

星形胶质细胞的兴奋对神经元树突丝运动的调节机制*

柳浦青¹⁾ 竺可青^{1, 2)**}

(¹⁾ 浙江大学医学院病理学与病理生理学系, 杭州 310058; ²⁾ 浙江大学医学院神经生物学系, 杭州 310058)

摘要 神经元树突上树突丝(filopodia)的形成及其运动, 是神经元探索胞外环境、寻找突触前膜结构的一种方式. 为研究星形胶质细胞的兴奋对神经元树突上树突丝运动的调节机制, 在与神经元混合培养的星形胶质细胞中转染光敏感通道(channelrhodopsin-2). Channelrhodopsin-2 是一种可表达于细胞膜表面的非选择性阳离子通道, 可被特定模式的蓝光激活, 导致大量钙离子内流并进一步诱发星形胶质细胞产生钙波, 从而实现了选择性激活星形胶质细胞的目的. 研究结果显示, 在混合培养的神经元与星形胶质细胞模型中, 激活的星形胶质细胞可以抑制神经元 filopodia 的运动, 与外源性 ATP、谷氨酸的作用效果一致. 这表明星形胶质细胞激活后可能通过释放 ATP 和谷氨酸等递质来抑制神经元 filopodia 的运动.

关键词 光敏感通道, 星形胶质细胞, 钙波, 神经元, 树突丝, ATP, 谷氨酸

学科分类号 R338, Q2

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00497

星形胶质细胞作为中枢神经系统中最主要的胶质细胞, 不仅对神经元起到营养、支持和保护的作用, 而且参与神经元与胶质细胞之间的信号调节, 对神经元的发育也有重要的影响^[1-2]. 神经元发育过程中树突上树突丝(filopodia)的形成及其运动, 是神经元探索胞外环境、寻找突触前结构的一种方式, 在建立树突和轴突的联系、形成突触过程中具有非常重要的生理意义^[3-5]. 但是星形胶质细胞是否对神经元树突丝发育有重要的影响, 可否通过释放信号分子来调节树突丝的发生和运动, 目前还不清楚. 原因之一是, 没有一个可行的方案可以通过选择性激活星形胶质细胞, 观察星形胶质细胞的兴奋对神经元树突丝的形成和运动状况的影响.

光敏感通道(channelrhodopsin-2, ChR2)是一个 7 次跨膜的非选择性阳离子通道蛋白, 在 470 nm 左右的激发光激活后可通透大量钙离子, 从而引起细胞内钙升高和细胞膜去极化^[6]. ChR2 在神经系统研究中已有较多应用, 主要用于诱发神经元动作电位, 从而研究神经元活动在特定生理过程中的作用, 如神经元活动在突触形成的调节作用^[7-8]. 本研究首次用 ChR2 转染星形胶质细胞, 在神经元与

胶质细胞混合培养的条件下, 实现了用激光选择性激活胶质细胞的方法, 为进一步研究星形胶质细胞对神经元树突丝发育的影响提供了可能.

1 材料与方法

1.1 细胞培养

星形胶质细胞取自新生 SD 大鼠的皮层细胞, 在含 10% FBS 的 MEM 培养液中培养. 胶质细胞长满培养瓶后, 置摇床过夜, 使小胶质细胞脱落, 贴在瓶壁上就是纯度达 95% 以上的星形胶质细胞. 神经元细胞取自 E17 天的 SD 大鼠胚胎皮层细胞, 用含 2% B27, 1% 谷氨酰胺的 Neurobasal 培养液中培养. 培养前小玻片先进行多聚赖氨酸包被, 然后放入培养皿. 细胞均放在 37℃、5% CO₂ 的培养箱培养.

* 国家自然科学基金资助项目(30770677).

