DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001003

正常及无镁诱导后神经元微环境对少突胶质前体细胞分化的影响

王　玥，蒋　莉，刘丽鸣，杨　霞，陈恒胜，程　莉

（重庆医科大学附属儿童医院神经内科、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地、儿科学重庆市重点实验室，重庆　400014）

【摘　要】目的：探讨正常神经元及痫性放电后神经元微环境对少突胶质前体细胞（oligodendrocyte precursor cell，OPC）分化的作用，从体外水平了解痫性放电对髓鞘再生的影响。**方法**：OPC 纯化后增殖 2~3 d 后进行分化，分化时根据加入的神经元培养基占总培养基体积的比例分为 3 个层次：1/8 浓度、1/4 浓度、1/2 浓度，每个层次再分为 3 组：OPC 分化培养基（ODM）组、OPC 分化培养基+相应浓度诱导后神经元培养基（ODM+INM）组、OPC 分化培养基+相应浓度正常神经元培养基（ODM+NNM）组，采用 qRT-PCR 检测 OPC 分化第 3 天、5 天、7 天血小板源性生长因子受体-α（platelet-derived growth factor receptor-alpha，PDGFRα）、环核苷酸磷酸二酯酶（cyclic neucleotide phosphodiesterase，CNPase）、髓鞘碱性蛋白（myelin basic protein，MBP）mRNA 水平的相对量的差异。**结果**：加入 1/2 体积的神经元培养基对 OPC 分化产生明显的影响，ODM+1/2NNM 组 MBP 转录水平在分化第 3 天（$P<0.05$）、第 5 天（$P<0.05$）明显高于 ODM 组，在分化第 7 天明显低于 ODM 组（$P<0.05$）；ODM+1/2INM 组 MBP 转录水平在分化第 3 天明显高于 ODM+1/2NNM 组（$P<0.05$），在分化第 5 天（$P<0.05$）、第 7 天（$P<0.05$）明显低于 ODM+1/2NNM 组。**结论**：神经元微环境对 OPC 分化有重要的影响作用，正常神经元微环境可以促进 OPC 的分化，而无镁诱导神经元痫性放电后的微环境会抑制 OPC 的分化。

【关键词】少突胶质前体细胞；分化；神经元；微环境；癫痫

【中图分类号】R742　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2015-12-30

Influence of microenvironment of normal neurons and neurons expressing seizure-like discharge induced by free-magnesium extracellular fluid culture on the differentiation of oligodendrocyte precursor cells

Wang Yue, Jiang Li, Liu Liming, Yang Xia, Chen Hengsheng, Cheng Li

(*Department of Neurology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University; Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders; China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders; Chongqing Key Laboratory of Pediatrics*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of microenvironment of normal neurons and neurons expressing seizure-like discharge induced by free-magnesium extracellular fluid culture on the differentiation of oligodendrocyte precursor cells (OPCs), and to explore the influence of epileptic seizure on the remyelination. ***Methods***: OPCs were purified on the 3rd day or the 4th day of proliferating phase. According to the proportion of additional neuronal medium in which neurons survived in the total medium, objects were divided into three levels: 1/8, 1/4, 1/2; and each level was subdivided into three groups: OPC differentiation medium (ODM) group, OPC differentiation medium+corresponding proportion of induced seizure discharge neuron medium (ODM+INM) group, OPC differentiation medium+corresponding proportion of normal neuron medium (ODM+NNM) group. PDGFRα, CNPase and MBP transcription expressions of oligodendrocyte cells on the 3rd day, 5th day, 7th day of differentiation phase were detected by qRT-PCR. ***Results***: There were significant differences in MBP transcription expressions between ODM group and ODM+1/2NNM group at the differentiation phase; MBP transcription expressions were higher in ODM+1/2NNM group than in ODM group on the 3rd

作者介绍：王　玥，Email：yuewangd@163.com，研究方向：癫痫与髓鞘破坏和再生障碍。

通信作者：蒋　莉，Email：dr_jiangli@hotmail.com。

基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：81371452）；教育部博士点基金资助项目（编号：20125503110011）；重庆市科委自然科学基金重点资助项目（编号：cstc2013jjB0031）。

优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160623.1545.012.html（2016-06-23）

day（$P<0.05$）and 5th day（$P<0.05$）of differentiation，while lower in ODM+1/2NNM group than in ODM group on the 7th day of differentiation（$P<0.05$）. There were also significant differences in MBP transcription expressions between ODM+1/2NNM group and ODM+1/2INM group at the differentiation phase；MBP transcription expressions were higher in ODM+1/2INM group than in ODM+1/2NNM group on the 3rd day of differentiation（$P<0.05$），while lower in ODM+1/2INM group than in ODM+1/2NNM group on the 5th day（$P<0.05$）and 7th day（$P<0.05$）of differentiation. ***Conclusion***：The neuronal microenvironment has significant effect on the differentiation of OPCs. The normal neuronal microenvironment can promote OPC differentiation，and the induced seizure-like discharge neuronal microenvironment can inhibit OPC differentiation.

