DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.08.001
第25卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 8
2003年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2003

文章编号:1000-5404(2003)08-0653-04

论著

维甲酸对MESPU35胚胎干细胞系神经定向分化的影响

秦茂林,蔡文琴,姚忠祥 (第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 了解维甲酸(Retinoic acid, RA)对MESPU35胚胎干细胞系诱导分化的影响。方法 小鼠胚胎成纤维细胞作为饲养层,培养MESPU35细胞系,4-/4+法诱导其神经定向分化。结果 相差显微镜观察RA诱导MESPU35细胞系出现神经样细胞拟胚体百分率随分化时相点和RA浓度升高而升高,免疫细胞化学观察分化的NF200和GFAP阳性细胞随分化时相点和RA浓度升高而增加,NF200阳性细胞由无突起变为多极细胞,GFAP阳性细胞突起由短变长,最后联结成网状。流式细胞仪检测分化的GFAP、NF200阳性细胞比例变化与免疫细胞化学结果相符。结论 RA诱导MESPU35细胞系神经定向分化的调节以浓度和时间依赖模式进行,提示其神经定向分化产生的高比例神经细胞可以用于移植治疗。

关键词:胚胎干细胞;分化;维甲酸
中图法分类号:R321.5;R329.2;R986 文献标识码:A

Effect of retinoic acid on differentiation of embryonic stem cell line MESPU35

QIN Mao-lin, CAI Wen-qin, YAO Zhong-xiang (Department of Histology and Embryology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the effect of retinoic acid (RA) on neural differentiation of embryonic stem cell line MESPU35. Methods MESPU35 ES cells cultured on feeder cells (mouse embryonic fibroblast) were induced by RA (4-/4 + method). Results By using RA treatment, it was found by phase contrast microscope that the percentage of outgrowths of embryonic bodies containing neuron-like cells increased as the concentration of RA and days of differentiation increased. Immunocytochemistry results showed numbers of NF200 positive cells and GFAP positive cells increased with the increases of the concentrations of RA and time of differentiation. NF200 positive cells changed from spherical shape to multipolar shape. Processes of GFAP positive cells became longer, connected with each other and formed a network. The results by flow cytometry were in conformity with those by immunocytochemistry. Conclusion The differentiation of ES cells can be induced by RA in dose-dependent manner and time-dependent manner, suggesting that MFSPU35 cells can provide a source of differentiated nerve cell types that can be used for transplantation.

Key words: embryonic stem cells; differentiation; retinoic; acid

近年来细胞移植治疗中枢神经系统(Central nerve system, CNS)损伤有很大进展,包括胚胎脑组织、神经干细胞等多种供体移植用于CNS损伤后治疗,对神经结构和功能恢复起到很大的促进作用,但存在供体来源问题。胚胎干细胞(Embryonic stem cells, ES)能够分化为神经元、神经胶质细胞和神经前体细胞,ES细胞神经定向诱导有利于得到高比例分化的神经细胞,已有报道用来源ES细胞的少突胶质细胞前体移植治疗小鼠脱髓鞘病[1],能够促进轴突伸长和髓鞘再生。本实验利用来源于C57BL/6J小鼠的MESPU35胚胎干细胞株(北京大学生命科学院建系)进行神经定向分化条件的研究,4-/4+法,不同浓度血清培养拟胚体,维甲酸诱导分化,利用免疫细胞化学、流式细胞仪进行观察,以期找到该细胞最佳神经分化条件,为CNS损伤修复提供供体来源。

1 材料与方法

1.1 实验动物

孕13~16 d昆明小鼠,购自第三军医大学实验动物中心。MESPU35胚胎干细胞株[2],购自北京大学生命科学院遗传学教研室。

1.2 饲养层细胞的制备

孕13~16 d的小鼠胚胎,去头,胸腹腔脏器及四肢后,胰酶

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30000172);第三军医大学科研基金资助项目(1999)
作者简介:秦茂林(1970-),男,河南省洛阳市人,博士研究生,讲师,主要从事胚胎干细胞方面的研究。电话(023)68752231
收稿日期:2002-07-25;修回日期:2002-12-28

