

## 人脑脊液对鼠神经干细胞增殖分化的影响

刘国平<sup>1</sup> 赵京涛<sup>1</sup> 方加胜<sup>2</sup>

1. 湖南省湘潭市中心医院神经外科, 湖南 湘潭, 411100

2. 中南大学湘雅医院神经外科, 湖南 长沙, 410008

**摘要:**目的 研究脑外伤血性脑脊液和脑积水清亮脑脊液对神经干细胞增殖分化的影响。方法 从大鼠脑组织中分离培养神经干细胞, 分别用人的两种脑脊液培养, 分为试验组(血性脑脊液组)和对照组(脑积水清亮脑脊液组), 于不同时间观察神经干细胞在两组脑脊液中的生长及增殖分化情况; 并应用免疫细胞化学技术对两组脑脊液中神经干细胞的分化进行鉴定和比较。结果 神经干细胞在两种脑脊液中均能存活并分化, 部分细胞悬浮生长长达十余天之久。加脑脊液培养第二天试验组 NSE 阳性细胞(神经元)的比例比对照组高, 有统计学意义( $P < 0.05$ ); 培养第十天试验组 GFAP 阳性细胞(星形胶质细胞)的比例比对照组高, NSE 阳性细胞的比例比对照组低, 有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 神经干细胞在脑外伤血性脑脊液和脑积水清亮脑脊液中均能存活、增殖和分化。两组脑脊液对神经干细胞分化的种类上有差异。

**关键词:** 脑脊液, 神经干细胞, 分化

### Effect of human cerebrospinal fluid on the proliferation and differentiation of rat neural stem cells

LIU Guo-Ping<sup>1</sup>, ZHAO Jing-Tao<sup>1</sup>, FANG Jia-sheng<sup>2</sup> 1. Department of Neurosurgery, Central Hospital of Xiangtan City, Xiangtan 411100; 2. Department of Neurosurgery, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, 410008

**Abstract: Objective** To investigate the effect of the injured brain cerebrospinal fluid(CSF) from traumatic brain injury and the hydrocephalus patients on the survival, proliferation and differentiation of neural stem cells(NSCs). **Methods** NSCs were isolated and cultured from brain of SD rat. The NSCs were cultured in human bloody CSF from the injured brain patients(the experimental group) or CSF from the hydrocephalus patients(the control group). The growth, proliferation and differentiation pattern of NSCs in two groups were observed at different times. The differentiated cells were identified by immunocytochemistry and their proportions were compared.

**Results** The NSCs could survive and differentiate both in bloody CSF and hydrocephalus CSF, and part of the cells could grow up by floating in CSF more than ten days. On the second day of the cultivate process, the percentage of NSE positive cells (neurons) in experimental group is significantly higher than that of control group( $P < 0.05$ ). On the tenth day, the percentage of GFAP positive cells (astrocytes) in the experimental group is significantly higher than that of control group, while the percentage of NSE positive cells in the experimental group is significantly lower than that of control group( $P < 0.05$ ). **Conclusions** The NSCs can survive, proliferate and differentiate both in the bloody CSF and hydrocephalus CSF of injured brain. There was different effect on the differentiation of NSCs between the two groups.

**Key words:** Cerebrospinal fluid(CSF), Neural stem cells(NSCs), Differentiation

神经干细胞替代治疗中枢神经系统疾病是当前国内外研究的热点,通过脑脊液移植神经干细胞是治疗中枢神经系统损伤的非常有前景的途径。但神经干细胞在脑脊液中的生长情况如何,脑脊液对神经干细胞的增殖与分化究竟有何影响,通过脑脊液移植的时机如何,目前相关的报道不多。本实验通过体外模拟神经干细胞在脑外伤后的血性脑