** 通讯联系人.

Tel: 0571-88206272, E-mail: zhukeqing@zju.edu.cn

收稿日期: 2011-03-09, 接受日期: 2011-06-09

1.2 材料

DMEM, MEM, FBS, F12, Neurobasal, B27, Glutamate 购自 GIBCO 公司; 脂质体转染试剂 Lipofect2000 购自 Invitrogen 公司; 电转试剂盒购自德国 Amaxa 公司; ATP 和谷氨酸购自美国 Sigma 公司; 钙指示剂 Rhod2 购自 Invitrogen 公司; 玻片购自美国 Warner instrument 公司; ChR2、mCherry、GFP 质粒由中国科学院上海神经生物研究所惠赠。

1.3 神经元和星形胶质细胞的质粒转染及混合培养模型

纯培养神经元: 先将 E17 的 SD 大鼠胚胎皮层取出, 在 0.25% 胰蛋白酶中消化 12 min, 然后用血清终止, 加入适当的培养基轻轻吹打组织, 使成均匀的细胞悬液。取含 1×10^6 个细胞的细胞悬液离心后弃去上清, 留下细胞沉淀。电转液与 5 μ g GFP 质粒混合静置 5 min 后与细胞混匀并转移至电转杯。电转后将细胞转移至在培养箱预热的 D/F 培养液, 1 h 后换成 Neurobasal。

纯培养星形胶质细胞: 取纯化后的星形胶质细胞, 用 0.25% 胰酶消化约 3 min, 并用血清终止。调整细胞浓度, 使接种在培养皿内的细胞密度在 60%~70%。继续培养 2~3 天, 使细胞密度达 80% 左右。将 5 μ g ChR2 与 5 μ l 脂质体分别与 OPTIM 混合静置 5 min, 再将两者混匀静置 20 min, 然后加入到星形胶质细胞的培养皿内, 3 h 后换成新的 MEM 培养液(含 2% B27)。

神经元与星形胶质细胞混合培养: 原代培养的星形胶质细胞转染 ChR2, 24 h 或 48 h 后将电转 mCherry 的神经元接种到星形胶质细胞上, 1 h 之后换成 Neurobasal 培养液。

1.4 星形胶质细胞胞内钙检测及 ChR2 的光刺激模式

将纯培养及混合培养的细胞在激光共聚焦显微镜下观察(Fluoview 500; Olympus, Tokyo, Japan), 鉴定质粒表达情况。转染 ChR2 的星形胶质细胞培养液用终浓度为 5 μ mol/L 的 Rhod2 在 37℃ 的培养箱孵育 30~40 min。激光共聚焦显微镜的激发光选择 488 和 cy3, 物镜为 20 $\times$ 。圈出转入 ChR2 的星形胶质细胞进行序列扫描(Timelapse), 参数为: Interval, 3.0 s; Number, 500; Total time, 25 min; Resolution, 512 $\times$ 512。为了防止 Rhod2 荧光猝灭和激活星形胶质细胞, 实验时激发光强度调低, HeNe: 0.5%~1.0%, 荧光信号放大倍数调高,

PMT: 700~800。光刺激星形胶质细胞前, 我们用 cy3 扫描星形胶质细胞约 3 min, 未见钙兴奋, 再给予光刺激。刺激 ChR2 的光源来自 LASER-WAVE II 和石英光纤(南京宝光公司提供), 选用的刺激模式为 470 nm, 1 Hz, 800 ms/次, 10 次/组, 功率计测得到达细胞表面的激光强度约为 10 mW/mm²。

1.5 对神经元 filopodia 运动的观察

DIV4~DIV5 纯培养神经元给予 100 μ mol/L ATP 或者 100 μ mol/L 谷氨酸, 观察这两个递质对神经元 filopodia 运动的影响。混合培养的神经元, 同样选择 DIV4~DIV5 这个发育阶段进行观察, 所选的神经元细胞靠近转染光敏感通道的星形胶质细胞并且树突与轴突形态区别明显。同时星形胶质细胞给予光刺激, 刺激模式同上。观察纯培养神经元激发光选择 488, 观察混合培养的神经元激发光选择 cy3, 物镜为 60 $\times$ 水镜。Filopodia 的观察采用 Timelapse 序列扫描, 参数为: Interval, 10 s; Number, 121; Total time, 20 min; Resolution, 2048 $\times$ 2048。

