

人嗅黏膜神经干细胞体外培养 及氟西汀对其增殖和神经发生的影响

谢扬智¹ 李乾露¹ 杨德雨^{1,2} 房亮² 廖娟² 李远² 王娟¹ 刘莉³ 江洪⁴ 李志伟^{1*}

¹重庆医科大学附属永川医院神经内科, 重庆 402160; ²重庆医科大学附属永川医院中心实验室, 重庆 402160;

³重庆医科大学附属永川医院体检中心, 重庆 402160; ⁴重庆医科大学附属永川医院耳鼻喉科, 重庆 402160)

摘要 人嗅黏膜神经干细胞是新近发现的可用于神经精神疾病研究的良好材料, 同时, 抗抑郁治疗促进脑部神经干细胞增殖及向神经细胞转化。然而, 嗅黏膜神经干细胞体外培养方法及抗抑郁药对其增殖及神经发生的影响尚不清楚。该研究采用组织块培养获取嗅细胞, 神经球培养法纯化神经干细胞, Nestin免疫荧光验证神经干细胞特异性。加入促神经分化培养基诱导神经干细胞向神经细胞分化, MAP2(microtubule associated protein 2)、TUJ1(β 3-tubulin)免疫荧光验证神经细胞特异性。采用CCK-8和蛋白质分子印记技术分别检测抗抑郁药对嗅黏膜神经干细胞增殖及分化的影响。结果显示, 体外培养嗅黏膜神经干细胞呈球状聚集; Nestin、MAP2、TUJ1免疫荧光阳性; 抗抑郁药促进嗅黏膜神经干细胞增殖、促进其向神经细胞转化, TUJ1表达上升。综上所述, 抗抑郁药能够促进神经干细胞增殖及神经发生, 可能为其抗抑郁治疗的机制之一。

关键词 嗅黏膜; 神经干细胞; 神经发生; 抗抑郁药; 组织块培养

Culture of Human Olfactory Mucosa Neural Stem Cells *In Vitro* and Effects of Fluoxetine on Their Proliferation and Neurogenesis

Xie Yangzhi¹, Li Qianlu¹, Yang Deyu^{1,2}, Fang Liang², Liao Juan², Li Yuan², Wang Juan¹, Liu Li³, Jiang Hong⁴, Li Zhiwei^{1*}

¹Department of Neurology, Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China;

²Central Laboratory, Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China;

³Department of Health Management, Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China;

⁴Department of Otolaryngology, Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China)

Abstract Human olfactory neural stem cells are satisfactory materials applied in neuropsychiatry diseases recently discovered. Antidepressants could promote proliferation and neurogenesis of neural stem cells in human. However, culture method *in vitro* and effects of antidepressants on their proliferation and neurogenesis remains unknown. In the present study, tissue piece culture method and neurosphere method were used to harvest olfactory cells and purify neural stem cells separately. Nestin immunofluorescence was performed to verify the specificity of neural stem cells. Neural basal medium was used to induce the differentiation into neuron from neural stem cells. TUJ1 and MAP2 immunofluorescence were performed to verify the specificity of neuron. CCK-8 and Western blot were applied to measure effects of antidepressants on proliferation and differentiation of neural stem cells. Results

收稿日期: 2016-08-04 接受日期: 2016-10-24

国家自然科学基金(批准号: 31300917)和重庆市自然科学基金计划(批准号: cstc2016jcyjA0452)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-85381660, E-mail: lzw023@126.com

Received: August 4, 2016

Accepted: October 24, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31300917) and the Natural Science Foundation Project of Chongqing (Grant No.cstc2016jcyjA0452)

*Corresponding author. Tel: +86-23-85381660, E-mail: lzw023@126.com

网络出版时间: 2016-12-19 15:23:11

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20161219.1523.002.html>

showed that olfactory neural stem cells aggregated as neurosphere. Immunofluorescence assay showed Nestin, TUJ1, MAP2 positive in the treated cells. Compared with control group, antidepressants enhance the proliferation of neural stem cells, also, the expression of TUJ1 were up-regulated. Antidepressants could increase neurogenesis of neural stem cells which was likely to be one of the mechanisms in antidepressant treatment.

