临床神经生化专栏 文章编号:0253-3626(2010)09-1295-03

体外培养神经干细胞球的离散:一种安全有效的方法

刘 霞[1],Djung Lilya Wati[2],齐志国[3],李雷雷[2],房 亮[2],谢 鹏[1]

(1.重庆医科大学附属第一医院神经内科;2.重庆医科大学神经科学研究中心;3.神经生物学重庆市市级重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨一种安全有效地对体外培养神经干细胞球进行离散的方法。方法:采用常规胰蛋白酶消化、单纯巴斯德吸管吹打、滤网研磨、控制神经球体积的胰酶短时消化4种方法,比较其各自的离散效果和离散后细胞存活情况。结果:胰酶消化较长时间虽然可以得到单细胞但是细胞难以存活,单纯巴斯德吸管吹打不能完全离散神经球,不锈钢滤网研磨细胞损伤大,存活率低下,而采用控制神经球体积结合胰蛋白酶短时消化可以轻易获得单细胞并且细胞存活率明显高于其他方法(93.2%,$P<0.05$)。结论:控制神经球体积的胰酶短时消化法是离散神经干细胞球的一种安全有效的方法。

【关键词】神经干细胞;神经球;离散

【中国图书分类法分类号】R331 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-04-15

Dissociating neurospheres of neural stem cell cultured in vitro: a safe and effective method

LIU Xia, et al

(*Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore a safe and effective method for dissociating neural stem cell neurospheres cultured in vitro. *Methods*: Neurospheres were dissociated by using of four methods, that digestion of trypsin, triturating only with pasteur pipette, grinding with stainless steel mesh and controlling volume of nerospheres with short-time digestion of trypsin. The four methods were evaluated by comparing their discrete capacity and cell survivals. *Results*: Trypsin digestion time prolonged led to dissociation of neurospheres, but neural stem cells (NSCs) were hardly survival. Neurospheres could not be dissociated completely by triturating only with pasteur pipette. Grinding with stainless steel mesh would damage neurospheres severely induced low survival rates of NSC. In contrast, controlling volume of nerospheres with short-time digestion of trypsin could separate neurospheres better than the other methods and higher NSC survival rate (93.2%, $P<0.05$). *Conclusion*: Controlling volume of nerospheres with short-time digestion of trypsin is a safe and effective method for dissociating neurospheres of NSCs cultured in vitro better than other three methods.

【Key words】Neural stem cell; Neurosphere; Dissociation

神经干细胞(Neural stem cell,NSC)是指一类能够形成神经组织,具有多分化潜能,能够自我更新和自我繁殖的细胞[1]。自 Renyolds BA 1992 年从成年哺乳动物体内培养出神经干细胞并提出成年人体内也存在神经干细胞以来,有关神经干细胞的研究已逐渐成为神经科学研究的热点。神经干细胞在体外培养体系中以神经球的方式生长增殖,现有多种离散神经球的方法,但在安全性或有效性方面存在各种缺陷,对实验过程造成困扰。作者在实践过程中摸索出一种方法,通过控制神经球体积结合胰蛋白酶短时消化,提高了离散神经干细胞球的安全性和有效性。

1 材料与方法

1.1 实验分组

实验分为控制神经球体积组及对照组。对照组根据离散方法不同又分为常规胰蛋白酶消化组,单纯巴斯德吸管吹打组,不锈钢滤网研磨组。控制神经球体积组采用控制神经球体积结合胰蛋白酶短时消化方法离散神经球。

1.2 试剂与材料

动物:出生 24 h 内的 Sprague-Dawley 大鼠,由重庆医科大学实验动物中心提供,符合国家级动物标准。试剂:DMEM/F12 培养基、B27 添加剂、胰蛋白酶(GIBCO,美国),EGF、

作者介绍:刘 霞(1976-),女,硕士,研究方向:抑郁症相关研究。

通讯作者:谢 鹏,男,教授,E-mail:peng.xie58@gmail.com。

基金项目:国家重大科学研究计划(973 计划)项目(编号:2009CB918302)。

bFGF、台盼兰(SIGMA,美国)。设备:相差显微镜、显微数码照相装置(Nikon,日本)。

1.3 方法

1.3.1 神经干细胞的分离和培养 对照组:方法参照Vescovi AL[2]等,无菌条件下取新生 SD 鼠的海马组织,剥离脑膜及血管,用眼科剪将海马组织剪碎,加入少量基础培养基,用巴斯德吸管反复吹打 20 余次,经 300 目不锈钢滤网滤过,1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞。细胞重悬于神经干细胞培养基(DMEM/F12 培养基,B27,EGF、bFGF)。以 2×10^5 个 /ml 密度接种于玻璃培养瓶,37℃、5%CO_2 培养箱培养 3 d 后,离心收集未贴壁生长的细胞,更换新鲜培养液,稍加吹打分散小细胞团,在培养 4 d 后重复此步骤 1 次,以后每 5~7 d 传代 1 次。

