

Nurr1 基因修饰人脐血间充质干细胞源性多巴胺能神经元移植治疗帕金森病

黄仕雄¹, 刘 军^{2*}, 文国强¹, 肖颂华², 廖小平¹, 刘运林², 欧阳锋¹, 邢诒刚²
(1. 海南省人民医院神经内科, 海南 海口 570311; 2. 中山大学附属第二医院神经科, 广东 广州 510120)

摘 要:【目的】探讨 Nurr1 基因修饰的人脐血间充质干细胞(HUCB-MSC)源性的多巴胺能神经元移植对帕金森病(PD)模型鼠的治疗作用。【方法】SD 大鼠 PD 模型随机分为假手术组(A组)、单纯 HUCB-MSC 组(B组)、Nurr1 基因修饰 HUCB-MSC 组(C组)。将 HUCB-MSC 及 Nurr1 基因修饰后的 HUCB-MSC 体外分化为多巴胺能神经元,并通过立体定向的手段将其移植入毁损侧纹状体,观察移植前后 PD 模型大鼠旋转行为的变化和脑内多巴胺(DA)含量的改变,以及纹状体区酪氨酸羟化酶(TH)表达的变化。【结果】B、C 两组在移植后第2周、4周和8周时旋转行为及脑内 DA 含量均较 A 组有所改善($P < 0.05$, $P < 0.01$),且 B、C 组间比较 C 组改善明显($P < 0.05$),这种差异以第8周时最为明显。移植后 B、C 两组 TH 表达较 A 组明显增高,并随着时间的增加而逐渐增高,且 C 组在各时间点上 TH 表达较 B 组含量高($P < 0.05$),并在移植后第8周时最为明显。【结论】Nurr1 基因修饰 HUCB-MSC 来源的多巴胺能神经元移植治疗 PD 模型鼠,能有效地增加鼠脑内多巴胺含量和纹状体区 TH 的表达,改善 PD 模型鼠的症状,为细胞移植治疗 PD 提供了一种崭新的手段。

关键词: Nurr1 基因;人脐带血;间充质干细胞;多巴胺能神经元;帕金森病

中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 1672-3554(2009)05-0522-05

Therapeutic Effect of Transplantation of Dopaminergic Neuron Derived from Nurr1 Gene Modified HUCB-MSC to Rat Model of Parkinson's Disease

HUANG Shi-xiong¹, LIU Jun^{2*}, WEN Guo-qiang¹, XIAO Song-hua², LIAO Xiao-ping¹, LIU Yun-lin²,
OUYANG Feng¹, XING Yi-gang²

(1. Department of Neurology, Hainan Provincial People's Hospital, Haikou 570311, China;

2. Department of Neurology, The Second Affiliated Hospital, Guangzhou 510120, China)

Abstract:【Objective】To observe the therapeutic effect on rat model of Parkinson's disease (PD) by transplantation of dopaminergic neuron derived from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells (HUCB-MSC) modified by Nurr1 gene.【Methods】Forty-five SD rat model of PD were grouped randomly into sham operation group (group A), HUCB-MSC transplantation group (group B) and Nurr1 gene modified HUCB-MSC group (group C). HUCB-MSC and Nurr1 gene modified HUCB-MSC were differentiated to dopaminergic neuron and then transplanted into impair striatum of rat PD model. Rotational behavior examination was carried out at different time point after transplantation. Dopamine content and the expression of tyrosine hydroxylase (TH) in rat striatum were detected at the same time point as well.【Results】The rat rotational behavior was improved and dopamine content in striatum increased obviously in group B and C as compared with group A at the 2nd, 4th, and 8th week after transplantation ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively). These changes were more significant in group C than that in group B at each time point after transplantation ($P < 0.05$) and the differences reached the most obvious at 8th week after transplantation. Meanwhile, TH expression in rat striatum in group B and C increased with time and was higher than that in group A ($P < 0.01$), furthermore, it was higher in group C than that in group B after transplantation ($P < 0.05$), and the differences reached most

