

神经干细胞的分化影响其对肝细胞生长因子的趋化性迁移

魏友华 刘 靖 陈叶冰 徐晓静 张焕相*

(苏州大学医学部细胞生物学系, 江苏省干细胞研究重点实验室, 苏州 215123)

摘要 神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的定向迁移对神经系统发育和损伤后修复至关重要, 但NSCs的定向迁移与NSCs的分化之间的关系鲜有研究。该研究以此为切入点, 以肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)为趋化因子, 神经干细胞系C17.2为研究对象, 首先, 建立了不同分化阶段的NSCs(分别分化0, 12, 24, 72 h)的分化模型; 其次, 运用Boyden chamber和Dunn chamber研究了不同分化状态下的NSCs对HGF的趋化性迁移。Boyden chamber结果显示: 下室加入HGF后, 分化12, 24 h的NSCs迁移至膜下方的细胞数目显著高于分化0, 72 h的NSCs; Dunn chamber结果显示: 分化12, 24 h的NSCs迁移效率显著高于分化0, 72 h的NSCs。这些结果表明, NSCs的分化影响其对HGF的趋化性迁移, 为在临床上更有效地利用NSCs治疗各种神经系统退行性疾病提供了理论依据。

关键词 神经干细胞; 细胞分化; 肝细胞生长因子; 趋化性; 细胞迁移

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的定向迁移在哺乳动物神经系统的发育和损伤修复中至关重要^[1-4]。许多神经系统退行性疾病的发生都与NSCs定向迁移能力的缺陷有关^[5]。越来越多的研究表明, 无论是内源的还是外源移植的NSCs都能通过趋化性迁移到达脑损伤的特定区域^[2,6-7]。而这些经过长距离迁移至体内特定病理区域的NSCs可以通过定向分化取代损伤区域的细胞发挥功能, 也可以通过旁分泌各种营养因子来改善损伤区域的微环境, 进而促进损伤区域的功能修复^[4,8]。NSCs的这种趋化性迁移能力为神经系统的损伤修复带来了希望, 但是NSCs在体内的定向迁移是个复杂而精准的调控过程, 很多具体的调控机理还不为人所知, 尤其是NSCs的分化状态对其趋化性迁移行为的影响鲜有报道。

神经系统损伤区域分泌的各种因子对NSCs定向迁移的诱导作用已被证实^[9-12], 肝细胞因子(hepatocyte growth factor, HGF)是其中重要的一种^[13]。研究表明, HGF在体内的表达具有显著的时空差异性^[14], 对神经系统的发育起着重要的作用。同时体外迁移实验表明, 与胶质瘤等损伤区域分泌的其它相关因子相比, HGF对未分化状态的NSCs趋化性迁移的诱导作用最强^[13]。因此, 我们选择了HGF作为趋化因子来研究不同分化状态下NSCs的趋化性迁

移行为。

为获得不同分化状态下的NSCs, 我们选择目前在体内外普遍应用的神经干细胞系C17.2作为研究对象。C17.2是一种来源于新生小鼠小脑的外颗粒层永生化的NSCs^[1], 并在体内外实验中均表现出与原代培养NSCs相似的多分化潜能和定向迁移能力^[15]。更重要的是, 体内移植实验表明: C17.2细胞能够在动物体内长期增殖和分化而不会形成肿瘤^[1], 表明C17.2是研究NSCs迁移、分化和细胞替代治疗神经疾病的良好模型和载体。因此, 我们首先利用C17.2在体外成功建立了不同分化阶段的NSCs的分化模型, 然后利用HGF作为趋化诱导因子研究了NSCs的分化与其定向迁移之间的关系, 为以后利用NSCs治疗相关退行性神经系统疾病提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

H-DMEM培养基、DMEM/F12培养基、胎牛血清(fatal calf serum, FCS)、马血清(horse serum, HS)、N2均购自Gibco公司; 胰蛋白酶(Trypsin)、EDTA、多