脊液和外伤后交通性脑积水的清亮脑脊液环境中生长,探讨两种脑脊液对神经干细胞增殖与分化的影响,为临床应用研究提供实验基础。

#### 1 材料和方法

##### 1.1 实验动物与试剂

新生 24 小时 SD 大鼠 3 只,由中南大学实验动物中心提供。DMEM/F12 培养基(Gibco),兔抗大

收稿日期:2011-01-11;修回日期:2011-03-14

作者简介:刘国平(1977-),男,硕士,主治医师,主要从事神经干细胞培养移植及临床神经外科的诊治研究。

鼠 NeuN 单克隆抗体, 兔抗大鼠 GFAP 单克隆抗体, SP 试剂盒(北京中杉生物工程有限公司)。

## 1.2 原代脑神经干细胞的分离和培养

取新生 SD 大鼠 3 只, 75% 乙醇消毒, 颈椎脱臼处死, 剪开头皮, 分离出脑组织, 剔除脑组织内血管、纤维, 放入盛基础培养基的无菌培养皿中, 剪成约  $0.5 \sim 1 \text{ mm}^3$  组织小块, 玻璃吸管反复轻柔吹打, 过 200 目滤网, 制成单细胞悬液, 以 1000 转/分离心 5 分钟, 去上清液, 加无血清培养基 2 ml 重悬细胞, 台盼兰染色计活细胞数, 以  $5 \sim 10 \times 10^5$  个/ml 密度接种到 25ml 培养瓶中, 置  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度培养箱中培养。此后每三天半量换液一次, 每七天左右传代一次。传代培养纯化的细胞经 Nestin 鉴定, 显示 Nestin 免疫反应阳性, 表明所培养的细胞为神经干细胞。

## 1.3 脑脊液的收集

所有脑脊液均于无菌条件下取自神经外科脑室-腹腔分流术中或无菌条件下腰椎穿刺术中, 其中脑积水清亮脑脊液 6 例(外伤后交通性脑积水患者, 伤后一至三个月左右采集, 脑脊液细胞数正常, 蛋白  $< 0.5 \text{ g/L}$ ), 闭合性脑挫裂伤血性脑脊液 15 例(脑外伤后一周左右采集, 血性脑脊液细胞总数为  $200 \times 10^6/\text{L} \sim 100000 \times 10^6/\text{L}$ , 蛋白  $0.7 \text{ g/L} \sim 5.6 \text{ g/L}$ , 细胞总数  $< 200 \times 10^6/\text{L}$  或  $> 100000 \times 10^6/\text{L}$  及颅内感染者排除在外), 标本量约 5-10 ml/例, 立即分装置于无菌小瓶中, 封口后置于  $4^\circ\text{C}$  冰箱不超过 24 小时, 或  $-20^\circ\text{C}$  冰箱不超过一周。

## 1.4 脑脊液和神经干细胞共培养

将第 3 代生长良好的神经干细胞球移入试管, 1000r/m 离心 5min 后去上清液, 加基础培养基 1ml, 吹打干细胞球使分散成单细胞悬液和小的神经球, 调整细胞浓度后种植于 6 孔培养板中, 分成两组, 一组添加脑积水清亮脑脊液, 另一组添加脑外伤血性脑脊液(各 3 ml), 继续在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度培养箱中培养, 每天观察神经干细胞的生长情况。

## 1.5 脑脊液对神经干细胞的诱导分化试验

选取第 3 代生长良好的神经球, 1000r/m 离心 5min 后去上清液, 加基础培养基 1~2 ml, 轻轻吹打使干细胞球分散, 种植于多聚赖氨酸包被的盖玻片上。试验分组: 于 24 孔培养板中分成两组: 试验组脑外伤血性脑脊液组, 对照组脑积水清亮脑脊液组。每孔添加脑脊液 0.75 ml, 每天观察其生长分化情况, 5 天更换脑脊液, 分别于 2 天、5 天、10

