

论著 · 实验研究

高压氧影响离体神经干细胞分化的量效及时效关系

湛崇峰 杨于嘉 王庆红 姚跃 李萌

(中南大学湘雅医院儿科,湖南 长沙 410008)

[摘要] 目的 探讨不同压力 and 不同稳压时间下高压氧(HBO)对离体神经干细胞(NSCs)分化的影响,旨在找出 HBO 治疗的最佳压力与稳压时间。方法 取出生 3 日内新生 Sprague-Dawley 大鼠的脑皮质组织,在含 B27、bFGF 和 EGF 的 DMEM/F12 培养基中悬浮培养 NSCs。将传至 2~3 代的 NSCs 随机分为不做处理的对照组(CON)和 HBO 处理组。HBO 处理组根据所用压力和稳压时间分为 6 组: NSCs 分别给予 1 个绝对大气压(ATA)、2 ATA、3 ATA 的 HBO 处理,每种压力再分别给予 30 和 60 min 两种稳压时间。HBO 后继续培养 24 h,7 组细胞在同一时间行免疫荧光染色,荧光显微镜下观察 NSCs 分化为 NSE 阳性细胞的百分率。结果 NSCs 分化为 NSE 阳性细胞的分化率从低到高依次为 CON 组(3.72±0.88%),1ATA-30 min 组(3.85±0.44%),1ATA-60 min 组(5.45±0.52%),3ATA-30 min 组(6.08±0.57%),2ATA-30 min 组(6.72±0.76%),3ATA-60 min 组(7.89±0.62%),2ATA-60 min(9.17±0.50%);除 1ATA-30 min 组外,其余各 HBO 组与对照组比较,差异有统计学意义(P<0.01);同一压力下 60 min 组与 30 min 组之间的差异及 2ATA-60 min 组与其他各组之间的差异均有统计学意义(P<0.01)。结论 2 ATA 压力下稳压时间为 60 min 的 HBO 促进 NSCs 向神经元分化的作用最强。

[中国当代儿科杂志,2010,12(5):368-372]

[关键词] 高压氧;分化;压力;时间;神经干细胞
[中图分类号] R [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2010)05-0368-05

Effect of hyperbaric oxygen administered at different pressures and different exposure time on differentiation of neural stem cells *in vitro*

CHEN Chong-Feng, YANG Yu-Jia, WANG Qing-Hong, YAO Yue, LI Meng. Department of Pediatrics, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China (Yang Y-J, Email:yyjcjp@163.com)

Abstract: Objective To study the effect of hyperbaric oxygen (HBO) administered at different pressures and different exposure time on the differentiation of neural stem cells (NSCs) *in vitro*. **Methods** The cerebral cortices from newborn rats (0-3 days old) were sterilely collected, digested, and centrifuged. After removal of the supernatant, the cells were re-suspended with DMEM/F12 medium containing B27, bFGF and EGF. The NSCs of 2-3 passages were randomly divided into seven groups: a control (untreated) and 6 HBO treatment groups that NSCs were subjected to HBO treatment of different pressures (1, 2 or 3 ATA) and different exposure time (30 or 60 minutes). The differentiated NSCs were examined by neuron-specific enolase (NSE) immunocytochemistry 24 hrs later. Percentage of NSE positive cells differentiated from NSCs was assessed by fluorescent microscopy. **Results** The percentage of NSE positive cells differentiated from NSCs was the highest in the HBO 2ATA-60 min group (9.17±0.50%) (P<0.01), followed by the HBO 3ATA-60 min (7.89±0.62%), HBO 2ATA-30 min (6.72±0.76%), HBO 3ATA-30 min (6.08±0.57%), HBO 1ATA-60 min (5.45±0.52%), HBO 1ATA-30 min (3.85±0.44%) and control groups (3.72±0.88%). In addition to the HBO 1ATA-30 min group, the other HBO treatment groups had increased significantly percentage of NSE positive cells compared with the control group (P<0.01). Under the same pressure, the 60 min treatment groups had increased significantly percentage of NSE positive cells compared with the 30 min treatment groups (P<0.01). **Conclusions** HBO treatment (2 ATA, 60 minutes) produces a best effect in the differentiation of NSCs into neurons.

