

The Effect of Transplantation of Neural Stem Cells on the CMAP in Rats with Hypoxic-Ischemic Brain Injury

Yipeng Xu, Tian Hou

Department of Rehabilitation, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi Xinjiang
Email: penn119@126.com

Received: Sep. 26th, 2017; accepted: Oct. 6th, 2017; published: Oct. 13th, 2017

Abstract

Objective: To explore the feasibility of NSCs transplantation for the treatment of hypoxic-ischemic encephalopathy in infants. **Methods:** A total of 40 two-day-old neonatal Wistar rats were randomly divided into group A and group B (20 rats each group). A total of 40 two-day-old neonatal Wistar rats were randomly divided into group NSCs and group HIE (20 rats each group). Intraventricular transplantation of exogenous NSCs was operated 72 hrs after surgery. Motor Evoked Potential and Pathology Examination were evaluated at 3 weeks and 7 weeks after operation. **Results:** At 3rd and 7th week after operation, the NSCs group rats's hindlimb quadriceps CMAP draws out the wave amplitude to be higher compared with control group ($P < 0.01$). **Conclusions:** Intraventricular transplantation of exogenous NSCs can apparently improve behavioral function. It is suggested that intraventricular transplantation of NSCs is of a great potential feasibility for the treatment of hypoxic-ischemic encephalopathy in infants.

Keywords

Neural Stem Cells, Transplantation, CMAP, Hypoxic-Ischemic Brain Injury

神经干细胞移植对缺血缺氧性脑损伤大鼠的动作电位的影响

徐奕鹏, 侯甜

新疆维吾尔自治区人民医院康复科, 新疆 乌鲁木齐
Email: penn119@126.com

收稿日期: 2017年9月26日; 录用日期: 2017年10月6日; 发布日期: 2017年10月13日

摘要

目的: 探讨NSCs移植对治疗新生儿缺血缺氧性脑病的可行性。方法: 采用E14胎鼠大脑皮层制备NSCs。将40只Wistar大鼠随机分配到NSCs组(20只)、HIE组(20只), 对7日龄NSCs移植组新生大鼠在建模后72 h进行经脑室NSCs移植, 于移植后3周、7周进行运动诱发电位测定。结果: 术后3周、7周时NSCs移植组实验鼠后肢股四头肌复合动作电位(CMAP)与对照组相比引出波幅明显偏高($P < 0.01$)。结论: NSCs移植可改善缺血缺氧性损伤大鼠的运动功能。经脑室NSCs移植对于缺血缺氧性脑病的新生儿具有很大的治疗潜力, 为今后成功防治小儿脑瘫提供了新的可行性途径。

关键词

神经干细胞, 移植, 动作电位, 缺血缺氧性脑损伤

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

小儿脑性瘫痪是目前小儿时期最主要的运动功能伤残疾病, 且终生存在。近年来脑瘫的发生率无明显降低, 在某些地区甚至有上升的趋势。其主要病因是由于早产、产伤、围产期窒息及核黄疸等原因造成脑组织的缺血缺氧。在新生儿期尤其是出生后一个月内, 脑白质极易因脑缺血缺氧而受损[1]。

神经系统的功能单位 - 神经元, 在缺血缺氧损伤后不可再生, 从而严重影响神经功能。对于脑瘫的治疗, 人们采用了各种办法和手段, 目前尚无较好的治疗方法。目前, 已有报道采用干细胞移植治疗 huntington 病、帕金森症、脑卒中后遗症等。近期, 有学者研究表明 NSCs 的早期干预治疗有望成为临床治疗 HIE 的重要手段。NSCs 作为新生神经细胞的“种子”, 具有的免疫豁免性、良好的融合和迁徙能力, 为中枢神经的再生性治疗和基因治疗提供了可能。NSCs 所具有的这种迁徙能力使它得以通过直接移植到脑脊液循环中, 在进一步迁徙整合过程中参与神经结构和功能的修复与重建[2]。经侧脑室穿刺法移植的 NSCs 由于直接突破血脑屏障, 并与宿主细胞在形态和功能上形成良好的整合, 因此是一个干细胞移植的有效途径。经腰椎穿刺法移植 NSCs 在理论上具有同样的效果, 而后者可能是将来临床干细胞移植更为实用、简洁的有效途径[3]。本实验建立缺血、缺氧性脑损伤的动物模型并将神经干细胞注入缺血缺氧鼠损伤侧大脑的侧脑室, 证明了其神经电生理得到明显改善, 为日后神经干细胞移植治疗小儿脑瘫的治疗提供了依据。