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

消化，机械吹打后种植于底面积为 25 cm^2 玻璃培养瓶中，加入含10%小牛血清(天津 TDB 生物公司)，2×10^{-4} mol/L 的谷氨酰胺，50 U/ml 青霉素，1× 非必需氨基酸(Gibco 公司)的 DMEM 培养基(Gibco 公司)。于 37 ℃，5% CO_2 培养箱中培养 24 h，更换培养基后培养 72～96 h 至细胞融合，常规传代。将融合的鼠胚成纤维细胞加入含 10 μg/ml 丝裂霉素-C 的上述培养基中培养 2～3 h 后，常规胰酶消化，单细胞悬液按密度 1×10^6/ml 种植于 24 孔板或是 6 cm 塑料培养皿中，细胞贴壁伸展后(约 2 h)，饲养层细胞制备完毕。

1.3 MESPU35 细胞系的维持

将冻存的MESPU35 细胞系迅速复苏，种植在制备了饲养层细胞的培养皿中，在培养基中补加 1×10^3 U/ml 的白血病抑制因子(Leukomia inhibitory factor，LIF，Gibco 公司)，15%的混合血清(10%的小牛血清和5%的胎牛血清，后者购自 Gibco 公司)和 0.1 mmol/L 的β 巯基乙醇。37 ℃，5% CO_2 培养箱中培养，每天更换培养基，每两天传代一次。

1.4 4-/4+法诱导 ES 细胞神经定向分化

胰酶消化接近长满培养皿的 ES 细胞，记数后吸取 1×10^6 个细胞的悬液，转入国产 5.5 cm 培养皿，补加培养液至 4 ml(分别加入不同浓度 2%、5%、10%小牛血清，培养后观察拟胚体数量、贴壁情况和出现神经样细胞拟胚体的比例，决定使用某个特定血清浓度用于后续实验)，悬浮培养 2 d(拟胚体贴壁，可轻轻吹打，使之重悬)；小心吸去培养液，加入 4 ml 新鲜培养液，继续悬浮培养2 d。加入含不同浓度 RA(5×10^{-7}、1×10^{-6}、和 5×10^{-6} mol/L)的培养液，继续悬浮培养 2 d；吸去培养液，加入含 RA 的培养液，继续悬浮培养 2 d。吸去培养液，加入适量新鲜培养液(不含 RA)，轻轻吹打使拟胚体分散均匀，转入 6 cm 网格板中(每板转入约 100 个拟胚体)，补加培养液至 5 ml。此后 5、9、14 d 观察，每组计数 100 个拟胚体，计算分化出神样细胞的拟胚体数占拟胚体总数的比例。判断神经样细胞的形态学标准是：细胞的突起比细胞的胞体长 5 倍，且相互连接交织成网状[3]。

1.5 免疫细胞化学染色

分化的 ES 细胞贴壁培养在盖玻片上，于分化 5、9、14 d 时取出盖玻片，PBS 洗涤 3 遍，4%多聚甲醛固定 30 min；0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次，清除残存的固定剂；具体染色步骤参见文献[4]，NF200(一抗均购自 Sigma 公司)标记神经元，GFAP 标记星形胶质细胞，半乳糖苷脂(Galactocerebroside，Gal-c)标记少突胶质细胞，显色采用 FITC 荧光或是 SABC-CY3 荧光显色试剂盒、DAB 显色 5～15 min 或硫酸镍铵增强的 DAB 显色法(显色液配制：2.5%硫酸镍铵和 0.035% DAB，溶于 0.1 mol/L 醋酸钠溶液，过滤除去不溶物后，加入 0.03% H_2O_2，显色结果为蓝黑色)；显微镜下观察染色深浅，至适当程度用 0.01 mol/L 的 PBS 终止显色；水溶性甘油或是 DPX 封固后观察照相。每个样本高倍镜下随机记数 20 个拟胚体中阳性细胞数，计算阳性细胞均值。

