论著

文章编号:1000-5404(2013)12-1188-04

树突状细胞通过NT-3/TrkC信号通路调控神经干细胞存活的体外研究

王 钟[1],陈太邦[1],王永飞[2],郭乔楠[2],赵建华[1] (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所脊柱外科[2]; 400038 重庆,第三军医大学西南医院病理学研究所[2])

[摘要] **目的** 研究共培养状态下树突状细胞(dendritic cell, DC)对神经干细胞(neural stem cell, NSC)存活的影响及其作用机制。**方法** 体外分离、纯化SD大鼠原代DC和NSC,将二者用Transwell技术共培养,用NT-3特异性抗体中和NT-3的表达;然后采用qRT-PCR方法检测DC中神经营养素-3(neurotrophin-3, NT-3)的mRNA水平,流式细胞术检测NSC凋亡;同时用免疫荧光、Western blot技术确定NSC表面NT-3特异性受体Trk C的表达。**结果** 与DC单独培养组相比,共培养体系中,DC表达NT-3水平显著性增强($P<0.05$);同时共培养能显著增加NSC存活,该效应能被NT-3特异性中和性抗体阻断;共培养能够增加NSC中NT-3特异性受体TrkC表达($P<0.05$),并上调TrkC磷酸化水平,而NT-3特异性抗体能够抑制TrkC表达和磷酸化上调($P<0.05$)。**结论** DC和NSC共培养能够增加DC中NT-3表达,高表达的NT-3则通过NSC膜上的TrkC受体促进NSC的存活。

[关键词] 神经干细胞;树突状细胞;NT-3;TrkC;存活;信号通路

[中图法分类号] R322.8;R329-33;R329.26 [文献标志码] A

Dendritic cell-induced neural stem cell survival *via* NT-3/TrkC signaling pathway

Wang Zhong[1], Chen Taibang[1], Wang Yongfei[1], Guo Qiaonan[2], Zhao Jianhua[1] ([1]Department of Spinal Surgery, Daping Hospital, Institute of Surgery Research, Third Military Medical University, Chongqing, 40042; [2]Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the effect of dendritic cell (DC) on neural stem cell (NSC) survival when they were cocultured *in vitro*. **Methods** Primary DC and NSC isolated and purified from SD rats were cocultured by Transwell technique *in vitro*. The expression of neurotrophin-3 (NT-3) mRNA in DC was determined by qRT-PCR, and the apoptotic ratio of NSC was detected with flow cytometry. In addition, the expression of NT-3 specific receptor tropomyosin receptor kinase C (TrkC) in NSC was detected with immuno flourescence and Western blotting. **Results** Compared with simple DC group, the expression of NT-3 significantly increased in the DC cocultured with NSC ($P<0.05$). The survival of NSC markedly increased and the effect was selectively blocked by a NT-3 specific neutralizing antibody. In addition, the levels of expression and phosphorylation of NT-3 specific receptor TrkC significantly increased in NSC ($P<0.05$), and the increase could also be inhibited by the NT-3 specific neutralizing antibody. **Conclusion** Coculture of DC and NSC upregulates the expression of NT-3 in DC and promotes the survival of NSC in a NT-3/TrkC-dependent manner.

[**Key words**] neural stem cell; dendritic cell; NT-3; TrKC; survival; signal pathway

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81070981). Corresponding author: Zhao Jianhua, E-mail: zhaojianhua1964@yahoo.com

神经干细胞(neural stem cell, NSC)具有可自我更新并分化为神经元和神经胶质细胞的能力,在脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)的治疗中有巨大应用潜力[1-4]。本课题组以及Mikami等[5]证实受损脊髓移植树突状细胞(dendritic cells, DC)能够改善局部微环境,促进内源性神经干细胞增殖,同时促进脊髓功能恢复。前期体内实验发现,在脊髓损伤后移植DC可增加局部组织中神经营养素-3(neurotrophin-3, NT-3)等保护性细胞因子的表达,促进损伤的脊髓恢复功能,将其用于临床实验,取得较好的效果[6-8]。体外实验也发现,NSC与DC共培养上清中的NT-3较对照组明显升高,并在48 h达到峰值浓度,升高的NT-3能促进