Keywords olfactory mucosa; neural stem cells; neurogenesis; antidepressants; tissue piece culture

抑郁症是常见的精神疾病,它具有高致残、致死率。据世界卫生组织预测,2020年抑郁症将成为第二大影响人类健康的疾病。虽然抑郁症研究已有很长历史,但由于其病因复杂、无明显病理改变,目前仍未取得实质性进展。究其原因,可能与人脑组织样本难以获得有关。虽然尸检研究弥补了一些不足,然而尸检脑样本来源稀缺且不是活体组织,受疾病病程和药物治疗等影响,研究结果存在偏倚。嗅黏膜主要由神经干细胞及嗅神经元组成,是嗅觉通路的颅外部分,嗅干细胞分化为神经细胞穿过筛孔与嗅球发生联系,后者再投射至嗅皮质。因此,脑部疾病分子异常常在嗅觉通路有所反应。鉴于嗅黏膜是颅外与脑组织相连唯一可再生神经组织,符合被检者基因背景,且可通过鼻内窥镜活体、动态取材,操作简易、创伤小。因此,从嗅黏膜、嗅细胞层面研究神经精神疾病受到了越来越多学者关注。脑区神经纤维缠结和老年斑是阿尔兹海默病(Alzheimer's disease, AD)的特异病理变化。Arnold等^[1]发现,这种特异性改变在AD患者嗅黏膜中也存在,故嗅黏膜活检可能成为AD诊断指标。Mackay-sim课题组^[2]发现,精神分裂症患者嗅黏膜神经干细胞核糖体蛋白和涉及核糖体通路蛋白明显下降,可能与精神分裂症的发病机制有关。鉴于嗅黏膜、嗅细胞在神经精神疾病研究中的优势,我们提出抑郁症是否也存在嗅黏膜、嗅细胞病理改变,其能否为抑郁症的防治提供新思路。我们前期的研究发现,抑郁模式动物嗅黏膜有序排列消失,嗅黏膜萎缩,嗅黏膜神经干细胞、成熟神经元、非成熟神经元数量均减少^[3];同时,我们发现,抑郁模式动物脑室-嗅球-嗅黏膜通路神经发生障碍,其侧脑室下区、嗅球均出现神经发生障碍并伴随嗅觉减退^[4]。Eleni等^[5]发现,氟西汀能逆转慢性皮质醇注射引起的小鼠嗅球神经发生障碍和嗅觉减退。Negoiias等^[6]采用影像学方法发现抑郁患者嗅球体积减少。

基于以上背景,我们推测抑郁症患者也存在嗅黏膜、嗅细胞改变。本研究拟通过嗅黏膜组织块培

养纯化扩增人嗅黏膜神经干细胞,探索抗抑郁药对人嗅黏膜神经干细胞增殖及神经发生的影响,为抑郁症神经发生障碍学说提供新的证据。

1 材料与方法

1.1 材料

正常人嗅黏膜通过鼻内窥镜活检获得(源于重庆医科大学附属永川医院耳鼻喉科,通过伦理委员会批准并得到受试者知情同意),DMEM/F12、胎牛血清、B27、Neurobasal[®]培养基、ITS-X、0.25%胰蛋白酶和青/链霉素均购自Gibco公司。重组人成纤维生长因子-2(recombinant human fibroblast growth factor-2, FGF-2)、重组人表皮生长因子(recombinant human epidermal growth factor, rhEGF)购自PROSPEC公司。多克隆兔抗Nestin抗体购自ABGENT公司,单克隆鼠抗 β -actin抗体及单克隆兔抗TUJ1(β 3-tubulin)购自Cell Signaling Technology公司,多克隆兔抗MAP2抗体购自Abcam公司。细胞核染色液DAPI购自Bioss公司。免疫荧光一抗稀释液、二抗稀释液、固定液、封闭液、洗涤液均购自碧云天生物技术有限公司。山羊抗兔荧光二抗及共轭辣根过氧化物酶山羊抗鼠和山羊抗兔二抗均购自Abbkine公司。RIPA蛋白质裂解液和蛋白酶抑制剂、BCA蛋白质定量试剂盒均购自碧云天生物技术有限公司。PVDF膜、增强型化学发光试剂购自Millipore公司。Cell Counting Kit-8(CCK-8)购自Dojindo公司。氟西汀粉剂购自Sigma-Aldridge公司。

