

[文章编号] 1000- 4718(2005)01- 0026- 05

NT- 3 基因修饰施万细胞促进神经干细胞体外分化为神经元样细胞*

郭家松^{1,3}, 曾园山^{1Δ}, 李海标¹, 黄文林², 刘然义²

(中山大学¹中山医学院组织胚胎学教研室神经科学教研室,²肿瘤防治中心, 广东 广州 510080;

³第一军医大学分校, 广东 广州 510315)

[摘要] 目的: 观测神经营养素- 3(NT- 3)基因修饰施万细胞(SCs)对神经干细胞体外分化为神经元样细胞的影响。方法: 神经干细胞(NSCs)分别与NT- 3基因修饰SCs(NT- 3- SCs) LacZ基因基因修饰SCs(LacZ- SCs)和SCs在体外共培养, 7d后用免疫组化方法观测NSCs的分化并计算其中神经元样细胞的分化率。结果: NSCs在体外可分化为神经元样细胞(NF阳性)和神经胶质样细胞(GFAP阳性), 与未基因修饰的SCs相比, NT- 3- SCs能更有效地提高神经元样细胞的分化率, 而LacZ- SCs与SCs没有明显区别。结论: NT- 3- SCs能促进NSCs向神经元样细胞分化。

[关键词] 干细胞; 许旺细胞, 神经营养素 3; 神经元样细胞

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)主要特性之一是能分化为神经元和神经胶质细胞, 但分化为神经元的比率较低^[1], 所以如何提高NSCs向神经元的分化率成了人们普遍关注的问题。神经营养素- 3(neurotrophin- 3, NT- 3)具有较广泛的生物学活性, 在神经发育及神经再生过程发挥重要作用。它不仅能在体内促进受损伤神经元的存活及其神经纤维的再生^[2], 而且也能影响体外培养的神经元分化^[3]。施万细胞(Schwann cells, SCs)是构成周围神经髓鞘的神经胶质细胞, 它能分泌多种神经营养类物质, 已证明可以创造有利于中枢神经再生的胶质微环境。本研究室已证实SCs能在体内外促进NSCs向神经元样细胞分化^[4,5]。但是迄今为止尚未见NT- 3基因修饰SCs对NSCs向神经元分化影响方面的报道, 为此, 我们利用NT- 3基因修饰SCs, 观察其对NSCs体外分化的影响, 为利用NT- 3基因修饰SCs和NSCs联合移植治疗中枢神经损伤的实验研究提供依据。

材 料 和 方 法

1 主要试剂

DMEM/F12培养基(Gibico) LacZ报告基因和NT

- 3基因重组腺病毒(AdvLacZ和AdvNT- 3, 中山大学肿瘤防治研究中心黄文林教授提供)、胎牛血清(fetal bovine serum FBS, 四季青)、胶原酶(Sigma)、胰蛋白酶(Sigma)、多聚赖氨酸(Sigma)、阿糖胞苷(Sigma)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor bFGF, Gibico)、无血清辅助培养基B27(Gibico)、核荧光Hoechst33342(Sigma)、小鼠抗大鼠nestin单克隆抗体(Sigma)、小鼠抗大鼠NF单克隆抗体(博士德)、小鼠抗大鼠GFAP单克隆抗体(博士德)、0.01 mol/L PBS(博士德)、SABC-Cy3免疫荧光组织化学试剂盒(博士德)、AEC封片剂(迈新)。

