

GABA促进成年小鼠SVZ来源的神经干细胞增殖

晋贞超¹ 邓小兰¹ 王健² 郑敏^{1*}

(¹重庆医科大学干细胞与组织工程研究所, 重庆 400016; ²重庆医科大学附属第二医院神经内科, 重庆 400016)

摘要 通过Alamar blue、BrdU掺入免疫荧光双标法、流式细胞术检测了抑制性神经递质GABA(γ -aminobutyric acid)对成年小鼠脑室下区(sub ventricular zone, SVZ)来源的神经干细胞(neural stem cell, NSC)增殖的影响。结果表明, 成体NSCs被不同浓度的GABA和BICC干预后, GABA组增殖较空白对照组明显增强, BICC组的增殖则减弱; GABA组作用后增殖活跃期的NSCs比例明显高于空白对照组, BICC组增殖活跃期的NSCs比例明显降低($P<0.05$); GABA作用组的处于S-G₂期的细胞比例较对照组显著增加($P<0.05$)。该研究表明, GABA能促进成年小鼠SVZ区来源的NSCs进入增殖活跃期从而促进其增殖。

关键词 神经干细胞; 增殖; γ -氨基丁酸

GABA Promoted the Proliferation of Neural Stem Cells from the SVZ of Adult Mice

Jin Zhenchao¹, Deng Xiaolan¹, Wang Jian², Zheng Min^{1*}

(¹Department of Stem Cells and Tissue Engineering of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

²Neurology Department of Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract The Alamar blue, BrdU incorporation assay and fluorescence activated cell sorter were used to investigate the effect of γ -aminobutyric acid (GABA), an important inhibitory neurotransmitter in the nervous system, on proliferation of neural stem cells (NSCs) from adult mouse subventricular zone (SVZ). The results showed that with intervention of different concentrations of GABA and BICC, the proliferation of NSCs was significantly enhanced in GABA group, and was decreased in BICC group; In GABA group, the proportion of NSCs in active proliferation period was significantly higher than blank control group, while the proportion in BICC group was significantly lower ($P<0.05$), and the proportion of cells in S-G₂ period was significantly increased ($P<0.05$) in GABA group. The results indicated that GABA can promote proliferation of NSCs from SVZ zone of adult mouse by promoting them into active proliferation period.

Key words neural stem cell; proliferation; γ -aminobutyric acid

1992年, Reynolds等^[1]率先用神经球培养方法先后从胎鼠和成年鼠纹状体分离得到神经干细胞(neural stem cells, NSCs), 之后的研究发现并证实了

包括人类在内的多物种的胚胎和成体神经系统中均存在神经干细胞^[2]。尽管目前对于神经干细胞的分离、诱导、体外培养已经取得成功^[3], 但是如何在不同

收稿日期: 2013-09-24 接受日期: 2013-12-23

国家自然科学基金(批准号: 31100985)和重庆市科委自然科学基金(批准号: CSTC2010BB5096)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485626, E-mail: 527111972@qq.com

Received: September 24, 2013 Accepted: December 23, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31100985) and the National Natural Science Foundation of Chongqing Science & Technology Commission (Grant No.CSTC2010BB5096)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485626, E-mail: 527111972@qq.com

网络出版时间: 2014-04-01 14:06 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.04.0309.html>

改变基因组稳定的前提下对成年动物神经干细胞的增殖进行有效地调控,是神经干细胞参与神经修复并应用于神经退行性病变的治疗所必须解决的首要问题^[4]。GABA作为一种抑制性神经递质,在神经发生的早期以一种自分泌或者旁分泌的方式作用于GABA受体,表现出明显的兴奋作用^[5]。研究认为,GABA对于成年哺乳动物的神经干祖细胞的增殖也起着重要的调节作用,但是否为正性调节还存在争议^[1-3]。本研究从成年小鼠的SVZ(sub ventricular zone, SVZ)分离培养NSCs,分别给予GABA及其A受体阻断剂BICC(bicucullin),通过测定神经干细胞的增殖能力和处在增殖活跃期的细胞比例的改变,证实了GABA对于成年小鼠SVZ来源的神经干细胞体外增殖的促进作用。

