

## 外源性神经节苷脂对神经干细胞增殖分化的作用

段建钢<sup>1</sup> 项涛<sup>2</sup> 陈红<sup>2</sup> 刘鸣<sup>3</sup>

**摘要** 目的:探讨外源性神经节苷脂(GM<sub>1</sub>)对从大鼠分离培养的神经干细胞(NSCs)增殖及分化的作用。方法:①利用无血清培养技术从胎鼠大脑皮质和海马分离培养原代细胞,加血清诱导其分化。②在 NSCs 培养基和 DMEM/F12 培养基中加入不同浓度的 GM<sub>1</sub>, 观察 GM<sub>1</sub> 对 NSCs 增殖和分化的作用。结果:①与不含 GM<sub>1</sub> 的 NSCs 培养基相比,在 NSCs 培养基中加入低浓度的 GM<sub>1</sub>, NSCs 的生长无明显改变,随着 GM<sub>1</sub> 浓度的增加, NSCs 克隆球体积逐渐减小,细胞逐渐死亡;②在 DMEM/F12 培养基中单独加 GM<sub>1</sub> 而不加血清, NSCs 克隆球均未见继续生长,也未见分化,而是迅速的死亡。结论:①在 NSCs 培养基中,低浓度(12.5 μg/ml) GM<sub>1</sub> 对 NSCs 的增殖无明显影响,但较高浓度的 GM<sub>1</sub> 对 NSCs 的增殖有抑制作用。②DMEM/F12 培养基中单独加 GM<sub>1</sub>, 而不加血清和其他生长因子,既不能诱导 NSCs 分化,也不利于 NSCs 的继续生长。

**关键词** 神经干细胞;细胞培养;增殖;分化;外源性神经节苷脂

中图分类号:Q813.11, R49 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2006)-11-0985-03

A study on extrinsic ganglioside GM<sub>1</sub> on proliferation and differentiation of neural stem cells/DUAN Jian-gang, XIANG Tao, CHEN Hong, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006, 21(11):985—987

**Abstract Objective:** To study the possible role of ganglioside GM<sub>1</sub> on proliferation and differentiation of neural stem cells(NSCs) of rats in vitro. **Method:** ①Fetal rats were employed in the study. The primary cells isolated from the cerebral cortex and hippocampus were cultured with serum-free incubation technique and differentiation were induced with serum. ②The proliferation and differentiation features of NSCs were observed under phase contrast microscope after GM<sub>1</sub> was added with different concentrations in NSCs and serum-free DMEM/F12 culture media. **Result:** ①Comparing with control, no significant proliferation of NSCs occurred while GM<sub>1</sub> was added with low concentration; however, the volumes of NSCs clones gradually decreased and accompanied with cell death while GM<sub>1</sub> was added with high concentration in NSCs culture medium. ②NSCs, cultured in DMEM/F12 culture medium only containing GM<sub>1</sub>, neither proliferated nor differentiated, but were soon dead. **Conclusion:** ①GM<sub>1</sub> of low concentration (12.5 μg/ml) had not significant influence on proliferation of NSCs; but GM<sub>1</sub> of higher concentration could inhibit it in NSCs culture medium. ②NSCs could not differentiate and keep growing in serum-free DMEM/F12 culture medium only containing GM<sub>1</sub> without other growth factor.

**Author's address** Dept. of Neurology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, 610041

**Key words** neural stem cells; cell culture; proliferation; differentiation; ganglioside GM<sub>1</sub>

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的发现为神经损伤修复的研究提供了一条新思路,它的增殖、迁移和分化与所处的微环境密切相关。微环境中含有各种生长因子和细胞因子,而 NSCs 对外源性神经营养因子的反应具有多样性,因此每个外源性因子的作用必须特异性地放在一个系统进行验证。神经节苷脂是大多数哺乳动物细胞膜的组成成分,其中单唾液酸四己糖神经节苷脂(monosialotetrahexosylganglioside, GM<sub>1</sub>)在中枢神经系统内所占的比重特别高。近年来有关 GM<sub>1</sub> 的研究较多,发现其在神经发生、生长、分化过程中起着必不可少的作用,对于损伤后的神经修复也非常重要<sup>[1-2]</sup>,这些作用都是通过神经细胞的研究中得出的,然而 GM<sub>1</sub> 对原代培养 NSCs 作用的研究尚未见报道,如果 GM<sub>1</sub> 能对 NSCs 的增殖、分化产生影响,将为临床合理使用

