维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)04-0366-04

3~18 周胎龄人胚胎神经干细胞的分离、培养及增殖

冯 敏[1],胡 晶[2],王莎莉[1],张 苓[3]

(1.重庆医科大学生理学教研室,重庆 400016;2.重庆医科大学医学检验系实验诊断学教研室,重庆 40016;
3.重庆市南岸区人口与计划生育生殖健康中心)

【摘 要】目的:在分离、纯化、培养 3~18 周胎龄人胚胎神经干细胞(NSC)的基础上,进一步研究 3~18 周胎龄 NSC 的增殖特点。方法:从 3~18 周龄流产人胚胎的大脑皮质和神经管组织中分离 NSC,实验分组:A 组(3~6 周龄),B 组(7~11 周龄),C 组(12~18 周);培养、纯化 NSC;以单细胞克隆实验及免疫细胞化学对其进行生物学特性鉴定;计数神经球数目、直径检测其生长情况。结果:从 3~6 周流产人胚胎大脑皮层和神经管组织中以及 7~18 周的人胚胎大脑皮层中均分离获得了可在体外生存增殖的 NSC,经鉴定,该类细胞在生长方式、形态结构、功能特征、表面标志等方面,均具有典型 NSC 的生物学特征;A 组人胚胎 NSC 的神经球数目和直径均大于 B、C 组($P<0.05$)。结论:3~18 周胎龄组 NSC 的增殖能力均随胎龄的增加而逐步减弱。

【关键词】胎龄;人神经干细胞;增殖
【中国图书分类法分类号】R329.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-12-29

Isolation, cultivation, purification and proliferation of different gestational age human embryonic neural stem cells

FENG Min, et al

(*Department of Physiology, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the proliferation regularity of different gestational age human embryonic neural stem cells after them were isolated, cultivated and purified successfully. *Methods*: 3~18 weeks human embryo were obtained under asepsis condition, and divided into 3 groups according to gestation age: A group(3~6w), B group(7~11w), C group(12~18w). The each group of NSCs were isolated and purified after primary culture, and identified by single-cell clone culture and immunocytochemistry.(ICC) To study NSCs growth feature by counting numbers and diameters of neurospheres. *Results*: The cells could survive and proliferate in vitro which were isolated from 3~6 weeks human embryo pallium and neurocanal or 7~18 weeks human fetus pallium. Identification of the cells showed that they had the typical feature of NSC biology in many aspects, such as growth pattern, morphosis, function feature and surface marker. The numbers and diameters of neurospheres from 3~6w gestation age group are much higher than that from 7~18w gestation age group ($P<0.05$). *Conclusion*: Succeeded in isolating cells this can survive in vitro for long time from 3~18 weeks human embryo pallium and neurocanal. Culture in vitro and identification showed the cells were NSCs. There were significant differences in proliferation characteristic of each group, The proliferation characteristics of little gestation age groups better than big gestation age groups.

【Key words】Gestation age; NSC; Proliferation

神经干细胞(Neural stem cell, NSC)是近来神经科学领域的研究热点之一,在治疗神经系统损伤以及多种神经系统疾病方面具有广阔的临床应用前景[1],但人类 NSC 来源稀少,增殖缓慢,难于在体外稳定传代、扩增,使人 NSC 的移植的应用受到很大限制。本研究从 3~18 周流产人胚胎的神经管组织或(和)大脑皮层中分离 NSC 并进行鉴定,在此基础上探讨不同胎龄对人胚胎 NSC 增殖的影响,为治疗神经系统疾病而筛选出较为优化的 NSC 标本积累实验依据。

