

脑源性神经营养因子促进海马神经干细胞的存活、增殖及向神经元分化

李昕松 蒋莉* 陈恒胜 张晓萍

(重庆医科大学附属儿童医院神经内科, 重庆 400014)

摘要 探讨脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)对海马神经干细胞(neural progenitor/stem cells, NPCs)的存活、增殖及分化的影响。采用无血清培养基体外分离、纯化、扩增胎鼠海马NPCs。通过细胞形态观察、nestin免疫荧光染色及血清促分化检测NPCs的干细胞特性;采用神经球计数及神经球直径测定观察BDNF对NPCs的促增殖作用,筛选出在适当细胞密度下,促进NPCs增殖的有效浓度;采用Tunel染色及全自动生化分析仪测定细胞培养上清液乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)的含量探讨BDNF对海马NPCs存活的影响;采用抗- β -微管蛋白(tubulin) III (Tuj-1)染色检测NPCs分化成神经元的百分率,同时测定分化神经元突起的长度。分离的海马NPCs表现为nestin免疫染色阳性,具有自我增殖能力、且能分化为神经元和星形胶质细胞;当细胞密度为 5×10^5 个/ml时,10~200 ng/ml BDNF能显著促进NPCs的增殖,其中40 ng/ml BDNF促增殖作用最强,40 ng/ml BDNF能显著增大神经球直径;40 ng/ml BDNF显著减少NPCs的凋亡率(Tunel+/DAPI+),抑制LDH漏出;40 ng/ml BDNF能显著促进NPCs分化为Tuj-1免疫染色阳性神经元,且分化后神经元的突起长度显著大于对照组。上述结果提示:BDNF促进海马NPCs的存活、增殖及向神经元方向分化。

关键词 神经干细胞;海马;脑源性神经营养因子;增殖;分化

国内外研究已证实,在人类及其他哺乳动物的中枢神经系统的某些部位存在成体神经干细胞(neural progenitor/stem cells, NPCs),而脑内NPCs的增殖及分化受众多因素的影响^[1]。我们的前期实验已发现,在惊厥持续状态后一定的时间窗内,海马齿状回不仅存在明显的NPCs增殖反应^[2],同时伴有该部位脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)的表达增高^[3],而高表达的BDNF能显著抑制惊厥发作后的神经元坏死和凋亡,因此,我们推测,惊厥持续状态后高表达的BDNF可能对海马NPCs也有一定的作用。鉴于体外培养具有环境单一、条件易于调控、可避免体内多种因素影响等优点,本实验通过培养胎鼠海马NPCs,探讨BDNF对海马NPCs增殖、存活及分化的影响。

1 材料与方方法

1.1 神经干细胞体外培养及鉴定

取胎龄15~16天的Wistar鼠,75%乙醇消毒后,断头取脑,解剖显微镜下、冰盘上钝性分离海马组

织,置于预冷的D-Hanks液中漂洗2次,转入含无血清DMEM/F12培养液的离心管内,用巴氏吸管反复吹打成细胞悬液后,200目不锈钢筛网过滤,取滤液离心,1500 r/min,10 min,收集沉淀。用完全培养液制成单细胞悬液,血球计数板计数,以 5×10^5 个/ml密度种植于50 ml的培养瓶中,置37℃、5% CO₂培养箱培养。其中完全培养液的成分为含有2% B27 (Gibco公司)、20 ng/ml bFGF (Peprotech公司)、20 ng/ml EGF (Peprotech公司)的DMEM/F12 (Gibco公司)培养基,3~5天进行半量换液,5~7天后传代培养,取第2~3代的细胞用于实验。

生长3~7天的神经球接种于多聚赖氨酸包被的玻璃片上12 h后,4%多聚甲醛固定,0.1% Triton/PBS,室温,10 min;5% BSA封闭30 min,室温;山羊抗-大鼠nestin多抗(Santa Cruz公司),4℃,24 h;兔抗山羊

