

RCMV感染星形胶质细胞对神经干细胞分化的影响

孙秀宁¹ 史立宏² 梁瑞文¹ 刘志军^{3*} 李瑞芳¹ 管英俊⁴ 于 丽⁴ 管志玉¹

(¹潍坊医学院人体寄生虫学教研室, 潍坊 261053; ²潍坊医学院药理学教研室, 潍坊 261053;

³潍坊医学院微生物学教研室, 潍坊 261053; ⁴潍坊医学院组织胚胎学教研室, 潍坊 261053)

摘要 探讨大鼠巨细胞病毒(rat cytomegalovirus, RCMV)感染大鼠星形胶质细胞后, 对神经干细胞分化的影响。原代分离培养新生大鼠星形胶质细胞和胚胎海马神经干细胞, 将星形胶质细胞感染RCMV后和神经干细胞在Transwell 24孔共培养体系下进行共培养, 同时设对照组; 用免疫荧光染色等方法检测神经干细胞与感染RCMV的星形胶质细胞共培养后, 其分化细胞中神经微管相关蛋白(microtubule-associated protein 2, MAP2)和星形胶质细胞胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)的表达。结果发现, 感染RCMV的星形胶质细胞与神经干细胞共培养时, 神经干细胞分化减慢, 分化成的神经元和星形胶质细胞比率低于对照组, 提示星形胶质细胞感染RCMV后可抑制神经干细胞的分化, 可能与RCMV影响星形胶质细胞合成和分泌各种营养因子, 干扰了神经干细胞的分化进程有关。

关键词 RCMV; 星形胶质细胞; 神经干细胞; 分化

人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)感染在世界范围内普遍存在, 胎儿先天性感染易导致以神经性损伤为主的严重并发症, 在新生儿中感染率约为1%, 其中约有5%~10%在出生时可表现为严重的神经性损伤如小头畸形、脑水肿等^[1], 但受种属特异性的限制, HCMV先天性感染致畸的机制尚未进行深入研究。

大鼠巨细胞病毒(rat cytomegalovirus, RCMV)与HCMV基因组具有较高同源性, 基因的转录和表达都有一定时序性, 两者都具有相似的致病基因即刻早期基因, 两者都通过胎盘垂直传播给胎儿, 感染症状也非常相似^[2-3], 由于大鼠神经系统的发育和分化过程与人类高度相似, 胚胎取材方便、时间均一, 且不涉及人类伦理学问题, 所以本研究拟通过探讨大鼠胚胎星形胶质细胞(astrocyte, AS)感染RCMV后对神经干细胞(neural stem cells, NSCs)分化的影响, 进一步深入阐明RCMV对神经损伤的分子机制具有重要意义, 并为后续研究中建立RCMV感染的在体大鼠胚胎发育模型提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 RCMV病毒 取出冻存的RCMV Maas-tricht株(由荷兰Maastricht大学医学中心医学微生物

学系Dr. C. A. Bruggeman分离并惠赠, 本室保存), 在流动的自来水中迅速融化; 取处于对数生长期的大鼠胚肺成纤维细胞, 加入200~300 μ L病毒悬液, 于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的恒温箱中培养, 待细胞病变至80%以上时反复冻融细胞3次, 离心收取上清, 测定病毒感染滴度, 分装并保存于-80 $^{\circ}$ C冰箱备用。

1.1.2 实验动物 成年未经产雌性、雄性SD大鼠10只, 体重(230 \pm 10) g, 购自本校动物中心, 常温环境饲养。

1.1.3 主要试剂 B27、bFGF、EGF等神经干细胞培养因子购自美国GIBCO公司, 兔抗鼠Nestin、兔抗鼠MAP2、兔抗鼠GFAP均购自美国Chemicon公司, FITC-羊抗兔IgG购自美国Invitrogen公司。反转录PCR(RT-PCR)检测所用引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。大鼠巨细胞病毒即刻早期基因1和2(*IE1*、*IE2*)的引物设计取自: GenBank: U62396.1。*IE1*上游引物为: 5'-aca ttc taa aaa agc agc cg-3', 下游引物为: 5'-gtt ccc ata ctc tga tca gt-3', 扩增产物长度为485 bp; *IE2*上游引物与*IE1*上游引物相同, 下游引物为:

