



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103940985 A

(43) 申请公布日 2014. 07. 23

(21) 申请号 201410140961. 2

(22) 申请日 2014. 04. 10

(71) 申请人 首都医科大学

地址 100069 北京市丰台区右安门外西头条
10 号

(72) 发明人 段维明 张永鑫 杨春

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 宋焰琴

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 33/533 (2006. 01)

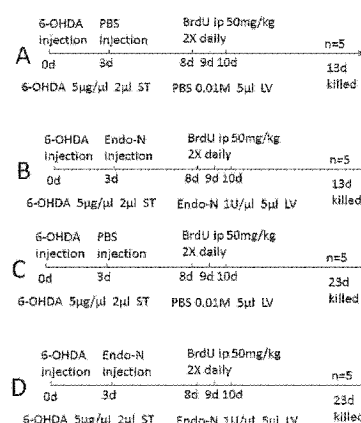
权利要求书1页 说明书13页 附图5页

(54) 发明名称

研究脑内源性神经干细胞迁移、增殖、分化的
方法

(57) 摘要

一种研究脑内源性神经干细胞迁移、增殖、分化的方法:1) 对动物脑切片进行 5 溴脱氧尿嘧啶和双肾上腺皮质激素、5 溴脱氧尿嘧啶和神经元核心抗原、5 溴脱氧尿嘧啶和胶质细胞源性神经营养因子双标免疫荧光染色,以及唾液酸化神经细胞粘附因子单标免疫荧光染色;2) 使用 GraphPad Prism6.0 软件统计分析数据并绘图,5 溴脱氧尿嘧啶阳性细胞为单因素多组数据使用 one-way 方差分析;所述动物脑切片经过以下处理:在脑右侧纹状体内立体定位注射 6-羟多巴溶液后,在侧脑室注射 PSA 特异性裂解酶原液,再腹腔注射 5 溴脱氧尿嘧啶溶液。本发明为研究脑内源性神经干细胞迁移影响提供了一种有效的研究方法。



1. 一种研究脑内源性神经干细胞迁移、增殖、分化的方法：

1) 对动物脑切片进行 5 溴脱氧尿嘧啶和双肾上腺皮质激素、5 溴脱氧尿嘧啶和神经元核心抗原、5 溴脱氧尿嘧啶和胶质细胞源性神经营养因子双标免疫荧光染色,以及唾液酸化神经细胞粘附因子单标免疫荧光染色；

2) 使用 GraphPad Prism6.0 软件统计分析数据并绘图,5 溴脱氧尿嘧啶阳性细胞为单因素多组数据使用 one-way 方差分析。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述动物脑切片经过以下处理：

在脑右侧纹状体内立体定位注射 6-羟多巴胺溶液后,在侧脑室注射 PSA 特异性裂解酶原液,再腹腔注射 5 溴脱氧尿嘧啶溶液。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述动物脑切片是动物左右脑切片。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述动物脑切片中包括有对照组脑切片。

5. 根据权利要求 1 或 4 所述的方法,其中,所述对照组脑切片是立体定位注射 6-羟多巴胺溶液后,在侧脑室注射磷酸缓冲盐溶液缓冲液,再腹腔注射 5 溴脱氧尿嘧啶溶液。

6. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述动物脑切片腹腔注射 5 溴脱氧尿嘧啶溶液是连续注射数天。

7. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述统计分析数据的结果用平均值 $\pm$ 标准误差表示,以 $p < 0.05$ 作为在统计学差异的界限。

研究脑内源性神经干细胞迁移、增殖、分化的方法

技术领域

[0001] 本发明属于基础医学领域,具体地本发明涉及一种研究脑内神经干细胞的迁移、增殖、分化等影响的方法。

背景技术

[0002] 帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是一种常见的以黑质纹状体通路病变为主要特征的中枢神经系统进行性退变性疾病。目前 PD 的发病机制尚未明确,是多种机制协同作用的结果。临床上的疗法都不能从根本上阻止 PD 病人黑质纹状体通路的进行性退变,近来越来越多的人认为启动脑内源性神经干细胞参与脑损伤修复很可能发展成为一个崭新的治疗脑损伤的策略。这一治疗策略尤其适用于修复慢性脑损伤疾病 - 帕金森病。

[0003] 目前经典药物治疗如口服左旋多巴 (L-dopa) 在初期可以减轻或缓解症状,但并不能延缓病程的进展,且长期使用有明显的副作用,即 L-dopa 诱导的运动障碍。外科手术如深部脑刺激下丘脑核也只能暂时减轻或缓解症状。这些疗法都不能从根本上阻止 PD 病人黑质纹状体通路的进行性退变,启动脑内源性神经干细胞参与 PD 脑损伤修复是一个崭新的治疗慢性脑损伤的策略。

[0004] 神经发生就是指神经元发育的整个过程,从一个前体细胞分裂开始,一直到新的神经元成熟、整合并具有功能的过程。神经前体细胞能自我更新,但多处于静止状态。当 CNS 受损或变性时,细胞微环境发生改变,NSCs 被激活,发生增殖、迁移、分化、整合,促进神经元再生及损伤部位脑组织结构和功能的恢复。成年脑有两个神经生发区,在那里神经再生比较活跃:一个是侧脑室旁边的脑室管膜下区 (SVZ);一个是海马的颗粒细胞下区 (SGZ)。这两个部位神经干细胞所产生的未成熟的神经细胞 (Neuroblast) 有各自的传统迁移通路,SVZ 所产生的未成熟神经细胞形成细胞簇,沿着嘴侧迁移流 (RMS) 迁移到嗅球、分化成中间神经元;SGZ 所产生的未成熟神经细胞则迁移到海马齿状回的颗粒细胞层,分化成中间神经元加入到神经回路中。揭示这些细胞迁移的分子机制和规律将会给引导这些细胞向脑损伤区迁移提供重要的理论依据。大量研究发现这两种细胞的共同特点是细胞表面均表达很高水平的唾液酸化神经细胞粘附因子。当这些细胞到达目的地、分化成成熟中间神经元后,细胞表面的 PSA 表达就会消失,提示 PSA-NCAM 在未成熟神经细胞定向迁移中起重要的作用。有实验表明如果将 Endo-N 注射到侧脑室,传统迁移通路 RMS 就会遭到破坏,SVZ 所产生的未成熟神经细胞则向其他脑组织包括纹状体异位迁移明显增多。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种研究脑内源性神经干细胞迁移、增殖、分化的方法,为研究脑内源性神经干细胞迁移、增殖、分化等影响提供一种有效的方法。

[0006] 为实现上述目的,本发明提供的研究脑内源性神经干细胞迁移、增殖、分化的方法:

[0007] 1) 对动物脑切片进行 BrdU (5 溴脱氧尿嘧啶) 和 DCX (双肾上腺皮质激素)、BrdU

和 NeuN (神经元核心抗原)、BrdU 和 GFAP (胶质细胞源性神经营养因子) 双标免疫荧光染色, 以及 PSA-NCAM (唾液酸化神经细胞粘附因子) 单标免疫荧光染色;

[0008] 2) 使用 GraphPad Prism6.0 软件统计分析数据并绘图, BrdU 阳性细胞为单因素多组数据使用 one-way ANOVA 分析。

[0009] 所述的方法中, 动物脑切片经过以下处理: 在脑右侧纹状体内立体定位注射 6-OHDA (6-羟多巴胺) 溶液后, 在侧脑室注射 Endo-N (PSA 特异性裂解酶) 原液, 再腹腔注射 BrdU 溶液。

[0010] 所述的方法中, 动物脑切片是指动物左右脑切片。

[0011] 所述的方法中, 所述动物脑切片中包括有对照组脑切片。

[0012] 所述的方法中, 所述对照组脑切片是立体定位注射 6-OHDA 溶液后, 在侧脑室注射 PBS 缓冲液, 再腹腔注射 BrdU 溶液。

[0013] 所述的方法中, 所述动物脑切片腹腔注射 BrdU 溶液是连续注射数天。

[0014] 所述的方法中, 所述统计分析数据的结果用平均值 $\pm$ 标准误差 (Mean $\pm$ SEM) 表示, 以 $p < 0.05$ 作为在统计学差异的界限。

[0015] 本发明的方法可以用于研究神经干细胞的迁移特点, 分析 6-OHDA 损伤的纹状体中的迁移来的细胞的分化能力, 为进一步深入研究如何启动脑内源性神经干细胞迁移、增殖、分化等影响奠定了重要的工作基础。

附图说明

[0016] 图 1 是本发明一个实施例的方法研究路线。

[0017] 图 2 是本发明一个实施例对 C57BL/6J 小鼠侧脑室注射 Endo-N 去除 PSA 后, PSA-NCAM 的免疫荧光染色结果; 其中: 图 a 为对照组, 图 b 为实验组, 切片为矢状位切片, 图中虚线表示的是 RMS。LV, 侧脑室; OB, 嗅球; RMS, 嘴侧迁移流。比例尺, 250 μ M。