收稿日期:2007-11-19 接受日期:2008-01-29

国家自然科学基金(No.30672217)和重庆市卫生局科研基金(No.06-2-158)资助项目

* 通讯作者。Tel: 023-63624424, E-mail: dr_jiangli@126.com

IgG-FITC, 室温, 2 h; 以上每一步骤后, 均进行磷酸盐缓冲液漂洗 3 次, 每次 5 min。缓冲甘油封片, 荧光显微镜下观察。

将机械分离的单个 NPCs 接种于多聚赖氨酸包被的玻片上, 培养基成份含有 2% B27 和 1% 胎牛血清(Gibco 公司)的 DMEM/F12 培养基, 隔天半量换液, 培养 7 天后, 分别采用抗- β -微管蛋白(tubulin) III (Tuj-1) (1 : 500, Promega 公司)和抗-GFAP (1 : 200, Santa Cruz 公司)鉴定 NPC 能否分化成神经元和星形胶质细胞。4% 多聚甲醛固定 30 min, 室温; 0.1% Triton/PBS, 室温, 10 min; 5% BSA 封闭 30 min, 室温; 小鼠抗-Tuj-1, 4 °C, 24 h; 山羊抗小鼠 IgG-FITC (1 : 100, 中杉公司), 室温, 2 h; 兔抗-GFAP (1 : 100, 中杉公司), 4 °C, 24 h; 山羊抗兔 IgG-TRITC (1 : 100, 中杉公司), 室温, 2 h; DAPI 复染细胞核。以上每一步骤后, 均进行磷酸盐缓冲液漂洗 3 次, 每次 5 min。缓冲甘油封片, 荧光显微镜下观察。

1.2 不同浓度的 BDNF 促增殖实验

将生长 7 天后的神经球用吸管轻轻吹打成单细胞悬液, 以 5×10^5 个/ml 密度接种于 96 孔板中, 分别给予含有 10、20、40、80、160、200 ng/ml BDNF (Peprotech 公司)的完全培养液, 不同浓度 BDNF 各有 5 孔, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养中培养 4 天后, 显微镜下计数神经球形成数目。

根据神经球计数, 筛选出在适当细胞密度下, 促进神经球数目形成最有效的 BDNF 浓度, 然后采用 Image Proplus 5.1 软件, 测量该 BDNF 浓度组及实验对照组神经球的直径。

1.3 乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)含量测定及 TUNEL 染色

将神经球机械分离成单细胞悬液后, 以 5×10^5 个/ml 密度接种于 24 孔板中, 给予含有 40 ng/ml BDNF 的完全培养液培养 4 天后, 收集细胞上清液, 按照 LDH 试剂盒(上海科华生物公司)说明, 于全自动生化分析仪上进行测定, 检测反应产生的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)引起 340 nm 处吸光度的上升速率, 吸光度的上升速率与 LDH 的活力呈正比关系, 通过计算得出标本中 LDH 的含量, 以 U/L 表示, 40 ng/ml BDNF 组与实验对照组各设 6 孔。

将生长 4 天的神经球接种于多聚赖氨酸包被的玻片上 12 h 后, 4% 多聚甲醛固定; 0.1% Triton X-100/0.1% 枸橼酸, 4 °C, 2 min; TUNEL 反应液(Roche 公司), 37 °C, 60 min; DAPI 复染细胞核, 10 min, 室温; 上

述每一步骤后, 均进行磷酸盐缓冲液冲洗 3 次, 每次 5 min; 50% 磷酸缓冲甘油封片, 荧光显微镜下观察。以 TUNEL⁺/DAPI⁺ 作为 NPCs 的凋亡发生率, 40 ng/ml BDNF 组与实验对照组各设 7 样本, 每一样本随机计数 3 个视野, 取其平均值。

