

转 VEGF 基因内皮祖细胞移植治疗阿尔茨海默病模型小鼠的研究

王玉琳 刘晶 张朝东

066000 河北省秦皇岛市第一医院神经内科(王玉琳、刘晶); 110001 沈阳, 中国医科大学附属第一医院神经内科(张朝东)

通信作者: 张朝东, Email: zhangcd2011@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2018.02.011

【摘要】目的 将体外诱导的血管内皮祖细胞(EPCs)转入血管内皮生长因子(VEGF)基因, 并向移植到 AD 模型鼠脑内海马区, 观察该部位及邻近部位的血管重建以及内皮细胞功能的改善情况, 为 AD 的治疗提供研究基础。**方法** 采用体外分离培养小鼠骨髓源性 EPCs。构建的携带人 VEGF165 基因的 pcDNA3.1 质粒转染至 EPCs, 观察 EPCs 表达 VEGF 情况。采用 APP/PS1 双转基因鼠模型, 将转染人 VEGF165 基因的 EPCs 移植至模型鼠脑内, 观察小鼠行为学的变化、A β 含量, 以及血管的形成情况。**结果** 将转染 VEGF 基因的 EPCs 移植入小鼠的海马区后, 动物在第 4, 5, 6 天进行空间导航试验发现, 与对照组比较, 平均潜伏期明显缩短($P < 0.05$); 免疫组化结果显示, 与对照组、EPCs 组比较, EPCs+VEGF 组额叶皮层和海马区 A β 含量明显减少($P < 0.01$), 海马区 CD34 阳性细胞数更高($P < 0.01$)。**结论** 将 EPCs+VEGF 移植入鼠脑内, 可以发现小鼠的记忆能力增强, 原因可能与促进新生血管的生成、A β 清除有关。

【关键词】 阿尔茨海默病; 内皮生长因子; APP/PS1 双转基因鼠模型; 淀粉样蛋白; 内皮祖细胞

Research of Alzheimer disease model mouse implanted with endothelial progenitor cells transfected with VEGF gene

Wang Yulin, Liu Jing, Zhang Chaodong

Neurology Department, First Hospital of Qinhuangdao, Hebei Province, Qinhuangdao 066000, China(Wang YL, Liu J); Neurology Department, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China(Zhang CD)
Corresponding author: Zhang Chaodong, Email: zhangcd2011@163.com

【Abstract】Objective Vascular endothelial progenitor cells (EPCs) induced in vitro were transferred into vascular endothelial growth factor (VEGF) gene and transplanted into the hippocampus of Alzheimer disease (AD) model rats. To observe the reconstruction of blood vessels and the improvement of endothelial cell function in this area and adjacent areas, so as to provide basis for the treatment of AD. **Methods** This experiment used EPCs obtained from the bone marrow of mouse and kept in in vitro cultures. By constructing pcDNA3.1 plasmids carrying human VEGF165 gene and transfecting the EPCs, how the gene affects EPCs and its expression were observed. Using the APP/PS1 double transgenic model rats, human VEGF165 gene transfected EPCs was implanted into model rat's brain, to observe rat's behavioral differences, A β protein amounts, and blood vessel formation. **Results** After implanting EPCs transfected with VEGF gene into the hippocampus of mice, the animals were tested on 4, 5 and 6 d. The average latency was significantly shorter than that in the control group ($P < 0.05$). The results of immunohistochemistry showed that compared with the control group and the EPCs group, the content of A β in the frontal cortex and hippocampus of EPCs+VEGF group decreased significantly, and the number of CD34 positive cells in hippocampus were higher ($P < 0.01$). **Conclusions** By implanting EPCs+VEGF into brains of mice, the memory ability of mice can be found to be enhanced, which may be related to the promotion of angiogenesis and the clearance of A β protein.

