

干细胞因子诱导神经干细胞定向迁移

周春雷 魏友华 刘靖 郑彦文 张俊克 王丹 吴丹 苏军 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) 能够定向追踪胶质瘤, 然而其内在作用机制及影响因素尚不明了。本实验运用 Boyden chamber 及 Dunn chamber 来研究干细胞因子 (stem cell factor, SCF) 诱导 C17.2 神经干细胞的趋化性迁移。Boyden chamber 结果显示, 下室加入 SCF 后迁移至膜下方的 C17.2 细胞数显著多于对照组; Dunn chamber 结果显示, 仅在外槽加入 SCF 的 C17.2 细胞迁移速率及迁移效率显著高于内外槽均加入 SCF 的细胞, 单个细胞迁移轨迹分析表明仅在外槽加入 SCF 后细胞朝着浓度梯度方向迁移而内外槽均加入 SCF 后细胞的迁移则无规律。这些结果表明, SCF 能够诱导 C17.2 细胞的定向迁移, 为进一步了解神经干细胞定向追踪胶质瘤提供了理论依据。

关键词 神经干细胞; 干细胞因子; 趋化性; 迁移

胶质瘤是一种常见的颅内恶性肿瘤, 致死率极高。胶质瘤细胞通过分泌生长因子、蛋白水解酶、细胞外基质和表达特异膜蛋白来获得高破坏性的侵袭能力^[1,2], 使得单个瘤细胞极易浸润周围组织, 导致肿瘤复发, 因此用传统的治疗方法如外科手术、放射疗法和化学疗法等很难彻底治愈。利用遗传修饰的细胞跟踪这些散在的瘤细胞, 并将其彻底根除, 成为极具潜力的治疗恶性胶质瘤的方法。神经干细胞 (neural stem cells, NSCs) 具有向脑损伤区域趋化性迁移的能力, 包括向胶质瘤的迁移^[3,4]。动物实验证明移植的 NSCs 可以用来治疗胶质瘤^[4]。这些移植的 NSCs 不仅可以通过脑内已存在的迁移路径进行迁移, 而且当有肿瘤细胞存在时可以通过非正常迁移路径迁移至肿瘤区域^[4], 提示在肿瘤区域分泌了一些可以调节细胞迁移的因子, 而 NSCs 表达这些因子的受体^[5,6]。

研究表明胶质瘤所释放的趋化因子、生长因子及细胞外基质都是引起 NSCs 向胶质瘤定向迁移的重要外在刺激因素^[7~10]。其中干细胞因子 (stem cell factor, SCF) 可与其受体 c-kit 相互作用激活多条信号通路诱导中枢神经系统内的 NSCs 定向迁移^[11,12]。然而 NSCs 应答这些外在刺激并调控自身迁移行为的研究却非常少见。

C17.2 是一种永生化的神经干细胞系, 来源于新生小鼠小脑的外颗粒层细胞, 在含有表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 和碱性成纤维生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 的培养基当中进行培养, 其神经球用含有 V-myc 和 β -半乳糖苷

酶基因的逆转录病毒载体转染并筛选而获得^[13,14], 目前已被广泛用于体内神经干细胞迁移、分化、增殖等相关研究^[15~18]。SCF 是否能诱导 C17.2 细胞的趋化性迁移? SCF 影响了 C17.2 细胞的哪些迁移行为? 这些方面的研究报道不多, 为此本实验主要研究了 SCF 诱导 C17.2 细胞的趋化性迁移行为。

1 材料与方法

1.1 材料

H-DMEM 培养基、胎牛血清 (fatal calf serum, FCS)、马血清 (horse serum, HS) 均购自 Gibco 公司, 胰蛋白酶、EDTA、多聚赖氨酸 (poly-L-lysine, PLL) 均购自 Sigma 公司, L-谷氨酰胺购自上海生工, SCF 购自 Peprtech 公司, 35 mm 培养皿和细胞培养瓶购自美国 Coring/Costar 公司。C17.2 神经干细胞系由美国 Evan Y Snyder 教授授权, 上海大学文铁桥教授赠予。