[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (5):368-372]

Key words: Hyperbaric oxygen; Differentiation; Pressure; Time; Neural stem cell

[收稿日期]2010-02-03;[修回日期]2010-03-10
[基金项目]国家自然科学基金项目资助(批准号 30672240)。
[作者简介]湛崇峰,女,博士研究生。
[通信作者]杨于嘉,教授。

新生儿缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)是围产期足月儿脑损伤的最常见原因^[1],能导致严重的后遗症。高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)治疗是比较有希望的治疗方法之一。HBO能明显改善机体对氧的摄取和利用方式,使血氧含量增多,血氧分压增高,血氧弥散能力增强^[2]。我们以前的实验已经证实,在2个绝对大气压(atmosphaera absolutus, ATA)的压力下,稳压时间为30~60 min的HBO处理对新生大鼠HIBD时疗效最佳^[3];HBO治疗可促进HIBD新生大鼠内源性神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的增殖并分化为成熟的神经元^[4]。但是HBO在何种压力和稳压时间下最有利于将神经干细胞分化成为神经元目前尚不清楚。本实验在细胞水平,探讨不同压力 and 不同稳压时间下HBO对NSCs分化的影响,旨在找出HBO治疗的最佳压力与时间,为临床上HBO在新生儿缺氧缺血性脑病中的应用提供有用的实验依据。

1 方法

1.1 材料与方法

1.1.1 实验动物 出生3日内的新生Sprague-Dawley(SD)大鼠,由中南大学动物实验部提供。

1.1.2 材料 小鼠Nestin抗体、兔NSE抗体、兔GFAP抗体、Cy3标记羊抗兔IgG、Cy3标记羊抗小鼠IgG、FITC标记羊抗兔IgG均购自武汉博士德公司;DMEM/F12(1:1)培养基为Hyclone公司产品;B27为Gibco BRL公司产品;bFGF、EGF为Pepro Tech公司产品。胎牛血清为杭州四季青生物工程公司产品。

1.1.3 仪器 常压缺氧舱,自制有机玻璃舱30 cm×40 cm×50 cm,两侧各有一1 cm×1 cm小孔,一侧通氮氧混合气,另一侧与测氧仪相通,底层铺有钠石灰以吸收CO₂及湿气;高压氧舱为中国船舶工业总公司第701研究所研制(YLC0.5/1A型);测氧仪为CY-12C型便携式数字测氧仪,测氧范围0~100%,杭州梅城电化分析仪器厂;低温高速台式离心机(美国ICE公司);倒置相差显微镜、荧光显微镜(日本Olympus公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 将NSCs接种至6孔板,加入含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基后,分为空白对照组(CON)和HBO处理组,后者又分为3种不同的压力(1 ATA, 2 ATA和3 ATA),每种压力再设

30 min和60 min两种稳压时间,共6组,即1ATA-30 min, 1ATA-60 min, 2ATA-30 min, 2ATA-60 min, 3ATA-30 min和3ATA-60 min 6组。HBO后继续培养24 h,7组细胞在同一时间行免疫荧光染色,实验重复8次。

1.2.2 新生鼠脑皮质NSCs分离取材和培养 取出生3日内的新生SD大鼠,10%水合氯醛腹腔麻醉处死后,75%乙醇浸泡消毒5 min,分离脑皮质组织,仔细剥除脑膜面血管,剪碎,加入0.25%胰蛋白酶,37℃下消化15 min,终止消化并反复吹打制成单细胞悬液,200目筛网过滤,200 g离心5 min,弃上清液后,用DMEM/F12培养基(含20 μL/mL B27, 10 ng/mL bFGF, 20 ng/mL EGF)重悬,接种至培养瓶,在37℃、5% CO₂培养箱中培养,每3~4 d半量换液1次,7 d传代1次。

1.2.3 HBO处理 将6组细胞给予HBO处理1次,方法如下。①洗舱:纯氧洗舱氧流量10 L/min,15 min;②升压:氧流量2~3 L/min,加压时间为20~25 min;③稳压:稳压时间为30或60 min,分别给予1 ATA、2 ATA、3 ATA压力治疗,稳压期间氧流量为3~5 L/min,平均氧浓度不低于90%;④减压:匀速减压20~25 min。

1.2.4 免疫细胞化学 将细胞去除培养液,PBS洗涤2次后,4%多聚甲醛固定40 min,用0.5% Triton X-100处理10 min,2% BSA处理60 min。加入一抗,4℃冰箱过夜。去除一抗,加入荧光标记的二抗,湿盒中孵育60 min。去除二抗后,加Hoechst 33258,室温孵育20 min,50%缓冲甘油封片,阴性对照用PBS液代替一抗。荧光显微镜下计数(每张片子随机取6个非重叠视野)。重复上述实验8次。按下列公式计算:神经干细胞分化为神经元的百分率 = NSE染色阳性细胞/Hoechst 33258染色细胞×100%。

