维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)06-0851-03

大鼠 NSCs 向多巴胺能神经元分化研究

王光辉,王顺和,杨慧敏,李　苏,李　苒,谭晓姝

(重庆医科大学基础医学院病理教研室,重庆　400016)

【摘　要】目的:探讨 IL-1β 对神经干细胞(NSCs)分化为多巴胺能神经元作用。方法:体外培养和鉴定中脑来源 NSCs,用免疫学方法检测分化细胞酪氨酸羟化酶 (TH) 表达。结果:血清组、IL-1β 10pg/ml 组、IL-1β 120pg/ml 组、IL-1β 150pg/ml 组、IL-1β 200pg/ml 组诱导 7d 后 TH 细胞分别平均为 0.45%、0.6%、7.2%、12.5%、8.75%。结果显示 IL-1β 诱导 NSCs 明显提高 TH 细胞表达率,与血清组比较有显著性差异($P<0.05$),在 IL-1β 150pg/ml 剂量范围内 TH 细胞表达率与剂量呈正相关。结论:IL-1β 有诱导 NSC 向多巴胺能神经元分化的显著作用。

【关键词】神经干细胞;分化;白细胞介素 -1β;多巴胺能神经元

【中国图书分类法分类号】R329.28　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2006-05-20

The effects of IL-1 beta on the differentiation of rats NSCs into dopaminergic neurons in vitro

WANG Guanghui, et al

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

【Abstract】***Objective***: To explore the effects of IL-1 beta on the differentiation of NSCs into dopaminergic neurons. ***Methods:*** To isolate and culture mesencephalic neural stem cells in vitro .we used immunocytochemistry to detect TH-positive neurons induced by 10%FBS and interleukin-1 bate for 7days respectively. ***Results:*** The positive ratio of TH expression in induced cells by 10%FBS, IL-1β 10pg/ml, IL-1β 120pg/ml, IL-1β 150pg/ml, IL-1β 200pg/ml were 0.45%, 0.6%, 7.2%, 12.5% and 8.75% respectively .The positive ratios of TH expression in induced cells by IL-1β 150pg/ml(12.5%) were much higher than that by 10%FBS(control 0.45%)($P<0.05$), The positive ratio of TH expression in induced cells was relate to the dosage of IL-1β. ***Conclusion***: The induction of IL-1 beta on the differentiation of NSCs into dopaminergic neurons in vitro is significant.

【Key words】Neural stem cells (NSCs); Differentiation; IL-1 beta; Dopaminergic neurons

神经干细胞(neural stem cells,NSCs)是具有多向分化潜能和自我更新能力的神经细胞,可分化为神经元和神经胶质细胞[1],因此,它为神经系统损伤和变性疾病带来了治疗契机。帕金森病(Parkinson disease,PD) 主要病理变化是选择性中脑黑质致密部 DA 能神经元变性、大量丧失(>80%)。多巴胺合成减少,导致多巴胺 / 乙酰胆碱平衡失调。移植多巴胺能神经元是治疗该疾病的一种策略, 通过对 NSCs 进行体外诱导有望获得足量的有效多巴胺能神经元,为细胞移植治疗研究打下基础。本试验通过用 IL-1β 体外诱导大鼠 NSCs 分化生成多巴胺能神经元(标志酶酪氨酸羟化酶 TH),探讨 IL-1β 分化 NSCs 机制, 为多巴胺能神经元基础研究和临床应用奠定细胞学基础。

作者介绍: 王光辉(1975-),男,硕士,主要研究方向:神经干细胞。

1　材料和方法

1.1　材料

SD 大鼠由第三军医大学大坪医院动物中心提供。培养基 DMEM/F12 和 B27 以及表皮细胞生长因子(EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)购于 Gibco 公司。nestin 抗体, NSE (neuron specific enolase)、GFAP (glial fibrillary acidic protein) 抗体购于 Chemicon 公司。TH(tyrosine hydroxylase)抗体购于 Sigma 公司。SABC-Cy3 免疫荧光试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司。

