

·基础研究·

神经细胞黏附分子NB-3在调节胚胎来源神经干细胞分化和迁移中的作用*

赵彤¹ 黄欣¹ 赵华¹ 吴奎武² 朱玲玲^{1,3} 范明¹

摘要

目的:探讨NB3基因在调节小鼠神经干细胞分化和迁移中的作用。

方法:分离培养来源于E14.5d NB3缺失和野生型小鼠海马的神经前体细胞,通过免疫荧光染色方法检测NB3缺失对神经干细胞(NSCs)诱导分化后神经元分化和迁移的影响。

结果:①NB3在体外培养的神经干细胞中表达,并和干细胞的标记分子Nestin共定位;②NB3基因缺失后对神经干细胞的体外增殖能力无明显影响,但在用1%胎牛血清诱导分化后,NB3缺失的神经干细胞产生更多的神经元;③与对照组相比,从NB3基因缺失的神经干细胞分化而来的神经元表现为相互聚集而不向神经球外迁移。

结论:NB3在神经元的再生和迁移中具有一定的调节作用。

关键词 神经黏附分子;神经干细胞;迁移;分化

中图分类号:Q249,R49 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2012)-07-0590-04

Effects of neural cell adhesion molecule NB-3 on regulating differentiation and migration of embryonic neural stem cells/ZHAO Tong, HUANG Xin, ZHAO Hua, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2012, 27(7): 590—593

Abstract

Objective: To investigate the effects of NB3 on regulating differentiation and migration of embryonic neural stem cells(NSCs).

Method: The NSCs were isolated and cultivated respectively from E14.5d NB-3-deficient mice and wide type cells. The effects of NB3 on regulating differentiation and migration of NSCs were detected by immunofluorescence.

Result: NB-3 was highly expressed in NSCs derived from E14.5d hippocampus. There was no significant difference of proliferation of NSCs between NB-3 deficient mice and wild type mice; However, the NB-3 deficient NSCs differentiated into more neurons than those from wild type cells, and the neurons differentiated from NB-3 deficient NSCs clustered and less migrated to outside of neurospheres compared with those from wild type cells.

Conclusion: NB-3 might be a novel factor which regulated the differentiation of NSCs and the migration of neurons.

Author's address Department of Cognitive Science, Institute of Basic Medical Sciences, Beijing, 100850

Key word neural adhesion molecule; neural stem cell; neuron; migration

神经系统的发育是一个比较复杂的过程,主要经历细胞的增殖、分化、迁移、突起生长、形成突触等几个不同的阶段。而这些过程又是由不同的内外因素共同调节的,如生长因子、细胞因子、胞外基

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2012.07.002

*基金项目:国家自然科学基金面上项目(30670792;30870799);北京市自然科学基金面上项目(5092023)

1 军事医学科学院基础医学研究所认知科学教研室,北京,100850; 2 军事医学科学院基础医学研究所; 3 通讯作者

作者简介:赵彤,女,硕士,助理研究员; 收稿日期:2011-02-28

质等^[1]。神经细胞黏附分子(neural cell adhesion molecule, NCAM)是在神经系统中介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质间相互识别、黏附和信号转导的重要信号分子^[2]。对于脑组织形态、神经元延伸、建立突触连接及神经细胞间相互作用等方面都有重要意义。神经细胞黏附分子NB-3是1996年发现的黏附分子^[3],属于免疫球蛋白超家族的Contactin亚家族,集中表达于神经系统,对神经元的形成,突起的生长具有重要的调控作用^[4-5]。目前对于NB-3的研究报道较少,本研究拟利用NB3基因敲除小鼠,分离培养来源于胚胎14.5天小鼠海马的神经前体细胞,通过免疫荧光染色的方法检测NB3缺失对神经干细胞(neural stem/progenitor cells, NSCs)的增殖分化和迁移的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

NB3转基因小鼠由本院动物中心饲养和繁殖。小鼠妊娠时间的计算:6—8周龄NB3杂合子雄性和雌性小鼠于傍晚合笼,次日清晨检查阴栓后,分开饲养,记为0.5d(E0.5)。

1.2 主要试剂

细胞培养:DMEM/F12(1:1)培养基、胎牛血清、青链霉素、L-谷氨酰胺、0.25%胰蛋白酶为美国HyClone公司产品;N2添加剂、B27添加剂、EGF、bFGF均为美国Invitrogen公司产品;L-多聚赖氨酸(poly-L-lysine)为美国SIGMA公司产品。