1.2.5 分化细胞计数 荧光显微镜下计数,每张片子随机取6个非重叠视野,按上述公式计算出神经干细胞分化为神经元的百分率,得出平均值(6个百分率相加除以6),重复实验8次,每组得出8个平均值,进行方差齐性检验, $P > 0.1$,认为方差齐,可进行SNK- q 检验。

1.3 统计学分析

采用SPSS 13.0软件进行统计学分析,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间比较用随机分组设计资料的单因素方差分析(SNK- q 检验), $P < 0.05$ 判断为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SD大鼠NSCs的培养

原代培养的细胞在无血清的培养基中悬浮生长,48 h后就可以见到大部分细胞死亡,但能见到由2~3个细胞组成的小细胞团,即原代克隆,随着培养时间的增加,细胞团逐渐增大、增多,7 d时生长为数十个至数百个细胞的克隆,呈球形悬浮生长,形态不规则,折光性强,周围可见混杂的其他细胞(图1A)。原代克隆的形成率在20%~30%之间。传代后出现与原代培养相同的大量次代克隆,并逐渐增大,7 d后可再次传代。连续传代3次后,可见细胞团仍呈悬浮生长,形态规则,折光性强,无突起生长,周围无明显混杂细胞(图1B)。NSCs在体外传代培养后,已分化成熟的细胞会逐渐贴壁死亡,而NSCs则在培养基中悬浮生长,因此利用传代培养的

方法可以纯化所培养的NSCs。

2.2 NSCs的诱导分化及鉴定

将NSCs接种至已用明胶或多聚赖氨酸包被的6孔板中,一部分仍然用含20 μL/mL B27, 10 ng/mL bFGF, 20 ng/mL EGF的DMEM/F12培养基培养2 h后,行Nestin免疫荧光染色;另一部分加入含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基诱导分化,绝大多数细胞在24 h内会贴壁,并从细胞团的边缘伸出突起(图1C)。随着培养时间的延长,越来越多的细胞从细胞团中爬行出来,伸出长长的突起,有时会交织成网。

免疫细胞化学发现:NSCs标记蛋白Nestin在各级克隆中都有表达(图1D);在用10%胎牛血清的DMEM/F12培养基诱导7 d后,可见神经元细胞的标记物NSE(图1E)和神经胶质细胞的标记物GFAP(图1F)在诱导7 d的细胞中表达,而且诱导后的细胞大部分为GFAP阳性的胶质细胞。