【Key words】oligodendrocyte precursor cell；differentiation；neuron；microenvironment；epilepsy

少突胶质前体细胞（oligodendrocyte precursor cell，OPC），广泛分布在中枢神经系统，大多数情况下分化为少突胶质细胞，包绕神经元轴突形成髓鞘，加快神经信号的传递速度和效率及抑制轴突芽生[1]，是维持正常神经环路不可或缺的一部分。髓鞘形成依赖神经元活动，部分通过神经递质促进少突胶质细胞分化和髓鞘形成[2-3]。临床上利用弥散张量成像检测到部分癫痫患者的脑白质异常，不仅如此，部分脱髓鞘疾病（例如多发性硬化等）也会出现癫痫发作[4]，均提示癫痫发作与髓鞘再生障碍有着密切的联系。相关研究发现匹罗卡品诱导颞叶癫痫动物模型的海马髓鞘碱性蛋白（myelin basic protein，MBP）表达量下降，髓鞘体积及厚度减小，有髓纤维长度减短[5]，进一步从体内动物实验证明了痫性放电对髓鞘的影响。为了探索神经元与 OPC 之间的联系，许多研究从体外水平建立两种细胞的共培养模型，包括中枢神经系统神经元与 OPC 共培养[6-7]、外周神经系统神经元与 OPC 或施旺细胞的共培养[8-9]，此外，还有学者将脑片与 OPC 共培养[10]、脊髓组织块与 OPC 共培养[11]等，发现 OPC 在体外培养条件下，可逐渐分化为少突胶质细胞，进一步包绕神经突起形成髓鞘，神经元也可通过突触、突触外机制调节OPC 的增殖、分化、存活。1995 年 Sombati 成功建立体外癫痫模型，其模型主要采用无镁细胞外液诱导海马神经元，使其产生以阵发性去极化偏移或者阵发性持续棘波样爆发为特征的反复自发性惊厥样放电[12]，并有研究学者采用相同方法诱导皮质神经元，同样使其出现反复自发性惊厥样放电[13]。但是，目前尚未发现痫性放电后的神经元与 OPC 共培养的模型。为了从体外水平探索癫痫与髓鞘再生障碍之间的相关性，本实验将探索神经元微环境对 OPC 分化的影响，首先检测正常神经元微环境对 OPC 分化的影响，并采用 Sombati 的体外癫痫模型诱导神经元痫性放电，观察癫痫细胞模型神经元微环境与正常神经元微环境对 OPC 分化的影响的差异。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 SPF 级成年雌性、雄性 SD 大鼠（重庆医科大学动物实验中心提供），按照 1∶1 合笼，检查到阴栓当天为孕 1 d，神经元培养采用出生 1 d 内的新生鼠，OPC 培养采用出生 3 d 内的新生鼠。

1.1.2 实验试剂 DMEM/F12 培养基（HyClone 公司）、Neurobasal 培养基（Gibco 公司）、澳洲胎牛血清（Gibco 公司）、B27 培养基添加剂（Gibco 公司）、L-谷氨酰胺（Sigma 公司）、0.25%胰酶-EDTA（Gibco 公司）、N2（Gibco 公司）、Human PDGF-AA（PeproTech 公司）、Human bFGF（PeproTech 公司）、牛胰岛素、EDTA Na_2（Solarbio 公司）、NaCl（Sigma 公司）、HEPES（Sigma 公司）、$CaCl_2$（Sigma 公司）、D-(+)-Glucose（Sigma 公司）、KCl（Sigma 公司）、甘氨酸（Solarbio 公司）、多聚赖氨酸（Sigma 公司）、NF-200 抗体（Millipore 公司）、PDGFR-a 抗体（Santa Cruz）、NG2 抗体（Millipore 公司）、olig2 抗体（Millipore 公司）、MBP 抗体（Covance 公司）、二抗 555nm 羊抗小鼠（life 公司）、二抗 555nm 羊抗兔（life 公司）、二抗 488 nm 羊抗兔（life 公司）、二抗 488nm 羊抗小鼠（life 公司）、抗荧光淬灭封片液（碧云天公司）、PDGFR-a 引物（中国生工生物工程公司）、CNPase 引物（中国生工生物工程公司）、MBP 引物（中国生工生物工程公司）、高纯总 RNA 快速提取试剂盒（BioTeke 公司）、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser（Takara 公司）、SYBR（Takara 公司）。

1.2 实验方法

1.2.1 神经元培养及鉴定

1.2.1.1 神经元培养 新生 1 d 内的 SD 大鼠 10 只，处死后取出脑组织，分离皮质并剥除血膜，剪碎后用稀释的胰酶-EDTA（胰酶-EDTA∶PBS=1∶1）消化 10 min，澳洲胎牛血清终止消化，用 200 目滤网（提前用 PBS 润湿）过滤，收集其滤液，

离心(800 r/min,10 min,4 ℃),然后重悬细胞,按照每孔(5~10)×10^5个细胞接种在多聚赖氨酸包被过的6孔板上,置于37 ℃、5%CO_2培养箱中培养,4 h后全量换为无血清培养基(Neurobasal+2%B27+1%L-谷氨酰胺),每3 d无血清培养基半量换液。

1.2.1.2 神经元鉴定 培养第7天的神经元爬片,每批随机选取爬片2张,共3批细胞爬片(即3次独立重复实验)。采用免疫荧光法标记神经元神经丝蛋白(neurofilament protein,NF)200,操作步骤:4%多聚甲醛固定,0.01 mon/L PBS漂洗3次,每次5 min,10%牛血清白蛋白及10% TritonX-100封闭15 min,一抗NF200(1:500)4 ℃孵育过夜,第2日复温1 h后,0.01 mon/L PBS漂洗3次,每次5 min,二抗(1:500)室温孵育1 h,0.01 mon/L PBS漂洗3次,每次5 min,DAPI染核(1:5 000),经0.01 mon/L PBS漂洗3次,每次5 min,抗荧光淬灭封片液封片。在激光共聚焦显微镜下扫描。