【Key words】 Alzheimer disease; Endothelial growth factor; APP/PS1 double transgenic model mouse; Amyloid protein; Endothelial progenitor cells

随着血管内皮祖细胞(EPCs)参与体内血管新生理论的建立,移植EPCs治疗血管疾病,促进脑缺血区域血管重建也开始受到关注。近年来的研究表明神经发生与脑血管发生关系密切,在治疗某些血管性疾病中取得了一定的效果。血管内皮生长因子(VEGF)是强有效促血管生成因子,具有诱导血管生成、增强血管通透性及维持血管功能等作用,其中VEGF165是VEGF五种表型之中促血管生成作用最强的亚型。由于VEGF165蛋白的生物半衰期短等问题,局部给药难以达到预期效果,在分子生物学飞速发展的今天,VEGF基因治疗为我们开辟了新思路。VEGF165基因修饰EPCs,可促进其持续的分泌、与祖细胞共同发挥作用,这样联合应用,有望提高EPCs提高对阿尔茨海默病(AD)的治疗效果。

一、材料与方法

1. 动物和试剂:(1)动物:APP/PS1双转基因小鼠共18只,周龄48周,中国医科大学动物实验中心提供。将18只小鼠按照每组6只分为3组,分别为对照组、EPCs组和EPCs+VEGF组;EPCs培养及鉴定和转染的VEGF基因内皮祖细胞由本实验前期获得。(2)试剂:小鼠单克隆抗人A β (1:400, Sigma);小鼠抗人的CD34(1:100, 北京中杉);羊抗小鼠的免疫组化试剂盒,浓缩型DAB试剂盒(北京博奥森)。(3)主要仪器设备:低速冷冻离心机(KDC-2046)、立体定位仪(NARISHIGE)石蜡切片机、电热恒温鼓风干燥箱和Morris水迷宫装置等。

2. 方法:(1)细胞移植术:采用小鼠海马CA1区定位注射,方法为10%水合氯醛按照2.5 ml/kg腹腔注射麻醉;麻醉成功后,常规去除毛发,将小鼠颅骨固定于立体定位仪上,碘伏消毒头部皮肤后剪开头皮正中梭形切口,剥离骨膜,1%过氧化氢烧灼骨板直至发白,骨缝清晰可见;根据小鼠脑立体定位图谱,小鼠大脑右侧海马齿状回坐标(前囟后2.3 mm,矢状缝右侧旁开2.0 mm,硬脑膜下1.8 mm)确定注射部位;按照上述坐标钻孔开颅,微量注射器抽取5 μ l移植细胞,进针至海马区,进针速度要缓慢,注射完成后留针15 min,缓慢退针;注射结束后,过氧化氢清洁手术野,缝合头皮,腹腔注射青霉素(2万U/100g, 2次/d,连续3d)。放置于温暖安静处直至清醒。(2)各组干预方法:①对照组:APP/PS1双转基因AD小鼠6只,仅进行动物麻醉、手术钻孔后缝合头皮,未给其他处理。②EPCs组:APP/PS1双转基因AD小鼠6只,海马移植EPCs细胞,移植液体剂量为5 μ l。③EPCs+VEGF组:APP/PS1双转基因AD小鼠6只,

海马细胞移植转染VEGF165的血管EPCs,细胞计数为 2×10^5 个。(3)小鼠学习记忆功能的行为学测定:待小鼠移植术后15 d,取上述各组小鼠6只进行水迷宫实验。参照Morris实验方法进行, Morris水迷宫由直径120 cm、高50 cm圆形水池及直径为9 cm的站台构成,液面高出站台0.5 cm,水温维持在25 $^{\circ}$ C。隐蔽平台获得实验历时6 d。(4)脑组织的灌注:于移植后21 d对各组动物脑组织固定。4%多聚甲醛磷酸缓冲液灌注取小鼠的大脑,10%水合氯醛腹腔注射麻醉,仰卧固定、剪开胸腔,暴露心脏,将连续灌注液的针头插入左心室,剪破右心耳,先用预冷的0.01 mol/L PBS(pH7.4)灌注,待右心耳流出的液体基本为无色,脏器变白,换0.01 mol/L PBS(pH7.4)配制的4%多聚甲醛磷酸缓冲液灌注10 min,两种灌注液量均为20 ml。灌注后可见灌注成功的老鼠周身变僵硬。断头取脑,去除多余的脑组织,固定于相同的固定液中24 h。脑组织经冲洗、脱水、透明、浸蜡、包埋,切片,制成8 μ m厚的连续切片,每10张切片取3张。(5)免疫组织化学染色:小鼠脑组织的A β 斑块和新生血管行A β 和CD34免疫组织化学染色分析。具体步骤为:脱蜡微波修复;封闭液封闭2 h;分别是小鼠抗人A β 抗体(1:400)结合A β 斑块,小鼠抗人CD34抗体(1:100)4 $^{\circ}$ C过夜;生物素二抗37 $^{\circ}$ C孵育2 h;SABC孵育2 h;DAB显色;苏木精复染;洗涤、封片、镜检。

