维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)08-0812-05

神经干细胞定向分化为少突胶质细胞的实验研究

杨慧敏,王顺和

(重庆医科大学基础医学院病理学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:通过体外诱导使神经干细胞定向分化为少突胶质细胞,为从神经干细胞来源得到少突胶质细胞提供实验基础。方法:体外分离培养新生大鼠神经干细胞,加入甲状腺素(T_3)和(或)胰岛素诱导分化,免疫细胞化学方法检测诱导末期 NSC 分化中 GalC,GFAP 的表达,通过比较增殖情况、分化率、GalC 阳性细胞突起长度分析不同诱导因素组合对 NSC 定向诱导为少突胶质细胞的作用。结果:经甲状腺素和(或)胰岛素诱导后能够分化出少突胶质细胞,不同浓度 T_3 和(或)胰岛素对少突胶质细胞分化的影响不同。结论:甲状腺素和胰岛素能诱导神经干细胞向少突胶质细胞分化,且促进分化细胞的增殖和成熟,T_3(40ng/ml)和胰岛素(25μg/ml)共同使用时这一作用较明显。

【关键词】神经干细胞;甲状腺素;胰岛素;细胞分化

【中国图书分类法分类号】R329.28 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-11-09

Induction of neural stem cells into oligodendrocytes

YANG Huimin, et al

(*Department of Pathology, Institute of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To induce neural stem cells (NSCs) differentiating into oligodendrocytes in vitro and provide experiment foundation for NSCs-derived oligodendrocytes. *Methods*: The primary NSCs were isolated from endbrain and midbrain of neonatal rats, and then the cells were cultured in vitro. NSCs were induced by thyroid hormone(T_3) and(or) insulin, and the effect of T_3 and insulin was analysed by comparing the proliferation and the differentiation rate of NSCs and by measuring the prominency of GalC-positive cells. *Results*: NSCs were induced into oligodendrocytes by thyroid hormone and/or insulin, and different concentration of T_3 and/or insulin had different effects on differentiation. *Conclusion*: Thyroid hormone and insulin can induce NSCs to differentiate mainly into oligodendrocyte and promote the proliferation and maturation of oligodendrocytes. The effect is more outstanding when 40ng/ml T_3 is used in combination with 25μg/ml insulin.

【Key words】 Neural stem cell; Thyroid hormone; Insulin; Cellular differentiation

神经干细胞(Neural stem cells, NSCs)是神经组织的干细胞,可分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞,在胚胎及成年哺乳类动物中广泛存在。少突胶质细胞(Oligodendrocyte, OLs)作为中枢神经系统的成髓鞘细胞,在神经干细胞的自然分化产物中所占比例最少[1]。近年来脱髓鞘疾病如多发性硬化症等的发病有上升的趋势,少突胶质细胞的作用也越来越多的受到人们的重视,如何在体外获得足量的 OLs 成为脱髓鞘疾病治疗研究中存在的难题,目前建立的 OLs 分离培养方法操作困难,且获得的细胞纯度不尽人意。如果能在一定条件下,使 NSCs 定向分化为少突胶质细胞,不失为 OLs 的另一有效来源。本实验通过培养获得新生大鼠端脑及中脑神经干细胞,利用不同浓度的甲状腺素(T_3)和(或)胰岛素使 NSCs 分化出更多的 OLs,旨在为在体或离体诱导神经干细胞向少突胶质细胞分化,通过细胞移植治疗脱髓鞘疾病提供实验基础。

作者介绍:杨慧敏(1979-),女,硕士,主要研究方向:神经病理。

1 材料与方法

1.1 实验动物

新生 24h 内清洁级 Wistar 大鼠,购于第三军医大学大坪医院动物实验中心。

1.2 主要试剂及抗体

甲状腺素(T_3)和胰岛素购自 Sigma 公司,抗 nestin 和抗 GalC 购自 Chemicon 公司,抗 GFAP 购自北京中山生物技术有限公司。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.3 神经干细胞的分离培养及鉴定

