

卢延华,管博文,刘旭,等. 模拟衰老大鼠星形胶质细胞条件培养基对神经干细胞增殖能力的影响[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(2): 153-160.

Lu YH, Guan BW, Liu X, et al. Effects of rat senescent astrocytes on the proliferation of neural stem cells [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(2): 153-160.

Doi:10. 3969/j.issn.1005-4847. 2020. 02. 001

模拟衰老大鼠星形胶质细胞条件培养基对神经干细胞增殖能力的影响

卢延华,管博文,刘旭,吕颖,王卫,魏强,孟爱民*

(中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室,北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心,北京 100021)

【摘要】 目的 建立大鼠星形胶质细胞衰老模型,模拟老年大鼠体内星形胶质细胞衰老,探讨衰老的星形胶质细胞条件培养基对神经干细胞增殖能力的影响。**方法** 采用胰酶消化法分离新生 1 d 大鼠皮层星形胶质细胞和 15 d 胎鼠端脑神经干细胞,200 μmol/L H₂O₂ 诱导星型胶质细胞 4 h 建立衰老模型;收取培养 3 d 和 7 d 衰老细胞上清作为条件培养基,以 1:3 或 1:2 的比例加入神经干细胞增殖培养基中,通过神经干细胞及神经球计数观察对增殖功能的影响,以正常星型胶质细胞条件培养基作为对照。**结果** 3 d 正常条件培养基对神经干细胞短期增殖无影响,对长期增殖有抑制作用;3 d 衰老条件培养基抑制神经干细胞的增殖;7 d 正常条件培养基促进神经干细胞短期增殖,对长期增殖有抑制作用;7 d 衰老条件培养基抑制神经干细胞的增殖,抑制作用大于正常条件培养基。**结论** H₂O₂ 诱导衰老的星形胶质细胞抑制神经干细胞的增殖,对长期增殖的抑制作用大于正常星形胶质细胞。

【关键词】 衰老星形胶质细胞;神经干细胞;增殖能力

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 02-0153-08

Effects of rat senescent astrocytes on the proliferation of neural stem cells

LU Yanhua, GUAN Bowen, LIU Xu, LYU Ying, WANG Wei, WEI Qiang, MENG Aimin*

(Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS); Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC); NHC Key Laboratory of Human disease Comparative Medicine; Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Critical diseases, Beijing 100021, China)

Corresponding author: MENG Aimin. E-mail: aiminmeng@cnilas.org

【Abstract】 Objective To investigate the effects of rat senescent astrocytes on the proliferation of neural stem cells using an H₂O₂-induced senescent astrocyte model. **Methods** Primary cortical astrocytes and telencephalic neural stem cells were isolated by trypsin digestion from newborn and fetal rats, respectively. Rat astrocytes were incubated for 4 h with H₂O₂ to establish the senescent model. The supernatants of senescent cells cultured for 3 and 7 days were collected as conditioned medium, then added at a ratio of 1:3 or 1:2 to observe its effect on neural stem cell counts and neurosphere counts (proliferation). Normal astrocyte conditioned medium was used as control medium. **Results** The 3 d normal conditioned medium had no effect on the short-term proliferation of neural stem cells, but inhibited their long-term

[基金项目] 中国医学科学院医学与健康科技创新工程经费资助(2017-I2M-3-015);国家重点研发计划(2017YFA0105204);国家自然科学基金(81573094)。

Funded by CAMS Innovation Fund for Medical Sciences(CIFMS, 2017-I2M-3-015), National Key R&D Program of China (2017YFA0105204) and National Natural Science Foundation of China (81573094).

[作者简介] 卢延华(1993—),女,在读硕士研究生,研究方向:神经干细胞治疗神经系统疾病。Email: 2439660316@qq.com

[通信作者] 孟爱民(1963—),女,研究员,博士,研究方向:成体干细胞损伤机制研究。Email: aiminmeng@cnilas.org

proliferation. The 3 d senescent conditioned medium inhibited the proliferation of neural stem cells. The 7 d normal conditioned medium promoted the short-term proliferation of neural stem cells and inhibited their long-term proliferation. The 7 d senescent medium inhibited the proliferation of neural stem cells, and the inhibitory effect was greater than that of normal medium. **Conclusions** Rat senescent astrocytes induced by H_2O_2 inhibited the proliferation of neural stem cells, and the inhibition of long-term proliferation was greater than that of normal astrocytes.

【Keywords】 senescent astrocyte; neural stem cell; proliferation

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

目前,越来越多的研究证明细胞衰老与疾病的发生发展关系密切^[1],而脑内细胞的衰老与神经系统疾病的关系也逐渐得到研究者的关注^[2-3]。星形胶质细胞是脑内存在数量最多的细胞类型,疾病损伤会使星形胶质细胞衰老,星形胶质细胞出现功能障碍时,对大脑的结构和功能具有较大的影响,一方面结构支持功能丧失,另一方面也通过分泌衰老相关分泌表型(senescence-associated secretory phenotypes, SASP)、降低神经营养因子的分泌改变脑内微环境损伤神经细胞^[4-5]。另外,神经退行性疾病和脑卒中多发于中老年人,目前仍然缺乏有效治疗,随着再生医学的发展,从上世纪末开始进行干细胞治疗的实验研究,大量的动物实验表明通过移植干细胞可有效改善疾病症状^[6],但老年动物模型疗效比年轻动物模型差^[7],说明不同的大脑微环境会对干细胞的功能产生影响,降低干细胞疗效。本研究模拟老年大鼠体内星形胶质细胞衰老,建立大鼠星形胶质细胞衰老模型,检测衰老的星形胶质细胞是否对胎鼠端脑神经干细胞增殖产生影响,用以探讨衰老的星形胶质细胞所导致的脑组织微环境的改变是否可以影响干细胞的功能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠孕 15 d 胚胎及出生 1 d 新生鼠,购于北京华阜康生物科技股份有限公司【SCXK(京)2014-0004】。本实验通过了实验动物伦理审查会审批(IACUC 号:MAM19001)。