1.2.2 OPC培养及鉴定

1.2.2.1 OPC培养 参照Niu等[14]OPC原代培养及化学纯化方法。混合培养第8天,更换增殖培养基(DMEM/F12+5 μg/ml胰岛素+ 1%N_2+20 ng/ml Human PDGF-AA+20 ng/ml Human bFGF),根据细胞状态增殖2~3 d后,进行细胞化学纯化。纯化后,隔天更换增殖培养基。后续进行细胞分化实验时,则更换为分化培养基(DMEM/F12+1%FBS+1%N_2+5 μg/ml胰岛素)。

1.2.2.2 OPC鉴定 纯化后增殖1 d的OPC爬片,每批随机选取爬片2张,共3批细胞爬片(即3次独立重复实验)。采用免疫荧光法标记血小板源性生长因子受体-α(platelet-derived growth factor receptor alpha,PDGFRα)/少突胶质细胞转录因子-2(oligodendrocyte transcription factor-2,olig2)/硫酸软骨素蛋白聚糖NG2,一抗采用PDGFRa/olig2/NG2(1:500)抗体,具体操作步骤同前。

1.2.2.3 少突胶质细胞鉴定 分化第3天的少突胶质系细胞爬片,每批随机选取爬片2张,共3批细胞爬片(即3次独立重复实验)。采用免疫荧光双标少突胶质细胞标志物MBP和olig2,联合使用一抗MBP抗体、olig2抗体(1:500),具体操作步骤同前。

1.2.3 无镁诱导癫痫细胞模型和全细胞膜片钳记录 (1)神经元爬片培养至第11天,除去培养基,更换为细胞外液,膜片钳检测正常神经元的自发动作电位(n=8)。(2)神经元爬片培养至第11天,除去培养基,加入无镁诱导液,孵箱37℃、5%CO_2培养3 h后,更换为正常神经元培养基,采用Multiclamp-700B膜片钳系统对神经元细胞进行全细胞模式的电流钳记录。经拉制仪(MODEL P-97,SUTTER INS TRUMENT CO)拉制并且抛光的电极口径约为1 μm左右,电极充满电极内液后即形成3~5 MΩ的阻抗。当记录电极与细胞之间封接稳定后,给予负压打孔破膜,形成全细胞钳制,即形成膜片钳全细胞记录状态,记录无镁外液诱导后神经元放电情况(n=9)。

1.2.4 神经元培养基收集

1.2.4.1 正常神经元培养基收集 神经元培养至第11天,除去培养基,加入正常细胞外液,孵箱37 ℃、5%CO_2培养3 h后,更换为正常神经元培养基,培养第14天时收集神经元培养基。

1.2.4.2 无镁诱导后神经元培养基收集 操作步骤同正常神经元培养基的收集,不同点为将正常细胞外液改为无镁细胞外液。

1.2.5 实验分组 本实验根据加入的神经元培养基占最后总培养体积的比例(神经元培养基/总培养基),分为3个层次:1/8浓度、1/4浓度、1/2浓度(即神经元培养基占总体积的1/8、1/4、1/2)。每种浓度再分为3组:OPC分化培养基组(ODM组)、OPC分化培养基+相应体积诱导后神经元培养基组(ODM+INM组)、OPC分化培养基+相应体积正常神经元培养基组(ODM+NNM组)。每组包括3批细胞进行检测(即3次独立重复实验)。

1.2.6 qRT-PCR检测OPC分化后各个时期标志物的mRNA相对表达量 首先根据高纯总RNA快速提取试剂盒说明书提取各个时间点每个组总mRNA,立即检测其mRNA浓度,然后根据逆转录试剂盒将mRNA逆转录为cDNA。PDGFRα、环核苷酸磷酸二酯酶(cyclic neucleotide phosphodiesterase,CNPase)、MBP、β-actin 4种引物由中国生工生物工程公司合成。PCR反应总体系为25 μl,包括SYBR 12.5 μl,引物1.0 μl,引物1.0 μl,ddH_2O 8.5 μl,cDNA 1 μl。循环参数:PDGFRα、CNPase:95 ℃ 5 s,59.8 ℃ 30 s,65 ℃ 30 s,共39个循环;MBP:95 ℃ 5 s,62.9 ℃ 30 s,65 ℃ 30 s,共39个循环。采用相对定量法,结果以$2^{-\Delta\Delta Q}$表示。各期标志物百分率=相应标志物mRNA相对量/3种标志物mRNA相对量;比较神经元微环境对OPC影响时,将ODM组各期标志物表达量标化。

PDGFRα、CNPase、MBP、β-actin 4种引物序列见表1。

表1 PDGFRα、CNPase、MBP、β-actin引物序列

Tab.1 PDGFRα, CNPase, MBP, β-actin primer sequence

引物	序列	
PDGFRα	引物上游	5'-CATTGTGCTCCGTAGTCCCC-3'
	引物下游	5'-GCTCCTGAGAACTGTACCCAC-3'
CNPase	引物上游	5'-AGACATAGTGCCCGCAAAGG-3'
	引物下游	5'-GTAGCCACCGTGTCCTCATC-3'
MBP	引物上游	5'-CTCCATCGGGCGCTTCTTTA-3'
	引物下游	5'-TCTCAGACACAGGGACATGC-3'
β-actin	引物上游	5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3'
	引物下游	5'-TTTAATGTCACGCACGATTTC-3'