1.4 NPCs 分化成神经元的鉴定及突起长度的测量

将机械分离的单个 NPC 以 2×10^5 个/ml 的细胞密度接种于多聚赖氨酸包被的玻片上, 根据培养基的不同, 设置实验对照组和实验组, 前者含有 2% B27 和 1% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基, 后者含有 2% B27、1% 胎牛血清和 40 ng/ml BDNF 的 DMEM/F12 培养基。隔天半量换液, 培养 7 天后, 采用抗-Tuj-1 免疫荧光染色进行 NPCs 分化后神经元数量鉴定。方法同 1.1, 以 Tuj-1⁺/DAPI⁺ 比值比较不同分化条件下 NPCs 分化成神经元的百分率, 40 ng/ml BDNF 组与实验对照组各设 5 样本, 每一样本随机计数 3 个视野, 取其平均值。抗-Tuj-1 免疫荧光染色后, 荧光显微镜下拍照, 采用 Image Proplus 5.1 软件测量不同培养条件下分化神经元突起的长度。只选择没有与其他神经元接触, 且长度至少大于神经元胞体直径的突起进行测量, 对照组和实验组各测量 50 个视野中的所有符合要求的神经元突起。

1.5 统计学分析

采用 SPSS13.0 统计软件对实验数据进行统计处理, 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较用单因素方差分析检验, 均值间两两比较采用 Bonferroni's 检验; 两组独立样本的比较采用 *t* 检验; 以 $P < 0.05$ 认为有显著性差异。

2 结果

2.1 海马 NPCs 的纯化与鉴定

胎鼠海马的原代细胞, 接种后即刻在相差显微镜下呈现为单个或成对的悬浮圆形细胞; 24~48 h 后, 圆形细胞单个或成对存在; 72 h 后可见细胞分裂相; 到 4~5 天时形成十几个到上百个细胞的集落, 这些集落大部分呈球形悬浮生长, 少部分贴壁平铺生长, 细胞形态规则, 未见到明显的突起生长。采用机械分离的方法将神经球吹打成单细胞, 传代培养, 生长速度基本同原代培养, 海马 NPCs 可传代培养 3~4 代, 提示分离的 NPCs 具有自我增殖和更新能力。免疫荧光染色显示培养的 NPCs 表达干细胞标记蛋白之一 nestin, 1% 胎牛血清可使 NPCs 分化为神经元(抗-Tuj-1 免疫染色阳性)和星形胶质细胞(抗-GFAP 免疫染色阳性), 提示分离的 NPCs 具有多向分化潜能(图 1)。

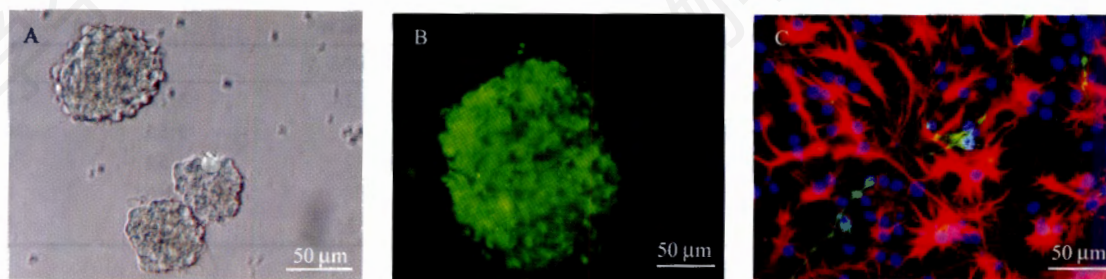


图1 NPCs的形态与鉴定

A: 相差显微镜下, 培养3天的NPCs聚集成团, 形成神经球; B: 培养7天的NPCs细胞球 nestin 免疫荧光染色阳性; C: NPCs在含有1%胎牛血清的培养基中培养7天后, 免疫荧光染色显示, NPCs可分化为神经元(Tuj-1⁺, 绿色)和星形胶质细胞(GFAP⁺, 红色), 细胞核(DAPI染色, 蓝色)。

