文章编号:1000-5404(2007)15-1469-04

论著

# 不同胚龄人神经前体细胞分离培养及分化特性的比较

桂伶俐[1],张传汉[1],刘志恒[1,2],吴 鹏[3] (华中科技大学同济医学院附属同济医院:[1]麻醉学教研室,[3]妇产科学教研室,武汉 430030;[2]深圳市第二人民医院麻醉科,深圳 518035)

**提 要: 目的** 研究不同胚龄人神经前体细胞(neural progenitor cell, NPC)培养及增殖分化特性。**方法** 取人胚原代细胞分为小胚龄全脑组、较大胚龄全脑组及较大胚龄纹状体组,悬浮培养。鉴定细胞球巢蛋白抗原的表达,分化及自我更新能力。观察各组培养细胞的生长、增殖状况。运用免疫荧光细胞化学法比较各组神经球分化后,神经元及星形胶质细胞的比例。**结果** 各组培养出的悬浮细胞球巢蛋白抗原阳性,可分化为MAP2或GFAP阳性细胞,BrdU掺入实验阳性。培养1周时,较大胚龄纹状体组的神经球数目最多,形态最规则,其次分别为小胚龄全脑组、较大胚龄全脑组。采用有限稀释法可从较大胚龄纹状体组挑选单细胞克隆球。各组NPC诱导分化后,MAP2或GFAP阳性细胞率组间比较差异无显著性。**结论** 不同胚龄人脑组织均可培养出NPC。取全脑时,随着胚龄的增加,NPC培养难度增大,但针对不同胚龄可采用不同的原代取材方法。不同胚龄NPC的星形胶质细胞及神经元分化比例一致。

**关键词**: 细胞培养;神经前体细胞;细胞分化;时间特异性
**中图法分类号**: R322.81; R329-33; R329.1 **文献标识码**: A

# Culture and differentiated characteristics of human neural progenitor cells derived from embryonic brains of different ages

GUI Ling-li[1], ZHANG Chuan-han[1], LIU Zhi-heng[1,2], WU Peng[3] ([1]Department of Anesthesiology, [3]Department of Obstetrics and Gynecology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030; [2]Department of Anesthesiology, The Second People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518035, China)

**Abstract**: **Objective** To investigate the culture, proliferation and differentiation of human neural progenitor cells derived from embryonic brains of different age. **Methods** The free-floating cells were cultured as 6 – 9 weeks embryonic whole brain group, 14 – 17 weeks embryonic whole brain group, 14 – 17 weeks embryonic striatum group. The expression of Nestin, self-renewal and multipotential properties of the cell clusters were identified. The growth and proliferation of the cell aggregations of each group were observed. After the neurospheres from each group were induced, the percentage of neuron or astrocyte was investigated by immunocytochemical staining. **Results** The cell aggregations of each group were positive of Nestin and Brdu immunochemical stainings, and could differentiate into MAP2 or GFAP positive cells. One week *in vitro*, there were the most neurospheres in 14 – 17 weeks embryonic striatum group, and a few in 6 – 9 weeks embryonic whole brain group, and fewer in 14 – 17 weeks embryonic whole brain group. Single cell from 14 – 17 weeks embryonic striatum group could form clone. After differentiation of neural progenitor cells from each group, the percentage of MAP2 or GFAP positive cells had no significant difference among the three groups. **Conclusion** Neural progenitor cells can be derived from embryonic brains of different age. With gestational age increasing, the neural progenitor cells become more difficult to be isolated from the whole brains. Different regions should be obtained as primary culture according to the different embryo age. The percentage of differentiated neuron or astrocyte is coincident in neural progenitor cells from embryonic brains of different age.