1.2 嗅黏膜细胞原代培养及传代

方法参照前期研究基础^[7],通过鼻内窥镜自正常人上鼻甲和鼻中隔上部夹取嗅黏膜2块。(1)将所取嗅黏膜置于含青链霉素的DMEM/F12培养基中清洗3次,每次5 min。(2)取少量胎牛血清覆盖步骤(1)处理的嗅黏膜组织,用眼科剪将其剪碎。(3)取胎牛血清浸润嗅黏膜碎块,置于孵箱孵育15 min后将组织放在已涂有胎牛血清的2 cm培养皿中,滴加少量DMEM/F12培养基,盖玻片覆盖。(4)每隔1 d换液1

次。约1周后,细胞开始爬出;2周后,出现大量细胞。此后,将含血清完全培养基换成神经干细胞诱导培养基(DMEM/F12、1% ITS-X、50 ng/mL EGF、50 ng/mL FGF2、2% B27、1%青/链霉素),每隔1 d换液1次(将悬浮的细胞离心后回种到培养皿),约10 d后,出现呈球状聚集的神经球。出现多个神经球时,离心去上清,加适量0.25%胰蛋白酶消化神经球,移液器反复吹打5 min,终止消化弃上清后,重新铺在6 cm皿中,约7 d后,细胞再次聚集成球,此为第二代神经球。

1.3 神经干细胞免疫荧光验证

将培养的第三代神经球用0.25%胰蛋白酶消化,吹散成单个细胞,加入培养基终止消化,离心去上清,用神经干细胞诱导培养基重悬细胞,将细胞悬液滴于玻片进行爬片,细胞孵箱中孵育1 d。免疫荧光洗涤剂润洗3次,每次2 min;免疫荧光固定液固定爬片15 min;润洗3次;滴加免疫荧光封闭液,室温封闭30 min。滴加Nestin一抗(1:50),4 °C孵育过夜,次日室温复温45 min,弃去抗体,洗涤剂润洗3次。暗室孵育二抗1 h(1:500),润洗3次。滴加DAPI复染核,润洗3次,封片置于荧光显微镜下摄像。

1.4 神经细胞免疫荧光验证

将取得的第三代神经球吹散成单个细胞,用促神经分化培养基(Neurobasal®培养基、2% B27、1%谷氨酰胺、1%青/链霉素)重悬细胞,将细胞悬液滴于玻片,置于孵箱孵育72 h。免疫荧光染色步骤与前述类似,一抗换为MAP2、TUJ1。

1.5 CCK-8法检测氟西汀对干细胞增殖活性的影响

取第三代神经球,消化吹打均匀,神经干细胞诱导培养基重悬接种在96孔板中(1×10^4 /孔,100 μ L/孔),每组设3个复孔。细胞贴壁生长后,对照组加入5.0 μ L双蒸水,实验组加入5.0 μ L不同浓度氟西汀,使得最终浓度分别为0.5、1.0、2.0、5.0 μ mol/L。分别于药物处理后第3、5、7 d加入CCK-8溶液(10 μ L/孔),置细胞孵箱孵育1.5 h,酶标仪设定450 nm波长检测各组吸光度(D)值。根据公式(增殖率=各药物处理组吸光度值/对照组吸光度值的平均值 $\times 100\%$)计算增殖率,从而评价氟西汀对神经干细胞增殖的影响。

1.6 蛋白质印记测定不同浓度氟西汀处理神经干细胞后神经元蛋白质TUJ1的水平

神经干细胞用完全普通培养基重悬均匀铺于6孔板,加入等量氟西汀或双蒸水使其终浓度分别为0、0.5、1.0、2.0 μ mol/L。孵育48 h后,RIPA裂解液

裂解提总蛋白,BCA法行蛋白质定量,以25 μ g/孔进行12%聚丙烯酰胺凝胶电泳,将电泳完的凝胶移至PVDF膜上,行湿法转膜,转膜完毕将膜放入5%脱脂奶粉封闭液封闭1 h,继而和抗TUJ1(1:1 000稀释)、抗 β -actin(1:1 000稀释)4 °C孵育过夜;TBST洗3次,每次10 min。山羊抗鼠(1:6 000)或山羊抗兔(1:6 000)二抗分别与抗 β -actin和抗TUJ1结合,常温孵育1 h后,TBST洗3次,每次10 min。滴加适量ECL反应液,采用Bio-Rad成像系统曝光膜,Image Lab软件行灰度分析, β -actin为内部参照,以TUJ1/ β -actin灰度值作为TUJ1的相对表达量。