2 神经干细胞的培养及鉴定

选用新生1- 2 d的SD新生鼠(雌雄不拘, 中山大学实验动物中心提供), 在无菌条件下取出海马及侧脑室下区, 剪碎后0.25%胰蛋白酶消化并制成 1×10^7 cells/L悬液, 用含20 μg/L bFGF, 20 mL/L B27的DMEM/F12无血清培养液进行悬浮培养。每2 d进行半量更换培养液, 每次换液的同时更换培养瓶。7- 9 d后将细胞克隆球机械分离并进行传代, 第2代培养7- 8 d后, 取少量细胞克隆球用核荧光Hoechst33342(10 mg/L, DMEM/F12配制)标记2 h, 然后进行神经上皮干细胞蛋白(neuroepithelial stem cell protein, nestin) SABC-Cy3法免疫荧光细胞化学鉴定: 收集细胞 \rightarrow 0.01 mol/L PBS(含0.3% Triton, 下同)洗5 min \rightarrow 2.5%多聚甲醛固定10 min \rightarrow 0.01 mol/L PBS洗3次各5 min \rightarrow 正常山羊血清(1: 50)封闭20 min \rightarrow nestin一抗(1: 100)4℃过夜 \rightarrow PBS洗3次各5 min \rightarrow 生物素化二抗(1

[收稿日期] 2003- 06- 10 [修回日期] 2003- 09- 15

* [基金项目] 国家重点基础发展规划资助项目(No. 19990540009); 国家自然科学基金资助项目(No. 30270700); 广东省社会发展攻关基金(2003C33808)

Δ通讯作者 Tel: 020- 87331452; E- mail: yzeng@sums.edu.cn

: 100) 37 °C 30 min → PBS 洗 3 次各 5 min → SABC- Cy3 复合液(1: 50) 37 °C 30 min → 涂片及 AEC 封片(注: 中间各步骤均需离心去原液)。

3 施万细胞的培养及鉴定

选用新生 1- 2 d 的 SD 新生鼠(雌雄不拘, 中山大学实验动物中心提供), 消毒后取臂丛神经和坐骨神经, 剥去神经外膜, 剪碎。用 0. 16% 胶原酶和 0. 25% 胰蛋白酶消化后用含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液制成 1×10^7 cells/L 细胞悬液, 移入经多聚赖氨酸铺板的培养瓶, 于 37 °C 5% CO₂ 培养箱中进行培养。20 min 后将未贴壁的细胞移入另 1 培养瓶, 再过 20 min 重复 1 次。培养 24 h 后在培养液中加入终浓度为 10^{-5} mol/L 的阿糖胞苷作用 12 h, 细胞每 2- 3 d 更换培养液。当细胞长至 90% 以上时用酶消化法进行细胞传代。

