

## 不同类型星形胶质细胞对神经干细胞定向分化的影响

刘媛, 龙在云, 曾琳, 李民, 伍亚民, 王正国

[摘要] 目的 观察不同类型星形胶质细胞作为饲养层细胞对神经干细胞定向分化为神经元的影响。方法 通过无血清培养的方法, 将原代培养所获得的神经干细胞克隆、经纯化和标记后, 分别接种在以原浆型和纤维型星形胶质细胞作为饲养细胞的培养皿中并加入 Neural Basal 培养基, 10 d 后行 NF-200 免疫荧光染色, 在显微镜下随机选取 20 个视野, 记数神经元和标记神经干细胞的比例, 并对分化的神经元细胞进行胆碱酯酶染色和 Fura-3 探针标记。结果 在原浆型和纤维型星形胶质细胞培养条件下, 神经干细胞分化为神经元的比例分别为 72% 与 43%, 分化细胞胆碱酯酶染色阳性。分化神经元在药物刺激下, 细胞内可发生钙离子活动的变化。结论 原浆型星形胶质细胞具有较好地促进神经干细胞向神经元, 特别是向有生物学活性的运动神经元分化, 可作为神经组织工程中研究中一种新的种子细胞。

[关键词] 星形胶质细胞; 原浆型; 纤维型; 神经干细胞; 神经元; 分化

Effects of Different Astrocytes on Differentiation of Neural Stem Cells LIU Yuan, LONG Zai-yun, ZENG Lin, et al. Third Department of Research Institute of Surgery, Daping Hospital, the Third Military Medical University, State Key Laboratory of Trauma, Burn and Combined Injury, Chongqing 400042, China

**Abstract:** **Objective** To observe the differentiation of neural stem cells (NSC) into neurons under different astrocytes feeding layers. **Methods** The NSC purified from primary cultured clones and labeled by DAPI in serum-free media were plated in different feeding layers: cytoplasmic astrocytes and fibrous astrocytes respectively with Neural Basal (NB) media. After 10 d, immunohistochemistry with antibody NF-200 was taken to calculate the percents of neurons by 20 fields of vision chosen randomly. The differentiated neurons were stained with AchE and labeled with Fura-3 AM. **Results** The ratios of differentiated neurons in cytoplasmic and fibrous astrocytes were 72% and 43% respectively. In most differentiated neurons the AchE staining was positive and had the activity of  $Ca^{2+}$  stimulated by medicine. **Conclusion** The cytoplasmic astrocytes can induced NSC differentiated into neurons, especially into active motor neurons, which can be chosen for a new seeding cells in the nervous tissue engineering.

**Key words:** astrocyte; cytoplasmic; fibrous; neural stem cell; neurons; differentiation

[中图分类号] R318.5 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2007)11-1026-03

[本文著录格式] 刘媛, 龙在云, 曾琳, 等. 不同类型星形胶质细胞对神经干细胞定向分化的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2007, 13(11): 1026-1028.

神经干细胞(neural stem cells, NSC)的发现为治疗中枢神经系统损伤带来了新的曙光, 并成为了神经组织工程研究中最具有优势的种子细胞。国外研究发现, 移植 NSC 的分化与其所处的微环境和内在特性密切相关。由于 NSC 的定向诱导、分化受到众多因素的影响, 特别是在体条件下, 细胞内、外微环境的变化异常复杂<sup>[1-2]</sup>, 因此, 深入研究 NSC 在体外的分化情况对进一步认识 NSC 的功能, 更好地利用 NSC 治疗中枢神经系统损伤具有重要作用。本研究拟对原浆型和纤维型星形胶质细胞在体外条件下诱导 NSC 的分化进行初步探讨。

## 1 试剂与方法

基金项目: 重庆市院士基金(合同号: 7671)资助; 国家自然科学基金(30171068)资助。

作者单位: 第三军医大学大坪医院野战外科研究所三室, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室, 重庆市 400042。作者简介: 刘媛(1975-), 女, 四川资中县人, 博士研究生, 助理研究员, 主要研究方向: 脊髓损伤与修复。通讯作者: 伍亚民、王正国。

**1.1 材料** Neural Basal 培养基: Gibco, USA; DME M/F12: Hyclone, USA; 优等胎牛血清: Gibco, USA; 巢素(Nestin): Santacruz; 神经微丝单克隆抗体(Neurofilament 200, NF-200): Sigma, USA; 胶质纤维酸性蛋白(glial fibrous acid protein, GFAP): 武汉博士德生物制品公司; Nestin 抗体: Parmigen, USA; Fura-3 AM: Sigma, USA; N2 添加剂: Gibco, USA; 优等胎牛血清: Hyclone, USA。

