

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2014.05.003

EPO 促进胚胎神经干细胞向神经元分化的形态学研究*

袁丽丽¹ 马登殿² 孔佑华¹

(¹ 济宁医学院基础学院, 山东 济宁 272067; ² 济宁医学院附属医院, 济宁 272029)

摘要 目的 探讨促红细胞生成素(erythropoietin,EPO)促进神经干细胞(neural stem cells,NSCs)分化的形态学表现,为细胞移植治疗脑部疾病和脑损伤提供实验依据。**方法** 取大鼠 14 d 胚胎脑皮质先增殖培养,后贴壁分化培养。适时镜下观察,免疫细胞化学染色,用 nestin 鉴定 NSCs,GFAP 鉴定神经胶质细胞、MAP2 鉴定神经元。选取第 3 代 NSCs,向培养基中分别添加不同剂量的 EPO,浓度分别为 0.5u/ml,5u/ml,50u/ml,500u/ml,并设不添加 EPO 的对照组,MAP2 免疫荧光共聚焦显微镜观察 NSCs 向神经元方向的分化。**结果** 1)鼠胚胎脑皮质在无血清悬浮培养形成大量神经球,并可传代,球内细胞均表达 nestin。分化培养,可检测出 MAP2 或 GFAP 阳性细胞。2)EPO $\geq$ 5u/ml 各组分化培养,表达 MAP2 阳性细胞显著升高($P<0.05$)。**结论** 大鼠胚胎脑皮质体外培养可获得 NSCs;适当浓度 EPO 可提高 NSCs 向神经元的分化。

关键词 神经干细胞;神经元;分化;促红细胞生成素

中图分类号:R321 **文献标识码**:A **文章编号**:1000-9760(2014)10-313-04

Study of morphology about the promotion of erythropoietin to the differentiation of the cultured NSCs from brain cortex in vitro

YUAN Li-li, Ma Deng-dian, KONG You-hua

(Academy of Basic Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: Objective Methods Results Conclusion To investigate the promotion of EPO on the differentiation of the neural stem cells (NSCs) in vitro from cerebral cortex of pregnant SD rats. The brain cortex were isolated and cultured in serum-free suspension, and then in differentiating suspension. Nestin was used to detect the NSCs. Glia fibrillary acid protein (GFAP) and microtubule-associated protein 2 (MAP2) were used to detect the differentiation of NSCs by immunocytochemistry. After obtained the third passage (P3) of NSCs, EPO of different concentration (0.5, 5, 50, 500u/ml) was added to the medium. And there was a control group without EPO. MAP2 was used to detect the neuron after the differentiation by immunocytochemistry. The results showed that the separated cells from embryonic brain cortex formed neurospheres, in which nestin-positive cells were detected. GFAP and MAP2-positive cells were detected after differentiation culture. MAP-2-positive cells of the EPO supplementation groups ($>5U/ml$) showed an significant increase in the immunochemistry dying test compared with the control group. The results indicate that NSCs can be obtained from the separated cerebral cortex of embryonic rats. Appropriate concentration of EPO can increase the rate of the neuron after the differentiation the NSCs in vitro.

Key words: Neural stem cells; Culture, neuron; Differentiation; Erythropoietin

近些年,促红细胞生成素(erythropoietin,EPO)对中枢神经系统的保护作用^[1]研究较多。本实验镜下取大鼠 14d 天胚胎脑皮质行体外培养,鉴定为神经干细胞(neural stem cells,NSCs)之后培养基中加入不同浓度的 EPO 继续体外培养,观察 NSCs 向神经元方向分化的形态学表现。

* [基金项目] 济宁市科技局 2012 年科研基金项目(编号:2012jnjc07)

1 材料与方法

1.1 实验材料

成年雌雄未经产 SD 大鼠晚 8:00 合笼,次日晨 8:00 查到精子者记为 E0d。

悬浮培养基:DMEM/F12(1:1, Hyclone), 20 ng/ml EGF(Sigma), 20 ng/ml bFGF(Sigma), 2% B27(Gibco), 100 u/ml 青霉素, 100 μ g/ml 链霉素。

贴壁分化培养基:DMEM/F12(1:1, Hyclone), 10%FBS(杭州四季青), 100u/ml 青霉素, 100 μ g/ml 链霉素。

1.2 方法

1.2.1 NSCs 培养和鉴定

1.2.1.1 NSCs 的分离和传代及自然分化 取孕 14d(E14d)SD 大鼠胚胎脑皮质,用袁丽丽等^[2-3]培养方法先悬浮培养传代 3 次,第 3 代(P3)细胞悬浮培养 7d,收集部分细胞离心后待做电镜标本,其余悬浮细胞移入涂有 L-多聚赖氨酸包被盖玻片的 24 孔培养板中加入分化培养基。放入培养箱培养 6~8h,随机选取培养板,将盖玻片固定,待行 nestin 免疫细胞化学染色。其余培养板继续行分化培养,7d 后取出细胞爬片固定,待行神经胶质原纤维酸性蛋白(glia fibrillary acid protein, GFAP)、微管相关蛋白 2(microtubule-associated protein 2, MAP2)免疫细胞化学染色。