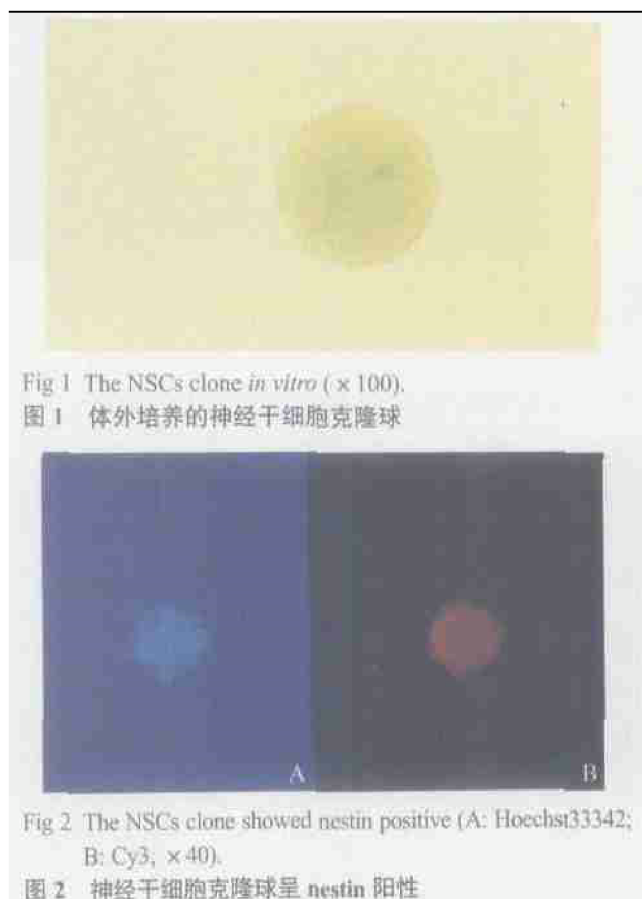
4 NT- 3 基因修饰施万细胞对神经干细胞体外分化影响的实验

实验分组: A 组: 单纯神经干细胞 (NSCs only) 组; B 组: 施万细胞+ 神经干细胞 (SCs+ NSCs) 组; C 组: LacZ 基因修饰施万细胞+ 神经干细胞 (LacZ- SCs+ NSCs) 组; D 组: NT- 3 基因修饰施万细胞+ 神经干细胞 (NT- 3- SCs+ NSCs) 组。将 2 块 24 孔培养板共 48 个孔分成 4 组, 每组 12 孔, 在各孔中加入 1 块消毒盖玻片, 用多聚赖氨酸进行铺板。培养纯化后的 SCs 经 0. 25% 胰蛋白酶消化并制成 2.5×10^7 cells/L 的悬液。在 B C D 组各孔加细胞悬液 200 μL, 培养 24 h 后, C、D 组分别接种 LacZ 报告基因和 NT- 3 基因重组腺病毒(AdvLacZ 和 AdvNT- 3), B 组不接种腺病毒; A 组的培养孔只用多聚赖氨酸铺板。将培养纯化的 NSCs 用 Hoechst33342 (10 mg/L) 标记 2 h, 含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液清洗并用极细的吸管尽可能将 NSCs 克隆球吹打散开。细胞计数后制成 5×10^6 cells/L 的悬液。当 C D 组基因修饰完成后, 吸去 B C D 组培养孔内的原培养液, 向包括 A 组在内的所有各孔内加入 200 μL NSCs 悬液。继续培养 7 d 后用含 2. 5% 多聚甲醛的 PBS 固定, 然后分别进行神经丝蛋白 (neurofilament, NF) 和胶质原纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 的 SABC- Cy3 免疫荧光细胞化学(方法基本同 2, 但不需离心)。在荧光显微镜下观察经 Hoechst33342 标记的 NSCs 细胞核(蓝色荧光)和 Cy3 免疫标记的阳性细胞胞浆(红色荧光)以及双标记情况。每组随机选择 36 个视野。用目镜测试网格计数被 Hoechst33342 标记的细胞总数以及其中 NF 阳性细胞数, 并计算出 NF 阳性细胞数占 Hoechst33342 标记的细

胞总数的百分率。结果用 SPSS 10. 0 进行卡方分析。

结 果

原代培养的 NSCs 在第 2 d 开始即出现小的克隆球, 此后克隆球不断长大。同时有些不能形成克隆球的细胞则贴壁并长出突起, 我们认为这些细胞是在取材时存在的分化后细胞。通过多次换液的同时吹打细胞悬液并更换培养瓶, 贴壁细胞可逐渐消失, 在第 7- 9 d 即可获得纯化的 NSCs 大克隆球。用极细吸管将克隆球吹打散后传代培养 7- 9 d 又可长出 NSCs 大克隆球(图 1)。Hoechst33342 是一种可标记活细胞的核荧光, 克隆球经标记后可见其中的细胞核被标记(图 2A), 同时这些细胞经免疫细胞化学鉴定呈 nestin 阳性(图 2B)。



体外分化实验中, 各组的 NSCs 加入到预先处理过的培养孔, 并改用含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液培养后, 在 1 h 内细胞基本上都开始贴壁生长并逐渐长出突起。7 d 后除克隆球中未迁移出来的细胞外, 其余均已长出突起呈分化状态。通过观察 Hoechst33342 标记的 NSCs 细胞核(蓝色荧光)和经 GFAP 和 NF200 免疫荧光细胞化学标记的阳性细胞胞浆(红色荧光)双标记情况, 可见各组均有细胞分化为

