

星形胶质细胞纤维生长和突触形成的方向性和特异性

曹敬丽, 李奇, 王雅杰(首都医科大学附属北京天坛医院, 临床医学研究实验室, 北京市 100050)

文章亮点:

- 1 文章采用绿色荧光蛋白转基因小鼠作原代细胞培养, 该转基因小鼠的细胞可自发表达绿色荧光蛋白, 辅以胶原纤维酸性蛋白荧光免疫组化, 便于在共聚焦显微镜下观察星形胶质细胞和其他细胞的相互作用关系, 有望为神经修复学治疗提供新视角。
- 2 实验发现, 海马原代培养的细胞包含胶原纤维酸性蛋白阳性的星形胶质细胞和胶原纤维酸性蛋白阴性的锥体细胞等, 星形胶质细胞在胞体周围向外伸出多个突起, 个别突起特异性地伸向远端的锥体细胞, 并终止于锥体细胞的胞体形成突触样结构。
- 3 在星形胶质细胞伸长的突起中, 并不是所有的突起都伸向同一个锥体细胞, 亦不是所有的突起都伸向有细胞的方向, 说明突起的伸长具有方向性, 亦具有特异性。
- 4 在突触样结构的形成中, 并不是纤维突起所接触到其他细胞的所有位置都形成突触末梢, 而是呈现出一定的方向性和特异性。

关键词:

组织构建; 组织工程; 绿色荧光蛋白; 胶原纤维酸性蛋白; 星形胶质细胞; 突触; 血-脑屏障; 锥体细胞; 突起; 海马; 信号传导; 原代细胞; 国家自然科学基金

主题词:

星形细胞; 突触; 信号传导; 绿色荧光蛋白类

基金资助:

国家自然科学基金(81303268, 81572474); 北京市自然科学基金(7132094, 7152098, 7144209)

摘要

背景: 星形胶质细胞除了被动地起代谢和结构支持的作用外, 还能够以更复杂的方式与神经元相互作用, 主动地参与中枢神经系统的信息处理。

目的: 通过观察星形胶质细胞纤维生长和突触形成的方向性和特异性, 探索星形胶质细胞在与神经元相互作用中的可能机制。

方法: 取新生 24 h 内绿色荧光蛋白转基因小鼠, 以原代细胞分离培养和爬片方法获得海马原代细胞, 以胶原纤维酸性蛋白荧光免疫组化方法特异性标记星形胶质细胞, 在共聚焦显微镜下观察结果。

结果与结论: 星形胶质细胞纤维向距离较远的锥体细胞定向伸长, 并且终止于锥体细胞的胞体, 末端与锥体细胞的胞体形成突触样结构; 而且并不是所有的突起都伸向临近的细胞, 其突触样结构的形成也不全是在最临近的位点。表明星形胶质细胞纤维伸长和突触形成具有方向性和特异性, 为进一步探索星形胶质细胞与锥体细胞之间的信号传导提供依据。

曹敬丽, 李奇, 王雅杰. 星形胶质细胞纤维生长和突触形成的方向性和特异性[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(45):6787-6792.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.42.012

Directional and specific characteristics of astrocyte fiber growth and synapse formation

Cao Jing-li, Li Qi, Wang Ya-jie (Laboratory of Clinical Medical Research, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China)

Abstract

BACKGROUND: Studies have shown that astrocytes participate not only in the passive metabolic and structural support, but also actively in the central nervous system information processing.

OBJECTIVE: By observing the directionality and specificity of astrocyte fiber growth and synapse formation, to explore the possible mechanisms of astrocytes and neurons in the interaction.

METHODS: Primary cells from the hippocampi of green fluorescent protein transgenic newborn mice were isolated and cultured, glial fibrillary acidic protein was used as specific marker for astrocytes in immunofluorescence staining, and then the results were observed and scanned by confocal microscope.

RESULTS AND CONCLUSION: The elongation of astrocyte fibers was directional and specific, and terminated to the pyramidal cells nearby. The end of astrocyte fibers and pyramidal cells contributed to the synapse formation. However, not all the projections were toward the adjacent cells, and synapse-like structure was not only

曹敬丽, 女, 1979 年生, 山东省曲阜市人, 汉族, 2014 年清华大学&北京协和医学院毕业, 博士, 助理研究员, 主要从事脑血管结构、功能异常及相关疾病的应用基础研究。

通讯作者: 王雅杰, 博士, 主任医师, 硕士生导师, 首都医科大学附属北京天坛医院, 临床医学研究实验室, 北京市 100050

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2015)42-06787-06

稿件接受: 2015-09-08

http://www.crter.org

Cao Jing-li, M.D., Assistant researcher, Laboratory of Clinical Medical Research, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

Corresponding author: Wang Ya-jie, M.D., Chief physician, Master's supervisor, Laboratory of Clinical Medical Research, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

Accepted: 2015-09-08

formed nearby. The results implicated that both astrocytes fiber elongation and synapse formation have the directionality and specificity, providing evidence for further studies on signal transduction between astrocytes and pyramidal cells.

