DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.01.008
第26卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 1
18 2004年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)01-0018-04

# PD大鼠纹状体提取液诱导中脑神经干细胞分化为多巴胺能神经元的研究

余小强[1],阮怀珍[1],蔡文琴[1],范晓棠[1],姚忠祥[2],杨 辉[3] (第三军医大学:[1]基础医学部神经生物学教研室;[2]基础医学部组织胚胎学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038;[3]新桥医院神经外科,重庆 400037)

提 要:目的 研究PD大鼠纹状体提取液诱对中脑神经干细胞的诱导分化作用。方法 ①体外分离、培养大鼠胚胎的中脑神经干细胞,并诱导其分化,巢素(Nestin)、神经丝-200(NF-200)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)免疫组化染色鉴定。②加入纹状体提取液后,分化细胞用抗酪氨酸羟化酶(TH)免疫组化鉴定,并用流式细胞技术检测分化比例。结果 ①从大鼠胚胎的腹侧中脑部位分离获得了大量未分化、呈巢状悬浮生长的细胞团,且能分化为神经元和神经胶质细胞。②经纹状体提取液诱导后,能够分化出多巴胺能神经元,分化比例达20%左右。结论 纹状体提取液能诱导中脑神经干细胞向多巴胺能神经元的分化。

关键词:中脑;神经干细胞;纹状体提取液;分化
中图法分类号:R322.81;R329.21;R329.24 文献标识码:A

# Striatal extracts of PD rats induce differentiation of mesencephalic neural stem cells into dopaminergic neurons

YU Xiao-qiang[1], RUAN Huai-zhen[1], CAI Wen-qin[1], FAN Xiao-tang[1], YAO Zhong-xiang[2], YANG Hui[3] ([1]Department of Neurobiology, [2]Department of Histology and Embryology, College of Medicine, [3]Department of Neurosurgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract**: **Objective** To study the effects of striatal extracts of PD rats on the differentiation of mesencephalic neural stem cells (NSCs) into dopaminergic neurons. **Methods** After being isolated from fetal rat mesencephalon, NSCs were induced to differentiate. The differentiated cells were identified by immunocytochemical staining with nestin, neurofilament (NF-200), and glial fibrillary acidic protein (GFAP). Mesencephalic NSCs were induced by striatal extracts, and the cells were detected by tyroxine hydroxylase (TH) immunocytochemical staining and analyzed by flow cytometry. **Results** Nest-like clusters of neural stem cells were obtained in the supernatant, and the cells could be differentiated into neurons and astrocytes, etc. About 20% of the neural stem cells were induced into dopaminegic neurons by striatal extracts. **Conclusion** The cells from fetal rat ventral mesencephalon can be induced into dopaminegic neurons by striatal extracts.

**Key words**: neural stem cell; striatal extract; differentiation

在对帕金森病(parkinson disease, PD)的治疗研究中,如何在体外获得足量的多巴胺能神经元一直是困扰着神经科学界的一个难题。胎脑移植虽说能够有比较好的效果,但是由于伦理和来源的限制,不能够得到广泛应用。1992年Reynolds[1]和Richards[2]先后从成鼠的纹状体和海马内分离出神经干细胞,并因此彻底改变了以往认为中枢神经系统神经元不能再生的认识。目前在对啮齿类动物和人类的胚胎研究中,已经先后从大脑皮层、海马、纹状体、嗅球、脑室沿线包括侧脑室、第三脑室和第四脑室、间脑、中脑、小脑和脊髓、视网膜中分离得到神经干细胞[3,4]。因为它有很强的分裂和增殖能力,可以在体外大量得到,为中枢神经系统某些疾病的治疗带来了新的希望。由神经干细胞定向诱导分化得到多巴胺能神经元成为帕金森病研究领域的热点,它可以解决药物治疗的某些不足之处,也能够解决胎脑多巴胺能神经元的来源问题。本实验用细胞培养、免疫组化和流式细胞技术分离培养了大鼠胚胎的中脑神经干细胞,并利用纹状体提取液对其进行诱导分化,观察其向多巴胺能神经元分化的可能及数量,以期为神经干细胞的基础研究和帕金森病的治疗

