

# 星形胶质细胞与 $A\beta_{1-40}$ 诱导凋亡的 PC12 细胞共育条件培养液对神经干细胞分化的影响机制

闫荣 罗晓光 毕国荣 冯娟 张朝东

**【摘要】** 目的 将星形胶质细胞与  $\beta$ -淀粉样蛋白( $A\beta_{1-40}$ )诱导凋亡的 PC12 细胞共育,观察星形胶质细胞条件培养液(ACM)对胚胎大鼠皮层神经干细胞(NSCs)体外定向分化为神经元的比例影响及机制,探讨神经营养素家族蛋白[包括脑源性神经营养因子(BDNF)、神经生长因子(NGF)、神经营养素-3(NT-3)]是否参与此过程。方法 PC12 细胞分别经  $10 \mu\text{g/mL}$   $A\beta_{1-40}$  诱导不同时间(0、4、6、12、24 h)后分为两部分,第一部分应用流式细胞技术检测不同时间点 PC12 细胞凋亡率;第二部分分别与星形胶质细胞共育 2 d,将收集的 ACM 分为两部分,一部分应用 ELISA 法检测 ACM 中 BDNF、NGF、NT-3 蛋白含量,另一部分以 1:3 比例同 DMEM/F12 培养基混合,对 NSCs 进行体外诱导分化,应用激光共聚焦显微镜、NSE 免疫荧光技术鉴定和计数神经元分化比例。结果 在  $A\beta_{1-40}$  作用 6 h 时间点,PC12 细胞凋亡率达高峰,与其共育的 ACM 中 BDNF 蛋白总量明显增高,诱导的 NSCs 神经元分化比例明显升高,与其他组比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 星形胶质细胞与  $A\beta_{1-40}$  诱导凋亡的 PC12 细胞共育后,ACM 提高了 NSCs 向神经元的分化比例,ACM 中 BDNF 可能参与了这一过程。

**【关键词】** 星形胶质细胞; 神经干细胞; 细胞分化; 脑源性神经营养因子

**【中图分类号】** Q254 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-8925(2009)07-0661-05

## Effect of conditioned medium from coculture of astrocytes and $\beta$ -amyloid-induced apoptotic PC12 cells on the differentiation of neural stem cells and the possible mechanism YAN

Rong\*, LUO Xiao-guang, BI Guo-rong\*, FENG Juan\*, ZHANG Chao-dong. \*Department of Neurology, Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang 110004, China

Corresponding author: FENG Juan, Email: ylld1@163.com

**【Abstract】** **Objective** To observe the effect of the conditioned medium obtained from the coculture of astrocytes and  $\beta$ -amyloid ( $A\beta_{1-40}$ )-induced apoptotic PC12 cells on the neuronal differentiation efficiency of neural stem cells (NSCs), and investigate the possible involvement of the neurotrophins proteins including brain-derived neurotrophic factor (BDNF), nerve growth factor (NGF) and neurotrophin-3 (NT-3) in the induced differentiation of the NSCs. **Methods** PC12 cells were induced by  $A\beta_{1-40}$  for different time lengths (0, 4, 6, 12, and 24 h), and after detection of the apoptotic rates using flow cytometry, the cells were cocultured with astrocytes for 2 days. The astrocyte-conditioned medium (ACM), after analysis of the neurotrophins proteins using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), was mixed with DMEM/F12 medium at the proportion of 1:3 to induce the differentiation of the NSCs. The cell differentiation was identified by laser confocal microscopy, NSE immunofluorescent labeling, and neuronal counting. **Results** Flow cytometry showed that induction by  $A\beta_{1-40}$  for 6 h resulted in the highest apoptosis rate of PC12 cells ( $P < 0.05$ ). BDNF content in the ACM derived from the coculture of astrocytes and the PC12 cells induced for 6 h was significantly increased, and the NSCs

DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2009.07.004

基金项目:辽宁省科学技术计划项目(2004215003-1)

作者单位:110004 沈阳,中国医科大学附属盛京医院神经内科(闫荣、毕国荣、冯娟);110001 沈阳,中国医科大学附属第一医院神经内科(罗晓光、张朝东)

通信作者:冯娟,Email: ylld1@163.com

induced in this ACM showed the highest neuronal differentiation rates, showing significant difference from those induced by other ACMs ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The ACM derived from the coculture of  $A\beta_{1-40}$ -induced PC12 cells and astrocytes can increase the neuronal differentiation rates of NSCs *in vitro*, and BDNF in the ACM may play a role in this process.