**Key words**: cells, cultured; neural progenitor cell; cell differentiation; gestational age

**基金项目**:国家自然科学基金(30300328)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30300328)

**作者简介**:桂伶俐(1977 – ),女,湖北省武汉市人,博士研究生,医师,主要从事神经干细胞与脑保护方面研究。电话:(027) 63031220, E-mail: gui_gui8022@yahoo.com.cn

**通讯作者**:张传汉,电话:(027) 62998989, E-mail: chzhang@tjh.tjmu.edu.cn

**收稿日期**:2006-08-30;**修回日期**:2006-10-13

神经前体细胞(neural progenitor cell, NPC)在神经损伤和神经退行性疾病的治疗中,有着巨大的运用前景。体外培养 NPC 可为细胞移植提供大量种子细胞。文献[1,2]报道,在体外从不同胚龄的中枢神经系统均能扩增出人神经干细胞或前体细胞,但不同胚龄 NPC 培养及分化特性鲜有比较。本研究拟比较小胚龄及较大胚龄胚脑来源人神经前体细胞分离培养和分化特性,为不同胚龄脑组织的原代取材及相应 NPC 在细胞移植中的运用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 胚胎 从同济医院妇产科收集 5 例孕 6~9 周子宫钳刮流产人胚胎及 10 例孕 14~17 周水囊引产人胚胎,均源自意外妊娠而终止的孕妇,且经本人同意,填写知情同意书,报医院伦理委员会批准,并遵守人类干细胞研究的伦理原则。

1.1.2 试剂 Neurobasal、B27 添加剂、胎牛血清(Fcs)购自 Gibco 公司;碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)及白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)购自 PeproTech 公司;多聚鸟氨酸、明胶及 BrdU 购自 Sigma 公司;抗巢蛋白(nestin)抗体购自 BD 公司,抗 BrdU 抗体、抗微管相关蛋白 2(microtube-associated protein, MAP2)抗体、抗胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)抗体、抗 2,3-环核苷酸磷酸二脂酶(cyclic nucleotide phosphohydrolase, CNPase)抗体均购自 Neo-Markers 公司; FITC 或 TRITC 标记荧光二抗购自北京中山公司。无血清培养基为 Neurobasal + B27 (20 ml/L) + EGF (20 μg/L) + bFGF(20 μg/L) + LIF(20 μg/L),分化培养基为 Neurobasal + B27(20 ml/L) + 1% Fcs。

### 1.2 方法

1.2.1 原代细胞的分组及分离培养 无菌条件下分离胚胎脑组织,分为 3 组,小胚龄(6~9 周)全脑组($n=5$)、较大胚龄(14~17 周)全脑组($n=5$)及较大胚龄纹状体组($n=5$),其中纹状体取材于两侧侧脑室壁的前底部。剥除脑膜及表面血管,在 D-Hanks 液中漂洗 3 次,剪成约 1 mm × 1 mm × 1 mm 小块后,用细吸管轻柔吹打组织至碎块完全散开成细胞悬液,经 200 目尼龙滤网过滤,制成单细胞悬液,加入无血清培养基,计数细胞,调整细胞密度以 $10^6$ 个/ml 数量级分别接种于 25 $cm^2$ 培养瓶,静置悬浮培养,每天观察培养细胞生长状况。

1.2.2 NPC 的传代培养 神经球直径过大致中心营养不足时,需行传代培养。将细胞以 800~1 000 r/min 离心 5 min 后,去上清,加入 500 μl 的无血清培养基,再转入 1.5 ml EP 管中,用 200 μl 枪头反复吹打,添加新鲜培养基,接种入培养瓶。根据神经球生长情况 7~10 d 传代 1 次。

1.2.3 NPC 的贴壁、诱导分化 用 0.001% 多聚鸟氨酸和 0.2% 明胶相继包被放置有玻片的六孔板,随后接种培养至第 3 代的 NPC,加入分化培养基 7 d 后,免疫荧光细胞化学法检测分化细胞。

1.2.4 5-溴-2-脱氧尿苷(Bromodeoxyuridine, BrdU)掺入实验 各组神经球吹散后接种至放有玻片的六孔板中贴壁培养,待完全贴壁后,换成含 10 μmol/L BrdU 的无血清培养基培养 2~3 h。取出细胞爬片,甲醇固定 20 min,0.01 mol/L PBS 清洗 3 遍, 4 mol/L 的 HCl 溶液中浸泡 1 h,之后行 BrdU 免疫荧光细胞化学检测。

