

# 神经干细胞移植治疗大鼠无神经节细胞症的初步研究

王 栋 胡 博 詹江华

**【摘要】 目的** 观察神经干细胞(Neural Stem cells, NSCs)在无神经节细胞症大鼠直肠壁内移植的存活和分化情况,以及对肠道运动和反射功能的改善,探讨神经干细胞移植对肠无神经节细胞症的治疗作用。**方法** 用 0.5% 苯扎氯铵溶液浸湿造模,造模成功后,随机分为两组,每组各 30 只。模型组用免疫荧光标记的提纯好的脐带间充质神经干细胞  $150 \mu\text{L}$  (浓度  $10^7/\text{mL}$ ) 分 3 处注入大鼠无神经节细胞肠壁内,对照组用生理盐水注射。并分别于注射后 2, 4, 8 周取材,观察大体表现,免疫荧光显微镜观察神经干细胞在病变肠管中的成活情况,免疫组化检测神经元特异性烯醇化酶(NSE)和 S-100 蛋白表达情况,钡灌肠检查肠道功能情况。**结果** 本组造模成功 60 例,无试验过程中死亡。模型组移植后 2 周取材,其中 22 只移植后可检测到肠壁内移植细胞存活,证明神经干细胞移植成功;4 周取材可见分化为神经节细胞和星型胶质细胞,免疫组化可见肠壁内 NSE 和 S-100 蛋白表达;8 周取材与 4 周结果相同。注射生理盐水组无一只有神经节细胞存活。免疫组化检测,移植组病变肠段肠壁内神经细胞表达明显高于对照组。钡灌肠结果显示,神经干细胞移植前后结肠形态上有明显不同。**结论** 脐带间充质干细胞来源的 NSCs 在无神经节细胞的肠壁内可以存活和分化,并在一定程度上恢复肠神经功能,从而为 NSCs 移植治疗无神经节细胞性巨结肠病提供了实验依据。

**【关键词】** 无神经节细胞症; 神经干细胞; 移植; 大鼠; 功能改善

**An Experimental Study on the Therapeutic Effect of Transplanted Neural Stem cells in Aganglionic Megacolon Rats Model.** WANG Dong, HU Bo, ZHAN Jiang-hua Department of Surgery, Tianjin Children's Hospital, Tianjin 300074, China

**【Abstract】 Objective** To elucidate the potential and the biological significance of grafting of central nervous system-derived NSCs(CNS-NSCs) as a therapeutic strategy for neuronal replacement in disorders of the enteric nervous system(ENS) such as aganglionic megacolon. **Methods** To induce chemical ablation of the enteric plexus in rat to produce an aperistaltic narrow segment simulating to Hirschsprung's disease, the cationic surfactant BAC was applied to a 2 cm serosal surface of the rectum. CNE-NSCs were transplanted into the denervated segment of rectum. After 2, 4 and 8 weeks grafted cells were visualized in rectum tissue sections by fluorescent staining for neuronal and astrocytic markers. **Results** 60 rats arrived after chemical induce animal model. We separated into 2 groups ( $n = 30$  for each group). We can see the alive NSCs in the enteric wall (22/30) after being transplanted into the denervated gut after 2 weeks injection. 4 weeks later, NSCs could survive and could differentiate into neurons and glial cells in vivo. At the 8-week assessment, some transplanted NSCs exhibited immunophenotypes of neuronal and glial cell. Barium enema show us there are enteric function improvement after NSCs transplantation. **Conclusions** Grafted CNS-NSCs can survive and differentiation, And restore the denervated rectum of rat in vivo nerve function to a certain extent, which indicates that NSCs provide a promising cellular replacement candidate for treatment of aganglionosis and some other disorder of the enteric nervous system.

