

• 基础研究 •

mfat-1 转基因小鼠通过促进神经干细胞增殖修复缺氧缺血性脑损伤

刘雨桐, 张 何, 蔡皓然, 陈雨沐, 杨海元*, 王 盈*

江苏省异种移植重点实验室, 南京医科大学医学遗传学系, 江苏 南京 211166

[摘要] 目的: 验证mfat-1转基因小鼠是否通过促进成体神经干细胞增殖修复缺氧缺血性脑损伤。方法: 在体外实验中, 分离并培养mfat-1转基因小鼠和同窝阴性鼠的成体神经干细胞, 进行氧糖剥夺/复氧(oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R)造模, 检测神经干细胞增殖情况; 在体内实验中, 对mfat-1转基因小鼠及其同窝阴性对照小鼠进行缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)造模, 检测成体神经干细胞的增殖能力。结果: 成功构建HIBD小鼠模型和神经干细胞体外培养体系。mfat-1转基因小鼠来源的成体神经干细胞的增殖能力较野生型小鼠来源的成体神经干细胞更强; 与野生型小鼠比较, mfat-1转基因小鼠神经干细胞增殖能力显著增强且行为学改善。结论: mfat-1转基因小鼠通过促进神经干细胞增殖修复小鼠HIBD。

[关键词] mfat-1; 成体神经干细胞; 缺氧缺血性脑损伤; 增殖

[中图分类号] R743.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2024)11-1483-08

doi: 10.7655/NYDXBNSN240442

Mfat - 1 transgenic mice participate in the repair of hypoxic - ischemic brain injury by promoting the proliferation of neural stem cells

LIU Yutong, ZHANG He, CAI Haoran, CHEN Yumu, YANG Haiyuan*, WANG Ying*

Jiangsu Key Laboratory of Xenotransplantation, Department of Medical Genetics, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** To verify whether mfat-1 transgenic mice participate in the repair of hypoxic-ischemic brain damage by promoting the proliferation of adult neural stem cells. **Methods:** *In vitro* experiments, adult neural stem cells from wild-type and mfat-1 transgenic mice were isolated and cultured, subjected to oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) modeling, and the proliferation of neural stem cells was assessed; *in vivo* experiments, mfat-1 transgenic mice and their littermates were subjected to hypoxic-ischemic brain damage (HIBD) modeling, and the proliferation capacity of adult neural stem cells was evaluated. **Results:** The mouse HIBD model and the neural stem cell *in vitro* culture system were established successfully. The proliferation ability of adult neural stem cells derived from mfat-1 transgenic mice was higher than that from wild-type mice; mfat-1 transgenic mice showed significantly enhanced proliferation capacity of neural stem cells compared to wild-type mice and displayed better behavioral performance. **Conclusion:** mfat-1 transgenic mice participate in the repair of HIBD by promoting the proliferation of mouse neural stem cells.

[Key words] mfat-1; adult neural stem cell; hypoxic-ischemic brain damage; proliferation

[J Nanjing Med Univ, 2024, 44(11): 1483-1490]

[基金项目] 国家自然科学基金(31701283, 81970164); 江苏省高等学校大学生创新创业训练计划项目(202310312078Y)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: hyyang@njmu.edu.cn; ywang@njmu.edu.cn

缺氧缺血性脑损伤(hypoxic ischemic brain damage, HIBD)是指脑血流减少或停止,导致脑组织部分或完全缺氧^[1]。由于高代谢需求,大脑易受到血液供应剥夺的损害。神经元损伤和不可修复的脑组织损伤在脑缺血后的几分钟内即可发生^[2-3]。新生儿和成年人的脑缺氧缺血损伤可导致严重的神经功能障碍或死亡^[4]。HIBD已成为最严重的公共卫生问题之一。虽然近年来对HIBD的研究越来越深入,但迄今还没有用于治疗HIBD的药物获得食品及药物管理局的批准^[5],因此,目前迫切需要探索新的治疗策略。

饮食中n-3多不饱和脂肪酸(n-3 polyunsaturated fatty acid, n-3 PUFA)在防治HIBD中发挥的有益作用已有广泛研究,包括抑制炎症反应和氧化应激、促进脑血管新生、减少细胞凋亡以及改善代谢等^[6-8]。在哺乳动物中,因为缺少有效的合成酶,n-3 PUFA在血浆中的含量与摄入量直接相关,并且受到吸收率的影响,因此本研究利用稳定表达内源性n-3 PUFA的mfat-1转基因小鼠开展相关研究。fat-1基因来源于秀丽隐杆线虫,编码n-3去饱和酶,可以将n-6 PUFA转化为n-3 PUFA,提高内源性n-3 PUFA/n-6 PUFA的比值。mfat-1转基因小鼠是将fat-1基因的密码子进行了优化,使其在哺乳动物体内可以进行更加高效的表达。n-3 PUFA在大脑中的高表达对HIBD诱导的脑损伤具有一定保护作用,可以导致相对较低水平的神经元坏死、凋亡和炎症^[9-10]。

成年啮齿类动物大脑内有两个特定区域可以持续进行成体神经发生:侧脑室的脑室下区(subventricular zone, SVZ)和海马齿状回的颗粒层下区(subgranular zone, SGZ)^[11]。已有研究显示,在脑损伤之后,SVZ和SGZ区域存在短暂但是明显的神经干细胞(neural stem cell, NSC)增殖,以及向同侧的受损部位迁移、修复的现象^[12-13]。但是这一自发过程远不足以修复卒中后的大脑损伤,因此科研人员将研究重点转向如何促进内源性神经干细胞增殖和分化。本研究首次从促进内源性成体神经干细胞增殖的角度来探讨mfat-1转基因小鼠对HIBD的修复作用,为HIBD的治疗提供新的思路 and 方向。

