

基础研究

锂剂对神经干细胞分化的影响及相关机制探究

朱振中¹, 贺西京², 金东旭¹, 厉强³, 张长青¹

(1 上海交通大学附属第六人民医院骨科 200233 上海市; 2 西安交通大学第二附属医院骨科 710004 陕西省西安市;

3 山东省青岛市市立医院骨科 266011 山东省青岛市)

【摘要】目的:探讨锂剂对神经干细胞(neural stem cells, NSCs)分化的调控作用及机制, 为优化 NSCs 移植治疗 SCI 疗效提供理论基础。**方法:**以 Fischer 344 新生大鼠侧脑室下区培养的 NSCs 为细胞模型, 首先采用 Cyquant DNA 定量法测定对照组及 0.5、1、3、5mM 锂剂处理组在分化条件下的生长曲线; 同时结合星形胶质细胞(AST)标记物 GFAP 及 S100 β , 行神经元标记物 Tuj1 细胞免疫化学染色, 应用 Western Blotting 蛋白定量法检测不同浓度锂剂对 NSCs 分化终产物中神经元及 AST 总量的影响, 同时采用 TUNEL 凋亡检测法寻找锂剂的非毒性浓度区间, 以排除混杂因素。最后通过与其下游经典作用通路 GSK3 β 抑制剂 SB216763 对 NSCs 增殖、分化、凋亡的作用比较, 探究锂剂的可能作用机制。**结果:**TUNEL 凋亡检测显示体外锂剂的非毒性浓度区间为 (0~3mM); 在此范围内, 1mM 锂剂处理组中 Tuj1⁺细胞总数较对照组提高约 1.47 ± 0.06 倍 ($P < 0.05$), SB216763 处理组 Tuj1⁺细胞总数提高约 2.25 ± 0.07 倍 ($P < 0.05$); 3mM 锂剂处理组中 GFAP⁺细胞总数为对照组的 0.55 ± 0.02 倍 ($P < 0.05$), S100 β 与 GFAP 染色结果趋势一致, SB216763 处理组中 GFAP⁺细胞总数为对照组的 0.90 ± 0.06 倍 ($P > 0.05$)。**结论:**锂剂可明显促进 NSCs 向神经元方向分化并 AST 的分化, 其最佳作用浓度分别为 1mM 及 3mM, 前者可能是通过锂剂下游经典作用通路 GSK3 β 实现, 而后者可能通过 GSK3 β 旁路途径实现。

【关键词】 锂剂; 神经干细胞; 分化调控

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2013.12.09

中图分类号: Q813.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2013)-12-1101-08

Effect and mechanism of lithium on the differentiation of neural stem cells/ZHU Zhenzhong, HE Xijing, JIN Dongxu, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2013, 23(12): 1101-1108

【Abstract】Objectives: To investigate the effect and its underlying mechanism of lithium on modulating neural stem cells differentiation. **Methods:** NSCs were isolated from the subventricular zone of neonatal Fischer 344 Rat. The growth curve of differentiating NSCs was detected by using Cyquant assay. Immunocytochemistry staining combining with BrdU incorporation assay were used to detect neuronal marker Tuj1 and astrocytes marker GFAP and S100 β , the percentage, as well as the total numbers of each lineage were also estimated. TUNEL apoptosis assay was also performed to rule out the lithium toxicity. Finally, lithium and GSK3 β inhibitor-SB216763's effect on regulating neuronal and astrocytes were tested and compared. **Results:** Lithium concentration lower than 3mM was non-toxic in differentiating NSCs. 1mM lithium stimulated neuronal production by 1.47 ± 0.06 folds ($P < 0.05$), while SB216763 increased by 2.25 ± 0.07 folds ($P < 0.05$), 3mM lithium reduced GFAP⁺ cell number to 0.55 ± 0.02 folds ($P < 0.05$) compared with control group, S100 β staining result showed the similar tendency, conversely, SB216763 did not reduce GFAP⁺ cell number, with 0.90 ± 0.06 folds compared with control group ($P > 0.05$). **Conclusions:** Lithium exerts dual roles on NSCs's differentiation. It stimulates neurogenesis at concentration of 1mM with its inhibition on downregulating GSK3 β pathway, meanwhile suppresses astroglialogenesis at concentration of 3mM, which may be mediated by non-canonical pathway.

【Key words】 Lithium; Neural stem cells; Differentiation**【Author's address】** Department of orthopedics, the Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 100035, China

基金项目: 国家自然科学基金(项目编号: 81200944/H0910); 中国博士后基金(项目编号: 2012M520044)

第一作者简介: 男(1981-), 住院医师, 医学博士, 研究方向: SCI 修复

电话: (021)64369181-56047 E-mail: zzz1129@gmail.com

通讯作者: 贺西京 E-mail: xijing_h@vip.tom.com

脊髓损伤(SCI)后功能重建是世界性难题,尽管神经干细胞(NSCs)的发现和移植为SCI修复带来了新的希望^[1],但其中仍存在诸多难题需要攻克。如移植的NSCs绝大部分分化为星形胶质细胞(AST)^[2],这不仅降低了NSCs移植治疗效率,还有可能引起胶质瘢痕的形成,阻碍损伤修复。如何定向调控NSCs分化方向,促进其向神经元分化的同时抑制其向AST的分化,提高移植治疗效率,是该领域的热门话题。锂剂作为经典的抗抑郁药在临床应用已有100多年的历史^[3],最近对于NSCs的研究揭示了此经典药物的新特性。研究发现锂剂可促进NSCs增殖^[4]并可诱导其向神经元方向分化^[5],该作用可能是通过对糖原合成酶激酶(GSK3 β)的抑制,造成其下游Wnt/ β -catenin信号通路的激活^[6],最终影响了调控细胞周期蛋白Cyclin D1功能而实现,其促神经元分化可能与脑源性神经营养因子(BDNF)释放有关^[7]。然而,虽有研究提示锂剂可抑制NSCs向AST的分化,但其确切效果尚存在争议,相关机制研究亦尚未开展。本研究综合多项指标观察了锂剂对NSCs分化,尤其是对AST分化的调控作用,并对其相关机制进行了初步探讨。旨在为解决NSCs移植后过度胶质分化问题,提高NSCs移植疗效寻找新的探索。

