文章编号:1000-5404(2006)07-0691-03

论著

绿色荧光蛋白作为神经干细胞示踪标记的实验研究

谭新杰[1],胡长林[1],蔡文琴[2] ([1]重庆医科大学附属第二医院神经内科,重庆 400010;[2]第三军医大学基础医学部神经生物学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 研究携带绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)的腺病毒感染神经干细胞(neural stem cells,NSCs)后的荧光稳定性和持久性及其对NSCs生物学特性的影响;探讨利用其作为NSCs示踪标记的可行性。**方法** 利用GFP-腺病毒空载体感染NSCs(NSCs-GFP),经G418筛选并连续传代,在相差显微镜下观察未感染NSCs和感染NSCs的形态以及在荧光显微镜下观察感染NSCs及其诱导分化后的GFP表达情况;并检测NSCs-GFP的细胞活性和细胞周期。调整GFP标记神经干细胞浓度为$1\times10^5/\mu l$,将其植入大鼠侧脑室内,观察其在脑内的表达。**结果** 未感染NSCs和感染NSCs的形态学、细胞活性和细胞周期等无明显差异($P>0.05$)。GFP在诱导分化后的NSCs-GFP子代细胞中有高表达,并且第1代和第20代NSCs-GFP的绿色荧光无明显差别。在植入侧侧脑室周围可见绿色荧光的强表达,且持续时间较长。**结论** GFP荧光稳定持久,对转染细胞的生物学特征无明显影响,并且移植后的荧光呈长时间强表达,因此可以将其作为神经干细胞的示踪标记,这将有利于神经干细胞移植后的可塑性研究。

关键词:绿色荧光蛋白;神经干细胞;移植;示踪
中图法分类号:R322.8;R329.2;R329-33 **文献标识码**:A

Green fluorescent protein as a marker of neural stem cells

TAN Xin-jie[1], HU Chang-lin[1], CAI Wen-qin[2] ([1]Department of Neurology, The Second Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, [2]Department of Neurobiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the fluorescent stabilization and persistence of green fluorescent protein (GFP) and its effect on bionomics of the infected neural stem cells (NSCs), and explore the feasibility of NSCs marked by GFP (NSCs-GFP). **Methods** NSCs were infected by GFP-adenovirus carrier. After the infected cells were selected by G418, GFP expression of NSCs-GFP and differentiated NSCs-GFP were detected under phase contrast microscope and fluorescent microscope. The morphological feature, the cytoactive, and cell cycle of the uninfected cells were compared with those of the infected cells. NSCs-GFP was transplanted into the ventricle of rats and the expression of GFP in the brain was examined under fluorescent microscope. **Results** The morphological feature of the uninfected NSCs was similar to that of the NSCs-GFP, and there were no significant differences in the cytoactive and cell cycle between the NSCs and the NSCs-GFP ($P>0.05$). The expression of GFP was located around the ventricle and persisted for a long time. **Conclusion** The fluorescence of GFP is stable and persistent and the GFP has no negative effects on the NSCs-GFP. It is an ideal maker of neural stem cells and could be used for the study of NSCs transplantation.

Key words: green fluorescent protein; neural stem cells; transplantation; marker

自从Reynolds发现神经干细胞(neural stem cells,NSCs)以来,其已成为国内外神经科学研究者关注和研究的热点。由于神经干细胞(NSCs)是一群具有多向分化潜能和自我更新能力的细胞,因此应用NSCs移植治疗中枢神经系统疾病拥有较好的前景。但在NSCs移植研究中,我们有必要对NSCs进行示踪标记,以便实时跟踪和区分植入的NSCs及宿主细胞。绿色荧光蛋白是一种生物发光蛋白,在紫外光或蓝色光激发下可稳定地发出绿色荧光。本实验利用GFP重组腺病毒载体感染神经干细胞并将其植入大鼠侧脑室内,研究GFP的荧光稳定性和持久性以及GFP对NSCs生物学特征的影响,探索其作为神经干细胞示踪标记的可行性,为进一步的NSCs移植研究提供体外研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM/F_{12}、B_{27}、胎牛血清均购自GIBCO公司;bFGF、Nestin、碘化丙啶、G418均购自SIGMA公司;GFP-腺病毒空载体(3

作者简介:谭新杰(1977-),男,江西省遂川县人,博士研究生,主要从事神经元前体细胞迁移方面的研究,现在贵州省人民医院干部医疗科。电话:(023)63705052,E-mail:txj1012@tom.com

收稿日期:2005-06-15;修回日期:2005-12-30

$\times 10^8$ VP/ml)由作者实验室构建,其携带有独立、完整的 GFP 表达系统,以 GFP 作为示踪标记,使重组病毒的包装、转染的状况以及移植后的迁移可以直接观察,简化了操作。