1 材料和方法

1.1 材料

野生型(wild type, WT)C57BL/6J小鼠,由南京医科大学医药实验动物中心提供。C57BL/6J背景的mfat-1转基因小鼠以及同窝阴性对照小鼠,由南

京医科大学动物实验中心饲养,实验过程中严格遵守南京医科大学动物伦理委员会的规定(伦理学批文编号:IACUC-2012032); Accutase 细胞消化液、DMEM/F-12 培养基、B-27 添加剂、杜氏磷酸盐缓冲液(DPBS)、无糖DMEM(Gibco公司,美国);碱性成纤维细胞生长因子、表皮生长因子、肝素、黄体酮、腐胺、HEPES 缓冲液、葡萄糖、多聚赖氨酸(D型, L型)、5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)、4%多聚甲醛、4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)、氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride, TTC)试剂(Sigma公司,美国);胰岛素铁硒传递蛋白(ITSS)(Invitrogen公司,美国);台盼蓝染液PI Staining Solution(Thermo Fisher Scientific公司,美国);BrdU抗体(Abcam公司,美国);层黏连蛋白(Roche公司,瑞士);细胞冻存液(苏州新赛美生物科技有限公司);10%即用型正常山羊血清(武汉博士德公司);苏木素染液、伊红染液(武汉谷歌生物公司);无水乙醇(上海沪试公司);2×Taq Master Mix(南京诺唯赞公司);核酸染料(武汉ABclonal公司);引物序列和磷酸化的寡核苷酸序列由南京金斯瑞公司合成;PBST溶液、Triton X-100(AMRESCO,美国);盐酸溶液、荧光二抗、石蜡、二甲苯、Tris、EDTA、乙醇、琼脂糖(上海英潍捷基公司)。

1.2 方法

1.2.1 琼脂糖凝胶电泳鉴定mfat-1转基因小鼠的基因型

将mfat-1转基因小鼠与C57BL/6J WT小鼠交配繁殖得到子代小鼠。将用于小鼠编号的脚趾剪碎后放入无菌EP管内,加入400 μL裂解液和2.5 μL蛋白酶K(20 mg/mL)后混匀,55℃水浴裂解过夜。向EP管内加入等体积的酚/氯仿,涡旋10~15 s,室温静置3 min。12 000 r/min离心,吸取上层无色水相液体200 μL于新的EP管内。加入2倍体积预冷的无水乙醇,涡旋混匀后,12 000 r/min离心5 min。弃上清,沿管壁加入70%乙醇清洗,重复以上步骤。再将EP管倒扣于吸水纸上,吸干乙醇,加入65℃预热的无菌ddH₂O溶解DNA,分光光度计检测DNA的浓度与纯度。利用NCBI网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)设计靶向mfat-1基因序列的引物,产物大小为438 bp,其中正向引物序列为5'-GGACCTT-GGTGAAGAGCCG-3',反向引物序列为5'-GCCGTC-GCAGAAGCCAAAC-3'。将PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳(120 V, 45 min),使用凝胶成像仪曝光。

1.2.2 HIBD小鼠模型的建立

手术缺血建模:采用改良的Rice-Vannucci模型建立方法,使用2%异氟烷麻醉小鼠。使用剃毛刀将其颈部毛发削除。酒精棉球进行常规消毒后,使用手术刀在颈正中距离下颌线1 cm处作一长约1 cm的切口。在体视显微镜下用眼科镊钝性逐步分离皮下组织及颈前肌群,暴露气管前肌后沿左侧胸锁乳突肌肌腱向下分离可见左侧的颈动脉三角,其内可见搏动的颈总动脉及其伴行的静脉和神经。用眼科镊小心分离左侧颈总动脉避免损伤附近的迷走神经,以免影响小鼠的正常呼吸从而导致死亡。如有少量渗血,可用棉签压迫出血处10 s即可止血,分离颈总动脉后用6-0缝合线双重结扎,并在两个结扎线结中间用维纳斯剪剪断血管。剪去多余的缝合线,保持视野洁净。最后用持针器缝合皮肤切口。每只小鼠手术总时间控制在5 min左右。假手术组仅暴露和分离左侧颈总动脉,既不结扎也不剪断血管。

缺氧建模:术后1 h,小鼠苏醒后将HIBD组放入密闭的低氧舱中。低氧舱中持续通入92%氮气,气体流量控制在2 L/min,使舱内氧气浓度保持为8%。缺氧过程持续50 min,保持舱体温度为37 ℃。缺氧过程中小鼠会出现皮肤青紫,烦躁不安,间歇性全身癫痫,翻身困难,浅快呼吸、昏迷甚至死亡。假手术组则不做缺氧处理。

1.2.3 TTC染色检测脑梗死体积

小鼠深度麻醉后迅速断头取全脑,吸水纸吸干脑表面液体,置于-40 ℃冰箱内冷冻10 min。将冷冻后的大脑组织平放于-20 ℃冷冻台上,用预冷的刀片冠状位切脑片,整个大脑半球(含嗅球)被切成5~6片后放于干燥的血皿内,每片厚度约2 mm。血皿内加入一定体积的2% TTC溶液,以浸没脑片为宜,放入37 ℃温箱内,避光孵育15 min后将脑片翻面,相同条件下继续孵育15 min。吸除血皿内的TTC溶液,加入适量4%多聚甲醛过夜固定组织。拍照,观察脑切片颜色(脑梗死的组织内,脱氢酶活性消失,不能将TTC染色液还原成红色,故呈现苍白色;而有活性的脑组织中含有脱氢酶,可以使TTC还原成红色,故呈现红色)。使用Image J软件计算梗死体积。

