

L-型钙通道对大鼠胚胎海马神经干细胞增殖和分化的调控*

冯锦丽^{1)**} 胡德辉²⁾ 高天明^{3)**}

(¹)解放军总医院第二附属医院神经内科, 北京 100091; ²南方医科大学基础医学院生理学教研室, 广州 510515;

³南方医科大学基础医学院解剖学教研室, 神经生物学教研室, 广州 510515)

摘要 为鉴定大鼠胚胎海马神经干细胞(NSCs)是否表达功能性的L-型钙通道, L-型钙通道是否参与了对大鼠胚胎NSCs增殖和分化调控. 分离孕15天Wistar大鼠胚胎海马组织, 制成单细胞悬液, 利用无血清培养技术, 在添加bFGF、EGF、N-2和B27 supplement的DMEM/F12培养液中进行培养. 采用细胞免疫荧光法对原代至第5代细胞进行鉴定, 均有巢蛋白(nestin)的表达, 第3代nestin阳性细胞比例达97%. 把培养的细胞诱导分化5天后, 这些细胞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; 细胞免疫印迹结果显示, NSCs表达L-型钙通道的Cav1.2 α_1 C亚单位, 而无Cav1.3 α_1 D亚单位的表达; 利用全细胞膜片钳技术在NSCs上记录到了L-型钙电流, 证明了NSCs所表达的L-型钙通道具有功能. 进一步对细胞进行药理学干预, 发现L-型钙通道的激活不仅可以促进胚胎NSCs的增殖, 而且使增殖的NSCs向神经元分化的比例显著增加. 以上结果表明, Wistar大鼠胚胎海马NSCs表达功能性的L-型钙通道; L-型钙通道参与了胚胎NSCs增殖和分化的调控.

关键词 大鼠, 胚胎神经干细胞, L-型钙通道, 增殖, 分化

学科分类号 Q256, Q189

神经干细胞(NSCs)是指: 来源于神经组织, 具有自我更新和无限增殖能力, 可以分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的细胞^[1]. Gage^[2]将神经干细胞的特性概括为三点: a. 可生成神经组织或来源于神经系统; b. 具有自我更新能力; c. 可通过不对称细胞分裂产生新细胞.

神经再生是近几年神经科学领域的研究热点之一, 由于NSCs具有高度的自我更新能力、低免疫源性^[3,4]、多潜能分化、迁移功能及良好的组织融合性^[5~7]等特性, 因此NSCs为治疗中枢神经系统肿瘤, 急、慢性神经系统损伤以及多种神经系统疾病如多发性硬化、Alzheimer病、Parkinson病、Huntington病、缺血性脑损伤提供了一个很好的平台.

研究表明, 细胞的内在程序(细胞周期因子: Rb、p107、p130、necdin、E2F; 基因: bHLH、Mash1、Ngns、NeuroD、Math2; Notch信号途径)和外部环境因素(激素和神经类固醇; 神经递质和神经调节质; 营养因子; BMP)共同参与了NSCs

增殖和分化的调控^[8], 但是其具体机制仍不明了, 人们对NSCs增殖和分化的调控机制仍在不懈的探寻中.

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^[9]. 业已证明, 成年大鼠HPCs存在功能性的L-型钙通道^[10], 且L-型钙通道Cav1.2 α_1 C和Cav1.3 α_1 D亚单位在成年大鼠海马不同亚区的神经元中呈现差异性表达^[11]. Gage在培养的胚胎E16天的海马前体细胞(HPCs)上记录到了电压依赖性钙电流^[12], 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^[13]. 因此

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

** 通讯联系人.

Tel: 020-61648216, Fax: 020-61648216; 010-66775053

E-mail: tianminggao@tom.com, fengjinli886@tom.com

收稿日期: 2006-07-17, 接受日期: 2006-11-02

我们推测大鼠胚胎海马 NSCs 可能存在功能性的 L-型钙通道, 并可能参与了对大鼠胚胎 NSCs 增殖和分化调控。

1 材料与方法

1.1 实验动物

孕 15 天的 Wistar 大鼠, 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 公司); 谷氨酰胺、EGF、Human 重组 bFGF、多聚鸟氨酸、胰蛋白酶、Acctuase、DAPI、Nifedipine、MK-801、KCl(Sigma 公司); 特级胎牛血清(Hyclone 公司); BrdU、Monoclonal Mouse anti-Nestin、Monoclonal Mouse anti-Tuj1、GFAP (Chemicon 公司)、Monoclonal Mouse anti- Doublecortin (Dcx 公司); TRITC-Donkey anti Sheep-IgG、TRITC-Donkey anti Mouse-IgG、FITC-Goat anti Mouse-IgG、FITC-Goat anti Rabbit-IgG、正常山羊血清、正常驴血清(Jackson 公司); Sheep anti BrdU (Bioscience 公司); Rabbit antiCav1.2 α_1 C、antiCav1.3 α_1 D、BayK8644 (Alomone Labs 公司)。