作者介绍:冯 敏(1976-),男,硕士,
主要研究方向:神经干细胞。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 3~18 周人工药物流产胎儿 重庆医科大学附属第二医院、重庆市妇幼保健院以及重庆市南坪生殖健康中心提供。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1.2 主要试剂 bFGF、EGF、trypsin、Dnase Ⅰ(Sigma 公司);B27、N2、DMEM/F12(Gibco 公司);Nestin 抗体、NF200 抗体、GFAP 抗体、Gal-C 抗体(Chemicon 公司);通用型免疫组化 SP 试剂盒(晶美生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 人胚胎 NSC 的培养 取 3~6 周人胚胎,无菌条件下取得胚脑和神经管组织,7~18 周胚胎仅取皮质组织,经 trypsin 和 Dnase Ⅰ消化后,机械吹打为单细胞悬液,按 1×10^6 个/ml 的细胞浓度接种入 NSC 培养液(DMEM/F12 培养液+B27+20ng/ml bFGF 和 20ng/ml EGF)中培养,3 天半量换液,7 天传代。

1.2.2 单细胞克隆培养 将培养的神经球吹打为单细胞悬液,稀释为 100 个/ml 的细胞悬液,取 1ml 的悬液用培养液稀释,加入 96 孔板中,次日观察并标记含单细胞的培养孔。单细胞克隆长大后分离成单细胞悬液,种入 25ml 培养瓶中培养。

1.2.3 检测 nestin 的表达 将 NSC 细胞悬液涂片后用 4%多聚甲醛固定,免疫组化染色参照说明书。一抗为 Nestin 抗体,同时作空白对照,DAB 显色。

1.2.4 多向分化能力检测 按试剂盒说明书分别进行 NF200、GFAP、Gal-C 免疫细胞化学染色,鉴定神经元,神经胶质细胞,少突胶质细胞。

1.2.5 实验分组 A 组:胎龄 3~6 周的人胚胎;B 组:胎龄 7~11 周的人胚胎;C 组:胎龄 12~18 周的人胚胎。

1.2.6 不同胎龄人胚胎 NSC 的生长情况 NSC 常规培养 3 天后吹打为单细胞悬液,换 NSC 培养液,按 1×10^6 个/ml 接种。镜下观察细胞生长状态,此后不进行传代操作,每隔 1 日镜下(10×10)选取培养瓶均分的 6 个区域,每区域随机选择 2 个视野对不同组别的神经球计数并测量直径。

1.3 统计学处理

数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,行方差分析。

2 结 果

2.1 人胚胎 NSC 的培养和传代

新鲜分离得到的 3~18 周胎儿脑皮质及神经管组织细胞,细胞直径约 8~12μm,大多呈单个圆球状,分散存在,部分细胞胞质有粗大颗粒,少数为不规则细胞团块,直径约 30~40μm,均有较强的折光性。培养 48h 后可见少数折光性强的神经球(2~10 个细胞)开始形成。培养 5~7 天后,培养液中可见大小不等的神经球,集落悬浮生长,呈球形、卵圆形、桑葚状,折光性强,组成每个大集落的细胞可达数十至数百个。原代培养初期可见大量的死亡细胞及细胞碎片,还有少量贴壁的不规则状细胞,传 2~3 代后,细胞碎片和贴壁细胞几乎消失,仅剩各个大小不等、折光性强并逐渐增大的神经球。以后每 7 天传代一次,在体外长期传代可达 18 代。

2.2 人胚胎 NSC 的鉴定

2.2.1 自我更新能力的检测——单细胞克隆培养

多数 NSC 在培养后 24~48h 期间分裂为 2~4 个细胞的小克隆,7~10 天均发展为数十甚至数百个细胞的较大的克隆,经消化成单细胞传代后仍能形成克隆球。单个 NSC 细胞原代培养时克隆形成率约为 1%,第二代克隆形成率为 20.5%。

2.2.2 NSC 的诱导分化

用 5%FCS 诱导神经球分化,4h 有神经球贴壁,48h 有突起的细胞形成,此后分化细胞逐渐增多,由集落发出,呈放射性排列。分化的细胞中,可见三种类型的细胞:

①细胞体积较小数量较少,常有数个短小突起和一个较长的突起,具有较强的折光性。此类细胞免疫细胞化学反应呈 NF200 阳性,被测细胞胞浆中由棕黄色颗粒沉着,提示为神经细胞(图 1)。

②细胞体积较大数量多,细胞突起较多且粗,平铺在盖玻片上。此类细胞免疫细胞化学反应呈 GFAP 阳性,被测细胞胞浆中由棕黄色颗粒沉着,提示为星形胶质细胞(图 2)。

