

联合检测结直肠癌中 GLUT-1、HIF-1 α 表达的临床意义

武雪亮¹, 王立坤², 周海丰¹, 郭飞¹, 杨永江¹, 刘博³,
杨东东^{1*}, 屈明¹, 薛军¹

(河北北方学院附属第一医院 1. 普通外科; 2. 超声医学科; 3. 病理科, 河北 张家口 075000)

【摘要】目的 观察结直肠癌组织中葡萄糖转运蛋白-1 (GLUT-1) 和缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 的表达变化, 并探讨其临床意义。**方法** 选取结直肠癌组织 50 例 (癌组) 和 50 例癌旁正常组织 (癌旁正常组), 采用免疫组化半定量检测两组结直肠组织的 GLUT-1、HIF-1 α 的表达量, 分析 GLUT-1、HIF-1 α 表达量与结直肠癌临床病理参数的关系, 并初步探讨其致癌机制。**结果** 癌组和癌旁正常组中 GLUT-1 表达量分别为 (2.285 \pm 0.459) 和 (1.086 \pm 0.148), 差异有显著性 ($t = 8.919, P < 0.001$); 癌组和癌旁正常组中 HIF-1 α 表达量分别为 (2.203 \pm 0.401) 和 (1.055 \pm 0.127), 差异有显著性 ($t = 7.144, P < 0.05$); GLUT-1 和 HIF-1 α 在结直肠癌中的表达量呈正相关 ($r = 0.958, P < 0.001$); GLUT-1、HIF-1 α 的表达量均与结直肠癌 TNM 分期、浆膜浸润、分化程度、淋巴转移、肝转移及脉管浸润有关 ($P < 0.05$)。**结论** 在结直肠癌组织中, GLUT-1 和 HIF-1 α 表达量均增高, 提示二者可作为评估结直肠癌发生、发展、转移及预后参考指标。

【关键词】 葡萄糖转运蛋白-1; 缺氧诱导因子-1 α ; 结直肠癌; 免疫组化; 临床意义

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 07-0077-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.07.013

Expression of HIF-1 α and GLUT-1 in colorectal carcinoma tissues and its clinical significance

WU Xueliang¹, WANG Likun², ZHOU Haifeng¹, GUO Fei¹, YANG Yongjiang¹, LIU Bo³, YANG Dongdong^{1*},
QU Ming¹, XUE Jun¹

(1. Department of General Surgery; 2. Department of Ultrasound; 3. Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

【Abstract】Objective To explore expression of GLUT-1 and HIF-1 α in human colorectal carcinoma tissues and discuss its clinical significance. **Methods** Fifty specimens of colorectal carcinoma tissues (cancer group) and 50 specimens of normal adjacent tissues (normal group) were selected, and immunohistochemistry was used to detect the expression levels of GLUT-1 and HIF-1 α in the two groups. Correlations between their expression levels and clinicopathological characteristics were analyzed, and the mechanism of carcinogenesis was investigated. **Results** Relative expression levels of GLUT-1 in cancer and normal groups were (2.285 \pm 0.459) and (1.086 \pm 0.148), respectively, and

【基金项目】 河北省财政厅临床医学优秀人才培养研究项目 (编号:361009); 河北省卫计委医学科学研究重点课题计划 (编号:20180834); 河北省张家口市科技局指令性计划 (编号:1621083D)。

【作者简介】 武雪亮 (1984—), 男, 硕士, 主治医师, 研究方向: 胃肠道恶性肿瘤的基础与临床诊治。E-mail: wxlwk@163.com

【通信作者】 杨东东 (1968—), 男, 主任医师, 研究方向: 胃肠道恶性肿瘤的基础与临床诊治。E-mail: ywcydd@126.com

the difference was statistically significant ($t = 8.919, P < 0.001$). The relative expression levels of HIF-1 α in cancer and normal groups were (2.203 ± 0.401) and (1.055 ± 0.127), respectively, and the difference was statistically significant ($t = 7.144, P < 0.001$). GLUT-1 expression levels were positively correlated with expression levels of HIF-1 α in colorectal carcinoma tissues ($r = 0.958, P < 0.001$). Expression of GLUT-1 and HIF-1 α was correlated with the TNM stage, depth of tumor invasion, differentiation degree, lymph node metastasis, liver metastasis, and vessel invasion ($P < 0.05$). **Conclusions** The expression levels of GLUT-1 and HIF-1 α are higher in colorectal carcinoma tissues, which serve as prognostic indicators for colorectal carcinoma.

【Key words】 GLUT-1; HIF-1 α ; colorectal carcinoma; immunohistochemistry; clinical significance

据 2012 年全球肿瘤流行病学数据统计:中国人群的结直肠癌目前排位死因顺位从第 7 位上升到第 5 位,男女死亡率分别为 9.0/10 万和 6.1/10 万,严重威胁国民健康^[1]。尽管近年来结直肠癌的普查力度不断加强,手术方式不断改进,靶向药物大力推广,并取得了一系列的成就和提高,但结直肠癌的 5 年生存率不足 60%,仍是公共卫生的关键问题,每年造成约 608 000 例患者死亡^[2]。因此,对结肠直肠癌的深入研究尤其对其分子生物学研究具有很高的临床价值。