收稿日期: 2009-04-29

基金项目: 广东省自然科学基金(06021226);海南省自然科学基金(806120)

作者简介: 黄仕雄, 博士, 副主任医师, 研究方向: 神经退行性疾病, E-mail: yyhsx@163.com; * 通信作者: 刘军, 副教授, 硕士生导师, E-mail: docliujun@hotmail.com

obvious at the 8th week. 【Conclusion】 Transplantation of dopaminergic neurons derived from HUCB-MSC modified with Nurr1 can elevate the DA content, increase the expression of TH in rat brain and improve the symptoms of rat model of PD effectively, which provide a new strategy for cell transplantation therapy for PD.

Key words: Nurr1 gene; human umbilical cord blood; mesenchymal stem cells; dopaminergic neuron; Parkinson's disease

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(5): 522-526]

利用外源性多巴胺能神经元重建脑内黑质纹状体系统是移植治疗帕金森病(Parkinson's disease, PD)的目标之一。国内外目前采用的补充多巴胺能神经递质或神经营养药物,虽然能部分改善病人症状,但并不能阻止病情的发展,甚至加速残存的多巴胺神经元变性。因此,阻止中脑多巴胺能神经元变性、促进多巴胺分泌的基因治疗和细胞移植目前则是国内外在PD研究领域的重中之重^[1]。脐血干细胞是一种具有分化潜能的原始细胞,具备自我更新和增殖能力,并能在特定因素的影响或诱导下,向各种细胞或组织分化^[2-3]。已有学者发现使用基因重组成纤维细胞生长因子-8(fibroblast growth factor-8, FGF-8)和音猬因子(sonic hedgehog, SHH)刺激可以将人脐带血间充质干细胞(human umbilical cord blood mesenchymal stem cells, HUCB-MSC)诱导分化为多巴胺能神经元,但阳性率较低,其移植后疗效欠佳^[4]。近年来发现的细胞核受体超家族的转录因子Nurr1与干细胞向多巴胺能神经元分化及多巴胺能神经元生存和发展关系密切,Nurr1基因的过表达能在一定程度上促进多种干细胞向DA能神经元的分化^[5-6]。我们在前期的体外研究已完成了HUCB-MSC的分离和纯化,进一步将HUCB-MSC以及Nurr1基因体外修饰的HUCB-MSC在条件培养液中培养,用细胞因子的诱导促使HUCB-MSC进一步向多巴胺能神经元分化,结果发现Nurr1基因体外修饰的HUCB-MSC较单纯HUCB-MSC向DA能神经元分化的比例明显增高^[7]。为了验证其进一步的治疗效果,本研究将HUCB-MSC以及Nurr1基因修饰后HUCB-MSC源性体外分化的DA能神经元移植入PD模型大鼠纹状体内,通过观察移植前后PD模型大鼠旋转行为的变化和脑内多巴胺(dopamine, DA)含量的改变,以及纹状体区酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)表达的变化,阐明Nurr1基因结合HUCB-MSC来源的多巴胺能神经元移植在PD细胞移植治疗策略中的重要地位。

1 材料与方法

1.1 实验材料

正常雄性Sprague Dawley (SD)大鼠,体质量为190~220 g之间,由中山大学实验动物中心提供。6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA),阿朴吗啡(apomorphine, Apo)和TH单克隆抗体(Sigma公司),510高压泵型高效液相色谱仪(美国HP公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 人脐血间充质干细胞体外诱导向多巴胺能神经元的分化 体外HUCB-MSC的分离、培养、鉴定;体外Nurr1基因的转染至MSC,转染后基因表达的检测,以及HUCB-MSC及Nurr1基因修饰的HUCB-MSC在含有FGF-8和Shh的神经细胞条件培养液中向DA能神经元的分化及鉴定见参考文献^[7]。

