基础研究 文章编号:0253-3626(2008)s1-0044-04

大鼠神经干细胞分离和培养的实验研究

何 梅[1],王学峰[1],马珊珊[2],席志芹[1]

(1.重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆 400016;2.山西医科大学第一附属医院神经内科,太原 030001)

【摘 要】目的:探索体外培养大鼠神经干细胞(Neural stem cells,NSCs)的方法和实验条件,建立一种较为可靠的神经干细胞培养方法。方法:分别选取孕14~16dSD胎鼠和新生1d的SD大鼠进行神经干细胞培养,采用单纯机械吹打和机械吹打加酶消化两种方法进行消化,对培养出的细胞进行神经干细胞、神经元、神经胶质细胞的免疫细胞化学和免疫荧光鉴定。结果:用2种来源的大鼠培养出的原代细胞,均表达Nestin,诱导分化后的细胞表达GFAP和MAP-2。结论:大鼠神经干细胞的原代分离与培养的关键是单细胞悬液的获得,消化液浓度太高或消化时间太长,容易因消化过度致细胞损伤甚至死亡。胎鼠来源者神经球形成早,数量多,增殖活力更强,但原代取材过程易被污染。新生鼠来源者鼠源易获得,组织取材过程操作简单,但神经干细胞成球率低。

【关键词】神经干细胞;细胞培养;免疫荧光;免疫生化

【中国图书分类法分类号】R741 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-08-29

Study on isolation and culture of neural stem cells from rat brain

HE Mei, et al

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

【Abstract】*Objective*: To establish the method of culturing neural stem cells (NSCs) from rat brain. *Methods*: E14~16 SD embryonic rat brain and postnatal one-day(P1) rat brain were respectively chose to culture neural stem cells, and two digestive methods that simple mechanical digestion and mechanical combined with chemical digestion were used to determine the best conditions in primary culture. Immunocytochemistry and immunofluorescence were used to identify NSCs, neurons and neuroglial cells. *Results*: Both the primary cells from two different kinds of rat brains expressed nestin antigen and the differentiated cells expressed GFAP and MAP-2 antigen. *Conclusion*: The key point of primary NSCs culture was obtaining the monoplast suspension. Overdigestion led to cell injury even death. NSCs from embryonic rat brain had better proliferation ability and could form cell clones earlier and more than NSCs from newborn rat brain, but they were easier to be contaminated. Obtaining newborn rat brain and isolation NSCs from newborn rat brain were easier, but NSCs from newborn rat brain had worse proliferation ability.

【Key words】Neural stem cells; Cell culture; Immunofluorescence; Immunocyto chemistry

NSCs是一种原始的未分化细胞,它有和成熟神经细胞相同的基因,且具有自我增殖和多向分化的潜能,神经干细胞研究是21世纪生命科学研究的重要领域。自从Reynolds等[1]人从成体脑组织内分离出NSCs以来,此领域的研究已经取得了长足进展,这不仅给神经损伤的修复及神经系统退行性疾病的治疗带来了新的希望,而且通过建立体外模型,利用NSCs高度可塑性及对疾病和内环境因素变化的敏感性,在模拟疾病环境下观察NSCs的变化,以此来诊断神经系统疾病的方法正逐步走向临床。而NSCs的体外分离与培养正是进行这些研究的基础,为此,我们探索了大鼠NSCs体外分离与培养方法,现报道如下。

作者介绍:何 梅(1982-),女,硕士,
研究方向:癫痫的诊治与发病机制。
通讯作者:王学峰,男,教授,E-mail:xfyp@163.com。

1 材料与方法

1.1 实验动物

孕14~16dSD胎鼠,清洁级新生1dSD大鼠。

1.2 培养基

DMEM/F12(1:1)(Hyclone 公司),2%的B_{27}(Invitrogen公司)、20ng/mlEGF(Peprotech公司)和20ng/mlb-FGF(Peprotech

公司。

1.3 组织取材

孕龄14～16dSD孕鼠1只，给予3.5%水合氯醛0.1ml/kg腹腔麻醉，橡皮筋将其仰卧固定于硬木板上，消毒腹部皮肤，剪开腹部皮肤肌肉，进入腹腔，暴露子宫，迅速分离出胎鼠，放进盛有75%酒精的小烧杯中，移进超净工作台，无菌条件下取出胎鼠脑组织，放入盛有冰冷的D-Hanks液的培养皿中。