GM<sub>1</sub> 提供进一步的理论基础。为此,本研究利用胎鼠的大脑皮质和海马,用 NSCs 培养基<sup>[3]</sup>分离、培养 NSCs,进一步在培养基中加入不同浓度的 GM<sub>1</sub>,来研究 GM<sub>1</sub> 在 NSCs 增殖、分化中是否发挥作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物和试剂

胎龄 18d 的 SD 大鼠由四川大学实验动物中心提供;DMEM/F12、N2、EGF、bFGF(Gbico 公司);兔抗大鼠 Nestin IgG、FITC 标记山羊抗兔 IgG 及 SABC 免疫组化试剂盒(博士德公司);兔抗大鼠 GFAP

1 四川大学华西医院神经内科,成都,610041

2 四川大学华西基础医学与法医学院人体解剖学教研室

3 通讯作者:刘鸣(四川大学华西医院神经内科,成都,610041)

作者简介:段建钢,男,博士

收稿日期:2006-06-30

IgG (Sigma 公司); 小鼠抗大鼠  $\beta$  III-Tubulin IgG (Promega 公司); FITC 标记山羊抗小鼠 IgG、BrdU、鼠抗人 BrdU 单克隆抗体(中山公司); 神经节苷脂 GM<sub>1</sub> 注射液(20mg/2ml, TRB Pharma Brazil)。

## 1.2 大鼠 NSCs 的分离、培养及诱导分化

取 SD 胎鼠, 在无菌状态下剪开头皮及颅骨, 仔细剥离脑膜及血管, 分离出大脑皮质和海马, D-Hank 液漂洗, 以 0.25% 胰酶消化约 15min, 加含血清培养基终止消化, 用巴氏吸管轻柔吹打成单细胞悬液, 并用 200 目的不锈钢网过滤, 吸取滤出液, 以 1000r/min 离心 10min 后弃上清, 加入无血清的 NSCs 培养 [组份为 DMEM/F12 (1:1)、N2、20ng/ml EGF 和 20ng/ml bFGF], 以  $5 \times 10^5$ /ml 的细胞密度接种于 50ml 培养瓶中, 于饱和湿度、37℃、5%CO<sub>2</sub> 恒温培养箱孵育。培养 7—10d 时, 将原代细胞克隆用含 50ml/L 小牛血清的 DMEM/F12 培养基诱导其分化。相差显微镜观察其生长及分化情况。

## 1.3 免疫细胞化学染色<sup>[4-6]</sup>

选取原代培养 7d 的细胞克隆, 一部分用含 BrdU (浓度为 0.5 $\mu$ mol/100ml) 的 NSCs 培养基孵育 48h 后行 BrdU 间接免疫荧光(IF)染色。一部分接种于预先置有 0.025% 多聚赖氨酸包被盖玻片的 12 孔培养板, 加入含 5% 小牛血清的 DMEM/F12 培养基, 贴壁 6h 的细胞行 Nestin 间接 IF 染色; 贴壁培养 7d 的细胞行 Nestin、 $\beta$  III-Tubulin 和 GFAP 间接 IF 染色。