倒置相差显微镜 (日本 Olympus 公司)、CO₂ 培养箱 (德国 Heraeus 公司)、恒温离心机 (法国 Jouan 公司)、AF-6000 活细胞工作站 (德国 Leica 公司)。

1.2 方法

1.2.1 C17.2 细胞培养 C17.2 细胞在含有 10% FCS 和 5% HS 的 H-DMEM 中培养, 融合度达到 90%~100% 的时候进行传代培养。传代方法为倒掉培养基, 用

收稿日期: 2009-10-13 接受日期: 2010-01-11

国家自然科学基金项目 (No.30671041)、国家重点基础研究发展规划 (973 计划) (No.2005CB623906)、江苏省高校自然科学基金重大基础研究项目 (No.06KJA18025) 资助

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

预热的磷酸缓冲液轻轻清洗两遍, 加入 2 ml 0.05% 胰蛋白酶细胞消化液, 在显微镜下观察, 细胞包体回缩即将脱落时吸掉胰蛋白酶细胞消化液, 轻轻敲打培养瓶底部促进细胞脱落, 加入 1 ml 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瓶中, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 待 2~3 天后, 细胞融合度达到 70%~80% 时可按照 1:2~1:10 不等的比例再次进行传代, 最大比例不超过 1:10。

1.2.2 C17.2 细胞 Boyden chamber 迁移实验 (1) 趋化性定向迁移: 准备一洁净饭盒, 里面垫上一层纱布, 放置一合适的塑料管架, 盛入适量温水(37 °C), 酒精棉球擦拭饭盒外部, 置细胞培养箱。Boyden chamber 下室加入含有不同 SCF 浓度(5、25、50 ng/ml)的培养液, 每孔 30 μl, 取一张膜(左上角剪一缺口)盖住下室 48 孔, 分别盖上软塑片和硬塑片, 拧紧螺帽。取长至融合度 95% 的 C17.2 细胞按照传代的方法消化细胞, 上室每孔加入 50 μl C17.2 细胞(接种密度为 4×10⁴ 个/孔)。将 Boyden chamber 置于刚准备好的饭盒内, 于培养箱内静止 6 h。取出 Boyden chamber, 松开螺帽, 取出膜。夹子夹住膜的两端, 刮去膜上面的细胞, 于磷酸缓冲液中清洗。将通过膜上的孔迁移并粘附在膜下面的细胞置于 4% 多聚甲醛中固定 30 min, 置 5% 结晶紫中染色 10 min, 自来水漂洗, 倒置相差显微镜拍照。统计迁移至膜下方的细胞数, 以下室未加 SCF 的为对照组。(2) 化学激动性迁移: 方法同(1), 唯一不同的是上室加入的是 50 μl 含有不同浓度的 SCF(5、25、50 ng/ml)的 C17.2 细胞, 与下室加入的 SCF 的浓度一致, 以上下室不加 SCF 的为对照组。(3) 运用 Dunn chamber 研究 C17.2 细胞的趋化性迁移: Dunn chamber 的外槽内加入趋化剂后能扩散至内槽并形成浓度梯度, 而且这种浓度梯度能够保持 30 h。在趋化性定向迁移实验中, Dunn chamber 的内槽加入 H-DMEM, 将长有 C17.2 细胞的盖片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朝, 工业凡士林封住盖片的三面, 吸水纸吸出外槽的液体后加入 50 ng/ml SCF (H-DMEM 稀释), 工业凡士林封口; 在化学激动性迁移实验中, 内外槽均加入 50 ng/ml SCF (H-DMEM 稀释)。使用 Leica AF6000 活细胞工作站对桥上的细胞运动进行跟踪观察, 每隔 5 min 拍摄一次, 持续跟踪观察 6 h。为了测定在 6 h 内细胞迁移的有效性, 使用 NIH ImageJ 软件分析 C17.2 细胞迁移的具体轨迹, 计算各细胞的实际迁移距离并测量细胞迁移过程