1.6 数据分析

星形胶质细胞胞内钙的测量, 先通过 Metamorph 软件分析得到图片中该细胞的平均荧光强度的大小, 再通过 Excel 软件分析计算可以得到胞内钙含量随着时间的变化情况。Filopodia 运动能力的强弱以 filopodia 端点的运动速度来衡量, 通过 Metamorph 软件可以得到每两张图之间端点的移动距离, 再通过 Excel 计算出端点的运动速度。两组数据间的统计学差异采用 *t*-test。

2 结 果

2.1 星形胶质细胞和神经元的质粒表达鉴定

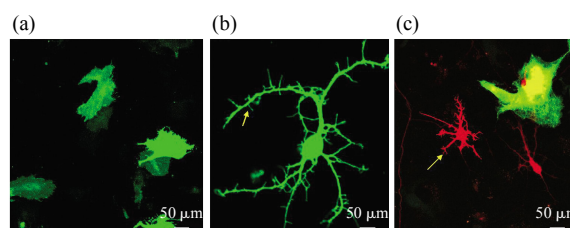


Fig. 1 Fluorescence image of cDNA expression in astrocytes and neurons

(a) ChR2-GFP expressed in astrocytes. (b) GFP expressed in DIV4 neurons. (c) ChR2-GFP expressed in astrocytes and mCherry expressed in neurons.

图 1a 显示 ChR2-GFP 转染 24 h 后在星形胶质细胞中的表达情况. ChR2-GFP 脂质体转染效率在 20%~30%, 在星形胶质细胞膜表面可以稳定表达一周之久. 图 1b 是体外培养第 4 天的神经元, 电转 GFP 神经元 filopodia 形态结构. 该时间为神经元树突发育的关键时期, 树突上 filopodia 的运动性比较强^[9]. 图 1c 为星形胶质细胞和神经元混合培

养的模型, 星形胶质细胞转染带绿色荧光蛋白的 ChR2, 神经元转染带红色荧光蛋白的 mCherry. 黄色箭头所指为树突上的 filopodia.