2. 材料

2.1. 实验动物

健康 7 日龄 Wistar 大鼠 40 只, 清洁级, 雌雄不限, 体重 13.75 ± 0.35 g 购自新疆医科大学实验动物中心, 许可证号 FCXK(新) 2003-0001。本实验研究符合动物保护委员会标准要求, 实验中尽可能减少使用动物的数量和减轻动物的痛苦。

2.2. 实验药品

异氟醚吸入麻醉剂 DMEM/F12 无血清专用培养基、小牛血清 1.2.4 碱性成纤维细胞生长因子、表皮生长因子 EGF、青霉素/链霉素、B27 无血清添加物、L2 谷胺酰胺。

2.3. 实验器材

国产手术显微镜、显微手术器械、动物缺氧箱、智能氧量分析仪、小鼠立体定位仪、微型磨钻、微量注射泵、微量进样器(10 UL)、Nicolet EDX 肌电诱发电位仪。

3. 方法

3.1. 实验分组

随机分为两组: NSCs 组($n = 20$) HIE 组($n = 20$)。

NSCs 组: 生后 7 天 Wistar 大鼠麻醉条件下行左侧颈总动脉双重结扎并离断, 置于缺氧环境中缺氧 3 小时; 3 天后进行神经干细胞移植。

HIE 组: 生后 7 天 Wistar 大鼠麻醉条件下行左侧颈总动脉双重结扎并离断, 置于缺氧环境中缺氧 3 小时; 中途脱落 12 只, 最终移植组 11 只, 对照组 17 只进入评估。

3.2. 模型的制作

3.2.1. 神经干细胞的制备

将 E14 孕鼠乙醚麻醉后打开腹腔切取子宫, 夹取胎鼠双侧大脑皮层组织, 用 D-Hanks 液冲洗。将脑组织剪成 1.0 mm^3 小块, 吸管吹打成单细胞悬液。室温 25°C 1000 r/min 下离心 5 min, 弃上清, $1 \times 10^6/4 \text{ mL}$ 密度置条件培养基中培养。

3.2.2. HIE 大鼠模型的制作

选用出生后第 7 天 Wistar 大鼠, 异氟醚吸入麻醉, 显微镜下行颈正中纵切口, 分离颈总动脉与迷走神经后以 6-0 丝线双重结扎颈总动脉并离断, 缝合皮肤切口。术后麻醉恢复 2 小时后根据经验放置于混合 8%氧 + 92%氮气缺氧箱中 3 小时。

3.2.3. HIE 大鼠神经干细胞移植模型的制作

NSCs 组: 选用出生后第 7 天 Wistar 大鼠, 麻醉后结扎颈总动脉并离断, 缝合皮肤切口。术后麻醉恢复 2 小时后放置于混合 8%氧 + 92%氮气缺氧箱中 3 小时。术后 3 天进行神经干细胞移植。将 $2 \mu\text{L}$ 移植液移植液缓缓注入新生大鼠的左侧侧脑室内, 注射完毕后留针 2 min 后取出, 骨蜡封闭注射针口。待新生大鼠苏醒后送返母鼠旁继续喂哺。

