

丙戊酸影响神经干细胞体外分化的量效和时效关系*

王莉 伍亚民[△] 刘媛 南国新 龙在云

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所三室 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室 重庆 400042)

摘要 目的 研究丙戊酸(VPA)浓度和干预时间对神经干细胞(NSCs)体外分化的影响。方法 以不同浓度的 VPA(0.1、0.3、0.5、0.75 和 1.0mmol/L)处理原代培养的神经干细胞,以 NB 培养基组做对照,分别于神经干细胞分化后 3 天、7 天、10 天和 14 天用免疫荧光双标鉴定并计数 微管蛋白 -III (β -tubulin III) 和胶质原纤维酸性蛋白 (GFAP) 阳性细胞的比例,并作统计学分析。结果 同一时相点组间比较,3 天时各组中神经元分化比例无显著差异;7 天时不同浓度 VPA 组与对照组分化神经元比例开始呈现差异;10 天时这种差异继续增大,0.75 mmol/L VPA 组中神经元比例为 $82.15 \pm 0.93\%$;14 天时保持这种差异;但各时相点 1.0 mmol/L VPA 组与 0.75 mmol/L VPA 组神经元分化的比例无显著差异。不同时相点组内比较发现,3-10 天内随着时间的延长,各组神经元分化的比例显著增加,但 14 天时神经元分化的比例较 10 天无显著变化。结论 0.75mmol/L VPA 在 10 天时促神经干细胞向神经元分化的作用最佳。

关键词 神经干细胞 丙戊酸 分化 剂量 时间

中图分类号 R338, Q813 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 12-2263-03

The Dose and Time Effect of Valproic Acid on Differentiation of Neural Stem Cells*

WANG Li, WU Ya-min, LIU Yuan, NAN Guo-xin, LONG Zai-yun

(Department 3, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, State Key Lab. Of Trauma, Burn & Combined wound, Chongqing 400042, China)

ABSTRACT Objective: To investigate effect of valproic acid (VPA) with different dose and treated time on differentiation of neural stem cells(NSCs). **Methods:** Different dose of VPA (0.1 mmol/L, 0.3 mmol/L, 0.5 mmol/L, 0.75 mmol/L and 1.0mmol/L) were used to enhance the differentiation of NSCs isolated and cultured in serum-free medium from the SD rats pregnant for 14 days. The NSCs in neural basal medium is the control group. Differentiated cells at 3rd day, 7th day, 10th day and 14th day were stained by DAPI, β -tubulin III and GFAP. And the ratio of differentiated cells was analysed. **Results:** The differentiated ratio of neurons at 3rd day had no disparity. At 7th day, 10th day and 14th day the differentiated ratio of neurons in VPA groups was higher than that in control group. The differentiated ratio of neurons in 0.75 mmol/L VPA group was $82.15 \pm 0.93\%$ at 10th day. But the differentiated ratio of neurons at 10th day and 14th day had no disparity. At 3 to 10 days the differentiated ratio of neurons in each group increased apparently, but at 14th day the differentiated ratio in each group didn't increased. **Conclusion:** 0.75 mmol/L VPA at 10th day produces the best effect on promoting the NSCs differentiated into neurons.

Key words: Neural stem cells; Valproic acid; Differentiation; Dose; Time

Chinese Library Classification(CLC): R338, Q813 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)12-2263-03

前言

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的发现给许多目前尚不能治愈的疾病带来了新的希望,目前已经广泛应用于脑损伤、脊髓损伤等疾病。但神经干细胞的分化,尤其是在体内的定向分化是当前制约神经干细胞应用的瓶颈。目前国内外研究多通过物理、基因转染等方法来研究神经干细胞的定向分化,这些方法距临床应用尚有很长一段距离^[1,2]。丙戊酸(valproic acid, VPA)是临床用于抗癫痫、抗抑郁的一线药物,在临床应用已有 40 多年,近年的研究发现 VPA 具有神经保护作用,能促神经

干细胞向神经元分化,但其促分化的作用与药物剂量及作用时间有何关系尚不清楚^[3,4]。因此,本研究拟在体外利用原代培养神经干细胞,观察 VPA 对神经干细胞分化的量效和时效关系。

1 材料与方法

1.1 材料

孕龄为 14d 的 SD 雌鼠 6 只(第三军医大学外研所动物所提供)、NB 培养基(Gibco), B27 添加剂(Gibco),碱性成纤维细胞生长因子(bFGF, 20 μ g/L, Gibco)、优等胎牛血清(FBS, Hy-

