

探索·发现

神经干细胞通过P25和P35蛋白质促进缺血缺氧性
脑病新生大鼠神经功能恢复田雨光¹ 庞 炜¹ 安 雷² 魏 伟³ 顾为望¹ 王玉珏¹ 岳 敏^{1*}⁽¹⁾南方医科大学实验动物中心暨比较医学研究所, 广州 510515; ⁽²⁾南方医科大学第三附属医院神经外科, 广州 510630; ⁽³⁾广东省脐带血造血干细胞库, 广州 510000

摘要 该文探讨了神经干细胞(neural stem cells, NSCs)对缺血缺氧性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)新生大鼠的治疗作用及P25、P35蛋白质水平变化的影响。60只新生7 d SD大鼠随机分为3组, 每组20只。Sham组: 施假手术; 模型组: HIE造模, 以PBS处理; 治疗组: HIE造模, 以NSCs治疗。干预后第5、7、14、21 d作神经行为学检测。第21 d处死, 取组织切片进行HE染色作病理分析。Western blot法检测海马区P25、P35蛋白质水平。免疫荧光双染验证P25、P35蛋白质水平。Rotarod test结果显示, 与Sham组比较, 模型组与治疗组大鼠在转轮中坚持时间明显下降($P<0.05$); 造模后第7、14、21 d, 治疗组大鼠在转轮中坚持时间升高趋势明显高于模型组($P<0.05$)。Morris水迷宫结果显示, 与模型组相比, 治疗组大鼠的逃避潜伏期在各个时间点均明显下降($P<0.05$)。模型组大鼠出现海马区神经元水肿、核染色质结构不清、空泡形成等病理变化, 治疗组病理损伤明显减轻。Western blot结果显示, 与Sham组相比, 模型组P35水平减少, P25水平增加($P<0.05$); 治疗组与模型组相比较P35水平增多, P25水平减少($P<0.05$)。免疫荧光双染在细胞学水平验证了P35、P25水平变化。该研究结果表明, NSCs可促进大鼠缺血脑损伤后神经功能恢复, 可能通过上调P35蛋白质水平, 下调P25蛋白质水平, 对脑缺血损伤起保护作用。

关键词 缺血性脑病; 神经干细胞; P35; P25; 神经功能

Effects of Neural Stem Cells on Treating Hypoxic-Ischemic
Encephalopathy through P25 and P35 ProteinsTian Yuguang¹, Pang Wei¹, An Lei², Wei Wei³, Gu Weiwang¹, Wang Yujue¹, Yue Min^{1*}⁽¹⁾Department of Laboratory Animal Center, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;⁽²⁾Department of the Third Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510630, China;⁽³⁾Department of Guangdong Cord Blood Bank, Guangzhou 510000, China)

Abstract The objective of this study is to evaluate the efficacy on neurological functional recovery after transplantation of neural stem cells (NSCs) and the changes of P25 and P35 proteins in adult rats. 60 rats (7-day-

收稿日期: 2017-06-04 接受日期: 2017-08-30

广东省自然科学基金(批准号: 2017A030313192)、国家自然科学基金(批准号: 801402625)、广东省医学科学技术研究基金(批准号: A2017124、A2016255)和广东省科技计划项目(批准号: 2016A030303008、2017A030303019)资助的课题

*通讯作者。Tel: 020-61360033, E-mail: yuemin958@163.com

Received: June 4, 2017 Accepted: August 30, 2017

This work was supported by Guangdong Natural Science Foundation (Grant No.2017A030313192), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.801402625), Guangdong Medical Science and Technology Research Foundation (Grant No.A2017124, A2016255) and Guangdong Science and Technology Plan Project (Grant No.2016A030303008, 2017A030303019)

