

神经干细胞体外扩增和诱导分化为多巴胺能神经细胞

郑敏^{①②} 王冬梅^① 焦文仓^① 李海民^① 赵连旭^①
白慈贤^① 王亚平^② 裴雪涛^{①*}

(^①军事医学科学院输血研究所干细胞生物学研究室, 北京 100850; ^②重庆医科大学基础医学研究所, 重庆 400014.
* 联系人, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn)

摘要 神经干细胞(neural stem cell, NSC)是神经系统发生的始祖细胞, 具有自我更新和多向分化潜能. NSC 的研究不仅对阐明神经系统发育有重要意义, 对神经系统疾病的治疗也提出了新的思路. 在体外对 NSC 进行培养鉴定和扩增, 细胞巢蛋白表达阳性, 具有多向分化能力; 体外传代培养 15 代后, 细胞数量增加约 $2.4(\pm 0.4) \times 10^4$ 倍; 在无血清培养体系中诱导 NSC 分化为多巴胺能神经细胞, 结果表明, 抗坏血酸(ascorbic acid, AA)能明显提高 NSC 定向分化为多巴胺能神经细胞的比例(由对照的 $(0.7 \pm 0.3)\%$ 升高到 AA $100 \mu\text{mol/L}$ 时的 $(17.2 \pm 2.3)\%$, $P < 0.01$). 这为获得足够的治疗帕金森疾病(PD)的多巴胺能神经元提供了新的思路, 对更好地利用 NSC 移植治疗 PD 有重要意义.

关键词 神经干细胞 多巴胺能神经细胞 抗坏血酸 分化 帕金森疾病

哺乳动物胚胎和成体中枢神经系统(CNS)内神经干细胞(NSC)的发现以及近年来分子神经生物学的发展, 使得可以应用干细胞移植来进行细胞替代和提供营养支持, 为神经系统的一些难治性疾病如帕金森疾病(Parkinson's disease, PD)治疗带来了希望^[1]. 随着研究的深入, 神经系统疾病细胞替代治疗的理想细胞已成共识. 阐明影响神经干祖细胞扩增和分化的内在信号和外来信号, 促进 NSC 向需要的细胞类型分化, 提高细胞移植后的存活和整合成为人们关注的焦点. NSC 的移植治疗中最为重要的是获得具有某种特定功能的细胞表型, 对 NSC 定向分化的研究, 发现高效率的诱导因素和深入研究其作用机制是干细胞治疗的突破点. PD 的治疗需要补充多巴胺能神经元, 如果能阐明 NSC 定向分化为多巴胺能神经元的因素, 就能提供满足需要的移植细胞来源. 研究发现, 一些物质有可能在此过程中发挥作用^[2]. 近年来, 抗坏血酸(AA)对 CNS 作用的研究引起了科学家的关注^[3]. 由于神经元特定 AA 转运子系统能保持细胞内外悬殊的浓度梯度, 脑尤其是前脑, 包括新纹状体中, AA 含量远较其他器官高, 而新纹状体富含多巴胺神经末梢, 黑质信号对新纹状体 AA 的释放起决定作用^[4]. 推测 AA 可能影响多巴胺能神经元发生. 因此我们在体外培养和扩增 NSC 的基础上, 进行了 AA 对胚胎鼠中脑来源的 NSC 分化为 DA 神经细胞影响的实验研究.

1 材料与方法

(i) 材料. Wistar 大鼠, 由军事医学科学院动物房提供. 培养基及因子: DMEM/F12, B27, 表皮细胞生长因子(EGF)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)购自 GIBCO 公司. 抗大鼠巢蛋白抗体, DAT (dopamine transporter)抗体, NSE (neuron specific enolase), GFAP (glial fibrillary acidic protein)和 GalC (galactocerebroside C)抗体, 购于 Chemicon 公司. 抗大鼠 TH(tyrosine hydroxylase)抗体和 AA, 购于 sigma 公司. RNA 提取及反转录试剂购自 Promega 公司.