1.2.5 单细胞克隆球的形成 将传代后形成的次代神经球制成单细胞悬液, 采用有限稀释法, 稀释到 $2\times10^4$ 个/L,共 40 ml,于 96 孔培养板中滴加稀释的细胞悬液,每孔 100 μl ,选取仅有 1 个细胞的培养孔作标记,并动态观察,由单个细胞扩增形成的神经球即为单细胞克隆球。

1.2.6 双苯甲亚胺 H 33342 细胞核染色 临用前将双苯甲亚胺 H 33342 稀释成 1 μg/ml 工作液,滴加于细胞爬片,室温孵育数分钟后,清水冲洗,荧光显微镜下观察,计数染色细胞核即为总细胞数。

1.2.7 免疫荧光细胞化学法 细胞爬片经 4% 多聚甲醛固定 20 min,0.01 mol/L PBS 洗 3 遍,0.5% triton X-100 处理 10 min,封闭 30 min,随后分别用抗巢蛋白、抗 BrdU、抗 MAP2、抗 GFAP、抗 CNPase 的一抗和空白对照 4 ℃孵育 12 h,0.01 mol/L PBS 洗 3 遍,用 FITC 或 TRITC 标记的荧光二抗 37 ℃孵育 1 h,滴加封片剂荧光显微镜下观察。显微镜下取 5 个视野,计数细胞阳性率。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS 11.5 进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析后 Duncan 检验。

## 2 结果

### 2.1 NPC 的鉴定

3 组培养物中,均可见悬浮生长的细胞球,巢蛋白免疫组化大部分细胞呈红色荧光阳性染色,定位于胞质,早期伸出的突起也呈阳性表达(图 1)。细胞球行 BrdU 免疫组化,大部分细胞核呈红色荧光阳性染色(图 2)。细胞球吹散后贴壁、诱导分化,贴壁早期为小圆形细胞,2、3 d 后发出突起,7 d 后可观察到大量不同形态的新生细胞。GFAP 染色时可见部分细胞质呈绿色荧光阳性染色,具有多个粗短不规则突起,呈典型星形胶质细胞样;MAP2 染色时可见部分细胞的细胞质呈红色荧光阳性染色,细胞具有 1 个或 2 个长突起、胞体为圆形或椭圆形,呈典型神经元样,且细胞间交联呈网状;CNPase 染色时未见或仅少量细胞阳性,且阳性细胞无典型的少突胶质细胞形态。