收稿日期: 2012-03-27 接受日期: 2012-05-10

国家自然科学基金(No.30900775)、山东省教育厅高等学校科技计划项目(No.J12LK04)和山东省卫生高层次人才1020工程(No.2008-1)资助项目

*通讯作者。Tel: 0536-8462027, E-mail: zhijun.liu1@gmail.com

5'-tgt gtc cat tcg gag cca cg-3', 扩增产物长度为620 bp; 内参照为GAPDH, 上游引物为: 5'-ctc atg acc aca gtc cat gc-3', 下游引物为: 5'-ttc agc tct ggg atg acc tt-3', 扩增产物长度为141 bp。

1.2 实验方法

1.2.1 星形胶质细胞的培养及鉴定 取新生1 d的SD乳鼠脑皮质, 剪碎、消化、离心, 经3次差速离心贴壁后, 接种于含10% FBS的高糖DMEM培养基中, 37 °C、5% CO₂孵箱中培养7~9 d。待培养的细胞70%~80%融合时, 将培养瓶置于恒温旋转摇床上摇18 h后, 进行培养即得纯化的星形胶质细胞。

采用免疫荧光染色法, 用星形胶质细胞特异性表达蛋白——胶质纤维酸性蛋白(glia fibrillary acidic protein, GFAP)标记星形胶质细胞, 对纯化获得的星形胶质细胞进行鉴定。Hoechst33258对胞核染色, 显微镜下观察, 随机选择10个不同的视野, 计算GFAP阳性细胞的百分率并求平均值。星形胶质细胞百分率为: [GFAP(+)细胞数/Hoechst33258(+)细胞数]×100%。

1.2.2 原代神经干细胞的培养及鉴定 用眼科剪轻轻剪碎13 d的鼠胚大脑皮层海马组织, 消化, 缓慢吹打, 去除未消化的组织, 加入含有bFGF、EGF和B27的生长培养基, 制成单细胞悬液, 以5×10⁵/mL密度接种入25 cm²培养瓶中, 置入37 °C、5% CO₂的培养箱中培养、传代。

NSCs的鉴定, 包括其标记蛋白nestin的检测和分化功能的检测: 把培养的细胞球取出后接种于涂有多聚赖氨酸的盖玻片上, 待细胞球贴壁后固定, 应用免疫荧光染色技术检测nestin的表达。撤掉培养基中的bFGF、EGF和B27, 以10%胎牛血清诱导神经干细胞分化, 分化6 d后的细胞, 冷丙酮固定10 min, 用免疫荧光染色检测神经元标记蛋白微管相关蛋白2(microtubule-associated protein 2, MAP2)和星形胶质细胞标记蛋白GFAP的表达, 并用Hoechst33258对胞核染色。

1.2.3 星形胶质细胞中RCMV感染的建立 取处于对数生长期的第3~4代星形胶质细胞, 加入RCMV(病毒感染复数MOI为5)的病毒悬液100 μL, 观察细胞病变, 并于病毒感染后2 d和5 d, 用RT-PCR检测病毒IE1和IE2基因的表达, 确定病毒感染的建立。PCR的反应参数为: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 共30个循环; 最

后72 °C延伸10 min。分别取3 μL的IE1和GAPDH扩增产物混合上样, 取3 μL的IE2和GAPDH扩增产物上样, 经1.5%琼脂糖凝胶电泳, 全自动凝胶成像分析系统对凝胶成像并记录结果。

1.2.4 建立共培养体系, 研究RCMV对神经干细胞分化的影响 使用Corning公司滤膜孔径为0.1 μm的Transwell 24孔共培养体系, 将原代培养的神经干细胞接种于下室, 添加含2% FBS的高糖DMEM培养基; 将感染RCMV的星形胶质细胞接种于上室并同时设对照组。由于滤膜孔径小于病毒颗粒孔径(<0.1 μm), 病毒颗粒不会进入下室, 但培养液体可自由通过, 由此可以建立感染RCMV的星形胶质细胞与神经干细胞的共培养系统。