Subject headings: Astrocytes; Synapses; Signal Transduction; Green Fluorescent Proteins

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81303268, 81572474; the Natural Science Foundation of Beijing, No. 7132094, 7152098, 7144209

Cao JL, Li Q, Wang YJ. Directional and specific characteristics of astrocyte fiber growth and synapse formation. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(45):6787-6792.

0 引言 Introduction

星形胶质细胞是脑组织内数量最多和分布最广的神经胶质细胞, 其对神经元的发育和迁移、突触的形成、递质的代谢以及神经元内、外环境稳态的调控等都起着十分重要的作用^[1-5]。脑组织超微结构显示, 星形胶质细胞介于毛细血管内皮细胞与神经元之间, 星形胶质细胞的突起参与构成血-脑屏障^[6]。因此, 血液中的外来化学物质必须通过星形胶质细胞才能进入神经元^[7]。研究结果显示, 海马等脑区的突触可被星形胶质细胞突起紧紧包绕, 与突触前、后膜共同形成突触三联体结构(Tripartite synapse)^[8]。星形胶质细胞通过分泌胶质源性神经调质影响突触前膜神经递质的释放和突触后膜的受体反应, 进而改变突触传递的效率, 调控突触可塑性^[9-10]。很多体内外实验发现星形胶质细胞可通过胶质源性的因子如谷氨酸、ATP、肿瘤坏死因子 α 、D-丝氨酸和胆固醇等调节突触的发生、活性及可塑性^[11-13]。

在生理和病理状态下, 星形胶质细胞对维持中枢神经系统细胞内外环境和细胞与细胞之间信号的传递发挥着多重作用。一般认为, 其功能具有如下几个方面: 星形胶质细胞作为谷氨酸及 γ -氨基丁酸代谢的关键部位^[14-15], 能控制神经递质的摄取和释放^[4, 16], 缓冲胞外离子浓度^[17], 调节离子稳态; 可与神经元形成突触联系^[18], 并且存在多种受体与接收多种物质的调控, 因此能处理和传递突触的信息^[19]; 抗氧化应激^[20], 从而影响局部的血液供应, 并且作为脑中惟一具有糖原储备能力的细胞^[21], 可以直接供给神经元氧化磷酸化所需的底物, 从而对抗能量代谢障碍所引起的神经元损伤^[22]。

最近二十几年的研究表明, 星形胶质细胞除了被动地起代谢和结构支持的作用外, 还能够以更复杂的方式与神经元相互作用, 主动地参与中枢神经系统的信息处理, 近期更有研究指出, 星形胶质细胞不但能包绕突触, 被动地调节突触功能, 而且亦能主动参与中枢神经系统的信息处理^[23]。近十几年来, 神经修复学研究逐渐渗透到神经变性疾病、脑缺血疾病康复治疗等领域。相应地, 一些潜在的有效细胞治疗已逐渐被验证, 比如神经干细胞、胚胎来源细胞等^[24-25]。

研究表明, 在脊髓损伤后进行星形胶质细胞移植能有效促进创面愈合, 并能在形态上促进运动神经元修复, 以及在功能上促进机体自发电位和诱发电位发生^[26]。以干细胞和前体细胞联合移植修复星形胶质细胞功能有望治疗脊髓损伤^[27]。亦有研究表明星形胶质细胞移植可修复损伤后

的记忆功能, 该修复作用独立于胆碱能神经元的再生而存在^[28]。另外, 星形胶质细胞可通过VAV2信号通路抑制许旺细胞的迁移^[29]。这说明星形胶质细胞在神经修复领域与其他细胞间的相互作用有许多潜在的作用机制亟待深入探索, 其中, 关于星形胶质细胞纤维生长和突触形成的方向性和特异性, 尚缺乏直观的依据。

