DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.20.034
第25卷第20期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 20
2003年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2003

文章编号:1000-5404(2003)20-1853-03

技术方法

非病毒载体介导神经干细胞基因转染的效果观察

Transfection efficiency of neural stem cells mediated by non-virus vector

刘仕勇,杨 辉,张治元,王 彬,邱克军 (第三军医大学附属新桥医院神经外科,重庆 400037)

提 要:目的 寻找较佳的神经干细胞非病毒载体基因转染方法。方法 采用磷酸钙、不同种类脂质体、Fugene 6和Nucleofector法将绿色荧光蛋白基因转染于神经干细胞,用荧光显微镜和流式细胞仪检测转染结果。结果 荧光显微镜观察和流式细胞仪检测结果表明,转染效率从高到低依次为Nucleofector法、DMRIE-C介导、FuGene6介导、Lipofectamine和磷酸钙转染,组间均存在显著差异。结论 Nucleofector法和DMRIE-C脂质体介导是神经干细胞基因转染的较佳方法。

神经干细胞由于其在神经发育和中枢功能重建中的巨大潜力而倍受关注,探讨各种基因在神经干细胞发育过程中的作用和探索神经干细胞作为基因治疗的载体细胞是人们研究的主要方向[1~3]。但目前的研究显示,神经干细胞的转染效率较为低下,某些在非神经系统细胞效果较为肯定的方法并不适用于神经干细胞的基因转染[4~6]。尽管病毒介导的基因转染具有更佳的转染效率,但由于其安全性和技术方面的原因,探讨高效率的非病毒载体基因转染方法具有较大的意义。本实验以绿色荧光蛋白基因(Green fluorescence protein, GFP)为报告基因,采用磷酸钙、不同种类脂质体、Fugene 6(非脂质体配方)和Nucleofector法(原代细胞核转染法)转染神经干细胞,检测其转染效率,以期寻找转染效率较高的非病毒基因转染方法。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康昆明种新生小鼠(P0天),雌雄不拘,由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 试剂和抗体

DMEM/F12和B27(Gibco)、bFGF(Sigma)、胎牛血清(杭州四季青生物材料研究所)。脂质体Lipofectamine和DMRIE-C由Invitrogen公司提供,FuGene6(非脂质体配方)来源于Roche公司。Nucleofector转染仪和小鼠神经干细胞专用试剂盒购自Amaxa公司(深圳达科为公司代理)。PEGFP-N1质粒购自Clontech公司。

基金项目:国家自然科学基金资助重点项目(30130110)
Supported by a grant from National Natural Science Foundation of China(30130110)
作者简介:刘仕勇(1973-),男,四川省长宁县人,博士研究生,主治医师,主要从事神经干细胞方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68755610
通信作者:杨 辉,电话:(023)68755610;E-mail:yanghxqh@cta.cq.cn
收稿日期:2003-07-04;修回日期:2003-09-18

1.3 实验方法

1.3.1 神经干细胞的分离培养 参照本实验室已建立的方法[2]。

1.3.2 GFP基因转染神经干细胞

1.3.2.1 磷酸钙介导 取生长旺盛的第三代神经干细胞,稍做吹打,种植入6孔培养板(每孔1×10^6个细胞),按文献[7]中的方法制备磷酸钙-DNA沉淀,每1 ml培养基中加0.1 ml沉淀,37 ℃培养,8 h后加入10%的有血清培养基,24 h后吸去培养基和沉淀,换液后继续培养(仍采用含10%的胎牛血清培养液)[6]。

1.3.2.2 脂质体Lipofectamine和DMRIE-C介导 脂质体Lipofectamine和DMRIE-C的转染按试剂说明书进行,转染时均采用无血清、无抗生素培养基,脂质体与DNA的比例2∶1(μl/μg),将脂质体和DNA分别加入250 μl培养基,静置5 min后将两者混合,轻轻拍打混匀,放置25 min后加入已预置神经干细胞的培养孔(每孔种植1×10^6个细胞,6孔培养板),37 ℃培养8 h后加入10%有血清培养基使神经干细胞贴壁分化。