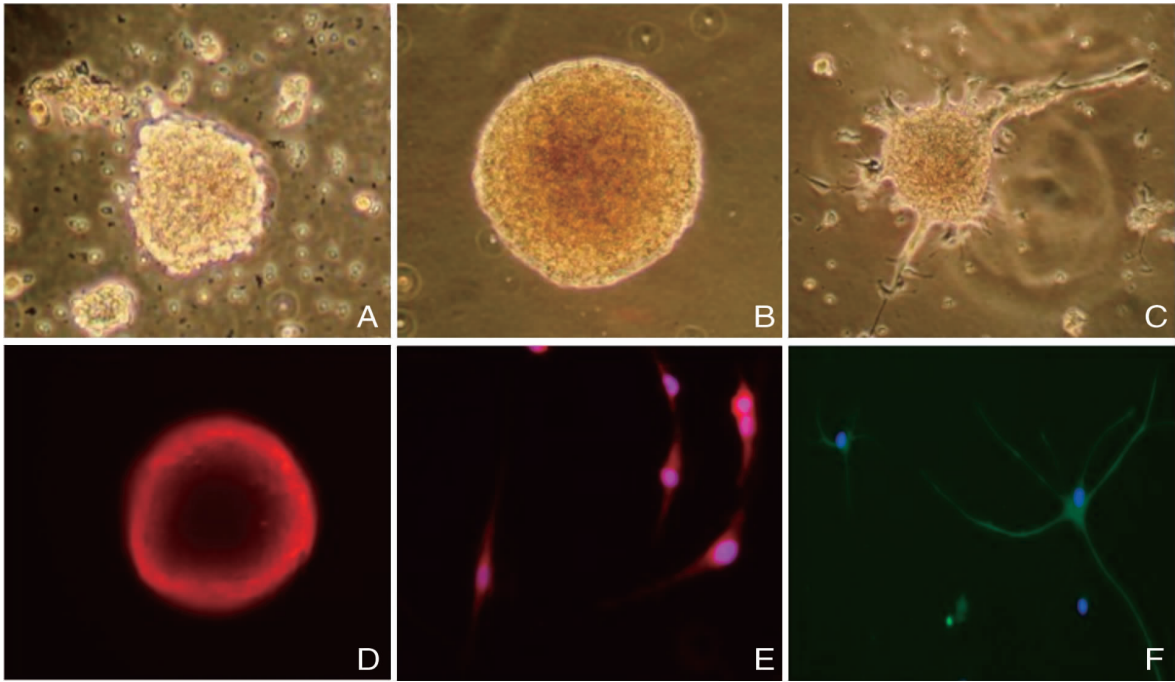


图1 SD大鼠NSCs的体外培养与鉴定(×100) A:倒置相差显微镜下原代培养的新生大鼠NSCs;B:倒置相差显微镜下第4代的NSCs;C:倒置相差显微镜下大鼠神经干细胞诱导后贴壁分化;D:荧光显微镜下大鼠神经干细胞Nestin染色(红色,CY3);E:荧光显微镜下大鼠神经干细胞诱导分化后,可见NSE阳性细胞(红色,CY3);F:荧光显微镜下大鼠神经干细胞诱导分化后,可见GFAP阳性细胞(绿色,FITC)。

2.3 HBO影响NSCs分化的量效及时效

将处理后的7组细胞在同一时间行免疫荧光染色,进行NSE染色,显微镜下计数NSCs分化为NSE阳性细胞的百分率。结果发现NSCs分化为NSE阳

性细胞的分化率从低到高依次为CON组($3.72 \pm 0.88\%$),1ATA-30 min组($3.85 \pm 0.44\%$),1ATA-60 min组($5.45 \pm 0.52\%$),3ATA-30 min组($6.08 \pm 0.57\%$),2ATA-30 min组($6.72 \pm 0.76\%$),3ATA-

60 min组(7.89 ± 0.62%), 2ATA-60 min(9.17 ± 0.50%)。除1ATA-30 min组外,其余各 HBO 组与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);同一压力下 60 min组与 30 min组之间的差异及 2ATA-60 min组与其他各组之间的差异均有统计学意义($P < 0.01$)。见图2和图3。

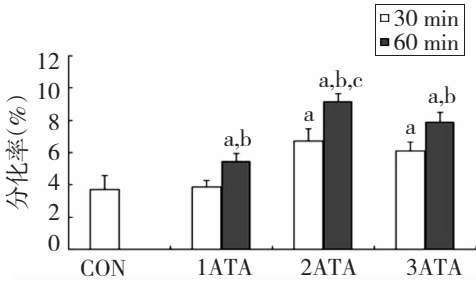


图2 各组表达NSE标记物阳性率比较 a:与CON组比较, $P < 0.01$;b与同一压力下30 min组比较, $P < 0.01$;c:与其他各组比较, $P < 0.01$ 。

