

海人酸对神经干细胞增殖及分化的影响

孙桂芳¹, 袁志浩², 彭涛¹, 王景涛¹, 付振强¹, 张博爱¹ (¹郑州大学第一附属医院神经内科, 河南省郑州市 450052; ²郑州市第三人民医院泌尿外科, 河南省郑州市 450000)

文章亮点:

作者以“海人酸; 神经干细胞; 增殖; 分化”为关键词, 通过检索万方医学全文库(2000/2013)、中国期刊网(2000/2013)、中国生物医学文献服务系统(2000/2013)、Ovid-Medline 医学文献库(2000/2013), 最终认定本课题具有先进性, 创新点如下: 脑组织缺血、缺氧后过度释放的兴奋性氨基酸可以通过 NMDA 受体激活内源性神经干细胞, 促使其增殖、分化, 来修复受损的神经功能。但过度释放的兴奋性氨基酸也可导致细胞内钙离子超载, 继而引起神经细胞的损伤, 不利于形成有效的神经网络。实验应用海人酸, 模拟兴奋性氨基酸的作用, 对体外培养的神经干细胞进行干预, 探讨海人酸对神经干细胞增殖、分化的影响。

关键词:

干细胞; 培养; 海人酸; 神经干细胞; 增殖; 分化; 神经元; 星形胶质细胞

主题词:

干细胞; 神经干细胞; 神经元; 细胞增殖; 细胞分化

摘要

背景: 神经干细胞对脑组织的修复作用非常有限, 约 80% 新增殖的内源性神经干细胞在 6 周内死亡, 仅 0.2% 的细胞继续增殖、分化, 参与修复。

目的: 分析不同剂量海人酸在对神经干细胞增殖及分化的影响。

方法: 体外分离并培养新生 Wistar 大鼠神经干细胞, 将神经干细胞分为空白对照组和加入不同浓度梯度的海人酸组, 通过免疫组化法和免疫荧光法进行鉴定, MTT 比色法测定海人酸对神经干细胞分化的影响, 计算分化后神经元和星形胶质细胞比例。

结果与结论: 海人酸组贴壁的神神经球分化速度较空白对照组快, 在同一时间点进行观察, 神经细胞的迁移距离较未处理组远。分化 5 d 后, 海人酸组所分化的细胞中, 星状细胞较空白对照组多, 而神经元样细胞相对较少, 培养的细胞具有自我更新和向神经元、少突胶质细胞和星形胶质细胞分化的潜能。兴奋性氨基酸海人酸可使部分神经干细胞死亡, 但可促进幸存的神经干细胞增殖及分化, 并诱导其向星形胶质细胞分化。

孙桂芳, 袁志浩, 彭涛, 王景涛, 付振强, 张博爱. 海人酸对神经干细胞增殖及分化的影响[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(14):2238-2243.

Kanic acid effects on the differentiation and proliferation of neural stem cells

Sun Gui-fang¹, Yuan Zhi-hao², Peng Tao¹, Wang Jing-tao¹, Fu Zhen-qiang¹, Zhang Bo-ai¹ (¹Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China; ²Department of Urology, the Third People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450000, Henan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: The role of neural stem cells to repair brain tissue is very limited. About 80% of endogenous neural stem cells will die within the first 6 weeks, and only 0.2% of the cells continue to proliferate, differentiate, and participate in the brain repair.

OBJECTIVE: To study the effects of kanic acids at different concentrations on the differentiation and proliferation of neural stem cells.

METHODS: The neural stem cells from newborn Wistar rats were isolated and cultured *in vitro*, and then divided into two groups: blank control group and experimental group. We treated the second group by adding different concentration gradients of kainic acid. Then the cells were identified by immunofluorescence and immunohistochemistry methods, cell differentiation was detected by MTT colorimetric assay and the percentages of neurons and astrocytes were calculated.

RESULTS AND CONCLUSION: The adherent neurospheres in the experimental group proliferated more rapid and showed longer migration distance than those in the blank control group. After 5 days of differentiation, the number of astrocytes in the experimental group was higher, but the number of neuron-like cells was lower compared with the blank control group. The cultured cells had self-renew and multipotent differentiation potential. Kanic acid could induce the neural stem cells to differentiate toward astrocytes efficiently.

Subject headings: stem cells; neural stem cells; neurons; cell proliferation; cell differentiation

孙桂芳, 女, 1983 年生, 河南省驻马店市人, 汉族, 2009 年郑州大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事神经病学方面的研究。

通讯作者: 张博爱, 教授, 郑州大学第一附属医院神经内科, 河南省郑州市 450052

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.14.017
[http://www.crter.org]

中图分类号:R394.2

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2014)14-02238-06

稿件接受: 2014-01-23

Sun Gui-fang, Master, Attending physician, Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Corresponding author: Zhang Bo-ai, Professor, Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Accepted: 2014-01-23

Sun GF, Yuan ZH, Peng T, Wang JT, Fu ZQ, Zhang BA. Kanic acid effects on the differentiation and proliferation of neural stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(14):2238-2243.