**【Key words】** Astrocytes; Neural stem cells; Neuronal differentiation; Brain-derived neurotrophic factor

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)是成年人体内存在的具有不断自我更新、多向分化潜能的细胞。阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)尸检病例首先发现了 NSCs 的存在及分化的能力<sup>[1]</sup>, 随后的动物实验也证实了这一点<sup>[2]</sup>。之后研究者就一直在尝试研究 AD 脑内微环境对移植 NSCs 的影响, 但是发现 NSCs 在自然状态下分化为神经元的比例并不是很高<sup>[3]</sup>。近来对中枢神经系统内数量庞大的星形胶质细胞产生了新的认识, 星形胶质细胞通过分泌各种营养因子参与神经元分化、神经发生<sup>[4-6]</sup>。但是在 AD 病理条件下星形胶质细胞对移植后 NSCs 分化等各种生物学功能影响及其机制一直是未澄清的。本次实验将研究对象单一纯化, 利用  $\beta$ -淀粉样蛋白( $A\beta_{1-40}$ )诱导 PC12 细胞凋亡, 再将纯化的原代培养星形胶质细胞与  $A\beta_{1-40}$  诱导后的 PC12 共同孵育, 收集星形胶质细胞条件培养液(astrocyte-conditioned medium after  $A\beta_{1-40}$ -induced PC12 cells, ACM), 观察 ACM 对胚胎大鼠皮层 NSCs 体外定向分化为神经元的比例影响及机制, 探讨神经营养素家族蛋白 [包括脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)、神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、神经营养素-3(neurotrophin-3, NT-3)]是否参与此过程。

## 材料和方法

### 一、材料

1. 实验动物: 新生 2 d Wistar 大鼠、孕 14 d Wistar 大鼠购自中国医科大学动物部。

2. 试剂和耗材: 插入式细胞培养皿, 适合于 24 孔板, 细胞直径 3.0  $\mu\text{m}$ , 美国 Gene 公司;  $A\beta_{1-40}$  (美国 Sigma 公司); 小鼠抗鼠神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)、兔抗鼠胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)、兔抗大鼠巢蛋白(nestin)、FITC 及 cy3 标记二抗(羊抗小鼠、羊抗兔)均购自武汉博士德公司; BDNF、NT-3 和 NGF ELISA 试剂盒均购自上海康成公司。

### 二、方法

1. 星形胶质细胞的分离、培养及鉴定: 收集 Wistar 大鼠皮层细胞, 差速贴壁法去除成纤维细胞, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$  摇床中振荡 2 次 (250 r/min, 第 1 次: 12~14 h; 第 2 次: 30~60 min), 为纯化可重复振荡。星形胶质细胞纯度 = GFAP 阳性细胞 / (NSE 阳性细胞 + GFAP 阳性细胞)  $\times 100\%$ , 如果纯度达 95% 以上, 就可以进行下一步实验。将纯化的星形胶质细胞以  $1 \times 10^7/\text{mL}$  密度随机接种于 24 孔培养板内。

2. PC12 细胞的培养: PC12 细胞系(大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤细胞系) 购自中国科学院北京细胞生物研究所。将 PC12 细胞以  $1 \times 10^7/\text{mL}$  密度随机接种于插入式细胞培养皿中, 继续培养 24 h; 用 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $A\beta_{1-40}$  分别处理 0、4、6、12、24 h 后, 分为两部分: 第一部分应用流式细胞仪检测细胞凋亡率; 第二部分与星形胶质细胞共育, 收集 ACM。

3. 流式细胞仪分析细胞凋亡率: 将收集的插入式细胞培养皿中的 PC12 细胞, PBS 冲洗 3 次, 70% 冷乙醇固定, 加入 PI 染液, 4  $^{\circ}\text{C}$  避光 30 min, 流式细胞仪(美国 BD 公司)检测, 用 Cell Quest 3.0 软件分析。