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, 显微镊(上海), DP70 摄像头(Olympus), 细胞培养瓶(Greiner Bio-one)。

1.4 NSCs 分离培养及传代

参照文献[12, 14]。怀孕 15 天的 Wistar 大鼠, 10%水合氯醛腹腔麻醉, 断头处死, 取胎鼠放置于冰解剖液中, 解剖显微镜下分离胎鼠海马, 去除软脑膜和血管, D-Hank's 液漂洗 3 次, 吸管吹打, 37℃ 0.125%胰酶溶液中消化 15 min 左右, 加入含 10%胎牛血清(FBS)的 DMEM/F12 终止消化, 600 r/min 离心 5 min, 弃上清, DMEM/F12 重悬细胞沉淀, 然后 500 目筛网过滤, 按 1×10^5 接种于培养瓶中, 同时添加 1%的 N₂、2% B27、20 μ g/L 的 EGF 和 bFGF (干细胞培养基 SCM)。待生长至 150 个细胞大小的克隆球时, 进行细胞传代。收集细胞悬液离心, 弃上清, 加入 Acctuase 溶液, 37℃ 下消化 5~10 min, 用 1 ml 移液枪轻轻吹打, 收集细胞悬液, 600 r/min 离心 5 min, 弃上清, SCM 重悬沉淀物, 计数细胞密度, 接种于新的培养瓶。每

5~7 天传代一次。以下实验均取自第 3~5 代细胞。

1.5 神经干细胞的分化

把含有克隆球或消化成单细胞的悬液, 接种于包被有 poly-ornithine (40 mg/L) 的盖玻片上, 30 min 后细胞开始贴壁并伸出突起, 2 h 后撤去培养基中的生长因子, 并加入 1% FBS。每 2 天换液 1/2, 诱导第 5 天, 细胞分化成具有神经元和胶质细胞形态的细胞, 突起交织成网。

1.6 细胞免疫荧光

取 NSCs 接种于包被有 poly-ornithine 的培养板或培养皿, 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 TrintonX-100。加入一抗(nestin 1 : 1 000; BrdU 10 mg/L; Tuj1 1 : 200; GFAP 5 mg/L; Dcx 1 : 200) 4℃冰箱过夜或 37℃ 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℃ 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。最后细胞核用 5 mg/L DAPI 标记 5 min。

1.7 免疫印记

将生长有克隆球的细胞悬液于 4℃ 3 000 g 离心 5 min, 弃上清, 将沉淀用预冷的 PBS 充分洗涤, 4℃ 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℃ 以 1 000 g 离心 10 min 后, 所得上清液转入超速离心管, 4℃ 以 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% Triton X-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℃ 以 10 000 g 离心 30 min。收集所得上清, 加入等体积 2 × 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, 以封闭液 (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℃ 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,以 ECL 检测。

1.8 电生理

全细胞膜片钳记录^[9,15]:将生长有 NSCs 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 $2.5 \sim 3.5 \text{ M}\Omega$) 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($\text{G}\Omega$ 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 $+40 \text{ mV}$ 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 (mmol/L): Cesium Methanesulfonate 145, HEPES 10, EGTA 11, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5, ATP-Mg 5, Leupitin hemisulfate 0.1。电极外液组成 (mmol/L): Choline chloride 75, TEA-Cl 50, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2, CsCl 5, BaCl_2 5, Glucose 10, tetrodotoxin 0.001 和 10 HEPES。 Ba^{2+} (5 mmol/L) 是作为载离子。所有溶液均用直径为 $0.22 \mu\text{m}$ 的滤膜过滤, pH 用 TEA-OH 调节到 7.3。