本实验拟采用单细胞培养方法, 观察星形胶质细胞纤维生长和突触形成的方向性和特异性, 为神经修复学研究提供实验依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 实验动物及材料 购买6-8周龄雄性绿色荧光蛋白转基因阳性小鼠和雌性普通ICR小鼠(购自上海斯莱克实验动物有限公司, 动物合格证号: 沪ICP备14053905号), 于SPF级动物房内饲养2周使小鼠适应新的环境, 然后1:1将绿色荧光蛋白雄小鼠和ICR雌小鼠合笼, 合笼后定期检孕, 待确定雌鼠怀孕后将雄鼠提走, 留孕鼠单只单笼饲养等待生育。确定怀孕后每天早、晚各检查1次, 以便及时发现生育现象。待雌鼠分娩后, 在倒置荧光显微镜下鉴定出绿色荧光蛋白阳性的子鼠。动物实验已经过首都医科大学附属北京天坛医院动物伦理学委员会批准。

星形胶质细胞培养使用的主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
DMEM/F12 培养基、青-链霉素、Tysine-EDTA、美国 Hyclone 公司胎牛血清	美国 Hyclone 公司
兔抗小鼠胶质原纤维酸性蛋白抗体	美国 Sigma 公司
罗丹明(激发波长 543 nm)标记的山羊抗兔二抗, 封闭用山羊血清及通透所用 Triton-100, 抗淬灭封片剂(不含 DAPI)和盖玻片, PBS	北京中杉金桥生物技术有限公司
Hoechst	Roche 集团中国分公司
多聚甲醛	国药集团
倒置荧光显微镜, 解剖显微镜	LEICA 公司
共聚焦显微镜	德国蔡司公司

1.2 细胞的分离和培养 取绿色荧光蛋白阳性的子鼠, 于出生24 h内做原代细胞培养。原代细胞培养时, 先将子鼠浸泡在碘伏里片刻以便充分消毒, 然后经体积分数75%的乙醇脱碘, 佩戴无菌手套, 在无菌操作下, 于超净工作台

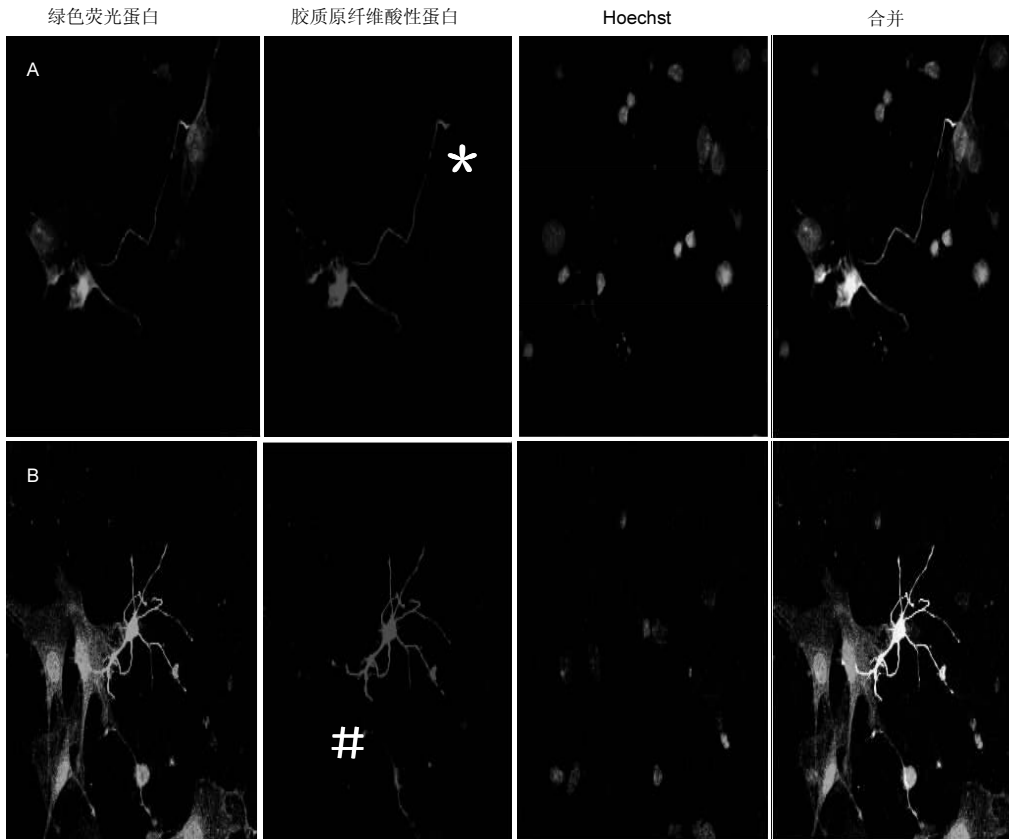


图 1 星形胶质细胞的鉴定(荧光免疫组化, $\times 40$)