4. 第二部分实验分组: 将插入式细胞培养皿(均含血清 RPMI1640 培养液 200  $\mu\text{L}/$  孔)放入与其匹配的 24 孔培养板内(均含血清 DMEM 培养液 800  $\mu\text{L}/$  孔) 2 d, 以达到共育目的, 细胞密度为  $1 \times 10^7/\text{mL}$ 。A 组(星形胶质细胞组), 即插入式细胞培养皿不含有 PC12 细胞, 24 孔培养板内含有星形胶质细胞; B 组(PC12+ 星形胶质细胞组), 即插入式细胞培养皿含有 PC12 细胞, 24 孔培养板内含有星形胶质细胞; C1 组 ~ C5 组 ( $A\beta_{1-40}$  分别处理 0、4、6、12、24 h 后的 PC12 细胞 + 星形胶质细胞组), 即插入式细胞培养皿中分别含有  $A\beta_{1-40}$  诱导处理 0、4、6、12、24 h 后的 PC12 细胞, 24 孔培养板内含有星形胶质细胞; D1 组 ~ D5 组 ( $A\beta_{1-40}$  分别处理 0、4、6、12、24 h 后的 PC12 细胞), 即插入式细胞培养皿中分别含有  $A\beta_{1-40}$  诱导处理 0、4、6、12、24 h 后的 PC12 细胞, 24 孔培养板内不含有星形胶质细胞。每组设 5 孔, 检测结果取平均值。

5. 收集各组 ACM; 每孔液体总量为 1 mL, 48 h 后移去插入式细胞培养皿, 小心收集上清液 1 mL/孔, 移入无菌 Eppendorf 管, 3000 r/min 离心 20 min, 再将上清液移入另一无菌 Eppendorf 管, -20 °C 冷藏, 备用。

6. ELISA- 双抗夹心法测定各组 ACM 中 BDNF、NGF、NT-3 含量: 将标准品 0.1 mL 和每组 ACM 0.1 mL (每孔先加 50  $\mu$ L 样品稀释液, 再加 50  $\mu$ L 样品) 加入预包被抗鼠 BDNF 抗体、NGF 抗体或 NT-3 抗体的 96 孔板, 1 孔只加样品稀释液的作为零孔。将准备好的生物素抗鼠 BDNF、NGF 或 NT-3 工作液按每孔 0.1 mL 依次加入 (TMB 空白显色孔除外), 37 °C 反应 60 min; 按每孔 0.1 mL 依次加入 ABC 工作液 (TMB 空白显色孔除外), 37 °C 反应 30 min; 再依次加入 TMB 显色液 0.1 mL、TMB 终止液 0.1 mL 每孔, 此时蓝色立转黄色; 用酶标仪在 450 nm 测定吸光度(A)值, 将 TMB 空白显色孔设为对照。所得 A 值的大小与 ACM 中 BDNF、NGF、NT-3 含量成正比, 即通过 A 值间接反映 BDNF、NGF、NT-3 含量。

7. NSCs 分离、培养及鉴定: 孕 14 d wister 大鼠 1 只, 分离胎鼠, 收集鼠皮层脑组织细胞, 加入 20  $\mu$ g/L bFGF 和 20 mL/L B27 的 DMEM/F12 培养液, 培养传代; 再分别以适当密度接种于多聚赖氨酸处理的 24 孔板; 巢蛋白免疫荧光鉴定。

8. NSCs 分化比例实验分组: 取第二部分实验收集的 A 组、B 组、C1~C5 组以 1:3 比例同 DMEM/F12 培养基混合, 取 1 mL, 分别加入装有 NSCs 的 24 孔培养板 (密度  $1 \times 10^7$ /mL) 中。依次分别设为 I 组 (A 组 + NSCs), II 组 (B 组 + NSCs), III 组 ~ VII 组 (C1 组 ~ C5 组 + NSCs), 每组设 5 个孔。