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054206);国家自然基金资助重点项目(30130110)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects) (G1999054206), and the Key Program of the National Natural Science Foundation of China (30130110)
作者简介:余小强(1978-),男,湖北省黄梅县人,硕士研究生,助教,主要从事神经干细胞与老年性疾病方面的研究。电话:(023)68752232
通信作者:阮怀珍,电话:(023)68752232;E-mail:hzruan61@yahoo.com
收稿日期:2003-01-17;修回日期:2003-07-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

研究提供基础资料。

## 1　材料和方法

### 1.1　实验动物

Wistar 大鼠 30 只, 雌雄不拘, 体质量 200～250 g, 由第三军医大学实验动物中心提供。

### 1.2　试剂和抗体

DMEM/F12 和 B27 均购自 Gibco 公司, 6-OHDA、阿卟吗啡、bFGF 均购自 Sgima 公司, 抗 Nestin IgG 和抗 NF-200 IgG 购自博士德公司, 抗 GFAP IgG 购自北京中山公司, 抗 TH IgG 购自晶美公司。

### 1.3　PD 大鼠纹状体提取液的制备

Wistar 大鼠 30 只, PD 大鼠模型的制作参照杨辉等[5]的方法制作。大鼠黑质坐标为: 前囟后 4.4 mm, 矢状缝左侧 1.1 mm, 硬脑膜下 7.5 mm, 齿杆下 2.4 mm。损伤后第 1 周和第 2 周开始用阿卟吗啡诱导旋转行为, 以大于 210 圈/30 min 为成功模型。共获得 16 只 PD 大鼠。3 周后, 大鼠麻醉迅速断头取脑, 在冰块上分离出含纹状体的脑冠状切面, 取出左右纹状体。用 Hank's 平衡盐液按体积比 1∶4 的比例匀浆。在低温离心机上以 15 000 r/min 离心 30 min。取上清, 过滤去菌, 于－80 ℃保存。

### 1.4　神经干细胞的培养和诱导分化

1.4.1　神经干细胞的分离培养　　取孕 13～14 d 大鼠, 在无菌条件下分离出胎脑, 在中脑和间脑之间横断, 以中脑曲为标志, 从背侧用探针沿中线分开后, 取腹侧约 1.0 mm×1.5 mm×1.0 mm 组织块, 直接吹打, 机械分离制成单细胞悬液。台盼蓝染色后细胞计数, 于每培养瓶加入约 $5\times10^6$ 个活细胞, 使用 DMEM/F12 加 B27 的无血清培养基, 同时加用 bFGF(20 ng/ml)。此后每 5～7 d 机械分离克隆传代 1 次, 方法同前。

1.4.2　神经干细胞的诱导分化　　取传 2～3 代的神经干细胞克隆, 置入装有 0.1%多聚赖氨酸处理过盖玻片的培养板中, 加入纹状体提取液进行诱导分化, 培养 10 d 后收获细胞。

1.4.3　免疫荧光标记实验　　将 SABC-FITC 标记免疫荧光法检测 Nestin 免疫反应阳性神经干细胞、GFAP 免疫反应阳性的神经胶质细胞和 NF-200 免疫反应阳性的神经元。标记免疫荧光法检测 Nestin 免疫反应阳性神经干细胞。SABC-Cy3 标记免疫荧光法检测 TH 免疫反应阳性的多巴胺能神经元。将悬浮培养的细胞团以及诱导分化培养的贴壁细胞用 4%多聚甲醛＋3%饱和苦味酸固定后, 烤干, 0.1 mol/L PBS 漂洗 3 次, 5 min/次, 后进行荧光标记, 操作方法由博士德试剂公司提供。

### 1.5　流式细胞术检测

诱导分化后 10 d, 吸出培养基, 加入 0.25%胰蛋白酶消化液吹打后收集细胞, 4%多聚甲醛固定细胞, 0.1 mol/L PBS 漂洗 3 次, 5 min/次, 加入 0.3%的 Triton X-100, 37 ℃, 15 min。离心去上清, 加入兔抗大鼠 TH IgG(1∶2 000), 37 ℃ 2 h 后冰箱过夜, 0.1 mol/L PBS 漂洗后加入 FITC 标记的羊抗兔 IgG。37 ℃孵育 1 h 后, 0.1 mol/L PBS 漂洗两次后稀释细胞, 在流式细胞仪上测定 1 万个细胞, 记录其中荧光标记细胞数, 百分比, 及平均荧光强度。