3. 统计学方法:实验数据采用统计软件SPSS 16.0进行分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,3组间比较采用单因素方差分析(ANOVA_s)处理。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

1. 各组小鼠平均潜伏期比较:见表1。结果显示,第1~6天各组小鼠搜索平台的平均潜伏期之间差异有统计学意义,随着训练的时间延长各组小鼠的平均潜伏期均有明显缩短。经统计发现,EPCs+VEGF组小鼠在第4、5、6天的平均潜伏期明显比对照组缩短($P < 0.05$);EPCs组小鼠在第5、6天的平均潜伏期比对照组缩短($P < 0.05$)。

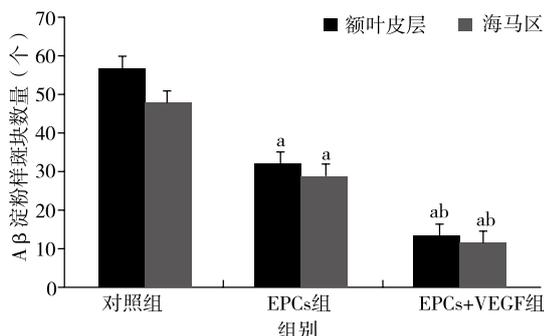
2. 各组小鼠脑组织的A β 免疫组织化学分析:见图1(见本期封三)、2。EPCs组和EPCs+VEGF组在额叶皮层和海马区的A β 淀粉样斑块明显少于对照组,且EPCs+VEGF组也少于EPCs组,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

3. 各组小鼠脑组织的血管免疫组织化学分析:见图3(见本期封三)、4。EPCs组和EPCs+VEGF组

表1 各组小鼠的平均潜伏期比较($s, \bar{x} \pm s$)

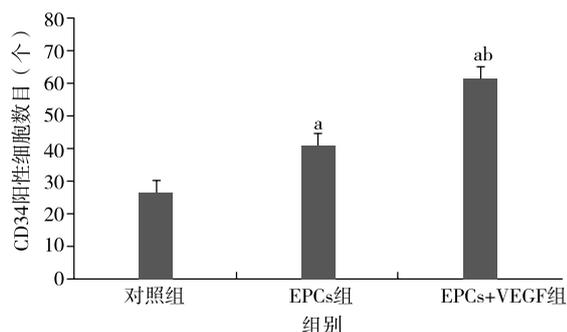
组别	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天	第6天
对照组	48.2 ± 3.2	47.7 ± 4.1	47.7 ± 3.4	43.8 ± 4.1	39.4 ± 4.8	39.1 ± 3.2
EPCs组	43.9 ± 4.2	42.3 ± 3.8	42.0 ± 2.3	38.5 ± 3.0	28.4 ± 5.3 ^a	22.4 ± 4.9 ^a
EPCs+VEGF	42.1 ± 4.4	40.2 ± 3.3	39.7 ± 3.1	35.7 ± 3.7 ^a	24.4 ± 4.8 ^a	19.7 ± 4.5 ^a
F值	4.6	5.3	7.6	9.8	30.3	40.6
P值	>0.05	>0.05	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注：^a与对照组比较， $P < 0.05$