0 引言 Introduction

神经干细胞可分裂、增殖及自我更新, 它的发现改变了既往神经细胞不可再生的观念, 可作为中枢神经系统结构和功能修复的新途径, 具有广阔的应用前景, 为缺血性脑血管病、神经退行性疾病、神经损伤等疾病的治疗带来希望, 因此神经干细胞也就成了当今生命科学的研究热点。神经干细胞不仅具有多分化潜能及自我更新、体外持续分裂增殖的干细胞属性, 而且体外易于基因工程操作, 能特异性表达具有临床价值的外源性功能蛋白, 包括各种神经营养因子、神经递质、酶类, 在移植部位能分化成各种类型神经元及神经胶质细胞, 是研究神经系统疾病及创伤修复的理想材料。然而, 尽管目前神经干细胞体外培养、分离已取得成功, 但用于临床还不成熟, 主要原因是对神经干细胞自我更新和分化的具体调控机制不明, 因此不能对于各种疾病的治疗做到有的放矢。

兴奋性氨基酸是脊椎动物中枢神经系统中具有广泛分布的一种神经递质。其中谷氨酸是脑内最重要的兴奋性神经递质, 中枢神经系统兴奋性氨基酸离子型受体(NMDA)在脑内的含量也很丰富而且与谷氨酸密切相关, 它对神经元也有去极化作用和兴奋作用, 其分子机制与谷氨酸能突触相似。相关研究表明, 脑缺血后过度释放的兴奋性氨基酸可以通过NMDA受体激活内源性神经干细胞, 促使其增殖、分化, 来修复受损的神经功能^[1-6]。脑组织缺血、缺氧可刺激海马齿状回颗粒细胞层、室管膜下层的神经干细胞增殖^[7-8]。但是在卒中发生后, 内源性神经干细胞对脑组织的修复作用非常有限, 约80%新增殖的内源性神经干细胞在6周内死亡, 仅0.2%的细胞继续增殖、分化, 参与修复。这可能也与脑缺血后兴奋性氨基酸过度释放和NMDA受体过度兴奋有关, 过度释放的兴奋性氨基酸虽然促使内源性神经干细胞增殖、分化, 但也可导致细胞内钙离子超载, 继而引起神经细胞的损伤, 不利于形成有效的神经网络环路^[9-12]。

海人酸是一种谷氨酸类似物, 是一种神经兴奋性毒剂, 大剂量的海人酸可以用来损毁核团或造成神经元溃变, 小剂量海人酸是兴奋作用。因此, 兴奋性氨基酸对脑缺血后神经功能的恢复是一把双刃剑, 实验所用的海人酸, 化学结构类似于谷氨酸, 在本实验中模拟兴奋性氨基酸的作用^[13-14]。神经干细胞的增殖和分化是目前该领域研究的两个重要方向, 实验将加入海人酸对体外培养的神经干细胞进行干预, 研究海人酸对神经干细胞增殖、分化的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 动物实验观察。

时间及地点: 实验于2007年7月至2009年1月在郑州大

学第一附属医院神经内科实验室完成。

材料:

实验动物: 新生Wistar大鼠两三只, 出生24 h以内, SPF级, 雌雄不限, 购自郑州大学实验动物中心, 动物合格证号: 410116。实验过程中对动物的处置符合医学伦理学标准。

海人酸对神经干细胞增殖及分化的影响实验用主要试剂:

试剂	来源
海人酸(kanic acid, KA)、多聚赖氨酸	Sigma公司
Neuralbasal培养基、B27	Gibco公司
碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)	Peprtech公司
Thermanox塑料细胞培养片(13 mm, 圆形)	NUNC公司
兔抗大鼠Cy3抗体、山羊抗兔IgG抗体、兔抗大鼠多克隆神经元特异性烯醇化酶(neuron specific enolase, NSE)抗体、兔抗大鼠多克隆胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)抗体、兔抗大鼠多克隆2, 3-环核苷酸磷酸二酯酶(2, 3-Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase, CNP)抗体。	Santa-Cruz公司
其他生化试剂	进口或国产分析纯

方法:

