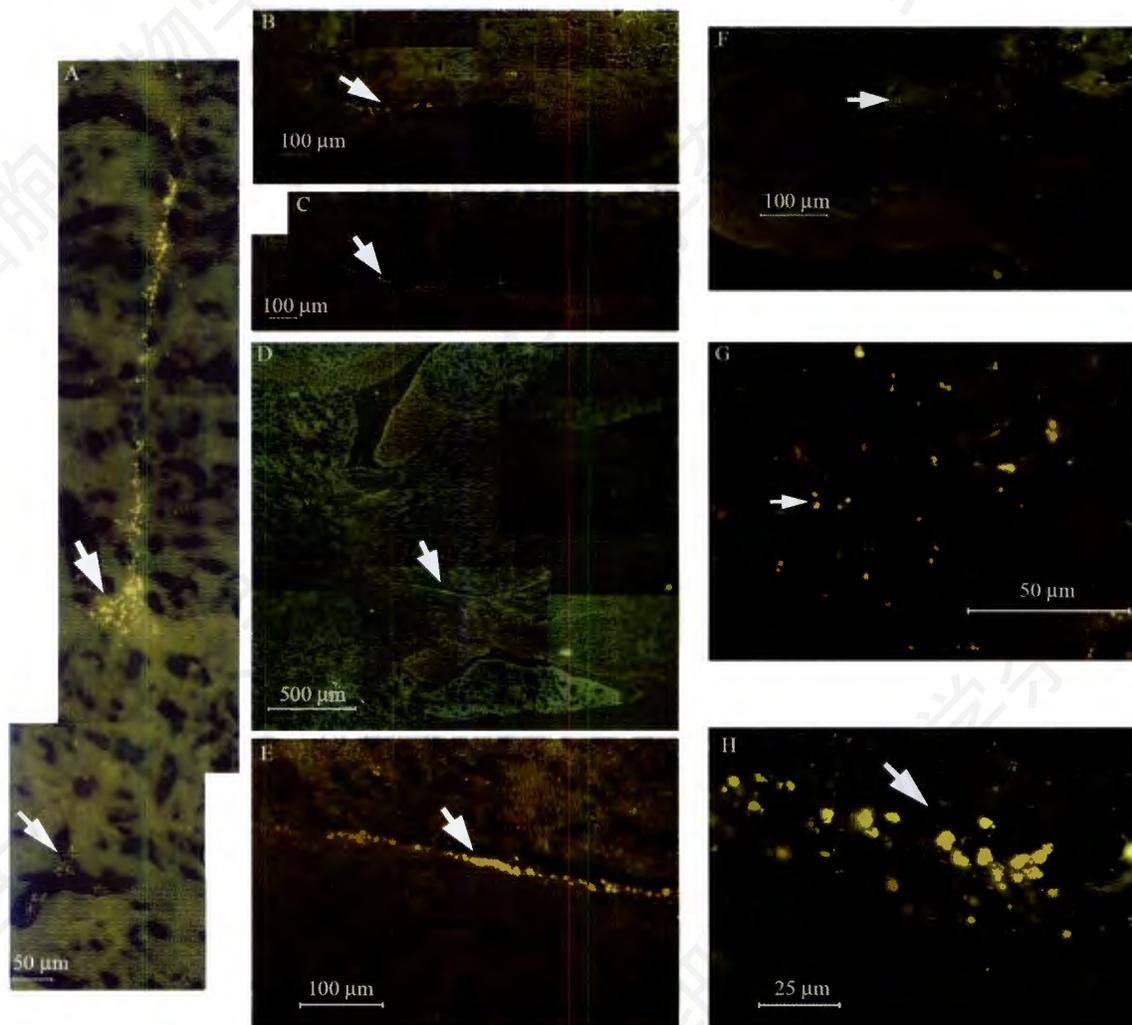
Group	Animal number (n)	Pre-transplantation	Post-transplantation
PD rats	9	245±13.27	234±14.93
SNC transplanted	10	322±21.75	189±21.08***
Striatum transplanted	4	254±7.04	169±27.29*

\* $P<0.05$ , \*\*\* $P<0.001$  compared with pre-transplantation.