3.3. 评价方法: 运动诱发电位检测

术后 3 周对两组大鼠分别进行股四头肌复合肌肉运动诱发电位(Compound Muscle Action Potential, CMAP)检测。具体如下: 大鼠腹腔注射 10%水合氯醛 $0.4 \text{ ml}/100\text{g}$ 体重, 顶部皮肤去毛, 碘酒、乙醇消毒, 顶正中矢状切开头皮, 推开骨膜, 暴露冠状缝与矢状缝, 以冠状缝后 3 mm, 中线旁开 2 mm 为刺激中心点, 保持局部颅骨湿润。双极刺激电极刺激大脑皮层运动区表面颅骨, 刺激强度 $2 \text{ mA} \sim 10 \text{ mA}$, 波宽 0.1 ms , 单次刺激。针状记录电极置于股四头肌内。参考电极置于同侧胫前肌内, 滤波 $30 \text{ Hz} \sim 300 \text{ Hz}$, 灵敏度 $5 \mu\text{V}$, 重复 1~5 次。接地电极置于尾根部。记录电位, 寻找最大波幅刺激强度, 分析 MEP 第一个向上的负波的波幅及峰潜伏期。

3.4. 统计方法

所有数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, SPSS17.0 软件进行统计分析, 采用两独立样本的 t 检验进行组间的统计学比较, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

4. 结果

术后 3 周组移植鼠后肢 CMAP 波幅为 13.070 ± 3.015 MV, 大于对照组 $HIE4.074 \pm 0.910$ MV, 统计学处理后认为差异有统计学意义($P < 0.01$); 术后 7 周移植组实验鼠后肢 CMAP 波幅为 24.030 ± 2.884 mv, 大于实验组 2.021 ± 0.542 mv, 统计学处理后认为差别有统计学意义($P < 0.01$)。如表 1 所示: 术后 3 周、7 周移植组后肢 MEP 与对照组 HIE 组相比, 波幅明显增高。

5. 讨论

脑室周围白质软化症是新生儿缺血缺氧性脑病最常见的脑损伤类型, 主要引起脑室周围白质的少突胶质细胞受损, 纤维束损伤, 导致去髓鞘病变, 是造成脑瘫等神经系统后遗症的主要原因[4] [5], 迄今对早产儿 PVL 尚无防治良策。外源性 NSCs 的移植研究进展, 为早产儿脑室周围白质软化症的治疗提供了新的思路[6] [7]。脑瘫治疗后疗效的评价指标包括行为学的改善, 神经电生理的变化, 以及病理的改善。其中神经电生理是评价指标中比较客观、微创、利于临床应用的方法。也正因为如此, 目前最常用、经典的指标之一是神经电生理功能检测, 运动诱发电位能直接反映外周运动神经的功能状态[8]。近年来神经干细胞移植的实验研究开始增多, 逐渐将神经电生理的功能检测运用到实验评价指标中。郭世磊等将种植非神经干细胞性成体干细胞源性神经元细胞构建的组织工程化神经移植于鼠、犬外周神经损伤缺损模型中, 发现非神经干细胞性成体干细胞源性神经元细胞, 可以在外周神经微环境中存活、增殖、形成突触联系, 促进了神经功能的修复。何珏等[9]研究发现骨髓间充质干细胞移植后脊髓损伤大鼠的运动诱发电位和体感诱发电位恢复较为显著, 波幅增高。移植后第 5 周微弱的复合肌肉动作电位(CAMP)出现, CAMP 的波幅随手术恢复时间的延长而逐步增大, 两者具有线性相关关系。王玉成等[10]对脊髓损伤大鼠进行许旺细胞联合 C5a 受体拮抗剂移植后发现后肢运动功能评价联合移植组优于对照组。联合组大鼠体感诱发电位及运动诱发电位的潜伏期、波幅明显优于其他组, 提示许旺细胞移植和 C5a 受体拮抗剂联合应用可促进脊髓损伤大鼠神经突触的再生, 改善其肢体运动功能和电生理功能。王广志等[11]研究证实接受嗅鞘细胞移植脊髓损伤大鼠体感诱发电位及运动诱发电位的潜伏期、波幅明显优于对照组, 细胞移植组大鼠 BBB 后肢运动功能评分较对照组明显提高。本实验观察并探讨了大鼠缺血缺氧损伤后运动诱发电位(motorevoked potential, MEP)的变化。对两组实验鼠后肢进行了 MEP 检测。MEP 是指应用电或磁刺激皮层运动区, 产生兴奋, 通过下行传导通路, 使脊髓前角细胞去极化, 在相应外周神经或肌肉表面记录到的电位结果显示, 术后 3 周、7 周移植组实验鼠后肢 MEP 与对照组相比, 波幅明显升高, 达到最大