1.7 统计学分析

SPSS 19.0软件进行统计处理,计量资料3组及以上用单因素方差分析,组间比较用LSD-*t*检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 嗅黏膜组织块培养

嗅黏膜组织块培养第8 d,细胞从组织边缘爬出(图1A),继续培养7 d,细胞铺满培养皿(图1B)。

2.2 原代培养人嗅黏膜神经干细胞动态观察

将2.1培养所得细胞用神经干细胞诱导培养基培养约7 d,出现半悬浮聚集呈巢状生长的细胞团(图2A),继续培养至第10 d,出现大量聚拢悬浮生长的神经球(图2B),培养至第20 d,细胞聚集过大,内部因缺乏营养出现坏死(图2C)。

2.3 单个嗅神经干细胞和神经细胞形态

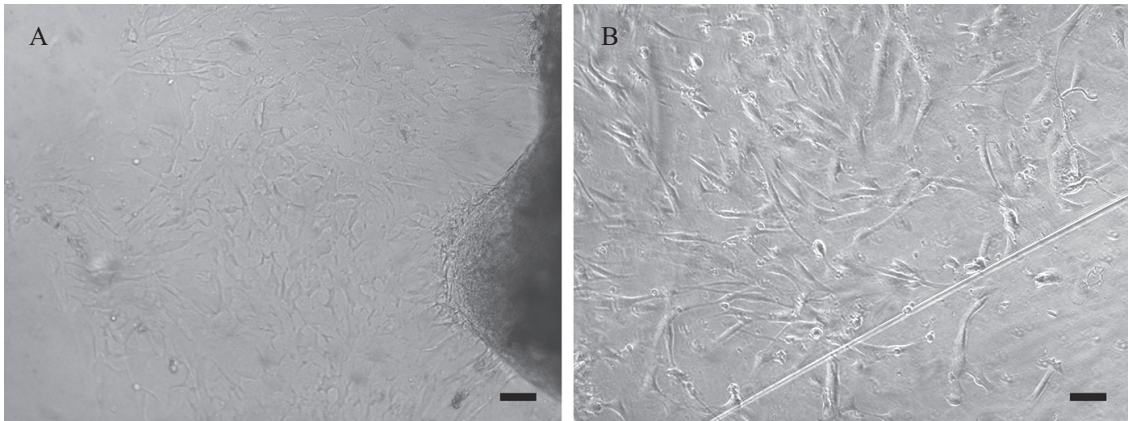
单个嗅神经干细胞呈圆形或水平状(图3A),分别为圆形基底细胞(globose basal cell)或水平状基底细胞(horizontal basal cell),神经细胞具有长突起,突起间互相连接(图3B)。

2.4 Nestin、TUJ1、MAP-2免疫荧光染色结果

神经干细胞特异抗原Nestin表达于细胞质中,水平基底细胞和圆形基底细胞荧光染色均呈阳性(图4);神经细胞呈梭形,向同一个方向延伸,TUJ1、MAP2荧光染色呈阳性,表达于细胞质中(图4)。

2.5 氟西汀促进人嗅黏膜神经干细胞增殖

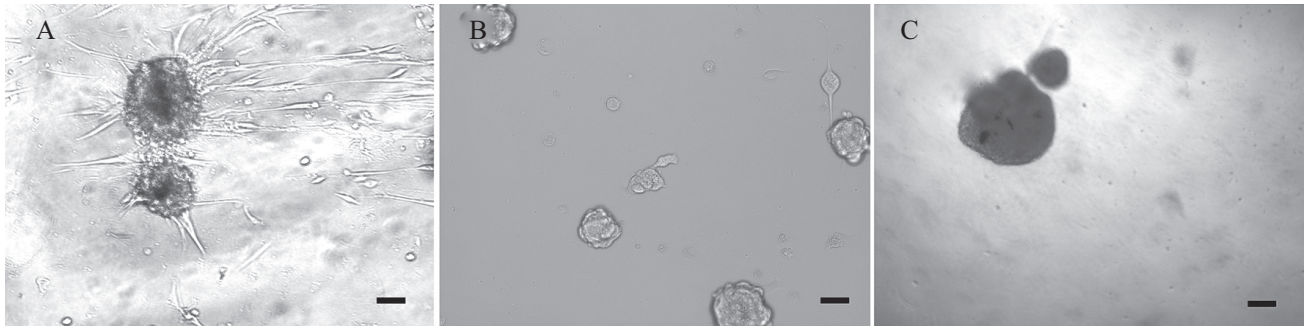
CCK-8细胞增殖实验如图5所示,与对照组(0 μ mol/L)相比,1.0、2.0 μ mol/L浓度的氟西汀均能促进细胞增殖,具有统计学意义;第7 d,0.5 μ mol/L浓度的氟西汀促进细胞增殖,具有统计学意义;5.0 μ mol/L浓度氟西汀对细胞具有明显毒性作用。



