DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.01.007
第25卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 1
2003年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2003

文章编号:1000-5404(2003)01-0015-04

论著

NOV对大鼠神经干细胞增殖和分化的影响

李成仁,李 巍,蔡文琴,苏炳银,陈德英 (第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨NOV基因和蛋白对大鼠神经干细胞(NSCs)增殖和分化的影响。方法 NOV基因重组质粒转染COS-7细胞和NSCs,收集COS-7细胞和NOV基因修饰COS-7细胞的条件培养液(简称COS-CM和NOV-CM),作用于培养的NSCs,^{3}H-TdR掺入检测NSCs的增殖,免疫细胞化学和流式细胞仪检测NSCs的分化。结果 ①NOV-CM能明显促进NSCs对^{3}H-TdR的摄入,说明NOV-CM能明显促进细胞的增殖,另外NOV-CM的促细胞增殖作用具有一定的量效关系;②免疫细胞化学和流式细胞仪结果显示,NOV-CM促进NSCs向神经元方向分化;③NOV基因修饰NSCs分化时,神经元的比例增高。结论 NOV可能具有促进NSCs增殖和分化的作用。

关键词:NOV;神经干细胞;增殖;分化
中图法分类号:R322.8;R329.28;R394.2 文献标识码:A

Effects of nephroblastoma overexpressed gene on proliferation and differentiation of neural stem cells in rats

LI Cheng-ren, LI Wei, CAI Wen-qin, SU Bing-yin, CHEN De-ying (Department of Histology and Embryology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effects of nephroblastoma overexpressed gene (NOV) on proliferation and differentiation of neural stem cells (NSCs) in rats. Methods NOV gene recombinant plasmid was respectively transfected into COS-7 cells and NSCs by liposome method. Conditioned media (CM) of COS-7 cells and COS-7 cells modified by NOV gene were collected. COS-CM and NOV-CM, NSCs were cultured in CM. Proliferation of NSCs was detected by incorporation of ^{3}H-TdR, and differentiation of NSCs by immunocytochemistry and flow cytometry. Results ① NOV-CM markedly promoted the incorporation of ^{3}H-TdR in cultured NSCs and the effect was concentration-dependent; ② NOV-CM was found to be helpful for the differentiation of NSCs to neurons; ③ When differentiation of NSCs was modified by NOV gene, the number of neurons also increased. Conclusion NOV may have promoting effects on the proliferation and differentiation of NSCs.

Key words: nephroblastoma overepressed gene; neural stem cells; proliferation; differentiation

神经干细胞(Neural stem cells, NSCs)的研究是当前神经科学研究热点中的热点,它的成功分离培养为许多棘手的神经系统疾病如神经退行性疾病和中枢神经系统损伤的治疗带来了曙光。NSCs属于多能干细胞,在体外它能在含有EGF和/或bFGF的无血清培养基中保持不断增殖状态,并一直保持干细胞的特性[1]。它们在一定诱导因素的作用下具有分化成星形胶质细胞、少突胶质细胞和神经元的潜能[2]。许多因子包括生长因子和营养因子,对NSCs的增殖和分化都具有重要作用。肾母细胞瘤过度表达基因(Nephroblastoma overexpressed gene, NOV)是1991年发现的一种原癌基因,其编码的NOV蛋白是一种胰岛素样生长因子(Insulin-like growth factor, IGF)结合蛋白,属于IGF家族的成员。我室以前的研究显示NOV基因是神经系统发育的一个调控因子[3,4],但NOV基因和蛋白对NSCs的增殖和分化的影响,目前尚属空白。本实验在体外培养大鼠神经干细胞的基础上,研究NOV基因和蛋白对NSCs的增殖和分化的影响,为神经干细胞的基础研究提供部分实验数据。

1 材料与方法

1.1 生物材料及试剂

自胚胎12 d大鼠大脑皮层培养的NSCs、COS-7细胞、含NOV全长基因的pcDNA3.1/Myc-His(+)/lacZ重组质粒由本实

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39900078);全军医学科研"十五"计划青年基金资助项目(01Q097);重庆市科委应用基础研究项目(2001)
作者简介:李成仁(1970-),男,浙江省东阳市人,博士,讲师,主要从事神经干细胞与神经损伤方面的研究。电话:(023)68752231
通信作者:蔡文琴,电话:(023)68753460,E-mail:wenqin@public.cta.cq.cn
收稿日期:2002-09-10;修回日期:2002-12-12

