

分类号: R743.33

密级: 公开

U D C: 616.8

编号: 2019217567



廣州醫科大學

碩士學位論文

神經幹細胞定向分化 GABA 能神經元 治療腦橋梗死的研究

研究生: 唐祥月

導 師: 姜永軍 副教授

申請學位類別:	醫學碩士	年 級:	二〇一九級
學 科 專 業:	神經病學	研 究 方 向:	腦血管病
論文提交日期:	二〇二二年五月	論文答辯日期:	二〇二二年六月
學 位 類 型:	學術型	學位授予單位:	廣州醫科大學

二〇二二年六月

学位论文独创性声明

本人郑重声明：所提交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。文中依法引用他人的成果、对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中做出明确标注或得到许可。论文内容未包含法律意义上已属于他人的任何形式的研究成果，也不包含本人已用于其他学位申请的论文或成果。

本人如违反上述声明，愿意承担以下责任和后果：

1. 交回学校授予的学位证书；
2. 学校可在相关媒体上对作者本人的行为进行通报；
3. 本人按照学校规定的方式，对因不当取得学位给学校造成的名誉损害，进行公开道歉。
4. 本人负责因论文成果不实产生的法律纠纷。

论文作者签名： 唐祥月 日期： 2022年 6月 6日

学位论文知识产权权属声明

本人在导师指导下所完成的论文及相关的职务作品，知识产权归属广州医科大学及附属单位。广州医科大学及附属单位享有以任何方式发表、复制、公开阅览、借阅以及申请专利等权利。本人离校后发表或使用学位论文或与该论文直接相关的学术论文或成果时，署名单位仍然为广州医科大学及附属单位。任何其他收存和保管本论文的单位和个人，未经本论文作者、导师授权，不得将本论文转借他人、复制、抄录或以其他方式传播，否则，引起有碍作者的著作权益问题，将会追究相应的法律责任。

论文作者签名： 唐祥月 日期： 2022年 6月 6日

导师签名： 姜玉峰 日期： 2022年 06月 07日

学位论文使用授权声明

1. 学校可以保留本论文的原件及复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库，可以采用影印、缩印或扫描等复印手段保存、汇编学位论文；

2. 本人授权学校向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。

本学位论文属于（请在以下相应方框内打“√”）：

1. 保密 ，在 ___ 年 ___ 月解密后适用本授权书。
2. 不保密 。

论文作者签名： 唐祥月 日期： 2022年 6月 6日

导师签名： 姜玉峰 日期： 2022年 06月 07日



廣州醫科大學
硕士学位论文

神经干细胞定向分化 GABA 能神经元
治疗脑桥梗死的研究

Differentiation of exogenous neural stem cells into
GABAergic neurons treating pontine infarction

研究生： 唐祥月
学 号： 2019217567
专业名称： 神经病学
导 师： 姜永军副教授
导师单位： 广州医科大学附属第二医院

论文答辩委员会成员（签名）：

二〇二二年六月

目 录

中英文缩略词	I
中文摘要	1
Abstract.....	3
前 言.....	5
1 材料与amp;方法	7
2 结 果.....	19
3 讨 论.....	39
4 结 论.....	42
参考文献	43
综 述.....	47
硕士期间发表的论文	61
致 谢.....	62

中英文缩略词

缩略词	英文全称	中文名称
AAV2/1	Adeno-associated virus	2/1 型腺相关病毒
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor	脑源性神经营养因子
Dlx 2	Distal-less homeobox 2	无远端同源盒转录因子 2
ET-1	Endothelin 1	内皮素-1
HoxB1	Homeobox B1	同源盒基因 B1
HE	Hematoxylin-eosin staining	苏木精-伊红染色
IF	Immunofluorescence	免疫荧光
MCAO	Middle cerebral artery occlusion	大脑中动脉闭塞
MRI	Magnetic resonance image	磁共振成像
mRNA	Messenger RNA	信使 RNA
NSC	Neural stem cell	神经干细胞
OGD	Oxygen and glucose deprivation	氧糖剥夺
Olig2	Oligodendrocyte Transcription Factor 2	少突胶质细胞转录因子 2
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
PI	Pontine infarction	脑桥梗死
qRT-PCR	Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction	实时定量逆转录聚合酶链 反应
ROS	Reactive oxide species	活性氧簇
SGZ	Subgranular zone	海马亚颗粒区
SVZ	Subventricular zone	脑室下区
TrkB	Tyrosine kinase receptor B	酪氨酸激酶受体 B

神经干细胞定向分化 GABA 能神经元 治疗脑桥梗死的研究

研究生：唐祥月

导师：姜永军 副教授

中文摘要

【背景】

在后循环梗死中，脑桥梗死 (Pontine infarction, PI) 最为多发。受损神经网络的自发恢复和再生有限，造成不可逆的组织损伤和神经元丢失，大多数患者表现为持续的神经功能障碍。目前许多临床前研究已经在动物模型中使用神经干细胞(Neural stem cells, NSCs) 治疗前循环梗死。然而，由于与前循环梗死在解剖、病理生理机制等方面存在较大的差异，脑桥梗死后 NSCs 的应用仍面临许多挑战。

【目的】

研究基因修饰过表达 BDNF 和 Dlx2 的外源性 NSCs 移植后能否提高存活率以及向 GABA 能神经元的分化率，并进一步探索移植源性神经元是否与宿主神经回路整合并重建受损神经回路。

【方法】

通过注射内皮素的方法建立小鼠脑桥梗死模型；病毒转染基因修饰 NSCs，采用免疫荧光、TUNEL、跨突触病毒追踪、全细胞膜片钳记录、磁共振成像和行为学测试等方法检测脑桥梗死的病理生理变化和移植 NSCs 的治疗前景。

【结果】

1. 脑桥梗死同侧运动传导通路中断。
2. 脑桥梗死区未见内源性 NSCs 原位生成或迁移而来。
3. BDNF 过表达可促进移植 NSCs 存活和向神经元分化，而 BDNF 受体 TrkB 的缺失则相反。此外，共同过表达 Dlx2 可促进 NSCs 向 GABA 能神经元分化，与宿主神经回路在形态学和功能上整合，减少梗死面积，显著提高神经功能评分。

【结论】

脑桥梗死后内源性 NSCs 无原位生成或迁移而来；过表达 BDNF 和 Dlx2 可促进外源性 NSCs 分化为有功能的 GABA 能神经元，整合并重建宿主受损神经回路，促进脑桥梗死小鼠神经功能恢复。

【关键词】脑桥梗死，神经干细胞，BDNF，Dlx2，GABA 能神经元

Differentiation of exogenous neural stem cells into GABAergic neurons treating pontine infarction

Postgraduate: Xiangyue Tang

Tutor: Prof. Yongjun Jiang

Abstract

Introduction

Pontine infarction(PI) is the most common type of posterior circulation infarction. Spontaneous recovery and regeneration of damaged neural networks are limited, resulting in irreversible tissue damage and neuron loss, and most patients present with persistent neurological dysfunction. Many preclinical studies have used neural stem cells (NSCs) to treat anterior circulation infarction in animal models. However, there are still many challenges in the application of NSCs after PI due to the differences in anatomy and pathophysiological mechanism between PI and anterior circulation infarction.

Objective

To investigate whether exogenous NSCs with genetically modified expression of BDNF and Dlx2 can improve survival rate and differentiation rate into GABAergic neurons after transplantation, and further explore whether transplant-derived neurons can integrate with host neural circuits and rebuild damaged neural circuits.

Methods

We established a mouse model of PI by injecting endothelin into right pons. Genetically modified NSCs were introduced to treat PI. Immunostaining, TUNEL, Trans-synaptic virus tracking, whole-cell patch clamp recordings, MRI and behavioral tests were applied to detect the pathophysiology of PI and the treatment prospects of grafted NSCs.

Results

1. Ipsilateral motor pathway of PI was interrupted.
2. There was no in situ generation or migration of endogenous NSCs in the infarction area of pons.
3. BDNF overexpression promoted the survival rate and neuronal differentiation of graft-derived NSCs, while the loss of BDNF receptor TrkB was the opposite. In

addition, co-overexpression of Dlx2 promoted the differentiation of NSCs into GABAergic neurons, which was integrated with the host neural circuits in morphology and function, and reduced infarct size and significantly improved neurological function scores.

Conclusion

Endogenous NSCs did not proliferate or migrate in situ after PI. Overexpression of BDNF and Dlx2 can promote the differentiation of exogenous NSCs into functional GABAergic neurons, integrate and rebuild the damaged neural circuits of the host, and promote the recovery of neural function in PI mice.

[Key words]: Pontine infarction, Neural stem cells, BDNF, Dlx2, GABAergic

前言

缺血性脑卒中是全球三大致死疾病之一，引起不可逆的组织损伤和神经元丢失，从而导致神经功能缺损。在所有后循环梗死当中，73.3~81.8%位于脑桥^[1]。脑桥主要由纵行和横行神经纤维束组成，在感觉和运动传导中起着重要作用。因此，脑桥梗死后神经回路的重建是恢复的关键。神经可塑性和神经回路的重组有助于不同程度的自发恢复，但难以重建受损的神经网络，临床上大多数患者仍表现出持续的运动、感觉功能障碍。

许多临床前研究已经使用神经干细胞(Neural stem cells, NSCs)治疗缺血性卒中动物模型。NSCs 是一类具有分化潜能和自我更新能力的细胞，兼有免疫原性低、组织相容性好等特点，可分化为神经元以恢复受损的神经回路^[2, 3]。因此，在临床前研究中，NSCs 已被用于治疗许多神经系统疾病，如脊髓损伤^[4, 5]。虽然有很多研究尝试用 NSCs 治疗前循环梗死，但尚无治疗脑桥梗死的报道^[6-8]。

目前主要有内源性和外源性 NSCs 治疗两种方法，最好的治疗策略是激发内源性 NSCs，可降低外源性 NSCs 移植带来的风险，如移植的不良影响等。成年哺乳动物大脑内源性 NSCs 主要分布在海马亚颗粒区(Subgranular zone, SGZ)、侧脑室周围的脑室下区(Subventricular zone, SVZ)^[6-8]。正常情况下，体内内源性 NSCs 处于静止、未分化的休眠状态，并在干细胞池中保持动态平衡。一旦受到脑缺血损伤等外界刺激，其可被激活增殖和迁移到梗死区，并分化成神经元和胶质细胞^[9-11]，可补充丢失的神经元以修复神经回路。另外，通过营养支持、调节炎症反应等以改善缺血缺氧微环境，可加快神经功能恢复^[12]。然而，SGZ 或 SVZ 与脑桥之间存在较长的距离，脑桥梗死后是否有原位或迁移而来的内源性 NSCs 尚不清楚。

通常内源性 NSCs 被诱导激活的数量非常有限，且大部分分化为胶质细胞^[13]，受损脑组织神经功能恢复仍较差^[14, 15]。目前，脑卒中后外源性 NSCs 移植已被证实可修复组织缺损和促进功能恢复。大量研究评估了外源性 NSCs 移植在缺血性脑卒中动物模型的治疗效果和安全性^[16, 17]。Lees 等人^[18]和 Vu 等人^[19]使用 Meta 分析来评估干细胞移植(包括 NSCs)的疗效。NSCs 移植后，脑缺血动物的神经功能得到明显改善，脑梗死体积减小^[18, 19]。另外，外源性 NSCs 治疗没有发现重大的安全问题。

移植 NSCs 对缺血性脑损伤的修复机制主要包括以下几个方面^[5, 20-23]: 一、外源性 NSCs 通过分化以细胞替代作用补充丢失的宿主神经元, 更为重要的是, 移植源性神经元可形成突触结构, 具有电活动, 整合并重建受损的神经回路; 二、移植的 NSCs 通过分泌神经营养因子或抗炎因子等以改善缺血区域周围炎症免疫微环境。三、移植的 NSCs 可激活更多的内源性细胞来修复神经损伤。

对于 NSCs 治疗脑桥梗死, 仍存在一些挑战。首先, 梗死后不良微环境由活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 和促炎因子组成, 不仅降低了迁移而来的内源性或移植 NSCs^[24]的生存率, 并且增加了向星形胶质细胞分化的比例^[25, 26]。因此, 提高 NSCs 的存活率和向神经元的分化率成了必须解决的两大难题。许多研究试图通过改善移植微环境, 通过调节 NSCs 基因表达水平以促进移植后 NSCs 存活和向神经元分化, 其中一种较为有效的办法是通过基因修饰 NSCs, 使其过表达脑源性神经营养因子(Brain-derived neurotrophic factor, BDNF)。BDNF 在神经系统中广泛表达, 可促进神经细胞的存活和分化^[25], 目前已被证实可以改善小鼠前循环梗死模型中 NSCs 的生存^[27, 28]。然而, 脑桥梗死后的病理生理机制与前循环有很大不同, BDNF 能否挽救移植的 NSCs 尚不清楚。其次, 脑桥神经元以 GABA 能神经元或中间神经元为主, 移植 NSCs 能否弥补丢失的 GABA 能神经元尚不清楚。同源框蛋白 Dlx2 是 Distal-less 家族成员, 是一种促进中间神经元 GABA 合成、突触发生和树突发生的转录因子^[29]。在人多能干细胞中, Dlx2 与 ASCL1 共同过表达可产生纯 GABA 能神经元^[30]。最后, NSCs 来源的神经元是否能与宿主脑桥神经网络整合也尚未得到证实。

在本研究中, 我们通过基因修饰 NSCs 以过表达 BDNF 和 Dlx2, 以此研究 NSCs 移植后能否提高存活率以及向 GABA 能神经元的分化率, 并进一步探索移植源性神经元是否整合并重建宿主受损神经回路, 最后评估 NSCs 移植能否改善脑桥梗死小鼠的神经功能。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物来源

本课题使用成年雄性 C57 小鼠 (6-8 周), 由辽宁长生生物技术股份有限公司 (许可证 NO.SCXK (辽) 2020-0001) 提供。术前饲养 7 天, 环境温度控制在 25 °C, 相对湿度 65%, 12/12 h 明暗循环饲养, 给予充足食物和水。所有实验动物均按实验动物处理要求进行处理。本实验经广州医科大学第二附属医院机构动物护理与使用委员会审核批准。

1.1.2 实验设备

超净工作台	博进, 上海
荧光倒置显微镜	Nikon, 日本
移液器	Thermofisher, 美国
低速离心机	湘仪, 中国
激光共聚焦显微镜(Leica SP8)	Leica, 美国
低温摇床	Thermofisher, USA
电子天平(T-200)	JM, 中国
小动物核磁共振成像系统	Bruker, 德国
高速离心机	Eppendorf, 德国
恒温生化培养箱	泰宏, 中国
超低温冰箱	Thermofisher, USA
PCR 仪	Bio-Rad, 美国
三气培养箱	REVCD, 美国
Leica 光学显微镜	Leica, 德国
高压蒸汽灭菌器	勤诚, 北京
荧光显微镜	Nikon, 日本
立体定位仪	瑞沃德, 深圳

1.1.3 实验试剂

TUNEL 试剂盒	凯基生物, 中国
RNA 逆转录试剂盒	Takara, 日本
细胞培养基 DMEM	Gibco, 美国
青霉素/链霉素双抗	Gibco, 美国
胎牛血清 FBS	Gibco, 美国
B27	Gibco, 美国
FGF	PeptoTech, 美国
EGF	PeptoTech 美国
pAAV-hSyn-mCherry-3XFLAG-WPRE	OBIO, 中国
pSLenti-EF1-EGFP-F2A-Puro-CMV-HA-Bdnf-WPRE	OBIO, 中国
pSLenti-EF1a-EGFP-F2A-Puro-CMV -MCS	OBIO, 中国
pSLenti-U6-shRNA(TrKB)-CMV-EGFP-F2A-Puro-WPRE	OBIO, 中国
pSLenti-U6-shRNA(NC2)-CMV-EGFP-F2A-Puro-WPRE	OBIO, 中国
pSLenti-EF1-EGFP-F2A-Puro-CMV-HA-Bdnf-P2A-Dlx2-WPRE	OBIO, 中国
抗 NeuN 抗体	Abcam, 美国
抗 GFAP 抗体	Abcam, 美国
抗 Nestin 抗体	Abcam, 美国
抗 Ki67 抗体	Abcam, 美国
抗 β Tubulin 抗体	Abcam, 美国
抗 BDNF 抗体	Abcam, 美国
抗 TrKB 抗体	Santa Cruz, 美国
抗ChAT抗体	Abcam, 中国
抗 GAD65+67 抗体	Abcam, 美国
抗 MNDAR 抗体	Abcam, 美国
抗 PSD95 抗体	Cell-Signaling Tech, 美国

抗 Synapsin 抗体	Santa Cruz, 美国
抗 MBP 抗体	Proteintech, 美国
驴抗兔 488 IgG 抗体	Cell-Signaling Tech, 美国
驴抗鼠 594 IgG 抗体	Cell-Signaling Tech, 美国
苏木素/伊红染液	Sigma-Aldrich, 德国

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠脑桥梗死模型

- 1) 用氯胺酮(100 mg/kg)/噶嗪(10 mg/kg) 诱导麻醉;
- 2) 将小鼠放置在立体定位仪内, 小鼠面罩和耳杆固定, 用异氟醚 (95% 氧 + 5% 异氟醚, RWD 公司)维持麻醉;
- 3) 在双侧外眦连线中点至后囟后 0.6 cm 作 1 cm 切口;
- 4) 在前囟后侧 5.2 mm, 中线右侧 0.5 mm 为定位坐标, 用颅骨钻开一小孔;
- 5) 将汉密尔顿微量注射器置入脑组织内部距颅骨表面 6 mm 处;
- 6) ET-1 (200 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 以 0.25 $\mu\text{l}/\text{min}$ 注射 2 μl ;
- 7) 注射完成后在原处放置 5 min, 然后从鼠脑中取出;
- 8) 缝合切口, 腹腔注射青霉素后放回原鼠笼。

1.2.2 MCAO 模型

- 1) 利用线栓法制作大脑中动脉梗塞模型 (tMCAO)^[31];
- 2) 小鼠麻醉后, 维持肛温 37 $^{\circ}\text{C}$ 情况下, 取颈部正中切口, 在手术显微镜下仔细显露右侧颈总动脉 (CCA)、颈外动脉 (ECA) 和颈内动脉 (ICA);
- 3) 将 6-0 硅涂层纤维 (Doccol 公司, Redlands, CA, USA) 引入颈动脉, 并进入颈总动脉分叉 9-12 mm 处的 ICA。留置 60 min, 取下再灌注。多普勒血流检测记录血流量降至基线的 30 % 或者以下, 认为卒中模型成功。

1.2.3 行为学评分

采用肢体放置试验评估本体感觉, Voetsch 评分评估椎基底系统感觉运动能力。

1.2.3.1 肢体放置试验

与先前的报道一样^[32], 以下 6 个试验均可测评前肢, 试验 4 和试验 6 评测后肢, 一侧躯体最高 16 分。

0分：无放置；

1分：不完全或延迟(大于 2s)放置；

2分：立刻正确放置。

试验 1：缓慢将小鼠从距桌面 10 cm 高处放于桌面。正常表现为前肢伸展并放在桌面上。

试验 2：将小鼠前肢接触桌缘，使头向上 45°，正常表现为用下颌支持以防鼻子和鼻毛接触桌面。

试验 3：将小鼠面对桌缘，观察前肢如何放置，正常状态下双前肢放于桌面。

试验 4：将小鼠一侧身体移动向桌缘，观察前后肢放置情况。

试验 5：将小鼠从后向前推向桌缘，正常状态下小鼠抓住桌缘，病变小鼠前肢掉落。

试验 6：与实验 5 操作方法相同，但将小鼠向后桌缘推。

1.2.3.2 改良 Voetsch 神经功能评分

Voetsch 评分是一项椎-基底系统感觉运动能力评分，包含 14 个参数，每个参数的得分范围为 0(完全神经功能缺损)到 3(无神经功能缺损)，总分为 42 分^[33]。

1) 将小鼠放在 50 cm × 40 cm 的桌面，让其自由活动 5 min。观察其头部的自发运动：向所有方向转动，3 分；偏向一边，2 分；只转向一侧，1 分；固定在单侧，0 分；

2) 将小鼠放在 50 cm × 40 cm 的桌面，让其自由活动 5 min。活动完全正常，3 分；活动稍有下降，2 分；活动明显降低，1 分；昏迷，0 分；

3) 观察头尾向转圈：向双侧转圈，3 分；偏向一侧，2 分；仅限一侧，1 分；跌在一侧，0 分；

4) 前肢运动评估：双侧对称运动，3 分；轻微不对称，2 分；明显不对称，1 分；瘫痪，0 分；

5) 四肢运动评估：双侧对称运动，3 分；轻微不对称，2 分；明显不对称，1 分；瘫痪，0 分；

6) 当小鼠静止时，捏耳刺激耳廓，测试疼痛反射：迅速离开刺激，3 分；缓慢远离刺激，2 分；对疼痛产生反应，1 分；无反应，0 分；

7) 当小鼠静止时，在其身体两侧发出响声以测试听力：对手指摩擦有反应，3 分；对打响指有反应，2 分；对响亮的掌声有反应，1 分；无反应，0 分；

8) 用钝棒分别触碰小鼠两侧的触须, 观察其对刺激的反应: 触碰时有反应, 3分; 触碰时一侧反应减弱, 2分; 两侧减少, 1分; 无反应, 0分;

9) 评估躯干轴向感觉, 用钝棒分别从小鼠两侧尾部向头部划过, 观察其对刺激的反应: 对刺激的轻快、对称反应, 3分; 轻微减弱或不称反应, 2分; 明显降低和不称反应, 1分; 无反应, 0分;

10) 测试角膜反射, 抓握小鼠, 用棉签触碰角膜两侧: 双眼快速闭上, 3分; 一侧反射减弱, 2分; 两侧减弱, 1分; 无反应, 0分;

11) 检查颈部感觉, 抓握小鼠, 用钝棒触碰颈部: 反应迅速, 3分; 反应迟钝, 2分; 反应明显减弱, 1分; 无反应, 0分;

12) 评估小鼠探索能力: 使用黑白箱, 三分之二打开并照亮, 而其余部分盖上盖子保持黑暗, 一个7 cm长的门连接明暗空间。将小鼠放置在光照区5 min, 然后再放置在黑暗区5 min, 让它四处走动并记录活动。当小鼠四肢完全进入一个区域时, 记录得分。得分如下: 主动进入光亮区和黑暗区, 3分; 进入一个区域, 2分; 刺激后仅缓慢移动, 1分; 静止不动, 0分;

13) 攀爬能力评估: 将小鼠放在一个70 cm×20 cm、与地面水平成30°的平面底部。评分如下: 攀上顶部, 3分; 中途停止, 2分; 静止不动, 1分; 立刻掉落, 0分;