2.2 星形胶质细胞 ChR2 激活后胞内钙升高及其不同的钙波形式

图 2a 中所圈出的黄色细胞是转染带绿色荧光 ChR2 且用红色荧光染料 Rhod2 标记胞内钙的星形

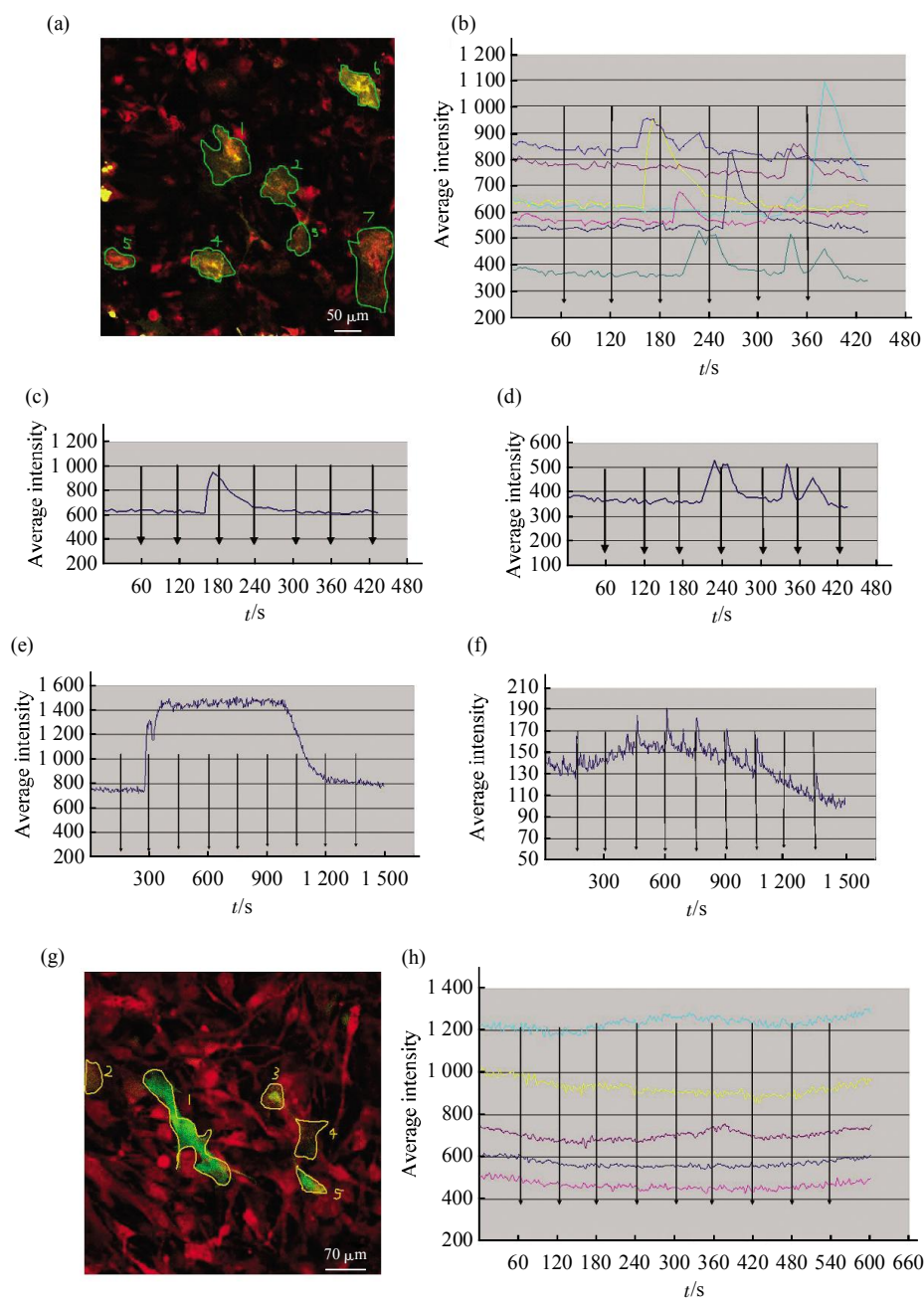


Fig. 2 Intracellular Ca²⁺ of astrocytes increase after activation of ChR2 by 470 nm blue light and show some different dynamic patterns

(a) Rhod2 combined with intracellular Ca²⁺ of astrocytes emitting red fluorescence; astrocytes transfected with ChR2 emitting green fluorescence. (b) The selected astrocytes response to the light stimulation with different dynamic of Ca²⁺ concentration. (c~f) Four major dynamic patterns of astrocyte Ca wave after stimulation. (g) Rhod2 combined with intracellular Ca²⁺ of astrocytes emitting red fluorescence; astrocytes transfected with GFP. (h) Astrocytes transfected with GFP have no response to light stimulation.