葡萄糖转运蛋白-1 (GLUT-1) 是葡萄糖转运蛋白家族中最重要的成员,广泛存在于真核生物和原核生物中,在癌症发展阶段,包括早期肿瘤生长,癌症转移和侵袭等方面均具有重要作用。相关报道证实,在乳腺癌、食管癌、胃癌、肝癌等肿瘤细胞内均发现 GLUT-1 的高表达, GLUT-1 的活性和表达水平与肿瘤的恶性生物学行为密切相关^[3-5], 而 GLUT-1 在结直肠癌方面的研究鲜有报道。缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 是细胞在低氧条件下产生的一种核转录因子,在恶性肿瘤的发生发展过程中,扮演着重要的角色,能增强其侵袭性,是近年研究较多的致癌因子。本研究通过对结直肠癌和癌旁正常结直肠组织中 GLUT-1 和 HIF-1 α 行免疫组织化学染色分析半定量检测,旨在探讨 GLUT-1 和 HIF-1 α 在结直肠癌中的表达情况及与相关临床病理因素间的关系,为结直肠癌的靶向诊疗提供科学参考。

1 材料和方法

1.1 实验材料

收集河北北方学院附属第一医院普通外科 2016 年 9 月至 2017 年 1 月手术切除的结直肠癌组织 50 例和同期同例癌旁正常结直肠组织 50 例,结直肠的癌组织自癌灶中心处取得,另外取经病理证实为正常肠组织的标本切缘。本研究经本院伦理

委员会批准,患者知情同意参加本研究。所有病例均为原发性肿瘤,术前没有行针对性治疗,如新辅助放化疗等,术后标本均在 1 h 内获得,并存于液氮中。

1.2 主要试剂与仪器

兔抗 GLUT-1 多克隆抗体、鼠抗 HIF-1 α 单克隆抗体购于美国 Abcam 公司;免疫组化试剂盒、DAB 显色剂购于上海 Gene Tech 公司。光学显微镜: Nikon Eclipse 50;台式高速离心机:德国 Eppendorf 公司;冰冻切片机:北京格美胜达医疗设备有限公司;低温冰柜:青岛海尔公司。

1.3 实验方法

1.3.1 免疫组织化学染色及半定量测定^[6]

10% 的甲醛溶液固定,石蜡包埋,切片厚度 4 μm ,应用苏木精-伊红染色,行病理诊断。用 80 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱对切片进行烘烤 30 min,再用乙醇进行脱水,并使内源性过氧化物酶灭活,应用枸橼酸缓冲液行高温高压水化修复过程;之后 PBS 洗 3 次,加入一抗 (1:100) 50 μL ,温度控制于 4 $^{\circ}\text{C}$ 一夜;再用 PBS 洗 3 次,加入二抗 50 μL 。室温下 DAB 显色,PBS 洗 3 次,苏木精轻度复染,盐酸乙醇分化后流动清水冲洗 10 min,梯度乙醇脱水,松节油透明和树胶行封片处理,PBS 代替一抗作为阴性对照,光镜下观察。采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统进行半定量测定,计算单位面积阳性染色积分光密度值,取均值。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料用平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, GLUT-1 和 HIF-1 α 的表达与临床病理参数的关系应用 t 检验或方差分析,采用散点图法进行相关性分析,检验水准设 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

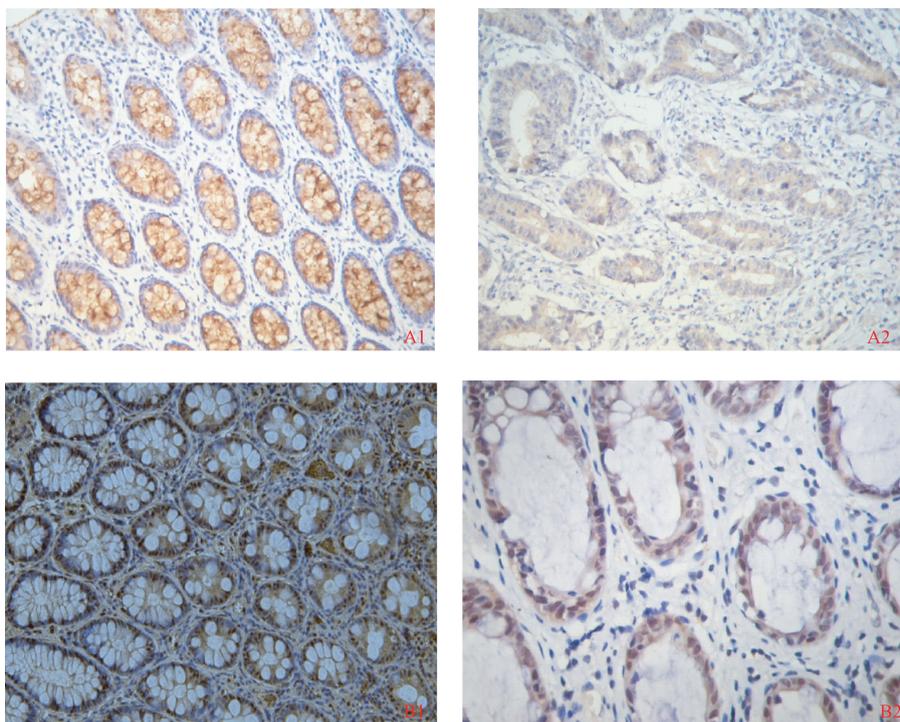
2.1 结直肠癌、癌旁正常组织中 GLUT-1 和 HIF-1 α 表达情况

癌组和癌旁正常组织中 GLUT-1 表达量分别为

(2.285 ± 0.459) 和 (1.086 ± 0.148), 组间差异有显著性 ($t = 8.919, P < 0.001$); 癌组和癌旁正常组织中 HIF-1 α 表达量分别为 (2.203 ± 0.401) 和 (1.055 ± 0.127), 差异有显著性 ($t = 7.144, P < 0.001$), 见图 1、2。

2.2 GLUT-1 和 HIF-1 α 表达与结直肠癌临床病理特征的关系

GLUT-1 和 HIF-1 α 的表达量都和肿瘤的浸润深度、分化程度、TNM 分期、淋巴转移、肝转移和脉管浸润有关 ($P < 0.05$)。TNM 分期高、分化程度低、伴淋巴结转移、肝转移和脉管浸润的患者 GLUT-1 和 HIF-1 α 的表达量均升高, 而 GLUT-1 和 HIF-1 α 的表达量与患者肿瘤大小无相关性 ($P > 0.05$), 见表 1。