③细胞体积较小数量极少,细胞突起较少、且



图 1 NF200 染色 (×400)

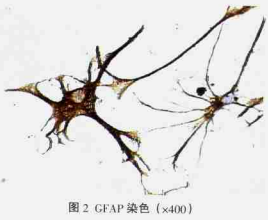


图 2 GFAP 染色 (×400)

维普资讯 http://www.cqvip.com

短细。此类细胞免疫细胞化学反应 Gal-C 阳性，被测细胞胞浆中由棕黄色颗粒沉着，提示为少突胶质细胞(图 3)。

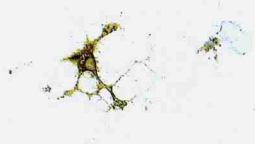


图 3 Gal-C 染色(×400)

2.2.3 Nestin 抗原的表达

培养的神经球进行 nestin 免疫细胞化学染色，结果显示，被测细胞胞浆有棕黄色颗粒沉着，呈 nestin 阳性(图 4)。

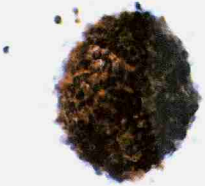


图 4 nestin 染色(×400)

2.3 不同胎龄人胚胎 NSC 的生长情况

不同胎龄组 NSC 在培养液中均能生长存活。培养 6h 后，各组细胞生长情况差别不大，大部分细胞呈单个圆球状，分散存在，部分细胞胞质有粗大颗粒，少数为不规则细胞团块，直径约 30~40μm，均有较强的折光性。培养 24h 后，3~6 周胎龄组少数悬浮细胞有聚集现象，聚集的神经球由 2~10 个细胞组成，直径约 10~50μm；另有部分细胞裂解死亡，可见细胞碎片浮于液面。7~11 周胎龄组和 12~18 周胎龄组悬浮细胞无聚集现象，部分细胞贴壁，成簇生长，有 1~2 个突起；部分细胞胞质内可见小黑点，胞膜变暗，折光性下降；部分细胞裂解为碎片，以 12~18 周胎龄组的细胞碎片更多。培养 48h 后，3~6 周胎龄组悬浮细胞出现大量聚集现象，聚集的神经球折光性强，由数十个细胞组成，直径增大到 50~100μm；7~11 周胎龄组和 12~18 周胎龄组悬浮细胞开始出现聚集，聚集的神经球数目较少，直径较小，约 20~50μm。培养 7~10 天后，通过换液传代，细胞碎片和贴壁细胞大部分消失，各组神经球都逐渐增大，但神经球数目(表 1，图 5~7)和直径(表 2，图 8~10)存在显著性差异。

表 1 不同胎龄人胚胎 NSC 体外培养的神经球数目(n=4，$\bar{x}\pm s$)

天数	A 组	B 组	C 组
d5	47.71 ± 14.07*	31.0 ± 3.63▲	16.58 ± 3.72
d7	55.5 ± 11.45*	40.59 ± 6.88▲	19.31 ± 2.52
d9	95.17 ± 29.32*	50.42 ± 18.74▲	27.08 ± 7.34
d11	74.32 ± 7.65*	47.29 ± 14.38▲	24.88 ± 5.01

* 与 B 组比较 $P<0.01$，▲与 C 组比较 $P<0.05$

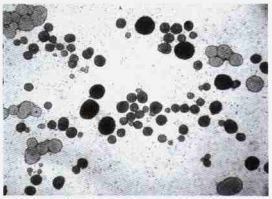


图 5 3~6 周组人胚胎 NSC d9(×40)

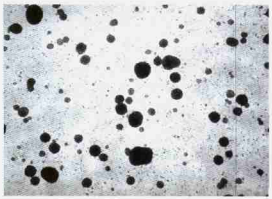


图 6 7~11 周组人胚胎 NSC d9(×40)

维普资讯 http://www.cqvip.com

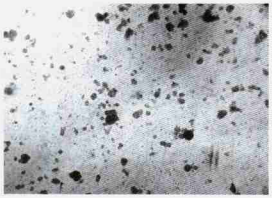


图 7 12~18 周组人胚胎 NSC d9 (×40)