1.2 动物

Wistar 成年大鼠 2 只,雌雄各 1 只,体质量 200 ~ 250 g,由第三军医大学实验动物中心提供。

1.3 神经干细胞的分离培养[1,2]

Wistar 成年大鼠,雌雄合笼后,检查阴栓,见阴栓后,计为 E0 d,至 E10.5 d,将动物麻醉后,常规碘酒、酒精消毒皮肤,打开腹腔,暴露两侧子宫,用眼科镊钳住子宫头端,顺子宫分离至子宫角处剪下,放入培养皿中,依次去除子宫壁及胎膜,在解剖显微镜下仔细分离获得胎鼠端脑,再用 D-Hanks 液漂洗,用眼科剪反复切割组织,再用 200 目细胞筛过滤,去除血管、结缔组织,收集入离心管中,再反复吹打,制成单细胞悬液,经细胞计数后,分装入 50 ml 培养瓶中,细胞数约为 1×10^6/ml,培养条件:6 ml DMEM/F12 + 120 μl B_{27} + 12 μl bFGF, 37 ℃, 5% CO_2,每 6 ~ 7 天传代 1 次。

1.4 神经干细胞的感染及诱导分化

取 1 瓶无血清培养的神经干细胞,感染前 1 d 换液,加入 GFP-腺病毒 10 μl 感染生长旺盛的神经干细胞(NSCs-GFP),2 d 后加入 G418(600 μg/ml)继续培养,6 ~ 7 d 后收集细胞,取少量培养的神经干细胞作诱导分化,置入装有 0.1% 多聚赖氨酸处理过盖玻片的 3.5 cm 培养皿中,培养条件为:1.5 ml DMEM/F_{12} + 30 μl B_{27} + 15% FCS, 37 ℃, 5% CO_2,培养 6 d 后收获细胞。

1.5 细胞活性的检测

将 NSCs 及 NSCs-GFP 台盼蓝染色并计数,按 1×10^5 个/ml 的活细胞密度接种于 5 个 96 孔板中, 100 μl/孔,每种细胞设 8 个复孔,培养至第 3 天时每孔加 MTT 液 10 μl(5 mg/ml), 37 ℃ 孵育 4 h 后终止培养,每孔加 100 μl 二甲基亚砜(DMSO),震荡 10 min,在酶标仪上(波长 570 nm)测定吸光度 D(570)值。

1.6 细胞周期的检测

分别取传代后第 3 天的 NSCs 及 NSCs-GFP 各 2 瓶,吸管吹打制备单细胞悬液,1 000 r/min 离心 10 min,PBS 洗 2 次后悬于 0.1 ml PBS 中吹打,用 70% 乙醇(-20℃)固定后,于 -20 ℃ 冰箱过夜。检测时 1 500 r/min 离心 5 min,弃乙醇,PBS 洗 2 次,弃上清,每样品管中加 1ml 碘化丙啶(50 mg/L),避光染色 30 min,用流式细胞仪进行检测,计算各期细胞百分比。

1.7 移植及检测

调整 GFP 标记的神经干细胞浓度为 1×10^5/μl,备用。大鼠麻醉后固定于立体定向仪上,取备用的 GFP 标记神经干细胞 10 μl 缓慢注入侧脑室,注射位点为前囟后 1.5 mm,中线向右旁开 2 mm,深度 3.5 mm,注射时间为 10 min。分别于移植后 1、7、14、21、28 d 灌注固定,并将脑组织行冰冻切片(片厚为 20 μm),荧光显微镜下观察。

1.8 统计学处理

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并采用 SPSS 10.0 统计软件进行成组设计 t 检验。

2 结果

2.1 NSCs 与 NSCs-GFP 的形态学特征

由胚 10.5 d 端脑皮层分离培养的细胞,经 6 ~ 7 d 无血清加 bFGF 培养后,细胞呈球状集落, 95% 以上的 NSCs 球呈悬浮生长,细胞增殖旺盛。细胞集落传代 20 代以上仍具干细胞特性、且生长状态良好。加入携带 GFP 的腺病毒后,于 3 h 后在荧光显微镜下开始出现稀少的微弱绿色荧光;24 h 后 NSCs 球大部分被感染上,呈较强的绿色荧光;48 h 后 NSCs 球几乎全部感染上,呈球形强绿色荧光(图 1)。并且,GFP 转染后的 NSCs 在无血清培养 20 代时仍有 GFP 的强表达。在相差显微镜下,NSCs 与 NSCs-GFP 均呈球形,两者形态结构无明显差异。免疫荧光染色显示 GFP 转染后的 NSCs 呈 Nestin 染色阳性,证明 GFP 转染后的细胞是神经干细胞[3](图 2)。