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

验室培养和构建，DOTAP 脂质体转染试剂盒和 G418 购自 Roche 公司，^{3}H-TdR 购自上海原子能研究所，NF-200 抗体（多抗）、GFAP 抗体（多抗）和 Gal 抗体（多抗）均购自 Sigma 公司，SABC 试剂盒、SABC-FITC 和 SABC-Cy3 购自博士德公司。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒转染 COS-7 细胞和 NSCs 用 DOTAP 脂质体转染试剂包裹重组质粒转染培养的 COS-7 细胞和 NSCs。G418（500 μg/ml）筛选 14 d 后收集抗性细胞，调整细胞浓度后继续培养。转染了 NOV 基因的 COS-7 细胞简写成 NOV/COS-7 细胞，转染了 NOV 基因的 NSCs 简写成 NOV/NSCs。

1.2.2 COS-7 细胞和 NOV/COS-7 细胞条件培养液（Conditioned Medium，CM）的制备 生长状态良好的 COS-7 细胞和 NOV/COS-7 细胞，传代于 50 ml 培养瓶中，细胞密度为 10^6/瓶，培养 48 h 后换以无血清培养基，继续培养 24 h 后收集 CM，简称为 COS-CM 和 NOV-CM。将收集的 CM 用 0.22 μm 孔径滤膜过滤，−20 ℃保存。使用时的剂量一般为整个培养液一半，即将培养 NSCs 的培养液吸出 1/2 后再加入相同体积的 CM。部分实验中设置了换液 1/3 或全换为 CM 的浓度组，即 CM 占最终液体量的 1/3 或全部（称 1/3 及全剂量组）。一般不作特殊说明时，CM 占总培养液的 1/2。

1.2.3 液闪检测 NSCs 对^{3}H-TdR 摄入的影响 NSCs 按每孔 10^5 的细胞密度种植于 24 孔培养板，24 h 后分为对照组、COS-CM 组和 NOV-CM 组，每组 8 孔，对照组不换液，COS-CM 组和 NOV-CM 组分别用 COS-CM 和 NOV-CM 换液一半，继续培养 48 h，最后 24 h 加入^{3}H-TdR（1 μCi/孔）。另种植相应数量的 NSCs，分为对照组和 1/3、1/2 及全剂量 NOV-CM 组，每组 8 孔，继续培养 48 h，最后 24 h 加入^{3}H-TdR，观察不同浓度 CM 对^{3}H-TdR 摄入的影响。用自动多头细胞收集器收集细胞于玻璃纤维滤纸，冲洗固定，80 ℃烤干，加入闪烁液，置于 γ 液体闪烁计数仪检测。

1.2.4 NSCs 的分化 NSCs 和 NOV/NSCs 按每瓶约 5×10^4 的细胞密度种植于预先涂有多聚赖氨酸的 50 ml 培养瓶中或每皿约 1×10^4 的细胞密度种植于预先放有多聚赖氨酸涂布的盖玻片的 35 mm 培养皿中，分为正常对照组、COS-CM 组和 NOV-CM 组，每组 3 瓶或 3 皿，正常对照组用含 5% 胎牛血清培养基，COS-CM 组与 NOV-CM 组分别用 COS-CM、NOV-CM 换液一半后加入 5% 胎牛血清，分化 7 d 后终止培养，用流式细胞仪和免疫细胞化学检测。

1.2.5 免疫细胞化学染色 培养于盖玻片上的细胞，4% 多聚甲醛固定。采用抗 NF-200（1∶1 000）、抗 GFAP（1∶200）和抗 Gal（1∶200）分别标记神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞。设阴性对照，用 PBS 液代替一抗。具体方法参照文献[5]介绍的方法。

