维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)03－0321－04

Ferumoxides 标记神经干细胞及其对增殖分化的影响

王 爽[1], 谢 鹏[1], 牟 君[1], 赵裕光[2], 贾延劼[1]

(重庆医科大学临床学院 1.神经内科;2.普外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究超顺磁性氧化铁(superparamagnetic iron oxides. SPIOs)标记神经干细胞及其生物学特性。方法:神经干细胞培养、传代和诱导分化;菲立磁(Ferumoxides,一种 SPIOs)标记神经干细胞,制备磁标记神经干细胞;利用免疫细胞化学、透射电镜和 Prussian blue 染色等方法对磁标记神经干细胞的生长、分化等生物学特性进行研究。结果:在原代及传代细胞中有 Nestin 阳性细胞即神经干细胞。血清诱导下,神经干细胞可分化为 GFAP、MAP－2、NSE、Tau 蛋白及 NF200 阳性细胞。Ferumoxides 与神经干细胞共同孵育后,透射电镜及 Prussian blue 染色显示胞浆中含有铁颗粒,SPIOs 也可以随细胞的分裂增殖而传到子代细胞中。随 Ferumoxides 浓度的增高(2.8μg/ml～16.8μg/ml),Ferumoxides 对神经干细胞存活、分化能力的影响无显著性差异($P>0.05$)。当 Ferumoxides 的浓度大于 22.4μg/ml 时,SPIOs 影响其存活和分化($P<0.05$)。结论:本实验在国内首次利用 Ferumoxides 作为磁标记探针,对神经干细胞进行成功磁标记。为进一步利用核磁共振(MRI)对神经干细胞活体追踪奠定实验基础。

【关键词】神经干细胞;超顺磁性氧化铁;Ferumoxides;磁标记细胞

【中国图书分类法分类号】R743.34 【文献标识码】A 【收稿日期】2004－11－26

Experimental study on biological characteristics of ferumoxides labeled neural stem cells

WANG Shuang, et al

(*Department of Neurology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the biological characteristics of superparamgnetic iron oxides(SPIOs)labeled neural stem cells(NSCs). *Methods*: The culture, passage and differentiation of NSCs were completed from newborn rat brain. Ferumoxides labeled NSCs were prepared as magnetic labeled NSCs. Using immunocytochemistry, transmission electron microscopy(TEM) and Prussian blue staining, the growth, differentiation and other biological characteristics were studied. *Results*: Nestin positive cells were found in the culture and daughter clones. NSCs could be differentiated into positive GFAP, MAP－2, NSE, Tau protein and NF200 cells in serum culture. When NSCs incubated with ferumoxides, the iron particles were seen in intracellular(non－nucleus)as well as in dauhgter clones. With the increase in concentration of ferumoxides(2.8μg/ml～16.8μg/ml), it showed no significant difference in effects on the growth and differentiation of NSCs($P>0.05$). When the concentration of ferumoxides exceeded 22.4μg/ml, there was significant difference($P<0.05$). *Conclusion*: In China, ferumoxides is first successfully used to label NSCs, a kind of SPIOs with magnetic labeled NSCs, which provides experimental basis for tracing magnetic labeled NSCs in vivo with MRI.

【Key words】Neural stem cells; Superparamagnetic iron oxides(SPIOs); Ferumoxides; Magnetic labeled cells

近几年来利用神经干细胞及其前体细胞替代治疗神经系统疾病已经越来越多地受到人们的关注。但是要将神经干细胞真正应用于临床,必须解决一个重要问题,就是植入人脑内的神经干细胞的存活、迁移、识别和动态监测[1]。本实验利用磁标记探针 Ferumoxides 对大鼠神经干细胞进行标记,并对其生物学特性进行了研究。为将来利用磁共振成像(MRI)技术追踪移植的神经干细胞,无创地监测神经干细胞在活体内的存活和迁移,以及随移植时间而演变的规律奠定基础。

作者介绍:王 爽(1976－),女,博士,
主要研究方向:神经干细胞基础及临床应用。

基金项目:国家自然基金项目资助(30370500),
重庆医科大学优秀博士学位论文科研经费资助,
中国博士后科学基金资助项目(2003033363)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料与方法