1.2.2 SD大鼠帕金森病模型制备 SD大鼠帕金森病模型制作以及行为学检测采用本课题组以往建立的方法,详见参考文献^[8]。

1.2.3 实验动物分组及HUCB-MSC源性DA能神经元移植策略 取合格的PD模型鼠共45只,随机分为3组。对照组(假手术组, A组), 15只;单纯HUCB-MSC源性多巴胺能神经元移植治疗组(单纯移植组, B组), 15只;Nurr1基因修饰的HUCB-MSC源性多巴胺能神经元移植治疗组(基因修饰组, C组), 15只。采用10%水合氯醛腹腔内注射麻醉模型鼠成功后,行毁损侧纹状体一点定位注射。注射量均为4 μ L/只,细胞浓度为 $1 \times 10^5/\mu$ L,注射完成后留针10 min再移除,以保证细胞植入,假手术组予以4 μ L生理盐水注射。移植大鼠不进行任何免疫抑制剂的处理。

1.2.5 PD模型鼠移植后的行为学检测及脑内DA含量的测定 各组分别于移植后第2、4、8周,行Apo诱发行为学检测,计数大鼠平均每分钟身体旋转360°的次数,观察各组PD模型进行不同移植策略后行为学的变化。各组在做完旋转实验后,

分别取3只模型鼠,断头取脑立即置于冰上,快速解剖移植(毁损)侧纹状体,保存于 -70°C 冰箱内待测。同时分别取健康大鼠3只作为空白对照。测定时行纹状体称质量,加入高氯酸匀浆,离心取上清液,过滤后行高效液相测定脑内DA含量。

1.2.6 移植后纹状体区TH检测 各组动物(每个时间点取2只动物进行检测)于进行Apo诱发旋转实验后即采用升主动脉灌注法固定脑组织,作厚度为 $5\mu\text{m}$ 的切片,按试剂盒说明书操作,并行TH染色,阳性染色呈棕色。采用图像分析仪分析纹状体区TH染色的平均灰度和平均吸光度,计算阳性单位值。

1.3 数据统计和结果分析

全部数据应用SPSS 10.0软件进行统计学分析,数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组数据差

异显著性检验采用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 移植后模型鼠行为学的检测结果

在移植后第2、4、8周对模型鼠旋转行为进行检测,结果显示:B组及C组在移植后第2、4和8周时其旋转行为均较移植治疗前有所改善,且随时间延长改善情况越明显。对3组在移植后第2、4、8周时比较发现,在各时间点B组、C组均较对照组均有明显改善($P < 0.05$),其中以C组改善更为明显,同B组比较在各时间点亦有明显差异($P < 0.05$),且这种差异以移植后第8周最为明显,见表1。

表1 移植后模型鼠旋转行为

Table 1 Rotational behavior in PD rat model after transplantation

($\bar{x} \pm s$, r/min)

Group	Before treatment	After treatment		
		2 nd week	4 th week	8 th week
A	10.34 ± 0.96	10.08 ± 1.03	10.49 ± 1.09	11.03 ± 1.07
B	10.16 ± 0.92	$8.84 \pm 0.85^{1)}$	$7.74 \pm 0.68^{1)}$	$7.18 \pm 0.61^{1)}$
C	10.51 ± 0.97	$7.39 \pm 0.72^{1)2)}$	$6.55 \pm 0.58^{1)2)}$	$6.05 \pm 0.57^{1)2)}$

1) Compared with sham-operation group(A) and before treatment, $P < 0.05$; 2) Compared with HUCB-MSC treatment group(B), $P < 0.05$

2.2 移植后PD大鼠脑内多巴胺含量的测定

利用高效液相色谱技术对各组大鼠纹状体内的DA水平进行检测,结果如表2所示。B、C两组脑内DA含量较A组明显增高($P < 0.01$),在第8周时最为明显,其差异具有统计学意义($P < 0.01$)。移植后各时间点C组比B组含量高($P < 0.05$),而这种差异在移植后8周时达到最大,但C组即使在移植后8周时,其脑内DA含量仍较健康大鼠低($P < 0.01$)。