大鼠神经干细胞的分离、培养及诱导分化: 取新生的Wistar大鼠, 放入体积分数75%乙醇中浸泡30 s消毒, 剪刀断头, 在无菌条件下剪开头皮及颅骨, 取出侧脑室部位和大脑皮质脑组织, 放入玻璃皿中, 剥离表面脑膜, 然后用冰冷的D-Hank's液洗3次, 用眼科剪剪成大小约1 mm×1 mm×1 mm的组织块, 用0.25%胰酶消化10 min, 然后加入小牛血清终止消化, 玻璃吸管轻轻吹打均匀, 机械分离, 加入冰冷的D-Hank's液离心, 1 000 r/min, 离心5 min, 共离心3次, 弃上清, 用无血清干细胞培养基(Neuralbasal+b27+碱性成纤维细胞生长因子)悬浮细胞, 再用200目细胞筛过滤, 制成单细胞悬液, 锥虫蓝染色活细胞并计数, 以 $5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度种入培养瓶中, 置入饱和湿度、37 °C、体积分数5% CO₂恒温培养箱孵育, 7 d后再次用玻璃吸管吹打机械分离法使细胞克隆球分离, 传代1次, 每天倒置相差显微镜下观察干细胞生长情况。选取传代至第3代神经干细胞克隆球, 接种于置有Thermanox塑料细胞培养片的24孔培养板中, 干细胞培养基中撤去碱性成纤维生长因子, 继续培养10 d, 倒置相差显微镜下观察神经干细胞球贴壁后分化情况。

实验分组: 取第3代神经干细胞球培养液, 吹打均匀, 按照每孔400 μL接种于24孔培养板中, 置于饱和湿度、37 °C、体积分数5%CO₂恒温培养箱继续培养4 h, 使神经干细胞球贴壁, 再进行分组, 空白对照组: 继续用不含碱性成纤维生长因子及血清的Neuralbasal培养基培养; 海人酸各组: 分别加入含有不同浓度(100 μmol/L, 500 μmol/L、

1 mmol/L, 2 mmol/L, 4 mmol/L)海人酸的Neuralbasal培养基干预30 min, 再换用不含碱性成纤维细胞生长因子及血清的Neuralbasal培养基, 继续培养10 d。每组重复设8个孔。

神经干细胞的鉴定并检测其分化后神经元及胶质细胞

比例: 取400 μ L传代3代以上的神经干细胞球悬液, 加入放有Thermanox塑料细胞培养片的24孔培养板中, 一组继续培养4 h, 使神经干细胞球贴壁, 用多聚甲醛固定细胞, 巢蛋白染色备用; 另一组用撤去碱性成纤维细胞生长因子的Neuralbasal培养基继续培养10 d, 使细胞分化, 用多聚甲醛固定, 神经元特异性烯醇化酶、胶质纤维酸性蛋白及2, 3-环核苷酸磷酸二酯酶染色备用; 其中巢蛋白、神经元特异性烯醇化酶工作效价为1:100, 胶质纤维酸性蛋白、2, 3-环核苷酸磷酸二酯酶工作效价为1:200, 二抗Cy3, 工作效价为1:1000, 染色后在倒置荧光显微镜下观察并拍照。免疫组织化学SP法操作参考说明书, 神经元特异性烯醇化酶、2, 3-环核苷酸磷酸二酯酶及胶质纤维酸性蛋白免疫组织化学染色, 一抗工作效价同前, 染色后显微镜下计数200个细胞, 采用双人随机双盲计数阳性细胞, 计算阳性细胞百分率。

MTT法测定细胞的存活率和增殖速度: 细胞贴壁分化后从第2天开始, 取出培养板, 在各孔加5%MTT 20 μ L, 继续培养4 h, 加入DMSO 200 μ L, 在酶标仪中振荡10 min, 使结晶完全溶解后在490 nm下测定各孔A值, 每日用同样方法检测, 连测7 d。

主要观察指标: ①检测空白对照组和海人酸各组神经干细胞分化后神经元和胶质细胞比例。②MTT法测定空白对照组和海人酸组神经干细胞的存活率和分化后增殖速度。

统计学分析: 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用SPSS 13.0软件对实验结果进行分析, 应用t检验对海人酸组内数据两两比较, 应用单因素方差分析(One-way ANOVA)对空白对照组和海人酸各组进行组间比较, $\alpha=0.05$ 作为检验水准。

2 结果 Results

2.1 神经干细胞鉴定

巢蛋白抗原表达: 巢蛋白免疫荧光检测显示: 神经干

细胞球经分散后形成单细胞, 再增殖, 传导至第3代形成的神经干细胞球呈巢蛋白抗原阳性(图1A)。

多潜能分化特性: 将传代3代以上的神经干细胞在撤去碱性成纤维生长因子的培养基中贴壁分化培养10 d后, 使神经干细胞贴壁分化, 形成神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞3种细胞, 分别做抗神经元特异性烯醇化酶、胶质纤维酸性蛋白、2, 3-环核苷酸磷酸二酯酶免疫荧光染色, 用免疫荧光检测, 可检测到神经干细胞分化后的3种神经细胞: 神经元特异性烯醇化酶、胶质纤维酸性蛋白、2, 3-核苷酸磷酸二酯酶阳性细胞(图1B, C, D)。

