

研究报告

成年大鼠海马神经前体细胞
表达功能性的 L-型钙通道*

冯锦丽 胡德辉 陈 明 田映红 施志敏 杨建明 朱心红 李晓文 高天明**

(第一军医大学解剖学教研室, 生理学教研室, 广州 510515)

摘要 为了建立一种能够获得高纯度成年大鼠海马神经前体细胞 (HPCs) 的体外贴壁培养方法, 并鉴定 HPCs 上是否存在功能性 L-型钙通道, 分离 Wistar 成年大鼠海马组织, 制成单细胞悬液, 利用无血清培养技术, 在添加碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、表皮生长因子 (EGF)、N2 和 B27 supplement 的 DMEM/F12 培养液中进行培养. 连续传代, 采用细胞免疫荧光法对第六代细胞进行鉴定, 呈巢蛋白 (nestin) 阳性的细胞可达 99.9%. 把培养高纯度的细胞在分化培养基中诱导分化 14 天后, 表现为神经元和星形胶质细胞的形态, 且分别呈 III 型 β -微管蛋白 (Tuj1) 阳性和胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 阳性. 细胞免疫荧光和免疫印迹结果显示, HPCs 表达 L-型钙通道的 Cav1.2 α_1 C 和 Cav1.3 α_1 D 亚单位, 共聚焦钙成像证明了功能性 L-型钙通道的存在, 并且利用全细胞膜片钳技术记录到了 L-型钙电流. 以上结果表明成年 Wistar 大鼠的海马 HPCs 可表达功能性的 L-型钙通道.

关键词 成年大鼠, 海马, 神经前体细胞, L-型钙通道

学科分类号 Q2

近年研究表明, 成年中枢神经系统 (CNS) 仍能不断地产生新的神经元, 即成年 CNS 仍有神经再生, 这也就意味着在成年 CNS 中存在有神经干/前体细胞 (neural stem/progenitor cells). 业已证实, 成年动物及人类侧脑室下区 (subventricular zone, SVZ)^[1,2]、海马齿状回颗粒细胞下层 (subgranular zone, SGZ)^[3,4]、嗅球、纹状体^[5-7]、大脑皮质^[8]、黑质^[9]、中隔与脊髓均存在神经前体细胞^[10]. 其中, SVZ 和 SGZ 是两个目前较为公认的、有神经前体细胞存在的区域.

研究表明, 在正常成年大鼠和小鼠的海马齿状回每天有数以千计的新生神经元不断产生^[11]. 这些新产生的神经元具有成熟神经元的形态, 且能够产生动作电位并与 CA3 区的靶神经元建立功能性突触联系. 海马的成年神经再生与许多生理 (学习记忆、应激) 和病理 (癫痫、脑缺血) 过程密切相关^[12,13], 但目前对调控成年神经再生的具体机制仍不清楚, 而阐明这一问题的前提条件就是建立海马神经前体细胞的体外培养技术平台.

L-型钙通道在神经发育过程中具有重要作用, 例如: 神经锥生长、神经元的迁移、轴突和树突的延伸、突触可塑性等^[14]. Gage 等^[15]在培养的胚胎 E16 天的 HPCs 上记录到了电压依赖性钙电流, 并且有报道电压依赖性钙通道参与了胚胎 HPCs 向神

经元分化的调控^[16]. 但在成年的 HPCs 上是否表达 L-型钙通道目前尚未见报道. 本研究目的在于建立成年大鼠 HPCs 的体外培养技术, 并鉴定 HPCs 是否表达功能性 L-型钙通道.

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年雌性 Wistar 大鼠 (≥ 3 个月), 由南方医科大学实验动物中心提供.

1.2 实验试剂

DMEM/F12、N2、B27 (Gibco); 谷氨酰胺、EGF、Human 重组 bFGF、多聚鸟氨酸、Laminin、Dispase、Acetase、Hoechst33258、Nifedipine (Sigma); Papain、DNase (Worthington); 青链霉素、特级胎牛血清 (Hyclone); BrdU、Monoclonal Mouse anti-Nestin、Monoclonal Mouse anti-Tuj1、GFAP (Chemicon); TRITC-Donkey anti Sheep-IgG、TRITC-Donkey anti Mouse-IgG、FITC-Goat anti Mouse-IgG、FITC-Goat anti Rabbit-IgG、正常山羊

*国家自然科学基金(30330240、30125013、30371772)、广东省自然科学基金重点项目(37047)、教育部长江学者奖励计划资助项目.

**通讯联系人.

Tel/Fax: 020-61648216, E-mail: tgao@fimmu.com

收稿日期: 2005-04-11, 接受日期: 2005-04-30

血清、正常驴血清(Jackson); Sheep anti BrdU (Biodesign); Rabbit anti Cav1.2 α_1 C、anti Cav1.3 α_1 D、BayK8644 (Alomone Labs); Fluo3-AM 和 F-127 (Biotium).