1.3.2.3 Fugene 6介导 按试剂说明书进行,取6 μl FuGene 6稀释于100 μl无血清培养基(无抗生素),加入3 μg质粒DNA,室温下静置25 min。收集细胞,种植于6孔培养板(1×10^5个细胞/孔),将上述的FuGene 6-DNA复合物加入培养板,混匀后置孵箱培养,8 h后加入10%有血清培养基使神经干细胞贴壁分化。

1.3.2.4 Nucleofector法介导 收集神经干细胞,每个样品4×10^6个/细胞,800 r/min,离心5 min,去上清,依次加入100 μl小鼠神经干细胞转染液和5 μg DNA,Nucleofector转染仪转染,使用A-33程序,成功后种植于6孔培养板,每孔种植1×10^6个细胞,转染后立即加入10%有血清培养基使神经干细胞贴壁分化。

1.3.3 荧光显微镜观察 于转染后在4~72 h内荧光显微镜下动态观察,于48 h时进行显微细胞计数:计算10个视野(100倍,随机抽取)的平均阳性细胞数,乘以200(6孔培养板的视野数),即为总阳性细胞数。

1.3.4 流式细胞仪检测 于转染72 h后用0.25%胰酶消化培养孔内细胞,4%多聚甲醛固定20 min,D-Hank液漂洗,1 500

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

r/min 离心 5 min，混匀后采集样本，用 FACstar 流式细胞仪检测，每组取 3 个样本，每样本计数 10 000 个细胞，并计算其阳性率。

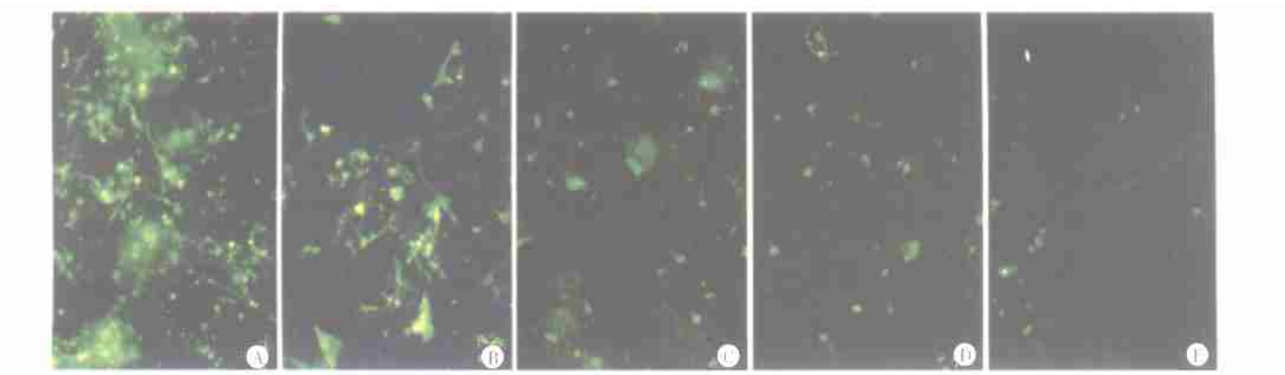
1.4 统计学处理

采用 SPSS 软件作 χ^2 检验。

2 结果

2.1 荧光显微镜下观察结果

皮层神经干细胞采用上述方法转染 GFP，4 h 后即见有少量阳性细胞，荧光强度较亮，散在于神经干细胞克隆团中，基本成圆形或椭圆形，24 h 后阳性细胞明显增多，荧光蛋白表达高峰期在 48 h。贴壁分化后可见到神经元样细胞、少突胶质细胞样细胞和星形胶质细胞样细胞。在脂质体介导和磷酸钙法转染中观察到部分 GFP 阳性细胞突起不明显，形态不甚规则，伴有散在的绿色颗粒，在普通光镜下见到较多死亡细胞，显示上述转染方法对细胞有一定的毒性作用。而 Nucleofector 法和 FuGene6 转染的细胞死亡较少，GFP 阳性细胞的形态也较佳，见图 1。