1.9 统计学分析

试验均重复 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 NSCs 的分离培养及鉴定

镜下观察可见,接种于培养瓶中的细胞呈圆形,大小不一,折光性强。接种后 24 h,培养液中可见大量的单个悬浮细胞,有的呈分裂相,部分细胞贴壁,有突起,显示为神经元或胶质细胞形态。培养第 3 天,可见大量大小不等悬浮生长的细胞克隆球,培养第 5~7 天绝大部分悬浮生长的细胞克隆球细胞数目达到 150 个左右(图 1a),此时需要及时传代,否则克隆球内部的细胞由于缺乏营养将死

亡,死亡的细胞崩解后产生大量的有毒成分,近而影响其他细胞的生长。以后每 5~7 天传代一次。除原代培养外,以后传代时细胞消化均用 Accttase, Accttase 作用温和,对细胞损伤少,不需用含血清的培养基中止消化反应,减少了外源性因素对细胞生物学性状的影响^[10]。

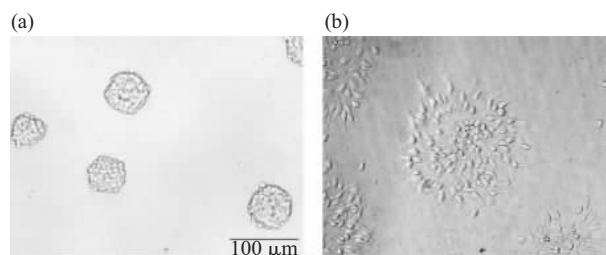


Fig. 1 Suspending and attaching of neurospheres

(a)The morphology of neurospheres formed by neural stem cells *in vitro* culture. (b)The right shows neurospheres having attached for 24 h ($\times 320$).

取原代或传代后的细胞悬液接种于铺有 poly-ornithine 的培养皿中,接种后 4 h 细胞克隆球贴壁,此时免疫荧光鉴定发现克隆球中均有细胞表达 Nestin 抗原(图 2a)。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,Nestin 主要分布于细胞的胞浆和突起,图 2b 中显示的是克隆球消化成单个细胞后 Nestin 的表达及分布。

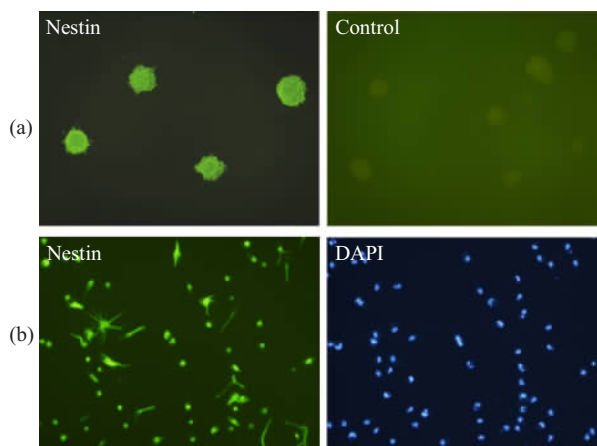


Fig. 2 Identification of neurospheres and single neural stem cell

(a)Labeled neurospheres. (b) Labeled single neural stem cell. Green represents Nestin-positive cells. Cell nuclei are labeled with DAPI (blue). The right of (a) is control. ($\times 320$).

2.2 NSCs 的诱导分化和鉴定

细胞克隆球贴壁 1 天后,可见细胞从克隆球中游离出来,多为不规则的多边形,细胞较小,突起较明显,胞体饱满,边缘发亮,折光性强(图 1b).继续培养至第 5 天,克隆球中的细胞基本全部游离出来,单层平铺于培养皿皿底,排列紧密,有突起.克隆球细胞之间建立了广泛的联系.随着培养时间的延长,可见皿底出现神经网络样结构.

把克隆球消化成单细胞悬液,接种于包被有 poly-ornithine 的盖玻片上,30 min 后细胞开始贴壁并伸出突起,2 h 后撤去培养基中的生长因子,并加入 1% FBS,诱导 NSCs 分化.每 2 天换液 1/2,诱导第 5 天,可见细胞分化成具有神经元和胶质细胞形态的细胞,突起交织成网(图 3a).免疫荧光结果表明,细胞有 Tuj1(图 3b)和 GFAP(图 3b)蛋白的表达.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干细胞.