新生1dSD大鼠4只，于-20℃冰箱内放置5min，放进盛有75%酒精的小烧杯中浸泡5min，移进超净工作台，无菌条件下取出大鼠脑组织，放入盛有冰冷的D-Hanks液的培养皿中。

1.4 脑组织的消化

新生1dSD大鼠脑组织采用以下2种方法进行消化，并比较其消化效果，根据比较的结果，胎鼠来源的脑组织仅采用了后面一种消化方法。

1.4.1 单纯机械吹打 用眼科镊仔细分离脑膜，去除脑干和小脑，剩余组织用眼科剪剪碎，用巴氏吸管反复吹打成乳糜状，经200目细胞筛过滤，过程中仍用巴氏吸管吹打，获得单细胞悬液。

1.4.2 机械吹打加酶消化 脑组织剪碎后加入10倍体积消化液，消化液浓度分别选用0.1%胰蛋白酶-0.02%EDTA消化液(Hyclone公司)，0.25%胰蛋白酶-0.02%EDTA消化液，0.5%胰蛋白酶-0.02%EDTA消化液，37℃孵育15min，将细胞液盛于培养瓶内于倒置显微镜下观察有较多单细胞时，10%胎牛血清(杭州四季青公司)终止消化，经200目细胞筛过滤，获得单细胞悬液。

1.5 接种

将机械吹打加酶消化法获得的单细胞悬液用无生长因子的培养基冲洗2次，1 000r/min×5min离心，完全培养基重悬，分别按5×10^4个/ml、5×10^5个/ml、5×10^6个/ml密度将细胞接种于50ml培养瓶中，置于37℃、5%CO_2培养箱中培养。

1.6 换液

2~3d后，若细胞生长良好，培养液由红色变微黄，1 000r/min×5min离心后半量换液。

1.7 传代

7～9d后对细胞进行传代，传代前显微镜下随机选取10个高倍视野，计算平均每个视野的神经球数，用$\bar{x}\pm s$表示[2]。采用巴氏吸管轻柔吹打，并用0.1%胰蛋白酶-0.02%EDTA消化液1ml 37℃孵育10min，10%胎牛血清终止消化后再行吹打，离心，干细胞培养液重悬细胞，按1:1.5比例进行传代，对于神经干细胞球小于0.5个/HP则不进行分瓶，对神经干细胞球小于0.1个/HP者合于同时接种的其它培养瓶中。

1.8 神经干细胞的鉴定

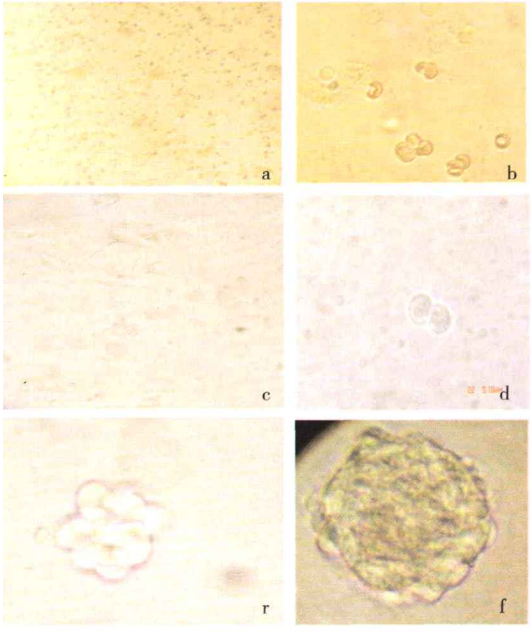
将生长良好的第3代神经球吹散后爬片，固定，进行神经上皮干细胞蛋白(Neuroepithelial stem cell protein,Nestin)(博士德生物工程有限公司)的免疫细胞化学染色及免疫荧光染色鉴定。用含10%胎牛血清的DMEM/F12诱导神经干细胞分化，7d后行微管相关蛋白-2(Microtubule associated protein-2,MAP-2)(博士德生物工程有限公司)和神经胶质酸性蛋白(Glial fibrillary acidic protein,GFAP)(博士德生物工程有限公司)的免疫细胞化学染色及免疫荧光染色分别鉴定神经元和神经胶质细胞[3]。