1 材料与方法

1.1 材料

健康3月龄C57BL/6J小鼠10只,体重20~25 g,雌雄各半,由重庆医科大学实验动物研究中心提供。

1.2 试剂及仪器

GABA、BICC、BrdU、Alamar blue、胰蛋白酶购自Sigma公司。神经干细胞培养基Neural basal、B27、EGF、bFGF、胎牛血清均购自GIBCO公司;大鼠抗小鼠nestin抗体、兔抗鼠BrdU抗体购自Santa Cruz公司;cy3-山羊抗兔二抗、FITC-兔抗鼠二抗购自武汉博世德公司。

1.3 成年小鼠SVZ神经干细胞分离、原代培养及传代

分离获得3只成年小鼠SVZ脑组织,手术刀切碎成小于1 mm³大小,用预热的0.125% EDTA-胰蛋白酶溶液于37 °C水浴消化15~20 min;加入数滴胎牛血清终止消化,用尖头吸管轻轻吹打细胞至液体成糊状后,加入5 mL冰预冷PBS轻轻混匀,用200目网筛过滤,收集细胞悬液;1 000 r/min离心5 min,弃上清,以神经干细胞培养液重悬,制成单细胞悬液^[5],调整细胞密度为5×10⁵/L,接种于25 cm²培养瓶,置于37 °C、5% CO₂、95%湿度的孵箱常规培养。48~72 h后更换新鲜培养液,之后每3 d半量换培养液一次。每5~6 d按1:2比例传代培养。

1.4 GABA对NSCs增殖影响的检测

原代(P0)和传代培养至第三代(P3)及第六代(P6)的NSCs,调整细胞密度为5×10⁵/L,接种于96孔

板,每孔100 μL。分为:空白对照组、GABA不同浓度组(按终浓度10, 100, 1 000 μmol/L,每天加入),每组重复3孔。6 d后加入Alamar blue 10%(v/v)孵育6 h,在570 nm测定吸光度值(D)。以GABA不同浓度组的吸光度值与对照组吸光度值的比值表示GABA对NSCs增殖的作用。

1.5 GABA受体阻断剂BICC对NSCs增殖作用的检测

传代培养至P3的NSCs,调整细胞密度为5×10⁵/L,接种于96孔板中,每孔100 μL。分为:空白对照组、GABA 30 μmol/L组、BICC 10 μmol/L组、GABA 30 μmol/L+BICC 10 μmol/L组,每组重复3孔。5~6 d后加入Alamar blue进行细胞增殖检测,方法同1.4。

1.6 GABA对NSCs增殖活跃细胞比例影响的检测

传代培养至第三代的NSCs,调整细胞密度为1×10⁷/L,接种于多聚赖氨酸(P-L-L)包被的96孔板,每孔100 μL。分为:空白对照组、GABA 30 μmol/L组、GABA 30 μmol/L+BICC 10 μmol/L组,每组重复3孔。各孔加入BrdU共培养24 h后,加入DAPI孵育5 min, PBS洗三遍,4%多聚甲醛固定10 min,0.3% TritonX-100破膜15 min,10%牛血清封闭,37 °C水浴30 min,一抗混合液(大鼠抗小鼠nestin和兔抗鼠BrdU按1:100稀释)4 °C过夜,避光二抗混合液(cy3, FITC 1:50稀释混合)30 min,荧光显微镜下同一个视野分别用两种激发光观察,拍照,软件重叠,计数每孔的BrdU⁺/nestin⁺细胞数(增殖活跃期细胞)。

1.7 GABA对NSCs细胞周期的影响

传代培养至第三代(P3)的NSCs,调整细胞密度为1×10⁷/L,培养瓶培养,分组为:对照组、GABA终浓度30 μmol/L组。作用12 h后,离心收集细胞,弃上清,用预冷PBS洗细胞两次。加入预冷70%乙醇,于4 °C固定过夜, PBS洗细胞后加入500 μL PBS(含50 μg/mL溴化乙锭(PI)、100 μg/mL RNase A、0.2% Triton X-100)4 °C避光孵育30 min后进行流式细胞分析。计数2~3万个细胞,结果用细胞周期拟和软件ModFit分析。