1.2.6 流式细胞仪检测 消化收集培养瓶内的细胞，4% 多聚甲醛固定，PBS 洗涤 3 遍后按 1.2.5 的方法行免疫荧光染色，用流式细胞仪（FACstar PLUS 型，美国 Becton Dickison 公司）检测，每组 3 个样本，每样本计数 10 000 个细胞。

1.2.7 统计学处理 所有实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 液闪结果

液闪结果见表 1，2，COS-CM 组和 NOV-CM 组的 NSCs 的 cpm 值都较对照组有明显的增加（$P<0.01$），即 COS-CM 和 NOV-CM 均能促进培养的 NSCs 对^{3}H-TdR 的摄入，说明 COS-CM 和 NOV-CM 均能促进 NSCs 的增殖。其中 NOV-CM 组的 cpm 值比 COS-CM 组要高（$P<0.05$），说明 NOV-CM 中含有促进 NSCs 增殖的成分。另外液闪结果也显示 NOV-CM 的促 NSCs 增殖作用具有一定的量效关系，在 NOV-CM 占换液量 1/3 以上时就能明显地促进 NSCs 对^{3}H-TdR 的摄入，随换液中 CM 比例的增加，cpm 值也越大。

表 1 两种 CM 处理后对 NSC 增殖的影响（$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Effects of two kinds of CM on the proliferation of NSCs（$\bar{x}\pm s$）

Group	n	cpm
Control	8	1 360±73
COS-CM	8	1 989±179**
NOV-CM	8	2 783±56**#

**：$P<0.01$ *vs* Control；#：$P<0.05$ *vs* COS-CM

表 2 NOV-CM 对 NSCs 增殖作用的量效关系（$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 Relation between concentration and effects of NOV-CM on promoting proliferation of NSCs（$\bar{x}\pm s$）

Group	n	cpm
Control	8	1 360±73
1/3 NOV-CM	8	2 239±26**
1/2 NOV-CM	8	2 783±56**
Total NOV-CM	8	3 428±386**

**：$P<0.01$ *vs* Control

2.2 NSCs 分化的形态学观察

在相差显微镜下，分化第 7 天在各组 NSCs 球周围均可见到 3 种类型的细胞：① 具有多个粗长突起的星形胶质细胞样细胞，细胞较大，排列紧密，折光性弱；② 具有一两个或多个突起，胞体呈圆形或椭圆形的神经元样细胞，细胞较小，突起短而少，细胞排列疏松，折光性强；③ 具有多个细突起且不断分枝的少突胶质细胞样细胞，细胞较小。星形胶质细胞样细胞和神经元样细胞一般围绕着 NSCs 球呈放射状排列，少突胶质细胞样细胞一般在位于分化细胞的最外面单独分布或成群分布。在对照组和 COS-CM 组培养孔可见到较多星形胶质细胞样细胞，在它们中间或细胞上可见到神经元样细胞，在 NOV-CM 组和转染 NOV 基因组可见到较多的神经元样细胞，见图 1，2。

2.3 免疫细胞化学和免疫荧光染色结果

染色结果证实了上述形态学结果，在各组均可见有 NF-200、GFAP 和 Gal 阳性细胞，NF-200 阳性细胞，胞体较小，染色深；GFAP 阳性细胞，胞体较大，染色较浅；Gal 阳性细胞胞体较小，染色较深。在 NOV-CM 组和转染 NOV 基因组可见到较多的 NF-200 阳性细胞，细胞突起较长，互相连接成网格状结构，在对照组和 COS-CM 组可见到大量 GFAP 阳性细胞，见图 3～6。