采用免疫荧光染色法, 检测分化细胞中神经元标记蛋白MAP2和星形胶质细胞标记蛋白GFAP的表达, Hoechst33258对胞核染色, 显微镜下观察, 随机选择10个不同的视野, 计算MAP2和GFAP阳性细胞的百分率并求平均值。神经元百分率: [MAP2(+)细胞数/Hoechst33258(+)细胞数]×100%。星形胶质细胞百分率: [GFAP(+)细胞数/Hoechst33258(+)细胞数]×100%。

运用SPSS12.0统计软件包, 各组MAP2和GFAP阳性细胞的百分率对比采用卡方 χ^2 检验进行统计分析, $P<0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

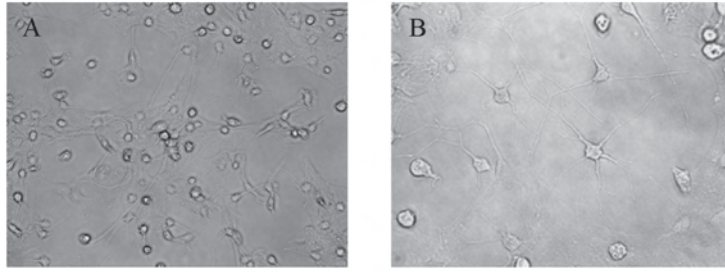
2.1 星形胶质细胞的培养及结果鉴定

培养纯化的星形胶质细胞有两种, 一部分外观扁平, 细胞体较大, 折光性好, 突起宽而扁, 似荷包蛋样, 分支较少, 属于原浆型星形胶质细胞; 另一部分细胞体较小, 呈椭圆形或多角形, 突起较多、细长并有分支, 属于纤维性星形胶质细胞(图1)。

免疫荧光染色结果显示, 大多数细胞胞浆显示绿色荧光, 即GFAP阳性。Hoechst33258染色后, 胞核均呈蓝色荧光。显微镜下随机选择10个不同的视野, 计算GFAP阳性细胞的百分率为96%。这证实我们培养的细胞是纯度很高的星形胶质细胞(图2)。

2.2 神经干细胞的原代培养及结果鉴定

大鼠13 d胚胎皮层海马分离的细胞培养7 d时, 生长为数十个细胞到数百个细胞的克隆, 呈球形悬浮生长, 形态规则, 折光性强, 将其传代后出现与原



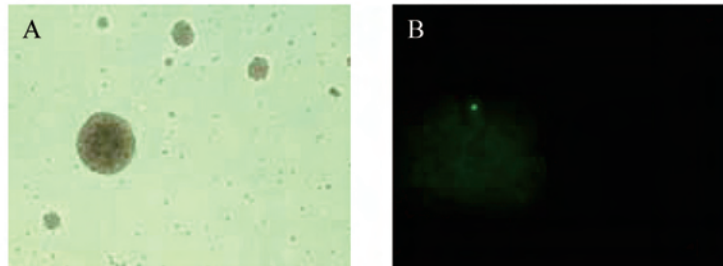
A: 100×; B: 200×.

图1 原代培养的星形胶质细胞
Fig.1 Primarily cultured astrocytes



原代培养的大鼠星形胶质细胞, 表达GFAP。
Rat astrocytes cultured primarily, expressing GFAP.

图2 星形胶质细胞免疫荧光染色(100×)
Fig.2 Immunofluorescent staining of astrocytes(100×)



A: 原代培养的神经球; B: 免疫荧光染色表现为nestin阳性。
A: primarily cultured nospheres; B: positive immunofluorescence nestin staining.