14) 平衡木行走能力评估: 把小鼠放在离地10 cm, 宽2.5 cm, 长80 cm的平衡木的一端, 评分如下: 走完整个平衡木, 3分; 走完部分平衡木, 2分; 在平衡木上行走时跌倒, 1分; 无运动, 0分。

1.2.4 免疫荧光

- 1) 组织细胞样本用4%多聚甲醛固定, 后用PBS清洗;
- 2) 滴加5% BSA封闭2 h;
- 3) 用5% BSA + 0.5% TritonX100稀释一抗, 后滴加一抗覆盖组织样本, 放入湿盒内, 4℃过夜;
- 4) PBS冲洗玻片3次, 每次3 min;
- 5) 滴加二抗覆盖组织样本, 放入湿盒, 37℃孵育2 h;
- 6) PBS冲洗玻片3次, 每次3 min;
- 7) 用DAPI封片剂复染核5 min后封片;

8) 荧光显微镜或激光共聚焦荧光显微镜下观察拍照。

1.2.5 神经干细胞培养、诱导分化及缺血缺氧模型(OGD)制作

1.2.5.1 神经干细胞培养

- 1) E13 天 C57 孕鼠麻醉处死, 75% 酒精消毒腹部后切开;
- 2) 取出孕鼠子宫, 冷 PBS 冲洗; 缓慢取出胚胎, 移入含 7-10 ml 冷 PBS 培养皿中;
- 3) 手术取胎鼠海马区放入 15 ml 离心管, 吸管吹打 4-5 次, $110 \times g$ 离心 5 min;
- 4) 取出上清, 用 1 ml 0.05% 胰蛋白酶重悬细胞, 在 37°C 消化 10 min;
- 5) $110 \times g$ 离心 5 min, 取上清, 在 1 ml 完全培养基重悬细胞, 细胞计数;
- 6) 按 2×10^5 个/ml, 5 ml 接种到 T25 培养瓶中。细胞培养液包括 DMEM/F12, $20 \mu\text{g}/1$ 表皮生长因子 (EGF)、 $20 \mu\text{g}/1$ 碱性成纤维细胞因子 (FGF)、2% B27、1% 青霉素/链霉素双抗;
- 7) 培养 3 天可开始出现神经球;
- 8) 培养 6-7 天, 神经球直径大约 150-200 μm , 可传代。

1.2.5.2 神经干细胞鉴定及诱导分化

1) 在铺板前一天, 24 孔板以多聚赖氨酸包被过夜。将神经干细胞球消化成单细胞悬液后计数, 每孔铺 5×10^4 个细胞, 在铺板后第二天, 待全部细胞贴壁后用多聚甲醛固定, Nestin 和 Ki67 免疫荧光染色以鉴定神经干细胞;

2) 将 24 孔板每孔铺 1×10^5 个细胞, 铺板后第 2 天, 待全部细胞贴壁后更换成含 2% B27 和 1% 双抗的培养基, 分别诱导分化 3 天, 7 天和 14 天。后行 β -Tubulin 和 NeuN 免疫荧光染色以确定能分化成神经元。

1.2.5.3 OGD(糖氧剥夺实验)

1) 细胞铺板后一天, 用无糖 DMEM 替代旧的完全培养基, 然后将孔板转移到三气培养箱 (37°C , 95% N_2 和 5% CO_2) 进行缺氧处理;

2) 在三气培养箱中培养 6 h 后, 返回正常培养箱, 用原始培养基再培养 24 h。

1.2.6 TUNEL 染色

- 1) 将细胞爬片或冷冻切片浸入 4% 多聚甲醛固定液中, 室温固定 20-30 min;

- 2) 样本片浸入 $1 \times$ PBS 漂洗三次, 每次 5 min;
- 3) 配制 1% Triton X-100 通透液, 即用即配;
- 4) 样本片浸入通透液中, 室温促渗 3-5 min;
- 5) 浸入 $1 \times$ PBS 漂洗三次, 每次 5 min;
- 6) 配制 TdT 酶反应液: 在 45 μ l Equilibration Buffer 加入 1.0 μ l biotin-11-dUTP 和 4.0 μ l TdT Enzyme, 即用即配, 注意避光;
- 7) 样本周围用吸水纸吸干, 每个样本片加 50 μ l TdT 酶反应液, 放入湿盒中, 37 $^{\circ}$ C 避光反应 60 min;
- 8) 反应后的样本片浸入 $1 \times$ PBS 漂洗三次, 每次 5 min, 注意避光;
- 9) Streptavidin-Fluorescein 试剂 5 μ l 与 45 μ l Labeling Buffer 混匀, 计算所需的总量后, 即用即配, 注意避光;
- 10) 样本周围用吸水纸吸干, 每个样本片加 50 μ l Streptavidin-Fluorescein 标记液, 放入湿盒, 37 $^{\circ}$ C 避光反应 30 min;
- 11) 反应后的样本片浸入 $1 \times$ PBS 漂洗三次, 每次 5 min, 注意避光;
- 12) DAPI 染色液复染细胞核, 室温反应 10 min。洗去 DAPI 染液, 加封片液, 显微镜观察。

1.2.7 qRT-PCR

1.2.7.1 Trizol 法提取总 RNA

- 1) PBS 清洗六孔板中的贴壁细胞 2 次, 加 1 ml Trizol, 混匀, 室温静置 5 min;
- 2) 转移到 1.5 ml 离心管, 加入 0.2 ml 氯仿, 振荡 15 s, 静置 2 min; (静置到分层)
- 3) 4 $^{\circ}$ C 离心, 12000 $g \times$ 15 min, 取上清;
- 4) 加入 0.5 ml 异丙醇, 将管中液体轻轻混匀, 室温静置 10 min;
- 5) 4 $^{\circ}$ C 离心, 12000 $g \times$ 10 min, 弃上清;
- 6) 加入 1ml 75%乙醇, 轻轻洗涤沉淀。4 $^{\circ}$ C, 7500 $g \times$ 5 min, 弃上清;
- 7) 晾干, 加入 20-100 μ l 的 DEPC H₂O 溶解 (65 $^{\circ}$ C 促溶 10-15 min);
- 8) 检测总 RNA 浓度。-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

1.2.7.2 mRNA 逆转录

实验详细步骤参照 takara 说明书进行。

表 1-1 反应体系

试剂	剂量
PrimeScript RT Enzyme Mix I	1 μ l
5 \times PrimeScript Buffer 2 (for Real Time)	4 μ l
Oligo DT primer	1 μ l
Random 6 mers	1 μ l
总 DNA	1000 ng (X μ l)
RNase Free 水 (DEPC 水)	20- X μ l

置于 PCR 仪，反应条件：37 $^{\circ}$ C 15 min， 85 $^{\circ}$ C 5s， 4 $^{\circ}$ C hold，得到的 cDNA 于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.7.3 设计基因所需引物

使用网 NCBI 查找目标基因完整序列，使用 PrimerBank 来设计基因的引物。

表1-2 引物序列表

基因	引物序列 Forward (方向: 5' \rightarrow 3')	引物序列 Reverse (方向: 5' \rightarrow 3')
BDNF	TCATACTTCGGTTGCATGAAGG	AGACCTCTCGAACCTGCCC
TrKB	CTGGGGCTTATGCCTGCTG	AGGCTCAGTACACCAAATCCTA
Olig2	TCCCCAGAACCCGATGATCTT	CGTGGACGAGGACACAGTC
Hoxb1	GCCCCAACCTCTTTTCCCC	GACAGGATACCCCGAGTTTTG
Akt1	ATGAACGACGTAGCCATTGTG	TTGTAGCCAATAAAGGTGCCAT
Dlx2	GTGGCTGATATGCACTCGACC	GCTGGTTGGTGTAGTAGCTGC
β -Actin	TGGTCGTGACAACGGCTC	CCATGTCGTCCAGTTGGTAAC

1.2.7.4 基因片段扩增

1) 采用 Real-time PCR 检测各基因表达丰度。所有操作均在冰上完成，以 β -actin 为内参基因，引物均由深圳华大基因设计并合成。每组设置 3 个复孔，不同标本的相对表达定量 (RQ, Relative Quantity) 值 $RQ = 2^{-\Delta Ct}$ 。 $\Delta Ct =$ 目的基因 Ct 值 - 内参基因 Ct 值。详细步骤如下：

表 1-3 PCR 反应体系

试剂	加入量
TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2×)	5 μ l
PCR Forward Primer (10 μ M)	0.4 μ l
PCR Reverse Primer (10 μ M)	0.4 μ l
DNA 模板	1 μ l
RNase Free 水 (DEPC 水)	3.2 μ l

2) PCR 扩增条件

表 1-4 PCR 反应程序设置

步骤	温度	持续时间	循环次数
预变性	95 °C	30 s (Ramp Rate 4.4 °C/秒)	1
PCR	分析模式:	定量分析	
	95 °C	5 s (Ramp Rate 4.4 °C/秒)	
	60 °C	30 s (Ramp Rate 2.2 °C/秒, Acquisition Mode : Single)	40
融解	分析模式:	融解曲线	
	95 °C	5 s (Ramp Rate 4.4 °C/秒)	
	60 °C	1 min (Ramp Rate 2.2 °C/秒)	1
	95 °C	(Ramp Rate 0.11 °C/秒, Acquisition Mode : Continuous, Acquisitions : 5 per °C)	
降温	50 °C	30 s (Ramp Rate 2.2 °C/秒)	1

1.2.8 MRI 成像

用 3%异氟烷诱导小鼠麻醉后, 加入 2%的异氟烷和氮气/氧气的混合气体维持麻醉, 并对动物的心率和呼吸进行实时动态监护, 应用 7.0 T 小动物核磁共振成像系统 (PharmaScan, Bruker), 行 T2 加权成像 (T2W)。采用 RARE 序列, 扫描参数为: TR 2500 ms, TE 36 ms, 层厚 0.5 mm, 层间距 0.5 mm, FOV 20 mm×18 mm, 矩阵 256×256, 反转角(FA) 180°, 重复 1 次, 扫描时间为 11 min 20 s。

1.2.9 苏木精和伊红染色

1.2.9.1 组织石蜡包埋切片

- 1) 取材: 组织固定于 4% 多聚甲醛时间超过 24 h;
- 2) 脱水: 将固定的组织块按梯度酒精脱水。75% 酒精 4 h, 85% 酒精 2 h, 90% 酒精 2 h, 95% 酒精 1 h, 无水乙醇 I 30 min, 无水乙醇 II 30 min, 醇苯 5-10 min, 二甲苯 I 5-10 min, 二甲苯 II 5-10 min;
- 3) 包埋: 浸蜡 2 h 以上, 将融化的蜡滴加入包埋框, 待蜡凝固之前将组织放入并贴上标签;
- 4) 切片: 修整好的蜡块置于石蜡切片机上, 4 μm 厚度切片。切片漂于摊片机 40 $^{\circ}\text{C}$ 温水上展平组织, 用载玻片捞起组织, 放进 65 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱内烘烤 2 h。

1.2.9.2 HE 染色

- 1) 石蜡切片脱蜡至水: 依次将切片放入二甲苯 I 10 min-二甲苯 II 10 min-无水乙醇 I 3 min-无水乙醇 II 3 min-95% 酒精 3 min-95% 酒精 3 min-85% 酒精 3 min-75% 酒精 3 min-50% 酒精 5 min-蒸馏水洗;
- 2) 苏木素染细胞核: 切片入苏木素染 60 s, 自来水洗 30 s, 1% 的盐酸酒精分化数秒, 自来水冲洗, 0.6% 氨水返蓝, 流水冲洗;
- 3) 伊红染细胞质: 切片入伊红染液中染色 30 s;
- 4) 脱水封片: 将切片依次放入 95% 酒精 I 5 min -95% 酒精 II 5 min-无水乙醇 I 5 min -无水乙醇 II 5 min -二甲苯 I 5 min -二甲苯 II 5 min 中脱水透明, 将切片从二甲苯拿出晾干, 使用中性树脂胶封片;
- 5) 显微镜下观察并采集图像。

1.2.10 神经干细胞慢病毒转染

- 1) 在铺板前一天用多聚赖氨酸包被 24 孔板、6 孔板过夜;
- 2) 第二天把神经干细胞按 5×10^4 个/孔接种到 24 孔板, 每孔加入完全培养液 0.5 ml; 按 1×10^6 个/孔接种到 6 孔板, 每孔加入完全培养液 1 ml;
- 3) 第三天根据相应感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 计算加入所需慢病毒或腺相关病毒的体积数, 后放回培养箱;
- 4) 24 h 后换原先新鲜培养基;
- 5) 慢病毒感染细胞 72 h 后, 在荧光显微镜下观察 GFP 荧光蛋白表达情况。

1.2.11 神经干细胞移植

- 1) 将 6 孔板中培养的神经干细胞消化成单细胞悬液;

- 2) 将小鼠放置在立体定位仪内, 打开皮肤组织, 在原先造模位置将汉密尔顿微量注射器置入脑组织内部距颅骨表面 6 mm 处;
- 3) 神经干细胞 (5×10^5 个/ μl) 以 $0.25 \mu\text{l} / \text{min}$ 注射 2 μl ;
- 4) 注射完成后在原处放置 10 min, 然后从鼠脑中取出;
- 5) 手术完成后用牙科水泥修补颅骨处的洞;
- 6) 缝合切口, 腹腔注射青霉素;
- 7) 每 10 min 对老鼠进行一次监测, 直到清醒, 然后再放回到笼子里。

1.2.12 全细胞膜片钳记录

1.2.12.1 脑切片制备

- 1) 小鼠用异氟醚麻醉;
- 2) 大脑被快速取出并在冰冷的切片液体中冷却, 其中含有: 120 nM Choline-Cl、2.5 nM KCl、7 nM MgCl₂、0.5 nM CaCl₂、1.25 nM NaH₂PO₄、25 nM NaHCO₃ 和 10 nM 葡萄糖;
- 3) 使用 VT-1000S 振动切片机 (Leica, Germany) 在冰冷改良的人工脑脊液 (ACSF) 中对脑桥 (300 μm) 进行切片;
- 4) 将切片转移到含有 ACSF 的储存室, 其中含有: 126 nM NaCl、3 nM KCl、1 nM MgSO₄、2 nM CaCl₂、1.25 nM NaH₂PO₄、26 nM NaHCO₃ 和 10 nM 葡萄糖。所有溶液都用 95% O₂ / 5% CO₂ (体积 / 体积) 饱和。在 32 °C 下 30 min 和在室温 (24 \pm 1 °C) 下孵育 1 h 后, 切片被转移到记录室。

1.2.12.2 全细胞膜片钳记录

- 1) 切片被放置在用 ACSF 灌注 (2 ml/min) 的记录室中。GFP (+) 细胞的全细胞膜片钳记录使用配备红外敏感 CCD 相机 (DAGE-MTI, IR-1000E) 的直立显微镜通过红外光学进行可视化。移液器由电阻为 3-5 M Ω 的微量移液器拉拔器 (P-97, Sutter) 拉动。使用 MultiClamp 700B 放大器和 1550B 数字转换器 (Molecular Device) 进行记录;
- 2) 记录时, GFP (+) 神经元保持在 -70 mV, 移液管溶液含有 (以 mM 为单位): 125 K-gluconate、5 KCl、1 MgCl₂、4 Mg-ATP、0.3 Na-GTP、0.2 EGTA、10 HEPES 和 10 Na-phosphocreatine (pH 7.40, 285 mOsm)。通过注射一系列的去极化或超极化脉冲(从 10 pa 到 -50pa, 以 -10pa 为步长)引起膜电位的变化。在

电流箝位下，记录自发放电。在电压箝位下-70 mV 保持电位下记录突触后电流 (PSC)。如果串联电阻高于 20 M Ω 或波动超过初始值的 20%，细胞将被舍弃。数据以 1 khz 过滤，以 10 khz 采样。

1.2.13 神经纤维束的病毒示踪

- 1) 异氟醚(1-2%/氧)麻醉小鼠；
- 2) 使用颅骨钻在初级运动皮层(M1)定位坐标(-0.7 mm AP、-1.0 mm ML、-0.5 mm DV)上钻出小孔；
- 3) 以 50 nl/min 的速度注射 500nl 含有 9.24×10^{12} V.G./ml 的腺相关病毒 (AAV 2/1 pAAV-hSyn-mCherry-3xFLAG-WPRE)；
- 4) 注射完成后，针留置注射部位 5 min 后退出，以防回流；
- 5) 15 天后处死小鼠，取脑组织；
- 6) 按每 1500 μm 的间隔，制作厚度 50 μm /张的连续脑切片，并贴附在载玻片上；
- 7) DAPI 复染核后，封片。

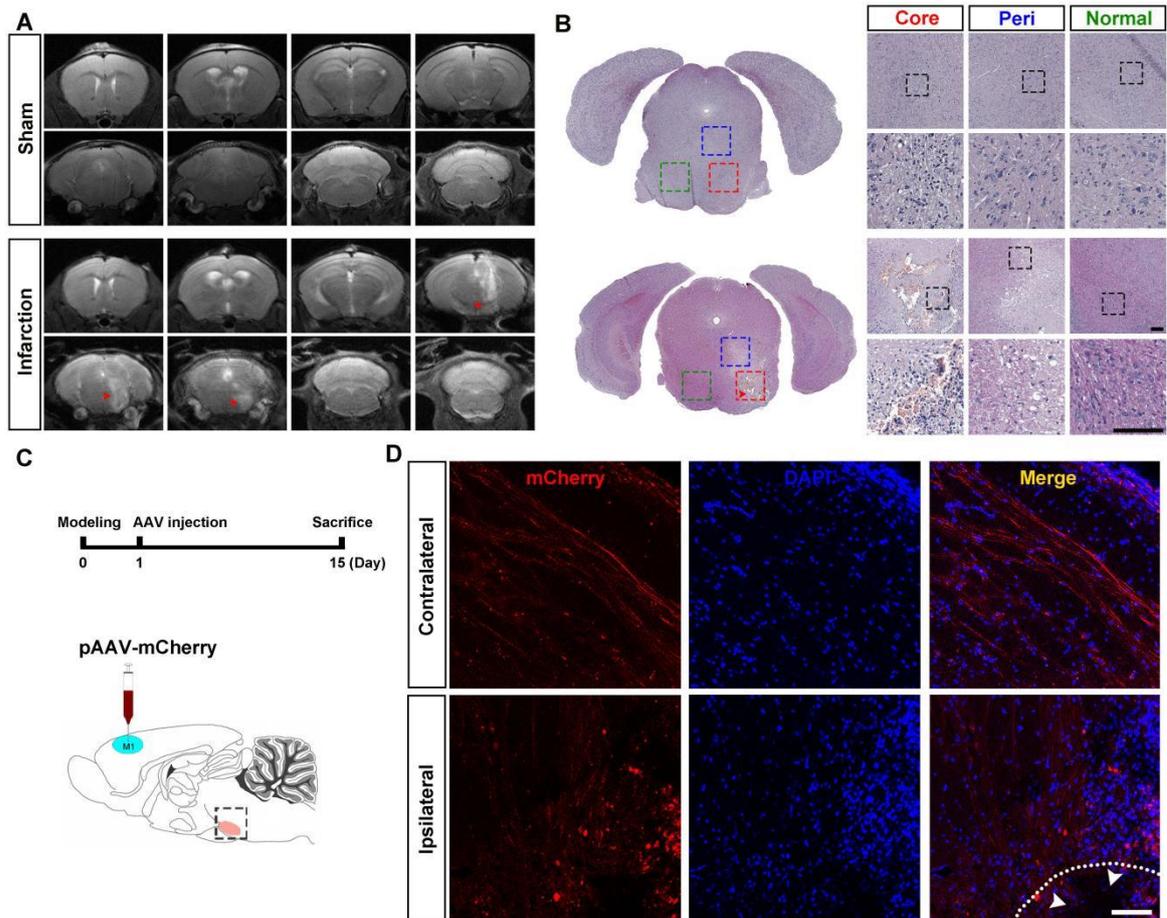
1.3 统计分析

使用 SPSS 25.0 进行统计分析，实验数据采用均数 \pm 标准差 ($\bar{X} \pm \text{SD}$) 表示，根据两组之间比较采用 *t* 检验；三组以上比较采用单因素方差分析；组间两两比较采用 SNK 和 LSD 法；方差不齐的数据采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义，统计作图通过 Graphpad Prism 5.0 (Graphpad Software, USA) 软件绘制。

2 结 果

2.1 脑桥梗死后神经回路受损

我们通过注射内皮素(ET-1)的方法建立了脑桥梗死动物模型，并通过 MRI 和 HE 染色证实 (图 1A,B)。注射内皮素引起脑桥梗死后，小鼠在第 3 天和第 7 天的感觉运动功能显著不足，尤其是运动行为 (图 20C)。为了研究运动传导通路是否被破坏，我们使用 AAV 2/1 病毒进行逆行跨突触追踪。简单地说，在脑桥梗死后 1 天将相同剂量的 AAV 2/1 病毒注入双侧大脑初级运动皮层 (M1) (图 1C)，2 周后取脑冷冻切片。在脑组织矢状面切片中，与对侧相比，桥脑梗死侧 mCherry 红色荧光蛋白标记的神经纤维束在梗死区大部分中断 (图 1D)。此外，将脑组织从吻侧向尾侧取 7 张冠状切片，可观察到在脑桥梗死侧荧光强度明显降低(图 1E)，提示脑桥梗死起源于 M1 的运动传导通路大部分中断。



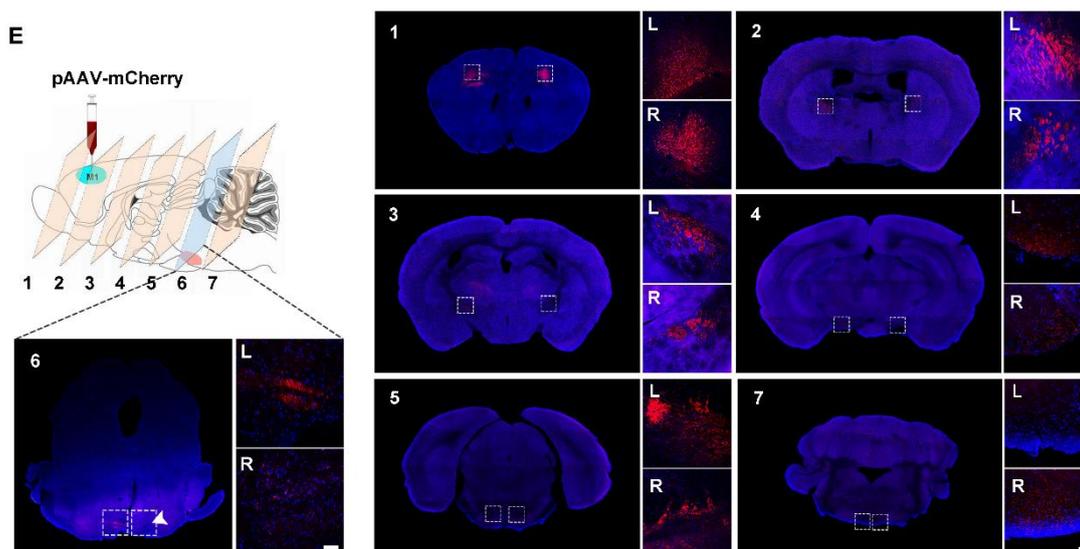


图 1. 脑桥梗死动物模型构建与运动纤维束追踪。(A) MRI 检测假手术组和脑桥梗死组。(B) HE 染色检测假手术组和脑桥梗死组，分别取梗死核心区，梗死周围区和对侧正常区三个视野。红色箭头指示梗死区。Core 为梗死核心区，Peri 为梗死周围区，Normal 为对侧正常区。(C) 病毒示踪运动纤维束时间流程示意图。(D) 病毒示踪后脑组织矢状面切片，脑桥梗死同侧和对侧 mCherry 红色荧光示踪的神经纤维束。白色虚线，白色箭头指示梗死区。(E) 病毒示踪后脑组织冠状面切片。白色箭头指示梗死区。蓝色：DAPI，红色：mCherry 荧光蛋白。比例尺= 50 μm 。