2.3 免疫组织化学结果

纹状体区TH免疫组化结果显示,移植后各时间点动物纹状体区TH染色的阳性单位(positive unit, PU)值在A组为 3.2 ± 0.3 ,在B、C两组其TH表达较A组明显增高,且随着时间的增加而逐渐增高,在第2、4、8周时,B组TH的PU值分别为 4.6 ± 0.2 , 5.3 ± 0.1 和 5.8 ± 0.2 ,C组为 5.5 ± 0.3 , 6.8 ± 0.2 和 7.1 ± 0.3 ,同A组相比均有显著性差异($P < 0.01$),且C组在各时间点上TH表达较B组

表2 移植后PD大鼠脑内多巴胺含量

Table 2 Content of dopamine of brain in PD rat model after transplantation

($\bar{x} \pm s$, ng/mg)

Group	2 nd week	4 th week	8 th week
Normal	$6\ 685 \pm 650$	$6\ 731 \pm 644$	$6\ 594 \pm 648$
A	$1\ 867 \pm 153^{1)}$	$1\ 831 \pm 152^{1)}$	$1\ 806 \pm 149^{1)}$
B	$2\ 277 \pm 211^{1)2)}$	$2\ 470 \pm 243^{1)2)}$	$3\ 045 \pm 278^{1)2)}$
C	$2\ 875 \pm 244^{1)2)3)}$	$3\ 645 \pm 368^{1)2)3)}$	$4\ 384 \pm 351^{1)2)3)}$

1) Compared with normal group $P < 0.01$; 2) Compared with sham operation group(A) and before treatment; $P < 0.01$; 3) Compared with HUCB-MSC treatment group(B) $P < 0.05$

含量高($P < 0.05$),这种差异在移植后8周时达到最大($P < 0.01$;图3)。

3 讨 论

由于PD的病理学基础和黑质-纹状体通路研究的较为透彻,而且其结构较其它神经部位简单,

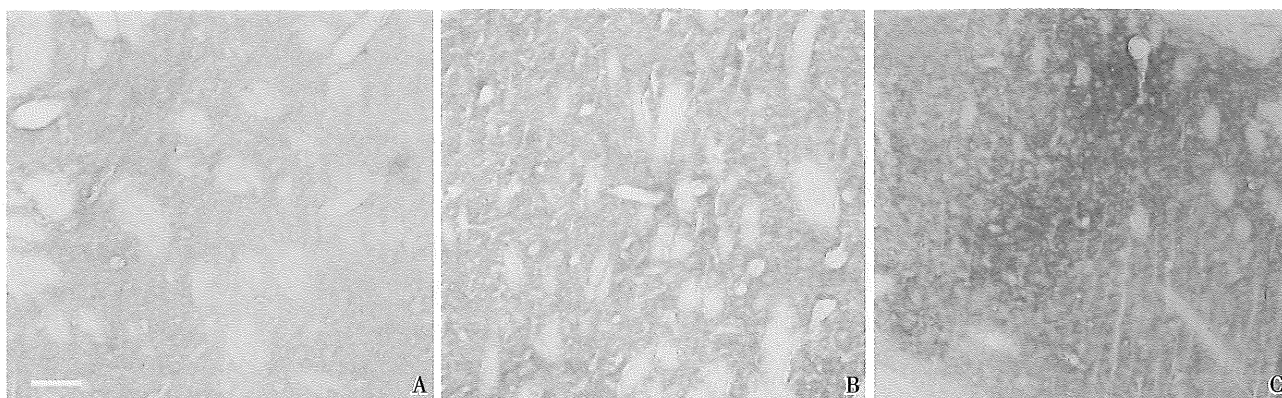


图3 移植治疗后第8周大鼠纹状体区 TH 免疫组化染色

Fig.3 TH immunohistochemistry of rat striatum at the 8th week after transplantation

A: sham operation group; B: HUCB-MSC transplantation group; C: Nurr1 gene modified HUCB-MSC group. Scale bar: 100 μ m