控制神经球体积组:神经干细胞分离方法同对照组。但自接种次日起,每日用相差显微镜观察神经球 1~2 次,必要时用巴斯德吸管轻柔吹打细胞,将细胞球直径控制在 50 μm 左右,其余处理同对照组。

1.3.2 神经干细胞球的离散 取体外培养传至 3 代的神经干细胞进行如下离散实验。常规胰蛋白酶消化:将悬浮生长的神经球吸至 10 ml 离心管中,1 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液。用 0.25%胰蛋白酶 1 ml 重悬神经球,并于 37℃消化 5 min~1 h 等, 用 1 ml 含 10%胎牛血清 DMEM/F12 培养液终止消化,用玻璃吸管吹打消化后的神经球 20 余次,离心并用神经干细胞培养液重悬后,台盼蓝染色,计数。

单纯巴斯德吸管吹打: 将悬浮生长的神经球吸至 10 ml 离心管中,用玻璃吸管反复吹打 70 次,台盼蓝染色,计数。

不锈钢滤网研磨:在 10 ml 离心管上放置玻璃漏斗,将神经球移至平放于玻璃漏斗上的 300 目不锈钢滤网上,用 1 次性注射器筒芯研磨,用 DMEM/F12 培养液冲洗滤网,1 000 r/min 离心 5 min,换用神经干细胞培养液重悬细胞,台盼蓝染色,计数。

控制神经球体积结合胰蛋白酶短时消化:将控制神经球体积组的神经球吸至 10 ml 刻度离心管中,1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液。用 0.25%胰蛋白酶 1 ml 重悬神经球,并于 37℃消化 5 min,用含 10%胎牛血清 DMEM/F12 培养液 1 ml 终止消化,吹打数次,离心并用神经干细胞培养液重悬后,台盼蓝染色,计数。

以上操作均在无菌条件下进行,离散后的各组细胞均按 2×10^5 个/ml 密度接种于玻璃培养瓶,置于 37℃,5%CO_2 培养箱继续培养。

1.3.3 相差显微镜下观察神经球单细胞化效果 接种于培养瓶后,于离散后即刻、1 d 后、1 周后在相差显微镜下观察神经球单细胞化效果及神经干细胞生长情况。

1.3.4 活细胞计数 吸取 100 μl 上述刚离散后和继续培养 1 d 后的各组细胞悬液至 EP 管内,加入 100 μl 台盼蓝染色液,轻轻吹打混匀,静置 3 min,用血球计数板进行细胞计数,细胞存活率 = 未被蓝染的细胞数/细胞总数。

1.4 统计学处理

各组细胞存活率以百分比的均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,各组间离散后细胞存活率和离散次日细胞存活率之间的比较采用方差分析。统计检验为双侧概率检验。采用 SPSS10.0 软件进行统计分析。

2 结 果

用上述 4 种方法离散体外培养的神经干细胞球的效果存在差异。用 0.25%胰蛋白酶消化神经干细胞球,消化时间在 30 min 以内,用吸管吹打难以将神经球离散(图 1),延长消化时间,经吹打后有较多细胞从神经球离散出来,但细胞损伤严重,细胞碎片增多(图 2)。单纯用巴斯德吸管吹打离散,尽管吹打达 70 次,仅有少量细胞从神经球分离出来(图 3),在离散次日可见大量神经球崩解,细胞死亡。不锈钢滤网研磨可将大多数神经球离散成单细胞,但细胞损失严重,可见较多的细胞碎片和死细胞(图 4),但存活的细胞继续培养生长良好。将神经细胞球体积体积控制在 50 μl 左右,用 0.25%胰蛋白酶消化 5 min,吹打数次后可将神经球轻易地分散成单细胞(图 5),台盼蓝染色细胞存活率约为 93%,继续培养 1 d 后虽然细胞存活率减低至约 82%,但此后生长情况好,见表 1。

控制神经球体积结合胰蛋白酶短时消化法离散神经球,神经细胞存活率明显高于其它 3 组细胞存活率($P<0.05$,差异有统计学意义)。

3 讨 论

神经干细胞研究不仅可阐明神经发育的机制,而且在神经系统损伤修复和神经退行性疾病的细胞替代治疗以及基因治疗中都有巨大的应用[3],近年来有大量关于神经干细胞研究的报道。用上述方法可以成功地从大鼠脑海马中分离培养出神经干细胞,这些细胞可在体外长期培养,大量增殖,并且其子代细胞也保持了干细胞的特征,能自我更新,自我复