1 材料与方法

1.1 实验材料

DMEM/F12培养基(Invitrogen),Neural BasalTM培养基(Gibco),B27培养基(1:50,Gibco, USA),氯化锂(LiCl,Sigma-Aldrich),SB216763(Tocris),Poly-L-lysine(PLL,100mg/L,Sigma-Aldrich),Laminin(10 μ g/ml,Invitrogen),CyQUANT^R Cell Proliferation Assay Kit(Invitrogen),Fluoroskan Ascent 荧光检测仪(Thermo Labsystem); GFAP(Rabbit Polyclonal,1:200,Dako),Tuj1(mouse monoclonal,1:1000,Covance),BrdU(10 μ M, Sigma-Aldrich),BrdU单克隆抗体(Mouse, monoclonal, 1:1000, Sigma-Aldrich),Hoechst 33342(Molecular Probes, 5 μ g/ml)。抗小鼠或兔FITC/TRITC偶联的荧光二抗(FITC,1:400;TRITC,1:800,Invitrogen); DeadEndTM Fluorometric TUNEL 检测系统(Promega),Leica倒置相差显微镜,Zeiss Axiovert 200M型荧光显微镜以及Zeiss LSM510激光共

聚焦显微镜。

1.2 实验方法

1.2.1 新生大鼠侧脑室下区NSCs的取材及体外培养 参照Lois等^[8]的方法对新生Fischer 344大鼠侧脑室下区取材并制成单细胞悬液,步骤简述如下:新生大鼠(P0-P1)断头处死后在无菌条件下逐层暴露并取出脑组织,在预冷的D-Hanks液中剥离脑组织表面膜性组织及血管后,沿脑矢状线中点用剃须刀额状切开脑组织,暴露侧脑室下区,在体视显微镜下分离侧脑室壁下组织。漂洗后用火焰抛光过的弯头巴斯德吸管吹打数次,经200目筛网过滤制成单细胞悬液。最后转入NSCs培养基中(DMEM/F12+B27+10ng/ml EGF+10ng/ml bFGF),按 2×10^5 /ml的密度将细胞培养于10cm培养皿中,5%CO₂于37℃培养并定期将细胞置于OLYMPUS倒置相差显微镜下进行形态学观察并采集图像,观察比较不同时期细胞生长过程中形态结构的变化。此细胞定义为P0,并以此类推。每天加入10 $\times$ NSCs培养基,隔天换液。P0细胞培养至第7天时传代,P1后细胞培养方法同上,每隔3~4d传代,此研究采用的细胞均来源于P1-P2。

1.2.2 NSCs的分化条件及步骤 NSCs传代后先培养于NSCs培养基中,24h后用预温的DMEM/DF12清洗并加入NSCs分化培养基NeuralBasalTM及B27,隔天半量换液,定期观测细胞生长状况,于设定时间终止分化用以相关指标检测。细胞种植环境及总数取决于实验目的,细胞增殖实验:细胞接种于96孔板中,起始接种密度为 10^4 /孔;分化及凋亡检测:接种于预先由PLL/laminin包被的圆玻片上,置于24孔板中,起始接种密度为 2×10^4 /盖玻片;Western-Blotting检测:接种于6孔板,接种密度为 10^6 /孔。细胞分为三个处理组,分别为对照组(NB27)、氯化锂处理组(NB27+不同浓度LiCl:0.5mM、1mM、3mM、5mM)以及SB216763处理组(NB27+10 μ M SB216763)。

1.2.3 Cyquant Assay 检测NSCs的增殖 NSCs在上述分化培养基中培养至预定时间点(第1、3、5、7天)后,弃去分化培养基并清洗,将细胞冷冻于-70℃超低温冰箱中,待检测周期完毕后收集所有时间点细胞,室温解冻,每孔加入100 μ l裂解液,(溶液组成:1 $\times$ 细胞裂解液,180 mM NaCl,

1mM EDTA 以及 1.35 Kunitz units/ml RNase), 常温下裂解 1h。保留裂解液, 避光条件下加入荧光标记物(溶液组成: 1×细胞裂解液, 1×荧光标记物, 180mM NaCl, 1mM EDTA 以及 1.35 Kunitz units/ml RNase), 室温下孵育 5min。利用 Fluoroskan Ascent 荧光检测仪, 检测 $485 \pm 10\text{nm}$ 激发光下 $530 \pm 12.5\text{nm}$ 荧光强度。最后根据标准曲线将荧光量转化为细胞数或相对值并进行组间比较。

