doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2011.02.001

·基础医学·

EPO 对鼠胚脑皮质神经干细胞抗凋亡作用的研究*

袁丽丽[1] 姜海燕[2] 杜红梅[3] 崔运河[1] 孔佑华[1] 张 慧[1]

([1] 济宁医学院基础医学与法医学院,山东 济宁 272067;[2] 济宁医学院精神卫生学院,济宁 272067;
[3] 潍坊医学院组织胚胎学教研室,山东 潍坊 261042)

摘 要 目的 探讨促红细胞生成素(erythropoietin,EPO)对体外培养神经干细胞(neural stem cells,NSCs)凋亡的影响,为 NSCs 移植治疗脑损伤和脑部疾病提供实验依据。**方法** 孕 14 d(El4)大鼠取鼠胚脑皮质悬浮培养、贴壁诱导分化。采用光电镜观察,用免疫细胞化学染色以 Nestin 蛋白作为鉴定 NSCs 的标记物,以 MAP2、GFAP 蛋白检测 NSCs 的分化。取第 3 代(P3)NSCs 向悬浮培养基中分别添加不同剂量的 EPO,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,通过 Caspase-3 蛋白检测 NSCs 的凋亡。**结果** 1)提取和分离 E14d SD 大鼠的胚脑皮质,在添加 B27、bFGF、EGF 的无血清培养基中培养,可形成大量悬浮的神经球并可进行体外扩增传代,神经球内的细胞均呈 Nestin 阳性、BrdU 阳性。在添加 10%胎牛血清的培养基中,神经干细胞可自然分化为神经元和神经胶质细胞。2)加入≥5U/ml EPO,神经球内 Caspase-3 的表达显著下降($P<0.01$)。**结论** 1)大鼠胚胎脑皮质体外培养可得到大量增殖的 NSCs 并能分化为神经元和神经胶质细胞,为 NSCs 的研究提供了适宜的细胞培养模型。2)加入≥5U/ml EPO 可降低体外培养的鼠胚脑皮质 NSCs 的凋亡率。

关键词 神经干细胞;培养;凋亡;促红细胞生成素

中图分类号:R321 **文献标志码**:A **文章编号**:1000-9760(2011)04-077-04

Study of anti-apoptotic effect of erythropoietin on the cultured NSCs from brain cortex of embryonic rats in vitro

YUAN Li-li, JIANG Hai-yan, DU Hong-mei, et al

(College of Basic and Forensic Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: ***Objective*** To explore the effects of EPO on the apoptosis of the neural stem cells (NSCs) in vitro from brain cortex of embryonic Sprague-Dawley rats. ***Methods*** The NSCs were isolated and cultured in serum-free suspension, then cultured by differentiating suspension. Nestin was used to detect the NSCs. Microtubule-associated protein 2(MAP2) and glial fibrillary acid protein (GFAP) was used to detect the differentiation of NSCs by immunofluorescent cytochemistry. EPO was added to the serum-free suspension. According to the final EPO concentration, the cells were divided into 4 experimental groups, they were 0.5,5,50,500U/ml, in addition the control group was without EPO. Caspase-3 was measured to analyze the apoptosis of NSCs by immunofluorescent cytochemistry. ***Results*** The results showed that separated cells from brain cortex could proliferate and subculture in vitro. Nestin-positive cells were detected in neural stem spheres. MAP2- and GFAP-positive cells were detected in serum with 10% FBS. Caspase-3-positive NSCs in EPO supplementation groups(>5U/ml) were decreased in neural stem spheres compared with the control group. ***Conclusion*** Our results indicate that the separated cells from brain cortex of embryonic rats are multipotent and have the ability of self-renew and differentiation, which suggest that it may be a good cell culture model for the study of NSCs. The present results suggest that EPO can decrease the apoptosis of the NSCs in vitro.