* 基金项目:国家自然科学基金(30772299),重庆市自然科学基金(CSTC, 2008BB5278)

作者简介:王莉(1981-),女,硕士研究生,主要从事脊髓损伤与再生修复的研究, E-mail: wangli8134@163.com

[△]通讯作者:伍亚民, E-mail: yaminwu65@hotmail.com

(收稿日期 2011-04-02 接受日期 2011-04-26)

clone), 丙戊酸 (VPA) (Sigma), Nestin (1:800, 小鼠抗大鼠单克隆 IgG, Pharmingen), β -tubulin III (1:800, 小鼠抗大鼠的单克隆 IgG, Sigma), 胶质原纤维酸性蛋白 (GFAP) (1:160, 兔抗大鼠多克隆 IgG, Sigma), 4,6- 联脒 -2- 苯基吡啶 (DAPI) 抗体 (Sigma), FITC (1:100, 山羊抗小鼠 IgG, 北京中杉), TRITC (1:100, 山羊抗兔 IgG, 北京中杉), 0.01 mmol/L PBS、正常封闭山羊血清 (北京中杉), 多聚赖氨酸 (Sigma)。

1.2 实验方法

1.2.1 NSCs 的培养与鉴定 按参考文献^[5]方法获取原代和传 3 代的皮层神经干细胞, 应用免疫荧光单标法, 结合 Nestin 抗体 (1:800, Pharmingen) 来检测 NSCs 中的 Nestin 抗原。再取培养的 NSCs 球经血清分化后, 用 β -tubulin III 单克隆抗体 (1:800, Sigma) 和 GFAP 抗体 (1:160, Sigma), 进行免疫荧光双标, 对 NSCs 进行鉴定。

1.2.2 VPA 对 NSCs 分化的干预 将传 3 代的 NSCs 以 5×10^4 L⁻¹ 的密度种入直径为 35 mm 培养皿中 (培养皿底部放置多聚赖氨酸处理过的盖玻片), 加入含 B27、bFGF 和 5% 优等胎牛血清的 NB 培养基 2 ml, 并分别加入浓度为 0.1 mmol/L、0.3 mmol/L、0.5 mmol/L、0.75 mmol/L 和 1.0 mmol/L 的 VPA^[4], 分别为 A 组、B 组、C 组、D 组和 E 组, 以 NB 培养基组为空白对照组。在撤销 bFGF 后的第 3 天、5 天、7 天和 10 天分别取出爬满分化细胞的盖玻片, 40 g/L 多聚甲醛固定后, 按照免疫荧光染色步骤 (方法见参考文献^[6]), 以 β -tubulin III 和 GFAP 分别标记分化的神经元和星形胶质细胞。每张玻片采用双盲法选择 5 个视野计数神经元和星形胶质细胞的比例, 每组每个时相点 4 张玻片 (每组每个时相点共计 20 个视野), 以缺一抗作为对照, 荧光剂为 FITC 和 TRITC。荧光成像采用激光共聚焦扫描 (型号: Leica, TCS SP2)。

1.2.3 统计学分析 统计学处理数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS11.0 软件对组间和组内进行 t 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞学形态观察

原代及传代培养的神经干细胞, 最初为呈圆形或椭圆形的单细胞, 折光性强。培养 24 小时后单细胞分裂增殖, 形成体积较小的多个细胞聚集成的干细胞球体, 呈悬浮生长。2-3 天后球体体积增大, 呈不规则的球形或卵圆形, 大小不一。5-7 天后可见上百个细胞组成的球体, 折光性佳, 生长状态良好。分化的神经干细胞则呈贴壁生长, 可见干细胞球周围有细胞突起长出, 随着分化时间的延长, 分化细胞逐渐增多, 第 5 天可见细胞突起密集, 相互连接形成网络状, 在分化细胞上层可见体积较小、胞体呈椭圆形、三角形的细胞, 并有长而细的突起; 下层可见胞体较大的细胞, 突起少而短。

2.2 NSCs 的鉴定

原代和传代培养的神经干细胞球经 Nestin 免疫荧光鉴定后呈阳性, 表明该细胞球有干细胞源性; 对分化后的干细胞经 β -tubulin III 和 GFAP 鉴定后, 呈阳性, 说明该干细胞能分化为神经细胞, 是神经干细胞。