新生 24h 内清洁级 Wistar 大鼠，处死后无菌条件下分离端脑及中脑部分，剪碎后加入 0.125%胰酶 /0.02%EDTA 1～2ml，37℃消化 20min，中止消化后轻柔吹打成单细胞悬液，以 1×10^6 细胞 /ml 密度接种于培养瓶中，后参照郑敏[2]等的方法进行 NSC 培养及鉴定。

1.4 神经干细胞的诱导分化

取新鲜传代的 P3 NSCs，轻柔吹打分散细胞球后以 5×10^4 个细胞 /ml 密度接种于预先放置有多聚赖氨酸包被盖玻片的 24 孔板中，实验组设为 4 组：T_3 组（以 40ng/ml T_3 诱导分化）；胰岛素组（25μg/ml 胰岛素）；联合用药组一（40ng/ml T_3 +25μg/ml 胰岛素）；联合用药组二（20ng/ml T_3 +25μg/ml 胰岛素）。在各实验组中加入相应浓度 T_3 和（或）胰岛素进行诱导分化（培养液中含 bFGF、EGF），隔日换液，18 天后，培养液中撤去生长因子 bFGF、EGF 继续培养 7 天后终止诱导。未加 T_3 和胰岛素的同期培养细胞作为对照组（自然分化组），培养方法同诱导组。

1.5 免疫细胞化学检测

将诱导分化 25 天各组的贴壁细胞进行少突胶质细胞标志物 GalC、星形胶质细胞标志物 GFAP 免疫细胞化学检测，采用 S-P 法，DAB 显色。胞浆中有棕黄色颗粒沉着为阳性表达。

1.6 数据获得和统计学处理

细胞增殖情况及 GalC 和 GFAP 免疫细胞化学检测数据获得：对诱导分化 25 天的免疫细胞化学片每张随机选取 10 个视野，400 倍光镜下分别计数总细胞数和阳性细胞数，阳性细胞数 / 总细胞数即为所得阳性率。每次各组分别取片 6 张，独立重复实验 3 次。少突胶质细胞成熟度数据获得：用测微计在光镜下每组（除阴性对照组共测量 9 个外）随机测量 30 个 GalC 阳性细胞突起长度，以该细胞最长的突起计算，独立重复实验 3 次。所得结果均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，统计学处理用 SPSS12.0 软件进行 t 检验和单因素方差分析（one way ANOVA）。

2 结 果

2.1 新生大鼠神经干细胞的分离培养和鉴定

培养 2 天后部分细胞分裂形成 2~4 个细胞的细胞团，随培养天数增加细胞团内细胞数迅速增多，形成数十至数百个细胞所组成的神经球，悬浮球状生长。传代后形成的神经球形态与原代相似。撤除生长因子后，NSC 呈自然分化过程，大量神经样细胞贴壁，大小不等，胞体呈圆形、椭圆形或多角形，有双极或多极突起。免疫细胞化学染色可见，神经球为 nestin 阳性，结合培养细胞的生长特性，说明所得细胞为神经干细胞（图 1）。

2.2 向少突胶质细胞分化

在神经干细胞诱导分化过程中，对照组细胞球生长同 NSC 传代培养，撤除生长因子后，NSC 呈自然分化过程；联合用药组诱导 6 天后神经球边缘开始长出细小突起，神经球逐渐贴壁，有细胞自神经球向外迁出，8 天后有贴壁细胞出现，贴壁细胞胞体较小，呈椭圆形，有较短的对称的两极突起或三极突起（图 2），呈链状排列，随培养天数增加突起逐渐延长。撤除生长因子后，贴壁细胞突起增多，胞体略增大，由椭圆形变为圆形或多角形，折光性强，初级胞突少且短，次极胞突分支茂密，常交互形成“蜘蛛网”样，呈少突胶质细胞样（图 3A），撤除因子后 5 天，“蜘蛛网”样的细胞数目增多，次极突起增多，增长，亦可见一些胞体较大的细胞，突起细长并逐渐铺展开，末端有“血管足样”突起，呈星形胶质细胞样（图 3B）。