1.2.1.2 免疫细胞化学染色 Nestin、GFAP、MAP2 进行免疫细胞化学染色^[2]。

1.2.2 EPO 掺入实验

1.2.2.1 分组 第 3 代 NSCs 悬浮及其后贴壁分化培养基中添加 EPO,根据 EPO 终浓度 0.5、5、50、500u/ml 分为 4 个实验组,另设对照组(不加 EPO)。培养方法同上。

1.2.2.2 免疫荧光染色 NSCs 爬片 7d 固定行 MAP2 免疫荧光染色^[3]。后行激光共聚焦显微镜下观察并拍照。每组随机取 4 张盖玻片,每张 400 倍镜下随机选 5 个视野计数 MAP2 阳性细胞数及总细胞数,计算视野中 MAP2 阳性细胞百分率。实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 SPSS11.5 统计学软件处理数据,各组率的比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 神经干细胞鉴定

2.1.1 倒置相差显微镜及电镜观察结果 分离 E14d 鼠胚胎脑皮质得到单细胞,台盼蓝活细胞计数 >96%,在生长培养基中细胞悬浮生长。第 5~7 天,形成神经球,可传代。电镜观察细胞核大,细胞器很少,核质比较大。见图 1。

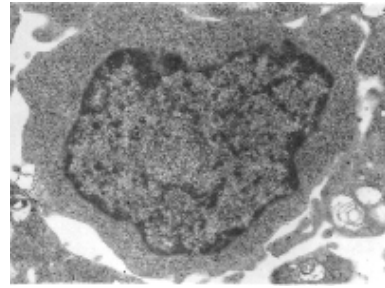


图 1 NSCs 悬浮生长 7d 电镜照片($\times 60000$)

2.1.2 免疫细胞化学染色观察结果 免疫细胞化学染色结果显示, nestin 在神经球内细胞胞浆呈阳性表达,细胞浆被染成棕褐色,见图 2。

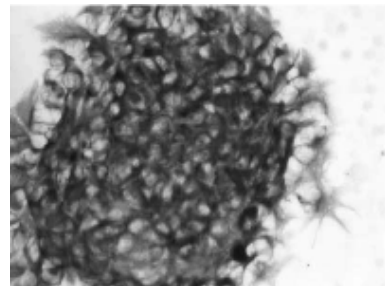


图 2 神经球爬片 6h,免疫细胞化学染色示神经球内细胞 nestin 表达阳性($\times 400$)

分化培养 7d, GFAP:在部分细胞胞浆及突起中呈阳性表达,被染成棕褐色,胞体较大、突起粗而短,见图 3。MAP2:在部分细胞胞浆及突起中呈阳性表达,细胞胞浆及突起呈棕褐色,见图 4。



图 3 神经球分化 7d,免疫细胞化学染色示 GFAP 阳性细胞($\times 400$)

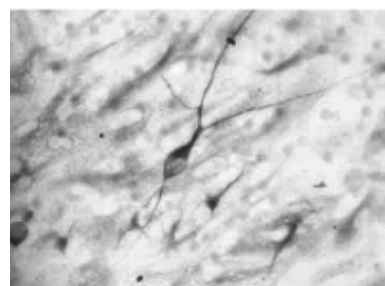


图 4 神经球分化 7d,免疫细胞化学染色示 MAP2 阳性细胞($\times 400$)

2.2 EPO 掺入实验

2.2.1 光镜观察 加入 EPO 分化培养,细胞透亮,折光较好,见图 5,部分细胞伸出的突起细而长,随时间进行细胞突起形成复杂的网络。

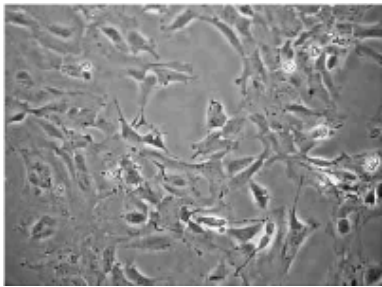


图 5 EPO 5u/ml 组,神经干细胞分化培养 4d 光镜照片(×100)