1.6 流式细胞仪检测分化细胞的比例

分化后细胞，胰蛋白酶消化为单细胞悬液，1 000 r/min 离心 10 min；0.01 mol/L 的 PBS 漂洗 5 min，1 000 r/min 离心 10 min 重复 3 遍；弃上清，用 4%的多聚甲醛固定 30 min；充分洗涤后加入一抗(阴性对照不加一抗)，4℃反应 12 h；加入 FITC 荧光二抗(FITC 结合的 IgG)，湿盒，37 ℃反应 1 h；0.01 mol/L 的 PBS 充分洗涤后，流式细胞仪检测标记率。

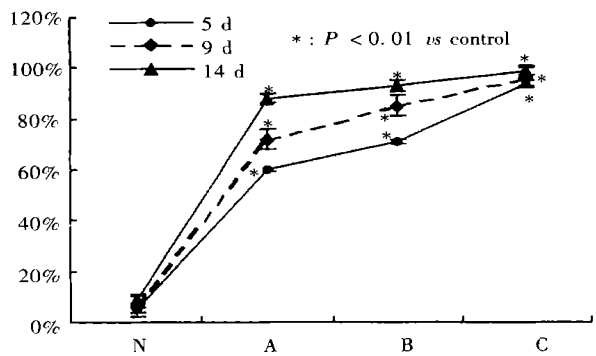
1.7 统计学处理

采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 相差显微镜观察

相差显微镜观察不同血清浓度对拟胚体形成有明显影响：如果血清浓度为 2%则拟胚体形成数量太少，贴壁比例也少；10%小牛血清，胚体形成数量和贴壁比例高，然而出现神经样细胞拟胚体比例低；5%血清培养时，拟胚体贴壁比例和 10%血清类似，而出现神经细胞拟胚体比例高。相差显微镜观察发现 RA 诱导 ES 细胞分化对比自然分化的 ES 细胞在形态学方面有所不同。RA 诱导时，ES 细胞分化产生的细胞形态比较单一的多突起细胞，RA 诱导剂浓度升高和分化时间延长，出现神经样细胞拟胚体的百分率增高，见图 1。



N：Control，A：5×10^{-7} mol/L，B：1×10^{-6} mol/L，C：5×10^{-6} mol/L

图 1 RA 诱导 MESPU35 细胞出现的神经样细胞拟胚体的百分率

Fig 1 Percentage of embryonic bodies containing neuron-like cells induced by RA

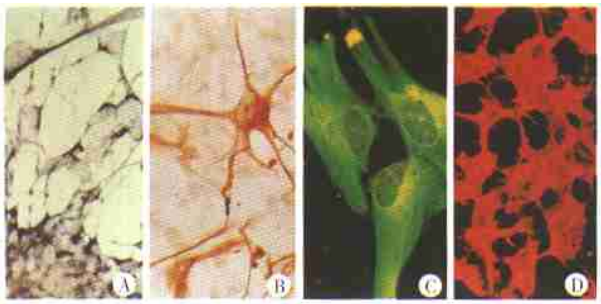
2.2 免疫细胞化学

免疫细胞化学染色发现在不同浓度梯度 RA 诱导 ES 细胞分化过程中，1×10^{-6} mol/L RA 诱导组，分化 5 d NF200 阳性细胞数目较少，位于拟胚体的附近，至分化 9 d，NF200 阳性细胞突起较长，见图 2A，14 d 时出现多极细胞出现，见图 2B。GFAP 阳性细胞数量随分化时相点延长而增多，产生的 GFAP 阳性的细胞平铺，细胞核明显，分化 9 d 出现较为成熟的细胞，见图 2C。至分化 14 d，GFAP 阳性细胞在拟胚体外周出现，数量明显增多，见图 2D。5×10^{-7} mol/L RA 组和 5×10^{-6} mol/L RA 组诱导 ES 细胞分化，免疫细胞化学实验观察到结果与 1×10^{-6} mol/L RA 组一致。Gal-c 免疫细胞化学染色观察不同分化时相点细胞，未见阳性反应，见表 1。

2.3 流式细胞仪

检测 RA 诱导 ES 细胞分化不同时相点细胞比例，检测结果见表 2。

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



A: 9 d, NF200$^+$ cells; B: 14 d, NF200$^+$ cells; C: 9 d, GFAP$^+$ cells; D: 14 d, GFAP$^+$ cells