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

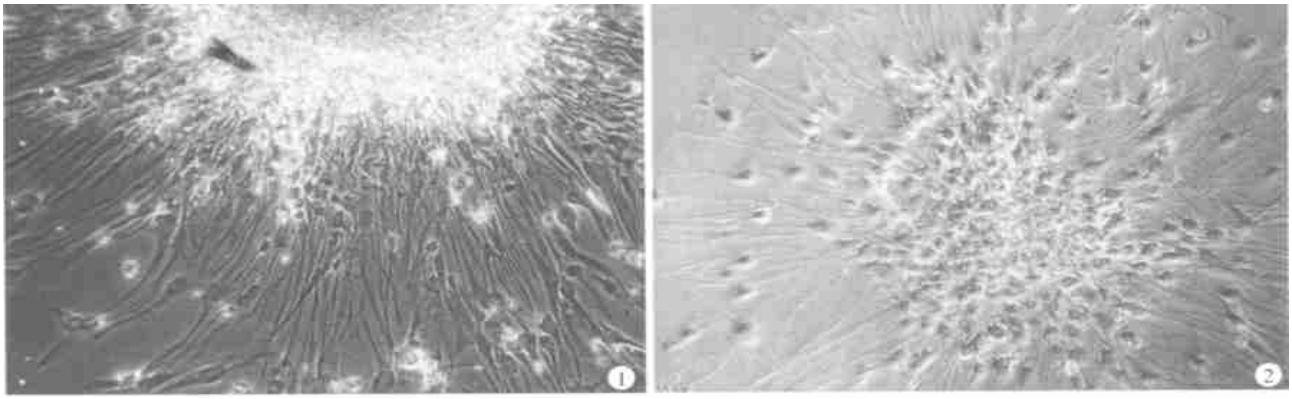


图 1　对照组的 NSCs 分化 7 d （相差显微镜× 200）

Fig 1　Differentiation of 7 days in control group under phase contrast microscope （× 200）

图 2　NOV-CM 组的 NSCs 分化 7 d （相差显微镜× 200）

Fig 2　Differentiation of 7 days in NOV-CM group under phase contrast microscope （× 200）