1.1.2 试剂与仪器

DMEM/F12 HEPES 培养基(Gibco, 11330032), B27(Gibco, 17504044), NEAA(Gibco, 11140050), N2 添加剂(invitrogen, 17502048), rat EGF(peprotech, 400-25-20), rat bFGF(peprotech, 400-29-10), L-谷氨酰胺(solarbio, G0200), 青链霉素(碧云天, C0222), FBS(hyclone, SH30406.05), 30%

H_2O_2 (天津市大茂化学试剂), 0.25% trypsin(hyclone, SH30042.01), accutase 消化酶(gibco, A1110501), Poly-D-lysine hydrobromide(PDL, sigma, P0296), 细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色试剂盒(β -gal, 碧云天, C0602), Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein(GFAP) antibody(R&D, MAB1195), Anti-nestin Antibody(chemicon, MAB353), Goat anti-Rabbit IgG secondary antibody, Alexa Fluor 594(invitrogen, R37117), Goat anti-Rat IgG Secondary Antibody, Alexa Fluor 594(invitrogen, A11007), 封闭用正常山羊血清工作液(北京中山金桥生物科技公司, ZLI9056), MTT(Thermo Fisher, M6494)。

荧光显微镜(leica, DMi8, 德国), 酶联免疫检测仪(Thermo Fisher, 51119200, 美国), countstar 自动细胞计数仪(上海睿钰生物科技有限公司, IC-1000, 中国)。

1.2 方法

1.2.1 原代细胞分离及纯化

新生大鼠皮层星形胶质细胞(astrocyte, AS)^[8]: 取新生鼠大脑, 剪去嗅球、小脑和脑干, 夹取皮层机械剪碎呈乳糜状, 加入 0.25% trypsin 37℃ 消化 15 min, 待组织呈絮状时加入 10% FBS/DMEM 终止消化, 1000 r/min 离心 7 min, 弃上清, 以 AS 培养基(DMEM/F12+10% FBS+1% L-谷氨酰胺+1% 双抗)重悬, 过滤并计数, 调整细胞浓度为 1×10^6 /mL, 接种在事先用 PDL 包被过的 25T 培养瓶中, 细胞贴壁生长, 4 h 后更换培养基, 之后连续培养数天, 待细胞长满基本融合, 置 37℃ 恒温摇床以 200 r/min 振荡 4 h 进行纯化, 弃去培养基, 加入 0.25% trypsin 消化 5 min, 收集细胞悬液, 1500 r/min 离心 5 min, 弃上清, AS 培养基重悬并继续培养至第 3 代备用。

胎鼠端脑神经干细胞(neural stem cell, NSC)^[9]: 取胎鼠大脑, 剪去嗅球、小脑和脑干, 机械剪碎呈乳糜状, 加入 accutase 消化 15 min, 待组织呈絮状时 1000 r/min 离心 7 min, 弃上清, 以 NSC 增殖培养基(DMEM/F12+2% B27+20 ng/mL EGF+20

ng/mL bFGF+1% L-谷氨酰胺+1% 双抗+1% N2 添加剂+1% NEAA)重悬,过滤并计数,调整细胞浓度为 1×10^6 /mL,接种在 25T 培养瓶中,细胞悬浮生长,第 2 天换液,继续培养至第 3 代备用。

1.2.2 细胞免疫荧光检测

胶质原纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 是 AS 的特异性蛋白,是一种胞浆内丝状蛋白;巢蛋白 (nestin) 表达于胞浆,是 NSC 的特征性蛋白。将第 3 代 AS 和 NSC 分别制备成浓度为 1×10^5 和 1×10^6 /mL 的单细胞悬液,24 孔板每孔加 0.5 mL 细胞悬液,其中加 NSC 的孔需事先用 PDL 包被,孵箱培养 24 h,4%多聚甲醛固定 15 min,0.05% TritonX-100 破膜 15 min,山羊血清封闭 1 h,滴加稀释 200 $\times$ 的一抗,4 $^{\circ}$ C 过夜,避光条件下滴加稀释 200 $\times$ 的相应的荧光二抗,室温孵育 1 h,DAPI 封闭液封片,荧光显微镜下照相观察。随机选择 8 个视野($\times 200$)至少 200 个细胞计算阳性率。

1.2.3 H₂O₂ 诱导大鼠星形胶质细胞衰老及条件培养基的收集

将 AS 浓度以 1×10^5 /mL 接种在 25T 培养瓶中,培养 48 h 后,分为两组,对照组:培养基更换为不含 H₂O₂ 的 DMEM/F12 培养基;衰老组:培养基更换为含 200 μ mol/L H₂O₂ 的 DMEM/F12 培养基,培养 4 h,再次更换为 DMEM/F12 培养基连续培养 3 d 或 7 d,收集星形胶质细胞条件培养基 (astrocyte conditioned medium, ACM) 和衰老星形胶质细胞条件培养基 (senescent astrocyte conditioned medium, SACM)。

