

三维神经干细胞分化模型在神经药物检测中的应用

刘庆喜¹ 吴玥婷^{1,2} 孙 贺¹ 崔占峰³ 李朝晖^{3*}

(¹天津卫凯生物工程有限公司, 天津 300457; ²天津中医药大学, 天津市现代中药重点实验室, 天津 300193;

³英国牛津大学, 生物医学工程研究所, 牛津 OX13PJ)

摘要 将神经干细胞接种在透明质酸支架进行三维(3D)培养, 使用传统平面(2D)培养做对比, 经诱导培养基进行1, 7, 14 d诱导分化。采用细胞免疫组织化学和Real-time PCR技术检测神经干细胞特异性标记物巢蛋白(nestin)、神经元微管蛋白(tubulin)及胶质细胞胶原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)在蛋白水平和mRNA水平上的变化; CCK-8和活细胞染色技术检测神经细胞的增殖能力及神经细胞膜损伤修复效果。结果显示, 神经干细胞在3D和2D培养条件下经诱导培养基诱导14 d后, tubulin表达量明显增加, 而GFAP表达量降低, 3D效果更加明显。CCK-8和活细胞染色结果显示, 干细胞在3D培养条件下较2D培养条件下其分化和分化后的神经细胞膜损伤修复效果显著。三维培养模型能够对神经细胞分化后的药物损伤模型起到更好的保护作用。因此认为, 3D透明质酸-神经细胞分化模型是更适合于构建体外神经药物筛选及安全性检测的优势模型。

关键词 神经干细胞分化; 3D培养; 透明质酸; 体外药物检测模型; 膜损伤修复

Development of A 3D Stem Cell-derived Neuron Model for Neuronal Drug Testing

Liu Qingxi¹, Wu Yueting^{1,2}, Sun He¹, Cui Zhanfeng³, Li Zhaohui^{3*}

(¹Tianjin Weikai Bioeng Ltd., Tianjin 300457, China; ²Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; ³Institute of Biomedical Engineering, Oxford University, Oxford OX13PJ, UK)

Abstract The neural stem cells were cultured in hyaluronic acid-based three-dimensional (3D) scaffold and induced differentiation for 1, 7 and 14 days, besides the conventional two-dimensional (2D) culture was set as a control. The expressions of stemness marker (nestin), neuronal marker (tubulin) and glial cell marker (glial fibrillary acidic protein, GFAP) were detected using immunocytochemistry staining and Real-time PCR; The cell survival and proliferation ability during differentiation culture and drug testing were assayed using the CCK-8 Kit and Live-Dead Cell Staining Kit. During culture period, tubulin expression was significantly increased and glial cell marker GFAP expression reduced, whereas the changes observed in 3D model were more obvious. Cells cultured in the 3D model were shown a significant protective effect on drug-induced nerve damage post differentiation. Neural stem cells cultured in 3D hydrogel retained a high differentiation potential to form neuron cells compared to conventional 2D culture. The 3D culture model could provide an additional protection on drug-induced nerve damage post differentiation, also the developed 3D stem cell-derived neuronal model could be an advanced *in-vitro* model for drug toxicity testing and for efficacy and safety assessments in stem cell therapy to treat neurodegenerative diseases.

Keywords neural stem cell differentiation; three-dimensional culture; hyaluronic acid; *in-vitro* drug testing model; membrane damage repair

收稿日期: 2014-12-16 接受日期: 2015-02-10

国家科技部国际合作项目(批准号: 2011DFA31960)资助的课题

*通讯作者。Tel: +0044-186-5617654, E-mail: zhaohui.li@eng.ox.ac.uk

Received: December 16, 2014 Accepted: February 10, 2015

This work was supported by the Foundation of the International Cooperation Project of Science and Technology Ministry of China (Grant No.2011DFA31960)

*Corresponding author. Tel: +0044-186-5617654, E-mail: zhaohui.li@eng.ox.ac.uk

网络出版时间: 2015-04-28 10:39

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150428.1039.001.html>

目前普遍使用的神经细胞体外培养方法多为单层贴壁培养(2D)以及3D无支架神经球培养。单层贴壁培养以1952年Dulbecco开展的单层传代培养为代表^[1], 标志着进入了细胞体外研究时代。此种方法优点包括操作简单、环境可控性强、样品特征性和均一性好等。其局限性在于细胞在体外去分化, 使其在体外很难完成细胞某些代谢功能的研究。3D无支架培养以Reynold所创立的“神经球”为代表^[2], 实现了神经干细胞(neural stem cells, NSCs)高密度3D悬浮培养, 但随着神经球尺寸的增大, 球内细胞生长所需营养无法及时从球外获得, 导致球中心部位出现大量细胞凋亡和坏死。而另一种3D培养方法, 称为3D有支架培养方法, 是将细胞接种到特定的支架材料上来支持细胞在3D空间的生长^[3-4]。因人体组织具有3D复杂结构^[5], 细胞和细胞之间、细胞和细胞外基质之间的相互作用是维持细胞活性和功能的基础。所以, 3D有支架培养方法能更好地模拟体内的基质和血液循环的环境^[6], 从而实现更接近于人体细胞内环境的体外细胞研究, 例如, 胚胎干细胞可以在比较柔软的3D支架中诱导分化成神经细胞^[6]。