[基金项目] 国家自然科学基金(81070981)

[通信作者] 赵建华, E-mail:zhaojianhua1964@yahoo.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130410.1712.022.html(2013-04-10)

NSC 增殖,并更好地向神经元方向分化[9]。这些发现都提示共培养状态下 NT-3 对 NSC 起着重要作用,但具体机制尚不明了。本实验采用体外共培养条件下应用 NT-3 特异性抗体(antibody of NT-3,NT-3 抗体)阻断 NT-3 作用,观察 NT-3/TrkC 信号途径激活状态与 NSC 存活的关系,以明确 DC 分泌的 NT-3 在共培养条件下调控 NSC 的可能机制。

1 材料与方法

1.1 骨髓源性 DC 的原代培养

参照 Hauben 等[10]的方法培养诱导 SD 大鼠(4~6 周,雌性,体质量 150~200 g,第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供)胫骨骨髓来源的 DC,传代 2 次后收集备用。

1.2 NSC 原代培养

清洁级 SD 新生鼠(1~3 d,雌性,第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供)全脑组织分离纯化原代 NSC,参照 Mistry 等[11]的培养方法,传代培养。收集第 3 代细胞,制备细胞悬液备用。

1.3 共培养体系建立

使用6孔培养板分两组培养 DC,每组重复 3 次。NSC/DC 组:NSC 和 DC 用 Transwell 小室(0.4 μm, Millipore)分隔培养组,上室 DC(细胞浓度 1×10^5/mL,1.5 mL),下室 NSC(细胞浓度 1×10^6/mL,2.5 mL)。DC 单独培养组:将收集的 DC 加入上室(细胞浓度 1×10^5/mL,1.5 mL),下室 DMEM/F12 培养基,2.5 mL。共培养 48 h 后收集上室 DC 待检测。

其余部分实验分 3 个实验组,每组重复实验 3 次。NSC/DC 组处理同前,只收集 NSC。单纯 NSC 组:上室 DMEM/F12,1.5 mL,下室 NSC,1×10^6/mL,2.5 mL。NSC/DC + NT-3 抗体组:细胞浓度同 NSC/DC 组,培养基为含 20 μg/mL NT-3 抗体(博奥深,bs-0160r)的 DMEM/F12。共培养 48 h 后收集下室 NSC 待检测。

1.4 细胞免疫荧光染色

将 NSC/DC 组和 NSC 组的神经球收集于离心管中,4% 多聚甲醛固定 15 min,PBS 清洗 3 次,0.3% Triton X-100 穿膜 15 min,PBS 漂洗 5 min×3 次,加 1% BSA 封闭15~30 min 后,加入多克隆兔抗大鼠 TrkC 一抗(1∶500,Abcam),4 ℃过夜,37 ℃复温 2 h,PBS 漂洗 5 min×3 次,加 CY3 标记的山羊抗兔二抗(碧云天)室温孵育 90min。PBS 漂洗 5 min×3 次后复染 Hochest。PBS 漂洗 5 min×3 次后中性树胶封片,激光共聚焦显微镜下观察细胞形态并照片。

1.5 Western blot 检测

收集各组下室 NSC 细胞,经细胞裂解液裂解后提取总蛋白。样本分两组,其中检测磷酸化 TrkC(p-TrkC,Abcam ab79811)组的蛋白经磷酸化蛋白富集柱(Thermo Scientific,90003)富集磷酸化蛋白,备用。将两组蛋白经考马斯亮蓝比色法定量。待检测 p-TrkC 的蛋白经过 7% SDS-PAGE 凝胶电泳,PVDF 转膜,脱脂奶粉室温封闭 2 h;加入一抗:绵羊抗大鼠p-TrkC多抗(1∶300),4 ℃过夜,二抗为辣根过氧化物酶标记兔抗绵羊抗体(Sigma,A6154)。待检测 TrkC 的蛋白经过 10% SDS-PAGE 凝胶电泳,PVDF 转膜,脱脂奶粉室温封闭 2 h;加入一抗:兔抗大鼠 TrkC 多抗(1∶200,博奥深 bs-0176R),4 ℃过夜,二抗为辣根过氧化物酶标记山羊抗兔抗体。将经二抗共孵育1 h的 PVDF 膜用 PBS 漂洗 5 min×3 次,辣根过氧化物酶再与化学发光底物(SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific)结合而可产生可测量信号。作用 1 min,Thermo X 线片暗盒曝光、显影、定影形成底片。扫描底片,Labwork 软件分析 Western blot 条带灰度值。