Figure 1 Identification of astrocytes (immunofluorescence, $\times 40$)

图注: 图中绿色荧光蛋白为绿色荧光蛋白转基因小鼠来源的细胞内源性绿色荧光, 反应细胞的存活和突起生长状况; 胶原纤维酸性蛋白为星形胶质细胞的特异性标记物, 阳性表示该细胞为星形胶质细胞; Hoechst 标记细胞核; Merged 为绿色荧光蛋白、胶原纤维酸性蛋白和 Hoechst 合并在一起。图中 A 为星形胶质细胞纤维向距离较远的锥体细胞定向伸长, 并且终止于锥体细胞的胞体, 末端与锥体细胞的胞体形成突触样结构(*), 说明星形胶质细胞纤维伸长具有方向性和特异性; B 为星形胶质细胞并不是所有的突起都伸向临近的细胞, 其突触样结构的形成也不是在最临近的位点, 而是绕过胞体在特定的位点形成突触样结构(#), 说明星形胶质细胞与其他细胞突触的形成亦具有方向性和特异性。

内用无菌组织剪将消毒后的小鼠断头, 分别用 2 把无菌眼科剪依次剪开头皮和颅骨, 以无菌纤维镊钝性分离双侧海马, 取出, 在解剖显微镜下剥离表面结缔组织膜。另取一把无菌眼科剪剪碎组织, 并用 DMEM/F12 培养基洗涤两三遍, 将剪碎的组织块用 0.25% 的胰酶 37°C 消化 3 次, 每次 5 min, 辅以吹打方法使成为散在的细胞。收集每轮消化后的单个细胞, 以含血清培养基适时终止, 将收集的单细胞以含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 (1:1) 悬浮, 调节细胞浓度至 $5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 吹打混匀, 以每孔 0.5 mL 的量接种于多聚赖氨酸包被好的 24 孔培养板, 于 37°C 体积分数 5% CO_2 培养箱内培养。培养第 2 天, 待大部分细胞都贴壁后, 给细胞全量换液 1 次, 以后每隔 2 d 换一次液。

1.3 细胞爬片 双手戴无菌手套, 取 24 孔板, 将外表喷洒体积分数 75% 乙醇消毒, 于紫外消毒后的超净工作台内, 轻轻撕开包装, 将 24 孔板取出, 置于超净工作台上, 全程注意勿使孔板的盖张开来避免污染。点燃酒精灯, 于超净工作台内, 无菌操作下, 将 24 孔无菌培养板内铺上 $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ 无菌盖玻片, 以多聚赖氨酸包被, 将消化后的单细胞用含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 (1:1) 悬浮, 调节细

胞浓度至 $0.5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 吹打混匀, 以每孔 0.5 mL 接种于 24 孔培养板进行细胞爬片。爬片的细胞经 40 g/L 无菌多聚甲醛固定, 0.01 mol/L 无菌 PBS 洗 3 遍备细胞免疫组化用。单细胞悬液接种在 24 孔板上之后, 于普通光学显微镜下观察细胞状态。

1.4 细胞免疫组化 将待染色的细胞爬片置于 24 孔板中, 每孔放一张细胞爬片, 细胞面朝上。待细胞培养结束后, 吸掉培养基, 以 0.01 mol/L PBS 洗 3 次, 用 40 g/L 多聚甲醛室温固定 10 min, 再以 0.01 mol/L PBS 洗 3 遍, 以含 10% 山羊血清的 PBST (含 0.3% Triton-100 的 0.01 mol/L PBS) 室温封闭 30 min, 吸掉封闭液, 滴加胶原纤维酸性蛋白一抗工作液 (1:200), 4°C 孵育过夜, 然后室温复温 30 min, 0.01 mol/L PBS 洗 3 次, 再滴加罗丹明标记的山羊抗小鼠二抗工作液 (1:400), 室温孵育 30 min, 0.01 mol/L PBS 洗 3 次, hoechst 染核 (1:1 000) 室温 3 min, 0.01 mol/L PBS 洗 3 遍, 向粘附载玻片上滴加一小滴抗淬灭剂, 将染色后的细胞爬片封固在载玻片上完成封片。然后于共聚焦显微镜下观察并扫描结果。

1.5 主要观察指标 星形胶质细胞纤维生长和突触形成。

2 结果 Results

2.1 细胞形态 光学显微镜下可见, 散在单个细胞漂浮于培养液中, 圆形, 周边有光晕, 遮光性好, 提示细胞状态良好。接种片刻之后, 多数细胞已沉至孔板底, 尚未贴壁。细胞贴壁后, 在胞体周边开始向外伸出突起, 呈贴壁性生长。