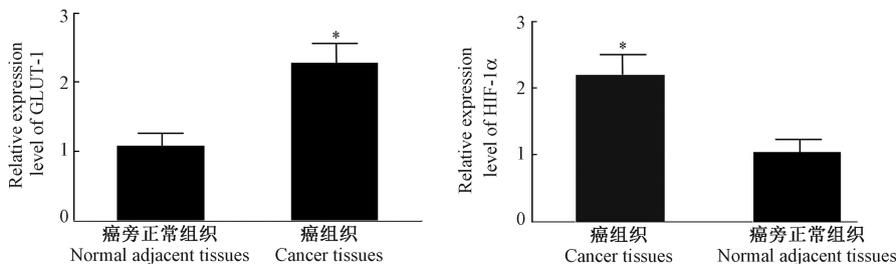


注: A1: 癌旁正常组织中 GLUT-1 表达 ($\times 200$); A2: 结直肠癌组织中 GLUT-1 表达 ($\times 200$); B1: 癌旁正常组织中 HIF-1 α 表达 ($\times 200$); B2: 结直肠癌组织中 HIF-1 α 表达 ($\times 400$)。

图 1 癌旁正常结直肠组织和癌组织中 GLUT-1 和 HIF-1 α 蛋白的表达 (SP 法)

Note. A1: GLUT-1 expression in normal adjacent tissues ($\times 200$); A2: GLUT-1 expression in colorectal carcinoma tissues ($\times 200$); B1: HIF-1 α expression in normal adjacent tissues ($\times 200$); B2: HIF-1 α expression in colorectal carcinoma tissues ($\times 400$).

Figure 1 Expression of GLUT-1 and HIF-1 α in human colorectal carcinoma tissues and normal adjacent tissues. Streptavidin-peroxidase (SP) method



注: 与癌旁正常组织比较, * $P < 0.001$ 。

图 2 免疫组化半定量表达检测分析

Note. Compared with the normal adjacent tissues, * $P < 0.001$.

Figure 2 Quantitative immunohistochemical detection and analysis

表 1 GLUT-1 和 HIF-1 α 在结直肠癌组织中的表达及与临床病理因素的关系Table 1 Relationships between GLUT-1 and HIF-1 α expression in colorectal carcinoma tissues and clinicopathological factors

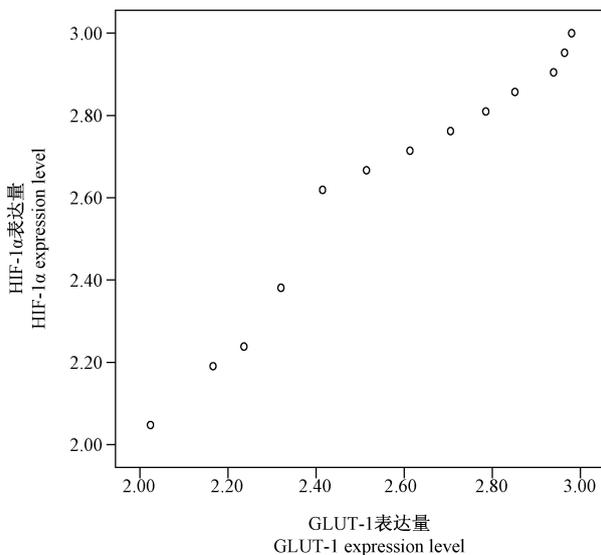
病理参数 Pathological parameters	<i>n</i>	GLUT-1 表达量 GLUT-1 expression level	HIF-1 α 表达量 HIF-1 α expression level
肿瘤大小(cm) Tumor size			
≥ 5	32	2.289 \pm 0.403	2.177 \pm 0.395
< 5	18	2.080 \pm 0.424	2.039 \pm 0.271
分化程度 Differentiation degree			
高 High	12	2.061 \pm 0.107	1.950 \pm 0.101
中 Moderate	21	2.330 \pm 0.172	2.199 \pm 0.117
低 Low	17	2.510 \pm 0.103	2.407 \pm 0.095
浆膜浸润 Serosal invasion			
有 Yes	39	2.452 \pm 0.370	2.343 \pm 0.261
无 No	11	2.074 \pm 0.251	2.015 \pm 0.239
TNM 分期 TNM stage			
I + II	8	1.830 \pm 0.402	1.801 \pm 0.399
III + IV	42	2.366 \pm 0.457	2.254 \pm 0.346
淋巴结转移 Lymph node metastasis			
有 Yes	33	2.431 \pm 0.386	2.320 \pm 0.297
无 No	17	2.080 \pm 0.272	1.971 \pm 0.254
肝转移 Liver metastasis			
有 Yes	7	2.477 \pm 0.460	2.366 \pm 0.451
无 No	43	1.845 \pm 0.411	1.831 \pm 0.402
脉管浸润 Vascular infiltration			
有 Yes	16	2.358 \pm 0.411	2.247 \pm 0.405
无 No	34	1.996 \pm 0.285	1.961 \pm 0.274

注:除肿瘤大小外,其他各病理参数不同程度间比较, $P < 0.05$ 。

Note. Comparison among different degrees for each pathological parameter except for tumor size, $P < 0.05$.

