广州医科大学

博士研究Th学位论文



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

**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**

**专 业 名 称：神 经 病 学研** 究 生：刘 菲 菲学 **号：2011310218**

**指 导 老 师：龙 大 宏 教授**

本课题受广东省自然科学基金资助项目(9151063101000016)和广州市属高校科研计划项目(2012C042)资助。

广州医科大学 广州二 0 一四年五月

目 录

[摘要](#_Toc686212433) 3

[第一部分 胚胎大鼠神经干细胞的体外培养](#_Toc686212434) 3

[第二部分](#_Toc686212435) **[NGF](#_Toc686212435)**[联合](#_Toc686212435)**[BDNF](#_Toc686212435)**[对体外培养的神经干细胞分化为神经元的影响](#_Toc686212435) 4

[第三部分](#_Toc686212436) **[NGF](#_Toc686212436)**[和](#_Toc686212436)**[BDNF](#_Toc686212436)**[联合神经干细胞在](#_Toc686212436)**[192-IgG-saporin](#_Toc686212436)**[致阿尔茨海默病模型鼠中的应用](#_Toc686212436) 4

[1. 将NSC先悬浮培养到P2代的神经球，再转化成单层贴壁培养，更利于](#_Toc686212437) 4

[2. NGF和BDNF联合应用比单独应用时可以诱导更多的NSC分化为神经元，p-ERK，MASH1，NGN1和NeuroD的水平在各组间的变化差异与神经元分化比例有着正相关的联系，这些结果都表明联合应用NGF 和](#_Toc686212438) 4

[3. 用NGF或(和) BDNF体外诱导NSC分化3 d，再将混合细胞移植到模型鼠受损侧的基底前脑，可以明显提高受损动物的学习记忆能力，补充胆碱能神经元数量，提高海马突触素和AChE纤维数量，联合诱导比单因子诱导的效果更明显。](#_Toc686212439) 4

**[Abstract](#_Toc686212440)** 4

[主要符号中英文对照表](#_Toc686212441) 6

[前言](#_Toc686212442) 11

**[1](#_Toc686212443)** [神经干细胞及其在神经系统中的作用](#_Toc686212443) 11

**[3](#_Toc686212444)** [影响](#_Toc686212444)**[NSC](#_Toc686212444)**[分化的因素](#_Toc686212444) 11

**[3.1](#_Toc686212445)** [神经营养因子对](#_Toc686212445)**[NSC](#_Toc686212445)**[分化的影响](#_Toc686212445) 11

**[3.2](#_Toc686212446)****[MAPK/ERK](#_Toc686212446)**[信号通路对](#_Toc686212446)**[NSC](#_Toc686212446)**[分化的影响](#_Toc686212446) 11

**[3.3](#_Toc686212447)** [转录因子对](#_Toc686212447)**[NSC](#_Toc686212447)**[分化的影响](#_Toc686212447) 11

**[5](#_Toc686212448)** [本研究的立题依据和创新点](#_Toc686212448) 12

[第一部分 胚胎大鼠神经干细胞的体外培养](#_Toc686212449) 12

**[1](#_Toc686212450)** [材料和方法](#_Toc686212450) 12

**[1.1](#_Toc686212451)** [动物、主要试剂和仪器](#_Toc686212451) 12

**[1.2](#_Toc686212452)****[NSC](#_Toc686212452)**[的取材、培养和传代](#_Toc686212452) 15

**[1.3](#_Toc686212453)****[NSC](#_Toc686212453)**[的分化](#_Toc686212453) 15

**[1.4](#_Toc686212454)****[NSC](#_Toc686212454)**[的干性鉴定和分化能力鉴定](#_Toc686212454) 15

**[1.5](#_Toc686212455)** [免疫细胞化学](#_Toc686212455)**[/](#_Toc686212455)**[免疫荧光](#_Toc686212455)**[(Immunocytochemistry/Immunofluorescence, ICC/IF)](#_Toc686212455)** 15

**[1.6](#_Toc686212456)****[Q-PCR](#_Toc686212456)**[步骤](#_Toc686212456) 15

**[1.6.1](#_Toc686212457)****[RNA](#_Toc686212457)**[的提取](#_Toc686212457) 15

**[1.6.2](#_Toc686212458)** [逆转录合成](#_Toc686212458)**[cDNA](#_Toc686212458)**[第一链](#_Toc686212458) 16

**[1.6.3](#_Toc686212459)****[Q-PCR](#_Toc686212459)**[反应检测基因表达](#_Toc686212459) 16

**[1.7](#_Toc686212460)** [统计学分析](#_Toc686212460) 17

**[2](#_Toc686212461)** [结果](#_Toc686212461) 18

**[2.1](#_Toc686212462)****[NSC](#_Toc686212462)**[的培养和增殖及干性签定](#_Toc686212462) 18

**[2.2](#_Toc686212463)****[NSC](#_Toc686212463)**[的分化能力鉴定](#_Toc686212463) 18

**[3](#_Toc686212464)** [讨论](#_Toc686212464) 18

**[3.1](#_Toc686212465)****[NSC](#_Toc686212465)**[的体外培养方案](#_Toc686212465) 18

**[3.2](#_Toc686212466)** [影响](#_Toc686212466)**[NSC](#_Toc686212466)**[分化的因素](#_Toc686212466) 18

**[3.3](#_Toc686212467)****[NSC](#_Toc686212467)**[体外培养的不足](#_Toc686212467) 19

**[3.4](#_Toc686212468)** [神经球转化为单层贴壁培养的优点](#_Toc686212468) 19

**[4.](#_Toc686212469)** [结论](#_Toc686212469) 19

[第二部分](#_Toc686212470) **[NGF](#_Toc686212470)**[联合](#_Toc686212470)**[BDNF](#_Toc686212470)**[对体外培养的神经干细胞分化为神经元的影响](#_Toc686212470) 20

**[1](#_Toc686212471)** [材料和方法](#_Toc686212471) 20

**[1.1](#_Toc686212472)** [动物、主要试剂和仪器](#_Toc686212472) 20

**[1.2](#_Toc686212473)****[NSC](#_Toc686212473)**[的取材和培养](#_Toc686212473) 22

**[1.3](#_Toc686212474)** [单独使用](#_Toc686212474)**[NGF](#_Toc686212474)**[或](#_Toc686212474)**[BDNF](#_Toc686212474)**[和两个因子的联合应用](#_Toc686212474) 22

**[1.3.1](#_Toc686212475)****[NGF](#_Toc686212475)**[和](#_Toc686212475)**[BDNF](#_Toc686212475)**[浓度的确定](#_Toc686212475) 22

**[1.3.2](#_Toc686212476)** [因子的单独使用和联合应用对](#_Toc686212476)**[NSC](#_Toc686212476)**[分化及相关分子改变的影响](#_Toc686212476) 22

**[1.4](#_Toc686212477)** [免疫细胞化学](#_Toc686212477)**[/](#_Toc686212477)**[免疫荧光](#_Toc686212477) 23

**[1.5](#_Toc686212478)****[Q-PCR](#_Toc686212478)**[步骤](#_Toc686212478) 23

**[1.6](#_Toc686212479)** [总蛋白的提取和浓度测定](#_Toc686212479) 24

**[1.6.1](#_Toc686212480)** [细胞裂解提取总蛋白](#_Toc686212480) 24

**[1.6.2](#_Toc686212481)** [蛋白浓度测定](#_Toc686212481) 24

**[1.7](#_Toc686212482)** [蛋白免疫印迹](#_Toc686212482)**[(western blotting, WB)](#_Toc686212482)** 25

**[1.7.1](#_Toc686212483)****[WB](#_Toc686212483)**[试剂准备](#_Toc686212483) 25

**[1.7.2](#_Toc686212484)****[WB](#_Toc686212484)**[分离胶和浓缩胶的制备](#_Toc686212484) 28

**[1.7.3](#_Toc686212485)****[WB](#_Toc686212485)**[操作步骤](#_Toc686212485) 30

**[1.8](#_Toc686212486)** [统计学分析](#_Toc686212486) 30

**[2](#_Toc686212487)** [结果](#_Toc686212487) 30

**[2.1](#_Toc686212488)****[NGF](#_Toc686212488)**[和](#_Toc686212488)**[BDNF](#_Toc686212488)**[诱导单层贴壁培养](#_Toc686212488)**[NSC](#_Toc686212488)**[分化](#_Toc686212488) 30

**[2.2](#_Toc686212489)** [比较因子的单独使用和联合应用对](#_Toc686212489)**[NSC](#_Toc686212489)**[分化的影响](#_Toc686212489) 31

**[2.3](#_Toc686212490)****[WB](#_Toc686212490)**[检测](#_Toc686212490)**[PD98059](#_Toc686212490)**[对](#_Toc686212490)**[P-ERK](#_Toc686212490)**[的水平变化和神经元分化比例的影响](#_Toc686212490) 33

**[2.4 Q-PCR](#_Toc686212491)**[检测](#_Toc686212491)**[NGF](#_Toc686212491)**[或](#_Toc686212491)**[(](#_Toc686212491)**[和](#_Toc686212491)**[) BDNF](#_Toc686212491)**[对](#_Toc686212491)**[bHLH](#_Toc686212491)**[家庭基因的表达变化的影响](#_Toc686212491) 34

**[3](#_Toc686212492)** [讨论](#_Toc686212492) 37

**[3.1](#_Toc686212493)****[NGF](#_Toc686212493)**[和](#_Toc686212493)**[BDNF](#_Toc686212493)**[对](#_Toc686212493)**[NSC](#_Toc686212493)**[分化为神经元的叠加作用](#_Toc686212493) 37

**[3.2](#_Toc686212494)****[ERK](#_Toc686212494)**[的磷酸化参与](#_Toc686212494)**[NGF](#_Toc686212494)**[和](#_Toc686212494)**[BDNF](#_Toc686212494)**[对](#_Toc686212494)**[NSC](#_Toc686212494)**[的叠加作用](#_Toc686212494) 37

**[3.3](#_Toc686212495)****[MASH1](#_Toc686212495)**[、](#_Toc686212495)**[NGN1](#_Toc686212495)**[和](#_Toc686212495)**[NeuroD](#_Toc686212495)**[的表达变化参与](#_Toc686212495)**[NGF](#_Toc686212495)**[和](#_Toc686212495)**[BDNF](#_Toc686212495)**[对](#_Toc686212495)**[NSC](#_Toc686212495)**[的叠加作用](#_Toc686212495) 37

**[3.4](#_Toc686212496)****[NSC](#_Toc686212496)**[在细胞移植中的前景和挑战](#_Toc686212496) 37

**[4.](#_Toc686212497)** [结论](#_Toc686212497) 38

[第三部分](#_Toc686212498) **[NGF](#_Toc686212498)**[和](#_Toc686212498)**[BDNF](#_Toc686212498)**[联合神经干细胞在](#_Toc686212498)**[192-IgG-saporin](#_Toc686212498)**[致阿尔茨海默病模型鼠中的应用](#_Toc686212498) 39

**[1](#_Toc686212499)** [材料和方法](#_Toc686212499) 39

**[1.1](#_Toc686212500)** [动物、主要试剂和仪器](#_Toc686212500) 39

**[1.2](#_Toc686212501)****[SD](#_Toc686212501)**[大鼠侧脑室的](#_Toc686212501)**[192-IgG-saporin](#_Toc686212501)**[注射](#_Toc686212501) 41

**[1.3](#_Toc686212502)** [水迷宫行为学测试](#_Toc686212502) 41

**[1.3.1](#_Toc686212503)****[Morris](#_Toc686212503)**[水迷宫实验装置](#_Toc686212503) 41

**[1.3.2](#_Toc686212504)** [定位航行实验](#_Toc686212504)**[(](#_Toc686212504)**[隐藏平台实验](#_Toc686212504)**[)](#_Toc686212504)** 42

**[1.3.3](#_Toc686212505)** [空间搜索实验](#_Toc686212505) 42

**[1.4](#_Toc686212506)****[NSC](#_Toc686212506)**[的培养，诱导分化和移植](#_Toc686212506) 42

**[1.5](#_Toc686212507)** [动物的灌注及组织切片](#_Toc686212507) 42

**[1.6](#_Toc686212508)** [形态学检测](#_Toc686212508) 42

**[1.6.1](#_Toc686212509)** [免疫组织化学](#_Toc686212509)**[(immunohistochemistry](#_Toc686212509)**[，](#_Toc686212509)**[IHC)](#_Toc686212509)**[检测](#_Toc686212509)**[p75NGFR](#_Toc686212509)**[受体和突触素](#_Toc686212509) 42

[1.6.2 海马切片](#_Toc686212510)**[AChE](#_Toc686212510)**[纤维染色各种试剂配制：](#_Toc686212510) 43

**[1.6.3](#_Toc686212511)** [切片脱水透明](#_Toc686212511) 44

**[1.7](#_Toc686212512)** [统计学分析](#_Toc686212512) 44

**[2](#_Toc686212513)** [结果](#_Toc686212513) 44

**[2.1](#_Toc686212514)****[Morris](#_Toc686212514)**[水迷宫比较不同组之间的行为学差异](#_Toc686212514) 45

**[2.2](#_Toc686212515)** [胆碱能神经元在不同组间的差别](#_Toc686212515) 46

**[2.3](#_Toc686212516)** [突触素染色在不同组间的差别](#_Toc686212516) 48

**[2.4](#_Toc686212517)****[AChE](#_Toc686212517)**[染色在不同组间的差别](#_Toc686212517) 49

**[3.](#_Toc686212518)** [讨论](#_Toc686212518) 50

**[3.1](#_Toc686212519)****[192-IgG-saporin](#_Toc686212519)**[致](#_Toc686212519)**[AD](#_Toc686212519)**[模型的建立](#_Toc686212519) 50

**[3.2](#_Toc686212520)****[NSC](#_Toc686212520)**[对](#_Toc686212520)**[AD](#_Toc686212520)**[模型鼠的影响](#_Toc686212520) 50

**[3.3](#_Toc686212521)****[NGF](#_Toc686212521)**[和](#_Toc686212521)**[BDNF](#_Toc686212521)**[联合](#_Toc686212521)**[NSC](#_Toc686212521)**[对](#_Toc686212521)**[AD](#_Toc686212521)**[模型鼠的影响](#_Toc686212521) 51

**[4](#_Toc686212522)** [结论](#_Toc686212522) 51

[全文总结和展望](#_Toc686212523) 52

[参考文献](#_Toc686212524) 52

[综述](#_Toc686212525) 57

**[4](#_Toc686212526)** [结论](#_Toc686212526) 58

[展 望](#_Toc686212527) 58

[参考文献](#_Toc686212528) 58

[作者简介](#_Toc686212529) 59

[附](#_Toc686212530)[录](#_Toc686212530) 61

[学位论文原创性声明](#_Toc686212531) 63

[学位论文知识产权权属声明](#_Toc686212532) 63

[关于学位论文使用授权的说明](#_Toc686212533) 63

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

**博士研究生：刘菲菲导师：龙大宏教授**

摘**要**

**研究背景：**阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种常见的神经退行性疾病，其主要特征是进行性的不可逆转的记忆和认知功能衰退，主要的病理学变化包括胆碱能神经元丢失。神经干细胞(Neural stem cell, NSC)是一类非常重要的多潜能干细胞，有能力分化为神经元或神经胶质细胞，在细胞移植治疗以神经元丢失为主要特征的神经系统疾病中有潜在的应用前景。NSC在体外可以进行神经球悬浮培养和单层贴壁培养，也可以在两者之间进行转换。NSC分化机制非常复杂，而且受多方面因素的影响。研究表明，神经生长因子(nerve growth factor, NGF)和脑源性神经生长因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)不但可以维持神经元的生长和存活，还可以促进NSC增殖并诱导其分化为神经元。NGF和BDNF通过与NSC表面的受体Trk结合，激活MAPK/ERK信号通路，参与NSC的增殖分化调控。转录因子的表达变化对NSC 的增殖分化也有非常重要的调节作用。碱性螺旋-环-螺旋

（bHLH）转录因子家族中的HES1和HES5成员，有维持NSC增殖并抑制其分化的作用，另外的家庭成员如MASH1, NGN1和NeuroD则可促进NSC分化。了解NSC的分化机制，主要是为了把NSC应用于细胞移植代替疗法治疗神经退行性疾病。研究表明，NSC移植可以改善受损神经的功能，经NGF或BDNF处理的NSC在移植后的存活和迁移能力都更高。

# 第一部分 胚胎大鼠神经干细胞的体外培养

**目的**建立NSC体外培养方案，使NSC在体外可以得到增殖和分化。**方法**无菌条件下取SD大鼠胚胎端脑，无血清悬浮培养，形成P2代神经球后，将神经球消化成单细胞，分为神经球悬浮培养和单层贴壁培养，并对两种不同培养方式下的

NSC进行干性鉴定和分化能力鉴定。**结果**神经球悬浮培养和单层贴壁培养均可得到的NSC，单层贴壁培养的细胞Nestin阳性率有93.17±3.06 %；分化3d后，在不

1

加入诱导因子的情况下，悬浮培养的神经球β-tubulinⅢ阳性细胞为11.91±2.73 %，单层贴壁培养的NSC分化后β-tubulinⅢ阳性细胞率为19.55±1.09 %。**结论**先经过两代神经球悬浮培养后，再转化进行单层贴壁培养的NSC更利于分化为神经元。

**关键词：**神经干细胞；神经球；单层贴壁培养；分化

# 第二部分 **NGF**联合**BDNF**对体外培养的神经干细胞分化为神经元的影响

**目的**研究单独使用NGF或BDNF和两个因子联合应用对神经干细胞分化为神经元的影响，并探讨可能的分子机制。**方法**将单层贴壁培养的细胞分为四组，对照组，NGF组，BNDF组，BNDF和NGF联合组。在诱导分化1 d，3 d，7 d和14 d时用免疫荧光技术检测各组神经元分化比例，用荧光定量PCR(Q-PCR)技术检测HES1, HES5，MASH1, NGN1和NeuroD表达量的变化。在应用MEK抑制剂

PD98059处理细胞的情况下，蛋白免疫印迹(WB)技术用于检测不同组MEK下游信号蛋白磷酸化的ERK(p-ERK)的水平变化。**结果**单独使用NGF或BDNF都可以诱导神经元分化，诱导3 d时神经元比例分别为31 %和35 %, BDNF和NGF联合诱导时，神经元比例更高，诱导3 d时约为39 %，各组间差异有统计学意义(*P*＜0.01)。

WB结果表明，在使用和不使用MEK抑制剂PD98059的情况下，NGF组和BDNF组都比对照组p-ERK水平高，联合组比NGF组和BDNF组的p-ERK水平高，各组间差异有统计学意义(*P*＜0.01)。Q-PCR结果表明HES1和HES5在诱导分化后明显降低，但各组间差异无统计学意义；MASH1、NGN1和NeuroD表达在诱导分化后有明显上升，联合组比NGF组和BDNF组表达水平明显提高，各组间差异有统计学意义(*P*＜0.05)。**结论**p-ERK，MASH1, NGN1和NeuroD的水平在各组间的变化差异与神经元分化比例有着正相关的联系，所有这些结果都表明联合应用NGF和BDNF可以提高对NSC分化为神经元的影响，这为我们下一步的在体实验提供理论依据和实验基础。

**关键词：**神经生长因子；脑源性神经生长因子；分化；碱性螺旋 -环-螺旋

# **第三部分** **NGF**和**BDNF**联合神经干细胞在**192-IgG-saporin**致阿尔茨海默病模型鼠中的应用

**目的**探讨不同诱导方案下混合细胞的移植对192-IgG-saporin致AD模型动物的影响。**方法**将动物分为5组，假手术组，AD模型组，NGF组，BDNF组，联合组。假手术组用等体积的生理盐水代替192-IgG-saporin，动物建模3 w后，用NGF，

2

BDNF和联合因子诱导NSC，将诱导3 d后的混合细胞移植到受损动物的基底前脑，这3组动物简称为NGF组，BDNF组和联合组。细胞移植4周后，水迷宫检测不同组动物的学习记忆能力，免疫组织化学检测不同组动物基底前脑胆碱能神经元数量的改变和海马突触素的改变，组织化学方法检测海马AChE纤维的改变。**结果**模型组学习记忆能力明显下降，细胞移植组可以明显提高受损动物的学习记忆能力，其中联合组第4 d的逃避潜伏期缩短至8.87±0.26 s，第5 d空间搜索实验穿越平台次

数为5.33±1.15次，与模型组差异有统计学意义(*P*＜0.05)；联合组基底前脑胆碱能神经元数量为96.00±6.20，恢复到假手术组的98.16%，海马突触素OD值恢复到假手术组的92.45%, AChE纤维数量恢复到假手术组的95.41%。**结论**用NGF 和

BDNF体外诱导NSC 3 d，再将混合细胞移植到受损动物，可以明显提高受损动物的学习记忆能力，补充胆碱能神经元数量，提高海马突触素和AChE纤维数量，联合诱导比单因子诱导的效果更明显。

**关键词：**老年痴呆症；水迷宫；胆碱能神经元；突触素；胆碱能纤维 **总结：**

## 1. 将NSC先悬浮培养到P2代的神经球，再转化成单层贴壁培养，更利于

NSC向神经元方向分化。

## 2. NGF和BDNF联合应用比单独应用时可以诱导更多的NSC分化为神经元，p-ERK，MASH1，NGN1和NeuroD的水平在各组间的变化差异与神经元分化比例有着正相关的联系，这些结果都表明联合应用NGF 和

BDNF可以提高对NSC分化为神经元的影响，这为我们下一步的在体实验提供理论依据和实验基础。

## 3. 用NGF或(和) BDNF体外诱导NSC分化3 d，再将混合细胞移植到模型鼠受损侧的基底前脑，可以明显提高受损动物的学习记忆能力，补充胆碱能神经元数量，提高海马突触素和AChE纤维数量，联合诱导比单因子诱导的效果更明显。

3

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

Candidate: Liu Fei-fei

Tutor: Pro. Long Da-hong

**Abstract**

**Background:** Alzheimer's disease (AD) is a common neurodegenerative disorders in elderly people, which is characterized by progressive and irreversible decline of memory and cognitive function. The major pathological features include the progressive degeneration and loss of cholinergic neurons and synapses encompassing the brain. Neural stem cell (NSC) is important pluripotent stem cells, which can differentiate to form the specified neurons, glial cells, and oligodendrocytes. NSC has potential application for cell replacement therapy, such as AD, which is characterized by uncontrolled cell death. NSC can be cultured in vitro as neurospheres or adherent monolayer, or be transferred neurospheres to monolayer culture. The mechanism during differentiation to neurons is very complex and influenced by many factors. The present study showed that nerve growth factor (NGF) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) BDNF treatment could support the survival of existing neurons as well as encourage the growth and differentiate of new neurons. NGF and BDNF involved in regulationg of NSC proliferation and diffiretiation via binding Trk receptors and activating MAPK/ERK signal pathway. A basic helix-loop-helix (bHLH) is a protein structural motif that characterizes a family of transcription factors (TFs), which plays prominent roles in proliferation, growth and differentiation processes of NSC. HES1 and HES5 maintain the number and status of undifferentiated NSC and neural progenitors (NPs) cells and inhibite differentiation. MASH1, NGN1 and NeuroD can promote neural differentiation. The major goal to understand the differentiation mechanism of NSC is that NSC is applied as transplation therapy to treat neurodegenerative diseases. It was showed that NSC could impreove function of impaired nerve after grafted and that NGF or BDNF treated NSC was improved in survival number and migration area.

4

**PartⅠCulture of neural stem cells from rat embryo in vitro**

**Aims:** Culturing of NSC in vitro was investigated, in which NSC could proliferate and differentiate. **Methods:** The cerebrums of rat embryos were separated in sterile working condition and cultured in serum-free medium. When the secondary neurospheres were formed, Accutase digested them into single cells. Then they were divided into two parts, one was cultured with suspension neurospheres, the other was plated to adherent monolayer. And the abilities of" stem" and" differentiation" in two methods were

Examined. **Results:** NSC I s obtained in both of two. Proportation of Nestin-positive cells in adherent monolayer culture is 93.17±3.06 %. β-tubulinⅢ-positive cells is higher in adherent monolayer culture (19.55±1.09 %) than in suspension neurospheres

(11.91±2.73 %) without any inducing factor. **Conclusion:** The adherent monolayer culture transferred from P2 neurospheres is a better method for differentiation of neurons from NSC.