[0018] 图 3 是本发明一个实施例 6-OHDA 注射 13 天后 BrdU+ 细胞的免疫荧光染色结果; 其中: a 为对照组左脑纹状体矢状位切片, b 为对照组右脑纹状体矢状位切片、d 为实验组左脑纹状体矢状位切片、e 为实验组右脑纹状体矢状位切片。图 c 是图 b 的虚线框的放大的矢状位切片共聚焦图, 图 f 是图 e 的虚线框的放大, 图 g 是单因素多组数据的方差分析结果图, 对照小鼠 $n=5$, 实验组小鼠 $n=5$, $*p < 0.05$ 有统计学意义。

[0019] 图 4 是本发明一个实施例的 6-OHDA 注射 13 天后 BrdU/DCX+ 双标细胞的免疫荧光染色结果; 其中: a 为对照组左脑纹状体矢状位切片, b 为对照组右脑纹状体矢状位切片、d 为实验组左脑纹状体矢状位切片、e 为实验组右脑纹状体矢状位切片。小鼠脑矢状位切片纹状体共聚焦图图 f 为放大图 c 的虚线框的激光共聚焦正交投影图, 显示的双标细胞为 BrdU/DCX+ 细胞; 图 c 比例尺 500 μ M, 图 e 比例尺 25 μ M。

[0020] 图 5 是本发明的一个实施例的 6-OHDA 注射 23 天后 BrdU+ 细胞的免疫荧光染色结果矢状位切片共聚焦图。其中: a 为对照组左脑纹状体矢状位切片, b 为对照组右脑纹状体矢状位切片、d 为实验组左脑纹状体矢状位切片、e 为实验组右脑纹状体矢状位切片。图 c 是图 b 的虚线框的放大, 图 f 是图 e 的虚线框的放大。图 g 是单因素多组数据的方差分析结果图。(对照小鼠 $n=5$, 实验组小鼠 $n=5$, $*p < 0.05$ $\#p < 0.05$ 有统计学意义)

[0021] 图 6 是本发明的一个实施例的 6-OHDA 注射 23 天后 BrdU/GFAP+ 双标细胞的免疫

荧光染色结果。其中:a 为对照组左脑纹状体矢状位切片,b 为对照组右脑纹状体矢状位切片、d 为实验组左脑纹状体矢状位切片、e 为实验组右脑纹状体矢状位切片。小鼠脑矢状位切片纹状体共聚焦图图 f 为放大图 c 的虚线框的激光共聚焦正交投影图,显示的双标细胞为 BrdU/GFAP+ 细胞,图 c 比例尺 100 μ M,图 e 比例尺 25 μ M。

[0022] 图 7 是本发明的一个实施例的 6-OHDA 注射 23 天后 BrdU/NeuN+ 双标细胞的免疫荧光染色结果。其中:a 为对照组左脑纹状体矢状位切片,b 为对照组右脑纹状体矢状位切片、d 为实验组左脑纹状体矢状位切片、e 为实验组右脑纹状体矢状位切片。小鼠脑矢状位切片纹状体共聚焦图图 f 为放大图 c 的虚线框的激光共聚焦正交投影图,显示的双标细胞为 BrdU/NeuN+ 细胞,图 c 比例尺 100 μ M,图 e 比例尺 25 μ M。

具体实施方式

[0023] 在此对本发明说明书中涉及的若干英文缩略语作一说明,后文中提到的英文缩略语均按此说明理解:

- [0024] PD (Parkinson's disease) 帕金森病;
- [0025] AD (Alzheimer disease) 阿尔兹海默病;
- [0026] DA (dopamine) 多巴胺;
- [0027] L-DOPA (levodopa) 左旋多巴;
- [0028] PB (phosphate buffer) 磷酸缓冲液;
- [0029] PBS (phosphate buffered saline) 磷酸缓冲盐溶液;
- [0030] SN (Substantia nigra) 黑质;
- [0031] TH (tyrosine hydroxylase) 酪氨酸羟化酶;
- [0032] 6-OHDA (6-Hydroxydopamine) 6-羟多巴;
- [0033] Endo-N (endoneuraminidase) PSA 特异性裂解酶;
- [0034] EGF (epidermal growth factor) 表皮生长因子;
- [0035] BDNF (brain derived neurotrophin factor) 脑源性神经营养因子;
- [0036] GFAP (glial fibrillary acidic protein) 胶质源纤维酸性蛋白;
- [0037] SGZ (subgranular zone) 颗粒下层;
- [0038] SVZ (subventricular zone) 室管膜下区;
- [0039] RMS (rostral migratorystream) 嘴侧迁移流;
- [0040] NSCs (neural stem cells) 神经干细胞;
- [0041] NPCs (neural precursor cells) 神经前体细胞;
- [0042] DW (distilled water) 蒸馏水;
- [0043] NeuN (neuron special protein) 神经元核心抗原;
- [0044] DCX (doublecortin) 双肾上腺皮质激素;
- [0045] BrdU (5-bromo-2,-deoxyuridine) 5 溴脱氧尿嘧啶;
- [0046] NGS (normal goat serum) 正常山羊血清;
- [0047] ANOVA (analysis of Variance) 方差分析;
- [0048] PFA (paraformaldehyde) 多聚甲醛;
- [0049] PSA-NCAM (Polysialic acid-neural cell adhesion molecular) 唾液酸化神经

细胞粘附因子；

[0050] GDNF (glial cell derived neurotrophic factor) 胶质细胞源性神经营养因子。

[0051] 本发明的一个实施例是通过纹状体单侧注射 6-OHDA 来制备慢性脑损伤模型。由于纹状体是黑质多巴胺能神经元的主要靶区,注射于其中的 6-OHDA 可被前者的末梢吸收,通过逆轴突转运至黑质内的神经元胞体,在经单胺氧化酶转化成自由基,可选择性地破坏这些神经元而出现类似 PD 的症状。由于 6-OHDA 必须通过逆轴突转运才能到达中脑黑质,因此多巴胺能神经元的死亡是一种间接的、渐进的过程。跟黑质直接毁损法相比,这种损伤过程更接近于人类 PD 发病的临床特点,在手术操作上纹状体较黑质更易于解剖定位。本发明更感兴趣的是在局部损伤的纹状体靠近 svz 区,将 Endo-N 原液注射到侧脑室去除 PSA 后,细胞间的同嗜性黏附作用增加,因此,本发明观察了它对传统迁移通路 RMS 的作用情况。DCX 主要表达于迁移中的神经干细胞胞体和前导突起上,常用于标记迁移中神经干细胞。因此,同时观察了 BrdU 和 DCX 双标细胞的情况,分析纹状体中的 BrdU 阳性细胞数量。也观察了迁移而来的神经干细胞的分化能力。这将为进一步深入研究如何启动脑内源性神经干细胞迁移、增殖、分化等影响奠定部分重要的工作基础。

[0052] 本发明的目的：

[0053] (1) 用 Endo-N 去除 PSA 能否增加 SVZ 区神经干细胞异位迁移到 6-OHDA 损伤的纹状体；

[0054] (2) 研究异位迁移的神经干细胞的分化能力,进而为研究帕金森病的病理提供部分基础。

[0055] 本发明采用的脑组织冰冻切片,可以使用以下方法制得：

[0056] (1) 选取 C57BL/6J 实验用雄性小鼠分为四组,每组五只动物,全部在脑右侧纹状体内,立体定位注射 2μ 16-OHDA 溶液。

[0057] (2) 6-OHDA 立体定位注射 3 天后,实验组小鼠侧脑室注射 5μ l Endo-N 原液,对照组注射相同体积的 PBS 缓冲液。

[0058] (3) 在 6-OHDA 注射后,第 8 天开始,每天两次,分别对 4 组共 20 只动物按 50mg/kg 腹腔注射 BrdU 溶液,连续注射 3 天。

[0059] (4) 分别在 6-OHDA 注射后第 13 天、第 23 天灌杀取材,固定脱水包埋。用冰冻切片机对实验小鼠全脑进行矢状切片,切片厚度为 35μ m。

[0060] (5) 对四组全部动物左右脑切片,进行 BrdU 和 DCX、BrdU 和 NeuN、BrdU 和 GFAP 双标免疫荧光染色,以及 PSA-NCAM 单标免疫荧光染色。

[0061] (6) 使用 GraphPad Prism6.0 软件统计分析数据并绘图,BrdU 阳性细胞为单因素多组数据使用 one-way ANOVA 分析。