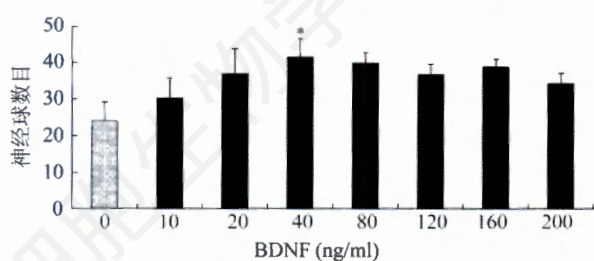


图2 不同浓度BDNF促进NPCs形成神经球的数目
细胞密度为 5×10^5 个/ml, * $P < 0.05$ 。

2.2 BDNF促进NPCs增殖

在0~200 ng/ml的范围内以7个不同浓度BDNF组培养NPCs, 4天后进行神经球计数。结果显示, 在含有BDNF的7个实验组中, 神经球形成数目均显著高于对照组($P < 0.05$); 而在7个不同浓度组中, 加入40 ng/ml BDNF后形成的神经球数目显著高于其他浓度($P < 0.05$)。提示在 5×10^5 个/ml细胞密度下, 40 ng/ml BDNF能显著促进NPCs增殖(图2)。

对40 ng/ml BDNF作用组和实验对照组形成的神经球直径进行测量, 两组神经球的平均直径为

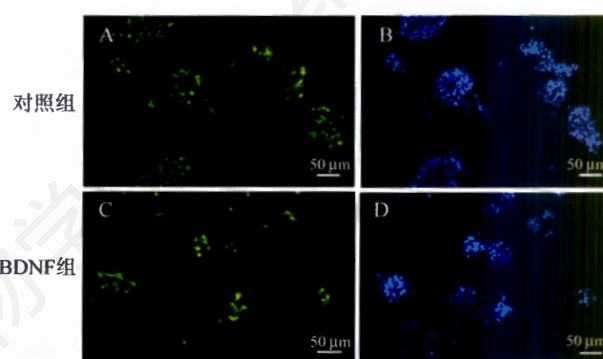


图3 不同干预条件下Tunel染色显示NPCs的凋亡情况

A: 对照组NPCs的Tunel染色; B: 同一视野下对照组NPCs的DAPI染色; C: 40 ng/ml BDNF组NPCs的Tunel染色; D: 同一视野下40 ng/ml BDNF组NPCs的DAPI染色。

(43.14 ± 22.79) μm 和(78.60 ± 11.23) μm , 具有显著性差异($P < 0.05$), 与神经球计数结果一致。

2.3 BDNF促进NPCs存活

凋亡细胞因核染色体断裂而染色即Tunel阳性细胞, 结果显示: 凋亡的NPCs散在分布于神经球中(图3), BDNF组NPCs的凋亡率为(19 ± 15)%, 显著低于