9. 激光共聚焦显微镜观察 NSCs 分化、NSE 免疫荧光技术对各组 NSCs 神经元分化鉴定及计数: 4% 多聚甲醛固定 NSCs, BSA 封闭, 加入一抗, 孵育 2 h; 加入二抗, 孵育 30 min; 加入荧光保护油, 激光共聚焦扫描显微镜应用 Quant Report 软件观察各组神经前体细胞球生长。荧光显微镜下, 每张片分别选取 5 个不同视野照相。神经元分化比例 = NSE 阳性细胞数 / 相同视野中光镜下细胞总数  $\times 100\%$ 。

### 三、统计学方法

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 应用 SPSS 11.5 统计软件, 组间差异采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用  $q$  检验,  $P \leq 0.05$  示差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、星型胶质细胞形态学观察及免疫荧光染色鉴定

培养第 2 天见细胞贴壁, 3~5 d 逐渐长出突起, 并相互交织成网状, 7~9 d 即可达 90% 融合, 呈铺路石样外观, 免疫荧光 GFAP 染色呈强阳性, NSE 染色呈阴性, 星型胶质细胞纯度达 98% 以上。

### 二、流式细胞仪检测 PC12 细胞凋亡率

在  $A\beta_{1-40}$  作用 0 h、4 h 时间点, PC12 细胞凋亡率较低 [分别为  $(5.33 \pm 3.98)\%$ 、 $(15.01 \pm 4.15)\%$ ], 6 h 达高峰 [ $(34.38 \pm 8.10)\%$ ], 以后逐渐降低 [12 h、24 h 凋亡率分别为  $(13.32 \pm 1.39)\%$ 、 $(8.32 \pm 0.98)\%$ ], 其中 6 h 时 PC12 细胞凋亡率与其他时间点相比, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

### 三、ELISA- 双抗夹心法测定各组 ACM 中 BDNF、NGF、NT-3 含量

1. BDNF 总量: A 组、B 组、C1 组、C2 组 BDNF 总量较低, C3 组 ~ C5 组总量明显升高, 与 A、B、C1、C2 组比较, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); D1 组 ~ D5 组未检测到 BDNF 蛋白。(表 1)

2. NGF 总量: A 组 ~ C5 组 NGF 总量差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), D1 组 ~ D5 组未检测到 NGF 蛋白。(表 1)

3. NT-3 总量: 各组中均测不出。(表 1)

### 四、NSCs 生长及鉴定

胚胎大鼠大脑皮层原代细胞在无血清含 bFGF、B27 的 DMEM/F12 培养液中, 第 1 天呈比较均匀单个分散生长, 48 h 后即可形成悬浮样集落状生长的细胞团, 经多次传代后, 部分细胞仍然呈集落样生长, 随着培养时间延长, 细胞团在逐渐增大。巢蛋白免疫荧光染色阳性。(图 1)

### 五、激光共聚焦扫描显微镜观察结果

NSCs 克隆成球, 中心部细胞排列疏松, 细胞呈圆形。I 组 (A 组 + NSCs) ~ IV 组 (C2 组 + NSCs) NSCs 大部分仍呈克隆球状, 细胞体积不断增大, 突起增多, 少部分可见到有已分化的细胞从克隆球中迁移到周边, 形状多从圆形到梭形再到多角形; V 组 (C3 组 + NSCs) ~ VII 组 (C5 组 + NSCs) 神经前体细胞克隆球膨大, 疏松, 绝大部分细胞呈多角形, 有长突起, 迁出的细胞长突起之间或与细胞胞体之间相互间连接形成网状结构。(图 2, 3)

### 六、免疫荧光技术检测 NSCs 神经元分化比例

I 组 (A 组 + NSCs) ~ IV 组 (C2 组 + NSCs) 中神经元分化比例较低, V 组 (C3 组 + NSCs) ~ VII 组 (C5 组 + NSCs) 神经元分化比例明显升高。(表 2)(图 4~7)

表 1 各组 ACM 中 BDNF、NGF、NT-3 蛋白总量( $\bar{x}\pm s$ )

Tab.1 Total proteins of BDNF, NGF and NT-3 in the collected conditioned media measured using ELISA in different groups (*Mean* $\pm$ *SD*)