透明质酸(hyaluronic acid, HA)是一种分布在多种组织细胞外基质的蛋白多糖, 具有特殊的生物学活性, 既能够提供支架结构、帮助信号传导, 又能促进干细胞增殖、迁移、分化和修复等, 且具有无毒、低免疫反应、高生物相容、生物可分解以及人体可吸收等特性^[6-8]。近年来, 人们尝试采用透明质酸作为3D支架^[5], 把几种干细胞接种到透明质酸中, 取得了初步的成功。尽管许多研究从适合细胞生长的角度证实了透明质酸适合多种干细胞的生长特性, 但有关透明质酸3D培养对神经干细胞诱导分化的影响^[6-8,10]的研究报道较为罕见。

本实验的目的是建立一个更接近于体内微环境的体外3D神经细胞分化模型, 用于神经药物毒性和有效性检测。此模型的建立首先是使用神经干细胞在3D透明质酸支架内分化, 并在分化的不同阶段检测分化程度, 优化分化培养条件。之后使用优化的分化后神经模型进行药物诱导下神经细胞膜损伤修复的研究, 并将3D干细胞分化和神经细胞膜损伤修复效果和2D分化模型进行比较, 从而确立了3D透明质酸-神经细胞分化模型是更适合于构建体外神经药物筛选及安全性检测的优势模型。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 动物 孕14 d SD胎鼠购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心, 级别为SPF级, 许可证号: SCXK-(军)2012-0004。实验过程中对动物的处理符合动物伦理学标准。

1.1.2 试剂 DMEM培养液、F12、bFGF、EGF、B27、N2、Glutamax、Heparin、BSA、D-Glucose、Laminin购自Gibco公司; Live/Dead Viability-Cytotoxicity Kit购自Invitrogen公司; 青链霉素混合液、RPMI1640培养液、Accutase™、NaHCO₃、NaCl、Retinoic acid、RA、HyStem Cell Culture Scaffold Kit购自Sigma公司; CCK-8 Kit购自BestBio公司; Anti-nes-tin IgG、Anti-tubulin IgG、Anti-GFAP IgG购自Abcam公司; HEPES购自Roche公司; TRITC标记山羊抗兔二抗IgG、山羊抗小鼠二抗IgG购自中杉金桥公司。

1.1.3 仪器 超净工作台(CA-920-3, 上海净化设备厂); 血球计数板(XB-K-25, 上海市求精生化试剂仪器有限公司); 离心机(Z323, HERMLE公司, 德国); 超纯水机(Millipore-Q-Synthesis公司, 法国); CO₂培养箱(HERA cell, Kendro Laboratory Products公司, 德国); 酶标仪(SPECTRAFLUOR, TECAN, Sunrise公司, 奥地利); 高压灭菌器(SS-325, TOMY KOGYO公司, 日本); 荧光倒置显微镜(IX70-131, OLYMPUS公司, 日本); 水浴振荡器(SHA-C, 江苏安普电子工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 3D透明质酸破碎水凝胶支架制备 根据HyStem Cell Culture Scaffold Kit说明书对各溶液进行配制, 按照实验计划将HyStem溶液与Extralink溶液以4:0.7(v/v)的比例在1.5 mL离心管中混合均匀(例如, 400 μ L HyStem配70 μ L Extralink), 120 \times g离心5 s。由于两者的交联极易发生, 需将离心后的溶液快速转至2 mL注射器中(采用0.5 mm \times 16 mm的针头吸入的方式), 尽量排尽注射器内的空气, 以免造成后续实验操作的难度。

将含有混合溶液的注射器针头朝下倒置于培养箱中, 20 min后, 弹动注射器管壁可见透明质酸水凝胶形成。取1.5 mL离心管, 推动注射器将水凝胶打进离心管中, 120 \times g离心10 s使离心管壁的水凝胶沉入底部。将浓度为1 mg/mL的层黏连蛋白(laminin)以1:0.1(v/v)的比例加入离心后的水凝胶, 搅动使其

使用浓度为0.1 mg/mL。将36 μ L混合后的凝胶添加至孔板内,轻轻拍打孔板,以保证水凝胶均匀分布。

1.2.2 细胞分离培养及诱导分化 取孕14 d SD大鼠,引颈处死。摘除子宫并用PBS清洗,取出胚胎,放入盛有新鲜无菌PBS的培养皿中,取胚胎头部并放入新培养皿中,在体式显微镜下撕开并除去胚胎头部的两层膜,暴露整个脑组织。取海马区放入盛有新鲜培养基的平皿中,用眼科剪剪成1 mm³大小的碎块,加入1 mL AccutaseTM, 37 °C震荡10 min并用吸管反复吹打20次,消化成单细胞悬液。离心去除上清,加入适量新鲜培养基重悬细胞计数,以 1×10^8 /L的密度接种于25 cm²培养瓶中,进行原代及继代培养。

神经干细胞完全培养基主要成分为: DMEM/F12/RPMI1640(1:1:1), EGF 20 ng/mL, bFGF 10 ng/mL, Heparin 5 mg/mL, HEPES 5 mmol/L, Glucose 23.33 mmol/L, Glutamax 3 mmol/L, 1% B27。标准培养基为: RPMI1640, 10% FBS, 1% MEM, 1% Pen/Strep。分化培养基主要成分为: RPMI1640, 10% FBS, 1% MEM, 1% Pen/Strep, 10 μ mol/L Retinoic acid。维持培养基主要成分为: Neurobasal Medium A, 2% B27, 50 μ g/L BDNF, 10 μ g/L NGF, 1% MEM, 1% Pen/Strep。

细胞以相同的密度分别接种于2D和3D培养板中,使用标准培养基过夜培养,待细胞贴壁后换成诱导培养基诱导7 d,然后换成神经元维持培养基继续培养,细胞诱导培养期间,2D与3D模型下的细胞以相同的处理方式对细胞进行诱导换液培养。