胶质细胞. 在实验开始时, 我们先用激光共聚焦显微镜 cy3 通道对细胞扫描一段时间. 当星形胶质细胞钙荧光基线稳定约 3 min 左右, 我们再给予光刺激. 为了防止 Rhod2 荧光猝灭和激活星形胶质细胞, 实验时激发光强度调低, HeNe: 0.5%~1.0%, 荧光信号放大倍数调高, PMT: 700~800. 图中每个箭头代表一组刺激, 刺激模式为 470 nm, 1Hz, 800 ms/次, 10 次/组. 刺激后星形胶质细胞内 Ca^{2+} 浓度呈现出不同的变化方式, 相应钙波如图 2b 所示. 我们发现 ChR2 激活引起星形胶质细胞不同程度的兴奋表现为不同形式的钙波, 主要有 4 种形式: a. 图 2c 一次短时程钙波, 即光刺激过程中星形胶质细胞出现一次短暂的钙波. 一次短时程钙波的出现时间并不一致, 可能出现于一组刺激之后也可能出现在多组刺激之后. b. 图 2d 多次短时程钙波, 光刺激过程中星形胶质细胞出现多次

短暂的钙波. 一组或多组光刺激后诱发细胞产生两个或两个以上钙波, 钙波的个数和出现形式不固定. c. 图 2e 单次长时程钙波, 光刺激过程中星形胶质细胞出现一次较长时间钙波. 单个钙波的维持时间一般在 60 s 之内, 但是也发现少数细胞被激活后胞内钙处于高浓度水平长达 10 多分钟. d. 图 2f 多次即时钙波, 光刺激过程中每组刺激都能立即诱发一个钙波. 这种钙波与光刺激对应性较好, 每组刺激对应一个钙波, 这种情况下光控开关控制星形胶质细胞的钙活动. 图 2g, 2h 这组对照实验表明, 星形胶质细胞的兴奋是由于刺激光敏感通道而非 GFP 引起的.