图3 原代培养的神经干细胞球及免疫荧光染色(200×)
Fig.3 Primarily cultured nospheres and the immunofluorescent staining(200×)

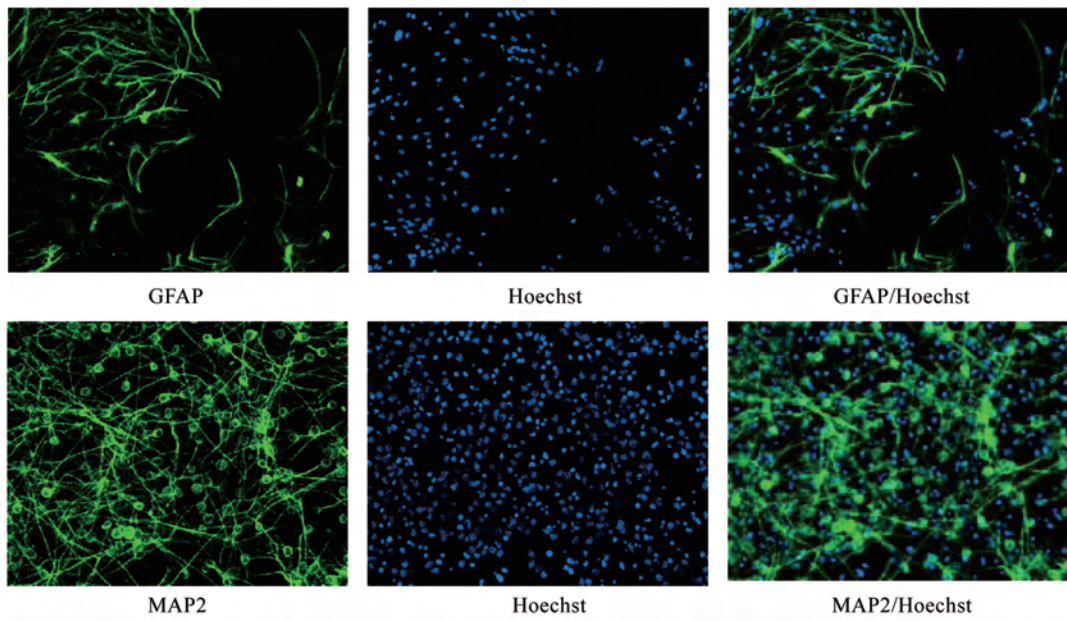
代培养相同的大量次代克隆(图3A)。

细胞球免疫荧光染色结果显示, 细胞胞浆着绿色荧光, 即nestin表达阳性(图3B), 证明我们培养的细胞球符合神经干细胞球的特点。分化6 d后, 部分细胞呈MAP2阳性, 为神经元, 其胞浆呈绿色, 胞体较小、突起长, 数量较少(图4); 部分细胞为GFAP阳性细胞, 属于星形胶质细胞, 数量多, 胞浆呈绿色, 胞

体较大、突起粗而大(图4)。此结果表明我们培养的细胞球具有分化成神经元和星形胶质细胞的能力, 进一步证实其为神经干细胞。

2.3 RCMV感染星形胶质细胞的确定

RCMV感染星形胶质细胞5 d后, 出现典型的病毒感染形态学改变: 胞体逐渐变圆、增大, 突起变短减少甚至消失(图5)。在感染的第2 d和第5 d, RT-



原代培养的神经干细胞诱导分化6 d后, 分化形成的神经元为MAP2阳性, 星形胶质细胞为GFAP阳性。

Six days post induction of differentiation in primary cultured NSCs, the MAP2-positive cells were neurons and GFAP-positive cells were defined as astrocytes.

图4 神经元和星形胶质细胞免疫荧光染色(100×)

Fig.4 Immunofluorescent staining of neurons and astrocytes(100×)