GFAP 阳性细胞即神经胶质样细胞(图 3)和 NF 阳性细胞即神经元样细胞(图 4)。因本文旨在探讨 NSCs 向神经元样细胞的分化,故计数了核荧光 Hoechst33342 标记细胞中 NF 阳性细胞的比率,结果显示:LacZ- SCs

+ NSCs 组与 SCs+ NSCs 组之间无显著差异($P > 0.05$),而这 2 组显著高于 NSCs only 组($P < 0.05$),低于 NT- 3- SCs+ NSCs 组($P < 0.05$,表 1)。

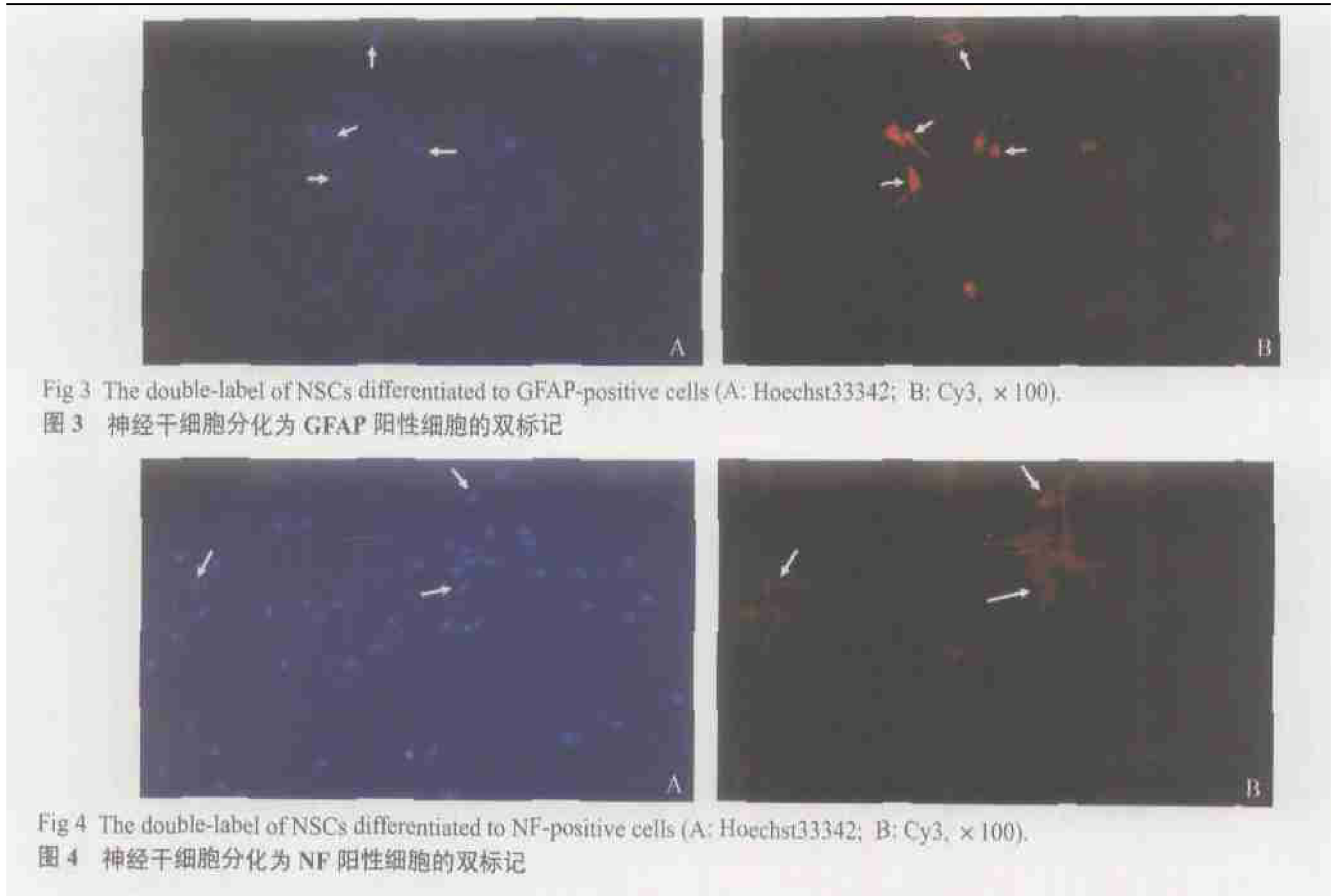


表 1 NF 阳性细胞数占 Hoechst33342 标记细胞数的百分率
 Tab 1 The percentage of NF- positive cells in the Hoechst33342 labeled cells (%)

Group	Number of NF- positive cells (n)	Number of Hoechst33342 labeled cells (n)	Percentage of NF- positive cells (%)
NSCs only	256	1 108	23.10
SCs+ NSCs	364	1 297	28.06*
LacZ- SCs+ NSCs	293	1 023	28.64*
NT- 3- SCs+ NSCs	316	967	32.68** #

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs NSCs only group; # $P < 0.05$ vs SCs+ NSCs group.

讨 论

体外培养的 NSCs 在有丝分裂原的作用下能保持良好的增殖状态。有丝分裂原主要有 2 种:表皮生长因子(epithelium growth factor, EGF)和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)。本研究结果显示 NSCs 在含 bFGF 的无血清培养液中呈克隆球或称神经球(neurosphere)状态悬浮生长,并

