

• 基础实验研究论著 •

雪旺细胞联合高压氧治疗对脑缺血代偿区 netrin-1 表达的影响

刘艳丽, 李婷婷, 张 华[△]

(湖北医药学院附属东风医院检验科, 湖北十堰 442008)

摘要:目的 研究高压氧治疗与雪旺细胞联合移植对脑缺血代偿区 netrin-1 的表达的影响。方法 建立大鼠大脑中动脉闭塞模型,分为第 1 组雪旺细胞移植和第 2 组雪旺细胞移植联合高压氧治疗。用 RT-PCR 观察 netrin-1 mRNA 表达变化情况。结果 联合治疗组 netrin-1 mRNA 比单纯细胞移植组降低 1/4。结论 netrin-1 在高压氧的作用下降低,可能的原因为高压氧增加自由基的生成,自由基导致 netrin-1 的降低。

关键词:脑缺血; 雪旺细胞; 高压氧

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.08.005

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)08-0923-02

The effect of netrin-1 expression in cerebral ischemia compensatory area with the application of Schwann cell transplant and hyperbaric oxygen therapy

Liu Yanli, Li Tingting, Zhang Hua[△]

(Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Dongfeng Hospital of Hubei Medicine University, Shiyan, Hubei 442008, China)

Abstract: Objective To study the effect of netrin-1 expression in cerebral ischemia compensatory area with the application of Schwann cell transplant and hyperbaric oxygen therapy. **Methods** Establish middle cerebral artery occlusion model, rat were divided into twice, the first group was the transplantation of schwann cell, the second group is cell transplant and hyperbaric oxygen. Netrin-1 mRNA is detected with the application of reverse transcription PCR (RT-PCR). **Results** Netrin-1 mRNA decreased a quarter between the combination therapy group and only cell transplant group. **Conclusion** Netrin-1 is decreased by hyperbaric oxygen, possibly because hyperbaric oxygen increase free radicals, but free radicals decrease netrin-1 mRNA.

Key words: brain ischemia; schwann cell; hyperbaric oxygenation

脑缺血后组织缺氧是细胞损伤的主要原因之一,高压氧(HBO)被认为是治疗脑缺血方法之一。netrin-1 是层粘连蛋白相关的分泌蛋白,有研究发现用腺相关病毒高表达 netrin-1 增加实验性卒中大鼠坏死灶周围血管密度,促进运动功能恢复^[1]。本实验将雪旺细胞移植与高压氧联合治疗脑缺血,观察高压氧对脑缺血代偿区 netrin-1 表达的影响。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 SD 成年健康雌性大鼠 16 只,由湖北医药学院实验动物中心提供,体质量 220 g 左右,分为大脑中动脉阻塞脑缺血给予 SC 治疗组和 SC 移植合并高压氧治疗组,每组 8 只大鼠。

1.2 雪旺细胞培养和纯化 原代培养:取 4~5 d 的 GFP 乳鼠 10 只,处死后浸泡于 75% 的乙醇溶液中消毒,无菌条件下取双侧坐骨神经剥除神经外膜,将神经束剪成 0.1~0.2 mm 的碎块,于该培养皿中依次加入 0.16% 胶原酶,0.25% 胰蛋白酶各 1 mL,消化 5 min,用含有 10% 小牛血清的 DMEM/F12 培养基终止消化,接种到培养瓶中第 5 天进行传代培养。传代培养:用 0.3% 胰蛋白酶约 1.5~2 mL 直接加入培养瓶中,倒置显微镜下观察 20~30 s,待雪旺细胞回缩成亮团状,终止消化,离心 15 min。弃上清,于沉淀中加入含 20% 小牛血清的 DMEM/F12 培养基 1.5 mL,吹打混匀后,移入新培养瓶中,37 ℃,5% CO₂ 孵育箱中继续培养。

1.3 大鼠大脑局灶缺血模型的制作 用 3.6% 水合氯醛(10 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,仰卧固定于手术台上,纵向切开颈部正中皮肤及皮下组织,暴露左颈总动脉(CCA)。在 CCA 剪一小切口,将一端椭圆略膨胀,长约 6 cm,直径 0.2 mm 的鱼线插入 CCA 后徐徐推进至略感阻力,提示鱼线盲端已达大脑中动脉。

1.4 细胞移植 SD 大鼠脑缺血后立即分别进行各组细胞移植。细胞悬液浓度为 $5 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 。将 SD 大鼠仰卧后固定于手术台上,于颈总动脉移植细胞,移植速度为 1 $\mu\text{L} / \text{min}$,移植完毕后缝合颈部皮肤。

1.5 免疫抑制剂使用 SD 大鼠于手术前后 3 d 腹腔注射稀释环孢素 0.2 毫升/只(环孢素:生理盐水=1:10),减轻细胞移植排斥反应。

1.6 细胞移植后基因表达 提取皮质总 RNA,逆转录扩增 netrin-1 和 β -actin mRNA 表达。上下游引物序列如表 1。上下游引物各 0.5 μL ,PCR 反应总体积为 25 μL ,实验条件:94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 30 s,退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min 共 35 个循环,最后 72 ℃ 总延伸 10 min。PCR 产物取 20 μL 用含 1:20 000 gold view 的 1% 琼脂糖凝胶电泳,电压 280 v,时间 25 min。BIO-RAD 凝胶成像仪紫外模式下拍摄凝胶图片,以 β -actin 为内参照进行电泳条带光密度分析,灰度扫描,求得各目的条带与 β -actin 的相对比值,进行统计学分析。