2.2 脑桥梗死后 SVZ 内源性 NSCs 增加

成年哺乳动物大脑内源性 NSCs 主要分布在脑室下区(SVZ)和海马的亚颗粒区(SGZ)。我们使用 Nestin 和 Ki67 抗体追踪内源性 NSCs。与对侧和假手术组相比，脑桥梗死后 3 天，同侧 SVZ 区的内源性 NSCs 数量显著增加(图 2A 和 2B)。随着时间的推移，数量继续增加。假手术组同侧和对侧 NSCs 数量均无显著差异(图 2C)。有趣的是，即使在脑桥梗死后 28 天，SGZ 区内源性 NSCs 数量无显著增殖(图 3)。

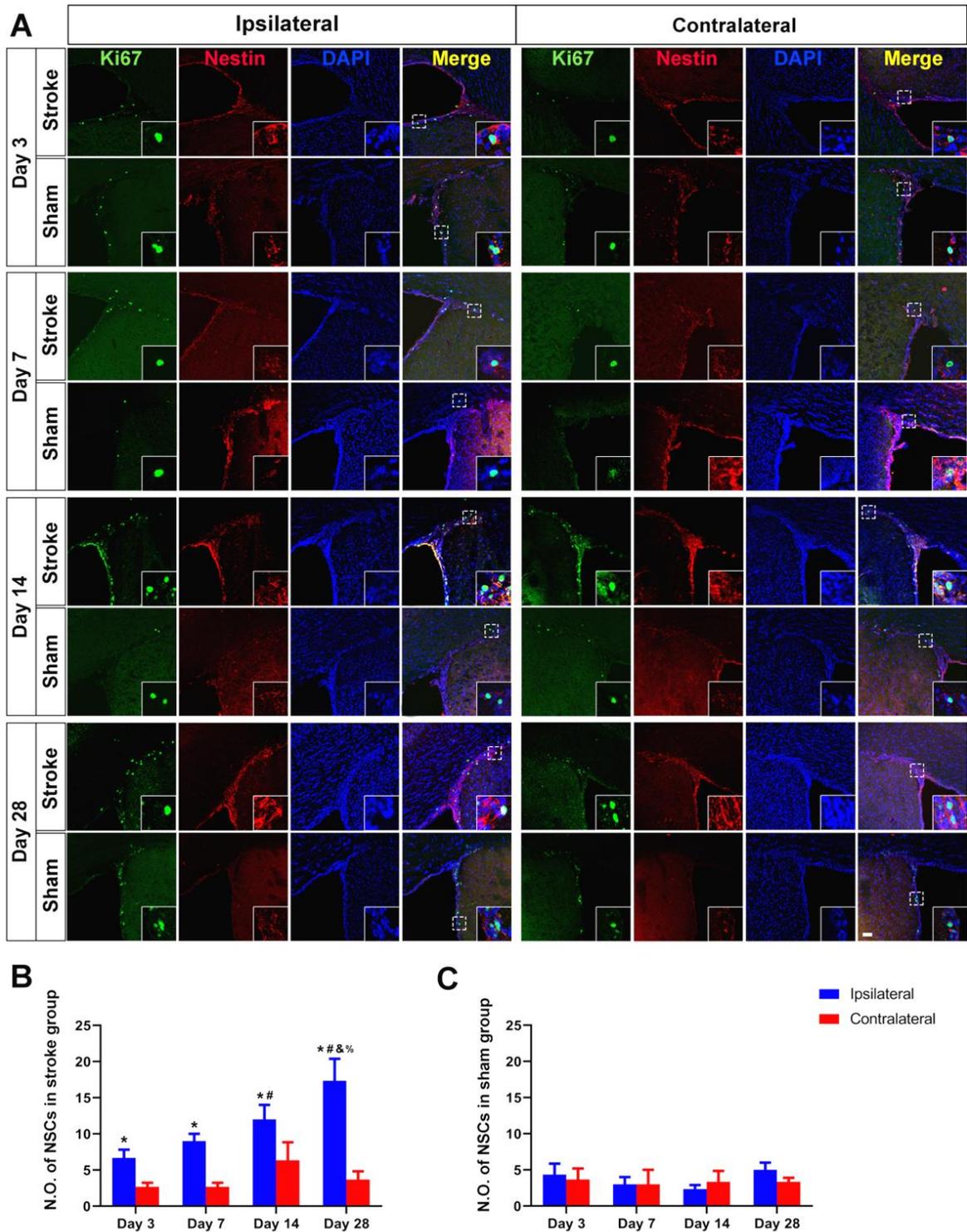


图 2. 脑桥梗死后 SVZ 内源性 NSCs 增加。(A) 脑桥梗死后 3、7、14 和 28 天，用 Ki67 抗体和 Nestin 抗体检测 NSCs。(B) 与对侧 SVZ 相比，同侧 SVZ 内源性 NSCs 数量显著增加，且随着时间的推移继续增加。(C) 假手术组同侧和对侧 SVZ 区 NSCs 数量无显著差异。* 代表与对侧比较，# 代表与第 3 天比较，& 代表与第 7 天比较，% 代表与第 14 天比较， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。比例尺 = 50 μm 。

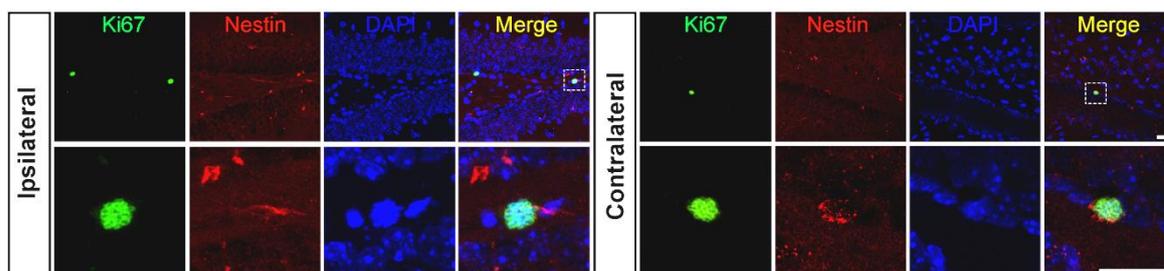


图 3. 脑桥梗死后第 28 天免疫荧光染色，两侧 SGZ 区内源性 NSCs。比例尺= 20 μm 。

2.3 NSCs 未从 SVZ 向脑桥迁移

在 MCAO 模型中，卒中后 3 天免疫荧光染色可观察到内源性 NSCs 沿着 SVZ 到皮层梗死区分布(图 4)。随着时间的延长，更多的 NSCs 分布在整個梗死区域(图 5)，提示 NSCs 从 SVZ 向大脑皮层梗死区迁移，或是梗死皮层原位 NSCs 增殖，这与之前的研究结果一致^[34]。然而，在 PI 模型中，即使在 SVZ 内源性 NSCs 随时间增加，脑桥中也没有发现 NSCs(图 5)。这些结果表明，在脑桥梗死后 28 天内，没有内源性 NSCs 在原位生成或从 SVZ 迁移而来。

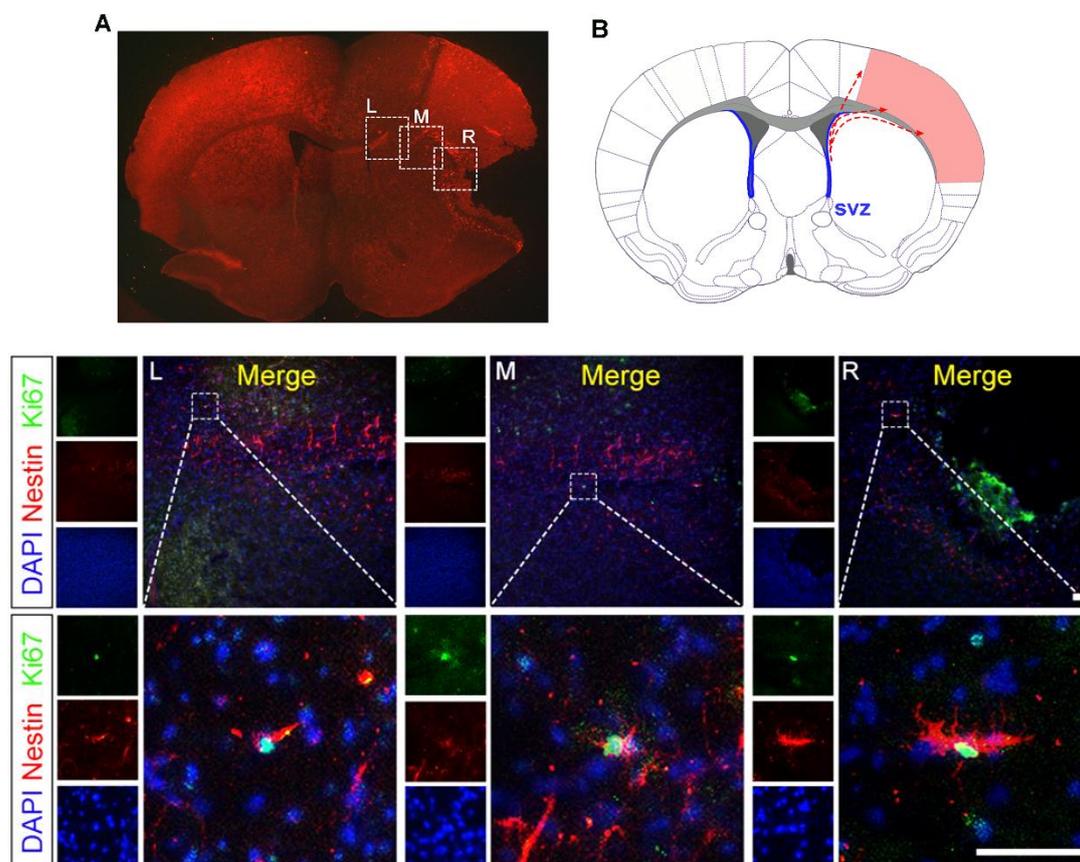


图 4. MCAO 造模后第 3 天，用 Ki67 抗体 (绿色) 和 Nestin 抗体 (红色) 检测大脑皮层梗死区内源性 NSCs。L,M,R 三个视野均可见 NSCs 沿 SVZ 向梗死皮层分布。比例尺= 50 μm 。

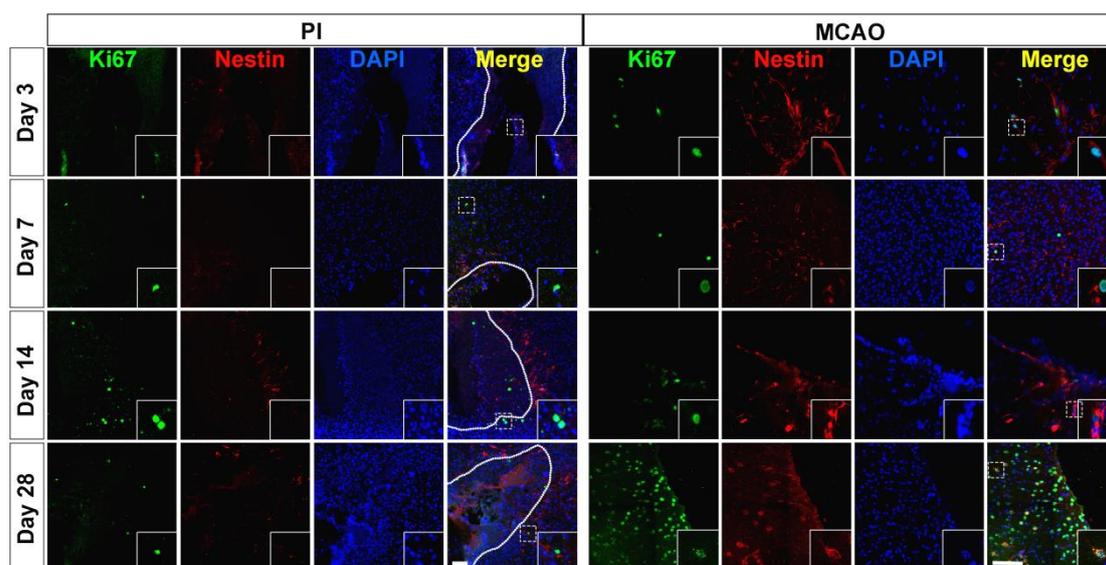


图 5. 脑桥梗死病灶周围无 NSCs。造模后第 3、7、14 和 28 天，脑切片用 Ki67 抗体(绿色)、Nestin 抗体(红色)和 DAPI (蓝色) 染色检测 NSCs。PI 组未见 NSCs，相比之下，NSCs 在 MCAO 第 3 天出现在梗死区，且数量呈时间依赖性增加。PI，脑桥梗死；MCAO，大脑中动脉闭塞，白色虚线为脑桥梗死区，比例尺= 50 μm 。

2.4 NSCs 在体外发育成成熟的神经元

由于脑桥梗死区域缺乏原位或迁移的内源性 NSCs，我们尝试移植外源性 NSCs 促进脑桥梗死后功能恢复。用于移植的 NSCs 来源于 E13 小鼠海马。在培养 3 天后，NSCs 开始形成神经球(图 6A)。NSCs 经 Ki67 和 Nestin 免疫荧光染色鉴定(图 6B)。在神经元诱导分化条件下处理 3 天后 NSCs 向神经元分化，全部为 β -Tubulin 阳性 NeuN 阴性的未成熟神经元。88.77 \pm 2.35% 的神经元在第 7 天成熟，所有成熟神经元在第 14 天形成，且形成长神经突(图 6C 和 E)。此外，88.12 \pm 1.99% 和 89.10 \pm 3.30% 的神经元在第 7 天表达 Synapsin (突触前膜标记物)和 PSD 95(突触后膜标记物) (图 6D 和 E)。在 1% FBS 的诱导条件下培养 3 天，大部分 NSCs 分化为星形胶质细胞(图 7)。

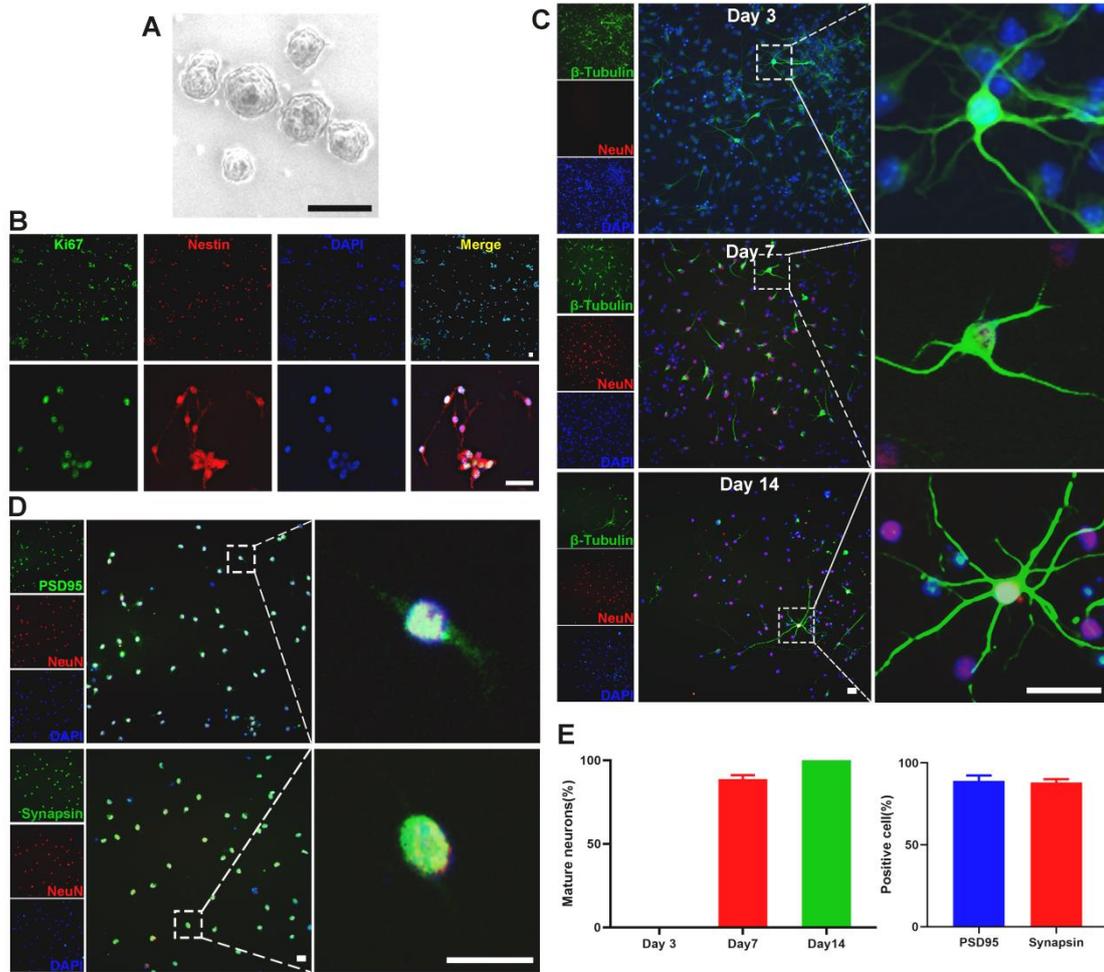


图 6. NSC 鉴定和诱导分化。(A) NSCs 在培养 3 天后可形成神经球。(B) 用 Ki67 抗体 (绿色) 和 Nestin 抗体 (红色) 鉴定 NSC。(C) 用 β -Tubulin (绿色)、NeuN 抗体 (红色) 检测未成熟和成熟神经元。在神经元诱导条件下培养 3 天, NSCs 开始分化成未成熟神经元; 在诱导分化第 7 天, 大部分分化为成熟神经元; 在诱导第 14 天, 全部神经元成熟。(D) 在神经元诱导分化条件下培养第 7 天, 大部分神经元表达兴奋性突触后膜标志物 PSD95 和突触前膜标志物 Synapsin。(E) 直方图显示诱导 3 天, 7 天和 14 天, 成熟神经元的比例 (左图); 诱导 7 天 PSD95 和 Synapsin 阳性神经元比例 (右图)。比例尺= 25 μ m。

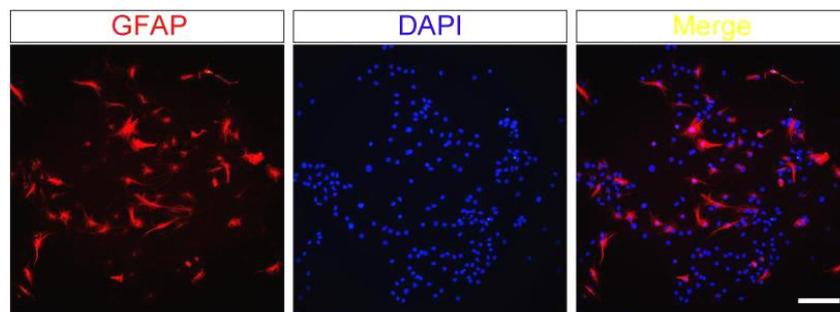
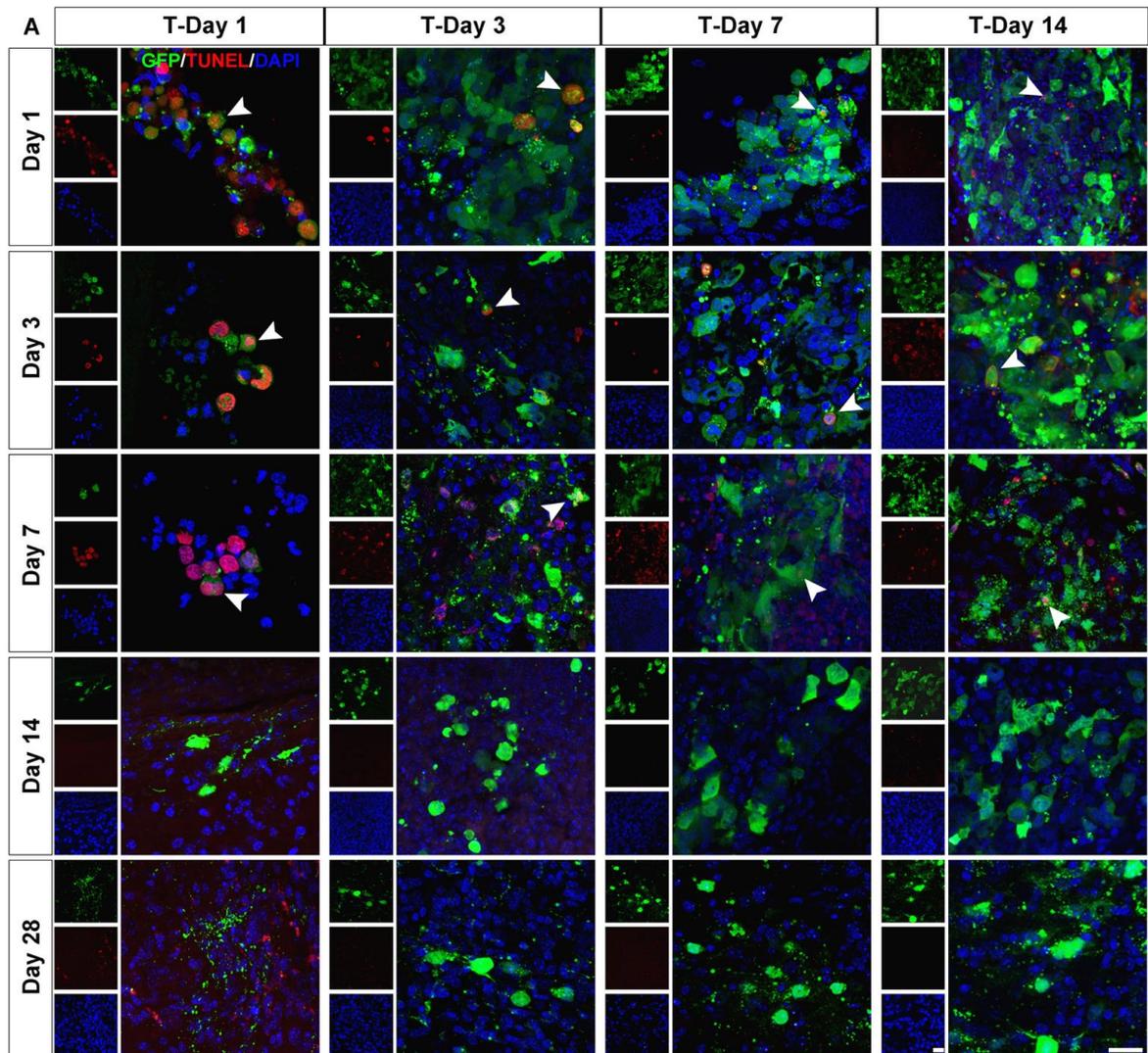