1.8 统计学处理

实验数据以mean±S.D.形式表示,对GABA对NSCs增殖影响的检测数据和GABA受体阻断剂BICC对NSCs增殖作用的检测数据采用SPSS 18.0软件进行两样本之间的t检验;对GABA对NSCs增殖活跃细胞比例影响的检测数据采用SPSS 18.0进行样本之间的卡方检验,P<0.05为差异有统计学

意义。

2 结果

2.1 GABA对神经干细胞增殖的作用

倒置显微镜下观察原代(P0)、第三代(P3)、第六代(P6)的细胞状况,发现无论是神经球的数目还是大小,GABA组都较对照组多而大,经Alamar blue对细胞增殖进行检测,在P0、P3、P6,GABA作用组与对照组相比较增殖均有显著的增加,其中GABA 100 μmol/L组、GABA 1 000 μmol/L组与对照组之间的差异均有统计学意义,表明一定浓度GABA能促进P0、P3、P6神经干细胞的增殖。但是GABA 1 000 μmol/L组与GABA 100 μmol/L组比较,增殖并没成比例增加反而减少,表明GABA对神经干细胞

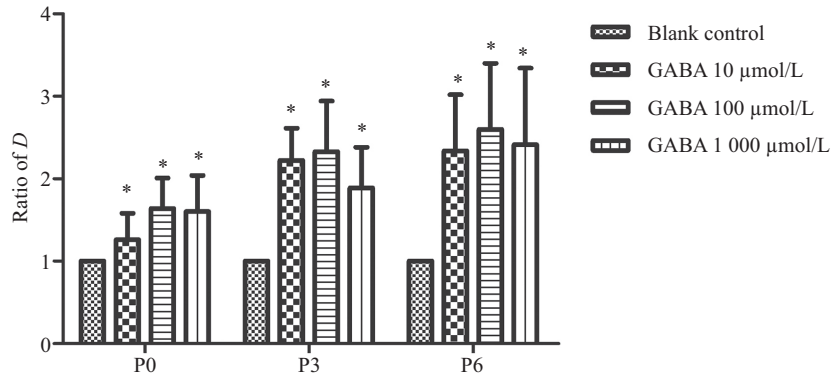
的增殖促进作用并不成线性增加(图1)。

2.2 GABA受体阻断剂BICC对NSCs增殖作用

GABA 30 μmol/L作用组NSCs增殖明显增加,Bicucullin 10 μmol/L作用组NSCs增殖明显减弱,结果有统计学意义($P<0.05$),而GABA 30 μmol/L与Bicucullin 10 μmol/L共同作用后,GABA的促增殖作用明显被抑制(图2)。

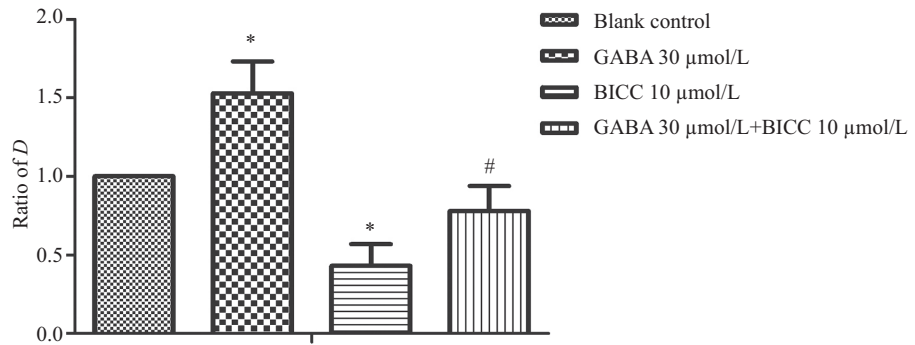
2.3 GABA对NSCs中增殖活跃细胞比例的影响

GABA 30 μmol/L组的nestin⁺细胞数、BrdU⁺细胞数和BrdU⁺/nestin⁺双阳性细胞数较对照组明显增加(图3);而GABA 30 μmol/L+BICC 10 μmol/L组BrdU⁺细胞数明显减少。统计分析GABA 30 μmol/L作用组中增殖活跃期细胞比例与对照组之间以及GABA 30 μmol/L+Bicucullin 10 μmol/L组与对照组