**1.2 NSC 的培养与鉴定<sup>[3]</sup>** 取怀孕 13~15 d SD 孕鼠, 麻醉、消毒后, 打开腹腔, 取出胎鼠, 分离大脑皮层放入 D Hanks 液中, 机械分离吹打细胞后, 用 100 和 200 目细胞筛分别过滤, 制成单细胞悬液。并以 NB 培养基进行培养, 待克隆形成后, 取出细胞球用 Nestin 抗体进行鉴定。

### 1.3 星形胶质细胞的纯化培养及鉴定

**1.3.1 混合培养<sup>[4]</sup>** 出生 2 d 内 SD 大鼠于无菌条件下取大脑皮层组织, 用眼科剪将组织剪成小块, 然后用 0.25% 胰蛋白酶(DME M/F12 配制) 37℃ 消化, 离心

后用培养液(10%胎牛血清, 2 mmol/L L-谷氨酰胺, 0.6%葡萄糖, 1:1 DMEM/F12)吹打细胞沉淀, 分散成单细胞悬液。接种于玻璃培养瓶, 于培养箱中孵育 30 min, 翻转瓶子吸出细胞悬液。接种于涂有 Poly-L-Lysine 的培养瓶中, 种植密度为  $1 \times 10^6/\text{cm}^2$ 。于 37 °C 含 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中培养, 每 3 d 换液 1 次。培养 14 d, 残存的神经元基本死亡, 剩下的细胞大部分为星形胶质细胞, 少量的少突胶质细胞以及小胶质细胞。

**1.3.2 分离培养<sup>[45]</sup>** 混合胶质细胞培养至 14 d 时, 向培养基中加入 10 mmol/L L-leucine-methyl-ester 并孵育 1 h 以杀死小胶质细胞。剩余细胞培养箱孵育 2 h 后, 在 37 °C 摇床上振荡 180 r/min 16 h, 0-2A 前体细胞被摇起, 瓶中所剩的一层为原浆型星形胶质细胞。摇下来的 0-2A 前体细胞经 200 目筛网过滤, 除去少数原浆型星形胶质细胞集落后, 种植在铺有 Poly-L-Lysine 的培养瓶中。使用含 20% FCS 的培养液促进 0-2A 前体细胞分化为纤维型星形胶质细胞。

**1.3.3 星形胶质细胞的鉴定<sup>[8]</sup>** 用星形胶质细胞特异的 GFAP 抗体进行免疫荧光染色, 并进一步从形态学上对两类细胞进行鉴定。

**1.4 两种星形胶质细胞与 NSC 的共培养** 将两类星形胶质细胞在有血清的条件下大量增殖; 待细胞增殖到培养皿中 70% 丰度时, 将纯化的经 DAPI 标记的 NSC( $5 \times 10^5$  个/皿, 皿直径 35 mm)接种于两种饲养层细胞中, 加入 NB 培养基, 分化 10 d 后行 NF-200 免疫荧光染色。

**1.5 分化细胞胆碱酯酶染色** 分别取 0.06 N (0.82%) 乙酸钠 6.32 ml、0.1 N (0.6%) 乙酸 0.20 ml、0.1 M (2.94%) 柠檬酸钠 0.48 ml、30 mM (0.75%) 硫酸铜 1 ml、5 mM (0.165%) 铁氰化钾 1 ml、 $\text{H}_2\text{O}$  0.8 ml 组成混合液; 然后将乙酰胆碱 5 mg 溶于上述混合液中, 调节 pH 至 5.5~5.6。将上述液体加入培养皿中, 于 37 °C 孵育 30 min, 脱水后封片, 于显微镜下观察。

**1.6 分化神经元细胞内的游离钙浓度变化检测** 将分化的神经元于无钙的培养基中与 10 mM 的 Fura-3AM 于 37 °C 含 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中培养 30 min, PBS 清洗后加入有钙的培养基, 并加入  $10^{-8}$  mmol/L 地塞米松, 于激光共聚焦显微镜进行连续的时间序列扫描, 观察细胞内钙离子的变化情况。

## 2 结果

**2.1 NSC 的培养与鉴定** 体外培养的 NSC 克隆呈球形、桑椹状, 悬浮生长, 折光性强。NSC 特异性的抗体 Nestin 染色呈阳性。见封三彩图 1.1。

**2.2 原浆型和纤维型星形胶质细胞的培养与鉴定** 体外分离培养的原浆型星形胶质细胞外观扁平, 胞体

较大, 突起宽而扁, 很少分支。纤维型星形胶质细胞胞体较小, 呈圆或卵圆形, 突起较多, 细长并有分支。用星形胶质细胞特异的 GFAP 抗体进行免疫组织化学染色, 两种细胞的胞浆均着色。显示原浆型和纤维型星形胶质细胞均达到体外纯培养。见封三彩图 1.2、图 1.3。