与联合用药组一相比，联合用药组二贴壁细胞出现和形态变化时间晚于前者，细胞突起数量少于联合用药组一，长度亦短于该组；T_3 组总体细胞数量较前述二组减少；胰岛素组总体细胞数量略少于联合用药组，细胞突起数量少于联合用药组，长度亦不及该二组，且观察到较多星形胶质细胞。

诱导结束后各组“蜘蛛网”样细胞免疫细胞化学检测呈 GalC 阳性（图 3C），证实为少突胶质细胞，同时存在 GFAP 检测阳性的细胞（图 3D），证实为星形胶质细胞，两种细胞在各组中所占百分比不等。

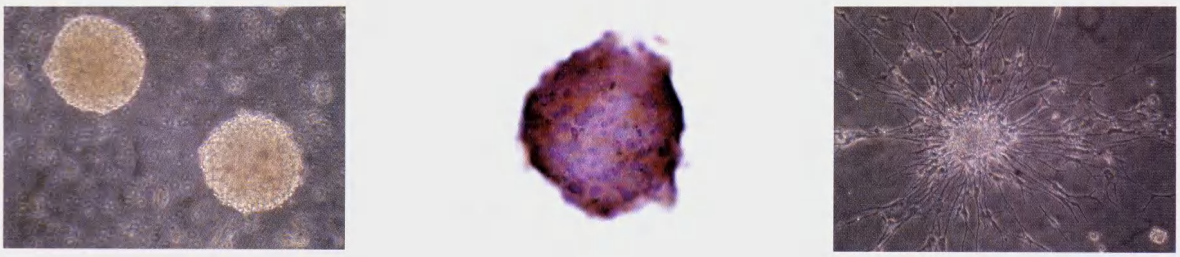
表 1 T_3、胰岛素对 NSC 诱导分化过程中细胞增殖的影响（10 个高倍镜视野细胞总数，$\bar{x}\pm s$）

组 别	对照组	联合用药组一	联合用药组二	T3 组	胰岛素组
细胞计数	108 ± 3.61	129.67 ± 5.69[a]	123.67 ± 4.73[a]	91.67 ± 6.51[ab]	118 ± 3.00[b]