1.1 主要试剂

EGF、bFGF、多聚赖氨酸购自 Sigma 公司;胎牛血清购自 Gibco 公司;抗大鼠 Nestin 单克隆抗体(北京晶美公司);GFAP、MAP－2、NSE、Tau 蛋白及 NF200 单克隆抗体购自武汉博士德生物技术有限公司;SP 试剂盒购自北京中山生物公司。Ferumoxides 由 Advanced Magnetics 公司惠赠。

1.2 方法

1.2.1 神经干细胞培养、鉴定、传代及诱导分化方法参照文献[2]。

1.2.2 磁标记神经干细胞的制备取 1.2.1 培养的神经干细胞球,机械吹打成单细胞,以约 5×10^5/ml 的密度接种到含有不同浓度 Ferumoxides 的无血清培养基(DMEM/F12 + B27 + 20ng/mlbFGF + 20ng/mlEGF)中孵育。Ferumoxides 浓度分别为 5.6μg/ml, 11.2μg/ml, 16.8μg/ml, 22.4μg/ml。5%CO_2,37℃培养 48h。

1.2.3 磁标记神经干细胞的鉴定取 1.2.2 中部分细胞做透射电镜,观察铁颗粒是否被吞噬进细胞。同时做 Prussian blue 染色。取 1.2.2 中部分细胞贴壁 1 天,4% 多聚甲醛固定,PBS 洗 3 次,2% $K_3Fe(CN)_6$ + 6% HCl 孵育 30min,核固红复染。

1.2.4 磁标记探针对神经干细胞存活、增殖、分化的影响

对 1.2.2 中的磁标记神经干细胞绘制生长曲线。取 1.2.2 中神经干细胞(Ferumoxide 浓度为 5.6μg/ml, 11.2μg/ml, 22.4μg/ml),培养 5～7 天后,再次离心、机械吹打成单细胞,部分细胞以约 5×10^4/ml 接种到 25ml 培养瓶中进行传代培养,5～7 天传代 1 次,同时以正常神经干细胞做空白对照。部分细胞以约 5×10^5/ml 接种到预先涂布 poly－l－lysine 盖片的 6 孔培养板中进行贴壁诱导分化(DMEM/F12 + 5% 胎牛血清)5～7 天后,在光镜下对免疫细胞化学染色的神经干细胞(NF200 及 GFAP 染色)进行计数,每组 5 个培养神经干细胞的盖玻片,在每个盖玻片随机选择 10 个高倍视野计数。

2 结 果

2.1 神经干细胞培养

原代培养细胞培养 5～7 天时,可形成含数十至数百个细胞的悬浮细胞球,形态规则。传代后细胞分裂增殖旺盛。但是随着传代次数的逐渐增加,细胞分裂增殖的速度有所减缓(图 1)。

2.2 神经干细胞鉴定及免疫细胞化学染色

可见有 Nestin 阳性细胞,且传代后的 Nestin 阳性细胞较原代培养的多且胞体较大。免疫细胞化学染色可显示神经元特有的 NF200、NSE、MAP－2、Tau 蛋白阳性细胞以及星形胶质细胞特有的 GFAP 阳性细胞(图 2～7)。

2.3 Prussian blue 染色

可见细胞的胞浆内含有蓝色颗粒,即铁颗粒(图 8、9)。

2.4 透射电镜

可见铁颗粒位于神经干细胞胞浆中(图 10 箭头所示)。

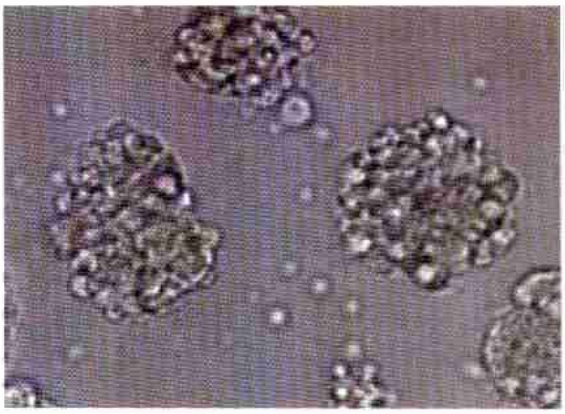


图 1 培养 14 天的神经干细胞(200×)

