短篇论著

文章编号:1000-5404(2010)13-1466-03

层黏连蛋白和 Matrigel 对人胚胎干细胞源性神经上皮祖细胞向神经分化的影响

袁 丁,林 戈,卢光琇 (410078 长沙,中南大学生殖与干细胞工程研究所,人类干细胞工程研究中心)

[摘要] **目的** 比较层黏连蛋白和 Matrigel 在人胚胎干细胞源性神经上皮祖细胞向神经细胞分化过程中的作用。**方法** 人胚胎干细胞诱导分化的神经上皮祖细胞,比较其在层黏连蛋白和 Matrigel 处理的培养皿上贴壁增殖能力,免疫荧光染色检测神经上皮祖细胞标记 Nestin 和 Musashi,神经元标记 Tuj1 和星型胶质细胞标记 GFAP。**结果** 神经上皮祖细胞在 2 种细胞外基质上贴壁率相近,但层黏连蛋白组的神经突起形成率和 Tuj1 阳性细胞比例分别为(97 ± 2)% 和(75 ± 5)%,明显高于 Matrigel 组的(89 ± 3)% 和(50 ± 5)%($P < 0.05$)。**结论** 层黏连蛋白是神经上皮祖细胞向神经元分化的重要细胞外基质。

[关键词] 胚胎干细胞;神经分化;层黏连蛋白
[中图法分类号] R329-33; R329.2; R341 **[文献标志码]** A

人胚胎干细胞向神经细胞诱导分化被认为是胚胎干细胞用于临床替代治疗最有潜力的方向之一。已有研究者将人胚胎干细胞诱导成为神经上皮祖细胞或各种神经细胞类型,除了采用添加多种细胞生长因子或基质细胞共培养的方法外,要提高神经细胞体外分化效率,细胞外基质也是重要的因素之一[1-4]。本研究采用直接诱导的方法将人胚胎干细胞诱导为神经上皮祖细胞,通过消化成体积接近的小细胞团贴壁分化的方法,比较层黏连蛋白和 Matrigel 对神经上皮祖细胞贴壁分化扩增和神经元分化成熟的作用有否差异,以期建立一种简单高效的神经上皮祖细胞贴壁诱导方法,为特定细胞类型的诱导分化提供技术平台和细胞来源。

1 材料与方法

1.1 细胞系

人胚胎干细胞为 chHES-8 和 chHES-22 两株胚胎干细胞系[5],常规培养在人胚胎成纤维细胞制备的饲养层上。培养基为:培养基为人胚胎干细胞培养基:DMEM/F12,15% Knockout Serum Replacement,0.1 mmol/β-巯基乙醇,1 mmol/L L-谷氨酰胺,1% 非必须氨基酸,4 ng/ml 成纤维细胞生长因子 2。

1.2 主要试剂

DMEM /F12 (1∶1)培养基、Knockout Serum Replacement 、N2 添加剂、Alexa Fluor 抗小鼠 488、抗兔 594 (Gibco 公司,USA),成纤维细胞生长因子 2 (R&D 公司,USA),脑源性神经营养因子、胶质源性神经营养因子(Biosource 公司,USA),维生素 A、环腺苷酸(Sigma,USA),小鼠抗人 Nestin、兔抗人 Musashi、小鼠抗人 Tuj1、小鼠抗人 Otx2、兔抗人酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)、小鼠抗人胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)(Chemicon 公司,USA)。

1.3 方法

1.3.1 人胚胎干细胞向神经上皮祖细胞的诱导分化 传代培养至第 4 ~ 5 天的人胚胎干细胞,将用于神经上皮的诱导分化,将培养基更换为神经诱导培养基:DMEM/F12,1% N2 supplements,1 mmol/L L-谷氨酰胺,1% 非必须氨基酸,添加 4 ng/ml 成纤维细胞生长因子 2。在饲养层细胞上培养 10 d,大量神经上皮"rosette"结构出现提示神经上皮祖细胞产生。