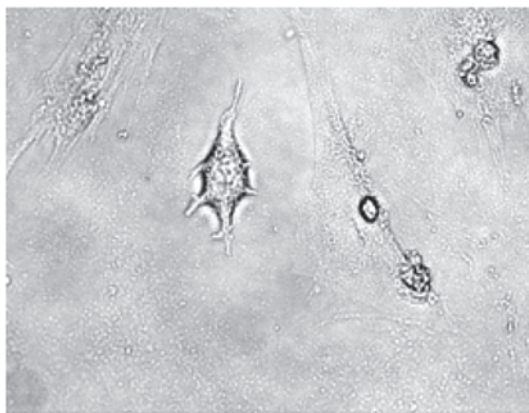


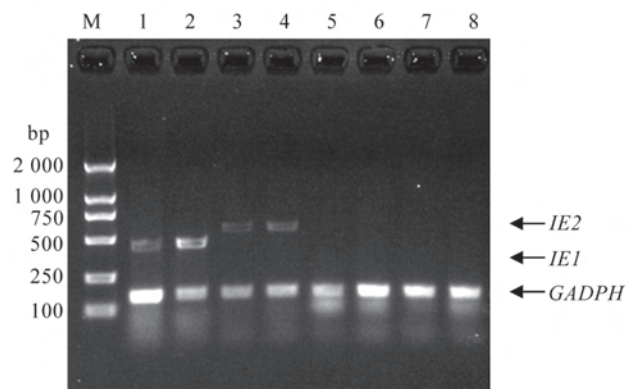
图5 感染RCMV 5 d后的星形胶质细胞(200×)

Fig.5 Astrocytes infected by RCMV at day 5(200×)

PCR均检测到星形胶质细胞中病毒IE1基因和IE2基因的表达, 确定病毒感染星形胶质细胞(图6)。

2.4 RCMV感染星形胶质细胞后对神经干细胞分化的影响

在Transwell 24孔共培养体系中, 对照组接种的细胞2 h可见贴壁, 6 h后便见有细胞从细胞球中爬出,



M: DL 2 000 marker; 1,2: RCMV感染胶质细胞第2, 5 d, 细胞中检测到病毒基因IE1的表达; 3,4: RCMV感染胶质细胞第2, 5 d, 细胞中同时检测到病毒基因IE2表达; 5-8: 对照组在相同时间点未检测到IE1和IE2表达。

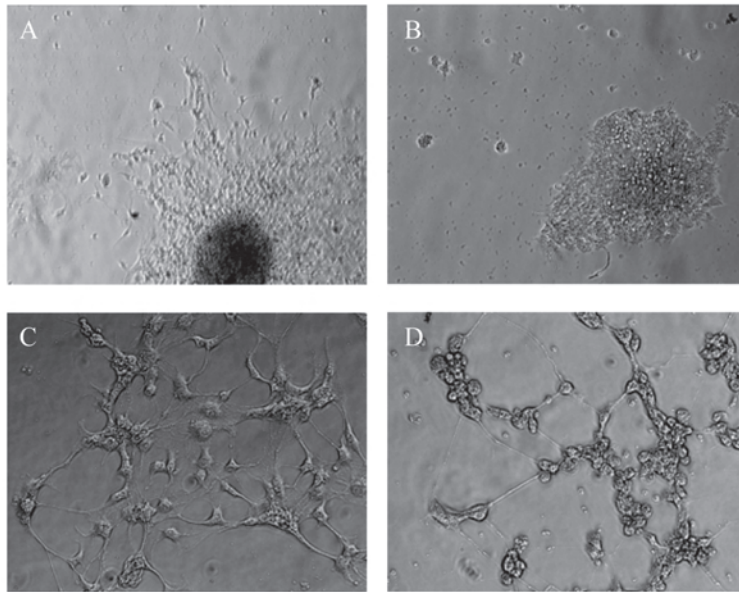
M: DL 2 000 marker; lane 1 and 2: day 2, day 5 post RCMV infection, IE1 was detected from infected astrocytes; lane 3 and 4: day 2, day 5 post RCMV infection, IE2 was detected from the same infected astrocytes; lane 5-8: at the same time points, no IE1 or IE2 was detected in the control groups.

图6 应用RT-PCR技术确定RCMV感染星形胶质细胞

Fig.6 Confirmation of the infection by RCMV to astrocytes by RT-PCR

24 h即发现神经球周围有大量的细胞向外迁移,其突起向外呈放射状延伸(图7A)。6 d时神经干细胞球基本分化完全,这些细胞大小形态不一,有的胞体较小、突起细长并出现分支、折光性好,为神经元样细胞;有的胞体较大,细胞突起粗大、分支很多,为星形胶质细胞(图7C)。而感染组中的细胞球比对照

组中的细胞球贴壁生长慢,24 h后才见细胞团块的边缘向外长出突起(图7B)。至分化6 d时,未分化细胞仍然较多(图7D)。免疫荧光染色结果显示,对照组神经元和星形胶质细胞分化率分别为19.13%和64.47%,感染组分别为11.04%和56.66%,感染组神经元分化率和对照组相比,差异显著($P<0.05$,图8)。