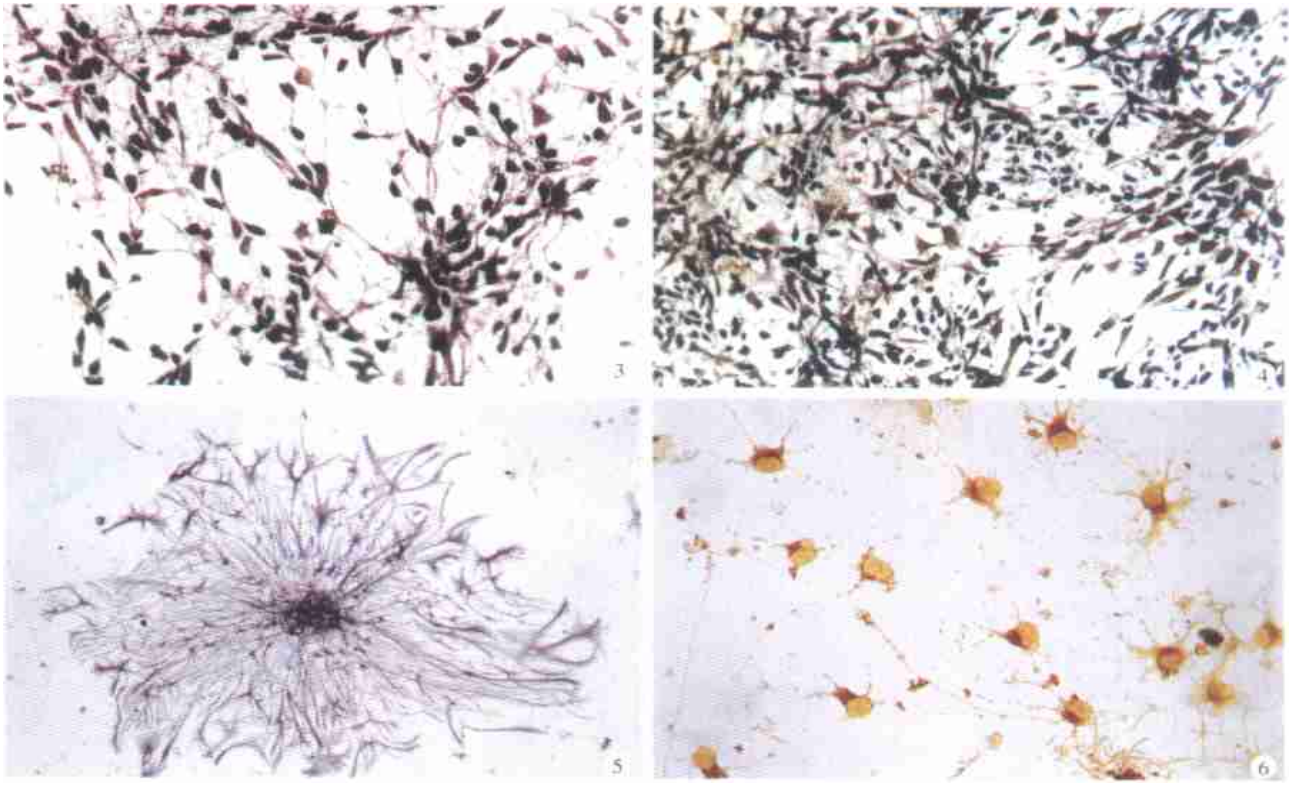


图 3　对照组 NSCs 分化 7 d 后 NF-200 阳性细胞 （SABC- 硫酸镍铵增强法× 200）

Fig 3　NF-200 positive cells with SABC-Nickel ammonium sulfate staining 7 days after differentiation in control group （× 200）

图 4　NOV-CM 组 NSCs 分化 7 d 后 NF-200 阳性细胞 （SABC- 硫酸镍铵增强法× 100）

Fig 4　NF-200 positive cells with SABC-Nickel ammonium sulfate staining 7 days after differentiation in NOV-CM group （× 100）

图 5　对照组 NSCs 分化 7 d 后 GFAP 阳性细胞 （SABC- 硫酸镍铵增强法× 100）

Fig 5　GFAP positive cells with SABC-Nickel ammonium sulfate staining 7 days after differentiation in control group （× 100）

图 6　对照组 NSCs 分化 7 d 后 Gal 阳性细胞 （SABC-DAB 显色× 400）

Fig 6　Gal positive cells with SABC— DAB staining 7 days after differentiation in control group （× 400）

2.4　流式细胞仪检测结果

结果显示在对照组中 GFAP 阳性细胞数量较多, 加入 COS-CM 后 GFAP 阳性细胞和 NF-200 阳性细胞数量未见明显变化(P > 0.05); NOV-CM 组 GFAP 阳性细胞数量明显减少, NF-200 阳

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

性细胞数量明显增加($P<0.05$)；转染NOV基因组的NSCs分化成NF-200阳性细胞数量增加，GFAP阳性细胞数量减少($P<0.05$)，但与NOV-CM组相比，分化成神经元数量较少，两组之间有显著性差异($P<0.05$)。各组之间少突胶质细胞数量相差不显著($P>0.05$)。具体结果见表3。

表3 NSCs分化的流式细胞仪检测($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab 3 Count of differentiation of NSCs using flow cytometer($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Group	n	NF-200	GFAP	Gal
Control	3	30.90±2.59	44.68±3.47	4.14±0.53
COS-CM	3	33.69±3.62	45.89±2.74	4.26±0.67
NOV-CM	3	54.68±4.36*	39.97±4.27*	5.38±0.82
NOV-gene	3	45.15±3.35*	38.69±4.83*	4.63±0.59

