论 著 文章编号:0253-3626(2008)11-1301-04

星形胶质细胞通过激活PKA信号通路在神经干细胞增殖、分化中的作用

张云东[1],顾小红[1],赵继宗[2],许民辉[1],邹咏文[1],沈光建[1]

(1. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所,重庆 400042;2. 首都医科大学附属天坛医院神经外科,北京 100050)

【摘 要】目的:研究星形胶质细胞(Astrocyte,AS)对PKA信号通路的激活在神经干细胞(Neural stem cell,NSC)增殖、分化中的调节作用。方法:取孕13 d胎鼠大脑皮层分散培养NSC,应用AS培养上清刺激NSC,以及应用PKA受体拮抗剂H_{89}预处理大脑皮层NSC后,用Western blot方法测定NSC内PKA、nestin、NSF的含量变化,采用MTT 测量和分析AS对培养的NSC增殖和定向分化的影响。结果:正常对照组的NSCNSF含量较低,AS刺激后,nestin含量迅速降低,而NSF的含量则逐渐升高;H_{89}(15 μmol/L)可明显抑制AS刺激NSC后NSF含量的增加。结论: AS可通过激活NSCPKA信号通路,促进NSC增殖和分化。

【关键词】星形胶质细胞;神经干细胞;PKA;NSF

【中国图书分类法分类号】R581.11 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-01-07

Role of astrocyte in the proligeration and differentiation of nerve stem cells by activating PKA signal pathway

ZHANG Yun-dong, et al

(*Department of Neurosurgery, Daping Hospital Research Institute of Field Surgery, the Third Military Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To study the effect of astrocyte activating PKA signal pathway on the proligeration and differentiation of nerve stem cells.*Methods*:Cerebral cortex of 13-day embryo mice was taken and the nerve stem cells were cultured scatteringly. Astrocyte was used to stimulate the nerve stem cells,and H89, PKA recepter antagonist, was used to pretreat the nerve stem cells of the cerebral cortex, then the contents of PKA,nestin,and NSF in the nerve stem cells were determined using western blot. MTT was applied to determine and analyse the effect of horizontal cell on the proliferation and orientational differentiation of cultured nerve stem cells. *Results*:In the normal control group the content of NSF in the nerve stem cells was low; after astrocyte stimulation the nestin content decreased rapidly,while the content of NSF increased gradually. H_{89}(15 μmol/L) could markedly supress the increase of NSF content in the nerve stem cell stimulated by horizontal cells. *Conclusion*:Astrocyte can promote the proliferation and differentiation of nerve stem cells by activating PKA signal pathway of nerve stem cells.

【Key words】 Neural stem cells;Astrocyte;PKA;NSF

星形胶质细胞(Astrocyte,AS) 能分泌多种细胞因子,调控神经干细胞(Neural stem cell,NSC)分化。有关NSC移植,人们进行了许多实验性研究,移植的NSC都经历过一个体外培养的过程,NSC移植后保持着多分化潜能,局部微环境信号AS的作用在诱导其分化方面可能起重要的作用[1],然而通过何种途径调控NSC分化,尚不清楚。我们通过用AS培养的上清液刺激培养的NSC,观察其形态特点和发育规律的变化, 以期认识AS对NSC移植后细胞分化调节中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 NSC取材和培养

取孕12 d Wistar大鼠(第三军医大学附属大坪医院动物室提供),3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉,在解剖显微镜下分离取出胎鼠大脑,剪下大脑皮层,经D-Hank's液冲洗后仔细

作者介绍: 张云东(1968-),男,副教授、副主任医师,博士后,研究方向:创伤后应激反应的调控机理。

通讯作者: 顾小红,女,副教授,E-mail:zhanggxh68@sina.com。

基金项目: 重庆市自然科学基金(CSTC,2008BB5105);第三军医大学校科研基金。

剪碎成约0.5 mm^3的小块;吸管反复吹打后,镜下见全部分散为单细胞;转移细胞悬液到50 ml培养瓶内,加入无血清的完全培养液(培养液由DMEM/F12、bFGF 20 ng/ml、青霉素 100 U/L和链霉素 100 U/L)。

NSC的传代:将原代培养7 d后贴壁细胞及在贴壁细胞上形成的细胞球,经吹打收集于离心管中,加入0.25%的胰酶,37℃消化3~5 min;将培养液和细胞克隆团,离心5 min(800 r/min),加入新鲜的培养液;以吸管轻吹打后,用完全培养液制成单细胞悬液,进行台盼蓝染色并记数。

单细胞克隆:用吸管在传至第五代NSC的50 ml培养瓶内,吸出1个细胞团,转移到10 ml离心管内;分散为单细胞悬液,吸1 ml细胞悬液到50 ml细胞培养瓶,加入47 ml的DMEM/Fu,使总体积为48 ml,细胞数约100个。