1.3 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件进行统计学分析。细胞免疫荧光鉴定、qRT-PCR结果均来自于3次独立重复实验。计量资料用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析进行统计学分析,组间两两比较采用LSD-t法,检验水准α=0.05。

2 结 果

2.1 原代神经元的鉴定

图 1A 光镜下观察培养第 7 天的神经元，可见神经元之间的轴突、树突连接紧密，形成网状，胞体透亮，成锥体和纺锤形，用神经元特异性 NF200 抗体染色，显示 90%以上细胞为 NF200 阳性，证明培养的细胞为神经元(图 1B)。



A. 培养至第 7 天，神经元胞体成锥体、纺锤形，突起伸长相互形成网络

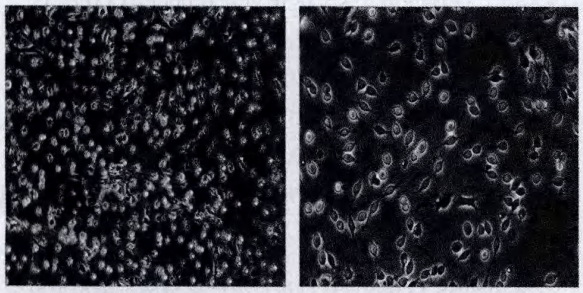
B.培养至第 7 天的神经元免疫荧光染色，特异性 NF200 阳性，图中显示为红色，DAPI 染细胞核，颜色为蓝色

图 1 神经元光镜和免疫荧光图片（200×）

Fig.1 Neuron light microscope and immunofluorescence images (200×)

2.2 OPC 的鉴定

纯化后增殖期的 OPC，光镜下观察 OPC 胞体透亮，折光性高，呈圆形，其突起主要为两极和三极(见图 2A、B)，分化后的少突胶质细胞，其突起逐渐增多为多极，呈蜘蛛网状(图 4A)。采用免疫荧光方法标记 OPC 标志物 PDFRα、NG2、olig2，荧光显微镜观察 PDGFRα 主要表达在胞质和胞膜上，NG2 在胞体和突起上均表达，olig2 主要表达在细胞核，其 3 种标志物均为阳性，表明培养的细胞为 OPC(图 3A、B、C)，分化后的细胞都表达 olig2，部分表达 MBP，说明培养的 OPC 可以分化为少突胶质细胞(图 4B)。

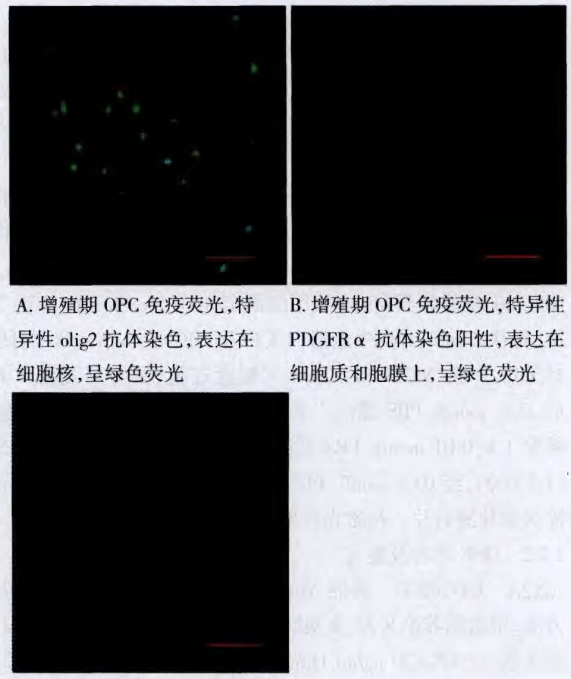


A. OPC 光镜图片(100×)，胞体透亮

B. OPC 光镜图片(200×)，OPC 胞体呈圆形，其突起主要为两极和三极

图 2 OPC 光镜图片

Fig.2 OPC light microscope images



A. 增殖期 OPC 免疫荧光，特异性 olig2 抗体染色，表达在细胞核，呈绿色荧光

B. 增殖期 OPC 免疫荧光，特异性 PDGFRα 抗体染色阳性，表达在细胞质和胞膜上，呈绿色荧光

C. 增殖期 OPC 免疫荧光，特异性硫酸软骨素蛋白聚糖 NG2 染色，表达在胞体和突起上，呈红色荧光

图 3 OPC 免疫荧光图片（400×）

Fig.3 OPC immunofluorescence images (400×)



A. 分化期少突胶质系细胞，胞体呈圆形、椭圆形、锥形，突起增多，呈蜘蛛网状

B. 分化期少突胶质系细胞免疫荧光双标法，特异性 olig2 染色阳性，图中显示为绿色，表达在细胞核，成熟少突胶质细胞特异性 MBP 染色阳性，图中显示为红色，表达在细胞质和突起

图 4 少突胶质细胞系分化期图片（400×）

Fig.4 Differentiation of oligodendrocyte cells images (400×)

2.3 无镁癫痫模型的全细胞记录

无镁外液处理前，可检测到神经元(n=8)自发动作电位(频率范围小于 3 Hz，波幅 20~40 mV)，见图 5；无镁细胞外液处理 3 h 后恢复正常培养基的神经元(n=9)，24 h 内能够记录到约 90%的神经元出现阵发性持续棘波样爆发(频率范围在 3~9 Hz，波幅 20~60 mV)，见图 6，确定无镁诱导 N 惊厥样放电模型成功建立。