## 1.4 GM<sub>1</sub> 对原代 NSCs 增殖作用研究的实验分组

将按前述方法从鼠脑分离出来的细胞加入 NSCs 培养基进行原代培养时分成 4 组。对照组(C): 自接种之日起就用无血清 NSCs 培养基培养; 实验组 1(G1): 自接种首日起, 就用含 12.5 $\mu$ g/ml GM<sub>1</sub> 的 NSCs 培养基培养; 实验组 2(G2): 自接种首日起, 就用含 25 $\mu$ g/ml GM<sub>1</sub> 的 NSCs 培养基培养; 实验组 3(G3): 自接种首日起, 就用含 50 $\mu$ g/ml GM<sub>1</sub> 的 NSCs 培养基培养。细胞接种密度均为  $5 \times 10^5$ /ml。分别于接种后用相差显微镜逐日观察细胞的生长情况。

## 1.5 GM<sub>1</sub> 对 NSCs 诱导分化作用研究的实验分组

选取 C 组体外培养 7d 的原代细胞克隆接种于预先置有 0.025% 多聚赖氨酸包被盖玻片的 24 孔培养板时分为 4 组。其中对照组(C')加入含 50ml/L 小牛血清的 DMEM/F12 培养基; 实验组 1'(G1')加入含 GM<sub>1</sub> 12.5 $\mu$ g/ml 的无血清 DMEM/F12 培养基; 实验组 2'(G2')加入含 GM<sub>1</sub> 25 $\mu$ g/ml 的无血清 DMEM/F12 培养基; 实验组 3'(G3')加入含 GM<sub>1</sub> 50 $\mu$ g/ml 的无血清 DMEM/F12 培养基。分别于接种后用相差显微镜逐日观察细胞的生长及分化情况。

## 2 结果

### 2.1 大鼠 NSCs 原代培养及鉴定

胎鼠大脑皮质及海马的原代细胞在 NSCs 培养基中培养时, 接种后即刻, 相差显微镜下, 为较多悬浮的圆形细胞, 边界清楚, 折光性强, 单个或成对存在; 到 7d 时长成十几个到上百个细胞的集落, 这些集落大部分呈球形悬浮生长, 形成克隆球(图 1, 见后置彩色插页 1), 少部分贴壁平铺生长。克隆球呈 Nestin 阳性反应, IF 染色克隆呈绿色(图 2, 见后置彩色插页 1); BrdU 孵育后的原代细胞克隆呈 BrdU 阳性反应, IF 染色呈黄绿色; 阴性对照均未见 Nestin 及 BrdU 阳性反应。

### 2.2 NSCs 克隆球诱导分化及鉴定

原代 NSCs 克隆球在含 50ml/L 小牛血清的 DMEM/F12 培养基中诱导分化 7d 时, 相差显微镜下可见分化成大量形态不一、胞体丰满的多角形神经元样细胞和多突起的星状细胞, 从克隆球周围迁移出, 呈放射状排列(图 3, 见后置彩色插页 1)。免疫细胞化学染色显示, 诱导分化形成的子细胞中,  $\beta$  III-Tubulin 阳性的神经元, IF 染色胞浆呈绿色(图 4, 见后置彩色插页 1); GFAP 阳性的星形胶质细胞, SABC 法染色胞浆呈棕黄色, 均可见许多突起呈放射状从克隆球长出(图 5, 见后置彩色插页 1)。