收稿日期: 2012-03-29 接受日期: 2012-05-02

国家自然科学基金(No.30870642, No.31071220)资助项目

*通讯作者。Tel: 0512-65880277, E-mail: hzhang@suda.edu.cn

聚赖氨酸(poly-L-lysine, PLL)、单克隆鼠抗nestin、单克隆鼠抗 β -III tubulin均购自Sigma公司; FITC标记的山羊抗小鼠二抗购自Proteintech公司; L-谷氨酰胺购自上海生工生物工程技术有限公司; 肝细胞生长因子(HGF)购自Peprtech In公司; 35 mm培养皿和细胞培养瓶购自Coring costar公司。C17.2神经干细胞系由美国Evan Y. Snyder教授馈赠。

Boyden Chemotaxis Chamber购自Neuro Prob公司; Dunn chamber购自英国Hawksley公司; 倒置相差显微镜购自日本Olympus公司; CO₂培养箱购自香港Heal Force公司; 恒温离心机购自法国Jouan公司; AF-6000活细胞工作站购自德国Leica公司。

1.2 实验方法

1.2.1 C17.2细胞的培养和诱导分化 将未分化状态的C17.2细胞培养在含有10% FCS和5% HS的H-DMEM中以维持细胞正常的生长, 当细胞汇合度达到90%左右的时候进行传代培养。

传代方法: 倒掉培养皿中原有的培养基, 用预热的PBS轻轻清洗两遍以去除残留下来的培养基, 加入2 mL 0.05%胰蛋白酶消化液, 置于显微镜下观察, 当细胞胞体回缩即将脱落时吸掉胰蛋白酶消化液, 轻轻敲打培养皿底部以促进细胞脱落, 然后加入1 mL含有血清的完全生长培养基重悬细胞, 将重悬的细胞按比例转移至预先加有完全生长培养基的新培养皿中, 置于37 °C、5% CO₂培养箱中培养。

待细胞汇合度达到70%~80%时可按照1:2~1:10不等的比例再次进行传代, 最大传代比例不超过1:10。

当C17.2细胞长到50%的时候, 将完全生长培养基更换为无血清诱导分化的培养基(DMEM/F12+N2)^[6], 然后分别取诱导分化0, 12, 24, 72 h的细胞进行免疫荧光染色鉴定。

1.2.2 免疫化学检测 将诱导培养获得的不同分化状态下的NSCs用4%多聚甲醛固定15 min, PBS洗涤两次, 0.01% Triton X-100透化40 min, 2% BSA封闭1 h, 分别孵育单克隆鼠抗nestin和单克隆鼠抗 β -III tubulin一抗, 4 °C过夜, PBS漂洗3次, 每次5 min; 分别加入相应的二抗, 室温孵育45 min, PBS漂洗3次, 每次5 min; 加入1 μ mol/L Hoechst 33258室温孵育5 min, PBS漂洗2次, 最后用50%缓冲甘油(PBS配置)封片, 荧光显微镜下观察阳性细胞情况。

1.2.3 细胞迁移的Boyden chamber实验 为分析

NSCs的趋化性迁移, 我们利用Boyden chamber在群体水平上检测不同分化阶段NSCs的迁移能力。Boyden chamber下室加入含有25 ng/mL HGF的无血清培养基, 每孔30 μ L。将预先用PLL包被过的多聚碳酸酯膜在左上角剪一个缺口做标记后, 盖住Boyden chamber下室的48孔, 分别盖上软塑片和硬塑片, 拧紧螺帽。取生长汇合度达到90%左右的C17.2细胞进行消化, 用无血清诱导分化培养基将消化的细胞制备成 8×10^5 /mL的单细胞悬液, 50 μ L单细胞悬液接种在Boyden chamber的上室。将含有细胞的Boyden chamber置于预先准备的铝盒内, 于培养箱内培养4 h后取出, 松开螺帽, 取出膜。用刀片将膜面靠近Boyden chamber上室的未迁移的细胞刮掉, 于PBS缓冲液中漂洗2次。将通过膜孔迁移至膜下面的细胞于4%多聚甲醛中固定30 min, 然后置于5%结晶紫中染色15 min, 一级水漂洗后, 倒置相差显微镜拍照。利用NIH Image J软件统计发生趋化性迁移至膜下的细胞数目。