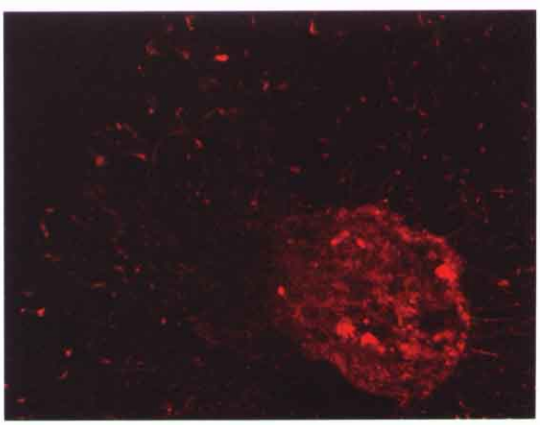


**图 1 细胞球巢蛋白免疫组化染色** (免疫荧光 ×100)

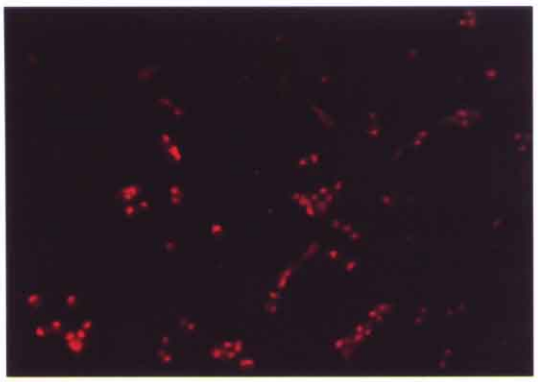
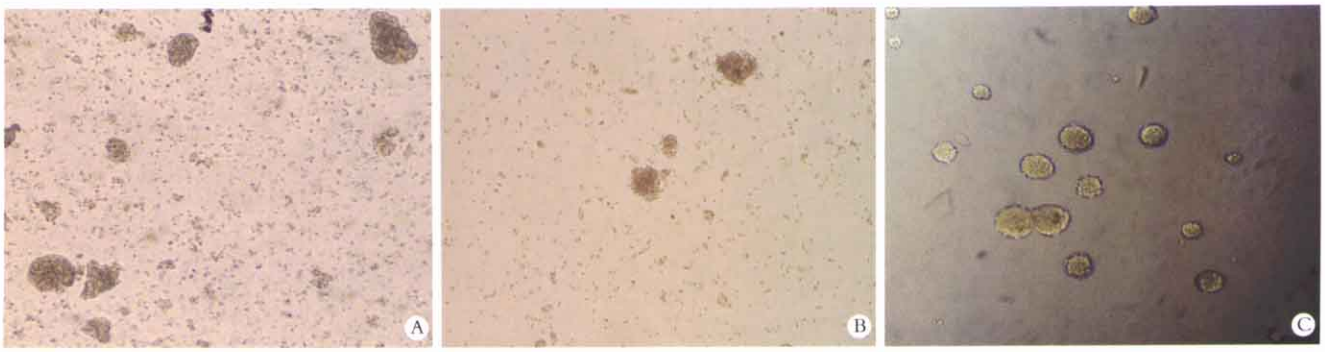


**图 2　细胞球 BrdU 免疫组化染色**　（免疫荧光 ×100）

## 2.2　不同胚龄 NPC 培养及增殖特性

3 组细胞体外悬浮培养生长 1 周，接种后 3 组细胞都为小圆形。小胚龄全脑组和较大胚龄全脑组有较多贴壁细胞，较大胚龄纹状体组贴壁细胞较少。小胚龄全脑组接种后次日逐步聚集，形态不规则；较大胚龄全脑组接种后次日聚集，呈小团状。较大胚龄纹状体组接种后 2 h 细胞聚集成桑椹样，2 d 或 3 d 后呈规则圆形（图 3）。1 周时每低倍镜视野神经球数目，小胚龄全脑组为 9 ~ 11 个；较大胚龄全脑组为 2 ~ 3 个；较大胚龄纹状体组为 15 ~ 23 个。较大胚龄纹状体组产生的神经球数目最多，形态也最为规则，其次为小胚龄全脑组，再次为较大胚龄全脑组。各组 NPC 自第 3 代后，增殖速度减慢，至第 5 ~ 6 代后停止生长，渐趋死亡，体外培养时间约 2 个月。采用有限稀释法挑选单细胞克隆球，可见较大胚龄纹状体组来源的单个细胞培养至 24 ~ 36 h 时，分裂形成了 2 个细胞，到第 7 天时，逐渐形成了由几十个圆形细胞组成的小细胞簇，即单细胞克隆球。但单克隆形成率非常低，约 1%。而其他两组未见单细胞克隆球形成。




A：小胚龄全脑组；B：较大胚龄全脑组；C：较大胚龄纹状体组

**图 3　各组原代细胞培养 1 周时形态变化**　（相差显微镜 ×100）

## 2.3　不同胚龄 NPC 的星形胶质细胞及神经元分化比例

小胚龄全脑组、较大胚龄全脑组及较大胚龄纹状体组来源的第 3 代 NPC 分化后，行 GFAP、MAP2 免疫组化及双苯甲亚胺 H 33342 细胞核染色。发现星形胶质细胞的分化比例分别为（15.97 ± 1.19）%（图 4）、（16.04 ± 3.38）%、（16.40 ± 2.36）%，组间比较差异无统计学意义（$P > 0.05$）；神经元的分化比例分别为（44.84 ± 3.21）%（图 5）、（44.18 ± 4.02）%、（42.88 ± 2.12）%，组间比较差异无统计学意义（$P > 0.05$）。而同组内神经元的分化比例明显高于星形胶质细胞（$P < 0.01$）。