1.2 AS的培养及鉴定[2]

将上述脑组织细胞悬液用0.125%的胰蛋白酶消化15 min(37℃),用含有血清的培养基终止消化,离心10 min(1 000 r/min)。吹散细胞用培养基稀释先行贴壁处理,然后以2×10^6个接种于75 cm^2的塑料培养瓶中, 培养基为DMEM/F12和10%新生牛血清。生长8~10 d待细胞融合后,置于37℃摇床中14~16 h(250 r/min),用以去除少突胶质细胞和小胶质细胞,然后用0.25%胰蛋白酶消化传代,培养约28 d,使得AS处于指数生长期。免疫荧光法检测培养细胞的胶质原纤维酸性蛋白表达方法。小鼠抗胶质原纤维酸性蛋白IgG1,按1:500倍稀释,FITC标记的羊抗小鼠IgG,按1:200倍稀释。

分组①刺激组:培养AS的上清液刺激培养的NSC组;②拮抗剂处理组:预先用H_{89}(15 μmol/L)处理,再用培养AS的上清液刺激;③对照组:对照组-培养基刺激培养的NSC;H_{89}对照组-预先加入相同剂量的H_{89}稀释液D-Hank,再用培养基刺激培养的NSC。

在细胞培养室的下室加入培养AS无血清培养基培养的上清400 μl和200 μl 无血清培养基,再在上述各组细胞培养室的上室加入NSC悬液(6.7×10^2个/ml)200 μl个。

1.3 用Western blot方法测定PKA、nestin、NSF的表达

提取培养NSC总蛋白,根据蛋白浓度计算所需上样量。加一抗、辣根过氧化物酶标记二抗,化学发光试剂增强反应,曝光,凝胶成像系统分析结果,设对照并重复3次。

1.4 MTT实验检测NSC的增殖

称取250 mg MTT,放入小烧杯中,加50 ml PBS(0.01 mol/L,pH7.4)在电磁力搅拌机上搅拌30 min,用0.22 μm的微孔滤器隙菌,分装,4℃保存,浓度为5 mg/ml。离心收集NSC,吸管机械吹打分离,制备单细胞悬液,记数板镜下记数,每孔150 μl的体积,1×10^5个/ml细胞密度接种于96孔培养板中, 每15孔为1组,培养7 d后,每孔加入MTT溶液(5 mg/ml)20 μl,37℃孵育4 h,终止培养,小心吸取孔内上清液,置于EF管中,离心1 000 r/min,5 min,弃上清,每孔加入150 μlDMSO,振荡10 min,使结晶物充分溶解,于490 nm波长,酶联免疫检测仪测定各孔光吸收值,由OD值判断细胞增殖情况。

1.5 统计学处理

实验结果用"$\bar{x}\pm s$"表示,采用SPSS软件进行单因素方差分析。

2 结 果

2.1 相差显微镜观察

AS刺激NSC后4~6 h,观察到NSC胞体收缩,呈圆形或卵圆形,折光性较强,细胞数目逐渐减少。

2.2 AS对NSC磷酸化PKA(P-PKA)含量的影响

2.2.1 PKA含量的变化 AS刺激NSC后,于30 min、2 h、6 h P-PKA含量明显增加,于6 h后回落至较低水平,于24 h P-PKA含量仍在较低水平,但与对照组仍差异非常显著($P<0.01$);H_{89}可明显抑制AS刺激NSC的P-PKA含量增加(表1,图1)。

表1 AS对神经干细胞P-PKA含量变化的影响($\bar{x}\pm s$,$n=3$)

	PKA 含量(OD)	
	AS	AS+H_{89}
对照组	0.46±0.03	0.32±0.05
15 min	1.21±0.11**	0.64±0.16*
30 min	4.90±0.20**	2.42±0.19**
2 h	3.74±0.22**	0.83±0.08**
6 h	2.07±0.17**	1.16±0.07**
12 h	2.68±0.16**	1.45±0.17**
24 h	2.70±0.23**	1.80±0.08**

注:*$P<0.05$,**$P<0.01$

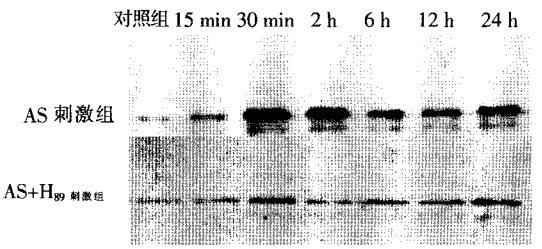


图 1 NSCP-PKA 含量的变化

2.2.2 AS激活的PKA在NSC分化中的作用 Westen blot检测了nestin蛋白:AS处理后,nestin蛋白快速减少或消失;而NSF蛋白的含量明显逐渐增加(表2、3,图2、3)。

2.2.3 AS在NSC增殖中的作用 在AS培养的过程中,NSC均呈悬浮球状生长,细胞形态为圆形,未见突起生长,与空白对照组形态相似,没有或者仅有少量细胞贴壁。MTT法检测AS对NSC增殖的影响,结果显示可明显促进NSC增殖。AS作用后6 h细胞增殖最为明显,然后增殖效应逐渐减弱(表4)。