图 7. 1% FBS 诱导 3 天, NSCs 分化为 GFAP 阳性星形胶质细胞。比例尺= 100 μ m。

2.5 脑桥梗死后移植 NSCs 存活率低

经携带 GFP 基因的慢病毒载体转染示踪 NSCs 后，我们在脑桥梗死后第 1 天(T-Day 1)、第 3 天(T-Day 3)、第 7 天(T-Day 7)和第 14 天(T-Day 14)将 GFP-NSCs 移植到梗死区域(图 8B)。TUNEL 染色显示移植后 28 天内大部分 NSCs 死亡(图 8A)。在 T-Day 1 组，移植 1 天后 NSCs 出现大量死亡，第 28 天几乎未发现活的移植 NSCs。在 T-Day 3 天、T-Day 7 天和 T-Day 14 天移植的 NSCs 在移植后第 28 天的存活率分别为 $4.45 \pm 0.48\%$ 、 $19.17 \pm 5.20\%$ 和 $15.75 \pm 4.82\%$ (图 8A 和 C)。这些结果提示脑桥梗死后最佳移植时间为梗死后第 7 天，以下实验也将该时间作为移植时间点。



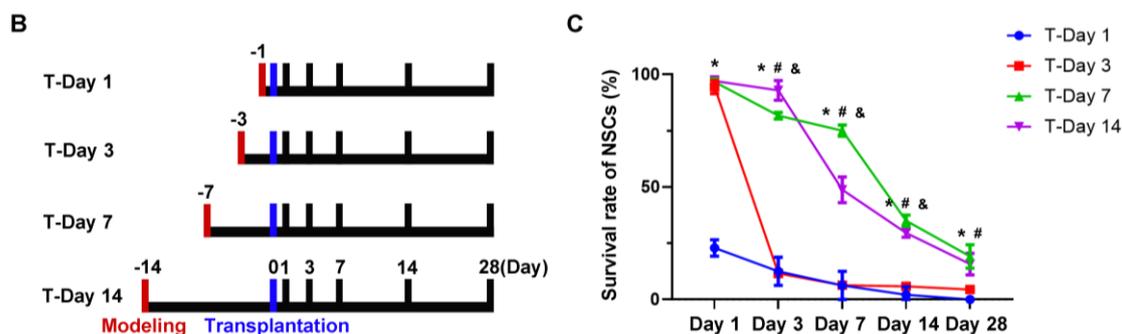
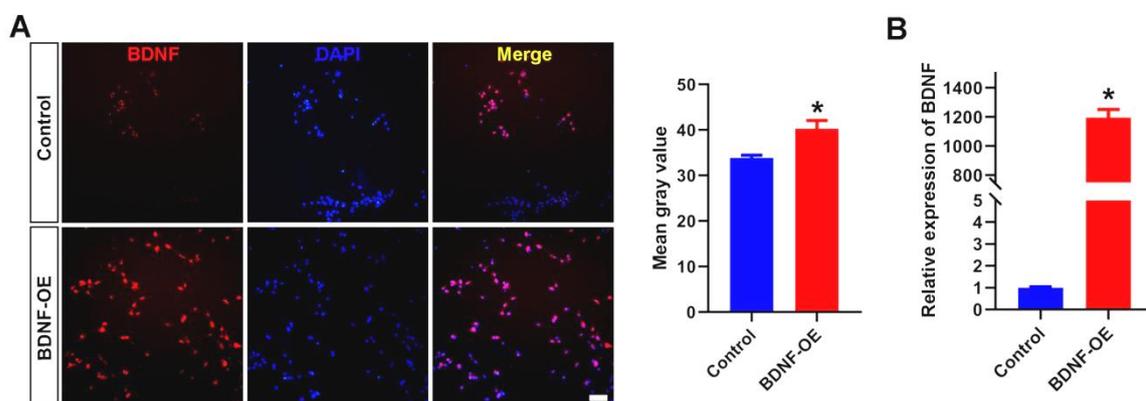


图 8. 移植 NSCs 存活率低。(A) GFP-NSCs (绿色)在脑桥梗死后第 1 天 (T-Day 1)、第 3 天 (T-Day 3)、第 7 天 (T-Day 7)和第 14 天 (T-Day 14) 被移植到梗死区域。分别于移植后第 1、3、7、14、28 天取脑切片。白色箭头为 TUNEL (红色) 阳性移植凋亡细胞。(B) 造模、移植与取脑时间示意图。(C) 折线图显示移植 GFP-NSCs 的存活率。* 表示 T-day 7 与 T-day 1 比较, # 表示与 T-day 3 比较, & 表示与 T-day 14 比较。P < 0.05 为差异有统计学意义, 比例尺= 20 μ m。

2.6 基因修饰 NSCs 以过表达 BDNF:

为了提高移植 NSCs 的存活率, 我们使用携带 BDNF 编码序列的慢病毒载体(pSLenti-EF1-EGFP-F2A-Puro-CMV-HA -BDNF-WPRE) 转染 NSCs。采用半定量荧光技术和 qRT-PCR 检测 BDNF 基因的表达。与对照组相比, 荧光半定量结果显示 BDNF 蛋白表达量显著增加(图 9A), BDNF 基因表达量为 1196.33 ± 55.82 倍 (图 9B)。此外, 培养 14 天后, BDNF 蛋白表达水平仍显著高于对照组 (图 9C)。为了进一步验证 BDNF 对移植的 NSCs 的作用, 我们用 Lenti-shRNA (pSLenti-U6-shRNA (TrkB)-CMV-EGFP-F2A-Puro-WPRE) 敲低 BDNF 的受体 TrkB 的表达。经 qRT-PCR 分析, TrkB 的表达量下调至 $24.00 \pm 1.00\%$ (图 9D)。



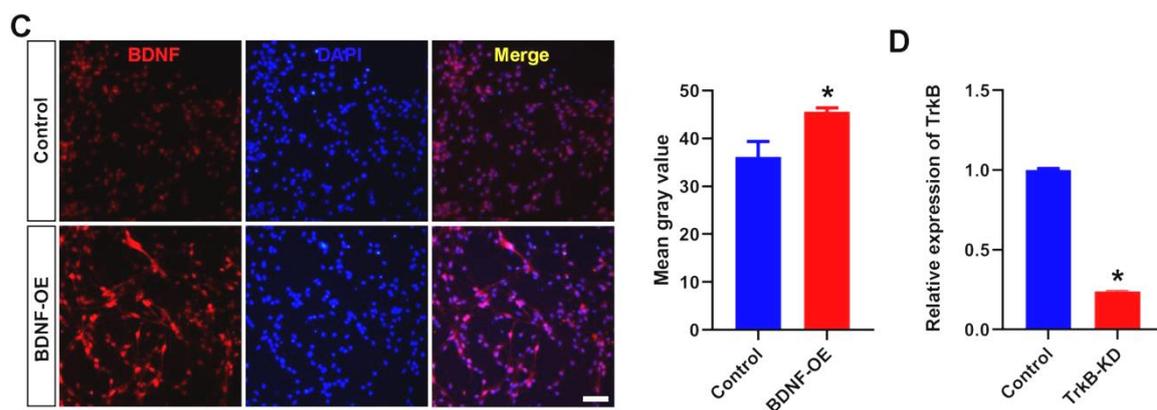


图 9. 慢病毒载体的鉴定。(A) Lenti-BDNF 和对照病毒转染 NSCs 后 3 天, 用 BDNF 抗体检测 BDNF 表达, 直方图显示两组荧光半定量结果。(B) 直方图显示 BDNF-OE 组和对照组 BDNF 基因转录 qRT-PCR 的结果。(C) Lenti-BDNF 和对照病毒转染 NSCs 后 14 天, 直方图显示 BDNF-OE 组平均荧光强度比对照组高。(D) Lenti-shRNA 和对照病毒转染 NSCs 后 3 天。直方图显示 TrkB-KD 组 TrkB mRNA 水平明显降低。OE 代表过表达, KD 代表敲低; * 代表与对照组比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, 比例尺= 100 μm 。

2.7 BDNF 提高 NSCs 的生存率

在对照组中, 当 NSCs 暴露于 OGD 时, TUNEL 阳性细胞比例为 $37.13 \pm 6.95\%$, 与之相比, BDNF-NSCs 组显著降低了 TUNEL 阳性细胞数至 $9.20 \pm 3.42\%$ (图 10A 和 B)。在体内实验中, NSCs 移植后第 28 天, BDNF-NSCs 组细胞存活率增加到 $48.33 \pm 1.44\%$, 显著高于对照组(图 10A 和 C)。与之相反, TrkB-KD 组在 OGD 条件下 TUNEL 阳性 NSCs 数量高达 $68.75 \pm 15.24\%$, 而在移植后第 28 天, TrkB-KD 组移植的 NSCs 几乎无法被观察到(图 10)。以上结果表明 BDNF 可通过靶向 TrkB 受体促进缺血缺氧不良环境下 NSCs 的存活。

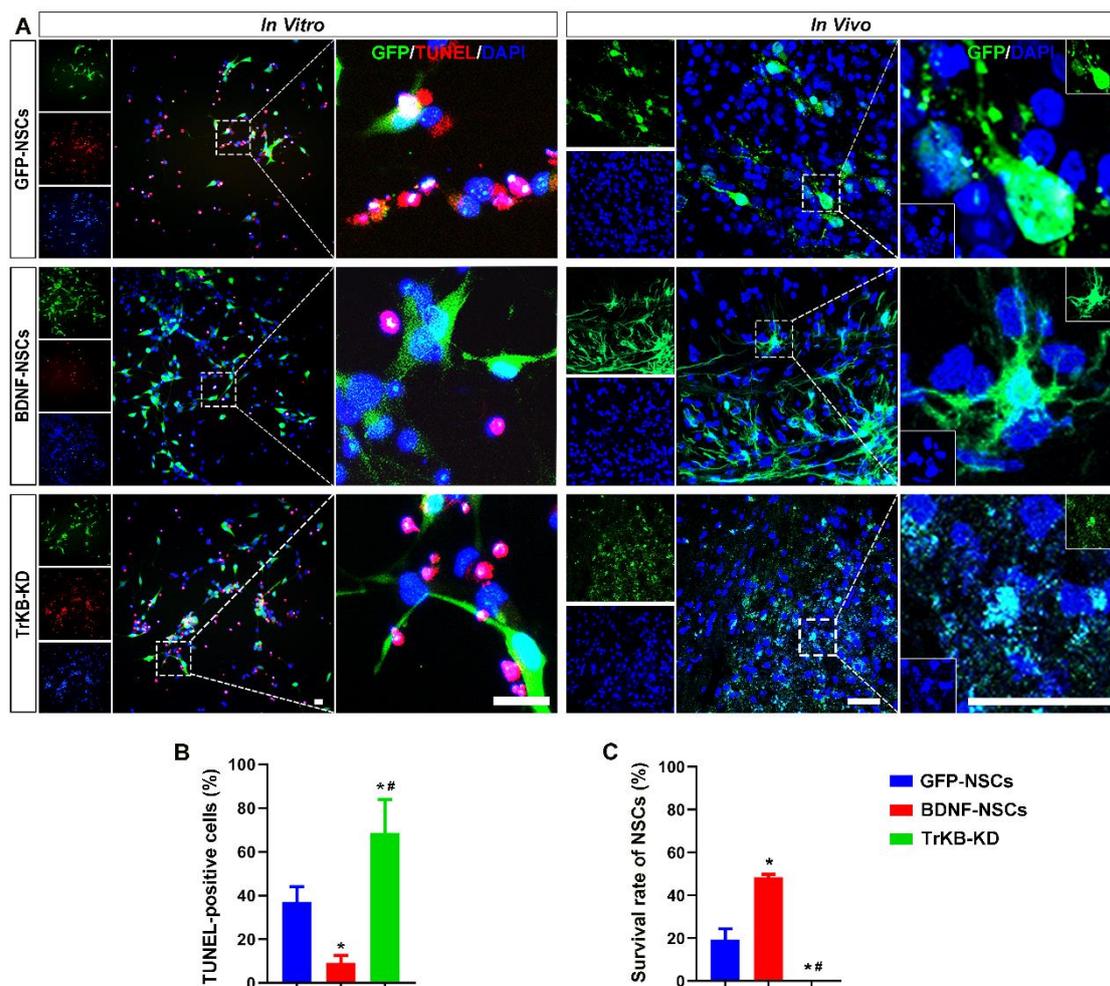


图 10. BDNF 提高了 NSCs 的存活率。(A) GFP-NSCs 对照组、BDNF-NSCs 和 TrkB-KD 组的 NSCs(绿色)分别转染 Lenti-Control、Lenti-BDNF 和 Lenti-shTrkB。在体外，对 NSCs 进行 OGD 处理。TUNEL 染色(红色)检测凋亡细胞。在体内，脑桥梗死后第 7 天移植 NSCs，移植后第 28 天取脑切片观察 GFP 阳性细胞存活情况。(B) 体外 TUNEL 阳性细胞比例直方图。(C) 直方图显示 GFP 阳性细胞在体内存活率。* 表示与 GFP-NSCs 组比较，# 表示与 BDNF-NSCs 组比较， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义，比例尺= 20 μm 。

2.8 BDNF 促进 NSCs 向神经元分化

为了研究 BDNF 是否促进 NSCs 向神经元分化，在体外实验中，我们在对照组、BDNF-NSCs 和 TrkB-KD 组中检测了 β -Tubulin 和 GFAP 阳性细胞的比率(图 12)。在神经元诱导分化条件下培养 5 天， β -Tubulin 阳性细胞在 BDNF-NSCs 组高于对照组，分别为 $27.04 \pm 0.84\%$ 和 $22.19 \pm 1.38\%$ 。TrkB-KD 组 β -Tubulin 阳性细胞最少，为 $9.08 \pm 0.50\%$ (图 12A 和 C)。在星形胶质细胞诱导分化培养条件下，对照组、BDNF-NSCs 和 TrkB-KD 组 GFAP 阳性细胞比例分别为 $45.02 \pm$

3.25%、 $34.84 \pm 1.37\%$ 和 $51.76 \pm 5.24\%$ (图 12B 和 C)。此外, NSCs 在经过 OGD 处理后, qRT-PCR 分析显示, 过表达 BDNF 可上调神经发生相关基因 Olig2 和 HOXB1 (图 11)。在体内实验中, 移植后第 28 天检测移植 NSCs 向神经元和星形胶质细胞的分化情况。如图 12 所示, 与对照组相比, BDNF-NSCs 组的 MAP2 阳性细胞显著增加, 达到 $90.73 \pm 0.67\%$, 而 GFAP 阳性细胞减少, 为 $16.62 \pm 1.59\%$ 。以上结果表明 BDNF 可促进 NSCs 向神经元分化。

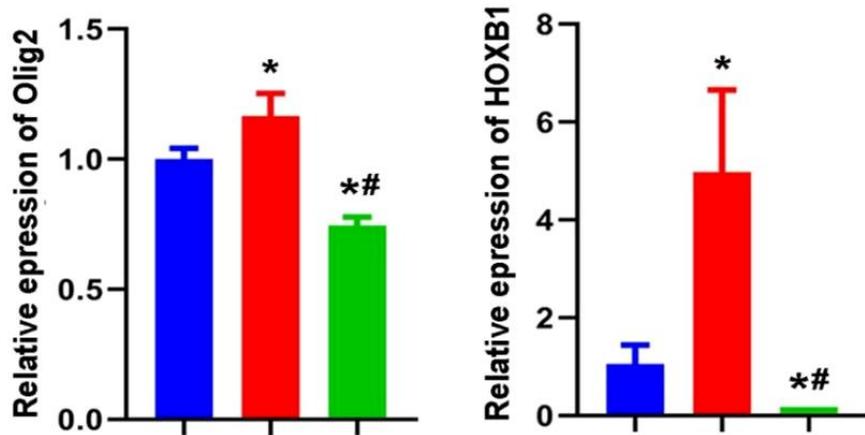
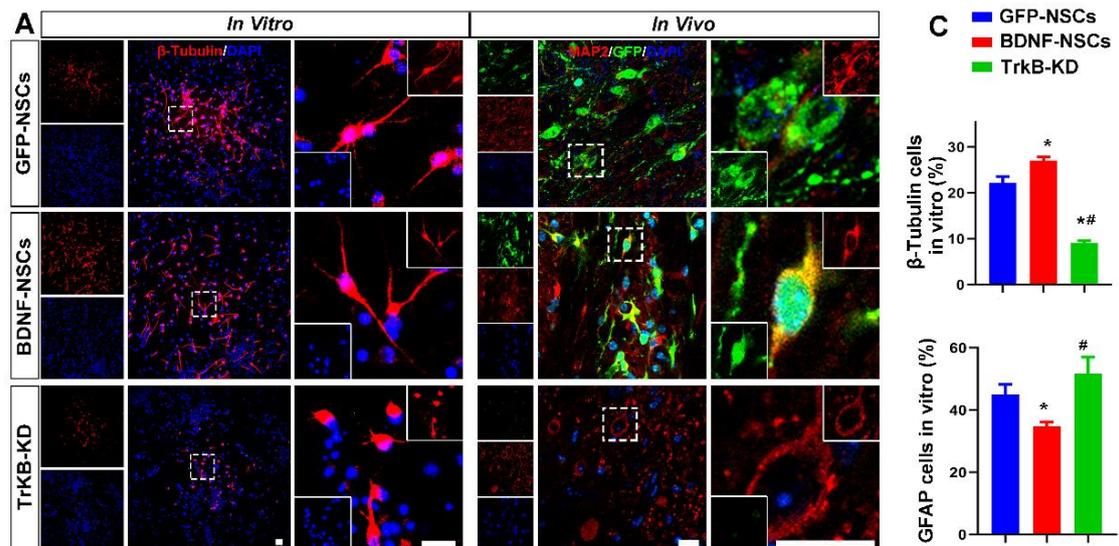


图 11. BDNF 促进 NSCs 神经发生相关基因 Olig2 和 HOXB1 上调。蓝色代表对照组, 红色代表 BDNF-NSCs 组, 绿色代表 TrkB-KD 组; * 表示与对照组比较, # 表示与 BDNF-NSCs 组比较。P < 0.05 为差异有统计学意义。



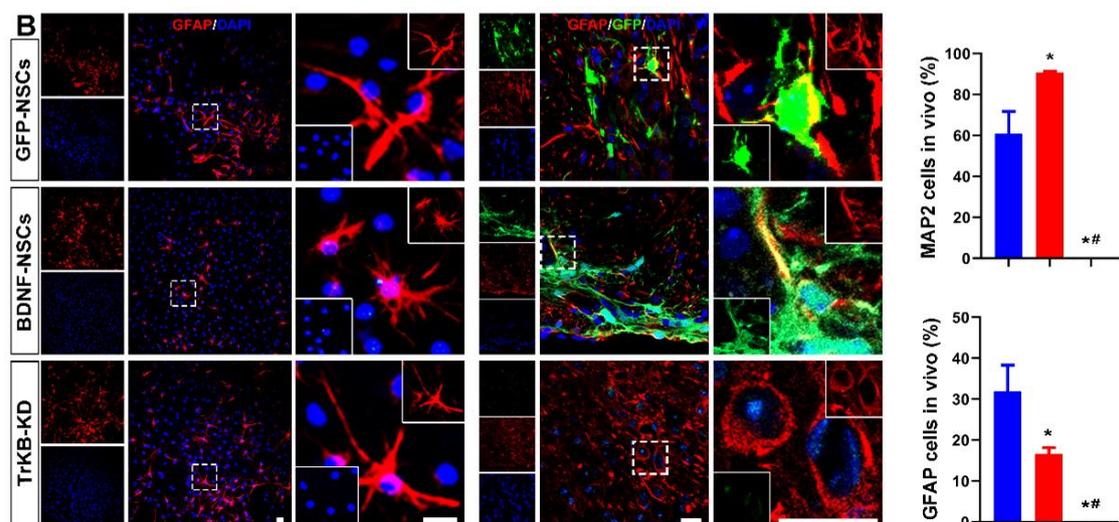


图 12. BDNF 促进 NSCs 向神经元分化。NSCs 对照组、BDNF-NSCs 组和 TrkB-KD 组的 NSCs 分别转染 Lenti-Control, Lenti-BDNF 和 Lenti-shTrkB。在体外, 分别在神经元和星形胶质细胞诱导分化培养条件下对 NSCs 处理。在体内, 脑桥梗死后第 7 天移植 NSCs, 移植后第 28 天取脑。(A) 抗 β -Tubuling 和抗 MAP2 (红色) 分别检测未成熟和成熟神经元(红色)。(B) 抗 GFAP 检测星形胶质细胞(红色)。(C) 直方图显示 β -Tubuling 和 MAP2 阳性神经元和 GFAP 阳性星形胶质细胞的百分比。* 表示与对照组比较, # 表示与 BDNF-NSCs 组比较。P < 0.05 为差异有统计学意义, 比例尺= 15 μ m。

2.9 脑桥梗死后 GABA 能神经元减少

在不同大脑区域的神经元表型具有多样性。我们通过免疫染色研究 MCAO 和脑桥梗死后丢失的神经元类型 (图 13A)。结果显示大脑皮层多为 NMDAR 阳性谷氨酸能神经元而非 GAD 65+67 阳性 GABA 能神经元, 分别占 $75.24 \pm 4.57\%$ 和 $4.71 \pm 0.15\%$; 梗死区可见大量 NMDAR 阳性神经元丢失, 占比降至 $30.52 \pm 0.73\%$ 。相反, 脑桥区域多为神经纤维, 细胞数量较少, 主要为 GABA 能神经元, 占 $18.42 \pm 0.76\%$, 脑桥梗死后主要导致 GABA 能神经元丢失 (图 13B 和 C)。