Table 1. CMAP of rats in two groups were compared between 3 weeks and 7 weeks after operation

表 1. 两组实验鼠术后 3 周、7 周大鼠 CMAP 比较

分组	3 W (MV)	7 W (MV)
移植组 NSCs	13.070 ± 3.015	24.030 ± 2.884
缺血缺氧组 HIE	4.074 ± 0.910	2.021 ± 0.542
t	9.033	23.713
P	<0.01	<0.01

波幅所需刺激强度也相应降低, 进一步说明移植后实验鼠的神经传导性得到提, 改善了脑瘫模型鼠肢体运动的功能, 这一结果与行为学预期结果相符。本实验将神经干细胞注入缺血缺氧鼠损伤侧大脑的侧脑室, 证明了其神经电生理得到明显改善, 为日后神经干细胞移植治疗小儿脑瘫的治疗提供了依据。

参考文献 (References)

- [1] Li, T., Yu, Y. and Cai, H. (2015) Effects of Brain-Derived Neurotrophic Factor Pretreated Neuron Stem Cell Transplantation on Alzheimer's Disease Model Mice. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, **8**, 21947-21955.
- [2] 朱薇薇, 赵红洋, 温天莲, 等. 缺氧缺血性脑损伤新生大鼠脑 Nogo 受体水平及 NEP1-40 的神经保护作用[J]. 中华儿科杂志, 2010, 48(2): 138-142.
- [3] 万虹, 李德志, 杨飞, 历俊华, 王身国, 王忠诚. 许旺细胞与 PLGA 共同移植于大鼠全横断脊髓损伤的实验研究[J]. 中华外科杂志, 2007, 45(12): 843-846.
- [4] 栾佐, 屈素清, 尹国才, 阎凤清, 胡晓红, 吴南海. 新生鼠缺氧缺血性脑损伤后不同途经人神经干细胞移植的实验研究[J]. 中华小儿外科杂志, 2006, 27(9): 497-500.
- [5] 贺月秋, 陈惠金, 钱龙华, 陈冠仪. 构建以少突胶质细胞前体为主与人类早产儿脑室周围白质软化病理相似的动物模型[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(19): 3742-3747.
- [6] Yan, Y., Sun, H.H., Hunter, D.A., et al. (2012) Efficacy of Short-Term FK506 Administration on Accelerating Nerve Regeneration. *Neurorehabilitation and Neural Repair*, **26**, 570-580. <https://doi.org/10.1177/1545968311431965>
- [7] Ansari, A.M., Ahmed, A.K., Matsangos, A.E., et al. (2016) Cellular GFP Toxicity and Immunogenicity: Potential Confounders in *in Vivo* Cell Tracking Experiments. *Stem Cell Reviews*, **12**, 553-559.
- [8] 张志友, 王向野, 陈刚, 等. 神经营养因子 3 联合神经干细胞移植治疗缺氧缺血性脑损伤的实验研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2012, 11(10): 734-737.
- [9] 何珏, 王天科. 丙泊酚联合骨髓间充质干细胞移植对脊髓损伤大鼠后肢功能及电生理的影响[J]. 中国组织工程研究, 2015(41): 6659-6664.
- [10] 王玉成, 周江波. 许旺细胞联合 C5a 受体拮抗剂移植脊髓损伤大鼠的电生理及后肢功能变化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(36): 6762-6766.
- [11] 王广志, 刘明娜. 接受嗅鞘细胞移植脊髓损伤大鼠电生理及后肢功能变化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(1): 112-115.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2161-8712, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: acm@hanspub.org