2.3 NSCs 分化的免疫荧光鉴定及分化比例分析

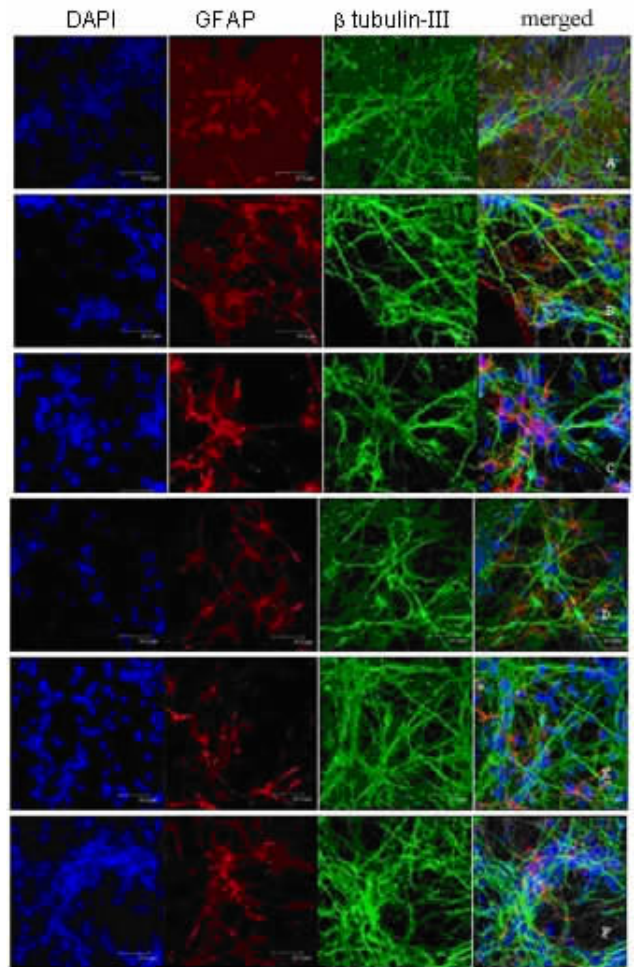


图 1 不同浓度 VPA 作用后神经干细胞分化 7d 的免疫荧光染色 (bar=37.5 μ m): A 对照组 B 0.1 mmol/L VPA 组 C 0.3 mmol/L VPA 组 D 0.5 mmol/L VPA 组 E 0.75 mmol/L VPA 组 F 1.0 mmol/L VPA 组。DAPI (蓝色) 标记细胞核, GFAP (红色) 标记星形胶质细胞, tubulin-III (绿色) 标记神经元。

Fig.1 Immunofluorescence examination of differentiated NSCs at different concentration of VPA at 7th day: A control group; B 0.1 mmol/L VPA group; C 0.3 mmol/L VPA group; D 0.5 mmol/L VPA group; E 0.75 mmol/L VPA group; F 1.0 mmol/L VPA group. DAPI (blue) marks nuclei, GFAP (red) marks astrocytes, tubulin-III (green) marks neurons.

诱导分化后, 对各组细胞进行 β -tubulin III、GFAP 和 DAPI 免疫荧光染色。经过 SPSS11.0 分析后发现, 同一时相点组间比较, 3 天时各组中分化神经元和星形胶质细胞的比例无显著差异; 7 天时不同浓度 VPA 组与对照组间分化神经元比例开始呈现差异, 其中 0.75 mmol/L VPA 组中神经元比例达 $66.76 \pm 0.91\%$, 星形胶质细胞为 $30.7\% \pm 1.80\%$; 10 天时不同组别间分化细胞比例的差异继续增大, 0.75 mmol/L VPA 组中神经元比例为 $82.15 \pm 0.93\%$, 1.0 mmol/L VPA 组中神经元比例为 $83.82 \pm 0.89\%$; 14 天时组间细胞差异趋势同第 10 天, 但各时相点 1.0 mmol/L VPA 组与 0.75 mmol/L VPA 组神经元分化的比例无显著差异。不同时相点组内比较发现, 3-10 天内随着时间的延长, 各组神经元分化的比例显著增加, 但 14 天时神经元分化的比例较 10 天无显著变化。综上所述, VPA 促进神经干细胞向神经元分化有明显的时间和剂量依赖性, 以 0.75

mmol/L VPA 第 10d 时分化神经元比例最高,之后随着 VPA 浓度的增高和时间的延长,并未出现神经元分化比例的显著增加,具体结果见表 1 和图 1。

表 1 不同浓度 VPA 促神经干细胞分化为神经元的比例 (% ,n=20)
Tab.1 Rate of neurons differentiated from NSCs by VPA at different concentration (% ,n=20)