2.2 海人酸对神经干细胞分化的影响

显微镜下观察结果: 通过倒置显微镜下观察, 发现空白对照组中悬浮神经球均可贴壁, 折光性好。而海人酸组神经球贴壁率较低, 培养孔中可见大量贴壁后又悬浮起来的神经球, 神经球变黑, 折光性变差, 继续培养, 这些未贴壁的神经球逐渐死亡, 可见有絮状物和较多细胞碎片漂浮在培养基中, 贴壁的神经球继续分化, 但分化数天后, 实验发现海人酸组贴壁的神经球分化速度较空白对照组快, 在同一时间点进行观察, 神经细胞的迁移距离较未处理组远。分化5 d后观察, 海人酸组所分化的细胞中, 星状细胞, 胞体为扁平形, 突起细长, 突起伸展在细胞之间且交织成网状, 较空白对照组多, 而神经元样细胞相对较少(图2)。

免疫组织化学法检测神经干细胞分化结果: 实验结果显示: 空白对照组神经元和胶质细胞平均比例为(23.07 \pm 1.51)%和(76.93 \pm 1.51)%; 海人酸组神经元和胶质阳性细胞平均比例为(13.99 \pm 2.07)%和(86.01 \pm 2.07)%, 相比差异有显著性意义($F=377.4$, $P < 0.01$, 表1)。

2.3 MTT法检测神经干细胞在加入海人酸后细胞的分化速度的改变 与空白对照组相比, 在第2天时海人酸组(1 mmol/L海人酸组)细胞A值明显下降, 与空白对照组相比在2, 3 d时A值差异有显著性意义($P < 0.05$), 但海人酸组细胞分化较快, 从第4天起A值与空白对照组比较, 差异无显著性意义($P > 0.05$, 表2)。

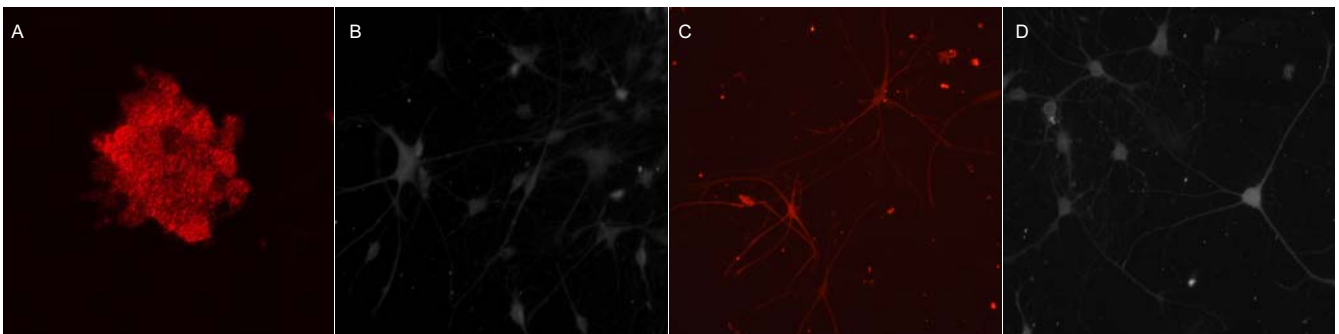


图1 第3代新生大鼠脑神经干细胞免疫鉴定及多潜能分化特性(免疫荧光染色, $\times 400$)

Figure 1 Identification and pluripotent differentiation of neonatal rat neural stem cells at passage 3 (immunofluorescence staining, $\times 400$)

图注: 图中A为神经干细胞球呈巢蛋白抗原阳性; B为可分化为神经元特异性烯醇化酶阳性的神经元; C为可分化为胶质纤维酸性蛋白阳性的星形胶质细胞; D为可分化为2, 3-环核苷酸磷酸二酯酶阳性的少突胶质细胞。