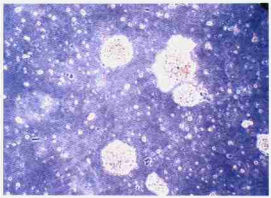


图 10 12~18 周组人胚胎 NSC d9(×200)

表 2 不同胎龄人胚胎 NSC 体外培养的神经球直径 ($\mu m, n=4, \bar{x}\pm s$)

天数	A 组	B 组	C 组
d5	106.17±9.00*△	87.04±7.50*	66.59±5.86
d7	143.29±9.92*△	113.08±7.14*	83.09±4.79
d9	206.71±10.95*△	155.54±8.03*	113.45±6.58
d11	342.94±18.31*△	251.87±12.66*	142.75±12.62

*与 C 组比较 $P<0.01$，△与 B 组比较 $P<0.01$

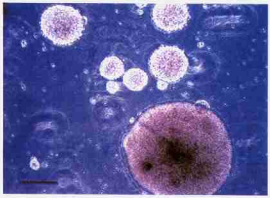


图 8 3~6 周组人胚胎 NSC d9(×200)，bar=100μm

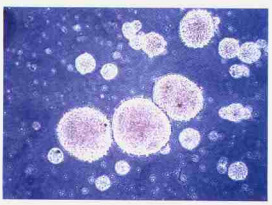


图 9 7~11 周组人胚胎 NSC d9(×200)

3 讨 论

NSC 在神经损伤修复以及在神经系统疾病的治疗中存在巨大的应用前景。虽然 NSC 来源较为广泛，近来还有报道从成年人皮肤可获得神经前体细胞[2]，但目前 NSC 建系尚不成熟，从其他类型的细胞系分化的技术也不完善，胚胎干细胞的应用受到伦理道德和技术的限制，故 NSC 原代培养成为首选。从人神经系统发育过程来看，胚胎第 27 天左右，形成神经管，神经管前段衍化为脑，后段衍化为脊髓。从理论上讲神经管中的细胞应该是更早期的 NSC，也是 NSC 较为集中的部位。所以我们除以药物(米非司酮)流产的 3~18 周胎龄胚胎的大脑皮质为取材对象以外，还首次以 3~6 周龄胚胎神经管组织为取材对象，这样我们获得了更多和更早期的 NSC。同时我们还观察到，与以往采用的水囊引产胚胎相比，低龄胚胎标本来源更加充足，且更能缩短取材时间，提高细胞活力。由于此阶段的神经管组织中血管内膜发育不完全，取材时出血少，大大降低了 NSC 培养时受血清分化的干扰。提高了实验的成功率。

对所获细胞进行传代纯化，同时对纯化细胞的自我更新能力，特异性 NSC 抗原的表达，多向分化潜能进行鉴定和观察。本研究证实了从 3~6 周流产人胚胎大脑皮层和神经管组织中以及 7~18 周的人胚胎大脑皮层中获得的能在体外长期生存的细胞在功能特征、表面标志等各方面，均具有典型 NSC 的生物学特性，证明获得的细胞为 NSC。

神经球的数目和大小是判断 NSC 增殖能力的重要指标，而神经球大小的控制又是神经干细胞扩增的关键。在 NSC 培养中，细胞都只能通过培养基

维普资讯 http://www.cqvip.com

中的营养物和溶解的氧的扩散来维持正常代谢。随着 NSC 的增殖，神经球的形成和体积增加，培养细胞会因得不到足够的营养物而坏死，所以控制神经球大小在坏死临界直径以下是神经干细胞扩增的关键[3]。实验中我们发现神经球直径超过 250μm 时，神经球中心开始陆续出现坏死，此时需要及时分割神经球传代培养。传代培养时用连续轻微吹打的方法，将直径较大的神经球分割为几个较小的部分，而用酶消化的方法虽然可以解离神经球为单细胞，但细胞存活力很差，很难保持良好的增殖活性。