图 5 膜片钳检测正常神经元动作电位

Fig.5 Action potential of normal neuron detected by patch-clamp



图 6 膜片钳检测无镁诱导后神经元阵发性持续棘波样爆发

Fig.6 Spontaneous seizure-like discharge of neuron induced by free-magnesium extracellular fluid detected by patch-clamp

2.4 qRT-PCR 检测结果

2.4.1 分化培养基对 OPC 分化的影响 观察 OPC 在分化培养基(ODM 组)条件培养下，各期分化指标转录水平随时间的变化。发现随分化时间增加，MBP 比例呈现逐渐增加的趋势；PDGFRα 比例呈现逐渐减少的趋势；CNPase 比例呈现逐渐增加的趋势。图 7 显示 3 种标志物在不同分化时期其比例的变化(未将各个时间点的标志物表达情况进行统计学比较)。

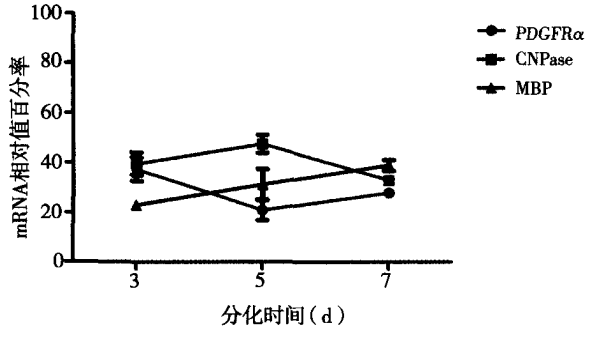


图 7 各期标志物在不同分化时间的百分率

Fig.7 Percentage of each stage maker at different differentiation time

2.4.2 正常神经元微环境对 OPC 分化的影响 将正常神经元培养基按照相应比例加入到分化培养基中(1/8、1/4、1/2 浓度)，分别比较 1/8 浓度正常神经元培养基组(ODM+1/8NNM 组)与单纯分化培养基组(ODM 组)、1/4 浓度正常神经元培养基组(ODM+1/4NNM 组)与单纯分化培养基组(ODM 组)、1/2 浓度正常神经元培养基组(ODM+1/2NNM 组)与单纯分化培养基组(ODM 组)，发现 1/2 浓度正常神经元培养基对 OPC 分化有明显的影响。添加 1/2 浓度正常神经元培养基后发现，在分化第 3、5 天，ODM+1/2NNM 组 MBP 相对量高于 ODM 组(P=0.014、P=0.010)，分化第 3 天伴随 PDGFRα 相对量下降(P=0.004)，分化第 5 天伴随 CNPase 下降(P=0.004)，见表 2、3；分化第 7 天，MBP 相对量低于 ODM 组(P=0.012)，伴随 CNPase 相对量下降(P=0.001)，见表 3。ODM+1/8NNM 组、ODM+1/4NNM 组与 ODM 组比较，其 MBP 相对量无统计学差异。

2.4.3 无镁诱导后神经元微环境对 OPC 分化的影响 将无镁诱导后神经元培养基按照相应比例加入到分化培养基中(1/8、1/4、1/2 浓度)，分别比较 1/8 浓度无镁诱导后神经元培养基组(ODM+1/8INM 组)与 1/8 浓度正常神经元培养基组(ODM+1/8NNM 组)、1/4 浓度无镁诱导后神经元培养基组(ODM+1/4INM 组)与 1/4 浓度正常神经元培养基组(ODM+1/4NNM 组)、1/2 浓度无镁诱导后神经元培养基组(ODM+1/2INM 组)与 1/2 浓度正常神经元培养基组(ODM+1/2NNM 组)，发现 1/2 浓度无镁诱导后神经元培养基对 OPC 分化有明显影响。分别添加 1/2 浓度不同状态神经元培养基后发现，在分化第 3 天，ODM+1/2INM 组的 MBP 相对量明显高于 ODM+1/2NNM 组(P=0.029)，见表 2；分化第 5、7 天，ODM+1/2INM 组 MBP 表达量明显低于 ODM+1/2NNM 组(P=0.001，P=0.026)，分化第 5 天伴随 PDGFRα、CNPase 相对量增加(P=0.002，P=0.000)，见表 3、4。ODM+1/8INM 组与 ODM+1/8NNM 组、ODM+1/4INM 组与 ODM+1/4NNM 组的 MBP 相对量无统计学差异。

表 2 分化第 3 天各期标志物 mRNA 表达水平($\bar{x}\pm s$)

Tab.2 mRNA expressions of each stage marker on the third day of differentiation($\bar{x}\pm s$)

组别		PDGFR α	CNPase	MBP
1/8浓度	ODM	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
	ODM+1/8NNM	0.87 ± 0.07	1.03 ± 0.18	1.25 ± 0.24
	ODM+1/8INM	0.81 ± 0.10	1.13 ± 0.14	1.28 ± 0.16
	F 值	6.033	0.759	2.637
	P 值	0.037	0.509	0.151
1/4浓度	ODM	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
	ODM+1/4NNM	0.69 ± 0.17[a]	1.16 ± 0.56	0.86 ± 0.25
	ODM+1/4INM	0.69 ± 0.07	1.17 ± 0.54	0.88 ± 0.28
	F 值	8.380	0.135	0.392
	P 值	0.018	0.876	0.692
1/2浓度	ODM	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
	ODM+1/2NNM	0.66 ± 0.08[a]	0.86 ± 0.32	1.56 ± 0.12[a]
	ODM+1/2INM	0.80 ± 0.14	0.97 ± 0.40	2.02 ± 0.32[b]
	F 值	10.409	0.194	19.991
	P 值	0.011	0.829	0.002