1.2.4 ACM 和 SACM 处理胎鼠端脑神经干细胞:

96 孔板每孔接种 5×10^3 个 NSC (浓度为 5×10^4 /mL),实验按加入 AS 条件培养基的不同分 5 组:control 组,培养基为 NSC 增殖培养基;ACM1 组,ACM 与 NSC 增殖培养基比例为 1:3;ACM2 组,ACM 与 NSC 增殖培养基比例为 1:2;SACM1 组,SACM 与 NSC 增殖培养基比例为 1:3;SACM2 组,SACM 与 NSC 增殖培养基比例为 1:2。培养 3 d 或 7 d 后,显微镜下照相,随机选择 8 个视野 (100 $\times$) 计算神经球数量(/mL),之后收集细胞悬液,制备成单细胞悬液进行计数(/mL)。

1.2.5 MTT 法测大鼠星形胶质细胞活力

将 AS 浓度以 0、 0.625×10^4 、 1.25×10^4 、 2.5×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 /mL 接种在 96 孔板中,每孔 100 μ L,设 6 个平行孔,分别在第 1、3、5、7 天进行

MTT 实验,每孔加 MTT 溶液 (10 g/L) 20 μ L,继续培养 4 h 后终止培养,弃去培养液,每孔加 150 μ L DMSO,振荡 10 min,选择 570 nm 波长 (参比波长 630 nm),在酶联免疫监测仪上测定各孔光吸收值 (OD)^[10]。

1.2.6 β -gal 染色

星形胶质细胞诱导衰老培养 3 d 或 7 d 后,按试剂盒提供的方法进行 β -gal 染色。加入 β -gal 固定液室温固定 15 min,去除固定液加入 β -gal 染色工作液,37 $^{\circ}$ C 孵育过夜 (无 CO₂),显微镜下照相观察。随机选择 8 个视野($\times 200$)至少 200 个细胞计算阳性率。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计分析数据,实验数据以平均值 $\pm$ 标准误 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA),以 *P* < 0.05 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 大鼠皮层星形胶质细胞和胎鼠端脑神经干细胞的分离及鉴定

对培养至第 3 代的 AS 和 NSC 分别进行抗 GFAP 和抗 nestin 免疫荧光染色,结果显示细胞表达 GFAP 的阳性率为 (97.15 $\pm$ 1.48)% (见图 1),细胞表达 nestin 的阳性率为 (98.03 $\pm$ 1.36)% (见图 1),即分离的原代大鼠 AS 和 NSC 纯度均在 95% 以上。

2.2 大鼠星形胶质细胞增殖活力

通过 MTT 法测定 AS 增殖活性,结果显示不同浓度细胞接种后在第 3~5 天为对数生长期,增殖速度较快,之后慢慢降低,其中细胞浓度在 2.5×10^4 、 5×10^4 /mL 时始终保持稳定增长,见图 2。

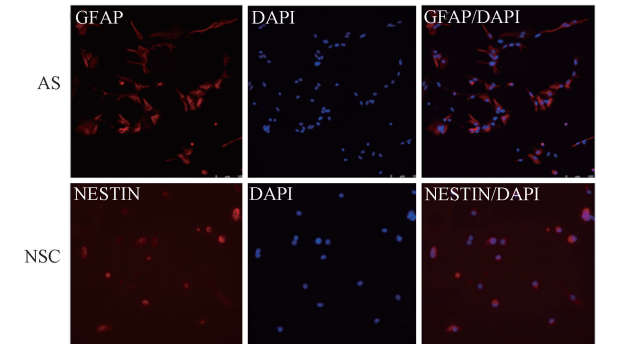


图 1 大鼠原代星形胶质细胞和神经干细胞($\times 200$)
Figure 1 Rat primary AS and NSC ($\times 200$)