天行免疫细胞化学染色检测。

## 1.6 免疫细胞化学染色

将含有分化细胞的盖玻片取出, 用 SP 组织化学染色试剂盒分别检测 NSE、GFAP 在分化细胞中的表达。

## 1.7 细胞计数

免疫细胞化学染色阳性为棕褐色, 阴性对照不着色, NSE(+) 的细胞代表神经元, GFAP(+) 细胞代表星型胶质细胞, 少突胶质细胞因在 NSCs 分化产物中所占比例很少<sup>[1]</sup>, 未行免疫染色。苏木精复染核呈蓝色的细胞代表总细胞数。倒置相差显微镜下随机选择五个独立高倍视野计数阳性细胞及总细胞数, 计算各系细胞比例并求其平均数, 至少独立实验四次。残留在神经球中的神经干细胞因聚合密集, 难以计数, 排除在外。

## 1.8 统计学分析

结果采用 SPSS12.0 统计软件进行分析, 所得数据均以均数  $\pm$  标准差形式 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 数据间差异以  $t$  检验证实, 以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 神经干细胞与不同脑脊液共培养观察

神经干细胞在脑积水清亮脑脊液和脑外伤血性脑脊液中均能成活生长。在共培养后约两三小时, 即可看到神经球贴壁并出现分化, 随后血性脑脊液组中的神经球贴壁数量较清亮脑脊液组多, 神经球分化速度更快; 24 小时后两组脑脊液中约 80%~90% 的神经球均已贴壁分化, 但仍有小部分神经球未贴壁呈悬浮生长; 到第 10 天时, 两组脑脊液中仍可见少量神经球呈悬浮生长。不同浓度的血性脑脊液对干细胞的分化也有着影响, 脑脊液微黄, 脑脊液常规检查细胞总数仅为上百个 ( $\times 10^6/\text{L}$ ) 时, 此时贴壁分化的神经球比例相对较少, 贴壁的时间晚, 悬浮生长的神经球多, 与清亮脑脊液对神经干细胞的作用无明显差别; 而当血性脑脊液中细胞总数为  $10^3 \sim 10^5$  ( $\times 10^6/\text{L}$ ) 之间时, 神经干细胞贴壁分化的速度最快, 分化比较彻底。

### 2.2 不同脑脊液对神经干细胞分化的影响

分别于分化培养 2 天、5 天、10 天后做免疫细胞化学染色, 结果显示在两种脑脊液中神经干细胞均能分化为中枢神经系统的主要细胞: 表达 NSE 的神经元, 表达 GFAP 的星形胶质细胞。在血性脑脊液中, NSE(+) 细胞由开始时的  $36.6\% \pm 4.62\%$  降至  $25.2\% \pm 4.82\%$ , GFAP(+) 细胞逐渐增多, 从  $62.0\% \pm 9.27\%$  升至  $72.4\% \pm 5.77\%$ 。

在清亮脑脊液培养基中,神经球分化结果如下:游离在神经球外的单个细胞中NSE(+)细胞数逐渐增多,从24.6%±7.02%升至37.4%±6.80%,而GFAP(+)细胞数则从73.6%±5.77%降至59.8%±6.76%。统计结果显示,血性脑脊液中神经干细胞在第2天分化为神经元的比例比对照组高( $P < 0.05$ );分化5天两组脑脊液中分化为神经元和星形胶质细胞的比例差异无显著性;分化10天后清亮脑脊液组分化为神经元的比例要高( $P < 0.05$ ),而血性脑脊液组分化为星形胶质细

胞的比例要高( $P < 0.05$ )。

表1 NSCs在两种脑脊液中不同时间的分化情况( $n=5$ )

		试验组 ( $\bar{x} \pm S$ )	对照组 ( $\bar{x} \pm S$ )
NSE 阳性细胞	2 d	36.6% ± 4.62% *	24.6% ± 7.02%
	5 d	32.5% ± 3.46%	33.2% ± 8.76%
	10 d	25.2% ± 4.82% *	37.4% ± 6.80%
GFAP 阳性细胞	2 d	62.0% ± 9.27%	73.6% ± 5.77%
	5 d	64.0% ± 3.81%	62.6% ± 6.19%
	10 d	72.4% ± 5.77% *	59.8% ± 6.76%