1.2.4 小鼠行为学评分

Longa评分具体操作为:将小鼠摆放在地板上,观察小鼠行走能力。评分标准分为5个等级:0分,正常,无神经功能缺损;1分,对侧前爪不能完全伸展,轻度神经功能缺损;2分,行走时,小鼠向瘫痪侧转圈,中度神经功能缺损;3分,行走时,小鼠身体向

瘫痪侧倾倒,重度神经功能缺损;4分,不能自发行走,有意识丧失。

Bederson评分具体操作为:小鼠尾巴被轻轻握住,悬在地板上方1 m处,观察前肢弯曲情况。评估标准分为4个等级:0级,无明显缺陷;1级,前肢屈曲;2级,对侧推力(和前肢屈伸)的抵抗力降低而无盘旋;3级,行为与2级相同,提尾转圈。

1.2.5 小鼠体内干细胞增殖水平检测

灭菌生理盐水溶液作为溶剂配制BrdU溶液(母液浓度为15 mg/mL)。断颈处死前2 h按照300 mg/kg体重的标准进行腹腔注射。灌注过的脑组织置于4%多聚甲醛中固定24 h,经脱水、透明、浸蜡以及包埋制作成组织蜡块,选取小鼠大脑的SVZ区和SGZ区进行冠状面切片,对切片进行常规脱蜡,ddH₂O清洗2次,每次3 min。将石蜡切片放入含有抗原修复液的烧杯中,121 ℃、3 min进行抗原修复。在组织上滴加2 mol/L盐酸37 ℃孵育30 min。弃掉盐酸,用PBS清洗3次,每次10 min。滴加即用型山羊血清室温封闭1 h,移除封闭液,加入BrdU抗体,4 ℃孵育过夜。除去一抗,用PBST清洗切片3次,每次5 min。滴加荧光二抗,孵育1 h。PBST清洗3次,每次5 min,DAPI核染3 min并封片,在荧光显微镜下拍照并计数。

1.2.6 成体神经干细胞体外培养系统的建立

取8~12周龄的mfat-1转基因小鼠及其同窝WT小鼠,通过断颈法处死小鼠,经3%碘酒浸泡3 min,75%酒精漂洗、消毒后,转移至PBS中浸泡冲洗1遍。取无菌剪刀剪去颅骨上的毛发、皮肤,剪开颅骨,仔细剥除脑膜、血管及纤维结缔组织成分,用挖脑勺剥离完整的鼠脑。将剥离的完整鼠脑转移至6 cm无菌的培养皿中,用预冷的PBS清洗2遍。然后转移至新的6 cm无菌的培养皿中,用无菌刀片对鼠脑进行冠状切片。将鼠脑侧脑室室脑膜下区所在的冠状切片用无菌镊子转移至新的6 cm无菌的培养皿中,移入超净台,加入少量预冷的0.01 mol/L DPBS。将上一步获得的鼠脑冠状切片移至体视显微镜下,用无菌眼科显微镊分离侧脑室室脑膜下区的脑组织。将上一步分离获得的侧脑室室脑膜下区的脑组织转移至无菌的1.5 mL离心管中,加入预热的0.1%的胰酶200 μL,用无菌剪刀在超净台上充分剪碎,直至脑组织块大小为1.0 mm左右。将剪碎的脑组织块转移至6孔板中,加入预热的0.1%的胰酶1 mL,37 ℃培养箱中消化30 min。每隔10 min取出用巴士德管轻柔吹打1次,显微镜下观察组织消化情况。将消化好的脑组织块移入无菌的15 mL离

心管中,350 g 离心 5 min,吸弃上清。加入 1 mL 胰酶抑制剂,350 g 离心 5 min,弃上清。加入预热的无血清培养基 1 mL,用 1 mL 无菌枪头温和均匀地吹打至单细胞悬液。在培养初期,培养基采用无血清培养基 (serum-free medium, SFM),每隔 2 d 进行半量换液。在 7 d 左右,神经干细胞可形成神经球,将神经球转移到新的无菌 6 cm 培养皿中继续培养。将第 3 代神经球消化成单细胞悬液,调整密度为 1×10^5 个/mL,接种至多聚赖氨酸 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和层黏连蛋白 (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 等比例混合液预处理的 24 孔板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养。约 2 h 后神经干细胞开始贴壁。2~3 d 后,贴壁神经干细胞长满培养皿开始细胞传代。