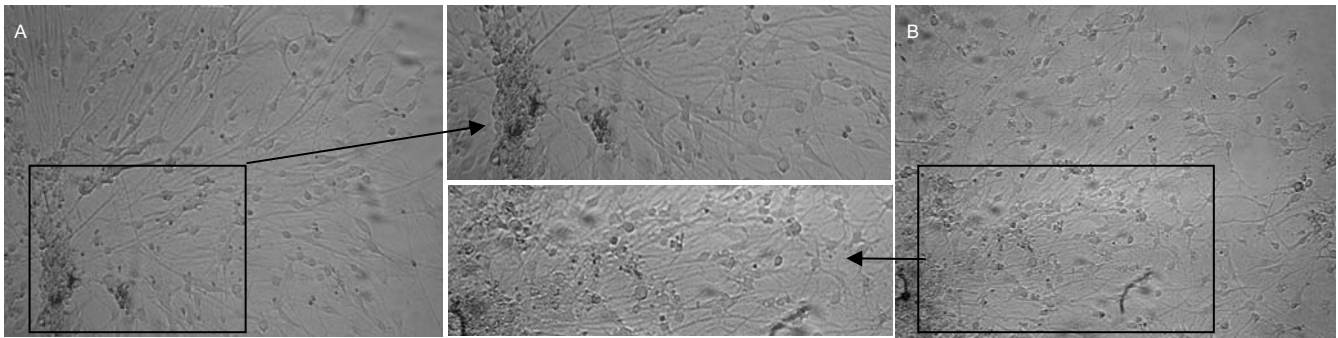


图2 神经干细胞贴壁分化5 d的细胞形态(倒置显微镜观察, $\times 200$)

Figure 2 The morphology of adherent neural stem cells after 5 days of differentiation (inverted microscope, $\times 200$)

图注: 图中A为空白对照组: 神经球均可贴壁, 折光性好; B为海人酸组: 贴壁分化5 d的细胞中星状细胞较多, 而神经样细胞相对较少。

表1 神经干细胞分化为神经元和胶质细胞比例

Table 1 The proportion of neurons and glial cells differentiated from neural stem cells in different groups ($\bar{x} \pm s, n=20, \%$)

组别	神经元	胶质细胞
空白对照组	23.07 \pm 1.51	76.93 \pm 1.51
100 μ mol/L 海人酸组	13.49 \pm 1.96 ^a	86.51 \pm 1.96 ^{ab}
500 μ mol/L 海人酸组	14.78 \pm 2.01 ^{ab}	85.22 \pm 2.01 ^a
1 mmol/L 海人酸组	14.24 \pm 1.68 ^a	85.76 \pm 1.68 ^a
2 mmol/L 海人酸组	13.89 \pm 2.09 ^a	86.11 \pm 2.09 ^a
4 mmol/L 海人酸组	13.53 \pm 2.60 ^a	86.47 \pm 2.60 ^a

表注: 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 100 μ mol/L 与 500 μ mol/L 海人酸组间比较, ^b $P < 0.05$ 。

表2 海人酸对神经干细胞增殖的影响

Table 2 The effect of kainic acid on the proliferation of neural stem cells ($\bar{x} \pm s, n=5, A$)

时间	空白对照组	海人酸组
2 d	0.131 \pm 0.013	0.104 \pm 0.011 ^a
3 d	0.147 \pm 0.012	0.135 \pm 0.009 ^a
4 d	0.165 \pm 0.010	0.159 \pm 0.014
5 d	0.188 \pm 0.013	0.184 \pm 0.010
6 d	0.194 \pm 0.011	0.183 \pm 0.010
7 d	0.209 \pm 0.014	0.191 \pm 0.016
8 d	0.217 \pm 0.012	0.209 \pm 0.014
9 d	0.211 \pm 0.014	0.213 \pm 0.012

表注: 可见海人酸组细胞分化较快, 从第4天起A值与空白对照组比较, 差异无显著性意义。与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$ 。

3 讨论 Discussion

神经干细胞就是指可自我更新并且可以分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的细胞^[15]。神经干细胞具有很强的增殖和分化能力, 它已在中枢神经组织损伤修复方面展示了不可估量的临床应用前景。但是, 目前有关神经干细胞的组织来源、定向诱导分化、移植技术和神经功能修复的功能判定等方面尚存在诸多难题^[16], 如何解决这些难题, 并建立一个适合于临床中枢神经损伤修复的神经干细胞移植治疗技术平台是非常迫切的问题。

神经生物学的重要进展之一是发现神经干细胞的存在, 它们在体外可以被生长因子诱导而增殖, 并保持分化成神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的潜能^[17], 移植后能在宿主的神经组织中生存、整合和分化, 并且基因转染后可表达外源基因产物, 科研工作者正试图从神经干细胞所具有的这些属性来探讨将神经干细胞作为中枢神经系统的发育、神经系统移植以及神经系统替代治疗的理想材料。神经干细胞之所以能在体内分裂、增殖并分化, 有赖于在发育过程中对其进行精确调控的某种时空模式, 当然, 这一过程也必然依赖于各种生长因子的协同作用。在神经干细胞的增殖分化过程中, 很多因子如转化生长因子、血小板衍生的生长因子、胶质细胞成熟因子等起着协同作用^[18]。同时, 细胞外基质对神经干细胞的作用也不容忽视。邓鑫等^[19]观察血管内皮生长因子165对大鼠海马神经干细胞增殖和分化的影响, 通过不同培养基的干预, 发现血管内皮生长因子165是神经干细胞增殖及分化的促进因素, 且可