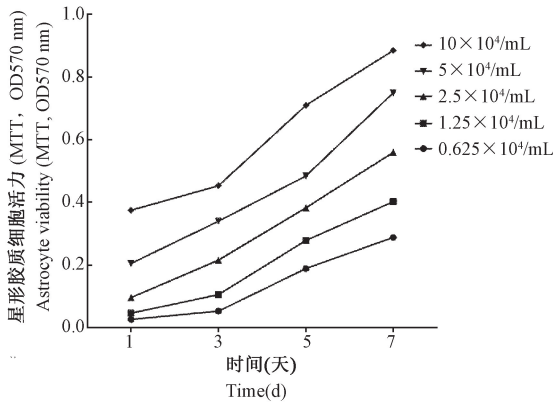


图 2 大鼠星形胶质细胞生长曲线

Figure 2 Cell growth curve of rat AS

2.2 H₂O₂ 诱导大鼠星形胶质细胞衰老

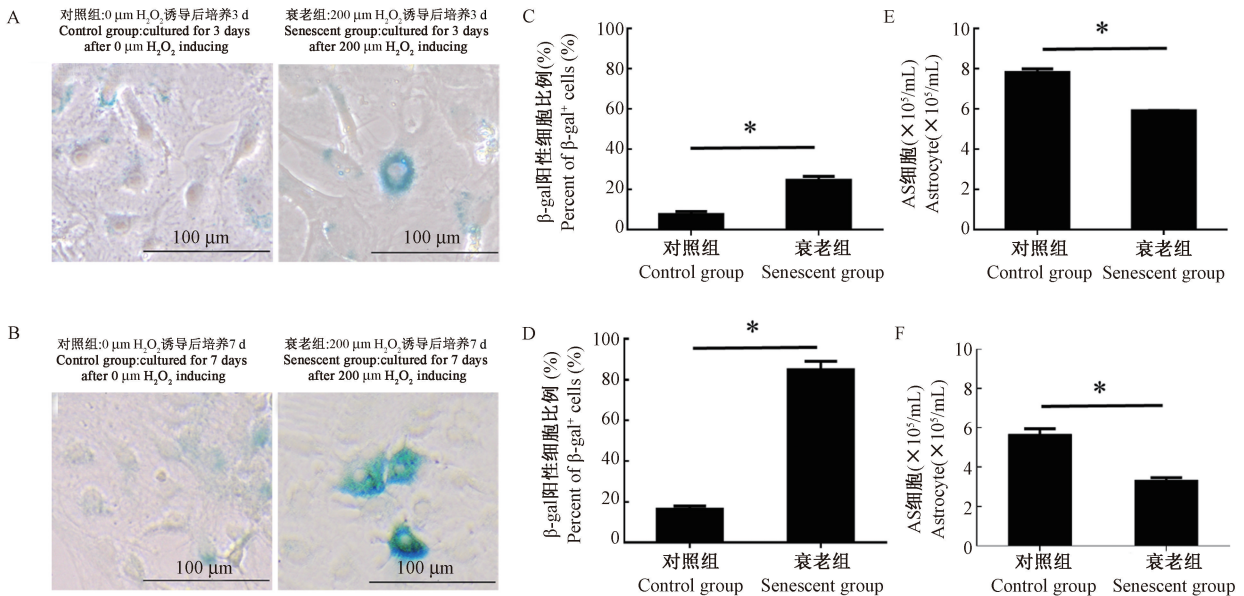
AS 经 H₂O₂ 诱导后,衰老细胞胞体变大呈扁平状,β-gal 染色阳性(见图 3A、B),与对照组相比,培养 3 d 和 7 d 后 β-gal 阳性细胞数分别增加(16.95 ± 1.93)%、(68.40 ± 4.16)% (见图 3C、D),AS 细胞数量分别减少(24.27 ± 1.56)%、(41.10 ± 2.22)%

(见图 3E、F),差异均有显著性($P < 0.05$),提示 200 μmol/L H₂O₂ 诱导 4 h 能够使 AS 衰老,结果见图 3。

2.3 衰老大鼠星形胶质细胞条件培养基对胎鼠端脑神经干细胞短期增殖能力的影响

为观察衰老 AS 对 NSC 短期增殖能力的影响,分别收集连续培养 3 d 和 7 d 的 ACM 和 SACM,以不同的比例加入 NSC 增殖培养基中,培养 3 d 后对 NSC 的增殖情况进行检测。

结果显示,加入 3 d 条件培养基,ACM2 组、SACM1 组和 SACM2 组均可使神经球数量减少($P < 0.05$),条件培养基的含量越高,神经球数量越少,直径越大,见图 4A、B。消化为单个细胞计数结果显示,ACM 组神经干细胞的数量变化没有显著性差异,而 SACM1 组神经干细胞数量降低(18.13 ± 5.49)%;SACM1 组与 ACM1 组相比降低(22.99 ± 5.43)%,SACM2 组与 ACM2 组相比降低(18.98 ± 3.57)%,差异均具有显著性($P < 0.05$),见图 4C。

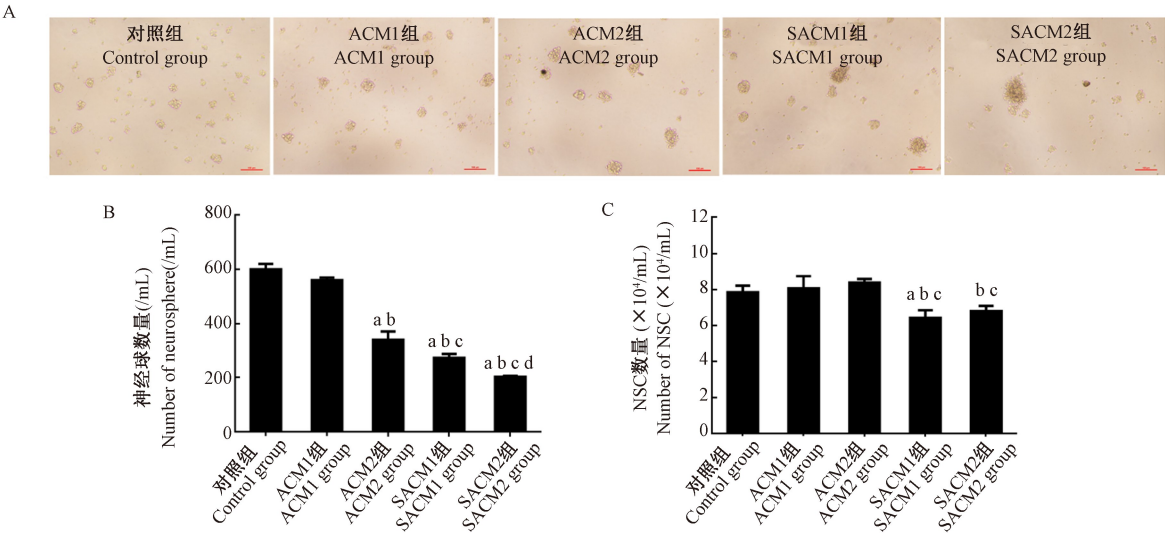


注: A: H₂O₂ 诱导后培养 3 d AS β-gal 染色(× 200);B: H₂O₂ 诱导后培养 7 d AS β-gal 染色(× 200);C: H₂O₂ 诱导后培养 3 d β-gal 阳性细胞比例;D: H₂O₂ 诱导后培养 7 d β-gal 阳性细胞比例;E: H₂O₂ 诱导后培养 3 d AS 细胞数量差异;F: H₂O₂ 诱导后培养 7 d AS 细胞数量差异。与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图 3 H₂O₂ 诱导星形胶质细胞衰老