2.3 GLUT-1 和 HIF-1 α 在结直肠癌中表达的相互关系

相关性分析散点图表明, GLUT-1 和 HIF-1 α 在结直肠癌中的表达呈正相关 ($r = 0.958$, $P < 0.001$), 见图 3。

图 3 GLUT-1 和 HIF-1 α 相关性分析散点图Figure 3 Scatter plot of correlation analysis of GLUT-1 and HIF-1 α

3 讨论

结直肠癌的发生、发展是多个基因调控的多步骤、多因素、多阶段的复杂过程, 其中失控性生长和不断侵袭增殖是恶性肿瘤细胞的最主要特征, 这种特征的维系主要靠葡萄糖的无氧酵解为其提供能量, 该过程即使在氧充足的环境下仍可持续进行^[7]。由于肿瘤的高消耗、高代谢, 需要较普通细胞成倍的能量。而正常情况下, 葡萄糖无法独立通过细胞膜的双分子层结构, 必须依赖跨膜分布的葡萄糖转运蛋白作为载体, 因而这类载体的活性及表达量对肿瘤细胞的恶性增殖具有极其重要的意义^[8]。

GLUT-1 是葡萄糖转运蛋白家族最重要的成员, GLUT-1 内含 492 个氨基酸, 由 12 个疏水性的跨膜 α 螺旋结构域、两个电荷的膜内区及膜外区构成^[9]。Deng 等^[10]解析的人源 GLUT-1 的晶体结构显示其经典的协助转运超家族的折叠方式: 12 个跨膜螺旋组成 NH_2 -端和 $-\text{COOH}$ 端 2 个结构域, 其中的腔孔呈向胞内区展开, 这即是其转运的基础框架。

肿瘤细胞膜上的 GLUT-1 的表达受多种途径调节, 目前研究较多的有 PI3K/AKT/mTOR (磷脂酰肌

醇-3 激酶/蛋白激酶 B/雷帕霉素靶蛋白)途径、HIF-1 α (缺氧诱导因子-1 α) 和 p53 途径, PI3K/AKT/mTOR 与癌细胞的增殖、微血管形成和转移蛋白的合成关系密切,且需要大量能量供应,在肝癌、胃癌、子宫癌等肿瘤细胞中均证实能上调 GLUT-1 的表达^[11]。

本研究显示 GLUT-1 和 HIF-1 α 在结直肠癌中的表达量明显高于在癌旁正常组织,表明在肠黏膜癌变的过程中,细胞膜上的 GLUT-1 和 HIF-1 α 表达水平不断上调,从而确保肿瘤对能量的摄取。进一步研究显示, GLUT-1 和 HIF-1 α 表达量与结直肠癌的病理分期、浸润深度、分化程度、淋巴结转移、肝转移和脉管浸润均明显相关,且散点图分析显示二者呈明显正相关。HIF-1 α 是调控癌细胞对缺氧耐受的关键蛋白,研究表明:在肝癌细胞内, HIF-1 α 能直接激活 GLUT-1 等糖酵解相关因子活性,从而满足肝癌细胞的能量摄取,增强其对缺氧的耐受性^[12];在胃肿瘤体外培养的细胞内,缺氧条件下应用 HIF-1 α 抑制剂处理后,癌细胞内活性氧比例更高,凋亡更显著^[13]。国内杨通印等^[14]对 142 结直肠癌组织免疫组化检测发现 GLUT-1 和 HIF-1 α 表达明显高于正常肠黏膜,且二者存在协同作用,在低氧环境下, HIF-1 α 表达上调能诱导 GLUT-1 高表达,加速癌细胞糖酵解,促进癌细胞浸润和转移。

综上, GLUT-1 异常表达对结直肠癌的发生和进展有重要作用,深入探究 GLUT-1 和 HIF-1 α 的作用机制有望为结直肠癌精确治疗提供重要的理论依据。

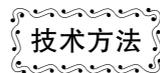
参考文献:

[1] 张玥, 石菊芳, 黄慧瑶, 等. 中国人群结直肠癌疾病负担分析 [J]. 中华流行病学杂志, 2015, 36(7): 709 - 714.
[2] Sharkas GF, Arqoub KH, Khader YS, et al. Colorectal cancer in Jordan: survival rate and its related factors [J]. J Oncol, 2017,

2017; 3180762.

- [3] Wei SB, Fan Q, Yang L, et al. Promotion of glycolysis by HOTAIR through GLUT1 upregulation via mTOR signaling [J]. Oncol Rep, 2017, 38(3): 1902 - 1908.
[4] Choi BH, Song HS, An YS, et al. Relation between fluorodeoxyglucose uptake and glucose transporter-1 expression in gastric signet ring cell carcinoma [J]. Nucl Med Mol Imaging, 2011, 45(1): 30 - 35.
[5] Kim HM, Jung WH, Koo JS. Site-specific metabolic phenotypes in metastatic breast cancer [J]. J Transl Med, 2014, 12: 354.
[6] 许良中, 杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判定标准 [J]. 中国癌症杂志, 1996, 6(4): 229 - 231.
[7] 刘卓, 宋冰, 李小寒. 结直肠癌筛查影响因素的研究进展 [J]. 中国医药导报, 2014, 11(2): 41 - 43.
[8] Dong H, Yang X, Xie J, et al. UP12, a novel ursolic acid derivative with potential for targeting multiple signaling pathways in hepatocellular carcinoma [J]. Biochem Pharmacol, 2015, 93(2): 151 - 162.
[9] 畅怡, 聂秀红, 曹若瑾, 等. 增龄对大鼠膈肌 Glut-1 和 Glut-4mRNA 表达的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(8): 15 - 17.
[10] Deng D, Xu C, Sun P, et al. Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1 [J]. Nature, 2014, 510(7503): 121 - 125.
[11] Fan R, Hou WJ, Zhao YJ, et al. Overexpression of HPV16 E6/E7 mediated HIF-1 α upregulation of GLUT1 expression in lung cancer cells [J]. Tumour Biol, 2016, 37(4): 4655 - 4663.
[12] 梁飞, 姬宏斌, 宫伟, 等. 肝细胞癌中 HIF-1 α 与 Glut1 表达的关系及意义 [J]. 实用癌症杂志, 2014, 29(1): 28 - 32.
[13] Tanaka T, Kitajima Y, Miyake S, et al. The apoptotic effect of HIF-1 α inhibition combined with glucose plus insulin treatment on gastric cancer under hypoxic conditions [J]. PLoS One, 2015, 10(9): e0137257.
[14] 杨通印, 郝朗松, 郭德正. 缺氧诱导因子 1 α 、葡萄糖转运蛋白 1 和乳酸脱氢酶 5 在结直肠癌的表达及其意义 [J]. 中华病理学杂志, 2017, 46(2): 93 - 97.