2.2 NSCs-GFP 的诱导分化

NSCs-GFP 培养液中加入 15% 胎牛血清 3 h 后,NSCs 球即开始分化,相差显微镜下在 NSCs 球周围可见胶质细胞样细胞和神经元样细胞;同时,这些细胞在蓝色荧光激发下均呈现遍布整个细胞体的强绿色荧光(图 3)。在 NSCs-GFP 传代 20 代后,经诱导分化,荧光显微镜下同样可见绿色荧光的存在,与传代 1 次诱导分化之后的绿色荧光比较,两者没有明显差异。

2.3 细胞活性及细胞周期

NSCs 和 NSCs-GFP 均生长旺盛,细胞活性及细胞周期中各期细胞的比例无明显差异($P > 0.05$),见表 1。

2.4 NSCs-GFP 移植后的检测

在 NSCs-GFP 移植的各个时相点均可见到绿色荧光的表达。随着时间的推移,绿色荧光的表达部位逐渐朝侧脑室周围扩展,14 d时表达最强,随后逐渐减弱,至 28 d 时荧光基本消失(图 4)。

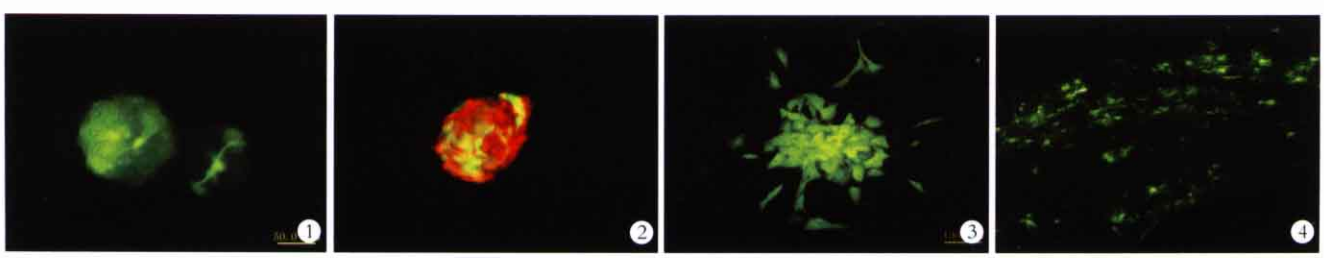


图 1 GFP-腺病毒感染后的神经干细胞球 (免疫荧光 ×200)

图 2 GFP-腺病毒感染神经干细胞球后 Nestin(红色)和 GFP(绿色)荧光双标记,黄色为 GFP-腺病毒感染的神经干细胞 (免疫荧光 ×200)

图 3 NSCs-GFP 诱导分化后绿色荧光蛋白的表达 (免疫荧光 ×400)

图 4 NSCs-GFP 植入侧脑室后绿色荧光蛋白的表达 (免疫荧光 ×200)

表 1　NSCs 与 NSCs-GFP 的细胞活性及细胞周期的比较（$\bar{x} \pm s$）

组别	$D(570)$	细胞周期(%)		
		G_1	S	G_2/M
NSCs	0.76 ± 0.03	47.28 ± 0.42	28.71 ± 0.41	24.36 ± 0.55
NSCs-GFP	0.77 ± 0.06	46.66 ± 0.32	28.23 ± 0.57	25.73 ± 0.36

3　讨论

神经干细胞是存在于哺乳动物中枢神经系统中的具有增殖能力及多向分化潜能的细胞群，它们在特定的微环境下能分化为神经元、星形胶质细胞及少突胶质细胞。NSCs 在神经系统疾病治疗方面的应用前景已受到人们的普遍关注，对 NSCs 的分离、培养、鉴定及移植等的深入研究已成为神经科学研究的热点。

当前神经科学领域研究中常用的 NSCs 标记方法有：①遗传性地改变细胞的基因，使其表达特异性的标志物，如绿色荧光蛋白（GFP）、β-半乳糖苷酶（β-Gal、LacZ）等。②利用 Y 染色体作为标志物。③利用特定的染料标记细胞，如细胞核染料 Hoechst。④5-溴脱氧尿嘧啶核苷（BrdU）或氚标记去氧胸腺嘧啶核苷来标记正在分裂的细胞。⑤超顺磁氧化铁标记 NSCs，从而在磁共振（MR）成像上来检测移植细胞在宿主体内的分布、迁移和分化情况。在所有这些标记技术中，GFP 及其突变体具有独特和鲜明的特点：①荧光产生无需借助任何反应底物，且性质稳定、荧光保持时间较长[4]。②基因序列短、分子量小、融合后不影响目的基因的表达且对细胞无毒性作用[5]。③便于进行活细胞的实时观察。