[0062] 制得的脑组织冰冻切片中：

[0063] 1) 实验组动物迁移流 RMS 中,有少量 PSA-NCAM 阳性细胞,对照组动物迁移流 RMS 中,有大量的 PSA-NCAM 阳性细胞。

[0064] 2) 实验组动物纹状体中有大量 BrdU 阳性细胞,存在 BrdU 和 DCX、BrdU 和 NeuN、BrdU 和 GFAP 双标细胞。对照组动物纹状体有少量 BrdU 阳性细胞,未发现 BrdU 和 DCX、BrdU 和 NeuN、BrdU 和 GFAP 双标细胞。

[0065] 由此可以得知：

[0066] 1)用 Endo-N 去除 PSA 后,有大量神经干细胞异位迁移到 6-OHDA 损伤的纹状体,这些神经干细胞可能来自于 SVZ 区。

[0067] 2)迁移来的神经干细胞具有分化能力,可以分化为神经元和胶质细胞。

[0068] 以下举一个具体实施例作详细说明。

[0069] 一、实验材料

[0070] 1、实验动物

[0071] 本实施例所用的动物为 C57BL/6J 小鼠,雄性,8-10 周,体重 22-26g,由首都医科大学动物部提供。每天十二小时光照与十二小时黑暗交替环境,摄食饮水自由,饲养条件为 SPF 级。

[0072] 二、实验方法

[0073] 1、小鼠脑立体定位注射与 BrdU 的腹腔注射标记

[0074] 1) 6-OHDA 的立体定位注射

[0075] 将实验小鼠分为四组(A、B、C、D),每组五只动物(见图 1),全部在大脑右侧纹状体内,立体定位注射 6-OHDA 溶液(5mg/ml 6-OHDA,0.2% 的维 C,0.9%NaCl)。

[0076] 2) 步骤如下:

[0077] (1) 小鼠称重,用 Equitisin 按 3ml/kg 体重,腹腔注射麻醉,将麻醉好的小鼠腹面向下,在下方垫一块泡沫,并固定于脑立体定位仪上。

[0078] (2) 头部备皮,常规碘酒酒精消毒后,取正中矢状切口,切开皮肤及皮下组织,钝性分离,直至暴露颅骨,根据小鼠脑立体定位图谱确定纹状体注射位点坐标。选用的注射位点坐标为,前卤前(AP)+0.5mm,正中中线右旁开(ML)+1.9mm,硬脑膜下(DV)-2.65mm,门齿棒低于耳间线(TB)-1mm。

[0079] (3) 在手术显微镜下,立体定位上述注射位点,用牙科钻余在相应的颅骨处,小心钻开一小孔,不要用力过大,避免损伤大脑实质,用小镊子轻轻挑开硬脑膜。

[0080] (4) 用 Hamilton 微量注射器,缓缓注入 2 μ l 6-OHDA(5 μ g/ μ l) 溶液(图 1),每注射 1 μ l 留针 1min,注射完毕后留针十分钟,防止液体溢出,最后慢慢退出 Hamilton 微量注射器。

[0081] (5) 用碘酒和酒精擦拭伤口消毒抗菌后,缝合皮肤,将动物放置于温暖环境中,苏醒后给予食物和水。

[0082] 2、Endo-N 原液的立体定位注射

[0083] 6-OHDA 立体定位注射 3 天后,实验组(B、D) 小鼠侧脑室注射 5 μ l Endo-N 原液(1U/ μ l),对照组(A、C) 注射相同体积的 0.01MPBS 缓冲液(见图 1)。步骤如下:

[0084] (1) 小鼠称重,用 Equitisin 按 3ml/kg 体重,腹腔注射麻醉,将麻醉好的小鼠腹面向下,在下方垫一块泡沫,并固定于脑立体定位仪上。

[0085] (2) 小鼠头部酒精消毒后,取正中矢状切口,切开皮肤及皮下组织,钝性分离,直至暴露颅骨,根据小鼠脑立体定位图谱确定侧脑室注射位点坐标。选用的注射位点坐标为,前卤(AP)+0mm,正中中线右旁开(ML)+0.9mm,硬脑膜下(DV)-2.3mm,门齿棒低于耳间线(TB)-1mm。

[0086] (3) 在手术显微镜下,立体定位上述注射位点,用牙科钻余在相应的颅骨处,小心钻开一小孔,不要用力过大,避免损伤大脑实质,用小镊子轻轻挑开硬脑膜。

[0087] (4) 用 Hamilton 微量注射器, 缓缓注入 $5\mu\text{l}$ Endo-N 原液 ($1\text{U}/\mu\text{l}$) 或 0.01M 的 PBS (见图 1), 每注射 $1\mu\text{l}$ 留针 3min, 注射完毕后留针十分钟, 防止溢出, 最后慢慢退出微量注射器。

[0088] (5) 用碘酒和酒精擦拭伤口消毒抗菌后, 缝合皮肤, 将动物放置于温暖环境中, 苏醒后给予食物和水。

[0089] 3、BrdU 的腹腔注射标记

[0090] 在 6-OHDA 注射后, 第 8 天开始, 每天两次, 间隔 4 小时, 分别对 4 组共 20 只动物按 $50\text{mg}/\text{kg}$ 腹腔注射 BrdU 溶液, 连续注射 3 天(见图 1)。具体步骤:

[0091] (1) 用 1ml 的注射器, 配合 4 号针头进行小鼠腹腔注射

[0092] (2) 注射时右手持注射器, 左手的小指和无名指抓住小鼠的尾巴, 另外三个手指抓住小鼠的颈部, 使小鼠的头部向下。这样腹腔中的器官就会自然倒向胸部, 防止注射器刺入时损伤大肠、小肠等器官。进针的动作要轻柔, 防止刺伤腹部器官。尤其是对于体重较小的小鼠, 腹腔注射时针头可以在腹部皮下穿行一小段距离, 最好是从腹部一侧进针, 穿过腹中线后在腹部的另一侧进入腹腔, 注射完药物后, 缓缓拔出针头, 并轻微旋转针头, 防止漏液。

[0093] 4、取材与固定

[0094] A、B 组在 6-OHDA 注射后第 13 天灌杀取材, C、D 组在 6-OHDA 注射后第 23 天灌杀取材(图 1)。

[0095] (1) 调试清洗灌注泵: 用 0.01M PBS 冲洗管道, 排净管道中的气泡, 待管道中充满 PBS 时, 关机备用。

[0096] (2) 小鼠称重, 用 Equitisin 按 $3\text{ml}/\text{kg}$ 体重, 腹腔注射麻醉。

[0097] (3) 将小鼠腹面向上妥善固定于蜡盘上, 用止血钳提起剑突处皮肤, 剪开皮肤及皮下组织, 继而向两侧剪开, 直至腋中线, 充分暴露胸腹腔交界处及膈肌。再从剑突处剪开膈肌, 向两侧分离, 充分暴露胸腔和心脏。注意向上轻轻挑着剪, 防止损伤内脏引起大量出血;

[0098] (4) 游离心脏, 分离心包膜, 将灌注针插入左心室, 用止血钳固定。剪开右心耳, 打开灌注泵。灌注 0.01M PBS。尽快暴露腹腔, 轻轻按摩腹腔内肝脏, 以帮助血液的快速排空, 待动物肝脏明显发白时, 关闭灌注泵, 将灌注管移至 4% 的多聚甲醛溶液中, 盛多聚甲醛溶液的烧杯事先放入冰块中。打开灌注泵, 灌注多聚甲醛, 前 $1/3$ 量快速灌注, 后 $2/3$ 量缓慢灌注, 动物四肢抽动僵直后, 继续灌注多聚甲醛 100ml 左右。

[0099] (5) 灌注完毕后, 用咬骨钳剥离颅骨及硬脑膜, 去除小脑帘、大脑幕。放入 4% 的多聚甲醛溶液中继续固定, 4°C 保存 24 小时后取出脑组织, 放入 30% 的蔗糖溶液中 4°C 保存至标本沉底。

[0100] 5、小鼠脑组织冰冻切片

[0101] (1) 将脱水完成后的脑组织从 30% 的蔗糖溶液中取出, 用少量的 0.01M 的 PBS 冲洗, 用 OCT 包埋做好标记, 放入 -40°C 低温冰箱过夜。

[0102] (2) 冰冻切片机预冷, 安装固定刀片, 待温度稳定在 -20°C 时, 冻出冰台, 准备小毛笔一只, 备用。

[0103] (3) 取出包埋块, 置于冰冻切片机, 参考小鼠脑立体定位图谱, 按标记从左脑开始至右脑对全脑进行矢状切片, 切片厚度为 $35\mu\text{m}$ 。

[0104] (4)全脑连续切片,左右脑分别分成5个孔放置,这样每孔均为一套连续切片。在小鼠左脑切到皮质下1ml时留片,按顺序放到放置左脑切片的孔中。在小鼠左脑嗅球和第三脑室不见时,开始留右脑切片。并按顺序放到放置右脑切片的孔中。所有切片放入盛有防冻液的24孔板中,4℃保存。