注：a，ODM+ 相应体积 NNM 组与 ODM 组比较，P<0.05；b：ODM+ 相应体积 INM 组与 ODM+ 相应体积 NNM 组比较，P<0.05

表 3 分化第 5 天各期标志物 mRNA 表达水平（$\bar{x}\pm s$）

Tab.3 mRNA expressions of each stage marker on the fifth day of differentiation（$\bar{x}\pm s$）

	组别	PDGFR α	CNPase	MBP
	ODM	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
1/8浓度	ODM+1/8NNM	1.25 ± 0.07[a]	0.95 ± 0.12	1.06 ± 0.14
	ODM+1/8INM	1.16 ± 0.06	0.93 ± 0.16	1.06 ± 0.13
	F 值	17.231	0.301	0.291
	P 值	0.003	0.751	0.757
	ODM	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
1/4浓度	ODM+1/4NNM	0.97 ± 0.10	0.87 ± 0.42	0.86 ± 0.21
	ODM+1/4INM	1.07 ± 0.10	0.83 ± 0.36	0.77 ± 0.26
	F 值	1.262	0.246	1.046
	P 值	0.349	0.789	0.408
	ODM	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
1/2浓度	ODM+1/2NNM	1.03 ± 0.16	0.74 ± 0.04[a]	1.14 ± 0.05[a]
	ODM+1/2INM	1.53 ± 0.12[b]	1.20 ± 0.11[b]	0.92 ± 0.06[b]
	F 值	20.319	32.835	17.936
	P 值	0.002	0.001	0.003

注：a，ODM+ 相应体积 NNM 组与 ODM 组比较，$P<0.05$；b：ODM+ 相应体积 INM 组与 ODM+ 相应体积 NNM 组比较，$P<0.05$

表 4 分化第 7 天各期标志物 mRNA 表达水平（$\bar{x}\pm s$）

Tab.4 mRNA expressions of each stage marker on the seventh day of differentiation（$\bar{x}\pm s$）

	组别	PDGFR α	CNPase	MBP
	ODM	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
1/8浓度	ODM+1/8NNM	1.36 ± 0.30	1.03 ± 0.12	0.95 ± 0.13
	ODM+1/8INM	1.61 ± 0.29	1.13 ± 0.13	0.96 ± 0.07
	F 值	4.974	1.280	0.297
	P 值	0.053	0.344	0.753
	ODM	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
1/4浓度	ODM+1/4NNM	0.82 ± 0.12	0.74 ± 0.21	0.90 ± 0.18
	ODM+1/4INM	0.87 ± 0.18	0.74 ± 0.20	0.87 ± 0.13
	F 值	1.675	2.461	0.803
	P 值	0.264	0.166	0.491
	ODM	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
1/2浓度	ODM+1/2NNM	0.89 ± 0.16	0.73 ± 0.07[a]	0.82 ± 0.09[a]
	ODM+1/2INM	0.92 ± 0.08	0.76 ± 0.05	0.68 ± 0.06[b]
	F 值	0.859	27.813	21.164
	P 值	0.470	0.001	0.002

注：a，ODM+ 相应体积 NNM 组与 ODM 组比较，$P<0.05$；b：ODM+ 相应体积 INM 组与 ODM+ 相应体积 NNM 组比较，$P<0.05$

3 讨 论

OPC作为一种神经前体细胞，大部分分化为少突胶质细胞，进而包绕神经元轴突形成髓鞘[1]。此进程中，OPC 逐渐分化为晚期 OPC、未成熟少突胶质细胞、成熟少突胶质细胞，而不同的分化时期的细胞，具有不同的表面标志物，PDGFRα 为 OPC 特异性表达的标志物，NG2 也是中枢神经系统非脉管类细胞中 OPC 的特异性标志物，CNPase 在分化中晚期出现，MBP 表达阳性表明该细胞为成熟少突胶质细胞[15]。本实验观察了 OPC 在单纯分化培养基中的分化进程，发现随分化时间的延长，PDGFRα 转录水平先明显减少，后变化不明显，CNPase 转录水平先增多后减少，MBP 转录水平逐渐增加，这说明在此培养基环境中，OPC 能逐渐分化为未成熟少突胶质细胞，最后分化为成熟少突胶质细胞。

OPC 与神经元联系紧密，二者之间有重要的突触联系，后者可以通过释放神经递质调控 OPC 的分化。有研究发现癫痫动物模型中海马 MBP 表达量下降，此外，还发现幼鼠癫痫持续状态后的急性期至慢性期，胼胝体和海马的 MBP 表达量均下降，幼鼠的有髓神经纤维在癫痫持续状态后的急性期受损，到达后期仍旧没有修复[16]。由此可见，癫痫发作可能与髓鞘破坏和髓鞘再生障碍有关，但是癫痫发作是否影响 OPC 分化为成熟少突胶质细胞仍不明确。为此，本课题组以国际公认的体外癫痫模型-无镁外液诱导神经元产生反复自发性惊厥样放电细胞模型，探索神经元异常放电后微环境改变对 OPC 分化的影响。