[收稿日期] 2017 - 12 - 13



新生树鼯多巴胺神经元的体外培养

李娟¹, 曾晓锋², 杨根梦², 仝品芬¹, 代解杰^{1*}

(1. 中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所, 云南省重大传染病疫苗研发重点实验室, 昆明 650118;
2. 昆明医科大学法医学院, 昆明 650500)

【摘要】 目的 分离培养鉴定树鼯多巴胺神经元, 为进一步建立多巴胺神经元功能异常疾病研究的细胞模型打下基础。方法 应用神经元专用培养基添加 B27 和 Glutamax 的培养液对新生树鼯多巴胺神经元进行体外培养。采用免疫荧光法对培养细胞进行鉴定。结果 成功培养出树鼯原代多巴胺神经元, 免疫荧光法检测酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH) 免疫阳性神经元达到(88.49 ± 2.4)%。结论 使用本方法可以培养出高纯度的树鼯多巴胺神经元。

【关键词】 多巴胺神经元; 原代培养; 树鼯

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 07-0082-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.07.014

In vitro culture of dopamine neurons from newborn tree shrew

LI Juan¹, ZENG Xiaofeng², YANG Genmeng², TONG Pinfen¹, DAI Jiejie^{1*}

(1. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College; Yunnan Key Laboratory of Major Infectious Diseases Vaccine Development, Kunming 650118, China. 2. School of Forensic Medicine, Kunming Medical University, Kunming 650500)

【Abstract】 **Objective** Isolation, culture, and identification of dopaminergic neurons from newborn tree shrew to establish a cellular model and study abnormal dopaminergic neurons. **Methods** B27 and Glutamax were added to culture medium for *in vitro* culture of dopaminergic neurons from tree shrew. The cultured cells were identified by immunofluorescence. **Results** Cells isolated from newborn tree shrew were identified as dopaminergic neurons. The rate of tyrosine hydroxylase (TH)-positive neurons was (88.49 ± 2.4)%. **Conclusions** This method can be used to culture dopaminergic neurons from tree shrew *in vitro*.

【Key words】 dopaminergic neurons; primary culture; tree shrew

树鼯(*Tupaia belangeri*)是生活在热带和亚热带地区的一种哺乳动物,在分类上它比啮齿类动物更接近于灵长类,且其体积小、易繁殖,因此是一种很有前途的动物模型^[1]。目前,树鼯主要用于病毒感染如丙肝、甲型流感 H1N1、肠道病毒 EV71 等^[2],神

经疾病障碍^[3-5],癌症^[6]及代谢疾病^[7]等方面的研究。有研究发现帕金森疾病(Parkinson's disease, PD)的发生与α-synuclein蛋白(一种广泛存在的突触前蛋白)密切相关,而树鼯的基因组测序结果显示,其α-synuclein蛋白序列与人类的序列同源性为

【基金项目】 国家自然科学基金项目(编号:81560303,81660310);云南省联合支持国家计划项目(编号:2015GA009);云南省科技人才和平台计划项目(编号:2017HC019);重点实验室运行补助专项(编号:2017DG008);云南省重大科技专项(编号:2017ZF007)。

【作者简介】 李娟(1980—),女,在读博士,主要从事病原生物学研究。E-mail: 121093258@qq.com

【通信作者】 代解杰,男,研究员,研究方向:疾病动物模型研究。E-mail: dj@imbcams.com.cn

97.1%,因此推测树鼩是研究 PD 的合适动物模型^[4]。多巴胺作为一种单胺类神经递质,在哺乳动物中枢神经系统中起着非常重要的生理功能,包括情感认识、思维认知、记忆力以及运动等,多巴胺神经元不仅在帕金森病的发病过程中起着关键作用,还与很多精神性疾病,如多动症和药物性神经毒性如甲基苯丙胺的大脑损害等高度相关^[8-9]。因此寻找一种高效、高纯度且简单易行的树鼩多巴胺神经元原代培养方法,是研究 PD 及其他多巴胺神经功能异常疾病的基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

新生 3 d 内中缅树鼩 4 只,普通级,雌雄各半,体重 9.4 ~ 17.5 g,平均(13.2 ± 3.7) g,由中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心提供[SCXK(滇)K2013-0001],实验在中国医学科学院医学生物学研究所开展[SYXK(滇)K2013-0001]。实验过程中做到实验动物使用的 3R 原则,实验程序遵循福利伦理要求(福利伦理审查号:DWSP2017053)。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM/F12、胎牛血清、双抗、0.25% 胰酶消化液、PBS 以及 D-Hank's 液购自 Hyclone 公司; Neurobasal-A 培养基、无血清培养添加剂 B27、Glutamax 购自 Gibco 公司;鼠抗酪氨酸羟化酶(TH)购自 Scata 公司;鼠抗 β -tubulin-III、兔抗 nestin 以及 Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor 488) 购自 Abcam 公司, Alexa Fluor 555 标记山羊抗兔荧光 IgG 购自 ThermoFisher Scientific 公司。Ti 荧光显微镜购自 Nikon 公司;SP5 共聚焦荧光显微镜购自 Leica 公司;PDL 包被的细胞瓶、6 孔板及共聚焦专用培养皿购自 Nest 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 原代细胞培养