1.2.4 细胞免疫组织化学染色或 BrdU 免疫组化法检测增殖 NSCs 分化至第 7 天时取出玻片, 用 4%多聚甲醛固定细胞 20min, 对于 BrdU 增殖检测, 在 NSCs 分化至第 5 天时加入终浓度为 $10\mu\text{M}$ 的 BrdU 直至分化结束, 4%多聚甲醛固定后首先采用 0.1M 稀盐酸 37°C 变性 30min, 0.01M PBS 液冲洗后加入 10%的 NGS (内含 0.3%的 Triton-X-100) 封闭 1h, 然后加入相应的检测抗体 (兔 GFAP, 1:200, DAKO; 兔或鼠 Tuj1, 1:1000, Covance; 鼠 BrdU 单克隆抗体, 1:1000, Sigma-Aldrich) 于 4°C 过夜孵育, PBS 液再次冲洗后于避光条件下加入针对相应检测抗体的荧光二抗 (抗鼠 TRITC 偶联, 1:800 及抗兔 FITC 偶联, 1:400), 室温孵育 2h 后加入 Hoechst 33342 ($5\mu\text{g}/\text{ml}$) 复染细胞核作用 10min, PBS 冲洗后用 Aqua-Mount 封片剂封片。同批次细胞设立 3 组玻片, 每组玻片利用 Zeiss Axiovert 200M 型荧光显微镜随机选择视野功能于 200 倍镜下由计算机随机选择 5 个视野 (共 15 个视野), 采集相应激发光下阳性细胞 (FITC: 488nm , TRITC: 542nm) 及 Hoechst33342 (405nm) 标记信号, 利用 ImageJ 图像分析软件自动分析计算细胞核总数, 半自动分析计算目的抗原阳性细胞总数, 各谱系细胞比例数为相同视野下目的抗原阳性细胞占有所有 Hoechst33342 阳性细胞核数的比值。某组中某谱系细胞实际数量=该组细胞总数×某谱系细胞占总数的百分比。

1.2.5 TdT 介导的 dUTP 缺口末端标记技术 (TUNEL) 凋亡检测 细胞在分化培养基中培养至预定时间点后 (第 1、3、5 天) 首先采用 4%多聚甲醛 (无甲醇) 4°C 条件下固定细胞 25min, 0.01M PBS 清洗后利用 0.2% Triton X-100 溶液浸泡细胞 5min 进行细胞膜破膜处理。每玻片滴加 $100\mu\text{l}$ 平衡缓冲液, 室温静置 5~10min。避光条件下解冻试剂盒中核苷酸混合物并制备足量的 rTdT 孵育

缓冲液 ($50\mu\text{l}/\text{玻片}$, 全程操作在冰上进行), 滴加 $50\mu\text{l}$ rTdT 孵育缓冲液, 避光条件下于 37°C 孵育 60min, 使核苷酸于片段与 DNA 充分结合。稀释试剂盒中 $20\times\text{SSC}$ 至 $2\times$, 去处玻片上的 rTdT 孵育缓冲液并将玻片浸泡于足量 $2\times\text{SSC}$ 中 15min 以终止反应。0.01M PBS 充分清洗玻片以去处未结合的 fluorescein-12-dUTP, 封片后立即于荧光显微镜下检测 (目标 fluorescein-12-dUTP 绿色荧光: $520 \pm 20\text{nm}$; 细胞核 Hoechst33342 检测: 460nm)。

1.2.6 Western-Blotting 检测 NSCs 中 GFAP 的表达 NSCs 细胞分化至第 7 天时弃去原培养液, 每孔加 2ml 4°C 预冷的 PBS (0.01M pH7.2~7.3) 洗涤 3 次后加入 $200\mu\text{l}$ RIPA 细胞裂解液并于冰上裂解 15min。 4°C 下 12000rpm 离心 5min。利用 BSA 标准曲线比色分析法测定样品蛋白浓度并确定上样量 ($5\mu\text{g}/\text{孔}$)。恒定电流 25~40mA 下电泳 2~3h, 后转于 PVDF 膜上 (15V , 1h)。TBST 适当清洗后置入 5%脱脂奶粉溶液中封闭 1h, 一抗 4°C 过夜 (GFAP, 1:1000, Cell Signaling), TBST 再次清洗后加入抗兔辣根过氧化物酶结合二抗 (1:10000, Abcam), 室温孵育 1h, 清洗后采用 ECL plus Western Blotting 检测系统发光, 随后将膜放入 X-线片夹中进行曝光 (10s 至 20min), 采用 AFP X-Ray 胶片自动冲洗机显影, 最后扫描胶片并采用 ImageJ 图像处理系统分析目标带的净光密度值并根据相关统计方法进行组间比较。

1.3 统计学分析

数据以平均值±标准差的形式表述, 独立实验重复 3 次。组间采用非配对 t 检验或单因素方差分析 (ANOVA) 进行统计学分析, 多组间比较辅以 Dunnett's 后检验, $P < 0.05$ 定义为有显著性差异。

2 结果

2.1 锂剂对分化条件下 NSCs 增殖的影响

NSCs 在转入分化培养基 24h 后形态发生较明显的变化, 由原先双极或三极性折光性较强, 半贴壁细胞 (图 1a) 转变为无明显突起, 折光性较差的完全贴壁细胞, 细胞数量未发生明显改变。2~3d 后细胞数量明显增多, 细胞形态改变不明显 (图 1b)。4~5d 时细胞细胞形态及结构发生改变, 细胞分为两层, 底层为体积较大, 折光性较差, 形

态不规则的细胞群(图 1c),而处于其上的是折光性好,胞体较小呈梭形,带有两极或者三极突起的细胞群,该细胞群分布不均匀,呈集落性生长。5~7d 后见该细胞群数量增多(图 1d)。

NSCs 转入分化培养基后第 1、3、5、7 天利用 Cyquant 荧光细胞定量法测定各组间细胞总量。数据显示对照组细胞数量随时间推移而逐渐增多,1~3d 时细胞增殖速度最快,4~7d 后逐渐趋于平稳,7d 后细胞数量增多至初始接种量的 1.6 倍($P<0.05$,图 1e)。锂剂处理组表现出与对照组相似的趋势,7d 后 1mM LiCl 处理组细胞数量较对照组提高 1.1 倍,其余浓度无明显性差异。SB216763 处理组在 1~3d 时发生明显增殖,并且持续至第 7d,细胞数量增多至初始接种量的 2.3 倍($P<0.05$),为对照组的 1.4 倍($P<0.05$,图 1f)。