1.2.7 Nestin 免疫荧光染色检测成体神经干细胞干性

取培养至第 3 代的干细胞,调整细胞的密度为 1×10^5 个/mL。接种于铺有多聚赖氨酸和层黏连蛋白双包被的无菌玻片的 24 孔板中,继续培养约 8 h。待成体神经干细胞爬片后,吸除 SFM 培养基。用 pH 为 7.4 的无菌 PBS 缓冲液洗涤 3 次,5 min/次。4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的多聚甲醛室温下固定 30 min,无菌 PBS 置于摇床上洗涤 3 次,每次 5 min。2 mol/L 的 HCl 溶液室温孵育 35 min,吸除 HCl 溶液,加入 pH 为 8.5 的 0.1 mol/L 硼酸钠溶液,中和 10 min。无菌 PBS 置于摇床上洗涤 3 次,每次 5 min。加入 0.5% 的 Triton X-100 通透 5 min。吸除通透液,加入 5% 的即用型山羊血清,室温下,放置于摇床上,封闭 1 h。除去山羊血清,加入小鼠抗 Nestin 一抗 (1:500 稀释),先在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,再放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床孵育过夜。吸除一抗,用无菌 PBST 置于摇床上洗涤 3 次,每次 10 min。避光加入 Alexa Fluor 488 标记的羊抗鼠二抗 (1:200 稀释),摇床上室温孵育 1 h。吸除二抗,用无菌 PBST 置于摇床上洗涤 3 次,每次 5 min,避光。加入 DAPI 核染 2 min,暗室中荧光显微镜观察并拍照。

1.2.8 神经干细胞氧糖剥夺/复氧 (oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R) 实验

将生长状态良好的神经球转移至 15 mL 离心管中,200 g 离心 5 min。吸除上清液,加入 0.3 mL 预热的 Accutase 消化酶,轻微吹打神经球,使其与消化酶充分混合。将加入酶的细胞悬液置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的热台上,消化 2~3 min,500 g 离心 5 min。吸除 Accutase 消化液,加入 1 mL SFM 重悬神经干细胞,用微量移液枪温和吹打 60~80 次,使神经球分散为单细胞悬液。将细胞放于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中平衡 30 min,培养基更换为无糖培养基。乏氧袋、细胞连同氧气指示剂一起放入密闭的盒子中,待氧气指示剂颜色发生变

化,即氧浓度约 1% 时开始计时,2 h 后取出细胞,更换为正常培养基,继续培养。

1.2.9 体外神经干细胞增殖能力检测

加入含有 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ BrdU 的 SFM 培养基,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h,吸除培养基,500 μL PBS 漂洗 5 min 3 次,4% 多聚甲醛固定 20 min 后,PBS 再次漂洗 5 min 3 次。加入含有 0.5% 的 Triton X-100 的 PBS 溶液室温下通透 10 min,吸除通透液,加入 PBS 漂洗 3 次。向每孔中加入 2 mol/L 的盐酸溶液,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 30 min 进行 DNA 变性。PBS 漂洗 5 min 3 次,加入山羊血清,室温封闭 1 h 后,加入 BrdU 抗体 (1:1 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。吸除一抗,用 PBST 溶液于摇床上漂洗 5 min 3 次。在避光条件下加入荧光二抗,室温避光孵育 1 h。吸除二抗,于避光条件下用 PBST 溶液于摇床上漂洗 5 min 3 次。荧光显微镜下观察、拍照,计算 BrdU 阳性细胞占总细胞的比例。

1.3 统计学方法

所有数据均使用 GraphPad 软件分析。定量资料数据以均数 \pm 标准误 ($\bar{x} \pm s_x$) 表示,两组数据的比较采用双尾非配对 Student's *t* 检验分析。小鼠的行为学评分对比图采用箱线图展示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功完成 mfat-1 小鼠基因型鉴定并构建 HIBD 模型

凝胶电泳结果显示,泳道 6~10 出现 438 bp 的阳性基因片段 (图 1A),是 mfat-1 转基因阳性的小鼠。通过结扎左侧颈总动脉 (图 1B) 和 8% 的低氧进行 HIBD 造模后,WT 小鼠出现偏瘫 (图 1C)、提尾转圈、精神不振、腹部凹陷等表现,表明造模成功,此时小鼠脑部出现梗死区。

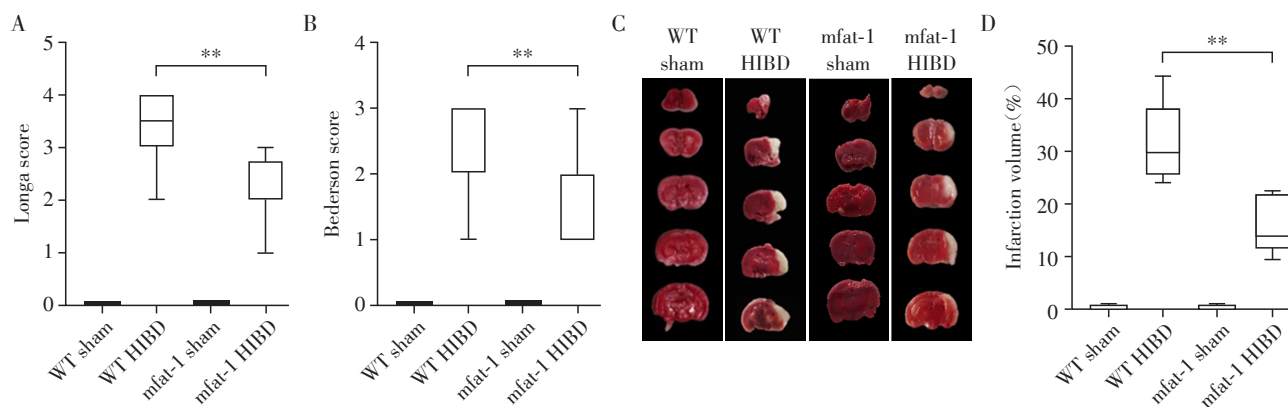
2.2 mfat-1 小鼠行为学改善且脑梗死体积减小

用经典的 Longa 评分和 Bederson 评分评估 HIBD 造模后 24 h 小鼠的神经功能缺损和神经行为表现。如图 2A 所示,作为对照的假手术组中的所有小鼠的神经行为评分等级均为 0 级,显示其神经功能并未缺损。而在 HIBD 造模组中,mfat-1 小鼠的 Longa 评分较野生型低 (2.05 ± 0.69 vs. 3.35 ± 0.75 , $P < 0.01$),mfat-1 组有更好的行为学表现,显示出较弱的神经损伤。图 2B 中的 Bederson 评分也展示了相同的结果 (WT+HIBD 组 2.55 ± 0.60 vs. mfat-1+HIBD 组 1.35 ± 0.59 , $P < 0.01$)。以上结果表明,mfat-1