### 1.6　统计学处理

采用 $\chi^2$ 检验。

## 2　结果

### 2.1　大鼠胚胎中脑神经干细胞的分离、培养及鉴定

由大鼠胚胎 13～14 d 原代培养的中脑神经干细胞, 在无血清和含 B27 及 bFGF 的培养基中培养 2～3 d 时, 即可以见到含 4～8 个细胞的细胞团的出现。培养到 6～7 d 时, 可以见到比较大的悬浮生长神经干细胞克隆, 生长状态良好, 未见明显的突起长出(图 1)。继续传代吹打成单细胞悬液后, 仍能长出同样性状的克隆, 细胞传至 8～9 代仍具有干细胞特性。细胞团经 Nestin FITC 荧光标记后, 呈强阳性, 甚至可以分辨出其中单个细胞的存在(图 2)。干细胞克隆在不含 bFGF 的无血清的培养基内, 在 3～4 h 很快贴壁生长, 在加入纹状体提取液(300 μl/ml)后, 进行诱导分化。2 d 后即可以见到突起从神经球中向外长出, 1 周左右, 在干细胞周围即可以见到不同形态的增殖的新生细胞, 呈放射状增长(图 3)。分化的细胞有的为 1～2 个或多个长突起的呈 NF-200 免疫荧光阳性的神经元(图 4)。多数细胞呈 GFAP 免疫荧光阳性的星型胶质细胞成片状生长(图 5)。

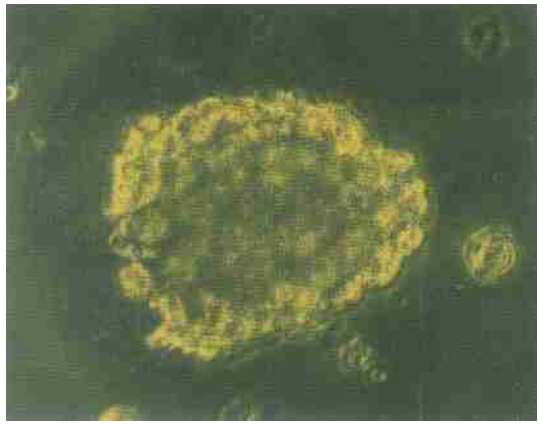


图 1　大鼠中脑神经干细胞集落　(相差显微镜×400)

**Fig 1　Cluster of NSCs from fetal rat**　(phase contrast microscope×400)



图 2　Nestin 免疫反应阳性细胞　(SABC-FITC×400)

**Fig 2　Nestin-positive cells**　(SABC-FITC×400)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



图 3 神经干细胞的分化(7 d)(相差显微镜× 400)
**Fig 3 Differentiated NSCs at 7 d after differentiation**
(phase contrast microscope× 400)

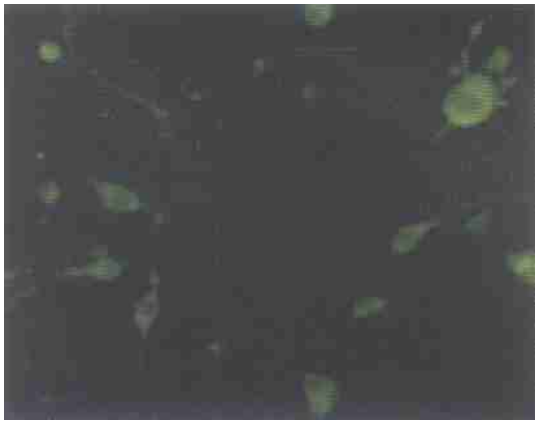


图 4 分化 10 d 的 NF-200 免疫反应阳性细胞 (SABC-FITC× 400)
**Fig 4 NF-200-positive cells at 10 d after differentiation**
(SABC-FITC× 400)



图 5 分化 10 d 的 GFAP-200 免疫反应阳性细胞 (SABC-FITC× 400)
**Fig 5 GFAP-positive cells at 10 d after differentiation**
(SABC-FITC× 400)