**Key words:** Neural stem cell; Neurospheres; Adherent monolayer culture; Differentiation

**PartⅡCombined effect of NGF and BDNF on the neuronal differentiation of neural stem cells and the potential molecular mechanisms**

**Aims** The effect of NGF, BDNF and BNDF combined with NGF on neuronal differentiation of NSC and their possible mechanisms were investigated by this study. **Methods** Adherent monolayer culture was employed to obtain highly homogeneous NSC. The cells were divided into four groups: control, NGF, BDNF, and a combination (BDNF+NGF) group. The proportions of neuron and phospho-ERK (p-ERK) levels were examined using immunocytochemistry and western blotting. Q-PCR was used to measure the mRNA levels of HES1, HES5, MASH1, NGN1 and NeuroD at different time intervals after neurotrophins-induced differentiation. **Results** Both NGF and BDNF are found to induce the neuronal differentiation of NSC. Proportion ofβ-tubulin III-positive cells are 31% in NGF, 35% in BDNF and 39% in combination at 3 days after

NTs-induced differentiation, the differences among them are statistically significant(*P*＜

0.01). P-ERK expression levels are the higher in NGF and BDNF and highest in

5

Combination group, and differences among them are statistically significant(*P*＜0.05). Q-PCR results show that relative quantity (RQ) of HES1 and HES5 are evidently reduced after NTs-induced differentiation. There is no significant difference among control, NGF, BDNF and combination group at all time points. Expressions of MASH1, NGN1 and NeuroD are markedly enhanced in NTs-induced differentiation groups as compared to the control and highest in combination group at all time intervals. The differences among

Them are statistically significant(*P*＜0.05). **Conclusion**β-tubulinⅢpositive neurons in

Different groups are positively correlated to the expression of MASH1, NGN1 and NeuroD, and the level of p-ERK. BDNF combined with NGF significantly improves neuronal differentiation of NSC, which may provide promising support for practical application of NSC in neurodegenerative diseases.

**Key words:** Nerve growth factor; Brain-derived neurotrophic factor; Differentiation- induced; Basic helix-loop-helix

**PartⅢCombined effect of NGF and BDNF and NSC on rat model of Alzheimer's disease with 192-IgG-saporin**

**Aims** Effects of different mixed cells transplantation on model of Alzheimer's disease with 192-IgG-saporin were investiged. **Methods** Rats were divided into five groups: sham, AD model, NGF, BDNF and combination. 4 w after injection of AD model, rats received mixed cells into the basal forebrain. Morris water maze and immunohistochemistry were employed to test learning and memory, number of cholinergic neuron and OD of synaptophysin. Histochemistry was employed to test lenth of nerve fibre. **Results** Learning and memory ability of AD model are significantly declined. Transplantation of mixed cells could significantly increase the ability, including escape latency shorten (8.87±0.26 s ), frequency through the platform in spatial probe increased (5.33±1.15 ), number of cholinergic neuron supplied (98.16%), OD of synaptophysin rescued (92.45%) and quantity of nerve fibre growth (95.41%). The differences between cells transplantation group and AD model were statistically

Significant(*P*＜0.05). **Conclusion** Nerve cells after induced 3 d by NGF combined BNDF

Ware grafted into AD models. Learning and memory ability were significantly improved,

6

Which could be attributed to the rescue of cholinergic neuron, synaptophysin and nerve fibre. Combination group had a more significantly effect than NGF or BDNF alone.

**Key words:** Alzheimer's disease; Water maze; Cholinergic neuron; Synaptophysin; AChE fiber

**Summary:**

1. The adherent monolayer culture transferred from P2 neurospheres was a better method for differentiation of neurons from NSC.

2. β-tubulinⅢpositive neurons in different groups were positively correlated to the

Expression of MASH1, NGN1 and NeuroD, and the level of p-ERK. BDNF combined with NGF significantly improved neuronal differentiation of NSC, which may provide promising support for practical application of NSC in neurodegenerative diseases.

3. Nerve cells after induced 3 d by NGF combined BNDF ware grafted into AD model. Learning and memory ability were significantly improved, which could be attributed to the recovery of cholinergic neuron, synaptophysin and nerve fibre. Combination group had a more significantly effect than NGF or BDNF alone.

7

# 主要符号中英文对照表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 英文缩写 | 英文全称 | 中文名 |
| AChE | acetylcholinesterase | 乙酰胆碱酯酶 |
| AD | Alzheimer's disease | 阿尔茨海默病 |
| BDNF | Brain-derived neurotrophic factor | 脑源性神经营养因子 |
| bHLH | Basic helix-loop-helix | 碱性螺旋-环-螺旋 |
| CNS | Central nervous system | 中枢神经系统 |
| EGF | Epidermal growth factor | 表皮生长因子 |
| ERK | Extracellular signal regulated kinase | 细胞外信号调节激酶 |
| FGF | Fibroblast growth factor | 成纤维生长因子 |
| GFAP | Glial fibrillary acidic protein | 神经胶质纤维酸性蛋白 |
| HDB | Horizontal diagonal band | 斜角带水平支 |
| HES | Hairy and enhancer of split | -- |
| ICC | immunocytochemistry | 免疫细胞化学 |
| IF | immunofluorescence | 免疫荧光 |
| LNGFR | Low affinity nerve growth factor receptor | 低亲和力神经生长因子受体 |
| MAPK | Mitogen-activated protein kinases | 丝裂原激活蛋白激酶类 |
| MASH | Mammalian achaete-scute homologue | -- |
| MS | Medial septum | 内侧隔核 |
| NeuroD | Neurogenic differentiation | -- |
| NFTs | Neurofibrillary tangles | 神经元纤维缠结 |
| NGF | Nerve growth factor | 神经生长因子 |
| NGN1 | neurogenin-1 | 神经原素 |
| NPs | Neural progenitors | 神经前体 |
| NSC | Neural stem cell | 神经干细胞 |
| NTFs | Neurotrophic factors | 神经营养因子类 |
| NTs | neurotrophins | 神经营养因子 |
| PAGE | Polyacrylamide gel electrophoresis | 聚丙烯酰胺凝胶电泳 |
| PDL | poly-d-lysine | 多聚赖氨酸 |
| PCR | Polymerase chain reaction | 聚合酶链式反应 |

8

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |
|  | RTFQ-PCR,  Q-PCR | Real-time fluorescence quantitative PCR | 实时荧光定量 PCR |  |
|  | RMS | Ostral migratory stream | 吻侧迁移流 |  |
|  | RQ | Relative quantity | 相对表达量 |  |
|  | RT | reverse-transcribed | 逆转录 |  |
|  | SDS | Sodium dodecyl sulfonate | 十二烷基磺酸钠 |  |
|  | SEM | Standard errors of the mean | 标准平均误差 |  |
|  | SGZ | Subgranular zone | 颗粒下层 |  |
|  | SP | Senile plaque | 老年斑 |  |
|  | SVZ | Subventricular zone | 室管膜下层 |  |
|  | TFs | Transcription factors | 转录因子 |  |
|  | Trk | Tyrosine kinase receptors | 酪氨酸蛋白激酶受体 |  |
|  | VDB | Vertical diagonal band | 斜角带垂直支 |  |
|  | WB | Western blotting | 1.7 蛋白免疫印迹 |  |

9

前**言**

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)也称老年性痴呆，是一种以进行性不可逆转的记忆和认知功能减退为临床表现的中枢神经系统退行性疾病(neurodegenerative diseases)[1-4]。随着社会人口老龄化的增加，AD发病率增高，目前仍无有效的治疗方法，给家庭、社会带来沉重负担，亟需研究寻找有效治疗措施。

AD的主要病理学变化包括老年斑(senile plaque, SP)的沉积[5, 6]，神经元纤维缠结(neurofibrillary tangles)的形成[7, 8]，以及胆碱能神经元(cholinergic neuron)的丢失和突触(synapsis)减少[9, 10]。研究表明，移植NSC到192-IgG-saporin导致的AD模型鼠的基底前脑，可以明显补充基底前脑胆碱能神经元的数量，恢复海马胆碱能纤维的再生，改善模型鼠的学习记忆能力[11, 12]。

### **1** 神经干细胞及其在神经系统中的作用

神经干细胞(neural stem cell, NSC)是一类可自我更新的多潜能细胞，有能力分化为神经元或神经胶质细胞，具有很强的可塑性，并在学习记忆和海马突触可塑性中起重要作用[12-15]。在成体内，NSC主要存在于侧脑室的室管膜下区(subventricular zone, SVZ)和海马齿状回的颗粒下层(subgranular zone, SGZ)[16, 17]. NSC在成体中有非常重要的作用，在成体的一生中，NSC都会经由神经发生而生成，它们可以分化、迁移，代替损伤、死亡或丢失的神经元[18]。一方面，当受到刺激时，NSC可以沿着吻侧迁移流(rostral migratory stream, RMS)从SVZ区迁移[19]；另一方面，位于海马齿状回SGZ区的NSC可以分化为兴奋性颗粒神经元，参与学习记忆[20]。NSC作为神经系统自我修复的细胞学基础，已成为中枢神经系统疾病和损伤修复的研究焦点。

Hattiangady将F344新生鼠SVZ-NSC移植到红藻氨酸诱导损伤的成年鼠海马区，结果表明，移植后NSC可以很好的存活和迁移，并能分化出不同类型的神经细胞，同时还可以表达多种神经营养因子，以此中和神经发生的降低和异常[21]。Song通过检测成年新生神经元在海马神经网络中参与的程度，来评估海马神经发生的影响，结果表明成年海马新生神经元具有独特的电生理特征，制造突触前-后的合作伙伴联系，应答突触刺激，整合活性依赖模式的海马神经网络[20]。NSC在疾病中的作用在全球很多实验室都逐渐得到阐明[22]，使它们在神经系统疾病中有很大的应用前景，可通过细胞移植代替疗法去治疗神经变性疾病或神经损伤[23]，如AD、帕金森(Parkinson's, PD)、肌萎缩性脊髓侧索硬化症(Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS)等。

**2 NSC可以在体外培养增殖**

10

干细胞移植的临床应用仍存在很多问题[24]，首要面临的就是用于移植的NSC来源。适合特定个体移植的NSC直接来源并不多，如果从供体直接移植到宿主，少量的供体NSC很难达到有效的治疗效果，所以我们要建立NSC的体外培养方案，将获得的NSC在体外进行培养增殖，以得到足够量的可用于移植的NSC。为了研究NSC的分化机制和神经发生的分子细胞机制，NSC的体外培养也是非常重要的。在表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和成纤维成长因子(fibroblast growth factor, FGF)存在的情况下，NSC可以在体外进行无血清培养[25, 26]。目前，神经干细胞的体外培养增殖多采用神经球悬浮培养和单层贴壁培养。神经球悬浮培养有很多优点，如神经球易于形成，且用起来较方便。但是随着神经球的体积越来越大，神经球内部的细胞由于无法接触到培养基，就会出现异质性[27]；而且消化后的神经细胞较难再形成神经球[28]。相比之下，神经干细胞的单层贴壁培养就有更多的优势。单层贴壁培养的NSC可以均一地与培养基接触，它们表现出更高的同质性。而且由于是单层细胞，更利于直接的检测和研究[29]。单层贴壁培养的方法同样适用于神经球转化成单层培养[30]。

### **3** 影响**NSC**分化的因素

NSC在临床应用中面临的第二个问题是NSC很难分化为人们所期望的神经细胞，不能得到足够量的所期望的神经元类型，使NSC在细胞移植治疗中受到很大的限制[31]。NSC 的分化机制非常复杂，而且受多种因素影响，一直以来，如何调控

NSC分化命运，以更好更快应用到中枢或周围神经损伤治疗，成为学者们研究的热点。在体内，NSC主要受到其所处的微环境的影响，包括周围的血管，星形胶质细胞，小胶质细胞，室管膜细胞，细胞外基质，以及所处的位置。体外培养的NSC可以被神经营养因子(Neurotrophins, NTs)或其他一些化学物质（如维甲酸，叶酸）诱导趋向神经元方向分化。另外，NSC内源性基因的表达也对NSC的分化方向有非常重要的影响，如碱性螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH)转录因子家族中的一些成员，*Notch*，信号通路相关蛋白等。

### **3.1** 神经营养因子对**NSC**分化的影响

神经营养因子(Neurotrophins, NTs)是由靶细胞分泌的一组特异性蛋白分子，有促进和维护神经元生长、存活、分化和执行功能的作用。包括神经生长因子(nerve growth factor, NGF)，脑源性神经生长因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)，神经营养素3，4/5，6和7(neurotrophin-3, -4/5, -6 and -7, NTs-3, -4/5, -6 and -7)。

11

BDNF在中枢神经系统(central nervous system, CNS)的学习和长期记忆中有重要作用，BDNF作用于特定的神经元，支持其存活，并能促进新生神经元或突触的生长和分化[32-34]. BDNF对体外培养的NSC有非常明显的促分化作用，可以促进

NSC向神经元方向分化[35, 36]。Blurton-Jones等将NSC移植到3倍速度老化的转基因AD小鼠(3xTg-AD)海马后发现，BDNF可以介导海马突触密度的很大增强，并以此改善3xTg-AD小鼠的认知功能[37]。Ma将BDNF基因修饰的NSC和普通的NSC分别转入外伤性脑损伤(traumatic brain injury, TBI)大鼠脑组织以后发现，和普通

NSC移植相比，BDNF/NSC可以明显提高神经运动功能，移植细胞存活的数量更多，所含神经元类型的比例更高，突触前、后蛋白和再生相关基因的表达也更高[38]。Chen的研究表明，BDNF有助于NSC的增殖，促进NSC向神经元和少突胶质细胞的分化[39]。BDNF和NSC同时移植到海马伞损伤的AD模型鼠后，结果表明，BDNF可以提高NSC的修复功能，提高AD模型鼠的学习记忆能力[37, 40]。

NGF对神经元的存活及新生神经元的分化也有非常重要的作用[41, 42]，NGF帮助感觉神经元和交感神经的存活和维持，可以引起轴突生长和分支[43, 44] 。

SC1/PRMT5复合体可以维持NSC处于增殖状态，Alexandra Chittka研究表明，NGF可以降低SC1/PRMT5甲基转移酶的活性[45]。用表达NGF的重组载体转染大鼠胚胎中脑NSC，结果表明重组后的NGF可以促进NSC的增殖，同时观察到NGF促NSC分化的作用[46]。重组NGF可以促进海马伞损伤的AD模型鼠基底前脑胆碱能神经元的存活[47]，NGF对基底前脑胆碱能神经元的保护作用，使其在AD中有非常重要的应用前景[48, 49]。

NSC细胞膜上有两类NTs受体[36, 50]，P75NTR是一类低亲和力受体，可与所有类型的NTs结合。另外一类受体是Trk受体，其不同的亚型只与不同的特定的NTs结合[51-53]。研究表明，BDNF可以特异性结合TrkB，支持已有神经元的存活，促进新生神经元的分化[54]。NGF 与TrkA 特异性结合后，参与细胞存活和分化[55]。被

BDNF和NGF激活后的Trk可以活化Ras蛋白，引起一系列的信号应答，主要是通过PI3/Akt和MAPK/ERK两条信号通路参与细胞和突起的生长，存活和分化[56-58]。

### **3.2** **MAPK/ERK**信号通路对**NSC**分化的影响

丝裂原蛋白激酶激活的蛋白激酶(mittogen-activated protein kinases, MAPK, 通常也称extracellular signal regulated kinase, ERK)可在所有真核生物中表达，参与调节细胞的生长、基因表达、分化、有丝分裂、存活和凋亡。ERK1/2 是哺乳动物中最具

12

有特色的MAPK 系统，很多生长因子可以通过一些关键的调节器特异性的激活

ERK1或ERK2. NTs与Trk受体结合后，可通过鸟嘌呤核苷酸交换因子(guanine nucleotide exchange factor, GEF) GDP-GTP的转化活化Ras蛋白，活化后的Ras蛋白可以激活一系列的蛋白，沿着Ras-Raf-MEK-ERK途经传递信号到细胞核，最终影响核内DNA 表达的变化，使细胞发生变化，从而调节细胞的增殖或分化。

MAPK/ERK信号通路包括很多蛋白，其中MAPK通过将相临蛋白磷酸化的方式，起到信号“开关”作用[59]。BDNF通过MAPK-依赖模式强化长期记忆，防止细胞凋亡[60, 61]。NGF通过MAPK可以促进骨髓间充质干细胞分化为神经元，调节神经元分化和存活，促进细胞周期，防止细胞凋亡[62-64]。

### **3.3** 转录因子对**NSC**分化的影响

碱性螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH)是表征一种转录因子(transcription factors, TFs)的蛋白结构花样，这些蛋白的表达对NSC的增殖、生长和分化有非常重要的作用[65, 66]。SVZ区来源NSC广泛表达MASH1和HES1等[67]。转录因子，如LMX1A, Olig2可以从大部分神经前体细胞中诱导出所期望的神经元系，通过重新编程使处于发育中的两极细胞命运的改变[31]。*HES1*和*HES5*编码转录抑制因子，通过维持前体细胞处于有增殖能力的状态，来维持非分化的NSC和神经祖细胞(neural progenitors, NPs)的数量和状态。HES1调节NSC增殖，抑制其HES1的表达可以引起NSC分化[68]。也有研究表明，表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)和Notch信号通路（涉及到Notch1，HES1的表达）相互作用，共同调节SVZ区细胞群落的增殖平衡[69]。HES1蛋白可以通过抑制*MASH1*表达，一是通过直接与*MASH1*的启动子结合抑制其表达[70]；二是HES1竞争性结合E47，形成一个非功能性的异源二聚体，抑制MASH1-E47 异源二聚体的形成的，而

MASH1与E47结合后才能表现活性，诱导NSC分化为神经元[71]。MASH1可以诱导NSC的形态分化和神经元标志物的表达。Krolewski研究基因敲除MASH1小鼠胚胎嗅上皮(olfactory epithelium, OE)的结构和组成后发现，OE只生成了很少的嗅觉感应神经元[72]。Kim跟踪MASH1敲入小鼠的遗传谱系表明，MASH1细胞系可以长期持续产生新的神经元，不仅限于短暂扩充的细胞群体[73]。对斑马鱼的研究表明，

MASH1b还短暂表达在原肠胚形成后的中间躯干内胚层，提供第一胰腺内分泌前体细胞的产生[74]。NGN1和NeuroD在神经分化过程中也有非常重要的作用。研究表明，在嗅觉神经前体细胞中，MASH1可以调节NGN1的表达进而调节NeuroD 的

13

表达[75]；NGN1和NeuroD经由一个成簇的共识结合位点的增强子信号，首先识别神经发生相关的靶点，激活一组核心转录因子，调节神经发生，以此建立强健的神经发生调控网络[76]。胚胎干细胞表达NGN1后就开始退出细胞周期，形成前体细胞，专门分化为神经元[77]，NGN1是bHLH因子代码的组成成分，调节小脑皮质细胞类型的特化[78]。不能表达NeuroD的小鼠前庭耳蜗神经节的神经元不能迁移或激活，也不能表达TrkB和TrkC，而TrkB和TrkC很可能对这些神经元正常的迁移和神经分布是必需的[79]。BDNF和NGF可以诱导NSC表达MASH1、NGN1和NeuroD[80]。阻止ERK5磷酸化可以抑制NGN1诱导的神经发生，而ERK5可以由BDNF激活[81]。

**4 NSC在神经退行性疾病中的应用前景**

AD也称老年性痴呆，是一种以认知和记忆功能进行性减退为临床表现的中枢神经系统退行性疾病，其主要症状是进行性记忆力减退和认知障碍。随着社会人口老龄化的增加，AD发病率增高，目前仍无有效的治疗方法，给家庭、社会带来沉重负担，因此，亟需研究寻找有效治疗措施。AD的病因及发病机制复杂，目前尚未完全明确，其中胆碱能神经元丢失假说在各假说中占有重要地位。胆碱能神经元对学习记忆非常重要，生化研究发现AD患者胆碱乙酰基转移酶活力明显下降，胆碱能神经元大量丢失，主要发生在基底前脑区域[82]。建立一个可靠的AD动物模型是研究AD的重要环节。国内外早有研究表明，侧脑室注射神经免疫毒素192-IgG-saporin可以损伤胆碱能神经元及其纤维[83, 84]，造成动物模型的学习记忆能力下降[85]，运动缺陷[86]等，模拟AD的行为学改变和部分病理学特征。

研究NSC增殖分化的机制，主要的目的是把NSC用于细胞移植代替疗法去治疗神经变性疾病或神经损伤，改善受损神经的功能。Hattiangady等将F344新生鼠SVZ-NSC移植到红藻氨酸诱导损伤的成年鼠海马区，结果表明，移植后NSC可以很好的存活和迁移，并能分化出不同类型的神经细胞，同时还可以表达多种神经营养因子，以此中和神经发生的降低和异常[21]。由人源iPSCs诱导而来的NSC移植到缺血中风模型大鼠的纹状体后，这些iPSC源的NSC可以迁移至缺血受损区域，和对照组相比，可以明显改善动物的功能[87]。移植NSC到192-IgG-saporin导致的AD模型鼠的基底前脑，可以明显补充基底前脑胆碱能神经元的数量，恢复海马胆碱能纤维的再生，改善模型鼠的学习记忆能力[88, 89]。研究表明，BDNF和NGF修饰或处理的NSC比单独移植NSC在细胞存活、迁移、分化及神经功能恢复方面都有更好的效果[40, 46, 90]。

14

### **5** 本研究的立题依据和创新点

由于NSC的增殖分化机制非常复杂，而且受多种因素影响，因此建立更好的NSC体外培养方案对后续实验的顺利进行及有着非常重要的意义。NGF和BDNF都可以诱导NSC分化为神经元，两者联合应用时有叠加作用，但其机制尚不完全清楚，叠加作用可能涉及到的信号通路和基因表达变化都没有被系统地阐述，叠加作用在动物实验中是否依然存在更是我们关注的焦点。依据这些问题，我们展开一系列的研究，从

NSC的体外培养，到分化机制，再到动物实验，以了解NGF和BDNF对NSC分化的影响及其在动物实验中的作用。本文是首次对NGF和BDNF的叠加作用进行系统性阐述的研究性论文，包括（1）神经元比例，(2) MAPK/ERK信号通路，(3) HES1，HES5，

MASH1, NGN1和NeuroD转录因子的表达变化，（4）以及NGF和BDNF诱导NSC分化3d后移植到192-IgG-saporin导致的AD模型鼠的基底前脑后，对实验动物学习记忆能力的影响，基底前脑胆碱能神经元的变化，海马突触素和AChE纤维的变化。

本文第一部分的研究旨在建立NSC的体外培养方案，不仅可以使NSC在体外得到很好的增殖，更利于分化为神经元，而且便于我们研究调查，以保证得到更科学更准确的数据。第二部分，再比较单独应用NGF或BDNF和联合应用时的不同，初步探讨NSC的分化机制。NSC的增殖分化机制非常复杂，而且受多种因素影响，一直以来，如何调控NSC分化命运，以更好更快应用到中枢或周围神经损伤治疗，成为学者们研究的热点。能够得到足够多的纯度较高的所期望的神经元亚型，是

NSC在细胞移植治疗神经系统疾病临床应用的一个关键的难点。这一部分的研究，我们力求一种更好的诱导培养方案，并探讨NSC可能的分化机制，为以后的实验提供参考和依据。第三部分，在本实验室已经成功构建神经免疫毒素192-IgG-saporin致阿尔茨海默病动物模型[91]的基础上，我们将不同诱导方案下的NSC移植到192-IgG-saporin致AD模型鼠的基底前脑，探讨移植后的NSC对模型鼠基底前脑胆碱能神经元数量、海马AChE纤维和突触素的影响，并比较不同诱导方案之间的差别，为NSC的细胞移植提供临床应用的理论基础和指导。

15

# 第一部分 胚胎大鼠神经干细胞的体外培养

NSC的体外培养是用于细胞移植治疗的第一步，建立更好的培养方案，对后续实验的顺利进行有着非常重要的意义，是后续实验的基础所在。本部分的研究旨在建立NSC的体外培养方案，不仅可以使NSC在体外得到很好的增殖，更利于分化为神经元，而且便于我们研究调查，以保证得到更科学更准确的数据。我们将神经球悬浮培养和单层贴壁培养两种方法结合应用并进行比较，通过Nestin染色，HES1和HES5基因表达水平的检测，比较两种培养方法的细胞干性，通过β-tubulinⅢ和

GFAP染色来比较两种方法的分化能力，选择更好的体外培养方案，以得到纯度较高，增殖效果显著，且更利于分化为神经元的NSC。

## **1** 材料和方法

### **1.1** 动物、主要试剂和仪器

|  |  |
| --- | --- |
| (1) 孕 13-15 天的 SD 大鼠 | 广东省实验动物中心 |
| (2) Neurobasal 培养基 | Gibco |
| DMEM/F12 培养基 zhi k | U qGuaibnco20150807 |
| B27 添加剂 | Gibco |
| N2 添加剂 | Gibco |
| EGF | PrimeGene |
| bFGF | PrimeGene |
| Accutase | Sigma |
| 多聚赖氨酸(PDL) | Sigma |
| 牛血清白蛋白(BSA) | Sigma |
| 兔抗 β-tubulin Ⅲ 多抗 | Sigma |
| 小鼠抗 GFAP 单抗 | Sigma |
| Triton X-100 | Sigma |
| 兔抗 Nestin 多抗 | Abcam |
| TRITC 标记羊抗兔 IgG | Abcam |
| FITC 标记羊抗小鼠 IgG | 北京博奥森生物技术有限公司 |
| TRIzolTM RNA 抽提试剂盒 | TakaRa |