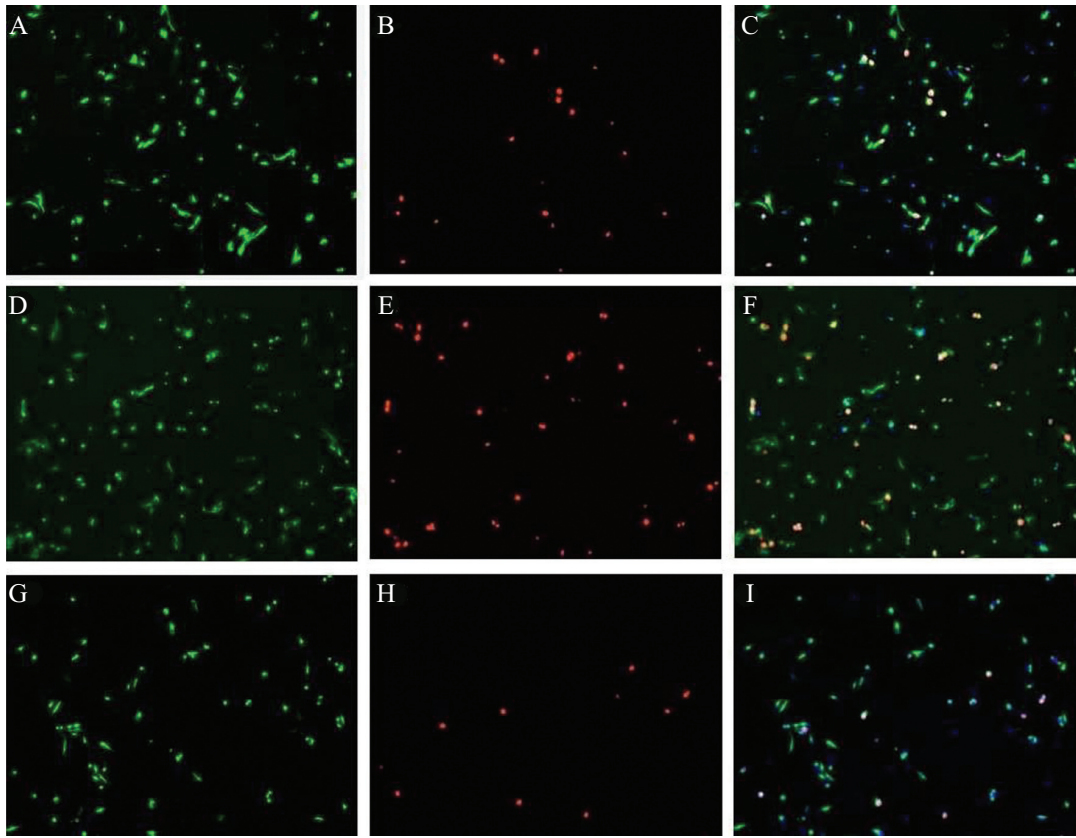
空白对照、GABA 10 μmol/L、GABA 100 μmol/L、GABA 1 000 μmol/L作用的NSCs在P0、P3、P6增殖的情况。n=3, * $P<0.05$,与空白对照组相比。The proliferation of NSCs treated by Blank control, GABA 10 μmol/L, GABA 100 μmol/L and GABA 1 000 μmol/L in P0, P3 and P6. n=3, * $P<0.05$ vs blank control group.

图1 GABA对NSCs增殖的影响
Fig.1 Effects of GABA on proliferation of NSCs



空白对照、GABA 30 μmol/L、BICC 10 μmol/L、GABA 30 μmol/L+BICC 10 μmol/L作用的NSCs增殖的情况。n=3, * $P<0.05$,与空白对照组相比, # $P<0.05$,与GABA 30 μmol/L组相比。The proliferation of NSCs treated for 6 d by blank control, GABA 30 μmol/L, BICC 10 μmol/L and GABA 30 μmol/L+BICC 10 μmol/L in P3. n=3, * $P<0.05$ vs blank control group, # $P<0.05$ vs GABA 30 μmol/L group.