组别	BDNF 总量	NGF 总量	NT-3 总量
A 组: 星形胶质细胞组	0.28 $\pm$ 0.09	0.26 $\pm$ 0.01	0.00 $\pm$ 0.00
B 组: PC12+ 星形胶质细胞组	0.26 $\pm$ 0.09	0.25 $\pm$ 0.07	0.00 $\pm$ 0.00
C1 组: A $\beta$ -PC12(0 h)+ 星形胶质细胞组	0.43 $\pm$ 0.10	0.30 $\pm$ 0.10	0.00 $\pm$ 0.00
C2 组: A $\beta$ -PC12(4 h)+ 星形胶质细胞组	0.53 $\pm$ 0.10	0.40 $\pm$ 0.25	0.00 $\pm$ 0.00
C3 组: A $\beta$ -PC12(6 h)+ 星形胶质细胞组	1.53 $\pm$ 0.25 <sup>ab</sup>	0.41 $\pm$ 0.29	0.00 $\pm$ 0.00
C4 组: A $\beta$ -PC12(12 h)+ 星形胶质细胞组	1.57 $\pm$ 0.29 <sup>ab</sup>	0.42 $\pm$ 0.32	0.00 $\pm$ 0.00
C5 组: A $\beta$ -PC12(24 h)+ 星形胶质细胞组	1.58 $\pm$ 0.32 <sup>ab</sup>	0.43 $\pm$ 0.35	0.00 $\pm$ 0.00
D1~D5 组: A $\beta$ -PC12 组	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
F 值	54.073	0.975	0.477
P 值	0.000	0.461	0.908

与 A 组、B 组比较, <sup>a</sup>*P*<0.05; 与 C1 组、C2 组比较, <sup>b</sup>*P*<0.05

表 2 各组 ACM 对 NSCs 神经元分化比例的影响( $\bar{x}\pm s$ )

Tab.2 Effect of different conditioned media on neuronal differentiation rates of the neural stem cells (*Mean* $\pm$ *SD*)

组别	神经元分化比例(%)
I 组(A 组 +NSCs)	3.78 $\pm$ 0.57
II 组(B 组 +NSCs)	4.16 $\pm$ 0.64
III 组(C1 组 +NSCs)	8.64 $\pm$ 0.88
IV 组(C2 组 +NSCs)	16.22 $\pm$ 1.19
V 组(C3 组 +NSCs)	46.48 $\pm$ 3.66
VI 组(C4 组 +NSCs)	46.12 $\pm$ 2.30
VII 组(C5 组 +NSCs)	46.27 $\pm$ 2.37
F 值	1417.361
P 值	0.000

除 A 组、B 组之外, 其余任两组之间 *P* 均 <0.05

### 讨 论

AD 的治疗一直是神经科领域未攻克的难题。目前国内外研究发现 NSCs 移植入 AD 动物模型脑内, 可以分化为神经元和胶质细胞, AD 动物认知功能可以得到改善<sup>[1,2]</sup>。但是体内、外的实验研究均发现 NSCs 在自然状态下分化为神经元的比例不高<sup>[3]</sup>。那么 AD 病理状态下反应性星形胶质细胞对移植 NSCs 的分化影响如何? 是什么机制参与了此过程? 本研究将初步探讨这一问题。

由于胶质细胞占中枢神经系统细胞总数近 90%, 其中星形胶质细胞数量最多, 分布最广。近 20 年对星形胶质细胞的认识不断增加, 如: 星形胶质细胞与神经元之间通讯和对话, 其对神经元分化、神经发生等的影响<sup>[1,4,5]</sup>。所以研究 AD 病理状态下脑部微环境对干细胞分化的影响离不开星形胶质细胞。为了避免 AD 脑内各种错综复杂的干扰因素, 本次

实验将研究对象单一纯化, 利用 A $\beta$ <sub>1-40</sub> 诱导 PC12 细胞凋亡, 将纯化的原代培养新生大鼠皮层星形胶质细胞与经 A $\beta$ <sub>1-40</sub> 诱导后的 PC12 共同孵育, 并且收集其 ACM, 即反应性 ACM, 观察 ACM 对胚胎大鼠皮层 NSCs 体外定向分化为神经元的比例影响及机制。