**Fig.4 EGFP labeled cells at SNc in the host brain 4 months after transplantation**

A: the injection side (A-P: -5.2 mm; M-L: 1.8 mm; D-V: -7.8 mm); B: migrated cells in the area 1 mm ahead of injection side (A-P: -4.2 mm); C: migrated cells in the area 0.6 mm back of injection side (A-P: -5.8 mm). Scale bar: 25  $\mu$ m.



**Fig.5 EGFP labeled cells at CPU in the host brain 4 months after transplantation**

A: the injection side (A-P: -0.2 mm; M-L: 3.5 mm; D-V: -5.5 mm), upper arrow shows the injection side, lower arrow shows the cells migrated from injection side; B: the migrating cells 2.5 mm away from the median sagittal plane; C: the migrating cells 2.9 mm away from the median sagittal plane; D: the migrating cells arranged in cambered strap at 1.9 mm away from the median sagittal plane; E: the magnification photomicrograph of Fig.D, the EGFP labeled migrating NSCs; F: the distribution of many migrated cells at SNc; G: the magnification photomicrograph of some migrated cells at SNc; H: the magnification photomicrograph of some migrating cells in the way from striatum to SNc. Scale bar, H: 25  $\mu$ m; A, G: 50  $\mu$ m; B, C, E, F: 100  $\mu$ m; D: 500  $\mu$ m.

射到一侧内侧前脑束从而建立单侧黑质损毁模型。实验共注射 105 只 SD 大鼠, 4 周后经阿朴吗啡诱发, 定量检测动物的旋转行为<sup>[6]</sup>。旋转 7 r/min 以上者为造模成功, 共有 57 只, 行为学检测造模成功率为 54%。TH 染色阳性是黑质细胞功能存在的标志<sup>[7]</sup>。成功 PD 模型大鼠中脑黑质 TH 免疫组织化学检测显示, 正常侧 TH 反应阳性神经元数量较多, 胞体较大, 突起明显; 而注射 6-OHDA 侧黑质 TH 阳性神经元数量则明显减少, 下降超过 90% 以上。

神经干细胞移植到 PD 大鼠的黑质或纹状体 4 个月阿朴吗啡诱导的行为学检测表明, 模型组大鼠与 4 个月前比较, 行为学上没有显著性变化, 说明此种动物模型的 PD 症状可以长时期保持稳定, 没有自我恢复; 而细胞移植组大鼠的旋转圈数明显减少, 与移植前比较都具有显著性差异, 其中移植到黑质的大鼠, 行为学具有极显著差异, 说明神经干细胞移植可以改善 PD 大鼠的行为症状。

### 3.2 rAAV<sub>2</sub>-EGFP 感染标记神经干细胞

如何区别移植细胞和宿主细胞是神经干细胞移植研究首先要解决的问题。以往的研究为标识移植细胞与宿主细胞的区别, 通常运用 BrdU 或其它核染料标记移植的神经干细胞或进行跨种属移植, 然后通过免疫组化方法加以区别。由于这类方法对移植后细胞的检测都需要经过组织化学或免疫组化处理过程, 不仅工作量大, 而且不能对细胞突起进行标记, 因而对于追踪细胞突起的相互联系、研究可能存在的环路重建过程而言存在局限。近年来, EGFP 标记技术的成熟给移植细胞的示踪提供了强有力的工具。运用绿色荧光蛋白基因重组的病毒感染神经干细胞, 从而标记移植细胞, 使其可自体表达 EGFP, 并可获得突起和末梢含有 EGFP 的移植神经细胞类型用来追踪研究细胞移植后的行为。由于该方法对脑切片无需处理即可在荧光显微镜下观察, 简便直观, 所以在神经干细胞移植研究中广为应用<sup>[8-11]</sup>。本实验中采用的 rAAV<sub>2</sub>-EGFP 没有致病性<sup>[12]</sup>。体外培养的神经干细胞经 rAAV<sub>2</sub>-EGFP 感染后, 随着 EGFP 在宿主细胞内的表达, 神经干细胞即带有了 EGFP 标记, 在荧光显微镜下显示为绿色。分化后的细胞从胞体到突起都显现绿色荧光, 在一定程度上可显示出细胞的形态。