2.2 锂剂与特异性抑制 GSK3 β 对神经元分化的调控作用

NB27 培养基中分化 7d 后,免疫细胞化学染色鉴定结果显示大多数细胞表现为 GFAP 或者 Tuj1 阳性,锂剂及 SB216763 均显著提高分化终产物中神经元的数量。0.5mM LiCl 提高神经元总

数约 1.28 ± 0.03 倍 ($P<0.05$),1.0mM LiCl 组为 1.47 ± 0.06 倍 ($P<0.05$),3.0mM LiCl 组为 1.33 ± 0.03 倍 ($P<0.05$),5.0mM LiCl 组开始降低,为 0.66 ± 0.02 倍($P<0.05$),SB216763 处理组中神经元的数量较对照组提高 2.25 ± 0.07 倍 ($P<0.05$,图 2d)。BrdU 嵌合实验结果显示对照组中 BrdU 阳性细胞占 Tuj1 阳性细胞比率仅为 $(4.8\pm1.2)\%$,1.0mM 锂剂组为 $(14.3\pm2.8)\%$ ($P<0.05$),SB216763 组为 $(25.7\pm2.6)\%$ ($P<0.05$,图 3)。锂剂与 SB216763 有相似的作用,验证了上述实验结果,提示锂剂促神经元生成可能与其对 GSK3 β 的抑制有关。

2.3 锂剂与特异性抑制 GSK3 β 对 AST 分化的调控作用

0.5mM LiCl 组降低 AST 总数至对照组的 0.75 ± 0.05 倍,1.0mM LiCl 组为 0.64 ± 0.02 倍,3.0mM LiCl 组为 0.55 ± 0.02 倍,5.0mM LiCl 组为 0.54 ± 0.03 倍 ($P<0.05$),而与之相反的是,SB216763 处理组中 AST 数量并未发生明显改变,为对照组的 0.90 ± 0.06 倍($P>0.05$,图 2e)。另外,我们还选用了 S100 β 作为 AST 标记物比较了

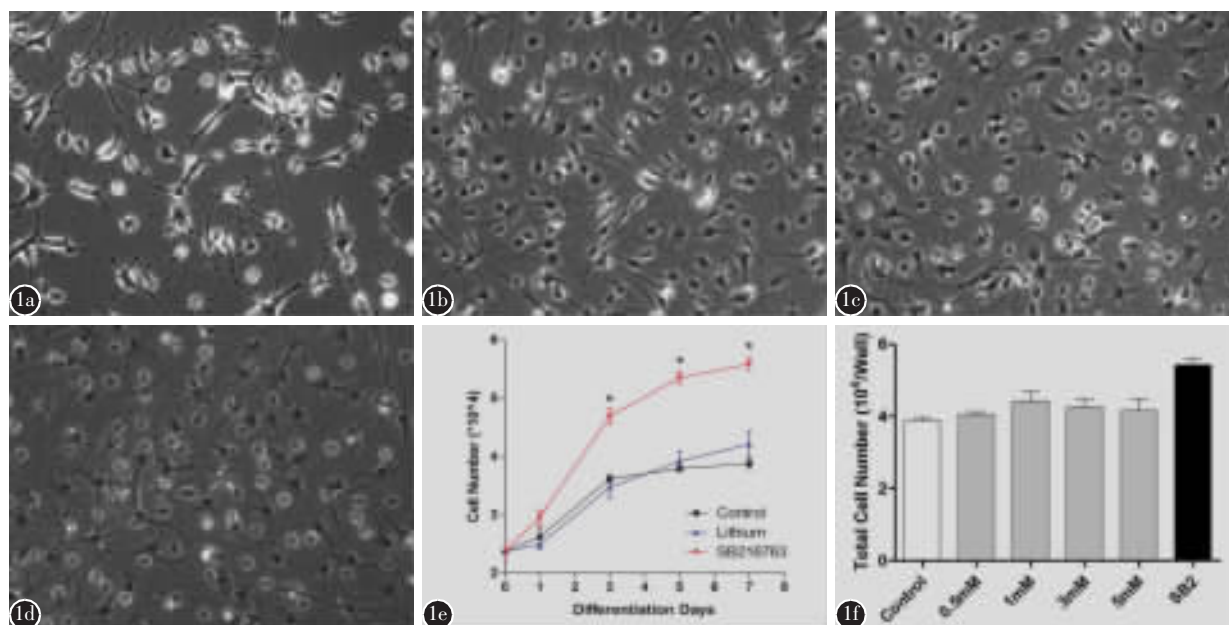


图 1 a~d NSCs 置入分化培养基 (NB27) 后不同时间点 (a 1d, b 3d, c 5d, d 7d) 明场图 (各时间点如图所示, 标尺=100 μ m) e 分化条件下 NSCs 的生长曲线示 SB216763 处理组细胞数量明显多于对照及锂剂处理组 f 分化 7d 后各处理组细胞总数比较, 锂剂及 SB216763 组细胞数量明显高于对照组

Figure 1 a~d Bright view pictures show NSCs cultured in NB27 medium at different time point (a 1d, b 3d, c 5d, d 7d), Scale bar=100 μ m. e Growth curve of differentiating NSCs, SB216763 stimulated NSCs proliferating. f Total cell number count among groups at 7d time point, lithium and SB216763 increased total cell number by 1.1 and 1.4 fold respectively.