16

|  |  |
| --- | --- |
| RT-PCR Kit | TakaRa |
| 荧光定量 PCR 试剂盒 | TakaRa |
| 75%酒精，PBS，青-链霉素双抗，台盼兰，氯仿，异丙醇等均为国产分析纯。 | |
| （3） 超净工作台 | 苏净安泰 |
| 冰箱 | LG |
| -80℃低温冰箱 | Thermo |
| 台式低温离心机 | Thermo |
| 超纯水仪 | 广州誉维生物科技有限公司 |
| 电子天秤 | 上海天平仪器厂 |
| 37 ℃恒温培养箱 | SANYO |
| Q-PCR 仪 | APPLIED BIOSYSTEMS |
| 荧光显微镜 | Nikon |
| 倒置荧光显微镜 | Olympus |
| 微量移液器 | Eppendorf |
| 血球细胞计数板 |  |

(4)一次性无菌耗材：10zchmi k培u养qu皿an，2500m15L0和80175mL离心管，10μL、200μL、

1000μL枪头，6孔板，巴斯特灭菌移液器，0.22μm针头过滤器；

(5)解剖工具：普通剪刀、镊子各2把，眼科剪、镊各3把，显微解剖剪2把，洗干净后高温高压蒸气灭菌30min。

(6)试剂的准备：

BSA(0.1％)：将BSA溶于PBS中，终浓度为0.1％，然后使用0.22μm针头过滤器消毒；表皮生长因子(EGF母液, 20mg/L)溶解EGF到灭菌的含0.1％BSA的PBS中，终浓度为20mg/L；碱性成纤维细胞生长因子(bFGF母液, 20mg/L)溶解FGF2到灭菌的含0.1％BSA的PBS中，终浓度为20mg/L。将它们100μL/管分装存储，避免反复冻融。

封闭液：将BSA溶于PBS中，终浓度为10％，然后使用0.4μm针头过滤器去除残渣。

抗体稀释液：终浓度0.5% BSA和终浓度为0.1% Triton X-100溶于PBS溶液中，

0.4μm针头过滤器过滤去除残渣。

17

PDL细胞培养表面涂层：用无菌双蒸水将PDL稀释成5 g/L母液，0.5mL/管分装备用。培养表面涂层时，用无菌双蒸水稀释成100 mg/L的PDL工作液，用这一溶液覆盖所需的表面，37℃过夜后，去除PDL并用双蒸水冲洗表面三次。

### **1.2** **NSC**的取材、培养和传代

孕13-15 d SD大鼠，颈椎脱臼处死后用75%的酒精常规消毒，迅速剖开腹部，拉出Y型子宫，用75%酒精消毒2次后，置于预冷的PBS中，取胚胎鼠，断头，用无菌纱布固定头部，用眼科剪从断头处中线将头皮和颅骨剪至嗅球部，用镊子掀开两边颅骨，暴露脑组织，小心将全脑取出，置于预冷的PBS中，用显微解剖镊小心剥去脑膜，去除嗅球，小脑和脑干，分离出端脑，用预冷的PBS漂洗2次，置于预冷DMEM/F12中，用显微解剖镊将端脑剪碎（约1 mm3），一起转移至15 mL离心管，并用巴斯特管小心吹打100-200次，制成单细胞悬液，25℃，200×g离心5 min，弃上清，重复三次。重新制成悬液，取10μL样本，加等量0.4%台盼蓝混合均匀，活细胞计数。加入增殖培养基DMEM/F12+2%B27+bFGF+EGF(bFGF和EGF终浓度为20μg/L)，调节细胞密度为5×10 5 /mL，加入75 cm2培养瓶中，放入37℃、5% CO2培养箱中培养。

培养24 h后，悬浮的细胞zh可i k形u成quPan代2球01, 50将8细07胞转移至50 mL离心管，静置

1

30 min，使神经球自然沉淀，弃上清，加入新鲜的培养基，机械吹打传代。再培养

24-48 h后可形成P2代球，200×g离心5 min，弃上清，加入1 mL的Accutase进行消化。消化时先小心吹打数下，然后握在手心以增加温度，消化3 min时，取少量液体到显微镜下观察，如果大部分细胞已成单细胞，即加入≥5倍体积的DMEM/F12终止消化（Accutase被稀释后可自我消化）；如果大部分细胞仍处未分开，可延长消化时间，但总时间不要超过6 min，不苛求把所有细胞消化成单细胞。消化时会出现一层白色的膜，主要是已分化的星形胶质细胞和神经元，离心之前可用枪头移去。

将消化后的细胞分两部分，一部分仍悬浮培养，以5×10 5 /mL的密度接种到培养瓶中，每48 h半量换液，72-96 h可进行传代。另外一部分用单层贴壁方式来培养，以5×10 4 /cm2的密度接种到PDL包被好的培养皿和24孔板中，每48 h半量换液，细胞融合度达到80%时用Accutase消化传代。

### **1.3** **NSC**的分化

培养48 h后，悬浮培养的细胞可形成P3代球，200×g离心5 min收集细胞，用分化培养基DMEM/F12 (250 mL/L) +Neurobasal (750 mL/L) +B27 (10 mL/L) +N2 (5

18

mL/L）重悬细胞，接种到包有PDL的24孔板中。同时将之前接种到24孔板中单层培养的细胞培养基换成分化培养基。

### **1.4** **NSC**的干性鉴定和分化能力鉴定

取培养48 h的P3代球悬浮液，接种到PDL包被的24孔板中，6 h后，和单层贴壁培养的细胞同时行细胞免疫荧光(immunofluorescence, IF)染色，用NSC标记抗体Nestin(1:200)检测不同培养条件下是否得到NSC。

分别提取培养48 h时的P3代球和单层贴壁细胞的RNA，用荧光定量PCR(Q-PCR)技术检测HES1和HES5的相对表达量，比较不同培养方式下Notch信号通路的活化程度。

在1.3中，细胞在分化培养中培养72 h后，用神经元标记抗体β-tubulinⅢ(1:300)和星形胶质细胞标记抗体GFAP(1:600)检测NSC的分化能力。

### **1.5** 免疫细胞化学**/**免疫荧光**(Immunocytochemistry/Immunofluorescence, ICC/IF)**

首先，用抗体稀释液将所需抗体稀释到一定的浓度，4℃备用。

(1)移去培养基，用预冷的多聚甲醛(40 g/L)固定20 min；

(2)用PBS洗3×，每次5min；

(3)用含0.3% Triton-X100的0.1M PBS穿透，室温20min（此步骤适用于检测表达在细胞核内的蛋白）；

(4) 10 %的BSA封闭液室温封闭30min；

(5)加入30μL/孔（24孔板）适当浓度的一抗，贴上孔大小的封口膜，使抗体均匀，4℃孵育过夜；

(6)翌日加入PBS，移出抗体混合液；

(7)用PBS洗3次，每次5min，以去除多余的抗体；

(8)加入0.3%的苏丹黑（用75%的乙醇配），去除非特异性荧光，1min；

(9)用PBS洗3次，每次5min；

(10)最后洗完，加入适当稀释的结合荧光标记的二抗（TRITC标记二抗浓度为

1: 300，FITC标记二抗浓度为1: 100），避光，贴上孔大小的封口膜，使抗体均匀，室温2～3h；

(11)加入PBS，移除二抗；

(12)用PBS洗3次，每次5 min；

(13)加入适量DAPI(100μg/L)染核，避光，室温10 min；

19

(14)用PBS洗3次，每次5 min；

(15)加入适量甘油，用倒置荧光显微镜观察并拍照。每组IF染色每次做3个复孔，实验重复3次。

### **1.6** **Q-PCR**步骤

#### **1.6.1** **RNA**的提取

准备试剂：氯仿，异丙醇，75℅乙醇，无RNase的水或0.5℅ SDS（溶液均需用

DEPC处理过的水配制）

(1)在培养板中加入TRIzol裂解细胞，1mL/孔（6孔板）。

(2)室温(15-30℃)放置5 min，使核酸蛋白复合物完全分离。

(3)每使用1 mL TRIzol加入0.2 mL氯仿(TRIzol的1/5体积)，剧烈振荡15秒，室温放置5min。

(4) 4℃12000×g离心15 min。样品分为三层：底层为黄色有机相，上层为无色水相和一个中间层。RNA主要在水相中，水相体积约为所用TRIzol试剂的50℅。

(5)把水相转移到RNase-free新管中（注意不要吸到中间蛋白层），加入和水相等体积的异丙醇，沉淀水相中的RNA。例如每使用1mL TRIzol有0.5mL水相，则加入0.5mL异丙醇，室温放置10 min。

(6) 4℃12000×g离心10 min，小心移去上清。

(7)用1 mL 75℅乙醇洗涤RNA沉淀，4℃12000×g离心5 min，弃上清。

(8)室温放置干燥或真空抽干RNA沉淀，大约晾5-10 min即可加入25 μL 无

RNase的水重新融解RNA，-70℃保存备用。

#### **1.6.2** 逆转录合成**cDNA**第一链

取2μg RNA，在0.2 mL Eppendorf管中冰上建立40μL RT反应体系：

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 用量(μL) |
| 5×Buffer | 8 |
| RT 酶 | 2 |
| Oligo dT | 2 |
| Radom | 2 |
| RNA | 2 μg |
| H2O | 至 40 μL |

混匀后，37℃反应15 min，85℃反应5 sec，反应结束后置-70℃保存备用。

20

#### **1.6.3** **Q-PCR**反应检测基因表达

将引物用双蒸水配制成10μM的母液，-20℃保存备用，取第一条链cDNA 2μL

作为模板，在冰上建立20μL PCR反应体系：

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 用量(μL) |
| 2×SYBR Mix | 10 |
| 引物 F | 0.4 |
| 引物 R | 0.4 |
| ROX Ⅱ | 0.4 |
| cDNA | 2 |
| ddH2O | 6.8 |
| Total | 20 |

Q-PCR中检测的基因及引物如表1。

表 1-1 NSC中所检测表达基因Q-PCR引物列表

Tab. 1-1 Q-PCR primers used to detect gene expression in NSC

| Gene | Primer sequence |
| --- | --- |
| β-actin | Forward 5'GAGACCTTCAACACCCCAGC3' |
|  | Reverse 5'ATGTCACGCACGATTTCCC3' |
| HES1 | Forward 5’- TAACGCAGTGTCGCCTTCC-3’ |
|  | Reverse 5’- AGAGGTGGGCTAGGGAGTTTATG-3’ |
| HES5 | Forward 5’- AGCCGGTGGTGGAGAAGAT-3’ |
|  | Reverse 5’- AGTTTGGAGTTGGGCTGGTG-3’ |

Q-PCR反应在7500 real-time PCR仪上进行，反应条件为：预变性95℃30 sec；95℃5 sec，60℃34 sec，共40个循环；95℃15 sec，60℃1 min，95℃15 sec。本实验中，β-actin为内参基因，NSC为对照样品，其它样品目的基因的表达以此进行标准化，然后再相互比较。

每组做3批样品，同一批样品同时做Q-PCR时，每个样品的每对引物设3个复孔。相对表达量(relative quantity, RQ)计算公式：

△△CT＝(CT实验组目的基因-CT实验组内参基因) - (CT对照组目的基因-CT对照组内参基因) RQ＝2 -△△CT

21

Ct值的定义：Ct值中的“C”代表Cycle（循环），“t”代表检测threshhold（阈值），其含义是PCR扩增过程中荧光信号强度达到阈值所需要的循环数。

### **1.7** 统计学分析

数据采用*x**s*表示，用SPSS17.0进行统计学分析，主要统计方法是单因素方差分析，*F*检验和*t*检验，以*P*＜0.05为差异具有统计学意义。

## **2** 结果

### **2.1** **NSC**的培养和增殖及干性签定

取自13-15 d胚胎鼠的NSC增殖迅速，原代培养的细胞可在24 h后形成P1代球，球与球之间会形成不同程度的融合，折光性好，细胞结合疏松，机械吹打可制成单细胞悬液。P2代球可在传代后24-48 h形成，由十几个到几十个细胞组成，折光性好，细胞结合较之前紧密，已经不能通过机械吹打制成单细胞。

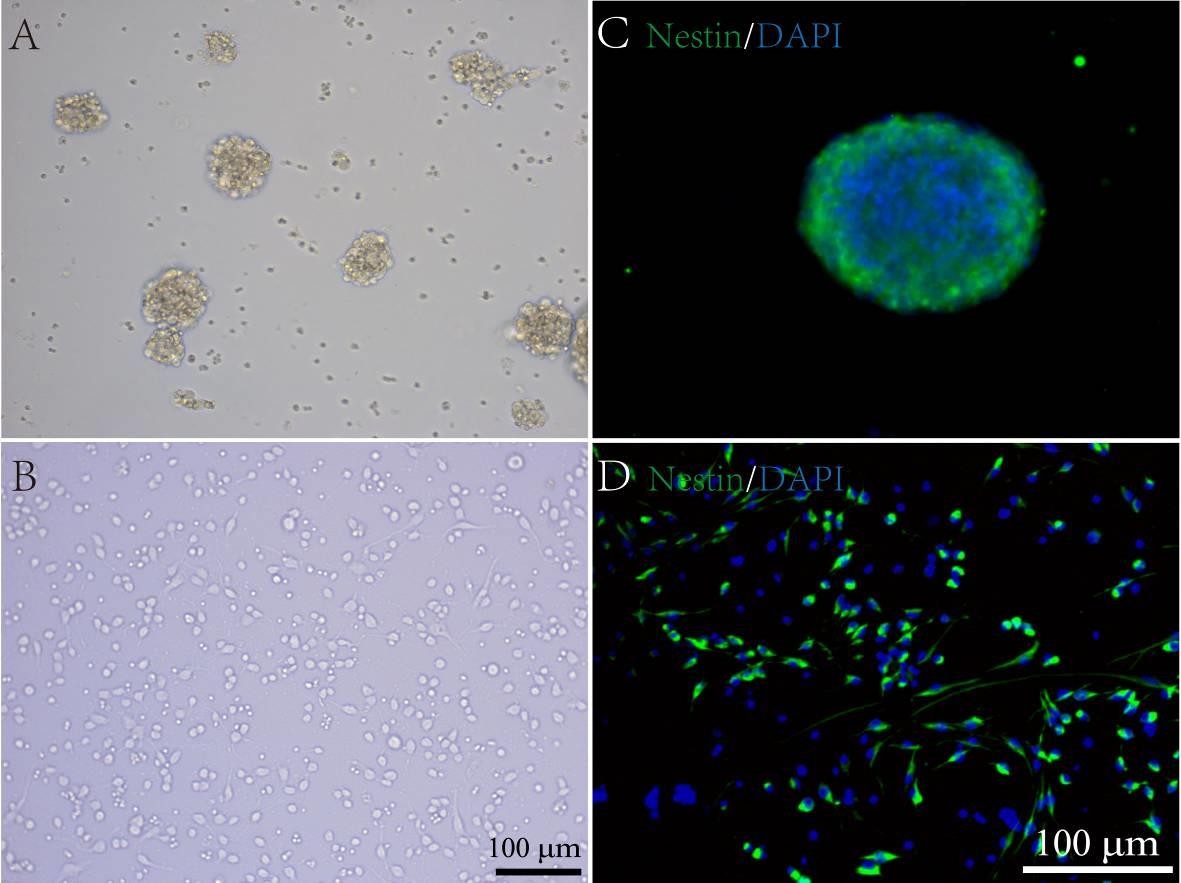


图 1-1 NSC活细胞形态及干性签定

Fig. 1-1 Live cells morphology of NSC and identification the ability of“stem”

A. 将P2代神经球消化成单细胞再培养48 h，可以形成P3代神经球，有少许神经球会聚在一起，非分裂细胞会粘附在培养皿底面。B. P2代神经球消化成单细胞后接种到PDL-包被的培养孔中，培养48 h时拍照结果显示，单层贴壁培养的NSC均匀分散成单层，形态多显单极和

22

双极，少数会成三极。C. Nestin染色结果显示，神经球的边缘比中间呈现更鲜明的荧光，提示神经球内部可能存在一些非分裂细胞。D. 单层的NSC均匀的染上绿色荧光。

P3代球约48 h可形成，折光性好，由几个到十几个细胞组成，随着培养时间的延长可逐渐增大，如图1-1 A。单层培养的细胞在接种2 h后可贴壁。24 h时观察细胞呈椭圆形，梭形或两极形态。48 h后细胞多呈两极形态，少数呈梭形或三极形态。如图1-1 B。

Nestin染色结果表明，P2代之后的两种培养方式都得到了纯度较高的NSC, P3代神经球可以着色边缘较中间更鲜明的绿色荧光，如图1-1 C；单层培养的NSC可以均匀着色，绿色荧光鲜明，Nestin阳性细胞率为93.17±3.06 %。如图1-1 D。

Q-PCR结果表明，在不同培养方式之间，相对内参以β-actin为内参基因，神经球为对照样品，HES1(*P*＞0.05)和HES5(*P*＞0.05)的相对表达量在神经球培养和单层贴壁培养两个培养方案中都没有显著性差异。如图1-2。



图1-2 HES1和HES5在悬浮神经球培养和单层贴壁培养中的表达量

Fig. 1-2 RQ of HES1 and HES5 in neurospheres and adherent monolayer culture

本实验中β-actin作为内参基因，神经球作为对照样品，HES1和HES5在单层培养和神经球培养中的相对表达量相同。

### **2.2** **NSC**的分化能力鉴定

两种培养方式在撤掉bFGF和EGF之后均可分化，分化72 h后IF结果显示，单层培养和悬浮神经球，β-tubulinⅢ阳性细胞率分别为19.55±1.09 %和11.91±2.73 %；GFAP阳性细胞率分别为25.41±2.26 %和39.71±3.87 %；统计学分析表明，β-tubulinⅢ阳性细胞率(*P*＜0.001)和GFAP阳性细胞率(*P*＜0.001)在不同培养方式之间差异有统计学意义，如图1-3，β-tubulinⅢ和GFAP的IF染色如图1-4。

23



图 1-3 不同培养方式下NSC分化后的β-tubulinⅢ和GFAP染色及比例

Fig. 1-3 Double stains ofβ-tubulin Ⅲand GFAP after differentiation of NSC in two culture modes

A.在从神经球迁移出来的区域染上β-tubulinⅢ阳性细胞。B. β-tubulinⅢ阳性细胞在单层培养中分布均匀。C. 神经球和从神经球迁移出来的细胞都能染上GFAP. D. GFAP阳性细胞的单层培养中的分布均匀。



图 1-4 不同培养方式下NSC分化后的β-tubulinⅢ和GFAP阳性细胞比例

24

Fig. 1-4 Proportions ofβ-tubulin Ⅲand GFAP after differentiation of NSC in two culture modes

A. 分化3 d后单层培养细胞的β-tubulinⅢ阳性率高于神经球培养的。B. 单层培养的GFAP

阳性率在单层中低。

## **3** 讨论

### **3.1** **NSC**的体外培养方案

NSC增殖和分化的机制是非常复杂的。研究表明，FGF和EGF等有丝分裂原可以促进NSC增殖[26]。NSC一般采用神经球悬浮培养，这样的培养方式很容易收集细胞，下一步的应用变得简单。但是随着神经球的增大，内部细胞接触不到培养基，很容易出现死亡或分化，使神经球细胞出现异质性。单层培养的细胞可以均匀与培养基接触，更有利于支撑NSC的均匀分裂。为了选择更好的实验培养方法，对分化/未分化细胞的形态和存活的直接监视是非常重要的，而细胞的单层培养为此提供了机会[29]。我们在实验中发现，如果将原代细胞直接进行单层贴壁培养，细胞中会有一定量的杂细胞，由于底面有PDL包被，使得NSC和杂细胞不能有效分开，而且培养48 h后可发现，本来单层的细胞被聚在一起，可能是杂细胞中的胶质细胞的作用[29]。而且贴壁细胞的收集需要消化和机械吹打，会对细胞造成一定的损伤。研究表明，单层贴壁培养的方法同样适用于神经球转化成单层培养[30]。悬浮培养时，杂细胞会贴在底面，而处于增殖状态的NSC悬浮在培养基中，培养几天后，可纯化去掉大部分的杂细胞。因此先悬浮培养几天后再进行单层培养，是一种比较高效可行NSC的纯化方式。

### **3.2** 影响**NSC**分化的因素

*HES1*和*HES5*编码转录抑制因子，通过维持前体细胞处于有增殖能力的状态，来维持非分化的NSC和神经祖细胞(neural progenitors, NPs)的数量和状态。HES1调节NSC增殖，抑制其HES1的表达可以引起NSC分化[68]。也有研究表明，表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)和Notch 信号通路（涉及到

*Notch1*, *HES1*的表达）相互作用，共同调节SVZ区细胞群落的增殖平衡[69]。HES1蛋白可以通过抑制*MASH1*表达和MASH1蛋白的活性来抑制细胞分化[70, 71]。本实验IF结果表明，两种培养方式都得到了NSC。神经球不方便计数，因此我们用Q-PCR的方法，进一步比较了两种培养方式中Notch信号通路中相关基因的表达。Q-PCR

25

结果表明，HES1和HES5在两种培养方式没有显著性差异，结合IF结果和活细胞观察结果，提示了两种培养方式都得到了高效增殖的NSC。

### **3.3** **NSC**体外培养的不足

无论是悬浮培养，还是单层贴壁培养，传代到一定程度后，细胞增殖都变得缓慢。悬浮培养的神经球传到P6代以后，细胞增殖开始变得缓慢，培养7 d后，神经球一般也只有增殖几个到十几个细胞组成，而且细胞结合紧密，不易再消化使之分离。单层贴壁细胞传代3次以后，细胞增殖变得缓慢，在底面分布不均，培养4 d后，有些地方融合度可达80%以上，有些地方却仍保持在20%左右，几乎没有增殖。这样的情况下，为了得到更多的细胞所消耗的时间和资源，要比再取胚胎鼠原代细胞要多。虽然长期保持NSC的高效增殖并不容易，但目前NSC的实验室培养技术已经变得普遍。尽管如此，它们在临床的广泛应用仍未解决。不仅是来源的问题，一个很重要是原因是NSC很难分化为人们所期望的神经细胞，不能得到足够量的所期望的神经元类型，使NSC在细胞移植治疗中受到很大的限制[18, 20]。

### **3.4** 神经球转化为单层贴壁培养的优点

之前有实验室用单克隆化及单层化的培养方式纯化细胞，纯化5代后，得到了

Nestin阳性率达99%的高纯度神经球，不过这种方式在之后分化为神经元的过程中是否依然保持优势，文中只给了细胞分化的图片，并没有给出具体的数据[92]。本研究发现，P2代神经球形成时，大部分杂细胞已经被纯化去掉，而且由于生长时间不长，球内部细胞很少出现分化或死亡，因此由P2代神经球消化而来的细胞，在单层贴壁培养条件下，最有利于细胞的进一步增殖或下一步分化，且要比再悬浮培养的神经球更有利于向神经元方向分化。可能的原因是：细胞是一个同质较高的群体，分化过程不会受到杂细胞的影响；细胞均匀地暴露在培养基中，均匀地接触营养物质，更有利于自身基因的表达。细胞更多地分化为神经元，不但为我们得到更多预期神经元提供前提条件，更为我们研究NSC分化奠定基础。神经球直接接种到PDL包被的孔板中分化时，我们只能计数从球上迁移出来的细胞的分化比例，而处于球内部的细胞团聚团聚重叠在一起，既不能均匀地接触培养基和生长因子，也无法准确计数，这种情况下得到的数据不能代表整体分化水平，不能为我们下一步研究提供可靠的依据。相比之下，单层贴壁培养的细胞互相分散，计数时不受干扰，可以更大程度地提供更准备科学的数据。由于单层贴壁培养的细胞可以均匀地接触培养

26

基，使得我们不仅在形态学上得到更准准确科学的数字，在分子生物学水平，同样可以得到更准确科学的数字。

## **4.** 结论

本研究首次创新性地应用神经球悬浮培养和单层贴壁培养相结合的方式，并且比较了P2代之后悬浮培养和贴壁培养在维持细胞干性和分化能力方面的差别。最终得出：原代细胞经过短暂的神经球悬浮培养，再进行单层贴壁培养的方案，不仅可以在较短的时间内纯化、得到高效增殖的NSC，同时NSC自然分化时神经元的比例也有显著性提高。这一结论为我们下一步研究NGF和BDNF对NSC的诱导分化提供技术支持。