1.2.4 细胞迁移的Dunn chamber实验 为了直接观察和记录细胞分化状态与HGF诱导的细胞迁移之间的关系, 我们采用Dunn chamber装置和延时动态视频来研究HGF诱导的不同分化状态下C17.2细胞在定向迁移过程中迁移速度和迁移效率所发生的变化。利用添加在Dunn chamber外槽中的趋化物能够快速扩散至内槽并且在两者之间的桥面上形成持续的、稳定的浓度梯度, 我们能够很直接地观察到细胞在浓度梯度桥面上的迁移轨迹。再通过软件分析细胞的迁移速度和迁移效率(forward migration index, FMI), 可以探讨细胞的分化状态对细胞迁移行为具体指标的影响^[7]。FMI为细胞迁移终点垂直于x轴的距离(y_4)与细胞迁移总距离($L_1+L_2+L_3+L_4$)的比值, 它反映了细胞迁移持续性的高低, FMI值越大表明细胞迁移持续性越高。

在Dunn chamber的内槽中加入诱导分化培养基, 然后将长有C17.2细胞的盖玻片的细胞面朝下盖在桥的正上方, 并使盖玻片的一端盖住桥而不盖住外槽, 凡士林封住盖玻片的三面, 用吸水纸吸出外槽的液体后加入含50 ng/mL HGF的无血清诱导分化培养基, 凡士林封口。使用Leica AF 6000活细胞工作站对桥上细胞的迁移行为进行跟踪观察, 每隔5 min拍摄一次, 持续跟踪观察4 h(图3B)。由NIH Image J软件分析得出单个细胞的迁移轨迹(图3C)。

1.2.5 统计学分析 采用独立性 t 检验对实验数据的差异性进行统计处理。实验数据以均数 \pm 标准误差(means \pm SEM)表示。 $P < 0.05$ 认为有显著性差异。

2 结果

2.1 不同分化状态下的C17.2 NSCs的培养和鉴定

未分化状态的NSCs(分化0 h)在含血清完全培养基中生长时形态不规则,呈扁平样,胞体饱满、边缘呈多极形态(图1A),几乎所有的细胞对nestin呈免疫阴性(图1C);对终端分化细胞表面标记蛋白 β -III tubulin(神经元表面标记蛋白)、A2B5(少突胶质细胞表面标记蛋白)和GFAP(星形胶质细胞表面标记蛋白)都呈免疫阴性(结果未显示)。当更换为含有N2的无血清诱导分化培养基培养时,细胞形态发生明显变化,诱导分化72 h时,类似神经元轴突的突起在部分细胞的胞体以两极或三极形式出现(图1B),免疫荧光鉴定少数细胞呈 β -III tubulin阳性(图1E),大部分细胞仍然表现出nestin阳性(图1D),GFAP和