首先在观察正常神经元微环境对 OPC 分化的影响的实验中，将加入正常神经元培养基的分化培养基与单纯的分化培养基进行对比，比较两组间少突胶质细胞系各期标志物的转录水平的差异。发现加入 1/2 浓度正常神经元培养基后，在分化第 3 天、第 5 天，MBP 转录水平升高，表明少突胶质细胞增多，分化第 3、5 天分别伴随 PDGFRα、CNPase 减少，表明 OPC、未成熟的少突胶质细胞数目少于 ODM 组，进一步推测正常神经元微环境可以促进 OPC 分化；但是在第 7 天，加入正常神经元培养基后，其 MBP 转录水平下降，说明在此时间点分化的少突胶质细胞少于 ODM 组，表明此时间点正常神经元微环境抑制 OPC 分化为少突胶质细胞。

进而对培养第 11 天的正常神经元运用膜片钳技术进行全细胞记录，可检测到神经元自发动作电位后，采用无镁外液孵育 3 h，然后恢复正常神经元培养基，运用膜片钳可检测到 90%以上神经元出现

阵发性持续棘波样爆发，证实体外癫痫模型建立成功。进一步从体外水平探索痫性放电后的微环境对 OPC 分化与正常神经元微环境有何不同。结果提示，与加入正常神经元培养基的分化培养基对比，发现加入 1/2 浓度无镁诱导后的神经元培养基，在分化第 3 天，诱导后神经元微环境中的 MBP 转录水平高于后者，表明在此条件下分化的少突胶质细胞更多，说明此微环境可以促进 OPC 分化为少突胶质细胞，但是在分化第 5 天、第 7 天，诱导后微环境中 MBP 转录水平低于后者，且在分化第 5 天同时伴有 PDGFRα 和 CNPase 水平高于后者，表明少突胶质细胞少于后者，OPC 和未成熟的少突胶质细胞多余后者，此现象说明在此时间点诱导后微环境抑制 OPC 分化为少突胶质细胞。

体外培养的神经元在其生存的过程中一定会释放各种生物因子，其生存的培养基是一个复杂的微环境。暂无文献报道正常和痫性放电后神经元微环境对 OPC 分化的影响，故需探索其对 OPC 分化产生影响的阈值；发现 1/4 浓度、1/8 浓度的培养基对 OPC 分化影响不明显，当其浓度达到 1/2 时，其微环境对 OPC 分化影响明显。本实验结果提示，不同状态神经元培养基对 OPC 分化有不同影响。有研究学者采用脑内微透析技术，发现颞叶癫痫患者海马区域细胞外谷氨酸水平升高[17]；有人对颞叶癫痫患者，采用谷氨酸化学交换饱和转移技术可以发现常规 MRI 未能发现的癫痫病灶[18]。此外，本实验室前期研究，将无镁诱导后神经元与相同时间点的正常神经元的培养基成分中的谷氨酸浓度进行对比，发现诱导后神经元培养基中的谷氨酸浓度高于正常组。因此，痫性放电细胞模型微环境中谷氨酸对 OPC 分化的影响应该受到关注。

谷氨酸是脑内一种重要的兴奋性神经递质，可以通过离子型和代谢型谷氨酸受体发挥作用[19]。有研究报道，神经电活动可以通过释放神经递质谷氨酸，促进少突胶质细胞的分化和髓鞘形成[20]。此外，有体外研究发现，谷氨酸通过 N-甲基-D-天冬氨酸（N-methyl-d-aspartate，NMDA）受体介导，促进大鼠室管膜下区的多能干细胞分化为少突胶质细胞[21]；NMDA 受体激动剂 NMDA 在一定范围内呈浓度依赖性促进 OPC 分化，但是超过此范围后，NMDA 对 OPC 分化产生抑制作用[22]。有人在脱髓鞘动物模型中也证实谷氨酸对 OPC 分化具有双向作用[23-24]。结合此次实验结果，推测谷氨酸的改变是导致诱导后微环境与正常神经元微环境对 OPC 分化产生不同影响的原因之一，有待于后续的进一步研究证实，并探索其作用机制。

参 考 文 献

[1] Nishiyama A, Komitova M, Suzuki R, et al. Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity[J]. Nat Rev Neurosci, 2009, 10(1): 9-22.

[2] White R, Kramer Albers EM. Axon-glia interaction and membrane traffic in myelin formation[J]. Front Cell Neurosci, 2014(7): 284.

[3] Yang QK, Xiong JX, Yao ZX. Neuron-NG2 cell synapses: novel functions for regulating NG2 cell proliferation and differentiation[J]. Biomed Res Int, 2013(201): 402843.

[4] Anderson G, Rodriguez M. Multiple sclerosis, seizures, and anti-epileptics: role of IL-18, IDO, and melatonin[J]. Eur J Neurol, 2011, 18(5): 680-685.

[5] Ye Y, Xiong J, Hu J, et al. Altered hippocampal myelinated fiber integrity in a lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy: a histopathological and stereological investigation[J]. Brain Res, 2013(1522): 76-87.

[6] Yang Z, Watanabe M, Nishiyama A. Optimization of oligodendrocyte progenitor cell culture method for enhanced survival[J]. J Neurosci Methods, 2005, 149(1): 50-56.

[7] Gardner A, Jukkola P, Gu C. Myelination of rodent hippocampal neurons in culture[J]. Nat Protoc, 2012, 7(10): 1774-1782.

[8] Wang Z, Colognato H, Ffrench-Constant C. Contrasting effects of mitogenic growth factors on myelination in neuron-oligodendrocyte co-cultures[J]. Glia, 2007, 55(5): 537-545.

[9] Paivalainen S, Nissinen M, Honkanen H, et al. Myelination in mouse dorsal root ganglion/Schwann cell cocultures[J]. Mol Cell Neurosci, 200, 37(3): 568-578.