表达神经干细胞特异性标志物 nestin。当培养液中撤去 bFGF 加入 FBS 后,将细胞悬液接种到预先铺被多聚赖氨酸的培养板,细胞很快就开始贴壁生长并逐渐长出突起,呈分化状态。国内外大量研究都已证明 NSCs 在自然分化条件下可分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞,其中神经元的分化率较低^[6]。

研究 NSCs 的主要目的是希望通过移植 NSCs 来治疗各种神经损伤性疾病。对于不同疾病,人们希望获得的细胞可能不同。如脱髓鞘的中枢神经疾病,希望 NSCs 能更多地分化成少突胶质细胞使损伤的神经纤维能重新髓鞘化。但对大部分神经损伤而言,更希望 NSCs 能尽可能分化为神经元以替代因损伤而丢失的宿主神经元。近年来,人们发现 NSCs 的分化能受到各种因素的调节。目前在体外对神经干细胞诱导分化的研究策略主要有 2 种:与其它细胞共培养或在培养液中加入各种细胞因子。在细胞共培养方面,已发现当与施万细胞^[4]、骨髓基质细

胞^[7]、嗜铬细胞^[8]和星形胶质细胞^[9]等细胞共培养时,这些细胞能促进 NSCs 向神经元分化。在细胞因子方面,同一来源的 NSCs 对不同的细胞因子反应不同,同一细胞因子对不同来源的神经干细胞也会有不同的生物学效应。如睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF)能使从胚胎大鼠海马分离的 NSCs 分化为星形胶质细胞的分化率由 6% 提高到 98%,而作用于从新生大鼠小脑分离的 NSCs 时,可使少突胶质细胞的分化率由 0 提高到 20%^[10]。已发现能促进 NSCs 向神经元分化的细胞因子主要有:神经营养素-3(neurotrophin-3, NT-3)、神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、血小板源性神经营养因子(platelet-derived growth factor, PDNF)、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF-1)和维甲酸(retinoic acid, RA)等^[3,6,11,12]。最近 Romero-Ramos 等^[13]报道,利用选择性的培养液可以使 NSCs 特异地分化为神经元、星形胶质细胞或少突胶质细胞,但这种特异性分化细胞的功能及寿命情况如何还不得而知。