根据廖慧丹等^[10]实验方法进行改良,取新生 3 d 内树鼩,皮下注射戊巴比妥钠麻醉,取离体头部放入 75% 酒精的培养皿浸泡 5 min;将头部取出放入干净培养皿中,在无菌超净台内,用无菌手术剪及镊子取出脑,放入 4℃ 预冷的含 2% 双抗的 D-Hank's 液中,去除软膜血管,剥离出中脑组织;用 D-Hank's 液清洗后,将组织剪碎至 1 mm 大小,转入 50 mL 离心管,2000 r/min 离心 5 min,弃上清,按

照体积 1:3 比例加入 0.25% 胰酶消化液(即离心管中剩余物与 0.25% 胰酶消化液的体积比为 1:3),反复吹打后放入 37℃、5% CO₂ 温箱消化 10 ~ 15 min;消化结束后,向离心管中加入含 5% 胎牛血清的细胞培养液(DMEM/F12,1% 双抗,5% FBS)终止消化,反复吹打消化后的细胞直至无肉眼可见的组织块,之后采用 70 目细胞筛过滤,滤液 2000 r/min 离心 10 min;弃上清,用上述培养基重悬细胞,调整细胞密度为 1×10^6 /mL,并转入 PDL 包被的细胞瓶上培养,培养 3 d 后换液,更换为神经元专用培养基(Neurobasal-A 培养基含 2% B27,1% Glutamax,1% 双抗),以后每 3 d 换一次液。

1.3.2 免疫荧光染色

接种在共聚焦显微镜专用培养皿的细胞,培养 14 d 时,吸出培养液,PBS 洗 2 遍,每次 5 min;加入 4℃ 预冷的 4% 多聚甲醛,覆盖即可,放入 4℃ 冰箱固定 30 min;室温下,吸出 4% 多聚甲醛,PBS 洗 3 遍,每次 5 min;加入 0.1% TritonTM X-100(PBS 配制),覆盖即可,20 min 后吸出,然后 PBS 洗 3 遍,每次 5 min;用体积浓度为 5% 山羊血清(PBS 配制)封闭 1 h。PBS 清洗 3 次,每次 5 min;加入一抗稀释液稀释的 nestin(1:100)、TH(1:100)、 β -tubulin-III(1:100),覆盖即可,放入 4℃ 冰箱孵育过夜;在室温下,吸取上述液体,PBS 洗 3 遍,每次 5 min;加入 PBS 稀释的二抗,稀释比例为 1:200,37℃ 孵育 1 h;PBS 清洗 3 次,每次 5 min;吸出二抗,PBS 洗 3 遍,每次 5 min。加入核染色剂 DAPI(1:500),室温染色 3 min,PBS 洗 3 遍,每次 5 min,然后用荧光倒置显微镜观察结果后用激光共聚焦显微镜拍照。

1.4 统计学方法

TH 阳性率计算:随机选取 5 个视野,以 DAPI 进行核染色为细胞总数,TH 染色阳性为阳性多巴胺神经元,计算 TH 阳性率,结果以平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 树鼩原代多巴胺神经元体外形态学观察

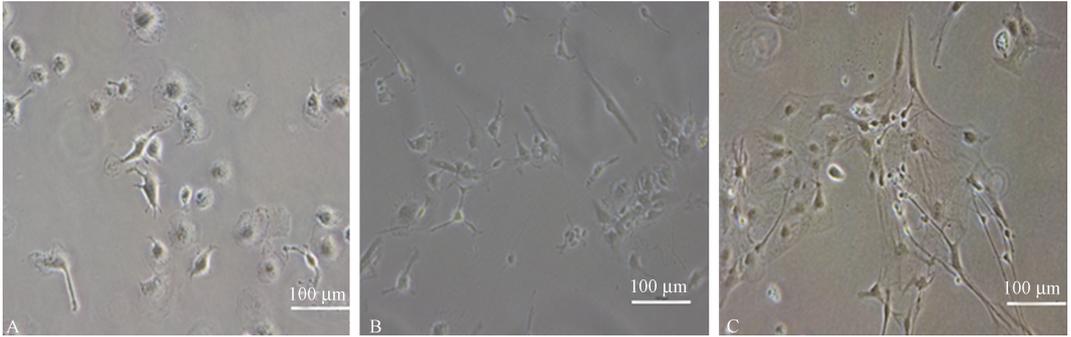
原代分离的单个细胞多呈圆形且具有折光性,细胞计数台盼蓝染色显示,细胞存活率为 90% ~ 95%。培养 3 d 后部分细胞贴壁,呈圆状凸起,周围边界清晰(图 1A);培养 7 d 时贴壁的神经元逐渐长出轴突(图 1B),随着时间增长细胞的轴突突起之间发生联系并交织成网状(图 1C)。

2.2 树鼯原代多巴胺神经元体外分化能力的鉴定

分别在细胞培养 7 d 和 14 d 时进行 anti-nestin 和 anti- β -tubulin-III 双免疫荧光鉴定(图 2)。当细胞培养 7 d 时,红色荧光的 nestin 的数量明显多于绿色荧光的 β -tubulin-III(图 2A),随着时间增长,细胞逐渐分化当培养至第 14 天时,绿色荧光的 β -tubulin-III 开始增多,与红色荧光的 nestin 的数量相当(图 2B)。

2.3 树鼯原代多巴胺神经元鉴定

当细胞培养至 14 d 时,进行 anti-TH 和 anti-nestin 双免疫荧光鉴定(图 3)。在高倍视野下随机选取 5 个视野,以 DAPI 进行细胞核染色代表细胞总数,TH 染色阳性代表阳性多巴胺神经元,计算 TH 阳性率,结果显示 TH 阳性占细胞总数的 $(88.49 \pm 2.4)\%$ (表 1)。

