

胶质源性神经营养因子体外诱导小鼠胚胎中脑神经干细胞分化的研究*

丁继固¹ 丁文杰² 李 光¹ 赵克勇¹

摘要 目的:探索胶质源性神经营养因子(GDNF)在体外诱导小鼠胚胎中脑神经干细胞(M-NSCs)分化成多巴胺能神经元的培养方法,为 M-NSCs 移植治疗帕金森病(PD)提供实验依据。方法:在有血清条件下体外培养鼠胚 M-NSCs,予以 GDNF 作诱导分化。TH 免疫细胞化学鉴定,流式细胞术检测 TH-ir 阳性神经元的百分率。结果:M-NSCs 向多巴胺能神经元分化的阳性率经流式细胞术检测结果,两组 TH-ir 阳性细胞比率 A 组(实验组,6 只)为 $13.53\% \pm 1.53\%$;B 组(对照组,6 只) $3.46\% \pm 0.77\%$,两组比较差异有显著性意义($P < 0.01$)。结论:GDNF 可促进 M-NSCs 分化成多巴胺能神经元。

关键词 中脑神经干细胞;多巴胺能神经元;胶质源性神经营养因子;酪氨酸羟化酶

中图分类号:R741, R742.5 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2008)-04-0341-03

Experimental study on differentiation of mesencephalic neural stem cells induced by GDNF in vitro/DING Jigu, DING Wenjie, LI Guang, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23(4):341—343

Abstract Objective: To explore the culture methods for the differentiation of mesencephalic neural stem cells (M-NSCs) from embryonic mice into dopaminergic (DAergic) neurons in vitro, and to provide the experimental information for the treatment of Parkinson's disease by cell transplantation. **Method:** M-NSCs were cultured and proliferated, then GDNF were used to induce differentiation in the condition of fetal bovine serum (FBS). Immunocytochemical techniques were used to detect the TH-ir cells from NSC differentiation, and FCM to detect the percentage of TH-ir in all the cells. **Result:** The proportions of M-NSCs differentiated into DAergic neurons were $13.53\% \pm 1.53\%$ in GDNF group, and $3.46\% \pm 0.77\%$ in control group ($P < 0.01$). **Conclusion:** GDNF can significantly increase the differentiation of DAergic neurons.

Author's address Department of Anatomy, Medical College, Xianning College, Xianning, 43710

Key words mesencephalic neural stem cells; dopaminergic (DAergic) neurons; glial cell line-derived neurotrophic factor; tyrosine hydroxylase

在对帕金森病(Parkinson's disease, PD)的脑神经干细胞移植治疗中,移植细胞的数量及多巴胺能神经元的分化比率是必须解决的问题。而有效的 NSC 的体外增殖与多巴胺能神经元的大量定向诱导分化是解决问题的关键所在。诱导方式及诱导剂的选择也相当重要,而胶质源性神经营养因子(glial cell-line derived neurotrophic factor, GDNF)对大鼠中脑多巴胺能神经元有特异性营养作用^[1]。因此,本研究拟探讨 GDNF 体外诱导中脑神经干细胞(mesencephalic neural stem cells, M-NSCs)向多巴胺能神经元分化情况,为在体外获得足够的多巴胺能神经元进行 PD 的转基因移植治疗提供线索。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

GDNF、碱性成纤维生长因子(bFGF)购自 Pepro-tech 公司;DMEM/F12 培养基、特优级胎牛血清

(FBS) 购自 HyClone 公司, B27 购自 GIBCO 公司;胰蛋白酶(Trypsin)、左旋多聚赖氨酸(PLL)购自 Sigma 公司;抗体:鼠抗人 nestin IgG, 鼠抗人神经元特异性烯醇化酶(NSE)单克隆抗体, 鼠抗人胶原纤维酸性蛋白(GFAP)单克隆抗体购自北京中山生物技术公司;小鼠抗大鼠酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH, 多巴胺合成的限速酶)IgG 单克隆一抗, 羊抗鼠 IgG(荧光标记二抗)购自 Sigma 公司。