27

# 第二部分 **NGF**联合**BDNF**对体外培养的神经干细胞分化为神经元的影响

NSC的增殖分化机制非常复杂，而且受多种因素影响，一直以来，如何调控NSC分化命运，以更好更快应用到中枢或周围神经损伤治疗，成为学者们研究的热点。体外培养的NSC可以被NTs诱导趋向神经元方向分化；NSC内源性基因，如bHLH转录因子家族中的一些成员对NSC的分化方向有非常重要的影响。能够得到足够多的纯度较高的所期望的神经元亚型，是NSC在细胞移植治疗神经系统疾病临床应用的一个关键的难点。这一部分的研究，我们力求一种更好的诱导培养方案，并探讨NSC可能的分化机制，为以后的实验提供参考和依据。

我们用NGF和BDNF诱导NSC分化，比较单独使用和联合应用时对NSC分化的不同影响，并比较相关的信号分子的改变。尽管已有一些文献报道单独使用NGF或

BDNF和联合应用NGF和BDNF时，NSC的分化为神经元的比例会不同[93]，分子改变也不同[80]，但这些研究不够系统，检测时间点也单一。我们非常想了解，在NSC被诱导分化时，单独使用NGF或BDNF，和联合应用时都有哪些不同，包括神经元分化的比例，信号通路如MAPK/ERK的改变，基因表达的变化，如HES1，HES5，MASH1，

NGN1和NeuroD，以及随着诱导时间的推移，转录因子的调控是如何改变的。为了得到更准确的数据，我们也要建立更科学的NSC体外培养分化方案。在论文的第一部分，我们的研究已经表明，通过将P2代神经球转化成单层贴壁培养，不但可以得到纯度较高的NSC，同时更有利于向神经元分化。在这样的基础上，我们首先单独用NGF和

BDNF诱导NSC分化，选出在我们实验条件下最合适分化为神经元的浓度，然后再比较单独应用NGF或BDNF和联合应用时的不同，初步探讨NSC的分化机制。

## **1** 材料和方法

### **1.1** 动物、主要试剂和仪器

|  |  |
| --- | --- |
| (1) 孕 13-15 天的 SD 大鼠 | 广东省实验动物中心 |
| (2) Neurobasal 培养基 | Gibco |
| DMEM/F12 培养基 | Gibco |
| B27 添加剂 | Gibco |
| N2 添加剂 | Gibco |
| EGF | PEPROTECH |
| bFGF | PEPROTECH |

28

|  |  |
| --- | --- |
| NGF | PEPROTECH |
| BDNF | PEPROTECH |
| Accutase | Sigma |
| 多聚赖氨酸(PDL) | Sigma |
| 牛血清白蛋白(BSA) | Sigma |
| 兔抗 β-tubulin Ⅲ 多抗 | Sigma |
| PD 98059 (MEK1 Inhibitor) | CST |
| Phosphor-p44/42 MAPK (Erk1/2) | CST |
| P44/42 MAPK (Erk1/2) | CST |
| 兔抗 GAPDH 多抗 | Abcam |
| TRITC 标记羊抗兔 IgG | Abcam |
| HRP 标记羊抗兔 IgG | Cwbio |
| TRIzolTM RNA 抽提试剂盒 | TakaRa |
| RT-PCR Kit | TakaRa |
| 荧光定量 PCR 试剂盒 | TakaRa |
| RIPA 裂解液 | 凯基生物 |
| Micro BCA 试剂盒 | Thermo |
| 75%酒精，PBS，青-链霉素双抗，台盼兰，氯仿、异丙醇等均为分析纯。 | |
| （3） 超净工作台 | 苏净安泰 |
| 冰箱 | LG |
| -80℃低温冰箱 | Thermo |
| 台式低温离心机 | Thermo |
| 超纯水仪 | 广州誉维生物科技有限公司 |
| 电子天秤 | 上海天平仪器厂 |
| 37 ℃恒温培养箱 | SANYO |
| Q-PCR 仪 | APPLIED BIOSYSTEMS |
| 荧光显微镜 | Nikon |
| 倒置荧光显微镜 | Olympus |
| 酶标仪 | BioTek |
| Western Blotting 电泳仪 | BioRad |

29

### **1.2** **NSC**的取材和培养

NSC的取材和培养见第一部分**1.2**。NSC培养形成P2神经球，用Accutase消化成单细胞，用增殖培养基(DMEM/F12+2%B27+bFGF+EGF)调节细胞密度为1×10 5/mL，接种到PDL-包被的孔板中，24孔板1mL/孔，6孔板4mL/孔，使细胞贴壁后密度约为5×10 4 /cm2，放入37℃、5% CO2培养箱中培养，每48 h半量换液。细胞融合度达到80%时，用分化培养基(DMEM/F12 +Neurobasal+B27+N2)置换增殖培养基。

### **1.3** 单独使用**NGF**或**BDNF**和两个因子的联合应用

#### **1.3.1** **NGF**和**BDNF**浓度的确定

将NSC分为7组：(1)对照组，(2) NGF 25μg/L诱导组，(3) NGF 50μg/L诱导组，(4) NGF 100μg/L诱导组，(5) BDNF 20μg/L诱导组，(6) BDNF 40μg/L诱导组，

（7）BDNF 80μg/L诱导组。对照组用分化培养基，6个诱导组分化培养基的基础上加入相应浓度的因子。

诱导分化3 d后用IF分别检测各组β-tubulinⅢ(1:300)和GFAP(1:600)的细胞阳性率，以确定本实验条件下两个因子的最适浓度。每组做3个孔（24孔板），实验重复3次。

其中，由于NGF浓度已经由本实验团队其他成员做了相关的探索性实验，因此这里本人只做验证性实验，只统计分析不同浓度时β-tubulinⅢ的阳性细胞率。

#### **1.3.2** 因子的单独使用和联合应用对**NSC**分化及相关分子改变的影响

将NSC分为4组：（1）对照组，(2) NGF 50μg/L诱导组，(3) BDNF 40μg/L诱导组，(4) NGF和BDNF联合诱导组。4个组之间的比较，通过以下几个方面进行：

(1)诱导分化1 d，3 d，7 d和14 d后，用IF检测各组β-tubulinⅢ(1:300)的细胞阳性率。

(2) PD98059高度选择抑制MEK的活性及MAP激酶级联反应，MEK处于ERK上游。将NSC分为8组，即原4组的基础上，每组分双份，其中每组的一份共4组用含MEK抑制剂PD98059(10μM)的分化培养基处理NSC，另外4组用不含

PD98059的分化培养基，30min后，分别加入相应的因子诱导或不加因子，再60min

后，提取各组总蛋白，WB检测ERK的磷酸化水平。

(3)诱导分化1 d，3 d和7 d后，提取RNA，用Q-PCR检测各组HES1，HES5，

MASH1, NGN1和NeuroD的相对表达量。

30

### **1.4** 免疫细胞化学**/**免疫荧光

IF染色步骤见第一部分**1.5**。每组IF染色每次做3个复孔，实验重复3次。

### **1.5** **Q-PCR**步骤

RNA提取，逆转录及Q-PCR步骤见第一部分**1.6**。本部分Q-PCR中检测的基因及引物如表2-1。

表 2-1 NSC中所检测表达基因Q-PCR引物列表

Tab. 2-1 Q-PCR primers used to detect gene expression in NSC

| Gene | Primer sequence |
| --- | --- |
| β-actin | Forward 5'GAGACCTTCAACACCCCAGC3' |
|  | Reverse 5'ATGTCACGCACGATTTCCC3' |
| HES1 | Forward 5’- TAACGCAGTGTCGCCTTCC-3’ |
|  | Reverse 5’- AGAGGTGGGCTAGGGAGTTTATG-3’ |
| HES5 | Forward 5’- AGCCGGTGGTGGAGAAGAT-3’ |
|  | Reverse 5’- AGTTTGGAGTTGGGCTGGTG-3’ |
| MASH1 | Forward 5’- AGGCCCTACTGGGAATGGA -3’ |
|  | Reverse 5’- CCCTGTTGCTGAGAACATTGA-3’ |
| NGN1 | Forward 5’- GACACCCTGCTTCATCCCGTA-3’ |
|  | Reverse 5’- TCTTTAAAGCTCCCAGCATCCAC-3’ |
| MASH1 | Forward 5’- TGCACCAGCCCTTCCTTT -3’ |
|  | Reverse 5’- CGGTGGATGGTTCGTGTTT -3’ |

Q-PCR反应在7500 real-time PCR仪上进行，反应条件为：预变性95℃30 sec；95℃5 sec，60℃34 sec，共40个循环；95℃15 sec，60℃1 min，95℃15 sec。本实验中，β-actin为内参基因，NSC为对照样品，其它样品目的基因的表达以此进行标准化，然后再进行比较。

每组做3批样品，同一批样品同时做Q-PCR时，每个样品的每对引物设3个复孔。相对表达量(relative quantity, RQ)计算公式：

△△CT＝(CT实验组目的基因-CT实验组内参基因) - (CT对照组目的基因-CT对照组内参基因) RQ＝2 -△△CT

Ct值的定义：Ct值中的“C”代表Cycle（循环），“t”代表检测threshhold（阈值），其

31

含义是PCR扩增过程中荧光信号强度达到阈值所需要的循环数。

### **1.6** 总蛋白的提取和浓度测定

#### **1.6.1** 细胞裂解提取总蛋白

（1）弃培养基，用PBS漂洗2次，加入RIPA裂解液和蛋白酶抑制剂(PMSF, 1 mM)，100μL/孔（6孔板）；

(2) 4℃30 min；

（3）用细胞刮子刮取贴壁细胞，将细胞及裂解液温和地转移至预冷的离心管中；

（4）4℃离心12，000×g，30 min；

（5）轻轻吸取上清，分装转移至新预冷的离心管中，取少量用于浓度测定，其余-70℃保存备用。

#### **1.6.2** 蛋白浓度测定

(1)按表2-2配制标准样品，

表 2-2 牛血清蛋白标准品的制备

Table 2-2 Preparation of Diluted Albumin(BSA) Standards

| Vial | Volume of Dluent | Volume and Source of BSA | Final BSA Concentration |
| --- | --- | --- | --- |
| A | 4.8 mL | 0.2 mL of Stock | 80 mg/L |
| B | 2.5 mL | 2.5 mL of vial A dilution | 40 mg/L |
| C | 1.0 mL | 3.0 mL of vial B dilution | 30 mg/L |
| D | 1.5 mL | 3.0 mL of vial C dilution | 20 mg/L |
| E | 2.5 mL | 2.5 mL of vial D dilution | 10 mg/L |
| F | 2.0 mL | 2.0 mL of vial E dilution | 5 mg/L |
| G | 2.0 mL | 2.0 mL of vial F dilution | 2.5 mg/L |
| H | 4.0 mL | 0 | 0 mg/L |

各取100μL按顺序置于96孔板中，做3个复孔；

(2)样品按体积稀释50 倍后，取100μL加入96孔板中，每个样品做3个复孔；

(3)将BCA试剂盒中的原液以MA: MB: MC=25:24:1的比例混合成反应液，各孔加入100μL BCA反应液，配成总体积200μL的工作液；

(4)把96孔板酶标板放在振荡器上振荡30 sec，60℃环境下60 min充分反应。

32

(5)酶标仪562nm波长下进行扫描，得到各孔溶液的吸光度A值。

(6)以蛋白浓度为横坐标，吸光值为纵坐标，绘出标准曲线，得到标准曲线和方程式；

(7)将待测样品的吸光值代入方程式，即可得所测蛋白浓度。（乘以50后是蛋白原液的浓度）

### **1.7** 蛋白免疫印迹**(western blotting, WB)**

#### **1.7.1** **WB**试剂准备

WB采用PAGE凝胶电泳，经SDS使蛋白变性，所有的蛋白都带上同等电荷的负电，根据分子量的大小分离，然后转移到固相载体PVDF膜上，经过抗原抗体反应，以检测特定蛋白在某种细胞中是否表达，或在不同细胞或组织中的表达差异。

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| (1) | 1.0Mol/L Tris·HCl (pH6.8) |  |
|  | Tris (MW121.14) | 12.114g |
|  | 蒸馏水 | 100mL |
| 溶解后，（用浓盐酸调 pH 至 6.8），室温下保存。 | | |
| (2) | 1.5Mol/L Tris·HCl(pH8.8) |  |
|  | Tris (MW121.14) | 18.671g |
|  | 蒸馏水 | 100mL |
| 溶解后，（用浓盐酸调 pH 至 8.8），室温下保存。 | | |
| (3) | 10％SDS |  |
|  | SDS | 10g |
|  | 蒸馏水至 | 100mL |
| 如溶解困难，可在 50℃水浴下溶解，室温保存。 如在长期保存中出现沉淀，水  浴溶化后，仍可使用。 | | |
| (4) | 10％过硫酸胺(AP) |  |
|  | 过硫酸胺 | 0.1g |
|  | 蒸馏水 | 1mL |
| 现用现配，可先将过硫酸胺干粉称好分量后放在 1.5mLEP 管中，一次性多装几  管，使用时加入蒸馏水水即可，溶解后，4℃保存，保存时间为 1 周。 | | |
| (5) | 四甲基乙二胺原液(TEMED)： | 4C 保存。 |
| (6) | 30%丙稀酰胺： | 4C 保存。 |

33

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| (7) | 5×电泳液缓冲液 |  |
|  | Tris(MW121.14) | 15.1g |
|  | 甘氨酸(MW75.07) | 94g |
|  | SDS | 5.00g |
| 蒸馏水至 1000 mL，溶解后室温保存，用时稀释 5 倍，通常取 200mL 配制成  1000mL 即可。 | | |
| (8) | 10×转膜缓冲液 |  |
|  | 甘氨酸(MW75.07) | 151.1g |
|  | Tris(MW121.14) | 30.3g |
| 蒸馏水至 1000mL. 溶解后室温保存，用时稀释 10 倍，并加入甲醇至 20%. 通常  取 100mL 母液，加 700mL 蒸馏水，最后加 200mL 甲醇，配制成 800mL 即可。(先加甲醇易产生沉淀) | | |
| (9) | 10×TBS 缓冲液 |  |
|  | Tris(MW121.14) | 24.2g |
|  | NaCl | 80.0g |
| 浓盐酸调 pH 至 7.6，蒸馏水至 1000mL，室温保存。 | | |
| (10) | 1×TBST 缓冲液 |  |
|  | 10×T BS 缓冲液 | 100mL |
|  | 蒸馏水 | 900mL |
|  | Tween-20 | 1 mL |
| 因 Tween-20 比较粘稠，应缓慢吸取并可把枪头剪掉一块，即可防止产生气泡。  溶解后室温保存。 | | |
| (11) | 封闭液/抗体稀释液(5%脱脂牛奶) | |
|  | 1×TBST 缓冲液 | 95-100 mL |
|  | 脱脂奶粉 | 5g |
| 溶解后 4℃保存，可于一周内使用。 | | |

#### **1.7.2** **WB**分离胶和浓缩胶的制备

制胶前准备：检查是否有足够的、干净的玻璃板、梳子和架子，其中玻璃板和梳子用无水乙醇沿同一方向擦拭；检查各试剂是否够量，没有立刻配制；装好架子，按照下面配方配制分离胶。

34

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| (1) | 12 %分离胶 | 1 块胶(5 mL) | 2 块胶(10 mL) |
|  | ddH2O | 1.65 | 3.3 |
|  | 30% Acr-Bis | 2 | 4 |
|  | 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 | 1.25 | 2.5 |
|  | 10 % SDS | 0.05 | 0.1 |
|  | 10 % APS | 0.05 | 0.1 |
|  | TEMED | 0.0025 | 0.005 |
| (2) | 4 %分离胶 | 1 块胶(2 mL) | 2 块胶(4 mL) |
|  | ddH2O | 1.441 | 2.883 |
|  | 30% Acr-Bis | 0.267 | 0.533 |
|  | 1 M Tris-HCl, pH 6.8 | 0.25 | 0.5 |
|  | 10 % SDS | 0.02 | 0.04 |
|  | 10 % APS | 0.02 | 0.04 |
|  | TEMED | 0.002 | 0.004 |

根据天气情况，可以调整10% APS和TEMED的用量，但调动幅度控制在原用量的90%-110%之间；倒好分离胶后，加入ddH2O，可以隔绝空气，同时也使分离胶和浓缩胶之间的界面更平整。

#### **1.7.3** **WB**操作步骤

(1)制备分离胶和浓缩胶；

(2)蛋白变性：准备蛋白样本，加入等体积的2×上样Buffer稀释，置于95℃中煮5 min；

(3)加样：每孔加入20μg样品

(4)电泳：置于电泳槽中，120V电泳15min，然后150V电泳120min；

(5)取出胶板，用切割刀修好胶；

(6)将胶置于转膜液中浸泡10 min; PVDF膜用甲醇活化1-2 min后，置于转膜液中浸泡10 min；

(7)按顺序放好下列物质：黑面→海绵→滤纸→胶→PVDF膜→滤纸（用吸管赶去气泡）→海绵；

(8)置于转膜槽中，黑面对黑面，加上冰块，加入转膜液；

(9)装好电极，于恒定电压100V下，60min；

35

(10)封闭：将膜用双蒸水洗3次，每次5min后，加入封闭液，常温摇床摇2h；

(11) TBST洗膜，10min，共3次，然后加入一抗(ERK1/2, 1:1000；P-ERK1/2，

1:1000；GAPDH，1:5000；用封闭液稀释)

(12)置于4℃摇床摇过夜；

(13)次日，TBST洗膜，10min，共3次；

(14)加入二抗（HRP标记羊抗免IgG，1: 5000，用封闭液稀释），常温摇床摇2-3h；

(15) TBST洗膜，10min，共3次；

(16)将膜置于发光液中浸泡约1min；

(17)将膜铺于曝光盒中，于暗室中曝光，洗胶片。

### **1.8** 统计学分析

数据采用*x**s*表示，用SPSS17.0进行统计学分析，主要统计方法是单因素方差分析，*F*检验和*t*检验，以*P*＜0.05为差异具有统计学意义。

## **2** 结果

### **2.1** **NGF**和**BDNF**诱导单层贴壁培养**NSC**分化

在单层贴壁培养的基础上，在分化培养基中加入不同浓度的NGF和BDNF诱导

NSC分化。72 h后IF结果显示，对照组β-tubulinⅢ阳性细胞率为18.47±0.09 %，不同浓度的BDNF诱导β-tubulinⅢ阳性细胞率分别为：对照组18.47±0.09 %, BDNF 20μg/L组24.09±0.38 %, BDNF 40μg/L组34.18±0.60 %和BDNF 80μg/L组34.32±0.05 %；GFAP

阳性细胞率分别为：对照组27.31±2.33 %, BDNF 20μg/L组23.82±0.49 %, BDNF

40μg/L组22.64±0.39 %和BDNF 80μg/L组22.64±1.39 %；统计学分析表明，β-tubulinⅢ阳性细胞率在BDNF组与对照组之间差异有统计学意义(*P*＜0.001)，其中BDNF 20

μg/L与其它两组间差异有统计学意义(*P*＜0.001)；GFAP阳性细胞率在BDNF组与对照组比较，其中BDNF 20μg/L与对照组差异无统计学意义(*P＞*0.05)，BDNF 40μg/L和BDNF 80μg/L与对照组差异有统计学意义(*P＜*0.05)，BDNF各组间差异无统计学意义，如图2-1，β-tubulinⅢ和GFAP阳性细胞的IF染色如图2-2。

不同浓度的NGF诱导β-tubulin Ⅲ阳性细胞率分别为：NGF 25 μg/L 组

23.11±1.04 %, NGF 50μg/L组30.90±3.34 %和NGF 100μg/L组31.43±0.74 %；统计学

分析表明，β-tubulin Ⅲ阳性细胞率在NGF组与对照组之间差异有统计学意义（*P*＜

36

0.5），其中NGF 25μg/L与其它两组间差异有统计学意义(*P*＜0.05)，而NGF 50μg/L

组和NGF 100μg/L组差异无统计学意义，如图2-3。



图2-1 不同浓度BDNF诱导NSC分化后IF双染

Fig. 2-1 Double-stains of differentiation cells of NSC in different concentrations of BDNF

BDNF诱导NSC分化72 h后，β-tubulinⅢ和GFAP阳性细胞被染上荧光，细胞相互分散，方便计数。GFAP和β-tubulinⅢ阳性细胞在整体范围内均匀分布，但在小的局部，两者会出现一定程度的分离，即这一局部以β-tubulin Ⅲ阳性细胞为主，而另外一个小局部则以GFAP阳性细胞为主。



图2-2 不同浓度BDNF诱导NSC分化为β-tubulinⅢ阳性细胞和GFAP阳性细胞比例

37

Fig. 2-2 Proportions of differentiation cells of NSC in different concentrations of BDNF

A. BDNF诱导组的β-tubulinⅢ阳性细胞比例比对照组高，BDNF 20μg/L组的阳性率比另外两个BDNF组低，BDNF 40μg/L和80μg/L两组之间差异无统计学意义。B. GFAP阳性细胞率在BDNF诱导组要比在对照组低，在BDNF各组间差异无统计学意义。



图2-3 不同浓度NGF诱导NSC分化后IF染色

Fig. 2-3 IF of differentiation cells of NSC in different concentrations of NGF

NGF诱导NSC分化72 h后，β-tubulin Ⅲ和GFAP阳性细胞被染上荧光。

### **2.2** 比较因子的单独使用和联合应用对**NSC**分化的影响

比较对照组，NGF组，BDNF组和联合组神经元分化的比例。结果表明，在检测的4个时间点中，对照组β-tubulin III阳性细胞率比三个诱导分化组的阳性率低，SPSS分析结果表明差异有统计学意义（*P*＜0.05，除诱导分化1 d时对照组和NGF组相比*P*＞

0.05）. 单独使用NGF或BDNF组和联合组相比，β-tubulin III阳性细胞率明显比联合组低，差异有统计学意义（*P*＜0.05，除诱导分化1 d时BDNF组和联合诱导组相比P＞

0.05). 各组的β-tubulin III阳性细胞率见表2-3和图2-5，β-tubulin III阳性细胞的IF染色见图2-4.

38



图2-4 Aβ-tubulin III阳性细胞的IF染色

39



图2-4B β-tubulin III阳性细胞的IF染色

Fig. 2-4 The expression ofβ-tubulin III in different groups.

40

单层贴壁培养的NSC用NGF或BDNF或两个因子联合诱导分化，分别在第1 d，3 d，7 d和14 d检测各组的β-tubulin III阳性细胞染色。随着分化时间的增加，各组细胞的突起变长，交织成网状，对照组的神经元明显比诱导组少。

表 2-3 不同诱导组的 β-tubulin III 阳性细胞率( *x*  *s* )

Tab. 2-3 Proportions of β-tubulin III-positive cells in different induced condition ( *x*  *s* )

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Time intervals |  | β-tubulin III (%) | |  |
|  | Control | NGF | BDNF | Combination |
| 1 day | 18.93±2.12 | 21.60±3.78 @ | 23.94±1.56 # | 26.85±3.03 # |
| 3 day | 19.55±1.09 | 30.90±3.34 #@ | 35.11±0.64 #@ | 39.13±1.30 # |
| 7 day | 24.05±1 .55 | 40.23±2.05 #@ | 45.59±1.54 #@ | 51.54±1.41 # |
| 14 day | 22.67±2.72 | 37.98±3.91 #@ | 41.77±2.35 #@ | 48.56±4.69 # |

#*P*＜0.05 表示和对照组相比，@*P*＜0.05 是和联合组相比。



图2-5 不同诱导组的β-tubulin III阳性细胞率

Fig. 2-5 Proportions ofβ-tubulin III-positive cells in different induced condition

SPSS分析诱导分化1 d，3 d，7 d和14 d 时β-tubulin III 阳性细胞率在不同组间的差异，

#*P*＜0.05表示和对照组相比，@*P*＜0.05是和联合组相比。

41

### **2.3** **WB**检测**PD98059**对**P-ERK**的水平变化和神经元分化比例的影响

WB结果表明，NGF和BDNF都可以提高EKR的磷酸化水平，联合组P-ERK

水平更高。PD98059孵育30min后，P-ERK水平明显降低，但在抑制30min+诱导

60min组，P-ERK水平可以被NGF或（和）BDNF部分提高，如图2-6.