(ii) NSC 培养. Wistar 孕大鼠(12.5 d), 深麻后颈椎断颈处死, 无菌条件下取出胎鼠, 打开脑腔, 剥离脑膜血管, 分离得到脑半球, 眼科剪剪为 $1 \sim 2 \text{ mm}^3$ 小组织块, 经 0.125% 胰酶消化和 DNase I 作用, 细巴斯德吸管吹打形成单细胞悬液, 以 4×10^5 个/mL 种植于塑料培养瓶中. 培养液为含 DMEM/F12, $2\% \text{ B27}$, EGF 20 ng/mL , bFGF 20 ng/mL , 青链霉素 $100 \text{ U} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$, 37°C $5\% \text{ CO}_2$ 孵箱培养. 待原代克隆出现后($7 \sim 10 \text{ d}$)离心收集神经球. 经胰酶消化, 细巴斯德吸管吹打成单细胞悬液后以 1×10^5 个/mL 种植于新培养液中, 每 7 天换液传代 1 次.

(iii) NSC 鉴定. (1) 巢蛋白表达. 离心收集培养形成的神经球经甩片到多聚赖氨酸包被的玻片上, 干燥固定后进行免疫细胞染色. (2) 分化实验. 新鲜传代培养的 NSC 种植于放有多聚赖氨酸包被的玻片

的6孔板上,常规培养3 d待贴壁后拆除因子,培养条件为DMEM/F12, B27, 5% FCS, 青-链霉素 $100 \text{ U} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$, 37°C 5% CO_2 孵箱培养. 诱导7 d后取出玻片做免疫细胞染色.

(iv) NSC 体外定向诱导分化. 新鲜传代的 NSC 以 5×10^4 个/mL 接种于放置有包被多聚赖氨酸盖玻片的24孔板内, 1 mL/孔, 贴壁培养3 d后更换培养液为DMEM/F12, 2% B27, 并加入抗坏血酸使其终浓度分别为1, 10和100 $\mu\text{mol/L}$. 3 d后半量换液, 第6天时终止诱导.

(v) 免疫细胞化学检测. 取不同组细胞爬片进行酪氨酸羟化酶(TH)和多巴胺递质转运子(DAT)的免疫细胞化学检测, 步骤如下: 4% 多聚甲醛固定20 min, 3% H_2O_2 室温10 min, pH 6.0 枸橼酸缓冲液, 95°C , 15 min 抗原修复, 山羊血清封闭, 一抗工作液, 4°C 过夜, 生物素标记二抗, 37°C , 30 min, 辣根过氧化物酶标记链酶卵白素, 37°C , 30 min DAB 显色2~10 min, 冲洗干燥封片. 对神经球的巢蛋白表达, 一抗接合后采用荧光素标记的二抗孵育30 min, 荧光显微镜观察.

(vi) RT-PCR 检测. 取不同组细胞(各 2×10^6 个/mL)提取RNA进行TH的RT-PCR的检测. RNA提取及反转录过程按常规进行. TH 引物设计为: 上游, 5'-CAGAGTCTCATCGAGGATGC-3'; 下游, 5'-CTTGT-CCTCTCTGGCACTGC-3', 扩增片段为376 bp. PCR 条件为 94°C , 5 min, 94°C , 30 s, 52°C , 30 s, 72°C , 30 s, 30个循环, 72°C , 7 min.

2 结果

2.1 干细胞培养

原代培养细胞在无血清培养基中生长24 h内可见细胞聚集现象, 部分细胞死亡, 第2天可见几个细胞形成的细胞团, 3~4 d可见到大于10个细胞的细胞团, 悬浮生长, 到7~8 d时生长成为上百个细胞的集落. 神经球悬浮生长, 细胞形态规则, 无明显的突起. 原代克隆的出现率为0.5%~1.5%, 次代培养及以后的克隆过程中, 神经球的出现明显增加. 传代培养细胞形态无明显变化(图1). NSC 增殖旺盛, 1×10^5 个/mL 的原代培养细胞经15次传代后数量扩增约 $2.4(\pm 0.4) \times 10^4$ 倍.