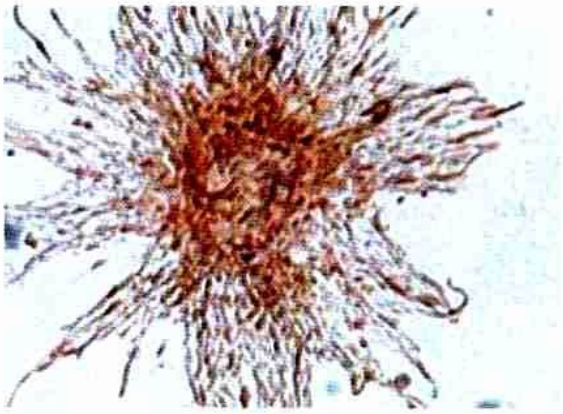


图 2 GFAP 阳性细胞(200×)

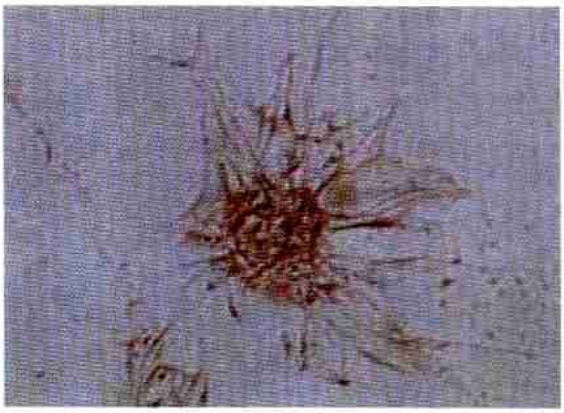


图 3 Nestin 阳性细胞(200×)

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 4 NF200 阳性细胞(200×)

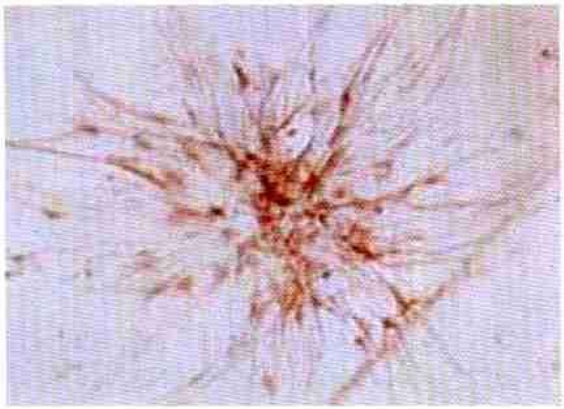


图 5 Tau 蛋白阳性细胞(200×)

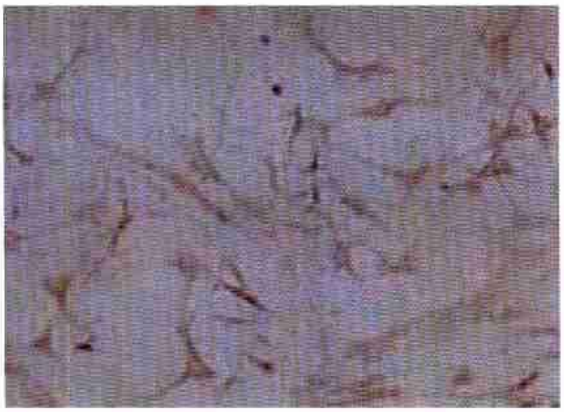


图 6 NSE 阳性细胞(200×)

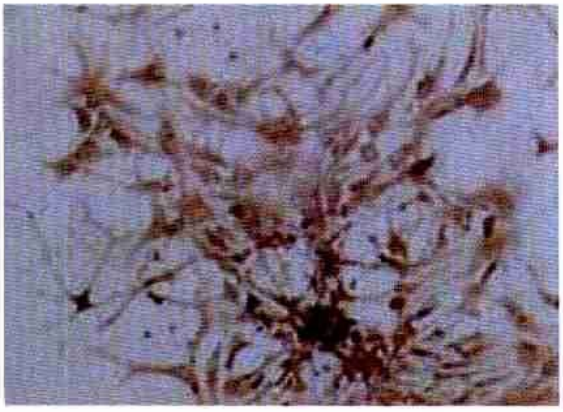


图 7 MAP－2 阳性细胞(200×)