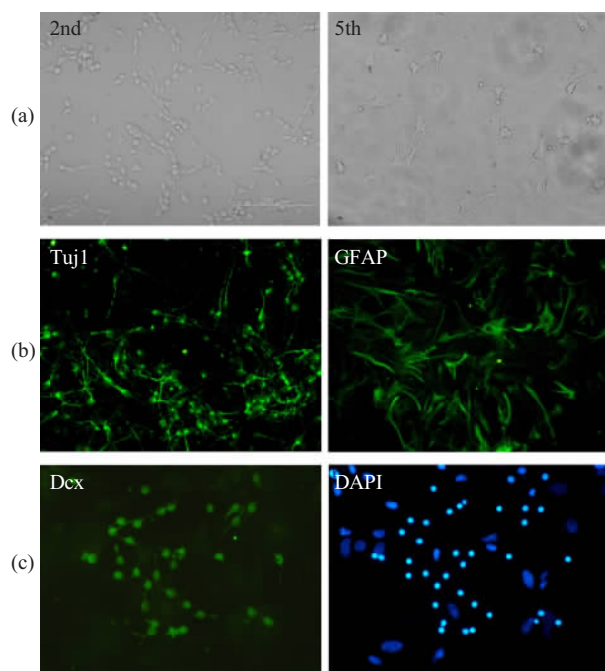


Fig. 3 The morphology and identification of differentiated cells

(a) Morphology of differentiated cells at the 2nd and 5th day of culture in differentiation medium. (b) The left is Tuj1-positive cells (green) which represent neurons. The right is GFAP-positive cells (green) which represent astrocytes. (c) The green represents Dcx-positive cell. Cell nuclei are labeled with DAPI in the same field (blue). ($\times 320$).

2.3 NSCs 上表达功能性 L-型钙通道

2.3.1 L-型钙通道蛋白的表达.由于 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^[6],在神经元中主要为 Cav1.2 α_1 C 和 Cav1.3 α_1 D.因此,我们在所培养的 NSCs 上仅对这 2 种亚单位进行鉴定.细胞免疫荧光结果显示无 Cav1.2 α_1 C 和 Cav1.3 α_1 D 蛋白的表达.而采用免疫印记的方法来进行检测显示,有 Cav1.2 α_1 C 蛋白的表达,而无 Cav1.3 α_1 D 的表达(图 4).我们对这一现象进行分析,认为可能是在胚胎 NSCs 阶段,细胞膜上 Cav1.2 α_1 C 蛋白表达量少,采用细胞免疫荧光的方法检测不到的缘故.下面的实验记录到的 L-型钙电流较成熟神经元小很多,也可能与 L-型钙通道在胚胎 NSCs 上表达量少有关.

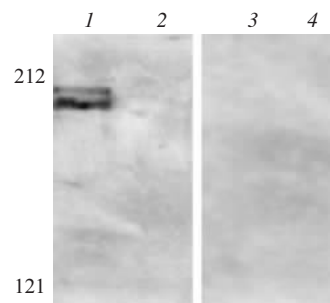


Fig. 4 Western blot analysis of Cav1.2 α_1 C and Cav1.3 α_1 D

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.

2.3.2 L-型钙电流的记录.为证明 NSCs 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 10 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.当电压从 -30 mV 直接去极化到 10 mV,平均电流为 (50 ± 7.15) pA,特异性的 L-型钙通道激动剂 BayK8644 (1 μ mol/L)使该电流显著增加至 (65 ± 8.35) pA ($n = 5$).与正常对照组比,差异显著 ($P < 0.05$),而 1 μ mol/L 的特异性 L-型钙通道阻断剂 Nifedipine 可明显使该电流降低到正常对照组的 45% 左右 ($n = 5$),10 μ mol/L Nifedipine 则完全抑制该电流(图 5).