表 1 Netrin-1 和 β -actin 的引物序列

因子	上游引物	下游引物	产物长度(bp)	退火温度(°C)
Netrin-1	5'-TTT GGC GAC GAG AAC GAA G-3'	5'-GCG GCA GTT GAG ACA GAC AC-3'	348	54.5
β -actin	5'-GTA AAG ACC TCT ATG CCA ACA-3'	5'-GGA CTC ATC GTA CTC CTG CT-3'	227	52.5

1.7 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计处理, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

SC 联合高压氧治疗组 netrin 相对灰度值为 (0.75 ± 0.08) , 与单独 SC 治疗组相对灰度值 (0.99 ± 0.19) 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。说明高压氧能有效减少枕叶 Netrin 表达。

3 讨 论

本研究发现高压氧联合雪旺细胞移植治疗大鼠脑缺血过程中, 高压氧联合雪旺细胞移植组与单纯雪旺细胞移植组比较, netrin-1 下降了 1/4。提示高压氧在治疗脑缺血过程中, 可能对某些有益的因子存在某种抑制作用。

雪旺细胞是周围神经的重要结构和功能细胞, 是神经组织工程研究的重要种子细胞。雪旺细胞可分泌多种与神经再生有关的细胞外基质成分; 分泌神经营养因子在组织工程研究中起非常重要的作用。以往雪旺细胞多用于周围神经缺损或神经功能紊乱, 最近有学者提出一种移植能分泌多种营养因子的细胞进入脑缺血梗死灶周围, 以期促进大脑功能的恢复的思想, 并证明了此种方案的可行^[2]。这些都为雪旺细胞移植提供了前期研究基础。Netrin-1 不仅是轴突导向因子, 而且还参与了神经元迁移、血管生成以及抗凋亡等过程^[3]。Wu 等^[4]发现, 脑梗死后向侧脑室持续性注射 netrin-1 可有效减少缺血导致的神经元凋亡。netrin-1 通过抑制凋亡和炎症保护肾小管上皮细胞, 同时降低氧化应激反应^[5]。急性脑缺血损伤的细胞内级联反应时, 自由基损伤是其中的一个重要环节^[6], 而 HBO 治疗增加氧供的同时, 也可能增加氧自由基, 因此, 很多文献研究了 HBO 治疗是否增加氧自由基损伤^[7-8], 楼敏等^[9]研究发现在脑缺血时间窗内, HBO 治疗能增加脑缺血区线粒体自由基生成, 并提高线粒体抗自由基酶活性。

Netrin-1 与自由基之间的关系目前还未完全明了, 之前的研究表明, netrin-1 能增加自由基的生成^[10-13], 而自由基如何影响 netrin-1 的表达目前并未见有关方面的报道, 本研究中 netrin-1 在高压氧的作用下降低, 可能的原因为高压氧增加自由基的生成, 自由基导致 netrin-1 的降低, 从而导致 netrin-1 导致的自由基降低, 这是机体在自由基损伤过程中的一种保护机制, 具体自由基是否会导致 netrin-1 的降低, 这需要进一步的研究。

参考文献

[1] Sun H, Le T, Chang TT, et al. AAV-mediated netrin-1 overex-

pression increases peri-infarct blood vessel density and improves motor function recovery after experimental stroke[J]. Neurobiol Dis, 2011, 44(1):73-83.

[2] Shi X, Kang Y, Hu Q, et al. A long-term observation of olfactory ensheathing cells transplantation to repair white matter and functional recovery in a focal ischemia model in rat[J]. Brain Res, 2010, 1317(1):257-267.

[3] 龚琼, 余剑. Netrin-1 及其受体在脑缺血中的作用[J]. 国际脑血管病杂志, 2010, 18(8):637-640.

[4] Wu TW, Li WW, Li H. Netrin-1 attenuates ischemic stroke-induced apoptosis[J]. Neuroscience, 2008, 156(3):475-482.

[5] Rajasundari A, Pays L, Mehlen P, et al. Netrin-1 overexpression in kidney proximal tubular epithelium ameliorates cisplatin nephrotoxicity[J]. Lab Invest, 2011, 91(12):1717-1726.

[6] Kawase M, Murakami K, Fujimura M, et al. Exacerbation of delayed cell injury after transient global ischemia in mutant mice with CuZn superoxide dismutase deficiency[J]. Stroke, 1999, 30(9):1962-1968.

[7] Veltkamp R, Siebing DA, Sun L, et al. Hyperbaric oxygen reduces blood-brain barrier damage and edema after transient focal cerebral ischemia[J]. Stroke, 2005, 36(8):1679-1683.

[8] Kim HY, Singhal AB, Lo EH. Normobaric hyperoxia extends the reperfusion window in focal cerebral ischemia[J]. Ann Neurol, 2005, 57(4):571-575.

[9] 楼敏, 王季华, 钱琼秋, 等. 高压氧对大鼠脑缺血区线粒体氧自由基影响的实验研究[J]. 浙江大学学报: 医学版, 2008, 37(5):437-443.

[10] Zhang H, Zhang C. New discovery of Netrin-1 in cardioprotection [J]. J Mol Cell Cardiol, 2010, 48(6):1033-1035.

[11] Chen H, Wei Q, Zhang J, et al. Netrin-1 signaling mediates NO-induced glial precursor migration and accumulation[J]. Cell Res, 2010, 20(2):238-241.

[12] Nguyen A, Cai H. Netrin-1 induces angiogenesis via a DCC-dependent ERK1/2-eNOS feed-forward mechanism[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(17):6530-6535.

[13] Zhang J, Cai H. Netrin-1 prevents ischemia/reperfusion-induced myocardial infarction via a DCC/ERK1/2/eNOS s1177/NO/DCC feed-forward mechanism[J]. J Mol Cell Cardiol, 2010, 48(6):1060-1070.

(收稿日期: 2012-12-18)