1.3 主要仪器和器材

超净工作台(苏净安泰)、倒置荧光显微镜(Olympus); 共聚焦显微镜(Leica); CO₂ 培养箱(Thermo); 离心机、解剖显微镜、显微镜(上海手术器械厂)、DP70 摄像头(Olympus); 细胞培养瓶(greiner bio-one).

1.4 细胞的分离培养及传代

成年 Wistar 大鼠海马神经前体细胞的培养^[4,17]: 每次实验取成年雌性 Wistar 大鼠(≥ 3 个月) 4 只, 10% 水合氯醛腹腔麻醉, 断头处死取脑组织, 解剖显微镜下分离双侧海马, 轻柔地去除软脑膜和血管, D-Hank's 液漂洗 3 次, 剪切成乳糜状(8 ~ 10 min), 37°C D-Hank's-dispase-DNase-papin (DDDP) 溶液中消化 35 min 左右, 加入含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM/F12 终止消化, 800 r/min 离心 5 min, 弃上清, 再用含有 10% FBS 的 DMEM/F12 重悬细胞沉淀, 然后 500 目筛网过滤, 接种于包被有 poly-ornithine (10 mg/L) 和 laminin (5 mg/L) 的培养瓶中, 24 h 后, 换成无血清的 DMEM/F12 细胞培养基, 同时添加 1% 的 N2、2% B27、20 μ g/L 的 EGF 和 bFGF (干细胞培养基 SCM). 每 3~5 天换液 3/5, 待细胞长至 80% ~ 90% 融合, Acctuse 消化传代. 每瓶加入 Acctuse 2~3 ml, 37°C 下 5~10 min, 用 1 ml 移液枪轻轻敲打瓶底, 收集细胞悬液, 离心 800 r/min 5 min, 弃上清, SCM 重悬沉淀物, 按 1:3 的比例接种于新的培养瓶. 每 8~10 天传代一次.

1.5 诱导分化

把 HPCs 消化成单细胞悬液, 接种于包被有 poly-ornithine (50 mg/L) 和 laminin (10 mg/L) 的培养板或培养皿上, 为使细胞更好地存活, 细胞贴壁 24 h 后, 再换成分化培养基. 分化培养基为: DMEM/F12、1 μ g/L 的 bFGF、1% FBS 和 100 nmol/L 的 retinoic acid(RA)^[17]. 每 2 天换液 1/2, 诱导 14 天, 细胞分化成具有神经元和胶质细胞形态的细胞.

1.6 饲养细胞层的制备

出生一天的 Wistar 大鼠, 分离海马, 剪切 2 min, 0.125% 的胰酶消化 15 min 左右, 用含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM/F12 终止消化, 离心

1 000 r/min 5 min, 细胞培养液重悬, 细胞按 1×10^5 密度接种于放置在 24 孔培养板里的盖玻片或 35 mm 的培养皿上, 盖玻片和皿之前用 ploy-L-lysine (40 mg/L) 包被. 第二天, 换液 1/2 并使血清的最终浓度达 1.75%, 7 天后细胞用 70% 的酒精-20°C 处理 30 min, PBS 漂洗 2 次, 吹干备用^[18].

1.7 细胞免疫荧光

取第六代 HPCs 接种于包被有 poly-ornithine 和 laminin 的培养板或皿, 2 h 后用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 固定前细胞用 0.01 mol/L 的 PBS 快速冲洗一遍. 固定后 PBS 洗 3 次, 每次 5 min. 正常血清封闭 2 h, 胞浆和核抗原血清封闭时加入 0.3% 的 Trinton X-100. 加入一抗(nestin 1 : 1 000; BrdU 10 mg/L; Tuj1 1:200; GFAP 5 mg/L; Cav1.2 α_1 C 1:200) 4°C 冰箱过夜或 37°C 1 h. PBS 漂洗 3 次, 每次 10 min, 加入相应的荧光二抗(FITC-Goat anti Mouse IgG; FITC-Goat anti Habbit-IgG; TRITC-Donkey anti Sheep-IgG; TRITC-Donkey anti Mouse-IgG), 室温避光 1 h. PBS 漂洗 3 次, 每次 10 min. BrdU 的染色: 细胞固定后, 2 mol/L HCl 37°C 孵育 1 h, 0.1% 硼酸中和 2 次, 每次 10 min. 然后血清封闭步骤同上. BrdU 与其他抗原双标时, 先标 BrdU. 最后 Hoechst33258 标记核, 5 mg/L 5 min.