图2-6 磷酸化ERK1/2水平变化

Fig. 2-6 Activation of ERK1/2

蛋白免疫印迹检测p-ERK和GAPDH表达(Com. =联合组，即BDNF+NGF组)。结果显示，

NGF或（和）BDNF可以提高ERK磷酸化水平，PD98059的加入可以明显抑制ERK磷酸化。

诱导培养3d后，IF检测β-tubulin III阳性细胞，结果表明，PD98059可以抑制神经元的分化，而NGF和BDNF可以诱导神经元分化，各组的β-tubulin III阳性细胞的IF染色如图2-7，β-tubulin III阳性细胞率见表2-4和图2-8。

各组在不孵育PD98059的情况下，诱导组的β-tubulin III阳性细胞率都比对照组高，而联合组比单独诱导组高，差异有统计学意义(*P*＜0.05)；在先孵育PD98059的情况下，各组的β-tubulin III阳性细胞率都下降，和不孵育抑制剂组相比，差异有统计学意义(*P*＜0.05)；在孵育抑制剂中和各组相比，抑制+诱导组的β-tubulin III阳性细胞率比单独的抑制组高，和抑制剂+单独诱导组相比，抑制剂+联合诱导组的β-tubulin III阳性细胞率也更高，差异有统计学意义(*P*＜0.05)。

42



图2-8 β-Tubulin III阳性细胞的阳性细胞染色

Fig. 2-8 IF stain ofβ-tubulin III-positive cells

43

先用PD98059孵育NSC 30 min，然后再用NGF或（和）BDNF诱导3 d，各组β-tubulin III阳性细胞的IF染色结果。

表 2-4 使用或不使用 PD98059 时各组 β-tubulin III 阳性细胞率(%， *x*  *s* ) Tab. 2-4 Proportions of β-Tubulin III (%) with or without PD98059 ( *x*  *s* )

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Groups | Control | NGF | BDNF | Combination |
| PD98059 (-) | 16.36±0.84 | 30.90±3.34 #@ | 35.33±0.19 #@ | 39.34±0.39 # |
| PD98059 (10 μM) | 13.77±0.93 \* | 25.26±1.31 \*#@ | 27.61±0.55 \*#@ | 31.56±0.25 \*# |

\**P*＜0.05和没有PD98059时相比，#*P*＜0.05表示在PD98059处理方式相同下和对照组相比，

@*P*＜0.05是在PD98059处理方式相同下和联合组相比。



图2-7 PD98059处理后各组β-Tubulin III阳性细胞率

Fig. 2-7 Proportions ofβ-Tubulin III with or without PD98059

先用PD98059孵育NSC 30 min，然后再用NGF或（和）BDNF诱导3 d，用IF检测各组β-tubulin III阳性细胞率，和不孵育PD98059的各组一起比较。\**P*＜0.05和没有PD98059时相比，#*P*＜0.05表示在PD98059处理方式相同下和对照组相比，@*P*＜0.05是在PD98059处理方式相同下和联合组相比。

### **2.4** **Q-PCR**检测**NGF**或**(**和**) BDNF**对**bHLH**家庭基因的表达变化的影响

Q-PCR检测NSC和各诱导分化组HES1, HES5，MASH1, NGN1和NeuroD

基因的表达变化，分化后3个时间点的检测结果表明，和NSC的表达量相比，HES1

44

和HES5 的表达量在对照组和诱导分化组都明显下降，差异均有统计学意义（*P*＜

0.05）；但对照组和诱导分化组相比，以及各诱导分化组之间相比，差异均无统计学意义，如表2-5和图2-9。

表2-5 Q-PCR检测不同的bHLH转录因子的相对表达量( *x**s* )

Tab. 2-5 RQ of different bHLH transcription factors detected by Q-PCR ( *x**s* )

| Genes | Time intervals | Control | NGF | BDNF | Combination |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| HES1 | 1 day | 0.323±0.089 | 0.324±0.033 | 0.437±0.110 | 0.341±0.097 |
|  | 3 day | 0.213±0.077 | 0.215±0.012 | 0.212±0.030 | 0.162±0.019 |
|  | 7 day | 0.147±0.010 | 0.141±0.023 | 0.144±0.026 | 0.149±0.031 |
| HES5 | 1 day | 0.338±0.030 | 0.327±0.043 | 0.354±0.042 | 0.331±0.031 |
|  | 3 day | 0.304±0.046 | 0.287±0.047 | 0.298±0.044 | 0.305±0.028 |
|  | 7 day | 0.212±0.052 | 0.207±0.009 | 0.211±0.090 | 0.181±0.064 |
| MASH1 | 1 day | 1.611±0.023 | 1.925±0.097 | 2.063±0.015 | 2.276±0.097 |
|  | 3 day | 1.717±0.182 | 2.619±0.112 | 2.710±0.150 | 3.281±0.290 |
|  | 7 day | 2.243±0.124 | 2.677±0.141 | 2.910±0.168 | 3.619±0.173 |
| NGN1 | 1 day | 1.318±0.133 | 1.942±0.221 | 1.583±0.212 | 1.754±0.195 |
|  | 3 day | 1.415±0.069 | 2.982±0.254 | 1.737±0.161 | 2.244±0.177 |
|  | 7 day | 0.335±0.012 | 0.797±0.104 | 0.353±0.093 | 0.520±0.076 |
| NeuroD | 1 day | 1.320±0.031 | 1.676±0.185 | 2.127±0.117 | 2.516±0.172 |
|  | 3 day | 1.553±0.087 | 2.350±0 .079 | 2.385±0.119 | 2.803±0.048 |
|  | 7 day | 1.457±0.212 | 2.009±0.151 | 2.089±0.183 | 2.537±0.205 |

RQ=relative quantity. β-actin was defined as endogenous gene and NSC was defined as reference sample.

分化后3个时间点检测促进NSC分化的转录因子的Q-PCR结果表明，MASH1在对照组和诱导分化组的表达量较NSC都明显上升，差异均有统计学意义(*P*＜0.05)；和对照组相比，单独使用NGF或BDNF都可以提高MASH1的表达，差异均有统计学意义(*P*＜0.05)；和单独使用NGF或BDNF的诱导组相比，联合诱导组

MASH1的表达量更高，和单独使用因子组之间的差异有统计学意义(*P*＜0.05)，如表2-5和图2-10A。

45



图2-9 HES1和HES5基因表达的变化

Fig. 2-9 The changes of expression levels of HES1 and HES5 on mRNA

本实验中，β-actin为内参基因，NSC为对照样品，A和B分别表示了NTs诱导NSC分化后各个检测时间点HES1和HES5在不同组间的相对表达量，\**P*＜0.05表示和NSC相比差异有统计学意义。



图2-10 MASH1、NGN1和NeuroDHES5基因表达的变化

Fig. 2-10 The changes of expression levels of MASH1, NGN1 and NeuroD on mRNA

46

本实验中，β-actin为内参基因，NSC为对照样品，A，B和C分别表示了NTs诱导NSC

分化后各个检测时间点MASH1, NGN1和NeuroD在不同组间的相对表达量，\**P*＜0.05表示和

NSC相比差异有统计学意义，#*P*＜0.05对照组相比，@*P*＜0.05和联合组相比。

NGN1在对照组和诱导分化组1 d和3 d时，各组表达量比NSC高，差异有统计学意义(*P*＜0.05)；但诱导7 d时，表达量下降；和对照组相比，单独使用NGF 或

BDNF都可以提高NGN1的表达量，且差异在3个检测时间点均有统计学意义（*P*＜

0.05)；联合诱导组NGN1的表达量介于NGF组和BDNF组之间，与NGF组和BDNF

组相比，3个检测时间点差异均有统计学意义(*P*＜0.05)，如表2-5和图2-10B。

诱导分化后NeuroD的表达量在3个时间点均比NSC高，NGF或BDNF单独可以诱导NeuroD的表达，而联合组比单独使用因子组的表达量更高，差异均有统计学意义(*P*＜0.05)，如表2-5和图2-10C。

## **3** 讨论

### **3.1** **NGF**和**BDNF**对**NSC**分化为神经元的叠加作用

前一部分我们讨论到，单层贴壁培养为我们提供了高度同质的NSC，均匀地接触培养基和因子，清晰地计数，为我们得到更科学更准确的数据提供基础，我们有理由相信，单层贴壁培养条件下得到的数据可以更真实地反应不同因子对NSC增殖和分化的影响。在这一部分，我们首先讨论了NGF和BDNF的使用浓度，根据本实验培养条件和目的，我们选择NGF 50μg/L和BDNF 40μg/L作为下一步研究的基础，这样浓度的诱导条件下，NSC可以分化出更多的神经元。

我们的结果表明，单独使用NGF或BDNF都可以提高神经元分化的比例，但在联合组，神经元比例更高。研究表明，NGF和BDNF可以显著提高NSC分化为神经元的比例[39, 94]，并提示NGF和BDNF都激活了某些信号通路，参与调节神经元分化。NGF和BDNF的联合使用对NSC分化为神经元有叠加作用，此叠加作用也在其他文献中用体外培养的大鼠NSC [93]和脊髓运动神经元[95]都得到过阐明。和单独使用NGF或BDNF相比，因子的联合应用是一个更好的诱导方案。另外，我们的结果显示，β-tubulin III阳性细胞率在诱导分化7d时最高。β-tubulin III是神经元的标记蛋白，在幼稚神经元和成熟神经元中都有表达。我们的结果显示，一直到诱导分化3 d时，Nestin阳性细胞都会存在（文中未给出），提示我们NSC的分化并不是同步进行的。诱导分化14 d时，β-tubulin III阳性细胞率较7 d时少，原因可能有二：分化终未端神经元不再表达

47

β-tubulin III；少量细胞死亡（诱导分化10 d时，显微镜观察对细胞的的监测可以看到少量细胞碎片）。

### **3.2** **ERK**的磷酸化参与**NGF**和**BDNF**对**NSC**的叠加作用

BDNF通过与TrkB结合，可以显著提高ERK的磷酸化水平[96]，Lim等的研究表明，

BDNF可以激活MAPK/ERK信号通路，该信号通路的上调有助于神经元分化和已分化神经元的存活[97]。Yuan的研究结果表明NGF-TrkA复合体可以调节NSC分化过程中

MAPK/ERK通路的活性[94]。NGF通过活化TrkA受体，参与PC12细胞的神经元样变形

[98]，NGF可以作用于NSC，促进ERK磷酸化，进而参与NSC分化为神经元的诱导[99]。

NGF和BDNF活化后的Trk受体可以通过Ras蛋白活化ERK[54, 55]，联合应用时，p-ERK

水平更高，提示我们NGF和BDNF对NSC分化的叠加作用很可能涉及到ERK磷酸化。

MEK抑制剂PD98059的使用进一步证实了这一点。NGF和BDNF都可以和PD98059竞争作用于MAPK/ERK信号通路，尽管用PD98059先孵育细胞，NGF或（和）BDNF的应用依然可以提高ERK的磷酸化水平。细胞形态学检测结果表明，各组的β-tubulin III阳性细胞率和p-ERK水平有相似的变化趋势，联合组的p-ERK和β-tubulin III阳性细胞率是最高的，这提示我们ERK的活化可能参与促进神经元分化。无论是否先用

PD98059孵育细胞，联合组的p-ERK和β-tubulin III阳性细胞率都是最高的，这进一步表明，NGF和BDNF对神经元的分化有叠加作用，两个因子的联合应用是更好的诱导方案。

### **3.3** **MASH1**、**NGN1**和**NeuroD**的表达变化参与**NGF**和**BDNF**对**NSC**的叠加作用

NSC的增殖分化过程是非常复杂的，受多种因素影响。体外培养的NSC除了受

NTs及其相关的受体和信号通路的作用之外，还受内源性基因的表达调控，转录因子的联合调控对NSC的增殖分化有非常重要的作用。HES1和HES5是分化抑制型基因，在NSC中高度表达，可以维持NSC处于增殖状态。Notch信号通过可以调节HES1和

HES5的表达，Notch和EGFR通路相互作用，共同调节NSC的自我更新[69, 100]。体外培养的NSC，当培养基中撤去EGF和bFGF后，HES1和HES5的表达量明显下降，在诱导分化组，NGF或（和）BDNF都不能诱导其表达，这表明，在NSC的增殖过程中，EGF和bFGF起着更重要的作用。也有研究表明，BDNF可以刺激NSC增殖，但依赖于BDNF的给药剂量和给药方式[39]，BDNF可以联合EGF共同刺激NSC的增殖，但当BDNF单独使用时，Nestin阳性细胞会明显减少，而神经元明显增多[36]。HES1可以抑制MASH1的功能，而NGF或BDNF添加可以明显提高MASH1的表达，联合组的提高更为明显，

48

这表明除了HES1之外还有其他的信号通路调节MASH1的表达。Chen的研究表明，

BDNF可以作用于Wnt/β-catenin信号通路[39]，Zhang的研究表明，MASH1是Wnt/β-catenin信号通路的下游分子[67]。MASH1表达量在各组和各检测时间点的变化趋势和β-tubulin III阳性细胞率呈现一致，说明MASH1的表达不仅可以促进神经元的分化，还可以维持其特征，而MASH1很可能是一个既可以表达在幼稚神经元又可以表达在成熟神经元的转录调控因子。NGN1是一个表达在神经前体细胞和神经元的转录调控因子[77]，它可以促进神经前体细胞向神经元的分化[81]。我们的结果显示，NGN1的表达量在诱导分化1 d和3 d时上升，在诱导7 d时下降，和文献报道的结果相符。在每一个检测时间点，NGF组的NGN1表达量都是最高的，联合组介于NGF和BDNF之间。由于NGN1可能调控不同神经元的特化[78]，NGF和BDNF可能诱导不同的神经元亚型[41]。在联合诱导组中，除了叠加作用之外，NGF和BDNF在作用于神经前体细胞诱导神经元亚型特化时很可能存在竞争作用。NeuroD同样可以促进神经前体细胞到神经元的分化[101]，我们的结果表明，诱导组和对照组相比，NeuroD的表达量明显上升，而联合诱导组的改变更为明显。从检测时间点的改变可以看出，NeuroD在幼稚神经元和成熟神经元中的表达均得到加强。

### **3.4** **NSC**在细胞移植中的前景和挑战

NSC治疗潜能开发的可能性引起公众的关注和科学家的兴趣，NSC让细胞移植代替疗法成为治疗神经再生性疾病的新的希望，并有望成为现实。针对神经功能障碍药物的开发和研究，也会得益于NSC系来源的神经元或病人本身诱导多潜能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)源的神经元。然而，为了收集NSC的潜能，主要的挑战还是开发一种体外诱导分化的培养方案，以生成特定的浓缩的足够量的所期望的细胞类型。中枢神经系统极为复杂，在发育过程中有上百种独特的神经元类型，这会成为研究NSC分化的主要障碍。因此，体外培养NSC的一个非常重要的目标就是了解NSC分化过程中细胞系选择是如何进行的，只有这样，特定类型神经元的高效获取才有可能成为现实[24, 102]。本研究从神经元分化比例，ERK磷酸化水平，MASH1、NGN1和NeuroD的表达作为研究的切入点，从形态学和分子生物学的角度对NSC的分化进行探讨，为以后进一步研究提供理论基础。

## **4.** 结论

本研究首次比较了NGF或BDNF以及两个因子联合对NSC诱导分化为神经元的作用，包括神经元比例，p-ERK水平，MASH1、NGN1和NeuroD基因的表达，结果表

49

明，联合诱导组比单独的NGF或BNDF可以诱导产生更多的神经元。另外，NGF和

BDNF联合组可以诱导更高的ERK磷酸化水平，诱导更高的MASH1和NeuroD基因的表达，进而参与神经元分化。我们的结果证明，NGF和BDNF联合应用，对NSC向神经元的分化有叠加作用。

50

# **第三部分** **NGF**和**BDNF**联合神经干细胞在**192-IgG-saporin**致阿尔茨海默病模型鼠中的应用

基底前脑的胆碱能神经元丢失是AD的重要病理特征之一，外源性补充NSC可以补充胆碱能神经元的数量，可能会改善AD患者的的症状。本实验室已经成功构建神经免疫毒素192-IgG-saporin致阿尔茨海默病动物模型，发现192-IgG-saporin能够造成模型鼠学习记忆能力的下降及基底前脑胆碱能神经远的损伤[91]；将体外培养的NSC移植到192-IgG-saporin模型鼠的基底前脑，可以明显改善模型动物的学习记忆能力，补充基底前脑胆碱能神经元的数量，促进AChE纤维的再生和突触生成[11]。本实验在研究侧脑室注射192-IgG-saporin损伤基底前脑胆碱能神经元的基础上，用不同方案预处理NSC[90]，诱导分化3d后的混合细胞移植到基底前脑，探讨移植后的NSC对模型鼠基底前脑胆碱能神经元数量、海马AChE纤维和突触素的影响，并比较不同诱导方案之间的差别，为细胞移植的临床应用提供理论基础和指导。

## **1** 材料和方法

### **1.1** 动物、主要试剂和仪器

|  |  |
| --- | --- |
| (1) SD 雄性成年大鼠(250-300g) | 广东省实验动物中心 |
| 孕 13-15 天的 SD 大鼠 | 广东省实验动物中心 |
| (2) Neurobasal 培养基 | Gibco |
| DMEM/F12 培养基 | Gibco |
| B27 添加剂 | Gibco |
| N2 添加剂 | Gibco |
| EGF | PEPROTECH |
| bFGF | PEPROTECH |
| NGF | PEPROTECH |
| BDNF | PEPROTECH |
| 192-IgG-saporin | Advanced targeting system |
| 碘化乙酰硫代胆碱 | Sigma |
| Accutase | Sigma |
| 牛血清白蛋白(BSA) | Sigma |
| 兔抗 NGFR p75 抗体 | Sigma |

51

|  |  |
| --- | --- |
| 兔抗突触素抗体 | Sigma |
| TritonX-100 | Sigma |
| 即用型超敏 S-P 试剂盒 | 福建迈新 |
| DAB 显色试剂盒 | 福建迈新 |
| 75%酒精，PBS，青-链霉素双抗，台盼兰，氯仿、异丙醇等均为分析纯。 | |
| （3） 超净工作台 | 苏净安泰 |
| 冰箱 | LG |
| -80℃低温冰箱 | Thermo |
| 台式低温离心机 | Thermo |
| 超纯水仪 | 广州誉维生物科技有限公司 |
| 电子天秤 | 上海天平仪器厂 |
| 37 ℃恒温培养箱 | SANYO |
| Q-PCR 仪 | APPLIED BIOSYSTEMS |
| 荧光显微镜 | Nikon |
| 倒置荧光显微镜 | Olympus |
| 酶标仪 | BioTek |
| Western Blotting 电泳仪 | BioRad |
| 大鼠脑立体定位仪 | Narishige 公司 |
| 微量注射器 | 上海安亭微量注射器厂 |
| Morris 水迷宫系统 | 上海软隆科技 |
| 恒温冰冻切片机 | Leica |

（4）1%戊巴比妥钠（麻醉剂）：称取1g戊巴比妥钠溶于100 mL双蒸水中，4℃保存。

### **1.2** **SD**大鼠侧脑室的**192-IgG-saporin**注射

健康成年雄性SD大鼠40只。体重250-300g，随机分成5组，每组8只即：(1)假手术组(sham，用等体积的生理盐水代替192-IgG-saporin); (2) 192-IgG-saporin模型组；(3) 192-IgG-saporin+NGF诱导NSC移植组，以下简称NGF组；(4) 192-IgG-saporin+ BDNF诱导NSC移植组，以下简称BDNF组；(5) 192-IgG-saporin+

NGF联合BDNF诱导NSC移植组，以下简称联合组。

52

192-IgG-saporin以0.01 M PBS稀释，终溶度为0.5μg/μL，5μL/管分装，-20℃保存备用，使用前解冻。全部器械以1 %新洁尔灭溶液浸泡过夜（加1 %亚硝酸钠防锈）。

(1) SD大鼠用1%戊巴比妥那(40mg/kg, 即4mL/kg)经腹腔注射麻醉后，采用平头颅位固定于大鼠立体定位仪上。

(2)用碘酒擦湿颅顶，剪去颅顶的毛，再用75 %酒精消毒。

(3)沿颅顶正中切开头皮，用3 %过氧化氢烧灼，使颅骨发白，暴露前后囟点，用3 %过氧化氢轻擦颅骨表面，使前后囟连成一线；

(4)以前囟点位原点，记录前囟点坐标，参考图谱，按侧脑室坐标：前囟后- 0.8

mm，左侧旁开1.5mm，针深5.5mm(进针深度为图谱原点加上颅骨厚度1.5mm)，用铅笔分表标记各个注射点，用针头在颅骨表面分别钻孔。

(5)用10μL微量注射器抽取192-IgG-saporin 5μL(0.5μg/μL)，从孔垂直进针，在5min钟内将药物注射完成，留针10 min，后缓慢撤针，5min撤完；其中生理盐水组注射同等体积的生理盐水；

(6)伤口消毒，皮肤缝合，后单独侍养。

### **1.3** 水迷宫行为学测试

动物手术3 w后，假手术组和AD模型组进行水迷宫测试。前4天为定位航行实验，每天每只动物4次，分别从四个象限放入，每次60s，站台停留2s。第5天后去掉平台，随机选一个象限放入，做空间搜索实验，测试动物在原平台所在象限的记忆能力。

#### **1.3.1** **Morris**水迷宫实验装置

圆形不锈钢水池直径为120 cm, 高50 cm；4个不同的标记物把水池等分为4个象限；目标象限的中央放置一圆形隐藏平台，低于水位1-1.5 cm，整个实验期间其位置保持不变，水温保持25℃左右；摄像机在迷宫正上方，同步记录大鼠运动轨迹，软件记录相关数据及图象结果。

#### **1.3.2** 定位航行实验**(**隐藏平台实验**)**

定位航行实验用于测量实验动物的学习和记忆能力，历时4 d，每天训练4次，每次60 s，平台停留时间设2 s，随机选择一个象限，将大鼠面向池壁放入水中，记录其寻找平台所需时间即逃避潜伏期(eseape lateney)。如果动物在60 s内未找到平台，将其引至平台并停留15-20 s。每只动物共计训练16次，计算每天各组4次逃避潜伏期的平

53

均值。

#### **1.3.3** 空间搜索实验

空间搜索实验用于测量动物的记忆能力。第5 d撤去平台，任选一个标记物将动物放人水中，测量实验动物60 s在目标象限的时间、游泳速度和穿越平台的次数。

### **1.4** **NSC**的培养，诱导分化和移植

NSC培养见第一部分**1.2**。NSC培养至P2时，用Accutase消化成单细胞，用分化培养基调整细胞密度为1×10 5/mL，将其分为3组：(1) 50μg/L NGF诱导组；(2) 40μg/L BDNF诱导组；(3) NGF和BDNF联合诱导组。细胞进行不贴壁诱导培养，为的是进行移植时不经过消化，保护细胞的活性。移植时，收集细胞后调整浓度至2.5×10 4/μL备用。用10μL微量注射器抽取5μL细胞悬液，动物手术同上，诱导后的混合型细胞移植部位为基底前脑。以前囟点位原点，记录前囟点坐标，参考图谱，按基底前脑坐标：前囟+0.8 mm、中线左侧+0.6 mm、深度为5.5 mm。

细胞移植4 w后，3个细胞移植组的SD大鼠进行水迷宫测试。前4天为定位航行实验，每天每只动物4次，分别从四个象限放入，每次60s，站台停留2s。第5天后去掉平台，随机选一个象限放入，做空间搜索实验，测试动物在原平台所在象限的记忆能力。

### **1.5** 动物的灌注及组织切片

灌注针；医用输液器；500 mL输液用玻璃瓶；血管钳；剪刀，镊子；生理盐水(0.4% NaCl)；4%多聚甲醛（用0.1M PBS配，调pH至7.6，用前在4℃预冷），1%戊巴比妥钠等。

(1)大鼠深度麻醉，迅速打开胸腔，暴露心脏，此时注意用血管钳钝性分离心包及周围软组织以便充分暴露心脏；

(2)持镊子捏住心脏，将套管针从心尖部位插入，向上进针到升主动脉；

(3)取出套管针内芯，连接生理盐水，打开输液开关，快速灌注，同时用剪刀在右心耳处剪一小口；

(4)待流出的液体无色后（肝脏变为白色后）更换为多聚甲醛；

(5)多聚甲醛灌注速度为先快后慢，快速灌注50mL后放慢速度；

(6)当动物四肢和全身肌肉会不停抽动时，视多聚甲醛灌注充分；

(7)断头后取大鼠全脑，放到4 %多聚甲醛24 h（此步及后面在4℃冰箱完成）；

54

（8）10%蔗糖沉底，约6-10h；20%蔗糖沉底，约6-10h；30%蔗糖沉底，约12-24h；

(9)切片，在冰冻切片机上完成。

(10)脑细胞速冻20 min后作连续冠状切，切片厚度为30μm，6片/孔收集切片。

(11)脑组织切片用冻存保护液可以在-20℃保存6-12 个月。

|  |  |
| --- | --- |
| 冻存保护液配制： | |
| 蔗糖 | 150 g |
| 乙二醇 | 150 mL |
| PBS | 至500 mL |