*Corresponding author. Tel: +86-20-61360033, E-mail: yuemin958@163.com

网络出版时间: 2017-10-30 11:55:15

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20171030.1155.002.html>

old Sprague-Dawley) were randomly assigned to sham-operated group ($n=20$), ischemia group ($n=20$) and NSCs transplanted group ($n=20$). Rotarod test and Morris test were performed at 5, 7, 14, 21 days after treatment to measure the behaviors of the rats. Hematoxylin-eosin staining was used to observe the pathological changes of brain damage in neonatal rats. Western blot was used to analyse the levels of P35 and P25 in hippocampus. The immunofluorescence double dye was used to verify the levels of P35 and P25 proteins. Rotarod test result showed that motor function recovered gradually and restored to near the normal level on the 21th day in NSCs group and there was a significant difference between NSCs group and HIE group on the 14th day ($P<0.05$). Morris test showed that escape latency significantly shortened in NSCs group at each time points compared with HIE group ($P<0.05$). Pathological results showed that hippocampal neuron edema, nuclear chromatin structure is not clear, and vacuoles appeared in HIE group. Compared with HIE group, pathological changes in brain were significantly lessened. Western blot showed that the changes of P35 and P25 levels were significantly different in other groups compared with the Sham group. The P35 level decreased while P25 level increased in HIE group ($P<0.05$). Compared with the HIE group, the P35 levels increased while P25 level decreased in NSCs group ($P<0.05$). The levels of P35 and P25 protein were verified by immunofluorescence double dye in cytological level. Our results showed that NSCs promoted the recovery of neurological function in rats after ischemic brain injury possibly by up regulating P35 level expression and decreasing the expression of P25 protein level.

Keywords hypoxic-ischemic encephalopathy; neural stem cells; P35; P25; neurological function

围产期窒息所致缺血缺氧性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)是新生儿期危害最大的常见病之一,常引起新生儿死亡和严重神经系统发育障碍^[1-3]。据统计,我国新生儿HIE发生率为活产儿的3%~6%,其中15%~20%在新生儿期死亡,存活者中20%~30%可能遗留不同程度的神经系统后遗症,且目前尚无有效的治疗手段^[4-6]。神经干细胞(neural stem cells, NSCs)免疫原性低,且能分化为神经元、少突胶质细胞和星形胶质细胞等神经细胞,这使NSCs的修复治疗成为HIE可能的治疗途径之一^[7-8]。目前研究表明,NSCs移植能在一定程度上缓解缺血缺氧导致的神经功能的障碍,对HIE起到一定的治疗作用,给HIE患者带来新希望。但是该研究还处于实验室研究阶段,影响移植的一些关键因素,如移植途径、时间、单纯或联合移植以及移植的细胞发挥作用的机制等还不明确^[9-10]。P35和P25是Cdk5的调节亚基,Cdk5在哺乳动物海马神经元的学习和记忆功能中发挥重要作用。Cdk5在多种人类神经退行性疾病中起着重要的作用,可能是构成包括阿尔茨海默氏病、肌萎缩侧索硬化症、帕金森病等神经变性疾病的主要分子病理基础^[11-13]。本研究通过对7日龄新生大鼠模型缺氧结合右侧颈动脉结扎处理的方法制备HIE模型,然后对建模后24 h的HIE新生大鼠进行经侧脑室NSCs移植治疗,并进行相关

的行为学、病理学检测及两种相关蛋白质P35和P25的水平检测,为NSCs治疗HIE机制研究提供支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

7日龄SD大鼠60只,体重 16.8 ± 2.3 g,由南方医科大学实验动物中心提供[SYXK(粤)2011-0074],随机分为3组,每组20只。Sham组:施假手术;模型组:HIE造模,以PBS处理;治疗组:HIE造模,以NSCs治疗。本项目已通过南方医科大学实验动物伦理委员会审查。

1.2 主要仪器与试剂

本实验所用到的仪器有:转棒仪(Rotarod,济南益延科技发展有限公司, YLS-4C)、RD1101-MWM-G鼠博士MORRIS水迷宫视频分析系统(上海移数信息科技有限公司)、HF-240全自动生化分析仪(山东海力孚企业管理有限公司)、68000型立体定位仪与KdScientific 310微量注射泵(深圳市瑞沃德生命科技有限公司)。