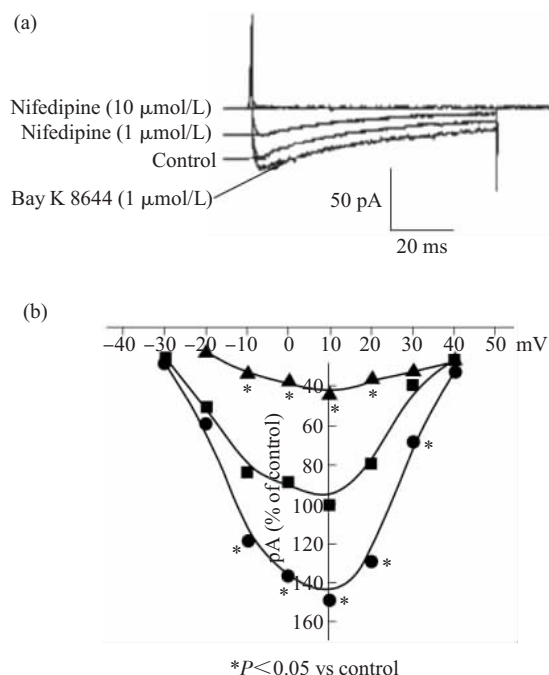


Fig. 5 Whole cell L-type voltage-gated calcium currents recorded from cultured NSCs

(a) An example showing the effects of Nifedipine and BayK8644 on L-type Ca^{2+} currents. (b) Current-voltage (I - V) curves before and after addition of Nifedipine and BayK8644. $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$: Nifedipine (1 $\mu\text{mol/L}$); $\bullet$ — $\bullet$: Bay K 8644 (1 $\mu\text{mol/L}$); $\blacksquare$ — $\blacksquare$: Control.

2.4 L-型钙通道参与了对 NSCs 增殖和分化的调控

2.4.1 L-型钙通道参与了对 NSCs 增殖的调控. 从以上实验我们已经知道, 大鼠胚胎海马 NSCs 表达了功能性的 L-型钙通道, 那么这些通道究竟具有哪些功能, 是否参与了对 NSCs 增殖的调节, 将是我们进一步探讨的内容. 由于 NSCs 增殖经过若干代后生物学特性会发生一定的改变, 因此我们下面的实验全部取自第 2~5 代的 NSCs. 实验分 5 组: 对照组、KCl 组、KCl + BayK8644 组、KCl + Nifedipine 组、KCl + MK-801 组. 我们发现, 细胞外液中加入 20 mmol/L 的 KCl 作用 12 h 后, 与对照组相比 BrdU⁺ 细胞百分比显著增加 ($P < 0.01$); 同时加入 KCl 和特异性 L-型钙通道激动剂 1 $\mu\text{mol/L}$ BayK8644, BrdU⁺ 细胞百分比也显著增加, 但与单独加入 KCl 相比增加没有显著意义. 若培养基中同时加入 KCl 和特异性 L-型钙通道阻断剂 10 $\mu\text{mol/L}$ Nifedipine 后, 与对照组相比, BrdU⁺ 细胞百分比没有显著意义变化, 说明 Nifedipine 能完全阻断由 KCl 所导致的 BrdU 阳性细胞的增加 ($P < 0.01$), 以上实验结果表明功能性的 L-型钙通道在体外促进了大鼠胚胎海马 NSCs 的增殖. 而特异性

的 NMDA 受体拮抗剂 10 $\mu\text{mol/L}$ MK-801 则不能阻断 KCl 的这种作用 (图 6a), 提示我们 NMDA 受体可能没有参与胚胎海马 NSCs 的增殖过程.

2.4.2 L-型钙通道参与了对 NSCs 分化的调控. 为进一步探讨 L-型钙通道的功能, 我们又做了以下实验来研究 L-型钙通道是否参与了对 NSCs 的分化调控. 为了细胞计数方便, 我们用 Dcx 来标记新生的神经元, Dcx 是一种微管相关蛋白, 仅表达于正在迁移和分化的神经元, 主要分布于正在分化的神经元的胞浆和轴突^[17], 目前广泛用于未成熟神经元的鉴定 (图 3c). 实验分 4 组: 对照组、KCl 组、KCl + Nifedipine 组、KCl + Nifedipine + MK-801 组 (图 6b). 我们首先对处于增殖阶段的 NSCs 进行药理学干预, 然后再诱导细胞的分化. 从图 6 中可以发现, 与对照组相比, KCl 能显著增加 Dcx⁺ 的细胞百分比 ($P < 0.05$), 而 Nifedipine 则能阻断由 KCl 所导致的 Dcx⁺ 细胞的增加 ($P > 0.05$). 而 KCl + Nifedipine + MK-801 组则显著降低了 Dcx⁺ 的细胞百分比 ($P <$