**【Key words】** Aganglionic; Neural stem cells; transplantation; Rat; Functional improvement

doi:10.3969/j.issn.1671-6353.2013.02.014

作者单位:天津医科大学研究生院(天津市,300070),通讯作者:詹江华, E-mail: zhanjianghua@yahoo.com, 本文为天津市卫生局重点资助项目,项目号 2010KR06

先天性巨结肠(Hirschsprung's disease, HD)是小儿外科常见疾病,发病率约 1/5 000,占消化道畸形的第 2 位<sup>[1]</sup>。其病因是由于胚胎期神经嵴细胞在消化道移行受阻,导致结肠壁肌间和黏膜下神经

节细胞缺如。手术是唯一有效的治疗手段<sup>[2-3]</sup>。神经干细胞是一类具有自我更新能力和多向分化潜能的细胞,能分化成为神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞等众多神经细胞。基于神经干细胞的自我更新及多向分化潜能的特性,神经干细胞移植为神经性疾病的治疗带来了希望。本研究探讨脐血间充质提纯的神经干细胞移植治疗大鼠无神经节细胞症的可行性,为 HD 的治疗提供新的思路。

## 材料与amp;方法

### 一、实验材料和试剂

苯扎氯铵(美国 Sigma 公司),单克隆大鼠抗鼠 Nestin IgG 抗体(美国 BD 公司),单克隆大鼠抗鼠 S-100 IgG 抗体(美国 Gibco 公司),DMEM/F12 培养基(美国 Gibco 公司),一抗稀释液、二抗试剂盒、DAB 显色液试剂盒、山羊封闭血清(北京中杉金桥生物科技有限公司),培养板、培养瓶(美国 COSTAR 公司)。耗材:离心管,移液管,培养皿,解剖器械(眼科剪,眼科镊,组织剪,组织镊等),尼龙筛网等。

### 二、实验动物选择、造模方法及神经干细胞

取清洁级 8 周龄 SD 大鼠 60 只。雌雄不拘,体重(200 ± 15) g,由天津医科大学实验动物中心提供,室温单笼饲养。

1. 动物造模方法:使用 0.5% 苯扎氯铵浸湿的脱脂棉贴肠壁包绕标记段结肠 1 周 20 min,术中间断滴加 0.5% 苯扎氯铵保持脱脂棉湿润,湿润范围 2 cm。造模 4 周后,观察肠管狭窄,镜下检查证实处理肠段神经节细胞消失,证明造模成功。(图 1)。

2. 试验动物分组:将造模成功的动物随机分为两组,每组 30 只;模型组采用脐血间充质神经干细胞 150 μL(浓度为 10<sup>7</sup>/mL)分 3 处注入大鼠造模段的结肠肠壁;对照组采用生理盐水注射造模成功的肠壁内。

3. 神经干细胞提纯方法:应用脐血间充质干细胞分离纯化神经干细胞,提取后的间充质细胞使用全反式视黄酸对神经干细胞分化,随着全反式视黄酸浓度(0.01, 0.1, 1.0, 10.0 μmol/L)升高,神经元样细胞分化率逐渐增加( $F = 358.59, P = 0.000$ )。全反式视黄酸浓度为 1.0, 10.0 μmol/L 时神经元样细胞分化率基本相似[(34.27 ± 0.81)%, (35.27 ± 0.32)%,  $P = 0.163$ ]。

4. 神经干细胞鉴定:脐血间充质干细胞经过全

反式视黄酸诱导 0、2、3、4 周取样,经过提纯后检测神经干细胞的含量,其诱导 4 周时,神经干细胞的含量达最高,采用实时定量 PCR 进行神经干细胞定量分析(图 2)。

5. 神经干细胞注射方法:术前 SD 大鼠常规禁食 24 h,以便排空肠道。以 10% 水合氯醛(0.2 mL/100 g)腹腔注射麻醉。根据标记手术线辨认去除神经节细胞的肠段,用 1 mL 注射器取神经干细胞悬液 150 μL 分 3 处注入肠壁,缓慢推注,注射后针头停留 3 min 防止细胞外溢。对照组用 150 μL 生理盐水代替神经干细胞,其余操作方法、给药剂量同模型组。术后禁食、禁水 8 h,然后正常饮食,分笼饲养观察。

6. 注射后神经干细胞鉴定:分别于注射神经干细胞后 2、4、8 周进行观察和鉴定。①免疫荧光显微镜下观察神经干细胞的存活情况;分别于每个时间段处死大鼠,做石蜡包埋标本,切片观察神经干细胞;标本用 40 g/L 甲醛溶液固定,常规脱水透明石蜡包埋,切片厚为 10 μm,常规 HE 染色。②免疫组织化学检测 NSE 和 s-100 的表达。③钡灌肠观测注射神经干细胞前后肠道的影像学变化。