1.9 统计方法

实验中数据分析采用SPSS14.0统计软件，平均数用$\bar{x}\pm s$表示，两两比较采用LSD-t检验，检验标准为$\alpha=0.05$。

2 结 果

刚接种的细胞为圆形，边缘光滑，折光性强，其中混有较多双凹圆盘状细胞，次日可见较多红细胞贴壁，聚集成团，并有较多细胞碎片，贴壁细胞中可见少量有突起的细胞，悬浮细胞中可见哑铃状二分裂细胞及3～4个细胞形成的神经球。3d后可见葡萄串状和桑椹状细胞球，7～9d后可见新旧不等的葡萄串状、桑椹状和蜂窝样细胞球(见图1)。

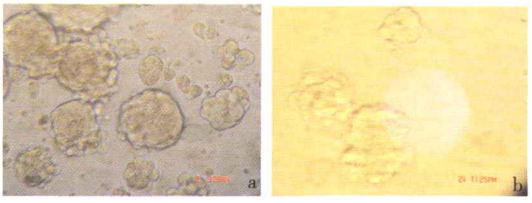


a .刚接种的细胞 倒置相差显微镜×100；
b.培养第2d，红细胞聚集 倒置相差显微镜×200；
c.培养第2d，贴壁的细胞 倒置相差显微镜×200；
d.培养第2d，哑铃状分裂的细胞 倒置相差显微镜×400；
e.培养第4d，新生神经球 倒置相差显微镜×400；
f.培养第9d，成熟神经球 倒置相差显微镜×400

图1 培养中神经干细胞的变化(新生SD大鼠来源，采用机械吹打加0.25%胰蛋白酶-0.02%EDTA消化液消化)

相同条件下(均采用机械吹打加0.25%胰蛋白酶-0.02%EDTA消化，按5×10^5个/ml密度接种)的胎鼠

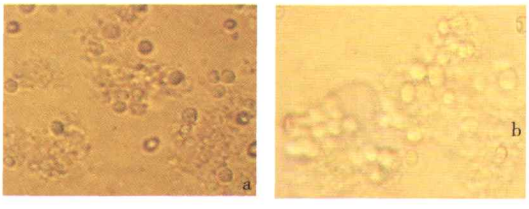
和新生大鼠脑组织细胞，前者神经球出现的时间更早，球体更大，细胞活力更好，7d后，平均每个高倍视野下神经球计数分别为(8.79±2.31)个/HP，(3.47±0.82)个/HP，2组间有明显的统计学差异(见图2)。



a.胎鼠来源的神经球倒置相差显微镜×400；
b.新生鼠来源的神经球倒置相差显微镜×400

图2　2种来源细胞形成神经球比较（采用机械吹打加0.25%胰蛋白酶-0.02%EDTA消化液酶消化培养第8d）

原代取材消化过程中，单纯机械吹打和加0.1%胰蛋白酶-0.02%EDTA消化液得到的单细胞悬液中含有较多小组织块，经培养后重新聚集成较大块组织，使其间的细胞不能充分获得营养物质而逐渐衰老死亡(见图3)。加0.5%胰蛋白酶-0.02%EDTA消化液孵育者，次日培养瓶中出现云絮状物质，而未见有细胞，推测消化过度致细胞死亡。加0.25%胰蛋白酶-0.02%EDTA消化液孵育，并在显微镜下控制消化时间者，细胞生长较好，接种24h后即可看到哑铃状二分裂细胞，72h后可见葡萄串状和桑椹状细胞球，为本实验原代取材过程中最佳消化方案。