[a] $P<0.05$ 与对照组比较

[b] $P<0.05$ 与联合用药组一比较

维普资讯 http://www.cqvip.com



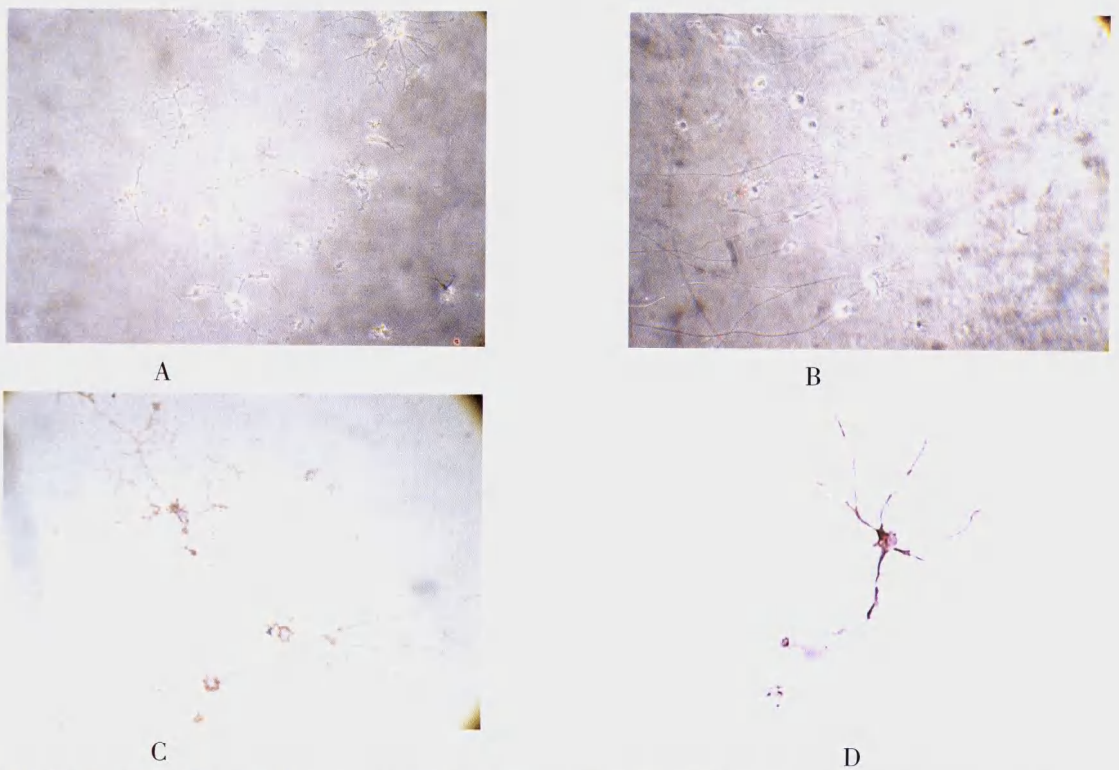
A B C

A：无血清培养基中生长的神经球，×200； B：神经球的 nestin 染色，S-P×400； C：自然分化状态，×100

图 1 体外培养的神经干细胞



图 2 分化过程中的贴壁细胞（分化 8d），×400



A B C D

A.撤除生长因子后少突胶质细胞形成，突起渐增多，×200； B.可见星形胶质细胞（图片下方），×200； C.GalC 染色，S-P×400； D.GFAP 染色，左下角少突胶质样细胞 GFAP 阴性，S-P×400

图 3 分化末期形态学观察

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 T_3、胰岛素对 NSC 分化后 GalC、GFAP 阳性率的影响($\bar{x} \pm s$)

阳性细胞百分率	对照组	联合用药组一	联合用药组二	T3 组	胰岛素组
GalC	0.42 ± 0.39	73.47 ± 6.10[ac]	51.58 ± 4.01[abc]	57.97 ± 5.37[abc]	31.24 ± 4.58[ab]
GFAP	81.72 ± 4.12	24.78 ± 3.86[c]	31.56 ± 3.46[c]	25.93 ± 3.16[c]	56.17 ± 4.05

[a]$P<0.05$ 与对照组比较;[b]$P<0.05$ 与联合用药组比较;[c]$P<0.05$ 与胰岛素组比较

表 3 T_3、胰岛素对少突胶质细胞突起长度的影响($\bar{x} \pm s$,μm)

阳性细胞百分率	对照组	联合用药组一	联合用药组二	T3 组	胰岛素组
GalC 阳性细胞最长突起长度	29.45 ± 14.72	69.77 ± 34.53[ab]	61.35 ± 26.99[ab]	43.27 ± 21.05[a]	67.99 ± 26.91[ab]

[a]$P<0.05$ 与对照组比较; $P<0.05$ 与 T_3 组比较

2.3 T_3、胰岛素对 NSC 定向分化为少突胶质细胞的影响

诱导过程中,各实验组中细胞数量以联合用药组一增长最为明显,T_3 组细胞数量增长较不显著(表 1)。表明胰岛素对 NSC 增殖有促进作用。

免疫细胞化学检测发现未经诱导的 NSC 很少分化为少突胶质细胞,多分化为 GFAP 阳性细胞。与 NSC 自然分化组比较,各实验组分化产物中 GalC 阳性细胞百分率明显提高($P<0.05$),以联合用药组一作用尤其明显。各实验组中,联合用药组一 GalC 阳性细胞百分率最高,与其余各组比较差异有显著性($P<0.05$),胰岛素组 GalC 阳性细胞百分率最低,与含 T_3 的各实验组相比差异有显著性($P<0.05$)。GFAP 检测结果显示,胰岛素组 GFAP 阳性细胞百分率高于其余各实验组,差异有显著性($P<0.05$)(表 2)。提示 T_3 和胰岛素均有诱导 NSC 向少突胶质细胞方向分化的作用,而 T3 在这一方面的作用更强,当诱导浓度为 40ng/ml 时作用较为明显。二者联合用药时这一诱导作用强于二者单独应用。T_3、胰岛素可诱导 NSC 向胶质细胞分化,且提高分化后的胶质细胞中少突胶质细胞的比例。