A: The result of gel electrophoresis of F1 progeny mouse genotype identification showed that the *mfat-1* transgenic fragment amplified by PCR was 438 bp. The “+” lane was the positive control. The “-” lane is the negative control. M stands for DNA marker. B: Ligation the left common carotid artery of mice for HIBD modeling. C: Mice after successful modeling.

图1 *mfat-1*转基因小鼠基因型鉴定及HIBD模型的建立
Figure 1 Identification of *mfat-1* transgenic mice genotypes and the establishment of HIBD model



A: Box plot of Longa scores for different groups (** $P < 0.01$, $n=20$). B: Box plot of Bederson score for different groups (** $P < 0.01$, $n=20$). C: Representative images of TTC-stained cerebral coronal sections of WT sham group, WT HIBD group, *mfat-1* sham group and *mfat-1* HIBD group. D: Box plot of quantitative assessment of cerebral infarction volume in each group (** $P < 0.01$, $n=7$).

图2 HIBD造模后小鼠神经行为表现及脑组织TTC染色
Figure 2 Neurobehavioral performance of mice and TTC staining of adult mouse brain tissue post HIBD

side组的BrdU阳性细胞较WT+injured side组明显增多[(36.33±3.91)个 vs. (28.78±3.19)个, $P < 0.01$, 图3A、B]。表明*mfat-1*转基因小鼠神经干细胞的增殖能力增强,这和*mfat-1*转基因小鼠大脑的损伤修复能力提高密切相关。

2.4 神经干细胞体外培养系统的建立

取8~10周龄小鼠大脑,显微镜下分离出红色框内的SVZ部分(图4A),剪碎,消化,去除胰酶后,加入无血清培养基。12 d后,绝大部分组织细胞死亡,留下的细胞团即为神经干细胞球(图4B),在培养基中悬浮生长;把神经干细胞球处理为单个细胞移入多聚赖氨酸和层黏连蛋白预处理的培养皿中,神经干细胞贴壁生长,形成单层细胞(图4C)。单层培养的细胞使用Nestin这个神经干细胞的标记基因进行免疫荧光,结果显示分离培养的细胞大部分呈现

小鼠具有较轻的神经功能缺损以及更好的运动协调和维持平衡的能力。

WT+HIBD组小鼠左颈总动脉结扎,在8% O₂和37 °C下缺氧50 min,小鼠结扎侧出现明显脑梗死区域,WT sham组与*mfat-1* sham组未出现脑梗死。而同窝*mfat-1*转基因小鼠同样条件进行造模之后,脑梗死体积显著减小(图2C)。对梗死区域体积占总脑体积百分比进行统计。WT+HIBD组及*mfat-1*+HIBD组梗死区域体积占比分别为(31.48±3.52)%和(16.07±2.52)%($P < 0.01$,图2D)。该结果表明*mfat-1*转基因小鼠HIBD后脑梗死程度明显降低。

