维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2004)04-0433-04

胚胎大鼠神经干细胞的分离培养及其鉴定

郑 敏[1], 王 健[2], 王亚平[1], 裴雪涛[3]

(1.重庆医科大学基础医学院组胚教研室,重庆 400016;2.重庆医科大学第二临床学院神经内科,重庆 400010;
3.军事医学科学院干细胞研究室,北京 100085)

【摘 要】目的:通过培养了解神经干细胞(neural stem cell,NSC)生物学特性,为深入研究其体内外分化奠定基础。方法:分离培养大鼠胎脑 NSC。通过单细胞克隆实验检测其自我更新能力、增殖能力和生物学特性;免疫细胞化学检测 NSC 特征性标志 nestin 表达和分化能力;BrdU 掺入实验检测细胞增殖状态;并比较 EGF、bFGF 对鼠 NSC 增殖刺激作用。结果:体外传代培养获得的 NSC 具有多向分化能力、很强的自我更新能力、表达 nestin;NSC 扩增迅速;传代培养的 NSC 性能稳定;联合运用 EGF、bFGF 对 NSC 增殖作用较单用强。结论:成功培养扩增了大鼠 NSC;EGF、FGF 联合作用能促进大鼠 NSC 增殖。

【关键词】神经干细胞;自我更新;多向分化;扩增
【中国图书分类法分类号】R74.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2003-10-21

Isolation, expansion and identification of fetal rat neural stem cell

ZHENG Min, et al

(*Department of Histology and Embryology, College of Basic Sciences, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To culture neural stem cell (NSC) in vitro, observe its biological property and provide basis for further study on differentiation. *Methods*: NSC of rat fetus were isolated and cultured. Single-cell clone culture was used to confirm the character of self-renewing. Ability of multi-directional differentiation and specific antigen, nestin, were detected by immunocytochemistry (ICC). BrdU was used to show cell stage in division. Effect of combination of EGF, bFGF on proliferation of rat NSC were evaluated. *Results*: The cultured NSC showed multipotential of differentiation into neurons and glial cells, as well as the ability of self-renewing. Cells expressed nestin. The population of the NSC expanded quickly and the total number of the cell increased 2.45×10^4 folds after 15 times' passage. The property of NSC was stable after long culture and preservation. Combination of EGF and bFGF stimulated cell proliferation than used singly. *Conclusion*: The cultured NSC express nestin, have the ability of self-renewing and multi-directional differentiation. Combination of EGF and bFGF could promote the proliferation of rat NSC.

【Key words】Neural stem cell; Self-renewing; Multipotential proliferation; Differentiation

干细胞的发现是人类发育生物学和疾病研究中的重大突破,干细胞不仅包含机体发育的全部奥秘,还给大量疾病的治疗带来了全新的思路。神经干细胞(neural stem cell,NSC)的存在被证实并分离培养成功[1],不仅对于中枢神经系统发育成熟后不可能再生的理论提出了挑战,为研究神经发生、神经系统遗传病的发病机制提供了理想的载体,还为神经系统损伤修复和退行性病变的治疗带来了新的希望。无论是作为脑组织移植的供体,还是作为体内诱导分化的靶细胞,神经干细胞都为中枢神经系统功能重建和神经再生提供了一条新的途径。NSC 作为神经系统疾病细胞替代治疗的理想细胞已成共识。近年来成年哺乳动物的脑中具有增殖和分化潜能的神经干细胞的发现,进一步推动了 NSC 的研究[2]。NSC 的研究已成为神经科学中重要的新兴领域。

NSC 的研究,以体外培养和扩增为基础。本部分研究的目的即通过 NSC 的培养,对 NSC 基本生物学特性进行观察研究,了解其增殖分化和体外培养获得大量扩增的条件,为进一步研究体内移植和定向分化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

作者介绍:郑 敏(1972-),女,讲师,
主要研究方向:干细胞分化调控。

维普资讯 http://www.cqvip.com

Wister 大鼠(250g±20g)由军事医学科学院动物实验中心提供。雌雄合笼第 2 天发现阴栓者记为 0.5 天。

1.2 培养试剂和抗体

无血清培养基 DMEM/F12 和添加剂 B27 购自 Gibco 公司,表皮细胞生长因子(EGF)碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)及 DNA 酶(DNase Ⅰ)购自 Sigma 公司。nestin 抗体、NeuN 抗体购自 Chemicon 公司,NSE 抗体、GFAP 抗体购自中山公司。