Key words: Neural stem cells; Culture; Apoptosis; Erythropoietin

促红细胞生成素(enrythropoitin,EPO)是一种造血生长因子,已用于治疗多种原因所致贫血,近来研究发现,EPO 具有非造血生物学特性,对多种组织损伤具有保护作用[1-3]。本实验对鼠胚脑皮质行体外培养,鉴定为神经干细胞后,加入 EPO 观察 EPO 对体外大鼠胚胎脑皮质 NSCs 凋亡的影

* 济宁医学院青年科研基金项目资助

响。

1 材料与方法

1.1 材料

雌性、雄性成年未经产 SD 大鼠由潍坊医学院实验动物中心提供。将成年雌雄 SD 大鼠于晚 8pm 按 2:1 比例合笼，次日 8am 阴道涂片查精子，查到精子者记为 E0d。

生长培养基：DMEM/F12(1:1, Hyclone)，2% B27(Gibco)，20 ng/ml bFGF(Sigma)，20 ng/ml EGF(Sigma)，100 U/ml 青霉素，100 μg/ml 链霉素。分化培养基：DMEM/F12(1:1, Hyclone)，10%胎牛血清(杭州四季青)，100U/ml 青霉素，100 μg/ml 链霉素。

1.2 NSCs 培养和鉴定

1.2.1 NSCs 的分离和传代 取胚胎 14d(E14d) SD 大鼠，脱臼处死，无菌条件下分离大鼠脑皮质，机械吹打，加入 0.25%胰蛋白酶 37℃消化 10min，铜网过滤离心弃上清，加入生长培养基，调整活细胞密度 5×10^5/ml，接种于培养瓶中，置于 37℃、5%CO_2、饱和湿度培养箱中培养。细胞接种后培养 24h 换液 1 次，以后每 2 天换液 1 次。接种 6～7d 神经球由 50～200 个细胞组成，采用胰蛋白酶加机械吹打的方法制成单细胞，离心弃上清，生长培养基重悬，以 5×10^5/ml 的细胞密度进行传代，传第 1 代的细胞记为 P1，按上述方法传代 3 次即传至 P3。每日在倒置显微镜下观察细胞生长状况，适时采集光镜照片。

将 P3 代神经球离心弃上清，加入血清培养基，以适当的密度接种入预先置入 L-多聚赖氨酸包被盖玻片的 24 孔培养板中培养，6～8h 吸去 24 孔板中的培养基，每孔加入 0.01M PBS 洗 3 次，取出盖玻片分别用冷丙酮固定 10min，进行 Nestin 的免疫细胞化学染色。

1.2.2 鼠胚大脑皮质神经干细胞的自然分化 取 P3 代的神经球悬液离心弃上清，加入血清培养基重悬细胞，将神经球置于预先涂有 L-多聚赖氨酸包被盖玻片的 24 孔培养板中行分化培养，7d 后细胞爬片行 MAP2、GFAP 免疫细胞化学染色，观察其生长分化状况。

1.2.3 免疫细胞化学染色 1)将细胞爬片分别用冷丙酮固定 10min 后，0.01M PBS(pH=7.2)冲洗，5min×3 次；2)3% H_2O_2 溶液孵育 30min，0.01M PBS 冲洗，5min×3 次；3)滴加 SP-9002 封闭用羊血清(试剂 A)，37℃孵育 30min，吸除多余血清，不洗；4)分别滴加小鼠抗 MAP2、小鼠抗 GFAP 及小鼠抗 Nestin 单克隆抗体，4℃冰箱过夜，0.01M PBS 冲洗，5min×3 次；5)滴加生物素标记的二抗(试剂 B)，37℃孵育 1h，0.01M PBS 冲洗，5min×3 次；6)滴加辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素(试剂 C)，37℃孵育 30min，0.01M PBS 冲洗，5min×3 次；DAB 避光显色 2～3min；7)PBS 终止显色，梯度酒精脱水，二甲苯透明，中性树胶封片。阴性对照用 0.01MPBS 代替第一单抗，其余步骤相同。