1.2 动物与分组

昆明小鼠,由武汉大学医学院实验动物中心提供。将实验动物分 A、B 两组:A 组(实验组,6 只)含 10%FBS 的 DMEM/F12+1ng/ml GDNF;B 组(对照

* 基金项目:湖北省教育厅重点课题(D200628008)

1 咸宁学院医学院解剖学教研室,湖北咸宁, 437100

2 咸宁学院医学院口腔系

作者简介:丁继固,男,教授

收稿日期:2007-10-08

组,6只)含10% FBS的DMEM/F12。

1.3 培养与检测

1.3.1 中脑神经干细胞培养及诱导分化:取妊娠12d小鼠,断髓处死,放入75%酒精中浸泡消毒2min,置超净工作台上,解剖显微镜下分离脑膜,切取中脑组织,用FBS洗3次,剪刀剪碎,加入0.25%胰蛋白酶(刚刚覆盖组织即可),37℃水平摇床消化5min。然后用含10%胎牛血清的培养基中止消化反应,吹打,使细胞混匀,1000r/min离心10min,去上清,用无血清培养基重悬细胞,200目尼龙网过滤;细胞计数器计数,将细胞以 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 接种于60mm培养皿中,添加4% B27和bFGF 20ng/ml。细胞生长约1周左右,不用胰蛋白酶消化,采用机械方法分离传代细胞,离心弃上清液,重悬,计数接种。将培养5—7d的神经球以20—30个细胞球/ cm^2 接种于置有预先经PLL包被盖玻片的24孔培养板中,待流式细胞仪检测的细胞直接接种至培养皿,按分组进行诱导分化。每3—4d换液1次。诱导10—12d,待80%细胞从神经球迁移出来,分化为单细胞时,进行免疫细胞化学鉴定及流式细胞术检测。

1.3.2 免疫细胞化学检测:取出待染细胞,FBS漂洗两次,纯甲醇-20℃固定20min,FBS漂洗3次,5min/次。1% Triton X-100透化20min,FBS漂洗3次,37℃羊血清孵育20min以封闭非特异反应,一抗分别为抗nestin IgG,抗NSE IgG,抗GFAP IgG,抗TH IgG,4℃过夜,次日加入荧光素Texas Red标记的二抗,37℃孵育1h,FBS洗3次,缓冲甘油封片,荧光显微镜下观察。

流式细胞术(FCM)检测TH阳性细胞比例,收集细胞,纯甲醇-20℃固定,PBS洗3次。1% Triton X-100透化20min,FBS洗3次,加入抗TH IgG一抗,4℃过夜,次日FBS洗3次,加入荧光素FITC标记的二抗,37℃孵育1h,FBS洗3次,400目尼龙网过滤,制成单细胞悬液,细胞计数,每组细胞总量调整至 1×10^5 — $10^6/\text{ml}$,上机检测荧光标记细胞百分率。

1.4 统计学分析

对A、B各组中,每张TH免疫荧光染色片随机取6个视野,分别进行DAPI标记计数和TH免疫荧光反应(TH-ir)阳性细胞计数,TH-ir阳性细胞率=TH-ir阳性细胞数/DAPI阳性数;每次实验各计数染色片6张;重复实验3次。版本用SPSS 12.0软件对数据进行统计处理,数据以均数 $\pm$ 标准差表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 培养和鉴定

孕12d小鼠中脑神经干细胞培养24h后,可见大部分细胞呈碎渣样死亡;存活细胞2—3d后,三五聚集成团,团块细胞界限不清,周围光晕可见(图1,见前置彩色插页6)。5—6d后长成直径约120—180 μm 神经细胞球(neurosphere),团块周边折光性好,但细胞界限仍不清,形成的神经球经免疫荧光染色显示:神经球细胞表达巢蛋白(nestin)抗原(图2,见前置彩色插页6),在随后的血清条件下能分化为NSE和GFAP阳性细胞(图3,见前置彩色插页6),表明它们具有多向分化潜能,是神经干细胞。