诱导终末期 GalC 阳性细胞胞体最长突起测量结果显示:实验组与对照组相比,可促进细胞突起的生长,且差异有显著意义($P<0.05$);各实验组中,T3 组与添加胰岛素的实验组相比,细胞突起较短($P<0.05$)(表 3)。提示胰岛素可促进少突胶质细胞突起的生长,即促进少突胶质细胞的成熟,T_3 对少突胶质细胞突起的生长促进程度低于胰岛素。

3 讨 论

神经干细胞倍受科学家关注的焦点之一在于其强大的分化潜能,若合理应用这一潜能,NSC 在神经疾病的细胞替代治疗方面有令人期待的前景。研究者设想利用 NSC 提供一种对以往难以治疗的、以特定的神经细胞群系破坏或丢失为特征的神经系统疾病安全有效的方法,如多发性硬化(少突胶质细胞破坏),从这一点来说,产生一系列能生成特定的神经元或胶质细胞的 NSCs 比产生一大类(一般的)NSCs 更有必要[3]。在已有的对神经干细胞分化的研究中,大多数干细胞自发分化为星形胶质细胞,其次为神经元,最少的是少突胶质细胞[1],这与我们在实验中观察到的结果一致。于是如何提高少突胶质细胞分化的比例成为研究的主要方向。

研究者在这一领域做了一定的工作:刘奔等[4]在原代培养的人胚 NSCs 培养液中添加 30nmol/l T_3 可诱导 NSCs 分化为少突胶质细胞的数量增加;还有研究者用神经母细胞瘤株 B104 的条件培养基逐渐替换神经干细胞培养液中的 EGF,可使神经干细胞分化为少突胶质前体细胞,撤去因子和 B104 条件培养基后少突胶质前体细胞可分化为少突胶质细胞[5]。虽然取得了不少进展,但研究大都止于某一阶段分化现象的观察。

早在 20 世纪 80 年代已有研究者证实含有 T_3、胰岛素、硒和转铁蛋白的无血清培养液有利于少突胶质细胞在体外长期存活[6]。甲状腺激素是哺乳动物脑发育中重要的生理调节因子[7],在细胞水平,T_3

维普资讯 http://www.cqvip.com

被认为作用于神经元和胶质细胞谱系，调节其分化时间。研究者发现在体外，T_3 可作用于少突胶质前体细胞触发其终末分化并增加少突胶质细胞的分化比率[8]。以往研究发现，胰岛素作为一种多功能的蛋白质激素，除了经典的代谢调节作用外，还具有重要的促生长作用。Schechter R 等[9]在胎鼠干细胞培养中加入 100ng/ml 外源性胰岛素或 IGF-1，发现胰岛素促进 NSCs 的生长和神经元的分化。Barres BA 等[10]指出高浓度胰岛素(或 IGFs)和 NT-3、CNTF (或 LIF、IL-6) 协同作用可维持少突胶质细胞的体外存活。因此，我们选用 T_3 和高浓度胰岛素(25μg/ml，相对 Schechter R 等而言)对新生大鼠 NSCs 进行诱导实验。

在实验中我们观察到高浓度胰岛素有促进分化过程中细胞增殖的作用，与自然分化组相比，培养液中含 25μg/ml 胰岛素的各实验组细胞计数结果明显增高，与 T_3 联合用药细胞数多于胰岛素单独应用。T_3 单独使用在本实验中未见明显促增殖作用，原因尚不明确。