## 结果

### 一、动物存活情况

60 只大鼠造模成功。造模后试验组和对照组分别注射提纯的神经干细胞和生理盐水,无论是试验组还是对照组注射后试验动物均存活。

### 二、造模成功的标志

注射 0.5% 苯扎氯铵 4 周后,处死大鼠,观察湿敷肠管形态呈现痉挛状态,取材,镜下检测肠壁内缺乏神经节细胞,证明造模成功。本组 60 只大鼠,注射神经干细胞和生理盐水过程中,观察肠管形态,均显示造模成功。

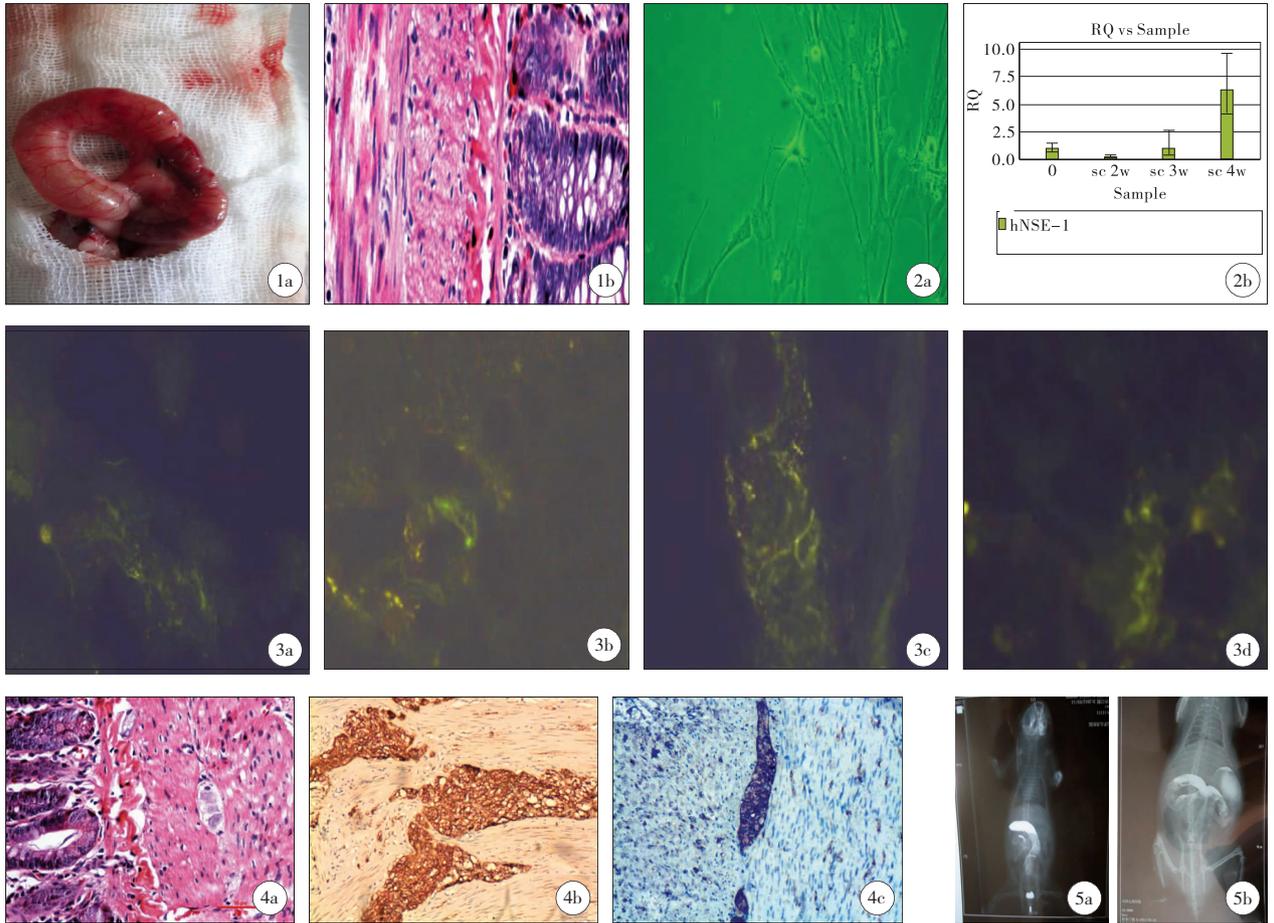
### 三、移植神经干细胞不同时间取材检测神经干细胞存活和分化情况

移植神经干细胞 2 周后取材,神经干细胞存活,部分分化;4 周后取材神经干细胞已经分化成为神经节细胞和神经胶质细胞;8 周后取材,神经节细胞分化情况与 4 周相同(图 3)。移植 4 周后,取移植后的肠壁组织进行免疫组化检查,观察 NSE 和 S-100 呈现阳性表达(图 4)。