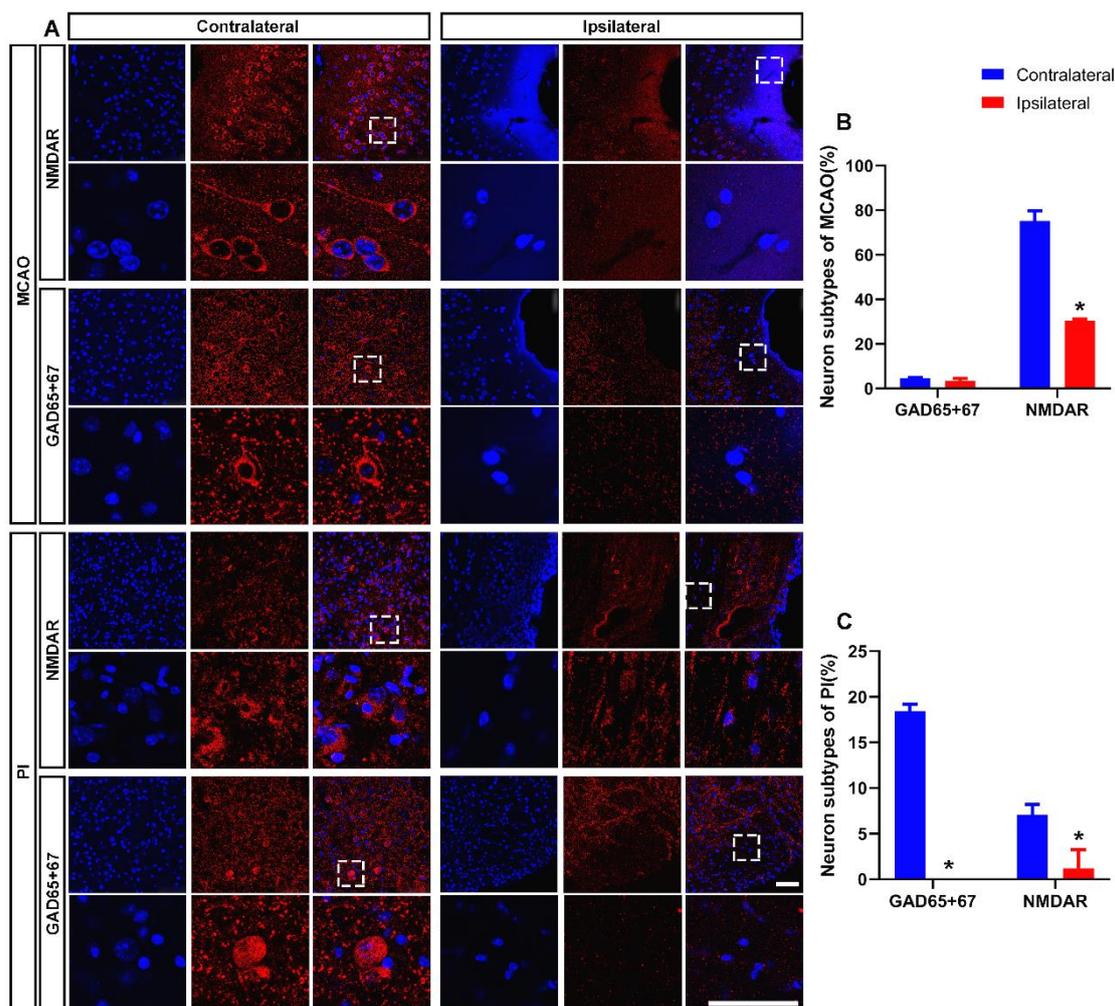


图 13. MCAO 和 PI 后兴奋性和抑制性神经元丢失。(A) 免疫荧光结果显示在大脑皮层中, GAD 65+67 阳性神经元数量较起 NMDAR 阳性的兴奋性神经元少。与对侧相比, 梗死区 NMDAR 阳性的神经元大量丢失; 在脑桥区, GAD 65+67 阳性神经元较 NMDAR 阳性的神经元数量多, 梗死区 GAD 65+67 阳性神经元丢失。红色: NMDAR 和 GAD 65+67; 蓝色: DAPI, 比例尺= 50 μ m。(B) 直方图表示 MCAO 组梗死同侧和对侧 GAD 65+67 阳性神经元和 NMDAR 阳性神经元的比例。(C) 直方图表示 PI 组梗死同侧和对侧 GAD 65+67 阳性神经元和 NMDAR 阳性神经元的比例。* 表示与梗死对侧比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2.10 基因修饰 NSCs 以过表达 BDNF 与 Dlx2:

为了促进移植 NSCs 分化以补充脑桥梗死后丢失的 GABA 能神经元, 我们使用双载 BDNF 和 Dlx2 编码序列的慢病毒载体 (pSLenti-EF1-EGFP-F2A-Puro-CMV-HA-BDNF-P2A-Dlx2-WPRE) 转染 NSCs。采用 qRT-PCR 检测 BDNF 和 Dlx2 基因的表达。与对照组相比, BDNF 基因表达量提高 700.27 ± 42.99 倍, Dlx2 基因表达量提高 768.61 ± 128.10 倍(图 14)。

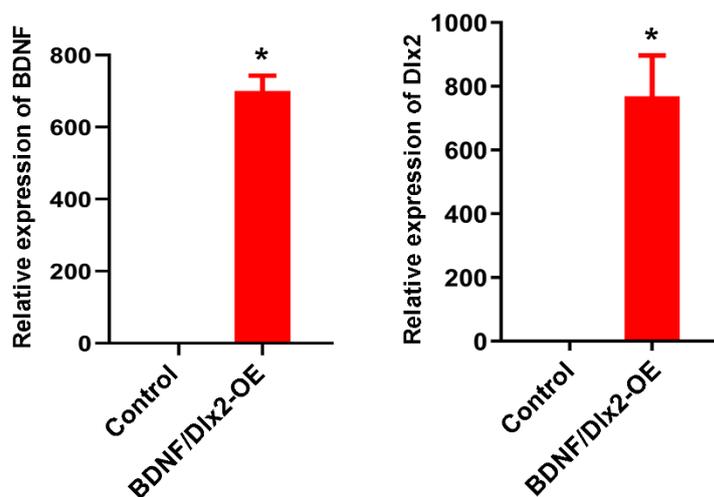


图 14. BDNF/Dlx2 慢病毒载体的鉴定。病毒转染 NSCs 后 3 天，直方图显示 BDNF/Dlx2-OE 组和对照组病毒组 BDNF 和 Dlx2 基因转录 qRT-PCR 的结果。OE 代表过表达，* 代表与对照组比较， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2.11 Dlx2 与 BDNF 共表达促进 NSCs 向 GABA 能神经元分化

为了确定移植后 28 天 NSCs 的命运，我们使用 GAD 65+67, ChAT 和 NMDAR 抗体检测体内移植源性细胞分化成 GABA 能神经元，胆碱能神经元以及谷氨酸能神经元的类型，Synapsin 和 PSD95 抗体检测突触结构，以及 MBP 抗体检测髓鞘化。免疫荧光结果显示，GFP-NSCs 组中，部分 GFP 阳性细胞表达 ChAT 以及 GAD 65+67，另外还表达了突触标志物 Synapsin 和 PSD95 (图 15)。在 BDNF-NSCs 组，ChAT 阳性细胞占 $53.66 \pm 3.57\%$ ，GAD 65+67 阳性细胞占 $35.69 \pm 2.59\%$ ，提示形成了兴奋性和抑制性神经元的混合群体；Synapsin 阳性细胞占 $70.57 \pm 4.19\%$ ，而无 PSD95 表达 (图 16A 和 B)。此外，在部分 GFP 阳性细胞突起周围可观察到 MBP 阳性细胞包绕 (图 16A)；在 BDNF/Dlx2-NSCs 组中，GAD 65+67 阳性神经元分化比例提高到 $61.27 \pm 4.89\%$ ，ChAT 阳性神经元占 $11.79 \pm 3.10\%$ 。值得注意的是，这些神经元大部分形成 Synapsin 阳性 ($72.61 \pm 2.07\%$) 而非 PSD95 阳性的突触结构，且部分细胞周围被 MBP 阳性的细胞包绕，提示形成髓鞘结构 (图 16A 和 B)。

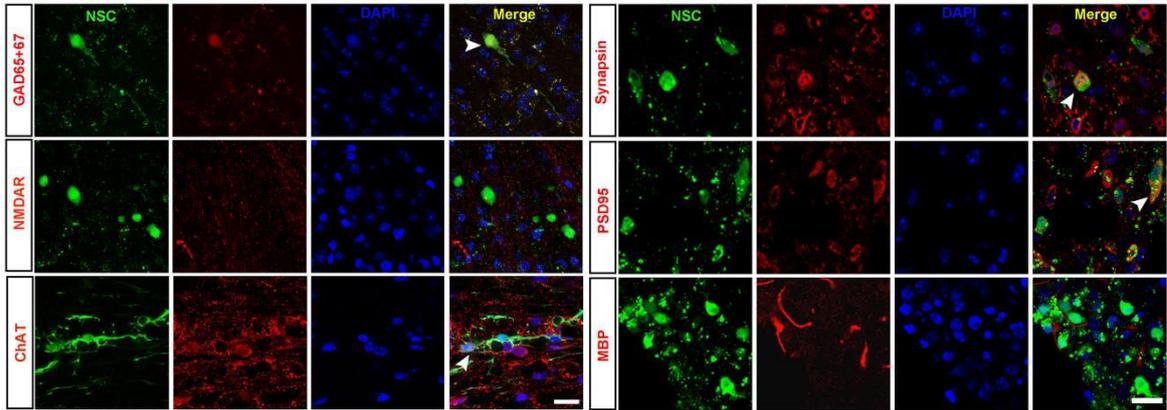
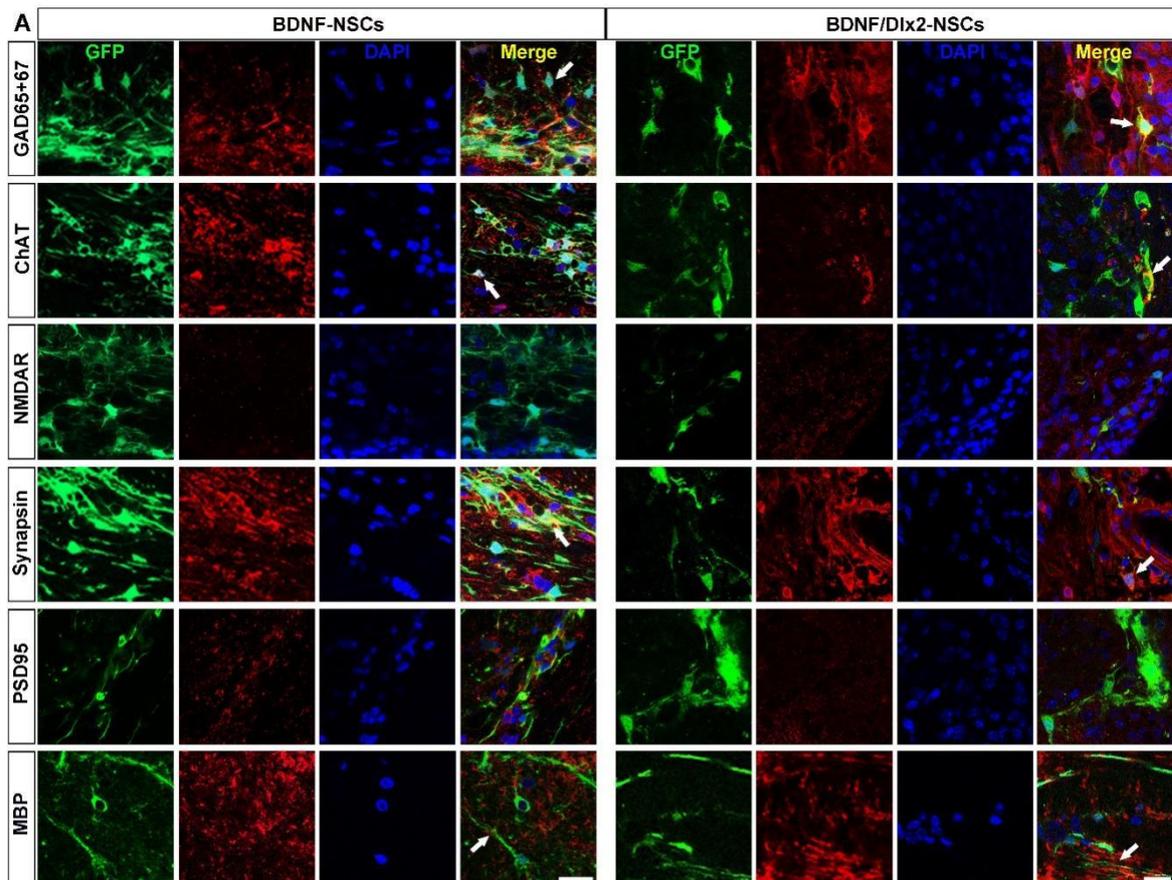


图 15. GFP-NSCs 源性细胞的表型特征，突触形成和髓鞘化。在 NSCs 移植后第 28 天，对照组的脑组织切片中存活的少量细胞表达神经递质标志物 ChAT 和 GAD 65+67，未表达 NMDAR；部分 GFP 阳性细胞表达突触前膜标记物 Synapsin 和兴奋性突触后膜标志物 PSD95，但未见髓鞘标志物 MBP 包绕在 GFP 阳性神经元周围。白色箭头指示双阳性细胞，比例尺= 20 μm 。



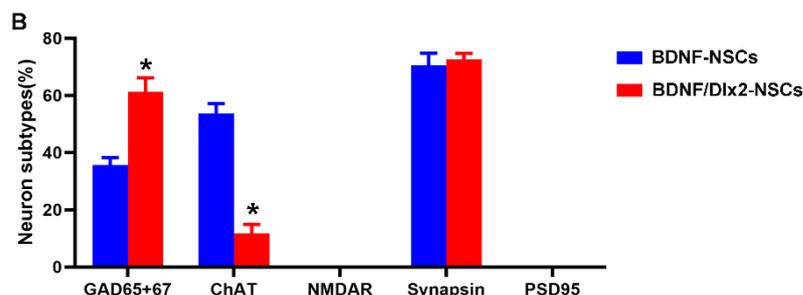


图 16. 基因修饰 NSCs 源性细胞的表型特征，突触形成和髓鞘化。(A) 在 NSC 移植后第 28 天，来源于 BDNF-NSCs 组和 BDNF/Dlx2 NSCs 组的脑组织切片用 GAD 65+67 抗体、NMDAR 抗体，ChAT 抗体来检测 NSC 分化成的 GABA 能神经元、谷氨酸能神经元、胆碱能神经元表型。在 BDNF-NSCs 组中，大部分 GFP 阳性细胞表达神经递质标志物 ChAT，GAD 65+67 次之。而在 BDNF/Dlx2-NSCs 组中，GFP 阳性细胞表达 GAD 65+67 数量明显增加。大部分 GFP 阳性细胞表达 Synapsin，但兴奋性突触后膜标志物 PSD95 表达量较少，MBP 是髓鞘标记物，在 GFP 阳性细胞周围发现。(B) BDNF-NSCs 组和 BDNF/Dlx2-NSCs 组所有 GFP 阳性细胞中神经递质标志物 ChAT、GAD 65+67 和 NMDAR，突触标志物 Synapsin 和 PSD95，以及 MBP 阳性细胞的百分比直方图。* 表示与 BDNF-NSC 组比较， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。比例尺= 20 μm 。

2.12 移植的 NSCs 来源的神经元与宿主神经回路整合

我们首先研究了 NSCs 来源的神经元与宿主神经回路的形态学整合。腺相关病毒 2/1 血清型 (AAV 2/1)，可通过突触前成分传递到突触后成分，其编码的红色荧光蛋白 (mCherry) 可标记神经纤维束。BDNF/Dlx2-NSCs 移植后第 14 天，将 AAV 2/1 注入双侧初级运动皮层 (M1)，第 28 天取脑切片 (图 17A)。脑桥中可见 GFP 与 mCherry 双阳性细胞 (图 17B)，表明 NSCs 来源的神经元与 M1 区神经元有突触连接，并接受突触传递物质。接下来，我们将 NSCs 与 Lenti-BDNF/Dlx2 和 AAV 2/1 病毒共转染，研究移植来源的神经元是否可以向宿主神经元发送突触信号。BDNF/Dlx2-AAV-NSCs 于 PI 造模后 7 天移植于脑桥，并在第 28 天取脑 (图 18A)。观察到脑桥移植区有较多 GFP 阴性 mCherry 阳性细胞 (图 18B)。为了验证该细胞类型，我们通过 MAP2 神经元抗体染色，证实了该细胞为宿主神经元 (图 18C)。这些结果表明，移植的 NSCs 来源的神经元能够接收和发送突触信号物质，与宿主神经元建立连接。

为了研究移植 NSCs 来源的神经元是否具有功能，我们在移植后 28 天进行了全细胞膜片钳记录。结果表明，NSCs 来源的神经元对突触激活具有自发动作

电位、诱发动作电位和突触后电流的反应，表明这些神经元具有电活性，存在动作电位并接收突触输入 (图 19A)。此外，NSCs 来源的神经元与宿主神经元具有相似的电生理特性 (图 19B)。这些数据表明，移植源性神经元在形态和功能上与宿主神经网络整合。

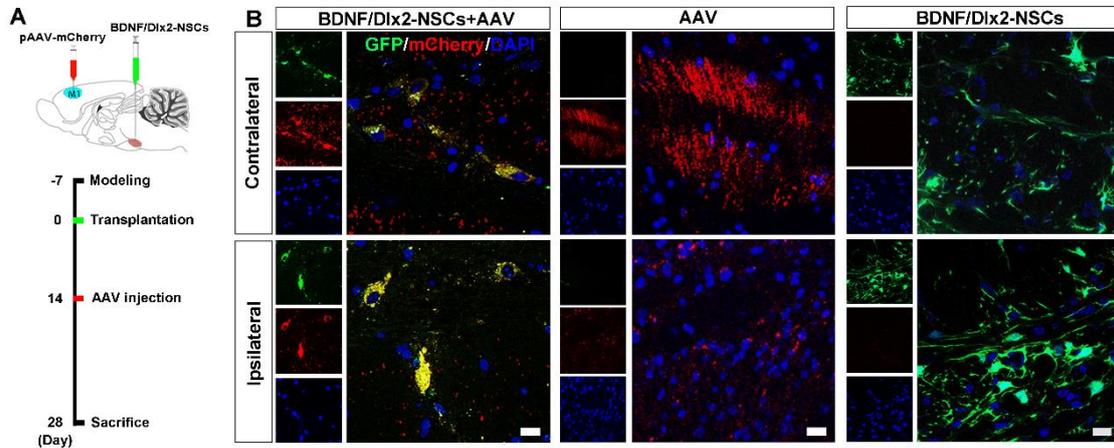


图 17. 移植 NSCs 来源的神经元可接受宿主神经元突触信号。(A) 示意图为 BDNF/Dlx2-NSCs 移植前 7 天 PI 造模，后第 14 天将相同剂量的 AAV 2/1 注入双侧初级运动皮层 (M1)，28 天后取脑切片。(B) 共聚焦图片显示 BDNF/Dlx2-NSCs + AAV 2/1 组脑桥梗死同侧和对侧 GFP 和 mCherry 双阳性的细胞 (左图)。AAV 2/1 组脑桥梗死同侧和对侧 mCherry 阳性神经纤维 (中图)。BDNF/Dlx2-NSCs 组梗死同侧和对侧 GFP 阳性细胞 (右图)。标尺= 20 μm 。

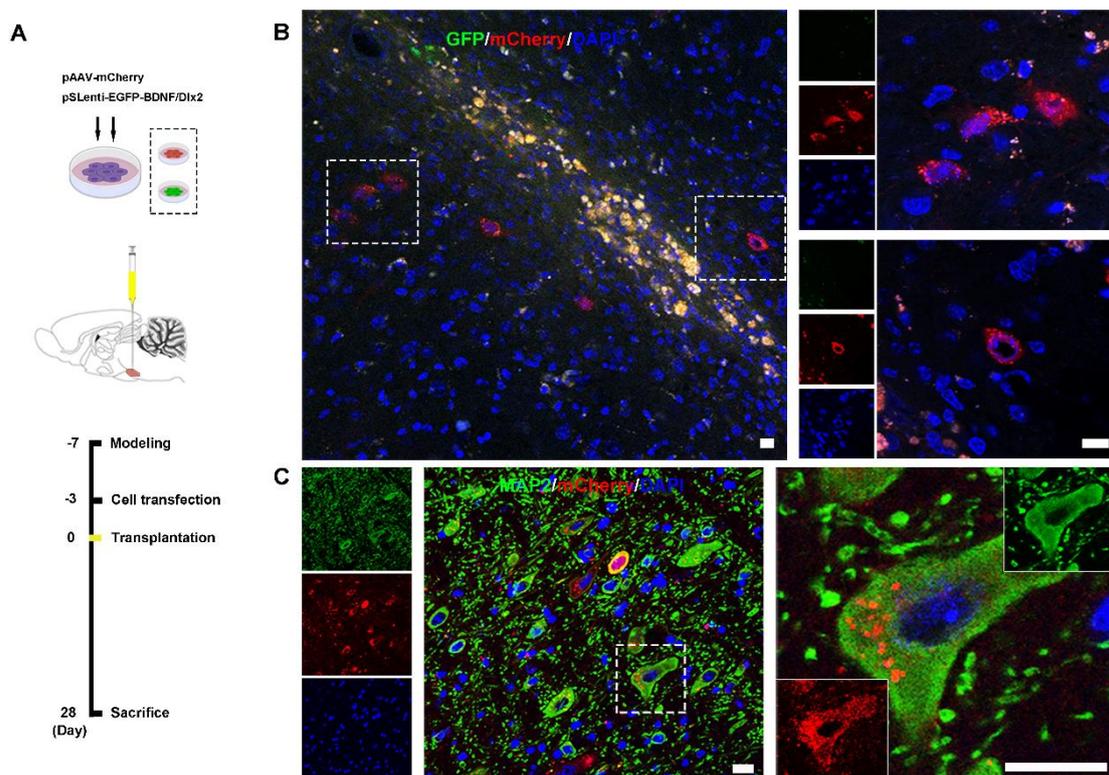


图 18. 移植 NSCs 来源的神经元可向宿主神经元发送突触信号。(A) pAAV-mCherry 和 pSLenti-EGFP-BDNF/Dlx2 共转染 NSCs 后移植到梗死脑桥，并于 28 天后取脑切片。PI 造模、NSCs 转染、移植和取脑切片时间示意图。(B) 移植部位两侧出现 GFP 阴性 mCherry 阳性细胞。(C) 存在 GFP 阴性 mCherry 阳性细胞的脑桥切片经 MAP2 抗体染色，共聚焦图片显示 mCherry 荧光蛋白在大部分 MAP2 阳性的神经元内表达，呈颗粒状结构。标尺= 20 μm 。