1.8 免疫印记

将贴壁生长的细胞消化, 细胞悬液于 4°C 3 000 g 离心 5 min, 弃上清, 将沉淀用预冷的 PBS 充分洗涤, 4°C 以 3 000 g 离心 5 min. 收集沉淀, 加入 2 ml 预冷的缓冲液 A (0.32 mol/L 蔗糖, 5 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 120 mmol/L KCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 0.2 mmol/L PMSF, 1 mg/L Aprotinin), 冰上充分匀浆, 4°C 1 000 g 离心 10 min 后, 所得上清液转入超速离心管, 4°C 100 000 g 离心 1 h. 弃去上清, 沉淀用适量预冷的缓冲液 B (20 mmol/L HEPES (pH 7.5), 10% 甘油, 2% TritonX-100, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 0.2 mmol/L PMSF, 1 mg/L Aprotinin) 重悬, 冰上孵育 2 h 后分装至 EP 管, 4°C 10 000 g 离心 30 min. 收集所得上清, 加入等体积 2 $\times$ 蛋白质电泳上样缓冲液, 煮沸 10 min 后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(7.5%), 后将蛋白质转移至 PVDF 膜, 封闭液(含 5% 脱脂奶粉的 PBS)封闭 1 h 后, 以溶解一定浓度一抗的封闭液 4°C 孵育

过夜. 经 PBS 洗脱后以溶解一定浓度辣根过氧化物酶标记二抗的封闭液室温孵育 1 h, 经 PBS 洗脱后, ECL 检测.

1.9 电生理实验

全细胞膜片钳记录^[19,20]: 将生长有 HPCs 的盖玻片置于含有细胞外液的记录槽中, 记录槽置于倒置显微镜 (Olympus IX270, 日本) 工作台上, 在显微镜下找到细胞, 利用三维操纵器 (Narishige, 日本) 将充灌细胞内液的玻璃微电极 (入水阻抗 2.5~3.5 M Ω) 移近细胞并轻压在细胞表面, 用负压使电极尖端与细胞膜表面形成高阻抗封接 (G Ω 级), 再以较大的负压吸破细胞膜, 补偿电容电流及电极串联阻抗, 形成全细胞记录. 钳制电压为 -50 mV, 从 -30 mV 到 +40 mV 给予去极化脉冲, 步距为 10 mV, 并用特异性 L 型钙通道激动剂 BayK8644 及阻断剂 Nifedipine 干预, 记录电流的变化. 实验过程由 pClamp5.5.0 (Axon Instrument, 美国) 控制, 通过 CEZ-2300 膜片钳放大器 (Nihon Kohden) 及 TL-125 数模转换器 (Scientific Solutions) 控制指令电压、信号采集, 并将信号存储于计算机硬盘中. pClamp8.0 软件对数据分析. 电极内液组成: cesium methanesulfonate 145 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, EGTA 11 mmol/L, CaCl₂·2H₂O 1 mmol/L, MgCl₂·6H₂O 5 mmol/L, ATP-Mg 5 mmol/L, leupitin hemisulfate 0.1 mmol/L. 电极外液组成: Choline chloride 75 mmol/L, TEA-Cl 50 mmol/L, MgCl₂·6H₂O 2 mmol/L, CsCl 5 mmol/L, BaCl₂ 5 mmol/L, Glucose 10 mmol/L, tetrodotoxin 0.001 mmol/L 和 10 mmol/L HEPES. Ba²⁺ (5 mmol/L) 是作为载离子. 所有溶液均用直径为 0.22 μ m 的滤膜过滤, pH 用 TEA-OH 调节到 7.3.

1.10 钙成像实验

在细胞外液中加入 fluo3-AM 和 F-127 使其终浓度为 2 μ mol/L, 避光室温孵育 30 min^[16]. 细胞外液组成: NaCl 140 mmol/L, KCl 3 mmol/L, MgCl₂ 1 mmol/L, CaCl₂ 2 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, Glucose 10 mmol/L. 无钙细胞外液为细胞外液中去掉 CaCl₂, 加入 1 mmol/L EGTA. 实验前, 用细胞外液冲洗细胞, 以洗去细胞外的 fluo3-AM. 激发光谱 488 nm, 发射光谱 530 nm, 荧光信号用共聚焦激光扫描系统检测. [Ca²⁺]_i 的变化用荧光强度表示. x-y-t 轴扫描.

1.11 统计学分析

实验均重复 3 次, 所有数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示. 组间

比较采用 one-way ANOVA 分析, 以 $P < 0.05$ 作为显著性差异的临界值.

2 结 果

2.1 HPCs 的分离、贴壁培养及鉴定

为了提高 HPCs 的成活率, 第一天接种用含有 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基. 接种后镜下观察可见大量有突起的单个神经细胞和少量圆形细胞, 圆形细胞沉于培养瓶的底部. 24 h 后弃上清换干细胞培养基, 观察可见非常稀疏的细胞贴于瓶底, 长至第 7 天再次观察发现细胞数量明显增多, 此时换液 1/2, 以后每 3 天换液 3/5. 换液时镜下观察细胞状态及密度, 随着时间的推移, 可见细胞数量逐渐增多, 细胞胞体透亮, 胞膜完整, 周围生有微绒毛, 并可见大量分裂相细胞, 如图 1 箭头所示, 高倍镜下可见细胞核大, 染色体疏松. 第 14 天, 细胞密度进一步增大, 细胞几乎铺满整个瓶底, 形成一个个的细胞克隆, 克隆中心细胞密度大, 细胞不停向周围扩展. 为了使细胞更好地增殖存活, 这时应及时传代. 以后每 8~10 天传代一次.