各组间 AST 总数。氯化锂处理组 S100 β 阳性细胞总数随锂剂浓度增加而减少: 分别为 0.72 ± 0.08 倍 (0.5mM LiCl, $P < 0.05$), 0.51 ± 0.09 倍 (1mM LiCl, $P < 0.05$), 0.44 ± 0.11 倍 (3mM LiCl, $P < 0.05$); 相反的是, SB216763 处理组 S100 β 阳性细胞总数与对照组相比无明显区别 (1.1 ± 0.09 倍, $P > 0.05$, 图 4)。除此以外, Western-blotting 针对 AST 标记物 GFAP 及神经元标记物 TuJ1 的蛋白表达情况也显示了较为一致的趋势(图 2f), 再次证实了上述结果的可靠性。

2.4 锂剂的毒性作用检测

TUNEL 凋亡细胞计数结果显示分化起始便有少量的凋亡细胞存在, 占细胞总数的 (6.0 ± 1.8)%, 且随着分化时间的延长其百分比略有增加, 7d 后对照组凋亡细胞百分比增加值至 (12.0 ± 0.87)%。与对照组相比, 低浓度 LiCl 处理组 ($<$

3mM) 以及 SB216763 处理组无明显性改变 ($P > 0.05$), 而 5mM LiCl 明显提高细胞群中凋亡细胞的比例至 (23.0 ± 2.4)% ($P < 0.05$, 图 5), 此结果说明 5mM LiCl 对分化中的 NSCs 有明显的毒性作用。

3 讨论

NSCs 移植为 SCI 修复提供了新的思路, 人们期望移植到 SCI 区的 NSCs 在局部分化为神经元, 桥接中断的神经轴突而重建脊髓功能。但研究发现移植的 NSCs 却多数分化为 AST, 只有极少数分化为神经元。过多 AST 细胞的生成不仅削弱了 NSCs 移植的治疗效果, 还有可能在后期形成胶质瘢痕, 阻碍再生轴突的经过。因此, 需要深入了解 NSCs 分化机制, 并在此基础上寻找可行的手段抑制 NSCs 向 AST 的过度分化。最新研究发现锂剂作为临床治疗双向性情感障碍的经典用

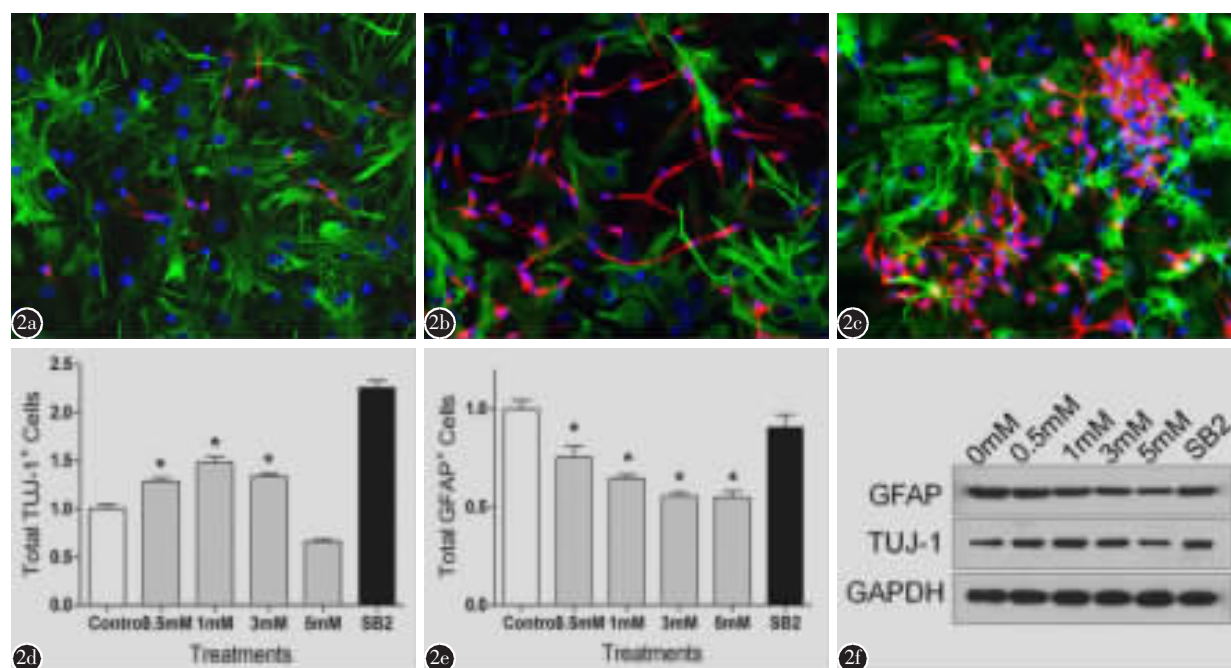


图 2 a~c 免疫细胞化学染色示 NSCs 置入分化培养基 7d 后神经元(Tuj1 阳性, 红色)、AST(GFAP 阳性, 绿色)比例, 细胞核为 Hoechst33342 阳性(蓝色)(a~c 分别为对照组、锂剂及 SB216763 处理组) d 各组间神经元总数计数, 1mM 锂剂组中神经元总数为对照组的 1.5 倍, SB216763 组为 2.3 倍 e 各组间 AST 总数计数, 锂剂组 AST 总数呈浓度依赖性降低, 5mM 锂剂组中 AST 总数约为对照组的一半, SB216763 组 AST 总数无明显变化 f Western blotting 对分化终产物中神经元、AST 标志性蛋白 TuJ1、GFAP 定量, 其结果与免疫细胞化学法趋势一致

Figure 2 Immunocytochemistry staining shows the heterogenous cell population containing neurons (Tuj1 positive, red) and astrocytes (GFAP positive, green). Nucleus were counterstained with Hoechst33342 (blue). a~c indicates control, Li and SB216763 treated group respectively. d Total cell count of neuronal lineage, neuron number was increases by 1.5 fold in 1mM Li and 2.3 fold in SB216763 group. e Astrocytes number was decreased by Li in dose-dependent manner but not SB216763, 5mM Li decreased AST to half. f Western blotting result shows the same tendency as immunocytochemistry result.