1.2　NSCs 培养与鉴定

取清洁级新生大鼠断颈处死 75%乙醇消毒 10min。无菌操作剪开皮肤、颅骨, 暴露脑组织。取中脑腹侧约 10mm × 15mm × 15mm 大小组织块,D-Hanks 液浸洗 3 次, 剥离脑膜

维普资讯 http://www.cqvip.com

及血管。剪碎加入胰酶和 EDTA 5% 二氧化碳 37℃细胞培养箱中消化 20min。10%FBS 中止消化,加入 0.01%DNA 酶室温下 5min。吹打使之形成单细胞悬液后过滤。收集滤液离心(1000r/min、5min),台盼蓝染色镜下计数,以 5×10^5 /ml 密度接种至 NSCs 培养基,37℃ 5% 二氧化碳和饱和湿度细胞培养箱培养。每 3~4 天半量换液,每 7 天传代,每次传代计数。取第 3 代 NSCs(P3)离心涂片后 4% 多聚甲醛固定 30min,nestin 免疫荧光检测。用纤对照 PBS 代替一抗。胞浆呈鲜红荧光者为阳性细胞。细胞免疫学检测 TH、NSE、GFAP 抗体工作液浓度分别为 1∶100、1∶200、1∶200。三者均在胞浆和突起表达,呈棕黄色。连续传代克隆制成单细胞悬液,加入 10% FBS,分化 7 天后免疫学检测。检测指标为 GFAP 和 NSE。

1.3 IL-1β 体外诱导分化 NSCs

取 NSCs P3 以 5×10^4 /ml 密度接种 24 孔板内,1ml/ 孔,培养 3 天后更换培养液为 DMEM/F12,10%FBS,作对照组,实验组在此基础上加入 IL-1β 10pg/ml、120pg/ml、150pg/ml、200pg/ml 每 3~4 天半量换液,7 天中止诱导。重复 3 组。细胞免疫学检测 TH 表达。TH 主要表达于核膜周围胞浆及突起,呈棕黄色者即为阳性细胞。

1.4 统计学处理

对免疫细胞贴片每张随机选取 10HPF 计数细胞,TH 阳性细胞数 / 总细胞数即为阳性率。实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS12.0 统计软件进行统计学分析,$P<0.05$ 有统计学意义。

2 结 果

2.1 NSCs 培养与鉴定

培养 12h 见细胞分裂成为 2~4 个细胞团,其数目和大小随时间增加。24 h 见细胞聚集现象,3~4 天形成球形或桑椹状,细胞形态规则,无明显突起。第 7 天数百克隆集落悬浮,可见贴壁细胞,第 28 天(P3)时细胞克隆呈大小一致的大球形和小桑椹状细胞克隆,未见贴壁细胞(图 1)。细胞计数显示传代至第 10 代细胞数量平均增加 41 倍,免疫学显示反复传代均保持呈 nestin(+)TH(-)、NSE(-)、GFAP(-)(图 2)。10%FBS 分化后免疫学显示以 NSE(+)和 GFAP(+)细胞为主,证实为神经元和星形胶质细胞(图 3)。

2.2 IL-1β 定向诱导 NSCs

10% FBS、IL-1β 10pg/ml、IL-1β 120pg/ml、IL-1β 150pg/ml、IL-1β 200pg/ml 分别诱导 7 天后 TH 细胞阳性率平均为 0.45%、0.6%、7.2%、12.5%、8.75%。后 3 组与血清组 /IL-1β 10pg/ml 组比较分化率有显著差异性($P<0.05$)。在 IL-1β 150pg/ml 剂量下 TH 细胞阳性率达 12.5%,浓度继续增加到

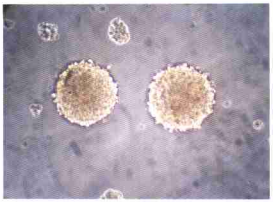


图 1 P3 神经球(×400)

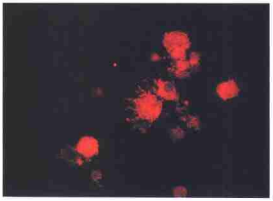


图 2 细胞中 nestin 表达(SABC-Cy3×1000)