NSC 的增殖能力与细胞起源和自身状态密切相关。研究表明，神经细胞发生的时间因动物品种、孕期而异，而不同胎龄以及不同部位的人胚胎 NSC 增殖能力在时间和空间顺序上究竟有何差异，则未见报道。本实验通过 3~18 周胎龄的人 NSC 进行相同条件的原代培养和种植密度，来观察 NSC 增殖情况，结果表明：3~6 周胎龄组 NSC 体外培养 11 天后，神经球数目最多，直径最大，出现时间最早。神经球达 74.32±7.65 个，显著高于 7~11 周胎龄组的 47.29±14.38 个，和 12~18 周胎龄组的 24.88±5.01 个；神经球直径达 342.94±18.31μm，也显著大于 7~11 周胎龄组的 251.87±12.66μm 和 12~18 周胎龄组的 142.75±12.62μm；神经球出现时间在 24h 以内，也显著短于 7~11 周的 48h 左右和 12~18 周胎龄组的 60h 左右。这些结果提示：不同发育阶段的 NSC 具有不同的增殖能力，从胎龄越小的胚胎中所获得的 NSC 增殖能力越强。

神经干细胞的增殖受着多种因素的影响，通常认为丝裂原样生长因子 EGF 和 bFGF 对神经前体细胞均有明显促分裂作用[4]，因此它们在调控 NSC 增殖以及对 NSC 特性的维持中起着尤为重要的作用[5]。我们的前期实验也证实，当培养液中缺乏 EGF 和 bFGF 时，神经球形成非常缓慢，随着培养时间的延长，大部分细胞裂解、死亡。近来发现 EGF 与bFGF 在调控 NSC 增殖中有一定差异，NSC 上的 FGF 和 EGF 的受体类型也不同，它们在调控 NSC 增殖分化中也起着不同的作用。bFGF 主要在胚胎发育早期具有维持神经前体细胞的生存和促进其增殖的作用，而 EGF 主要在发育晚期能促进神经前体细胞增殖。Rao[6]认为，依赖于 bFGF 的神经干细胞发育较早，而后形成 EGF 敏感的干细胞，最终形成神经球。Reimer 等[7]却认为 NSC 经 EGF 刺激扩增后，再用 bFGF 诱导可增加 NSC 和少突胶质细胞的增殖数量，使正在准备分化的神经元的细胞数量明显减少，说明 bFGF 能调节经 EGF 扩增后 NSC 的发育。故我们推测，不同胎龄人胚胎 NSC 的增殖能力的差异可能与 bFGF 与 EGF 受体的表达存在时空上差异有关，但这种差异的具体机制还有待进一步探讨。

（通讯作者：王莎莉，重庆医科大学生理学教研室，邮编：400016。）

参 考 文 献

[1] Jannotti C, Lu XB, Lu PH, et al. Neural stem cell transplantation in the repair of spinal cord injury [J]. Progress in Natural Science, 2001, 11(7): 490-503.

[2] Alexis Joannides, Phil Gaughwin, Christof Schwiening, et al, Efficient generation of neural precursors from adult human skin: astrocytes promote neurogenesis from skin-derived stem cells [J]. Lancet 2004; 364: 172-178.

[3] Sen A., Kallos, MS & Behie. LA Passaging protocols for mammalian neural stem cells in suspension bioreactors [J]. Biotechnology progress, 2002; 18: 337-345.

[4] Rosanna Dono. Fibroblast growth factors as regulators of central nervous system development and function[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2003; 284: 867-881.

[5] Whittemore SR, Morassutti DJ, Walters WM, et al. Mitogen and substrate differentially affect the lineage restriction of adult rat subventricular zone neural precursor cell populations [J]. Exp Cell Res, 1999; 252: 75-95.

[6] Rao MS. Multipotent and restricted precursors in the central nervous system[J]. Anat Rec, 1999; 257: 137-148.

[7] Reimer D, Lopez-Toledano MA, Mason I, et al. Developmental expression of fibroblast growth factor (FGF) receptors in neural stem cell progeny, modulation of neuronal and glial lineages by basic FGF treat-ment[J]. Neurol Res, 2001; 23(6): 612-621.