A：Nucleofector；B：DMRIE-C；C：Futene6；D：Lipofectamine；E：Calcium phosphate

图 **1** 不同方法介导神经干细胞基因转染后的 **GFP** 表达结果 （× 200）

采用不同方法转染神经干细胞后比较，Nucleofector 法介导的转染效率最高，见到大量绿色荧光蛋白阳性细胞，DMRIE-C 脂质体次之，明显低于 Nucleofector 法，FuGene6 的转染效率也优于 Lipofectamine，磷酸钙法转染效率最低，见图 1。显微细胞计数结果显示证实了上述趋势，采用 Nucleofector 法转染，48 h 后每孔中有 4.26×10^5 个阳性细胞，而 DMRIE-C 脂质体介导仅为 2.42×10^5 个，FuGene6 和 Lipofectamine 转染分别为 1.78×10^5 和 0.74×10^5 个，磷酸钙法为 0.16×10^5 个阳性细胞。

2.2 流式细胞仪检测结果

于转染 72 h 后行流式细胞仪检测，结果表明转染效率从高到低依次为 Nucleofector 法、DMRIE-C 介导、FuGene6 介导、Lipofectamine 和磷酸钙转染，分别为 45.18%、26.32%、18.34%、7.88%、2.62%，组间均存在显著差异（$P<0.05$）。

3 讨论

神经干细胞在培养过程中有别于神经系统其它细胞的一个特性就是它在无血清培养液中呈悬浮球形生长，大量细胞相互重叠、聚集成团块，这使得目前广泛采用的脂质体等方法难以很好地介导神经干细胞的转染。在多个作者报道的文献中，采用脂质体或常规电穿孔方法的转染效率未能超过 20%，甚至有报道在 5%以下[4~6]。采用病毒载体介导尽管可能得到更佳的转染效率，但由于安全性和技术方面的原因，如大片段基因转染就受限于病毒载体，使得探讨非病毒介导方法具有较大意义。本实验采用多种非病毒载体方法介导神经干细胞的基因转染取得了较高的效率，其中 Nucleofector 法、DMRIE-C 介导的转染效超过了 20%，这表明非病毒载体介导仍然可以获得较高的转染效率。本实验转染效率高于国外同类研究的原因可能与我们在转染后早期采用有血清培养基，避免了大量细胞死亡有关，同时，本实验采用的独特转染方法如 Nucleofector 法、DMRIE-C 介导也提高了神经干细胞的转染效率。

Nucleofector 转染是 Amaxa 公司近年来基于电穿孔原理而开发的优化转染程序，即针对特定种类细胞（如神经干细胞），将电穿孔时的各种影响因素进行优化，研制特定细胞的专用电转液，并将优化后的转染条件固定于一特定电脑程序以进行调控，这样可以最大限度的增加转染效率，同时避免了常规电穿孔方法的大量细胞死亡，小鼠神经干细胞转染方法和试剂即是该公司 2003 年 3 月最新推出的产品。本实验采用 Nucleofector 转染取得较好的转染效率和较少的细胞死亡，由于该法采用专用程序，具有较佳的稳定性和重复性，操作简单，对细胞的毒性较弱，表明这是一种较为理想的神经干细胞转染方法。DMRIE-C 脂质体转染以前主要应用于血液系悬浮生长的细胞，如 T 细胞等，本实验采用此法同样取得了较好的转染效果，明显优于其它

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

脂质体和 Fugene 6，分析其原因可能与神经干细胞的悬浮生长特性有关，考虑到 DMRIE-C 相对于 Nucleofector 转染低廉的价格，采用 DMRIE-C 不失为神经干细胞基因转染的较好选择。