1.2.3 细胞活力检测 采用CCK-8法及死活染色方法检测神经干细胞在不同培养模式下细胞的活力,将各组细胞以 1×10^5 /孔铺板, CCK-8液/培养基(1/10)浓度稀释后加入各组培养孔内,于5% CO₂、37 °C条件下培养2 h,酶标仪450 nm波长测定其吸光值,吸光值越高表明细胞的存活率越高。死活染色原理是:活细胞与钙黄绿素结合后,在激发光的作用下发出强烈的绿色荧光;而死细胞由于细胞膜破损,乙啶同型二聚体能够与细胞内的核酸结合,产生强烈的红色荧光。方法:弃掉培养基,0.01 mol/L PBS浸洗2~3次,每次5 min,配制Calcein AM及EthD-1工作液至4 μ mol/L,加入适量工作液到培养孔中,孵育250 min后,吸弃染液并用0.01 mol/L PBS浸洗2~3次,每次5 min,在倒置荧光显微镜下观察细胞生长状态。

1.2.4 免疫细胞化学染色 弃培养基,用新鲜的0.01 mol/L PBS洗3次,每次5 min;加入4%多聚甲

醛,固定20 min后用0.01 mol/L的PBS润洗3次,每次5 min;加入0.25% Triton X-100作用15 min后,用羊血清封闭30 min。添加鼠抗nestin单克隆抗体(1:250)、鼠抗tubulin(1:250)单克隆抗体和兔抗GFAP(1:500)多克隆抗体(双染),4 °C过夜后加入FITC标记的山羊抗兔和TRITC标记的山羊抗兔二抗液,避光孵育2 h。之后Hoechst 33342核染10 min,用0.01 mol/L PBS浸洗3次,每次5 min,于荧光显微镜下观察拍照。

1.2.5 Real-time PCR检测 在已加入0.5 mL预冷Trizol的样品中加100 μ L预冷的氯仿,振荡30 min,13 000 r/min、4 °C离心15 min。取出上清,再次加入等体积预冷的氯仿震荡,13 000 r/min、4 °C离心15 min。取出上清液,加等体积预冷异丙醇,室温放置20 min,13 000 r/min、4 °C离心15 min。小心吸去上清液,将离心管倒置,使液体尽量流干。用0.5 mL冰上预冷的70%乙醇(DEPC水配制)重悬RNA沉淀进行洗涤,13 000 r/min、4 °C离心5 min,弃上清,重复1次,吸除乙醇后13 000 r/min、4 °C离心3 min,重复1次,室温干燥。用20 μ L灭过菌的DEPC水溶解RNA样品,取3 μ L进行RNA胶电泳,其余样品-80 °C保存备用。

使用反转录试剂盒进行cDNA第一链合成,根据说明书将7 μ L的总RNA和1 μ L的Random Primer(N9)混匀,65 °C孵育5 min,迅速冰浴2 min;随后加入10 μ L 2 \times TS Reaction Mix、1 μ L TransScript RT Enzyme Mix和1 μ L DNA Remover混匀后,25 °C孵育10 min,42 °C孵育30 min,85 °C加热5 min失活TransScript RT,即得到cDNA第一链。

以cDNA第一链为PCR模板进行Real-time PCR反应,20 μ L的反应体系为:10 μ L 2 \times Power qPCR PreMix、上下游引物各0.4 μ L(终浓度0.2 μ mol/L)、cDNA模板2 μ L和0.4 μ L 50 \times Rox Reference Dye,最后用ddH₂O补至20 μ L。

Real-time PCR扩增程序:95 °C预变性10 min,95 °C 10 s,60 °C 20 s,72 °C 31 s(采集信号),40个循环;融解曲线反应程序:95 °C 1 min,60 °C 15 s,从60 °C按照1%的速率递进升温到95 °C,恒温10 s(采集信号);25 °C 15 s。

1.2.6 3D培养条件中药物对氧化损伤下的神经细胞的保护作用 槲皮素(quercetin, Que)是银杏叶提取物中黄酮类化合物的主要成分之一,其对黑质多巴胺能神经元损伤有显著的预防作用。先将槲皮素溶

解于DMSO中配制成母液,加药前用维持培养基稀释成100, 200, 400 $\mu\text{mol/L}$ 的药液,分别加至已分化培养了14 d的细胞-HA支架模型中构成三个药物干预组,每个浓度设3个平行孔,阳性药干预组更换生育酚(Tocopherol, VE)药液,96孔板内每孔150 μL 。空白对照组和 H_2O_2 损伤模型组更换同样体积的不含槲皮素的维持培养基。孵育30 h后,再向 H_2O_2 组、槲皮素和阳性药干预组加入终浓度为160 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 损伤药液,每孔150 μL 。继续培养8 h后吸弃上层药液,采用CCK-8及Live/Dead Viability-Cytotoxicity Kit分别检测空白对照组、 H_2O_2 膜损伤修复模型组及药物干预组的细胞活力。具体方法如1.2.2所示。

1.3 数据统计

用SPSS 17.0软件进行分析,实验数据以 $\text{mean}\pm\text{S.D.}$ 形式表示, $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著。