1.6 实时定量 PCR(quantitative real time PCR, qRT-PCR)检测 DC 的 NT-3 mRNA 表达及 NSC 中 TrkC mRNA 表达

所有引物由自上海生工生物工程有限公司设计并合成。参照 Trizol 试剂盒说明提取各组 NSC 中 RNA。逆转录反应体系:SYBR Premix Ex Taq™原液 5 μL 稀释至 10 μL、上下游引物(10 μmol/L) 1.6 μL、cDNA 模版 1.6 μL、灭菌蒸馏水(dH_2O) 6.8 μL。反应条件:95 ℃预变性 90 s、52.6 ℃退火 30 s、68 ℃延伸 60 s 45 个循环、68 ℃ 5 min。产物经凝胶电泳后,读取条带灰度值,以目的条带与内参条带的比值代表目的基因 mRNA 的表达水平。引物设计:TrKC 上游引物 5′-CCCACTACAA-CAATGGCAACT-3′,下游引物 5′-AAAGAGGACCACCAGAAG-GAC-3′,产物长度 42 bp;NT-3 上游引物 5′-CAAGTCCTCAGC-CATTGACAT-3′,下游引物 5′-CCAGCCTACG-AGTTTGTTGT-3′,产物长度 41 bp。

1.7 流式细胞术检测 NSC 凋亡率

使用商品化 Annexin V 试剂盒(欣博盛,FAK012)检测 NSC 凋亡率。方法简介如下:取总数为 10^6 的 NSC,加入胰酶吹打成单细胞悬液,用 4 ℃无菌 PBS 漂洗 2 次,结合缓冲液重悬,将细胞浓度调至 5×10^5/mL。取 195 μL 细胞悬液,先加 5 μL Annexin V-FITC 5 min,后加入 10 μL 浓度为 20 μg/mL 的 PI,室温孵育 10 min,采用流式细胞术检测。

1.8 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件行 t 检验。

2 结果

2.1 与 NSC 共培养上调 DC 中 NT-3 mRNA 表达

与 NSC 共培养 48 h, NSC/DC 组 DC 中 NT-3 mRNA 的表达显著高于 DC 单独培养组[(2.36±0.14) *vs* (1.17±0.04),$P<0.05$],显示与 NSC 共培养能够促进 DC 对 NT-3 的表达。

2.2 与 DC 共培养促进 NSC 的存活

流式细胞学检测发现 NSC/DC 组 NSC Annexin V 和 PI 双阴性细胞占总细胞的(48.83±1.65)%,较 NSC 组[(37.80±1.96)%]、NSC/DC + NT-3 抗体组[(37.77±2.73)%]显著性增高。且 NSC/DC 组 Annexin V 阳性 PI 阴性的早期凋亡细胞[(19.45±0.94)%]较 NSC 组[(25.30±1.63)%]、NSC/DC + NT-3 抗体组[(34.14±3.62)%]明显降低。