注: \* 与对照组相比,  $P < 0.05$ 。

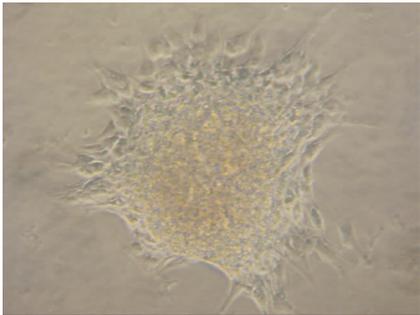


图1 NSCs在清亮脑脊液中分化1天相差显微镜(10×20)

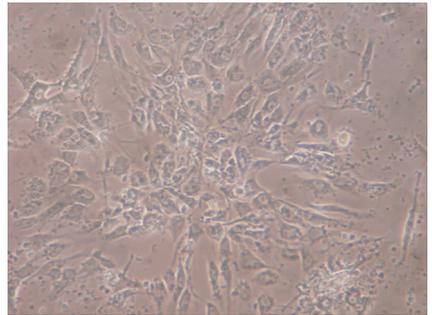


图2 NSCs在血性脑脊液中分化1天相差显微镜(10×20)

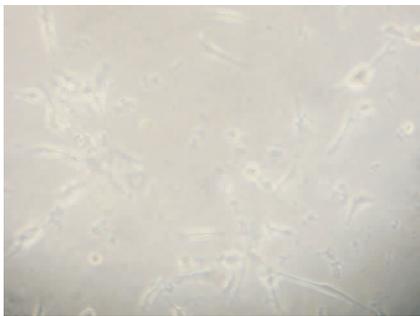


图3 NSCs悬液在清亮脑脊液中培养4天相差显微镜(10×20)



图4 NSCs悬液在血性脑脊液中培养4天相差显微镜(10×20)



图5 神经干细胞球分化出NSE(+)细胞光镜(DAB, 10×40)



图6 神经干细胞球分化出GFAP(+)细胞光镜(DAB, 10×40)

### 3 讨论

本实验将神经干细胞与血性脑脊液和脑积水脑脊液共培养,目的是比较两种脑脊液对移植细胞存活、增殖和分化的影响。Buddensiek 等<sup>[2]</sup>研究发现,胎鼠神经干细胞在成人脑脊液中比在标准培养基中能更好地存活,更好地增殖和分化,脑脊液的存在导致干细胞更快地丧失自我更新能力,促使神经干细胞更快地分化,轴索更快更粗地生长,但分化的细胞更多的是神经胶质细胞,神经元很少,因此,脑脊液刺激了神经胶质的增生而抑制了神经的形成。本实验发现神经干细胞能在两种脑脊液中均能存活、增殖和分化,并发现神经干细胞接种于两种脑脊液后数小时,均可见到贴壁分化现象,分化速度快,随时间推移,贴壁分化的细胞明显增多,最终分化为星形胶质细胞的比例高,结果与之相似。而实验中部分神经干细胞球悬浮生长长达十余天之久,考虑与脑脊液中的部分物质(如 FGF2 等)能促进神经干细胞增殖有关。Martin 等<sup>[3]</sup>研究发现,在脑发育早期,鸡胚胎的脑脊液和血清中存在 FGF2 的不同亚型,胚胎脑脊液中的 FGF2 在体内和体外均能促使神经上皮干细胞增殖,神经上皮干细胞能表达低水平的 FGF2,胚胎脑脊液中的 FGF2 主要来源于血清。Greenwood 等<sup>[4]</sup>研究发现人和鼠胚胎时期的脉络丛都能表达 FGF2。本实验中神经干细胞虽然增殖作用不明显,考虑与脑脊液量少,未能及时更换脑脊液有关,而人体内脑脊液处于不断产生、循环和回流的平衡状态,每天更新 3-4 次,脑脊液总量 1-2 天全部更新,在体内神经干细胞在脑脊液中的增殖可能更明显。Bai 等<sup>[5]</sup>研究发现,将神经干细胞悬液注入 SD 大鼠第四脑室,移植细胞能在脊髓表面形成细胞团,并逐渐增多,于术后 5 d 达到高峰。这种增殖形式均见于脊髓损伤组和脊髓未损伤组。