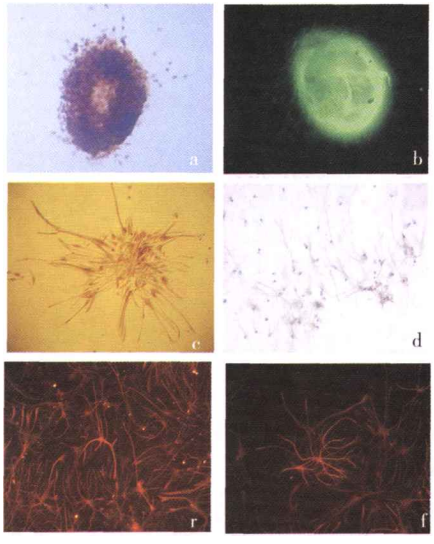
a.采用单纯机械吹打接种的细胞，与图1 a采用机械吹打加酶消化法接种的细胞相比，细胞中有较多组织块倒置相差显微镜×200；b.次日细胞聚集成团倒置相差显微镜(×200)

图3　消化不足的表现(新生SD大鼠来源，采用单纯机械吹打法消化)

新生鼠来源细胞接种密度为5×10^4个/ml者，2~3d，红细胞及成熟神经细胞死亡后，显微镜下可见活细胞极少，7d后平均神经干细胞球数均小于0.1个/HP。新生鼠来源细胞接种密度为5×10^6个/ml者，培养1~2d时细胞生长旺盛，培养液24h后开始变黄，需每天换液，而频繁换液导致细胞生长情况逐渐恶化，已形成的神经球老化速度加快，单个细胞生长不良，7d后，培养液中仅见衰老的神经球，此种细胞经传代后增殖不良而逐渐死亡。接种密度控制在5×10^6个/ml者，可基本避免上述情况，平均2~3d需换液1次，7d后培养液细胞球较多，且经传代后细胞生长情况较好。

传代过程中采用单纯机械吹打，所获得的传代细胞中仍残存一定数量的细胞球，不能充分分散。加酶消化后的细胞残存细胞球极少，但偶可因酶对细胞的损伤引起传代后细胞增殖能力降低，成球速度缓慢，成球率低，形成的神经球较小。

形成的神经球，经Nestin免疫细胞化学及免疫荧光染色阳性，证实为神经干细胞。诱导分化后形成有突起的细胞，经微管相关蛋白-2(MAP-2)和神经胶质酸性蛋白免疫细胞化学及免疫荧光染色均有阳性细胞(见图4)，表示获得的NSCs是具有分化为神经元和神经胶质细胞能力的NSCs。



a.胎鼠来源神经球(采用机械吹打加0.25%胰蛋白酶-0.02%EDTA消化液消化，原代培养第7d)nestin免疫细胞化学染色(×400)；
b.新生鼠来源神经球(采用机械吹打加0.25%胰蛋白酶-0.02%EDTA消化液消化，原代培养第7d)nestin免疫荧光染色(×400)；
c. 胎鼠来源分化细胞（诱导分化第7d)MAP-2 免疫细胞化学染色(×400)；
d.新生鼠来源分化细(诱导分化第7d)胞MAP-2免疫细胞化学染色(×400)；
e.胎鼠来源分化细胞(诱导分化第7d)GFAP免疫荧光染色(×400)；
f.新生鼠来源的分化细胞(诱导分化第7d)GFAP免疫细胞荧光染色(×400)

图4　NSCs及分化细胞的染色鉴定

3　讨　论

实验研究发现，大鼠NSCs的原代分离与培养过

程中关键在于单细胞悬液的获得，其中消化液浓度的选择和消化时间的掌握尤为重要，浓度太高或消化时间太长，容易因消化过度致细胞损伤甚至死亡，而浓度太低或消化时间太短，易造成消化不足致组织块残留，细胞容易聚集成团，导致中间的细胞缺乏营养物质而衰老死亡。在参考了以往文献的基础上，经过反复实验，最后选用机械吹打加0.25%胰蛋白酶-0.02%EDTA消化液37℃孵育，孵育时间在显微镜下观察掌握，一般在15min左右，结果证实采取这一方案种植的细胞生长良好。另外，原代取材过程中的污染控制也很重要，一定要保证无菌操作。