2.3 *mfat-1*转基因小鼠神经干细胞增殖能力增强

免疫组织化学和定量分析显示,*mfat-1*+injured

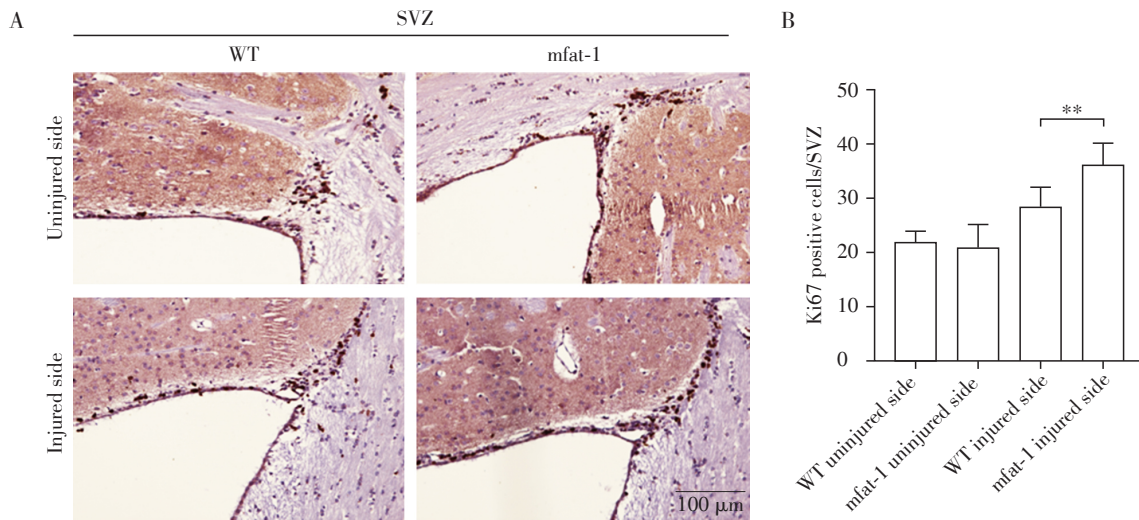
Nestin阳性,说明该细胞为神经干细胞(图4D~F)。

2.5 体外干细胞增殖能力的检测

对体外培养的单层贴壁生长的神经干细胞进行OGD/R造模,利用BrdU抗体进行免疫荧光,荧光显微镜下观察并拍照(图5A),计算BrdU阳性细胞占总细胞的比例(图5B)。定量分析表明,造模后野生型小鼠神经干细胞增殖能力较未造模组有所增强[(27.54±3.52)% vs. (73.00±4.82)%, $P < 0.01$],*mfat-1*转基因小鼠来源的神经干细胞在造模后增殖能力较WT造模组增强[(61.83±4.83)% vs. (73.00±4.82)%, $P < 0.01$],与小鼠的体内实验结果是一致的。

3 讨论

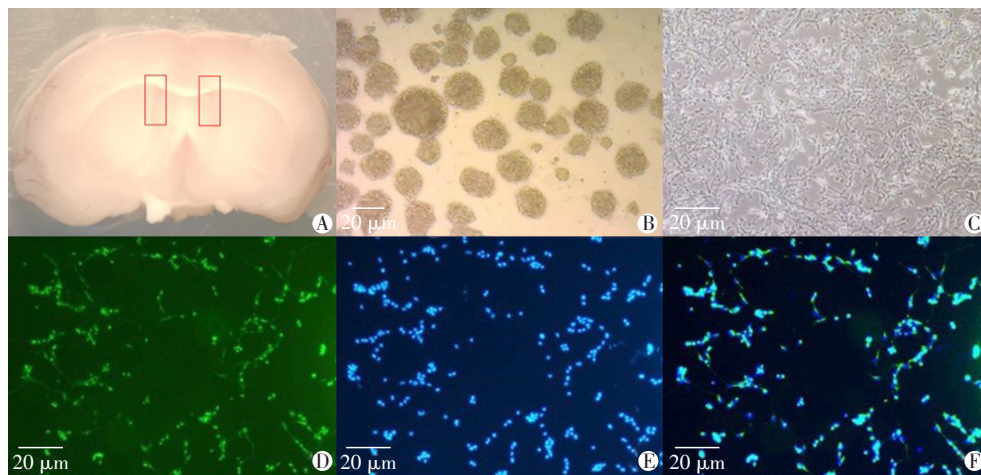
已有不少研究发现脑卒中以后侧脑室的脑室下带和海马的颗粒下带这两个成年哺乳动物脑内



A: Immunohistochemical results of BrdU in SVZ region on injured and uninjured sides after HIBD modeling in WT and mfat-1 mice (Scale bar=100 μm). B: Corresponding quantitative results (* $P < 0.01, n=10$).

图3 mfat-1转基因小鼠神经干细胞增殖能力增强

Figure 3 The proliferation ability of neural stem cells in mfat-1 transgenic mice is enhanced



A: Diagram of the mouse subventricular region for isolation of adult neural stem cells ($\times 10$). B: Suspension cultured nerve balls. C: Adherent monolayer neural stem cells. D: Nestin (green). E: DAPI (blue). F: Merge (B-F; Scale bar=20 μm).

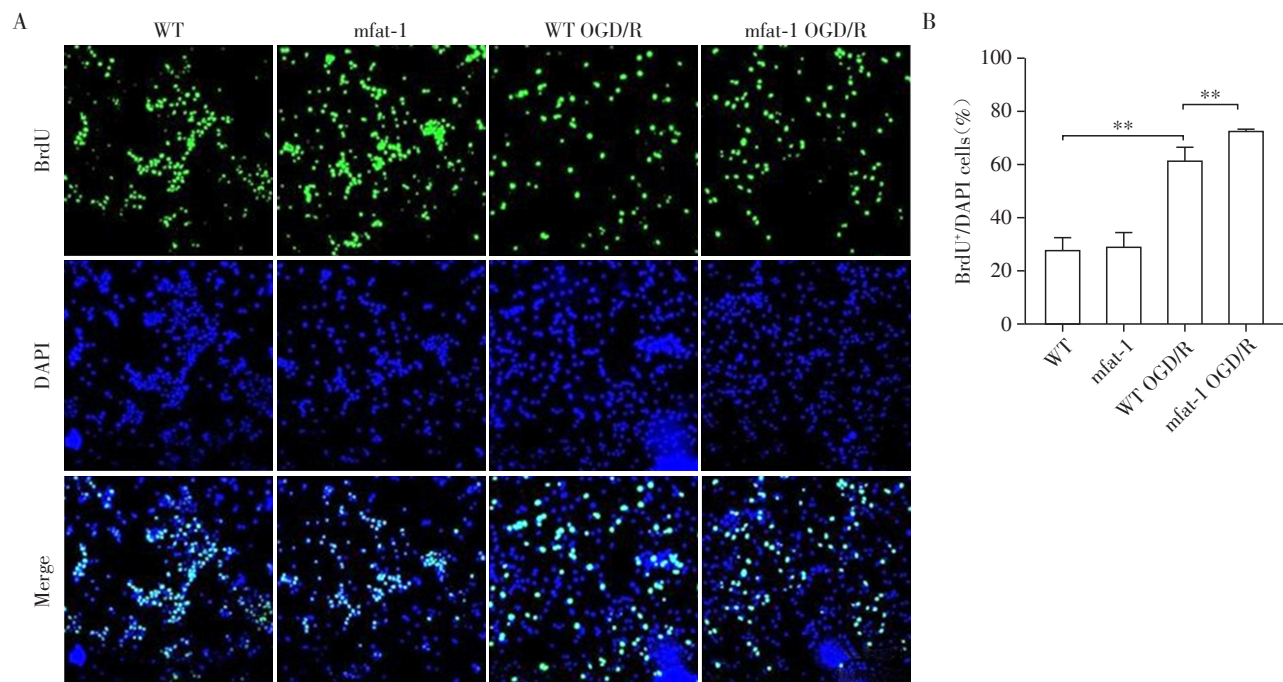
图4 小鼠神经干细胞体外培养

Figure 4 Immunofluorescence and morphological observation of neural stem cells cultured *in vitro*