我们研究了二者对 NSCs 分化的影响。NSCs 的自然分化少突胶质细胞阳性率少于 0.5%，各实验组少突胶质细胞分化率较对照组均有明显增高，以 T_3 (40ng/ml)和胰岛素联合用药组最高，为 73.47%，超过单独用药组；联合用药组中 T_3 40ng/ml 组分化率高于 20ng/ml 组；单独用药组中 T_3 组高于胰岛素组。说明 T_3 和胰岛素可诱导 NSCs 往少突胶质细胞方向分化，且两者有协同作用，T_3 的诱导作用与剂量有关。各组 GFAP 检测结果提示大剂量胰岛素及 T_3 可诱导 NSC 的胶质细胞向分化，可能与其增加少突胶质前体细胞增殖和分化有关。

少突胶质细胞形成髓鞘的重要步骤之一是少突胶质细胞突起的伸展，突起的延伸使其与轴突接触[11]。因此，对少突胶质细胞成熟度的观察我们采用余沪荣等[12]的方法，即测量分化终末 OLs 突起的长度。我们观察到，T_3 和胰岛素对 OLs 突起生长有明显促进作用，T_3(40ng/ml)和胰岛素联合用药组分化产生的 OLs 突起长于其余各组，而培养液中含 25μg/ml 胰岛素的各实验组细胞突起长于 T_3 单独作用组，表明二者均可促进 OLs 突起生长，即促进 OLs 成熟，而胰岛素对 OLs 突起生长的促进作用强于 T_3。

综上所述，我们认为，新生大鼠 NSCs 在 T_3 (40ng/ml)和胰岛素(25μg/ml)共同作用下可有效的向少突胶质细胞分化(分化率 73.47%)及促进分化的 OLs 成熟。在分化过程中，T_3 主要作用为促进 OLs 分化和成熟；胰岛素的主要作用为促进生长和增殖。这一方法可有效的从 NSCs 来源得到少突胶质细胞，为 NSCs 体外分化、少突胶质细胞获得和临床应用提供细胞学基础。

(通讯作者：王顺和，电话：(023)68485789；E-mail：wangshunhe120@yahoo.com)

参 考 文 献

[1] Vescovi AL, Parati EA, Gritti A, et al. Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human neural stem cell lines by epigenetic stimulation[J]. Exp Neurol, 1999; 156(1): 71-83.

[2] 郑 敏，王 健，王亚平，等.胚胎大鼠神经干细胞的分离培养及其鉴定[J]. 重庆医科大学学报，2004；29(4)：433-436.

[3] Bithell A, Williams BP. Neural stem cells and cell replacement therapy: making the right cells[J]. Clin Sci (Lond), 2005; 108(1): 13-22.

[4] 刘 奔，李兰英，刘春蓉，等.T3 对人神经干细胞分化为少突胶质细胞的影响[J]. 解剖学报，2003；34(2)：213-216.

[5] Fu SL, Hu JG, Li Y, et al. Induction of rat neural stem cells into oligodendrocyte precursor cell [J]. Acta Physiologica Sinica, 2005; 57(2): 132-138.

[6] Eccleston PA, Silberberg DH. The differentiation of oligodendrocytes in a serum-free hormone-supplemented medium[J]. Brain Res, 1984; 318(1): 1-9.

[7] Bernal J, Nunez J. Thyroid hormones and brain development[J]. Eur J Endocrinol, 1995; 133(4): 390-398.

[8] Baas D, Legrand C, Samarut J, et al. Persistence of oligodendrocyte precursor cells and altered myelination in optic nerve associated to retina degeneration in mice devoid of all thyroid hormone receptors [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002; 99(5): 2907-2911.

[9] Schechter R, Abboud M, William K, et al. Neuronal synthesized insulin roles on neural differentiation within fetal rat neuron cell cultures[J]. Brain Res Dev Brain Res, 2001; 127(1): 41-49.

[10] Barres BA, Schmid R, Sendnter M, et al. Multiple extracellular signals are required for long-term oligodendrocyte survival [J]. Development, 1993; 118(1): 283-295.

[11] Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system[J]. Physiol Rev, 2001; 81(2): 871-927.

[12] 余沪荣，汪 洋，沈馨亚.大鼠神经干细胞向少突胶质细胞定向分化的观察[J]. 解剖学杂志，2005；28(5)：526-528.