中的迁移效率(forward migration index, FMI)。FMI 为细胞迁移起始点到终点的最短距离与细胞迁移总距离的比值, 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。同时计算 6 h 内 C17.2 细胞的迁移速率。(4) 统计学分析: 实验数据和统计量化图由 SYSTAT SigmaPlot 和 SYSTAT SigmaStat 计算并绘制, 计量资料以均数 ± 标准误 (mean±SEM)表示, P<0.05 认为有显著性差异性。

2 结果

2.1 SCF 能够诱导 C17.2 细胞的迁移

在体外利用 Boyden chamber 来分析 SCF 诱导 C17.2 细胞的定向迁移。将培养的 C17.2 细胞以 4×10⁴ 个/孔的密度接种至 Boyden chamber 上室, 来检测其向不同浓度的 SCF 定向迁移能力。将通过膜孔迁移至膜下的细胞固定, 用结晶紫染色并计数。完全穿过膜孔并粘附在膜下方的定义为一个阳性细胞。随机选取实验组和对照组各 10 个视野, 细胞计数。与对照组相比, 下室加入了不同浓度 SCF (5、25、50 ng/ml)的实验组均显著提高了 C17.2 细胞的迁移响应能力, 迁移至膜下方的细胞数明显多于对照组, 在 25 ng/ml 时迁移的细胞数达到最大值(图 1)。

2.2 SCF 诱导 C17.2 细胞趋化性定向迁移

为了区分趋化性定向迁移(chemotaxis)和化学激动性迁移(chemokinesis), 我们在上下室同时加入相同浓度的 SCF (chemokinesis)或只在下室加入 SCF (chemotaxis)来研究其迁移行为。上下室同时加入相同浓度 SCF 的细胞迁移数与对照组无明显差异(图 1), 但显著低于只在下室加入 SCF 的细胞迁移数(图 1)。这表明 SCF 诱导 C17.2 细胞趋化性定向迁移。

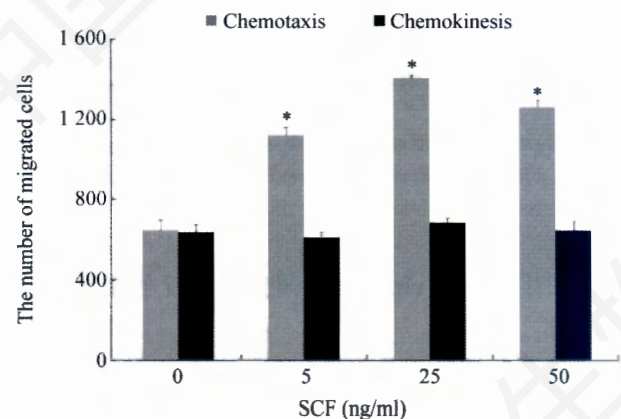


Fig.1 Stem cell factor (SCF) induces migration of C17.2 cells mainly through chemotaxis *in vitro*

*P<0.05, compared with no SCF added into the lower well.