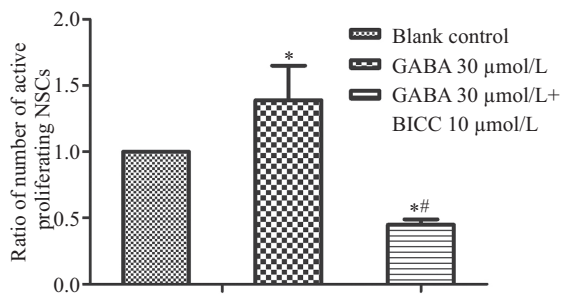
图2 GABA、BICC对NSCs增殖的影响
Fig.2 Effects of GABA and BICC on proliferation of NSCs



A~C: 空白对照组; D~F: GABA 30 μmol/L作用组; G~I: GABA 30 μmol/L+ BICC 10 μmol/L作用组; A~G: nestin⁺ (绿色); B~H: BrdU⁺ (红色); C~I: BrdU⁺/nestin⁺ (橙色)。
A~C: blank control group; D~F: 30 μmol/L GABA group; G~I: GABA 30 μmol/L+ BICC 10 μmol/L group; A~G: nestin⁺ (green); B~H: BrdU⁺ (red); C~I: BrdU⁺/nestin⁺ (active proliferating cell, orange).

图3 免疫荧光双染检测出的GABA、BICC作用24 h后NSCs的增殖活性(100×)

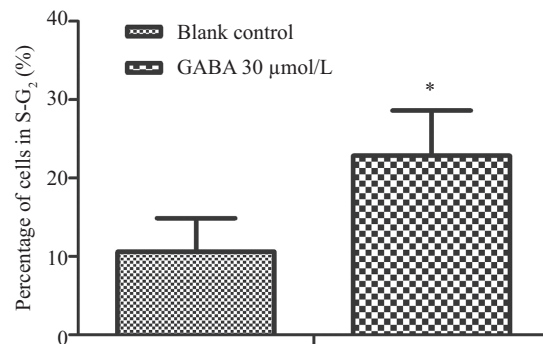
Fig.3 The active proliferation of NSCs treated by GABA and BICC for 24 h evaluated by the BrdU/nestin double staining (100×)



空白对照、GABA 30 μmol/L、GABA 30 μmol/L+BICC 10 μmol/L组的NSCs处于增殖活跃期的细胞数与对照组之比。n=3, *P<0.05, 与对照组相比, #P<0.05, 与GABA 30 μmol/L组相比。
The percentages of NSCs in active proliferation period activated by blank control, GABA 30 μmol/L and BICC 100 μmol/L in P3. n=3, *P<0.05 vs blank control group, #P<0.05 vs GABA 30 μmol/L group.

图4 GABA、BICC对NSCs增殖活跃期的影响

Fig.4 Effects of GABA and BICC on percentage of NSCs in active proliferation period



空白对照、GABA 30 μmol/L作用的NSCs处于增殖活跃期(S-G₂)的比例。n=3, *P<0.05, 与对照组相比。
The percentage of NSCs in S-G₂ phase treated for 12 h by control and GABA 30 μmol/L in P3. n=3, *P<0.05 vs blank control group.