的神经元生发区存在短暂但明显的干细胞增殖，以及干细胞沿新生的微血管向同侧受损部位迁移并分化的现象^[14]。然而，新生神经元数量少、存活时间较短，并且对于老龄患者，新生神经元数目会进一步减少，迁移率更低^[15-17]，对于神经损伤的修复是远远不够的。为促进神经损伤的修复，近年来的研究着重于促进新生神经元的数目及存活，由此干细胞疗法应运而生。该方法主要通过激活内源性的神经干细胞或者移植外源性的神经干细胞两个途径来达到治疗目的^[18]，但都有着各自的局限性。n-3 PUFA近年来频繁见于临床报道，在神经系

统病理恢复方面发挥着重要作用。人类内源性n-3 PUFA含量极低，需要从食物中补充^[19]。

1997年华盛顿大学 Spsychalla 从秀丽隐杆线虫 *C.elegans* 的基因组中获得了 fat-1 基因，该基因的翻译产物是 n-3 PUFA 脱氢酶，此酶能够以 n-6 PUFA 为底物进行脱氢反应生成相应的 n-3 PUFA，以此来提高 n-3 和 n-6 PUFA 比例^[20]。本研究所使用的动物是课题组利用转基因技术制备的第2代 fat-1 转基因小鼠，首先将 fat-1 基因的密码子进行了利于在哺乳动物体内进行有效表达的优化，然后置于巨细胞病毒增强子与鸡β-肌动蛋白启动子之后，通过原核显



A: Immunofluorescence of BrdU before and after OGD/R modeling in cultured neural stem cells derived from the *mfat-1* mice and WT mice (Scale bar=20 μ m). B: Corresponding quantitative results (** $P < 0.01$, $n=6$).

图5 *mfat-1* 转基因小鼠体外培养干细胞增殖能力增强

Figure 5 Enhanced proliferation capacity of cultured neural stem cells from *mfat-1* transgenic mice

微注射引入 C57BL/6J 小鼠,因此新构造的小鼠也被称为“*mfat-1* 转基因小鼠”。*mfat-1* 转基因小鼠实现了稳定且高效提高体内 n-3 PUFA 和 n-6 PUFA 比例的目的^[21],该转基因鼠的使用不仅排除了喂养时复杂的成分干扰还避免了长时间的饲料喂养,较以往通过喂食的方式创造了更稳定的研究环境。

虽然 n-3 PUFA 在中枢神经系统中发挥重要作用,但其在 HIBD 后的神经修复作用及具体机制尚不清楚。现有证据表明, n-3 PUFA 可以通过免疫调节、抗炎和抗氧化起到神经保护的作用^[22-25]。但是目前仍缺乏从神经发生的角度对 *mfat-1* 基因促进缺血性脑卒中损伤修复机制的研究。本课题组主要通过体内、体外两种研究手段,分别模拟大脑缺氧缺血损伤后对干细胞的增殖情况,得到在缺氧缺血条件下, *mfat-1* 转基因小鼠可以通过促进神经干细胞增殖修复 HIBD 的结论。

本研究尚存在不足:首先,小鼠成体的神经发生不仅存在于 SVZ 区域,还存在于 SGZ 区域的齿状回区域,在接下来的研究中将针对 SGZ 区域开展体内、体外的研究,以及更多和海马区密切相关的行为学测试。其次,神经发生不仅包括从神经干细胞增殖、经历均衡和不均衡性分裂成为定向祖细胞,还包括增殖的干细胞逐渐向功能区域迁移、不断

发生可塑性变化并与其他神经元建立突触联系从而产生神经功能的完整过程。本研究还未能从迁移、分化以及更后期的功能整合来开展工作,这也是后续的研究重点。最后, *mfat-1* 转基因通过促进神经发生修复 HIBD 这一过程背后存在的具体分子机制,也是在接下来的研究中计划详细探讨的内容。

利用 *mfat-1* 转基因的神经干细胞开展移植实验,可以将该研究课题成果更好地向临床转化。例如可针对缺血性脑卒中患者进行 *mfat-1* 转基因修饰的神经干细胞移植治疗,以提升相应脑区移植神经干细胞的缺氧耐力、存活率,促进移植神经干细胞分化、成熟及与宿主神经元形成神经环路的能力,以此促进脑损伤的修复,为神经干细胞疗法提供更多的可能性。

综上,本研究通过体外培养的神经干细胞 OGD/R 造模以及小鼠 HIBD 模型,揭示了 *mfat-1* 转基因小鼠通过促进成体干细胞的增殖能力修复 HIBD,为 HIBD 提供了更多有效的预防和治疗手段。

[参考文献]

- [1] LI C, WU Z Y, XUE H, et al. Ferroptosis contributes to hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats: Role of