本实验所用到的试剂有:蛋白酶抑制剂cocktail(Sigma公司)、PVDF膜(Millipore公司)、P25/P35(C-19)多克隆抗体(Cell Signaling公司)、辣根过氧化物酶标记二抗(中杉金桥生物技术有限公司)、Western blot化学发光检测试剂盒(凯基生物技术有限公司)、NSCs(广东省脐带血造血干细胞库,

来源于人胎脑, 移植时PBS洗涤3次, 终浓度调节为 $0.5 \times 10^5/\mu\text{L}$ 备用)。

1.3 HIE模型的建立

实验大鼠仰卧固定后, 经10%水合氯醛(400 mg/kg)腹腔注射麻醉, 在解剖显微镜下行颈正中切口, 分离出右侧颈总动脉后双重结扎, 并从两重结扎线中间剪断血管, 缝合切口。术后2~3 h, 置于37 °C恒温水浴的密闭缺氧箱中, 持续1.5 h通入8% O_2 +92% N_2 的混合气体, 气流量1 L/min。苏醒后返回母鼠身边喂养。

1.4 移植NSCs

大鼠脑缺血后24 h, 经10%水合氯醛(400 mg/kg)腹腔注射麻醉后, 俯卧位固定于脑立体定位仪, 头皮正中切开, 分离骨膜, 暴露前囟, 于颅骨背侧前囟后1.0 mm, 左旁开3.5 mm处钻一直径为2.0 mm的小孔, 按照立体定位图谱, 前囟后1.0 mm, 左旁开3.5 mm, 进针深度5.0 mm位置进行穿刺。治疗组以0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的速度恒速注射3 μL NSCs, 注射完毕后, 留针5 min, 缓慢移出针头。Sham组以同样方法注射等量PBS。

1.5 行为学检查

1.5.1 旋转实验(Rotarod test) 将实验鼠放于Rotarod仪上, 5 min内转速逐渐增加(4 r/min匀速增加至40 r/min), 直至大鼠从Rotarod仪上落下, 记录相应时间。对每只大鼠进行3次测试, 取其平均值与正常大鼠下落时间的百分比作为反映大鼠运动功能的指标, 数值越低, 反映大鼠运动功能损伤越严重。

1.5.2 Morris水迷宫实验 Morris水迷宫由平台、圆形水池和记录装置组成。每天开始实验时, 在水池里注水35 cm深, 水温维持在 20 ± 5 °C。实验期间迷宫四周参照物保持不变。水迷宫实验系统包括CCD摄像头、视频采集卡和水迷宫采集分析系统。所有实验大鼠均进行隐蔽平台实验5 d、探索实验1 d, 以评价各组大鼠学习和记忆能力的变化及干预后的影响。

1.6 HE染色

干预后第21 d, 每组随机选取10只大鼠, 用10%水合氯醛(400 mg/kg)腹腔注射麻醉后处死、将海马组织置于4%多聚甲醛中固定48 h后进行石蜡包埋及切片, 切片厚度为5 μm 。石蜡切片经常规脱蜡、水合后进行HE染色, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明后封片观察。

1.7 免疫荧光染色

干预后第21 d, 每组随机选取10只大鼠, 处死后取海马组织, 一部分用于Western blot检测, 一部分采

用免疫荧光用于检测P25与P35的水平。用于免疫荧光的组织, 用磷酸盐缓冲盐水洗涤3次, 然后冷冻切片, 孵育一抗与二抗后, 采用PE对P25进行染色, 采用FITC对P35进行染色, 最后使用Carl Zeiss LSM780激光扫描共焦显微镜进行切片扫描拍照。

1.8 Western blot检测

取海马组织约200 mg提取总蛋白, 以Bradford法进行蛋白质定量, 在10%的SDS-PAGE胶上电泳, 用Bio-Red电转膜仪将蛋白质转移至PVDF膜上, 以5%脱脂奶粉封闭1 h, 置于P25/P35抗体(1:1 000)稀释液4 °C下孵育过夜。加ECL发光剂, 于凝胶成像仪中成像, 用FluorChem SP软件对结果进行分析, β -actin作为内参。