### 2.3 不同浓度 GM<sub>1</sub> 对 NSCs 原代培养的影响

按步骤 1.2 分离出来的细胞接种后即刻, 相差显微镜下, 可见各组均为较多悬浮的圆形细胞, 边界清楚, 折光性强, 单个、成对或成团存在; 24h 后 C 组、G1 组和 G2 组均可见较多悬浮的由圆形细胞聚集成的细胞团块, 细胞边界清楚, 折光性强, 有少数贴壁的单个圆形细胞; G3 组可见较多贴壁的圆形细胞, 单个散在, 边界清楚, 折光性强, 出现少量细胞碎片, 未见明显的细胞团块(图 6, 见后置彩色插页 1)。48h 后 C 组、G1 组和 G2 组均可见一些悬浮的小细胞团块, 细胞生长状况好, 也出现一些细胞碎片; G3 组可见较多贴壁的圆形细胞, 单个散在, 边界清楚, 折光性尚可, 细胞碎片较前增多。以后随着培养时间的延长, C 组、G1 组的细胞团块体积逐渐增大, 细胞碎片逐渐减少; G2 组可见细胞团块数目逐渐减少, 体积也逐渐减小; G3 组可见贴壁的圆形细胞逐渐减少, 细胞碎片逐渐增多。原代培养第 7d, C 组与 G1 组均可见较大的悬浮克隆球, 细胞生长状况好, 细胞碎片少, G1 组的细胞克隆球与 C 组相比无明显差异; G2 组可见一些小的悬浮克隆球, 细胞边界欠清, 折光性一般, 有较多的细胞碎片; G3 组可见大量的细胞碎片, 残存的圆形细胞数目少, 边界欠清, 折光

性差,且未见克隆球(图 7,见后置彩色插页 1)。

## 2.4 不同浓度 GM<sub>1</sub> 对 NSCs 分化作用的影响

对照组 C' 的原代 NSCs 克隆球在含 5% 小牛血清的 DMEM/F12 培养基中 6h 左右见细胞集落已贴壁,12h 后即发现有突起从团块边缘长出,24h 后见有少数细胞分化为有突起的细胞,随着时间的推移,分化的细胞逐渐增多,突起不断增粗与延长并互相连接成网状(图 8,见后置彩色插页 1);而用含不同浓度 GM<sub>1</sub> 的无血清 DMEM/F12 培养基来诱导 NSCs 分化时,随着培养时间的延长,实验组 G1'、G2'、G3' 的原代 NSCs 克隆球均未见继续生长,也未见有突起从克隆球边缘长出和分化为有突起的细胞,而是迅速的死亡,变成大量细胞碎片。诱导分化 3d 时的 G1' 组细胞的生长情况,G2',G3' 组细胞的生长情况与此相同,相差显微镜下可见几乎所有的克隆球和单个散在的细胞都死亡,表现为折光性差,边界欠清,失去正常的细胞形态,变成大量的细胞碎片。

## 3 讨论

Nestin 一般作为 NSCs 的标志物<sup>[7]</sup>,本试验原代培养的神球呈 Nestin 和 Brdu 阳性表达。多分化潜能是 NSCs 又一个重要基本属性,我们应用相差显微镜和免疫细胞化学技术证实了克隆细胞具有分化为神经元和神经胶质细胞的能力。

GM<sub>1</sub> 是单唾液酸四己糖神经节苷脂,化学式为: C73H131M3O31,分子量为 1546.9,具有一个亲水基团和一个亲脂基团<sup>[8]</sup>。以 GM<sub>1</sub> 在培养基中的浓度为 8、16、32μmol/L 作为研究浓度的梯度,换算成本实验的浓度单位,即为 12.5μg/ml、25μg/ml、50μg/ml,用于研究 GM<sub>1</sub> 对 NSCs 的增殖及分化作用。

近年有些研究表明 GM<sub>1</sub> 具有促进神经再生、神经轴突生长、突触形成和恢复神经功能的作用,而这些作用都不是通过对体外原代培养 NSCs 的研究中得出的。本研究初次探讨了 GM<sub>1</sub> 对体外培养 NSCs 的增殖及分化作用。

发现随着培养时间的延长,G1 组的细胞克隆球在大小与数量上与 C 组相比无明显差异,说明在 NSCs 培养基中加入 GM<sub>1</sub>12.5μg/ml 时,其自我增殖能力和活力无明显改变;G2 组的 NSCs 增殖所形成的克隆球体积比对照组明显减小,且细胞的生长状况也逐渐变差,说明 NSCs 的自我增殖能力在 GM<sub>1</sub>25μg/ml 时有所降低;G3 组的 NSCs 逐渐死亡,形成大量细胞碎片,没有明显的克隆球形成,说明在 GM<sub>1</sub>50μg/ml 时,NSCs 的自我增殖能力明显受抑制,且对细胞的存活有害。因此,在 NSCs 培养基中,低