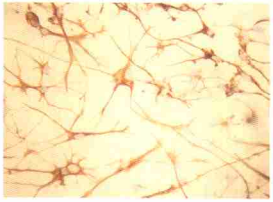


图 3 细胞中 GFAP 表达(SABC×400)

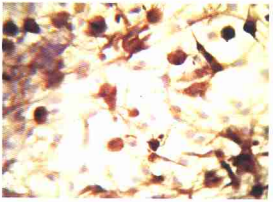


图 4 IL-1β150pg/ml 诱导 7d TH 细胞表达(SABC×400)

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 对照组和 IL-1β 诱导分化后 TH 阳性细胞表达率

阳性率(%)	对照组	10pg/ml组	120pg/ml组	150pg/ml组	200pg/ml组
TH	0.45 ± 0.11	0.6 ± 0.32	7.2 ± 0.68*△	12.5 ± 1.05*△☆	8.75 ± 0.46*△

注：*表示与 10%FBS 组比较，$P<0.05$；△表示与 IL-1β 10pg/ml 诱导组比较，$P<0.05$；☆表示与 IL-1β 120pg/ml 诱导组比较，$P<0.05$。

200pg/ml 对阳性率没有增加作用。在 IL-1β 150pg/ml 剂量范围内随着剂量的增加 TH 细胞表达率增加(图 4，表 1)。

3 讨 论

多巴胺能神经元来自于 NSCs 分化，NSCs 通常来源[2~4]①胚胎及幼年动物神经组织；②胚胎干细胞及生殖嵴细胞；③骨髓间充质细胞。真皮组织提取细胞分化也可得到一定数量的 NSCs[5]。NSCs 培养是获得 DA 能神经元的基础，我们通过无血清长期培养检测其自我更新能力，培养 10 代数目扩增 41 倍。通过免疫学方法证实细胞克隆均表达 NSCs 标志蛋白 nestin，分化细胞表达 NSE 和 GFAP，证实为神经元和星形胶质细胞。另外，DA 能神经元的含量中脑最高，取材在中脑保证了分化细胞中 DA 能神经元数量最多。为消除混杂 DA 能神经元的影响，用经过自然传代纯化的 P3 进行实验，P3 经免疫学证实无 TH、NSE 和 GFAP 表达。

NSCs 增殖分化是内环境和外环境信号共同结果[6]。血清、神经营养因子、维甲酸、视黄酸、T3 等可诱导 NSCs 向神经元或神经胶质细胞方向分化，分化表型与基因编码和胞外信号有关，对受体微环境进行调控可达到定向分化目的。白介素家族与神经系统的发育及中枢神经系统对损伤因子的反应关系密切[7,8]。另据研究表明单独应用 IL 家族或联合白血病抑制因子，抗坏血酸等诱导 NSC 均有不同程度的 TH 表达增加。IL-1 是发现于造血系统的致炎因子，分为 α、β 2 个亚型，二者共用受体。最初发现它促进造血细胞分化，后来发现它也存在于早期发育的中枢神经系统中。Carve 等[9]证实了 IL-1 作为一种重要诱导剂参与了神经系统 DA 能神经元的发育，他们发现 IL-1，单独或联合一些细胞因子如 IL-11、LIF 等组合可诱导神经干细胞分化出 TH 阳性神经元。IL-1β 作为 IL-1 的亚型之一，可能发挥相应诱导作用，因此我们选用 IL-1β 作为诱导剂来干预 NSCs 的分化。另外为了验证诱导剂量和 TH 阳性细胞的关系我们在实验组中设立 4 个 IL-1β 诱导剂量：10pg/ml、120pg/ml、150pg/ml、200pg/ml，分化 7 天。实验组结果与血清对照组比较 IL-1β 能够提高 TH 阳性细胞的表达，在 IL-1β 0~150pg/ml 剂量范围内呈现出分化细胞的 TH 阳性率随着剂量增加而增加，IL-1β 呈现明显剂量依赖性。在 IL-1β 150pg/ml 剂量诱导下，TH 阳性细胞表达率平均 12.5%。Carvey 等[9]通过研究大鼠胚胎中脑来源的 NSCs 证实 IL-1 能够显著提高 TH 细胞表达，阳性率达 25%(IL-1 150pg/ml)，我们结果与之有一定差距，可能与标本取材时间和部位有关。