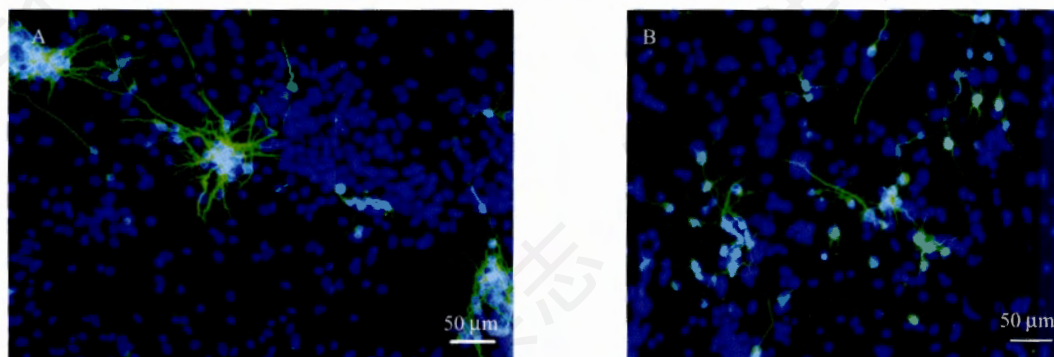


图4 不同干预条件下NPCs分化成神经元的情况

绿色: 抗-Tuj-1免疫荧光染色; 蓝色: DAPI染色。A: 含1%血清的促分化培养基; B: 含1%血清+40 ng/ml BDNF的促分化培养基。

表1 BDNF促进NPCs存活、增殖及分化指标

	样本量(n)	实验对照组	40 ng/ml BDNF组	t/t	P
神经球直径(μm)	5	43.14 \pm 22.79	78.60 \pm 11.23	3.121	0.014
LDH漏出量(U/L)	6	26.08 \pm 1.20	20.56 \pm 2.11	5.55	0.000
凋亡率(%)	7	39 \pm 17	19 \pm 15	2.52	0.027
神经元分化率(%)	5	10 \pm 1	15 \pm 0	7.404	0.001
突起长度(μm)	50	112.66 \pm 43.44	170.06 \pm 53.25	5.906	0.000

实验对照组(39 \pm 17)% ($P<0.05$)。

LDH是一种胞质酶,广泛存在于细胞胞浆内。正常情况下释放很少,当细胞膜的通透性增高或完整性丧失时,LDH扩散进入胞外介质,且释放量与细胞受损程度呈正相关。正常对照组与40 ng/ml BDNF组细胞上清液中LDH的浓度分别为(26.08 \pm 1.20) U/L、(20.56 \pm 2.11) U/L,具有极显著性差异($P<0.01$) (表1)。

2.4 BDNF促进NPCs分化

Tuj-1是神经元的特异性标记蛋白之一。无论是1%胎牛血清还是BDNF均能使NPCs分化为神经元和星形胶质细胞,实验对照组和40 ng/ml BDNF组中NPCs分化为神经元的百分率分别(10 \pm 1)%和(15 \pm 0)%,两者具有极显著性差异($P<0.01$),进而我们对Tuj-1免疫染色阳性的神经元突起进行测量,实验对照组和BDNF组神经元突起的长度分别为(112.66 \pm 43.44) μm 和(170.06 \pm 53.25) μm ,两者具有极显著性差异($P<0.01$) (图4,表1)。

3 讨论

本课题组前期研究表明,持续惊厥发作后,海马齿状回、CA1区及CA3区等部位存在明显的NPCs增殖及局部BDNF表达的增高^[2,3],BDNF是否对NPCs具有一定的调控作用值得关注。Scharfman等^[4]发现,齿状回定位注射BDNF,明显促进正常大鼠齿状回的神经再生水平,但由于体内众多因素的影响,BDN对脑内NPCs的影响的在体研究结果差异很大^[5-7]。因此,本实验采用体外培养的研究方法,单一因素研究BDNF对海马NPCs的影响。

干细胞最基本的特征是具有自我更新和多向分化潜能,NPCs在某些诱导条件下可分化为神经元和胶质细胞,本实验参照Liao等^[8]的实验方法,采用含有EGF和bFGF的无血清培养基,对分离纯化的海马细胞进行培养,证实培养的细胞可进行传代培养,表达NPC的标记蛋白之一nestin,且可分化为神经元和星形胶质细胞,表现出自我更新和多向分化的潜能,具有一般干细胞的特点,提示为NPCs。

为进一步明确BDNF是否对培养的NPCs具有促进存活、增殖及分化作用,本实验以10~200 ng/ml不同浓度的BDNF作用于培养的NPCs,并采用细胞上清液LDH测定及细胞Tunel染色观察BDNF对细胞存活的影响;采用神经球计数及直径测定研究BDNF对细胞增殖的影响;采用Tuj-1染色及突触长度测定观察BDNF对细胞分化的影响。结果显示:10~200 ng/ml BDNF均能促进NPCs的增殖反应,表现为神经球数目的增加,与人胚胎神经干细胞对BDNF的反应类似^[9],BDNF促进NPCs增殖作用与其浓度并无线性量效关系,而以40 ng/ml BDNF促进神经球数目增加最显著,宜为体外研究的最佳作用剂量。进一步与对照组相比发现,40 ng/ml BDNF可显著降低培养细胞Tunel染色阳性率,抑制海马NPCs的凋亡发生,并减少培养上清液中LDH浓度,提示BDNF可减轻细胞的受损程度及促进存活;同时,40 ng/ml BDNF也能促进海马NPCs向神经元方向分化及分化后神经元突起发育,与侧脑室来源的NPCs对BDNF的反应类似^[8]。