2.2 细胞鉴定 共聚焦显微镜结果显示, 在贴壁的细胞中, 既有胶质原纤维酸性蛋白阳性的星形胶质细胞, 亦有胶质原纤维酸性蛋白阴性的锥体细胞, 也有胶质原纤维酸性蛋白阴性的其他形态细胞(图1)。对于胶质原纤维酸性蛋白阴性的细胞, 单凭细胞形态尚不足以确定细胞类型, 但在本实验目的是观察星形胶质细胞的纤维生长和突触形成, 暂未对胶质原纤维酸性蛋白阴性的细胞做特异性鉴定。

2.3 星形胶质细胞纤维生长的方向性 荧光免疫组化结果显示, 星形胶质细胞从胞体到突起直至突起的末梢均有较强的胶质原纤维酸性蛋白表达, 通过示踪和观察胶质原纤维酸性蛋白, 可清晰地看到星形胶质细胞的纤维均发自胞体, 并沿着与胞体相反的方向伸长、生长。有的纤维中途又伸出分支, 各分支继续向远端伸长、生长。而且, 各分支间无重合、无重叠, 亦非杂乱、无序地伸长和生长。图1可见部分细胞末梢形成突触样结构。表明星形胶质细胞不仅富含星状排布的纤维状突起, 而且每个突起的伸长和生长都有相应的方向性。形成该方向性的确切机制尚有待进一步深入研究。

2.4 星形胶质细胞纤维生长的特异性 从图1可以看出, 星形胶质细胞突起的纤维向外生长, 每条纤维生长的方向各不相同。说明每条纤维各自执行的功能亦或许有差异。也就是说, 星形胶质细胞每条纤维的生长均具有特异性。

2.5 星形胶质细胞突触形成的方向性 从图1可以看出, 星形胶质细胞的纤维末梢可终止于其他细胞形成突触样结构。该突触样结构可以像触手样搭在锥体细胞的胞体上(图1A), 亦可以绕过中途的细胞伸向更远的细胞, 或者绕过胞体环绕半圈在胞体的另一侧形成突触样结构(图1B), 该突触样结构有的终止于锥体细胞的胞体, 有的终止于胶质原纤维酸性蛋白阴性的其他细胞胞体, 有的则终止于胶质原纤维酸性蛋白阴性的某些细胞的突起, 即便中途遇到某些细胞, 仍不影响其伸向“靶”细胞, 仿佛每个突触都携带着某个“使命”, 直到最终达成目的, 实施功能。说明伴随着星形胶质细胞每条纤维的方向性, 其末梢突触的形成亦具有特定的方向性。

2.6 星形胶质细胞突触形成的特异性 从图1可以看出, 在星形胶质细胞的各突起末梢突触样结构形成的过程中, 其位点显示出特异性, 即突触样结构的形成是有选择性的。有的地方, 虽然星形胶质细胞的纤维到达了别的细胞, 但其末梢并没有因此立即形成突触样结构, 而是特异性地绕过该细胞的底面, 在对侧形成突触样接触(图1B)。有的突触样结构也不是沿着纤维生长的方向直接形成的, 而是在

星形胶质细胞纤维生长到一定程度后, 仿佛受到了某个“召唤”, 突然拐弯而形成的(图1A)。综合实验结果, 星形胶质细胞纤维末梢突触样结构的形成并不总是就近形成, 亦不总是针对某一种细胞, 而是分别在特定的细胞和特定的位点恰如其分地形成突触样结构, 仿佛每个突触样结构都会随着各自纤维的特异性而特异性的形成, 进而执行各自独特的功能, 这说明星形胶质细胞纤维末梢突触结构的形成是有特异性的。关于该特异性形成的原因尚有待进一步研究。

3 讨论 Discussion

本实验所取实验动物为绿色荧光蛋白转基因小鼠, 该小鼠携带绿色荧光蛋白基因, 存活状态下可自发表达绿色荧光蛋白, 取该动物的组织做细胞原代培养, 可直接在荧光显微镜下观察到细胞呈现绿色荧光蛋白阳性, 一方面便于观察细胞生长状况和纤维突起生长状况, 另一方面在共聚焦显微镜拍摄照片的时候, 可以直接通过488 nm激光激发拍摄细胞照片, 省去了一个免疫组化的指标, 再辅以胶质原纤维酸性蛋白的免疫荧光, 即可在共聚焦显微镜下拍摄胶质原纤维酸性蛋白阳性的星形胶质细胞(543 nm激光器激发)和胶质原纤维酸性蛋白阴性的绿色荧光细胞, 便于观察两种细胞之间的相互作用关系。