突触联系易于建立,已成为神经干细胞能够治愈的最佳靶疾病^[9]。而利用外源性多巴胺能神经元重建脑内黑质纹状体系统是移植治疗 PD 的主要策略。Yang 等^[10]将人胚胎干细胞来源的多巴胺能神经元移植至 6-OHDA 所致的 PD 模型鼠,可使其运动功能得以改善长达 5 个月。类似的效果亦可见于过表达 Pitx3 的神经干细胞所分化形成的多巴胺能神经元上^[11]。然而由于神经干细胞以及胚胎干细胞的来源受限,取材难度大,尤其是牵涉到伦理道德方面的问题,大大地限制了其今后的临床应用。研究表明,脐血干细胞是一种具有分化潜能的原始细胞,具备自我更新和增殖能力,并能在特定因素的影响或诱导下,向各种细胞分化,是造血、内皮、间充质和神经等多种干细胞的丰富来源^[12-13]。具有来源丰富,易于获得且干细胞含量高,细胞原始,异体移植后免疫排斥反应发生率、程度较轻等优越性。因此进一步探讨脐血干细胞的特性,深入研究其定向分化以及神经移植后的作用将会对包括 PD 在内的多种神经退行性疾病的细胞移植治疗提供一种崭新的策略。

作为近年来发现的细胞核受体超家族的转录因子 Nurr1 与神经干细胞向多巴胺能神经元分化及多巴胺能神经元生存和发展关系密切^[5],同时我们以往的研究亦发现过表达的 Nurr1 基因可以拮抗 6-羟多巴对神经干细胞的毒性作用^[14]。我们在本课题的前期研究中已成功地在体外使用 Nurr1 基因诱导使得 HUCB-MSC 进一步向 DA 能神经元分化并完成了 DA 能神经元的鉴定,更重要的是发现 Nurr1 基因体外修饰的 HUCB-MSC 较

单纯 HUCB-MSC 向 DA 能神经元分化的比例明显增高^[7]。

本研究在完成 HUCB-MSC 以及 Nurr1 基因修饰后 HUCB-MSC 体外诱导分化成 DA 能神经元的基础上,将分化后的 DA 能神经元移植入 PD 模型大鼠脑纹状体内来进一步观察,对比其潜在的治疗效果。结果显示单纯移植组、基因修饰组在移植后第 2、4、8 周时其旋转行为均较治疗前有所改善,且随时间延长改善情况越明显;同时,三组在移植后各时间点比较,单纯移植组、基因修饰组两组均较对照组有明显改善($P < 0.05$);且基因修饰组改善更为明显,同单纯移植组比较亦有明显差异($P < 0.05$),这种差异以第 8 周时最为明显。上述结果表明,在用 HUCB-MSC 源性 DA 能神经元移植治疗后,PD 模型症状得以明显改善,而 Nurr1 基因修饰后的 HUCB-MSC 源性多巴胺能神经元治疗的效果更为明显,动物的症状改善程度和持续时间明显延长。表明了 HUCB-MSC 对 PD 潜在的治疗效果以及 Nurr1 基因对 HUCB-MSC 向 DA 能神经元诱导分化的重要作用。

为了更客观地衡量 HUCB-MSC 来源的 DA 能神经元和 Nurr1 基因修饰后 HUCB-MSC 来源的 DA 能神经元移植后脑内 DA 含量的变化,在移植后 2 周、4 周、8 周时利用高效液相色谱技术对 PD 模型鼠纹状体内的 DA 含量进行了定量测定,同时增加健康大鼠纹状体内 DA 含量的检测作为对照,发现两个移植治疗组脑内 DA 含量较假手术组明显增高($P < 0.01$),移植后各时间点上 Nurr1 基因修饰组脑内的 DA 含量较单纯移植组增高

($P < 0.05$),而这种差异在移植后8周时达到最大。但即使在移植后8周时,Nurr1基因修饰组脑内DA含量仍较健康大鼠低($P < 0.01$)。

TH免疫组化结果显示,移植后各时间点大鼠纹状体区TH在两个移植组表达较对照组明显增高,且随着时间的增加而逐渐增高。在第8周,单纯移植组和基因修饰组TH表达同对照组相比有显著性差异($P < 0.01$),且基因修饰组在各时间点上TH表达均较单纯移植组含量高($P < 0.05$),这种差异在移植后8周时达到最大($P < 0.01$)。