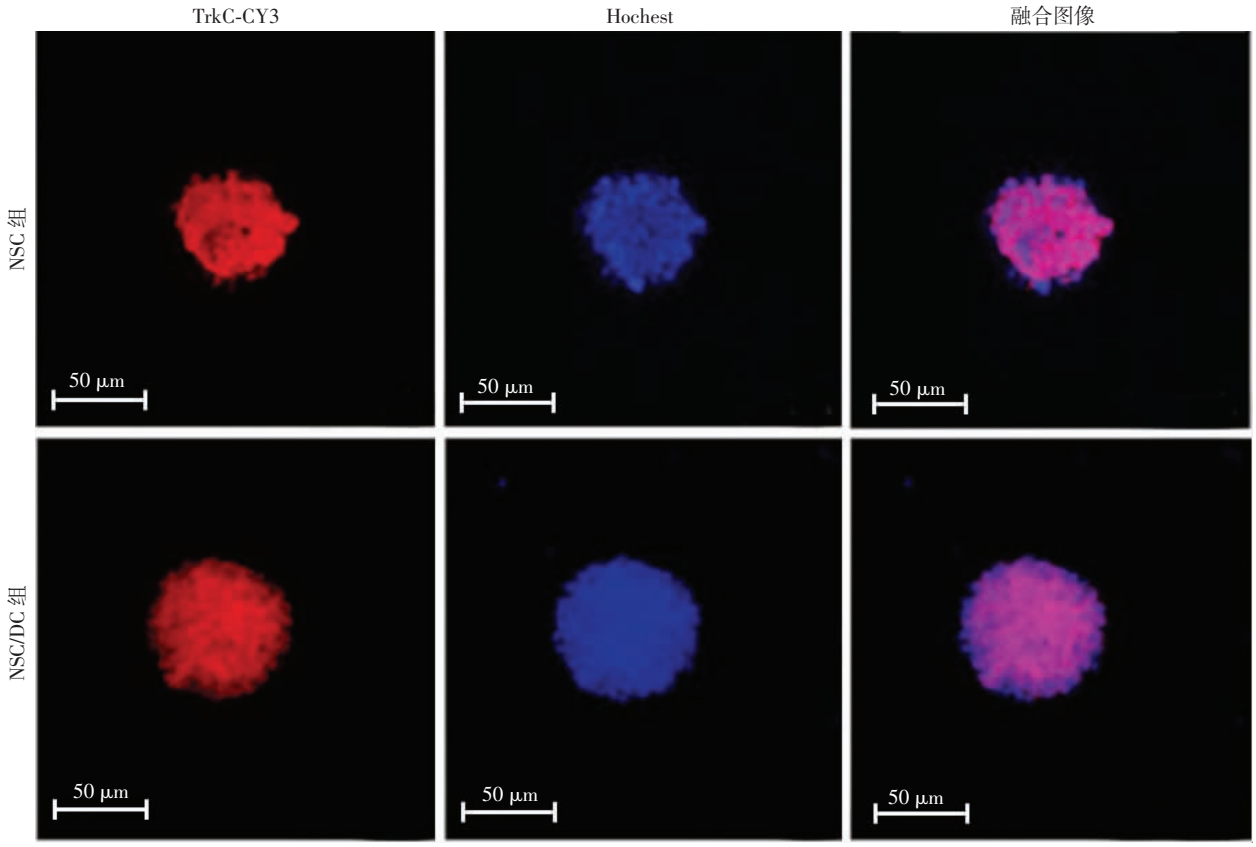
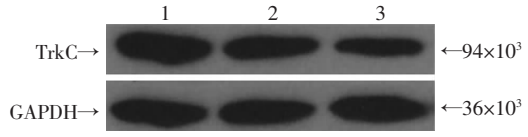


图1 激光共聚焦显微镜观察共培养对NSC的TrkC表达的影响

2.3 与DC共培养增强NSC中TrkC mRNA和蛋白表达

免疫荧光检查发现NSC/DC组NSC细胞球增大，TrkC（CY3红色荧光）表达较单纯NSC组NSC明显增加（图1）。qRT-PCR结果显示，与DC共培养能够显著增加NSC中TrkC的表达，即NSC/DC组NSC的TrkC mRNA水平（1.254±0.062）较NSC组（1.002±0.087）显著增高（$P<0.05$）；NSC/DC+NT-3抗体组TrkC mRNA表达（0.607±0.102）低于NSC/DC组（$P<0.05$），显示NT-3抗体能够阻断NSC/DC共培养TrkC mRNA的上调作用。Western blot证实在蛋白水平具有同样效应［NSC/DC组、NSC组、NSC/DC+NT-3抗体组分别为（1.148±0.038）、（0.912±0.068）、（0.682±0.087），图2］。