A: 培养第8 d细胞爬出; B: 培养第15 d细胞铺满, 标尺=20 μm。
A: cells were observed in the edge of olfactory mucosa at day 8; B: confluency reached at day 15. Scale bars=20 μm.

图1 嗅黏膜组织块培养动态观察

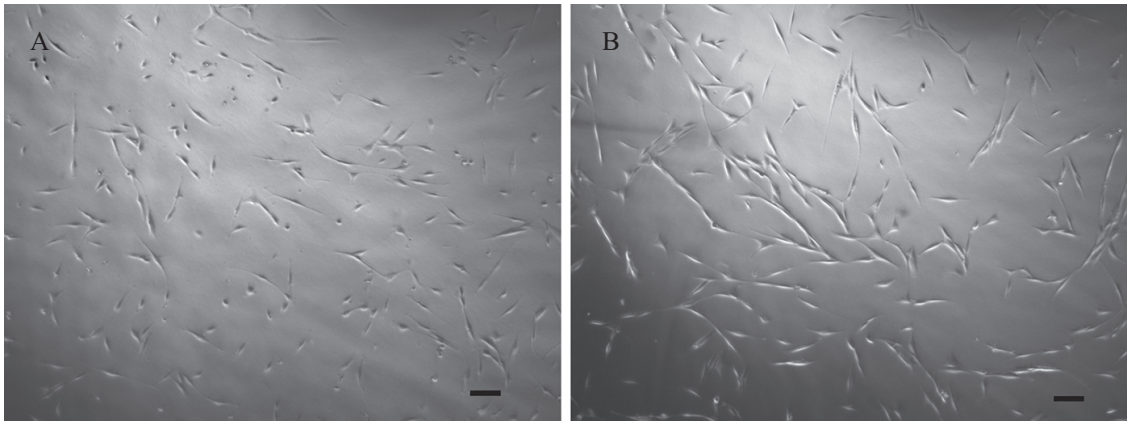
Fig.1 Dynamic observation of olfactory mucosa tissue piece culturing



A~C: 神经干细胞诱导培养基培养第7 d(A)、第10 d(B)、第20 d(C)的细胞形态, 标尺=20 μm。
A~C: representative result of day 7 (A), day 10 (B) and day 20 (C) cultivated in neural stem cells induced medium. Scale bars=20 μm.