2 结果

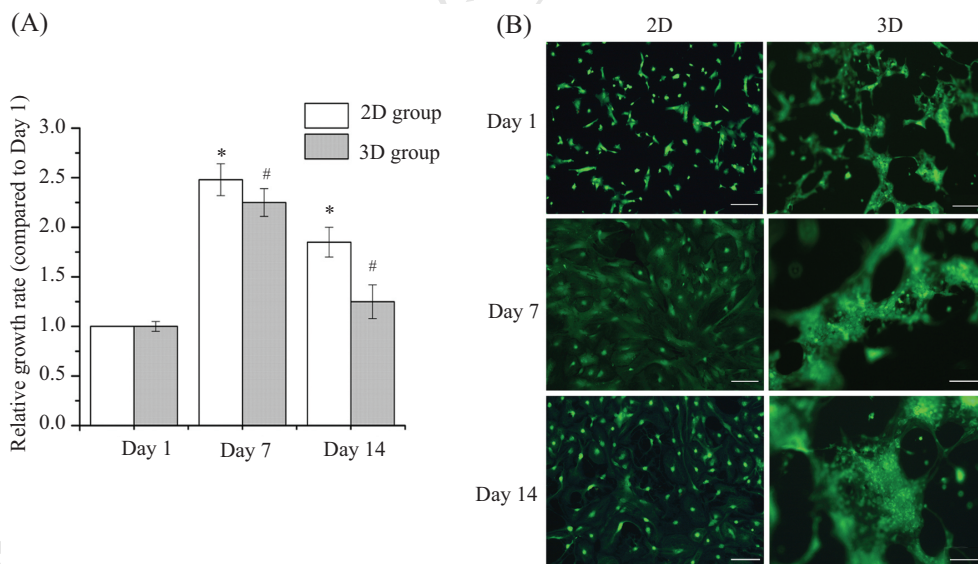
2.1 神经干细胞在3D分化模型与传统2D分化模型中增殖能力和活细胞染色的比较

将大鼠NSCs以 1×10^5 /孔的密度接种在培养板

中,以神经元诱导培养基诱导7 d,更换神经元培养基继续培养细胞14 d。使用CCK-8试剂盒检测神经干细胞在分化培养过程中的增殖能力。CCK-8结果显示,诱导1~7 d,在2D和3D培养条件下细胞呈现显著增殖;第8~14 d,细胞增殖明显降低。增殖能力减弱说明神经干细胞已经开始分化。而生长在2D条件下的细胞增殖速度明显高于生长在3D条件的细胞,表明3D培养条件更易于干细胞的分化,同时可以抑制干细胞不可控的增殖趋势(图1A)。死活细胞染色结果显示,在培养过程中,细胞在3D和2D培养条件下均能正常生长,没有明显的细胞死亡现象(图1B)。

2.2 神经干细胞在3D分化模型与传统2D分化模型中分化能力的比较

采用免疫荧光的方法观察神经干细胞在3D和2D培养条件下,经诱导后第1, 7, 14 d的细胞干性标记物nestin、神经元细胞标记物tubulin和胶质细胞标记物GFAP的表达。Nestin在诱导第7~14 d,免疫荧光有变暗的趋势,这种变化在3D培养条件下尤为突出,说明诱导后神经干细胞的干性减弱。Tubulin在诱导第1~14 d,免疫荧光逐渐增强,说明神经干细胞已

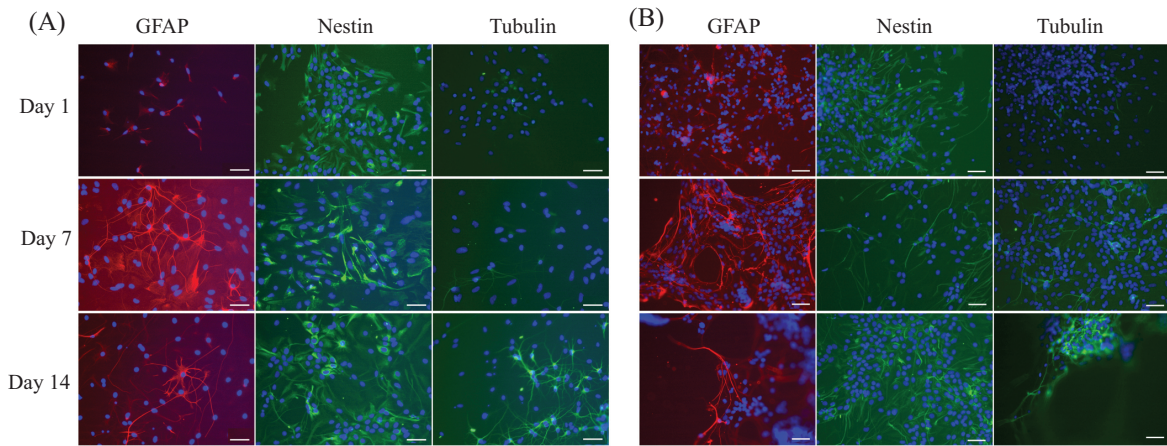


A: 神经干细胞在3D和2D培养条件下诱导分化后的增殖能力比较。实验独立重复3次,数据以 $\text{mean}\pm\text{S.D.}$ 形式表示。 $*P<0.05$, $\#P<0.05$,2D/3D第7 d、第14 d分别与相应第1 d进行比较。 $*$ 为2D组, $\#$ 为3D组;B: 神经干细胞在3D和2D培养条件下诱导分化后活性比较。活细胞为绿色,死细胞为红色。标尺=100 μm 。

A: proliferation potential of neural stem cells during induced differentiation in 3D and 2D culture conditions. Data were presented as the $\text{mean}\pm\text{S.D.}$ of three independent experiments. $*P<0.05$, $\#P<0.05$, 2D/3D group for Day 7 and Day 14 vs Day 1, respectively. $*$ stands for 2D group, $\#$ stands for 3D group; B: viability staining of neural stem cells during induced differentiation in 3D and 2D culture conditions. Live cells were in green while dead cells were in red. Scale bars=100 μm .