在第一部分实验中, 观察到随着 A $\beta$ <sub>1-40</sub> 诱导时间的延长, PC12 细胞凋亡率增高, 在 6 h 时达高峰后, 随后逐渐降低。ELISA 法测定的 A 组 ~C5 组 ACM 单位时间 BDNF 总量变化趋势与 A $\beta$ <sub>1-40</sub> 诱导 PC12 凋亡率变化趋势不一致, 且 D1~D5 组未检测到 BDNF, 说明共育 ACM 中 BDNF 是星形胶质细胞分泌的, 而非 PC12 细胞分泌。各组 NGF、NT-3 含量极少或未检测到, 说明反应性 ACM 中神经营养素家族以 BDNF 为代表。

第二部分实验中, 观察到在 I ~IV 组 NSCs 分化为神经元比例较低, 但 V ~VII 组分化比例明显升高, 说明在 6 h 这个时间点, A $\beta$ <sub>1-40</sub> 诱导的 PC12 细胞与星形胶质细胞共育的 ACM 明显提高了 NSCs 向神经元分化的比例, 推测 NSCs 向神经元分化比例随着 PC12 细胞凋亡率增高而增加, 6 h 之后又随其降低而减少。因此推测 I ~VII 组 NSCs 神经元分化比例可能与反应性 ACM 中某种可弥散因子和 PC12 细胞凋亡率有关。

Song 等<sup>[6]</sup>2002 年报道, 与星形胶质细胞共培养的 NSCs 分化为神经元数目是对照组的 10 倍, 而且进一步证实星形胶质细胞分泌的某种弥散因子参与了 NSCs 的神经再生过程; 在 Song 之后相继有报道指出, 与星形胶质细胞共育 4 d 后胚胎干细胞来源的 NSCs 神经元分化比例达(42.7 $\pm$ 2.6)%, 明显高于

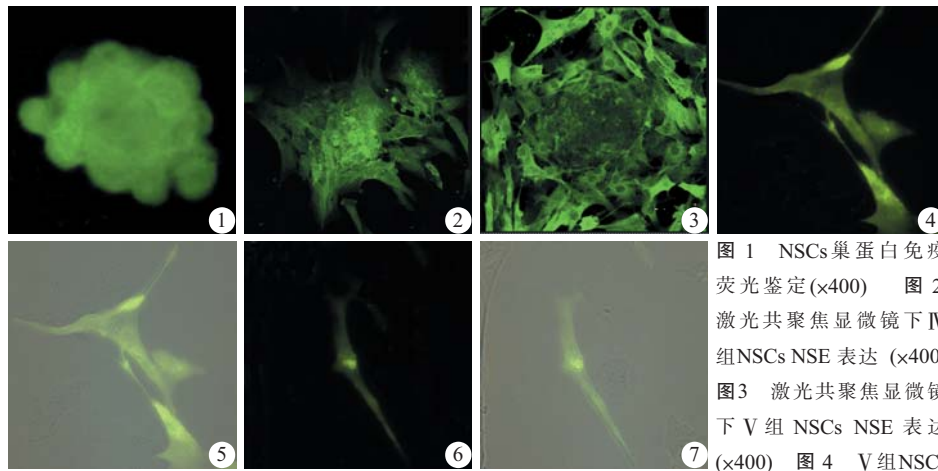


图 1 NSCs巢蛋白免疫荧光鉴定(x400) 图 2 激光共聚焦显微镜下 IV 组 NSCs NSE 表达 (x400) 图 3 激光共聚焦显微镜下 V 组 NSCs NSE 表达 (x400) 图 4 V 组 NSCs NSE 免疫荧光表达(x400) 图 5 V 组 NSCs NSE 免疫荧光表达和相同视野光镜合成图像(x400) 图 6 IV 组 NSCs NSE 免疫荧光表达(x400) 图 7 IV 组 NSCs NSE 免疫荧光表达和相同视野光镜合成图像(x400)