[0105] 6、小鼠脑矢状切片免疫荧光化学染色,

[0106] 四组全部动物左右脑连续矢状位脑切片,进行了BrdU的免疫荧光染色。A组和B组(6-OHDA注射后第13天灌杀),同时还进行了PSA-NCAM免疫荧光染色、BrdU和DCX双标免疫荧光染色。C组和D组(6-OHDA注射后第23天灌杀)动物,右脑部分切片同时还进行了BrdU和NeuN双标免疫荧光染色,BrdU和GFAP双标免疫荧光染色。

[0107] 1) BrdU的免疫荧光染色

[0108] (1)切片在0.01M的PBS中漂洗3次,5min/次;

[0109] (2)切片放入2N-HCL中,37℃下,孵育40min

[0110] (3)用0.1M Borate buffer漂洗3次,5min/次;

[0111] (4)在0.01M的PBS中漂洗3次,10min/次;

[0112] (5)10%的NGS溶液(1%BSA+0.25%TritonX-100)封闭。孵育1h,RT;

[0113] (6)5%的NGS溶液(1%BSA+0.25%TritonX-100)稀释抗体,孵育室温过夜。比例为大鼠抗BrdU单克隆抗体1:300;

[0114] (7)在0.01M的PBS中漂洗3次,10min/次

[0115] (8)二抗5%的NGS溶液(1%BSA+0.25%TritonX-100)稀释,孵育室温1h。比例为CyTM3-conjugated-山羊抗大鼠1:200;

[0116] (9)在0.01M的PBS中漂洗3次,10min/次

[0117] (10)将切片裱到载玻片上晾干,滴一滴荧光封片剂(Fluorescent Mounting Medium)于组织切片上,盖上盖玻片,让切片接触封片液,尽量避免气泡。

[0118] (11)显微镜下观察,共聚焦拍照,应注意荧光物质均易发生淬灭,染色后的样品宜避光保存。

[0119] 2) BrdU和DCX双标免疫荧光染色

[0120] (1)切片在0.01M的PBS中漂洗3次,5min/次;

[0121] (2)切片放入2N-HCL中,37℃下,孵育40min;

[0122] (3)用0.1M Borate buffer漂洗3次,5min/次;

[0123] (4)在0.01M的PBS中漂洗3次,10min/次;

[0124] (5)10%的NGS溶液(1%BSA+0.25%TritonX-100)封闭。孵育1h,RT;

[0125] (6)5%的NGS溶液(1%BSA+0.25%TritonX-100)稀释抗体,孵育室温过夜。比例为大鼠抗BrdU单克隆抗体1:300;兔抗Doublecortin (DCX)1:500;

[0126] (7)在0.01M的PBS中漂洗3次,10min/次;

[0127] (8)二抗5%的NGS溶液(1%BSA+0.25%TritonX-100)稀释,孵育室温1h。比例为Alexa Fluor488-山羊抗兔1:200;CyTM3-conjugated-山羊抗大鼠1:200;

[0128] (9)在0.01M的PBS中漂洗3次,10min/次;

[0129] (10)将切片裱到载玻片上晾干,滴一滴荧光封片剂(Fluorescent Mounting Medium)于组织切片上,盖上盖玻片,让切片接触封片液,尽量避免气泡;

[0130] (11)显微镜下观察,共聚焦拍照;应注意荧光物质均易发生淬灭,染色后的样品宜避光保存。

[0131] 3) PSA-NCAM 免疫荧光染色。

[0132] (1)切片在 0.01M 的 PBS 中漂洗 3 次,5min/次;

[0133] (2) 10% 的 NGS 溶液(1%BSA+0.25%TritonX-100)封闭。孵育 1h, RT;

[0134] (3) 5% 的 NGS 溶液(1%BSA+0.25%TritonX-100)稀释抗体,孵育室温过夜。比例为小鼠抗 PSA-NCAM 单克隆抗体 1:350;

[0135] (4)在 0.01M 的 PBS 中漂洗 3 次,10min/次;

[0136] (5)二抗 5% 的 NGS 溶液(1%BSA+0.25%TritonX-100)稀释,孵育室温 1h。比例为 DyLightTM488- 山羊抗小鼠 1:200;

[0137] (6)在 0.01M 的 PBS 中漂洗 3 次,10min/次;

[0138] (7)将切片裱到载玻片上晾干,滴一滴荧光封片剂(Fluorescent Mounting Medium)于组织切片上,盖上盖玻片,让切片接触封片液,尽量避免气泡;

[0139] (8)显微镜下观察激光,共聚焦拍照,应注意:荧光物质均易发生淬灭,染色后的样品宜避光保存。

[0140] 4) BrdU 和 NeuN 双标免疫荧光染色

[0141] (1)切片在 0.01M 的 PBS 中漂洗 3 次,5min/次;

[0142] (2)切片放入 2N-HCL 中,37℃下,孵育 40min;

[0143] (3)用 0.1M Borate buffer 漂洗 3 次,5min/次;

[0144] (4)在 0.01M 的 PBS 中漂洗 3 次,10min/次;

[0145] (5) 10% 的 NGS 溶液(1%BSA+0.25%TritonX-100)封闭。孵育 1h, RT;

[0146] (6) 5% 的 NGS 溶液(1%BSA+0.25%TritonX-100)稀释抗体,孵育室温过夜。比例为小鼠抗 NeuN 单克隆抗体 1:300;大鼠抗 BrdU 单克隆抗体 1:300;

[0147] (7)在 0.01M 的 PBS 中漂洗 3 次,10min/次;

[0148] (8)二抗 5% 的 NGS 溶液(1%BSA+0.25%TritonX-100)稀释,孵育室温 1h。比例为 DyLightTM488- 山羊抗小鼠 1:200;CyTM3-conjugated- 山羊抗大鼠 1:200;

[0149] (9)在 0.01M 的 PBS 中漂洗 3 次,10min/次;

[0150] (10)将切片裱到载玻片上晾干,滴一滴荧光封片剂(Fluorescent Mounting Medium)于组织切片上,盖上盖玻片,让切片接触封片液,尽量避免气泡。

[0151] (11)显微镜下观察,激光共聚焦拍照,应注意:荧光物质均易发生淬灭,染色后的样品宜避光保存。

[0152] 5) BrdU 和 GFAP 双标免疫荧光染色

[0153] (1)切片在 0.01M 的 PBS 中漂洗 3 次,5min/次;

[0154] (2)切片放入 2N-HCL 中,37℃下,孵育 40min;

[0155] (3)用 0.1M Borate buffer 漂洗 3 次,5min/次;

[0156] (4)在 0.01M 的 PBS 中漂洗 3 次,10min/次

[0157] (5) 10% 的 NGS 溶液(1%BSA+0.25%TritonX-100)封闭。孵育 1h, RT;

[0158] (6) 5% 的 NGS 溶液(1%BSA+0.25%TritonX-100)稀释抗体,孵育室温过夜。比例为兔抗 GFAP 多克隆抗体 1:1000;大鼠抗 BrdU 单克隆抗体 1:300;

[0159] (7) 在 0.01M 的 PBS 中漂洗 3 次, 10min/ 次;

[0160] (8) 二抗 5% 的 NGS 溶液(1%BSA+0.25%TritonX-100) 稀释, 孵育 室温 1h。比例为 DyLightTM549- 山羊抗兔 1:200 ;CyTM3-conjugated- 山羊抗大鼠 1:200 ;

[0161] (9) 在 0.01M 的 PBS 中漂洗 3 次, 10min/ 次;

[0162] (10) 将切片裱到载玻片上晾干, 滴一滴荧光封片剂(Fluorescent Mounting Medium) 于组织切片上, 盖上盖玻片, 让切片接触封片液, 尽量避免气泡。

[0163] (11) 显微镜下观察激光, 共聚焦拍照, 应注意: 荧光物质均易发生淬灭, 染色后的样品宜避光保存。

[0164] 7、统计学处理

[0165] 数据使用 GraphPad Prism6.0 软件统计分析并绘图, 单因素多组数据使用 one-way ANOVA 分析, 其结果用平均值 $\pm$ 标准误 (Mean $\pm$ SEM) 表示。以 $p < 0.05$ 作为在统计学差异的界限。

[0166] 本实施例选取了 A 组和 B 组的小鼠右脑含 RMS 的脑矢状位切片进行了成神经细胞 (Neuroblasts) 的特有的蛋白 PSA-NCAM 的染色, 结果用 Endo-N 原液 (1U/ μ l) 处理, 在 6-OHDA 注射 13 天后灌杀的实验组小鼠 (B 组) 的 RMS 中基本不表达 PSA-NCAM。而用等量的 PBS 处理的对照组小鼠 (A 组) 的 RMS 中高表达 PSA-NCAM (见图 2)。