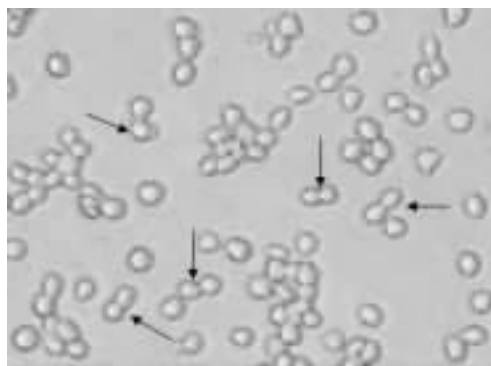


Fig.1 The morphology of adult hippocampal neural progenitor cells

Arrows point to the dividing cells. (x200)

分别取原代和传代培养的细胞做免疫荧光鉴定, 发现均有细胞表达 nestin 抗原. Nestin 抗原属第 IV 类中间丝, 在神经板上皮细胞即开始表达, 当神经细胞的迁移基本完成之后 nestin 的表达量开始下降, 并随神经细胞分化的完成而停止表达. Nestin 系早期原始神经细胞的标志物, 已被广泛用于神经干细胞的鉴定. 我们发现原代 nestin 阳性的细胞比例仅有 66.7%, 但第四代 nestin 阳性的细胞比例已达到 92.0%, 而到第六代时, nestin 阳性的细胞可达到 99.9% (图 2a), 这表明细胞培养传代的过程同时也是 HPCs 的一个逐步纯化的过程. 以下

实验均取用第六代以后的细胞。

在细胞培养液中加入 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 BrdU, 作用 24 h, 免疫荧光双标 BrdU 与 nestin, 发现几乎所有的细胞都同时表达这两种抗原, 说明细胞处于活跃的分裂增殖期 (图 2b)。

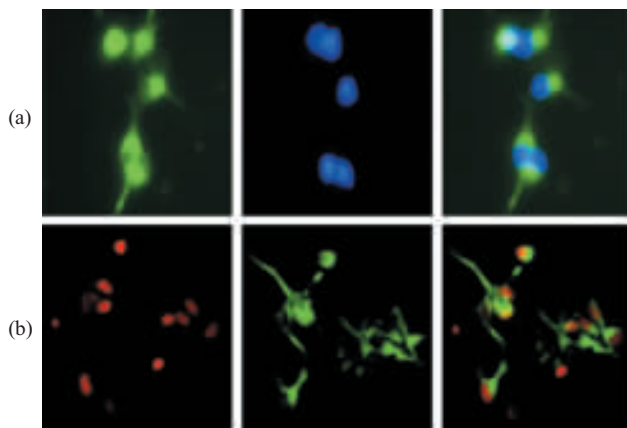


Fig.2 Identification of adult hippocampal neural progenitor cells and label of the dividing cells

(a) Green represents nestin-positive cells. Cell nuclei are labeled with Hoechst33258 (blue). (b) Co-expression of BrdU (red) with nestin (green). The right panels are merged pictures. ($\times 400$)

2.2 HPCs 的诱导分化和鉴定

把干细胞培养基换成分化培养基 (differentiation medium), 诱导 HPCs 的分化. 分化第 5 天镜下观察发现细胞长出突起, 已初步具有神经元和胶质细胞形态. 具有一个或两个长突起, 胞体呈圆形或椭圆形的神经元样细胞 (图 3a, A); 具有多个粗长突起和多角形胞体的星形胶质样细胞 (图 3a, B); 具有多个细长突起且不断分枝的少突胶质样细胞 (图 3a, C). 第 14 天做免疫荧光鉴定, 可见到 Tuj1 (图 3b) 和 GFAP (图 3c) 的阳性细胞. 分离培养的细胞表达 nestin 抗原, 能进行自我复制并分化成神经元和胶质细胞, 从而证明了所培养细胞为神经前体细胞。

2.3 HPCs 上表达功能性 L-型钙通道

2.3.1 L-型钙通道蛋白的表达. α_1 亚单位是组成功能性 L-型钙通道的一个必需的亚单位, α_1 分为多种亚型^[21], 在神经元中主要为 Cav1.2 α_1 C 和 Cav1.3 α_1 D. 因此, 我们把 L-型钙通道的这两种亚单位与 nestin 双标, 结果表明 HPCs 呈 Cav1.2 α_1 C 和 Cav1.3 α_1 D 阳性. 图 4a 为 Cav1.2 α_1 C 和 nestin 共同标记. Cav1.3 α_1 D 与 nestin 双标图像未给出. 蛋白质印迹结果也表明了细胞有 Cav1.2 α_1 C 和 Cav1.3 α_1 D 蛋白的表达 (图 4b)。