### 2.2 向多巴胺能神经元分化

使用纹状体提取液进行诱导分化,可以观察到加入纹状体提取液组,干细胞克隆相对而言,向外生长的类神经元样细胞数量较空白组为多,TH 免疫荧光检测可以观察到 TH 阳性神经元的存在。细胞较大,呈椭圆形,有较长的突起(图 6)。流式细胞检测结果,空白对照、自然分化、未毁损侧、毁损侧,阳性细胞百分率(%)分别为 1.66%、12.51%、22.63%、28.07%。

纹状体提取液能明显提高 TH 阳性细胞含量,与自然状态分化相比,能提高 TH 阳性细胞 2.5 倍左右。而左右两侧的纹状体提取液比较而言,毁损侧纹状体提取液能诱导出多巴胺能神经元的比例稍高,但是差异不显著($P>0.05$)。

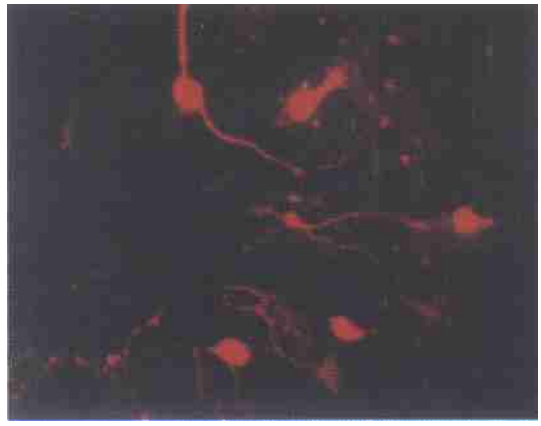


图 6 分化 10 d 的 TH 免疫反应阳性细胞 (SABC-Cy3× 400)
**Fig 6 TH-positive cells at 10 d after differentiation**
(SABC-Cy3× 400)

## 3 讨论

从多巴胺能神经元发育的部位即中脑曲分离的神经干细胞由于本身含有中脑源性的转录因子和相关发育信号,能够迅速对区域性的相关分子信号作出反应从而分化为多巴胺能神经元,显然更有利于诱导分化[6]。Svendsen 等[7]将来源于大鼠中脑和纹状体的神经干细胞分别移植到入 PD 大鼠纹状体中,只有前者才能分化出 TH 阳性的神经元,表明神经干细胞的来源对最终分化表型有很大的影响。Potter 等[8]也发现,IL-1 能够诱导中脑来源的神经干细胞分化为 TH 阳性的神经元,而不能诱导纹状体来源的神经干细胞。在胚胎后期,不同部位的神经干细胞并不是全能的,虽然其也都能够分化为神经元和胶质细胞,但有神经元分化的特异性。可能在中脑本身就存在相对更为接近多巴胺神经元的分化晚期的神经干细胞,在本实验中,选择中脑来源的神经干细胞,这有利于诱导分化出多巴胺能神经元。

诱导剂的选择也是相当重要,在对多巴胺能神经元营养作用的研究中,纹状体提取液一直备受关注,神经元的投射的靶部位可以分泌可溶性细胞因子从而对

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

于支配它的投射神经元有促进存活、生长和分化等作用。早在 1986 年, 研究显示纹状体提取液对于多巴胺能神经元有促进存活的作用, 推测其中可能含有特定的细胞因子。1993 年, GDNF 被发现并命名, 它具有很强的多巴胺能神经元特异性的营养作用。Nakajima 等[9] 认为, 纹状体提取液能够促进多巴胺能神经元的存活和生长, 是因为 GDNF 的存在。而周嘉伟等[10] 的研究发现, 这种作用仅仅用 GDNF 的升高是不能够解释的, 使用相应的抗体中和 GDNF, NT3 等营养因子的作用以后, 纹状体提取液还是有其它促多巴胺能神经元生长的活性因子的存在。纹状体提取液还对细胞的分化有促进作用, Shimano 等[11] 发现, 纹状体提取液能够促进培养的 I 型胶质细胞的分化。Nishino 等[12] 把来自于中脑的神经干细胞同时移植到同一 PD 大鼠的两侧纹状体, 在毁损侧分化出更多的多巴胺能神经元, 而在对侧很少。但是, 在我们的实验中, 体外诱导分化却没有表现出明显的差异性, 这也许是在体内的微环境不同所致。