### 四、钡灌肠结果

造模成功后,我们应用钡灌肠检查其肠道功能

表达情况,见肠管狭窄;而注射神经干细胞以后,其 肠道功能明显改善(图 5)。



**图 1** 大鼠造模结果。a,4 周后,解剖大鼠见肠壁痉挛。b,镜下可见神经节细胞缺如; **图 2** 脐带血间充质干细胞提纯后检测情况。a,诱导培养基加入后,细胞胞体收缩,伸出类似神经细胞轴突或树突状的突起,细胞变为多角形。b,为诱导 4 周后表达量明显增高; **图 3** 注射神经干细胞第 1 天、2 周、4 周、8 周时;肠壁内神经干细胞存活情况。a,注射后第 1 天,见带免疫荧光的神经干细胞定植到肠壁内; b,2 周后见神经干细胞有分化,呈现三角形; c,4 周时,神经干细胞成簇分布; d,8 周时,神经干细胞呈现椭圆形和多边形改变; **图 4** 移植神经干细胞 4 周时肠壁内神经节细胞分化情况。a,HE 染色可见神经节细胞。b,免疫组化检测神经节细胞对 NSE 呈阳性反应(SP 法,10×20)。c,神经节细胞对 S-100 呈阳性反应( SP 法,10×20); **图 5** 钡灌肠检查情况。a,钡灌肠显示肠管狭窄及近端扩张;b,注射神经干细胞 4 周时钡灌肠检查显示肠管扩张情况改善。

**Figure 1** The result of chemical medicine (BAC) induce animal model. A,aperistaltic narrow segment colon after 4 weeks injection with BAC. B,No neuron cells in the enteric wall under microscope in animal model; **Figure 2** The results of Mesenchymal stem cell ( MSC) purified. A,After add induced culture solution, the body of MSC shrink, extend dendrite and axon. The MSC changed polygon. B,The expression quality of MSC increased after 4 weeks inducing treatment; **Figure 3** The alive situation of MSC injection into enteric wall after 1 day, 2 weeks, 4 weeks, 8 weeks. 1 day later, MSC colonization in the colon wall using immunofluorescent staining. 2 weeks later, differentiation of MSC in the colon wall and showed triangle cell type. 4 weeks later, MSC colonization distribution in the colon wall. 8 weeks later, NSCs present oval and polygon; **Figure 4** The situation of NSCs transplant into enteric wall, it showed good differentiation neurons. A,neurons in the enteric wall using HE staining.B,NSE positive in the neurons using immunochemical staining.(SP×20).C,S-100 positive in the neurons using immunochemical staining. (SP×20); **Figure 5** The results of Barium enema in the animal model. A,Barium enema showed the colon stricture and proximity enlarge colon in the animal model. B,Barium enema showed the improving distend colon after injection MSC 4 weeks in animal model;

### 讨 论

肠道的运动由肠神经系统(enteric nervous system,ENS)控制,其解剖基础是肠壁具有神经元的神经丛。ENS 的所有神经元和神经胶质细胞起源于神

经嵴细胞,通过迷走神经从头到尾迁移入肠道发育形成。各种原因引起的神经嵴细胞迁移和分化异常,均会造成肠神经元解剖和功能异常,最终导致 HD。通过移植神经干细胞至神经元发育缺陷肠段,移植存活的神经干细胞在肠壁内迁移、分化、增殖,可以恢复病变肠段神经元的结构和功能,达到根治

HD 的目的,是一种理想的根治方法,具有潜在临床应用前景。有研究证实,神经干细胞可作为新的移植细胞来源治疗神经系统先天性和退化性疾病的供体细胞,以替代受损或缺失的细胞<sup>[4-5]</sup>;其具有广阔的应用前景,近年来成为研究的热点。