### 3.3 神经干细胞纹状体或黑质移植后的迁移与分布

近年来关于干细胞移植后的迁移现象有些报道,

但结果不一, 迁移的机制也不清楚。Zigova 等<sup>[13]</sup>和 Lundberg 等<sup>[14]</sup>研究表明神经干细胞移植到成年大鼠纹状体后, 干细胞不只局限在移植位点, 而是逐渐从移植位点向周围脑实质迁移。在干细胞移植治疗脑和脊髓各种损伤的研究中, 多数研究报导了神经干细胞具有向损伤组织区域定向迁移的能力<sup>[15-18]</sup>。干细胞自身的状态和移植后所处的环境是影响干细胞迁移和分化的主要因素<sup>[19]</sup>。Mukhida 等<sup>[20]</sup>研究人胚胎 8~10 周脑不同区域干细胞移植到 PD 大鼠黑质和纹状体的实验表明干细胞具有不同的存活和迁移能力, 其中前脑区域的干细胞具有较强的存活和迁移能力, 移植细胞主要分化为星形胶质细胞, 没有发现行为功能上的改善。Jain 等<sup>[21]</sup>用人神经前体细胞移植到 PD 大鼠纹状体发现移植细胞可以长距离迁移, 但并没有发现移植细胞向黑质损伤区域的定向迁移。我们的实验中采用胚胎 14 d 的 SD 大鼠的室下带区神经干细胞传代培养作为供体细胞, 与宿主属于同种同属。实验结果显示, EGFP 标记的神经干细胞移植到 PD 模型大鼠纹状体后排列成条索状向损伤的黑质区域进行较为广泛的长距离迁移, 迁移的细胞条带从纹状体移植位点向后内下侧具有明显的方向性(图 5B~图 5H)。移植细胞可以向黑质多巴胺神经元损伤区域定向迁移, 提示 6-OHDA 注射到内侧前脑束引起黑质损伤对移植的神经干细胞具有引导作用。图 4B 和图 4C 的结果则表明在黑质损伤部位移植的细胞主要在黑质部位扩散, 可以稳定地在黑质部位存活和分布, 实验中只观察到极少量的细胞迁移出黑质区域。从图 4A 和图 5A 中可以看到, 移植位点始终存在大量标记细胞, 这可能与移植过程中引起的移植点局部损伤有关。综合以上实验结果, 提示损伤区域对移植神经干细胞具有一定的诱导和稳定作用。

### 3.4 问题与展望

已有的多数研究认为, 神经干细胞在宿主脑内的迁移和分化机制与宿主脑内特定环境或各种损伤引起的神经趋化因子释放有关<sup>[22-24]</sup>。有研究表明神经干细胞可以表达多种趋化因子的受体<sup>[25,26]</sup>, 趋化因子可能吸引神经干细胞迁移至特定区域修复损伤或与宿主细胞整合<sup>[24]</sup>。由于损伤还可以引起其他不利于神经干细胞存活的因子释放, 形成复杂的调节环境, 趋化因子如何调节影响细胞的迁移和存活值得深入探讨。