[0167] 在 Endo-N 原液 (1U/ μ l) 处理的实验组 B 组小鼠 (在 6-OHDA 注射 13 天后灌杀) 的纹状体中, 含中有大量的 BrdU 阳性细胞 (见图 3)

[0168] 本实施例选取了 A 组和 B 组的小鼠左右脑一整套连续矢状位切片进行了 BrdU 的免疫荧光染色, 用倒置荧光显微镜观察全部脑切片, 选取含有纹状体纹理和视神经束同时纯在的矢状切片, 进行 BrdU 阳性细胞的统计并进行统计学比较。分为以下各组: Control-left 组和 Contorl-right 组的 (原始数据见表 1) Endo-N-left 组和 Endo-N-right 组 (原始数据见表 2)。使用双光子激光共聚焦显微镜拍照, 可观察到 Control-left 组 (图 3a) BrdU 阳性细胞很少, Contorl-right 组 (图 3b) 和 Endo-N-left 组 (图 3d) BrdU 阳性细胞不多, Endo-N-right 组 (图 3e) 有大量 BrdU 阳性细胞。四组数据使用 one-way ANOVA 分析, 其结果用平均值 $\pm$ 标准误 (Mean $\pm$ SEM) 表示。以 $p < 0.05$ 作为在统计学差异的界限 (图 3g)。结果 Endo-N-right 组与其他三组均有统计学差异。

[0169] 在 Endo-N 原液 (1U/ μ l) 处理的实验组 B 组小鼠 (在 6-OHDA 注射 13 天后灌杀) 的纹状体中, 含有少量 BrdU/DCX+ 双标细胞 (见图 4)。本实施例选取了 A 组和 B 组的小鼠右脑一套连续矢状位切片进行了 BrdU/DCX+ 双标免疫荧光染色, 用双光子激光共聚焦显微镜拍照, 在 B 组的 Endo-N-right (试验组右脑纹状体矢状切片) 组, 发现少量 BrdU/DCX+ 双标细胞 (图 4c), 在 A 组的 Contorl-right (对照组右脑纹状体矢状切片) 组没有发现明显标记物。本实施命例选取了一个 BrdU/DCX+ 双标细胞进行了共聚焦正交投影 (图 4f)。

[0170] 在 Endo-N 原液 (1U/ μ l) 处理的实验组 D 组小鼠 (在 6-OHDA 注射 23 天后灌杀) 的纹状体中, 含有大量的 BrdU 阳性细胞 (见图 5)。本实施例选取了 C 组和 D 组的小鼠左右脑一整套连续矢状位切片进行了 BrdU 的免疫荧光染色, 用倒置荧光显微镜观察全部脑切片, 选取含有纹状体纹理和视神经束同时纯在的矢状切片, 进行 BrdU 阳性细胞的统计并进行统计学比较。分为以下各组: Control-left 组和 Contorl-right 组的 (原始数据见表 3) Endo-N-left 组和 Endo-N-right 组 (原始数据见表 4)。使用双光子激光共聚焦显微镜

拍照,可观察到 Control-left 组(图 5a) BrdU 阳性细胞很少, Contorl-right 组(图 5b) 和 Endo-N-left 组(图 5d) BrdU 阳性细胞不多, Endo-N-right 组(图 5e) 有大量 BrdU 阳性细胞。四组数据使用 one-wayANOVA 分析, 其结果用平均值 $\pm$ 标准误(Mean $\pm$ SEM)表示。以 $p<0.05$ 作为在统计学差异的界限(图 5g)。结果 Endo-N-right 组与其他三组均有统计学差异。Endo-N-left 组与 Control-left 组也有统计学差异。

[0171] 在 Endo-N 原液(1U/ μ l)处理的实验组 D 组小鼠(在 6-OHDA 注射 23 天后灌杀)的纹状体中,含有少量 BrdU/GFAP+ 双标细胞(见图 6)。本实施例选取了 C 组和 D 组的小鼠右脑一套连续矢状位切片进行了 BrdU/GFAP+ 双标免疫荧光染色,用双光子激光共聚焦显微镜拍照,在 D 组的 Endo-N-right (试验组右脑纹状体矢状切片)组,发现少量 BrdU/GFAP+ 双标细胞(图 6c),在 C 组的 Contorl-right (对照组右脑纹状体矢状切片)组没有发现明显标记物。本实施例选取了一个 BrdU/GFAP+ 双标细胞进行了共聚焦正交投影(图 6f)。

[0172] 在 Endo-N 原液(1U/ μ l)处理的实验组 D 组小鼠(在 6-OHDA 注射 23 天后灌杀)的纹状体中,含有少量 BrdU/NeuN+ 双标细胞(见图 7)。本实施例选取了 C 组和 D 组的小鼠右脑一套连续矢状位切片进行了 BrdU/NeuN+ 双标免疫荧光染色,用双光子激光共聚焦显微镜拍照,在 D 组的 Endo-N-right (试验组右脑纹状体矢状切片)组,发现少量 BrdU/NeuN+ 双标细胞(图 7c),在 C 组的 Contorl-right (对照组右脑纹状体矢状切片)组没有发现明显标记物。本实施例选取了一个 BrdU/NeuN+ 双标细胞进行了共聚焦正交投影(图 7f)。

[0173] 本发明的方法中,6-OHDA 是一种神经毒素可以选择性损伤多巴胺能神经元。当把 6-OHDA 直接注射黑质后,小鼠中脑黑质中的富含单胺氧化酶的 DA 能神经元会吸收它,并在单胺氧化酶作用下转化成神经毒素,如自由基和醌类对神经元造成损害。对于神经解剖学而言,黑质传出的纤维主要形成了黑质纹状体投射,也就是投射纤维自黑质发出后,沿黑质背内侧上行经下丘脑外侧、内囊内侧到达纹状体的尾状核头部和壳核头部。当 6-OHDA 注射至小鼠纹状体后,被多巴胺能神经元末梢通过轴突逆转运输至黑质部细胞体内,通过破坏多巴胺能神经元的抗氧化系统,使线粒体功能、膜的稳定性和 DNA 完整性受到了破坏,最终导致黑质纹状体多巴胺系统的功能减退而产生慢性脑损伤症状。因此,使用 6-OHDA 制备 PD 动物模型的靶点主要有黑质致密部、纹状体及内侧前脑束,最常用的方法为单侧注射 6-OHDA 至黑质或内侧前脑束,促使多巴胺能神经元在较短时间内快速死亡,这样制备了 PD 急性损伤模型,不易模拟早期 PD 病理表现。而慢性损伤模型大可以直接注射 6-OHDA 至纹状体内而导致黑质多巴胺能神经元的退行性病变,这种方法可以在一周到几周的时间内缓慢产生神经元变性,符合 PD 进行性退变的病程。本发明中就是采用脑立体定位小鼠单侧纹状体内注射 6-OHDA 制造慢性脑损伤。

[0174] 2010 年 Daniela Battista 和 Urs Rutishauser 使用 Endo-N (PSA 的特异性裂解酶)去除 PAS 后,他们发现传统迁移通路 RMS 遭到破坏,SVZ 所产生的未成熟神经细胞则向其他脑组织包括纹状体异位迁移明显增多。本发明在实验动物的纹状体中也观察到了相同的结果,同时还发现小鼠右侧 6-OHDA 损伤的纹状体中有大量的 BrdU 阳性细胞,与纹状体未损伤的同只实验小鼠的左侧比较,这一现象尤为明显。因此通过本发明的方法可以 考虑到, 6-OHDA 损伤造成的局部炎性对神经干细胞的吸引力迁移作用是明显的。使用 Endo-N 有效的去除 PAS 后,失去了粘附力的神经干细胞在 svz 区和 RMS 起始区的大量聚集为向纹状体迁移提供了前提。这一结果提示人们使用 Endo-N 去除 PSA 将成为一个有效的启动内源性

神经干细胞治疗慢性脑损伤的途径。

[0175] 大量研究发现脑室管膜下区的神经干细胞在迁移过程中表面均表达很高水平的 PSA-NCAM。当这些细胞到达目的地、分化成成熟中间神经元后,细胞表面的 PSA 表达就会消失,提示 PSA-NCAM 在未成熟神经细胞定向迁移中起重要的作用,同时也有人证明 PSA-NCAM 有抑制神经干细胞分化的作用。因此,本发明可以对迁移到纹状体的神经干细胞的分化能力进行研究。并在做了染色后得到了喜人的结果,这类迁移而来的神经干细胞已分化成为成熟的神经元和星形胶质细胞。神经胶质细胞是人类中枢神经系统中的一类神经细胞,它们并不像神经元那样传导电冲动,长期以来被认为只起支持作用。直到近些年来,人们才开始认识到神经胶质细胞(尤其是星形胶质细胞)在大脑中的调节作用并和大脑认知能力有关。本发明的研究结果进一步提示迁移的神经干细胞的分化能力,为进一步实验提供了细胞基础。