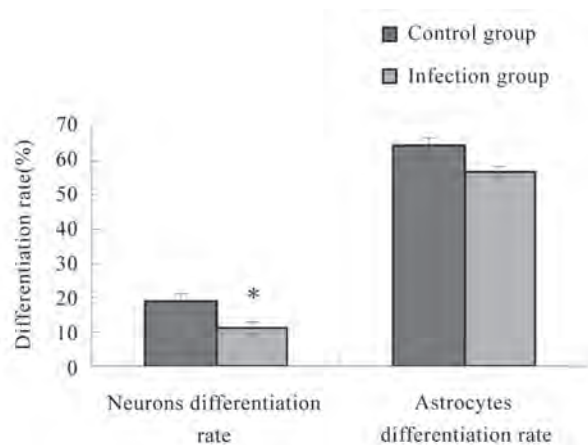


A,B: 共培养24 h后,对照组(A)比感染组(B)神经干细胞分化快,100 \times ; C,D: 共培养6 d后,对照组神经干细胞基本分化完全(C),感染组仍有一部分细胞未分化(D),200 \times 。

A,B: co-cultured after 24 h, NSCs in the control group (A) differentiated faster than NSCs in infection group (B), 100 \times ; C,D: 6 days post co-culture, NSCs in control group mostly differentiated (C) while part of the NSCs in infection group did not complete differentiation (D), 200 \times 。

图7 Transwell 24孔共培养体系中神经干细胞的分化状态

Fig.7 NSCs differentiation in 24-well Transwell co-culture system



* $P<0.05$.

图8 Transwell 24孔共培养体系中神经干细胞的分化率

Fig.8 NSCs differentiation rate in 24-well Transwell co-culture system

3 讨论

近期研究表明,星形胶质细胞对中枢神经系统的发育和功能成熟起重要作用^[4]。星形胶质细胞可以产生和分泌多种生物活性物质,促进神经干细胞向神经元分化^[5-6]。在体内星形胶质细胞能够合成分泌神经生长因子(NGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、胰岛素样生长因子、IL-1、IL-6、IL-3、 γ 干扰素、层黏连蛋白(laminin, LN)、纤连蛋白(fibronectin, FN)、前列腺素等,它们对维持神经组织中各类细胞的生存、发育、再生及分化均有重要作用,并对神经干细胞的分化具有一定的调控作用^[7-8]。

国内外许多学者的研究已经明确,星形胶质细胞是巨细胞病毒的完全容许细胞(能够使巨细胞病

毒形成产毒性感染的细胞), 最易被病毒感染, 其星形胶质细胞感染可以抑制神经干细胞向神经元和星形胶质细胞分化并诱导感染细胞凋亡^[9-12]。但是其抑制分化的机制是什么呢? 是病毒感染星形胶质细胞后, 影响了星形胶质细胞生物活性物质的合成和分泌, 从而间接导致神经干细胞的分化异常, 最终导致神经系统的损伤呢(①)? 还是星形胶质细胞内产生了子代病毒, 病毒感染神经干细胞, 直接影响其分化(②)? 这些问题目前还未见明确报道。

本课题组首先对问题①进行了初步研究: 将感染RCMV后的星形胶质细胞和神经干细胞在Transwell 24孔共培养体系下进行共培养, 观察神经干细胞的分化状况。感染RCMV后的星形胶质细胞和正常神经干细胞分别位于Transwell共培养体系上下室内, 由于上下室之间的滤膜孔径小于病毒颗粒孔径, 病毒颗粒不会进入下室直接感染神经干细胞, 但培养液体及星形胶质细胞分泌的生物活性物质可自由通过。2% FBS的高糖DMEM培养基既是星形胶质细胞培养基, 又是神经干细胞的分化培养基, 因此, 以上体系可以很好地研究感染RCMV后的星形胶质细胞对神经干细胞分化的影响。