此外, 本实验主要观察到移植细胞向损伤部位迁移的现象和 PD 动物行为学功能的改善, 但关于脑损伤对神经干细胞的迁移诱导机制以及迁移细胞的分

化取向,尤其是移植细胞与宿主细胞的功能整合方面,还有待更精巧的实验进行深入研究。而就干细胞类型而言,我们移植的细胞取自E14大鼠的脑室下带区,这种细胞本身即含有多种类型的细胞,包括干细胞、前体细胞和分化不同阶段的细胞群,在我们培养的过程中,随着干细胞的增殖,多种细胞也还会在神经球团中存在,这些细胞是否具有不同的迁移规律和分化特性也有待进一步研究。

### 参考文献(References)

- [1] Betarbet R, Sherer TB, Di Monte DA, *et al.* Mechanistic approaches to Parkinson's disease pathogenesis, *Brain Pathol*, 2002, 12(4): 499-510
- [2] Ben-Hur T, Idelson M, Khaner H, *et al.* Transplantation of human embryonic stem cell derived neural progenitors improves behavioral deficit in Parkinsonian rats, *Stem Cells*, 2004, 22(7): 1246-1255
- [3] Akerud P, Canals JM, Snyder EY, *et al.* Neuroprotection through delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor by neural stem cells in a mouse of Parkinson's disease, *J Neurosci*, 2001, 21(20): 8108-8118
- [4] 包新明, 舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱, 北京:人民卫生出版社, 1991, 30-59
- [5] 陈生弟, 陈先文. 帕金森病动物模型的研制, *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2003, 10(1): 28-32
- [6] Hefti F, Melamed E, Wurtman RJ. Partial lesions of the Dopaminergic nigrostriatal system in rat brain: biochemical characterization, *Brain Res*, 1980, 195(1): 123-137
- [7] Sil'kis IG. A possible mechanism for the dopamine-evoked synergistic disinhibition of thalamic neurons via the "direct" and "indirect" pathways in the basal ganglia, *Neurosci Behav Physiol*, 2002, 32(3): 205-212
- [8] Han SS, Kang DY, Mujtaba T, *et al.* Grafted lineage-restricted precursors differentiate exclusively into neurons in the adult spinal cord, *Exp Neurol*, 2002, 177(2): 360-375
- [9] Rosenqvist N, Hård Af Segerstad C, Samuelsson C, *et al.* Activation of silenced transgene expression in neural precursor cell lines by inhibitors of histone deacetylation, *J Gene Med*, 2002, 4(3): 248-257
- [10] Englund U, Fricker-Gates RA, Lundberg C, *et al.* Transplantation of human neural progenitor cells into the neonatal rat brain: extensive migration and differentiation with long-distance axonal projections, *Exp Neurol*, 2002, 173(1): 1-21
- [11] Enzmann V, Howard RM, Yamauchi Y, *et al.* Enhanced induction of RPE lineage markers in pluripotent neural stem cells engrafted into the adult rat subretinal space, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44(12): 5417-5422
- [12] During MJ. Adeno-associated virus as a gene delivery system, *Adv Drug Deliv Rev*, 1997, 27(1): 83-94
- [13] Zigova T, Pencea V, Betarbet R, *et al.* Neuronal progenitor cells of the neonatal subventricular zone differentiate and disperse following transplantation into the adult rat striatum, *Cell Transplant*, 1998, 7(2): 137-156
- [14] Lundberg C, Martínez-Serrano A, Cattaneo E, *et al.* Survival, integration and differentiation of neural stem cell lines after transplantation to the adult rat striatum, *Exp Neurol*, 1997, 145 (2Pt1): 342-360
- [15] Imitola J, Raddassi K, Park KI, *et al.* Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1alpha/CXC chemokine receptor 4 pathway, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(52): 18117-18122
- [16] Dwain I, Xiangpeng Y, Zeng Z, *et al.* Neural stem cells — a promising potential therapy for brain tumors, *Curr Stem Cell Res Ther*, 2006, 1(1): 79-84
- [17] Tang J, Xu HW, Fan XT, *et al.* Targeted migration and differentiation of engrafted neural precursor cells in amyloid  $\beta$ -treated hippocampus in rats, *Neurosci Bull*, 2007, 23(5): 263-270
- [18] Takeuchi H, Natsume A, Wakabayashi T, *et al.* Intravenously transplanted human neural stem cells migrate to the injured spinal cord in adult mice in an SDF-1- and HGF-dependent manner, *Neurosci Lett*, 2007, 426(2): 69-74
- [19] Ding S, Messam CA, Li P, *et al.* Murine brain progenitor cells have the ability to differentiate into functional neurons and integrate into the CNS, *Cell Transplant*, 2006, 15(8-9): 699-710
- [20] Mukhida K, Baghbaderani BA, Hong M, *et al.* Survival, differentiation, and migration of bioreactor-expanded human neural precursor cells in a model of Parkinson disease in rats, *Neurosurg Focus*, 2008, 24(3-4): E8
- [21] Jain M, Armstrong RJ, Elneil S, *et al.* Transplanted human neural precursor cells migrate widely but show no lesion-specific tropism in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease, *Cell Transplant*, 2006, 15(7): 579-593
- [22] Lu M, Grove EA, Miller RJ. Abnormal development of the hippocampal dentate gyrus in mice lacking the CXCR4 chemokine receptor, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(10): 7090-7095
- [23] Belmadani A, Tran PB, Ren D, *et al.* The chemokine stromal cell-derived factor-1 regulates the migration of sensory neuron progenitors, *J Neurosci*, 2005, 25(16): 3995-4003
- [24] Belmadani A, Tran PB, Ren D, *et al.* Chemokines regulate the migration of neural progenitors to sites of neuroinflammation, *J Neurosci*, 2006, 26(12): 3182-3191
- [25] Tran PB, Ren D, Veldhouse TJ, *et al.* Chemokine receptors are expressed widely by embryonic and adult neural progenitor cells, *J Neurosci Res*, 2004, 76(1): 20-34
- [26] Ji JF, He BP, Dheen ST, *et al.* Expression of chemokine receptors CXCR4, CCR2, CCR5 and CX3CR1 in neural progenitor cells isolated from the subventricular zone of the adult rat brain, *Neurosci Lett*, 2004, 355(3): 236-240