神经营养因子(NF)是促进 NSCs 分化的细胞因子。NF 包括神经生长因子(NGF)家族，胶质源性神经营养因子(GDNF)家族等。BDNF(脑源性神经营养因子)可促进 EGF 反应，海马及前脑室管膜下区 NSCs 存活和分化。GDNF 家族包括 GDNF，NTN，PSP 和 ART。GDNF 家族促神经发育的作用主要在外周，它促进肠神经嵴前体细胞的存活和增殖，且对外周感觉神经的发育至关重要。研究发现 GDNF 和 BDNF 是参与 DA 能神经元发育分化的外界信号分子。IL-1 在中枢神经系统内的表达，加之 Akaneya 等[10]实验研究发现无论是体内还是在体外 IL-1 均可以诱导胶质细胞产生神经营养因子，对多巴胺能神经元有诱导和营养作用。我们在实验中细胞贴片经免疫学证实背景细胞中星形胶质细胞阳性率达 80%~90%，推测其分泌 NF 有利于 TH 细胞表达和存活。

综合上述实验结果 IL-1β 能够提高 DA 胺能神经元分化率，本法可有效的从 NSCs 来源获得多巴胺能神经元，为 NSCs 体外分化、多巴胺能神经元基础研究和临床应用提供细胞学基础。

参 考 文 献

[1] Gritti A,Parati,Coval,et al. Multipotential stem cell from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor[J]. Neurosci,1996;16:1090-1100.

[2] Newman MB, Emerich DF, Borlongan CV, et al. Use of Human Umbilical Cord Blood (HUCB) Cells to Repair the Damaged Brain[J]. Current

(下转第 915 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

AAD 发病率可能远高于此。

3.2 高危因素

AAD 的发生与年龄，抗生素的抗菌谱，用药时间，宿主的个体差异，原发病病情程度，全身及肠道免疫功能等因素有关。婴幼儿由于血清免疫球蛋白和胃肠分泌型 IgG 较低，且小儿 3~4 岁内处于肠菌群的演替阶段，使用抗生素后容易发生 AAD，本文婴幼儿发病率达 9.41%，高于其他年龄组，与国内郑氏报道相符[3]。营养不良往往有免疫功能低下，原发病较重时可降低人的免疫功能。有报道血清毒素A-IgG 低水平较高水平发生 AAD 的可能性高 48 倍[4]。本研究显示原发病重，合并营养不良者 AAD 发生机会明显增加验证了此观点。据有关资料介绍几乎所有的抗生素均可引起 AAD。抗生素致 AAD 的高低排序目前尚无一致的意见，一般认为以广谱类青霉素最为常见，本研究显示单用以氨苄青霉素最为常见，联用比单用，青霉素类与头孢类抗生素联用 AAD 发生机会均明显增高。近年来随着头孢菌素类药(尤其是第三代)的普及认为其所致 AAD 有增多趋势[5]。本文与之不太一致可能与目前我们用第一代头孢药较广有关。AAD 通常在应用抗生素后 5~10 天，可早在当天或迟至停药后 6 周发生，本文在平均用药后 4.6 天出现，早发生可能与本院原发病情较轻，平均住院时间短，出院后无随访研究有关。

3.3 治疗与转归

AAD 在停用抗生素后可自行消失，一般 5~10 天可自行缓解，若病情需要可改为较少引起 AAD 的药物，或尽量避免使用广谱抗生素，避免抗生素联用，重症病例可加用微生态制剂，注重水电解质、酸碱平衡及支持疗法。本文 AAD 平均 3.1 天腹泻消失恢复较快，原因可能与本对象为 AAD 单纯型，同时及时应用抗腹泻药物有关。

参 考 文 献

[1] 朱燕凤.抗生素相关性腹泻[J].国外医学(儿科学),2002;29(1):47.