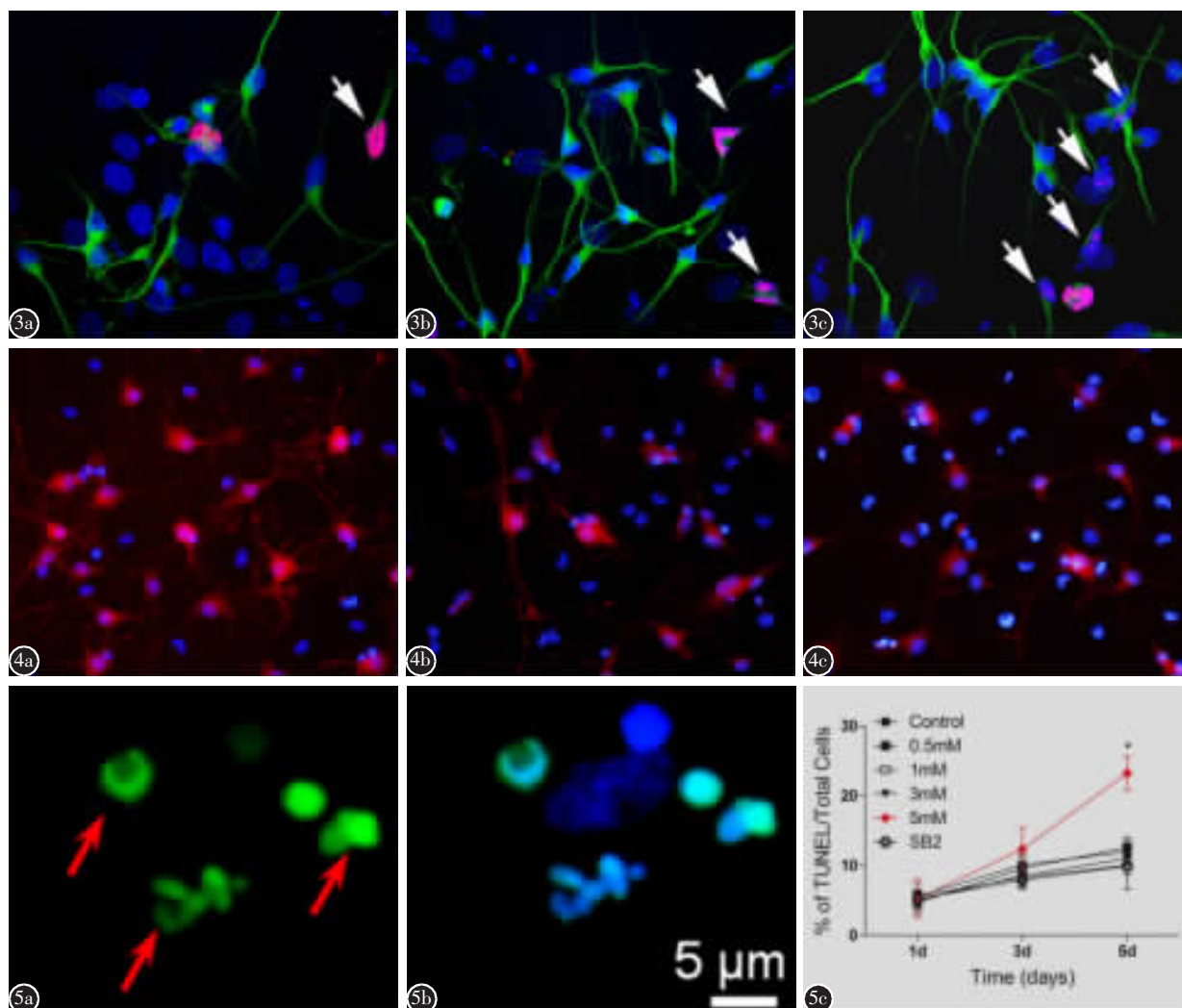


图 3 BrdU 嵌合实验检测锂剂与 SB216763 对神经元分化(Tuj1 阳性细胞,绿色)的影响。白色箭头所示为 BrdU 阳性细胞(红色),细胞核为 Hoechst33342 阳性(蓝色)(a~c 分别为对照组、锂剂以及 SB216763 处理组,结果显示锂剂及 SB216763 均可显著促进 NSCs 向神经元分化) **图 4** S100 beta 免疫组织化学染色检测锂剂与 SB216763 对 AST 分化的调控作用,其中 S100 beta 阳性细胞为红色,细胞核为蓝色,结果显示锂剂呈浓度依赖性抑制 AST 分化(a~c 分别为对照组、锂剂以及 SB216763 处理组) **图 5** TUNEL 法检测不同浓度锂剂及 SB216763 对分化 NSCs 的毒性作用 **a** 典型的凋亡细胞出现核固缩,碎裂及染色质浓集现象(TUNEL 阳性细胞,绿色) **b** TUNEL 与 Hoechst33342(蓝色)双重染色以计算凋亡细胞比例(标尺=5 μ m) **c** NSCs 分化后处理组间不同时间点(1d、3d、5d)中凋亡细胞占总细胞数的比例,其中 5mM 锂剂组在 5d 时表现出明显的细胞毒性作用(*表示有显著性差异, $P<0.05$)