能存在诱导神经干细胞向神经元分化的作用。张君度等^[20]观察胶质细胞源性神经营养因子对神经干细胞分化的影响, 通过胎鼠端脑进行神经干细胞体外培养, 结果发现胶质细胞源性神经营养因子能通过Mash-1的激活来诱导神经干细胞分化为更多的神经元, 并且此过程中bHLH转录因子表达有明显特异性, 将为日后进行神经干细胞定向分化的机制研究奠定基础。

实验培养的神经干细胞可增殖, 在连续传代培养后依然具有再次形成细胞克隆的能力, 即使在传代10代后仍然可形成神经干细胞球, 各代细胞球均可表达神经干细胞的特征性标志物巢蛋白, 经诱导分化后获得的细胞呈神经元特异性烯醇化酶、胶质纤维酸性蛋白、2, 3-环核苷酸磷酸二酯酶阳性, 表明细胞是神经干细胞。神经元特异性烯醇化酶、胶质纤维酸性蛋白、2, 3-环核苷酸磷酸二酯酶分别是神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞的特异性标志蛋白, 证明其具有多向分化潜能。本实验分离的细胞具有自我更新能力和多分化潜能, 是神经干细胞。

海人酸, 又名红藻氨酸, 在实验中模拟兴奋性氨基酸的毒性作用, 兴奋性氨基酸作为神经递质在脊椎动物中枢神经系统中分布广泛^[21-22], 缺血再灌注及痫性发作后, 脑内兴奋性氨基酸(EAA)将大量释放, 对神经细胞产生兴奋性毒性作用; 海人酸的毒性作用可能通过以下两种途径产生: 一是由于氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸受体

(AMPA-R)和海人酸受体(海人酸-R)过度兴奋所导致,以 Na^+ 内流为特征,可在数小时内发生,使神经细胞出现急性渗透性肿胀;二是神经细胞延迟性损伤,由N-甲基-D-天门冬氨酸受体(NMDA-R)过度兴奋所导致,以 Ca^{2+} 内流为特征,可在数小时至数日后发生,细胞内 Ca^{2+} 超载可能是EAA毒性作用的共同病理学机制^[23-26]。作者前期实验在神经干细胞分化时加不同剂量的海人酸和天麻素干预,MTT检测加入海人酸和天麻素后早期部分神经干细胞死亡,但可促进存活的神神经干细胞分化。实验结果说明了实验所分离细胞的可分化为神经元、少突胶质细胞和星形胶质细胞,是神经干细胞。海人酸可以诱导神经干细胞向胶质细胞分化。另外天麻素可在一定程度上减少海人酸兴奋性的影响,诱导神经干细胞向神经元分化。

本次实验结果发现:①神经干细胞在加入4 mmol/L的海人酸后仍有部分细胞存活,可继续贴壁生长,继续分化,对兴奋性氨基酸耐受能力显著强于神经元,既往研究证明神经元在100 $\mu\text{mol/L}$ 即出现细胞肿胀、大量死亡^[27],而神经干细胞在其50倍浓度时仍可存活。因此,实验推测,在由于EAA增多导致神经元死亡时,神经干细胞仍可幸存,并继续分化,参与神经功能的恢复。关于神经干细胞为什么对兴奋性氨基酸耐受较强的机制国内外文献尚未见报道,有待进一步研究。②海人酸浓度在100 $\mu\text{mol/L}$ -4 mmol/L时对神经干细胞分化有显著影响,所分化的胶质细胞的比例明显增加。Li等^[28]研究发现:在缺血再灌注时,Western blot显示神经干细胞分化为星形胶质细胞最多,神经元表达较少。也曾报道在神经干细胞缺血缺氧模型中,细胞的吸光度值下降,神经干细胞向神经元分化的百分率较正常对照组明显下降,而胶质细胞的比率,尤其是星形胶质细胞的比率明显增加。Panaqiotakos等^[29]也曾报道在遮蔽大鼠嗅球区后,再对其大脑进行25 Gy的放射治疗,结果发现:短时间内照射区域出现局灶性坏死,之后又出现脱髓鞘,而未照射嗅球区域则出现了短暂但惊人的代偿增生,增生细胞主要是星形胶质细胞。在正常微环境中,胶质细胞可分泌多种细胞因子和神经营养因子,这些因子在联系和维持神经元生存微环境中具有重要作用:①引导分化的神经元迁移:神经球贴壁分化后,因星形胶质细胞迁移速度较其他细胞快,可作为迁移的支架,引导分化的神经元进行迁移。②有利于细胞存活和分化:星形胶质细胞形成的微环境,既对神经干细胞的存活有利,又对其分化有促进作用,还有利于分化中的神经元的成熟与存活^[30-33]。但是,当脑损伤时,胶质细胞过度则增生,过度增生的胶质细胞可产生和释放肿瘤坏死因子和NO等神经毒性物质,加重损伤的发展,导致瘢痕形成^[34-35]。