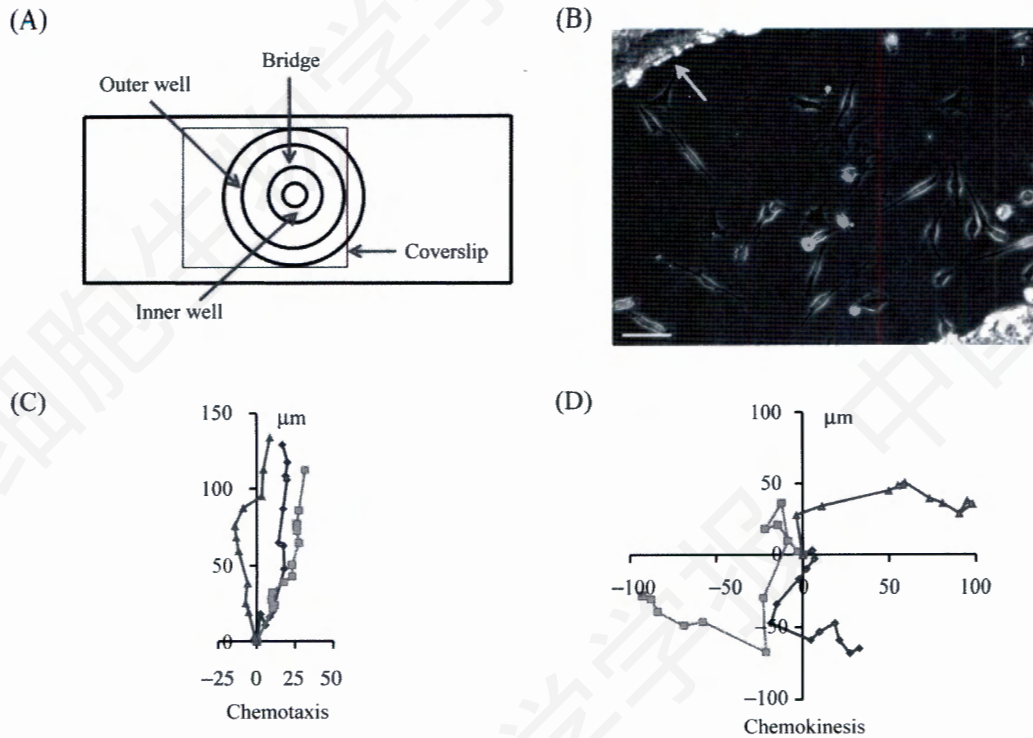


Fig.2 Migration tracks of representative cells (μm)

A: schematic representation of Dunn chamber (top view) with the overlying coverslip, showing the position of the inner well, bridge, and outer well; B: cells over the annular bridge between the inner and outer wells of the chamber can be observed under phase-contrast optics. Arrow indicates the direction of the outer well of the Dunn chamber. Bar=100 μm ; C: migration tracks of three representative cells in the presence of a SCF concentration gradient. The starting point for each cell is the intersection between the X and Y axes (0,0), and the source of SCF is at the top; D: migration tracks of three representative cells that migrate randomly under conditions of uniform SCF distribution. The starting point for each cell is the intersection between the X and Y axes (0,0).

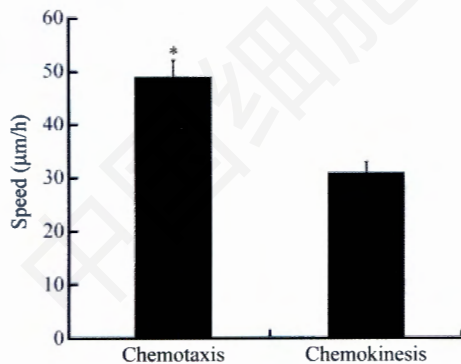


Fig.3 The migration speed ($\mu\text{m/h}$) under different conditions

* $P < 0.05$, compared with chemokinesis, in which SCF (50 ng/ml) were added in both inner and outer wells of the chamber.

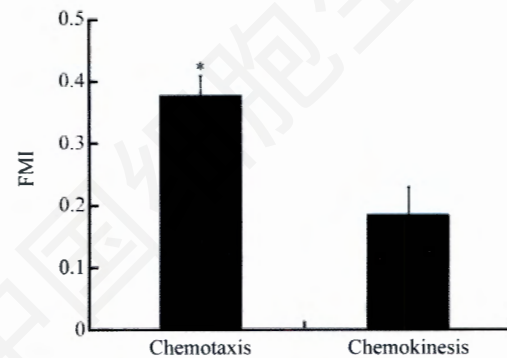


Fig.4 The FMI values under different conditions

* $P < 0.05$, compared with chemokinesis, in which SCF (50 ng/ml) were added in both inner and outer wells of the chamber.