2.2 诱导分化

中脑神经球在GDNF诱导条件下4h贴壁,12h可见球体之间伸出细长突起;2d左右有细胞沿着突起向外迁移;随后细胞的突起延长增多,细胞与细胞之间以及球体与球体之间形成纤维网络(图4,见前置彩色插页6)。TH免疫荧光检测两组均可见TH-ir阳性细胞,TH位于胞质及突起中,胞核无表达,胞体较大,圆形和椭圆形多见,突起呈TH-ir阳性神经元典型的串珠样形态。实验组中呈TH-ir阳性神经元数量比对照组多而且细胞的形态更为成熟(图5—6,见前置彩色插页6)。

2.3 M-NSCs向多巴胺能神经元分化的阳性率流式细胞术检测结果

两组TH-ir阳性细胞比率A组为 $13.53\% \pm 1.53\%$;B组 $3.46\% \pm 0.77\%$,两组比较差异有显著性意义($P < 0.01$)。

3 讨论

GDNF最初是从大鼠胶质瘤细胞系B49的条件培养液中分离纯化得到的,对大鼠中脑多巴胺能神经元有特异性营养作用;对于损伤后的多巴胺能神经元有挽救、促进恢复、促进存活、促进对多巴胺高亲和力摄取等作用,有效保护中脑的多巴胺循环,预防体内多巴胺能神经元的退行性病变^[1]。NSCs的分化受细胞自身基因的调控和外来信号的调控^[2]。目前外来信号研究中对NSCs向DA能神经元诱导分化有明确作用的因素包括:①细胞因子:BDNF、IL-1、FGF8等;②低氧环境及各种抗氧化剂;③化学物质:弗司扣林、潘生丁、N-乙酰半胱氨酸等;④其他:CAMP、中脑组织、骨髓基质细胞等^[3-5]。其中细胞因子在NSCs的分化中的作用越来越多地受到人们的重视。细胞因子不仅可以影响NSCs的生长与分化,而且能够促进成熟神经细胞的存活与成熟,在神经系统的生长发育,功能维持和损伤修复中

发挥重要的作用。目前,研究集中在从脑组织中分离 NSCs,观察细胞因子对其增殖分化的影响作用。现已发现众多细胞因子参与 NSCs 分化的调控,其中有多种细胞因子可促进 NSCs 向 DA 能神经元的分化,包括表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)和胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-I)等^[6]。近年来 GDNF 和白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)对 DA 能神经元的作用引起了广泛的关注。

NSCs 是指具有自我更新能力和分化成神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞能力的细胞。充足、安全且可靠的 NSCs 是研究和应用 NSCs 的前提。已有实验显示,在治疗一些神经系统疾病时,向动物体内植入已限制性向特定类型神经元分化的 NSCs,比植入未分化的 NSCs 的效果好^[7]。目前诱导 NSCs 向特定类型神经元分化的方法比较多,希望能找到一个稳定有效的诱导方法。在对 DA 能神经元的体外诱导研究中,细胞因子的作用一直备受关注。

NSCs 广泛存在于哺乳动物成年和胚胎的不同脑区。来自胚胎不同部位的 NSCs 分化有明显的区域特异性,来自中脑和间脑的 NSCs 较端脑和菱脑来源的 NSCs 有更高的 TH-ir 阳性细胞分化率,中脑和间脑来源的 TH 抗原阳性细胞的细胞形态也更接近于中脑 DA 能神经元^[8]。研究者将来源于大鼠中脑和纹状体的 NSCs 分别移植到入 PD 大鼠纹状体中,只有中脑来源的 NSCs 能分化出 TH-ir 阳性神经元^[9]。Potter 等也发现,IL-1 能够诱导中脑来源的 NSCs 分化为 TH-ir 阳性的神经元,而不能诱导纹状体来源的 NSCs 向 TH-ir 阳性神经元分化。在胚胎后期,不同部位的 NSCs 不是全能的,有向特定类型神经元分化的特点。本实验从 DA 能神经元发育的部位即中脑分离的 NSCs 由于本身含有中脑源性的转录因子和相关发育信号,能够迅速对区域性的相关分子信号作出反应从而分化为 DA 能神经元,显然有利于诱导分化。