Figure 3 S100 beta immunocytochemistry result showing Li and SB216763 exert distinct effect on astrogligenesis by NSCs (S100 beta was stained in red and nucleus were counterstained with Hoechst33342 in blue), lithium significantly reduced percentage of S100 beta+ fraction in a dose-dependent manner(a~c represent control, Li and SB216763 treated groups). **Figure 4** Both Li and SB216763 increased neuron production, as detected by BrdU incorporation assay. BrdU positive cells were stained in red and nucleus were counterstained with Hoechst33342 in blue, a~c Represent control, Li and SB216763 treated groups(Scale bar=25 μ m). **Figure 5** Cytotoxicity of lithium and SB216763 to differentiating NSCs, as detected by TUNEL assay. **a** Representative pictures show the morphological changes of apoptotic nucleus including chromosome consolidation and nucleus fragmentation (Scale bar=5 μ m). **b** Double staining of TUNEL with Hoechst33342(blue) to determine the percentage of apoptotic cells. **c** Percentage of apoptotic cells in each groups at different time point(1d, 3d, 5d). 5mM Li caused cytotoxicity at 5th day while other groups did not(* denotes $P<0.05$ vs. control).

药,对 NSCs 的分化也有显著的调控作用,可促进 NSCs 向神经元分化,但其对 AST 的分化调控作用却一直存在争议,相关机制仍不明确。

本研究从细胞增殖、谱系分化以及药物毒性角度全面检测了不同浓度锂剂对新生大鼠侧脑室下区 NSCs 分化的影响,系列结果显示锂剂对 NSCs 神经元和 AST 的分化调控发挥着截然不同的作用,其可以促进神经元的分化,同时抑制胶质分化。Cyquant assay 是一种基于细胞核中核糖核酸总量来评价细胞数的检测手段,结果表明 NSCs 在转入无营养因子的“分化培养基”后,总细胞数量明显增多,意味着增殖伴随着细胞分化而发生。锂剂对于此过程中细胞的数量没有显著性影响。在此基础上我们比较分化终产物中神经元和 AST 的百分比和数量,数据显示锂剂不仅可以提高神经元的生成,还可以抑制 AST 的产生。1mM LiCl 可以提高神经元的数量约 1.5 倍,而 AST 的数量则随着锂剂浓度的上升呈浓度依赖性递减。

为了排除锂剂的毒性作用,并寻找锂剂抑制 AST 分化的最佳浓度,我们同时利用 TUNEL 染色法检测不同浓度下分化 NSCs 中凋亡细胞的比例,TUNEL 是一种有效的检测凋亡的技术手段。细胞发生凋亡时,其完整的 DNA 链在内源性核酸酶的作用下被裂解成 180~200bp 的 DNA 片段,暴露出核苷酸残基在外源性 DNA 转移酶的作用下可以结合生物素标记的 dUTP,因此可以通过检测生物素的表达来直观地鉴定凋亡细胞。该结果显示 LiCl($\leq 3\text{mM}$)属于安全浓度,无明显毒性作用,而 5mM 的 LiCl 则会明显提高凋亡细胞比例,显示出细胞毒性作用。从另一方面也说明锂剂可以安全有效地抑制分化的 NSCs 产生 AST 细胞,其最佳浓度为 3mM。

既往的锂剂药代动力学显示锂剂的有效浓度为 0.8~1.2mM,浓度 $>1.5\text{mM}$ 便会表现出毒性作用,其中以肾毒性表现最为明显^[9]。体外实验数据表明 1mM 锂可以有效地促进 NSCs 增殖并促进其向神经元分化,我们的实验也得到了相似的结论。然而在我们的体系中并没有发现 1mM 锂剂可促进 NSCs 增殖,且 3mM 的 LiCl 也并未对细胞造成明显的毒性作用,究其原因我们认为有以下几种可能:既往关于锂剂促进 NSCs 增殖研究都是基于未分化的 NSCs,细胞处于 NSCs 培养基中。本实验增殖实验是针对分化的 NSCs,培养基中无

营养因子,细胞处于不同阶段性状差异以及营养因子的缺乏可能是造成锂剂不能促进其增殖的原因。锂剂 1.5mM 是中毒剂量的结论是来自于临床药代动力学研究,是基于机体的整体性评估。中毒表现是以最易损伤的器官或组织来衡量的,不一定等于神经系统的中毒浓度。事实上,既往的研究也表明,相对较高的锂剂浓度不仅没有造成神经细胞的毒性,反而更有利于促进其增殖,不仅 Shuken Boku 的实验结果显示 3mM LiCl 对 NSCs 无明显毒性^[10],Wexler 等^[9]的实验结果甚至显示 6mM LiCl 更能促进 NSCs 增殖并调控其向神经元方向分化。因此,组织、细胞类型、培养条件的不同可能是造成其对锂剂耐受性差异间的原因。

为了进一步探索锂剂调控 NSCs 分化的机理,我们还选用了 SB216763,一种 GSK3 β 的特异性抑制剂来进行对照研究。对 GSK3 β 的抑制是锂剂发挥作用的重要机制之一^[11],通过对比研究 SB216763 与锂剂对 NSCs 分化调控中各环节的作用,我们可以初步判断锂剂作用机制是否通过对 GSK3 β 的抑制而实现。我们的实验数据显示,与锂剂相似的是,SB216763 提高了 NSCs 分化中产物中神经元的数量及比例,提示锂剂对于神经元的分化调控可能是通过对 GSK3 β 的抑制而实现,这也与 Wexler 等最近的研究结论相符。Wexler 等利用显负性突变抑制特异性抑制 GSK3 β 而模拟了锂剂促神经元分化作用,而这两种相似的效应都随着 GSK3 β 通路下游的 β -catenin 的抑制而消失。我们的实验结果与 Wexler 的发现提示锂剂促进神经元产生可能是通过 GSK3 β / β -catenin 通路而实现。相反的是,SB216763 对于 AST 的分化调控作用则大相径庭,锂剂明显抑制 NSCs 向 AST 而 SB216763 却没有类似的作用,提示锂剂可能通过 GSK3 β 旁路途径调控 AST 的分化。