Note. A, Stained with β-gal 3 days after H₂O₂ induction (× 200). B, Stained with β-gal 7 d after H₂O₂ induction (× 200). C, Percent of β-gal⁺ cells 3 d after H₂O₂ induction. D, Percent of β-gal⁺ cells 7 d after H₂O₂ induction. E, Number of AS 3 d after H₂O₂ induction. F, Number of AS 7 d after H₂O₂ induction. Compared with control group, * $P < 0.05$.

Figure 3 Senescent AS induced by H₂O₂ exposure



注:A:3 d 条件培养基培养 NSC 3 d 后增殖情况 (× 200)。B: 神经球数量的变化。C: NSC 总数量的变化。与对照组相比,^a $P < 0.05$;与 ACM1 (ACM:NSC 为 1:3) 组相比,^b $P < 0.05$;与 ACM2 (ACM:NSC 为 1:2) 组相比,^c $P < 0.05$;与 SACM1 (SACM:NSC 为 1:3) 组相比,^d $P < 0.05$ 。

图 4 3 d 条件培养基对 NSC 短期增殖功能的影响

Note. A, Proliferation of NSC cultured for 3 ds (× 200). B, Number of neurosphere. C, Number of NSC. Compared with control group, ^a $P < 0.05$. Compared with ACM1 (ACM:NSC = 1:3) group, ^b $P < 0.05$. Compared with ACM2 (ACM:NSC = 1:2) group, ^c $P < 0.05$. Compared with SACM1 (SACM:NSC = 1:3) group, ^d $P < 0.05$.

Figure 4 Effects of 3 d conditioned medium on short-term proliferation of NSC

加入 7 d 条件培养基,ACM 或者 SACM 均可使神经球数量减少 ($P < 0.05$),条件培养基的含量越高,神经球数量越少,直径越大,见图 5A、B。消化为单个细胞计数结果显示,ACM2 组神经干细胞数量增加 (22.21 ± 7.02)%,SACM2 组降低 (24.25 ± 6.93)%;SACM1 组和 SACM2 组与 ACM2 组相比分别降低 (13.48 ± 3.10)%、(38.02 ± 5.67)%,SACM2 组与 SACM1 组相比降低 (28.36 ± 6.55)%,差异均具有显著性 ($P < 0.05$),见图 5C。

以上结果显示,3 d SACM 对 NSC 短期增殖有抑制作用,7 d ACM 促进 NSC 增殖,7 d SACM 抑制神经干细胞的增殖,并且加入 SACM 比例越大,抑制作用越显著。此外,加入条件培养基可使神经球数量减少,SACM 比 ACM 抑制作用更显著,但神经球直径 SACM 组 > ACM 组 > control 组。

2.4 衰老大鼠星形胶质细胞条件培养基对胎鼠端脑神经干细胞长期增殖能力的影响

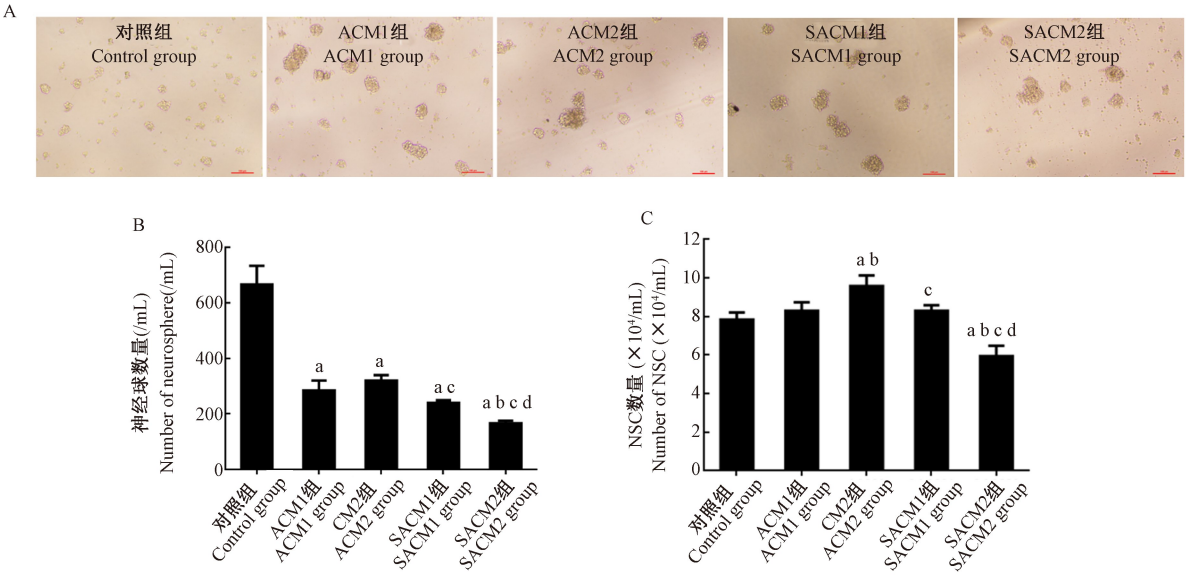
为观察星形胶质细胞对神经干细胞长期增殖能力的影响,分别收集连续培养 3 d 和 7 d 的 ACM 和 SACM,不同的比例加入 NSC 增殖培养基中,培养 7 d 后对 NSC 的增殖情况进行检测。