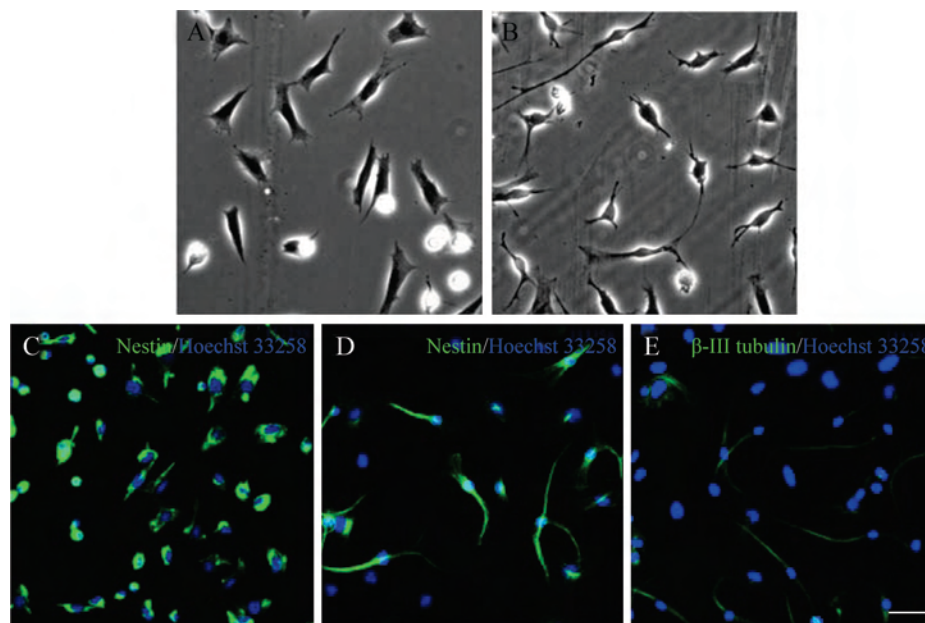
A2B5呈免疫阴性(结果未显示)。

2.2 NSCs的分化影响其对HGF的趋化性迁移

Boyden chamber结果表明,分化12, 24 h的NSCs迁移至膜下的细胞数目显著高于未分化和分化72 h的NSCs,分化72 h的细胞迁移至膜下的数目最少。虽然分化12 h的NSCs向HGF定向迁移至膜下的细胞数目明显高于分化24 h的NSCs,但二者之间没有显著性的统计学差异(图2)。

2.3 分化12, 24 h的NSCs具有更有效的FMI

Boyden chamber实验结果表明,NSCs对HGF的定向迁移与细胞的分化状态之间存在紧密联系,我们进一步采用延时动态视频和Dunn chamber来直接观察不同分化状态下个体NSCs在HGF浓度梯度存在情况下迁移行为的变化(图3)。结果表明,NSCs一旦开始分化,细胞的迁移速度就表现出显著性下降,但是分化细胞之间的迁移速度没有显著性的差异(图4A);同时,分化12, 24 h的NSCs的FMI显著高于分化0, 72 h的NSCs,并且在分化12 h时细胞的FMI最高(图4B)。

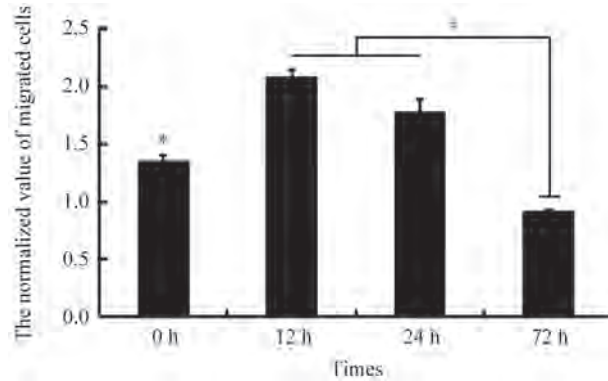


当细胞生长的汇合度达到50%时,将含血清的完全生长培养基更换为无血清的诱导分化培养基继续培养,利用相差显微镜以及免疫荧光来观察和鉴定诱导分化0, 12, 24, 72 h的C17.2。A: 分化0 h的C17.2细胞形态; B: 分化72 h的C17.2细胞形态; C: 分化0 h的C17.2细胞的nestin免疫荧光; D: 分化72 h的C17.2细胞的nestin免疫荧光; E: 分化72 h的C17.2细胞 β -III tubulin免疫荧光。蓝色(Hoechst 33258)代表细胞核。标尺=50 μ m。

The C17.2 cells were cultured in serum medium, then switched to induction medium when cells reached approximately 50% confluence. Cells were detected at 0, 12, 24, 72 h upon differentiation by contrast phase microscope and the immunofluorescence. A: the phenotype of cells with 0 h differentiation; B: the phenotype of cells with 72 h differentiation; C: cells immunopositive for nestin at 0 h differentiation; D: cells immunopositive for nestin at 72 h differentiation; E: cells immunopositive for β -III tubulin at 72 h differentiation. The blue (Hoechst 33258) represents the nucleus. Bar=50 μ m.