1.3 实验方法

1.3.1 神经前体细胞的分离培养和扩增

水合氯醛深度麻醉 12.5 天孕鼠,无菌操作条件下获取胚鼠脑。HBSS 液冲洗几次后剪碎,加入 0.125% 胰蛋白酶 37℃ 消化 30min。中止反应之后加入 0.01% DNA 酶,吸管轻柔吹打成单细胞悬液。离心(800r/min),用台盼蓝染色后进行细胞计数,无血清培养基进行培养(DMEM/F12 1:1 + 2%B27 + b FGF20ng/ml + EGF20ng/ml)。待原代克隆形成后分离克隆制作单细胞悬液,按 1×10^5/ml 接种培养。此后每 5~7 天机械分离克隆传代 1 次,方法同前。每次传代时记数细胞数。根据各代细胞数绘制细胞增殖曲线。

1.3.2 单细胞克隆培养

培养的细胞克隆制作单细胞悬液,台盼兰染色计数后将细胞稀释为 10^2/ml,取 10μl 加入到 96 孔板,并补入 NSC 培养液 200μl。4h 后标记单细胞孔,观察培养。培养中 3~4 天添加半量 NSC 培养液。单细胞克隆长大后分离成单细胞悬液,将 1 个克隆的所有细胞种入 25ml 培养瓶继续培养。

1.3.3 多向分化能力检测

单细胞克隆后代形成后制作单细胞悬液,种植于多聚赖氨酸涂布盖玻片的 6 孔培养板,加入有血清培养基(5% 的胎牛血清 + DMEM/F12),培养 7 天后行免疫细胞化学检测,检测指标为 GFAP、NSE。抗体以抗体稀释液稀释,工作浓度分别为 1:500,1:200。

1.3.4 nestin 表达检测

培养的 NSC 克隆形成后收集入离心管,800~1000r/min 离心,弃上清液,少量 PBS 轻轻吹打洗涤,调整细胞克隆密度,离心涂片将克隆固定于 P-L-L 包被的载玻片上。4%PFA 固定 20 min 后进行 nestin 的免疫细胞化学检测。nestin 抗体工作浓度为 1:200。

1.3.5 BrdU 掺入检测

培养的 NSC 克隆形成后消化分离克隆制作单细胞悬液,培养中按 1:1000 加入 3mg/ml BrdU 储存液(终浓度为 3μg/ml),作用 24~48h,离心收集细胞,更换新鲜 NSC 培养液,继续培养。克隆形成后经细胞离心涂片将克隆固定于 P-L-L 包被的载玻片上。4% PFA 固定 20 min 后进行 nestin 的免疫细胞化学检测。抗体工作浓度为 1:400。

1.3.6 细胞因子对克隆形成和数量扩增的影响

培养中以 2×10^5 细胞/ml 密度接种,采用不同细胞因子(bFGF20ng/ml, EGF20ng/ml, bFGF 20ng/ml + EGF20ng/ml)加入培养体系,计数克隆形成数并观察克隆大小形态。NSC 克隆形成后收集入离心管,800~1000r/min 离心 5 min,加入 0.125% 胰酶进行消化,吸管轻轻吹打分离克隆制作单细胞悬液,台盼兰染色计数细胞数。

2 结 果

2.1 克隆分析

原代培养细胞在无血清培养基中生长 2 天后大部分细胞死亡,部分细胞分裂形成 2~4 个细胞的细胞团,继续培养细胞数目迅速增加,到 7 天时生长成为数十个细胞到数百个细胞的集落,成悬浮球形生长细胞形态规则无明显的突起(见图 1)。克隆的传代培养中形成的克隆与原代相似。

2.2 采用有限稀释法接种细胞后

4h 可观察单细胞孔进行标记,结果在原代培养中种植 405 个单细胞孔,培养后获得 2 个细胞克隆,克隆形成率约为 0.5%。次代克隆及随后的亚克隆中克隆形成率则明显升高。在 P3 代的 NSC 单细胞克隆实验中共种植 240 个单细胞孔,培养后获得 38 个细胞克隆,克隆形成率约为 15.8%;而在 P15 代 NSC 单细胞克隆实验中 246 个单细胞孔培养后获得 45 个细胞克隆,克隆形成率约为 18.3%。对单细胞的养进行动态观察,显示多数单个细胞在培养后 24~48 h 分裂为 2~4 个细胞的小克隆,7~10 天均发展为上百个细胞的大克隆,经消化成单细胞传代后仍能形成克隆球,细胞形态同前。