图2 嗅黏膜神经干细胞培养动态观察

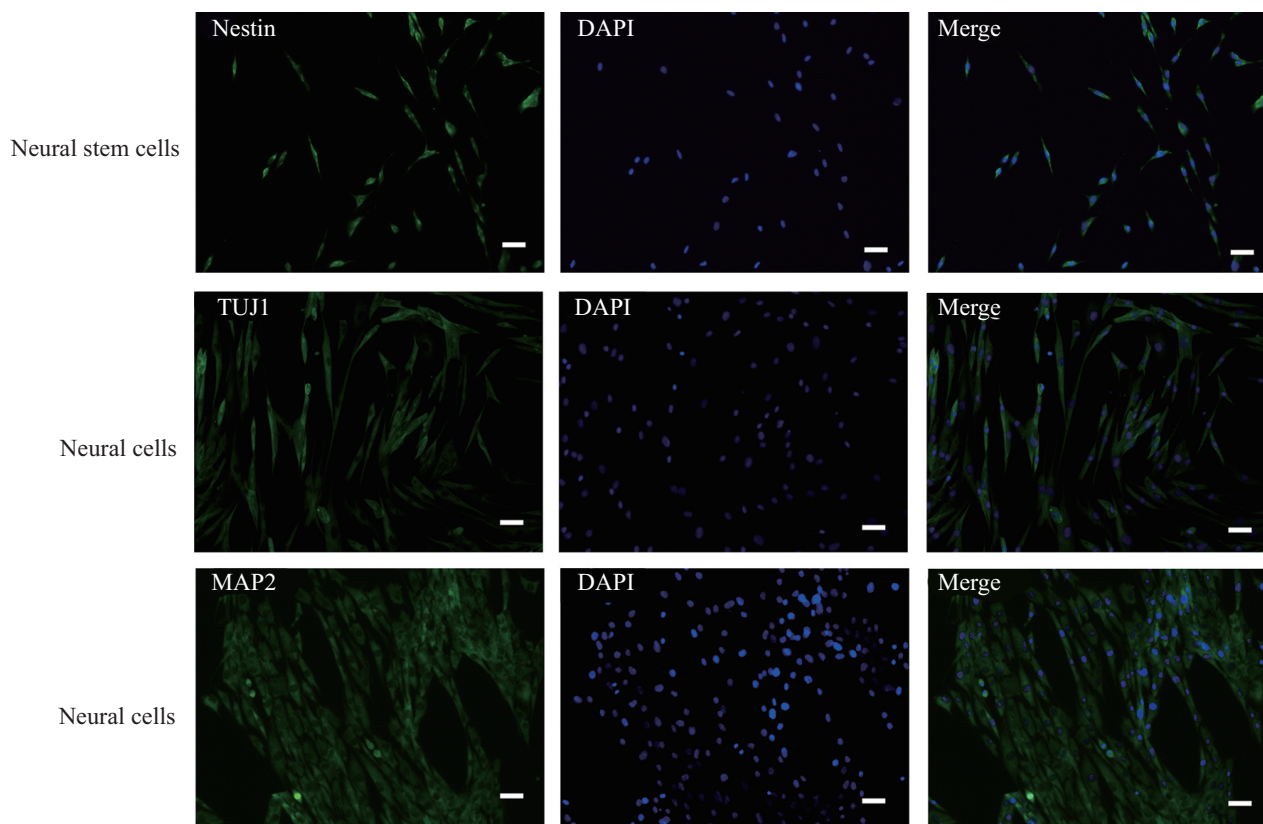
Fig.2 Dynamic observation of olfactory neural stem cells culturing



标尺=20 μm。
Scale bars=20 μm.

图3 单个嗅黏膜神经干细胞(A)和神经细胞(B)形态

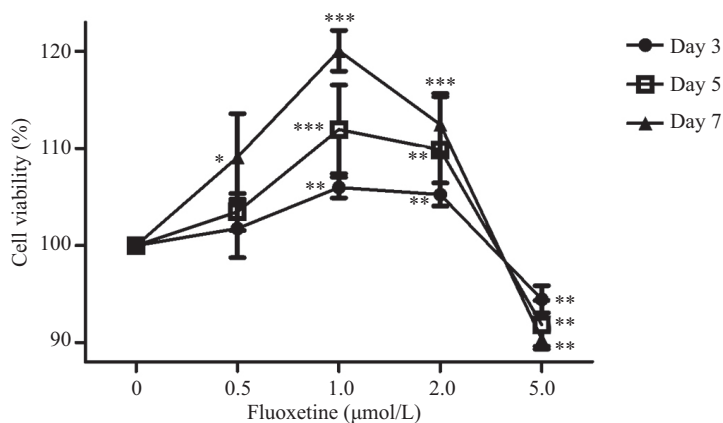
Fig.3 Morphology of single olfactory neural stem cells (A) and neural cells (B)



标尺=20 μm 。
Scale bars=20 μm 。

图4 嗅黏膜神经干细胞及神经细胞免疫荧光染色

Fig.4 Immunofluorescence for olfactory neural stem cell and neural cells



0.5、1.0、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度氟西汀促进神经干细胞增殖, 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度抑制生长。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比。

Fluoxetine increase cell viability of neural stem cells at concentration of 0.5, 1.0, 2.0 $\mu\text{mol/L}$, but inhibits at 5.0 $\mu\text{mol/L}$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ compared with the 0 $\mu\text{mol/L}$ group.