1.3.2 神经上皮祖细胞的贴壁分化 将分化第 10 天的克隆机械切割成细胞团,于添加 20 ng/ml FGF2 的神经诱导培养基中,悬浮培养 4 ~ 5 d。收集细胞团于 1.5 ml 离心管中,室温下待其自然沉降 5 min,去除残余培养基,添加 1 000 μl Hanks 平衡盐溶液,37 ℃培养箱中孵育 10 ~ 15 min,200 μl 加样器枪头轻轻吹散细胞团,使其成为直径为 100 ~ 200 μm 的小细胞团,新鲜培养基洗涤 1 次,重悬细胞,将其在 10 μg/ml 层黏连蛋白处理的细胞培养皿上贴壁培养 10 d,或者在 Matrigel 处理的细胞培养皿上贴壁培养,培养基为神经诱导培养基添加 10 ng/ml 脑源性神经营养因子, 10 ng/ml 胶质源性神经营养因子, 0.2 mmol/L 维生素 A 和 1 μmol/L 环腺苷酸。贴壁第 2 天,计数细胞团贴壁的效率,贴壁第 5 天,计数有明显神经丝样突起形成的细胞团比例。对照组采用为添加各种营养因子的神经诱导培养基。

1.3.3 免疫荧光染色分析 加入 4% 多聚甲醛,室温固定 20 min,0.2% Triton X-100 室温处理 10 min,4% 山羊血清室温封闭 30 min,4% 山羊血清稀释一抗,4℃湿盒内孵育过夜,抗体稀释比例为 Nestin(1∶50), Musashi(1∶500),Otx2(1∶400), TH (1∶500), Tuj1(1∶800), GFAP(1∶400)。二抗为 1∶1 000 稀释的 Alexa fluor 488 或 594,室温避光孵育 1 h,DAPI 染核,Nikon 荧光显微镜下观察。分别计数贴壁第 10 天层黏连蛋白和 Matrigel 处理皿中,Tuj1 和 GFAP 染色阳性细胞的百分比。

1.4 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验。

2 结果

2.1 神经上皮祖细胞贴壁生长与染色鉴定

消化后的神经上皮祖细胞易于贴壁,细胞呈长梭形,中央可见细胞排列紧密呈 rosette 结构,四周可见众多的神经丝状突起(图 1A、B)。贴壁第 2 天染色发现,这些细胞表达前中脑的抗原标记 Otx2 的阳性细胞为(93 ± 3)%,说明这些贴壁细胞含

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863 计划,2006AA02A102);国家重点基础研究发展计划(973 计划,2007CB948103)
[通信作者] 卢光琇,电话:(0731)84497661,E-mail: lugxdirector@yahoo.com.cn