2.3 nestin 抗原的表达

培养的 NSC 神经球进行 nostin 的免疫细胞染色,结果显示在原代培养形成的神经球中大部分细胞表达 nestin 阳性,反复传代培养后 nestin 表达明显增加。经多次传代形成的细胞克隆仍为 nestin 表达阳性(图 2)。

2.4 BrdU 掺入检测

经与 BrdU 共孵育后培养形成的神经球,大部分细胞 BrdU 表达阳性,部分细胞未表达 BrdU(图 3)。

2.5 分化结果

胎鼠 NSC 贴壁 2-4 天后即有突起长出,数天后即有大量不同形态的新生神经细胞。NSE 抗体为特异性识别神经元的抗体,GFAP 阳性细胞显示了星形胶质细胞的粗长突起和多角形胞体。在原代克隆、亚克隆后代及单细胞克隆分化后的细胞内均得

维普资讯 http://www.cqvip.com

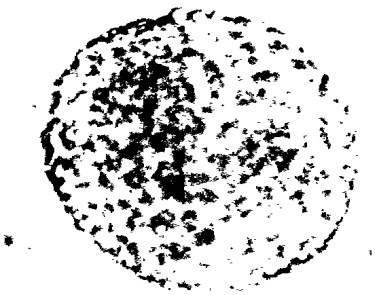


图 1 无血清培养的神经干细胞球(×100)

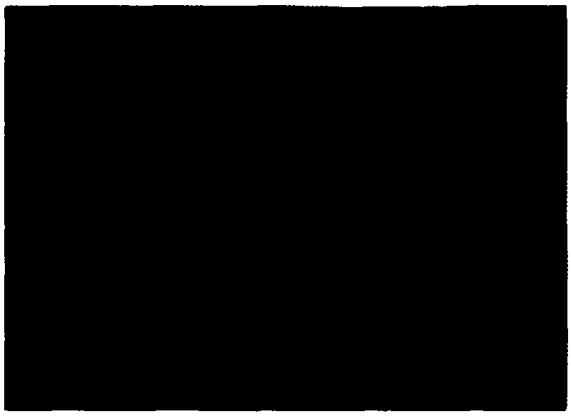


图 2 神经干细胞球中 nestin 表达(×100)



图 3 神经干细胞球中 BrdU 表达(×200)



图 4 NSC 分化细胞的 NSE、GFAP 表达(×200)

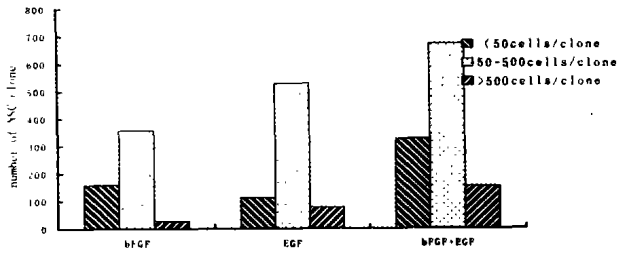


图 5 EGF 与 bFGF 对 NSC 克隆形成数量与大小的作用

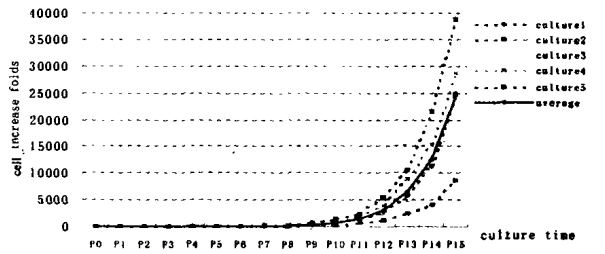


图 6 胚胎大鼠 NSC 体外扩增

到显示(图 4)。

2.6 细胞因子对克隆形成的影响

原代培养 6 天后,各组中均有大小不一、数量不等悬浮生长的细胞团,bFGF 组仅有少量细胞团形成,在 EGF 组中有较多的大中型细胞团形成,bFGF+EGF 组形成的细胞团在大小和数量上都高于单用组。其中较小的细胞团由数个至数十个细胞构成,而较大的细胞团由数百个甚至上千个细胞构成。

2.7 NSC 数量扩增

传代培养的 NSC 生长迅速,对 5 次连续传代培养的 NSC 进行记数,发现增殖效率不完全一致。经 15 次传代培养后细胞数量平均增加了 2.45×10^4 倍,细胞得到大量扩增。