图1 诱导培养基对神经干细胞在2D和3D模型中增殖能力的影响

Fig.1 The effect of induction medium on neural stem cell proliferation in 2D and 3D models



A: 在2D分化模型中, nestin、tubulin和GFAP的表达; B: 在3D分化模型中, nestin、tubulin和GFAP的表达。红色为GFAP阳性, 绿色为nestin和tubulin阳性, 蓝色为细胞核, 标尺=50 μm 。

A: the expressions of nestin, tubulin and GFAP in 2D differentiation model; B: the expressions of nestin, tubulin and GFAP in 3D differentiation model. Red represented GFAP positive, nestin and tubulin were shown in green while the nucleus were in blue, Scale bars=50 μm .

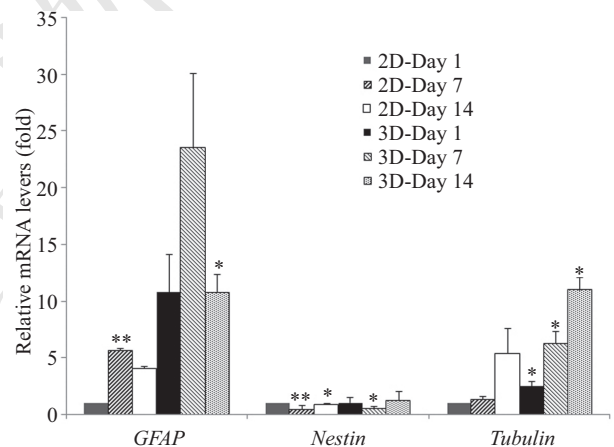
图2 细胞免疫荧光检测神经标志物nestin、tubulin和GFAP在三维和二维分化模型中的表达

Fig.2 Detection of the expressions of neural markers nestin, tubulin and GFAP in 3D and 2D differentiation models

经开始向神经元分化。GFAP在诱导第1~7 d迅速增高, 然后在第7~14 d又有减弱的趋势, 这可能是因为大脑中所占比例最大的细胞为胶质细胞, 而且神经干细胞向胶质细胞自然分化的能力很强, 而第1~7 d诱导培养基中存在血清, 从而增强了干细胞自然分化的速度, 故GFAP从免疫荧光强度上有显著增加的趋势; 诱导7 d后, 为了保护已经从神经干向神经元分化的细胞, 换成不含血清的神经元维持培养基, 这样就抑制了胶质细胞的生长, 故第7~14 d GFAP在蛋白水平上又出现降低的现象(图2)。

2.3 在3D和2D分化模型中各分化标记物在mRNA水平上的变化

为了进一步了解3D和2D培养条件对神经干细胞分化的影响, 我们采用了Real-time PCR技术, 对诱导后第1, 7, 14 d的神经细胞干性标记物nestin和分化标记物GFAP、tubulin在mRNA水平上的表达进行了研究(图3)。诱导第7~14 d, tubulin的mRNA表达量逐渐增加, 与免疫荧光逐渐增强的检测结果相一致。此实验结果进一步说明, 神经干细胞已经开始向神经元分化。GFAP mRNA在诱导第1~7 d迅速增高, 在第7~14 d又呈减弱趋势, 这也和免疫荧光检测结果吻合。而神经细胞干性标记物nestin在14 d诱导分化过程中, mRNA表达水平偏低。这充分证明我们使用的神经干细胞分化方法正确有效。当然, 如何有效实现神经干细胞完全分化成神经细胞还有待于进一步研究。



实验独立重复3次, 数据以mean \pm S.D.形式表示。* P <0.05, ** P <0.01, 与相应的2D第1 d进行比较。

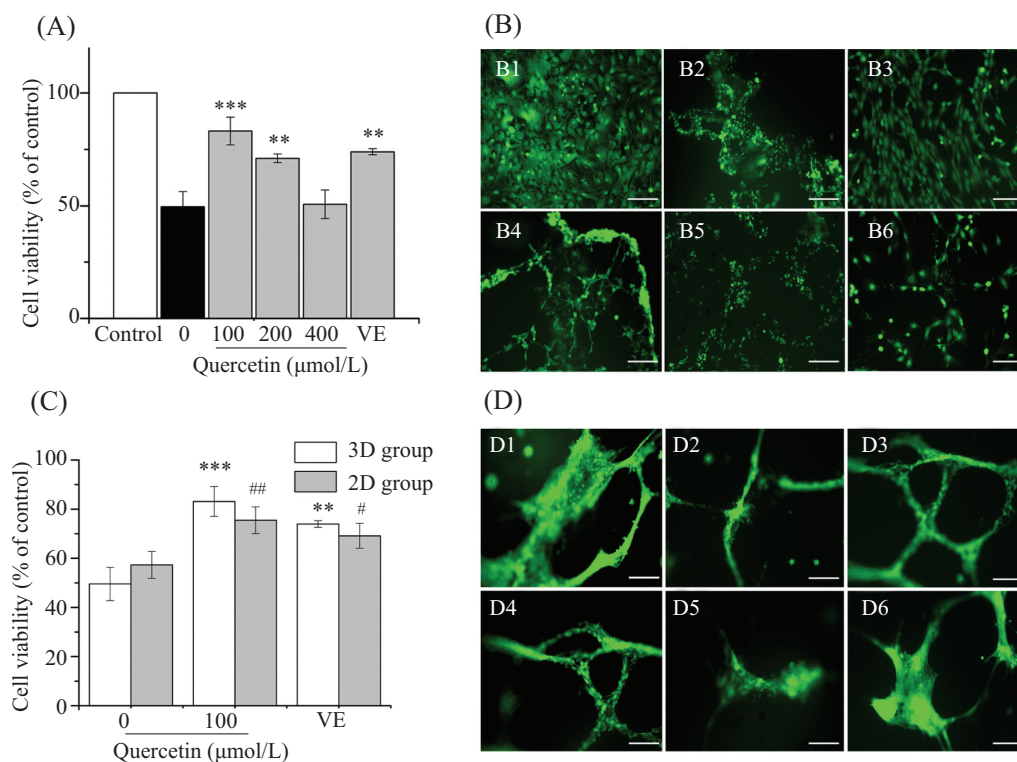
Data were presented as the mean \pm S.D. of three independent experiments. * P <0.05, ** P <0.01 compared with the respective 2D-Day 1.