锂剂在临床应用于治疗双极性情感障碍已经有 100 多年的时间,其人体药代动力学特征及安全性已经有了充分的了解,因此具有很强的临床应用可行性。1mM 锂剂可发挥良好的情绪稳定作用,通过口服给药便可获得稳定的血药浓度。该研究发现相同浓度的锂剂也可明显促进 NSCs 向神经元分化,我们推断其不仅可能有助于“发动”脊髓损伤后内源性 NSCs 的神经再生作用,还有望促进外源性 NSCs 更多地向神经元分化,从而提

高其移植疗效。3mM 的锂剂对 AST 的分化有明显的抑制作用, 该特性可能对解决当前 NSCs 移植后 AST 过度分化问题有所帮助, 另外, 研究发现 NSCs 向 AST 分化的调控异常与中枢胶质瘤的形成有密切的关系^[12], 3mM 锂剂对 AST 分化的抑制的特性使得其也有可能成为胶质瘤治疗的辅助药物, 不过如何在体内达到该药物浓度而避免其毒性作用是今后将要研究的重点内容, 该研究有望拓宽锂剂的应用范围, 最终为临床上述问题的克服提供新的思路。

4 参考文献

1. Parr AM, Kulbatski I, Tator CH. Transplantation of adult rat spinal cord stem/progenitor cells for spinal cord injury [J]. J Neurotrauma, 2007, 24(5): 835-845.
2. Cao QL, Zhang YP, Howard RM, et al. Pluripotent stem cells engrafted into the normal or lesioned adult rat spinal cord are restricted to a glial lineage[J]. Exp Neurol, 2001, 167(1): 48-58.
3. Young W. Review of lithium effects on brain and blood [J]. Cell Transplant, 2009, 18(9): 951-975.
4. Chen G, Rajkowska G, Du F, et al. Enhancement of hippocampal neurogenesis by lithium[J]. J Neurochem, 2000, 75(4): 1729-1734.
5. Su H, Chu TH, Wu W. Lithium enhances proliferation and neuronal differentiation of neural progenitor cells in vitro and after transplantation into the adult rat spinal cord [J]. Exp Neurol, 2007, 206(2): 296-307.
6. Wexler EM, Geschwind DH, Palmer TD. Lithium regulates adult hippocampal progenitor development through canonical Wnt pathway activation[J]. Mol Psychiatry, 2008, 13(3): 285-292.
7. Su H, Zhang W, Guo J, et al. Lithium enhances the neuronal differentiation of neural progenitor cells in vitro and after transplantation into the avulsed ventral horn of adult rats through the secretion of brain-derived neurotrophic factor[J]. J Neurochem, 2009, 108(6): 1385-1398.
8. Lois C, Alvarez-Buylla A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90(5): 2074-2077.
9. Gangadhar BN, Subhash MN, Umapathy C, et al. Lithium toxicity at therapeutic serum levels[J]. Br J Psychiatry, 1993, 163: 695.
10. Boku S, Nakagawa S, Masuda T, et al. Glucocorticoids and lithium reciprocally regulate the proliferation of adult dentate gyrus-derived neural precursor cells through GSK-3 β and β -catenin/TCF pathway [J]. Neuropsychopharmacology, 2009, 34(3): 805-815.
11. Lenox RH, Wang L. Molecular basis of lithium action: integration of lithium-responsive signaling and gene expression networks[J]. Mol Psychiatry, 2003, 8(2): 135-144.
12. Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. Neural stem cells and the origin of gliomas[J]. N Engl J Med, 2005, 353(8): 811-822.

(收稿日期: 2013-01-04 末次修回日期: 2013-06-18)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 彭向峰)

消息

第五届全国全脊椎肿瘤切除学习班暨脊柱外科新技术论坛通知

由复旦大学附属中山医院骨科主办的第五届全国全脊椎肿瘤切除学习班暨脊柱外科新技术论坛将于 2014 年 5 月 9 日~12 日在上海复旦大学附属中山医院召开。课程分为理论授课和实操两部分。理论授课以脊柱肿瘤治疗、颈枕部手术、脊柱弹性固定等脊柱外科新理论为重点学习内容。实操作为利用新鲜尸体标本, 学员在老师指导下进行实际操作, 包括全脊椎切除技术、颈人工椎间盘技术、经椎弓根截骨技术、腰椎 TLIF 技术等高难度手术及其他脊柱手术操作。实操操作名额限制为 48 人, 不接受现场报名, 要参加操作的学员请先联系陆医师(手机: 13917306891)预先报名, 操作的报名截止日期为 2014 年 4 月 20 日, 报名情况请关注 <http://www.zs-hospital.sh.cn/> 的“学术会议”栏内的通知或登录 <http://www.zs-hospital.sh.cn/> 的“骨科公告”栏内查询相关通知。

理论听课+实操学费为 2600 元, 仅参加理论听课学费为 1000 元。食宿统一安排, 费用自理。结业后将授予国家级继续医学教育 I 类学分 10 分证书。学费请汇入: 上海中山医疗科技发展有限公司, 1001220709004678928, 工行上海市建国西路支行。学员汇款后请把汇款凭证及报名回执电子版 e-mail 至: lu.yanjiang@zs-hospital.sh.cn, 收到凭证后我们将与您联系确认。

联系方式: 上海市枫林路 180 号, 骨科、脊柱外科: 董健主任、姜晓幸主任、陆彦炯医师。邮政编码: 200032。电话: (021) 64041990 转 2336。