实验中海人酸组细胞分化较空白对照组快,这可能是由于加入海人酸后许多神经干细胞死亡,其余的神经干细胞则代偿性分化较快,但是所分化的细胞中星形胶质细胞过多,神经元较少,不足以形成有效的神经网络。氨基酸

类递质参与神经干细胞分化的调控,调控干细胞的分化是神经干细胞研究的重要方向。实验应用了免疫荧光法、免疫组化法和MTT法和研究海人酸对神经干细胞分化和增殖的影响,结果提示:兴奋性氨基酸海人酸可使部分神经干细胞死亡,但可促进幸存的神经干细胞增殖及分化,并诱导其向星形胶质细胞分化,因此,将EAA作用通路阻断可能减轻神经干细胞的损伤,并且有利于神经干细胞向神经元方向分化,形成有效的神经网络,这为缺血性脑血管病、癫痫的治疗提供了新的方向,也为中枢神经系统变性疾病的治疗带来希望。

致谢: 感谢郑州大学第一附属医院神经内科实验室李京红老师对本实验给予的指导和帮助。

作者贡献: 第一作者进行实验设计并实施及成文,第四、第五作者进行实验评估,第二、第三作者负责资料收集,通讯作者审核,第一作者对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验已获郑州大学医学伦理委员会批准,实验过程中对动物的处置应符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 兴奋性氨基酸-是指具有2个羧基和1个氨基的酸性游离氨基酸包括谷氨酸、天门冬氨酸,是中枢神经系统的兴奋性神经递质,尤其谷氨酸是中枢神经系统含量最高、分布最广、作用最强的兴奋性神经递质。

作者声明: 文章为原创作品,无抄袭剽窃,无泄密及署名和专利争议,内容及数据真实,文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Nochi R, Kato T, Kaneko J, et al. Involvement of metabotropic glutamate receptor 5 signaling in activity-related proliferation of adult hippocampal neural stem cells. *Eur J Neurosci*. 2012; 36(3):2273-2283.
- [2] Bunk EC, König HG, Bonner HP, et al. NMDA-induced injury of mouse organotypic hippocampal slice cultures triggers delayed neuroblast proliferation in the dentate gyrus: an in vitro model for the study of neural precursor cell proliferation. *Brain Res*. 2010;1359:22-32.
- [3] Ciceroni C, Mosillo P, Mastrantoni E, et al. mGluR3 metabotropic glutamate receptors modulate the differentiation of SVZ-derived neural stem cells towards the astrocytic lineage. *Glia*. 2010;58(7):813-822.
- [4] Kantowitz JT, Javitt DC. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor dysfunction or dysregulation: the final common pathway on the road to schizophrenia? *Brain Res Bull*. 2010; 83(3-4):108-121.
- [5] Yamashita T, Ninomiya M, Hernandez Acosta P, et al. Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci*. 2006;26(24):6627-6636.
- [6] Tania Aguado, Eva Romero, Krisztina Monory, et al. The CB1 cannabinoid receptor mediates excitotoxicity-induced neural progenitor proliferation and neurogenesis. *Biol Chem*. 2007; 282:23892-23898.