2.3 ATP、谷氨酸及兴奋的星形胶质细胞对神经元 filopodia 运动的影响

对神经元树突上 filopodia 运动的观察结果如图 3 所示. filopodia 的端点随着 filopodia 的伸长、

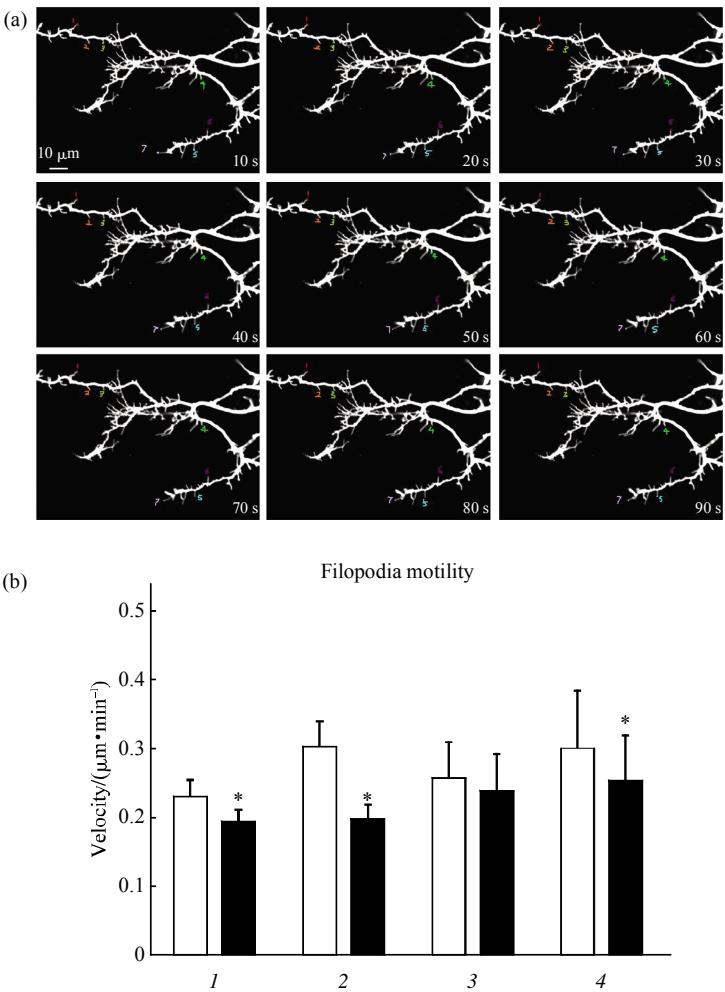


Fig. 3 Astrocytic Ca^{2+} waves induced by ChR2 activation as well as ATP and glutamate inhibit filopodia motility
(a) The positions of filopodia tips change with filopodia extension or retraction, or switching. (b) To evaluate motility of filopodia, confocal images were collected for 20 min at 10 s intervals. The velocity of the filopodia movement and distance of the filopodia from the start point were analyzed by Metamorph. 1: ATP; 2: GLU; 3: Light sti GFP; 4: Light sti ChR2. □: Before; ■: After.

缩短和摆动等活动方式在平面内移动. 以 filopodia 端点的运动作为 filopodia 活动的参考指标进行观察. 整个 Timelapse 过程由时间间隔为 10 s 的 121 幅图组成, 给药前或者光刺激前观察 10 min, 给药后或者光刺激后再观察 10 min. 图 3a 组图展示的是一个神经元 filopodia 随着时间变化其端点位置相应发生了变化. 用 Matamorph 软件选取该神经元上的 7 个 filopodia, 跟踪这些 filopodia 的端点. 每个 filopodia 在两幅图之间的移动距离可以由软件读出, filopodia 的运动速度就是移动距离除以时间.

ATP 组: filopodia 的平均运动速度是来自 13 个神经元的 40 个 filopodia, 给药前的运动速度为 $(0.23 \pm 0.03) \mu\text{m}/\text{min}$, 给药后的运动速度为 $(0.19 \pm 0.02) \mu\text{m}/\text{min}$, $P < 0.05$; 谷氨酸组: filopodia 的平均运动速度是来自 13 个神经元的 41 个 filopodia, 给药前的运动速度为 $(0.30 \pm 0.03) \mu\text{m}/\text{min}$, 给药后的运动速度为 $(0.20 \pm 0.02) \mu\text{m}/\text{min}$, $P < 0.05$; 光刺激转染 GFP 的星形胶质细胞: filopodia 的平均运动速度是来自 11 个神经元的 40 个 filopodia, 刺激前的运动速度为 $(0.26 \pm 0.05) \mu\text{m}/\text{min}$, 刺激后的运动速度为 $(0.25 \pm 0.05) \mu\text{m}/\text{min}$, $P > 0.05$; 光刺激转染 ChR2 的星形胶质细胞: filopodia 的平均运动速度是来自 11 个神经元的 40 个 filopodia, 刺激前的运动速度为 $(0.30 \pm 0.08) \mu\text{m}/\text{min}$, 刺激后的运动速度为 $(0.25 \pm 0.06) \mu\text{m}/\text{min}$, $P < 0.05$. 结果表明, ATP 和谷氨酸这两种神经递质, 可以抑制神经元 filopodia 的运动, ChR2 介导的星形胶质细胞的兴奋也可以抑制神经元 filopodia 的运动, 并且可能是通过释放 ATP 和谷氨酸实现的.

3 讨 论

以往研究星形胶质细胞对神经元发育的影响存在一些限制, 原因之一是缺乏选择性和特异性强的刺激手段. 我们首次将 ChR2 转入星形胶质细胞, 通过激活 ChR2 来激活星形胶质细胞, 从而观察星形胶质细胞对神经元 filopodia 运动的影响. 通过特定模式的光刺激选择性激活星形胶质细胞的方法与药物激活星形胶质细胞的方法相比, 特异性强、选择性高. 如果使用 ATP 和谷氨酸刺激星形胶质细胞, 不仅对星形胶质细胞产生作用, 而且对混合培养中的神经元也产生刺激作用. 光刺激则只对星形胶质细胞产生, 刺激作用一旦停止, 则相当于排除外界的干扰作用. 另外, 我们在实验过程中发

现, 光刺激激活的星形胶质细胞经过一段时间的恢复可被再次激活的现象. 这一现象未有记录, 提示我们光敏感通道的激活在星形胶质细胞很可能也具有可逆性.