表2 AS诱导神经干细胞nestin的变化($\bar{x}\pm s$, n=3)

	Nestin 含量(OD)	
	AS	AS+H_{89}
对照组	3.27±0.20	1.46±0.17
15 min	1.52±0.16**	1.02±0.09*
30 min	1.40±0.12**	0.96±0.13**
2 h	0.93±0.10**	0.90±0.12**
6 h	0.71±0.13**	0.55±0.07**
12 h	0.65±0.15**	0.30±0.04**
24 h	0.37±0.08**	0.18±0.03**

注:*P<0.05,**P<0.01

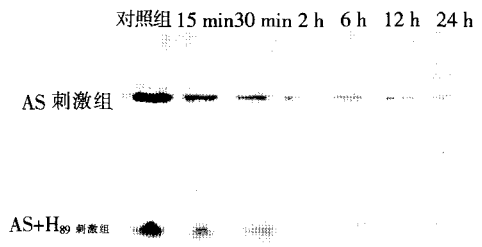


图 2 NSCnestin 含量的变化

表3 AS诱导神经干细胞NSF分化的影响(OD)($\bar{x}\pm s$, n=3)

	NSF 含量(OD)	
	AS	AS+H_{89}
对照组	0.75±0.15	0.41±0.12
15 min	0.82±0.10	0.35±0.11
30 min	0.64±0.07	0.40±0.07
2 h	0.61±0.16	0.40±0.10
6 h	2.19±0.10**	0.81±0.09**
12 h	3.13±0.23**	0.83±0.15**
24 h	3.28±0.17**	1.15±0.13**

注:*P<0.05,**P<0.01

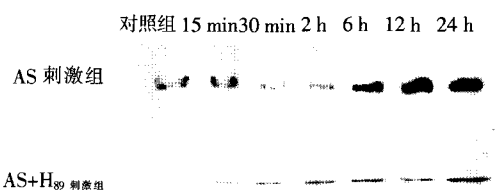


图 3 细胞 NSF 含量的变化

3 讨 论

由于AS是占中枢神经细胞总数40%~60%的一大类细胞群体,目前认为AS是形成中枢神经系统微环境重要的组成成分,对神经元的物质代谢、神经信号传递处理和脑的高级功能活动具有重要作用。

表4 AS对神经干细胞增殖的影响(OD)($\bar{x}\pm s$, n=5)

	OD	
	AS	AS+H_{89}
对照组	0.67±0.12	0.54±0.10
6 h	2.37±0.23**	0.63±0.11
12 h	2.19±0.20**	0.75±0.13*
18 h	2.16±0.12**	1.13±0.12**
24 h	1.92±0.20**	1.43±0.21**

注:*P<0.05,**P<0.01

PKA信号通路在调节发育中的脑和几种神经细胞链向神经元和胶质细胞分化中起关键作用,然而,在AS在NSC发育和分化中的作用以及PKA信号通路在其中的作用知之甚少。

我们检测了用AS处理的NSC活性,研究发现,正常情况下NSC有少量的磷酸化PKA含量,AS刺激后,P-PKA染色含量明显增加。发现PKA活性快速增加,在6 h内增加3倍,活性于12 h达峰值,然后逐渐下降,于处理后24 h回落至较低水平,刺激后各组P-PKA含量明显提高;预先用 PKA阻滞剂H_{89}均可明显抑制AS刺激的干细胞P-PKA含量增加。说明AS可刺激NSCcAMP生成增加后,cAMP继而活化PKA,使异四聚体的PKA解离,催化亚基从而由细胞质进入核内继续传递信息。提示PKA信号物质参与了AS调控的NSC功能变化的过程[3,4],PKA信号通路的激活可促进CREB磷酸化,而进一步调节与调节干细胞的生长、分化相关的各种靶基因的产生[5,6]。

为了研究NSC在AS作用下的增殖情况,本实验采用近年来广泛应用的MTT法四唑盐(MTT)比色试验。与细胞计数法、软琼脂克隆形成试验及3H-TdR掺入试验等计数方法比较,MTT法具有灵敏度高,重复性好,操作简便、经济、快速、易自动化的优点。