本实验结果发现, 与感染RCMV的星形胶质细胞共培养的神经干细胞贴壁较慢, 神经干细胞分化也明显慢于对照组。对照组共培养6 h后神经干细胞球周围就有细胞爬出, 6 d后神经干细胞分化成典型的神经元和星形胶质细胞, 并交织成网状。感染组共培养24 h后才见细胞球周围有细胞爬出。6 d后神经干细胞分化成的神经元和星形胶质细胞数量少于对照组。光镜下观察到若干胞体较小、立体感强、边缘光滑的神经元样细胞, 这类细胞的数量对照组较感染组要多, 细胞的状态也更具生命力。免疫荧光染色结果显示, 感染组分化细胞中神经元和星形胶质细胞的百分率低于对照组, 尤其是神经元明显低于对照组, 这与最新文献报道一致^[13], 这或许是胚胎感染巨细胞病毒, 导致神经性损伤如小头畸形、脑水肿等的原因之一。

巨细胞病毒是先天性感染及致胎儿发育畸形的最主要的原因之一^[14], 但其致畸的确切机制并不明了。作为一种嗜神经病毒, 巨细胞病毒可以感染多种神经细胞, 但是以星形胶质细胞最为易感^[1]。巨细胞病毒感染细胞后, 其基因表达呈一定的时序性, 病毒即刻早期基因(*IE1/IE2*)最先被宿主细胞因子激

活并最早表达, 其mRNA在病毒感染后2 d即可被检测到, 并可维持较长时段。因此, 检测*IE1/IE2*基因是判断RCMV感染细胞的有效手段^[15]。本研究将星形胶质细胞感染RCMV后和神经干细胞在Transwell 24孔共培养体系下进行共培养, 研究神经干细胞的分化状况。结果发现, 巨细胞病毒感染星形胶质细胞后, 会明显影响神经干细胞的分化。因此推测在胚胎发育期, 巨细胞病毒可能通过感染星形胶质细胞, 影响了胶质细胞的细胞周期, 干扰了星形胶质细胞生物活性物质的合成和释放, 使神经干细胞分化受阻, 不能在胚胎发育阶段形成足够多的或比率正常的神经元和星形胶质细胞, 从而引起胚胎期脑组织结构和生理功能出现异常, 导致神经损伤或畸形发生。巨细胞病毒感染星形胶质细胞后影响神经干细胞分化的具体机制是什么, 与哪一种类型的星形胶质细胞分泌的哪些生物活性物质相关呢? 这将是我们的课题组下一步深入研究的问题。

参考文献 (References)

- 1 Lokensgard JR, Cheeran MC, Gekker G, Hu S, Chao CC, Peterson PK. Human cytomegalovirus replication and modulation of apoptosis in astrocyte. *J Hum Virol* 1999; 2(2): 91-101.
- 2 Loh HS, Mohd-Lila MA, Abdul-Rahman SO, Kiew LJ. Pathogenesis and vertical transmission of a transplacental rat cytomegalovirus. *Virol J* 2006; 3: 42.
- 3 Loh HS, Mohd-Azmi ML, Lai KY, Sheikh-Omar AR, Zamri-Saad M. Characterization of a novel rat cytomegalovirus (RCMV) infecting placenta-uterus of *Rattus rattus diardii*. *Arch Virol* 2003; 148(12): 2353-67.
- 4 Nakayama T, Momoki-Soga T, Inoue N. Astrocyte-derived factors instruct differentiation of embryonic stem cells into neurons. *Neurosci Res* 2003; 46(2): 241-9.
- 5 Petrova P, Raibekas A, Pevsner J, Vigo N, Anafi M, Moore MK, *et al.* A new mesencephalic, astrocyte-derived neurotrophic factor with selectivity for dopaminergic neurons. *J Mol Neurosci* 2003; 20(2): 173-88.
- 6 Barkho BZ, Song H, Aimone JB, Smrt RD, Kuwabara T, Nakashima K, *et al.* Identification of astrocyte-expressed factors that modulate neural stem/progenitor cell differentiation. *Stem Cells Dev* 2006; 15(3): 407-21.
- 7 黎海燕, 罗杰峰, 沈岳飞. 控制和影响神经干细胞增殖分化为神经元的途径及因素. *中国组织工程研究与临床康复(Li Haiyan, Luo Jiefeng, Shen Yüefei. Approaches and factors controlling and influencing the proliferation and differentiation of neural stem cells into neurons. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research)* 2007; 11(3): 559-62.
- 8 Oh J, McCloskey MA, Blong CC, Bendickson L, Nilsson