图 2　**MESPU35** 细胞分化后免疫细胞化学染色　(SABC× 200)

Fig 2　Immunostaining of differentiated MESPU35 cells　(SABC× 200)

表 1　**MESPU35** 细胞分化为 **NF200** 标记阳性细胞的比率(%, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Positive cell rates by NP200 immunostaining differentiated from MESPU35 cells (%, $\bar{x}\pm s$)

Croup	Duration of inducement		
	5 d	9 d	14 d
5×10^{-7} mol/L RA	12.6±0.4	18.2±0.3 *	22.9±0.5 *
1×10^{-6}mol/L RA	15.3±0.3 *	25.4±0.1 *	32.6±0.7 *
5×10^{-6}mol/L RA	16.4±0.2 *	26.7±0.6 *	36.3±0.8 *
Control (No RA)			9.6±0.2

*: $P<0.01$ *vs* control

表 2　**MESPU35** 细胞分化为 **GFAP** 标记阳性细胞的率(%, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Positive cell rates by GFAP immunostaining differentiatel from MESPU35 cells (%, $\bar{x}\pm s$)

Croup	Duration of inducement		
	5 d	9 d	14 d
5×10^{-7} mol/L RA	13.5±0.2	36.3±0.4 *	36.8±0.2 *
1×10^{-6}mol/L RA	24.9±0.1 *	45.0±0.7 *	50.3±0.2 *
5×10^{-6}mol/L RA	43.3±0.4 *	52.8±0.2 *	57.1±0.5 *
Control (No RA)			10.0±0.1

*: $P<0.01$ *vs* control

3　讨论

3.1　神经定向分化与血清浓度的关系

Gajovic 等[5]报道 ES 细胞诱导产生神经细胞的比例与分化中所用血清的浓度有关, 血清浓度与诱导分化的神经细胞数量成反比, 然而在无血清培养基中诱导产生神经细胞需要的时间比较长, 且分化的速度十分缓慢。ES 细胞神经定向分化需要两个信号, 一种是空间的聚集, 即拟胚体的形成; 另一种是如 RA 等化学信号的刺激。拟胚体形成和贴壁的多少直接影响神经定向分化, 血清浓度太高形成的拟胚体出现神经样细胞的比例低, 太低则影响拟胚体的形成和贴壁, Gajovic[5]实验显示用 1%血清培养 ES 细胞, 分化出高比例的神经细胞; 10%或无血清培养结果相反。本实验采用 5%血清, 与报道偏差可能是 ES 细胞系不同导致的。

3.2　RA 诱导 MESPU35 细胞分化产生的细胞类型

RA 是一种细胞分化和胚层分化的诱导剂, 一般认为 RA 进入细胞后与细胞质中的 CRAPB (Cellular RA binding protein)结合形成复合物, 进入细胞核内, 其中 RA 与染色质上的受体结合, 从而调控一系列基因的表达, 使细胞表型发生转变[6]。有研究表明 RA 能够诱导 ES 细胞神经定向分化[7], 产生神经前体细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞和神经元等, 这些细胞能够产生神经冲动和形成突触。本实验采用 RA 诱导 MESPU35 细胞系分化出高比例的星形胶质细胞和神经元, 流式细胞仪分析发现其二者约占所有细胞的 80%～90%, 提示 RA 能够高效诱导 MESPU35 细胞神经定向分化。MESPU35 细胞系分化任何时相点, 未发现 Gal-c 阳性细胞, 导致此结果的原因尚不清楚。推测可能 Gal-c 是成熟少突胶质细胞的标志物, 而非幼稚少突胶质细胞标志物, 分化时间不足导致细胞内未出现 Gal-c, 具体原因有待于进一步的检测证明。

3.3　RA 浓度和分化时间对 MEspu35 细胞神经分化的影响

诱导出现神经细胞的比例成 RA 浓度依赖模式, 随着 RA 的浓度升高, 其诱导分化的神经细胞的比例增加, Gajovic[5]最高使用过 1×10^{-4} mol/L 的 RA 浓度。但是也有人报道[8], 高浓度 RA 诱导 ES 细胞分化的同时, ES 细胞分化产生的细胞产生凋亡的比例随诱导时间的增加而增多。本实验所用的 RA 浓度为 5×10^{-7}～5×10^{-6} mol/L, 此浓度范围诱导产生的神经细胞比例随 RA 浓度升高而增加, 呈浓度依赖模式。相同 RA 浓度, 随分化时间延长, 诱导产生的神经细胞比例增加, 提示 ES 细胞神经定向分化也是一种时间依赖模式。