作为一种检测细胞存活和生长的方法,MTT试验显色剂四唑盐是一种能接受氢原子的染料,活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性的MTT还原为难溶性的蓝紫色结晶物,并沉积在细胞中,而无活性的细胞无此功能。二甲基亚砜(DMSO)能溶解细胞中的紫色结晶物,酶联免疫检测仪在490 nm波长处测定其光吸收值,由其OD值可间接反映活细胞数量。

本实验中AS处理NSC后,细胞呈现NSC所特有的克隆团样悬浮生长,没有或者仅仅有很少量的细胞贴壁,与对照组的细胞形态相同;Nestin检测阳性,BrdU标记实验亦显示NSC克隆团中绝大部分细胞具

有分裂增殖能力,也即在MTT实验中细胞数目的增加是NSC自身增殖的结果。NSC均呈悬浮球状生长,细胞形态为圆形,未见突起生长,与空白对照组形态相似,没有或者仅有少量细胞贴壁,Nestin检测阳性。BrdU荧光标记结果显示细胞克隆中大部分细胞为BrdU阳性细胞,表明克隆主要由分裂增殖的细胞组成。

前面的实验证实,AS处理NSC后,可活化PKA引起,但是否能引起干细胞增殖和分化? 实验显示,用AS刺激NSC,于6 h后细胞数量逐渐增加达到高峰。用H_{89}预先处理NSC,可明显减少细胞量的增加,说明AS引起细胞内P-PKA催化亚基从胞质进入胞核,不仅可使转录因子CREB磷酸化,而且可使磷酸化的CREB具有转录活性,可以使干细胞增殖增加,AS可通过刺激PKA信号通路调控NSC的分化和增殖[7,8]。

本研究探讨了AS引起NSC分化的生物化学特性,我们用免疫细胞化学、Westen blot检测了nestin蛋白:AS处理后24 h,nestin蛋白快速减少或消失;而NSF蛋白的含量明显增加。所以,通过AS激活PKA促进CREB磷酸化,从而调节神经元分化相关的各种基因的表达[9,10]。

NSC与其它干细胞类似,在体内的分化过程中均受到局部环境中各种信号分子的作用。在本实验中,我们只探讨了微环境中的一个因素,即用纯化培养的AS刺激NSC,所以无法知道在在体多种因素联合诱导下,哪中因素效应较其它因子占优;多因素影响力达平衡产生多系分化细胞;多因素之间的相互作用;多因素联合诱导有别于单因子诱导的结果,所以就无法明确AS在微环境中对NSC作用的地位,这有待于我们今后的实验阐明,但无论是否起主导地位,最终是明确了AS可通过激活PKA信号通路调控神经干细胞,这对研究NSC移植后的增殖、分化具有重要的理论和实际意义。

参 考 文 献

[1] Nakayama T,Momoki S T,Inoue N,et al. Astrocyte2derived factors instruct differentiation of embryonic stem cells into neurons[J]. NeurosciRes,2003,46(2):241-249.

[2] McCarthy K D,Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures form rat cerebral[J]. J Cell Biology,1980,85(3):890-902.

[3] Bousquet C,Chesnokova V,Kariagina A,et al. cAMP neuropeptide agonists induce pituitary suppressor of cytokine signaling-3: novel negative feedback mechanism for corticotroph cytokine action[J]. Mol Endocrinol,2001,15(11):1880-1890.

[4] Giwon K,Youngshik C,Junehee P,et al. Activtion of protein kinase A induces neuronal differentiation of HiB5 hppocampal progenitor cells[J]. Mol Brain Research,2002,109(4):134-145.

[5] White D M,Walker S,Brenneman D E,et al. CREB contributes to the increased neurite outgrowth of sensory neurons induced by vasoactive intestinal polypeptide and activity-dependent neurotrophic factor[J]. rain Res,2000,868(1):31-38.

[6] Chu M S,Chang C F,Yang C C,et al.Signalling pathway in the induction of neurite outgrowth in human mesenchymal stem cells[J]. Cell Signal,2006,18(4):519-530.

[7] Song H,Stevens C F,Gage F H. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells[J]. Nature,2002,417(1):39-44.

[8] An Y H,Wang H Y,Gao Z X,et al. Differentiation of rat neural stem cells and its relationship with environment[J]. Biomed Environ Sci,2004,17(1):1-7.

[9] Kimura I,Konishi M,Miyake A,et al.Neudesin,a secreted factor, promotes neural cell proliferation and neuronal differentiation in mouse neural precursor cells[J]. J Neurosci Res,2006,83(8):1415-1424.

[10] Seki T.Microenvironmental elements supporting adult hippocampal neurogenesis[J]. Anat Sci Int,2003,78(2):69-78.

(责任编辑:关蕴良)

《重庆医科大学学报》

欢迎投稿,欢迎订阅

邮发代号 78-132