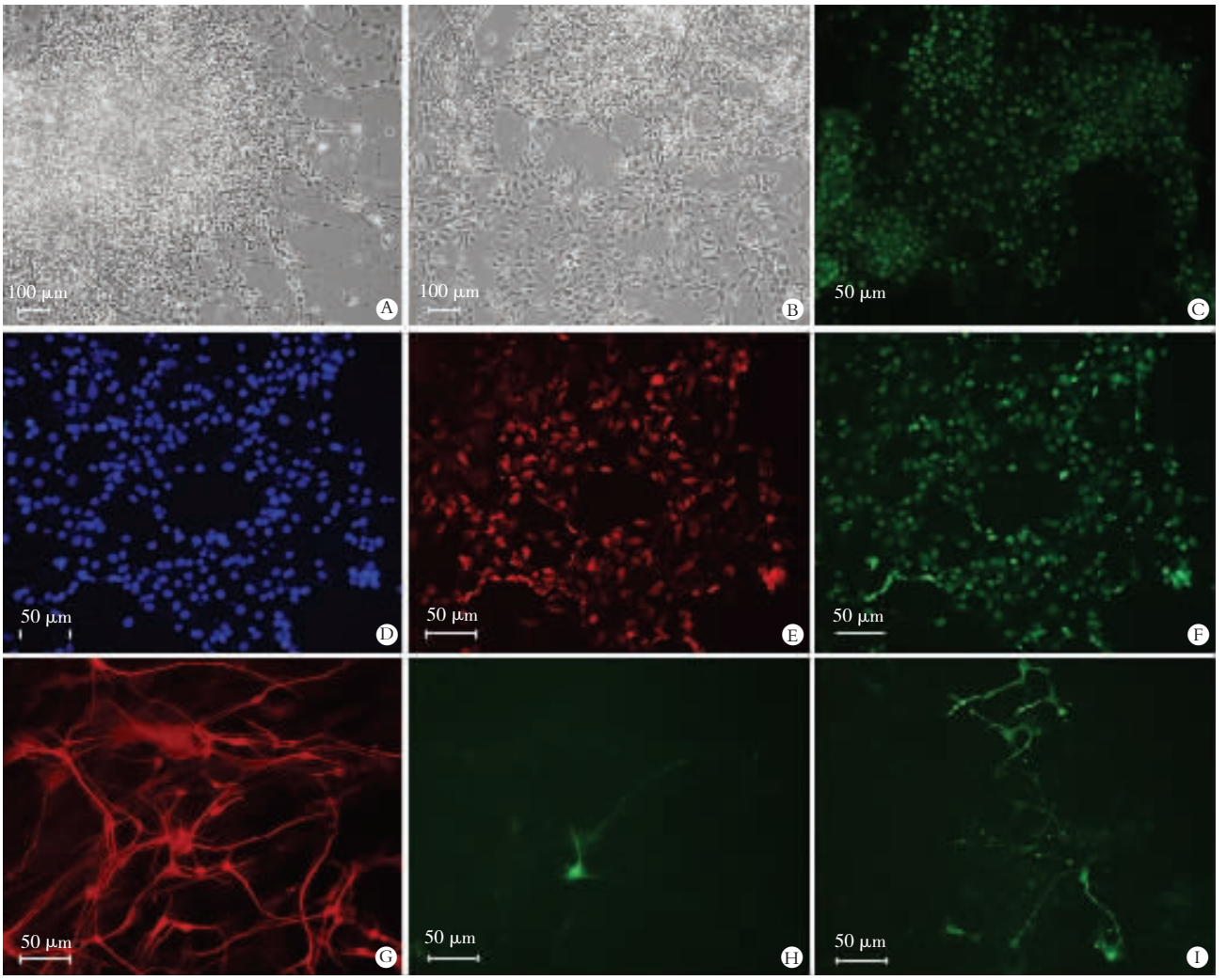
有大量的神经上皮祖细胞，且多表达前中脑的位置标记（图 1C）。同时，这些细胞同时为 Nestin 和 Musashi 染色阳性，分别为（94 ± 2）% 和（95 ± 2）%（图 1D ~ F）。贴壁第 10 天，染色发现大量含有神经丝状细胞突起的 Tuj1 染色阳性细胞，提示神经元的形成，其中有极少数细胞表达多巴胺能神经元的标记 TH，少数细胞星型胶质细胞的标记 GFAP 染色阳性，提示星型胶质细胞的形成（图 1G ~ I）。