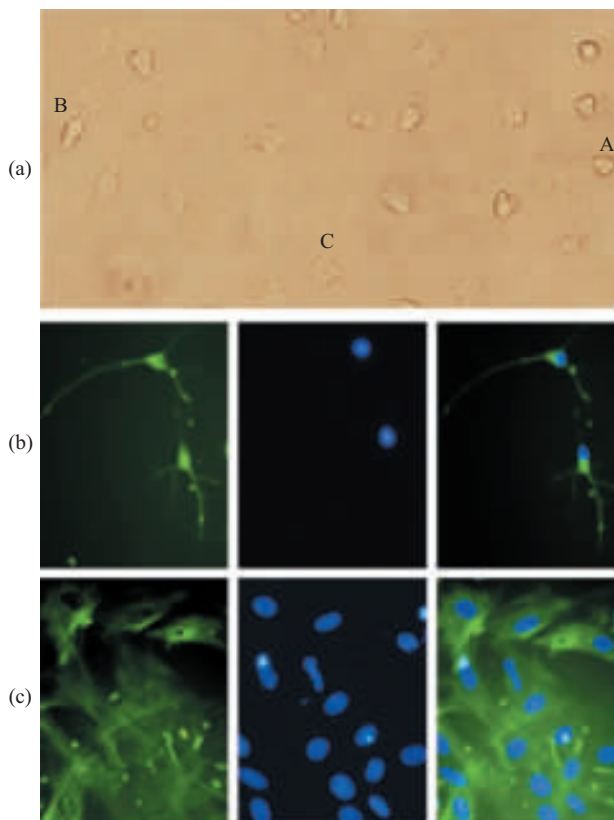


Fig.3 The morphology and identification of differentiated cells

(a) Morphology of three major differentiated cells at 5th day of culture in differentiation medium. A: neuron-like cell, B: oligodendrocyte-like cell, C: astrocyte-like cell. (b) Tuj1-positive cells (green) represent neurons. (c) GFAP-positive cells (green) represent astrocytes. In (b) and (c), cell nuclei are labeled with Hoechst33258 (blue) and the right panels are merged pictures. ($\times 320$)

2.3.2 钙成像. 为证明 HPCs 上存在功能性 L-型钙通道, 我们通过共聚焦显微镜, 对已负载 fluo-3 的 HPCs 进行荧光扫描. 首先我们在细胞外液中加入 20 mmol/L 的 KCl 后, 观察到荧光强度显著增强 ($P < 0.01$, $n=37$) (图 5 a, b), 表明去极化可诱导细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增加. 洗去 KCl 加入 L-型钙通道特异性阻断剂 Nifedipine (10 $\mu\text{mol/L}$), 这时荧光强度略有降低 ($P < 0.05$), 稍后再加入 KCl, 同一视野相同细胞上未见荧光强度的显著增强 ($P > 0.05$, 图 5b). 用 Nifedipine 的溶剂乙醇 (0.1%) 处理 HPCs, KCl 仍可诱导荧光强度显著增强 ($F/F_0=1.15 \pm 0.08$, $P < 0.01$, $n=10$), 表明 Nifedipine 的作用不是乙醇所致. 另外, 在无钙细胞外液中加入 KCl 后未见荧光强度的显著增强 ($F/F_0=1.01 \pm 0.02$, $P > 0.05$, $n=10$). 以上结果表明 L-型钙通道介导了 KCl 诱导的钙离子内流. 乙醇对照组和无钙细胞外液组统计图未给出。

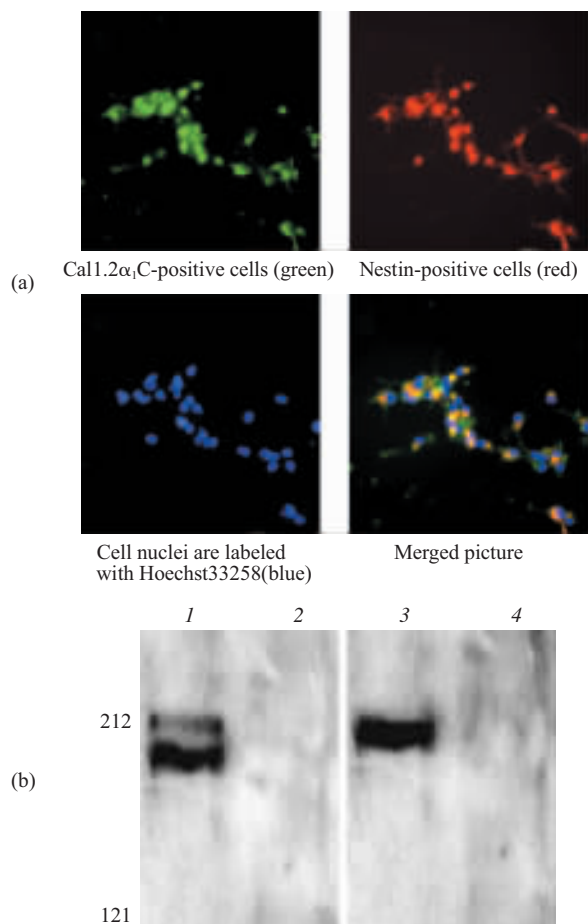


Fig.4 Expression of L-type calcium channel α subunits on the adult hippocampal neural progenitor cells