*: $P<0.05$ *vs* Control

3 讨论

NSCs这一概念是Reynolds和Weiss等[6]于1992年提出的，他们从成年小鼠纹状体分离出能在体外不断分裂增殖的，具有多种分化潜能的细胞群，即NSCs；由于NSCs须在丝裂原生长因子的作用下才能维持干细胞的特性，因此被称为生长因子维系的NSCs。Reynolds和Svendsen等在分离NSCs时最初是用EGF，随着研究的深入，发现EGF不是维持NSCs的惟一因子，bFGF也能够刺激NSCs的增殖与分化[7]。我们经过初步研究发现，在培养的NSCs中加入COS-CM和NOV-CM均能促进NSCs摄入^{3}H-TdR，而NOV-CM的促进作用比COS-CM的要大，提示COS-7细胞和NOV/NSCs的分泌物均具有促进NSCs增殖的作用，其中转染了NOV基因的COS－7细胞分泌物中多了NOV蛋白，它可能对NSCs的增殖有促进作用，并且这个促增殖作用具有量效关系。NOV蛋白是IGF的结合蛋白，而IGF对NSCs的增殖具有促进作用[8]，我们推测NOV/COS-7细胞分泌的NOV可能通过调节IGF的作用来发挥促进NSCs的增殖，也可能是NOV蛋白本身就有促进NSCs增殖的作用。NSCs的分化可能存在外来信号调控和细胞自身基因调控两种机制[9]。外来信号中，NSCs的生存微环境决定了干细胞的分化命运。即使同一来源的NSCs移植到不同的分化部位后其分化结果也不相同，但均与接受移植部位的细胞相似，这一现象提示了外来信号调控作用的重要性[10]，NSCs的分化过程中许多细胞因子、激素等可促进NSCs的分化，而且它们常协同调节分化。为了观察NOV蛋白对NSCs分化的作用，我们用COS-CM和NOV-CM处理进行分化的NSCs，然后用流式细胞仪和免疫细胞化学进行检测，结果发现COS-CM对NSCs的分化作用不显著，而NOV-CM具有促进NSCs向神经元方向分化，并且经NOV-CM处理的分化出来的神经元突起较长，提示NOV蛋白除了促进NSCs向神经元分化，还可能对新分化来的神经元的突起生长有一定的促进作用。文献[8]报道IGF可以促进NSCs向神经元的方向分化，NOV/COS-7细胞分泌的NOV可能是通过调节IGF的作用来影响NSCs的分化，也可能NOV本身也有促进NSCs向神经元方向分化的作用。为了观察NOV基因对NSCs分化的作用，我们将转染了NOV基因的NSCs直接进行分化，结果与NOV－CM组相似，转染了NOV基因也有促进NSCs向神经元方向分化的作用，神经元的比例相对于对照组来说也增高。其中存在的机制我们推测：NSCs在转染了含NOV基因的真核表达载体后，可以表达和释放NOV蛋白，分泌的NOV蛋白可以促进NSCs自身和周围NSCs向神经元分化，也通过调节IGF的作用来发挥作用。由于自身分泌的NOV蛋白量的关系，因此促进NSCs向神经元分化的比例没有加入NOV-CM的高。

参考文献：

[1] Gritti A, Parati E A, Cova L, *et al*. Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self renew in response to basic fibroblast growth factor[J]. J Neurosci, 1996, 16(3): 1091－1100.

[2] Chow S Y, Moul J, Liu Y, *et al*. Survival and differentiation of rat spinal cord stem cells grafted into normal and injured adult spinal cord[J]. Soc Neurosci Abstr, 1997, 23(2): 905－918.

[3] Su B Y, Cai W Q, Zhang C G, *et al*. The expression of ccn3 (nov) RNA and protein in the rat central nervous system is developmentally regulated [J]. Mol Pathol, 2001, 54(3): 184－191.

[4] Su B Y, Cai W Q, Zhang C G, *et al*. A developmental study of novH gene expression in human central nervous system[J]. C R Acad Sci III, 1998, 321(11): 883－892.

[5] 蔡文琴，王伯行云. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交[M]. 成都：四川科学技术出版社，1994. 61.

[6] 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.

[7] Parmentier M L, Woods D, Greig S, *et al*. Rapsynoid/partner of inscuteable controls asymmetric division of Larval neuroblasts in Drosophila[J]. J Neurosci, 2000, 20(84): 1－5.

[8] Arsenijevic Y, Weiss S, Schneider B, *et al*. Insulin-like growth factor-I is necessary for neural stem cell proliferation and demonstrates distinct actions of epidermal growth factor and fibroblast growthfactor-2[J]. J Neurosci, 2001, 21(18): 7194－7202.

[9] Brannen C L, Sugaya S O. *In vitro* differentiation of multipotent human neural progenitors in serum-free medium[J]. Neuroreport, 2000, 11(5): 1123－1128.

[10] Meltzer H, Hatton J D, Sang U H. Cell type-specific development of rodent central nervous system progenitor cells in culture[J]. J NeuroSurg, 1998, 88(1): 93－98.

（编辑 王 红）

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