培养的细胞贴壁之后可于光学显微镜下观察, 普通光学显微镜只能看到细胞的生长形态, 仅凭光学形态无法精确地判断细胞类型。为了区分出星形胶质细胞, 作者选择荧光免疫组化方法, 以星形胶质细胞的特异性marker标记出星形胶质细胞, 最终, 在共聚焦显微镜下观察和扫描结果。经共聚焦显微镜扫描, 以激光器488 nm激发后可见所有贴壁的细胞均表达绿色荧光, 以激光器543 nm激发后可见星形胶质细胞均被染成了红色, 然后以405 nm激光器激发hoechst使蓝色细胞核显现。

早在1856年人们就了解到了胶质细胞的存在, 但直到19世纪末通过Golgi染色人们才能够清晰的观察到它的形态^[30]。典型的星形胶质细胞一般有5-8个主要的突起^[31-32], 有的突起再发出细的分支, 分支通常呈随意性、多形态方式生长。每个突起被称为一个“微功能区”^[33], 它们都含有很多线粒体^[34], 具有代谢独立性的特性。通常, 这些微功能区环绕在单个或者多个突触的周围^[35-36], 因此一个微功能区可以独立于所属细胞的其它部分而与突触相互作用^[37]。

本实验发现, 这“微功能区”能够特异性地向距离较远的锥体细胞伸长、生长, 但又不是所有的“微功能区”都向该锥体细胞伸长、生长。相应地, 每一个“微功能区”都有各自独特的生长方向和“靶”细胞, 这说明星形胶质细胞的纤维生长具有鲜明的方向性, 该方向性有望为神经修复学研究提供新思路。关于该方向性形成的机制尚有待进一步研究。本实验亦发现各“微功能区”分别有各自独

特的“靶”细胞,各自分别伸向各自的靶细胞,中途并不紊乱,也不相互重叠,这说明星形胶质细胞的各纤维状突起的生长具有特异性,该特异性的发现有望为神经修复学研究提供新线索。但关于该特异性形成的原因以及星形胶质细胞各纤维状突起同其“靶”细胞间的信号传导有待进一步深入研究。

突触是神经细胞之间进行信息交流的重要结构基础^[38-39],它可以通过释放神经递质进行细胞间的信息传递^[40],其可塑性对脑的学习记忆功能非常重要^[41]。传统的观念认为,神经元突触主要由突触前成分和突触后成分组成,两者之间借突触间隙隔开^[42-43]。近年来,由于观察到位于突触周围的胶质细胞突起在调节突触部位递质的释放和摄取过程中起着重要作用,提出了神经元之间的突触是一种三联复合体结构的新观点,即突触由突触前成分、突触后成分以及在其周围与之密切相关的胶质细胞三者共同构成^[44]。本实验发现,在低浓度单细胞培养条件下,星形胶质细胞的纤维末梢可以直接伸向远端的锥体细胞,并终止于锥体细胞的胞体形成突触样结构,在该突触样结构形成的位点,并未发现第三方细胞。这说明星形胶质细胞的纤维末梢可以直接和其他细胞形成突触,区别于先前文献中描述的包绕在突触周围,这一发现有望为神经修复学研究提供新视角。另外,星形胶质细胞纤维末梢在突触样结构的形成过程中,突触结构的形成有着方向性和特异性,该方向性和特异性的形成有望为神经修复学研究提供新思路,关于该方向性和特异性形成的原因以及突触间信息传递及功能,尚有待进一步研究。

作者贡献: 曹敬丽完成资料收集、实验设计、实验实施、结果采集、文稿撰写,王雅杰参与实验设计把关和指导、文稿修改及经费支持,李奇协助细胞培养及经费支持。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

学术术语: 典型的星形胶质细胞的特征? 一般有5-8个主要的突起,在单细胞培养中,各突起呈纤维状向外生长,亦呈纤维突起或纤维。有的突起再发出细的分支,分支通常呈随意性、多形态方式。每个突起及分支的末端被称为末梢。末梢与其它细胞接触后形成的结构为突触样,俗称突触。