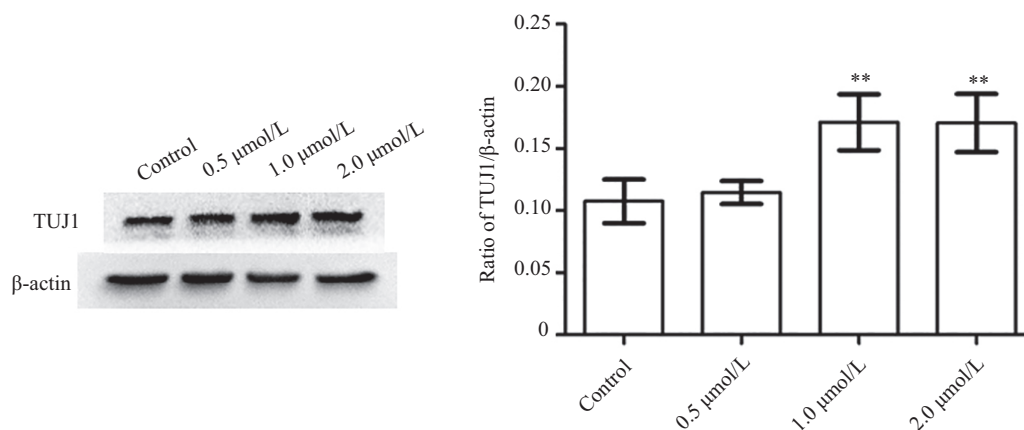
图5 氟西汀对嗅黏膜神经干细胞增殖的影响

Fig.5 Effects of fluoxetine on proliferation of olfactory neural stem cells

2.6 氟西汀促进神经干细胞分化为神经细胞

蛋白质印记如图6所示。与对照组相比, 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 和2.0 $\mu\text{mol/L}$ 氟西汀能促进神经干细胞分化

为神经细胞, 神经细胞特异蛋白质TUJ1水平上升, 且1.0 $\mu\text{mol/L}$ 促神经干细胞分化为神经细胞的能力最强。



1.0 μmol/L和2.0 μmol/L氟西汀促进神经干细胞分化为神经细胞。** $P < 0.01$, 与对照组相比。

Fluoxetine promote differentiation into neural cells from neural stem cells at concentration of 1.0 μmol/L and 2.0 μmol/L. ** $P < 0.01$ compared with the control group.

图6 氟西汀对嗅黏膜神经干细胞分化为神经细胞的影响

Fig.6 Effects of fluoxetine on differentiation into neural cells from olfactory neural stem cells

3 讨论

本研究采用组织块培养法获取了人嗅黏膜神经干细胞, 分别采用CCK-8和蛋白质印记技术探讨了氟西汀对神经干细胞增殖及分化为神经细胞的影响。

研究表明, 压力应激抑制神经干细胞神经发生, 而抗抑郁治疗起促进作用^[8], 故神经干细胞常用于探索抗抑郁药对神经发生影响。既往神经干细胞体外培养常用胰蛋白酶将组织消化成单个细胞, 此法不可避免会对细胞产生损伤。本研究采用组织块培养法不仅避免了胰蛋白酶损伤, 且若保持组织块活力, 可以不断产生新细胞, 提高了组织利用率。Nestin又名巢蛋白, 常被用作鉴定神经干细胞^[9]。将神经球吹散为单个细胞后, 95%细胞Nestin荧光染色阳性, 可用于后续实验。神经干细胞诱导培养基培养20 d时, 神经球集聚过大, 造成球体内部营养缺乏造成坏死, 提示应及时对神经球传代处理。之所以选择氟西汀进行实验, 首先是因为它是临床应用最广泛的抗抑郁药, 其次是有研究表明, 它能促进正常非抑郁大鼠神经发生^[10], 故可能对正常人嗅神经干细胞也有作用。

本研究表明, 氟西汀能促进神经干细胞增殖及神经发生, 这与其他鼠源性细胞研究一致^[11-12]。然而, 相比这些研究中较高浓度氟西汀促进神经干细胞增殖与神经发生, 我们发现, 低浓度氟西汀效果最佳, 这与临床患者氟西汀血药浓度0.5 μmol/L接近^[13]。与这些研究相比, 本研究具有以下优势。首先, 建立了一种自体神经干细胞体外培养方法, 不仅可应用