结果显示,加入 3 d 条件培养基,ACM1 组、

ACM2 组、SACM1 组和 SACM2 组均可使神经球数量减少 ($P < 0.05$),直径增大,但各组间无差异,见图 6A、B。消化为单个细胞计数结果显示,ACM1 组、ACM2 组、SACM1 组和 SACM2 组 NSC 数量分别降低 (50.76 ± 2.28)%、(46.00 ± 7.34)%、(57.40 ± 3.99)%、(58.04 ± 3.11)%,差异均具有显著性 ($P < 0.05$),见图 6C。

加入 7 d 条件培养基,ACM1 组、ACM2 组、SACM1 组和 SACM2 组均可使神经球数量减少 ($P < 0.05$),直径增大,但各组间无差异,见图 7A、B。消化为单个细胞计数结果显示,ACM1 组、ACM2 组、SACM1 组和 SACM2 组 NSC 数量分别降低 (61.86 ± 5.34)%、(65.23 ± 2.60)%、(73.08 ± 1.90)%、(79.77 ± 3.47)%,SACM1 组和 SACM2 组比 ACM1 组分别降低 (29.41 ± 4.99)%、(46.97 ± 9.10)%,差异均具有显著性 ($P < 0.05$),见图 7C。

以上结果显示,3 d ACM 和 SACM 对 NSC 长期增殖有抑制作用,两者抑制作用无差异;7 d ACM 和 SACM 对 NSC 长期增殖有抑制作用,但 SACM 抑制作用大于 ACM。此外,加入条件培养基可使神经球数量显著减少,ACM 和 SACM 作用无差异,神经球直径无差异。

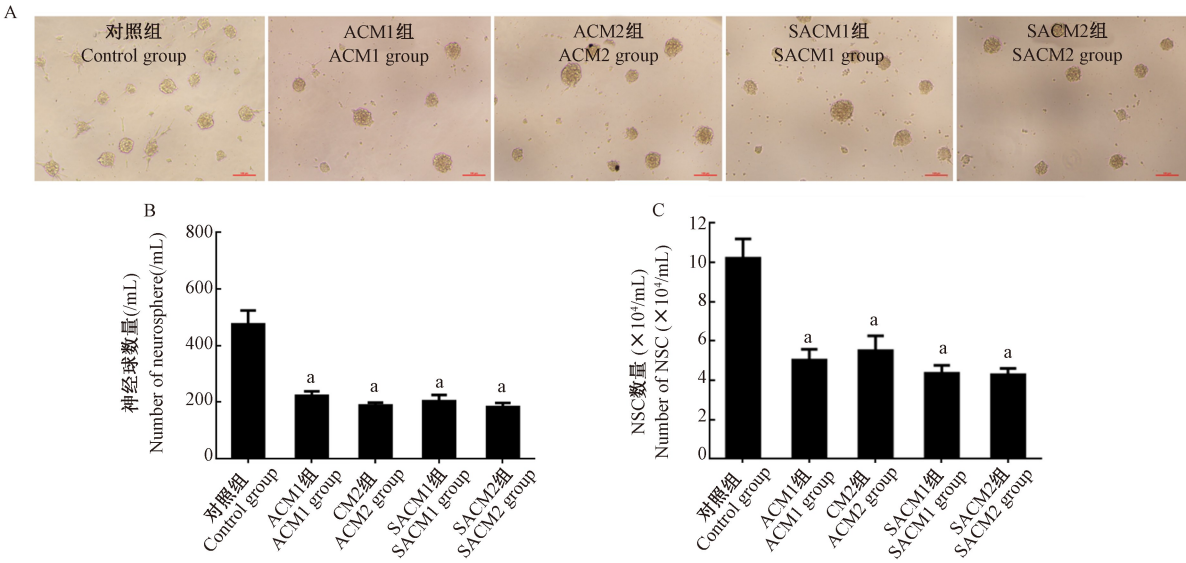


注：A:7 d 条件培养基培养 NSC 3 d 后增殖情况($\times 200$)。B. 神经球数量的变化。C. NSC 总数量的变化。与对照组相比,^a $P < 0.05$; 与 ACM1 (ACM:NSC 为 1:3) 组相比,^b $P < 0.05$; 与 ACM2 (ACM:NSC 为 1:2) 组相比,^c $P < 0.05$; 与 SACM1 (SACM:NSC 为 1:3) 组相比,^d $P < 0.05$ 。

图 5 7 d 条件培养基对神 NSC 短期增殖功能的影响

Note. A, Proliferation of NSC cultured for 3 days ($\times 200$). B, Number of neurosphere. C, Number of NSC. Compared with control group,^a $P < 0.05$. Compared with ACM1 (ACM:NSC = 1:3) group,^b $P < 0.05$. Compared with ACM2 (ACM:NSC = 1:2) group,^c $P < 0.05$. Compared with SACM1 (SACM:NSC = 1:3) group,^d $P < 0.05$.