**Fig.1** Nestin expression in the neural stem cells identified by immunofluorescent staining (x400) **Fig.2** NSE expression in the neural stem cells in group IV detected by laser confocal microscopy(x400) **Fig.3** NSE expression in the neural stem cells in group V detected by laser confocal microscopy (x400) **Fig.4** NSE expression in the neural stem cells in group V detected by immunofluorescent staining (x400) **Fig.5** Merged image of the neural stem cells in group V observed by immunofluorescent staining and light microscope in the same vision field showing NSE expression (x400) **Fig.6** NSE expression in the neural stem cells in group IV by immunofluorescent staining (x400) **Fig.7** Merged image of the neural stem cells by immunofluorescent staining and light microscope in the same vision field showing NSE expression in group IV(x400)

对照组；与星形胶质细胞的 ACM 共育 3 d 后的 NSCs 神经元分化比例达(21.7±4)%，明显高于对照组<sup>[7,8]</sup>。

国内外已有文献证实 BDNF 能够促进 NSCs 向神经元分化，并且提高神经元分化比例<sup>[9,10]</sup>。体内实验也显示，将 BDNF 注入鼠侧脑室后明显增加了微管相关蛋白-2 阳性表达的新生神经元数量<sup>[11]</sup>。研究发现，脑损伤后，BDNF mRNA 表达上调，可能参与 NSCs 激活、增殖分化和移行<sup>[12]</sup>。此外，还有研究发现 BDNF 对 NSCs 的分化作用可能有区域特异性；BDNF 能提高鼠海马和前脑室管膜下区 NSCs 分化为锥体结构样细胞，但不能诱导鼠小脑、中脑、纹状体等来源 NSCs 分化成锥体样细胞<sup>[13,14]</sup>。

结合国内外研究结果，笔者等推测 PC12 细胞经  $\text{A}\beta_{1-40}$  诱导后出现凋亡同时分泌了某种细胞刺激因子，然后与星形胶质细胞共育，前者刺激星形胶质细胞反应性分泌功能增强，向共育培养液中分泌了可扩散的某种神经营养因子以及以 BDNF 为代表的神经营养家族，然后 ACM 中 BDNF 通过某一信号途径传递到 NSCs 核内，通过一系列相应基因和蛋白表达，调节了 NSCs 向神经元分化，因此推测 AD 病理条件下反应性星形胶质细胞有助于促进 NSCs 向神经元分化，并且 ACM 中的 BDNF 可能参与了此过程，这可能为 AD 反应性星形胶质细胞神

经修复机制又增添了一小部分内容，但是 AD 脑内微环境中星形胶质细胞对 NSCs 分化的作用机制是错综复杂的，还需要进一步探索。

#### 参 考 文 献

- [1] Lovell MA, Geiger H, Van Zant GE, et al. Isolation of neural precursor cells from Alzheimer's disease and aged control postmortem brain[J]. *Neurobiol Aging*, 2006, 27(7): 909-917.
- [2] Oliveira AA Jr, Hodges HM. Alzheimer's disease and neural transplantation as prospective cell therapy[J]. *Curr Alzheimer Res*, 2005, 2(1): 79-95.
- [3] Shihabuddin LS, Homer PJ, Ray J, et al. Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus[J]. *J Neurosci*, 2000, 20(23): 8727-8735.
- [4] 刘慧, 王小军, 胡荣, 等. 星形胶质细胞[J]. *生理科学进展*, 2004, 35(1): 86-91.
- [5] Perea G, Araque A. Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses [J]. *Science*, 2007, 317 (5841): 1083-1086.
- [6] Song HJ, Stevens CF, Gage FH. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells[J]. *Nature*, 2002, 417(6884): 39-44.
- [7] Zhou YF, Fang F, Fu JR, et al. An experimental study on astrocytes promoting production of neural stem cells derived from mouse embryonic stem cells[J]. *Chin Med J*, 2005, 118(23): 1994-1999.
- [8] 戴宜武, 徐如祥, 赵春平, 等. 神经干细胞发育过程中分化、迁移调控机制研究现状[J]. *中华神经医学杂志*, 2003, 3(2): 140-144.
- [9] Vicario-Abejon C, Johe KK, Hazel TG, et al. Function of basic

抗原的能力最强。因此,在 DC 成熟的前期加入肿瘤抗原,使其摄取、处理 U251 蛋白抗原,并以 MHC 限制的方式呈递在 DC 表面<sup>[6]</sup>。