**2.3 原浆型和纤维型星形胶质细胞诱导 NSC 分化的结果** 经 DAPI 标记的 NSC(核蓝色)与两种胶质细胞共培养后, 第 2 天部分 NSC 开始贴壁, 并长出短、小突起; 分化第 7 天, 在细胞上层可见部分包体呈圆形或卵圆形, 折光性好、有 2 个或 2 个以上细长突起的细胞。以后, 生长情况良好的细胞其突起互相连接并交织呈网状。该类细胞在原浆型饲养条件下较多。通过 NF-200 免疫荧光染色, 标记分化神经元(红色)。见封三彩图 1.4、图 1.5。随机选择 10 个视野, 记数 100 个标记细胞中分化神经元/细胞总数<sup>[6]</sup>, 原浆型细胞饲养条件下标记细胞总数为  $(72 \pm 6.5)$  个, 纤维型细胞饲养条件下为  $(43 \pm 4.6)$  个。

**2.4 分化细胞胆碱酯酶染色结果** 在与原浆型细胞共培养的分化细胞中, 可见较多的胆碱酯酶阳性细胞, 为运动神经元, 见封三彩图 1.6。与纤维型细胞共培养的分化细胞中, 阳性细胞数量较少。

在分化神经元细胞中加入  $10^{-6}$  mmol/L 地塞米松后, 细胞内游离钙离子浓度于给药后 5 s 左右明显升高, 并持续维持于较高水平。见图 1。

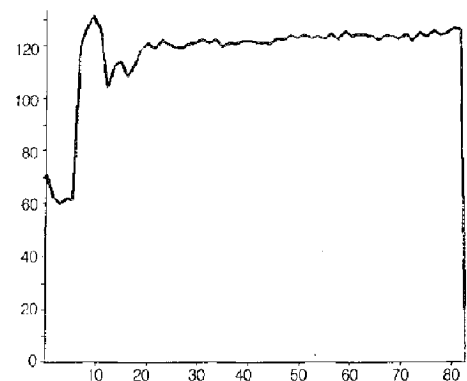


表 1 分化神经元细胞内游离钙离子浓度变化

## 3 讨论

在神经组织工程研究过程中, 种子细胞的选择至关重要。NSC 由于具有自我增殖和多向分化潜能, 给中枢神经系统损伤的修复带来了新的希望, 并成为神经组织工程研究中的热点。NSC 的分化受到多种因素的影响, 包括细胞自身基因和外来信号的调控。神经营养因子对中枢神经系统和周围神经的神经元均有一定的促进存活和刺激突起生长的作用<sup>[6-7]</sup>。

星形胶质细胞是中枢神经系统(CNS)中在数量上占绝对优势的一类细胞。星形胶质细胞可分泌胶质源

性神经生长因子 (glial derived neurotrophic factor, GDNF)、神经生长因子 (neural growth factor, NGF)、脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF)、神经营养因子 (neurotrophin, NT)、睫状神经营养因子 (ciliary neurotrophic factor, CNTF) 5 种神经营养因子以及 IL-1、IL-6、细胞粘附分子等多种细胞因子,能促进神经元的存活、生长以及迁移,在神经元的发育及损伤修复过程中起着不可替代的作用<sup>[7-9]</sup>。不同类型的星形胶质细胞分泌细胞因子的能力不同。

在本实验中,我们选择不同类型的星形胶质细胞作为诱导条件,观察其对 NSC 定向诱导分化的作用。结果显示,与纤维型星形胶质细胞组相比,原浆型星形胶质细胞组 NSC 分化为神经元的比例升高,星形胶质细胞的比例降低,并能获得较多的胆碱能神经元,且分化的神经元在受到激素刺激的条件下可发生细胞内电活动的改变,具有神经细胞的生物学功能。相关研究发现,不同类型星形胶质细胞分泌 CNTF 的能力有显著的差别:纤维型星形胶质细胞在培养条件下表达 CNTF 的量为原浆型星形胶质细胞的 3 倍以上,而 CNTF 是通过 LIFR 信号转导通路促进 NSC 分化成为星形胶质细胞<sup>[10-11]</sup>。我们推测,纤维型星形胶质细胞高表达 CNTF 可能更大程度上促使 NSC 向胶质细胞分化,而削弱向神经元的分化。

本研究通过共培养方法获得了高比例、具有生物学功能的胆碱能神经元,为临床所需的细胞移植治疗中枢神经系统损伤和变性疾病提供了实验依据,对研究 NSC 分化的微环境机制和推动 NSC 的应用具有非常重要的理论和实际意义。本研究未能阐明不同类型星形胶质细胞影响 NSC 分化的机制,有待进一步研究。