1.3 EPO 掺入实验

1.3.1 分组 将 P3 NSCs 单细胞悬液接种于添加 EPO 的生长培养基中，根据 EPO 的终浓度随机分为 4 个实验组，即 0.5、5、50、500 U/ml 组，另设不加 EPO 的对照组。放入 37℃、5%CO_2 饱和湿度培养箱中静置培养，每日在倒置显微镜下观察细胞生长状况，适时采集照片。待形成神经球后将悬液离心，弃上清加入分化培养基重悬细胞，将神经球置于预先涂有 L-多聚赖氨酸包被盖玻片的 24 孔培养板中，用吸管每孔加入 200μl 重悬细胞液置盖玻片上，将 24 孔板置于 37℃、5%CO_2、饱和湿度培养箱中培养。6～8h 后取爬有细胞的盖玻片冷丙酮固定 10min，进行 Caspase-3 免疫荧光染色。荧光显微镜下计数 Caspase-3 染色阳性细胞的数目，每组随机取 4 张爬有细胞的盖玻片，每张玻片随机计数 5 个视野，计数视野中阳性细胞数占细胞总数的百分率。每组均设复孔，实验重复 3 次。

1.3.2 免疫荧光染色 将细胞爬片分别用冷丙酮固定 10min 后，0.01M PBS(pH=7.2)冲洗，5min×3 次；滴加正常羊血清，室温孵育 30min；甩掉多余血清，不洗；滴加小鼠抗 Caspase-3 一抗，4℃冰箱过夜，0.01M PBS 漂洗，5min×3 次；滴加 Cy3 标记的羊抗小鼠 IgG，避光条件下 37℃孵育 60min，0.01M PBS 冲洗，5min×3 次；分别滴加终浓度为 10μg/ml 的 Hoechst 33258，37℃避光孵育 30min，0.01M PBS 冲洗，5min×3 次，以防淬灭封片剂封片，4℃冰箱避光保存；荧光显微镜观察、拍照、计数。每实验组随机抽取 4 张玻片，每张玻片 400 倍视野下随机选取 5 个视野进行计数。阴性对照用 0.01MPBS 代替第一单抗，其余步骤相同。

1.4 统计学分析

数据采用 SPSS11.5 统计学软件处理。

2 结果

2.1 神经干细胞鉴定

2.1.1 倒置相差显微镜观察结果 从 E14d 鼠胚脑皮质分离得到的单细胞，呈悬浮生长，圆球形，细

胞饱满，折光性强，台盼蓝染色计数活细胞>96%。获取的细胞在生长培养基中呈悬浮生长。第 5 天～第 7 天，细胞形成的神经球多由数十个到数百个细胞组成，细胞排列紧密。传代培养后，单细胞可增殖形成小神经球，小神经球不断增大可形成由数百个细胞构成的大神经球。

2.1.2 免疫细胞化学染色 Nestin 免疫细胞化学染色结果显示，神经球内细胞胞浆均呈棕褐色，Nestin 表达阳性(图 1)。MAP2 免疫细胞化学染色：部分细胞胞浆及突起呈棕褐色，为 MAP2 表达阳性(图 2)。GFAP 免疫细胞化学染色：阳性细胞较多，胞浆及突起着色，呈棕褐色，胞体较大、突起粗而短(图 3)。

2.2 EPO 掺入实验

2.2.1 倒置相差显微镜观察 倒置相差显微镜观察可见，细胞接种 48h 时，EPO 各组细胞分裂相明显多于对照组；随着培养时间的延长，神经球数量逐渐增多，普遍大于对照组，尤其是 EPO 剂量为 5 U/ml 和大于 5 U/ml 的各组，神经球数量和大小明显高于正常对照组(图 4)。

2.2.2 Caspase-3 免疫细胞荧光化学染色 免疫细胞荧光化学染色结果显示，神经球内小部分细胞胞浆呈红色荧光(图 5)，Caspase-3 表达阳性，数据统计结果显示，EPO 剂量为 5 U/ml 和大于 5 U/ml 各实验组的 Caspase-3 阳性细胞表达率显著低于对照组($P<0.01$)，有统计学意义。

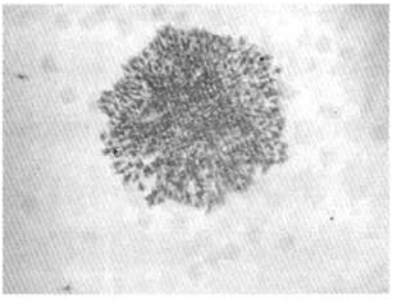

图 1 神经球，示神经球内细胞 Nestin 表达阳性(×100)