图5 GABA对NSCs细胞周期的影响

Fig.5 Effect of GABA on cell cycle of NSCs

之间的差异均具有统计学意义(P<0.05, 图4)。提示, GABA促进NSCs增殖表现在BrdU阳性的神经干细

胞比例明显增加, 而GABA_A受体阻断剂Bicucullin则抑制这一效应。

2.4 GABA对细胞周期的影响

在GABA条件培养的神经干细胞中,处于S-G₂的细胞比例明显高于对照组。流式细胞术检测对照组、GABA 30 μmol/L作用后的NSCs细胞周期发现,对照组有(10.63±4.25)%的细胞处在增殖分裂期,而GABA 30 μmol/L组则约有(22.85±5.76)%的细胞处在增殖活跃期,差异有统计学意义(图5)。

3 讨论

随着神经干细胞在体外的成功培养以及对脑损伤和神经变性疾病的不断研究,越来越多的文献表明,神经干细胞移植有可能会成为最有效的一种治疗手段^[7-8]。而对神经干细胞体外增殖进行有效的调控是神经干细胞移植治疗神经系统疾病必须解决的首要问题。

在多种信号分子中,来源于脑组织本身的神经递质引起了研究者的关注^[9]。GABA是脑内重要的抑制性神经递质,分布于丘脑、基底神经核、海马、小脑等部位。GABA受体不仅是CNS细胞上较重要的受体,而且还是神经元细胞上较早出现的标志性受体。有研究发现,GABA由兴奋到抑制的转变是神经发生的一个关键环节^[9-10]。与传统的GABA抑制作用不同,在未成熟神经细胞中,GABA以一种自分泌或旁分泌的方式释放并作用于GABA_A受体,表现出明显的兴奋作用,这种兴奋对成年动物神经发生起重要调节作用,随着神经元的成熟,GABA的兴奋作用逐渐被抑制作用取代^[10]。但作为脑内重要的神经递质,GABA如何影响成年小鼠神经干祖细胞增殖或者分化还存在争议^[11-12]。

我们首先分离培养了成年大鼠SVZ的NSCs,在体外特定培养体系中自发形成神经球,并经Nestin检测证实获得的细胞是NSCs。在建立起稳定的成年鼠SVZ区神经干细胞的体外培养体系后,通过在培养体系中加入不同浓度的GABA,观察GABA对NSCs增殖的影响。我们发现,无论原代培养还是传代培养的GABA,都可以促进源于成体SVZ区的神经干祖细胞增殖。GABA在作用浓度为10 μmol/L到100 μmol/L范围内表现出对神经干祖细胞增殖有明显的促进作用,而当GABA作用浓度进一步增加后,这种促增殖作用没有明显提升。

通过5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-Bromo-2-deoxyU-

ridine, BrdU)掺入,我们发现GABA可以促使细胞进入增殖活跃期,而GABA_A受体阻断剂Bicucullin能减少进入增殖活跃期的NSCs数量。我们进一步通过流式细胞术检测细胞周期,明确了GABA可以增加处于增殖活跃期的细胞比例。这与Liu等^[13]的研究结果GABA_A受体的激活可控制神经前体细胞的细胞周期是一致的。

我们观察到GABA对成体SVZ来源的NSCs具有增殖促进作用,而GABA的作用是通过与受体结合达到的。目前已经发现的GABA受体有三类,分别是GABA_A受体、GABA_B受体和GABA_C受体。GABA_A和GABA_B受体广泛分布于哺乳动物脑组织,GABA_C受体主要存在于视网膜神经元。GABA_A受体是一种门控Cl⁻通道受体,它由5个跨膜亚单位组成,不同的GABA_A受体所含亚单位的种类(α、β、γ、δ、ε、π、θ等)和数目不尽相同。Pontes等^[14]最近的研究表明,GABA通过离子移变A受体和代谢性B受体,对NSCs、神经前体细胞、成神经细胞进行正性刺激,从而对成年哺乳动物的神经通路的形成进行调节。成熟哺乳动物体内的GABA_A受体被激活后,细胞外Cl⁻内流,引起该细胞超极化,抑制其活动;但对于胚胎时期的神经元或非成熟神经元,其GABA_A受体被激动,Cl⁻通道被打开后,Cl⁻在细胞膜电位作用下向外流动,这样促进了细胞膜电位差减小,最终导致细胞去极化,介导细胞的兴奋效应。在培养体系中,GABA_A受体阻断剂Bicucullin可以抑制NSCs的增殖,在培养中联合使用GABA和Bicucullin时,Bicucullin也可以抑制GABA对NSCs的促增殖作用,推测GABA有可能是通过激活GABA_A受体起作用的。这也解释了为什么GABA在作用浓度为10 μmol/L到100 μmol/L范围内表现出对神经干祖细胞增殖有明显的促进作用,而当GABA作用浓度进一步增加后,这种促增殖作用没有明显提升:因为受体的数量是有限的,当GABA_A受体达到饱和后,GABA对NSCs的促增殖效应并不随GABA作用浓度的增加而增强。