1.9 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件处理。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差表示, 各组间比较采用单因素方差分析, 组间比较采用Student's *t*-test进行检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 行为学检查之旋转实验

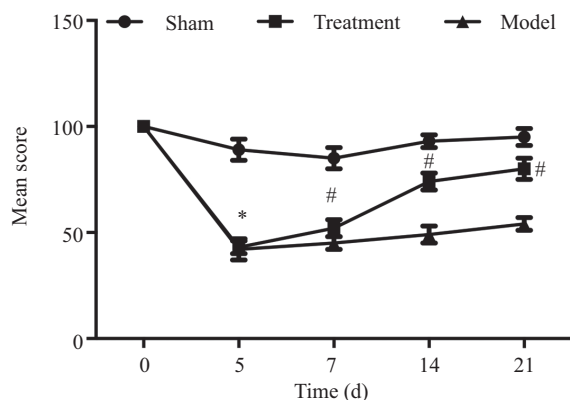
图1显示, 造模后第5、7、14、21 d时, Sham组大鼠在转轮中各时间点间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。造模后第5 d, 模型组与治疗组大鼠在转轮中坚持时间明显小于Sham组($P < 0.05$), 模型组与治疗组2组间差异无统计学意义($P > 0.05$), 表明HIE造模能显著降低大鼠运动功能。造模后第7、14、21 d, 相对于模型组, 治疗组大鼠在转轮中坚持时间明显升高($P < 0.05$), 随着时间延长, 差异更加明显。这一结果表明, NSCs治疗能有效降低HIE大鼠运动功能损伤。

2.2 行为学检查之Morris水迷宫实验

图2显示, 造模后第5 d时, 与Sham组比较, 模型组与治疗组大鼠逃避潜伏期时间变化呈现出延长的变化趋势, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 表明HIE造模能显著增加大鼠逃避潜伏期时间。造模后第5 d起, 治疗组大鼠逃避潜伏期时间明显下降($P < 0.05$), 而Sham组与模型组大鼠逃避潜伏期时间变化无明显差异($P > 0.05$)。结果表明, NSCs治疗能有效降低HIE大鼠逃避潜伏期时间。

2.3 HE染色结果

HE染色结果显示, Sham组大鼠海马区内神经

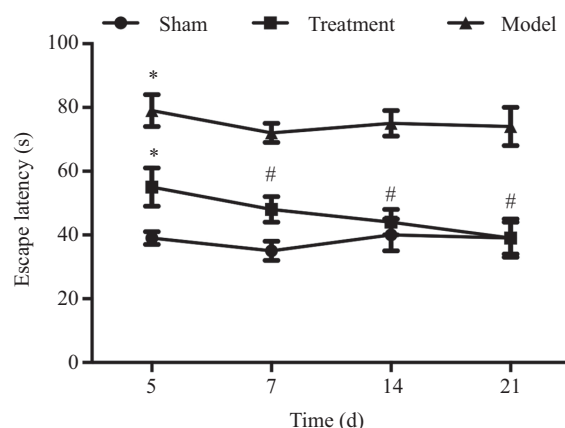


* $P < 0.05$, 与造模后第5 d Sham组比较; # $P < 0.05$, 与造模后第7、14、21 d模型组比较。

* $P < 0.05$ compared with sham group at the 5th day; # $P < 0.05$ compared with model group at the 7th, 14th, 21th day.

图1 大鼠造模后不同时间点旋转试验检测

Fig.1 Rotarod test at different time points



* $P < 0.05$, 与造模后第5 d Sham组比较; # $P < 0.05$, 与治疗组第5 d比较。

* $P < 0.05$ compared with sham group at the 5th day, # $P < 0.05$ compared with treatment group at the 5th day.