1.3 神经干细胞的分离培养

E14.5d C57BL/6孕鼠,腹腔注射3%戊巴比妥钠(1ml/100g)进行麻醉,75%乙醇消毒腹部。在无菌操作的条件下快速打开孕鼠腹腔,取出胎鼠放入预冷的解剖液(NaCl 8.0g, Na₂HPO₄·7H₂O 0.06g, KCl 0.4g, KH₂PO₄ 0.06g, NaHCO₃ 0.35g, 双蒸水定容至1L, PH 7.4)中浸洗2次。解剖显微镜下剥除脑膜,取出海马组织,放入含有1ml解剖液的小玻璃平皿中,手术剪剪碎。加入0.25%胰蛋白酶1ml,放置于5%CO₂培养箱中37℃消化20min,其间轻轻摇动2次;用含10%牛血清DMEM/F12中止酶消化,离心(600转/min×5min)。吸管轻柔吹打成单细胞悬液,收集滤液离心(1000转/min×5min)。用台盼蓝染色

后进行细胞计数,以 2×10^5 cells/ml密度重悬于培养液DMEM/F12(含1%Glu, 1%PS, 1%B27, 1%N₂, 20ng bFGF和20ng EGF)中^[6],接种于25cm²培养瓶中培养。培养5—7d后,用0.125%胰酶消化,轻轻吹散细胞至单细胞悬液进行传代,第2—5代的细胞用于以下实验研究。

1.4 神经干细胞的诱导分化

将传至P2代生长4—6d的神经干细胞球(约含200—300个细胞),用胰酶消化吹散为单细胞(1×10^5 cells/ml的密度)悬液,接种于0.1%多聚赖氨酸处理过35mm培养皿。诱导分化液为含1%胎牛血清的DMEM/F₁₂,其中添加1% B₂₇+1% N₂培养5—7d后,用4% PFA(多聚甲醛)室温固定30min。进行神经元标记分子Tuj1免疫荧光染色检测。

1.5 免疫荧光染色检测

将固定后的神经干细胞或分化后的细胞,用0.01mol/L PBS洗3次;用3%马/羊血清(0.3% TritonX-100稀释)室温30min;滴加适当比例稀释的一抗(NB-3抗体1:200;R&D Systems或Nestin抗体1:1000;Tuj1抗体1:2000;Chemicon),4℃孵育过夜;0.01mol/L PBS 10min×3次;滴加适当1:1000的荧光二抗(Alexa flour 488或594-结合抗体, Molecular Probes),室温孵育30min;用0.1mol/L PBS洗3次后;含核染料的DAPI液封片,荧光显微镜下观察拍照。

1.6 神经元迁移的检测

聚集的神经元数目的分析:来源于NB3缺失和野生型神经干细胞诱导分化的神经元中,Tuj1阳性的细胞聚集成簇(大于3个细胞为1簇)进行统计,镜下记数Tuj1阳性细胞聚集成簇的数目,每组4孔,每孔随机8—10个视野的平均数,不同批次细胞进行重复3次。

神经干细胞球分化后,神经元距神经球中心的距离测定:来源于NB3缺失和野生型的单个神经球诱导分化后,镜下测量Tuj1阳性细胞距离神经球中心的距离,每组统计5—6个神经球。不同批次的干细胞球进行重复3次。

1.7 统计学分析

数据的记录、处理、运算、作图和统计学分析应用Microsoft Excel 2000(Microsoft Corp.)软件进行,

其结果用平均值 $\pm$ 标准误表示。图像资料采用 Image-pro Plus 6.0, Adobe Photoshop 7.0 (Adobe, Inc.) 等软件进行编辑和处理。

2 结果

2.1 NB3在体外培养的神经干细胞中表达

我们将体外分离培养的来源于小鼠海马的神经干细胞进行免疫荧光染色实验结果表明:NB3在细胞中有较高的表达,主要表达于胞浆中,和神经干细胞标记分子 nestin 免疫阳性的细胞共定位(见图1)。提示NB3可能与神经干细胞的增殖、迁移和分化调控有关。

2.2 NB3缺失对神经干细胞体外分化为神经元的影响

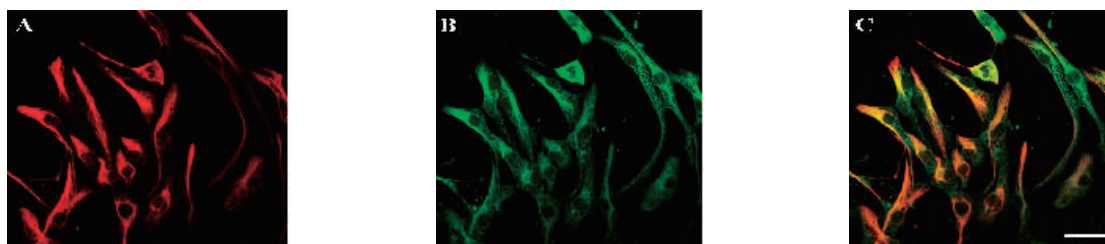
我们首先观察了体外分离培养的NB3基因缺失和野生型神经干细胞的增殖情况,NB3基因缺失后对神经干细胞的体外增殖能力无明显影响(图