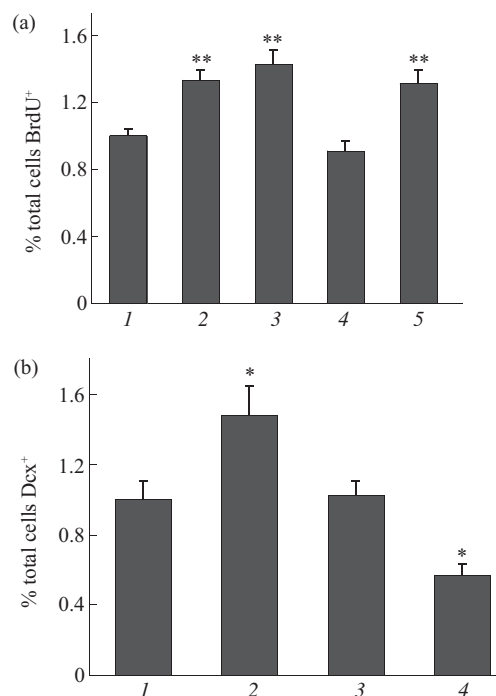


Fig. 6 Summary graph of L-type calcium channel and NMDA receptor modulation result

Graph (a) shows that L-type calcium channel promoted the proliferation of NSCs, but NMDA receptor did not participate in this process. 1: Control; 2: KCl; 3: KCl+BayK; 4: KCl+Nif; 5: KCl+MK-801. (b) suggests that both L-type calcium channel and NMDA receptor are involved in the process of differentiation of NSCs. The asterisk indicates a statistically significant difference ($P < 0.05$, $**P < 0.01$). 1: Control; 2: KCl; 3: KCl+Nif; 4: KCl+Nif+MK-801.

0.05). 以上结果表明, L-型钙通道在体外促进了大鼠胚胎海马 NSCs 向神经元方向分化, NMDA 受体也可能参与了这一过程.

3 讨 论

目前, NSCs 的体外分离培养技术已趋于成熟, 国内外神经科学领域的学者, 在 NSCs 的免疫组织或细胞化学特性以及增殖、迁移和分化的研究上做了大量的工作, 并取得了丰硕的成果. 但是到目前为止, 关于 NSCs 的电生理方面的探讨还很少, 且不够深入. 我们知道, 电信号传导是生物体细胞间信息传递的主要方式, 尤其在神经系统, 绝大多数的信息传输是依赖神经元之间的活跃电生理活动得以实现, 因此, 离子通道是神经元完成各种功能的结构基础, 离子通道的数量及特征可以影响神经元的功能.

Gage 在培养大鼠 E16 天的 HPCs 细胞膜上记录到了电压依赖性的 I_{Na} 和 I_{Ca} 、NMDA 电流、GABA 电流^[10]; Stewart 等^[18]从新生大鼠 SVZa 分离出的前体细胞上记录到了不同类型的 I_K ; Cai 等^[19]在 2004 年发现大鼠 E10.5 天的 NSCs 细胞膜上表达了 TTX 敏感和非敏感的钠通道、钙通道和至少 3 种类型的钾通道. 南方医科大学神经生物学教研室冯锦丽等^[10]于 2005 年在成年大鼠 HPCs 上观察到功能性 L-型钙通道的表达, 而且杨建明等^[11]发现 L-型钙通道 $Cav1.2\alpha_1C$ 和 $Cav1.3\alpha_1D$ 亚单位在成年鼠海马不同亚区的神经元中的表达呈现差异性. 本实验又在大鼠 E15 的海马 NSCs 上记录到了 L-型钙电流. 以上结果表明, NSCs 表达了多种离子通道, 钙通道中的 L-型钙通道可能在 NSCs 发育的过程中起着重要的作用.

Li 等^[20]在急性分离的成年大鼠海马神经元上记录到的 L-型钙电流大小为 (1439 ± 1058) pA; Gage 记录到的电压依赖性的钙电流平均为 (61 ± 9) pA (E16, P3-5, 生长因子为 RS/glia)^[12], 而 Cai 等^[19]记录到的平均为 (97.3 ± 8.3) pA (E10.5, 生长因子为 EGF), 电流大小有异可能与细胞的来源、代数及细胞培养的外部条件不同有关, 这同时也说明细胞膜上的钙通道的密度和数量随发育变化而发生改变, 这与 Pravettoni 等^[21]的报道是一致的. 本实验记录的 L-型钙电流平均大小为 (50 ± 7.15) pA 电流大小(P3-5), 与 Gage 记录到的同代细胞电压依赖性的钙电流 (61 ± 9) pA 大小相近, 说明了 NSCs 膜上电压依赖性的钙电流绝大部分成分可能是由 L-型

钙电流组成. 冯锦丽等^[10]记录的成年 HPCs 上 L-型钙电流平均为 (100 ± 12.35) pA, 进一步提示 L-型钙通道可能在 NSCs 发育过程中起着重要作用.