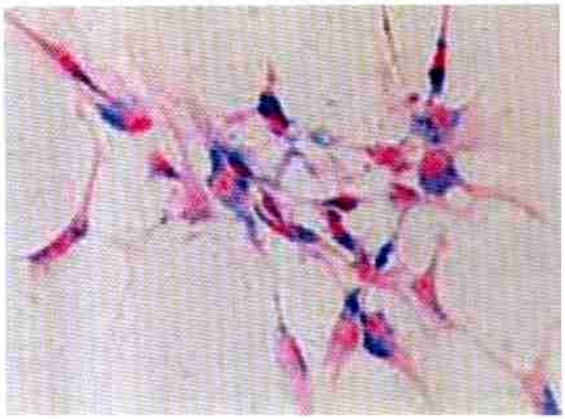


图 8 Prussian blue 染色(含血清 200×)

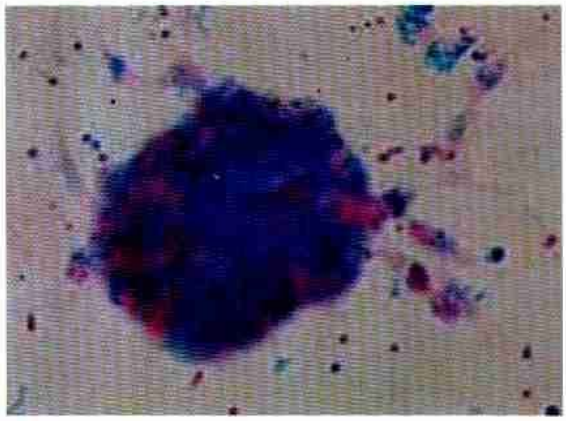


图 9 Prussian blue 染色(无血清 200×)

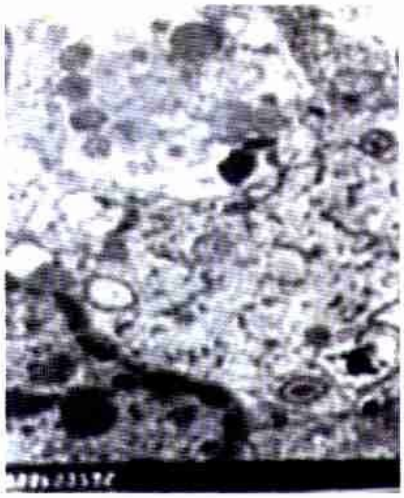


图 10 透射电镜(8000×)

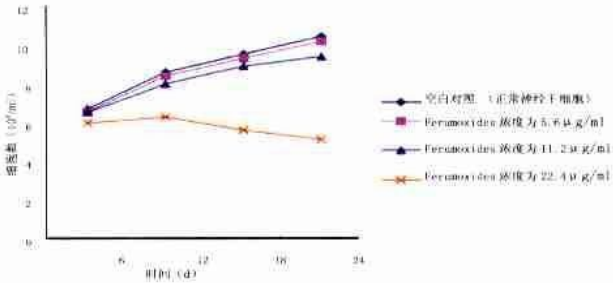


图 11 生长曲线

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.5 生长曲线(见图 11)

2.6 对诱导分化的影响(见表 1)

表 1 对诱导分化的影响($\bar{x} \pm s$)

组 别	NF200 阳性细胞	GFAP 阳性细胞
对照组(正常神经干细胞)	46.2±1.7	52.9±1.4
Ferumoxides 浓度 5.6μg/ml	45.4±2.1	50.1±1.9▲
Ferumoxides 浓度 11.2μg/ml	35.0±3.2	40.2±1.4▲
Ferumoxides 浓度 22.4μg/ml	30.7±1.3	33.5±0.9*

▲表示与对照组比较无显著差异($P>0.05$) *表示与对照组比较有显著差异($P<0.05$)

3 讨 论

近几年,利用 MRI 技术对神经干细胞进行追踪,监测引起了人们极大的兴趣。超磁性氧化铁(superparamgnetic irom oxides. SPIOs)是一种新型的磁共振对比剂,它基本结构以葡聚糖等包裹氧化铁颗粒而得[3,4]。Ferumoxides 直径为 150nm,其核心氧化铁颗粒的直径为 20nm。SPIOs 由于其特殊的化学结构,即使在较弱的磁场中也可产生较大的磁性,当外磁场撤消后磁性也迅速消失,在自旋回波(SE)和梯度回波(GRE)MRI 序列中,形成了低信号区而显像。因 SPIOs 直径一般在纳米数量级,且具有强大的磁效应,因此可将 SPIOs 作为磁标记探针,使神经干细胞带有氧化铁微粒而成为磁性标记的神经干细胞。