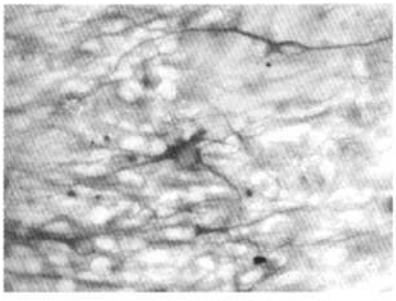

图 2 神经球爬片分化培养 7d，免疫细胞化学染色示 MAP2 阳性细胞(×400)

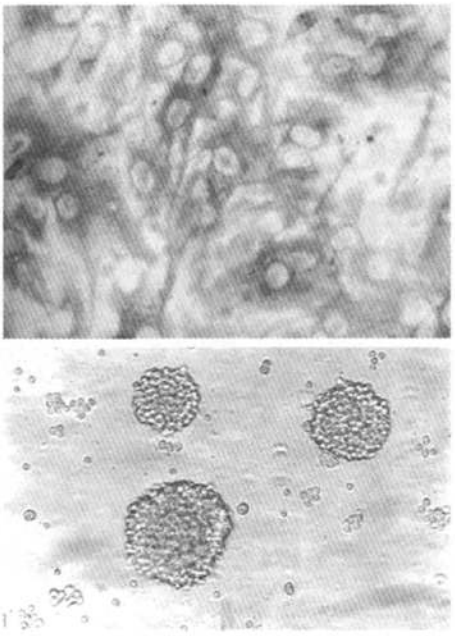

图 3 神经球爬片分化培养 7d，免疫细胞化学染色示 GFAP 阳性细胞(×400)

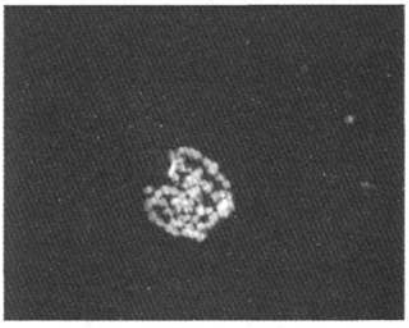

图 4 EPO5 U/ml 组悬浮培养 7d 的神经干细胞(×200)

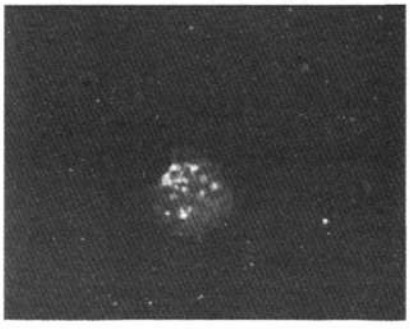

图 5 EPO5 U/ml 组神经干细胞，免疫荧光细胞化学染色(×200)

a：神经干细胞核经 Hoechst33258 复染，示蓝色荧光

b：神经干细胞中极少数细胞胞浆呈红色荧光，示 Caspase-3 阳性细胞

表 1 Caspase-3 在神经干细胞内的表达

组别	Caspase-3 标记细胞结果		合计	阳性率(%)
	阳性总数	阴性总数		
对照组	360	2828	3188	11.3
0.5U/ml 组	330	2955	3285	10.0
5U/ml 组	294	3306	3600	8.2*
50U/ml 组	283	3356	3639	7.8*
500U/ml 组	281	3375	3656	7.7*
合计	1548	15820	17368	8.9