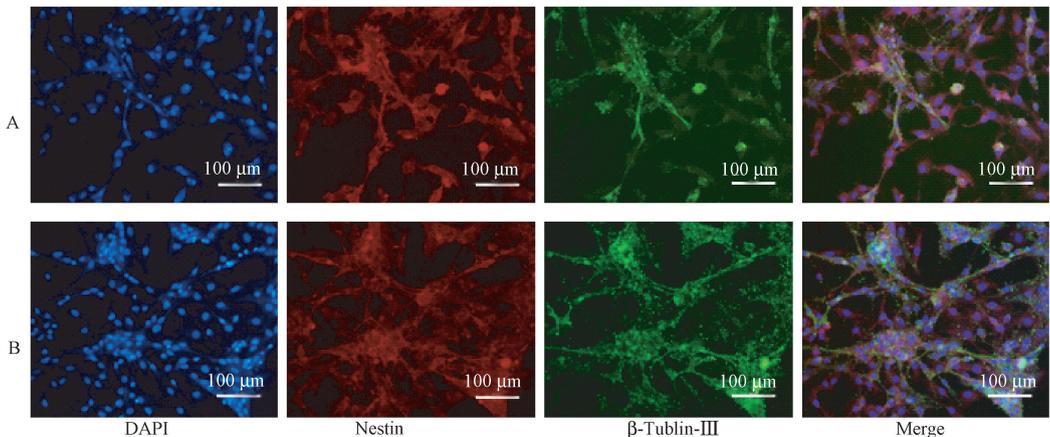


注:A:细胞培养 3 d,神经元贴壁,呈圆状凸起,周围边界清晰;B:细胞培养 7 d 神经元逐渐长出轴突;C:细胞培养 14 d 时,神经元的轴突突起之间发生联系并交织成网状。

图 1 树鼯原代神经元不同培养时间的形态($\times 200$)

Note. A: On day 3 of cell culture, neurons adhered to the culture vessel, which were rounded with a clear surrounding boundary. B: Neurons had gradually grown axons by day 7. C: At day 14, the axons of neurons were connected and interwoven into a network.

Figure 1 Morphology of primary neurons of the tree shrew

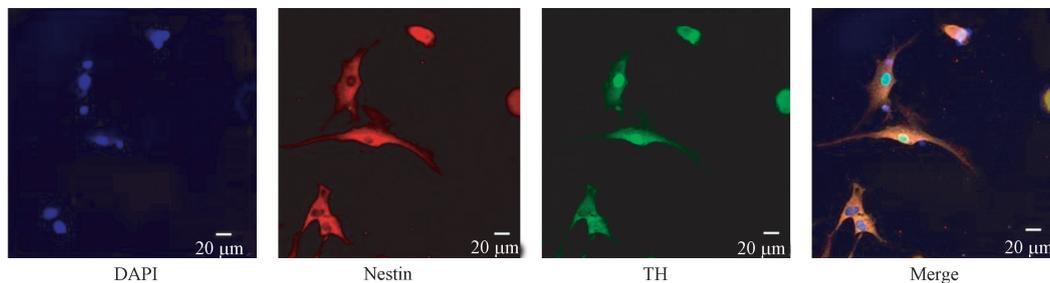


注:A:细胞培养 7 d;B:细胞培养 14 d。蓝色荧光为 DAPI 染细胞核;红色荧光为神经元特异标记蛋白 nestin 抗体;绿色荧光为 β -tubulin-III 抗体。

图 2 树鼯原代神经元不同培养时间的免疫荧光鉴定($\times 200$)

Note. A: Cells cultured for 7 days; B: Cells cultured for 14 days. Blue fluorescence indicates nuclei; Red fluorescence indicates nestin; Green fluorescence indicates β -tubulin-III.

Figure 2 Morphology of primary neurons of the tree shrew



注:蓝色荧光为 DAPI 染细胞核;红色荧光为神经元特异标记蛋白 nestin 抗体;绿色荧光为多巴胺神经元特异标记蛋白酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)抗体。

图 3 树鼯原代多巴胺神经元免疫学鉴定

Note. Blue fluorescence indicates nuclei; Red fluorescence indicates nestin; Green fluorescence indicates tyrosine hydroxylase (TH).

Figure 3 Immunofluorescence of primary dopaminergic neurons from the tree shrew

表 1 树鼯多巴胺神经元原代培养阳性率

Table 1 TH-positive rate of *in vitro*-cultured dopaminergic neurons from the tree shrew

视野 Views	细胞总数 Total number of cells	TH 阳性细胞数 Number of TH-positive cells	比例 (%) Percentage
1	70	64	91.4286
2	88	78	88.6364
3	115	99	86.0870
4	103	93	90.2913
5	143	123	86.0140
平均值 Mean	103.8	91.4	88.4915

3 讨论

神经干细胞是一种具有自我更新和分化潜能的细胞,可以分化为神经元和神经细胞如星形胶质细胞及少突胶质细胞等,而神经元对机体的神经发育以及修复受损的神经组织起到重要作用。神经干细胞的原代培养受到各种因素影响如培养细胞的质量,包括取样时间、位置、细胞密度、培养时间、细胞因子和血清浓度等^[11-12]。Xiong 等^[12]在神经干细胞的原代培养中加入神经生长因子(nerve growth factor, NGF)可以显著促进神经干细胞的成活率,但是 NGF 价格昂贵,在现代节约型社会中寻找另外一种廉价高效、经济实惠的培养方法显得更为重要,因此本实验旨在寻找一种更加经济实惠的多巴胺神经元培养方法,为研究多巴胺神经元相关的功能障碍疾病提供细胞模型。