图1 不同分化状态的C17.2细胞形态观察和细胞表型鉴定

Fig.1 The phenotype and immunocytochemical characterization of undifferentiated and differentiating NSCs in culture

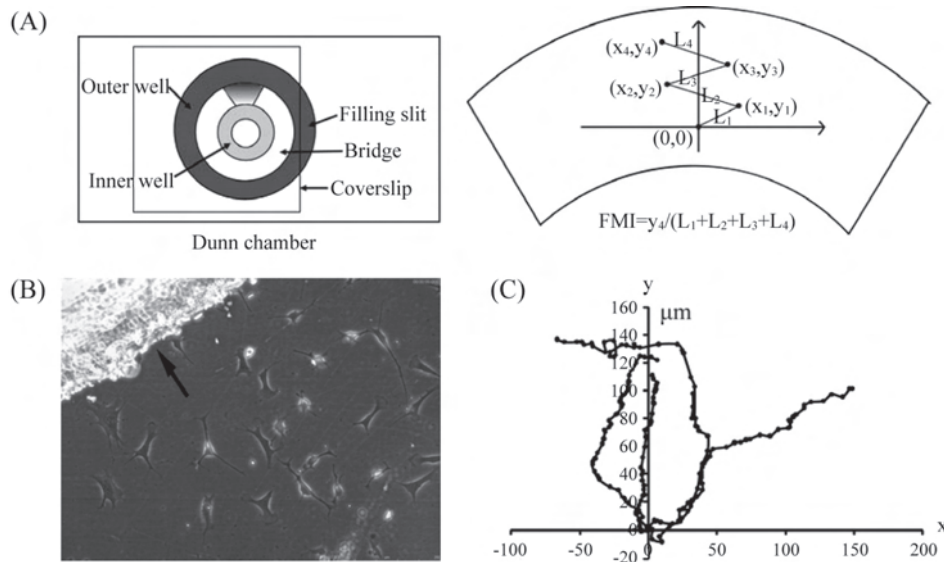


在Boyden chamber下室中加入25 ng/mL HGF时, 不同分化状态下C17.2细胞发生趋化性迁移的数目发生变化。未分化状态的C17.2在没有HGF诱导时发生迁移的细胞数目作为对照组, 设为1。数据的获得经过至少3次相互独立平行的重复实验。* $P < 0.05$, 分化0 h的细胞发生趋化性迁移的数目与分化12, 24, 72 h的细胞发生趋化性迁移的数目比较; # $P < 0.05$ 。

Cell migration was determined in the Boyden chamber after seeding cells under different differentiation states in the upper chamber. The inserts were assembled with the lower chamber filled with induction medium containing 25 ng/mL HGF. Values are expressed as a percentage of control value, i.e. the migration of undifferentiated cells without HGF was 1. Data represent the means \pm SEM from at least three independent experiments. * $P < 0.05$, cells of 0 h differentiation compared with transfilter migration of NSCs of 12, 24, 72 h differentiation show a significant difference in the number of migrated cells; # $P < 0.05$.

图2 HGF诱导的不同分化状态下的NSCs的群体性趋化迁移

Fig.2 Transfilter migration of NSCs under different differentiation states toward HGF

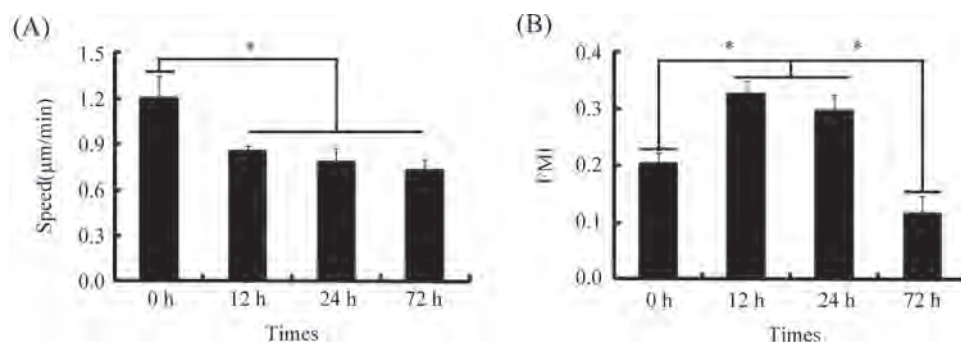


A: Dunn chamber示意图(右侧是左侧Dunn chamber中桥上单个细胞在浓度梯度存在时迁移轨迹的放大模式图)。图中正方形代表的是盖在Dunn chamber上方的盖玻片。细胞迁移的起始点定位于坐标体系的(0,0), HGF作为诱导因子加在外槽中。y轴代表浓度梯度的方向, y_4 代表细胞迁移终点垂直于x轴的距离, $L_1+L_2+L_3+L_4$ 代表细胞迁移过程的总距离, $FMI = y_4 / (L_1+L_2+L_3+L_4)$; B: 分化24 h的细胞在Dunn chamber中位于桥上发生趋化性迁移的相差图, 黑色箭头所指的方向代表外槽, 即50 ng/mL HGF形成的浓度梯度方向; C: 未分化状态的C17.2细胞在HGF浓度梯度存在的情况下, 经软件分析处理后, 发生趋化性迁移时的细胞迁移轨迹示意图。