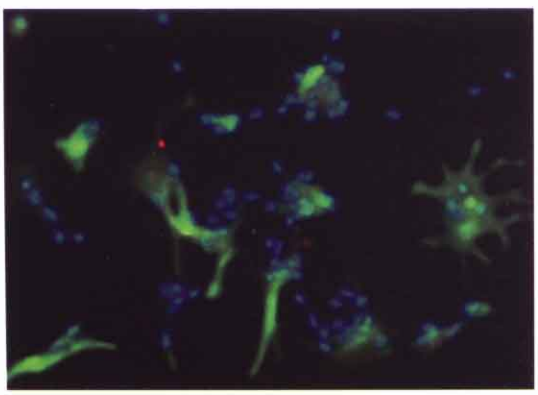


**图 4　NPC 星形胶质细胞分化比例**　（免疫荧光 ×200）

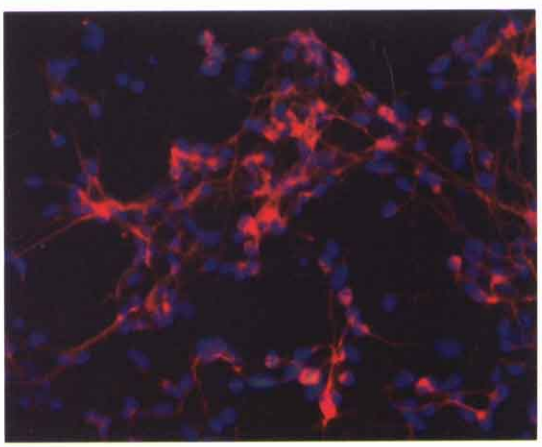


**图 5　NPC 神经元的分化比例**　（免疫荧光 ×200）

## 3　讨论

如何快速有效地分离培养出人胚神经干细胞或前体细胞是对其进一步研究的前提条件。本研究分别从孕 6 ~ 9 周及 14 ~ 17 周人胚脑培养出悬浮细胞球，经鉴定，其具有如下特征[3]：① 未分化属性。胚胎早期

细胞标志物——巢蛋白抗体检测为阳性。②增殖能力。BrdU 掺入实验阳性。③有限的自我更新能力。较大胚龄纹状体组次代神经球可形成单细胞克隆球，说明其具有一定的自我更新能力，但较之神经干细胞，其自我更新能力又有限，而其他各组未形成单细胞克隆球，说明其自我更新能力更低[4,5]。④多向分化潜能。神经球经诱导分化能生成大量神经元和星形胶质细胞，但未见典型的少突胶质细胞。因此，本研究从不同胚龄人胚胎成功分离、培养出 NPC，其聚集成球悬浮生长，称为神经球。

由于血清中存在可诱导细胞分化的因子，因此 NPC 需要在无血清条件下培养。Carpenter 等[6]报道，由 EGF、bFGF、LIF 三者作为外源有丝分裂刺激因子，可以体外长期扩增人胚神经干细胞。EGF 和 bFGF 联合作用可延长有丝分裂时间，LIF 具有促进增殖和抑制分化的作用。并且，Tarasenko 等[7]比较了 bFGF，EGF 和 LIF 单独及联合应用对培养的人胚神经干细胞的影响，发现上述 3 种生长因子联合应用对人神经干细胞的扩增最有效。Neurobasal、B27 为神经组织培养必需营养物质和添加剂。所以，本实验采用 Neurobasal、B27、EGF、bFGF 及 LIF 构成的无血清培养基，并用不含外源有丝分裂促进剂的 1% Fcs 培养基进行分化。在统一各胚龄 NPC 的生长分化外环境后，生长分化的不同多可归因于 NPC 来源的时空特异性。