注：^a与对照组比较， $P < 0.01$ ；^b与EPCs组比较， $P < 0.01$

图2 各组小鼠额叶皮层、海马Aβ淀粉样斑块数量比较



注：^a与对照组比较， $P < 0.01$ ；^b与EPCs组比较， $P < 0.01$

图4 各组小鼠海马区血管CD34阳性细胞数目

海马区的CD34阳性细胞数明显多于对照组，且EPCs+VEGF组也多于EPCs组，差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

讨论 EPCs形成血管有两种形式，一是血管的生成，即血管的抽芽方式形成血管；二是血管的发生，即通过原位EPCs分化，使该部位发出新生血管的效应，过程包括EPCs聚合成细胞簇或“血岛”，随着多个此类聚合形式的生长和融合，产生毛细血管网状结构，并在局部血循环作用下，继续分化为动静脉系统^[1-2]。我们研究显示移植入海马区的EPCs形成的血管较多，以远的部位则血管形成较少(见图3)，这体现了这种血管的发生关系，虽然EPCs具有分泌VEGF等因子的功能，但是这种功能会受到年龄和内环境的制约^[3]，致使VEGF等因子表达有

限，维持时间也不够理想，其通过脑组织的渗透功能也大为下降。

基因转染的祖细胞作为一种细胞移植治疗神经退行性疾病，是一种有前途的治疗方法^[4]；随着基因修饰治疗的发展，这种治疗已经成为治疗很多类似疾病的手段，将发挥越来越大的作用，转入的基因可以表达各种物质，如生长因子，激素、酶类等其他蛋白质。本实验研究发现注入鼠海马区的EPCs+VEGF165能够极大地促进血管的发生，从而有效地促进了血管的形成，这也与VEGF的特性是分不开的^[5]，而APP/PS1鼠是一种模拟AD血管改变较为理想的模型，大量的证据表明脑血管的改变是一种重要的致AD发展的机制^[6]，现代的研究证据表明脑血管的退行性变与Aβ沉积相关^[7]，最终影响到脑的灌注和血脑屏障的功能。

我们研究发现，采用这种方法治疗各组小鼠的老年斑的数目明显减少。研究表明，在AD脑内，VEGF会伴随着老年斑一起沉积^[8]。本研究中EPCs+VEGF组Aβ的含量明显减少(图1)，无论在海马还是在皮层中，本组的老年斑含量均明显减少，推测是由于通过新形成的血管促进它的清除实现的。用VEGF治疗不仅能使Aβ从脑组织转移到血液当中，而且也能降低Aβ低聚物的形成，脑组织匀浆法显示无论是单聚物还是多聚物均明显减少，而Aβ低聚物通过影响突触功能与AD的认知功能相关，从而达到治疗的目的，考虑这与血脑屏障通透性增加有关^[9]。采用VEGF治疗还可以增加神经元的存活和内皮细胞的发生，体内移植这种物质也明显减少了细胞的凋亡^[10-12]。研究显示，VEGF有双重功能，对于神经保护是必需的，主要包括Aβ的清除和淀粉样物质的神经毒作用^[13]，其结果可能也在于此。

老年斑和神经纤维缠结是AD的病理学特征，最终导致认知功能障碍，在临床上与AD的表现相关，但机制还远不清楚，AD最重要的治疗目标是改

善认知功能障碍,临床上在这些患者中表现相关的缺陷,也可表现记忆缺失,AD患者可以表现神经精神症状,这种交替的损害可能通过几种方式来解释,包括探索活动的丧失、空间定向、抑制控制力丧失^[14]。水迷宫实验是客观评价动物的学习记忆的一种客观指标,完整的测试了AD转基因鼠的海马功能,主要反映长期的空间记忆能力,空间导航试验表示的一种陈述式记忆,反映的是一种学习记忆能力,上述结果表明双转基因鼠对水迷宫潜伏期测试实验具有很好的敏感性,从行为功能上看应用EPCs组以及EPCs+VEGF组均较对照组潜伏期缩短,说明双转基因鼠经过治疗以后认知功能得到了改善,而主要体现在老年斑的减少上。