(a) Expression of Cav1.2 α_1 C on the adult hippocampal neural progenitor cells. ($\times 400$). (b) Western blot analysis of Cav1.2 α_1 C and Cav1.3 α_1 D. 1: anti-Cav1.2 α_1 C (1 : 200); 2: anti-Cav1.2 α_1 C, preincubated with the control peptide antigen; 3: anti-Cav1.3 α_1 D (1 : 200); 4: anti-Cav1.3 α_1 D, preincubated with the control peptide antigen.

2.3.3 L-型钙电流的记录. 为进一步证明 HPCs 上存在功能性 L-型钙通道, 我们用全细胞膜片钳技术记录了 L-型钙电流. 正常对照组共记录 8 个细胞, 钳制电压为 -50 mV, 指令电压从 -30 mV 去极化到 40 mV, 步距为 10 mV, 显示明显的 L-型钙电流的特征. 从 -30 mV 去极化到 10 mV, 随电压的增大, 电流也增大, 随后电压从 10 mV 逐步上升到 40 mV, 电流随电压增加而逐渐减小(图 6b). 当电压从 -30 mV 直接去极化到 10 mV, 平均电流为 (100 ± 12.35) pA, 特异性的 L-型钙通道激动剂 BayK8644 ($1 \mu\text{mol/L}$) 使该电流显著增加至 (150 ± 15.15) pA ($n=3$), 与正常对照组比, 差异显著 ($P<0.05$) (图 6), 而 $1 \mu\text{mol/L}$ 的特异性阻断剂尼氟地平(Nifedipine)可明显使该电流降低到正常对照组的 65%左右($P<0.05$)(图 6), $10 \mu\text{mol/L}$ 尼氟地平几

乎完全抑制了该电流(图 6a).

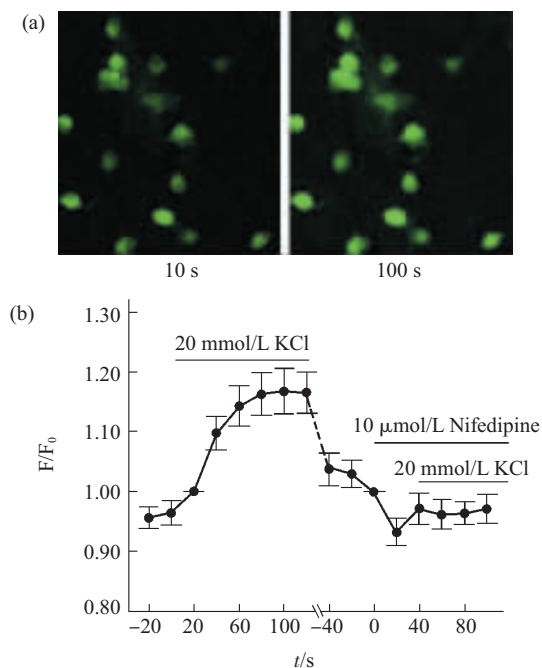


Fig.5 Depolarization with KCl caused elevations of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in proliferating adult-derived NPCs grown on a fixed substrate of hippocampal cultures

(a) Image are corresponding to 10 s and 100 s after the first addition of KCl. (b) Graph shows changes in Fluo3-AM fluorescence expressed as F/F_0 . Values are shown as $\bar{x} \pm s$ ($n=37$). KCl induced-response was blocked by the L-type calcium channel antagonist $10 \mu\text{mol/L}$ Nifedipine.

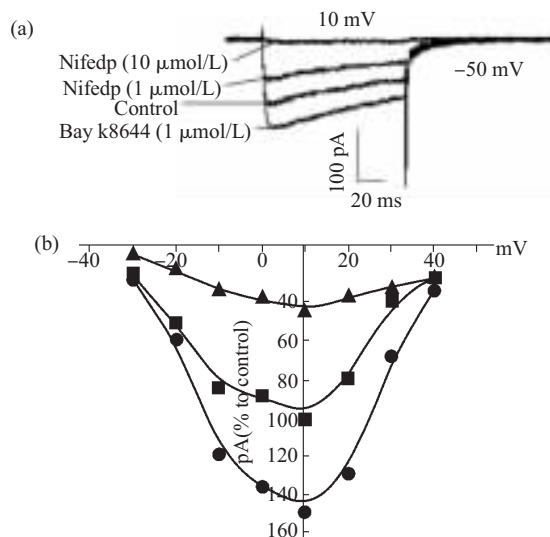


Fig.6 Whole cell L-type voltage-gated calcium currents recorded from cultured HPCs

(a) An example showing the effects of Nifedipine and BayK8644 on Ca^{2+} currents. (b) Current-voltage ($I-V$) curves before and after addition of Nifedipine and BayK8644. ■—■: control; ●—●: BayK8644; ▲—▲: Nifedipine.