2.2.2 MAP2 免疫细胞荧光化学染色及共聚焦显微镜观察 加入 EPO 分化培养 7d,MAP2 免疫细胞荧光染色共聚焦显微镜观察,示部分细胞胞浆及突起呈绿色荧光,MAP2 表达阳性,见图 6。

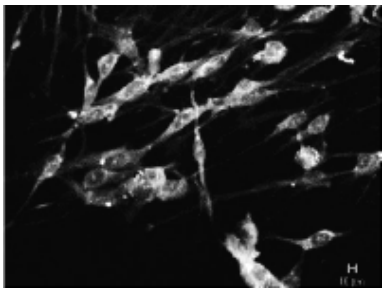


图 6 EPO 5u/ml 组,NSCs 免疫荧光细胞化学染色,示 MAP2 阳性细胞(×400)

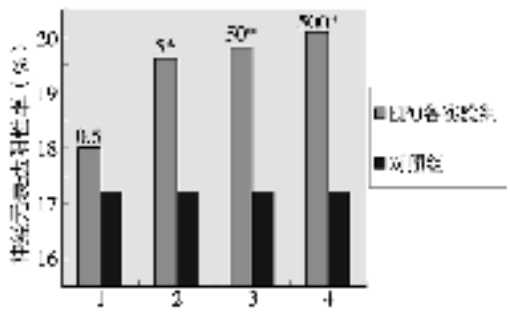
各实验组对 NSCs 向神经元方向分化的影响如表 1 所示。

表 1 加入 EPO 各组 MAP2 在神经元内的表达

组别	MAP2 标记细胞结果		χ^2	P
	阳性总数	阴性总数		
对照组	601	2889		
0.5u/ml 组	621	2829		
5u/ml 组	643	2635		
50u/ml 组	735	2980		
500u/ml 组	723	2879		
合计	3323	14212	14.407	0.006*

注: * $P<0.05$,说明 EPO 浓度不同时,NSCs 向神经元分化的比例不同或不全相同。

添加 EPO 各组分别与对照组比较(见图 7),MAP2 表达阳性率 $EPO \geq 5u/ml$ 各实验组显著高于对照组($P<0.05$)。



* 与对照组相比 $P<0.05$

图 7 EPO 各实验组与对照组比较神经元表达阳性率

3 讨论

NSCs 是当今科学研究热点之一。本实验分离胚胎大鼠脑皮质,经处理吹打成单细胞,在生长培养基对其悬浮培养,可获得悬浮生长的神经球,电镜结果显示,神经球内细胞核质比例较高,细胞器较少,此结果与一般干细胞形态特征相一致。nestin 具有维持神经前体细胞正常形态的作用,在本实验将 nestin 作为 NSCs 的标记物,神经球爬片 6~8h,其免疫细胞化学染色结果显示球内细胞均呈 nestin 阳性,表明生长培养基培养的细胞为 NSCs,且具增殖潜能。在添加 10%FBS 的培养基中 NSCs 贴壁,7d 后行免疫细胞化学染色,示分化细胞中部分表达 MAP2 阳性或 GFAP 阳性,表明本实验源于 SD 大鼠胚胎脑皮质的细胞体外培养,具有分化为神经元、星形胶质细胞的能力。

EPO 为促进红细胞生成素,在体内对 NSCs 的保护作用研究较多^[4-5],Yu 等^[4]的研究表明,在脑及脊髓 EPO 和其受体有抗细胞凋亡功能,对神经元正常发育有重要作用。体外培养可以研究单因素对 NSCs 的影响,本实验取材位置是 SD 大鼠胚胎脑皮质,前期实验结果^[2]表明 EPO 在适当浓度下可抑制体外培养的 NSCs 凋亡。本实验 NSCs 爬片分化 7d,MAP2 免疫荧光细胞化学染色结果显示 $EPO \geq 5 u/ml$ 各实验组阳性细胞表达率显著高于对照组($P<0.05$),表明适当剂量的 EPO 促进体外大鼠胚胎脑皮质 NSCs 向神经元方向分化。在体内促红细胞生成素 EPO 与促红细胞生成素受体(EPO-R)结合,激活蛋白酪氨酸激酶,在细胞内快速诱导多种蛋白质发生酪氨酸磷酸化,从而启动信号转导通路如 Ras 有丝分裂原激活蛋白激酶等将信号传到细胞核核因子 1,控制 NSCs 增殖、分化。脑内皮细胞在促红细胞生成素直接作用下分泌脑源性神经生长

(下转第 319 页)

本文结果表明,腹腔注射东莨菪碱的小鼠出现了明显的记忆障碍,GTPs 中、高剂量能明显改善小鼠在跳台实验中的记忆再现缺失,使小鼠的跳台错误次数减少,潜伏期明显延长;GTPs 各剂量组能拮抗小鼠在水迷宫实验中的空间定向学习记忆障碍,表现为从起点到达终点平台的潜伏期缩短,进入盲端的错误次数减少,明显提高学习的记忆能力。本文结果还表明,D-半乳糖模型组小鼠也出现了明显的记忆障碍,GTPs 各剂量组可明显改善 D-半乳糖引起的小鼠记忆减退,且具有一定的剂量依赖性。