A: schematic representation of Dunn chamber (top view) with the overlying coverslip (the square in the model), showing the position of the inner well, bridge, and outer well. A model of high-power magnification of cell migration trace on the bridge in Dunn chamber, the starting point for each cell is the intersection between the x and y axes (0,0), and the source of HGF is in the outer well. y_4 represents the most direct distance the cell progressed toward the gradient source (the outer well of the Dunn chamber), $L_1+L_2+L_3+L_4$ represents the cells' total path length. $FMI = y_4 / (L_1+L_2+L_3+L_4)$; B: cells of 24 h differentiation over the annular bridge between the inner and outer well of the chamber can be observed under phase-contrast optics. Black arrow indicates the direction of the outer well of the Dunn chamber. Cell migration was recorded continuously by time-lapse frame grabbing. Chemotaxis was tested by placing 50 ng/mL HGF in the outer well; C: migration tracks of four representative undifferentiated C17.2 in the presence of HGF concentration gradient.

图3 Dunn chamber和细胞趋化迁移示意图

Fig.3 The model of Dunn chamber and migration tracks of representative cells



在Dunn chamber外槽中加入50 ng/mL HGF时形成的浓度梯度对不同分化状态下的C17.2细胞迁移速度(A)和FMI(B)的影响。不同分化状态下的神经干细胞的迁移速度和FMI的计算是利用延时动态视频每隔5 min拍摄一次,持续跟踪观察4 h计算出的平均数值。* $P < 0.05$ 。

The migration speed (A) and FMI (B) of NSCs under different differentiation states in response to HGF. The speed and FMI of cells at different differentiation states were calculated for each time-lapse interval (5 min) with the time-lapse video and the mean speed and FMI were derived for a period of 4 h. Chemotaxis was tested by placing 50 ng/mL HGF in the outer well. * $P < 0.05$.

图4 不同分化状态下的NSCs应答HGF刺激时细胞迁移速度和FMI的变化

Fig.4 The migration speed and FMI changes of NSCs in response to 50 ng/mL HGF

3 讨论

NSCs具有自我更新和多向分化潜能^[18],能够经过长距离迁移至特定部位后通过特异性分化或分泌多种神经营养因子来维持和改善受损神经系统的功能^[8,15]。因此,移植的细胞能否高效迁移至体内特定部位是影响NSCs功能发挥和移植治疗效果的关键。然而,NSCs定向迁移参与的神经系统发育和损伤后修复是个复杂的过程,迁移过程中体内微环境的改变和各种炎症以及生长因子等极易诱导在迁移过程中的NSCs的分化^[19],而细胞状态的分化无疑会引起细胞迁移行为的改变进而影响其功能的发挥。因此,越来越多的人关注到细胞分化与细胞迁移之间的关系。

本研究采用国内外普遍接受与使用的神经干细胞系C17.2来进行诱导分化,以获得的不同分化状态的NSCs作为研究对象,以HGF作为趋化诱导因子,从群体迁移行为和个体迁移行为两个层次研究了不同分化状态下NSCs对HGF的趋化性迁移。发现分化12, 24 h的NSCs与未分化状态和分化72 h的NSCs相比,对HGF表现出更强的群体迁移行为和更有效的FMI,尤其是分化12 h的细胞群体迁移和FMI更是显著高于其它分化状态下的细胞。上述结果为进一步研究其它不同趋化因子对不同分化状态下NSCs的趋化性迁移提供了良好的研究模型,同时为解决临床上移植未知分化状态的NSCs而产生的个体疗效差异性提供了实验基础,为临床上选择性应用特定分化状态的细胞提供了理论依据。