目前人们对介导 NSCs 分化的调节机制还不很清楚,这方面的报道也很少。Menn 等^[14]认为 NSCs 在刚启动分化的时刻就开始表达 NT-3 的特异性高亲和力受体 TrkC, Hapner 等^[15]则认为 NT-3 能提高 NSCs 内 TrkC 的表达并促进其向神经元分化^[15]。本研究结果(表 1)显示 NSCs 在自然分化条件下(NSCs only 组)分化为 NF 阳性的神经元样细胞较少。与 SCs 共培养时(SCs+ NSCs 组),神经元样细胞的分化率有所提高。与 NT-3 基因修饰 SCs 共培养时(NT-3-SCs+ NSCs 组),神经元样细胞的分化率得到了进一步的提高。与 LacZ 基因修饰 SCs 共培养时(LacZ-SCs+ NSCs 组),神经元样细胞的分化率与 SCs+ NSCs 组没有显著差异。这结果验证了丁英等^[4]关于 SCs 能促进 NSCs 向神经元分化的观点,同时也进一步提示腺病毒介导 LacZ 报告基因在 SCs 的表达不影响 SCs 对 NSCs 向神经元分化的作用,而 NT-3 基因修饰的 SCs 比正常 SCs 能更有效地促进 NSCs 向神经元的分化。为下一步使用腺病毒介导 NT-3 基因修饰 SCs 与 NSCs 联合移植治疗中枢神经损伤提供了实验依据。

[参 考 文 献]

- [1] Mckay R. Stem cells in the central nervous system[J]. *Science*, 1999, 276(5309): 66-71.
- [2] Novikova LN, Novikov LN, Kellerth JO. Survival effects of BDNF and NT-3 on axotomized rubrospinal neurons depend on the temporal pattern of neurotrophin administration[J]. *Eur J Neurosci*, 2000, 12(2): 776-780.
- [3] Tzeng SF. Neural progenitors isolated from newborn rat spinal cords differentiate into neurons and astroglia[J]. *J Biomed Sci*, 2002, 9(1): 10-16.
- [4] 丁英,曾园山,庄菁,等. 施万细胞对培养的神经干细胞存活及其分化的影响[J]. *解剖学报*, 2003, 34(1): 73-78.
- [5] 丁英,曾园山,吴立志,等. 施万细胞对植入大鼠脊髓损伤区内的神经细胞存活和分化的影响[J]. *解剖学报*, 2003, 34(6): 589-593.
- [6] Takahashi J, Palmer JD, Gage FH. Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived neural stem cell cultures[J]. *J Neurobiol*, 1999, 38(1): 65-81.
- [7] 姜淑杰,顾平,李怡,等. 骨髓基质细胞对神经干细胞分化为神经元的影响[J]. *中国神经科学杂志*, 2002, 18(2): 490-494.
- [8] Schumm MA, Castellanos DA, Frydel BR, et al. Enhanced viability and neuronal differentiation of neural progenitors by chromaffin cell co-culture[J]. *Brain Res Dev Brain Res*, 2002, 137(2): 115-125.
- [9] Song H, Stevens CF, Gage FH. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells[J]. *Nature*, 2002, 417(6884): 39-44.
- [10] Johe KK, Hazel TG, Muller T, et al. Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system[J]. *Genes Dev*, 1996, 10(24): 3129-3140.
- [11] Williams BP, Park JK, Alberta JA, et al. PDNF-regulated immediate early response initiates neuronal differentiation in ventricular zone progenitor cells[J]. *Neuron*, 1997, 18(4): 553-562.
- [12] Vicario-Abejon C, Collin C, Tsoulfas P, et al. Hippocampal stem cells differentiate into excitatory and inhibitory neurons[J]. *Eur J Neurosci*, 2000, 12(2): 677-688.
- [13] Romero-Ramos M, Vourc'h P, Young HE. Neuronal differentiation of stem cells isolated from adult muscle[J]. *J Neurosci Res*, 2002, 69(6): 894-907.
- [14] Menn B, Timsit S, Represa A, et al. Spatiotemporal expression of noncatalytic TrkC NC2 isoform during early and late CNS neurogenesis: a comparative study with TrkC catalytic and p75NTR receptors[J]. *Eur J Neurosci*, 2000, 12(9): 3211-3223.
- [15] Hapner SJ, Boeshore KL, Large TH, et al. Neural differentiation promoted by truncated trkC receptors in collaboration with p75(NTR)[J]. *Dev Biol*, 1998, 201(1): 90-100.