[2] Hogenauer C,hammer HF,Krejs GJ,et al.Mechanisms and management of antibiotic-associated diamhea [J].Clin Infect Dis,1998;27(4):702-710.

[3] 郑亚汉. 头孢菌素致小儿抗生素相关性腹泻 39 例临床分析[J].药物流行病学杂志,2001;10(2):69.

[4] 王 薇.难辨梭菌性肠炎[J].国外医学(消化分册),2003;23(2):96-98.

[5] 陈志辉,俞月琴.抗菌药物临床应用新论[M].上海:同济大学出版社,1994.154-158.

(上接第 913 页)

癌，二者组织象有时可以相似，但富于糖原癌细胞油红 O 染色呈阴性，PAS 染色呈阳性可以鉴别。②乳腺脂肪坏死的嗜脂质细胞在冷冻切片时，与富于脂质癌细胞容易造成混淆，但癌细胞呈团索状，核多形性明显，而脂肪坏死，其嗜脂质的巨嗜细胞外，尚可见炎症细胞和异物巨细胞等侵润。

关于乳腺富于脂质癌的预后与治疗报道较少。Fisher 认为胞浆中的脂质含量越多，组织学恶性程度越高。一致的观点是：该病转移早，预后差，约半数患者在诊断后 2 年内死亡。近期，马永录等报告本病 5 例，肿瘤 2~5cm 大小；其中 C-erBb-2(+)4 例，(++)1 例，术前 4 例经 CMF 方案，进行新辅助化疗 3 疗程，仅 1 例乳腺包块有缩小，3 例乳腺包块无变化，可见 CMF 方案对乳腺富于脂质癌效果不佳，但是在此后随访中发现 1 例无瘤存活 5 年，2 例无瘤存活 3 年。本病，术后采用 CTF 方案和 TAX + THP 方案化疗，以及内分泌治疗，存活近 1 年。由此看来，本病患者其预后主要决定于肿瘤的临床分期，但是如果早诊断、早手术和术后的综合治疗得当(术后采用高敏性化疗药物、积极的内分泌治疗等)，患者仍可获得较高的生存率。

(上接第 853 页)

Neurovascular Research, 2004;1 (3):269-281.

[3] Jensen J B,Bjorklund A,Parmar M, et al. Neuron Differentiation from Neurosphere-Expanded Progenitors Depends on Gsh2 Expression [J]. Neuroscience, 2004;24 (31):6958-6967.

[4] Hermann A, Gastl R,Liebau SP, et al. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells [J]. Cell Science,2004;117 (19):4411-4422.

[5] Joannides A G, Phil S, Christof .Efficient generation of neural precursors from adult human skin: astrocytes promote neurogenesis from skin-derived stem cells[J]. Lancet, 2004;363:172-178.

[6] Dobrossy MD,Dunnett SB.The influence of the environment and experience on neural grafts[J].Nature rev,2001;2:871-879.

[7] Sung CS, Wen ZH, Chang WK,et al. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase attenuates interleukin-1 [beta]-induced thermal hyperalgesia and inducible nitric oxide synthase expression in the spinal cord [J]. Neurochemistry, 2005;94(3):742-752.

[8] WANG XJ, KONG KM, QI Wl, et al. Interleukin-1 beta induction of neuron a poptosis depends on p38 mitogen-activated protein kinase activity after spinal cord injury [J]. Acta Pharmacologica Sinica,2005;26 (8):934-942.

[9] Carvey PM ,Zao DL,Sortwell CE,et al. A clonal lineof mesencephalic progenitor cells converted to dopamine neurons by hematopo ietic cytokines:a source of cellsfor transplantation Parkinson s disease[J].Exp Neurol, 2001;171(1):98-108.

[10] Akaneya Y,Takahashi,Hatanaka.Inerlukin-1 beta enhances surviveal and interlukin 6 proteces against MPP(+)neurotoxicity in the culture of fetal rat dopaminergic neurons [J].Exp Neurol, 1995;136:43-52.