### **1.6** 形态学检测

#### **1.6.1** 免疫组织化学**(immunohistochemistry**，**IHC)**检测**p75NGFR**受体和突触素

(1)各组选取不同层次的切片4张，用PBS洗3次，每次5min；

(2)用3%的双氧水室温10min，去除内源性过氧化物酶；

(3)用PBS洗3次，每次5min；

(4) 10%的BSA(0.1M PBS配制，含0.3% Triton-X100的)室温封闭30min；

(5)适当浓度的一抗(p75NGFR浓度1: 5000用于检测基底前脑胆碱能神经元的数量，突触素浓度1: 100用于检测海马突触)，50μL/片，4℃孵育过夜；

(6)翌日加入PBS，洗3次，每次5min，以去除多余的抗体；

(7)加入S-P试剂盒中的C溶液，羊抗兔二抗，50μL/片，室温2-3h；

(8)加入PBS，洗3次，每次5 min；

(9)加入S-P试剂盒中的D溶液，即辣根过氧化物酶，室温10min；

(10)用PBS洗3次，每次5 min；

(11) DAB显色，避光，室温2-10 min（临时配制）；

(12)用PBS洗3次，每次5 min；

(13)将切片贴到粘附载玻片上脱水透明后封片，显微镜下观察并拍照。

#### 1.6.2 海马切片**AChE**纤维染色各种试剂配制：

|  |  |
| --- | --- |
| (1) 0.1M醋酸缓冲液(pH=6.0) |  |
| 醋酸钠·3H 2O(乙酸钠·3H 2O，分子量136.08) | 13.6g |
| 浓醋酸 | 0.3mL |
| 双蒸水 | 1000mL |

55

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| （2） 储备液Ⅰ |  |  |
| 醋酸缓冲液 | 66.3 mL |  |
| 柠檬酸钠(分子量294.1) | 0.120g(母液4.08mM，终液4mM) | |
| 无水硫酸铜(分子量159.61) | 0.049g(母液3.07mM，终液3mM) | |
| 双蒸水 | 33mL |  |
| （3） 储备液Ⅱ |  |  |
| 铁氰化钾(分子量329.25) | 0.165g(母液5.01mM，终液0.1mM) | |
| 双蒸水 | 100mL |  |
| （4） 0.1M硝酸钠 |  |  |
| 硝酸钠(分子量84.99) | 8.5g |  |
| 双蒸水 | 1000mL |  |
| （5） 反应液（临用前30 min配制，切记摇匀） | /100mL | /10mL |
| 碘化乙酰硫代胆碱 | 0.05g | 0.005g |
| 储备液Ⅰ | 98mL | 9.8mL |
| 储备液Ⅱ | 2mL | 0.2mL |

步骤：

(1) 0.1M醋酸缓冲液洗5min×3 ;

(2) 37°孵育箱中用反应液孵育30min，至切片呈紫红色后；

(3)醋酸缓冲液中洗5min×3 ；

(4)后入1%硫化胺漂染3min（临配，99mL双蒸水+1mL硫化胺）；

(5) 0.1M硝酸钠洗漂洗5 min×3 ;

(6) 0.1%硝酸银漂染2min(临配，100mL双蒸水+0.1g AgNO3，避光)；

(7) 0.1M硝酸钠漂洗5 min×3 ;

(8)室温干燥，常规脱水，透明，中性树胶封片。

#### **1.6.3** 切片脱水透明

室温脱水透明：75%酒精，5 min→80%酒精，5 min→90%酒精，5 min→95%酒精，5 min→95%酒精，5 min→100%酒精，10 min→100%酒精，10 min→100%酒精，10 min→TO生物透明剂，10 min→TO生物透明剂，10 min→TO生物透明剂，10 min。可延长最后一次在TO中放置的时间，脱水透明后用中性树胶封片，多余的树胶在晾干后可用TO擦拭去除。

56

### **1.7** 统计学分析

数据采用*x**s*表示，用SPSS17.0进行统计学分析，主要统计方法是单因素方差分析，*F*检验和*t*检验，以*P*＜0.05为差异具有统计学意义。

## **2** 结果

### **2.1** **Morris**水迷宫比较不同组之间的行为学差异

经过4 d的定位航行训练，不同组的实验动物寻找平台时间都减少，如表3-1和图3-1。结果显示，从第2 d开始，每天均值都较前一天小，联合组的下降更为明显；模型组的逃避潜伏期时间明显比假手术组长，训练第4 d可达47.74±1.05 s，差异有统计学意义(*P*＜0.05)；细胞移植组的时间比模型组缩短，差异有统计学意义（*P*

＜0.05），和假手术组相比，差异无统计学意义。联合组训练第2 d即可在13.15±2.55

s 内找到平台，较 NGF 组或 BDNF 组的时间短，差异有统计学意义(*P*＜0.05)。表 3-1 逃避潜伏期在不同组间的比较( *x*  *s* )

Table 3-1 Escape latency in different groups ( *x*  *s* )

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Groups | Day 1(s) | Day 2(s) | Day 3(s) | Day 4(s) |
| Sham | 40.94±6.86 | 25.74±5.82 | 15.44±0.79 | 7.61±2.76 |
| AD model | 60.04±0.13\* | 60.08±0.15\* | 57.36±3.10\* | 47.74±1.05\* |
| NGF | 44.96±3.37 # | 37.04±8.49 #@ | 26.69±4.55\* #@ | 11.17±3.27 #@ |
| BDNF | 47.15±14.22 # | 34.80±3.28 #@ | 18.96±5.26 #@ | 10.15±0.70 #@ |
| Combination | 47.81±9.01 # | 13.15±2.55\* # | 11.24±1.96 # | 8.87±0.26 # |

\**P*＜0.05 versus sham, #*P*＜0.05 versus AD model and @*P*＜0.05 versus combination.

空间搜索实验如图3-2，结果显示，各组动物均在目标象限（Ⅰ象限）游泳时间最长，假手术组和细胞移植组比模型组时间长，差异有统计学意义(*P*＜0.05)；但假手术组和细胞移植组间差异无统计学意义(*P＞*0.05)，结果见表3-2。假手术组和3个细胞移植组的游泳速度相比，差异无统计学意义(*P＞*0.05)，如表3-2。从穿越平台次数来看，模型组1.88±0.73次，明显低于其他各组，差异有统计学意义(*P*＜0.05)；细胞移植组NGF诱导细胞移植组为3.33±0.58次，BDNF诱导组为4.25±1.71次，联合诱导组为5.33±1.15次，联合组和单因子组相比，差异有统计学意义(*P*＜0.05)，如表3-2。

57



图3-1 各组动物定位航行实验中的逃避潜伏期

Fig. 3-1 Escape latency animals in hidden platform experiment in different groups

随着训练时间的推移，各组动物的逃避潜伏期呈下降趋势，假手术组和细胞移植各组比AD

模型组时间更短，联合组比NGF组或BDNF组下降更为明显。



图3-2 各组动物空间搜索实验中的运动轨迹

Fig. 3-2 Motion trailanimals in spatial probe in different groups

和假手术组相比，模型组的运动轨迹明显不同，动物多沿边缘作圆形或椭圆形运动，细胞移植后，动物不规则运动，运动轨迹多在水迷宫中间区域，穿越平台次数明显变多。

58

表 3-2 空间搜索实验在不同组间的比较 ( *x*  *s* ) Table 3-2 Spatial probe in different groups ( *x*  *s* )

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Groups | 第一象限时间(s) | 平均速度(cm/s) | 穿越次数 |
| Sham | 18.74±0.60 | 28.55±1.33 | 4.88±1.51 |
| AD model | 16.26±1.05\* | 23.98±0.86\* | 1.88±0.73 \* |
| NGF | 18.16±3.51 | 28.78±0.47 | 3.33±0.58 \*#@ |
| BDNF | 18.42±1.16 # | 25.51±2.19 | 4.25±1.71 # |
| Combination | 19.00±2.41 # | 26.80±2.97 | 5.33±1.15 # |

\**P*＜0.05 versus sham, #*P*＜0.05 versus AD model and @*P*＜0.05 versus combination.

### **2.2** 胆碱能神经元在不同组间的差别

p75NGFR染色结果见图3-3，阳性细胞计数结果见表3-3。结果显示，假手术组和细胞移植组的内侧隔核(medial septum, MS)和斜角带垂直支(vertical diagonal band, VDB)的p75NGFR阳性细胞即胆碱能神经元分布范围广，左右两边的细胞数大致相等，各组在不同部位的胆碱能神经元数量见表3-3. AD模型组MS和VDB的p75NGFR阳性神经元大量减少，分别减少到假手术组的36.32％和36.30％，差异均有统计学意义(*P*＜0.05)，模型组阳性细胞染色变浅，突起变短或消失。细胞移植组的联合组

MS和VDB的p75NGFR元分别恢复到假手术组的97.01%和98.16%，差异无统计学意义，与模型组相比差异有统计学意义(*P*＜0.05)。NGF组和BDNF组较联合组恢复得较少，差异有统计学意义(*P*＜0.05)；但较模型组多，差异有统计学意义(*P*＜0.05)。表3-3 各组MS及VDB区p75NGFR阳性神经元数量比较( *x**s* )

Table 3-3 Number of p75NGFR-positive cells in MS and VDB in different groups ( *x**s* )

| Groups | MS | 百分比(%) | VDB | 百分比(%) |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Sham | 67.00±7.94 |  | 97.80±3.49 |  |
| AD model | 24.33±2.08\* | 36.32 | 35.50±3.70\* | 36.30 |
| NGF | 51.33±2.52#@ | 76.62 | 82.67±8.62 #@ | 84.53 |
| BDNF | 50.67±4.04 #@ | 75.62 | 86.33±5.51 # | 88.28 |
| Combination | 65.00±7.07 # | 97.01 | 96.00±6.20 # | 98.16 |

\**P*＜0.05 versus sham, #*P*＜0.05 versus AD model and @*P*＜0.05 versus combination.

59



图3-3 各组基底前脑p75NGFR阳性细胞的染色

60

Fig. 3-3 IHC of p75NGFR-positive cells in basal forebrain in different groups

假手术组大鼠的MS和VDB的p75NGFR阳性神经元分布范围广，细胞密集，树突较多，染色较深，模型组细胞变少，树突消失或变短，染色较浅。细胞移植各组的细胞变多，突起恢复，胞体饱满，染色变深。

### **2.3** 突触素染色在不同组间的差别

突触素染色结果见表3-4和图3-4。海马切片突触素的切片：每只老鼠脑组织取

4张切片，每张切片在高倍镜(10×40)的CA1和齿状回随机选取3个视野，进行光密度(optical density, OD)测定，同时测定相应每张片胼胝体OD值作背景，视野OD减去背景OD得到校正OD，即突触素免疫反应物的实际密度。

结果显示，AD模型组与假手术组相比，CA1和齿状回突触素颗粒，经OD测定结果显示分别减少到36.25%和40.42%，差异有统计学意义(*P*＜0.05)。联合移植组OD分别恢复到假手术组的的92.45%和89.35%，与模型组OD相比差异有统计学意义(*P*＜0.05)。联合组较NGF或BDNF的OD更高，且差异有统计学意义（*P*＜

0.05)。

表 3-4 各组海马 CA1 区和齿状回 OD 值比较( *x*  *s* )

Table 3-4 OD values in hippocampal CA1 and dentate gyrus in different groups ( *x*  *s* )

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Groups | CA1 | 百分比(%) | 齿状回 | 百分比(%) |
| Sham | 0.402±0.007 |  | 0.437±0.010 |  |
| AD model | 0.146±0.007\* | 36.25 | 0.177±0.017\* | 40.42 |
| NGF | 0.288±0.006\* #@ | 71.57 | 0.302±0.004\* #@ | 69.34 |
| BDNF | 0.339±0.011\* #@ | 84.26 | 0.350±0.005\* #@ | 80.21 |
| Combination | 0.372±0.013\* # | 92.45 | 0.390±0.025\* # | 89.35 |

\**P*＜0.05 versus sham, #*P*＜0.05 versus AD model and @*P*＜0.05 versus combination.

61



图3-4 各组海马突触素染色体

62

Fig. 3-4 IHC of synaptophysin in hippocampus in different groups

海马突触素免疫反应产物呈现颗粒状或点状。假手术组海马着色较深，模型组染色变浅，细胞移植各组的突触素染色比模型组变深。

### **2.4** **AChE**染色在不同组间的差别

显微镜下随机选取30个视野(10×40倍)图片，使用IPP图像分析软件，划5×5格子，计算纤维与格子每边的交点，即为AchE阳性纤维数。AChE计数结果见表3-5，染色结果见图3-5。模型组的CA1和齿状回AChE阳性纤维均大为减少，CA1和齿状回纤维密度分别减少到假手术组的35.41%和37.81%，均P<0.01。细胞移植组中的联合组与模型组比较，纤维有明显增多，差异有统计学意义（*P*＜0.05），恢复到假手术组的95.41%和95.18%，联合组比NGF组或BDNF组的纤维要多，差异有统计学意义（*P*＜0.05）。

表 3-5 各组海马 CA1 区和齿状回 AChE 计数比较 ( *x*  *s* )

Table 3-5 Number of AChE-positive fiber in hippocampal CA1 and dentate gyrus in different groups ( *x*  *s* )

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Groups | CA1 | 百分比(%) | 齿状回 | 百分比(%) |
| Sham | 203.33±1.53 |  | 228.33±3.21 |  |
| AD model | 71.67±3.51\* | 35.41 | 86.33±6.11 \* | 37.81 |
| NGF | 177.67±2.52\*#@ | 87.38 | 200.33±5.51\*#@ | 87.73 |
| BDNF | 188.00±4.36\*# | 92.46 | 210.67±5.51\*# | 92.41 |
| Combination | 194.00±4.32\*# | 95.41 | 217.33±5.51\*# | 95.18 |

\**P*＜0.05 versus sham, #*P*＜0.05 versus AD model and @*P*＜0.05 versus combination.

63



图3-5 各组海马AChE纤维染色

64

Fig. 3-5 AChE in hippocampus in different groups

和假手术组相比，模型组的AChE阳性纤维明显变少，细胞移植后AChE阳性纤维变多。

## **3.** 讨论

### **3.1** **192-IgG-saporin**致**AD**模型的建立

基底前脑的胆碱能神经元及其投身到海马、新皮质、杏仁核和嗅球的突起，与学习记忆和认知能力有非常密切的关系，阻断或损坏这一投射系统任一环节都可导致动物认知障碍和学习记忆损害。基底前脑胆碱能神经元的丢失是AD患者的重要病理学改变之一，其数量丢失的程度和患者的认知能力密切相关[103]，因此建立了各种损伤基底前脑的胆碱能神经元模型对研究AD有非常重要的意义。免疫毒素192-IgG-saporin是由p75受体的单克隆抗体与saporin（可使核糖体失活）结合而成，192-IgG-saporin脑内注射后与细胞膜上的p75蛋白结合（在基底前脑，只有胆碱能神经元可表达p75），进入胞浆后，saporin脱离192-IgG并作用于核糖体，使其大亚基失去活性，阻止蛋白质合成，导致细胞死亡。本实验课题组早已研究证明采用免疫毒素192-IgG-saporin建立胆碱能系统损伤AD模型，可以导致基底前脑胆碱能神经元细胞死亡，海马突触素密度下降，海马AChE纤维丢失以及Y迷宫行为学的学习记忆能力，发现和正常组或生理盐水组相比明显下降[83, 91]，甚至会使大脑皮层BDNF的浓度下降[104]。我们的实验再次证明了这些变化。水迷宫行为学的测试结果表明，

AD模型鼠的学习记忆能力明显下降，IHC形态学结果显示，基底前脑p75阳性细胞明显变少，海马突触素密度下降，AChE纤维数量减少，说明我们成功建立了192-IgG-saporin致AD模型。

### **3.2** **NSC**对**AD**模型鼠的影响

成年鼠脑内SVZ和SGZ区的NSC或神经前体细胞可以感知内在微环境的变化，分泌多种神经递质，神经递质在调控神经再生中发挥重要作用[105]。但这种神经修复在大面积或较严重的脑损伤中，并不能直到真正的作用，不能恢复神经系统的功能，因此NSC 移植治疗中枢神经系统疾病中成为非常有前景的方案。NSC 移植到

APP/PS1双转基因致AD模型鼠后，可以明显提高模型鼠的认知能力[12]，移植的NSC还可以分泌多种因子，帮助提高模型鼠的认知能力[37]。本实验室研究表明，将NSC移植到192-IgG-saporin致AD模型鼠基底前脑，可以明显补充基底前脑胆碱能神经

65

元的数量，促进海马突触生成和AChE纤维生长[11, 89]。但是移植后NSC对AD模型鼠的学习记忆能力恢复尚显不足，有待进一步优化我们的方案。

### **3.3** **NGF**和**BDNF**联合**NSC**对**AD**模型鼠的影响

研究表明，BDNF和NGF对NSC有保护作用。BDNF作用于特定的神经元，支持其存活，并能促进新生神经元或突触的生长和分化。BDNF基因修饰的NSC移植到大鼠脑组织，其存活数量和迁移能力都得到提高[38]。用BDNF预处理NSC后再用于移植，细胞在脑组织的存活数量，神经元类型和迁移能力都更好[90]。将BDNF和NSC一起注射到海马伞切断后的AD模型鼠侧脑室，结果发现BDNF可以增强

NSC的作用，补充神经元数量，恢复学习记忆能力[40]。用表达NGF的重组载体转染大鼠胚胎中脑NSC，结果表明重组后的NGF可以促进NSC的增殖，同时观察到

NGF使NSC分化的作用[46]。NGF基因修饰的NSC移植到大鼠脑组织可以促进NSC表达p75NGFR受体和TrkA受体[106]。NGF和BDNF联合NSC比单独使用NSC有更好的效果，因此，我们结合本实验室的研究方向和目的，在成功建立192-IgG-saporin致AD模型的基础上，进行细胞移植治疗。用于移植的细胞是混合型细胞，先用NGF或BDNF以及两个因子联合诱导NSC，诱导分化3 d后，再将其移植到受损侧基底前脑。不同因子或因子组合诱导3 d后的混合细胞进行移植，水迷宫结果显示，和

AD模型组动物相比，细胞移植组动物学习记忆能力明显提高，联合组更为明显，逃避潜伏期时间比单因子组要短，说明联合诱导后的混合细胞更有利于恢复模型动物的学习记忆能力。动物的学习记忆能力和基底前脑的胆碱能神经元数量[107]及海马突触连接、AChE纤维的长度[108]都有非常密切的关系。我们的研究结果表明，细胞移植后，基底前脑的胆碱能神经元数量得到明显补充，海马突触素密度明显提高，海马AChE纤维长度明显提高，联合组效果比单因子诱导组更好。NGF和BDNF对NSC都有非常明显的诱导保护作用，我们的结果说明，联合应用NGF和BDNF时，其对NSC的叠加作用会影响到移植到体内后的分化结果。另外，我们的结果显示，细胞移植后胆碱能神经元数量得到补充、海马突触密度增加，AChE纤维得到生长，这三者同动物的学习记忆能力呈正相关联系，也进一步证明了这三者在学习记忆中的重要作用。

目前文献报道治疗神经系统疾病的细胞移植多直接受用NSC，但脑内的微环境非常复，移植后的NSC受其所在微环境的影响，分化命运多样，难以控制其方向。

66

提前用因子诱导NSC后，可以在一定程度上控制其分化命运，得到更多的神经元，这样一个混合的细胞群体再进行移植，更有利于向着所期望的神经元方向分化。

## **4** 结论

用NGF或（和）BDNF先诱导NSC，将诱导3 d的混合细胞于移植到受损动物的基底前脑，可明显改善动物的学习记忆能力，基底前脑的胆碱能神经元数量得到补充，海马突触素密度和AChE纤维都得到提高，其中联合组较单因子诱导组的效果更为明显，进一步证明联合诱导NSC分化是一种更好的培养方案。前一部分我们讨论过，联合组较NGF组或BDNF都是一种更好的诱导方案，涉及到ERK磷酸化，

MASH1, NGN1和NeuroD基因表达的提高，这一部分的结果从动物行为学和组织形态学方面进一步证明了联合诱导是一种更好的方案。

67

# 全文总结和展望

1. 本文第一部分首先建立了神经球悬浮培养转化为单层贴壁培养的体外培养方案，结果表明，将NSC先悬浮培养到P2代的神经球，再转化成单层贴壁培养，不但可以使NSC在体外得到很好的增殖，还更利于NSC向神经元方向分化，同时单层贴壁的细胞便于直接的检测和研究，以保证得到更科学更准确的数据。

2. 第二部分在单层贴壁培养NSC的基础上，比较了单独应用NGF或BDNF和联合应用时对NSC分化影响的不同，并初步探讨了NSC的分化机制。结果表明NGF和BDNF 联合应用比单独应用时可以诱导更多的NSC 分化为神经元，p-ERK，

MASH1和NeuroD的水平在各组间的变化差异与神经元分化比例有着正相关的联系，这些结果都表明联合应用NGF和BDNF可以提高对NSC分化为神经元的影响，这为我们下一步的在体实验提供了理论依据和实验基础。

3. 第三部分，在本实验室已经成功构建神经免疫毒素192-IgG-saporin致阿尔茨海默病动物模型的基础上，我们先用NGF或（和）BDNF体外诱导NSC分化3 d，再将不同方案诱导3 d的混合细胞移植到模型鼠的基底前脑，结果表明细胞移植后可以明显提高受损动物的学习记忆能力，补充胆碱能神经元数量，提高海马突触素和

AChE纤维数量，联合组比单因子诱导的效果更明显，进一步证明了联合应用NGF和BDNF是一种更好的诱导NSC分化的方案，NGF和BDNF对NSC可能存在叠加作用。

尽管脑内移植NSC在动物实验中已经取得一些令人鼓舞的进展，但其到真正应用于临床治疗还有很多问题，如移植细胞的长期存活，NSC的定向分化及迁移等。随着医学科技的发展，NSC作为细胞移植替代疗法在临床上的应用一将会成为现实。

68

参考文献

[1] Soininen H, Partanen J, Jousmaki V, et al. Age-related cognitive decline and electroencephalogram slowing in Down's syndrome as a model of Alzheimer's disease. Neuroscience, 1993, 53(1): 57-63.

[2] Robbins TW. Alzheimer's disease. Arresting memory decline. Nature, 1988, 336(6196): 207-8.

[3] Tanigawa T, Takechi H, Arai H, et al. Effect of physical activity on memory function in older adults with mild Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. Geriatr Gerontol Int, 2014: in press.

[4] Carman AJ, Dacks PA, Lane RF, et al. Current evidence for the use of coffee and caffeine to prevent age-related cognitive decline and Alzheimer's disease. J Nutr Health Aging, 2014, 18(4): 383-92.

[5] Hibbard LS and McKeel DW, Jr. Multiscale detection and analysis of the senile plaques of Alzheimer's disease. IEEE Trans Biomed Eng, 1995, 42(12): 1218-25.

[6] Rodriguez JJ, Noristani HN, Hilditch T, et al. Increased densities of resting and activated microglia in the dentate gyrus follow senile plaque formation in the CA1 subfield of the hippocampus in the triple transgenic model of Alzheimer's disease. Neurosci Lett, 2013, 552: 129-34.

[7] Brion JP, Couck AM, Passareiro E, et al. Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. J Submicrosc Cytol, 1985, 17(1): 89-96.

[8] Castillo-Carranza DL, Sengupta U, Guerrero-Munoz MJ, et al. Passive Immunization with Tau Oligomer Monoclonal Antibody Reverses Tauopathy Phenotypes without Affecting Hyperphosphorylated Neurofibrillary Tangles. J Neurosci, 2014, 34(12): 4260-72.

[9] Mann DM and Yates PO. Is the loss of cerebral cortical choline acetyl transferase activity in Alzheimer's disease due to degeneration of ascending cholinergic nerve cells. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1982, 45(10): 936.

[10] Burke RM, Norman TA, Haydar TF, et al. BMP9 ameliorates amyloidosis and the cholinergic defect in a mouse model of Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(48): 19567-72.

[11] 潘学兵, 龙大宏, 罗秀梅, et al. 神经干细胞移植对192-IgG-saporin阿尔茨海默病模型鼠基底前脑神经元p75NGFR阳性神经元和行为学的影响. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(45)： 8426-30.

69

[12] Zhang W, Wang PJ, Sha HY, et al. Neural Stem Cell Transplants Improve Cognitive Function Without Altering Amyloid Pathology in an APP/PS1 Double Transgenic Model of Alzheimer's Disease. Mol Neurobiol, 2014: in press.