本实验对未感染 NSCs 和携带 GFP 的腺病毒感染 NSCs 在相差显微镜下进行了观察，发现两者的干细胞球均呈球形，两者形态结构无明显差异；NSCs-GFP 经诱导分化后也能分化成胶质细胞样细胞和神经元样细胞。并且经细胞活性及细胞周期的检测显示，NSCs 和 NSCs-GFP 均生长旺盛，细胞活性及细胞周期中各期细胞的比例无明显差异，并且在连续多次传代后两者的生物学特征均无明显差异。这表明 GFP 的大量、长期表达对 NSCs 无毒性作用，细胞仍可连续传代培养，对宿主细胞的形态、增殖、分化均无明显影响。在 GFP-腺病毒感染 3 h 左右在荧光显微镜下可观察到微弱的绿色荧光，但较稀少；24 h 左右就可观察到 NSCs 球大部分呈绿色荧光，荧光强度较亮，发光的干细胞球较多；48 h 后几乎所有的 NSCs 球均呈绿色荧光，干细胞球通体发亮；并且在蓝色光激发下，GFP 绿色荧光能保持 1 h 以上。在诱导分化后的 NSCs 观察中，我们发现绿色荧光蛋白在分化后的胶质细胞样细胞和神经元样细胞均有表达，绿色荧光遍布整个胞体及其突起，能完整地显现整个细胞轮廓。NSCs-GFP 在传代多代再经诱导分化后仍可以大量表达绿色荧光蛋白，说明 GFP 的荧光性质非常稳定和持久。当将 GFP 标记的神经干细胞植入大鼠侧脑室后，仍可见到绿色荧光的强表达。并且，随着时间的推移，绿色荧光逐渐向远离侧脑室的部位扩展，提示 GFP 标记的神经干细胞具有迁移能力，说明 GFP 不影响神经干细胞的迁移特性，这与国外一些研究者的结果相似。Englund 等[6]用 GFP 标记外源性神经前体细胞，然后移植入大鼠的纹状体、海马、皮层等部位，追踪供体细胞在脑内的分化和迁移，结果发现，植入的 GFP 阳性细胞发生广泛迁移，部分分化为成熟的神经元[7,8]。

本实验结果显示，GFP 基因在 NSCs 中的整合和表达对于 NSCs 的基本生物学特性，如形态、增殖能力和分化潜能没有明显影响；并且在移植后的大鼠脑内绿色荧光的强表达持续较长时间。因此 GFP 作为一个活分子探针[9]，对于 NSCs 的分离和移植后观察体内分化、迁徙等方面有着独到之处。同时也为 NSCs 移植后进行细胞水平的电生理功能检测提供了一种有效的手段[10]，有利于对中枢神经系统可塑性的进一步研究。

参考文献：

[1] 李　巍，蔡文琴，姚忠祥. 大鼠神经干细胞分离培养及基因转染研究[J]. 第三军医大学学报，2001，23(12)：1425－1427.

[2] 张清勇，杨　波，赵新利，等. 胚胎大鼠神经干细胞的培养及鉴定[J]. 郑州大学学报：医学版，2003，38(1)：5－7.

[3] ANDRESSEN C，STOCKER E，KLINZ F J，*et al*. Nestin-specific green fluorescent protein expression in embryonic stem cell-derived neural precursor cells used for transplantation[J]. Stem Cells，2001，19(5)：419－424.

[4] TSIEN R Y. The green fluorescent protein[J]. Annu Rev Biochem，1998，67：509－544.

[5] GUBIN A N，REDDY B，NJOROGE J M，*et al*. Long-term stable expression of green fluorescent protein in mammalian cells[J]. Biochem Biophys Res Commun，1997，236(2)：347－350.

[6] ENGLUND U，FRICKER-GATES RA，LUNDBERG C，*et al*. Transplantation of human neural progenitor cells into the neonatal rat brain：extensive migration and differentiation with long-distance axonal projections[J]. Exp Neurol，2002，173(1)：1－21.

[7] LUNDBERG C，ENGLUND U，TRONO D，*et al*. Differentiation of the RN33B cell line into forebrain projection neurons after transplantation into the neonatal rat brain[J]. Exp Neurol，2002，175(2)：370－387.

[8] ENGLUND U，BJORKLUND A，WICTORIN K，*et al*. Grafted neural stem cells develop into functional pyramidal neurons and integrate into host cortical circuitry[J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2002，99(26)：17089－17094.

[9] MIGNONE J L，KUKEKOV V，CHIANG A S，*et al*. Neural stem and progenitor cells in nestin-GFP transgenic mice[J]. J Comp Neurol，2004，463(3)：311－324.

[10] SVENDSEN C N，BHATTACHARYYA A，TAI Y T. Neurons from stem cells：preventing an identity crisis[J]. Nat Rev Neurosci，2001，2(11)：831－834.

（编辑　王　红）