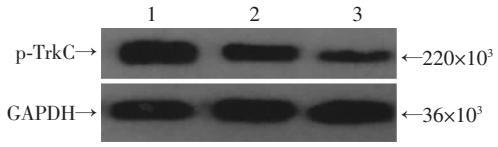


1：NSC/DC组；2：NSC组；3：NSC/DC+NT-3抗体组

图2 Western blot检测各组NSC的TrkC蛋白的表达

2.4 与DC共培养促进NSC中TrkC磷酸化

Western blot检测发现NSC/DC组p-TrkC水平（1.100±0.162）高于其余两组［NSC组、NSC/DC+NT-3抗体组分别为（0.651±0.052）、（0.392±0.066），$P<0.05$］，且变化趋势同TrkC相似（图3）。



1：NSC/DC组；2：NSC组；3：NSC/DC+NT-3抗体组

图3 Western blot检测各组NSC的p-TrkC蛋白的表达

3 讨论

神经干细胞具有促进脊髓损伤修复的能力[12]，但是单独移植神经干细胞的存活和分化非常有限，主要原因在于局部的抑制性微环境不利于其存活和分化，故而目前多采用干细胞联合神经营养策略，如增加局部NT-3、BDNF[4]，或者联合移植具有神经营养作用的细胞[5]以改善局部微环境。本实验证实DC和NSC共培养能够增加DC中NT-3表达，并转而上调NSC中NT-3特异性受体TrkC表达，促进NSC存活；在共培养体系中使用NT-3特异性中和抗体能够选择性阻断该效应，并下调p-TrkC水平，表明该作用是通过NT-3/TrkC途径而实现。现已证实，树突状细胞在受到外界抗原刺激时能增加包括NT-3、BDNF在内的多种神经营养因子的表达[9,13]，表明该体系中，神经干细胞或相关因素可能作为抗原性物质刺激树突状细胞而促进其

分泌 NT-3。值得注意的是,在 NSC/DC + NT-3 抗体组,NSC TrkC mRNA 和蛋白表达水平甚至低于单独 NSC 组,表明 NSC 可能有低水平的 NT-3 表达[14]。

NT-3 作为神经营养因子家族重要成员之一,广泛分布在神经系统,对神经系统的发育与存活起到至关重要的作用[15-16]。NT-3 及其受体 TrkC 缺陷的动物模型无法存活到成年,原因在于其背根神经节发育明显异常。而去除成年动物 NT-3 却不会诱发明显的神经功能异常,提示 NT-3 对神经发育或干细胞分化、增殖起重要作用,而发育成熟的神经组织对 NT-3 的依赖性下降。研究发现,损伤能够活化 CNS 中的神经干细胞,并逆转脊髓组织对 NT-3 的依赖性。Lee 等[17]研究发现,成年动物脊髓损伤后,局部重新出现多种胚胎时期表达的干性基因。Jessen 等[18]发现 SCI 能够增加脊髓局部神经细胞的去分化而增加其对 NT-3 等神经营养性因素的依赖性。本实验证实与 NSC 共培养能够增加 DC 表达 NT-3,并转而促进神经球增殖、存活,显示 DC 在 SCI 情况下能够对损伤局部起到有益的营养支持作用,从而促进局部活化的神经干细胞存活、增殖。

TrkC 作为 NT-3 的特异性受体,在与 NT-3 结合后发生自身磷酸化而发挥生物学作用[19-20]。本实验结果显示,与 DC 共培养能够显著促进 NSC 中 TrkC 的表达及活化,而是用 NT-3 特异性受体能够选择性阻断该效应,证实 DC 是通过 NT-3/TrkC 信号途径促进 NSC 存活和分化。

本实验证实,在体外 NSC 与 DC 共培养能够增加 DC 对 NT-3 的表达,并通过 NT-3/TrkC 信号途径促进 NSC 存活,但是 NSC 和 DC 来源的 NT-3 在促进 NSC 存活中所起的作用比例尚需进一步实验明确。

参考文献:

[1] Ronaghi M, Erceg S, Moreno-Manzano V, *et al*. Challenges of stem cell therapy for spinal cord injury: human embryonic stem cells, endogenous neural stem cells, or induced pluripotent stem cells? [J]. Stem Cells, 2010, 28(1): 93-99.