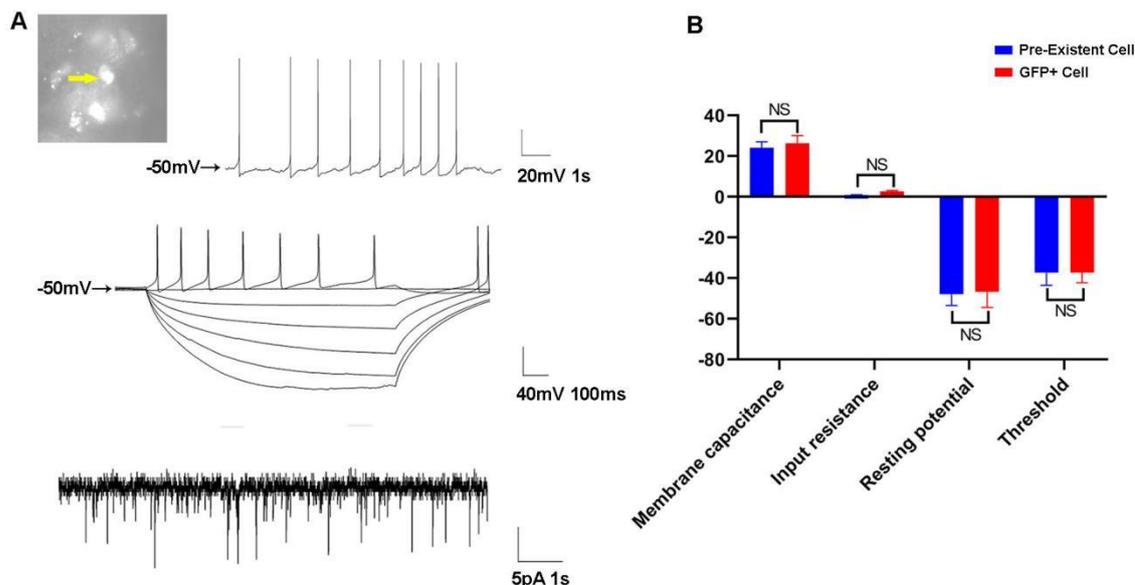


图 19. 移植 NSCs 来源的神经元具有电生理活动。(A) BDNF/Dlx2-NSCs 移植后第 28 天，全细胞膜片钳记录 GFP 阳性细胞具有自发动作电位 (上图)，可触发动作电位 (中图)，并显示自发的突触后电流(下图)。(B) GFP 阳性细胞的膜电容、输入电阻、静息电位、阈值等电生理参数与宿主原先存在的神经元相似。

2.13 NSCs 改善脑桥梗死后神经功能

在移植第-4 天、第 0 天、第 1 天、第 3 天、第 7 天、第 14 天、第 28 天采用 Voetsch 评分和肢体放置试验对神经功能进行评估 (图 20C)。在 Voetsch 评分中，PBS 组和 TrkB-KD 组评分低于 NSC 组和 BDNF /Dlx2 组。在第 14 天和第 28 天，BDNF /Dlx2 组得分高于 NSC 组 (图 20C)。在肢体放置试验中，PBS 组和 TrkB-KD 组评分低于 NSC 组和 BDNF /Dlx2 组，然而，在第 14 天和第 28 天，BDNF /Dlx2 组和 NSC 组无统计学差异 (图 20C)。其原因考虑为肢体放置试验只有 6 个评估项目，其敏感度远远低于有 14 项的 Voetsch 评分。

此外，我们在 NSCs 移植后第 28 天通过磁共振成像 (MRI) 和 HE 染色检测脑桥梗死体积。如图 20A 和 B 所示，NSCs 移植后梗死体积减小，BDNF /Dlx2 组

更明显。结合行为学评估、MRI 和 HE 染色，提示 BDNF /Dlx2-NSCs 移植后 PI 小鼠的梗死体积减小，神经功能改善。

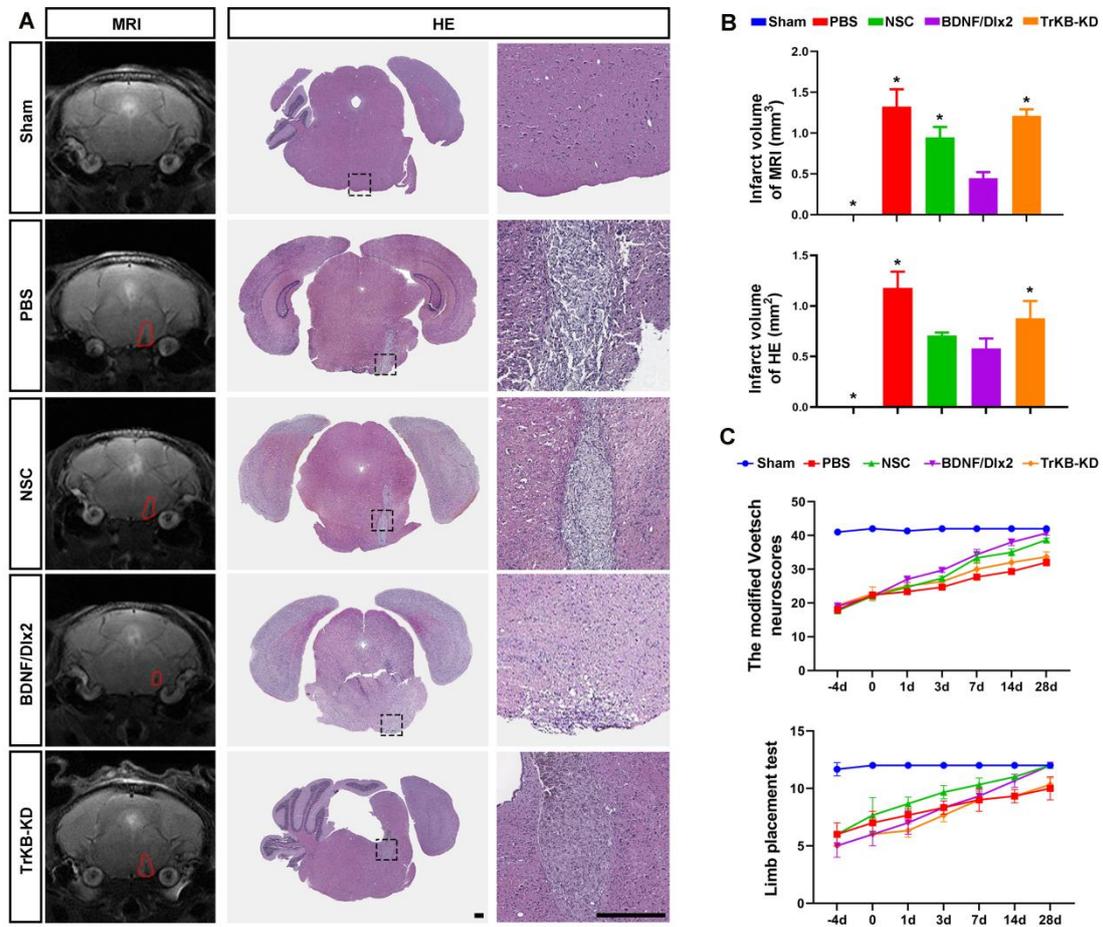


图 20. NSCs 移植治疗脑桥梗死。(A) MRI 和 HE 染色检测并测量梗死体积，红色虚线代表梗死区域。(B) 直方图显示 MRI 测量梗死体积 (上图)；HE 染色测量梗死面积(下图)。(C) 在移植后不同时间点分别采用 Voetsch 评分 (上图) 和肢体放置试验 (下图) 对神经功能进行评估。* 代表与 BDNF/Dlx2 组比较。比例尺= 300 μm 。

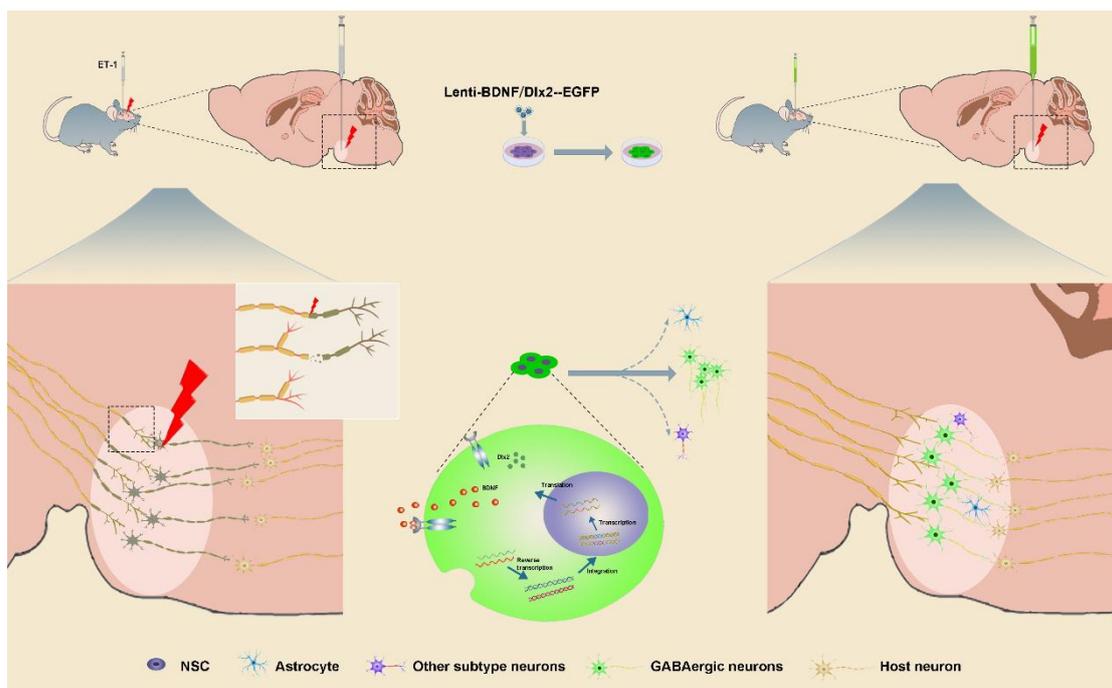


图 21. 图解总结。脑桥梗死后神经元丢失，髓鞘断裂，Lenti-BDNF/Dlx2-NSCs 移植于脑桥梗死灶，过表达 BDNF 和 Dlx2 促进 NSCs 的存活以及向 GABA 能神经元分化，与宿主神经元建立突触连接并重建受损神经回路。

3 讨论

脑桥有大量纵行和横行神经纤维束通行，在感觉和运动传导中起着重要作用。脑桥梗死引起不可逆的组织损伤和神经元丢失，导致神经功能缺损。本实验在脑桥梗死后通过对神经纤维束追踪，观察到运动传导通路中断，小鼠的运动和感觉功能障碍在脑桥梗死后至少持续 28 天。

在脑梗死的治疗中，目前有效的治疗方法局限于急性溶栓和血管内介入治疗，然而，对神经再生的改善微乎其微，难以重建受损的神经回路。既往研究表明 NSCs 对 MCAO 动物模型有治疗作用^[6,35-37]，此外，在脊髓损伤模型当中，NSCs 来源的神经元可作为“中继”重建受损的神经回路^[4,5]。因此，我们通过 NSCs 的细胞替代作用重建脑桥梗死后受损的神经回路。

最佳的治疗策略是诱导内源性 NSCs 增殖分化。在 MCAO 模型当中，可观察到内源性 NSCs 沿着 SVZ 到梗死皮层分布。此外，皮层梗死后 28 天，内源性 NSCs 分布于整个梗死区域，考虑为皮层梗死区 NSCs 原位生成或迁移而来，这与先前的研究结果一致^[38]。然而，脑桥并非公认的神源性区域，且距离 SVZ 与 SGZ 较远，即使脑桥梗死同侧 SVZ 内源性 NSCs 明显增加，在梗死区均未发现 NSCs。另一种可能的治疗方法是将梗死区周围现有的细胞类型（如星形胶质细胞）转分化为有功能的神经元，但这在目前的研究当中存在很大的争议^[39,40]。因此，外源性 NSCs 移植是用于治疗脑桥梗死的最佳选择。

外源性 NSCs 移植的首要问题是如何提高存活率，因为卒中后的微环境^[40-42]，如激活的级联炎症反应会对外源性 NSCs 造成损害。在移植时间的选择上，有研究认为，促炎细胞因子在卒中急性/亚急性期高度表达，随着时间的推移呈下降趋势，在 12 天后恢复到基本正常水平^[43]。在延迟时间点(如卒中后 7 天)进行 NSCs 移植可以避免急性/亚急性期的细胞毒性环境^[9]。我们的实验也证实，脑桥梗死后 1、3 天移植的外源性 NSCs 几乎没有在梗死后第 28 天存活；在第 7 天移植，外源性 NSCs 的存活率显著提高。因此，我们将脑桥梗死后第 7 天作为最佳移植时间点。

即使优化移植时间，NSCs 的存活率仍较低。许多方法已被应用于提高 NSCs 的生存能力。一种是 NSCs 与细胞因子共移植或移植前处理^[44-46]，另一种是基因修饰 NSCs 使其过表达神经营养因子，如神经营养因子 3^[47]、血管生成因

子^[48], BDNF^[27]。BDNF 及其受体在神经系统中广泛表达, 可保护现有神经元, 诱导神经发生, 促进突触可塑性^[27,49]。在 MCAO 模型中, 基因修饰 BDNF 过表达已被证实可促进移植 NSCs 的存活^[28]。在本研究中, 外源性 NSCs 经慢病毒转染过表达 BDNF, 在体外和体内均能保护 NSCs 免受缺血性损伤。此外, NSCs 可根据不同微环境条件分化为星形胶质细胞和神经元, 在先前的研究当中, 缺血时更多的 NSCs 发育成星形胶质细胞^[50-52], 这可能削弱其治疗作用。我们通过过表达 BDNF 促进 NSCs 大部分向成熟神经元分化, 而 BDNF 受体 TrkB 的下调抑制了 NSCs 的存活和神经分化。这表明 BDNF 通过靶向 TrkB 受体的方式改变 NSCs 的命运。

第二个关键问题是如何使移植 NSCs 定向分化为脑桥梗死后丢失的神经元类型。在本研究中, 可观察到大脑皮层神经元以谷氨酸能神经元为主, 而脑桥神经元主要为 GABA 能神经元, 脑桥梗死导致 GABA 能神经元丢失。过表达 BDNF 后移植 NSCs 向各类型神经元分化, 其中以胆碱能神经元为主, 难以充分补充脑桥梗死后丢失的神经元类型。Dlx2 是一种促进中间神经元 GABA 合成、突触发生和树突发生的转录因子^[29], 在人多能干细胞中, Dlx2 与 ASCL1 共同过表达可产生纯 GABA 能神经元^[30]。我们通过基因修饰共同过表达 Dlx2 诱导移植 NSCs 大部分向 GABA 能神经元定向分化。

第三个关键问题是 NSCs 来源的神经元是否与宿主神经元整合。在 BDNF/Dlx2-NSCs 移植后第 28 天, NSCs 来源的神经元出现长突起, 多数向梗死部位两侧横向延伸, 一小部分向吻侧和尾侧纵向延伸。免疫染色结果表明大部分 NSCs 来源的神经元与宿主神经元形成成熟的突触结构。在检测新生神经元与宿主神经回路结构整合中, 有研究通过电镜与神经示踪剂进行顺行和逆行追踪, 包括小麦胚芽凝集素(WGA)、跨突触水疱性口炎病毒(VSV)与伪狂犬病毒(PRV)^[4,5]。在本研究中, 我们使用编码 mCherry 红色荧光蛋白的顺行跨单突触病毒 AAV 2/1 研究突触信号物质是否可以通过突触结构, AAV 2/1 能特异性感染成熟神经元。首先, 将相同剂量 AAV 2/1 注入双侧大脑初级运动皮层 (M1), 我们发现脑桥区移植的 GFP 阳性细胞同时也表达了 mCherry 红色荧光, 考虑为移植源性神经元, 提示移植源性神经元可接受 M1 区宿主神经元的突触传递。接着我们进一步研究移植源性神经元是否可向宿主神经元发送突触传递物质。利用 AAV 2/1 和 Lenti-BDNF/Dlx2 转染 NSCs, 使其共表达 mCherry 红色和 GFP 绿

色荧光后移植入梗死部位。第 28 天后在移植区发现了较多 GFP 阴性 mCherry 阳性细胞, 通过 MAP2 神经元抗体荧光染色, 确认该细胞为宿主神经元。此外, mCherry 荧光蛋白在更大范围的宿主神经元中被发现, 表明 AAV 2/1 可以通过移植源性神经元建立的突触向宿主神经元进行顺向传递。所有这些数据表明, NSCs 来源的神经元可以接受宿主神经元的突触传递, 并通过突触传递信号到宿主神经元。

在研究新生神经元与宿主神经回路功能整合中, 有文献通过全细胞膜片钳记录, 或在电刺激运动皮层后进行 c-fos 免疫荧光染色验证^[4,53]。在本研究中, 我们应用电生理分析来表征 NSCs 来源神经元的电特性和与宿主神经元的功能连接。在移植后第 28 天, 全细胞膜片钳记录显示 NSCs 来源的神经元具有自发的动作电位, 可在突触激活时触发动作电位, 并显示自发的突触后电流。这表明这些神经元是电活动的, 能够发出动作电位和接收突触输入。根据细胞的放电形态和膜电位, 它们被认为是中间神经元或 GABA 能神经元。此外, NSCs 来源的神经元与宿主神经元的电生理参数相似。在外源性 NSCs 治疗脊髓损伤的研究当中, 可观察到移植源性神经元被 MBP 阳性细胞包绕, 提示移植源性神经元出现了再髓鞘化^[4]。值得注意的是, 本研究中也出现了一致的结果, 提示移植源性神经元可以被内源性少突胶质细胞包裹形成髓鞘, 这对电脉冲的传输有很大的贡献。以上形态学和电生理结果表明, NSCs 来源的神经元可以形成成熟的形态结构, 与宿主神经元有功能性的突触连接, 并整合入宿主神经回路。

第四个关键问题是移植 NSCs 是否可以治疗脑桥梗死。目前已有大量临床前研究^[9-10,54]评估了外源性 NSCs 移植在 MCAO 动物模型的治疗效果, 结果均表明移植 NSCs 能显著促进脑缺血动物的组织结构和神经功能恢复。在本研究中, 我们通过 MRI 和 HE 染色评估脑桥梗死体积, 联合 Voetsch 评分(反映椎基底神经系统的感觉运动能力)和肢体放置试验(评估视觉、触觉和本体感觉), 结果提示 NSCs 移植后脑桥梗死体积减小, 神经功能恢复。

综上所述, 共过表达 BDNF 和 Dlx2 促进 NSCs 向 GABA 能神经元分化, 与宿主神经元建立突触连接, 重建神经回路。本研究为外源性 NSCs 移植治疗脑桥梗死提供了依据。

4 结 论

脑桥梗死后内源性 NSCs 无原位生成或迁移而来；过表达 BDNF 和 Dlx2 可促进外源性 NSCs 分化为有功能的 GABA 能神经元，整合并重建宿主受损神经回路，促进脑桥梗死小鼠神经功能恢复。

参考文献

- [1] Maeshima, S., et al., *Functional outcome in patients with pontine infarction after acute rehabilitation*. *Neurol Sci*, 2012. **33**(4): p. 759-64.
- [2] Liu, X., et al., *Cell based therapies for ischemic stroke: From basic science to bedside*. *Progress in Neurobiology*, 2014. **115**: p. 92-115.
- [3] Daadi, M.M., et al., *Imaging neural stem cell graft-induced structural repair in stroke*. *Cell Transplant*, 2013. **22**(5): p. 881-92.
- [4] Lai, B.Q., et al., *Tissue-Engineered Neural Network Graft Relays Excitatory Signal in the Completely Transected Canine Spinal Cord*. *Adv Sci (Weinh)*, 2019. **6**(22): p. 1901240.
- [5] Abematsu, M., et al., *Neurons derived from transplanted neural stem cells restore disrupted neuronal circuitry in a mouse model of spinal cord injury*. *J Clin Invest*, 2010. **120**(9): p. 3255-66.
- [6] Hamblin, M.H., et al., *Modulation of gene expression on a transcriptome-wide level following human neural stem cell transplantation in aged mouse stroke brains*. *Exp Neurol*, 2022. **347**: p. 113913.
- [7] Gao, J., et al., *Metabolomic Profiling of the Synergistic Effects of Ginsenoside Rg1 in Combination with Neural Stem Cell Transplantation in Ischemic Stroke Rats*. *Journal of Proteome Research*, 2020. **19**(7): p. 2676-2688.
- [8] Zhang, H., et al., *Spatiotemporal PET Imaging of Dynamic Metabolic Changes After Therapeutic Approaches of Induced Pluripotent Stem Cells, Neuronal Stem Cells, and a Chinese Patent Medicine in Stroke*. *J Nucl Med*, 2015. **56**(11): p. 1774-9.
- [9] Mira, H., et al., *Signaling through BMPRII regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus*. *Cell Stem Cell*, 2010. **7**(1): p. 78-89.
- [10] Lugert, S., et al., *Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging*. *Cell Stem Cell*, 2010. **6**(5): p. 445-56.
- [11] Li, L. and H. Clevers, *Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals*. *Science*, 2010. **327**(5965): p. 542-5.
- [12] Sullivan, R., et al., *A possible new focus for stroke treatment - migrating stem cells*. *Expert Opin Biol Ther*, 2015. **15**(7): p. 949-58.
- [13] Kriegstein, A. and A. Alvarez-Buylla, *The glial nature of embryonic and adult neural stem cells*. *Annu Rev Neurosci*, 2009. **32**: p. 149-84.
- [14] Kalladka, D. and K.W. Muir, *Brain repair: cell therapy in stroke*. *Stem Cells Cloning*, 2014. **7**: p. 31-44.
- [15] Hankey, G.J., *Stroke*. *The Lancet*, 2017. **389**(10069): p. 641-654.
- [16] Banerjee, S., et al., *Human stem cell therapy in ischaemic stroke: a review*. *Age Ageing*, 2011. **40**(1): p. 7-13.