2.2　层黏连蛋白和 Matrigel 对神经球贴壁和神经元发生的促进作用

诱导的神经上皮祖细胞在层黏连蛋白（laminin）和 Matrigel 处理的皿上均能很好的贴壁，且多数细胞团形成一贴壁第 2 天的贴壁率均很高，分别为为（98 ± 2）% 和（100 ± 0）%，二者没有明显差异（$P > 0.05$）。但是层黏连蛋白组细胞团神经突起形成的时间较早，比例较高，也更为密集。而 Matrigel 组的神经上皮贴壁后，有部分细胞团不形成神经突起，而是分化为扁平上皮样细胞，且随着贴壁时间的推移这类上皮样细胞还会扩增。到贴壁第 5 天时，层黏连蛋白组神经丝形成的比例为（97 ± 2）%，明显高于 Matrigel 组（89 ± 3）%，有显著性差异（$P < 0.05$）。贴壁第 10 天，层黏连蛋白组的 Tuj1 阳性细胞比例为（75 ± 5）%，明显高于 Matrigel 组（50 ± 5）%（$P < 0.05$），提示层黏连蛋白组神经前体细胞形成的神经元比例较高。二者的 GFAP 阳性细胞比例无差异（$P > 0.05$），分别为（15 ± 3）% 和（17 ± 4）%。对照组的神经上皮祖细胞贴壁后，仅有部分细胞分化为神经细胞，贴壁第 10 天时，多数细胞死亡或脱壁，Tuj1 和 GFAP 阳性细胞分别为（20 ± 4）% 和（5 ± 2）%。

3　讨论

神经细胞的诱导分化需要适当的微环境，包括微环境中的细胞，可溶性的诱导因子和细胞外基质等。细胞外基质不但为细胞提供了生长分化的支架，也提供了维持细胞存活、迁移和命运决定的调控因子。细胞外基质通常是大分子糖蛋白，包括纤维黏连蛋白，层黏连蛋白和蛋白多糖等，其表达有一定的时间特异性模式，如在神经祖细胞分化、迁移和神经轴突形成中表达很丰富，而到了发育末期则表达下调[6]。层黏连蛋



A、B：分别为层黏连蛋白和 Martigel 处理皿上培养 10 d 的神经上皮祖细胞的光镜观察；C、F：分别为贴壁 2 d 的神经前体细胞 Otx2、DAPI、Nestin、Musashi 染色观察；G、I：分别为贴壁 10 d 的神经细胞 Tuj1、TH、GFAP 染色观察

图 1　神经上皮祖细胞贴壁后的培养染色鉴定

白、纤维黏连蛋白、胶原或 Matrigel 均能促进神经祖细胞或不同类型的神经前体细胞的扩增、迁移和分化。人胚胎干细胞向神经细胞的诱导分化多采用神经上皮祖细胞贴壁培养的方法,如何促进神经上皮祖细胞的贴壁效率并同时促进神经细胞的发生是提高神经诱导效率的关键问题之一[7]。多数神经细胞分化采用层黏连蛋白处理培养皿来培养神经上皮祖细胞,促进神经上皮祖细胞的贴壁和分化[8]。Matrigel 多用于人胚胎干细胞无饲养层培养的培养皿处理,也可用于胚胎干细胞的贴壁诱导分化[9]。本实验采用层黏连蛋白和 Matrigel 两种细胞外基质进行神经上皮祖细胞贴壁和诱导分化的比较,发现二者都能有效促进神经上皮的贴壁,但是贴壁后,层黏连蛋白能更好地促进神经上皮祖细胞向神经元的分化成熟,更早更多地形成神经突起;而 Matrigel 上神经突起形成较晚较少,可能与其对上皮样细胞增殖的促进作用有关。因此,采用机械消化加上层黏连蛋白处理培养皿的方法,可以促进神经上皮祖细胞的贴壁和分化,有利于神经元前体细胞的扩增与分化成熟。

参考文献:

[1] Gong J, Sagiv O, Cai H, *et al*. Effects of extracellular matrix and neighboring cells on induction of human embryonic stem cells into retinal or retinal pigment epithelial progenitors[J]. Exp Eye Res, 2008, 86(6): 957 - 965.

[2] Dhara S K, Hasneen K, Machacek D W, *et al*. Human neural progenitor cells derived from embryonic stem cells in feeder-free cultures[J]. Differentiation, 2008, 76(5): 454 - 464.