图2 大鼠造模后不同时间点逃避潜伏期检测

Fig.2 Escape latency test at different time

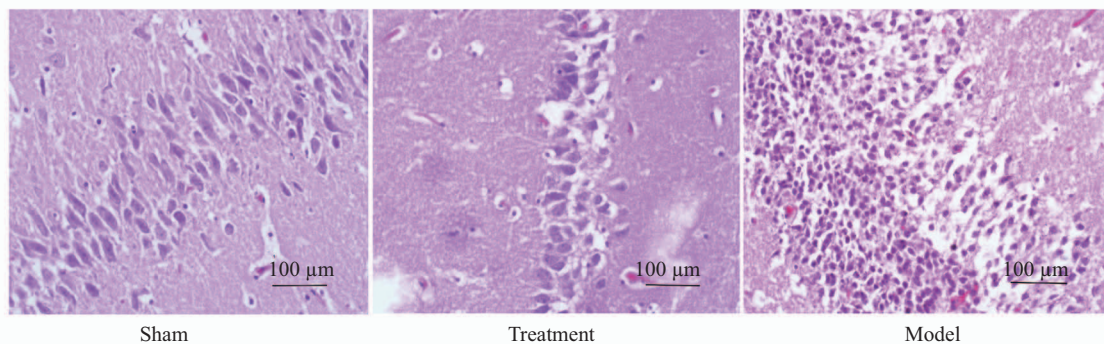


图3 大鼠造模后第21 d海马脑片HE染色

Fig.3 HE staining of the hippocampal region on 21 d after model establishment in rats

元细胞包膜完整,核大而圆,细胞间隙正常,细胞突起清晰可见;模型组大鼠海马区神经元水肿,核染色质结构不清,空泡形成,室管膜细胞重度水肿;而治疗组较模型组损伤较轻,海马区神经元轻度水肿,未见明显空泡(图3)。结果表明,NSCs治疗能有效降低HIE大鼠海马区内神经元损伤。

2.4 Western blot分析

Western blot结果显示(图4),模型组P35水平较Sham组和治疗组明显下降,P25水平较Sham组和治疗组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与Sham组比较,治疗组P35和P25水平变化不明显($P > 0.05$)。

2.5 免疫荧光染色检测P25与P35的表达

免疫荧光分析表明(图5),模型组P25蛋白(PE染色)水平较Sham组和治疗组升高,P35蛋白(TITC染色)表达水平较Sham组和治疗组下降,这进一步验证了上述Western blot检测P25与P35蛋白质的变化趋势。

3 讨论

HIE是引发新生儿死亡和神经系统发育障碍的最常见疾病,目前尚无有效的药物治疗。最近,一些研究报道了外源性的NSCs对新生儿缺血缺氧模型具有神经保护作用^[14-15]。NSCs具有自我更新的能力,并且拥有分化为胶质细胞系和神经细胞系的能力^[16]。研究表明,大脑缺血后NSCs可定向向损伤区域移动并分化为各类神经细胞^[17-19]。Cdk5在哺乳动物海马神经元的学习和记忆功能中发挥重要作用,生理状态下,Cdk5在P35等调节亚基的信号作用下锚定于膜上,磷酸化膜性底物,通过平衡促凋亡和促存活信号转导通路,在神经元发育、迁移、神经元存活中发挥重要作用^[20]。本研究通过结扎单侧颈动脉构建HIE模型,并通过旋转和水迷宫实验对NSCs治疗新生大鼠HIE损伤动物模型进行了行为学观察。研究结果表明,模型组大鼠与Sham组相