神经再生是一个涉及各种不同因素的复杂过

程, NSCs的增殖、对周围环境中存在因子的敏感性、细胞向损伤部位的迁移效率以及迁移到损伤部位的NSCs分化出的细胞能否有效参与该部位的细胞构筑等都会影响神经系统损伤后的修复^[20]。NSCs在体内的精确迁移对神经系统的发育、功能的正常发挥以及神经损伤后的修复都是一个关键的过程,但是这个过程不可能只受到单一因素的影响。事实上,越来越多的研究表明, NSCs在体内的迁移是一个多因素综合作用的结果,很多因子在细胞的迁移中起着重要作用。随着研究的不断深入,各种生长因子和炎症因子,包括HGF、干细胞因子、基质细胞衍生因子、白介素等,在细胞迁移中的作用也越来越得到更加深入细致的了解^[7,13,21-23]。

体外研究为体内利用NSCs移植治疗脑损伤和退行性神经系统疾病奠定了理论基础,我们希望在体外被证明的不同分化状态下的NSCs具有不同的趋化性迁移能力在体内同样可以被重复,进而通过在体外诱导分化而得到具有高效迁移能力的移植细胞来进行移植治疗,以达到最佳的治疗效果。但是,在将这种处于特定分化时期的细胞应用到临床治疗之前,我们仍需要对这种特定分化状态的细胞的分离鉴定、状态的维持以及调控这些细胞发生定向迁移的分子和细胞机制进行更加广泛和深入细致的研究。

参考文献 (References)

- 1 Snyder EY, Deitcher DL, Walsh C, Arnold-Aldea S, Hartwig

- EA, Cepko CL. Multipotent neural cell lines can engraft and participate in development of mouse cerebellum. *Cell* 1992; 68(1): 33-51.
- 2 Yan J, Welsh AM, Bora SH, Snyder EY, Koliatsos VE. Differentiation and tropic/trophic effects of exogenous neural precursors in the adult spinal cord. *J Comp Neurol* 2004; 480(1): 101-14.
- 3 Aboody KS, Najbauer J, Schmidt NO, Yang W, Wu JK, Zhuge Y, *et al.* Targeting of melanoma brain metastases using engineered neural stem/progenitor cells. *Neuro Oncol* 2006; 8(2): 119-26.
- 4 Aboody KS, Najbauer J, Danks MK. Stem and progenitor cell-mediated tumor selective gene therapy. *Gene Ther* 2008; 15(10): 739-52.
- 5 Ross ME, Walsh CA. Human brain malformations and their lessons for neuronal migration. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24: 1041-70.
- 6 Lee JP, Jeyakumar M, Gonzalez R, Takahashi H, Lee PJ, Baek RC, *et al.* Stem cells act through multiple mechanisms to benefit mice with neurodegenerative metabolic disease. *Nat Med* 2007; 13(4): 439-47.
- 7 Zhang Q, Liu G, Wu Y, Sha H, Zhang P, Jia J. BDNF promotes EGF-induced proliferation and migration of human fetal neural stem/progenitor cells via the PI3K/Akt pathway. *Molecules* 2011; 16(12): 10146-56.
- 8 Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 2008; 132(4): 645-60.
- 9 Schmidt NO, Przylecki W, Yang W, Ziu M, Teng Y, Kim SU, *et al.* Brain tumor tropism of transplanted human neural stem cells is induced by vascular endothelial growth factor. *Neoplasia* 2005; 7(6): 623-9.
- 10 Ehtesham M, Yuan X, Kabos P, Chung NH, Liu G, Akasaki Y, *et al.* Glioma tropic neural stem cells consist of astrocytic precursors and their migratory capacity is mediated by CXCR4. *Neoplasia* 2004; 6(3): 287-93.
- 11 Zhang H, Vutskits L, Pepper MS, Kiss JZ. VEGF is a chemoattractant for FGF-2-stimulated neural progenitors. *J Cell Biol* 2003; 163(6): 1375-84.
- 12 Liu J, Wei Y, Chen Y, Xu X, Zhang H. Differentiation of neural stem cells influences their chemotactic responses to vascular endothelial growth factor. *J Neurosci Res* 2011; 89(8): 1173-84.
- 13 Heese O, Disko A, Zirkel D, Westphal M, Lamszus K. Neural stem cell migration toward gliomas *in vitro*. *Neuro Oncol* 2005; 7(4): 476-84.
- 14 Korhonen L, Sjöholm U, Takei N, Kern MA, Schirmacher P, Castren E, *et al.* Expression of c-Met in developing rat hippocampus: Evidence for HGF as a neurotrophic factor for calbindin D-expressing neurons. *Eur J Neurosci* 2000; 12(10): 3453-61.
- 15 Englund U, Bjorklund A, Wictorin K, Lindvall O, Kokaia M. Grafted neural stem cells develop into functional pyramidal neurons and integrate into host cortical circuitry. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(26): 17089-94.
- 16 Liu WG, Lu GQ, Li B, Chen SD. Dopaminergic neuroprotection by neurturin-expressing c17.2 neural stem cells in a rat model of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2007; 13(2): 77-88.
- 17 Zicha D, Dunn GA, Brown AF. A new direct-viewing chemotaxis chamber. *J Cell Sci* 1991; 99(Pt 4): 769-75.
- 18 Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science* 2000; 287(5457): 1433-8.
- 19 Gage FH, Coates PW, Palmer TD, Kuhn HG, Fisher LJ, Suhonen JO, *et al.* Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995(25); 92: 11879-83.
- 20 Ayuso-Sacido A, Moliterno JA, Kratochvil S, Kapoor GS, O'Rourke DM, Holland EC, *et al.* Activated EGFR signaling increases proliferation, survival, and migration and blocks neuronal differentiation in post-natal neural stem cells. *J Neurooncol* 2010; 97(3): 323-37.
- 21 Kendall SE, Najbauer J, Johnston HF, Metz MZ, Li S, Bowers M, *et al.* Neural stem cell targeting of glioma is dependent on phosphoinositide 3-kinase signaling. *Stem Cells* 2008; 26(6): 1575-86.
- 22 Zhao D, Najbauer J, Garcia E, Metz MZ, Gutova M, Glackin CA, *et al.* Neural stem cell tropism to glioma: Critical role of tumor hypoxia. *Mol Cancer Res* 2008; 6(12): 1819-29.
- 23 Feng JF, Liu J, Zhang XZ, Zhang L, Jiang JY, Nolte J, *et al.* Guided migration of neural stem cells derived from human embryonic stem cells by an electric field. *Stem Cells* 2012; 30(2): 349-55.