注：* 与正常对照组相比 $P<0.01$

3 讨论

神经干细胞是当今神经科学领域研究的热点之一。本实验从大鼠胚胎脑皮质分离 NSCs，在基础培养液中添加较高浓度的 EGF(20ng/ml)和 bFGF(20ng/ml)组成生长培养基，对 NSCs 进行悬浮培养以维持 NSCs 的增殖状态。表皮生长因子(epidermal growth factor，EGF)和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor，bFGF)是促进 NSCs 增殖的主要生长因子，EGF 和 bFGF 均具有很强的促细胞生长的作用，是重要的有丝分裂原，在细胞的生长、发育与组织的损伤修复中起着重要的作用[4]。bFGF 在 NSCs 增殖的早期阶段发挥作用，可以促进有丝分裂，使 NSCs 获得对 EGF 的反应性；EGF 具有更强的促有丝分裂作用，在 NSCs 增殖后期发挥作用[5]。本实验从大鼠胚胎脑皮质分离 NSCs，应用无血清培养技术培养，即在基础培养液中添加了较高浓度的 EGF(20ng/ml)和 bFGF(20ng/ml)，以维持 NSCs 的增殖状态。NSCs 的生长培养基采取只加入不吸弃的方法，将保留细胞本身在培养过程中分泌的胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)和神经生长因子(NGF)等生长因子，有利于细胞生长。前期实验[6]通过电镜观察结果显示，培养的细胞核浆比例较高，细胞器也较少，与干细胞的一般形态特征一致。巢蛋白(Nestin)属于第Ⅳ类中间丝蛋白，具有维持神经前体细胞正常形态的作用，本实验用 Nestin 作为 NSCs 的标记物，其免疫细胞化学染色结果，在生长培养基中原代及传代培养的细胞爬片数小时后均呈 Nestin 阳性，表明培养的是 NSCs，且具有增殖的潜能。鼠胚脑皮质 NSCs 在培养基添加 10%FBS 条件下贴壁分化。免疫细胞化学染色显示分化细胞有 MAP2、GFAP 特异性抗原表达，表明本实验所取 SD 大鼠鼠胚脑皮质细胞具有分化为神经元、星形胶质细胞的能力。前期实验结果[7]中，鼠胚脑皮质细胞形成神经球后加入分化培养基自然分化，分化为神经元的比例达到 17.6%。

EPO 是一种含唾液酸的酸性热稳定(80℃)糖蛋白。Yu 等的研究表明[8]，EPO 及其受体在脑部及脊髓具有防止细胞凋亡的功能，对于神经细胞正常发育具有重要作用。有研究表明在缺氧/缺血时，EPO 对 CNS 具有明确保护作用。在体实验 EPO 对 NSCs 的研究较多，也取得了很大的进展。体外培养可以研究单因素对 NSCs 的影响，赵舒武等[9]研究发现，EPO 抑制体外培养的胚胎神经管 NSCs 凋亡。本实验取材来自 SD 大鼠鼠胚脑皮质，实验结果适当浓度 EPO 可以抑制体外培养的鼠胚脑皮质 NSCs 凋亡，与赵舒武等[9]研究结果相吻合。NSCs 的增殖、发育和分化的调控机制非常复杂，受外来信号和自身基因共同调节，将继续深入研究胚胎 NSCs 定向分化的诱导因素及其分化机制，为实现 NSCs 移植治疗中枢神经系统疾病提供理论基础。

参考文献：

[1] Junk AK, Mammis A, Savitz SI, et al. Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 10659-10664.

[2] Siren AL, Fratelli M, Brines M, et al. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 4044-4049.

[3] 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.

[4] Whittemore SR, Morassutti DJ, Walters WM, et al. Mitogen and substrate differentially affect the lineage restriction of adult rat subventricular zone neural precursor cell populations [J]. Exp Cell Res, 1999, 252(1): 75-95.

[5] Ciccolini F. Identification of two distinct types of multipotent neural precursors that appear sequentially during CNS development[J]. Mol Cell Neurosci, 2001, 17(5): 895-907.

[6] 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.

[7] 袁丽丽，管英俊，杜红梅，等. 缺氧对体外培养的鼠胚皮质神经干细胞增殖、分化及凋亡的影响[J]. 神经解剖学杂志，2008，24(4)：343-348.

[8] Yu X, Shacka JJ, Eells JB, et al. Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development [J]. Development, 2002, 129: 505-516.

[9] 赵舒武，高英茂，张晓丽，等. EPO 对体外培养的神经干细胞增殖、分化和凋亡的影响[J]. 神经解剖学杂志，2007，23(5)：549-553.

(收稿日期 2011-03-05)