- [7] Jin K, Minami M, Lan JQ, et al. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci*.2001;98: 4710-4715.
- [8] Jin K, Peel AL, Mao XO, et al. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(1):343-347.
- [9] Azami Tameh A, Clarner T, et al. Regional regulation of glutamate signaling during cuprizone-induced demyelination in the brain. *Ann Anat*. 2013;195(5):415-423.
- [10] Gu N, Jackson J, Goutagny R, et al. NMDA-dependent phase synchronization between septal and temporal CA3 hippocampal networks. *J Neurosci*. 2013;33(19):8276-8287.
- [11] Kim HJ, Kim TH, Choi SJ, et al. Fluoxetine suppresses synaptically induced $[Ca^{2+}]_i$ spikes and excitotoxicity in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res*. 2013;1490: 23-34.
- [12] Gibson CJ, Meyer RC, Hamm RJ. Traumatic brain injury and the effects of diazepam, diltiazem, and MK-801 on GABA-A receptor subunit expression in rat hippocampus. *J Biomed Sci*. 2010;17(1): 38.
- [13] Shacka JJ, Lu J, Xie ZL, et al. Kainic acid induces early and transient autophagic stress in mouse hippocampus. *Neurosci Lett*. 2007; 414(1):57-60.
- [14] Koga K, Sim SE, Chen T, et al. Kainate receptor-mediated synaptic transmissions in the adult rodent insular cortex. *J Neurophysiol*. 2012;108(7):1988-1998.
- [15] Meade AJ, Meloni BP, Mastaglia FL, et al. AP-1 inhibitory peptides attenuate in vitro cortical neuronal cell death induced by kainic acid. *Brain Res*. 2010;1360:8-16.
- [16] Sun Y, Jin K, Childs JT, et al. Vascular endothelial growth factor-B (VEGFB) stimulates neurogenesis: evidence from knockout mice and growth factor administration. *Dev Biol*. 2006;289(2):329-335.
- [17] Li Hua, Chen ZJ, Zhou SP. Apoptosis in glioma-bearing rats after neural stem cell transplantation. *Neural Regeneration Research*. 2013,8(19):1793-1802.
- [18] 张军,张琰君,贾云嶂,等. 碱性成纤维细胞生长因子对放射性诱导小鼠C17.2神经干细胞凋亡的影响[J]. *神经解剖学杂志*,2014, 30(1):98-102.
- [19] 邓鑫,宋来君,郭新宾. 血管内皮生长因子165对神经干细胞生长及分化的影响[J]. *中华脑科疾病与康复杂志(电子版)*,2013,3(3): 23-26.
- [20] 张君度,龙大宏,陈艳,等. 胶质细胞源性神经营养因子诱导神经干细胞分化过程中bHLH转录因子的表达变化[J]. *解剖学研究*, 2013, 35(6):427-430.
- [21] Sharma S, Rakoczy S, Dahlheimer K, et al. The hippocampus of Ames dwarf mice exhibits enhanced antioxidative defenses following kainic acid-induced oxidative stress. *Exp Gerontol*. 2010;45(12):936-949.
- [22] Spaethling J, Le L, Meaney DF. NMDA receptor mediated phosphorylation of GluR1 subunits contributes to the appearance of calcium-permeable AMPA receptors after mechanical stretch injury. *Neurobiol Dis*. 2012;46(3):646-654.
- [23] Lee KH, Cho JH, Choi IS, et al. Pregnenolone sulfate enhances spontaneous glutamate release by inducing presynaptic Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release. *Neuroscience*. 2010;171(1):106-116.
- [24] Santiago AR, Carvalho CM, Carvalho AP, et al. Differential contribution of L-, N-, and P/Q-type calcium channels to $[Ca^{2+}]_i$ changes evoked by kainate in hippocampal neurons. *Neurochem Res*. 2008;33(8):1501-1508.
- [25] Pilli J, Kumar SS. Triheteromeric N-methyl-D-aspartate receptors differentiate synaptic inputs onto pyramidal neurons in somatosensory cortex: involvement of the GluN3A subunit. *Neuroscience*. 2012;222:75-88.
- [26] Tsang SW, Vinters HV, Cummings JL, et al. Alterations in NMDA receptor subunit densities and ligand binding to glycine recognition sites are associated with chronic anxiety in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2008;29(10): 1524-1532.
- [27] Rangel A, Burgaya F, Gavín R, et al. Enhanced susceptibility of Prnp-deficient mice to kainate-induced seizures, neuronal apoptosis, and death: Role of AMPA/kainate receptors. *J Neurosci Res*. 2007 ;85(12):2741-2755.
- [28] Li Y, Chopp M. Temporal profile of nestin expression after focal cerebral ischemia in adult rat. *Brain Res*. 1999;838 (1-2): 1-10.
- [29] Panaqiatakos G, Alshamy G, Chan B, et al. Long-term impact of radiation on the stem cell and oligodendrocyte precursors in the brain. *PLoS ONE*. 2007;2(7): e588.
- [30] Ruocco LA, Gironi Carnevale UA, Sica A, et al. Differential prepuberal handling modifies behaviour and excitatory amino acids in the forebrain of the Naples High-Excitability rats. *Behav Brain Res*. 2009;198(1):29-36.
- [31] Daadi MM, Davis AS, Arac A, et al. Human neural stem cell grafts modify microglial response and enhance axonal sprouting in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Stroke*. 2010;41(3):516-523.
- [32] Csoknya M, Dénes V, Wilhelm M. Glial cells in the central nervous system of earthworm, *Eisenia fetida*. *Acta Biol Hung*. 2012;63 Suppl 1:114-128.
- [33] Sivakumar V, Ling EA, Lu J, et al. Role of glutamate and its receptors and insulin-like growth factors in hypoxia induced periventricular white matter injury. *Glia*. 2010;58(5):507-523.
- [34] Park DH, Eve DJ, Sanberg PR, et al. Increased neuronal proliferation in the dentate gyrus of aged rats following neural stem cell implantation. *Stem Cells Dev*.2010;19(2):175-180.
- [35] Daadi MM, Davis AS, Arac A, et al. Human neural stem cell grafts modify microglial response and enhance axonal sprouting in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Stroke*. 2010 ;41(3):516-523.