不同胚龄 NPC 具有不同的增殖分化特性，比如小鼠神经干细胞由于胚龄不同而对 EGF 和 bFGF 有不同的增殖反应[1]。本研究表明胚龄越大，全脑组织中的 NPC 越难分离培养。这除了小胚龄 NPC 对 EGF 和 bFGF 的增殖效应更敏感外，也可能是大胚龄单位脑组织内神经前体细胞数少于小胚龄者。由于小胚龄胚脑较小，纹状体等脑区刚开始发育，通常取全脑进行培养；而较大胚龄者胚脑较大，纹状体已充分发育，所以全脑培养效果不佳时可取特定的脑区进行原代细胞培养。本研究表明，较大胚龄纹状体培养出的神经球数目最多，这可能是由于，在纹状体等部位 NPC 含量相对集中，形成次级神经生发中心，当然也可能由于纹状体来源的 NPC 对 EGF 、bFGF 和 LIF 的促增殖作用更敏感[8]，其具体机制有待进一步研究。

本实验利用有限稀释法挑选单细胞克隆球，发现较大胚龄纹状体组 NPC 自我更新能力可能最强。但总体来说，利用有限稀释法克隆细胞球的形成比较困难。这是由于神经前体细胞具有密度依赖性，单个细胞甚至单个小克隆球在 96 孔板中生长分裂极其缓慢。Hulspan 等[9]应用有限稀释法行单细胞克隆亦未能成功。

本研究比较了不同胚龄 NPC 的星形胶质细胞及神经元的分化比例，发现各组间无明显差异。其原因可能为，虽然它们来源于不同的胚龄，但本实验挑选的胚龄时间段具有相似的分化潜能。但也有可能因为，通过体外相同培养条件的挑选，得到了具有相同有丝分裂原反应特性的 NPC，从而具有了相似的分化特性。

综上所述，从不同发育胚龄的中枢神经系统来源的人神经前体细胞均能在体外扩增，小胚龄可取全脑组织培养，而大胚龄则可取纹状体等特定脑区进行培养，且不同胚龄 NPC 的星形胶质细胞及神经元的分化能力一致。这些研究为选择不同潜能的供体细胞提供依据，并促进它们在神经退行性疾病和中枢神经损伤中的运用。

**参考文献：**


[1] Piao J H, Odeberg J, Samuelsson E B, *et al*. Cellular composition of long-term human spinal cord- and forebrain-derived neurosphere cultures[J]. J Neurosci Res, 2006, 84(3): 471 - 482.

[2] 祝畅，张传汉，刘志恒，等. 人胚神经干细胞的长期贴壁培养和鉴定[J]. 中国康复医学杂志，2006，21(4)：322 - 324.

[3] Reynold B A, Tetzlaff W, Weiss S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes[J]. J Neurosci, 1992, 12(11): 4565 - 4574.

[4] Reynolds B A, Rietze R L. Neural stem cells and neurospheres--re-evaluating the relationship[J]. Nat Methods, 2005, 2(5): 333 - 336.

[5] Bull N D, Bartlett P F. The adult mouse hippocampal progenitor is neurogenic but not a stem cell[J]. 2005, 25(47): 10815 - 10821.

[6] Carpenter M K, Cui X, Hu Z Y, *et al*. *In vitro* expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells[J]. Exp Neurol, 1999, 158(2): 265 - 278.

[7] Tarasenko Y I, Yu Y, Jordan P M, *et al*. Effect of growth factors on proliferation and phenotypic differentiation of human fetal neural stem cells[J]. J Neurosci Res, 2004, 78(5): 625 - 636.

[8] Kelly C M, Tyers P, Borg M T, *et al*. EGF and FGF-2 responsiveness of rat and mouse neural precursors derived from the embryonic CNS [J]. Brain Res Bull, 2005, 68(1 - 2): 83 - 94.

[9] Hulspas R , Tiarks C ,Reilly J ,*et al*. In vitro cell density-dependent clonal growth of EGF-responsive murine neural progenitor cells under serum-free conditions[J]. Exp Neurol, 1997, 148(1): 147 - 156.


（编辑 陈聪连）