综上所述, RA 诱导 MESPU35 细胞系神经定向分化的调节以浓度和时间依赖模式进行, 在 5%血清浓度下能够诱导产生高比例神经细胞, 提示 MESPU35 细胞系有可能作为 CNS 损伤后移植治疗的供体细胞。

参考文献:

[1] Brustle O, Jones K N, Learish R D, *et al*. Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants[J]. Science, 1999, 285 (5428): 754－756.

[2] 童　英, 韩　嵘, 郑玉兰, 等. 具高效种系嵌合能力的 C57BL/6J 小鼠 ES 细胞系的建立[J]. 遗传学报, 1999, 26(5): 468－473.

[3] Lopresti P, Poluha W, Poluha D K, *et al*. Neuronal differentiation triggered by blocking cell proliferation[J]. Cell Growth Differ, 1992, 3(9): 627－635.

[4] 蔡文琴, 王伯弢. 实用免疫细胞化学及核酸分子原位杂交技术

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

[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1994. 406—434.

[5] Gajovic S, St O L, Yokota Y, *et al*. Retinoic acid mediates Pax6 expression during *in vitro* differentiation of embryonic stem cells[J]. Differentiation, 1997, 62(4): 187—192.

[6] Angelov D N, Arnhold S, Andressen C, *et al*. Temporospatial relationships between macroglia and microglia during *in vitro* differentiation of murine stem cells[J]. Dev Neurosci, 1998, 20(1): 42—51.

[7] Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro A C, *et al*. Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells *in vitro*[J]. Mech Dev, 1996, 59(1): 89—102.

[8] Okazawa H, Shimizu J, Kamei M, *et al*. Bcl-2 inhibits retinoic acid-induced apoptosis during the neural differentiation of embryonal stem cells [J]. J Cell Biol, 1996, 132(5): 955—968.

(编辑 张大春)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2003)08-0656-02

深低温停循环行右颈内动脉动脉瘤夹闭术 1 例

Deep hypothermic circulatory arrest for operation on right carotid aneurysm: a case report

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

患者, 男, 39 岁, 无诱因出现头痛、伴呕吐, 继之出现右侧肢体偏瘫、失语。外院头颅 CT 示: 蛛网膜下腔出血; 经颅多普勒(Transcranial doppler, TCD)示: 左侧大脑中动脉痉挛; 腰穿示: 血性脑脊液。住院期间先后出现 3 次颅内出血, 3 次脑疝, 经止血、脱水、抗炎治疗后效果不佳, 转入我院。查体: 昏睡状, 脑膜刺激征阳性, 左侧肢体肌力Ⅴ级, 肌张力正常, 右上下肢肌力 0 级, 肌张力明显增高; 复查头颅 CT 提示: 交通性脑积水; 数字减影脑血管造影(Digital subtraction anglography, DSA)检查示: 右侧颈内动脉囊状动脉瘤, 瘤顶有一小囊, 瘤颈显示不清, 左侧大脑中动脉痉挛。诊断为: ① 右侧颈内动脉-后交通动脉动脉瘤(Hunt 分级为 Ⅲ~Ⅳ级); ② 交通性脑积水。经积极术前准备后, 在基础加局麻下行电解可脱微弹簧圈栓塞术(Gugliemi detachable coil, GDC), 由于寻找动脉开口困难, 未成功。因此我科与心脏外科联合行手术治疗。在深低温(18 ℃)条件下, 经右侧股动脉切开插管, 低流量体外循环, 逐步降血压、降温, 体温降至 18℃时, 停止体外循环(13 min), 心跳停止。迅速分离挑开蛛网膜, 暴露出颈内动脉, 见动脉瘤正位于颈内动脉上方, 瘤顶指向后上, 呈球形, 红褐色, 约 1.5 cm× 1.2 cm, 瘤颈位于颈内动脉主干。分离动脉瘤及动脉瘤颈, 钛合金动脉瘤夹夹闭动脉瘤, 切开动脉瘤体并切除部分动脉瘤。处理动脉瘤后立即恢复体外循环并逐步复温于体温恢复到 34℃时撤除体外循环。动脉瘤夹闭后停止冰毯降温, 升血压, 用鱼精蛋白中和肝素, 彻底止血后关颅。术中用脑电图行电生理监测, 保持皮层波形呈抑制状态, 给于硫喷妥钠、甘露醇、维生素 C 等作为脑保护剂。术后患者处于昏迷状, 带气管插管带呼吸机回监护室, 密切观察血气、电解质、肾功、呼吸节律、体温、脉搏、血压、桡动脉平均压、中心静脉压、血氧饱和度及尿量变化。术后出现体温不稳定和脑干损伤症状, 经保暖、降温和药物治疗后好转。术后第 3 天患者呼之能睁眼, 撤离呼吸机。术后第 10 天患者意识清楚, 能按吩咐动作, 无深低温后常见的心脏、肺部并发症。但患者有反应迟钝、表情淡漠等表现。现患者已康复出院。