星形胶质细胞的兴奋一般表现为钙波的形式^[10-11]. 激活 ChR2 引起的星形胶质细胞的兴奋, 其钙波形式多种多样, 原因可能有以下几点. a. 星形胶质细胞胞内 Ca^{2+} 升高的机制比较复杂. 当 ChR2 激活开放后, 大量的胞外 Ca^{2+} 内流激活星形胶质细胞, 使星形胶质细胞处于激活状态, 内质网和线粒体内储存的 Ca^{2+} 也随即释放到胞浆内^[12]. b. ChR2 的刺激模式, 要根据 ChR2 光学异构特性作进一步的优化. 对 ChR2 的光刺激模式, 在不同的研究中有不同的选择^[13-14]. 本实验中主要设计了 5 种刺激模式: (1) 470 nm, 1 Hz, 200 ms/次, 6 次/组; (2) 470 nm, 1 Hz, 250 ms/次, 10 次/组; (3) 470 nm, 1 Hz, 500 ms/次, 10 次/组; (4) 470 nm, 1 Hz, 800 ms/次, 10 次/组; (5) 470 nm, 1 Hz, 800 ms/次, 30 次/组. 实验结果显示第(3)种和第(4)种刺激模式较容易激活转染 ChR2 的星形胶质细胞. c. 导入星形胶质细胞的 ChR2 质粒的量还不能得到控制, 因此在细胞上表达量不均一. 我们实验室已有神经元光敏感通道的转基因小鼠, 但本实验需要星形胶质细胞带光敏感通道, 目前尚在联系中.

谷氨酸是星形胶质细胞与神经元之间互相交流的主要信号分子, 胞外谷氨酸可通过 AMPA 受体抑制神经元轴突上 filopodia 的运动^[15-16]. 研究发现, 外源性 ATP 和谷氨酸能抑制神经元树突上 filopodia 的运动, 同时光刺激激活的星形胶质细胞也抑制神经元树突上 filopodia 的运动. 星形胶质细胞的兴奋伴随着 ATP、谷氨酸等递质的释放^[17-18], 我们考虑 ChR2 被激活而兴奋的星形胶质细胞可能是通过释放 ATP、谷氨酸等递质从而发挥其抑制神经元树突 filopodia 运动的功能. 由星形胶质细胞转染 GFP 的对照实验结果可知, 光刺激本身不会引起星形胶质细胞的兴奋, 也不会对神经元树突丝运动产生影响.

本研究通过 ChR2 的应用选择性地激活星形胶质细胞, 发现星形胶质细胞兴奋后可能通过释放的 ATP 和谷氨酸抑制神经元 filopodia 的运动, 为研究星形胶质细胞是否通过信号分子调节神经元树突发育提供了前期探索.