图3 神经细胞特异性标志物 nestin、tubulin和GFAP在3D和2D分化条件下mRNA的变化

Fig.3 The mRNA changes of neuronal specific markers nestin, tubulin and GFAP in 3D and 2D differentiation models

2.4 在3D和2D过氧化氢损伤模型中药物对细胞膜损伤修复作用的比较

上述实验表明, 神经干细胞可以在我们建立的3D模型中更好地分化成神经元和胶质细胞, 从而可以作为一个更接近体内环境的体外模型, 用来研究药物对神经细胞膜损伤修复的影响。为了研究药物对神经细胞在3D培养条件中的氧化损伤修复作用是否优于2D培养条件, 本实验用不同浓度(100, 200, 400 $\mu\text{mol/L}$)的槲皮素, 分别对3D和2D过氧化氢损



A: 3D神经细胞活力检测; B: 3D神经细胞活性染色图; B1: 对照; B2~B5: 槲皮素浓度分别为0, 100, 200, 400 μmol/L; B6: 生育酚; C: 3D和2D神经细胞活力比较; D: 2D神经细胞活性染色图; D1: 对照; D2~D5: 槲皮素浓度分别为0, 100, 200, 400 μmol/L; D6: 生育酚。标尺=100 μm。实验独立重复3次, 数据以mean±S.D.形式表示。# $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 给药组(槲皮素和VE)分别与2D/3D 0 μmol/L槲皮素组相比。*为3D组, #为2D组。

A: the detection of neuronal cells viability in 3D model; B: staining for live cells in 3D model; B1: control; B2~B5: the concentration of quercetin was 0, 100, 200, 400 μmol/L, respectively; B6: VE; C: the comparison of cells viability in 3D and 2D models. D: staining for live cells in 2D model. D1: control; D2~D5: the concentration of quercetin was 0, 100, 200, 400 μmol/L, respectively; D6: VE. Scale bars=100 μm. Data were presented as the mean±S.D. of three independent experiments. # $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, drug groups (quercetin or VE) vs 2D and 3D 0 μmol/L of quercetin groups, respectively. *stands for 3D group, #stands for 2D group.

图4 不同浓度的槲皮素对损伤后神经细胞的保护作用

Fig.4 Protective effect of different concentrations of quercetin on neuronal cells after injury

伤模型孵育30 h, 之后添加160 μmol/L H₂O₂作用8 h, 同时设空白对照组、损伤组(即不加药物干预组)和阳性药物干预组(Tocopherol, VE)。CCK-8检测结果表明, 不加药物干预组的细胞(0 μmol/L槲皮素组)在H₂O₂作用下损伤可达50%左右, 而槲皮素浓度在小于400 μmol/L时能明显提高神经细胞的抗氧化应激损伤能力, 细胞活力增强, 其中以100 μmol/L槲皮素对细胞保护最有效。这种变化趋势在2D实验中也有体现。当将3D和2D模型对药物的反应进行比较时, 3D模型中细胞对药物应激反应明显优于传统的2D模型。3D和2D不加药物干预组, 3D模型里的细胞活力低于2D模型(7.64±1.31)%; 而在使用100 μmol/L槲皮素保护组里, 在3D损伤模型中细胞损伤修复后的细胞活力可达(83.13±6.11)%, 明显高于相同槲皮素浓度下的2D损伤模型组[(75.47±5.45)%]。当将槲皮

素保护组与不加药干预组相比, 较之2D模型, 槲皮素的保护作用在3D模型中体现地更加明显(图4A和图4C)。相应地, 细胞死活染色也证明槲皮素能对神经细胞的抗氧化应激损伤起到保护作用。2D过氧化氢诱导的模型组细胞出现不规则形态, 突触和胞体逐渐消失, 甚至出现大面积漂浮的状态; 3D过氧化氢诱导的模型组细胞形成的神经网状结构消失, 细胞连接处出现大面积空白区域。而药物干预组的细胞形态与对照组相比有显著性地改善(图4B和图4D)。以上提示, 药物在3D和2D损伤修复模型中均起到了有效的保护作用, 但从模型反映出的敏感度及细胞形态而言, 3D要优于传统2D损伤修复模型。