Figure 5 Effects of 7 d conditioned medium on short-term proliferation of NSC

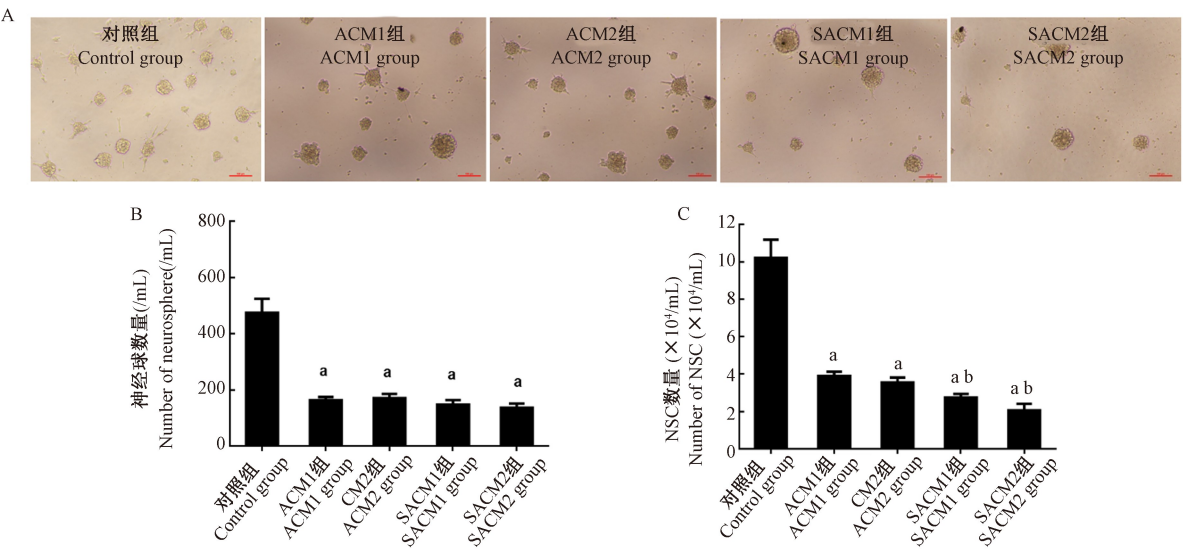


注：A:3 d 条件培养基培养 NSC 7 d 后增殖情况($\times 200$)。B: 神经球数量的变化。C: NSC 总数量的变化。与对照组相比,^a $P < 0.05$ 。

图 6 3 d 条件培养基对 NSC 长期增殖功能的影响

Note. A, Proliferation of NSC cultured for 7 days ($\times 200$). B, Number of neurosphere. C, Number of NSC. Compared with control group,^a $P < 0.05$.

Figure 6 Effects of 3 d conditioned medium on long-term proliferation of NSC



注:A. 7 d 条件培养基培养 NSC 7 d 后增殖情况(200×);B. 神经球数量的变化;C. NSC 总数的变化。与对照组相比,^a*P* < 0.05;与 ACM1(ACM;NSC 为 1:3)组相比,^b*P* < 0.05。

图 7 7 d 条件培养基对 NSC 长期增殖功能的影响

Note. A, Proliferation of NSC cultured for 7 days (× 200). B, Number of neurosphere. C, Number of NSC. Compared with control group, ^a*P* < 0.05. Compared with ACM1(ACM;NSC = 1:3) group, ^b*P* < 0.05.

Figure 7 Effects of 7 d conditioned medium on long-term proliferation of NSC

3 讨论

为了探讨衰老的 AS 是否会影响 NSC 功能,本研究首先在体外分离原代 AS 和 NSC,培养至第 3 代后纯度均在 95% 以上,符合实验要求,之后通过 200 μmol/L H₂O₂ 诱导 4 h 建立 AS 衰老模型,与 Bitto 等^[11] 研究结果相似,经 H₂O₂ 诱导后的 AS 可模拟体内相似的衰老样改变,包括形态学变化、细胞活力下降、生长周期停滞、细胞凋亡增加、β-gal 染色阳性、分泌 SASP 等等,培养时间越长,衰老的 AS 越多,培养 3 d 后约 30% AS 衰老,培养 7 d 后约 80% AS 衰老,最后收集 AS 条件培养基检测其对 NSC 增殖能力的影响。

NSC 作为一种成体干细胞,是用以治疗神经退行性疾病和脑卒中最常用的干细胞类型之一,具有自我更新和多向分化能力,理论上可分化为神经元重建损伤的神经系统。哺乳动物神经系统发育出现在胚胎发育的中后期,因此选择 15 d 胎鼠分离 NSC,结果显示此种方法可成功分离 NSC,且分离效率较高。增殖能力是判断 NSC 功能的重要指标,第 3 代 NSC 正常情况下具有良好的增殖分裂能力,因此选择第 3 代 NSC 培养 3 d 或 7 d 后检测其短期和长期增殖能力。本研究发现,正常的 AS 条件培养

基可促进 NSC 的短期快速增殖,表现为少量神经球的直径迅速增大,Wang 等^[12] 认为是 AS 通过分泌 IL-6、TNF-α、BDNF 等细胞因子和神经营养因子来实现的。以往研究也证明在成体海马存在内源性 NSC,当大脑受损时可刺激 NSC 增殖、迁移和分化以修复大脑功能^[13]。但培养 7 d 时 NSC 数量显著降低,提示 AS 虽然可以促进少量 NSC 快速增殖,但由于单个 NSC 增殖能力有限,因此表现为抑制作用,这可能也是神经系统损伤时仅依靠内源性 NSC 难以有效恢复功能的原因之一。