表 1 4 种方法离散神经球后的细胞存活率($\bar{x}\pm s$)

时间	胰酶消化 60 min	单纯用玻璃吸管吹打	不锈钢滤网研磨	控制神经球体积结合胰蛋白酶短时消化
离散后即刻	69.1 ± 4.2	65.1 ± 4.0	64.1 ± 2.3	93.2 ± 1.3*
离散后 1 d	54.3 ± 5.2	51.7 ± 4.8	61.3 ± 1.2	82.3 ± 2.4*

注:*$P<0.05$,差异有统计学意义



图 1 胰蛋白酶消化离散 30 min 的神经干细胞（×100）

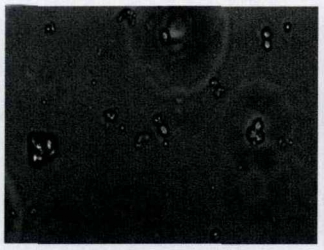


图 2 胰蛋白酶消化离散 60 min 的神经干细胞（×100）

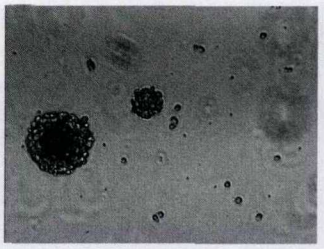


图 3 单纯巴斯德吸管吹打离散的神经干细胞（×100）

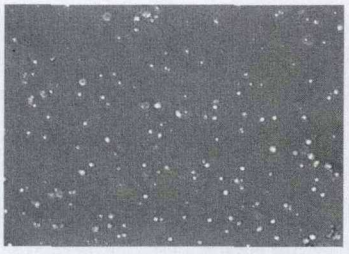


图 4 不锈钢滤网研磨离散的神经干细胞（×100）

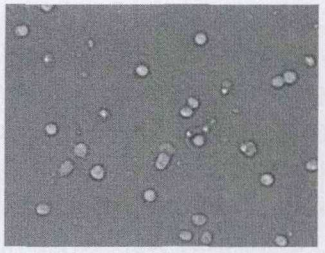


图 5 控制神经球体积及胰蛋白酶短时消化离散的神经干细胞（×200）

制，有多向分化潜能等。在体外培养过程中，若神经球体积过大，中央部分的细胞会因为缺乏营养而死亡[4]，神经球过于密集也会出现生长抑制，故应及时分散传代。在干细胞研究中，许多实验方法都是针对单个细胞进行的，将神经干细胞球单细胞化是实验中的必要步骤。

本研究发现，将神经干细胞球的直径控制在 50 μm 左右是安全有效离散的关键。与其它方法相比，控制神经干细胞球体积结合胰蛋白酶短时消化法能更安全和有效地离散神经干细胞球。如未对神经球体积进行有效控制，离散时单纯用巴斯德吸管吹打，尽管吹打次数达百余次，对大部分神经球都无法加以离散。本实验室曾尝试用多种酶消化液（包括胰蛋白酶、分散酶、胶原酶、透明质酸酶等）进行离散未有效控制体积的神经球，并且采用过各种酶消化液的组合和长短不同的作用时间，都不能达到安全有效的结果。延长消化时间至 30 min 以上虽然可使其分散为单细胞，但却导致细胞大部分或全部死亡[5]。用不锈钢滤网研磨离散干细胞球后，细胞存活率仅有 60%~65%，不利于传代培养和继续实验研究。而在有效控制神经干细胞球体积后，结合短时间胰蛋白酶消化，对细胞损伤小，细胞分散程度高，分散后细胞存活率高，对后继实验如流式细胞术，免疫细胞染色，细胞计数以及诱导分化等的结果影响也小。

参 考 文 献

[1] Fred H G. Mammalian neural stem cells[J].Science,2000,287(25):1433-1438.

[2] Vescovi A L,Snyder E Y. Establishment and properties of neural stem cell clones: plasticity in vitro[J]. Brain Pathol,1999,9(3):569-598.

[3] Kelly S,Bliss T M,Shah A K,et al. Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex[J]. Proc Natl Acad Sci,2004,101(32):11832-11844.

[4] 郑志竑，胡建石，陈文列，等.体外培养的神经干细胞球的超微结构[J].解剖学报，2003，34(6)：627-630.

[5] 郑志兹，林 玲，胡建石，等.大鼠脑神经干细胞的体外培养、增殖和分化[J].神经解剖学杂志，2003，19(1)：33-36.

（责任编辑：张学颖）

欢迎投稿，欢迎订阅

《医学教育探索》

邮发代号 78-127