巢氏蛋白(nestin)是一种中间丝蛋白,在中枢神经系统发育过程中,巢氏蛋白最先在神经前体细胞中表达,当神经前体细胞朝向终末方向分化时便停止表达,因此巢氏蛋白是神经干细胞早期的标志^[13]。微管蛋白是构成细胞骨架的一种蛋白,而β-微管蛋白-III(β-tublin-III)则表达在分化的轴突

和触突上,是神经元特有的标志物^[14]。在本试验中培养 7 d 后细胞表达多以 nestin 蛋白为主,而 14 d 之后则多以 β-tublin-III 蛋白为主,显示了神经干细胞逐渐向多巴胺神经元分化的时间发育过程。

目前诱导神经干细胞向神经元分化的方法较多,如添加生长因子 bEGF、EGF、GDNF 等,中药诱导如三七总皂苷^[15],或者用骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞^[16],但 these 方法诱导神经干细胞分化成神经元的比例却不高。陈梅玲等^[17]用 GDNF 诱导神经干细胞向多巴胺神经元分化,其 TH 阳性率仅为 6.6%,而韩姝等^[18]使用重组腺病毒加抗坏血酸共同诱导神经干细胞向多巴胺神经元分化,TH 阳性率达到 74%。本试验对神经干细胞使用低浓度血清进行贴壁培养,然后使用无血清培养基即神经元专用培养基以抑制胶质细胞生长。神经元专用培养基(Neurobasal-A)本身含有神经元生长所需的生长因子,非常有利于神经元的生长、增殖,且价格适中,培养 14 d 之后 TH 阳性率达到 88.49%。

多巴胺神经元是一类具有分泌并释放多巴胺作为神经递质的神经元,在维持正常脑功能中起着重要作用。而多巴胺神经元功能异常则会引起帕金森综合征或一些精神类疾病的发生,因此多巴胺

神经元的体外培养是研究这些疾病的基础。本文培养多巴胺神经元的方法具有简单经济,容易操作,通过本方法能够得到较高纯度的多巴胺神经元,对于研究相关疾病的发病、治疗等提供一个实验基础。

参考文献:

- [1] Fan Y, Huang ZY, Cao CC, et al. Genome of the Chinese tree shrew [J]. Nat Commun, 2013, 4: 1426.
- [2] 殷安国, 匡德宣, 李晓飞, 等. 树鼩模型在人类病毒性疾病研究中的应用进展 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(2): 86-89.
- [3] Feng R, Li S, Li F. Toll-like receptor 4 is involved in ischemic tolerance of postconditioning in hippocampus of tree shrews to thrombotic cerebral ischemia [J]. Brain Res, 2011, 1384: 118-127.
- [4] Ma KL, Gao JH, Huang ZQ, et al. Motor function in MPTP-treated tree shrews (*Tupaia belangeri chinensis*) [J]. Neurochem Res, 2013, 38(9): 1935-1940.
- [5] Wang J, Zhou QX, Tian M, et al. Tree shrew models: a chronic social defeat model of depression and a one-trial captive conditioning model of learning and memory [J]. Zoological Research, 2011, 32(1): 24-30.
- [6] Ye L, He M, Huang Y, et al. Tree shrew as a new animal model for the study of lung cancer [J]. Oncol Lett, 2016, 11(3): 2091-2095.
- [7] Cao J, Yang EB, Su JJ, et al. The tree shrews: adjuncts and alternatives to primates as models for biomedical research [J]. J Med Primatol, 2003, 32(3): 123-130.
- [8] 郭超, 丁玉强. 多巴胺和 5-羟色胺神经元发育的基因调控途径 [J]. 自然杂志, 2009, 31(3): 142-147, 15.
- [9] Li B, Chen R, Chen L, et al. Effects of DDIT4 in methamphetamine-induced autophagy and apoptosis in dopaminergic neurons [J]. Mol Neurobio, 2017, 54(3): 1642-1660.
- [10] 廖慧丹, 龙玲玲, 闫杰. 三种皮质神经元原代培养方法的改良及对比 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(4): 410-414.
- [11] Marei HE, Althani A, Afifi N, et al. Over-expression of hNGF in adult human olfactory bulb neural stem cells promotes cell growth and oligodendrocytic differentiation [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e82206.
- [12] Xiong LL, Chen ZW, Wang TH. Nerve growth factor promotes *in vitro* proliferation of neural stem cells from tree shrews [J]. Neural Regen Res, 2016, 11(4): 591-596.
- [13] Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein [J]. Cell, 1990, 60(4): 585-595.
- [14] Perry B, Jensen-Smith HC, Ludueña RF, et al. Selective expression of β tubulin isotypes in gerbil vestibular sensory epithelia and neurons [J]. J Assoc Res Otolaryngol, 2003, 4(3): 329-338.
- [15] 杨晓青, 刘英富, 徐云强, 等. 神经干细胞向神经元定向诱导分化方法的研究进展 [J]. 医学综述, 2014, 20(18): 3264-3270.
- [16] 苗雨润, 李娜, 匡德宣, 等. 体外诱导树鼩骨髓间充质干细胞向神经样细胞分化的实验研究 [J]. 实验动物与比较医学, 2017, 37(5): 337-343.
- [17] 陈梅玲, 沈岳飞, 李清华, 等. 不同浓度 GDNF 诱导神经干细胞向多巴胺能神经元分化研究 [J]. 重庆医学, 2011, 40(22): 2785-2187, 2190.
- [18] 韩姝, 师伟, 李艳华, 等. Wnt 3a 在神经干细胞向多巴胺能神经元分化过程中作用的研究 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2006, 33(10): 971-977.

[收稿日期]2018-03-07