参 考 文 献

- [1] Haber M, Zhou L, Murai K K. Cooperative astrocyte and dendritic spine dynamics at hippocampal excitatory synapses. *J Neurosci*, 2006, **26**(35): 8881–8891
- [2] Nishida H, Okabe S. Direct astrocytic contacts regulate local maturation of dendritic spines. *J Neurosci*, 2007, **27**(2): 331–340
- [3] Kayser M S, Nolt M J, Dalva M B. EphB receptors couple dendritic filopodia motility to synapse formation. *Neuron*, 2008, **59**(1): 56–69
- [4] Li H, Chen G, Zhou B, *et al.* Actin filament assembly by myristoylated alanine-rich C kinase substrate-phosphatidylinositol-4,5-diphosphate signaling is critical for dendrite branching. *Mol Biol Cell*, 2008, **19**(11): 4804–4813
- [5] Yoshihara Y, De Roo M, Muller D. Dendritic spine formation and stabilization. *Curr Opin Neurobiol*, 2009, **19**(2): 146–153
- [6] Nagel G, Szellas T, Huhn W, *et al.* Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(24): 13940–13945
- [7] Schoenenberger P, Zhang Schäfer Y P, Oertner T G. Channelrhodopsin as a tool to study synaptic transmission and plasticity. *Exp Physiol*, 2011, **96**(1): 34–39
- [8] Zhang Y P, Holbro N, Oertner T G. Optical induction of plasticity at single synapses reveals input-specific accumulation of α CaMK II. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(33): 12039–12044
- [9] Portera-Cailliau C, Pan D T, Yuste R. Activity-regulated dynamic behavior of early dendritic protrusions: evidence for different types of dendritic filopodia. *J Neurosci*, 2003, **23**(18): 7129–7142
- [10] Scemes E, Giaume C. Astrocyte calcium waves: what they are and what they do. *Glia*, 2006, **54**(7): 716–725
- [11] Schipke C G, Kettenmann H. Astrocyte responses to neuronal activity. *Glia*, 2004, **47**(3): 226–232
- [12] Reyes R C, Parpura V. The trinity of Ca^{2+} sources for the exocytotic glutamate release from astrocytes. *Neurochem Int*, 2009, **55**(1–3): 2–8
- [13] Alilain W J, Li X, Horn K P, *et al.* Light-induced rescue of breathing after spinal cord injury. *J Neurosci*, 2008, **28**(46): 11862–11870
- [14] Nikolic K, Grossman N, Grubb M S, *et al.* Photocycles of channelrhodopsin-2. *Photochem Photobiol*, 2009, **85**(1): 400–411
- [15] Chang S, De Camilli P. Glutamate regulates actin-based motility in axonal filopodia. *Nat Neurosci*, 2001, **4**(8): 787–793
- [16] Prithviraj R, Kelly K M, Espinoza-Lewis R, *et al.* Differential regulation of dendrite complexity by AMPA receptor subunits GluR1 and GluR2 in motor neurons. *Dev Neurobiol*, 2008, **68**(2): 247–264
- [17] Koizumi S, Fujishita K, Inoue K. Regulation of cell-to-cell communication mediated by astrocytic ATP in the CNS. *Purinergic Signal*, 2005, **1**(3): 211–217
- [18] Santello M, Volterra A. Synaptic modulation by astrocytes *via* Ca^{2+} -dependent glutamate release. *Neuroscience*, 2009, **158** (1): 253–259

The Effects of Activity of Astrocytes on Neuron Dendritic Filopodia Motility*

LIU Pu-Qing¹⁾, ZHU Ke-Qing^{1,2)**}

¹⁾ Department of Pathology and Pathophysiology, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

²⁾ Department of Neuroscience, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract The motile behavior of dendritic filopodia is a way by which neurons explore extracellular environment and could serve to connect dendrites with axons forming early synapses. It is unclear whether activity of astrocyte affects the motility of neuronal filopodia. To explore this possibility, astrocytes were transfected with channelrhodopsin-2 in a neuron-astrocyte mix culture model first. Expressing on cytoplasmic membrane, channelrhodopsin-2 was activated by pulses of blue light and caused activation of astrocyte, in which different dynamic patterns of Ca^{2+} current were shown after the stimulation. Activated astrocytes have an inhibitory effect on filopodia motility similar to extracellularly administrated ATP and glutamate. This indicates that activated astrocytes could probably inhibit dendritic filopodia motility through releasing ATP or glutamate. A method of selectively activating astrocytes in the mix culture of neuron and astrocyte was established, which provides a novel way for studying astrocytic signal regulation of neuronal development.

Key words channelrhodopsin-2, astrocyte, calcium wave, neuron, filopodia, ATP, glutamate

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00497

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30770677).

**Corresponding author.

Tel: 86-571-88206272, E-mail: zhukeqing@zju.edu.cn

Received: March 9, 2011 Accepted: June 9, 2011