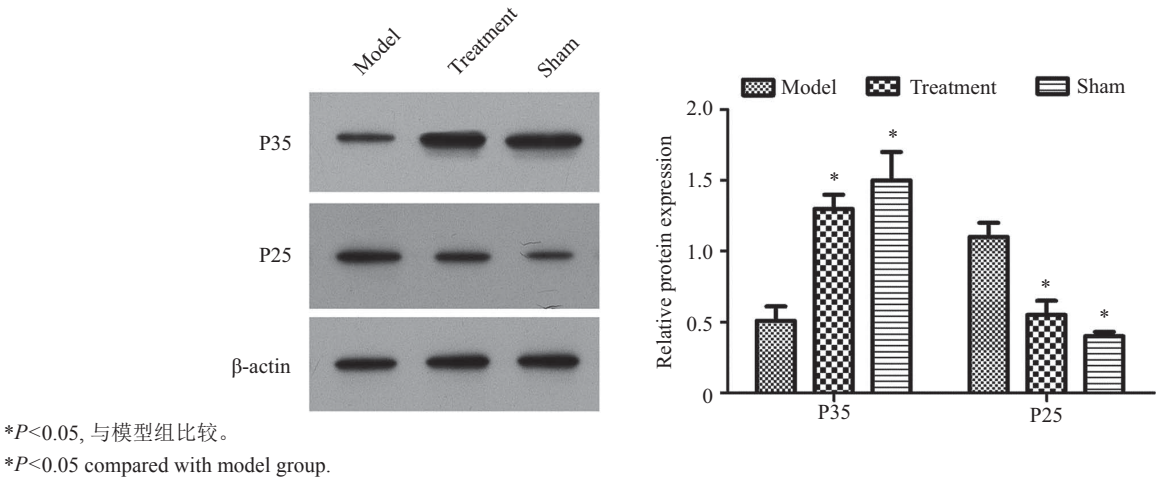


图4 大鼠海马P35和P25蛋白质水平
Fig.4 Relative protein levels of P35 and P25 in hippocampus of rats