本实验还发现神经干细胞在血性脑脊液组贴壁分化的速度快,最初分化为神经元的比例比对照组高,随着分化细胞的增多和成熟,最终分化为胶质细胞的比例比对照组高,神经元所占比例相对较少。可能与培养时,神经元一般不继续分裂且很容易死亡,而胶质细胞在培养过程中较易存活且可继续分裂增殖有关。神经干细胞在脑外伤血性脑脊液中分化产生胶质细胞比对照组要多,可能与脑外伤后机体产生一系列反应,脑脊液中促胶质细胞增生的成分增多有关。脑外伤时,脑屏障受损引起通

透性改变,脑脊液的成分发生相应变化,在损伤的局部或者整个脑中出现各种细胞因子,主要有:白介素(IL)族、肿瘤坏死因子(TNF)、干扰素(IFN)等。有研究表明 TNF- $\alpha$  和 IL-6 是阻止大脑神经再生的主要障碍<sup>[6]</sup>,IL-6 增多可诱导神经干细胞向星形胶质细胞分化<sup>[7]</sup>。李秋霖等<sup>[8]</sup>发现大鼠 NSCs 脑内移植能有效降低脑出血模型大鼠脑内 IL-6、TNF- $\alpha$  的表达,并能够改善运动神经功能缺损。这些都说明脑外伤后脑脊液性状的变化是促使神经干细胞向胶质细胞分化增多神经元分化减少的原因。Yan 等<sup>[9]</sup>研究发现将人胚胎脊髓来源干细胞鞘注入受伤的裸鼠椎管内,观察到干细胞能分化为神经元,形成轴索和突触,并与宿主运动神经元建立广泛联系。椎管的微环境决定了最终分化命运,损害的存在增加白质中胶质细胞的出现率。本实验中神经干细胞在两种脑脊液中的分化为神经元和星形胶质细胞的比例不一样,也说明了不同脑脊液对神经干细胞的分化有不同影响。

大量研究表明,炎症反应阶段不利于移植细胞的存活及分化。Okano 等<sup>[10]</sup>报道脊髓损伤细胞移植治疗的最佳时间是损伤后 1~2 周。本试验脑脊液取材来自外伤后一周,神经干细胞在此脑脊液中培养能分化出神经元和胶质细胞,也间接说明外伤一周后可能适合神经干细胞移植。但部分血性脑脊液浓度高,细胞总数多,神经干细胞生长差,增殖和分化受到抑制,可能与脑脊液中的炎症因子过多有关,说明神经干细胞的移植时机是相对的,需根据外伤后的具体情况决定。

本实验在交通性脑积水脑脊液中培养神经干细胞,发现神经元分化的比例最终比血性脑脊液组高。可能与脑脊液中炎症因子少,且含有 BDNF、FGF 等因子有关。Laske 等<sup>[11]</sup>研究发现,脑积水患者血清中 BDNF 的含量比正常血清中的含量明显要低,但脑脊液中的 BDNF 的含量与正常人无明显差别。目前研究表明 BDNF 能促进神经干细胞增殖<sup>[12]</sup>,并能促 NSCs 向神经元方向分化。Corti 等<sup>[13]</sup>将脊髓来源的小鼠神经干细胞鞘注入脊髓性肌萎缩的小鼠模型,鞘注的神经干细胞能迁移到实质并产生小部分运动神经元,受治疗的小鼠表现出神经运动功能的改善,延长了生存时间。