2.2 细胞鉴定

培养的 NSC 神经球在有多聚赖氨酸涂布的盖玻片上贴壁后, 进行巢蛋白的免疫细胞染色, 结果显示

细胞表达巢蛋白阳性. 反复传代培养后的细胞克隆仍为巢蛋白表达阳性(图2). 克隆贴壁后出现大量不同形态的新生神经细胞, 包括具有较少长突起、胞体轮廓清晰圆形或椭圆形的神经元样细胞和具有多个突起、细胞扁平的胶质细胞样细胞, 经免疫细胞化学鉴定分别为 NSE^+ , GFAP^+ 和 Gal C^+ .

2.3 AA 对 NSC 分化为多巴胺神经细胞的作用

免疫细胞化学检测发现, 未经诱导的 NSC 很少分化为 TH 阳性细胞(分化率 $0.7 \pm 0.3\%$). 而 AA 诱导能提高 TH 阳性百分率, AA 10 $\mu\text{mol/L}$ 时 TH^+ 阳性率率上升为 $(3.4 \pm 0.5)\%$, AA 100 $\mu\text{mol/L}$ 时作用尤其明显, 阳性率可达 $(17.2 \pm 2.3)\%$ (图3), 继续提高 AA 浓度对提高 TH 阳性率无明显作用. AA(10~100 $\mu\text{mol/L}$)诱导后, DAT 的阳性率也有明显升高(图4).

提取对照分化组和 AA 诱导组细胞 RNA, 鉴定其完整性后, 进行 TH mRNA cDNA 第1链合成和 PCR 反应. 检测结果表明, 一定浓度 AA(10~100 $\mu\text{mol/L}$)诱导能促进 NSC 化中 TH mRNA 表达(图5).

3 讨论

细胞移植已成为治疗神经系统疾病中细胞变性坏死丢失性的新希望和重要途径. NSC 能分化为各种神经系统细胞类型, 部分补偿损伤和丢失的细胞功能, 而且由于中枢神经系统特殊的血脑屏障的存在, 不同个体甚至不同物种间的 NSC 移植几乎无排斥反应, 除此之外 NSC 可作为基因表达的载体, 导入需要的外源基因而表达相应功能蛋白, 可以说 NSC 是脑细胞治疗的理想细胞^[5,6]. 因而, NSC 的研究引起了人们的极大兴趣.

NSC 的体外扩增是细胞移植的前提. NSC 的培养采用无血清选择性培养, 通过促分裂因子(如 EGF 和 bFGF)的作用得以传代培养扩增. 考虑到不同部位来源的 NSC 在分化方向的不同, 选取胚胎中脑细胞, 经体外无血清选择性传代培养, 获得的中脑 NSC 能分化为神经元和神经胶质细胞, 具有多向分化能力和很强的自我更新能力, 经体外传代培养20代后仍然具有克隆形成能力; NSC 扩增迅速, 原代胚胎中脑细胞经15次传代后获得约 2.4×10^{10} 细胞, 扩增约 2.4×10^4 倍. 传代培养的 NSC 性能稳定, 经冻存复苏后保持 NSC 自我更新、多向分化和大量增殖的特点, 可以用于进一步的细胞诱导和移植.

如何才能让 NSC 发挥功能? 成功的细胞移植包

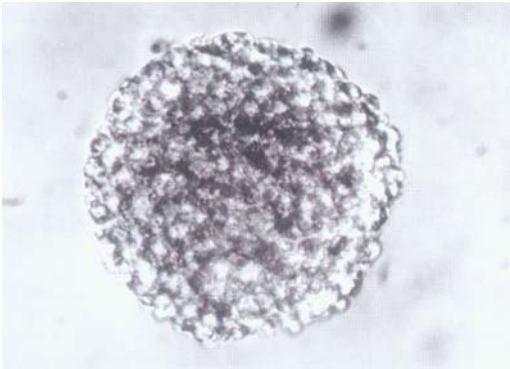


图 1 无血清培养的悬浮神经球($\times 200$)

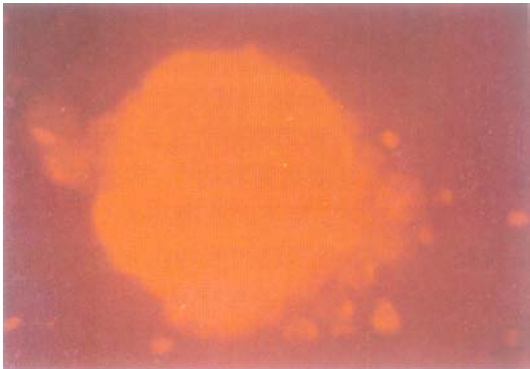


图 2 神经球的巢蛋白免疫荧光染色($\times 200$)