本实验结果表明,BDNF对体外分离培养的海马NPCs具有促进存活、增殖及分化的能力,结合本课题组前期在体研究发现持续惊厥后海马NPCs增殖及局部BDNF增高在时间和空间上的一致性,有理由推测BDNF对脑内NPCs可能具有相似作用,能否通过调控持续惊厥后体内BDNF表达,促进NPCs进行有序的增殖、分化与迁移,实现内源性修复持续惊厥后脑损伤值得进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] Abrous DN *et al. Physiol Rev*, 2005, **85**: 523
- [2] 李昕松等. *细胞生物学杂志*, 2007, **29**: 444
- [3] 胡越等. *第三军医大学学报*, 2006, **28**: 1663
- [4] Scharfman H *et al. Exp Neurol*, 2005, **192**: 348
- [5] Pencea V *et al. J Neurosci*, 2001, **21**: 6706
- [6] Lee J *et al. J Mol Neurosci*, 2000, **15**: 99
- [7] Larsson E *et al. Exp Neurol*, 2002, **177**: 1
- [8] Liao H *et al. J Neurosci Res*, 2008, **86**: 27
- [9] Pyle AD *et al. Nat Biotechnol*, 2006, **24**: 344

Enhancement of Survival, Proliferation and Differentiation into Neurons of Neural Progenitor Cells Isolated from Rats Hippocampus by Brain Derived Neurotrophic Factor

Ting-Song Li, Li Jiang*, Heng-Sheng Chen, Xiao-Ping Zhang

(Department of Neurology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract The objective of the study is to explore the effect of brain derived neurotrophic factor (BDNF) on the neural progenitor/stem cells (NPCs) of rat hippocampus. NPCs were obtained from Wistar rats at embryonic day 15-16 and cultured in serum-free medium, then the neurospheres were harvested, fixed and immunostained for nestin (the protein marker of stem cells); NPCs were induced to differentiate with 1% fetal calf serum containing medium; The single NPC was obtained by a mechanical dissociation and grown for 3 days in medium containing BDNF at the concentration of 10–200 ng/ml then the number of neurosphere were counted and the diameter of neurosphere were measured; Tunel staining positive cells and the level of lactic acid dehydrogenase (LDH) in culture medium were used to evaluate the effect of BDNF on the NPCs survival; β tubulin III (Tuj-1) immunostaining was used to label the neurons differentiated from NPCs, and the percentage of Tuj-1 positive cells among DAPI positive cells in the BDNF and control group were compared. Additionally, the length of neurite in Tuj-1 immunostaining positive cells was measured. The results showed that nestin-positive NPCs exhibited the ability of self-proliferation and could be induced to differentiate into neurons and astrocytes. BDNF at the concentration of 10–200 ng/ml enhanced the proliferation of NPCs at the cell density of 5×10^5 cells/ml, while 40 ng/ml BDNF exhibited the strongest proliferation enhancement; Diameter of newly formed neurosphere with 40 ng/ml BDNF was increased obviously while the apoptosis rate (Tunel⁺/DAPI⁺) and LDH leakage of 40 ng/ml BDNF group was significantly decreased compared with the control group. In 40 ng/ml BDNF group, more neurons (Tuj-1⁺ cells) were observed and total neuritic length in Tuj-1⁺ cells were significantly longer, compared to the control group. Our study suggest that BDNF has a neuroprotective effect, can promote NPCs proliferation and induce them differentiation into neurons.

Key words neural progenitor/stem cells; hippocampus; brain derived neurotrophic factor; proliferation; differentiation

Received: November 19, 2007 Accepted: January 29, 2008

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30672217) and Science Foundation of Chongqing Health Bureau (No.06-2-158)

*Corresponding author. Tel: 86-23-63624424, E-mail: dr_jiangli@126.com