作者声明: 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

4 参考文献 References

- [1] Pirooznia SK, Dawson VL, Dawson TM. Motor neuron death in ALS: programmed by astrocytes? *Neuron*. 2014;81(5):961-963.
- [2] Zhao C, Du H, Xu L, et al. Metabolomic analysis revealed glycyglycine accumulation in astrocytes after methionine enkephalin administration exhibiting neuron protective effects. *J Pharm Biomed Anal*. 2015;115:48-54.
- [3] Wang X, Lippi G, Carlson DM, et al. Activation of $\alpha 7$ -containing nicotinic receptors on astrocytes triggers AMPA receptor recruitment to glutamatergic synapses. *J Neurochem*. 2013;127(5):632-643.
- [4] Calvetti D, Somersalo E. Ménage à trois: the role of neurotransmitters in the energy metabolism of astrocytes, glutamatergic, and GABAergic neurons. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012;32(8):1472-1483.
- [5] Yang X, Sheng W, Ridgley DM, et al. Astrocytes regulate α -secretase-cleaved soluble amyloid precursor protein secretion in neuronal cells: Involvement of group IIA secretory phospholipase A2. *Neuroscience*. 2015;300:508-517.
- [6] Thomsen LB, Burkhart A, Moos T. A Triple Culture Model of the Blood-Brain Barrier Using Porcine Brain Endothelial cells, Astrocytes and Pericytes. *PLoS One*. 2015;10(8):e0134765.
- [7] Yao H, Wang T, Deng J, et al. The development of blood-retinal barrier during the interaction of astrocytes with vascular wall cells. *Neural Regen Res*. 2014;9(10):1047-1054.
- [8] Romero IA, Ray DE, Chan MW, et al. An in vitro study of m-dinitrobenzene toxicity on the cellular components of the blood-brain barrier, astrocytes and endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1996;139(1):94-101.
- [9] Kim H, Lee BH, Choi SH, et al. Gintonin stimulates gliotransmitter release in cortical primary astrocytes. *Neurosci Lett*. 2015;603:19-24.
- [10] Dal Prà I, Chiarini A, Armato U. Antagonizing amyloid- β /calcium-sensing receptor signaling in human astrocytes and neurons: a key to halt Alzheimer's disease progression? *Neural Regen Res*. 2015;10(2):213-218.
- [11] Lalo U, Rasooli-Nejad S, Pankratov Y. Exocytosis of gliotransmitters from cortical astrocytes: implications for synaptic plasticity and aging. *Biochem Soc Trans*. 2014;42(5):1275-1281.
- [12] Xing L, Li X, Snider WD. Neurodevelopment. "RASopathic" astrocytes constrain neural plasticity. *Science*. 2015;348(6235):636-637.
- [13] Wu KC, Kuo CS, Chao CC, et al. Role of voltage-gated K(+) channels in regulating Ca(2+) entry in rat cortical astrocytes. *J Physiol Sci*. 2015;65(2):171-177.
- [14] Sweeney A, Rodriguez MF, Scimemi A. 64 A novel role for astrocytes in regulating glutamate clearance during stroke. *J Biomol Struct Dyn*. 2015;33 Suppl 1:42-43.
- [15] Reyes-Haro D, Cabrera-Ruiz E, Estrada-Mondragón A, et al. Modulation of GABA-A receptors of astrocytes and STC-1 cells by taurine structural analogs. *Amino Acids*. 2014;46(11):2587-2593.
- [16] James LR, Andrews S, Walker S, et al. High-throughput analysis of calcium signalling kinetics in astrocytes stimulated with different neurotransmitters. *PLoS One*. 2011;6(10):e26889.
- [17] Barres BA, Chun LL, Corey DP. Calcium current in cortical astrocytes: induction by cAMP and neurotransmitters and permissive effect of serum factors. *J Neurosci*. 1989;9(9):3169-3175.
- [18] Codazzi F, Pelizzoni I, Zacchetti D, et al. Iron entry in neurons and astrocytes: a link with synaptic activity. *Front Mol Neurosci*. 2015;8:18.
- [19] Covelo A, Araque A. Lateral regulation of synaptic transmission by astrocytes. *Neuroscience*. 2015. in press.