## [参考文献]

- [1] Lepore AC, Neuhuber B, Connors TM, et al. Long-term fate of neural precursors cells following transplantation into developing and adult CNS [J]. Neuroscience, 2006, 142: 287 - 304.
- [2] Jason GE, Bartley DM, Gerd K, et al. Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cell [J]. Pro Neurobiol, 2005, 75: 321 - 341.
- [3] 刘媛, 龙在云, 伍亚民, 等. 神经干细胞移植对大鼠脊髓半切空洞损伤的修复作用 [J]. 中国矫形外科杂志, 2005, 13(20): 1573 - 1576.
- [4] Raff MC, Abney ER, Cohen J, et al. Two types of astrocytes in cultures of development rat white matter: differences in morphology, surface gangliosides and growth characteristics [J]. J Neurosci, 1983, 3: 1289 - 1300.
- [5] 蔡文琴. 现代实用细胞与分子生物学实验技术 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2003: 110 - 120.
- [6] Ryoichiro K, Toshiyuki O, Jun Hatakeyama, et al. Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation [J]. Exp Cell Res, 2005, 306: 343 - 348.
- [7] Bossolasco P, Cova L, Calzarossa C, et al. Neuroglial differentiation of human bone marrow stem cells in vitro [J]. Exp Neurol, 2005, 193: 312 - 325.
- [8] Hsingchi JL, Kara MS, Zanen S, et al. Glial-derived nexin, a differentially expressed gene during neuronal differentiation, transforms HEK cells into neuron like cells [J]. Neuroscience, 2005, 23: 9 - 14.
- [9] Gaa J, Coggeshall RE, Tarasenko YI, et al. Human neural stem cell-derived cholinergic neurons innervate muscle in motoneuron deficient adult rats [J]. Neuroscience, 2005, 131: 257 - 262.
- [10] Guillaume DJ, Johnson MA, Li XJ, et al. Human embryonic stem cell-derived neural precursors develop into neurons and integrate into the host brain [J]. J Neurosci Res, 2006, 84: 1165 - 1176.
- [11] Kim DE, Tsuji K, Kim YR, et al. Neural stem cell transplant survival in brains of mice: assessing the effect of immunity and ischemia by using real-time bioluminescent imaging [J]. Radiology, 2006, 241: 822 - 830.

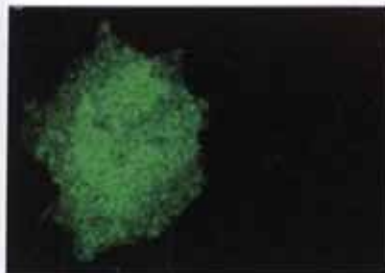


图 1.1 神经干细胞 Nestin 免疫组化染色

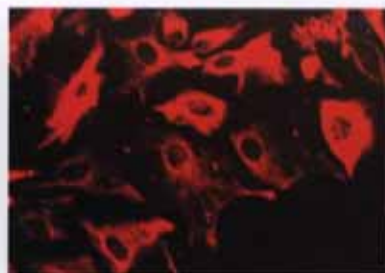


图 1.2 纯化培养的原浆型星形胶质细胞 GFAP 免疫组化染色

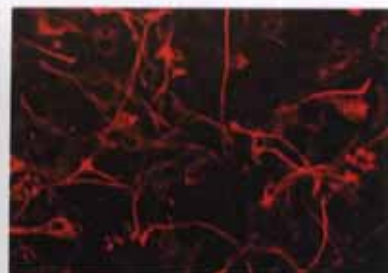


图 1.3 纯化培养的纤维型星形胶质细胞 GFAP 免疫组化染色

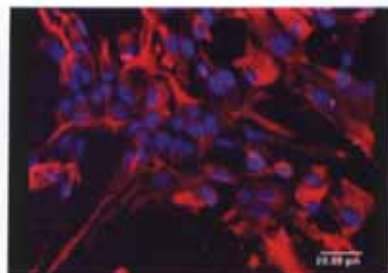


图 1.4 神经干细胞与原浆型星形胶质细胞共培养后的分化情况

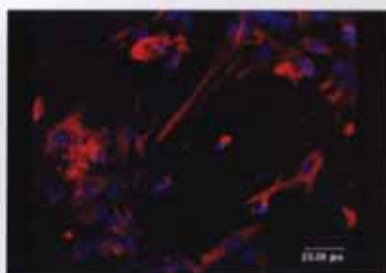


图 1.5 神经干细胞与纤维型星形胶质细胞共培养后的分化情况

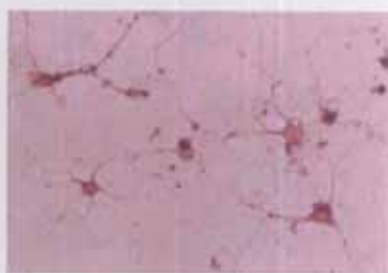


图 1.6 分化神经元胆碱酯酶染色结果 [100 ×]