关键词：神经干细胞；基因转染；绿色荧光蛋白
中图法分类号：R329.2 文献标识码：B

参考文献：

[1] Clarke D L, Johanssom C B, Wilbertz J, *et al*. Generalized potential of adult neural stem cells[J]. Science, 2000, 288(5471): 1660－1663.
[2] 刘仕勇，张可成，杨 辉，等. 神经干细胞的分离及其鉴定[J]. 第三军医大学学报，2000, 22(1): 26－28.
[3] 周德山，蔡文琴. 干细胞基础与应用研究的一些进展[J]. 第三军医大学学报，2003, 25(1): 1－3.
[4] Falk A, Holmstrom N, Carlen M, *et al*. Gene delivery to adult neural stem cells[J]. Exp Cell Res, 2002, 279(1): 34－39.
[5] Kim Y C, Shim J W, Oh Y J, *et al*. Co-transfection with cDNA encoding the Bcl family of anti-apoptotic proteins improves the efficiency of transfection in primary fetal neural stem cells[J]. J Neurosci Methods, 2002, 117(2): 153－158.
[6] Lemkine G F, Mantero S, Migne C, *et al*. Preferential transfection of adult mouse neural stem cells and their immediate progeny in vivo with polyethylenimine[J]. Mol Cell Neurosci, 2002, 19(2): 165－174.
[7] 萨姆布鲁克，拉塞尔 著. 黄培堂 译. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版. 北京：科学出版社，2002. 1282－1286.

（编辑 王 红）

文章编号：1000-5404(2003)20-1855-02

技术方法

ASA-602 立体定向仪的计算方法

Stereotactic calculation method for ASA-602 stereotactic apparatus

刘海鹏，杨 辉，周 政 （第三军医大学附属新桥医院神经外科，重庆 400037）

提 要：目的 寻找 ASA-602 立体定向仪的立体定位计算方法。方法 先根据中心点与靶点的关系，计算出靶点的坐标值（X、Y、Z）；然后根据立体定位框架上的固有数值，找出靶点测量值（X2、Y2、Z2）与靶点标值的关系。结果 无论靶点与中心点的关系如何，都可直接将靶点测量值换算成靶点坐标值。即：X＝X2，Y＝Y2＋40，Z＝Z2＋40。结论 该方法简便、直观，适合进一步推广应用。

立体定向神经外科就是利用立体定向仪上固定系统和导向系统将手术器械或特殊装置送入脑内预定靶点进行毁损、慢性电刺激、脑内神经细胞介质测定或进行脑组织移植等，使病人神经系统和内分泌系统的功能失调性症状改善，对脑功能或脑内某些疾病进行治疗和病因学研究[1~3]。近来 CT 定向术已相当普及，广泛用于颅内疾病诊断和治疗[4]。

立体定向系统包括固定架、定位架、导向仪和手术操作器械四个部分。将人脑颅骨固定于立体定向固定架，并在固定架上安装“N”形定位标志，即定位架，进行 CT/MRI 扫描，从带有定位框架的影像片上把可见的或推算出的目标点，投影到定向仪上的三维坐标刻度上，求出它的坐标读数（即 X、Y、Z 坐标值），依据这些读数，调整定向仪上与之相应数值，就可使患者脑内目标点坐标数值与定向仪上坐标数值吻合（重叠）。此时用定向仪上定向系统就能准确地把手术器械送到颅内目标点，完成定向手术[5]。

1 ASA-602 立体定向仪的性能特点

ASA-602 立体定向仪是 ASA-601S 的改进型，属于混合性坐标系定向仪，符合球心原理。用硬质轻合金材料制成，保持了原有的精度较高，做工精良，操作方便的特点，同时提高了刚度，减轻了重量，扩大了术野，既可进行常规定向手术，又为定向显微外科提出供有力的支持。导向操作灵巧，调节角度大，同时可进行两半球或后颅凹手术，精密度高，靶点命中准确度≤1.0 mm。可允许的靶点位置范围：X 方向 50～145 mm，Y 方向 30～170 mm，Z 方向 55～145 mm。可允许的手术入颅点探针活动范围：弓形架上的托板沿弧形架作左右滑动 10°～170°，弓形架沿框架作前后转动 20°～250°。既可用于 X 线定位，也可与 CT 或 MRI 相匹配来定位，适合各种手术要求，临床应用广泛。

2 ASA-602 立体定向仪的应用

立体定向手术的应用包括：①立体定向功能神经外科：帕金

作者简介：刘海鹏（1966－），男，陕西省兴平市人，博士，副主任医师，副教授，主要从事功能和立体定向神经外科和微创神经外科方面的研究，发表论文 30 余篇。电话：(023)68774610
通信作者：杨 辉，电话：(023)68755610；E-mail：yanghxqh@cta.cq.cn
收稿日期：2003-05-15；修回日期：2003-09-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net