- [20] Liu Y, Zeng X, Hui Y, et al. Activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors protects astrocytes against oxidative stress-induced apoptosis: implications for Parkinson's disease. *Neuropharmacology*. 2015;91:87-96.
- [21] Dienel GA. The metabolic trinity, glucose-glycogen-lactate, links astrocytes and neurons in brain energetics, signaling, memory, and gene expression. *Neurosci Lett*. 2015. in press.
- [22] Yang Y, Yeo CK. Conceptual Network Model From Sensory Neurons to Astrocytes of the Human Nervous System. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2015;62(7):1843-1852.
- [23] Zeis T, Allaman I, Gentner M, et al. Metabolic gene expression changes in astrocytes in Multiple Sclerosis cerebral cortex are indicative of immune-mediated signaling. *Brain Behav Immun*. 2015;48:313-325.
- [24] Akesson E, Wolmer-Solberg N, Cederarv M, et al. Human neural stem cells and astrocytes, but not neurons, suppress an allogeneic lymphocyte response. *Stem Cell Res*. 2009;2(1):56-67.
- [25] Uzzaman M, Benveniste RJ, Keller G, et al. Embryonic stem cell-derived astrocytes: a novel gene therapy vector for brain tumors. *Neurosurg Focus*. 2005;19(3):E6.
- [26] Li K, Javed E, Scura D, et al. Human iPS cell-derived astrocyte transplants preserve respiratory function after spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2015;271:479-492.
- [27] Falnikar A, Li K, Lepore AC. Therapeutically targeting astrocytes with stem and progenitor cell transplantation following traumatic spinal cord injury. *Brain Res*. 2015;1619:91-103.
- [28] Bradbury EJ, Kershaw TR, Marchbanks RM, et al. Astrocyte transplants alleviate lesion induced memory deficits independently of cholinergic recovery. *Neuroscience*. 1995;65(4):955-972.
- [29] Afshari FT, Kwok JC, Fawcett JW. Astrocyte-produced ephrins inhibit schwann cell migration via VAV2 signaling. *J Neurosci*. 2010;30(12):4246-4255.
- [30] Zhu J, Yan J, Thornhill WB. The Kv1.3 potassium channel is localized to the cis-Golgi and Kv1.6 is localized to the endoplasmic reticulum in rat astrocytes. *FEBS J*. 2014;281(15):3433-3445.
- [31] Risher WC, Patel S, Kim IH, et al. Astrocytes refine cortical connectivity at dendritic spines. *Elife*. 2014;3.
- [32] Cano V, Valladolid-Acebes I, Hernández-Nuño F, et al. Morphological changes in glial fibrillary acidic protein immunopositive astrocytes in the hippocampus of dietary-induced obese mice. *Neuroreport*. 2014. in press.
- [33] Mack AF, Wolburg H. Growing axons in fish optic nerve are accompanied by astrocytes interconnected by tight junctions. *Brain Res*. 2006;1103(1):25-31.
- [34] Burdett TC, Freeman MR. Neuroscience. Astrocytes eyeball axonal mitochondria. *Science*. 2014;345(6195):385-386.
- [35] Görg B, Karababa A, Shafiqullina A, et al. Ammonia-induced senescence in cultured rat astrocytes and in human cerebral cortex in hepatic encephalopathy. *Glia*. 2015;63(1):37-50.
- [36] Benjamin Kacerovsky J, Murai KK. Stargazing: Monitoring subcellular dynamics of brain astrocytes. *Neuroscience*. 2015. in press.
- [37] Wilcox KS, Gee JM, Gibbons MB, et al. Altered structure and function of astrocytes following status epilepticus. *Epilepsy Behav*. 2015;49:17-19.
- [38] Kaczor P, Rakus D, Mozrzymas JW. Neuron-astrocyte interaction enhance GABAergic synaptic transmission in a manner dependent on key metabolic enzymes. *Front Cell Neurosci*. 2015;9:120.
- [39] Huang Y, Lu MG, Guo WT, et al. Thrombospondin 1 promotes synaptic formation in bone marrow-derived neuron-like cells. *Neural Regen Res*. 2013;8(10):869-881.
- [40] Liu H, Zhou B, Yan W, et al. Astrocyte-like glial cells physiologically regulate olfactory processing through the modification of ORN-PN synaptic strength in *Drosophila*. *Eur J Neurosci*. 2014;40(5):2744-2754.
- [41] Miguez A, García-Díaz Barriga G, Brito V, et al. Fingolimod (FTY720) enhances hippocampal synaptic plasticity and memory in Huntington's disease by preventing p75NTR up-regulation and astrocyte-mediated inflammation. *Hum Mol Genet*. 2015;24(17):4958-4970.
- [42] Tatti R, Maffei A. Synaptic dynamics: how network activity affects neuron communication. *Curr Biol*. 2015;25(7):R278-280.
- [43] Tucker KR, Block ER, Levitan ES. Action potentials and amphetamine release antipsychotic drug from dopamine neuron synaptic VMAT vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(32):E4485-4494.
- [44] Tao-Cheng JH, Pham A, Yang Y, et al. Syntaxin 4 is concentrated on plasma membrane of astrocytes. *Neuroscience*. 2015;286:264-271.