脑脊液的成分复杂,既含有促神经干细胞增殖的物质,也含有促干细胞向不同方向分化的物质,不同脑脊液性状的变化将对神经干细胞的增殖分

化产生不同影响。本实验将大鼠神经干细胞分别与人类脑外伤血性脑脊液和脑积水脑脊液共培养,发现神经干细胞能在两种脑脊液中存活,增殖和分化,为神经干细胞移植用于临床提供实验依据。

参 考 文 献

- [ 1 ] Ozawa K, Uruno T, Miyakawa K, et al. Expression of the fibroblast growth factor family and their receptor family genes during mouse brain development. *Brain Res Mol Brain Res*, 1996, 41 ( 1-2 ) : 279-288.
- [ 2 ] Buddensiek J, Dressel A, Kowalski M, et al. Adult cerebrospinal fluid inhibits neurogenesis but facilitates gliogenesis from fetal rat neural stem cells. *J Neurosci Res*, 2009, 87 ( 14 ) : 3054-3066.
- [ 3 ] Martín C, Bueno D, Alonso MI, et al. FGF2 plays a key role in embryonic cerebrospinal fluid trophic properties over chick embryo neuroepithelial stem cells. *Dev Biol*, 2006, 297 ( 2 ) : 402-416.
- [ 4 ] Greenwood S, Swetloff A, Wade AM, et al. Fgf2 is expressed in human and murine embryonic choroid plexus and affects choroid plexus epithelial cell behaviour. *Cerebrospinal Fluid Res*, 2008, 5 : 20.
- [ 5 ] Bai H, Suzuki Y, Noda T, et al. Dissemination and proliferation of neural stem cells on the spinal cord by injection into the fourth ventricle of the rat; a method for cell transplantation. *J Neurosci Methods*, 2003, 124 ( 2 ) : 181-187.
- [ 6 ] Ajmone-Cat MA, Cacci E, Ragazzoni Y, et al. Pro-gliogenic effect of IL-1 in the differentiation of embryonic neural precursor cells in vitro. *J Neurochem*, 2010, 113 ( 4 ) : 1060-1072.
- [ 7 ] Islam O, Gong X, Rose-John S, et al. Interleukin-6 and neural stem cells: more than gliogenesis. *Mol Bio Cell*, 2009, 20 ( 1 ) : 188-199.
- [ 8 ] 李秋霖,王振忠,方剑波. 神经干细胞在脑出血大鼠脑内移植后对 IL-6、TNF- $\alpha$  表达的影响. *中华神经外科杂志*, 2010, 26 ( 3 ) : 272-276.
- [ 9 ] Yan J, Xu L, Welsh AM, et al. Extensive neuronal differentiation of human neural stem cell grafts in adult rat spinal cord. *PLoS Med*, 2007, 4 ( 2 ) : e39.
- [ 10 ] Okano H, Ogawa Y, Nakamura M, et al. Transplantation of neural stem cells into the spinal cord after injury. *Semin Cell Dev Biol*, 2003, 14 ( 3 ) : 191-198.
- [ 11 ] Laske C, Stransky E, Leyhe T, et al. BDNF serum and CSF concentrations in Alzheimer's disease, normal pressure hydrocephalus and healthy controls. *J Psychiatr Res*, 2007, 41 ( 5 ) : 387-394.
- [ 12 ] Islam O, Loo TX, Heese K, et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) has Proliferative Effects on Neural Stem Cells through the Truncated TRK-B Receptor, MAP Kinase, AKT, and STAT-3 Signaling Pathways. *Curr Neurovasc Res*, 2009, 6 ( 1 ) : 42-53.
- [ 13 ] Corti S, Nizzardo M, Nardini M, et al. Neural stem cell transplantation can ameliorate the phenotype of a mouse model of spinal muscular atrophy. *J. Clin. Invest*, 2008, 118 ( 10 ) : 3316-3330.