- the SIRT1/Nrf2/GPx4 signaling pathway[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2022, 28(12): 2268–2280
- [2] TUO Q Z, ZHANG S T, LEI P. Mechanisms of neuronal cell death in ischemic stroke and their therapeutic implications[J]. *Med Res Rev*, 2022, 42(1): 259–305
- [3] SUN X M, WANG Y N, ZHAO Y C, et al. Activation of the Epac/Rap1 signaling pathway alleviates blood-brain barrier disruption and brain damage following cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 117: 110014
- [4] CHEN A D, CHEN X H, DENG J H, et al. Research advances in the role of endogenous neurogenesis on neonatal hypoxic - ischemic brain damage [J]. *Front Pediatr*, 2022, 10: 986452
- [5] ZHANG R J, LIU H N, PU L Y, et al. Global burden of ischemic stroke in young adults in 204 countries and territories[J]. *Neurology*, 2023, 100(4): e422–e434
- [6] CHEN X R, WU S K, CHEN C N, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation attenuates microglial-induced inflammation by inhibiting the HMGB1/TLR4/NF- κ B pathway following experimental traumatic brain injury[J]. *J Neuroinflammation*, 2017, 14(1): 143
- [7] ELAGIZI A, LAVIE C J, O'KEEFE E, et al. An update on omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular health[J]. *Nutrients*, 2021, 13(1): 204
- [8] LIN L, ZHENG S R, LAI J Q, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids protect neurological function after traumatic brain injury by suppressing microglial transformation to the proinflammatory phenotype and activating exosomal NGF/TrkA signaling[J]. *Mol Neurobiol*, 2023, 60(10): 5592–5606
- [9] GENG X, WANG M, LENG Y J, et al. Protective effects on acute hypoxic-ischemic brain damage in mfat-1 transgenic mice by alleviating neuroinflammation [J]. *J Biomed Res*, 2021, 35(6): 474–490
- [10] LI X X, ZHANG Y M, CHANG J H, et al. Mfsd2a attenuated hypoxic-ischemic brain damage *via* protection of the blood-brain barrier in mfat-1 transgenic mice [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2023, 80(3): 71
- [11] KIM T A, SYTY M D, WU K, et al. Adult hippocampal neurogenesis and its impairment in Alzheimer's disease[J]. *Zool Res*, 2022, 43(3): 481–496
- [12] BOLDRINI M, FULMORE C A, TARTT A N, et al. Human hippocampal neurogenesis persists throughout aging [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 22(4): 589–599.e5
- [13] MORENO-JIMENEZ E P, TERREROS-RONCAL J, FLOR-GARCIA M, et al. Evidences for adult hippocampal neurogenesis in humans [J]. *J Neurosci*, 2021, 41(12): 2541–2553
- [14] RAHMAN A A, AMRUTA N, PINTEAUX E, et al. Neurogenesis after stroke: a therapeutic perspective [J]. *Transl Stroke Res*, 2021, 12(1): 1–14
- [15] SORRELLS S F, PAREDES M F, CEBRIAN-SILLA A, et al. Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults [J]. *Nature*, 2018, 555(7696): 377–381
- [16] SPALDING K L, BERGMANN O, ALKASS K, et al. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans [J]. *Cell*, 2013, 153(6): 1219–1227
- [17] TERREROS-RONCAL J, FLOR-GARCÍA M, MORENO-JIMÉNEZ E P, et al. Methods to study adult hippocampal neurogenesis in humans and across the phylogeny [J]. *Hippocampus*, 2023, 33(4): 271–306
- [18] LUTFI ISMAEL G, MAKKI ALHASSANI O J, SALAZRAGI R, et al. Genetically engineered neural stem cells (NSCs) therapy for neurological diseases; state-of-the-art [J]. *Biotechnol Prog*, 2023, 39(5): e3363
- [19] MURRAY M. Omega-3 polyunsaturated fatty acid derived lipid mediators: a comprehensive update on their application in anti-cancer drug discovery [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2024, 19(5): 617–629
- [20] ZHANG C Y, WANG X J, SUN S P, et al. Fat-1 expression alleviates atherosclerosis in transgenic rabbits [J]. *J Cell Mol Med*, 2022, 26(4): 1306–1314
- [21] LIEBIG M, DANNENBERGER D, VOLLMAR B, et al. Endogenously increased n-3 PUFA levels in fat-1 transgenic mice do not protect from non-alcoholic steatohepatitis [J]. *Hepatobiliary Surg Nutr*, 2019, 8(5): 447–458
- [22] BUS I D, WITKAMP R, ZUILHOF H, et al. The role of n-3 PUFA-derived fatty acid derivatives and their oxygenated metabolites in the modulation of inflammation [J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2019, 144: 106351
- [23] CALDER P C. New evidence for efficacy of marine-sourced n-3 fatty acids in postoperative patients [J]. *Am J Clin Nutr*, 2024, 119(4): 865–867
- [24] ZOU H Y, ZHANG H J, ZHAO Y C, et al. N-3 PUFA deficiency aggravates streptozotocin-induced pancreatic injury in mice but dietary supplementation with DHA/EPA protects the pancreas *via* suppressing inflammation, oxidative stress and apoptosis [J]. *Mar Drugs*, 2023, 21(1): 39
- [25] JOFFRE C, DINEL A L, CHATAIGNER M, et al. N-3 polyunsaturated fatty acids and their derivatives reduce neuroinflammation during aging [J]. *Nutrients*, 2020, 12(3): 647

[收稿日期] 2024-04-30

(本文编辑: 蒋 莉)