综上所述,我们的研究显示海马区注射EPCs 15 d后,APP/PS1鼠的行为损害得到改善,脑的A β 含量总体下降,同时促进海马区的血管新生,提示注射EPCs有望成为AD患者的治疗方法之一。

利益冲突 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

作者贡献声明 试验设计为王玉琳、张朝东,论文撰写为王玉琳,论文修订为张朝东,数据整理和分析为刘晶

参 考 文 献

- [1] Qin M, Guan X, Zhang Y, et al. Evaluation of ex vivo produced endothelial progenitor cells for autologous transplantation in primates[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 14. DOI: 10.1186/s13287-018-0769-5.
- [2] 李霞. 麦冬多糖-1对心肌缺血再灌注大鼠内皮祖细胞与缺血修饰白蛋白变化的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(19): 5449-5450. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2015.19.034.
- [3] Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures[J]. *Circulation*, 2002, 106(22): 2781-2786.
- [4] Yasuhara T, Shingo T, Kobayashi K, et al. Neuroprotective effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) upon dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease[J]. *Eur J Neurosci*, 2004, 19(6): 1494-1504. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2004.03254.x.
- [5] Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors[J]. *Nat Med*, 2003, 9(6): 669-676. DOI: 10.1038/nm0603-669.
- [6] Grammas P, Yamada M, Zlokovic B. The cerebrovasculature: a key player in the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2002, 4(3): 217-223.
- [7] Miao J, Vitek MP, Xu F, et al. Reducing cerebral microvascular amyloid-beta protein deposition diminishes regional neuroinflammation in vasculotropic mutant amyloid precursor protein transgenic mice[J]. *J Neurosci*, 2005, 25(27): 6271-6277. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1306-05.2005.
- [8] Yang SP, Bae DG, Kang HJ, et al. Co-accumulation of vascular endothelial growth factor with beta-amyloid in the brain of patients with Alzheimer's disease[J]. *Neurobiol Aging*, 2004, 25(3): 283-290. DOI: 10.1016/S0197-4580(03)00111-8.
- [9] Sargento-Freitas J, Aday S, Nunes C, et al. Endothelial progenitor cells enhance blood-brain barrier permeability in subacute stroke[J]. *Neurology*, 2018, 90(2): e127-e134. DOI: 10.1212/WNL.0000000000004801.
- [10] Spuch C, Antequera D, Portero A, et al. The effect of encapsulated VEGF-secreting cells on brain amyloid load and behavioral impairment in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(21): 5608-5618. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.03.042.
- [11] 杜公文, 杜怡斌, 张辉, 等. 共培养下内皮祖细胞对神经干细胞增殖及分化的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2013, 48(12): 1445-1448.
Du GW, Du YB, Zhang H, et al. Influence of endothelial progenitor cells on the proliferation and differentiation of neural stem cells under the condition of co-culture[J]. *Acta Universitatis Medicinalis Anhui*, 48(12): 1445-1448.
- [12] 杨纯生, 贺丹, 谭军. 血管内皮祖细胞对共植入缺血再灌注模型大鼠神经干细胞增殖、凋亡和血管重建的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2017, 21(5): 718-723. DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2017.05.011.
Yang CS, He D, Tan J. Co-culture with vascular endothelial progenitor cells: effects on proliferation and apoptosis of neural stem cells and vascular remodeling in rats with ischemia reperfusion injury[J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2017, 21(5): 718-723.
- [13] Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, et al. Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function[J]. *Nat Neurosci*, 2005, 8(1): 79-84. DOI: 10.1038/nn1372.
- [14] Chung JA, Cummings JL. Neurobehavioral and neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: characteristics and treatment[J]. *Neurol Clin*, 2000, 18(4): 829-846.

(收稿日期: 2017-12-09)

(本文编辑: 赵静姝)