我们推测,GABA通过与NSCs表面的GABA_A受体结合,激活细胞增殖信号途径,促使NSCs进入增殖活跃期,从而促进NSCs的增殖。但GABA作用的具体靶点和作用通路还不明确,是否通过其代谢产物发挥作用也有待进一步研究。

参考文献 (References)

- 1 Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian nervous system. *Science* 1992; 255(5052): 1707-10.
- 2 罗德宪. 神经干细胞的研究进展. 中国医药指南(Luo Dexian. Research development of neural stem cell. *Guide of China Medicine*) 2012; 10(17): 92-3.
- 3 陆利, 朱茜, 夏仲年, 宋慧芳, 杨桂姣. 成年小鼠室管膜下区神经干细胞分离及培养方法改良. *神经解剖学杂志*(Lu Li, Zhu Qian, Xia Zhongnian, Song Huifang, Yang Guijiao. A modified method for the isolation and culture of neural stem cells from the adult mice subventricular zone. *Chinese Journal of Neuroanatomy*) 2011; 27(5): 487-52.
- 4 Ess KC. Patient heal thyself: Modeling and treating neurological disorders using patient-derived stem cells. *Exp Biol Med* (Maywood) 2013; 238(3): 308-14.
- 5 Bolteus AJ, Bordey A. GABA release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone. *J Neurosci* 2004; 24(35): 2436-48.
- 6 Rietze RL, Valcanis H, Brooker GF, Thomas T, Voss AK, Bartlett PF. Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain. *Nature* 2001; 412(6848): 736-9.
- 7 Snyder BJ, Olanow CW. Stem cell treatment for Parkinson's disease: An update for 2005. *Curr Opin Neurol* 2005; 18(4): 376-85.
- 8 韩梅, 张文生, 李金凤, 孙媛媛, 朱友惠, 王永炎. 神经退行性或损伤性疾病防治的新观点——干细胞药物. *中国药理学通报* (Han Mei, Zhang Wensheng, Li Jinfeng, Sun Yuanyuan, Zhu Youhui, Wang Yongyan. A new insight and strategy of treatment and prevention for neurodegenerated or damaged disease——stem cell drugs. *Chinese Pharmacological Bulletin*) 2008; 24(7): 841-4.
- 9 田书林, 冯卫红, 唐民科. 成年哺乳动物神经发生的关键调节环节: GABA的作用由兴奋到抑制的转变. *生理科学进展*(Tian Shulin, Feng Weihong, Tang Minke. The neurogenesis in the adult mammalian key link of adjustment: the role of GABA by excitement to suppress. *Progress in Physiological Science*) 2009; 40(3): 256-60.
- 10 Stewart RR, Hoge GJ, Zigova T, LuskinMB. Neural progenitor cells of the neonatal rat anterior subventricular zone express functional GABA receptors. *J Neurobiol* 2002; 50(4): 305-22.
- 11 Tozuka Y, Fukuda S, Namba T, Tatsunori Seki, Tatsuhiro Hisatsune. GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron* 2005; 47(6): 803-15.
- 12 Giachino C, Barz M, Tchorz JS, Tome M, Gassmann M, Bischofberger J, *et al.* GABA suppresses neurogenesis in the adult hippocampus through GABAB receptors. *Development* 2014; 141(1): 83-90.
- 13 Liu X, Wang Q, Haydar TF, Bordey A. Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls GFAP-expressing progenitor proliferation. *Nat Neurosci* 2005; 8(9): 1179-87.
- 14 Pontes A, Zhang Y, Hu W. Novel functions of GABA signaling in adult neurogenesis. *Front Biol (Beijing)* 2013; 8(5): 496-507.