3 讨论

国内外把干细胞研究作为生物科技研究的重

点, 神经干细胞研究是当今生物医学领域最前沿的课题之一。近年来, 有关神经细胞体外3D模型的研究逐步增多, 所采用的3D支架材料种类各异, 但大都集中在建立3D细胞培养模型上, 对于分化模型报道罕见。3D培养技术有着重要的应用价值, 传统的2D培养技术由于细胞在体外培养, 其环境逐渐丧失了原有的特性。而动物实验完全在体内进行, 其体内复杂的因素使其很难研究单一过程, 3D培养技术既能最大程度模拟体内环境, 又能展现细胞培养的直观性和条件的可控性, 故能更好地应用在临床前的药检领域。

本实验采用透明质酸作为主要支架成分, 经层黏连蛋白修饰后建立3D神经细胞分化模型, 和传统2D分化模型相比, 无论在基因水平还是在蛋白水平上, 3D分化模型均优于传统2D分化模型, 这也为临床前的药物检测提供了一个全新的、模仿人体微环境的3D分化模型。由于使用不同步骤进行神经分化获得的细胞类群可能不同, 因此, 在分化实验中检测不同阶段以及不同亚型神经细胞的标志基因可以详细了解在不同分化条件下获得的神经细胞的构成。本工作的重点是研究建立体外3D分化模型的可行性, 为了简化实验条件只研究了三种广谱标记物nestin、tubulin和GFAP。对于其他不同亚型标记物, 例如Dcx、NeuN、Olig2、ChAT和TH等, 将在今后的工作中进行深入研究。

目前, 动物实验和体外细胞培养方法被广泛用于药物毒性检测^[9-11]。一方面, 动物实验不仅需要大量的动物、实验成本高、实验周期长、伦理上长期存在争议, 而且动物和人体内微环境存在一定差异, 动物对药物毒性的反应和代谢与在人体内的反应和代谢可能会完全不同。另一方面, 应用体外细胞培养(2D)来快速检测和筛选药物, 具有相对低成本、较好的重现性以及简单易操作、高通量等优势, 成为制药业现行的黄金标准。但是, 越来越多的实验结果证实了使用2D模型的局限性。目前正在发展中的3D细胞培养技术是介于单层细胞和动物实验之间的一种新技术, 既能模仿体内环境, 又能展现细胞研究的直观性和条件的可控性, 故能更好地应用于临床前的药物检测实验^[12-14]。

为了评估构建的3D分化模型在体外药物筛选中的可行性, 我们初步探索了药物对氧化应激损伤下神经细胞的保护作用^[15]。H₂O₂作为其中的一种副

产物, 可对神经细胞产生毒性, 引起细胞死亡。有文献报道, 槲皮素对黑质多巴胺能神经元损伤有显著的预防作用。槲皮素是银杏叶提取物中黄酮类化合物的主要成分之一。张晓琦等^[16]应用高效液相色谱法测定得到不同批次的银杏叶提取物中槲皮素的含量为23.93~49.78 mg/g。巴晓红等^[17]选用改良后的Thomas方法制作帕金森SD大鼠模型, 按100 mg/kg的剂量连续灌胃银杏叶提取物溶液14 d(1次/d), 发现其对黑质多巴胺能神经元损伤有显著的预防作用。因此, 本次药物毒性试验采用槲皮素提前干预H₂O₂损伤的3D分化模型, 检测细胞对槲皮素浓度梯度下的不同响应水平。利用我们构建的3D分化模型得到的结果显示, 经过100 μmol/L槲皮素预处理, 可明显减轻H₂O₂造成的细胞损伤, 而高浓度预处理组无效。同时, 3D模型中100 μmol/L槲皮素对细胞保护可达(83.13±6.11)%, 而在2D培养的P19神经元模型中在150 μmol/L剂量下对细胞的保护最强, 但仅为(78.3±8.5)%^[18]。由此可见, 本实验中构建的3D分化模型对药物剂量的敏感程度较2D的神经元细胞系更强, 同时又更接近体内的动物实验结果。这一模型为建立干细胞治疗技术的有效性和生物安全性评估平台提供了思路和可行技术支撑, 对于过氧化氢进行膜损伤修复过程中涉及的其他可以检测的指标, 例如总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH)、一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase, NOS)、一氧化氮(nitric oxide, NO)以及致衰因子(malondialdehyd, MDA)等, 还有待于在今后的工作中进行研究, 从而完善对3D培养条件下过氧化氢膜损伤修复的机制研究。

人体是一个能够自主新陈代谢的有机体, 体内细胞代谢产物可随血液循环经相应器官进行代谢, 使得体内细胞周围环境相对稳定, 本研究对体外细胞培养(即2D培养)进行了组织化修饰^[19], 使其接近体内3D特征, 对于临床前的药检有一定的应用价值。3D灌注式分化模型是建立在3D细胞培养基础上, 模仿人体血液循环系统对体外培养细胞进行灌注式培养, 能够较好地应用于临床前的药检试验。本研究建立的用于药物检验的神经干细胞3D分化模型无论在分化效果上, 还是药物对膜损伤修复作用方面都优于传统2D分化模型, 这也为今后更接近人体内环境的3D灌注式细胞培养、分化和药检打

下坚实的理论基础^[20-22]。

参考文献 (References)