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的表达, 如 c-Fos, 脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 和 Bcl-2 等^[22]. Ciccolini 等^[13]发现自发性的钙活动调节了神经前体细胞向神经元分化过程中轴突的生长和 GABA 的表达. Deisseroth 等^[23]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, 本实验又发现, L-型钙通道参与了胚胎 NSCs 体外增殖和向神经元方向的分化, 表明 L-型钙通道可能在 NSCs 向神经元分化的过程中扮演了重要角色. L-型钙通道的激活可引起多种生理效应: 如钙动作电位, 钙介导的细胞内事件, 包括神经递质的释放^[24]. 究竟是哪种效应参与了 NSCs 增殖和分化的调控, 将是我们以后深入研究的问题.

Arvidsson 等^[25]发现 NMDA 受体介导了中风后的成年大鼠齿状回神经再生. 在 NSCs 向神经元分化调控实验中我们发现, 与 KCl+Nifedipine 组相比, KCl+Nifedipine+MK-801 组进一步降低了 Dcx 阳性细胞百分比, 说明 NMDA 也可能参与了 NSCs 向神经元分化的过程, 而且可能是促进了 NSCs 向神经元分化, 这与 Arvidsson 等^[25]的报道是一致的. NMDA 受体激活使 O-2A 胶质祖细胞和由 NSCs 分化的神经元中的钙离子浓度升高^[26,27], Brazel^[28]研究发现, 缺血/缺氧导致了细胞外谷氨酸盐浓度增加, 通过 Kainate 和 group 2 mGluR, 而不是 NMDA 受体, 促进了来源于新生鼠 SVZ 的前体细胞体外存活和增殖. 以上研究提示我们 NMDA 受体参与了神经再生的调节, 而且可能在 NSCs 向神经元分化过程中与 L-型钙通道具有共同的下游作用机制——细胞内钙离子浓度升高.

随着研究的不断深入, 我们相信关于神经再生机制的神秘面纱将最终被揭开, 从而使神经系统疾病的治疗发生巨大变革.

致谢 感谢李勃兴硕士在免疫印迹实验上给予的无私帮助.