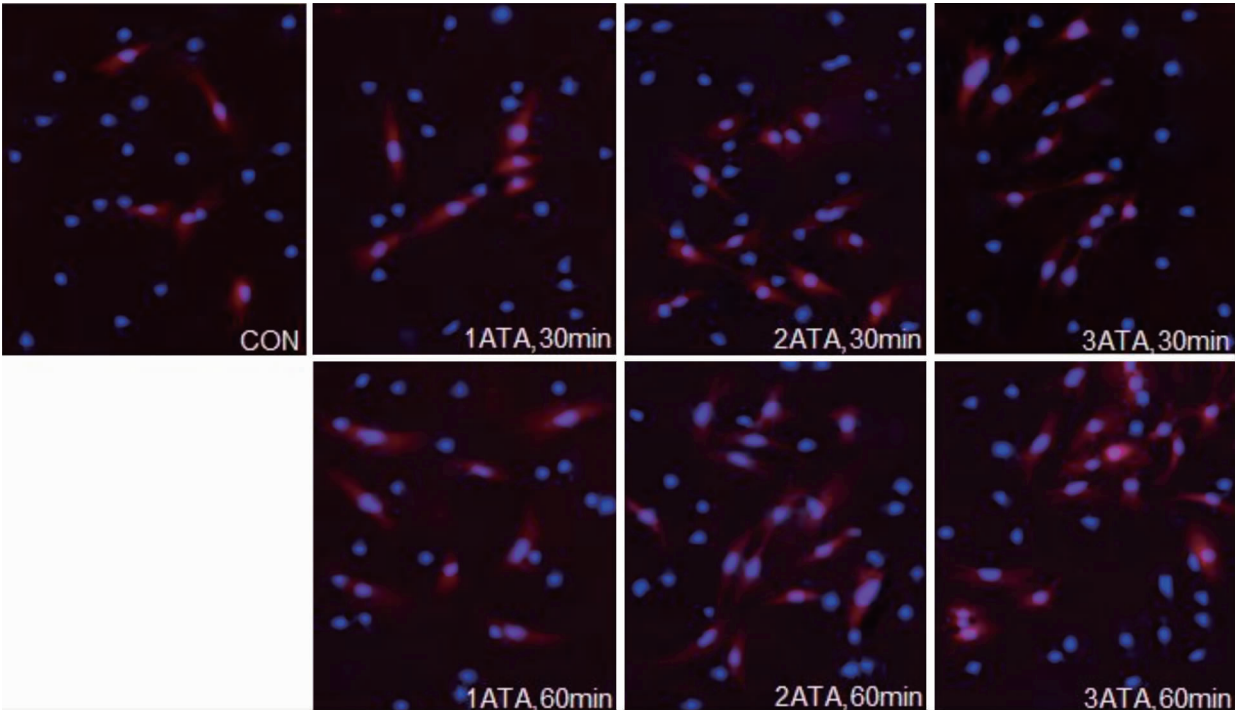


图3 HBO影响NSCs分化的量效及时效(×100) 7组细胞在同一时间做免疫荧光双标,红色(CY3)表示细胞浆中表达NSE,蓝色(Hoechst 33258)表示细胞核,应用荧光显微镜观察HBO不同压力和稳压时间下NSCs的分化。CON组、1ATA-30 min组、1ATA-60 min组、3ATA-30 min组、2ATA-30 min组、3ATA-60 min组、2ATA-60 min组NSCs分化为NSE阳性细胞的分化率依次增加。

3 讨论

在体外获得NSCs的标准方法就是选取成年哺乳动物存在干细胞的部位如侧脑室室管膜下区和海马区及胚胎的大部分区域,将这些组织用机械分散法或消化分离法制成单细胞悬液,在含有有丝分裂原表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)^[5-6]或碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF2)^[7-8]的培养基中培养。因为血清成分复杂,可能存在诱导NSCs分化的生长因子,目前主要采用无血清的培养基培养NSCs^[9]。原代培养时

细胞多为混杂生长,可同时存在上皮样细胞和成纤维样细胞。EGF和FGF能参与调节NSCs的分裂增殖,但具体机制不清。联用EGF和FGF对促进NSCs的增殖有相当明显的协同作用,与单独应用EGF或FGF相比有非常显著的差异^[10]。本课题在含有EGF和FGF的无血清培养基中培养出生3日内的新生SD大鼠脑皮质组织制成的单细胞悬液,采用悬浮培养的方式,分离培养NSCs。有报道指出,在含有EGF和FGF的无血清培养基中培养的人类神经干细胞,能存活达1年以上,并仍然保持其分化潜能^[11]。本实验成功地从新生SD大鼠的脑皮质组织中分离培养出了NSCs,通过培养和鉴定,充分

说明培养的 NSCs 具有不断增殖和多向分化的潜能,为 NSCs 在细胞水平的研究奠定了基础。体外培养的 NSCs 在经过增殖后去除有丝分裂原,NSCs 出现分化;或者在培养基中添加其他因子,也可以诱导 NSCs 向其他细胞分化。分化后的细胞可以用针对神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的特异性抗原来鉴定。