Groups	3d	7d	10d	14d
Control group	34.28± 0.60	46.43± 0.98	52.22± 1.03	54.76± 0.85
Group A	35.32± 0.74 ^{bc}	50.04± 0.84 ^{ac}	63.07± 1.06 ^a	65.63± 1.08 ^{ad}
Group B	35.74± 0.82 ^{bc}	51.42± 0.69 ^{ac}	69.11± 0.90 ^a	70.27± 0.95 ^{ad}
Group C	36.68± 1.06 ^{bc}	55.62± 0.73 ^{ac}	71.86± 1.21 ^a	73.98± 1.04 ^{ad}
Group D	36.73± 0.89 ^{bc}	66.76± 0.91 ^{ac}	82.15± 0.93 ^a	84.01± 0.97 ^{ad}
Group E	36.92± 0.74 ^{bc}	67.39± 1.05 ^{ac}	83.82± 0.89 ^a	85.24± 1.01 ^{ad}

a: P<0.01, 分别与同一时相点的对照组比较 b: P>0.05, 分别与同一时相点的对照组比较 c: P<0.01, 与同一组内第 10 天比较 d: P>0.05, 与同一组内第 10 天比较
a: P<0.01, contrast with control group at the same time b: P>0.05, contrast with control group at the same time c: P<0.01, contrast with the same group at 10th day d: P>0.05, contrast with the same group at 10th day

3 讨论

NSCs 的发现为中枢神经系统疾病,例如脊髓损伤、帕金森病及脑梗塞等带来了新的希望。随着研究的深入发现只神经干细胞能分化为特定细胞类型,来替代疾病中缺失的细胞才能发挥其修复治疗作用。神经元是神经系统中最重要的功能载体,一直以来如何从神经干细胞中获得足够数量的神经元,使其替代中枢神经系统中缺失或病变的神经元成为神经科学研究者关注的焦点^[7]。

目前研究者通过基因转染,例如 Hes 基因、Sox2 基因、Notch 信号分子以及 Wnt 信号分子等来诱导神经干细胞分化为神经元^[8-11]。也有研究者利用各种神经营养因子如 bFGF、VEGF 和 BDNF 等来促进神经元的生成^[12-14]。但基因转染因其安全性、致瘤性问题,神经营养因子因其获取困难等因素制约了它们在临床中的应用。如果能找到一种药物促进神经干细胞向神经元分化,无疑会加速神经干细胞在临床广泛应用的进程。VPA 作为临床抗癫痫和抗抑郁一线药物,已广泛应用 40 余年。它是小分子量的短链脂肪酸,能迅速透过血脑屏障,能通过抗细胞凋亡,抑制神经系统炎症反应发挥神经保护作用^[15-17]。近年来国外研究发现在体外细胞培养中 VPA 能通过抑制 HDAC,上调神经元生成基因 NeuroD 来促进 NSCs 向神经元分化^[18],用含 0.1 mmol/L VPA 的培养液培养神经干细胞时发现,微管蛋白 -III(tubulin-III)阳性神经元数量与对照组相比增加,并促进了轴突的生长 星形胶质细胞数量下降,而总细胞数量无明显变化^[19]。这为利用药物从神经干细胞中获得大量神经元带来希望。然而,VPA 促进神经干细胞向神经元分化是否跟其剂量和作用时间有关,是否 VPA 浓度越高,作用时间越长,获得的神经元数量就越多呢?