[13] Gage FH and Temple S. Neural stem cells: generating and regenerating the brain. Neuron, 2013, 80(3): 588-601.

[14] Christie KJ, Emery B, Denham M, et al. Transcriptional regulation and specification of neural stem cells. Adv Exp Med Biol, 2013, 786: 129-55.

[15] Iscru E, Ahmed T, Coremans V, et al. Loss of survivin in neural precursor cells results in impaired long-term potentiation in the dentate gyrus and CA1-region. Neuroscience, 2013, 231: 413-9

[16] Reynolds BA and Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. Science, 1992, 255(5052): 1707-10.

[17] Palmer TD, Takahashi J and Gage FH. The Adult Rat Hippocampus Contains Primordial Neural Stem Cells. Mol Cell Neurosci, 1997, 8(6): 389-404.

[18] Paspala SA, Murthy TV, Mahaboob VS, et al. Pluripotent stem cells - a review of the current status in neural regeneration. Neurol India, 2011, 59(4): 558-65.

[19] Sakaguchi M and Okano H. Neural stem cells, adult neurogenesis, and galectin-1: from bench to bedside. Dev Neurobiol, 2012, 72(7): 1059-67.

[20] Song J, Christian KM, Ming GL, et al. Modification of hippocampal circuitry by adult neurogenesis. Dev Neurobiol, 2012, 72(7): 1032-43.

[21] Hattiangady B and Shetty AK. Neural stem cell grafting counteracts hippocampal injury-mediated impairments in mood, memory, and neurogenesis. Stem Cells Transl Med, 2012, 1(9): 696-708.

[22] Martinez-Morales PL, Revilla A, Ocana I, et al. Progress in Stem Cell Therapy for Major Human Neurological Disorders. Stem Cell Rev, 2013, 9(5): 685-99.

[23] Moghadam FH, Alaie H, Karbalaie K, et al. Transplantation of primed or unprimed mouse embryonic stem cell-derived neural precursor cells improves cognitive function in Alzheimerian rats. Differentiation, 2009, 78: 59-68.

[24] Feng Z and Gao F. Stem cell challenges in the treatment of neurodegenerative disease. CNS Neurosci Ther, 2012, 18(2): 142-8.

70

[25] Aihara Y, Hayashi Y, Hirata M, et al. Induction of neural crest cells from mouse embryonic stem cells in a serum-free monolayer culture. Int J Dev Biol, 2010, 54: 1287-94.

[26] Nieto-Estévez V, Pignatelli J, Araúzo -Bravo MJ, et al. A global transcriptome analysis reveals molecular hallmarks of neural stem cell death, survival, and differentiation in response to partial FGF-2 and EGF deprivation. PLoS One, 2013, 8(1): e53594.

[27] Reynolds BA and Rietze RL. Neural stem cells and neurospheres--re-evaluating the relationship.

Nat Methods, 2005, 2(5): 333-6.

[28] Singec I, Knoth R, Meyer RP, et al. Defining the actual sensitivity and specificity of the neurosphere assay in stem cell biology. Nat Methods, 2006, 3(10): 801-6.

[29] Babu H, Claasen JH, Kannan S, et al. A protocol for isolation and enriched monolayer cultivation of neural precursor cells from mouse dentate gyrus. Front Neurosci, 2011, 5: 89.

[30] Theus MH, Ricard J and Liebl DJ. Reproducible expansion and characterization of mouse neural stem/progenitor cells in adherent cultures derived from the adult subventricular zone. Curr Protoc Stem Cell Biol, 2012, Chapter 2: Unit 2D.8.

[31] Panman L, Andersson E, Alekseenko Z, et al. Transcription factor-induced lineage selection of stem-cell-derived neural progenitor cells. Cell Stem Cell, 2011, 8(6): 663-75.

[32] Ma J, Zhang Z, Su Y, et al. Magnetic stimulation modulates structural synaptic plasticity and regulates BDNF-TrkB signal pathway in cultured hippocampal neurons. Neurochem Int, 2013, 62(1): 84-91.

[33] Revest JM, Le Roux A, Roullot-Lacarriere V, et al. BDNF-TrkB signaling through Erk1/2 phosphorylation mediates the enhancement of fear memory induced by glucocorticoids. Mol Psychiatry, 2013: in press.

[34] Jeon SJ, Rhee SY, Seo JE, et al. Oroxylin A increases BDNF production by activation of MAPK-CREB pathway in rat primary cortical neuronal culture. Neurosci Res, 2011, 69(3): 214-22.

[35]扎拉嘎胡， 敏张， 莉陈，et al. BDNF对大鼠胚胎神经干细胞诱导分化的影响. 武警医学院

学报, 2008, 17(1): 1-4.

[36] Islam O, Loo TX and Heese K. 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. Current Neurovascular Research, 2009, 6: 42-53.

71

[37] Blurton-Jones M, Kitazawa M, Martinez-Coria H, et al. Neural stem cells improve cognition via BDNF in a transgenic model of Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(32): 13594-9.

[38] Ma HY, Yu B, Kong L, et al. Neural stem cells over-expressing brain-derived neurotrophic factor (BDNF) stimulate synaptic protein expression and promote functional recovery following transplantation in rat model of traumatic brain injury. Neurochem Res, 2012, 37(1): 69-83.

[39] Chen BY, Wang X, Wang ZY, et al. Brain-derived neurotrophic factor stimulates proliferation and differentiation of neural stem cells, possibly by triggering the Wnt/beta-catenin signaling pathway. J Neurosci Res, 2013, 91(1): 30-41.

[40] Xuan AG, Long DH, Gu HG, et al. BDNF improves the effects of neural stem cells on the rat model of Alzheimer's disease with unilateral lesion of fimbria-fornix. Neurosci Lett, 2008, 440(3): 331-5.

[41] Allen SJ, Watson JJ, Shoemark DK, et al. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. Pharmacol Ther, 2013, 138(2): 155-75.

[42] Linher-Melville K and Li J. The roles of glial cell line-derived neurotrophic factor, brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor during the final stage of folliculogenesis: a focus on oocyte maturation. Reproduction, 2013, 145(2): 43-54.

[43] Freed WJ. The role of nerve-growth factor (NGF) in the central nervous system. Brain Res Bull, 1976, 1(4): 393-412.

[44] Madduri S, Papaloizos M and Gander B. Synergistic effect of GDNF and NGF on axonal branching and elongation in vitro. Neurosci Res, 2009, 65(1): 88-97.

[45] Chittka A. Differential regulation of SC1/PRDM4 and PRMT5 mediated protein arginine methylation by the nerve growth factor and the epidermal growth factor in PC12 cells. Neurosci Lett, 2013, 550: 87-92.

[46] Lin MH, Yang L, Fu R, et al. Cloning of the eukaryotic expression vector with nerve growth factor in rats and its effects on proliferation and differentiation of mesencephal neural stem cells of fetal rats. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2008, 28(5): 513-6.

[47] Gu H, Long D, Song C, et al. Recombinant human NGF-loaded microspheres promote survival of basal forebrain cholinergic neurons and improve memory impairments of spatial learning in the rat model of Alzheimer's disease with fimbria-fornix lesion. Neurosci Lett, 2009, 453(3): 204-9.

72

[48] Noh H and Seo H. Age-dependent effects of valproic acid in Alzheimer's disease (AD) mice are associated with nerve growth factor (NGF) regulation. Neuroscience, 2014, 266C: 255-65.

[49] Lapchak PA. Therapeutic potential for nerve growth factor in Alzheimer's disease: insights from pharmacological studies using lesioned central cholinergic neurons. Rev Neurosci, 1992, 3(2): 109-20

[50] Benoit BO, Savarese T, Joly M, et al. Neurotrophin Channeling of Neural Progenitor Cell Differentiation. J Neurobiol, 2001, 46(4): 265-80.

[51] Lamballe F, Klein R and Barbacid M. trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. Cell, 1991, 66(5): 967-79.

[52] Loeb DM, Maragos J, Martin-Zanca D, et al. The trk proto-oncogene rescues NGF responsiveness in mutant NGF-nonresponsive PC12 cell lines. Cell, 1991, 66(5): 961-6.

[53] Klein R, Nanduri V, Jing SA, et al. The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. Cell, 1991, 66(2): 395-403.

[54] Kumamaru E, Numakawa T, Adachi N, et al. Glucocorticoid suppresses BDNF-stimulated MAPK/ERK pathway via inhibiting interaction of Shp2 with TrkB. FEBS Lett, 2011, 585(20): 3224-8.

[55] Wuhanqimuge, Itakura A, Matsuki Y, et al. Lysophosphatidylcholine enhances NGF-induced MAPK and Akt signals through the extracellular domain of TrkA in PC12 cells. FEBS Open Bio, 2013, 3: 243-51.

[56] Huang EJ and Reichardt LF. Trk receptors roles in neuronal signal transduction. Annu. Rev.

Biochem., 2003, 72: 609-42.

[57] Segal RA. Selectivity in neurotrophin signaling: theme and variations. Annu. Rev. Neurosci., 2003, 26: 299-330.

[58] Nguyen N, Lee SB, Lee YS, et al. Neuroprotection by NGF and BDNF against neurotoxin-exerted apoptotic death in neural stem cells are mediated through Trk receptors, activating PI3-kinase and MAPK pathways. Neurochem Res, 2009, 34(5): 942-51.

[59] Sanes DH, Thomas AR and Harris WA. Naturally-occurring neuron death. Development of the Nervous System, 2011, Third Edition. Boston: Academic Press.: pp. 171-208.

[60] Purcell AL, Sharma SK, Bagnall MW, et al. Activation of a tyrosine kinase-MAPK cascade enhances the induction of long-term synaptic facilitation and long-term memory in Aplysia. Neuron., 2003, 37(4): 473-84.

73

[61] Nakazawa T, Tamai M and Mori1 N. Brain-derived neurotrophic factor prevents axotomized retinal ganglion cell death through MAPK and PI3K signaling pathways. Invest Ophthalmol Vis Sci., 2002, 43(10): 3319-26.

[62] Zhang YW, Chen Y, Liu Y, et al. APP regulates NGF receptor trafficking and NGF-mediated neuronal differentiation and survival. PLoS One, 2013, 8(11): e80571.

[63] Hong J, Qian T, Le Q, et al. NGF promotes cell cycle progression by regulating D-type cyclins via PI3K\_Akt and MAPK\_Erk activation in human corneal epithelial cells. Molecular Vision, 2012, 18: 758-64.

[64] McKelvey L, Gutierrez H, Nocentini G, et al. The intracellular portion of GITR enhances NGF-promoted neurite growth through an inverse modulation of Erk and NF-kappaB signalling. Biol Open, 2012, 1(10): 1016-23.

[65] Ahmed S, Gan HT, Lam CS, et al. Transcription factors and neural stem cell self-renewal, growth and differentiation. Cell Adhesion & Migration, 2009, 3(4): 412-24.

[66] Kageyama R, Ohtsuka T, Hatakeyama J, et al. Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation. Exp Cell Res, 2005, 306(2): 343-8.

[67] Zhang CQ, Zhang ZY, Shu HF, et al. The modulatory effects of bHLH transcription factors with the Wnt/beta-catenin pathway on differentiation of neural progenitor cells derived from neonatal mouse anterior subventricular zone. Brain Res, 2010, 1315: 1-10.

[68] Kabos P, Kabosova A and Neuman T. Blocking HES1 expression initiates GABAergic differentiation and induces the expression of p21(CIP1/WAF1) in human neural stem cells. J Biol Chem, 2002, 277(11): 8763-6.

[69] Aguirre A, Rubio ME and Gallo V. Notch and EGFR pathway interaction regulates neural stem cell number and self-renewal. Nature, 2010, 467(7313): 323-7.

[70] Chen H, Thiagalingam A, Chopra H, et al. Conservation of the Drosophila lateral inhibition pathway in human lung cancer: A hairy-related protein (HES-1) directly represses achaete-scute homolog-1 expression. Medical Sciences, 1997, 94: 5355-60.

[71] Sasai Y, Kageyama R, Tagawa Y, et al. Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to Drosophila hairy and Enhancer of split. Genes & Development, 1992, 6(12b): 2620-34.

[72] Krolewski RC, Packard A, Jang W, et al. Ascl1 (Mash1) knockout perturbs differentiation of nonneuronal cells in olfactory epithelium. PLoS One, 2012, 7(12): e51737.

74

[73] Kim EJ, Ables JL, Dickel LK, et al. Ascl1 (Mash1) Defines Cells with Long-Term Neurogenic Potential in Subgranular and Subventricular Zones in Adult Mouse Brain. PLoS One, 2011, 6(3): e18472.

[74] Flasse LC, Pirson JL, Stern DG, et al. Ascl1b and Neurod1, instead of Neurog3, control pancreatic endocrine cell fate in zebrafish. BMC Biology, 2013, 11: 78.

[75] Cau E, Gradwohl G, Fode C, et al. Mash1 activates a cascade of bHLH regulators in olfactory neuron progenitors. Development, 1997, 124(8): 1611-21.

[76] Seo S, Lim JW, Yellajoshyula D, et al. Neurogenin and NeuroD direct transcriptional targets and their regulatory enhancers. The EMBO Journal, 2007, 26(24): 5093-108.

[77] Velkey JM and O'Shea KS. Expression of Neurogenin 1 in mouse embryonic stem cells directs the differentiation of neuronal precursors and identifies unique patterns of down-stream gene expression. Dev Dyn, 2013, 242(3): 230-53.

[78] Lundell TG, Zhou Q and Doughty ML. Neurogenin1 expression in cell lineages of the cerebellar cortex in embryonic and postnatal mice. Dev Dyn, 2009, 238(12): 3310-25.

[79] Kim WY. NeuroD regulates neuronal migration. Mol Cells, 2013, 35(5): 444-9.

[80] Ito H, Nakajima A, Nomoto H, et al. Neurotrophins facilitate neuronal differentiation of cultured neural stem cells via induction of mRNA expression of basic helix-loop-helix transcription factors Mash1 and Math1. J Neurosci Res, 2003, 71: 648-58.

[81] Cundiff P, Liu L, Wang Y, et al. ERK5 MAP kinase regulates neurogenin1 during cortical neurogenesis. PLoS One, 2009, 4(4): e5204.

[82] Duan L, Bhattacharyya BJ, Belmadani A, et al. Stem cell derived basal forebrain cholinergic neurons from Alzheimer's disease patients are more susceptible to cell death. Mol Neurodegener, 2014, 9(3): in press.

[83]贺小松， 龙大宏， 许孟杰, et al. Aβ(1-40)及192-IgG-saporin联合作用对大鼠学习记忆以及海

马区锥体细胞和胆碱能纤维的影响. 解剖学研究, 2009, 31(6)：406-9.

[84] LeBlanc CJ, Deacon TW, Whatley BR, et al. Morris water maze analysis of 192-IgG-saporin-lesioned rats and porcine cholinergic transplants to the hippocampus. Cell Transplantation, 1999, 8: 131-42.

[85]罗秀梅， 龙大宏， 潘学兵, et al. 侧脑室注射192-IgG-saporin 致痴呆动物模型的实验研究.

神经解剖学杂志, 2006, 22(6): 629-33.

75

[86] Lehmann O, Jeltsch Hln, Lazarus C, et al. Combined 192 IgG-saporin and 5,7-dihydroxytryptamine lesions in the male rat brain: A neurochemical and behavioral study. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 2002, 72: 899-912.

[87] Yuan T, Liao W, Feng NH, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived neural stem cells survive, migrate, differentiate, and improve neurological function in a rat model of middle cerebral artery occlusion. Stem Cell Res Ther, 2013, 4(3): 73.

[88]潘学兵， 龙大宏， 罗秀梅，et al. 神经干细胞移植对192-IgG-saporin老年性痴呆模型鼠的学

习记忆及海马胆碱能纤维的影响. 解剖学研究, 2007, 29(4)：243-6.

[89] Xuan AG, Luo M, Ji WD, et al. Effects of engrafted neural stem cells in Alzheimer's disease rats.

Neurosci Lett, 2009, 450(2): 167-71.

[90] Rosenblum S, Smith TN, Wang N, et al. BDNF Pre-treatment of Human Embryonic-Derived Neural Stem Cells Improves Cell Survival and Functional Recovery after Transplantation in Hypoxic-Ischemic Stroke. Cell Transplant, 2014: in press.

[91]潘学兵， 龙大宏， 罗秀梅，et al. 免疫毒素192\_IgG\_saporin侧脑室注射建立阿尔茨海默病动

物模型的实验研究. 解剖学研究, 2006, 28(1): 3-7.

[92]丁道芳，邢三丽，周鸣鸣，et al. 大鼠胚胎神经干细胞单克隆化及单层化培养和鉴定. 生物化学与生物物理进展, 2009, 36(1)：72-6.

[93] Choi KC, Yoo DS, Cho KS, et al. Effect of single growth factor and growth factor combinations on differentiation of neural stem cells. J Korean Neurosurg, 2005, 44: 375-81.

[94] Yuan J, Huang GR, Xiao Z, et al. Overexpression of beta-NGF promotes differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into neurons through regulation of AKT and MAPK pathway. Mol Cell Biochem, 2013, 383(1-2): 201-11.

[95] Jr MGH, Shen S, Wiemelt AP, et al. Cyclic AMP elevation is sufficient to promote the survival of spinal. Journal of Neuroscience, 1998, 18(18): 7361-71.

[96] Ortega JA and Alcantara S. BDNF/MAPK/ERK-induced BMP7 expression in the developing cerebral cortex induces premature radial glia differentiation and impairs neuronal migration. Cereb Cortex, 2010, 20(9): 2132-44.

[97] Lim JY, Park SI, Oh JH, et al. Brain-derived neurotrophic factor stimulates the neural differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells and survival of

76

Differentiated cells through MAPK/ERK and PI3K/Akt-dependent signaling pathways. J Neurosci Res, 2008, 86(10): 2168-78.

[98] Van Kanegan MJ and Strack S. The protein phosphatase 2A regulatory subunits B'beta and B'delta mediate sustained TrkA neurotrophin receptor autophosphorylation and neuronal differentiation. Mol Cell Biol, 2009, 29(3): 662-74.

[99]苏肖英， 汪海涛， 孟茜， et al. 神经生长因子诱导神经干细胞分化的作用机制探讨. 广东医

学, 2012, 33(1): 44-8.

[100] Wang Z, Sugano E, Isago H, et al. Notch signaling pathway regulates proliferation and differentiation of immortalized Muller cells under hypoxic conditions in vitro. Neuroscience, 2012, 214: 171-80.

[101] Cardozo AJ, Gomez DE and Argibay PF. Neurogenic differentiation of human adipose-derived stem cells: relevance of different signaling molecules, transcription factors, and key marker genes. Gene, 2012, 511(2): 427-36.

[102] Tavares I. Human neural stem cell transplantation in spinal cord injury models: how far from clinical applicationStemCellResTher, 2013, 4(3): 61.

[103] Mukhin VN. The role of the basal forebrain cholinergic dysfunction in pathogenesis of declarative memory disorder in Alzheimer's disease. Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova, 2013, 99(6): 674-81.

[104] Angelucci F, Gelfo F, De Bartolo P, et al. BDNF concentrations are decreased in serum and parietal cortex in immunotoxin 192 IgG-Saporin rat model of cholinergic degeneration. Neurochem Int, 2011, 59(1): 1-4.

[105] Madhavan L and Collier TJ. A synergistic approach for neural repair: cell transplantation and induction of endogenous precursor cell activity. Neuropharmacology, 2010, 58(6): 835-44.

[106] Pagani L, Cenciarelli C, Casalbore P, et al. Identification and early characterization of genetically modified NGF-producing neural stem cells grafted into the injured adult rat brain. Neurol Res, 2008, 30(3): 244-50.

[107] Lee YS, Danandeh A, Baratta J, et al. Neurotrophic factors rescue basal forebrain cholinergic neurons and improve performance on a spatial learning test. Exp Neurol, 2013, 249: 178-86.

77

[108] McIntire LB, Berman DE, Myaeng J, et al. Reduction of synaptojanin 1 ameliorates synaptic and behavioral impairments in a mouse model of Alzheimer's disease. J Neurosci, 2012, 32(44): 15271-6.

78

# 综述

**神经干细胞在神经退行性疾病中的治疗潜能**

研究生：刘菲菲导师：龙大宏

**简介**

神经干细胞(neural stem cell, NSC)只要保持未分化状态，就具有多分化潜能、组织融合性，是一类能够自我更新的神经祖细胞。NSC在适当的条件下，可以生成神经元，星形胶质细胞和少突胶质细胞。NSC存在于哺乳动物胚胎和成年的中枢神经系统(central nervous system, CNS)内[1–3]，如脑室下区(subventricular, SVZ)和颗粒下层(subgranular zone, SGZ)[2–5]，神经发生的小生态是一个独特的微环境，通过旁分泌作用决定了NSCs的生存和命运[2,4]，如异型细胞-细胞接触和与特定的细胞外基质成分的相互作用[2]。未分化的NSC的特异性标记鉴定尚有争议。通常确定NSC是利用它们的自我更新能力，中枢神经系统的分化表型和神经元的电生理的出现。对处于分化或已分化细胞的一些明确的特征共识标记物包括β-tubulin III，MAP2，NeuN和GFAP。

神经退行性疾病(neurodegenerative diseases, NDs)有一个共同的机制，这个机制导致神经功能障碍，最终导致细胞死亡。目前的治疗只能针对症状，但却无法挽救重新获得细胞的功能，甚至无法阻止神经元死亡过程[6]。细胞移植用于治疗NDs有三个独立的过程，每个都可能是细胞疗法成为现实的瓶颈：（1）移植/注入细胞的存活，

（2）细胞到受伤区域的靶向性和（3）整合到宿主细胞的神经回路。移植的NSC能够迁移到特定的损伤部位[5]，因此这些细胞对不同的神经紊乱有治疗价值。通过选择不同的NDs动物模型，体内、外实验都证明了NSC的治疗潜力，如帕金森(Parkinson's, PD)[1–6]，亨廷顿舞蹈症(Huntington's)[1,3,5]，阿尔茨海默氏病（Alzheimer's diseases,

AD)[1–6]，多发性硬化症(multiple sclerosis)[2,4-6]，肌萎缩性侧索硬化症(Amyotrophic lateral sclerosis, ALS)[1-3,5,6]，实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis)[2,4-6]，脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)[3,5,6]，脑卒中(stroke)[1,3,5,6]，和创伤性脑损伤(traumatic brain injury, TBI)[1,3,5]. 在这些概念性研究基础上初步确定了NSC的治疗潜力，一些临床试验已经开始NSC治疗的安全性评价（一期）和有效性（阶段II，III），如PD，ALS，中风和慢性脊髓损伤[7]。大多数临床研究结果尚未报道；然而初步的从一些有限的研究数据表明的NSC的治疗的有效性、安全性和发

79

展趋势[8–11]。大多数这些临床研究的结果尚未报道，但是，从仅有的一些研究初步数据也可表明它的安全性和有效性。

在神经药理学机制方面，上述的有益的干细胞治疗作用是由涉及神经保护和/或神经发生的特殊过程介导的[5, 6]。一般来说，神经保护指的是通过激活生化和细胞途径拮抗神经元死亡。神经发生是内源性NSC/祖细胞的增殖过程，产生有丝分裂后期的神经元。神经发生是受控于各种分子，例如促/抗炎细胞因子（如干扰素γ、肿瘤坏死因子α、白细胞介素-1β、I白细胞介素-6有促炎作用[6, 12]，白细胞介素-4、转化生长因子β为抗炎细胞因子[2, 4]），神经递质（包括γ-氨基丁酸，多巴胺，谷氨酸，乙酰胆碱，五羟色胺，去甲肾上腺素）[5]与氧化应激有关的基团（如氧化氮）[5, 12]。通过激活不同的信号通路也可改变方向诱使神经发生，如启动MAPK, CXCR4和NF-κB[12]，这些信号通路在胚胎发育过程中通常都会存在；也会在NDs和脑损伤之后被激活。利用NSC作为外源性神经发生有一种混乱的现象，即不同实验室使用了不同的细胞群可能具有完全不同的分化潜能。它们分化成中枢神经系统的各种细胞，如上所述；或者也可能被限制，只分化为神经元[13, 14]。在另一方面，分化与未分化的细胞在神经保护能力方面无显著差异[15]。

受伤的大脑可以激活各种防御机制以修复神经元的损伤[2, 3]。这些机制包括增强神经营养因子合成和分泌（防御的第一线），以及从小胶质细胞和星形胶质细胞释放的促/抗炎分子，这些是脑实质炎症的主要介质[16]。这些初始信号诱导细胞增殖[3]并触发位于SVZ和/或SGZ的内源性NSC向损伤部位迁移调动，以协助神经保护和神经通路的长期再生[4, 5]。之后，炎性细胞从周围侵入大脑也有助于组织修复，同时提供促/抗炎细胞因子的分泌平衡[12]。神经变性过程可以促进神经发生，导致位于