神经干细胞有向胶质细胞分化的倾向, 在目前的研究中, 神经干细胞定向分化为多巴胺能神经元的比例总不是太高。Daadi 等[13] 把取自于小鼠胚胎 14 d 的中间与侧面神经隆起对 EGF 有反应的神经干细胞, 在体外用 EGF、bFGF, 和 B49 胶质细胞系的条件培养液进行培养, 在这种培养体系下, 只有 1%分化为神经元, 其中 TH 阳性者占 10%。将来自于大鼠胚胎 E12 d 腹侧中脑的神经干细胞在有 $N_2$ 和 bFGF 的培养条件下培养 1 周, 然后撤去有丝分裂原, TH 阳性的神经元增加, 达到总数的 11%[14]。如果利用神经干细胞株或者是胚胎干细胞, 分化比例要高一点, 但是却存在致瘤等危险。本实验使用纹状体提取液所得到的分化比例也不是太高, 这不排除与提取液的使用量有关。如何提高特定神经元的分化比例而减少胶质化是亟待解决的问题。

由于 PD 病的严重危害和治疗上的局限, 迫切希望能在体外得到大量可以应用的多巴胺能神经元, 干细胞的研究是解决这一问题的有效途径。如何选用合适来源的神经干细胞或者是胚胎干细胞, 如何应用现代的生物学技术对其进行基因调控及细胞因子的处理, 从而引导细胞定向分化, 需要进一步的深入研究。

参考文献:


[1] Reynolds B A, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system[J]. Science, 1992, 255(5052): 1707—1710.

[2] Richards L J, Kilpatrick T J, Bartlett P F. De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992, 89(18): 8591—8595.

[3] Weiss S, Dunne C, Hewson J, *et al*. Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis[J]. J Neurosci, 1996, 16(23): 7599—7609.

[4] Tropepe V, Coles B L K, Chiasson B J, *et al*. Retinal stem cells in the adult mammalian eye[J]. Science, 2000, 287(5460): 2032—2036.

[5] 杨　辉, 张可成, 蔡文琴. AM 脑内移植后 PD 鼠纹状体内单胺类神经介质及 D2 受体变化的研究[J]. 中华实验外科杂志, 1995, 12(4): 225—227.

[6] Ye W, Shimamura K, Rubenstein J L, *et al*. FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate[J]. Cell, 1998, 93(5): 755—766.

[7] Svendsen C N, Clarke D J, Rosser A E, *et al*. Survival and differentiation of rat and human epidermal growth factor-responsive precursor cells following grafting into the lesioned adult central nervous system[J]. Exp Neurol, 1996, 137(2): 376—388.

[8] Potter E D, Ling Z D, Carvey P M. Cytokine-induced conversion of mesencephalic-derived progenitor cells into dopamine neurons[J]. Cell Tissue Res, 1999, 296(2): 235—246.

[9] Nakajima K, Hida H, Shimano Y, *et al*. GDNF is a major component of trophic activity in DA-depleted striatum for survival and neurite extension of DAergic neurons[J]. Brain Res, 2001, 916(1—2): 76-84.

[10] Zhou J W, Shen Y, Tang Z S, *et al*. Striatal extracts promote the survival and phenotypic expression of rat fetal dopaminergic neurons *in vitro*[J]. Neurosci Lett, 2000, 292(1): 5—8.

[11] Shimano Y, Fukuda A, Fujimoto I, *et al*. Tissue extract from dopamine-depleted striatum enhances differentiation of cultured striatal type-1 astrocytes[J]. Neurosci Lett, 1996, 205(3): 193—196.

[12] Nishino H, Hida H, Takei N, *et al*. Mesencephalic neural stem (Progenitor) cells develop to dopaminergic neurons more strongly in dopamine-Depleted striatum than in intact striatum[J]. Exp Neurol, 2000, 164(1): 209—214.

[13] Daadi M M, Weiss S. Generation of tyrosine hydroxylase-producing neurons from precursors of the embryonic and adult forebrain[J]. J Neurosci, 1999, 19(11): 4484—4497.

[14] Studer L, Tabar V, McKay R D. Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats[J]. Nat Neurosci, 1998, 1(4): 290—295.


（编辑　张　宁）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net