本研究通过对 VPA 诱导神经干细胞向神经元分化的剂量和作用时间的观察,发现 VPA 对神经干细胞的作用有一定的浓度和时间依赖性。在 0-0.75 mmol/L 范围内,随着 VPA 浓度的增加,神经干细胞分化为神经元的比例增加,然而超过 0.75

mmol/L 后,随着 VPA 浓度增加分化神经元的比例并未显著增加。这可能因为超过一定浓度剂量后,VPA 对神经干细胞的有一定细胞毒性作用,对干细胞活性有一定程度的损伤,干细胞分化能力减弱。同时,本研究还观察到分化后 3-10d 神经元比例增加显著,10d 后神经元比例未见显著增加。这可能因为是神经干细胞分化后期,分化的胶质细胞增生迅速,而神经元不能分裂增生,导致神经元比例增速减慢。

综上所述,本研究在 VPA 促进神经干细胞向神经元分化的研究基础上,探讨了 VPA 促进神经干细胞向神经分化的最佳浓度和作用时间,为 VPA 与神经干细胞在临床的联合应用提供了一定的实验依据,拓展了 VPA 的应用范围。

参考文献 (References)

[1] Singh RP, Shiue K, Schomberg D, et al. Cellular epigenetic modifications of neural stem cell differentiation [J]. Cell Transplant, 2009, 18 (10): 1197-1211
[2] Conti L, Cattaneo E. Neural stem cell systems: physiological players or in vitro entities [J]. Nat Rev Neurosci. 2010, 11(3): 176-187
[3] Hsieh J, Nakashima K, Kuwabara T, et al. Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101 (47): 16659-16664
[4] Corson TW, Woo KK, Li PP, et al. Cell-type specific regulation of calreticulin and Bcl-2 expression by mood stabilizer drugs [J]. Eur Neuropsychopharmacol, 2004,14(2):143-150
[5] 王莉,伍亚民,刘媛,等.神经干细胞、丙戊酸联合应用对成鼠脊髓损伤的修复作用 [J].创伤外科,2009,11 (2) :159-162
Wang Li, Wu Ya-min, Liu Yuan, et al. Effects of neural stem cell and valproic acid on the repair of spinal cord injury in adult rats [J].J Trauma Surg, 2009,11(2):159-162
[6] 蔡文琴.现代实用细胞与分子生物学实验技术 [M].第一版.北京:人民军医出版社.2003 :110-120
Cai Wen-qin. Current protocols for cellular and biology [M]. No.1 edition, Beijing: People's military surgeon press, 2003:110-120

(下转第 2320 页)

- [6] 李云飞,王勤章,丁国富. 早期糖尿病膀胱尿动力学及 Cajal 样细胞的变化和意义 [J]. 临床泌尿外科杂志,2009,24(9):694-697
Li Yun-fei,Wang Qin-zhang,Ding Guo-fu. Changes and significances of urodynamics and cajal-like cells in diabetic cystopathy of the early stage[J].Clinical Urology, 2009,24(9):694-697
- [7] Shafik A, El-Sibai O, Shafik AA, et al. Identification of interstitial cells of Cajal in human urinary bladder: concept of vesical pacemaker [J]. Urology, 2004,64(4):809-813
- [8] McCloskey KD. Characterization of outward currents in interstitial cells from the guinea pig bladder[J]. J Urol, 2005, 173(1):296-301
- [9] Megan FK, Betty E, Lang RJ. Identification of the cells underlying pacemaker activity in the guinea-pig upper urinary tract [J]. The Journal of Physiology. 1999,519(3):867-884
- [10] Gillespie JJ, Harvey IJ, Drake MJ. Agonist- and nerve-induced phasic activity in the isolated whole bladder of the guinea pig: evidence for two types of bladder activity[J]. Exp Physiol, 2003, 88(3):343-357
- [11] Davidson RA, McCloskey KD. Morphology and localization of interstitial cells in the guinea pig bladder: structural relationships with smooth muscle and neurons[J]. J Urol, 2005, 173(4):1385-1390
- [12] Rasmussen H, Rumessen JJ, Hansen A, et al. Ultrastructure of Cajal-like interstitial cells in the human detrusor [J]. Cell Tissue Res, 2009,335(3):517-527
- [13] Biers SM, Reynard JM, Doore T, et al. The functional effects of a c-kit tyrosine inhibitor on guinea-pig and human detrusor [J]. BJU Int, 2006, 97(3):612-616
- [14] Kubota Y, Biers SM, Kohri K, et al. Effects of imatinib mesylate (Glivec) as a c-kit tyrosine kinase inhibitor in the guinea-pig urinary bladder [J]. Neurourol Urodyn, 2006, 25(3):205-210
- [15] McCloskey KD. Calcium currents in interstitial cells from the guinea-pig bladder [J]. BJU Int, 2006 Jun, 97(6):1338-1343
- [16] 王勤章,李云飞,丁国富.豚鼠膀胱 ICCS 的类型及钙离子振荡特征 [J].中华泌尿外科杂志,2010,31(9):614-617
Li Yun-fei,Wang Qin-zhang,Ding Guo-fu. The types and spontaneous Ca^{2+} waves of ICCS in the bladder of guinea pig [J].journal of Urology, 2010, 31(9):614-617
- [17] Nakayama S, Kajioka S, Goto K, et al. Calcium-associated mechanisms in gut pacemaker activity [J]. J Cell Mol Med. 2007, 11(5):958-968
- [18] Johnston L, Carson C, Lyons AD, et al. Cholinergic-induced Ca^{2+} signaling in interstitial cells of Cajal from the guinea pig bladder [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2008, 294(3):645-655
- [19] Liu HN, Ohya S, Furuzono S, Wang J, et al. Co-contribution of IP3R and Ca^{2+} influx pathways to pacemaker Ca^{2+} activity in stomach ICCs [J]. J Biol Rhythms, 2005, 20(1):15-26