3 讨 论

本实验以 Wistar 成年大鼠为研究对象, 采用贴壁法对海马神经前体细胞进行体外培养. 分离的细胞在体外可以增殖, 表达 nestin 蛋白并在分化培养基的诱导下分化成神经元和胶质细胞, 说明所培养的细胞为神经前体细胞, 这与 Palmer 等^[4,17]在 Fischer 344 大鼠上的研究结果是一致的. 通过连续传代培养, 我们把细胞的纯度提高到 99.9%, 这为以后成年中枢神经再生调控机理的研究提供了技术平台.

神经元再生是一个复杂的过程, 包括神经前体细胞的分裂增殖(proliferation)、迁移(migration)和分化(differentiation), 促进神经元再生的因素可通过这些不同的环节而发挥调节作用. 目前已经发现激素、神经营养因子和一些信号传导分子与成年中枢神经再生的调控相关^[11,22,23].

L-型钙通道在神经元发育过程中扮演了重要角色, 使人们对其在成年神经再生中的调控作用也产生了极大的兴趣. Gage 等^[5]在培养的大鼠胚胎 E16 天的 HPCs 上记录到了电压依赖性钙电流, Roy 等^[24]在由成年人的 HPCs 分化成熟的神经元上也记录到了 L-型钙电流, 本实验又在成年大鼠 HPCs 上观察到功能性 L-型钙通道的表达, 提示 L-型钙通道可能在成年 HPCs 的分裂增殖、迁移或分化中发挥作用. Deisseroth 等^[18]在 2004 年用药理学干预方法研究发现, L-型钙通道参与了成年大鼠海马 HPCs 向神经元分化的调控. 近年来又有研究表明, L-型钙通道的激活可以直接调控一些对神经元的功能和存活必需的基因表达, 如 c-Fos, 脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 和 Bcl-2 等^[25]. 因此, 今后需要深入研究 L-型钙通道调节神经再生的分子机理.

成年中枢神经的再生是适应某些生理过程如学习、迁徙、应激、幼仔识别等的需要^[12]. 成年中枢神经的再生也参与了某些病理过程. 脑缺血能够引起成年中枢神经的再生反应, 并且, 这些新生的神经元还能够迁移到病灶区代替已死亡的神经元而发挥功能^[26,27]. 一些神经退行性疾病如帕金森氏痴呆 (PD)、早老性痴呆 (AD)、亨廷顿氏舞蹈病 (HD) 等患者的脑内也享有神经元再生的现象^[28,29], 研究还发现癫痫也能够激活成年脑内的神经前体细胞而产生新生神经元^[30]; 而抑郁症的发生以及抗抑郁药的治疗作用均与成年海马神经元再生相关^[31,32]. 随着研

究的不断深入, 成年中枢神经再生的调控机理将不断被阐明, 而最终将为各种脑损伤及神经退行性疾病的治疗带来变革性的发展.

参 考 文 献

- 1 Reynolds B A, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 1992, **255** (5052):1707-1710
- 2 Richards L J, Kilpatrick T J, Bartlett P F. De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (18):8591-8595
- 3 Gage F H, Coates P W, Palmer T D, *et al.* Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (25): 11879-11883
- 4 Palmer T D, Takahashi J, Gage F H. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci*, 1997, **8** (6):389-404
- 5 Kay J N, Blum M. Differential response of ventral midbrain and striatal progenitor cells to lesions of the nigrostriatal dopaminergic projection. *Dev Neurosci*, 2000, **22** (1-2): 56-67
- 6 Mao L, Wang J Q. Gliogenesis in the striatum of the adult rat: alteration in neural progenitor population after psychostimulant exposure. *Dev Brain Res*, 2000, **130** (1): 41-51
- 7 Mao L, Lau Y S, Petroske E, *et al.* Profound astrogenesis in the striatum of adult mice following nigrostriatal dopaminergic lesion by repeated MPTP administration. *Dev Brain Res*, 2001, **131**(1-2): 57-65
- 8 Gould E, Reeves A J, Graziano M, *et al.* Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science*, 1999, **286** (5439): 548-552
- 9 Zhao M, Momba S, Janson A. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100** (13): 7925-7930
- 10 Gross C G. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat Rev Neurosci*, 2000, **1**: 67-73
- 11 Mao L, Wang J Q. Adult neural stem/progenitor cells in neurodegenerative repair. *Acta Physiol Sin*, 2003, **55**(3):233-244
- 12 Abrous D N, Koehl M, Le Moal M. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev*, 2005, **85** (2): 523-569
- 13 王晓民, 徐晓明, 陈军等, 主编. 神经科学进展(三). 北京: 高等教育出版社, 2004. 135-145
- 14 Wang X M, Xu X M, Chen J, *et al.* *Progress in Neuroscience (III)*. Beijing: Beijing Higher Education Press. 2004. 135-145
- 15 Berridge M J. Neuronal calcium signaling. *Neuron*, 1998, **21**(1): 13-26
- 16 Sah D W, Ray J, Gage F H. Regulation of voltage- and ligand-gated currents in rat hippocampal progenitor cells *in vitro*. *J Neurobiol*, 1997, **32** (1): 95-110
- 17 Ciccolini F, Collins Y J, Sudhoelter J, *et al.* Local and global spontaneous calcium events regulate neurite outgrowth and onset of GABAergic phenotype during neural precursor differentiation. *J Neurosci*, 2004, **23** (1):103-111
- 18 Palmer T D, Markakis E A, Andrew R, *et al.* Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci*, 1999, **19**(19): 8487-8489