3 讨 论

在发育和成熟的神经系统内均存在着神经干细胞,人和鼠胚胎的纹状体、海马、皮层脑室区等各个部分均发现了中枢神经干细胞。Stefano F 从病人嗅球部位获得神经干细胞,更拓宽了 NSC 的应用前景[3]。

NSC 的基本生物学特性包括:1、自我复制能力,2、处于较原始的未分化状态,3、具有多向分化潜能。本实验中采用了 E12.5 天的大鼠胚胎,分离培养的细胞群具有很强的自我更新能力,在连续传代培养 20 次后依旧维持克隆形成能力。为排除多细胞聚集的可能性,我们采用了单细胞克隆的方法进

维普资讯 http://www.cqvip.com

一步证明单个细胞能够分裂增殖成为克隆,即具有自我更新能力。1 个克隆中大部分细胞不可避免死亡或分化(可能为祖细胞和成熟细胞),但仍有 10%~20%的细胞具有克隆能力,表明克隆中部分细胞保持自我更新,而部分分化、凋亡。在原代 NSC 克隆、亚克隆后代分化形成的细胞内 NSE、GFAP 和 GalC 均得到显示,证明了克隆细胞具有分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的能力,即多分化潜能。因此,本实验中分离的细胞群具有自我更新能力和多分化潜能,具备了神经干细胞的基本属性,是中枢神经系统的干细胞。克隆形成实验和 nestin 检测还表明早期克隆中部分细胞为 NSC,还存在大量其他细胞(如祖细胞和成熟细胞),这部分细胞在长期的条件培养中逐渐死亡和分化,在数次传代培养后 NSC 趋于纯化。

在本实验中,我们还采用 BrdU 掺入观察了克隆细胞的 DNA 合成。细胞在分裂增殖时首先要合成分配到子代细胞中的 DNA,在培养中加入 BrdU,替代 U 参与 DNA 合成,检测 BrdU 表达可以了解细胞是否处于增殖期[4]。实验结果表明培养的神经球中大部分细胞处于 DNA 合成增殖期。

FGF2 与 EGF 对 NSC 增殖分化的作用是否一致存在争议[5]。Carpenter 在含 EGF、bFGF 和 LIF 的无血清培养基中培养的人类神经干细胞,能存活达一年以上,并仍然保持其分化潜能。我们比较了 EGF 与 bFGF 单独作用与合用对 NSC 克隆形成,发现 EGF 的刺激作用较 bFGF 强,而 EGF 与 bFGF 联用效果优于单用。我们推测联合应用是否对受体的表达有促进作用,从而获得更高的克隆产率。在此后的实验中我们选择了 DMEM/F12 + B27 + bFGF + EGF,获得较高的克隆形成。在该培养体系中 NSC 生长迅速,状态良好,细胞数量得以大量扩增。原代胚胎中脑细胞经 15 次传代后获得约 2.4×10^{10} 细胞,扩增约 2.4×10^{4} 倍。传代培养的 NSC 性能稳定,经冻存复苏后保持 NSC 自我更新、多向分化和大量增殖的特点,可以用于进一步研究。

针对中枢神经系统由于创伤、缺血及变性疾病神经细胞数量和功能缺失这一根本问题,神经干细胞展示了诱人的应用前景[6]。但应该看到神经干细胞的研究才刚刚开始,仍有许多悬而未决的问题,干细胞疗法还会有很长的路要走。对其生物学特性的深入了解,对其增殖分化进行有效控制将大大推动干细胞的应用。

参 考 文 献

[1] Bjorklund A, Lindvall O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders[J]. Nat Neurosci, 2000; 3(6): 537-544.

[2] Weissman I. L. Stem cells: Units of development, units of regeneration, and units in evolution[J]. Cell, 2000; 100: 157-168.

[3] Stefano FP, Francesco I, Marina G, et al. Isolation and characterization of the neural stem cells f rom the adult human olfactory blub[J]. Stem cells, 2000; 18(4): 295-300.

[4] Liu SC, Klein-Szanto AJ. Markers of proliferation in normal and leukoplakic oral epithe lia[J]. Oral Oncol, 2000; 36(2): 145-151.

[5] Vescovi A, Reynolds BA, Fraser DD, et al. bFGF regluates the proliferative fate for unipotent and bipotent EGF-generated CNS progenitor cells[J]. Neuron, 1993; 11: 951-966.

[6] Rietze RL, Valcanis H, Brooker GF, et al. Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain[J]. Nature, 2001; 412: 736-739.