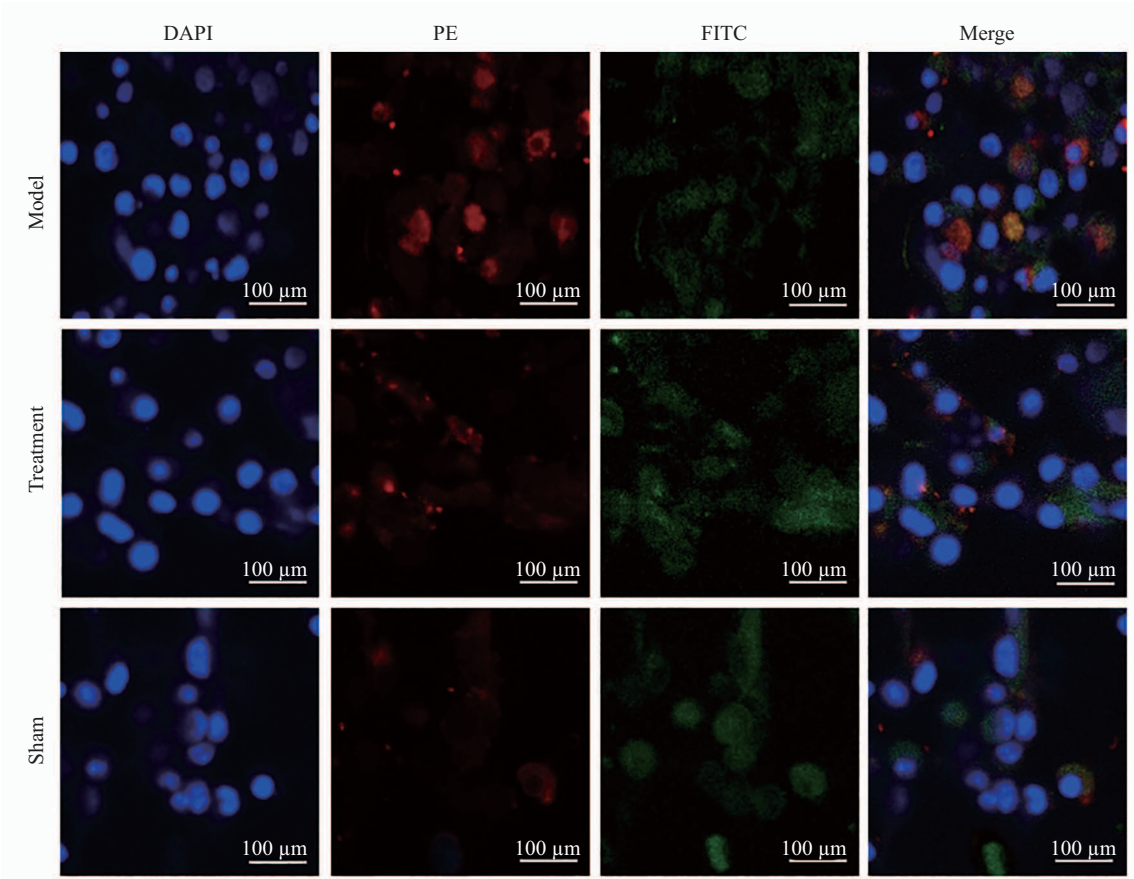


图5 大鼠海马P25和P35蛋白免疫荧光图
Fig.5 The immunofluorescence of P25 and P35 proteins in hippocampus of rats

比较运动功能明显下降, 而治疗组的运动功能恢复明显。病理结果显示, 与Sham组比较, 模型组和治疗组在不同时间点皮质区均可见海马区神经元水肿, 核染色质结构不清, 空泡形成, 但模型组相比治疗组凋亡细胞数均逐渐减少。该结果与顾平等^[21]报道的经侧脑室立体定向移植基质细胞治疗

脑缺血, 可抑制细胞凋亡, 改善脑缺血损伤神经功能缺损的结论相一致。同时, 本研究还发现, HIE损伤可导致海马神经元的损伤, 并介导P35蛋白质水平降低和P25蛋白质水平升高。这一结果可能的机制为: HIE损伤导致DNA损伤, 通过一系列信号转导, 激活蛋白水解酶, 将P35水解为P25和P25-

Cdk5复合物使Cdk5过度激活,使底物过度磷酸化,导致神经元变性坏死。而NSCs可以上调P35蛋白质水平,下调P25蛋白质水平,抑制Cdk5的过度激活从而对脑缺血再灌注所造成的损伤起到一定的保护作用。

本文为研究Cdk5在HIE脑损伤中的作用及NSCs的治疗机制提供了新思路,研究结果揭示了Cdk5在HIE脑损伤中可能发挥促凋亡作用,而NSCs可以阻断Cdk5及其信号转导通路,从而预防或减轻HIE脑损伤,但其具体作用与机制还有待深入研究。

参考文献 (References)

- Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science* 2000; 287(5457): 1433-8.
- Lange S. Peptidylarginine deiminases as drug targets in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Front Neurol* 2016; 7: 22.
- Natarajan G, Pappas A, Shankaran S. Outcomes in childhood following therapeutic hypothermia for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE). *Semin Perinatol* 2016; 40(8): 549-55.
- 蔡清, 薛辛东, 富建华. 新生儿缺氧缺血性脑病研究现状及进展. *中国实用儿科杂志*(Cai Qing, Xue Xindong, Fu Jianhua. Research status and progress of neonatal hypoxic ischemic encephalopathy. *Chinese Journal of Practical Pediatrics*) 2009; 24(12): 968-71.
- Zhao M, Zhu P, Fujino M, Zhuang J, Guo H, Sheikh I, *et al.* Oxidative stress in hypoxic-ischemic encephalopathy: molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Int J Mol Sci* 2016; 17(12): E2078.
- Wu Q, Chen W, Sinha B, Tu Y, Manning S, Thomas N, *et al.* Neuroprotective agents for neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Drug Discov Today* 2015; 20(11): 1372-81.
- Shendi D, Albrecht DR, Jain A. Anti-Fas conjugated hyaluronic acid microsphere gels for neural stem cell delivery. *J Biomed Mater Res A* 2017; 105(2): 608-18.
- 杨坦, 刘华, 王肇光, 高济凡, 肖东杰, 汪运山. 应用于缺血缺氧性脑病治疗的神经干细胞移植: 现实与未来. *中国组织工程研究*(Yang Tan, Liu Hua, Wang Zhaoguang, Gao Jifan, Xiao Dongjie, Wang Yunshan. Neural stem cell transplantation: its actuality and future used for treatment of hypoxic-ischemic encephalopathy. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*) 2014; 18(1): 143-4.
- Srivastava AK, Gross SK, Almad AA, Bulte CA, Maragakis NJ, Bulte JW. Serial *in vivo* imaging of transplanted allogeneic neural stem cell survival in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 2017; 289: 96-102.
- Omidi A, Akbari M, Mortezaee K, Eqlimi E, Beyer C, Zendedel A, *et al.* Prenatal transplantation of epidermal neural crest stem cells in malformation of cortical development mouse model. *Microsc Res Tech* 2016; doi: 10.1002/jemt.22809.
- Tripathi BK, Qian X, Mertins P. CDK5 is a major regulator of the tumor suppressor DLC1. *J Cell Biol* 2014; 207(5): 627-42.
- Amin ND, Zheng Y, Bk B, Shukla V, Skuntz S, Grant P, *et al.* The interaction of Munc 18 (p67) with the p10 domain of p35 protects *in vivo* Cdk5/p35 activity from inhibition by TFP5, a peptide derived from p35. *Mol Biol Cell* 2016; 27(21): 3221-32.
- Zhang Q, Xie H, Ji Z, He R, Xu M, He Y, *et al.* Cdk5/p25 specific inhibitory peptide TFP5 rescues the loss of dopaminergic neurons in a sub-acute MPTP induced PD mouse model. *Neurosci Lett* 2016; 632: 1-7.
- Donega V, van Velthoven CT, Nijboer CH. Intranasal mesenchymal stem cell treatment for neonatal brain damage: long-term cognitive and sensorimotor improvement. *PLoS One* 2013; 8(1): e51253.
- van Velthoven CT, Kavelaars A, van Bel F. Repeated mesenchymal stem cell treatment after neonatal hypoxia-ischemia has distinct effects on formation and maturation of new neurons and oligodendrocytes leading to restoration of damage, corticospinal motor tract activity, and sensorimotor function. *J Neurosci* 2010; 30: 9603-11.
- Wurmser AE, Nakashima K, Summers RG, Toni N, D'Amour KA, Lie DC, *et al.* Cell fusion independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage. *Nature* 2004; 430(6997): 350-6.
- 范广明, 张文彬, 张赛, 王丽君. 神经生长因子联合神经干细胞移植治疗大鼠脊髓损伤. *中国组织工程研究与临床康复*(Fan Guangming, Zhang Wenbin, Zhang Sai, Wang Lijun. Nerve growth factor combined with neural stem cell transplantation for treating spinal cord injury in rats. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*) 2014; 14(14): 2572-8.
- Liu QS, Li SR, Li K, Li X, Yin X, Pang Z. Ellagic acid improves endogenous neural stem cells proliferation and neurorestoration through Wnt/ β -catenin signaling *in vivo* and *in vitro*. *Mol Nutr Food Res* 2016; doi: 10.1002/mnfr.201600587.
- Braccioli L, Heijnen CJ, Coffey PJ, Nijboer CH. Delayed administration of neural stem cells after hypoxia-ischemia reduces sensorimotor deficits, cerebral lesion size, and neuroinflammation in neonatal mice. *Pediatr Res* 2016; doi: 10.1038/pr.2016.172.
- Yousuf MA, Tan C, Torres-Altoro MI, Lu FM, Plautz E, Zhang S, *et al.* Involvement of aberrant cyclin-dependent kinase 5/p25 activity in experimental traumatic brain injury. *J Neurochem* 2016; 138(2): 317-27.
- 顾平, 张忠霞, 张宝华, 王彦永, 张振清, 崔冬生, 等. 侧脑室移植骨髓基质细胞对脑缺血再灌注大鼠运动及认知功能的影响. *中国组织工程研究与临床康复*(Gu Ping, Zhang Zhongxia, Zhang Baohua, Wang Yanyong, Zhang Zhenqing, Cui Dongsheng, *et al.* Effects of lateral ventricle transplantation of bone marrow stromal cells on the movement and cognitive function of cerebral ischemic reperfusion rats. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*) 2011; 15(14): 2545-50.