[0176] 表 1:对照组(A 组)的小鼠脑纹状体 BrdU⁺ 数量

[0177]

Control-left					Contorl-right				
L1	L2	L3	L4	L5	R1	R2	R3	R4	R5
(n=5)	(n=9)	(n=6)	(n=3)	(n=6)	(n=10)	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=7)
3	6	12	2	8	24	27	7	12	38
5	3	10	9	3	19	41	13	14	26
4	1	11	8	4	24	49	15	20	15
5	2	13		7	21	16	25	14	28
6	2	6		9	11	8	8	19	12
	1	8		5	13	20	9	13	9
	2				14				23
	3				16				
	3				24				
					8				

[0178] L1-L5、R1-R5 为动物例数 ;n 可用于统计的切片数

[0179] 表 2:实验组(B 组)的小鼠脑纹状体 BrdU⁺ 数量

[0180]

Endo-N-left					Endo-N-right				
L1	L2	L3	L4	L5	R1	R2	R3	R4	R5
(n=5)	(n=4)	(n=6)	(n=6)	(n=5)	(n=6)	(n=6)	(n=9)	(n=9)	(n=5)
27	29	36	34	20	33	36	68	77	203
21	45	32	33	18	18	44	801	33	370
14	33	47	32	20	25	39	362	55	46
11	22	37	25	17	20	38	468	34	51
32		23	27	21	24	32	303	36	37
		33	21		37	14	263	43	
							183	48	
							36	41	
							62	43	

[0181] L1-L5、R1-R5 为动物例数 ;n 可用于统计的切片数

[0182] 表 3 :对照组 (C 组) 的小鼠脑纹状体 BrdU⁺ 数量

[0183]

Control-left					Contorl-right				
L1	L2	L3	L4	L5	R1	R2	R3	R4	R5
(n=7)	(n=5)	(n=9)	(n=5)	(n=7)	(n=6)	(n=7)	(n=6)	(n=6)	(n=6)
6	5	9	9	2	14	20	18	4	5
12	4	11	6	3	20	22	27	12	7
7	4	14	4	2	13	23	19	3	15
6	8	8	2	2	22	21	18	6	3
4	5	12	3	3	20	20	22	9	14
6		11		2	29	16	25	5	4
9		9		2		26			
		12							
		16							

[0184] L1-L5、R1-R5 为动物例数 ;n 可用于统计的切片数

[0185] 表 4 :实验组 (D 组) 的小鼠脑纹状体 BrdU⁺ 数量

[0186]

Endo-N-left					Endo-N-right				
L1	L2	L3	L4	L5	R1	R2	R3	R4	R5
(n=5)	(n=4)	(n=6)	(n=6)	(n=5)	(n=6)	(n=6)	(n=9)	(n=9)	(n=5)
25	16	28	45	30	70	46	33	37	18
19	17	29	31	21	24	29	54	26	68
23	28	26	34	29	37	28	37	30	97
22	21	20	22	33	69	31	51	19	23
29		19	20	31	63	26	49	28	49
23		16	31	27	56		83	26	60
		17	20	23					67
		24	25	21					68
			26						57