[3] Ma W, Tavakoli T, Derby E, *et al*. Cell-extracellular matrix interactions regulate neural differentiation of human embryonic stem cells[J]. BMC Dev Biol, 2008, 8: 90.

[4] Axell M Z, Zlateva S, Curtis M. A method for rapid derivation and propagation of neural progenitors from human embryonic stem cells[J]. J Neurosci Methods, 2009, 184(2): 275 - 284.

[5] Zhou J, Ou-Yang Q, Li J, *et al*. Human feeder cells support establishment and definitive endoderm differentiation of human embryonic stem cells[J]. Stem Cells Dev, 2008, 17(4): 737 - 749.

[6] Lathia J D, Patton B, Eckley D M, *et al*. Patterns of laminins and integrins in the embryonic ventricular zone of the CNS[J]. J Comp Neurol, 2007, 505(6): 630 - 643.

[7] Illes S, Theiss S, Hartung H P, *et al*. Niche-dependent development of functional neuronal networks from embryonic stem cell-derived neural populations[J]. BMC Neurosci, 2009, 10: 93.

[8] Hong S, Kang U J, Isacson O, *et al*. Neural precursors derived from human embryonic stem cells maintain long-term proliferation without losing the potential to differentiate into all three neural lineages, including dopaminergic neurons[J]. J Neurochem, 2008, 104(2): 316 - 324.

[9] Chen T, Bai H, Shao Y, *et al*. Stromal cell-derived factor-1/CXCR4 signaling modifies the capillary-like organization of human embryonic stem cell-derived endothelium *in vitro*[J]. Stem Cells, 2007, 25(2): 392 - 401.

(**收稿**:2010-01-12;**修回**:2010-03-02)

(编辑 吴培红)

短篇论著

文章编号:1000-5404(2010)13-1468-03

术中 B 超辅助下经外侧裂-岛叶入路显微手术治疗基底节区脑出血

何 程[1],林爱国[2],王俊伟[1],吴 南[1],冯 华[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院神经外科,全军神经系统疾病微创诊治专科中心[1];629000 四川 遂宁,遂宁市第一人民医院神经外科[2])

[摘要] **目的** 观察 B 超辅助下经外侧裂-岛叶入路显微手术治疗基底节区脑出血的疗效。**方法** 回顾性分析我科近 2 年 81 例(平均 62.3 岁)高血压性基底节区脑出血患者在 B 超辅助下经外侧裂-岛叶入路显微手术清除血肿的疗效,并实施随访。**结果** 术后 3 d 内复查头颅 CT 血肿清除率为 93.8%。死亡 7 例(8.64%)。术后 6 ~ 12 个月随访按日常生活活动(Activities of Daily Living)分级:Ⅰ级 13 例(16.05%)、Ⅱ级 29 例(35.80%)、Ⅲ级 26 例(32.10%)、Ⅳ级 5 例(6.17%)、Ⅴ级 1 例(1.24%)。**结论** 术中 B 超辅助下经外侧裂-岛叶入路显微手术是治疗高血压性基底节区脑出血的一种有效微创治疗方法。

[关键词] 脑出血;基底节区;术中 B 超;显微神经外科;外侧裂入路

[中图法分类号] R651.1; R743.34; R445.1 **[文献标志码]** A

高血压脑出血是高血压的严重并发症之一,具有较高病死率及病残率[1]。对基底节区的脑内血肿(出血量 40 ~ 80 ml)清除有多种方式,现较为公认的方式是经外侧裂-岛叶入路显微手术清除血肿[2,3]。我们于术中 B 超辅助下经外侧裂-岛叶入路显微手术清除基底节区脑内血肿更进一步提高血肿清除率、减少再出血、达到微创,更好的保护神经功能。现报造如下。

[通信作者] 林爱国,E-mail:snlaguo@yahoo.cn