讨论

颅内动脉瘤的外科治疗通常采用 3 种方式: ①开颅夹闭动脉瘤; ②经皮穿刺栓塞动脉瘤; ③ 载瘤动脉结扎术。到目前为止动脉瘤夹闭或结扎仍是首选方法。现代显微外科技术及动脉瘤夹制作工艺的提高, 使绝大多数颅内动脉瘤能够按常规方法予以夹闭。然而还有一部分复杂类型动脉瘤处理棘手, 例如巨大动脉瘤、深部位动脉瘤、动脉粥样硬化性大动脉瘤以及无法分辨流入和流出血管的动脉瘤, 这些动脉瘤靠常规解剖瘤颈的方法处理非常危险, 因为动脉瘤腔内压力极高, 容易引起瘤顶破裂大出血。所以通过降低动脉瘤顶压力来减少动脉瘤术中破裂的风险是行之有效的方法。降低瘤顶压力的常用方法有 3 种: 全身控制性降压、临时性血管阻断以及完全性循环停顿。全身降压由于其他器官和脑低灌注可能造成永久性损害, 应用较少。临时性血管阻断也因断流期间会发生不可逆性脑梗塞而应用受到一定限制。完全性循环停顿及深低温可完全终止动脉瘤内血流, 使手术安全可靠。但是深低温停循环仍有一些并发症存在: 如肺、肾、肝、脑等器官梗塞, 代谢性酸中毒以及体外循环造成凝血机制的改变等, 使深低温停循环处理颅内动脉瘤病例选择有严格限制。因此, 动脉硬化性巨大动脉瘤、部分闭塞的巨大动脉瘤、附着于重要结构周围(如视器、下丘脑等)的巨大动脉瘤, 眼动脉/床突旁巨大动脉瘤、基底动脉分叉部巨大动脉瘤适宜采用深低温停循环行动脉瘤夹闭。此外, 常规方法难以夹闭、反复蛛网膜下腔出血估计瘤顶极薄, 与周围结构粘连较明显, Hunt 和 Hess 分级为 Ⅲ~Ⅳ级者亦可采用深低温停循环方法处理动脉瘤。本病例动脉瘤呈囊状, 且瘤顶部还有一小囊状隆起, 瘤颈显示不清, 病程迁延 41 d, 且有反复出血表现, 瘤体与周围组织粘连严重, 有交通性脑积水, 并且介入栓塞治疗困难。而采用深低温(18 ℃)停循环下手术, 手术野清楚, 可放心剥离瘤体, 无大出血危险, 安全性较大[1]。

深低温停循环技术(Deep hypothermic circulatory arrest, DHCA)

(下转 659 页)

作者简介: 马立平(1963—), 女, 四川省阆中市人, 副主任护师, 主要从事神经外科重症监护方面的研究, 发表论文 10 篇。电话: (023)68755268

收稿日期: 2002-04-19; 修回日期: 2002-12-31

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