Differentiation of Neural Stem Cells Influences Their Chemotaxis toward HGF

Wei Youhua, Liu Jing, Chen Yebing, Xu Xiaojing, Zhang Huanxiang*

(*Jiangsu Key Laboratory of Stem Cell Research, Department of Cell Biology, Medical College of Soochow University, Suzhou 215123, China*)

Abstract Precise migration of NSCs is critically important for neurogenesis and repair in the nervous system. Although much effort has been devoted to the delineation of factors involved in the migration of NSCs, the relationship between the chemotactic response and the differentiation status of these cells, however, is not yet known. Previous studies have demonstrated that NSCs display a strong tropism for HGF, so we choose HGF as the chemoattractant. In the present study, using a neural stem cell line C17.2 cells, obtained NSCs at varying differentiation stages at first (cells of 0, 12, 24, 72 h differentiation), then used Boyden chamber and Dunn chamber to analyze the chemotactic migration of NSCs under different differentiation states in response to HGF. Boyden chamber results showed that the number of cells of 12, 24 h of differentiation migrated to HGF was significantly more than undifferentiated and 72 h of differentiation cells. The Dunn chamber results indicated that the forward migration index (FMI) was higher in both cells of 12, 24 h differentiation. These results illustrate that the response of NSCs to HGF varies widely depending on the differentiation states, thereby shedding light on optimization of the therapeutic potential of NSCs to be employed for neural regeneration after injury.

Key words neural stem cells; cell differentiation; hepatocyte growth factor; chemotaxis; cell migration

Received: March 29, 2012 Accepted: May 2, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30870642, No.31071220)

*Corresponding author. Tel: 86-512-65880277, E-mail: hzhang@suda.edu.cn