2.3 利用 Dunn chamber 研究 C17.2 细胞的趋化性迁移

接着分析了单个 C17.2 细胞在 SCF 浓度梯度中的趋向性迁移行为。利用 Dunn chamber (图 2A) 这种装置, 可以直接测定细胞的迁移速率和迁移方向。我们通过延时动态视频跟踪观察 C17.2 细胞在 6 h 内迁移的具体位置(图 2B), 由 Imang J 软件分析得出单

个细胞的迁移轨迹(图 2C), 迁移轨迹图的 Y 轴为趋化因子的浓度梯度方向, 结果表明仅在外槽加入 50 ng/ml SCF 的 C17.2 细胞朝着 SCF 的浓度梯度方向迁移, 表现为趋化性定向迁移; 而内外槽均加入 50 ng/ml 的 SCF 的细胞迁移轨迹无规律, 表现为化学激动性迁移(图 2D)。分析数据表明, 趋化性定向迁移的细胞的迁移速率和 FMI 均要显著高于化学激动性迁移的细

胞(图3、图4)。

3 讨论

用传统治疗癌症的方法来治疗颅内恶性肿瘤收效甚微,放射及化学药物治疗给予肿瘤细胞以抵抗力,而且肿瘤细胞天生的浸润性也使肿瘤极易复发^[19]。最近有多项研究提供了不同的治疗方法,如利用溶瘤病毒和基因治疗等,但是极具浸润性的脑肿瘤仍然无法彻底治愈。这些方法主要的缺点是运用的载体还不健全,免疫排斥导致存活率低而且治疗性的载体无法追踪浸润的肿瘤细胞。因此需要寻找一种能有效的将治疗性药物快速地传递到肿瘤区域的运输载体。Aboody等^[4]研究发现,将NSCs植入胶质瘤模型鼠体内后,一段时间后NSCs会遍布整个肿瘤区域,并随胶质瘤的迁移而向其他部位运动;如果将NSCs植入远离肿瘤部位的脑另一侧,NSCs也会穿过正常组织向肿瘤部位迁移。NSCs具备的肿瘤趋向性使得它们能够成为稳定的载体,从而携带基因工程药物定向攻击侵入脑内任何部位的神经胶质瘤细胞以及其他的恶性黑色素瘤、髓母细胞瘤和成神经细胞瘤。

然而,并不是所有的NSCs都发生了这种有效的迁移,仍有部分细胞停留在原地或者是迁移中途就停止了^[20]。神经胶质瘤细胞可以释放多种炎症趋化因子和生长因子,这些因子可以诱导NSCs定向迁移至肿瘤细胞所在区域,如基质细胞衍生因子1 α (stromal cell-derived factor-1, SDF-1 α), SCF和单核细胞趋化蛋白(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)^[7-10]。最初是发现它们可有效诱导造血细胞的迁移,近年来的研究表明还可以刺激NSCs的定向迁移^[8,9,12,21,22]。C17.2细胞系作为一种神经干细胞系,它拥有NSCs包括自我增殖及多向分化潜在在内的各方面特性。体内移植的C17.2细胞能够在脑损伤区域存活下来并分化成神经元或胶质细胞,进而减弱外伤性脑损伤所带来的大脑功能性障碍^[23]。本研究利用Boyden chamber分析发现,在体外SCF能够定向诱导C17.2细胞的迁移。当下室加入SCF后,迁移的细胞数要明显高于未加SCF的对照组,在25 ng/ml时迁移的细胞数达到最大值。当上下室均加入相同浓度的SCF时,迁移的细胞数与对照组并无显著差异,表明C17.2细胞向SCF作趋化性定向迁移。

然而神经胶质瘤细胞及其释放的各种因子诱导NSCs定向迁移的机制至今仍不清楚,尤其是影响了NSCs的哪些迁移行为还不是很清楚,而对此的研究将有利于利用NSCs作为肿瘤药物的载体定向治疗大