以上结果表明尽管移植后并不能完全纠正PD模型鼠脑内DA含量的减少,但细胞移植后仍使得脑内DA能神经元数量及DA含量增加,受损的DA能系统在一定程度上得到重建的作用仍是较为显著的。Nurr1基因修饰组所取得的疗效除了与其在多巴胺能神经元的发育、分化及维持中的主导作用外,还可能通过减少小胶质细胞和星形胶质细胞产生的神经毒性介质的形成而起到对PD多巴胺能神经元的保护作用^[15]。

综上所述,HUCB-MSC来源的,尤其是Nurr1基因修饰后HUCB-MSC来源的DA能神经元移植治疗PD模型,能有效地增加动物脑内TH的表达,改善PD模型鼠的症状。为细胞移植治疗PD提供了一种崭新的策略。

参考文献:

- [1] Svendsen CN, Caldwell MA, Shen J, et al. Long-term survival of human central nervous system progenitor cells transplanted into a rat model of Parkinson's disease[J]. *Exp Neurol*, 1997,148(1):135-146.
- [2] McGuckin C, Forraz N, Baradez MO, et al. Embryonic-like stem cells from umbilical cord blood and potential for neural modeling [J]. *Acta Neurobiol Exp*, 2006,66(4):321-329.
- [3] 王晶,李志忠,徐茅,等.人脐血间质干细胞一般特性及其多向分化潜能[J]. *中山大学学报:医学科学版*,2007,28(04):418-429.
- [4] Ogawa Y, Sawamoto K, Miyata T, et al. Transplantation of in vitro-expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats [J]. *J Neurosci Res*, 2002,69(6):925-933.
- [5] Backman C, Perlmann T, Wallen A, et al. A selective group of dopaminergic neurons express Nurr1 in the adult mouse brain [J]. *Brain Res*, 1999,851(1-2):125-132.
- [6] 李庆军,黎祥喷,刘军,等.含Nurr1基因腺病毒对神经干细胞分化的影响[J]. *实用神经疾病杂志*, 2005,8(5):7-8.
- [7] 黄仕雄,刘军,邢治刚,等. Nurr1基因转染人脐血间充质干细胞诱导分化为多巴胺能神经元的实验研究[J]. *中华神经医学杂志*, 2007,6(3):238-240,244.
- [8] 刘军,肖颂华,周道友,等.芳香族氨基酸脱羧酶转基因骨骼肌细胞脑内移植后对纹状体区多巴胺含量的影响[J]. *中华神经科杂志*,2004,37(1):41-44.
- [9] Storch A, Schwarz J. Neural stem cells and Parkinson's disease [J]. *J Neurol*, 2002,249(Suppl 3): III/30-III/32.
- [10] Yang D, Zhang ZJ, Oldenburg M, et al. Human embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons reverse functional deficit in parkinsonian rats [J]. *Stem Cells*, 2008,26(1):55-63.
- [11] O'Keeffe FE, Scott SA, Tyers P, et al. Induction of A9 dopaminergic neurons from neural stem cells improves motor function in an animal model of Parkinson's disease [J]. *Brain*, 2008,131(3):630-641.
- [12] Low CB, Liou YC, Tang BL. Neural differentiation and potential use of stem cells from the human umbilical cord for central nervous system transplantation therapy [J]. *J Neurosci Res*, 2008,86(8):1670-1679.
- [13] El-Badri NS, Hakki A, Saporta S, et al. Cord blood mesenchymal stem cells: Potential use in neurological disorders [J]. *Stem Cells Dev*, 2006,15(4):497-506.
- [14] 李庆军,刘军,肖颂华,等.6-羟基多巴对C17.2神经干细胞毒性及NURR1基因对其保护作用[J]. *中山大学学报:医学科学版*,2004,25(2):141-145.
- [15] Saijo K, Winner B, Carson CT. A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death [J]. *Cell*, 2009,137(1):47-59.

(编辑 刘清海)