## Migration of Neural Stem Cells after Transplanted in Parkinsonian Rat

Qing-Feng Zhu, Ji Ma, Chong-Gang Yuan\*

(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

**Abstract** The neural stem cells (NSCs) from E14 rat subventricular zone (SVZ) were isolated and amplified as the cell source for transplantation. The cells were labeled by enhanced green fluorescent protein (EGFP) using recombinant adeno-associated virus (rAAV2) containing the marker gene of EGFP. The adult Sprague-Dawley rats were used to establish Parkinson's disease (PD) models by unilateral microinjection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) which damaged dopaminergic neurons in the substantia nigra. EGFP labeled NSCs were transplanted into substantia nigra pars compacta (SNc) or striatum of PD rat models. To observe the behavior of transplanted NSCs, rats were sacrificed 120 days after transplantation and brains were cryosectioned serially in the coronal and saggital plane at the thickness of 30  $\mu\text{m}$ . The results showed that EGFP labeled cells were seen in injection sites of all rats. The cells transplanted into SNc migrated and dispersed in SNc. The cells transplanted into striatum migrated ventrally, posterior and internally to SNc in chains and showed SNc special direction significantly. This phenomenon implicated that the transplanted NSCs have the characteristic of migration to SNc and could survive at SNc for a long time.

**Key words** Parkinson's disease; neural stem cells; transplantation; migration

Received: November 15, 2008 Accepted: March 6, 2009

This work was supported by the PhD Program Scholarship Fund of ECNU 2008 (No.20080034)

\*Corresponding author. Tel: 86-21-62232729, Fax: 86-21-62232729, E-mail: cgyuan@bio.ecnu.edu.cn