于抗抑郁神经发生理论研究中, 还可进行细胞功能、组学、亚细胞分子异常研究; 其次, 嗅黏膜组织是神经组织, 相比其他诱导分化成的神经细胞需要经过基因重组, 其特性改变较少, 故而实验稳定性更好^[14]; 更为重要的是, 自体嗅黏膜神经干细胞体现疾病特异性改变, 结果更具说服力^[15]。

综上所述, 本研究结果表明, 嗅黏膜组织块培养是一种高效的体外神经干细胞培养法, 氟西汀能够促进人嗅黏膜神经干细胞增殖及分化为神经细胞, 为抑郁症神经发生理论增加了新的证据。

参考文献 (References)

- 1 Arnold SE, Lee EB, Moberg PJ, Stutzbach L, Kazi H, Han LY, *et al.* Olfactory epithelium amyloid-beta and paired helical filament-tau pathology in Alzheimer disease. *Ann Neurol* 2010; 67(4): 462-9.
- 2 English JA, Fan Y, Focking M, Lopez LM, Hryniewiecka M, Wynne K, *et al.* Reduced protein synthesis in schizophrenia patient-derived olfactory cells. *Transl Psychiatry* 2015; 5: e663.
- 3 Li Q, Yang D, Wang J, Liu L, Feng G, Li J, *et al.* Reduced amount of olfactory receptor neurons in the rat model of depression. *Neurosci Lett* 2015; 603: 48-54.
- 4 Yang D, Li Q, Fang L, Cheng K, Zhang R, Zheng P, *et al.* Reduced neurogenesis and pre-synaptic dysfunction in the olfactory bulb of a rat model of depression. *Neuroscience* 2011; 192: 609-18.
- 5 Siopi E, Denizet M, Gabellec MM, de Chaumont F, Olivo-Marin JC, Guilloux JP, *et al.* Anxiety- and depression-like states lead to pronounced olfactory deficits and impaired adult neurogenesis in Mice. *J Neurosci* 2016; 36(2): 518-31.
- 6 Negoias S, Croy I, Gerber J, Puschmann S, Petrowski K, Joraschky P, *et al.* Reduced olfactory bulb volume and olfactory sensitivity in patients with acute major depression. *Neuroscience*

- 2010; 169(1): 415-21.
- 7 李乾露. 人嗅黏膜组织块培养法获取神经干细胞的研究(硕士论文). 重庆医科大学(Li qianlu. Isolation of neural stem cells using tissue piece culture method from olfactory epithelium in human. Chongqing Medical University) 2016.
- 8 Schoenfeld TJ, Cameron HA. Adult neurogenesis and mental illness. *Neuropsychopharmacology* 2015; 40(1): 113-28.
- 9 Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992; 255(5052): 1707-10.
- 10 Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 2000; 20(24): 9104-10.
- 11 Chen SJ, Kao CL, Chang YL, Yen CJ, Shui JW, Chien CS, *et al.* Antidepressant administration modulates neural stem cell survival and serotonergic differentiation through bcl-2. *Curr Neurovasc Res* 2007; 4(1): 19-29.
- 12 Chiou SH, Chen SJ, Peng CH, Chang YL, Ku HH, Hsu WM, *et al.* Fluoxetine up-regulates expression of cellular FLICE-inhibitory protein and inhibits LPS-induced apoptosis in hippocampus-derived neural stem cell. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 343(2): 391-400.
- 13 Kelly MW, Perry PJ, Holstad SG, Garvey MJ. Serum fluoxetine and norfluoxetine concentrations and antidepressant response. *Ther Drug Monit* 1989; 2(11): 165-70.
- 14 Borgmannwinter K, Willard SL, Sinclair D, Mirza N, Turetsky B, Berretta S, *et al.* Translational potential of olfactory mucosa for the study of neuropsychiatric illness. *Transl Psychiatry* 2015; 5(3): 495-501.
- 15 Matigian N, Abrahamsen G, Sutharsan R, Cook AL, Vitale AM, Nouwens A, *et al.* Disease-specific, neurosphere-derived cells as models for brain disorders. *Dis Model Mech* 2010; 3(11/12): 785-98.