脑内胶质瘤等神经性疾病。本研究在体外利用Dunn chamber通过延时动态视频持续跟踪分析C17.2细胞迁移行为的变化,分析单个细胞迁移轨迹显示,C17.2细胞朝着SCF的浓度梯度方向进行迁移,表明C17.2细胞对SCF有明显的趋向性。分析其迁移的速率及迁移的有效性发现,SCF能显著提高C17.2细胞的迁移速率而且其迁移的有效性也得到显著提高。有研究报告SCF可与其受体c-kit相结合,诱导中枢神经系统内NSCs的迁移^[11,12],并且SCF与其受体c-kit相结合后可以激活多条信号通路^[24,25],SCF引起C17.2细胞迁移行为的变化是否正是由于SCF与其受体c-kit相结合后激活了相应的信号通路还需要进行深入的研究。

综上所述,本实验结果表明,SCF能够诱导C17.2细胞的定向迁移,SCF不仅能提高C17.2细胞的迁移速率而且能够提高其迁移的有效性,为进一步了解神经干细胞定向追踪胶质瘤提供了理论依据。

参考文献(References)

- 1 Tysnes BB, Mahesparan R. Biological mechanisms of glioma invasion and potential therapeutic targets. *J Neurooncol* 2001; 53(2):129-47.
- 2 Mueller MM, Werbowetski T, Del Maestro RF. Soluble factors involved in glioma invasion. *Acta Neurochir (Wien)* 2003; 145(11): 999-1008.
- 3 Benedetti S, Pirola B, Pollo B, Magrassi L, Bruzzone MG, Rigamonti D, *et al.* Gene therapy of experimental brain tumors using neural progenitor cells. *Nat Med* 2000; 6(4): 447-50.
- 4 Aboody KS, Brown A, Rainov NG, Bower KA, Liu S, Yang W, *et al.* Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(23): 12846-51.
- 5 Brown AB, Yang W, Schmidt NO, Carroll R, Leishear KK, Rainov NG, *et al.* Intravascular delivery of neural stem cell lines to target intracranial and extracranial tumors of neural and non-neural origin. *Hum Gene Ther* 2003; 14(18): 1777-85.
- 6 Allport JR, Shinde Patil VR, Weissleder R. Murine neuronal progenitor cells are preferentially recruited to tumor vasculature via alpha4-integrin and SDF-1alpha-dependent mechanisms. *Cancer Biol Ther* 2004; 3(9): 838-44.
- 7 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.
- 8 Imitola J, Raddassi K, Park KI, Mueller FJ, Nieto M, Teng YD, *et al.* Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1alpha/CXC chemokine receptor 4 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(52): 18117-22.
- 9 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.
- 10 Ziu M, Schmidt NO, Cargioli TG, Aboody KS, Black PM, Carroll RS. Glioma-produced extracellular matrix influences brain tumor tropism of human neural stem cells. *J Neurooncol* 2006; 79