[0187] L1-L5、R1-R5 为动物例数 ;n 可用于统计的切片数。

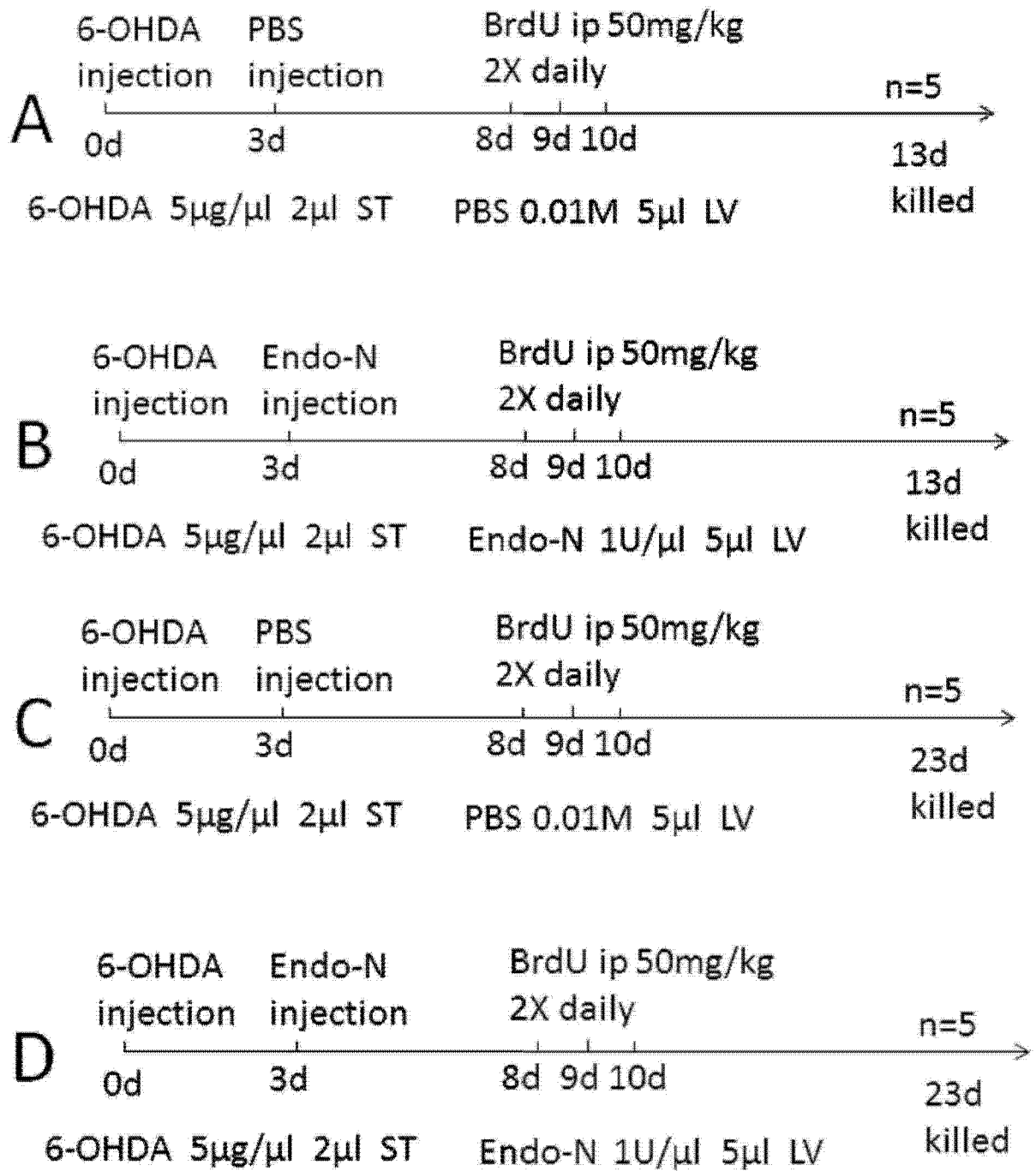


图 1

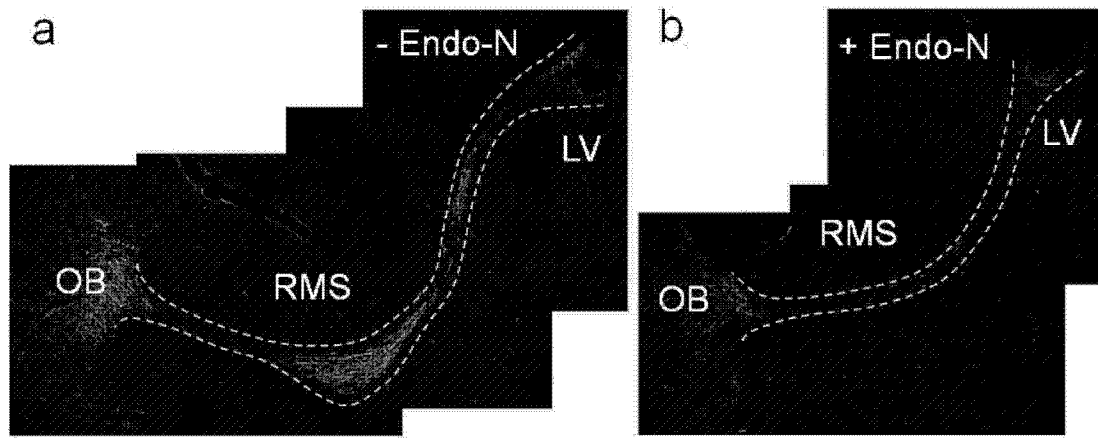


图 2

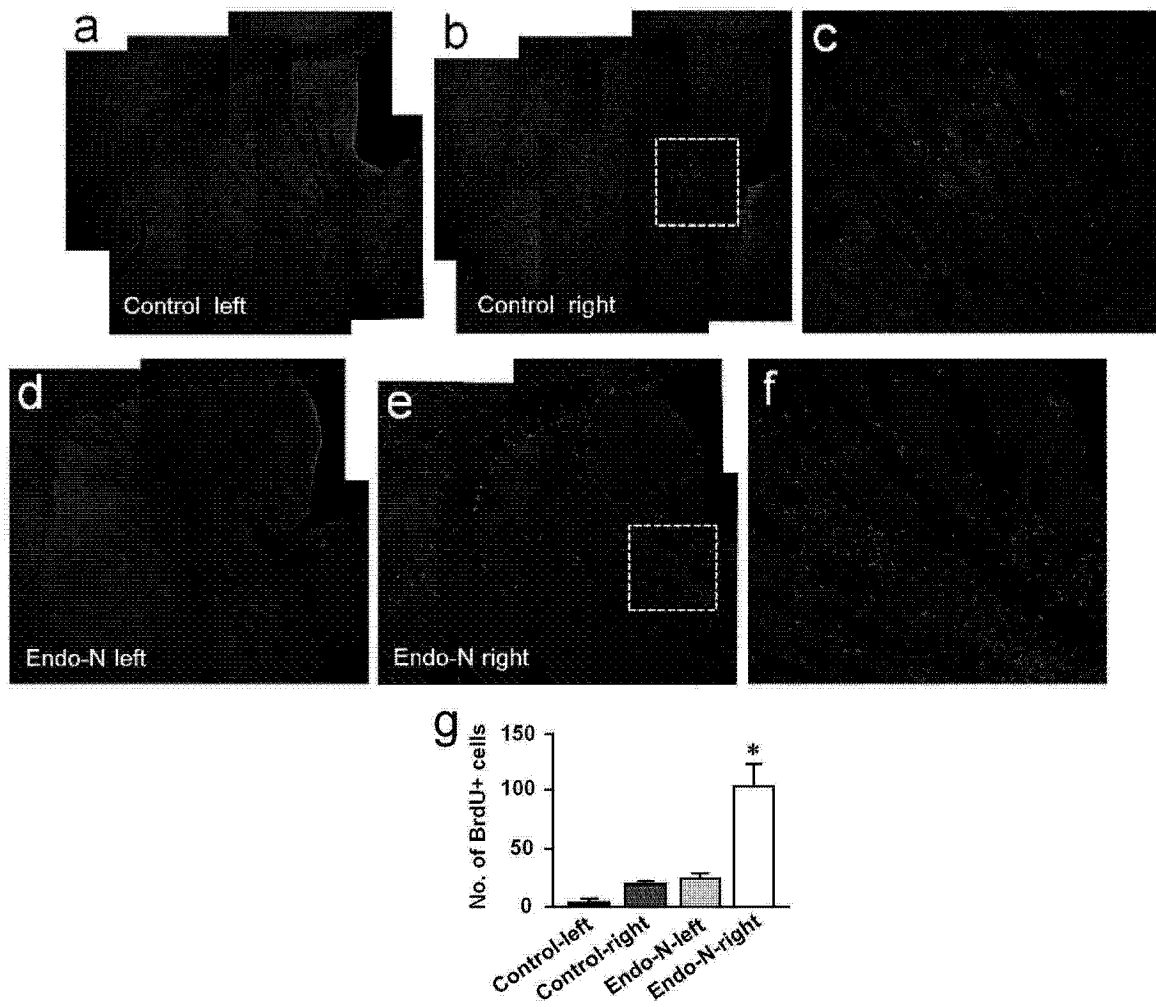


图 3

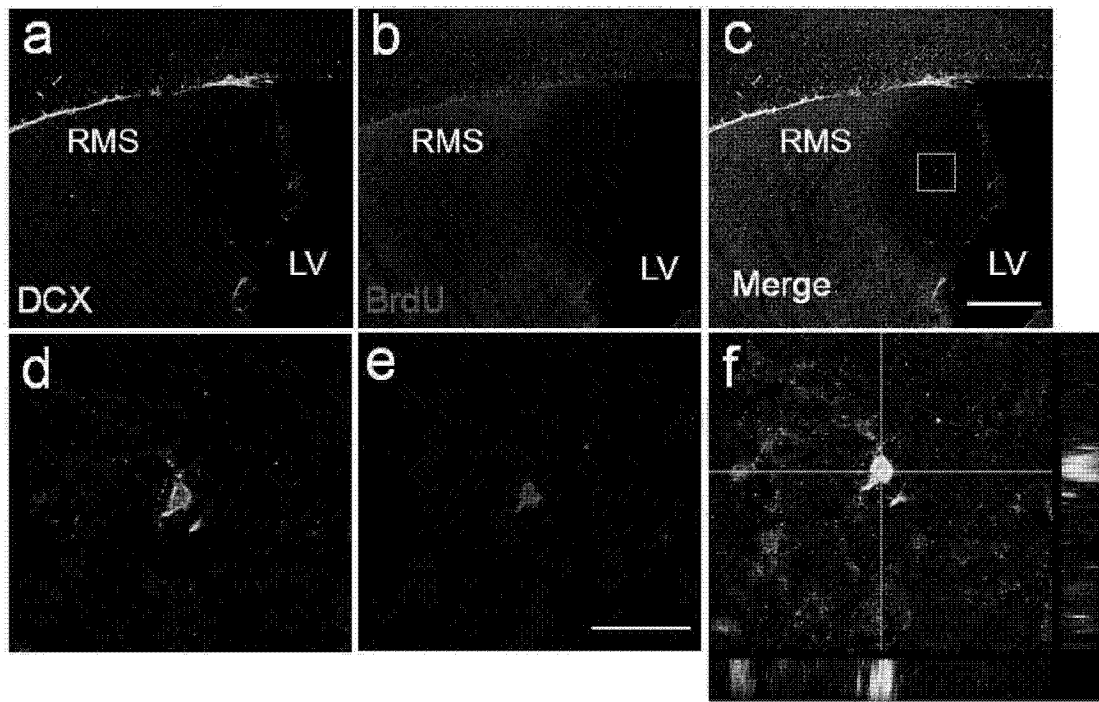


图 4

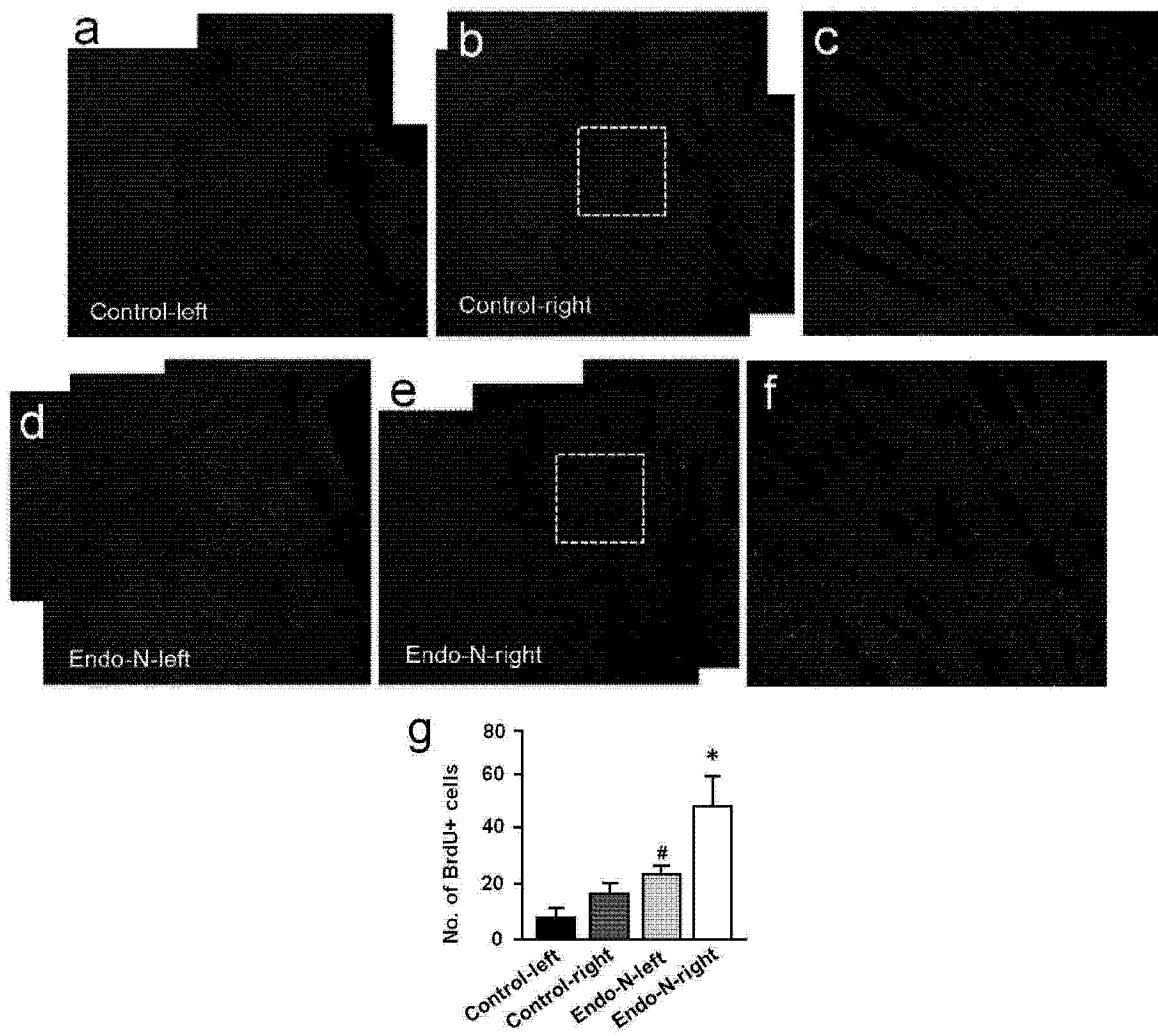


图 5

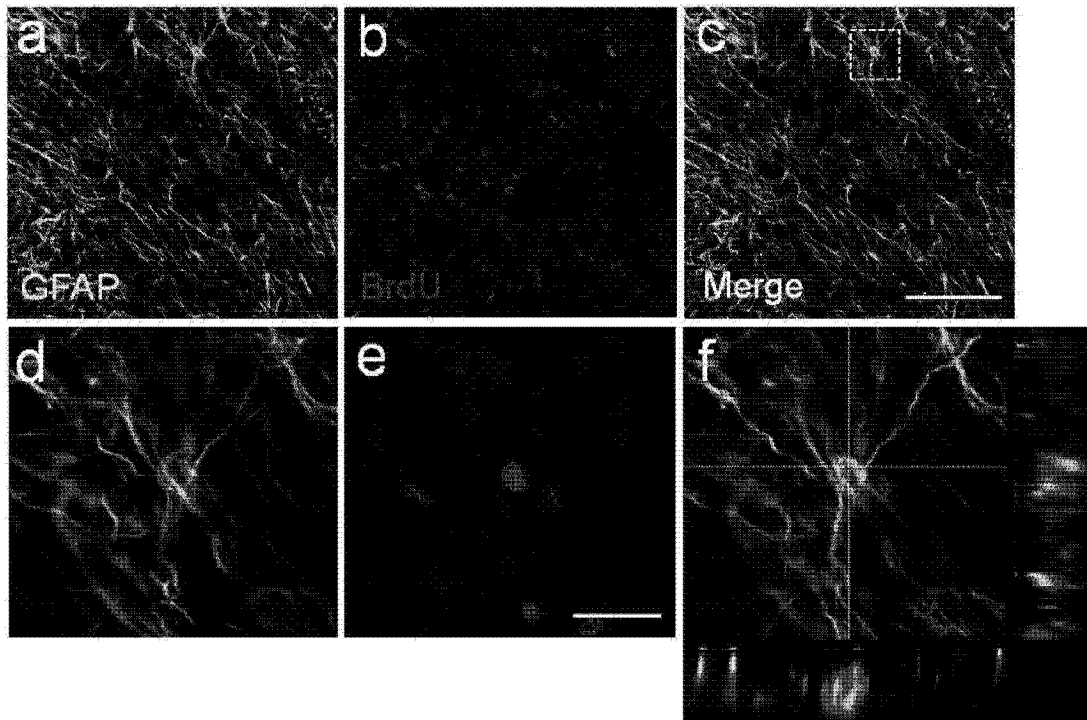


图 6

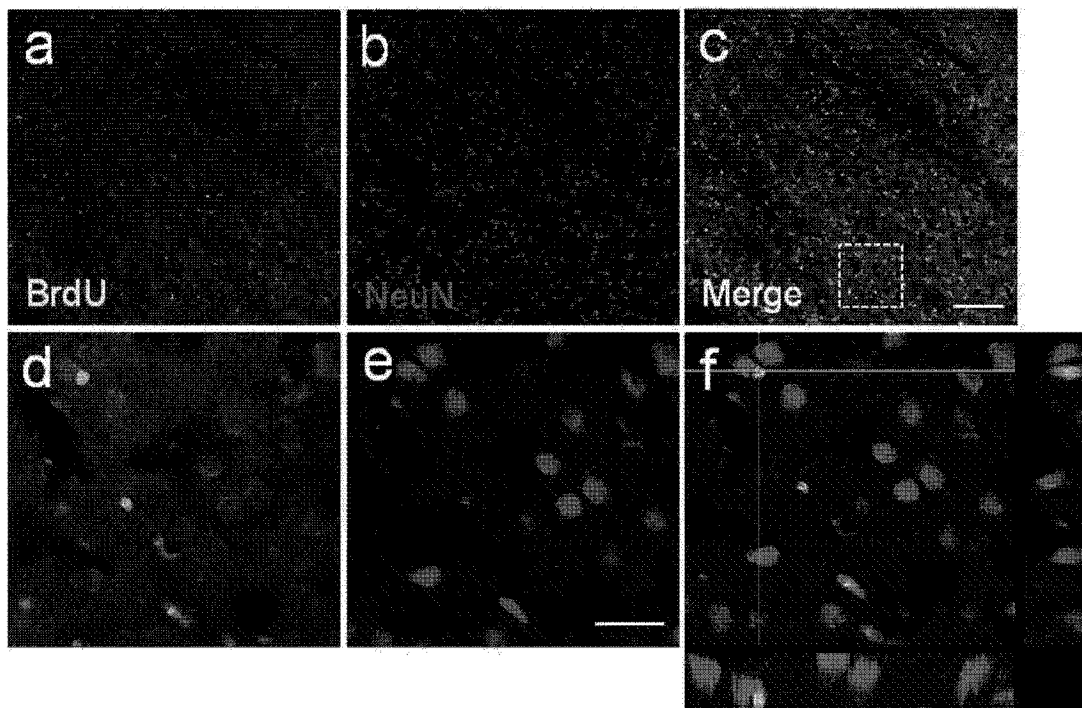


图 7

专利名称(译)	研究脑内源性神经干细胞迁移、增殖、分化的方法		
公开(公告)号	CN103940985A	公开(公告)日	2014-07-23
申请号	CN201410140961.2	申请日	2014-04-10
[标]申请(专利权)人(译)	首都医科大学		
申请(专利权)人(译)	首都医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	首都医科大学		
[标]发明人	段维明 张永鑫 杨春		
发明人	段维明 张永鑫 杨春		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/5058 G01N33/5073 G01N33/582 G01N2800/2835		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种研究脑内源性神经干细胞迁移、增殖、分化的方法：1) 