参 考 文 献

- 1 McKay R. Stem cells in the central nervous system. Science, 1997,

- 276 (5309): 66271
- 2 Gage H F. Mammalian neural stem cells. *Science*, 2000, **287** (5457): 1433~1438
- 3 Wobus A M, Boheler K R. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev*, 2005, **85** (2): 635~678
- 4 Davis A A, Temple S. A self-renewing multipotential stem cell in the embryonic rat cerebral cortex. *Nature*, 1994, **372** (6503): 263~266
- 5 Reynolds B A, Tetzlaff W, Weiss S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci*, 1992, **12** (11): 4565~4574
- 6 Walsh C, Cepko C L. Clonally related cortical cells show several migration patterns. *Science*, 1988, **241** (4871): 1342~1345
- 7 Takahashi M, Palmer T D, Takahashi J, *et al.* Widespread integration and survival of adult-derived neural progenitor cells in the developing optic retina. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 1998, **12** (6): 340~348
- 8 Koehl M, Moal M L. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev*, 2005, **85** (2): 523~569
- 9 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
- 10 冯锦丽, 胡德辉, 陈明, 等. 成年大鼠海马神经前体细胞表达功能性的 L-型钙通道. *生物化学与生物物理进展*, 2005, **32** (9): 822~828
Feng J L, Hu D H, Chen M, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2005, **32** (9): 822~828
- 11 杨建明, 胡德辉, 朱心红, 等. L-型钙通道 α_1 亚单位成年鼠海马神经元上的差异性表达. *第一军医大学学报*, 2005, **25** (10): 1225~1227
Yang J M, Hu D H, Zhu X H, *et al.* *Journal of Military Medical University*, 2005, **25** (10): 1225~1227
- 12 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
- 13 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
- 14 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
- 15 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
- 16 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. *Principles in Neuroscience*. Beijing: Beijing Medical University Publishing house, 1999. 228~238
- 17 Francis F, Koulakoff A, Boucher D, *et al.* Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron*, 1999, **23** (2): 247~256
- 18 Stewart R R, Zigova T, Luskin M B. Potassium currents in precursor cells isolated from the anterior subventricular zone of the neonatal rat forebrain. *J Neurophysiol*, 1999, **81** (1): 95~102
- 19 Cai J L, Cheng A W, Luo Y Q, *et al.* Membrane properties of rat embryonic multipotent neural stem cells. *J Neurochem*, 2004, **88** (1): 212~226
- 20 Li X M, Li J G, Hu P, *et al.* Changes in single L-type calcium channel currents in CA1 pyramidal neurons of rat hippocampus after transient forebrain ischemia. *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30** (5): 755~760
- 21 Pravettoni E, Bacci A, Coco S, *et al.* Different localizations and functions of L-type and N-type calcium channels during development of hippocampal neurons. *Dev Elopmental Biology*, 2000, **227** (2): 581~594
- 22 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
- 23 Deisseroth K, Singla S, Toda H, *et al.* Excitation-neurogenesis coupling in adult neural stem/progenitor cells. *Neuron*, 2004, **42** (4): 535~552
- 24 莱维坦, 卡茨玛克. *神经元: 细胞和分子生物学*. 北京: 科学出版社, 2001. 83~87
Levitan I B, Kaczmarek L K. *The Neuro Cell and Molecular Biology*. Translated by Shu S Y, Bao X M. Science Press, 2001. 83~87
- 25 Arvidsson A, Zaal K, Olle L. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke. *Euro J Neurosci*, 2001, **14** (1): 10~18
- 26 Wang C, Prolong W F, Schulz M F, *et al.* Functional N-methyl-D-aspartate receptors in O-2A glial precursor cells: a critical role in regulating polysialic acid-neural cell adhesion molecule expression and cell migration. *J Cell Biol*, 1996, **135** (6): 1565~1586
- 27 Yamada K, Hisatsunea T, Uchinob S, *et al.* NMDA receptor mediated Ca^{2+} responses in neurons differentiated from p53 - / - immortalized murine neural stem cells. *Neuroscience Letters*, 1999, **264** (1~3): 165~167
- 28 Brazel C Y, Nunez J L, Yang Z, *et al.* Glutamate enhances survival and proliferation of neural progenitors derived from the subventricular zone. *Neuroscience*, 2005, **131** (1): 55~65

L-type Calcium Channel Modulates Proliferation and Differentiation of Neural Stem Cells From Rat Embryonic Hippocampus *In vitro**

FENG Jin-Li¹⁾**, HU De-Hui²⁾, GAO Tian-Ming³⁾**

¹⁾Department of Neurology, The Second Affiliated Hospital of General Hospital of PLA, Beijing 100091, China;

²⁾Department of Physiology, Basic Medical Institute, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

³⁾Department of Anatomy, Department of Neurobiology, Basic Medical Institute, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract In order to identify whether functional L-type calcium channels are expressed in neural stem cells (NSCs) from rat embryonic hippocampus, and whether L-type calcium channels participate in the modulation of proliferation and differentiation of NSCs, the rat embryonic 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), N-2 and B27 supplement. Immunofluorescent labeling showed an expression of nestin-positive cells. Following five-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. Western blot analysis showed an expression of Cav1.2 α_1 C subunits in NSCs, but no Cav1.3 α_1 D subunits. Moreover, L-type calcium channel currents were recorded in those cells by using whole-cell patch clamp techniques. It was found that activation of L-type calcium channels promotes proliferation and differentiation to neuronal type of NSCs. The results indicated that rat embryonic hippocampal NSCs express functional L-type calcium channels, L-type calcium channels modulate proliferation and differentiation of NSCs.

Key words rat, embryonic neural stem cells, L-type calcium channel, proliferation, differentiation

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

**Corresponding author. Tel: 86-20-61648216, Fax: 86-20-61648216; 86-10-66775053, E-mail: tianminggao@tom.com; fengjinli886@tom.com

Received: July 17, 2006 Accepted: November 2, 2006