[2] Duan X, Kang E, Liu Y C, *et al*. Development of neural stem cell in the adult brain[J]. Curr Opin Neurobiol, 2008, 18(1): 108-115.

[3] Profyris C, Cheema S S, Zang D, *et al*. Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury[J]. Neurobiol Dis, 2004, 15(3): 415-436.

[4] Lu P, Jones L L, Tuszynski M H. BDNF-expressing marrow stromal cells support extensive axonal growth at sites of spinal cord injury[J]. Exp Neurol, 2005, 191(2): 344-360.

[5] Mikami Y, Okano H, Sakaguchi M, *et al*. Implantation of dendritic cells in injured adult spinal cord results in activation of endogenous neural stem/progenitor cells leading to de novo neurogenesis and functional recovery[J]. J Neurosci Res, 2004, 76(4): 453-465.

[6] Wang B, Xiao Z, Chen B, *et al*. Nogo-66 promotes the differentiation of neural progenitors into astroglial lineage cells through mTOR-STAT3 Pathway[J]. PLoS One, 2008, 3(3): e1856.

[7] Mausberg A K, Jander S, Reichmann G. Intracerebral granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces functionally competent dendritic cells in the mouse brain[J]. Glia, 2009, 57(12): 1341-1350.

[8] Hayashi K, Ohta S, Kawakami Y, *et al*. Activation of dendritic-like cells and neural stem/progenitor cells in injured spinal cord by GM-CSF[J]. Neurosci Rese, 2009, 64(1): 96-103.

[9] 王永飞, 赵建华, 晁瑞, 等. DCs 和 NSPCs 共培养促进 NSPCs 增殖及其机制的初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(5): 373-377.

[10] Hauben E, Gothilf A, Cohen A, *et al*. Vaccination with dendritic cells pulsed with peptides of myelin basic protein promotes functional recovery from spinal cord injury [J]. J Neuiosci, 2003, 23(25): 8808-8819.

[11] Mistry S K, Keefer E W, Cunningham B A, *et al*. Cultured rat hippocampal neural progenitors generate spontaneously active neural networks[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(3): 1621-1626.

[12] Kornblum H I. Introduction to neural stem cells[J]. Stroke, 2007, 38(2 Suppl): 810-816.

[13] Wang K, Chao R, Guo Q N, *et al*. Expressions of some neurotrophins and neurotrophic cytokines at site of spinal cord injury in mice after vaccination with dendritic cells pulsed with homogenate proteins[J]. Neuroimmunomodulation, 2013, 20(2): 87-98.

[14] 晁瑞, 赵建华, 刘明永, 等. 树突细胞及神经干细胞/前体细胞联合移植促进脊髓损伤大鼠运动功能恢复[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(10): 998-1002.

[15] Chen Q, Smith G M, Shine H D. Immune activation is required for NT-3-induced axonal plasticity in chronic spinal cord injury[J]. Exp Neurol, 2008, 209(2): 497-509.

[16] 陈太邦, 赵建华, 王永飞, 等. 体外树突状细胞通过 NT-3 上调 P-ERK1/2 的表达促进神经干/祖细胞分化[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(23): 2368-2372.

[17] Lee H J, Wu J, Chung J, *et al*. SOX2 expression is upregulated in adult spinal cord after contusion injury in both oligodendrocyte lineage and ependymal cells[J]. J Neurosci Res, 2013, 91(2): 196-210.

[18] Jessen K R, Mirsky R. Negative regulation of myelination: relevance for development, injury, and demyelinating disease[J]. Glia, 2008, 56(14): 1552-1565.

[19] Lanave C, Colangelo A M, Saccone C, *et al*. Molecular evolution of the neurotrophin family members and their Trk receptors[J]. Gene, 2007, 394(1/2): 1-12.

[20] Bratke K, Maruschke L, Darowski M, *et al*. A role for the neurotrophin receptor TrkB on maturing dendritic cells[J]. J Neuroimmunol, 2007, 189(1/2): 88-94.

(**收稿**:2013-01-31;**修回**:2013-03-20)

(编辑 王小寒)