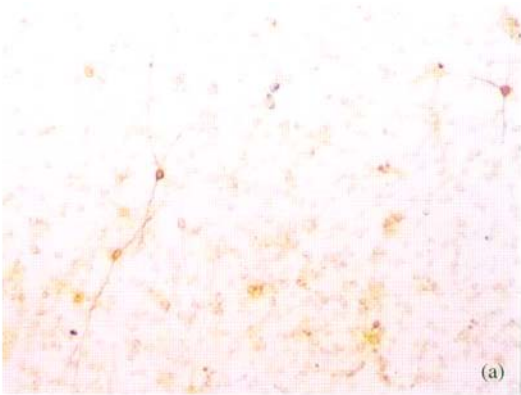


图 3 AA 诱导后 TH 染色
(a) 对照组, (b) AA 100 $\mu\text{mol/L}$ ($\times 100$)

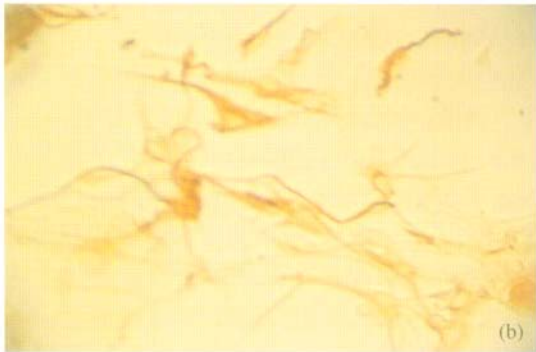
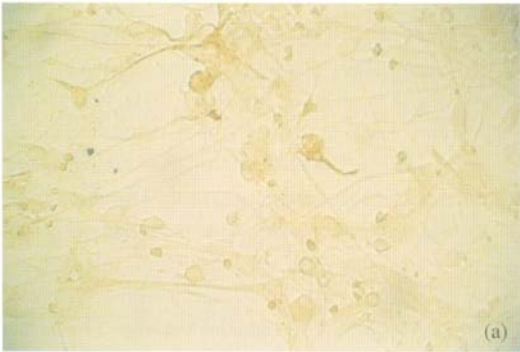


图 4 AA 诱导后 DAT 染色
(a) 对照组, (b) AA 100 $\mu\text{mol/L}$ ($\times 200$)

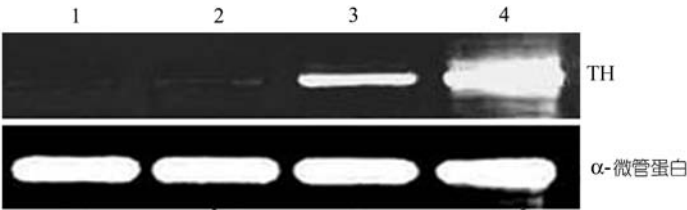


图 5 AA 诱导后 TH mRNA 表达
1 示对照组, 2 示 AA 1 $\mu\text{mol/L}$, 3 示 AA 10 $\mu\text{mol/L}$, 4 示 AA 100 $\mu\text{mol/L}$

括细胞的存活和获得特定神经细胞表型并整合到受体组织中发挥功能^[7]。具有多向分化能力的 NSC, 需要来自于内部或外部的分化信息决定分化方向。对受体微环境的调控是一种策略, 而在移植前启动 NSC 的定向分化可以更好地达到目的^[8]。实验中我们选取培养第3代后的 NSC, 用不同浓度的 AA 诱导其定向分化, 排除了中脑本身多巴胺能神经元的影响。我们选用的指标为多巴胺能神经元特异性的功能酶 TH 和 DAT。实验结果表明: AA 具有诱导 NSC 向多巴胺能细胞分化的能力, 在作用浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时即可表现出, 在 100 $\mu\text{mol/L}$ 时更为明显, 当浓度进一步增加时, TH 阳性率并无大的变化, 提示在 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, AA 的作用基本达到饱和。RT-PCR 结果显示, AA 对 TH mRNA 的转录有促进作用。DAT 是多巴胺能神经元特有的神经递质转运子, 在神经递质的运输和传递中起到重要作用。经 AA 诱导, DAT 阳性率也得以提高, 说明 AA 的诱导不仅能提高多巴胺能神经元的特征性功能酶 TH 的表达, 对神经递质的合成和转运也发挥功能。