SVZ和SGZ区的NSC的迁移，分化和整合成功能性神经元[3]。在轻微的损伤下，这些内源性修复和再生机制可能是足够的。然而在严重受损时，内源性机制尝试修复和恢复神经元的活动不能再提供神经保护作用[2, 5]。因此，一般情况下，单纯的内源性修复不能使其功能完全恢复[2]。通过移植NSC可能在某些情况下能缓解这个缺点。

日前用于治疗NDs有三种策略：（一）采用不同来源的干细胞，可以靶向到中枢神经系统的受伤部位，或局部移植干细胞；（二）药物干预来调节内源性NSC的增殖，迁移和分化，以提高NSC在大脑中神经发生区域有效性，比如SVZ和SGZ[3,5]，（三）通过移植外源性NSC来调节内源性NSC，以获得叠加和协同效应[5]。

80

**1治疗NDs的再生策略**

**1.1基于NSC移植的治疗方法**

由于NSC对多种NDs都有的治疗潜能，NSC移植治疗成为非常有希望的方法[1,2,4-6]。胎儿来源的NSC前体细胞可以从骨髓[1, 3, 5]，脐带血[1]以及胎脑中[4, 5]分离出来，移植的NSC如何发挥其神经保护作用的机制还尚未完全阐明，但是，几个趋势已经确立：

（一）移植NSC中的一小部分可以的增殖，迁移和分化，虽然他们的量非常小，但是在某种程度上能导致功能恢复。然而，目前尚不清楚，移植的细胞是怎样迁移到受伤部位的，虽然其迁移与脑膜及脉络丛有关，例如化学诱导剂或化学排斥剂和表达和/或分泌可以作用于干细胞的迁移[17, 18]。细胞移植的数量和再生过程的有效性在体内的关系很难说清，这可能会依赖病变的种类和大小，以及在大脑的具体位置而不同[19]。每种神经紊乱，脑卒中，脑外伤，AD或PD，有它自己的时间过程，不能在动物模型中完全模拟，用间充质干细胞的临床试验也不能解决这些问题。因此，很难把细胞移植的治疗功效和退行信号的大小联系起来[20, 21]。

（二）抗缺氧条件下，部分移植细胞可以在一个脑损伤的恶劣环境下存活一段有限的时间，因此能够发挥有益的营养作用。

（三）一些移植的NSC发生“交叉对话”，通过这种方式未成熟的NSC能够为它们的子细胞提供保护的环境。通过分泌神经保护/神经营养因子[2,4-6]，如神经生长因子

（NGF），脑源性神经营养因子(BDNF)，神经胶质细胞源性营养因子(GDNF)和神经营养因子-3[2, 5]和通过调节宿主的免疫反应[4]来促进神经元的分化。

（四）这种保持支撑的最大受益者有两个，一是内源性NSC，它们可以被动员、迁移并融入损伤的部位；二是损伤部位附近的受损或（和）正常神经元[6]。

此外，局部的星形胶质细胞反应也可作为神经保护作用的介质，促进数量有限的外源性前体细胞的存活，并促进其功能的发挥，促进多种神经营养因子（GDNF[22]，

BDNF，NGF，bFGF，血管内皮生长因子）的分泌。从主要的临床前研究得出一个重要结论，大部分NSC移植的治疗益处，可能源于NSC对微环境发挥有利的“旁观者效应”[2]。例如Kranz及其同事[13]对中风损伤后给予胎盘间充质干细胞(MSCs)使由外周免疫抑制和神经胶质细胞的活化导致的行为的恢复和减少病灶大小。一些研究表明，NSC可以整合到神经通路和在受损的脑组织功能再生。例如Bjorklund[23]利用正电子发射断层扫描(PET)扫描发现移植的胚胎干细胞自发向多巴胺能神经元分

81

化，这种多巴胺能神经元能够恢复帕金森氏病的动物模型脑的功能和行为。Weick[24]证明移植的人类胚胎干细胞可以分化为神经元，这些神经元可以功能性整合到宿主脑，支持多突触通路。Denham[25]的研究表明人类胚胎干细胞有能力定向分化成各种神经元亚型。

移植NSCs的缺点之一是他们存活的数量和持续时间是有限的，这或许可以解释NSC的疗效不足和阻止了从基础到临床的应用[2, 5, 6]。解决这一问题的一个可能的方法是，利用组织工程方法使之能更好接受环境。例如，将要移植的NSC纳入聚合物支架，通过提供物理保护来改善它们应对急性或慢性炎症反应的生存[26-28]。此外，调整这些支架可以控制释放神经营养因子的方式，为NSC和内源脑实质提供营养支持[29]。

**1.2内源性NSC的调节作用**

前体细胞的增殖和分化的能力取决于内在的和环境的小生态特征[3,5]。SVZ 和

SGZ所在小环境中富含轴突，可以分泌多种神经递质，神经递质在调控神经再生中发挥重要作用[5]。多个研究小组通过施用某些神经营养因子和其它生长因子、免疫化学法，成功地诱导刺激内源性神经发生和NSC的分化。例如，在6-羟基多巴胺( 6-OHDA)帕金森病大鼠模型中，TGF-α诱导Nestin阳性神经祖细胞的大规模的增殖和从SVZ到损伤部位的迁移。因此，纹状体内注射TGFα可能诱导SVZ区NSC的增殖，以恢复再生组织的神经-外胚层样特性。

虽然刺激内源性NSC看上去是一个有前景的方法，在动物模型中的研究并没有表现出显著的治疗效果[5]。为了改进这种治疗NDS的方法，为生长因子穿过血-脑屏障的给药开发新的技术方法，鉴定参与SVZ/SGZ祖细胞的增殖、迁移和分化调控的关键微环境，成为研究的重点。

**1.3通过移植NSC调节的内源性NSC的组合方法**

关于外源性和内源性NSC 之间的相互作用目前公认的理论依赖于两种机制：

（一）分泌神经营养因子、细胞因子和趋化因子以及（二）调制免疫系统，特别是炎症

[4,5]。

外源性SCs和内源性免疫炎症系统之间的相互作用影响内源性NSC，并为神经发生提供抵抗或许可的环境[4]。SCs移植中的免疫应答是有争议的[1, 2]。一些研究发现，抗炎细胞因子对神经发生有促进作用，而促炎分子抑制或阻止适当的神经形成

[2, 4,6]. 然而，其他研究报道同样的促炎细胞因子可以发起神经发生反应[2, 3]。

82

总的来说，不同组织来源SCs明显不同，尤其是MSCs，它能够在神经系统疾病的动物模型中诱导抗炎和免疫抑制作用，此动物模型中典型的炎症是不可或缺的。移植的SCs调节炎症，刺激神经形成及促进神经迁移到病变部位的作用可创造一个更适合神经保护和修复的环境。

**4** 结论

外源性的SCs移植可以为内源性神经祖细胞的刺激提供必要的足够的信号和线索，这表明外源性和内源性NSC之间存在协同作用。外源性NSC可通过分泌营养因子和免疫调节提供神经保护作用。此外，它们可在大脑中协同其他细胞激活内源性NSC。各种模式共同作用有助于增强宿主大脑神经再生能力。研究干细胞中微环境的线索和信号，这可促进移植后外源性和内源性的SCs之间的相互作用，将为神经退行性的脑部疾病提供治疗新靶标。在受损大脑区移植足够多外源性NSC和注射神经营养/神经调节的生长因子从而影响内源性神经发生，可以成为NDs治疗的理想方法。

展 望

存活和移植是充分利用NSC移植治疗潜力的两个主要障碍。用组织工程方法可以克服这个问题，如通过注射高分子支架提供物理保护，这将提高NSC生存率。寻找“最优”支架与发展有效地注射NSC和神经营养生长因子跨血脑屏障的创新技术同样重要。

参考文献

[1] Arien-Zakay H, Lecht S, Nagler A, et al. Human umbilical cord blood stem cells: rational for use as a neuroprotectant in ischemic brain disease. Int J Mol Sci, 2010, 11(9): 3513-28.

[2] Reekmans K, Praet J, Daans J, et al. Current challenges for the advancement of neural stem cell biology and transplantation research. Stem Cell Rev, 2012, 8(1): 262-78.

[3] Yoneyama M, Shiba T, Hasebe S. Adult neurogenesis is regulated by endogenous factors produced during neurodegeneration. J Pharmacol Sci, 2011, 115(4): 425-32.

[4] Mathieu P, Battista D, Depino A, et al. The more you have, the less you get: the functional role of inflammation on neuronal differentiation of endogenous and transplanted neural stem cells in the adult brain. J Neurochem, 2010, 112(6): 1368-85.

[5] Madhavan L, Collier TJ. A synergistic approach for neural repair: cell transplantation and induction of endogenous precursor cell activity. Neuropharmacology, 2010, 58(6): 835-44.83

[6] Carletti B, Piemonte F, Rossi F. Neuroprotection: the emerging concept of restorative neural stem cell biology for the treatment of neurodegenerative diseases. Curr Neuropharmacol, 2011, 9(2): 313-7.

[7] Trounson A, Thakar RG, Lomax G. Clinical trials for stem cell therapies. BMC Med, 2011, 9: 52.

[8] Bachoud-Levi AC, Gaura V, Brugieres P, et al. Effect of fetal neural transplants in patients with Huntington's disease 6 years after surgery: a long-term follow-up study. Lancet Neurol, 2006, 5(4): 303-9.

[9] Karussis D, Karageorgiou C, Vaknin-Dembinsky A, et al. Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. Arch Neurol, 2010, 67: 1187-94.

[10] Gaura V, Bachoud-Levi AC, Ribeiro MJ, et al. Striatal neural grafting improves cortical metabolism in Huntington's disease patients. Brain, 2004, 127(10): 65-72.

[11] Kumar AA, Kumar SR, Narayanan R. Autologous bone marrow derived mononuclear cell therapy for spinal cord injury: a phase I/II clinical safety and primary efficacy data. Exp Clin Transplant, 2009, 7(4): 241-8.

[12] Whitney NP, Eidem TM, Peng H. Inflammation mediates varying effects in neurogenesis: relevance to the pathogenesis of brain injury and neurodegenerative disorders. J Neurochem, 2009, 108(6): 1343-59.

[13] Kranz A, Wagner DC, Kamprad M, et al. Transplantation of placenta-derived mesenchymal stromal cells upon experimental stroke in rats. Brain Res, 2010, 1315: 128-36.

[14] Bonner JF, Connors TM, Silverman WF, et al. Grafted neural progenitors integrate and restore synaptic connectivity across the injured spinal cord. J Neurosci, 2011, 31(12): 4675-86.

[15] Arien-Zakay H, Nagler A, Galski H. Neuronal conditioning medium and nerve growth factor induce neuronal differentiation of collagen-adherent progenitors derived from human umbilical cord blood. J Mol Neurosci, 2007, 32(3): 179-91.

[16] Song H, Stevens CF, Gage FH. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. Nature, 2002, 417(6884): 39-44.

[17] Nguyen-Ba-Charvet KT, Picard-Riera N, Tessier-Lavigne M, et al. Multiple roles for slits in the control of cell migration in the rostral migratory stream. J Neurosci, 2004, 24(6): 1497-506.

[18] Connor B, Gordon RJ, Jones KS. Deviating from the well travelled path: precursor cell migration in the pathological adult mammalian brain. J Cell Biochem, 2011, 112(6): 1467-74.84

[19] Abe K, Yamashita T, Takizawa S, et al. Stem cell therapy for cerebral ischemia: from basic science to clinical applications. J Cereb Blood Flow Metab, 2012, 32(7): 1317-31.

[20] Boncoraglio GB, Bersano A, Candelise L. Stem cell transplantation for ischemic stroke. Cochrane Database Syst Rev, 2010, CD007231.

[21] De Feo D, Merlini A, Laterza C, et al. Neural stem cell transplantation in central nervous system disorders: from cell replacement to neuroprotection. Curr Opin Neurol, 2012, 25(3): 322-33.

[22] Shen LH, Li Y, Chopp M. Astrocytic endogenous glial cell derived neurotrophic factor production is enhanced by bone marrow stromal cell transplantation in the ischemic boundary zone after stroke in adult rats. Glia, 2010, 58(9): 1074-81.

[23] Bjorklund LM, Sanchez-Pernaute R, Chung S, et al. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(4): 2344-9.

[24] Weick JP, Johnson MA, Skroch SP, et al. Functional control of transplantable human ESC-derived neurons via optogenetic targeting. Stem Cells, 2010, 28(11): 2008-16.

[25] Denham M, Parish CL, Leaw B, et al. Neurons derived from human embryonic stem cells extend long-distance axonal projections through growth along host white matter tracts after intra-cerebral transplantation. Front Cell Neurosci, 2012, 6: 11.

[26] Tate MC, Shear DA, Hoffman SW, et al. Fibronectin promotes survival and migration of primary neural stem cells transplanted into the traumatically injured mouse brain. Cell Transplant, 2002, 11(3): 283-95.

[27] Zhong J, Chan A, Morad L, et al. Hydrogel matrix to support stem cell survival after brain transplantation in stroke. Neuro Neural Repair, 2010, 24(7): 636-44.

[28] Teng YD, Lavik EB, Qu X, et al. Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(5): 3024-9.

[29] Park J, Lim E, Back S, et al. Nerve regeneration following spinal cord injury using matrix metalloproteinase-sensitive, hyaluronic acid-based biomimetic hydrogel scaffold containing brain-derived neurotrophic factor. J Biomed Mater Res A, 2010, 93(3): 1091-9.

85

# 作者简介

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 个人信息 | | | |  |
| 姓名：刘菲菲 | 性别：女 | | 籍贯：河南 |
| 年龄：28 | 政治面貌：中国共产党党员 | | |
| 导师：龙大宏 教授 | | 最终学历/专业：博士/神经内科 | |
| 主要教育背景 | | | | |
| 2001 年 9 月-2004 年 6 月 河南省滑县第一高级中学  2004 年 9 月-2008 年 6 月 河南大学 生命科学学院 生物技术专业 获学士学位  2008 年 9 月-2011 年 6 月 广州医科大学 人体解剖与组织胚胎学专业 获硕士学位  2011 年 9 月至今 广州医科大学 神经病学专业其中，硕士、博士导师均为 龙大宏 教授 | | | | |
| 电脑技能 | | | | |
| 熟练掌握运用 Word, PowerPoint 文字编辑工具；  基本掌握 Excel，Origin75, SPSS 数据分析处理工具；  初步掌握 Photoshop，Canvas，CorelDRAW，AI 作图软件；  熟习运用 NCBI，google，丁香园，虚拟图书馆，baidu 等学术信息搜索及下载平台。 | | | | |
| 英语水平/能力 | | | | |
| CET4；能独立阅读、撰写 SCI 论文；可与外教进行简单交流。 | | | | |
| 博士期间课题简介 | | | | |
| 神经干细胞(neural stem cell, NSC)是一类非常重要的多潜能干细胞，有能力分化为神经元或神经胶质细胞，在体外可以进行神经球悬浮培养和单层贴壁培养。NSC 分化受到多方面的影响。研究表明，脑源性神经生长因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)和神经生长因子(nerve growth factor, NGF)不但可以维持神经元的生长和存活，还可以促进 NSC 增殖并诱导其分化为神经元。BDNF 和 NGF 通过与 NSCs 表面的受体 Trk 结合，激活 MAPK/ERK 信号通路，参与 NSC 的增殖分化调控。NSCs  内源基因的表达变化对其增殖分化也有非常重要的调节作用。研究表明，bHLH 转录 | | | | |

86

|  |
| --- |
| 因子家族中的 HES1 和 HES5 成员，有维持 NSC 增殖并抑制其分化的作用，另外的家庭成员如 MASH1, NGN1 和 NeuroD 则可促进 NSC 分化。  目前，我们已经建立了 NSC 体外培养方案，在体外经过两代神经球悬浮培养， 再进行单层贴壁培养的 NSC，不但可以得到快速纯化，而且自然分化为神经元的比例也更高[2]。在这种培养方案的基础上，我们将 NSC 分为 3 组：对照组，BDNF 诱导组，BDNF+NGF 联合诱导组。并在诱导 1，3，7 和 14d 的时候用免疫荧光的方法检测不同组 β-tubulin Ⅲ阳性细胞率，HES1、HES5、MASH1、NGN1 和 NeuroD 的表达变化，以及诱导 1h 以后 EKR1/2 的磷酸化水平，结果表明，联合组 β-tubulin Ⅲ阳性细胞率，MASH1、NGN1 和 NeuroD 的表达变化，EKR1/2 的磷酸化水平较对照组和 BDNF 组都有明显提高，提示我们 BDNF+NGF 联合组是更好的诱导方案。  我们将 192-IgG Saporin 注射到 SD 雄性大鼠侧脑室，制造学习记忆损伤模型。4w 后，移植不同方案诱导 3d 的混合细胞到基底前脑。4w 后，水迷宫检测学习记忆回复能力，免疫组织化学检测基底前脑 p75 阳性细胞和突触素改变情况，组织化学的方法检测海马 AchE 染色。验证联合组在体内是否也一样是更好的诱导方案。 |
| 主要技能 |
| 熟练掌握神经干细胞的分离培养、诱导分化技术； 熟练掌握免疫细胞荧光技术，免疫组织化学技术；  基本掌握蛋白免疫印迹(western blotting, WB)技术，荧光定量 PCR 技术。 |
| 在校期间所获奖励 |
| 博士期间获广东省解剖学会首届研究生学术论坛，叶鹿鸣“研究生优秀论文奖”； 本硕博期间多次获得“优秀学生干部奖”；  获硕士“优秀毕业研究生奖”； |
| 课余生活 |
| 作为学生干部，经常组织学生参加活动，包括微生物培养兴趣小组活动大赛，野炊， 爬ft，游泳，骑自行车，打羽毛球，唱歌等；通过这些活动，增进了同学之间的感情， 提高班级凝聚力，同时也锻炼了自己的组织能力。  作为研究生，经常参加学校或附属医院组织的学术活动，通过听报告，学到了很多以  前未涉及过的领域，开拓了自己的知识面；尤其对遗传学，有了一个全新的认识。 |

87

|  |
| --- |
| 自我评价 |
| 本人勤奋好学，谦虚谨慎，态度端正，积极向上，思想先进，能迅速接受新事物， 学习能力强，头脑灵活，不拘一格，善于思考，有较好的逻辑思维和分析能力，动手能力强，有团队精神，能够独立设计实验，开展工作，熟悉细胞培养鉴定领域，精通免疫细胞荧光/免疫组织化学技术，熟习数据整理分析方法。本人的兴趣即在于从事科学研究，从小志愿成为一名科学工作者，如能遂愿，将投入全部的热情来追逐梦想， 为人民服务，为科学奉献一生。如果一个人能从事自己喜欢的事业，将是一件非常幸运的事，而我愿意努力争取做那个“幸运”的人。  本人热爱祖国，热爱生活，喜爱科学，追求真理；喜爱音乐，喜欢自然；与人为善，尊老爱幼，是个充满正能量的阳光青年。  博士三年，我得到的不只是技术，思维，更是一种人生的态度，我对工作生活充满热情，会以一种非常积极向上的态度来迎接新生活，在以后的道路上，会一直以数  十年如一日的心态认真对待工作。 |

88

附 **录**



89

**攻读学位期间的研究成果**

[1]**刘菲菲**，龙大宏，龙静怡. 重组真核表达载体pEGFP－BDNF的构建. 解剖学研究, 2012, 34(2): 107-110.

[2]**刘菲菲**， 徐丽萍， 龙大宏，等. 神经干细胞的单层培养及分化过程中HES1 和

MASH1的表达变化. 中ft大学学报医学科学版, 2014, 35(1), 18-24.

[3] **Feifei Liu**, Aiguo Xuan, Yan Chen, et al. Combined effect of NGF and BDNF on the neuronal differentiation of neural stem cells and the potential molecular mechanisms. Molecular Medicine Reports (IF1.17), been accepted.

[4]王迪， 陈艳， **刘菲菲**， 等. Cyclopamine 对LN229 细胞Nurr1 基因表达的影响. 中

国临床解剖学杂志, 2012, 30(5): 539-542.

[5]包国庆，龙大宏，陈艳，**刘菲菲**， 等. 载神经生长因子纳米药物体外诱导PC12

细胞的药效. 中国组织工程研究, 2013, 17(16): 2891-2898.

[6]张君度，龙大宏，陈艳，**刘菲菲**. 胶质细胞源性神经营养因子诱导神经干细胞分化过程中bHLH转录因子的表达变化. 解剖学研究, 2013, 35(6)：427-430.

90

致谢

首先，非常感谢，特别感谢我的导师龙大宏教授，在我学习、工作和生活各方面的关怀。将近六年的学习生涯，在课题设计、实验和论文撰写过程中，导师都给予了悉心指导，导师严谨、细致、实事求是的精神和工作作风、积极乐观的人生态度一直感染着我。我跟了龙老师六年，我不是最优秀的，但是一定是成长最大，收获最多的。在我略有小成得意洋洋时，龙老师及时的劝诫，遏制了我骄傲等不良情绪的滋生，在我心灰意冷举步维艰时，是龙老师用语言鼓励我，用实际行动帮助我支持我，引导我一步一步往前走。龙老师对我实验、学习、生活等各方面的关怀、帮助和教诲，使我终生受益。

感谢教研室洪乐鹏主任对我们研究生的大力支持，感谢黄婉丹老师对我攻读博士给予的无私的帮助，特别感谢宣爱国老师和燕启江教授在英文论文写作方面给予的指导和帮助；感谢石纯、冷水龙、杨丹迪、郝彦利、王智明老师在实验过程中给予的指导和帮助，感谢陈艳和徐丽萍师姐、潘学兵和贺小松师兄在实验技术和实验设计方面给我的帮助和指导，非常感谢包国庆、王迪、张君度、谢珊艳、黄丽、黄鑫焱、王继申、汪光亮各位师弟师妹在实验、学习、生活等多方面给予的帮助。

感谢广医二院神研所赵绮华老师在WB技术方面给予的帮助和指导，赵老师言传身教和谨慎严谨的精神，使我受益匪浅；感谢龙跃生博士和瘳卫平教授给我学习的机会，感谢民福利、何娜、陈勇军、徐海清、曾敏怡、李文斌等多位同学给予的帮助，特别感谢孟珩博士在实验、学习和生活方面给予的帮助和指导，孟博士的两句如醍醐灌顶，是我博士生涯的两个转折点：一是我们毕竟是靠技术吃饭的；二是再坚持一下，也许多坚持1天，1个小时，甚至1分钟，结果都可能不同。孟博士积极乐观向上充满正能量的特质，深深影响着我。

感谢中ft大学医学院徐杰教授在我发表论文时给予的大力帮助和支持。感谢陈贤亮、李龙光、洪跃辉师弟对我实验方面的帮助和支持。

感谢我的妈妈始终如一的爱，感谢家人给予的支持与鼓励，使我得以完成学业。谨以此论文致谢所有关心和帮助我成长的人们！

91

# 学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。文中依法引用他人的成果、对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中做出明确标注或得到许可。论文内容未包含法律意义上已属于他人的任何形式的研究成果，也不包含本人已用于其他学位申请的论文或成果。

本人如违反上述声明，愿意承担以下责任和后果：

1．交回学校授予的学位证书；

2．学校可在相关媒体上对作者本人的行为进行通报；

3．本人按照学校规定的方式，对因不当取得学位给学校造成的名誉损害，进行公开道歉。

4．本人负责因论文成果不实产生的法律纠纷。

论文作者签名： 日期： 年 月 日

# 学位论文知识产权权属声明

本人在导师指导下所完成的论文及相关的职务作品，知识产权归属广州医学院及附属单位。广州医学院及附属单位享有以任何方式发表、复制、公开阅览、借阅以及申请专利等权利。本人离校后发表或使用学位论文或与该论文直接相关的学术论文或成果时，署名单位仍然为广州医学院及附属单位。任何其他收存和保管本论文的单位和个人，未经本论文作者、导师授权，不得将本论文转借他人、复制、抄录或以其他任何方式传播，否则，引起有碍作者的著作权益问题，将会追究相应的法律责任。论文作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月

# 关于学位论文使用授权的说明

1、学校可以保留本学位论文的原件及复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复印手段保存、汇编学位论文；

2、本人授权学校向国家有关部门或机构送交学位论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。送交学位论文时间选择（请在下面相应栏内打“√”）：

①答辩后即可送：是否

②延迟一年后送：

③延迟二年后送：

④延迟三年后送：

论文作者签名： 日期： 年 月 日导师签名： 日期： 年 月 日

92