神经细胞损伤或缺失后的再生及神经功能重建是神经系统疾病治疗的难题,随着细胞组织工程学的兴起和干细胞研究的不断深入,为神经损伤、神经退行性变等神经系统疾病的治疗提供了一条有效的途径;即利用适当的技术方法将种子细胞在体外或体内诱导分化为神经细胞,在体内修复和(或)重建神经系统功能,达到根治的目的<sup>[6]</sup>。NSCs 是目前细胞移植中较为理想的一种供体细胞,国内外学者对 NSCs 体外分化和在体移植进行了大量研究,结果表明 NSCs 移植到宿主大脑后具有神经重建功能,包括较强的存活和迁移能力以及有较强的向神经方向分化的潜能<sup>[7]</sup>。我们的试验证实脐血间充质干细胞提纯后可以在体内转化为神经干细胞,并且对于已经没有神经节细胞的肠壁内存活并转化为有功能的神经节细胞,这些神经节细胞可以表达功能,通过钡灌肠检查证实其肠道功能可以改善。

移植细胞能否在宿主体内存活并在周围环境诱导下进行分化是细胞替代疗法的一个重要问题<sup>[8]</sup>。本研究揭示了 NSCs 在肠壁内微环境内可以分化以及替代肠神经系统的功能,为将来开展神经干细胞移植治疗肠无神经节细胞症提供了依据。CNS - NSCs 肠壁内移植后可在无神经节肠壁内存活,并能分化成神经元和少量星形胶质细胞。NSCs 所处的局部微环境,对于细胞是否存活和分化起重要作用。许多体内实验表明,将神经干细胞植入受损部位,局部微环境能够刺激其分化成为相应的子代细胞,并对损伤有修复和治疗作用。目前 NSCs 在体内特异性分化的信号网络和机制尚不清楚,需进一步研究。

尽管 NSCs 用于细胞替代治疗某些疾病和损伤方面取得了很大进展,但目前仍存在许多困难和问题,如移植细胞在局部的存活率较低,移植后表达神经标志的细胞是否真的具有神经细胞的功能以及移植治疗后远期效果如何等。在治疗肠动力异常疾病时,NSCs 移植后肠动力的恢复至关重要。我们的研

究中,钡灌肠等实验结果表明,NSCs 移植后,肠功能得到了一定恢复,证明了移植细胞能够存活并可分化为有功能的神经细胞。尽管我们的研究取得了预期的结果,干细胞移植仍面临诸多挑战和困惑,如何选择最适宜的干细胞来源、最恰当的移植时间、移植细胞数量、移植途径、细胞的最佳标记示踪方法,如何提高移植细胞的存活率以及移植后的远期效果等,都有待于进一步研究和解决。

## 参 考 文 献

- 1 Kenny SE, Tam PK, Garcia-Barcelo M, et al. Hirschsprung's disease [J]. *Semin in Pediatr Surg*, 2010, 19(3):194-200.
- 2 Kim HY, Oh JT. Stabilization period after 1-stage transanalendorectal pull-through operation for Hirschsprung disease [J]. *J Pediatr Surg*, 2009, 44(9):1799-1804.
- 3 Tannuri AC, Tannuri U, Romno RL. Transanal endorectal pull-through in children with Hirschsprung's disease-technical refinements and comparison of results with the Duhamel procedure [J]. *J Pediatr Surg*, 2009, 44(4):767-772.
- 4 Andres RH, Horie N, Slikker W, et al. Human neural stem cells enhance structural plasticity and axonal transport in the ischaemic brain [J]. *Brain*, 2011, 134(6):1777-1789.
- 5 Maciaczyk J, Singec I, Maciaczyk D, et al. Restricted spontaneous in vitro differentiation and region-specific migration of long-term expanded fetal human neural precursor cells after transplantation into the adult rat brain [J]. *Stem Cells Dev*, 2009, 18(7):1043-1058.
- 6 Wang D, Zhang JJ, Ma JJ, et al. Neural stem cell transplantation with Nogo-66 receptor gene silencing to treat severe traumatic brain injury [J]. *Neural Regen Res*, 2011, 6(10):725-731.
- 7 Xuan AG, Luo M, Ji WD, et al. Effects of engrafted neural stem cells in Alzheimer's disease rats [J]. *Neuroscience Lett*, 2009, 450:167-171.
- 8 Wang Y, Gang XK, Liu Q, et al. Transplantation of X-box-binding protein-1 gene-modified neural stem cells in the lateral ventricle of brain ischemia rats [J]. *Neural Regen Res*, 2011, 6(1):6-11.