NT- 3 genetically modified Schwann cells promote neural stem cells to differentiate into neuron- like cells

GUO Jia- song^{1,3}, ZENG Yuan- shan¹, LI Hai- biao¹, HUANG Wen- lin², LIU Ran- yi²

(¹*Division of Neuroscience, Department of Histology and Embryology, Zhongshan Medical College,*

²*Cancer Center, Sun Yat- sen University, Guangzhou 510080, China;*

³*Branch Campus of The First Military Medical University, Guangzhou 510315, China)*

[ABSTRACT] **AIM:** To explore the effects of neurotrophin- 3 (NT- 3) - genetically modified Schwann cells (NT- 3- SCs) on differentiation of neural stem cells (NSCs) into the neuron- like cells. **METHODS:** The NSCs were co- cultured with NT- 3- SCs. Report gene LacZ genetically modified Schwann cells (LacZ- SCs) and normal SCs respectively *in vitro*. 7 d later, the differentiation of NSCs was studied by immunohistochemistry, and the percentage of neuron- like cells was calculated. **RESULTS:** NSCs differentiated to the GFAP- positive cells (glial- like cells) and NF- positive cells (neuron- like cells) *in vitro*. Compared to the normal SCs, NT- 3- SCs more efficiently promoted NSCs to differentiate into the neuron- like cells. The effect of LacZ- SCs was as the same to the normal SCs. **CON- CLUSION:** NT- 3- SCs promote NSCs to differentiate into the neuron- like cells.

[KEY WORDS] Stem cells; Schwann cells; Neurotrophin 3; Neuron- like cells

2005 年中国病理生理学会学术活动安排

会 议 名 称	日期	地点	预期人数	联系人地址、电话及 E- mail
1. 动物病理生理专业委员会第 12 次学术讨论会	8 月	内蒙古呼和浩特	110- 120	哈尔滨市东北农业大学动物医学学院病理教研室 郑世民、高雪丽 邮编: 150030 电话: 0451- 55190405, 0451- 55190263
2. 第 7 届全国休克会议(与中华创伤杂志年会合办)	10 月下旬	广州	200	刘 杰副教授 第一军医大学 电话: 020- 61648465 电子邮件: jieliu@fimmu.com
3. 第 10 届全国实验血液学会议	11 月 3- 7 日	西安	500	陈协群教授 第四军医大学西京医院血液科主任 电话: 029- 3375199 E- mail: xiequnchen@sina.com
4. 全国病理生理学教改研讨会	5 月	待定	100	金惠铭教授 上海复旦大学上海医学院 邮编: 200032 电话: 021- 54237081 电子邮件: hmjin@shmu.edu.cn
5. 全国危重病医学讲习班(与美国合办)	待定	待定	待定	陈德昌教授 协和医院加强医疗科 邮编: 100005 电话: 010- 65296561 电子邮件: chende@pumch.ac.cn
6. 炎症、感染、发热和低温专业委员会和中医专业委员会第 10 次学术会议	8 月	桂林	100	广州暨南大学医学院病理生理教研室 颜 亮教授 邮编: 510632 电话: 020- 85220253
7. 第 7 届 5 次常务理事会议	7 或 8 月	重庆	20	吴立玲教授 北京大学医学部病理生理室 邮编: 100083 电话: 010- 82802403 电子邮件: pathophy@bjmu.edu.cn