- [17] Chen, L., et al., *Meta-Analysis and Systematic Review of Neural Stem Cells therapy for experimental ischemia stroke in preclinical studies*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 32291.
- [18] Lees, J.S., et al., *Stem cell-based therapy for experimental stroke: a systematic review and meta-analysis*. Int J Stroke, 2012. **7**(7): p. 582-8.
- [19] Vu, Q., et al., *Meta-analysis of preclinical studies of mesenchymal stromal cells for ischemic stroke*. Neurology, 2014. **82**(14): p. 1277-86.
- [20] Christian, K.M., H. Song, and G.L. Ming, *Functions and dysfunctions of adult hippocampal neurogenesis*. Annu Rev Neurosci, 2014. **37**: p. 243-62.
- [21] Chollet, F., et al., *Pharmacological therapies in post stroke recovery: recommendations for future clinical trials*. J Neurol, 2014. **261**(8): p. 1461-8.
- [22] Li, J., et al., *Neurovascular Recovery via Cotransplanted Neural and Vascular Progenitors Leads to Improved Functional Restoration after Ischemic Stroke in Rats*. Stem Cell Reports, 2014. **3**(1): p. 101-114.
- [23] Hao, L., et al., *Stem cell-based therapies for ischemic stroke*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 468748.
- [24] Sakata, H., et al., *Minocycline-preconditioned neural stem cells enhance neuroprotection after ischemic stroke in rats*. J Neurosci, 2012. **32**(10): p. 3462-73.
- [25] Abematsu, M., I. Smith, and K. Nakashima, *Mechanisms of neural stem cell fate determination: extracellular cues and intracellular programs*. Curr Stem Cell Res Ther, 2006. **1**(2): p. 267-77.
- [26] Martino, G. and S. Pluchino, *The therapeutic potential of neural stem cells*. Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(5): p. 395-406.
- [27] Jiang, X.C., et al., *Neural Stem Cells Transfected with Reactive Oxygen Species-Responsive Polyplexes for Effective Treatment of Ischemic Stroke*. Adv Mater, 2019. **31**(10): p. e1807591.
- [28] Lee, H.J., et al., *Human neural stem cells genetically modified to overexpress brain-derived neurotrophic factor promote functional recovery and neuroprotection in a mouse stroke model*. J Neurosci Res, 2010. **88**(15): p. 3282-94.
- [29] Pla, R., et al., *Dlx1 and Dlx2 Promote Interneuron GABA Synthesis, Synaptogenesis, and Dendritogenesis*. Cereb Cortex, 2018. **28**(11): p. 3797-3815.
- [30] Yang, N., et al., *Generation of pure GABAergic neurons by transcription factor programming*. Nat Methods, 2017. **14**(6): p. 621-628.
- [31] Wen, Z., et al., *The effect of anterior communicating artery flow on neurovascular injury and neurobehavioral outcomes in mice with recurrent stroke*. Brain Res, 2019. **1724**: p. 146440.
- [32] Luo, M., et al., *Establishment of Acute Pontine Infarction in Rats by Electrical Stimulation*. J Vis Exp, 2020(162).
- [33] Lekic, T., et al., *Evaluation of the hematoma consequences, neurobehavioral profiles, and histopathology in a rat model of pontine hemorrhage*. J Neurosurg, 2013. **118**(2): p. 465-77.
- [34] Ohira, K., et al., *Ischemia-induced neurogenesis of neocortical layer 1 progenitor cells*. Nat Neurosci, 2010. **13**(2): p. 173-9.
- [35] Hou, S.W., et al., *Functional integration of newly generated neurons into striatum after*

- cerebral ischemia in the adult rat brain*. Stroke, 2008. **39**(10): p. 2837-44.
- [36] Wang, G., et al., *Silencing of circular RNA HIPK2 in neural stem cells enhances functional recovery following ischaemic stroke*. EBioMedicine, 2020. **52**: p. 102660.
- [37] Ohira, Koji et al. *Ischemia-induced neurogenesis of neocortical layer 1 progenitor cells*. Nature neuroscience vol. 13,2 (2010): 173-9.
- [38] Zhang, B., et al., *Intra-Arterial Delivery of Neural Stem Cells to the Rat and Mouse Brain: Application to Cerebral Ischemia*. J Vis Exp, 2020(160).
- [39] Wang, L.L., et al., *Revisiting astrocyte to neuron conversion with lineage tracing in vivo*. Cell, 2021. **184**(21): p. 5465-5481 e16.
- [40] Tai, W., X.M. Xu, and C.L. Zhang, *Regeneration Through in vivo Cell Fate Reprogramming for Neural Repair*. Front Cell Neurosci, 2020. **14**: p. 107.
- [41] He, J., et al., *Oxidative Stress, Inflammation, and Autophagy: Potential Targets of Mesenchymal Stem Cells-Based Therapies in Ischemic Stroke*. Front Neurosci, 2021. **15**: p. 641157.
- [42] Kang, S.S., et al., *Endogenous CNTF mediates stroke-induced adult CNS neurogenesis in mice*. Neurobiol Dis, 2013. **49**: p. 68-78.
- [43] Kulik, T., et al., *Regulation of cerebral vasculature in normal and ischemic brain*. Neuropharmacology, 2008. **55**(3): p. 281-8.
- [44] Kim, K.A., et al., *Role of Autophagy in Endothelial Damage and Blood-Brain Barrier Disruption in Ischemic Stroke*. Stroke, 2018. **49**(6): p. 1571-1579.
- [45] Sakata, H., et al., *Interleukin 6-preconditioned neural stem cells reduce ischaemic injury in stroke mice*. Brain, 2012. **135**(Pt 11): p. 3298-310.
- [46] Zhang, G., et al., *Interferon-gamma Promotes Neuronal Repair by Transplanted Neural Stem Cells in Ischemic Rats*. Stem Cells Dev, 2018. **27**(5): p. 355-366.
- [47] Zhang, G., et al., *Interferon- γ Promotes Neuronal Repair by Transplanted Neural Stem Cells in Ischemic Rats*. Stem Cells Dev, 2018. **27**(5): p. 355-366.
- [48] Li, X., Z. Yang, and A. Zhang, *The effect of neurotrophin-3/chitosan carriers on the proliferation and differentiation of neural stem cells*. Biomaterials, 2009. **30**(28): p. 4978-85.
- [49] Cao, L., et al., *VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory*. Nat Genet, 2004. **36**(8): p. 827-35.
- [50] Huang, E.J. and L.F. Reichardt, *Neurotrophins: roles in neuronal development and function*. Annu Rev Neurosci, 2001. **24**: p. 677-736.
- [51] Faiz, M., et al., *Adult Neural Stem Cells from the Subventricular Zone Give Rise to Reactive Astrocytes in the Cortex after Stroke*. Cell Stem Cell, 2015. **17**(5): p. 624-34.
- [52] Peron, S. and B. Berninger, *Imported Stem Cells Strike against Stroke*. Cell Stem Cell, 2015. **17**(5): p. 501-2.
- [53] Hou, Shang-Wei et al. *Functional integration of newly generated neurons into striatum after cerebral ischemia in the adult rat brain*. Stroke vol. 39,10 (2008): 2837-44.
- [54] Chen, L., et al., *Meta-Analysis and Systematic Review of Neural Stem Cells therapy for*

experimental ischemia stroke in preclinical studies. Sci Rep, 2016. **6**: p. 32291.

综述

神经干细胞治疗缺血性脑卒中的研究进展

摘要：缺血性脑卒中是全球三大致残和死亡疾病之一，引起不可逆的组织损伤和神经元丢失，从而导致神经功能缺损。虽然神经可塑性和神经回路的重组有助于不同程度的自发恢复，但对神经再生的改善微乎其微，而神经干细胞治疗已显示出有希望的临床前结果。神经干细胞（Neural stem cells, NSC）是一类具有自我更新能力的细胞，脑缺血性卒中后可迁移至病灶，分化为神经元和神经胶质细胞，补充丢失的神经元，以及通过营养支持、调节炎症反应等以改善缺血缺氧微环境。以内源性 NSCs 为基础的自发恢复并不足以实现神经功能的完全恢复，外源性 NSCs 移植已被证实可用于修复组织缺损和促进功能恢复。本文旨在综述 NSCs 在缺血性脑卒中的治疗作用，尤其是外源性 NSCs 移植治疗缺血性脑卒中的研究进展。最后，我们讨论了 NSCs 临床转化和应用的挑战。

关键词：缺血性脑卒中 神经干细胞 移植

缺血性脑卒中是由多种因素造成脑血液供应障碍，导致不可逆的组织损伤和神经元、胶质细胞和内皮细胞缺血缺氧性坏死，从而出现相对应神经功能损伤，其发病率和死亡率较高。脑缺血性卒中后在缺血及周围区发生一系列有害的病理变化，在急性期主要表现为三磷酸腺苷消耗，电解质浓度紊乱，兴奋性毒性谷氨酸释放，乳酸性酸中毒增加，活性氧(ROS)生成迅速增加^[1]，导致内皮细胞肿胀和血脑屏障损伤^[2]；亚急性期出现炎症细胞的激活和浸润、自噬的发生^[3]；在缺血性中风的慢性阶段(数月至数年)，血脑屏障(BBB)渗漏可能持续存在^[1]。虽然缺血性卒中的发生率较高，但目前有效治疗局限于急性溶栓和血管内介入治疗，治疗窗狭窄，存在出血风险。血管生成和神经再生有助于脑缺血性卒中后不同程度的自发恢复，但神经元增殖不能完全修复受损的大脑，大多数患者表现出持续的运动、感觉或认知障碍^[4,5]。因此，开发治疗卒中的新策略至关重要，而 NSCs 治疗已在缺血性脑卒中的临床前研究中得到深入发展。

NSCs 是一类具有分裂潜能和自我更新能力特点的细胞, 兼有免疫原性低、组织相容性好等特点, 可分化成神经元和胶质细胞。NSCs 主要分布在成年哺乳动物中枢神经系统的两个区域: 脑室下区(SVZ)和海马亚颗粒区(SGZ)^[6]。此外, 脑和外周神经系统的其他区域也可以发现 NSCs, 如纹状体、脊髓、新皮层和嗅球。正常情况下, 内源性 NSCs 处于静止、未分化的休眠状态(称为静息 NSCs, qNSCs), 并在干细胞池中保持动态平衡^[7,8]。在受到脑损伤等外界刺激时, qNSCs 可被激活增殖、迁移、分化^[9,10], 不仅基于组织替代, 还包括对炎症、免疫调节和内源性修复机制增强的影响^[11]。目前, 以 NSCs 为基础的脑卒中治疗分为内源性 NSCs 诱导和外源性 NSCs 移植两大类。

内源性 NSCs 在缺血性脑卒中后活跃地定位于脑损伤区域, 然后增殖分化为受损神经元表型, 自我修复和重建神经回路^[12]。脑缺血性损伤等病理条件从两个方面影响内源性神经发生。一方面, 位于神经源生态位的神经干/组细胞可向损伤区迁移, 趋化因子信号如 SDF-1、VEGF 和血管生成素从缺血组织释放, 影响 NSCs 沿血管到达损伤部位的过程^[13, 14]。另一方面, 纹状体、皮层和海马 CA1 区被认为是受损大脑的新神经源区, 在缺血性损伤后可生成新的神经元^[15, 16]。结合膜片钳记录, 电镜、逆行追踪技术以及评估早期基因 c-Fos 的表达, 较多研究已证明脑损伤后新神经元可整合至原有神经网络, 但主要集中在在受损的大脑皮层和纹状体^[17-21]。

然而, 内源性被激活的 NSCs 数量非常有限, 大部分正常分化为胶质细胞^[22], 通过诱导内源性神经生成, 受损脑组织神经功能恢复仍不足^[23, 24]。由此可知, 以内源性 NSCs 为基础的自发恢复并不足以实现神经功能的完全恢复, 外源性 NSCs 移植已被证实可用于修复组织缺损和促进功能恢复。临床前实验的结果表明, 外源性 NSCs 可以显著改善脑缺血动物的预后。移植 NSCs 对缺血性脑损伤的修复机制主要包括以下几个方面^[25-29]。首先, 外源性 NSCs 通过分化以细胞替代作用补充丢失的宿主神经元, 与宿主神经网络存在形态学和功能学整合, 从而重建受损的神经回路; 其次, 移植的 NSCs 通过分泌如 BDNF、NGF 等营养因子或抗炎因子, 改善了缺血区域周围炎症免疫微环境。最后, 移植的 NSCs 可激活更多的内源性细胞来修复神经损伤。目前大量的临床前研究^[30-32]评估了外源性 NSCs 移植

在缺血性脑卒中动物模型的治疗效果和安全性。Lees 等人^[33]和 Vu 等人^[34]使用 meta 分析来评估干细胞移植(包括 NSCs)的疗效。结果显示在 NSCs 移植后,脑缺血动物的神经功能得到明显改善,脑梗死体积减小。此外,预后程度改善与神经干细胞来源、注射方式、注射时机和剂量有关^[33, 34]。Chen 等^[32]也对 NSCs 治疗缺血性脑卒中的动物实验进行分析与评估,结果表明移植 NSCs 能显著促进脑缺血动物的神经功能和组织结构恢复。另外,没有发现重大的安全问题。

1. NSCs 移植

1.1 动物实验模型

目前关于 NSCs 移植以治疗缺血性脑卒中的研究大多采用 SD 大鼠或 C57 小鼠建立大脑中动脉闭塞(MCAO)脑缺血模型。MCAO 模型具有高度稳定性和可重复性,但操作稍微复杂一些,目前还没有更好的脑缺血模型。此外,实验研究主要使用健康成年动物,而非伴有其他疾病的老年动物,这与临床脑卒中患者并不完全吻合。

1.2 移植 NSCs 的来源

NSCs 目前有以下几种来源途径:首先,NSCs 可直接从胚胎组织的神经外胚层或成年动物^[35]的 SVZ 和 SGZ 中获得。第二,诱导多能干细胞也可以产生 NSCs^[36]。许多类型的体细胞可以分化成诱导多能干细胞。其中包括成纤维细胞、角化细胞^[37]、血^[38]和毛囊^[39]。第三,NSCs 也可以从其他来源派生。例如可以由胚胎干细胞生成^[40]。第四,将体细胞重新编程直接转化为诱导 NSCs^[41],该方法通过直接细胞转分化生成 NSCs,避免了生成诱导多能干细胞的漫长的中间步骤。

1.3 移植最佳时间

NSCs 移植时机至关重要。在移植时间选择上,卒中后 7 天可能被认为是 NSC 移植的最佳时间,而目前仍存在争议。大部分研究在建模后 24 小时以上进行 NSC 移植^[42],少部分研究在脑缺血后立即移植^[43]。有研究者认为在脑卒中急性/亚急性早期进行 NSC 移植,可通过释放治疗性营养因子,促进脑组织重塑,保护血脑屏障的完整性和功能^[44]。另外,还可减弱复杂的炎症信号级联反应。在一些研究中^[45],NSC 移植也被应用于慢性卒中后期。在啮齿动物卒中模型中,促炎细胞因子在 MCAO 急性/亚急性期高

度表达,但随着时间的推移呈下降趋势,在12天后恢复到基本正常水平^[46]。在延迟时间点(如卒中后7天)进行NSCs移植可以避免急性/亚急性期的细胞毒性环境^[47]。

1.4 移植数量与方式:

在NSCs移植中,还需要考虑的关键问题除了移植时间,还有NSCs的数量^[48, 49]。通常来说,移植NSCs数量在 1×10^5 以上^[50]。目前移植方式主要包括脑内、脑损伤区和血管内注射^[51, 52]。血管内注射包括尾静脉注射^[52]或动脉内注射^[53],然而,静脉输送可能导致NSCs滞留在肺和肝等过滤器官中。因此,动脉内注射可能是一个更合适的方法。此外,有报道称鼻内输送的干细胞可广泛迁移到缺血性中风的发病区域^[54]。

2. 优化移植方法

外源性NSCs移植后对修复神经回路有两个重要限制:低存活率和分化率。缺血区域由于高水平的活性氧、炎症导致的的不利微环境增加了移植细胞存活的难度。另外,NSCs移植本身可能诱发促炎反应甚至导致排斥反应^[55];此外,大部分移植NSCs在体内分化成星型胶质细胞^[12, 56, 57]。因此,提高移植NSCs的存活率和向神经元的分化率成了必须解决的两大难题。为了克服这些障碍,目前很多研究采用改良的方法以增强NSCs的治疗效果,如NSCs基因修饰、预处理、共移植、化学或生物材料辅助等。

2.1 外源性NSCs的体内示踪

为了更深入研究NSCs移植后在体内的去向,首要解决了NSCs的示踪问题。目前已开发了各种标记和追踪NSCs的方法。首先,直接标记是一种广泛应用的方法,用胸腺嘧啶类似物溴脱氧尿苷(BrdU)预先标记NSCs, BrdU在S期嵌入细胞核,随后可用抗体^[58]检测到。该方法可定量分析移植后NSCs的分裂数量。但由于BrdU会随着时间的推移而稀释,因此优先用于短期跟踪研究。其次,NSCs可以用超顺磁氧化铁颗粒(SPIO)标记^[59],从而可用磁共振成像(MRI)追踪,这似乎更便于向临床转化。NSCs还可以用荧光探针(如CM-Dil等^[60])标记,用于光学成像。近年来比较常用的方法是通过病毒转导进行标记,表达出荧光蛋白,如GFP和lacZ。然而,这种方法也存在一定的争议,比如改变NSC的特性^[58]。

2.2 外源性NSCs的基因修饰

目前很多研究尝试着对 NSCs 进行了修饰, 以提高 NSCs 移植后的治疗效果。主要集中在改善移植微环境, 以及增加 NSCs 在缺氧缺血微环境中的生存能力。可以肯定的是, NSCs 移植治疗缺血性脑卒中的未来方向将是 NSCs 与多种治疗方式的结合。

NSC 由于有限的细胞摄取和适度的增殖活性, 转染的难度很高^[61], 基于病毒的方法仍然是对 NSCs 进行基因修饰的主要方法。脑源性神经营养因子(BDNF)及其受体广泛表达于神经系统, 可促进神经细胞生存及增强神经发生。因此, 有研究试图通过基因修饰 NSCs 来诱导 BDNF 的过度表达, 以提高其存活率, 促进移植的 NSCs 向神经元分化^[62, 63]。神经营养因子 3 (Neurotrophin-3, NT-3) 是一类重要的生长因子, 能够促进神经元的存活、生长、分化, 刺激神经突起的形成^[64]。构建人 NT-3 的慢病毒载体后转染 NSCs, 移植至 MCAO 大鼠同侧纹状体区域后脑缺血大鼠的神经行为功能明显改善^[65]。血管内皮生长因子 (VEGF) 是一种重要的血管生成因子, 参与介导血管生成和营养补充^[66]。NSCs 转染 VEGF 基因后, 移植到脑卒中大鼠缺血区, 细胞可存活至 12 周。同时, 明显改善了脑卒中大鼠的神经功能, 说明转染 VEGF 可增加移植 NSC 的治疗效果。

因病毒载体安全问题尤为突出^[67], 利用理化性质来介导基因转移的非病毒载体材料研究已广泛开展。非病毒载体无传染性, 材料来源广泛, 化学结构可控制且易于大量制备, 与病毒载体相比较, 具有毒性低、免疫反应低等优点。然而, 因 NSCs 转染难度高, 且非病毒载体的转导效率低, 目的基因只能实现瞬间表达等原因, 目前开发出可用于转染 NSC 的非病毒载体非常少。有研究开发出了一种活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 反应电荷逆转聚合物[(2-丙烯酰基)乙基(p-硼酸苄基)二乙基溴化铵](B-PDEA)^[62], 其与质粒结合后能有效转染 NSCs。通过尾静脉注射, NSCs 可靶向聚集于 MCAO 小鼠模型梗死区域, 复合物进入细胞后, B-PDEA 被胞内 ROS 氧化为带负电荷的聚丙烯酸, 一方面可消耗细胞内产生 ROS, 另一方面迅速释放 BDNF 质粒进行高效转录, 大大提高了其在缺血性中风治疗中的治疗效果。

2.3 细胞因子预处理以重编程 NSCs

除了基因修饰, 有研究通过细胞因子预处理 NSCs 以重编程基因, 以

提高移植细胞的治疗效果。

白细胞介素-6 (IL-6)属于促炎细胞因子,参与缺血性卒中的发病机制。IL-6 预处理 NSCs 后,NSCs 被重新编程,细胞^[68]内锰超氧化物歧化酶(SOD2)显著上调,促进缺血区细胞存活;预处理后的 NSCs 还能诱导 VEGF 的分泌,促进微血管化,显著减小脑缺血梗死面积,改善神经功能。此外,当 IL-4 或 IL-10 等抗炎因子预处理 NSCs 时,结果与 IL-6 的结果一致。这些细胞因子主要起神经保护作用,促进细胞向损伤部位迁移。预处理方法主要为移植 NSCs 提供了良好的微环境^[69]。此外,使用 BDNF 预处理 NSCs 也有相似的结果,在脑缺血动物移植后可以看到细胞存活、迁移和神经功能的改善^[70]。

2.4 与细胞因子共移植

细胞因子是由多种细胞合成和分泌的小分子多肽或糖蛋白,可以调节 NSCs 的自我更新、增殖和分化,参与炎症反应等,对改善脑缺血性卒中后细胞微环境有重要作用。

神经生长因子(NGF)对神经元的发育、分化和再生均具有重要的调控作用。在 MCAO 模型中,NSCs 和 NGF 联合移植明显改善 MCAO 后大鼠神经功能^[71]。VEGF 在中枢神经系统中发挥着促进血管、神经生成以及神经营养和神经保护作用等^[72]。已有研究表明,VEGF 与 NSCs 共移植后表现出更好的行为恢复,大脑皮质和纹状体脑萎缩程度明显降低^[73]。 γ 干扰素 (IFN- γ) 是一类促炎症介质,联合 NSCs 移植后可使脑缺血大鼠体内神经发生显著增加^[74]。此外,BDNF 联合 NSCs 移植的治疗效果优于单独 NSCs 移植^[75]。

2.5 生物工程

生物工程在 NSCs 的应用中也发挥着重要作用。它们可以用来形成封装 NSCs 和生长因子的支架^[76]，封装还可以阻止体内免疫反应的激活。Wilson 等人进行了脑卒中后 5 天注射水凝胶生物材料支架的实验^[76]。另一项研究也发现，水凝胶可以促进脑内 NSCs 的分化^[77]。此外，Wang 等人利用细胞外基质中的 NSCs 和脑微血管内皮细胞重建了神经血管单元^[78]。最近有研究通过基因工程改造了丝状噬菌体，将病毒纳米纤维静电涂覆于生物相容性可注射的丝蛋白微粒上，不仅能促进 NSCs 的粘附、增殖和浸润，而且能诱导 NSCs 在基础培养基中 3 天内优先向神经元分化。将装载 NSCs 的微粒注射到模型大鼠脑卒中空腔后，微粒上的噬菌体纳米纤维在 2 周内刺激脑卒中部位血管生成和神经生成，实现脑再生，12 周内使大鼠肢体运动功能恢复^[79]。