在对 PD 的 NSC 移植治疗中,移植细胞的数量及多巴胺能神经元的分化比率是必须解决的问题。因此,简便而又有效的 NSC 的体外增殖与多巴胺能神经元的大量定向诱导分化是解决问题的关键所在。诱导方式及诱导剂的选择相当重要,在对多巴胺能神经元的体外诱导研究中,细胞因子的作用一直备受关注。本实验采用 GDNF 体外诱导小鼠中脑 NSC,观测中脑 NSC 分化为 TH-ir 阳性神经元的情况,结果证明 GDNF 能明显提高中脑 NSC 分化为

TH 阳性神经元的比例,GDNF 实验组较对照组有显著性差异;而且形态成熟,说明 GDNF 对 TH-ir 阳性神经元的发育及营养作用显著。其具体作用机制可能是通过跨膜信息传递作用即受体介导才能实现的,GDNF 与锚定在细胞表面的蛋白分子特异性结合,促使原癌基因 c-ret 编码的产物蛋白 Ret 磷酸化,磷酸化的 Ret 激活其下游的丝裂原活化蛋白激酶等,导致一系列胞内途径的激活,从而发挥其神经营养因子的生理功能。但对于 GDNF 能否促进 NSC 向多巴胺能神经元分化各家结果报道不一,Roussa^[10]等的结果显示神经球分化为 TH-ir 阳性神经元的数量不受 GDNF 处理的影响,而在 Sun^[11]等的研究中,GDNF 处理后的 TH-ir 阳性神经元数量较对照组提高 8 倍。本实验则较对照组提高 4 倍。造成结果差异的原因,可能与材料的来源,对 NSC 增殖阶段的处理,诱导时间的长短以及所用剂量不同等有关。

本实验用 GDNF 体外成功地对中脑 NSC 进行了定向诱导,为体外获得足够量的形态及功能成熟的多巴胺能神经元用于移植治疗 PD 提供了依据。

参考文献

- [1] 鞠海英. 胶质细胞源性神经营养因子的生物学研究[J]. 中国实验诊断学, 2006, 10(2): 205—207.
- [2] Riaz SS, Theofilopoulos S, Jauniaux E, et al. The differentiation potential of human fetal neuronal progenitor cells in vitro [J]. Developmental Brain Research, 2004, 153 (1): 39—51.
- [3] Kim TE, Lee HS, Lee YB, et al. Sonic hedgehog and FGF8 collaborate to induce dopaminergic phenotypes in the Nurr1-overexpressing neural stem cell [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003, 305(4): 1040—1048.
- [4] Studer L, Csete M, Lee SH, et al. Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen[J]. Neuroscience, 2000, 20 (19): 7737—7783.
- [5] 余小强, 阮怀珍, 蔡文琴, 等. PD 大鼠纹状体提取液诱导中脑 NSCs 分化为 DA 能神经元的研究 [J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(1): 18—21.
- [6] Moses D, Teper Y, Gantois I, et al. Murine embryonic EGF-responsive ventral mesencephalic neurospheres display distinct regional specification and promote survival of dopaminergic neurons[J]. Exp Neurol, 2006, 18: 4—8.
- [7] Wang X, Lu Y, Zhang H, et al. Distinct efficacy of pre-differentiated versus intact fetal mesencephalon-derived human neural progenitor cells in alleviating rat model of Parkinson's disease[J]. Neuroscience, 2004, 22, 175—183.
- [8] Horiguchi S, Takahashi J, Kishi Y, et al. Neural precursor cells derived from human embryonic brain retain regional specificity[J]. J Neurosci Res, 2004, 75: 817—824.
- [9] 张力, 江澄川, 冯林音, 等. 骨髓基质细胞对人胚胎 NSCs 分化极性的诱导[J]. 中国临床神经科学, 2002, 10: 1—5.
- [10] Roussa E, Kriegstein K. GDNF promotes neuronal differentiation and dopaminergic development of mouse mesencephalic neurospheres[J]. Neurosci Lett, 2004, 361: 52—55.
- [11] Sun ZH, Lai YL, Li P, et al. GDNF augments survival and differentiation of TH-positive neurons in neural progenitor cells[J]. Cell Biology International, 2004, 28: 323—325.