[10] Sypecka J, Sarnowska A, Domanska-Janik K. Crucial role of the local micro-environment in fate decision of neonatal rat NG2 progenitors[J]. Cell Prolif, 2009, 42(5): 661-671.

[11] Chen Z, Ma Z, Wang Y, et al. Oligodendrocyte-spinal cord explant co-culture: an in vitro model for the study of myelination[J]. Brain Res, 2010(1309): 9-18.

[12] Sombati S, Delorenzo RJ. Recurrent spontaneous seizure activity in hippocampal neuronal networks in culture[J]. J Neurophysiol, 1995, 73(4): 1706-1711.

[13] Cao HY, Jiang YW, Liu ZW, et al. Effect of recurrent epileptiform discharges induced by magnesium-free treatment on developing cortical neurons in vitro[J]. Brain Res Dev Brain Res, 2003, 142(1): 1-6.

[14] Niu J, Wang L, Liu S, et al. An efficient and economical culture approach for the enrichment of purified oligodendrocyte progenitor cells [J]. J Neurosci Methods, 2012, 209(1): 241-249.

神经病学

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001019

无镁诱导神经元惊厥样放电后 Lingo-1 对轴突的影响

刘丽鸣，蒋　莉，王　玥，何　蓉，陈恒胜，程　莉

（重庆医科大学附属儿童医院神经内科、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、儿科学重庆市重点实验室、重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地，重庆　400014）

【摘　要】目的：研究惊厥样神经元模型中含亮氨酸重复序列和免疫球蛋白结构域的 Nogo 受体作用蛋白（LRR and Ig domain containing，Nogo receptor interacting protein，Lingo-1）对神经元轴突的作用。**方法**：（1）培养 10 d 的皮层神经元，经正常细胞外液处理（正常组）或无镁细胞外液处理（无镁组）后用免疫荧光技术检测神经元轴突变化。（2）以上两种不同处理后 6、12、24、48、72 h 5 个时间点，用 qRT-PCR 及 Western blot 检测神经元中 Lingo-1 表达情况。（3）设计 shRNA 慢病毒抑制 Lingo-1 表达，分为正常组、无镁组、无镁+对照 shRNA 组和无镁+Lingo-1shRNA 组 4 组，用免疫荧光技术检测神经元轴突长度。**结果**：（1）正常组神经元轴突粗壮、轴突间网络连接较致密，神经丝蛋白 200（neurofilament proteins 200，NF200）只在突起表达；无镁组神经元轴突纤细、轴突间网络连接稀疏，NF200 在胞体内高表达。（2）各观察时间点上，无镁组 Lingo-1 的表达量均高于正常组（$P<0.05$）。（3）在神经元轴突长度上：无镁组小于正常组（$P=0.000$），无镁+对照 shRNA 组与无镁组无统计学差异，无镁+Lingo-1shRNA 组大于无镁组+对照 shRNA（$P=0.000$）。**结论**：无镁处理后神经元轴突损伤、Lingo-1 表达升高，抑制 Lingo-1 表达后神经元轴突损伤减轻，说明 Lingo-1 可能参与神经元放电后神经元轴突损伤。

【关键词】Lingo-1；皮层神经元；惊厥；轴突损伤；慢病毒感染

【中图分类号】R748　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2016-02-03

作者介绍：刘丽鸣，Email：291445171@qq.com，研究方向：惊厥性脑损伤。

通信作者：蒋　莉，Email：dr_jiangli@hotmail.com。

基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：81371452）；重庆市科委自然科学基金重点资助项目（编号：cstc2013jjB0031）；教育部博士点基金资助项目（编号：20125503110011）。

优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20160706.1712.022.html（2016-07-06）

[15] Guardiola-Diaz HM，Ishii A，Bansal R. Erk1/2 MAPK and mTOR signaling sequentially regulates progression through distinct stages of oligodendrocyte differentiation[J]. Glia，2012，60(3)：476-486.

[16] 李听松，叶园珍，蒋　莉，等. 幼鼠癫痫发生过程中胼胝体内髓鞘变化的研究[J]. 第三军医大学学报，2013，35(20)：2177-2180.

[17] During MJ，Spencer DD. Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain[J]. Lancet，1993，341(8861)：1607-1610.

[18] Davis KA，Nanga RP，Das S，et al. Glutamate imaging(GluCEST) lateralizes epileptic foci in nonlesional temporal lobe epilepsy[J]. Sci Transl Med，2015，7(309)：309ra161.

[19] Kew JN，Kemp JA. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology[J]. Psychopharmacology (Berl)，2005，179(1)：4-29.

[20] Wake H，Lee PR，Fields RD. Control of local protein synthesis and initial events in myelination by action potentials[J]. Science，2011，333(6049)：1647-1651.

[21] Cavaliere F，Urra O，Alberdi E，et al. Oligodendrocyte differentiation from adult multipotent stem cells is modulated by glutamate[J]. Cell Death Dis，2012(3)：e268.

[22] Li C，Xiao L，Liu X，et al. A functional role of NMDA receptor in regulating the differentiation of oligodendrocyte precursor cells and remyelination[J]. Glia，2013，61(5)：732-749.

[23] Pitt D，Werner P，Raine CS. Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis[J]. Nat Med，2000，6(1)：67-70.

[24] Gautier HO，Evans KA，Volbracht K，et al. Neuronal activity regulates remyelination via glutamate signalling to oligodendrocyte progenitors[J]. Nat Commun，2015(6)：8518.

（责任编辑：冉明会）