- Dulbecco R. Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of an animal virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1952; 38(8): 747-52.
- 关水, 葛丹, 陆瑞欣, 刘天庆, 马学虎, 崔占峰. 神经干细胞体外三维培养模型的构建. *中国科技论文在线*(Guan Shui, Ge Dan, Lu Ruixin, Liu Tianqing, Ma Xuehu, Cui Zhanfeng. Establishment of neural stem cells *in vitro* three-dimensional model. *Science Paper Online*) 2011; 2011(3):181-6.
- Leipzig ND, Wylie RG, Kim H, Shoichet MS. Differentiation of neural stem cells in three-dimensional growth factor-immobilized chitosan hydrogel scaffolds. *Biomaterials* 2011; 32(1): 57-64.
- Ge D, Song K, Guan S, Qi Y, Guan B, Li W. Culture and differentiation of rat neural stem/progenitor cells in a three dimensional collagen scaffold. *Appl Biochem Biotechnol* 2013; 170(2): 406-19.
- Yamada KM, Cukierman E. Modelling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell* 2007; 130(4): 601-10.
- Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 2006; 126(4): 677-89.
- Li Z, Cui Z. Three-dimensional perfused cell culture. *Biotechnol Adv* 2014; 32(2): 243-54.
- 叶青, 何为民, 康剑书. 透明质酸酶对眼眶成纤维细胞增殖及分泌透明质酸的影响. *四川大学学报(医学版)*(Ye Qing, He Weimin, Kang Jiانشu. The effect of hyaluronidase on proliferation and hyaluronic acid synthesis in orbital Fibroblast *in vitro*. *J Sichuan Univ (Med Sci Ed)*) 2010; 41(3): 530-2.
- Zeng R, Wang LW, Hu ZB, Guo WT, Wei JS, Lin H, *et al.* Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into neuron-like cells *in vitro*. *Spine* 2011; 36(13): 997-1005.
- Rasmussen MA, Hall VJ, Carter TF, Hyttel P. Directed differentiation of porcine epiblast-derived neural progenitor cells into neurons and glia. *Stem Cell Res* 2011; 7(2): 124-36.
- Leipzig ND, Xu C, Zahir T, Shoichet MS. Functional immobilization of interferon-gamma induces neuronal differentiation of neural stem cells. *J Biomed Mater Res A* 2010; 93(2): 625-33.
- Brannvall K, Bergman K, Wallenquist U, Svahn S, Bowden T, Hilborn J, *et al.* Enhanced neuronal differentiation in a three-dimensional collagen-hyaluronan matrix. *J Neurosci Res* 2007; 85(10): 2138-46.
- Arscott WT, Soltys J, Knight J, Draayer YM. Interferon β -1b directly modulates human neural stem/progenitor cell fate. *Brain Res* 2011; 1413: 1-8.
- 刘仕勇, 张可成, 杨辉, 蔡文琴, 何家全. 成年大鼠纹状体区神经干细胞的分离培养. *解剖学报*(Liu Shiyong, Zhang Kecheng, Yang Hui, Cai Wenqing, He Jiaquan. Isolation of neural stem cells from striatum of adult rats. *Acta Anatomica Sinica*) 2000; 31(1): 17-20.
- Breier JM, Gassmann K, Kayser R, Stegeman H, de Groot D, Fritsche E, *et al.* Neural progenitor cells as models for high-throughput screens of developmental neurotoxicity: State of the science. *Neurotoxicol Teratol* 2010; 32(1): 4-15.
- 张晓琦, 陈颖怡. 高效液相色谱法测定银杏叶提取物中槲皮素的含量. *色谱*(Zhang Xiaoqi, Chen Yingyi. Determination of quercetin in extract of *Ginkgo biloba* L. leaves by high performance liquid chromatography (HPLC). *Chinese Journal of Chromatography*) 1994; 12(4): 302-3.
- 巴晓红, 刘英. 银杏叶提取物及银杏总内酯对帕金森病大鼠黑质神经元损伤的保护作用. *中国临床康复*(Ba Xiaohong, Liu Ying. Effects of *Ginkgo biloba* extract and bilobalide on neuronal injury of substantia nigra of rats with Parkinson disease. *Chinese Journal of Clinical Rehabilitation*) 2006; 10(11): 39-41.
- Jazvinščak Jembrek M, Vuković L, Puhović J, Erhardt J, Oršolić N. Neuroprotective effect of quercetin against hydrogen peroxide-induced oxidative injury in P19 neurons. *J Mol Neurosci* 2012; 47(2): 286-99.
- Ramasamy S, Narayanan G, Sankaran S, Yu YH, Ahmed S. Neural stem cell survival factors. *Arch Biochem Biophys* 2013; 534(1/2): 71-87.
- Zahir T, Chen YF, MacDonald JF, Leipzig N, Tator CH, Shoichet MS. Neural stem/progenitor cells differentiate *in vitro* to neurons by the combined action of dibutyl cAMP and interferon- γ . *Stem Cells Dev* 2009; 18(10): 1423-32.
- 刁波, 唐瑛, 李德忠, 邓惠玲, 文晔, 王晓昆. 刺五加多糖对过氧化氢诱导海马神经元氧化应激损伤及细胞凋亡相关基因-2家族的影响. *时珍国医国药*(Diao Bo, Tang Ying, Li Dezhong, Deng Huiling, Wen Ye, Wang Xiaokun. *Shi Zhen Medicine and Materia Medica Research*) 2008; 19(11): 2505-7.
- 陈旭春, 程颖, 杨蕾, 李弘, 刘永锋. 三维及二维培养大鼠胰腺导管来源干细胞的体外对比实验研究. *中国普外基础与临床杂志*(Chen Xuchun, Cheng Ying, Yang Lei, Li Hong, Liu Yongfeng. Culture of pancreatic duct-derived stem cells of rats in the three-dimension and two-dimension cell culture. *Chin J Bases Clin General Surg*) 2012; 19(7): 722-6.