本研究结果显示 Ag-DC-CIK 组比其余各组对 U251 细胞的杀伤活性高,比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。说明经 U251 蛋白抗原负载的 DC 与 CIK 混合培养后,成熟的 DC 以 MHC 限制的方式处理 U251 蛋白抗原,并将该信号呈递给 CIK,从而增强了 CIK 对 U251 的特异识别和杀伤能力。

综上所述,经 CBMCs 诱导生成的 DC 在体外能有效地递呈胶质瘤细胞的抗原,并能进一步激活 CIK,对胶质瘤细胞产生高效而特异的杀伤作用,其杀伤活性明显高于 CIK 和 Ag-CIK。本研究为胶质瘤的细胞免疫治疗提供了实验数据和理论依据,也为颅内肿瘤的生物治疗提供了新思路。

#### 参 考 文 献

- [1] 朱新梅,吕传真,肖保国,等. 凋亡肿瘤细胞抗原致敏的树突状细胞疫苗治疗大鼠颅内胶质瘤的实验研究[J]. 中华神经外科杂志, 2004, 20(5): 367-371.
- [2] Melchionda F, McKirdy MK, Melissa F, et al. Escape from immune surveillance does not result in tolerance to tumor-associated antigens[J]. J Immunother, 2004, 27(5): 329-338.
- [3] Lee WT, Shimizu K, Kuriyama H, et al. Tumor-dendritic cell

fusion as a basis for cancer immunotherapy [J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2005, 132(5): 755-764.

- [4] 张志强,田志刚,崔正言,等. MTT 法检测 NK 和 LAK 活性的方法学探讨[J]. 中国实验临床免疫学杂志, 1994, 6(1): 12.
- [5] 黄伟,徐如祥,王清华,等. 肿瘤切除程度及术后放、化疗对胶质瘤疗效影响的临床研究[J]. 中华神经医学杂志, 2007, 6(3): 301-304.
- [6] De Vleeschouwer S, Fieuws S, Rutkowski S, et al. Postoperative adjuvant dendritic cell-based immunotherapy in patients with relapsed glioblastoma multiforme[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(10): 3098-3104.
- [7] Joshi PS, Liu JQ, Wang Y, et al. Cytokine-induced killer T cells kill immature dendritic cells by TCR-independent and perforin-dependent mechanisms[J]. J Leukoc Biol, 2006, 80(6): 1345-1353.
- [8] Introna M, Franceschetti M, Ciocca A, et al. A Rapid and massive expansion of cord blood-derived cytokine-induced killer cells: an innovative proposal for the treatment of leukemia relapse after cord blood transplantation[J]. Bone Marrow Transplant, 2006, 38(9): 621-627.
- [9] Weng DS, Zhou J, Zhou QM, et al. Minimally invasive treatment combined with cytokine-induced killer cells therapy lower the short-term recurrence rates of hepatocellular carcinomas [J]. J Immunother, 2008, 31(1): 63-71.

(收稿日期:2009-03-01)

(本文编辑:王志娟)

(上接 665 页)

- fibroblast growth factor and neurotrophins in the differentiation of hippocampal neurons[J]. Neuron, 1995, 15(1): 105-114.
- [10] Shimazaki T, Arsenijevic Y, Ryan AK, et al. A role for the POU-III transcription factor Brn-4 in the regulation of striatal neuron precursor differentiation[J]. EMBO J, 1999, 18(2): 444-456.
- [11] Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, et al. Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus[J]. J Neurosci, 2001, 21(17): 6706-6717.
- [12] Wang Y, Sheen VL, Macklis JD. Cortical interneurons upregulate

neurotrophins in vivo in response to targeted apoptotic degeneration of neighboring pyramidal neurons [J]. Exp Neurol, 1998, 154(2): 389-402.

- [13] Christie SD, Mendez I. Neural transplantation in spinal cord injury [J]. Can J Neurol Sci, 2001, 28(1): 6-15.
- [14] Ahmed S, Reynolds BA, Weiss S. BDNF enhances the differentiation but not the survival of CNS stem cell-derived neuronal precursors [J]. J Neurosci, 1995, 15(8): 5765-5778.

(收稿日期:2009-03-06)

(本文编辑:张玲)