(上接第 2265 页)

- [7] 侯天勇,伍亚民,张玉波,等.维甲酸对神经干细胞的增殖和分化效应 [J]. 中华神经医学杂志, 2005, 4(9): 888-891
Hou Tian-yong, Wu Ya-min, Zhang Yu-bo, et al. Effect of retinoic acid on proliferation and differentiation of neural stem cells [J]. Chin J Neuromed, 2005, 4(9): 888-891
- [8] 高博,邢雪松. Hes1 信号分子在内源性神经干细胞增殖分化中的作用 [J]. 沈阳医学院学报, 2010, 12(2):122-124
Gao Bo, Xin Xue-song. The effect of Hes1 on the proliferation and differentiation of endogenous neural stem cell [J]. Journal of shenyang medical college, 2010, 12(2):122-124
- [9] Pevny LH, Nicolis SK. Sox2 roles in neural stem cells [J]. Biochem Cell Biol, 2010, 42(3): 421-424
- [10] Mancini SJ, Mantei N, Dumortier A, et al. Jagged 1-dependent Notch signaling is dispensable for hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation [J]. Blood, 2005, 105(6):2340-2342
- [11] Toledo EM, Colombres M, Inestrosa NC. Wnt signaling in neuroprotection and stem cell differentiation [J]. Prog Neurobiol, 2008, 86(3):281-296
- [12] Sun JQ, Sha B, Zhou WH, et al. Basic fibroblast growth factor stimulates the proliferation and differentiation of neural stem cells in neonatal rats after ischemic brain injury [J]. Brain Dev, 2009, 31(5): 331-340
- [13] Li Q, Ford MC, Lavik EB, et al. Modeling the neurovascular niche: VEGF- and BDNF-mediated cross-talk between neural stem cells and endothelial cells: an in vitro study [J]. J Neurosci Res, 2006, 84(8): 1656-1668
- [14] 李政,王江,龙在云,等. VEGF、bFGF 联合应用对胎鼠大脑皮质神经干细胞分化的影响 [J]. 解放军医学杂志, 2010, 35(4):377-380
Li Zheng, Wang Jiang, Long Zaiyun, et al. Joint action of VEGF and bFGF on differentiation of neural stem cells from embryonic rat cortex [J]. Med J Chin PLA, 2010, 35(4):377-380
- [15] Dragunow M, Greenwood JM, Cameron RE, et al. Valproic acid induces caspase 3-mediated apoptosis in microglial cells [J]. Neuroscience, 2006, 140(4):1149-1156
- [16] Chen G, Zeng WZ, Yuan PX, et al. The mood-stabilizing agents lithium and valproate robustly increase the levels of the neuroprotective protein bcl-2 in the CNS. Neurochem, 1999, 72(2):879-882
- [17] Peng GS, Li G, Tzeng NS, et al. Valproate pretreatment protects dopaminergic neurons from LPS-induced neurotoxicity in rat primary midbrain cultures: role of microglia [J]. Brain Res Mol Brain Res, 2005, 134(1): 162-169
- [18] Laeng P, Pitts RL, Lemire AL, et al. The mood stabilizer valproic acid stimulates GABA neurogenesis from rat forebrain stem cell [J]. J Neurochem, 2004, 91(1): 238-251
- [19] Hisahara S, Chiba S, Matsumoto H, et al. Histone deacetylase SIRT1 modulates neuronal differentiation by its nuclear translocation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(40): 15599-15604