3. NSCs 治疗缺血性卒中的挑战：

目前，已有多个干细胞治疗缺血性卒中的临床研究项目在 ClinicalTrials.gov 网站注册，其中以 NSCs 为基础治疗缺血性卒中的临床研究仅有 6 项。其中一项是在军队八一脑科医院进行的，他们在 2019 年和 2020 年发表了研究成果^[80, 81]，研究结果表明将人脊髓源性 NSCs (NSI-566) 移植到稳定卒中患者的梗死周围区域具有良好的耐受性，并评估了初步的临床益处。另一项临床研究在格拉斯哥大学进行，该临床研究采用立体定向注射的方法对永生化 NSCs (CTX0E03) 进行异体移植。共纳入 11 例患者。随访 2 年，采用美国国立卫生研究院卒中量表 (NIHSS) 和 Barthel 指数法进行评估。结果证实外源性 NSCs 可促进移植后患者的神经功能恢复，且无相关不良反应^[82]。

尽管临床前和临床研究都证实了外源性 NSCs 移植可以治疗包括缺血性脑卒中在内的各种难治性神经系统疾病，但仍存在一些局限性，这些都限制了 NSCs 的快速临床转化和应用：

(1) NSC 的来源。由于它们只存在于大脑的特定干细胞池中，因此很难在体外获得大量的同质细胞。此外，NSCs 的采购还存在其他局限性，如培养细胞的逐渐老化、细胞的反复提取、安全性和伦理问题等。

(2) NSC 的免疫排斥问题。获得的外源性干细胞是异基因的，干细

胞应用的一个潜在障碍是细胞移植后的免疫排斥^[83]。同任何组织或器官移植一样，异基因干细胞也会受到宿主免疫系统的排斥。虽然 NSCs 很少表达主要组织相容性复合体(MHC)，但目前的研究发现，免疫细胞也能在大脑中产生免疫排斥。

(3) NSC 的潜在致瘤性。细胞治疗值得关注的问题是移植的外源性干细胞的潜在致瘤性。干细胞，特别是胚胎干细胞(ES)细胞或诱导多能干细胞(iPS)细胞是一种多能细胞，植入活体后有可能形成畸胎瘤或恶性肿瘤^[84, 85]。虽然尚未发现 NSCs 的致瘤性，但其体内移植后的异常增殖可能导致肿瘤的形成。

(4) NSC 移植的生存率和定向分化率。脑缺血引发的一系列炎症级联反应会严重影响移植后细胞的存活。此外，炎症因子可促进 NSCs 的胶质细胞分化，抑制神经元的生成。另外，如何控制移植的 NSCs 分化成特定类型的神经元，从而达到预期的治疗效果，尚待探索。

NSCs 疗法的一个明显优势是可以对缺血性卒中后脑内复杂和高度变化的环境作出动态反应。细胞疗法不再仅仅基于组织替代，可延伸到包括对炎症、免疫调节和内源性修复机制的增强的影响。目前少量的临床试验结果远远支持不了 NSCs 移植的临床应用，还需要更多的基础研究，以更好地了解 and 有效控制 NSCs 及其衍生物的增殖、迁移、分化、存活和功能的调节。在临床应用这项策略之前，需要临床前证据证明各种来源的 NSCs 的有效性和安全性，此外，利用 NSCs 的全部治疗潜力需要对再生背后的机制有更多的了解。

参考文献

- [1] He, J., et al., *Oxidative Stress, Inflammation, and Autophagy: Potential Targets of Mesenchymal Stem Cells-Based Therapies in Ischemic Stroke*. Front Neurosci, 2021. **15**: p. 641157.
- [2] Kulik, T., et al., *Regulation of cerebral vasculature in normal and ischemic brain*. Neuropharmacology, 2008. **55**(3): p. 281-8.
- [3] Kim, K.A., et al., *Role of Autophagy in Endothelial Damage and Blood-Brain Barrier Disruption in Ischemic Stroke*. Stroke, 2018. **49**(6): p. 1571-1579.
- [4] Weinstein, J.R., I.P. Koerner, and T. Moller, *Microglia in ischemic brain injury*. Future Neurol, 2010. **5**(2): p. 227-246.
- [5] Jin, R., G. Yang, and G. Li, *Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells*. J Leukoc Biol, 2010. **87**(5): p. 779-89.
- [6] Gritti A, B.L., Doetsch F, Caille I, Alvarez-Buylla A, Lim DA, Galli R, Verdugo JM, Herrera DG, Vescovi AL., *Multipotent Neural Stem Cells Reside into the Rostral Extension and Olfactory Bulb of Adult Rodents*. J Neurosci **2002 Jan 15**;22(2)
- [7] Mira, H., et al., *Signaling through BMPR-IA regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus*. Cell Stem Cell, 2010. **7**(1): p. 78-89.
- [8] Lugert, S., et al., *Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging*. Cell Stem Cell, 2010. **6**(5): p. 445-56.
- [9] Li, L. and H. Clevers, *Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals*. Science, 2010. **327**(5965): p. 542-5.
- [10] Shin, J., et al., *Single-Cell RNA-Seq with Waterfall Reveals Molecular Cascades underlying Adult Neurogenesis*. Cell Stem Cell, 2015. **17**(3): p. 360-72.
- [11] Sullivan, R., et al., *A possible new focus for stroke treatment - migrating stem cells*. Expert Opin Biol Ther, 2015. **15**(7): p. 949-58.
- [12] Faiz, M., et al., *Adult Neural Stem Cells from the Subventricular Zone Give Rise to Reactive Astrocytes in the Cortex after Stroke*. Cell Stem Cell, 2015. **17**(5): p. 624-34.
- [13] Barkho, B.Z., et al., *Endogenous matrix metalloproteinase (MMP)-3 and MMP-9 promote the differentiation and migration of adult neural progenitor cells in response to chemokines*. Stem Cells, 2008. **26**(12): p. 3139-49.
- [14] Carbajal, K.S., et al., *Migration of engrafted neural stem cells is mediated by CXCL12 signaling through CXCR4 in a viral model of multiple sclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(24): p. 11068-73.
- [15] Nato, G., et al., *Striatal astrocytes produce neuroblasts in an excitotoxic model of Huntington's disease*. Development, 2015. **142**(5): p. 840-5.
- [16] Magnusson JP, G.C., Tatarishvili J, Dias DO, Smith EM, Lindvall O, Kokaia Z, Frisén J., *A latent neurogenic program in astrocytes regulated by Notch signaling in the mouse*. Science

2014 Oct 10;346(6206)

- [17] Lai, B., et al., *Electrophysiological neurodifferentiation of subventricular zone-derived precursor cells following stroke*. *Neurosci Lett*, 2008. **442**(3): p. 305-8.
- [18] Ohira, K., et al., *Ischemia-induced neurogenesis of neocortical layer 1 progenitor cells*. *Nat Neurosci*, 2010. **13**(2): p. 173-9.
- [19] Yamashita, T., et al., *Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum*. *J Neurosci*, 2006. **26**(24): p. 6627-36.
- [20] Sun, X., et al., *New striatal neurons form projections to substantia nigra in adult rat brain after stroke*. *Neurobiol Dis*, 2012. **45**(1): p. 601-9.
- [21] Hou, S.W., et al., *Functional integration of newly generated neurons into striatum after cerebral ischemia in the adult rat brain*. *Stroke*, 2008. **39**(10): p. 2837-44.
- [22] Kriegstein, A. and A. Alvarez-Buylla, *The glial nature of embryonic and adult neural stem cells*. *Annu Rev Neurosci*, 2009. **32**: p. 149-84.
- [23] Kalladka, D. and K.W. Muir, *Brain repair: cell therapy in stroke*. *Stem Cells Cloning*, 2014. **7**: p. 31-44.
- [24] Hankey, G.J., *Stroke*. *The Lancet*, 2017. **389**(10069): p. 641-654.
- [25] Christian, K.M., H. Song, and G.L. Ming, *Functions and dysfunctions of adult hippocampal neurogenesis*. *Annu Rev Neurosci*, 2014. **37**: p. 243-62.
- [26] Chollet, F., et al., *Pharmacological therapies in post stroke recovery: recommendations for future clinical trials*. *J Neurol*, 2014. **261**(8): p. 1461-8.
- [27] Li, J., et al., *Neurovascular Recovery via Cotransplanted Neural and Vascular Progenitors Leads to Improved Functional Restoration after Ischemic Stroke in Rats*. *Stem Cell Reports*, 2014. **3**(1): p. 101-114.
- [28] Hao, L., et al., *Stem cell-based therapies for ischemic stroke*. *Biomed Res Int*, 2014. **2014**: p. 468748.
- [29] Abematsu, M., et al., *Neurons derived from transplanted neural stem cells restore disrupted neuronal circuitry in a mouse model of spinal cord injury*. *J Clin Invest*, 2010. **120**(9): p. 3255-66.
- [30] Banerjee, S., et al., *Human stem cell therapy in ischaemic stroke: a review*. *Age Ageing*, 2011. **40**(1): p. 7-13.
- [31] Kalladka, D., et al., *Human neural stem cells in patients with chronic ischaemic stroke (PISCES): a phase 1, first-in-man study*. *The Lancet*, 2016. **388**(10046): p. 787-796.
- [32] Chen, L., et al., *Meta-Analysis and Systematic Review of Neural Stem Cells therapy for experimental ischemia stroke in preclinical studies*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 32291.
- [33] Lees, J.S., et al., *Stem cell-based therapy for experimental stroke: a systematic review and meta-analysis*. *Int J Stroke*, 2012. **7**(7): p. 582-8.
- [34] Vu, Q., et al., *Meta-analysis of preclinical studies of mesenchymal stromal cells for ischemic stroke*. *Neurology*, 2014. **82**(14): p. 1277-86.

- [35] Lee, J.P., et al., *Neural stem cell transplantation in mouse brain*. Curr Protoc Neurosci, 2008. **Chapter 3**: p. Unit 3 10.
- [36] Liu, J., *Induced pluripotent stem cell-derived neural stem cells: new hope for stroke?* Stem Cell Res Ther, 2013. **4**(5): p. 115.
- [37] Aasen, T., et al., *Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(11): p. 1276-84.
- [38] Staerk, J., et al., *Reprogramming of human peripheral blood cells to induced pluripotent stem cells*. Cell Stem Cell, 2010. **7**(1): p. 20-4.
- [39] Petit, I., et al., *Induced pluripotent stem cells from hair follicles as a cellular model for neurodevelopmental disorders*. Stem Cell Res, 2012. **8**(1): p. 134-40.
- [40] Daadi, M.M., A.L. Maag, and G.K. Steinberg, *Adherent self-renewable human embryonic stem cell-derived neural stem cell line: functional engraftment in experimental stroke model*. PLoS One, 2008. **3**(2): p. e1644.
- [41] Thier, M., et al., *Direct conversion of fibroblasts into stably expandable neural stem cells*. Cell Stem Cell, 2012. **10**(4): p. 473-9.
- [42] Zhang, B., et al., *Intra-Arterial Delivery of Neural Stem Cells to the Rat and Mouse Brain: Application to Cerebral Ischemia*. J Vis Exp, 2020(160).
- [43] Kim, J., et al., *Neuroprotective effects of human neural stem cells over-expressing choline acetyltransferase in a middle cerebral artery occlusion model*. J Chem Neuroanat, 2020. **103**: p. 101730.
- [44] Huang, L., et al., *Human neural stem cells rapidly ameliorate symptomatic inflammation in early-stage ischemic-reperfusion cerebral injury*. Stem Cell Res Ther, 2014. **5**(6): p. 129.
- [45] Hamblin, M.H. and J.P. Lee, *Neural Stem Cells for Early Ischemic Stroke*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(14).
- [46] Kang, S.S., et al., *Endogenous CNTF mediates stroke-induced adult CNS neurogenesis in mice*. Neurobiol Dis, 2013. **49**: p. 68-78.
- [47] Drury-Stewart, D., et al., *Highly efficient differentiation of neural precursors from human embryonic stem cells and benefits of transplantation after ischemic stroke in mice*. Stem Cell Res Ther, 2013. **4**(4): p. 93.
- [48] Singh, M., et al., *Application of Stem Cells in Stroke: A Multifactorial Approach*. Front Neurosci, 2020. **14**: p. 473.
- [49] Bliss, T.M., R.H. Andres, and G.K. Steinberg, *Optimizing the success of cell transplantation therapy for stroke*. Neurobiol Dis, 2010. **37**(2): p. 275-83.
- [50] Darsalia, V., et al., *Cell number and timing of transplantation determine survival of human neural stem cell grafts in stroke-damaged rat brain*. J Cereb Blood Flow Metab, 2011. **31**(1): p. 235-42.
- [51] Guzman, R., M. Janowski, and P. Walczak, *Intra-Arterial Delivery of Cell Therapies for Stroke*. Stroke, 2018. **49**(5): p. 1075-1082.

- [52] Mays, R.W. and S.I. Savitz, *Intravenous Cellular Therapies for Acute Ischemic Stroke*. Stroke, 2018. **49**(5): p. 1058-1065.
- [53] Chua, J.Y., et al., *Intra-arterial injection of neural stem cells using a microneedle technique does not cause microembolic strokes*. J Cereb Blood Flow Metab, 2011. **31**(5): p. 1263-71.
- [54] Wei, N., et al., *Delayed intranasal delivery of hypoxic-preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhanced cell homing and therapeutic benefits after ischemic stroke in mice*. Cell Transplant, 2013. **22**(6): p. 977-91.
- [55] Reekmans, K.P., et al., *Clinical Potential of Intravenous Neural Stem Cell Delivery for Treatment of Neuroinflammatory Disease in Mice?* Cell Transplantation, 2011. **20**(6): p. 851-870.
- [56] Peron, S. and B. Berninger, *Imported Stem Cells Strike against Stroke*. Cell Stem Cell, 2015. **17**(5): p. 501-2.
- [57] Sirko, S., et al., *Reactive glia in the injured brain acquire stem cell properties in response to sonic hedgehog. [corrected]*. Cell Stem Cell, 2013. **12**(4): p. 426-39.
- [58] Lee, J.P., et al., *Neural stem cell transplantation in mouse brain*. Curr Protoc Neurosci, 2008. **Chapter 3**: p. Unit 3.10.
- [59] Politi, L.S., et al., *Magnetic-resonance-based tracking and quantification of intravenously injected neural stem cell accumulation in the brains of mice with experimental multiple sclerosis*. Stem Cells, 2007. **25**(10): p. 2583-92.
- [60] Imitola, J., et al., *Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1alpha/CXC chemokine receptor 4 pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(52): p. 18117-22.
- [61] Fontes, A. and U. Lakshmiopathy, *Advances in genetic modification of pluripotent stem cells*. Biotechnol Adv, 2013. **31**(7): p. 994-1001.
- [62] Jiang, X.C., et al., *Neural Stem Cells Transfected with Reactive Oxygen Species-Responsive Polyplexes for Effective Treatment of Ischemic Stroke*. Adv Mater, 2019. **31**(10): p. e1807591.
- [63] Lee, H.J., et al., *Human neural stem cells genetically modified to overexpress brain-derived neurotrophic factor promote functional recovery and neuroprotection in a mouse stroke model*. J Neurosci Res, 2010. **88**(15): p. 3282-94.
- [64] Li, X., Z. Yang, and A. Zhang, *The effect of neurotrophin-3/chitosan carriers on the proliferation and differentiation of neural stem cells*. Biomaterials, 2009. **30**(28): p. 4978-85.
- [65] Zhang, Z.H., et al., *Transplantation of neural stem cells modified by human neurotrophin-3 promotes functional recovery after transient focal cerebral ischemia in rats*. Neurosci Lett, 2008. **444**(3): p. 227-30.
- [66] Cao, L., et al., *VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory*. Nat Genet, 2004. **36**(8): p. 827-35.
- [67] Chen, W., et al., *Lipopolyplex for Therapeutic Gene Delivery and Its Application for the Treatment of Parkinson's Disease*. Front Aging Neurosci, 2016. **8**: p. 68.

- [68] Sakata, H., et al., *Interleukin 6-preconditioned neural stem cells reduce ischaemic injury in stroke mice*. Brain, 2012. **135**(Pt 11): p. 3298-310.
- [69] Wei, L., et al., *Stem cell transplantation therapy for multifaceted therapeutic benefits after stroke*. Prog Neurobiol, 2017. **157**: p. 49-78.
- [70] Rosenblum, S., et al., *BDNF Pretreatment of Human Embryonic-Derived Neural Stem Cells Improves Cell Survival and Functional Recovery After Transplantation in Hypoxic-Ischemic Stroke*. Cell Transplant, 2015. **24**(12): p. 2449-61.
- [71] Zhao, Y., et al., *[Neural stem cell transplantation and nerve growth factor promote neurological recovery in rats with ischemic stroke]*. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2008. **28**(7): p. 1123-6.
- [72] Licht, T., et al., *Reversible modulations of neuronal plasticity by VEGF*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(12): p. 5081-6.
- [73] Chu, K., et al., *Combined treatment of vascular endothelial growth factor and human neural stem cells in experimental focal cerebral ischemia*. Neurosci Res, 2005. **53**(4): p. 384-90.
- [74] Zhang, G., et al., *Interferon-gamma Promotes Neuronal Repair by Transplanted Neural Stem Cells in Ischemic Rats*. Stem Cells Dev, 2018. **27**(5): p. 355-366.
- [75] Xuan, A.G., et al., *BDNF improves the effects of neural stem cells on the rat model of Alzheimer's disease with unilateral lesion of fimbria-fornix*. Neurosci Lett, 2008. **440**(3): p. 331-5.
- [76] Wilson, K.L., S.T. Carmichael, and T. Segura, *Injection of Hydrogel Biomaterial Scaffolds to The Brain After Stroke*. J Vis Exp, 2020(164).
- [77] Moshayedi, P., et al., *Systematic optimization of an engineered hydrogel allows for selective control of human neural stem cell survival and differentiation after transplantation in the stroke brain*. Biomaterials, 2016. **105**: p. 145-155.
- [78] Wang, H., et al., *Reconstituting neurovascular unit with primary neural stem cells and brain microvascular endothelial cells in three-dimensional matrix*. Brain Pathol, 2021. **31**(5): p. e12940.
- [79] Liu, X., et al., *Highly Effective Stroke Therapy Enabled by Genetically Engineered Viral Nanofibers*. Adv Mater, 2022: p. e2201210.
- [80] Zhang, G., et al., *Stable Intracerebral Transplantation of Neural Stem Cells for the Treatment of Paralysis Due to Ischemic Stroke*. Stem Cells Transl Med, 2019. **8**(10): p. 999-1007.
- [81] Zhang, G., et al., *First Human Trial of Stem Cell Transplantation in Complex Arrays for Stroke Patients Using the Intracerebral Microinjection Instrument*. Oper Neurosurg (Hagerstown), 2020. **18**(5): p. 503-510.
- [82] Kalladka, D., et al., *Human neural stem cells in patients with chronic ischaemic stroke (PISCES): a phase 1, first-in-man study*. Lancet, 2016. **388**(10046): p. 787-96.
- [83] Broughton, B.R., et al., *Post-stroke inflammation and the potential efficacy of novel stem cell therapies: focus on amnion epithelial cells*. Front Cell Neurosci, 2012. **6**: p. 66.

- [84] Newman, M.B., et al., *Tumorigenicity issues of embryonic carcinoma-derived stem cells: relevance to surgical trials using NT2 and hNT neural cells*. *Stem Cells Dev*, 2005. **14**(1): p. 29-43.
- [85] Zhao, T., et al., *Immunogenicity of induced pluripotent stem cells*. *Nature*, 2011. **474**(7350): p. 212-5.

硕士期间发表的论文

1. **Tang X**, Wu L, Luo M, Qiu Z, Jiang Y, *Massive Pontine Hemorrhage by Dual Injection of Autologous Blood*. J Vis Exp, 2021(171).
2. Luo M, **Tang X**, Zhu J, Qiu Z, Jiang Y, Establishment of Acute Pontine Infarction in Rats by Electrical Stimulation. J Vis Exp.
3. 邱智华, 罗铭, **唐祥月**, 姜永军, 光学相干成像显示的颈动脉支架置入术后支架内血栓形成. 国际脑血管病杂志

致 谢

逝者如斯，不舍昼夜，硕士生涯至今也到了末尾。在过去的一千多个日夜，从实验新手到实验设计，实施以及最后的撰写，不可谓不坎坷。研究课题的顺利完成离不开老师的关心和耐心指导，同窗同门的守望相助。

读书思考，科研实践带给我人生的改变，除了理论知识和专业技能赋予社会立身的根本以外，还塑造了我的思维和人格。人生与科研一样，我不知道下一步是山峰或者低谷，也不知道是康庄大道或是阴冷小路；细胞处理后是否能有预想的结果，免疫荧光是否能出现斑斓的银河，冬天造模的小鼠是否能够活到下周，或是今天的仪器是否能够正常使用。有过失败的掩面哭泣，有不得已放弃的无奈，也有成功后的欢呼雀跃。未来的每一步都充满着不确定性，唯有坚持走好当下的每一步，才有可能在最后看到曙光。

学贵得师，亦贵得友。除了科研上的江湖，更为深刻的是在逆境时总能幸运的遇到为我打伞走过一程的贵人。

师也者，犹行路之有导也。首先我要衷心感谢我的导师姜永军老师，是您给了我一个学习的机会和平台，在这并非一帆风顺的路上，您是前方指路的明灯，亦是并肩作战的队友。在我迷茫时能拉我一把，在我困顿时能给予希望，从开始的文献阅读到实验设计与操作，从文章初稿到科研成图。除了对我的科研能力的培养和鞭策，我还要感谢您作为朋友一样在生活上的关心。您的自律、严谨治学的科研精神，精益求精的工作作风是我毕生学习的榜样，也将永远鼓励着我不断向前，永不言弃。我还要感谢课题组吴丽老师、邱智华老师和朱珏华老师耐心的帮助。感谢神经内科和神研所的各位老师。

友也者，犹涉险之有助也。我要感谢师兄罗铭，师妹黎少君，曾观凤，师弟祝金茂，是你们给了我无私的帮助，同门之情，此生难忘；我要谢谢我的舍友常雅彬，陈珺茹，何晓晴，黄文慧；还要感谢马莹师姐，胡斐师姐，张文君师姐以及同实验室的同学，师弟师妹们。另外，还要感谢给我提供帮助的基础学院的孙向东老师与黄洁师兄，徐敏东师兄，以及王莹同学。

我要感谢我的父母，父母亲出身农村，但相信读书能改变命运，再苦再难都不让家中兄弟姐妹中途辍学，辛苦拼搏半生，也落得一身伤病；我要感谢我的兄弟姐妹，给我生活上的支持与学业上的鼓励，是你们在背后给我提供了一

个可以安心求学深造的环境。我还要感谢自己和男朋友龚俊玮，不管以后遇到什么，不管是独自在国外深造还是进入工作岗位，我们都要勇敢坚强，不轻言放弃，走出属于自己的路。

衷心感谢参与评阅和答辩工作的各位教授老师，谢谢你们！