2D)。但在用1%胎牛血清诱导分化6d后,神经元的免疫荧光染色结果显示:NB3缺失的神经干细胞产生更多的神经元(见图2A、图2B)。更有趣的是,NB3缺失后分化产生的神经元容易聚集成簇,而不向外迁移。与对照组相比,从NB3基因缺失的神经干细胞分化而来的神经元表现为相互聚集而不向神经球外迁移。通过对聚集的神经簇的计数结果显示:NB3基因缺失后,聚集的神经簇数目是野生型的3倍(14.50 ± 2.89 vs. 3.75 ± 2.68 , $P < 0.05$),图2C。

2.3 NB3缺失对神经干细胞体外分化为神经元迁移的影响

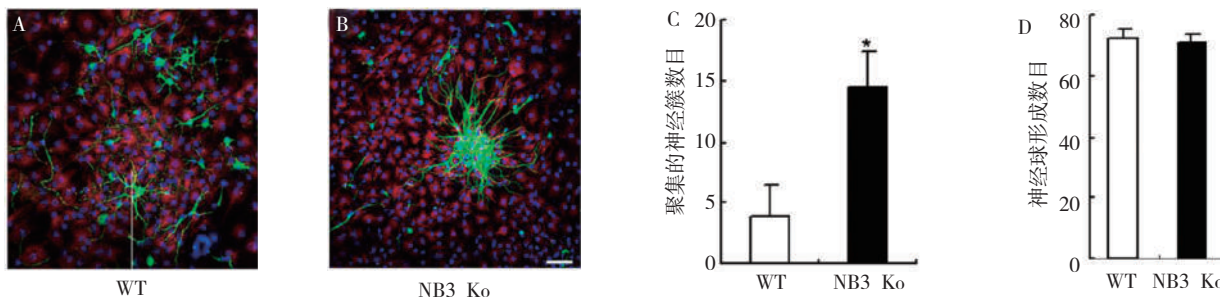
我们又进一步用单克隆的神经球贴壁后诱导分化7天,观察分化的神经元距离神经球中心的距离,经过测量结果显示:NB3基因缺失后,分化的神经元距离神经球中心的距离明显小于野生型组(155 ± 21 vs. 320 ± 20 , $P < 0.05$)(图3)。结果表明NB3在神经元的再生和迁移中具有重要的调节作用。

图1 NB3在体外分离培养的神经干细胞中表达



A:NB3在神经干细胞中的表达(红色); B:神经干细胞标志蛋白 nestin 阳性细胞(绿色); C:A、B合并图,标尺=50 μ m

图2 NB3缺失对神经干细胞体外分化为神经元的影响



A 野生型小鼠神经干细胞分化的神经元(绿色)

B NB3敲除小鼠的神经干细胞分化的神经元(绿色)