- 18 Deisseroth K, Singla S, Toda H, *et al.* Excitation-neurogenesis coupling in adult neural stem/progenitor cells. *Neuron*, 2004, **42** (4): 535~552
- 19 Porter N M, Thibault O, Thibault V, *et al.* Calcium channel density and hippocampal cell death with age in long-term culture. *J Neurosci*, 1997, **17** (14): 5629~5639
- 20 Li X M, Li J G, Hu P, *et al.* An improved method for acute isolation of neurons from the hippocampus of adult rats suitable for patch-clamping study. *Acta Physiol Sin*, 2004, **56** (1): 112~117
- 21 韩济生. 神经科学原理. 北京: 北京医科大学出版社, 1999. 228~238
Han J S. Theory of Neuroscience. Beijing: Beijing Medical University Press, 1999. 228~238
- 22 Iwai M, Sato K, Omori N. Three steps of neuroal stem cells development in gerbil dentate gyrus after transient ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002, **22** (4): 411~419
- 23 Kempermann G. Regulation of adult hippocampal neurogenesis implications for novel theories of major depression. *Bipolar Disorders*, 2002, **4** (1): 17~33
- 24 Roy N S, Wang S, Jiang L, *et al.* *In vitro* neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult human hippocampus. *Nature Med*, 2000, **6** (3): 271~277
- 25 West A E, Chen W G, Dalva M B, *et al.* Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(20): 11024~11031
- 26 Arvidsson A, Collin T, Kirik D, *et al.* Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med*, 2002, **8** (9): 963~970
- 27 Nakatomi H, Kuriu T, Nakafuku M, *et al.* Regeneration of hippocampal pyramidal neuron after ischemia brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell*, 2002, **110** (4): 429~441
- 28 Jin K, Peel A, Mao X, *et al.* Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **101** (7): 343~347
- 29 Curtis M, Penney E, Pearson A. Increased cell proliferation and neurogenesis in the adult human Huntington's disease brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100** (15): 9023~9027
- 30 Parent J M, Yu T W, Leibowitz R T, *et al.* Dentate granule neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult hippocampus. *J Neurosci*, 1997, **17** (10): 3727~3738
- 31 Kempermann G. Regulation of adult hippocampal neurogenesis implications for novel theories of major depression. *Bipolar Disorders*, 2002, **4** (1): 17~33
- 32 Santarelli L, Saxe M, Gross C, *et al.* Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*, 2003, **301** (5634): 805~809

Hippocampal Neural Progenitor Cells Express Functional L-Type Calcium Channel in Adult Rat*

FENG Jin-Li, HU De-Hui, CHEN Ming, TIAN Ying-Hong, SHI Zhi-Min,

YANG Jian-Ming, ZHU Xin-Hong, LI Xiao-Wen, GAO Tian-Ming**

(Department of Anatomy, Department of Physiology, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract In order to establish an *in vitro* attachment culture method for obtaining highly purified neural progenitor cells (HPCs) from the hippocampus of adult Wistar rats and to identify functional L-type calcium channels in those cells, the adult rat hippocampal tissue was dispersed into a single cell suspension, and the dissociated cells were cultured in serum-free DMEM/F12 medium containing epidermal growth factor (EGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), N2 and B27 supplement. After six passages, the proportion of nestin-positive cells reached to 99.9%. Following fourteen-days culture in differentiation medium, neuron-like and astrocyte-like cells were observed, which expressed β -tubulin III (Tuj1) and glial fibrillary acidic protein (GFAP), respectively. Immunofluorescent double labeling and Western blot showed an expression of Cav1.2 α_1 C and Cav1.3 α_1 D subunits in HPCs, and functional L-type calcium channels were confirmed by confocal microscopic Ca²⁺ imaging. Moreover, L-type calcium channel currents were recorded in those cells by using whole-cell patch clamp techniques. The results indicated that adult rat HPCs express functional L-type calcium channels.

Key words adult rat, hippocampus, neural progenitor cells, L-type calcium channel

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30330240, 30125013, 30371772), The Natural Science Foundation of Guangdong Province (37047), Cheung King Scholars Programme to TM Gao.

**Corresponding author. Tel/Fax: 86-20-61648216, E-mail: tgao@fimmu.com

Received: April 11, 2005 Accepted: April 30, 2005