- Hamilton M, Sakaguchi DS. Astrocyte-derived interleukin-6 promotes specific neuronal differentiation of neural progenitor cells from adult hippocampus. *J Neurosci Res* 2010; 88(13): 2798-809.
- 9 Cheeran MC, Hu S, Ni HT, Sheng W, Palmquist JM, Peterson PK, *et al.* Neural precursor cell susceptibility to human cytomegalovirus diverges along glial or neuronal differentiation pathways. *J Neurosci Res* 2005; 82(6): 839-50.
- 10 Odeberg J, Wolmer N, Falci S, Westgren M, Seiger A, Söderberg-Nauclér C. Human cytomegalovirus inhibits neuronal differentiation and induces apoptosis in human neural precursor cells. *J Virol* 2006; 80(18): 8929-39.
- 11 Odeberg J, Wolmer N, Falci S, Westgren M, Sundström E, Seiger A. Late human cytomegalovirus (HCMV) proteins inhibit differentiation of human neural precursor cells into astrocytes. *J Neurosci Res* 2007; 85(3): 583-93.
- 12 Li L, Wang B, Li P, Bai ZQ, Wang HT, Song XX. Human cytomegalovirus inhibits the differentiation of human hippocampus neural stem cells. *Bing Du Xue Bao* 2009; 25(3): 196-201.
- 13 Manohar B, Mutnal, Maxim CJ, Cheeran, Shuxian Hu, James R. Murine cytomegalovirus infection of neural stem cells alters neurogenesis in the developing brain. *PLoS One* 2011; 6(1): e16211.
- 14 Ross SA, Novak Z, Pati S, Patro RK, Blumenthal J, Danthuluri VR, *et al.* Mixed infection and strain diversity in congenital cytomegalovirus infection. *J Infect Dis* 2011; 204(7): 1003-7.
- 15 Xiaofeng E, Stadler BM, Debatis M, Wang S, Lu S, Kowalik TF. RNA interference-mediated targeting of human cytomegalovirus immediate-early or early gene products inhibits viral replication with differential effects on cellular functions. *J Virol* 2012; 86(10): 5660-73.

The Effect of RCMV Infecting Astrocytes on Neural Stem Cells Differentiation

Sun Xiuning¹, Shi Lihong², Liang Ruiwen¹, Liu Zhijun^{3*}, Li Ruifang¹, Guan Yingjun⁴, Yu Li⁴, Guan Zhiyu¹

(¹Department of Parasitology, Weifang Medical University, Weifang 261053, China; ²Department of Pharmacology, Weifang Medical University, Weifang 261053, China; ³Department of Microbiology, Weifang Medical University, Weifang 261053, China; ⁴Department of Histology and Embryology, Weifang Medical University, Weifang 261053, China)

Abstract To investigate the effects of rat cytomegalovirus (RCMV) infected astrocytes on neural stem cells (NSCs) differentiation, the astrocytes and embryonic hippocampal neural stem cells were isolated and primary cultured from SD rats. NSCs were co-cultured with RCMV infected astrocytes in Transwell 24-well plate system with respective control groups. After NSCs were co-cultured with RCMV infected astrocytes, immunofluorescence staining was performed to study the expression of MAP2 and GFAP on neurons and astrocytes, respectively. The results showed that after co-culturing astrocytes with NSCs, the NSC differentiation slowed down and the differentiated neurons to astrocytes ratio was lower compared with the control group, suggesting that astrocytes infected with RCMV can inhibit the differentiation of NSCs. The possible mechanism may be related with the nutritional factors secreted from astrocytes, but affected by RCMV infection and thus interfered the differentiation process of NSCs.

Key words RCMV; astrocyte; NSCs; differentiation

Received: March 27, 2012 Accepted: May 10, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30900775), the Education Department of Shandong Province University Science and Technology Project (No.J12LK04) and Shandong Province High-level Talent of Health 1020 Project (No.2008-1)

*Corresponding author. Tel: 86-536-8462027, E-mail: zhijun.liu1@gmail.com