同时本研究还发现 SACM 抑制 NSC 的增殖,培养的时间越长、加入的比例越大,抑制作用越显著,提示衰老 AS 可能通过分泌 SASP、降低神经营养因子含量等抑制 NSC 活性,并且相比 ACM 组,SACM 组神经球数量更少,提示由衰老 AS 所引起的微环境的变化更不利于大部分 NSC 的存活,甚至促进干细胞的凋亡^[4],目前的许多研究发现,随着年龄增长或者神经系统疾病的发生,脑内 AS 会出现衰老性改变,衰老的 AS 结构支持功能丧失,增加衰老相关分泌表型、减少神经营养因子的分泌,改变脑内微环境,这可能也是 NSC 治疗老年性神经系统疾病时疗效不显著的原因之一,目前 AS 也已成为治疗神经系统疾病新的靶点^[14-16]。

在 NSC 的应用中, NSC 在脑组织中的存活率较低仍然是此类研究尚未解决的难题, 研究者尝试通过采用与神经营养因子或者其他类型干细胞共移植的方式期望能够提高干细胞的存活率^[17], 大脑中复杂的微环境不仅使移植的干细胞难以存活, 同时也使 NSC 更多地向 AS 方向分化, 而受损脑内衰老的 AS 在其中所发挥的作用仍难有定论, 衰老 AS 对 NSC 分化方向的影响以及衰老 AS 对 NSC 产生功能影响的分子机制值得进一步探讨, 以便为 NSC 在神经退行性疾病和脑卒中等老年病中更好的应用提供基础数据。

参 考 文 献 (References)

- [1] Campisi J, Robert L. Cell senescence: role in aging and age-related diseases [J]. *Interdiscip Top Gerontol*, 2014, 39: 45–61.
- [2] Chinta SJ, Woods G, Rane A, et al. Cellular senescence and the aging brain [J]. *Exp Gerontol*, 2015, 68: 3–7.
- [3] Bhat R, Crowe EP, Bitto A, et al. Astrocyte senescence as a component of Alzheimer's disease [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (9): e45069.
- [4] Salminen A, Ojala J, Kaarniranta K, et al. Astrocytes in the aging brain express characteristics of senescence-associated secretory phenotype [J]. *Eur J Neurosci*, 2011, 34(1): 3–11.
- [5] Pertusa M, García-Matas S, Rodríguez-Farré E, et al. Astrocytes aged in vitro show a decreased neuroprotective capacity [J]. *J Neurochem*, 2007, 101(3): 794–805.
- [6] Huang HL, Qian K, Han XH, et al. Intraparenchymal neural stem/progenitor cell transplantation for ischemic stroke animals: a meta-analysis and systematic review [J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 4826407.
- [7] Wang Y, Ji XM, Leak RK, et al. Stem cell therapies in age-related neurodegenerative diseases and stroke [J]. *Ageing Res Rev*, 2017, 34: 39–50.
- [8] Li D, Liu N, Zhao HH, et al. Interactions between Sirt1 and MAPKs regulate astrocyte activation induced by brain injury in vitro and in vivo [J]. *J Neuroinflammation*, 2017, 14(1): 67.
- [9] 刘菲菲. NGF 和 BDNF 联合诱导 NSC 分化及其在 192-IgG-saporin 致阿尔茨海默病模型鼠中的应用 [D]. 广州: 广州医科大学, 2014.
Liu FF. Combined effect of NGF and BDNF on the neuronal differentiation of neural stem cell and on rat model of Alzheimer's disease with 192-IgG-saporin [D]. Guangzhou: Guangzhou Medical University, 2014.
- [10] 王璇, 王文广, 李娜, 等. 树鼩脊髓星形胶质细胞的分离鉴定 [J]. *实验动物与比较医学*, 2019, 39(1): 15–20.
Wang X, Wang WG, Li N, et al. Isolation and identification of spinal cord astrocytes in tree shrews [J]. *Lab Anim Comp Med*, 2019, 39(1): 15–20.
- [11] Bitto A, Sell C, Crowe E, et al. Stress-induced senescence in human and rodent astrocytes [J]. *Exp Cell Res*, 2010, 316 (17): 2961–2968.
- [12] Wang FW, Hao HB, Zhao SD, et al. Roles of activated astrocyte in neural stem cell proliferation and differentiation [J]. *Stem Cell Res*, 2011, 7(1): 41–53.
- [13] Ryu S, Lee SH, Kim SU, et al. Human neural stem cells promote proliferation of endogenous neural stem cells and enhance angiogenesis in ischemic rat brain [J]. *Neural Regen Res*, 2016, 11(2): 298–304.
- [14] Liu ZW, Chopp M. Astrocytes, therapeutic targets for neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke [J]. *Prog Neurobiol*, 2016, 144: 103–120.
- [15] Bussian TJ, Aziz A, Meyer CF, et al. Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline [J]. *Nature*, 2018, 562(7728): 578–582.
- [16] 许保磊, 王蓉. 兴奋性氨基酸转运体 2 在神经退行性变中的作用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2012, 22(10): 67–71.
Xu BL, Wang R. Role of EAAT2 in neurodegenerative diseases [J]. *Chin J Comp Med*, 2012, 22(10): 67–71.
- [17] Sandvig I, Gadjanski I, Vlaski-Lafarge M, et al. Strategies to enhance implantation and survival of stem cells after their injection in ischemic neural tissue [J]. *Stem Cells Dev*, 2017, 26(8): 554–565.

[收稿日期] 2019-12-06