浓度 (12.5μg/ml)GM<sub>1</sub> 对 NSCs 的增殖无明显影响,随着 GM<sub>1</sub> 浓度的增加,NSCs 的自我增殖能力逐渐下降,活力也逐渐受抑制。

本研究观察到分别用含 5% 小牛血清的 DMEM/F12 培养基和不同浓度 GM<sub>1</sub> 的无血清 DMEM/F12 培养基来诱导 NSCs 分化,结果显示随着培养时间的延长,血清诱导组 C' 的细胞生长状况良好,并分化为有突起的细胞;而用含不同浓度 GM<sub>1</sub> 的无血清 DMEM/F12 培养基诱导 NSCs 分化的各组原代 NSCs 克隆球均未见继续生长,也未见分化,而是迅速的死亡,变成细胞碎片。说明在体外培养中,培养基中单独加 GM<sub>1</sub>,而不加血清和其他生长因子,不能诱导 NSCs 分化,也不利于 NSCs 的继续生长。

这一个研究结果与近年的研究结果不同,可能是由于其他学者对 GM<sub>1</sub> 的研究是通过体内或体外含血清培养基进行研究的<sup>[2]</sup>,由于体内是一个错综复杂的因子网络和体外含血清培养基成分复杂,因此近年的研究结果提示 GM<sub>1</sub> 促进神经再生的作用很可能与所处的微环境密切相关。然而,由于 NSCs 对外源性神经营养因子的反应具有多样性,在 NSCs 研究的初期阶段,对单个的离体因子逐一试验的方法是必须经历的一个过程。为此,本研究排除了体内和体外含血清培养基的干扰,一方面,在无血清的 NSCs 培养基中研究了 GM<sub>1</sub> 对 NSCs 增殖的作用。同时,在无血清的 DMEM/F12 培养基中研究了 GM<sub>1</sub> 对 NSCs 分化的作用。本研究用的 GM<sub>1</sub> 的浓度是从 12.5μg/ml 开始递增的,至于 GM<sub>1</sub> 在 12.5μg/ml 以下时对 NSCs 增殖和分化的影响,及 GM<sub>1</sub> 在体内及含血清的培养基中对 NSCs 的作用有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] Jose Abad Rodriguez,Eugenia Piddini,et al. Plasma membrane ganglioside sialidase regulates axonal growth and regeneration in hippocampal neurons in culture [J]. J Neurosci,2001,21 (21): 8387.
- [2] Zhang H,Wang JZ,Sun HY,et al.The effects of GM1 and bFGF synergistically inducing adult rat bone marrow stromal cells to form neural progenitor cells and their differentiation[J]. Chin J Traumatol,2004,7(1):3.
- [3] Ciccolini F,Svensden CN. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) promotes acquisition of epidermal growth factor (EGF) responsiveness in mouse striatal precursor cells: identification of neural precursors responding to both EGF and FGF-2[J]. Neuroscience,1998,18(19): 7869.
- [4] 郑志斌,林玲. 神经细胞培养理论与实践[M].第 1 版. 北京: 科学出版社,2002.214—226.
- [5] 蔡文琴. 现代实用细胞与分子生物学实验技术[M].第 1 版. 北京: 人民军医出版社,2001.96—174.
- [6] 薛庆善. 体外培养的原理与技术 [M]. 第 1 版. 北京: 科学出版社,2001.349—358.
- [7] Lendahl U,Zimmerman LB,McKay RDG. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein [J]. Cell, 1990,60: 585.
- [8] Zeller CB,Marchase RB. Gangliosides as modulators of cell function[J].Am J Physiol,1992,262(6 Pt 1): C1341.