大量 NSC 移植治疗 PD 的实验研究说明, 未分化的神经前体细胞受到移植微环境信号的诱导, 而 NSC 存活和分化为 DA 能神经元数量很少则提示内源性的诱导是远远不够的, 研究其定向分化的诱导因素和机制对 NSC 的应用尤为重要。Carvey 等人^[9]发现某些造血生长因子能提高中脑来源的 NSC 分化为 DA 能神经元比例, 通过克隆筛选可得到 98% 的分化率。Yan 等人^[10]发现 AA 能增加 bFGF 扩增的神经祖细胞向多巴胺能神经元分化比例, 与我们的实验结果一致。AA 是一种常用的抗氧化剂, 在体外和体内实验中均表现出对多巴胺神经元的存活和抵抗毒性物质的有效作用^[11]。AA 对 NSC 的定向诱导作用是否与其抗氧化能力相关或存在其他机制尚需要进一步研究。但 AA 和 IL-1 的这种功能提示我们, 在体外大量扩增 NSC 的同时, 定向诱导其分化是可能的。对 NSC 定向分化的研究、发现高效率的诱导因素和

深入研究其作用机制, 为获得足够的治疗 PD 的多巴胺能神经元提供了新的思路, 对更好地发挥 NSC 移植治疗 PD 的作用具有重要意义。

致谢 本工作为国家重点基础研究发展规划资助项目(批准号: 001CB509906)、国家高技术研究发展计划重大专项(批准号: 002AA205051)和主题项目(批准号: 2001AA216151)资助项目。

参 考 文 献

- 1 Bjorklund A, Lindvall O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat Neurosci*, 2000, 3(6): 537~544
- 2 Zao D L, Potter E D, Carvy P M, et al. Differentiation of mesencephalic progenitor cells into dopaminergic neurons by cytokines. *Exp Neuro*, 1998, 149: 411~423
- 3 Rice M E. Ascorbic regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci*, 2000, 23: 209~216
- 4 Rebec G V, Pierce R C. A vitamin as neuromodulator—ascorbate release into the extracellular fluid of the brain regulates dopaminergic and glutamatergic transmission. *Prog Neurobiol*, 1994, 43: 537~565
- 5 Akamatsu W, Okano H. Neural stem cell, as a source of graft material for transplantation in neuronal disease. *No To Hattatsu*, 2001, 33(2): 114~120
- 6 唐炯, 喻红, 林丽珠, 等. 神经干细胞的体外培养和外源基因的表达. *科学通报*, 2000, 45(21): 2303~2305
- 7 Rossi F, Cattaneo E. Neural stem cell therapy for neurological diseases: dreams and reality. *Nature*, 2002, 3: 401~409
- 8 Dobrossy M D, Dunnett S B. The influence of the environment and experience on neural grafts. *Nature Rev Neurosci*, 2001, 2: 871~879
- 9 Carvey P M, Ling Z D, Sortwell C E, et al. A clonal line of mesencephalic progenitor cells converted to dopamine neurons by hematopoietic cytokines: a source of cells for transplantation in Parkinson's disease. *Exp Neuro*, 2002, 171: 98~108
- 10 Yan J, Studer L, McKay R D, et al. Ascorbic acid increases the yield of dopaminergic neurons derived from basic fibroblast growth factor expanded mesencephalic precursors. *J Neurochem*, 2001, 36: 307~311
- 11 Soto-Otero R, Mendez-Alvarez E, Hermida-Ameijeiras A, et al. Autoxidation and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of some antioxidants: potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurochem*, 2000, 74(4): 1605~1612

(2003-01-21 收稿, 2003-04-07 收修改稿)