- (2): 125-33.
- 11 Bantubungi K, Blum D, Cuvelier L, Wislet-Gendebien S, Rogister B, Brouillet E, *et al.* Stem cell factor and mesenchymal and neural stem cell transplantation in a rat model of Huntington's disease. *Mol Cell Neurosci* 2008; 37(3): 454-70.
 - 12 Erlandsson A, Larsson J, Forsberg-Nilsson K. Stem cell factor is a chemoattractant and a survival factor for CNS stem cells. *Exp Cell Res* 2004; 301(2): 201-10.
 - 13 Ryder EF, Snyder EY, Cepko CL. Establishment and characterization of multipotent neural cell lines using retrovirus vector-mediated oncogene transfer. *J Neurobiol* 1990; 21(2): 356-75.
 - 14 Snyder EY, Deitcher DL, Walsh C, Arnold-Aldea S, Hartweg EA, Cepko CL. Multipotent neural cell lines can engraft and participate in development of mouse cerebellum. *Cell* 1992; 68(1): 33-51.
 - 15 Liu WG, Wang XJ, Lu GQ, Li B, Wang G, Chen SD. Dopaminergic regeneration by neurturin-overexpressing c17.2 neural stem cells in a rat model of Parkinson's disease. *Mol Neurodegener* 2007; 2: 19.
 - 16 Magge SN, Malik SZ, Royo NC, Chen HI, Yu L, Snyder EY, *et al.* Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) in migration of neural progenitor cells toward glial tumors. *J Neurosci Res* 2009; 87(7): 1547-55.
 - 17 Neville CM, Huang AY, Shyu JY, Snyder EY, Hadlock TA, Sundback CA. Neural precursor cell lines promote neurite branching. *Int J Neurosci* 2009; 119(1): 15-39.
 - 18 Wang XJ, Liu WG, Zhang YH, Lu GQ, Chen SD. Effect of transplantation of c17.2 cells transfected with interleukin-10 gene on intracerebral immune response in rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2007; 423(2): 95-9.
 - 19 Giese A, Bjerkvig R, Berens ME, Westphal M. Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J Clin Oncol* 2003; 21(8): 1624-36.
 - 20 Brekke C, Williams SC, Price J, Thorsen F, Modo M. Cellular multiparametric MRI of neural stem cell therapy in a rat glioma model. *Neuroimage* 2007; 37(3): 769-82.
 - 21 Widera D, Holtkamp W, Entschladen F, Niggemann B, Zanker K, Kaltschmidt B, *et al.* MCP-1 induces migration of adult neural stem cells. *Eur J Cell Biol* 2004; 83(8): 381-7.
 - 22 Sun L, Lee J, Fine HA. Neuronally expressed stem cell factor induces neural stem cell migration to areas of brain injury. *J Clin Invest* 2004; 113(9): 1364-74.
 - 23 Riess P, Zhang C, Saatman KE, Laurer HL, Longhi LG, Raghupathi R, *et al.* Transplanted neural stem cells survive, differentiate, and improve neurological motor function after experimental traumatic brain injury. *Neurosurgery* 2002; 51(4): 1043-52; discussion 1052-4.
 - 24 Linnekin D. Early signaling pathways activated by c-Kit in hematopoietic cells. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31(10): 1053-74.
 - 25 Wandzioch E, Edling CE, Palmer RH, Carlsson L, Hallberg B. Activation of the MAP kinase pathway by c-Kit is PI-3 kinase dependent in hematopoietic progenitor/stem cell lines. *Blood* 2004; 104(1): 51-7.

Stem Cell Factor Induces Directional Migration of Neural Stem Cells

Chun-Lei Zhou, You-Hua Wei, Jing Liu, Yan-Wen Zheng, Jun-Ke Zhang, Dan Wang,

Dan Wu, Jun Su, Huan-Xiang Zhang*

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

Abstract Neural stem cells (NSCs) can directly migrate towards glioma. However, the mechanisms and factors that regulate migration are not well understood. In this study, we investigated stem cell factor (SCF) induced C17.2 cells migration by Boyden chamber and Dunn chamber. Compared with the control, the results of Boyden chamber showed that the number of the cells migrated to the lower well through a filter of 8-mm pore size was significantly higher than control when the SCF was added into the lower well. The Dunn chamber results indicated both the migration speed and the forward migration index (FMI) of cells exposed to SCF were significantly greater than those of cells exposed to a uniform concentration of SCF. The cell migration pattern also displayed a directed migration behavior towards the source of SCF in concentration gradients of SCF, while cells migrated randomly under conditions of uniform SCF distribution. These results illustrate that SCF induces the directional migration of C17.2 cells via the increase in the migration efficiency and the migration speed of these cells, which would provide data to understand the mechanisms of glioma-induced migration of NSCs.

Key words neural stem cells; stem cell factor; tropism; migration

Received: October 13, 2009 Accepted: January 11, 2010

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30671041), the National Basic Research Program of China (973 Program) (No.2005CB623906), the Natural Science Foundation for Key Basic Research Project of the Jiangsu Higher Education Institutions of China (No.06KJA18025)

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