综上所述,本文采用 2 种比较成熟的实验动物模型,采用 2 种行为学实验方法,证明 GTPs 能较好改善记忆获得障碍模型小鼠的记忆功能。GTPs 对学习记忆障碍的改善作用可能与其抗氧化、增强对自由基的清除、保护脑神经细胞免受自由基的损害作用有关,其具体作用机理正在研究中。

参考文献:

[1] 黄忠仕,黄仁彬,李江,等. 龙眼参多糖对不同模型拟痴呆小

(上接第 315 页)因子(NGF),后者通过作用于邻近细胞的旁分泌方式促进神经发生^[6-9]。在体外 EPO 促进源于胚胎脑皮质的 NSCs 分化,推测可能原因:一方面,源于大鼠胚胎脑皮质的 NSCs 有与促红细胞生成素相结合的受体,体外培养基中加入 EPO,EPO 便与脑皮质 NSCs 上的 EPO-R 结合启动了信号传导通路而促进 NSCs 向神经元方向的分化,另一方面可能刺激了源于胚胎脑皮质的 NSCs 分泌神经生长因子,此因子作用于邻近神经干细胞,从而促进了 NSCs 向神经元方向的分化。NSCs 向神经元方向分化的具体调控机制目前尚不清楚,受自身基因和外来信号等方面共同调节,下一步将继续深入探讨胚胎 NSCs 向神经元定向诱导分化的影响因素及其分化机制,为 NSCs 移植治疗中枢神经系统损伤及神经变性疾病提供理论基础。

参考文献:

[1] Burger D,Lei M,Geoghegan-Morphet N,et al. Erythropoietin protects cardiomyocytes from apoptosis via up-regulation of endothelial nitric oxide synthase[J]. Cardiovasc Res, 2006, 72(1):51-59.
[2] 袁丽丽,姜海燕,杜红梅,等. EPO 对鼠胚脑皮质神经干细胞

鼠的益智作用[J]. 右江民族医学院学报,2004,26(4):463-465.

- [2] 杜怡峰,闫鹏,韩晓娟. Alzheimer 病胰岛素信号通路的研究[J]. 济宁医学院学报,2012,35(2):84-92.
- [3] Cabrera C,Artacho R,Giménez R. Beneficial effects of green tea-a review[J]. J Am Coll Nutr,2006,25(2):79-99.
- [4] Thielecke F,Boschmann M. The potential role of green teacatechins in the prevention of the metabolic syndrome-a review[J]. Phytochemistry,2009,70(1):11-24.
- [5] 杨文豪,吕俊华. 绿茶多酚对学习记忆障碍小鼠的改善作用及其机制[J]. 华西药学杂志,2008,23(3):277-279.
- [6] 徐叔云,卞如廉,陈修. 药理实验方法学 3 版[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:826-827.
- [7] 辛勤,刘善庭,葛顺,等. 替米沙坦对脑缺血再灌注小鼠记忆障碍的改善作用[J]. 中国新药与临床杂志,2006,25(9):696-699.
- [8] 刘显明,李月芬,李国平. 茶氨酸对 D-半乳糖衰老模型小鼠抗衰老作用的实验研究[J]. 创伤外科杂志,2007,10(3):257-259.
- [9] 白雪,杨杰,刘昌福,延胡索总生物碱对 D-半乳糖所致衰老模型小鼠相关指标的影响[J]. 贵州医药,2008,32(5):399-401.

(收稿日期 2014-07-21)

抗凋亡作用的研究[J]. 济宁医学院学报,2011,34(2):77-80.

- [3] 袁丽丽,马登殿,杜红梅,等. 促红细胞生成素促进体外鼠胚脑皮质神经干细胞增殖[J]. 解剖科学进展,2010,16(6):550-553.
- [4] Yu X,Shacka JJ,Eells JB,et al. Erythropoietin receptor signaling is required for normal brain development[J]. Development,2002,129:505-516.
- [5] Wallach I,Zhang J,Hartmann A,et al. Erythropoietin-receptor gene regulation in neuronal cells[J]. Pediatr Res,2009,65:619-624.
- [6] Sargin D,El-Kordi A,Agarwal A,et al. Expression of constitutively active erythropoietin receptor in pyramidal neurons of cortex and hippocampus boosts higher cognitive functions in mice[J]. BMC Biol,2011,9:27.
- [7] Hirabayashi Y,Itoh Y,Tabata H,et al. The Wnt/{beta}-catenin in pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells[J]. Development,2004,131:2791-2801.
- [8] Wang L,Zhang Z,Wang Y,et al. Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats[J]. Stroke,2004,35:1732-1737.
- [9] 胡宝洋. 干细胞神经定向分化研究与医学转化[J]. 济宁医学院学报,2012,35(5):316-321.

(收稿日期 2014-07-10)