C 野生型与NB3敲除小鼠的神经干细胞分化的神经元比较
* $P < 0.05$,标尺=50 μ m

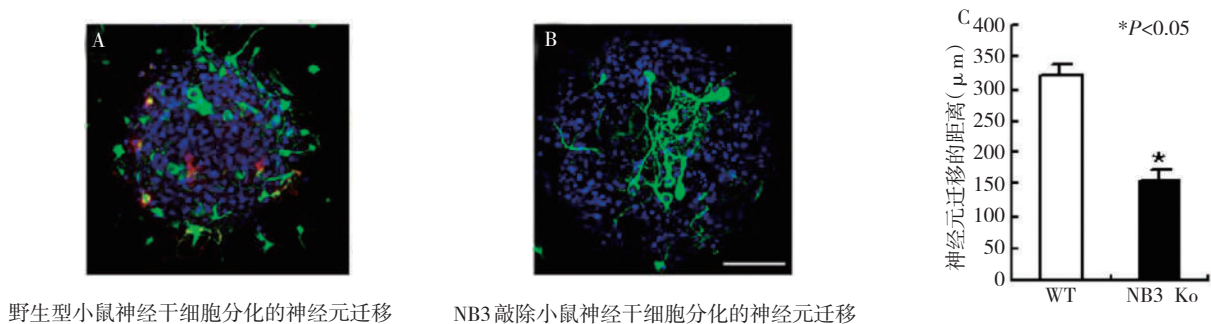
D 野生型与NB3敲除小鼠神经干细胞的神经球形成的数目比较

3 讨论

神经细胞黏附分子包括:整合素、钙黏素、免疫球蛋白超家族、选择素等多个黏附分子超家族^[1]。

它们位于细胞表面,能黏附同种或异种细胞表面分子,可以在一个细胞上或细胞外基质作为配体,而在另一个细胞上作为受体;既可作为配体也可作为受

图3 NB3缺失对神经干细胞体外分化为神经元的迁移影响



体。其主要作用是通过异亲和附着或同亲和附着结合活性参与神经元和胶质细胞之间的信息交流^[2]。近年来的神经干细胞研究中,人们越来越关注这些存在于细胞周围的黏附分子对神经干细胞行为的影响。研究已经证明了Integrin、TN-C和CHL1等在神经干细胞的发育中起着重要的作用^[7-8]。

NB3是1996年分离克隆的神经细胞黏附分子,属于免疫球蛋白超家族中Contactin/F3家族中的新成员,含有1028个氨基酸,和Contactin/F3家族成员如Tag-1、Big-1和Big-2约有50%的同源性^[3];NB-3 mRNA广泛表达在鼠脑中枢神经系统中,特别是大脑皮质的II/III和V层以及中脑和小脑;NB-3在小脑中表达增加至成年,相反在大脑中的表达在出生后7天下降至较低的水平^[9]。为了进一步明确NB3在中枢神经系统中的功能作用,日本一个实验室在2003年用Lac Z基因取代NB3基因的一部分,产生NB3功能缺失小鼠,而且Lac Z基因的表达和NB3 mRNA表达谱基本重合。这种小鼠可以存活和繁殖,但表现为易衰老和学习迟缓,以及一些运动功能障碍^[10]。我们前期的研究结果显示:小鼠脑内NB3还特异性表达在成年后神经干细胞存在的主要部位,如海马齿状回等部位^[11]。本研究对体外分离培养的神经干细胞的检测显示也有明显的NB3表达,并和神经干细胞的标记分子Nestin共定位,提示NB3在神经干细胞的发育中具有一定作用。

有研究显示来自NB3基因敲除和野生型小鼠海马的神经干细胞,体外培养时其增殖能力无明显差异,但NB3基因敲除的神经干细胞在含1%胎牛血清的培养液中能分化为更多的神经元。特别是,由NB3基因敲除的神经干细胞分化产生的神经元细

胞,在体外培养中表现为相互聚集而不向神经球外迁移。但在2004年,Cui等在研究中发现NB-3可以作为Notch的功能性配体参与少突胶质细胞的产生^[5]。体外给予NB3可引起Notch胞内部分核转移并通过Deltex1通路促进神经前体细胞向少突胶质细胞的分化。最近也有报道提示NB3可以通过PTP alpha调节皮质神经元突起的方向^[12]。但是NB3是否通过以上的分子来调节神经干细胞的分化和神经元的聚集尚有待于进一步研究。综上所述,NB3在神经干细胞的分化和迁移中可能具有一定作用。这不仅对于认识神经干细胞的调节有重要的理论意义,而且对于临床治疗中枢神经系统损伤和退行性疾病具有潜在的应用价值。

参考文献

- [1] Shapiro L, Love J, Colman DR. Adhesion molecules in the nervous system: structural insights into function and diversity [J]. Annu Rev Neurosci, 2007, 30:451—474.
- [2] Zhang Y, Yeh J, Richardson PM, et al. Cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily in axonal regeneration and neural repair[J]. Restor Neurol Neurosci, 2008, 26 (2—3):81—96.
- [3] Ogawa J, Kaneko H, Masuda T, et al. Novel neural adhesion molecules in the Contactin/F3 subgroup of the immunoglobulin superfamily: isolation and characterization of cDNAs from rat brain[J]. Neurosci Lett, 1996, 218(3):173—176.
- [4] Takeda Y, Akasaka K, Lee S, et al. Impaired motor coordination in mice lacking neural recognition molecule NB-3 of the contactin/F3 subgroup[J]. J Neurobiol, 2003, 56(3):252—265.
- [5] Cui XY, Hu QD, Tekaya M, et al. NB-3/Notch1 pathway via Deltex1 promotes neural progenitor cell differentiation into oligodendrocytes[J]. J Biol Chem, 2004, 279(24):25858—25865.
- [6] Zhu LL, Zhao T, Huang X, et al. Gene expression profiles and metabolic changes in embryonic neural progenitor cells under low oxygen[J]. Cellular Reprogramming, 2011, 13(2): 113—120.

(下转第604页)