国外有类似报道,Josephwon 等[5]使用 MION-46L(含有氧化铁的 MRI 对比剂)与 HIV-1 tat 肽共价结合,由于 HIV-1 tat 肽含有细胞膜易位信号,能有效地穿梭 MION 微粒,进入造血干细胞,使造血干细胞成为磁标记细胞。使用类似方法,Dodd 等[6]使用 MRI 方法追踪到小鼠的肝、脾中的磁标记细胞。Joseph A. 等[3]利用 MIONL-46L 作为磁标记探针对 CG-4 细胞进行标记,MRI 进行追踪。而国内未见相关报道。本实验在国内首次以 Ferumoxides 作为磁标记探针,对神经干细胞进行磁标记。当不同浓度 Ferumoxides(2.8~28μg/ml)与神经干细胞共同孵育 48h 后,透射电镜可见铁颗粒位于胞浆中,Prussian blue 染色显示胞浆中含有蓝色颗粒(即铁颗粒),这都说明 SPIOs 可以被神经干细胞吞噬。实验中,在传代的第 4 代子细胞中仍可见铁颗粒,这说明 SPIOs 可以随细胞的分裂增殖而传到子代细胞中。当 Ferumoxides 的浓度从 2.8μg/ml~16.8μg/ml 时,随浓度的增高神经干细胞吞噬铁的量越多,且对神经干细胞的存活、分化能力无显著性差异($P>0.05$)。原代及传代细胞诱导分化后,免疫组化方法可以显示有神经元标记物如神经微丝(NF200)、Tau 蛋白、神经元特异性稀醇化酶(NSE)、微管相关蛋白(MAP-2);星形胶质细胞标记物如胶质纤维酸性蛋白(GFAP)存在[7,8]。当 Ferumoxides 的浓度大于 22.4μg/ml 时,SPIOs 影响其存活和分化($P<0.05$)。这与国外报道是一致的[9],国内未见相关报道。

本实验对磁标记神经干细胞的生物学特性进行研究,为将来这神经干细胞脑内移植,MRI 活体追踪奠定基础。

参 考 文 献

[1] Maite Lewin, Nadia Cariesso, Ching-Hsuan Tung, et al. Tat peptide-Derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells[J]. Nature Biotechnology, 2000; 18: 410-414.

[2] 贾延劼,杨于嘉. 新生大鼠神经干细胞的分离合培养[J]. 中国当代儿科杂志, 2002; 4(2): 81-83.

[3] Joseph S. Frank, Brad R. Miller, Holly A. Zywicke, et al. Clinically Applicable Labeling of Mammalian and Stem Cells by Coming Superparmagnetic Iron Oxides and Transfction Agents [J]. Radiology, 2003; 228(2): 480-487.

[4] Arbab AS, Bashaw LA, Miller BR, et al. Characterization of biophysical and metabolic properties of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and transfection agent for cellular MR imaging[J]. Radiology, 2003; 229(3): 838-846.

[5] Josephson L, Tung CH, Morre A, et al. High-efficiency intracellular magnetic labeling with movel superparamagmetic-tat pettide conjugates[J]. Bioconj Chem, 1999; 10: 186-191.

[6] Dodd CH, Hsu HC, Chu WJ, et al. Normal T-cell response and in vivo magnetic resonance imaging of T cells loaded with HIV transactivator-peptide-derived superparamagnetic nanoparticles[J]. Immunol Methods, 2001; 256: 89-105.

[7] Steghaus-Kovac S. Stem cells as potential nerve therapy [J]. Science, 1999; 285(5428): 650-651.

[8] Brustle O, Jone KN, Learish RD, et al. Embryonic stem cell derived glial presursors: a source of myelinating transplants [J]. Scinece, 1999; 285(542): 754-756.

[9] Bulte JW, Douglas T, Witwer B, et al. Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells[J]. Nat Biotechnol, 2001; 19(12): 1141-1147.