对动物脑切片进行5溴脱氧尿嘧啶和双肾上腺皮质激素、5溴脱氧尿嘧啶和神经元核心抗原、5溴脱氧尿嘧啶和胶质细胞源性神经营养因子双标免疫荧光染色，以及唾液酸化神经细胞粘附因子单标免疫荧光染色；2) 使用GraphPad Prism6.0软件统计分析数据并绘图，5溴脱氧尿嘧啶阳性细胞为单因素多组数据使用one-way方差分析；所述动物脑切片经过以下处理：在脑右侧纹状体内立体定位注射6-羟多巴溶液后，在侧脑室注射PSA特异性裂解酶原液，再腹腔注射5溴脱氧尿嘧啶溶液。本发明为研究脑内源性神经干细胞迁移影响提供了一种有效的研究方法。

A	6-OHDA injection	PBS injection	BrdU ip 50mg/kg 2X daily		n=5
	0d	3d	8d	9d 10d	13d killed
	6-OHDA 5μg/μl	2μl ST	PBS 0.01M	5μl LV	
B	6-OHDA injection	Endo-N injection	BrdU ip 50mg/kg 2X daily		n=5
	0d	3d	8d	9d 10d	13d killed
	6-OHDA 5μg/μl	2μl ST	Endo-N 1U/μl	5μl LV	
C	6-OHDA injection	PBS injection	BrdU ip 50mg/kg 2X daily		n=5
	0d	3d	8d	9d 10d	23d killed
	6-OHDA 5μg/μl	2μl ST	PBS 0.01M	5μl LV	
D	6-OHDA injection	Endo-N injection	BrdU ip 50mg/kg 2X daily		n=5
	0d	3d	8d	9d 10d	23d killed
	6-OHDA 5μg/μl	2μl ST	Endo-N 1U/μl	5μl LV	