在以往的研究中，大鼠神经干细胞的体外培养既有取材于新生大鼠，也有取材于胎鼠[4-7]。本实验对2种来源的神经干细胞培养方法进行了比较，采用相同的消化条件、接种密度、无血清培养基进行培养，培养出的神经球分别进行细胞表面抗原Nestin免疫组化染色和荧光染色，均显示为阳性，且形成的神经球经传代吹打消化形成单细胞后还能重新生成新的神经球，表明其具有自我更新和增殖能力。神经球经胎牛血清混合培养诱导分化后均能形成神经元和NSCs，表明培养出的细胞具有多向分化的潜能，进一步证实2种方法均能培养出神经干细胞，但各有优劣：胎鼠来源者神经球形成更早，数量更多，增殖活力更强，但组织取材过程稍复杂，容易造成取材过程中细胞被污染，胎鼠的胎龄需要严格控制。新生鼠来源者鼠源容易获得，组织取材过程操作简单，容易控制污染，但神经干细胞成球率更低。

在不久的将来，研究神经干细胞移植，将为神经损伤失修复和神经系统退行性疾病的治疗开辟新的途径，而NSCs的体外培养正是这些研究的重要基础，因此，利用细胞培养技术分离培养NSCs已成为近年来神经科学研究的热点。目前，NSCs体外培养主要采用无血清培养基，细胞传代数量有限，无法生产出能满足细胞移植的足够量的NSCs，且如何精确控制NSCs的定向分化都是NSCs培养过程中尚需解决的问题。

参 考 文 献

[1] Reynolds BA,Weiss S.A multipotent EGF2 responsive striatalembryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes[J].J Neurosci,1992;12(11):4565-4574.

[2] Pruszak J,Sonntag KC,Aung MH,et al.Using the neurosphere assay to quantify neural stem cells in vivo[J].Curr Pharm Biotechnol,2007;8(3):141-145.

[3] Gage FH, Fisher LJ.Isolation, characterization,and use of stem cells from the CNS[J].Annu Rev Neurosci,1995;18:159.

[4] 刘 瞬，王红云，何 乐，等.胚胎大鼠神经干细胞培养及分化鉴定的实验研究[J]. 中国现代神经疾病杂志,2006;6(1):52-56.

[5] 曾可斌，王学峰.脑脊液对体外培养骨髓基质细胞生长的影响[J]. 现代神经疾病杂志,2003;3(2):96-99.

[6] 尹国才，栾 佐，屈素清，等.新生鼠大脑皮层神经干细胞培养及其在同胞鼠的细胞替代作用[J]. 中华围产医学杂志,2005;8(4):255-258.

[7] 陈福权，邱建华，王锦玲，等.大鼠嗅球神经干细胞培养[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志,2004;39(11):687-690.

(上接第 43 页)

酶等。这一发现为Aβ介导的认知障碍的临床治疗提供了一条新的思路。那么提高模型大鼠海马的RGMa表达水平能否起到与此类似的作用，以及提高到何种程度尚待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Hardy J,Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics[J]. Science,2002;297(5580):353-356.

[2] Schwab JM,Monnier PP.Central nervous system injury-induced repulsive guidance molecule expression in the adult human brain[J]. Archives Of Neurology,2005;62(10):1561-1568.

[3] Katsuhiko H,Masashi F. RGMa inhibition promotes axonal growth and recovery after spinal cord injury[J]. The Journal Of Cell Biology,2006;173(1):47-58.

[4] Nakamura S,Murayama N,Noshita T,et al.Progressive brain dysfunction following intracerebroventricular infusion of beta(1-42)-amyloid peptide[J]. Brain Res,2001;912(2):128-136.

[5] Brinks H,Conrad S,Vogt J,et al.The repulsive guidance molecule RGMa is involved in the formation of afferent connections in the dentate gyrus[J]. J Neurosci,2004;24:3862-3869.

[6] Steven P,Xu H,Megan L Kerr,et al.The β-amyloid protein of Alzheimer's disease increases neuronal CRMP-2 phosphorylation by a Rho-GTP mechanism[J]. Brain,2008;131(1):90-108.

[7] Zhou Y,Su Y,Baolin L,et al.Nonsteroidal anti-inflammatory drugs can lower amyloidogenic A?42 by inhibiting rho[J]. Science,2003;302:1215-1217.

[8] Park JH,Gimbel DA,GrandPre T,et al.Alzheimer precursor protein interaction with the nogo-66 receptor reduces amyloid-beta plaque deposition[J]. Neurosci,2006;26(5):1386-1395.