本课题前期实验已经发现 HBO 治疗可促进离体的 NSCs 向神经元细胞分化,但是不同的压力和不同的稳压时间对细胞的影响是不同的,这点我们在整体动物中已经得到了证实。刘丽旭等^[4]发现 2.0 ATA 压力下、稳压时间为 30~60 min 的 HBO 治疗新生大鼠 HIBD 时疗效最佳,当 HBO 压力过高时,不但不能起到治疗脑损伤的目的,反而会加重脑损伤。我们利用离体的 NSCs,观察不同压力和不同稳压时间的 HBO 处理对 NSCs 分化为神经元细胞的影响,找出最适合的压力和稳压时间,为临床上 HBO 在新生儿缺氧缺血性脑病中的应用提供有用的实验依据。在同一压力下不同稳压时间的 HBO 研究表明,60 min 组较 30 min 组 NSCs 分化为神经元细胞的比率明显增高,差异具有统计学意义,表明增加稳压时间可促进 NSCs 向神经元细胞分化;在相同的稳压时间下,随着 HBO 治疗压力的增高,NSCs 分化为神经元细胞的比率也随之增高,但 2 ATA 压力下分化的比率最高,3 ATA 压力时,分化的比率反而较 2 ATA 压力有所下降。从上述结果综合分析得出,2 ATA 压力下、稳压时间为 60 min 的 HBO 促进 NSCs 向神经元分化的作用最强。这与整体动物实验的结果是相一致的,表明 HBO 治疗 HIBD 时确实存在一个度的问题,须适量适时,不足时,不能起到充分的治疗作用,过量时,不但不能起到很好的治疗作用,疗效反而有所下降。但是在整体动物中,同一压力时增加稳压时间并不能增加 HBO 的疗效,考虑与整体动物水平时,受各种因素的干扰及实验条件的差异有关,而在细胞水平,各组实验条件基本一致,受外界因素的影响较小,对 HBO 的处理更加敏感。在整体水平如何进一步增加 HBO 的疗效呢,解决这一问题的方法就是增加 HBO 的疗程,王庆红等^[12]发现增加 HBO 疗程可促进 HIBD 新生大鼠 SVZ 区内源性 NSCs 皮层神经元

细胞的增殖和分化。
HBO 影响 NSCs 分化的具体机制目前还不是十分清楚,我们推测是与某些细胞因子的变化有关,但是应用 HBO 治疗时,哪些细胞因子发生了变化,尚需进一步研究。

致谢:感谢湖南省人民医院石永忠博士及魏伟强硕士在实验方面给予的帮助。

[参 考 文 献]

[1] Triulzi F, Parazzini C, Righini A. Patterns of damage in the mature neonatal brain[J]. *Pediatr Radiol*, 2006, 36(7):608-620.

[2] 李温仁,倪国坛. 高压氧医学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1998:3.

[3] 刘丽旭,杨于嘉. 高压氧治疗新生大鼠缺氧缺血性脑损伤量效及时效关系[J]. *中国当代儿科杂志*, 2001, 3(4):355-358.

[4] Yang YJ, Wang XL, Yu XH, Wang X, Xie M, Liu CT. Hyperbaric oxygen induces endogenous neural stem cells to proliferate and differentiate in hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats[J]. *Undersea Hyperb Med*, 2008, 35(2):113-129.

[5] Reynolds BA, Weiss S. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell[J]. *Dev Biol*, 1996, 175(1):1-13.

[6] Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes[J]. *J Neurosci*, 1992, 12(11):4565-4574.

[7] Gensburger C, Labourdette G, Sensenbrenner M. Brain basic fibroblast growth factor stimulates the proliferation of rat neuronal precursor cells in vitro[J]. *FEBS Lett*, 1987, 217(1):1-5.

[8] Davis AA, Temple S. A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex[J]. *Nature*, 1994, 372(6503):263-266.

[9] Brannen CL, Sugaya K. In vitro differentiation of multipotent human neural progenitors in serum-free medium[J]. *Neuroreport*, 2000, 11(5):1123-1128.

[10] Svendsen CN, Caldwell MA, Shen J, ter Borg MG, Rosser AE, Tyers P, et al. Long-term survival of human central nervous system progenitor cells transplanted into a rat model of Parkinson's disease[J]. *Exp Neurol*, 1997, 148(1):135-146.

[11] Vescovi AL, Reynolds BA, Fraser DD, Weiss S. bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuroglial) EGF-generated CNS progenitor cells[J]. *Neuron*, 1993, 11(5):951-966.

[12] 王庆红,杨于嘉,湛崇峰,姚跃,李萌. 增加高压氧疗程对治疗时间窗延迟的新生大鼠缺氧缺血性脑损伤的保护作用[J]. *中国当代儿科杂志*, 2009, 11(6):464-470.

(本文编辑:邓芳明)