DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.03.007
第25卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 3
2003年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2003

文章编号:1000-5404(2003)03-0197-04

论著

纤维连接蛋白在小鼠胚胎干细胞诱导为神经前体细胞中的作用

徐海伟[1],吴 旋[1],黎海蒂[1],范晓棠[2],曹 娟[1],唐 军[1] (第三军医大学基础医学部:[1]生理学教研室;[2]神经生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 观察采用ITSF和N_2无血清培养基诱导小鼠胚胎干细胞为神经前体细胞的作用及纤维连接蛋白对神经诱导的影响。方法 小鼠胚胎干细胞的培养和无血清诱导为神经前体细胞,NBT/BCIP染色,Nestin免疫组化染色。结果 细菌培养皿法或悬滴法培养胚体、ITSF或N_2无血清培养基均能将小鼠胚胎干细胞诱导为神经前体细胞。纤维连接蛋白预处理培养皿表面,对胚体的贴壁情况影响不大,但能使无血清培养后存活的细胞增多。结论 小鼠胚胎干细胞在ITSF和N_2培养基均能分化为神经前体细胞,在N_2培养基中加入纤维连接蛋白能使存活的神经前体细胞数量增多。

关键词:胚胎干细胞;神经前体细胞;细胞分化;纤维连接蛋白;小鼠
中图法分类号:R329.21;R329.28;R341.22 文献标识码:A

Effects of fibronectin on the induction of neural precursor cells from murine embryonic stem cells

XU Hai-wei, WU Xuan, LI Hai-di, FAN Xiao-tang, CAO Juan, TANG Jun (Department of Physiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effects of ITSF and N_2 serum-free medium on the differentiation of neural precursor cells from murine embryonic stem cells and the influence of fibronectin. Methods Cultivation of murine embryonic stem cells and differentiation to neural precursor cells with serum-free medium. The embryonic stem cells were stained with NBT/BCIP and the neural precursor cells stained with immunocytochemistry of nestin. Results Murine embryonic stem cells could be induced into neural precursor cells with ITSF or N_2 serum-free medium. The number of survival cells in serum-free medium increased after the surface of dishes was treated with fibronectin, however, no changes of the number of embryonic bodies were found. Conclusion Murine embryonic stem cells can be differentiated into neural precursor cells in ITSF and N_2 media. In medium N_2 combined with fibronectin, the survival of neural precursor cells can be increased.

Key words: embryonic stem cell; neural precursor cell; cell differentiation; fibronectin; mouse

胚胎干细胞(Embryonic stem cells, ESc)来源于早期胚胎内细胞团,可在体外培养并保持分化全能性,能分化成心肌、造血细胞和神经细胞等各种类型的细胞。1981年Evan[1]首先建立小鼠ES细胞系后,相继建立了金黄地鼠、大鼠、鸡、兔、猪和猴的ES细胞系[2]。在ES细胞诱导为神经细胞的研究中,较早采用全反式维甲酸(Retinoic acid, RA)诱导,但RA诱导得到的是神经元和神经胶质细胞,缺少增殖和分化能力,其可塑性和与移植部位的整合都不如神经前体细胞(Neural precursor cells, NPC)[3]。NPC泛指神经干细胞和神经祖先细胞,它能表达神经前体细胞的标志——巢蛋白(Nestin)[4]。

1996年Okabe等[4]提出的无血清培养法可诱导ES细胞为较高纯度的NPC。NPC既具有增殖分化潜能,又没有ES细胞生成畸胎瘤的危险,是较好的神经移植材料。无血清的体外培养体系较之RA方法更接近于胚胎正常发育过程。国外已采用无血清培养,将来源于小鼠ES细胞的NPC诱导为A_2B_5阳性的神经胶质祖先细胞,并用于髓鞘缺陷幼鼠的移植,结果移植细胞成功地生成了髓鞘[5]。用无血清培养法由ES细胞诱导神经前体细胞,国内还未见相应的报道。为此,本实验比较了细菌培养皿法和悬滴法培养胚体,ITSF和N_2诱导小鼠

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39900169、30070727、30100087);全军"十五"青年基金资助项目(01Q099);重庆市应用基础基金资助项目(2001)
作者简介:徐海伟(1972-),男,江苏省江阴市人,博士,讲师,主要从事褪黑素的神经保护作用及机制方面的研究,发表论文9篇。电话:(023)68752254
收稿日期:2002-10-08;修回日期:2002-12-21

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

胚胎干细胞为神经前体细胞方法的效果，并观察纤维连接蛋白对神经前体细胞存活、增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

ES 细胞株 MESPU13 从北大生命科学部引进。DMEM（高糖）、N-2 supplement、DMEM/F12（GIBCO），胎牛血清（Hyclone），β-巯基乙醇、胰岛素、转铁蛋白、硒化钠、纤维连接蛋白、多聚鸟氨酸（Sigma），Nestin 抗体（PharMingen），二抗和三抗（Zymed），DAB 显色试剂盒（武汉博士德）。

1.2 小鼠胚胎干细胞的培养

1.2.1 人胚胎成纤维细胞（HEF）的培养和饲养层的制备 冻存的 HEF 细胞一支快速复温后加入 8 倍体积的 DMEM 培养液，离心弃上清，加入含 7.5% FCS 的 DMEM 培养基中，37℃，5% CO_2 培养，胰酶/EDTA 消化传代。当 HEF 长到 90% 融合时，加入 10 μmol/L 的丝裂霉素-C 处理 160 min，PBS 漂洗 5 次备用。

1.2.2 小鼠 ES 细胞的复苏、培养和传代 冻存的 ES 细胞在 38℃水浴快速复温，加入 8 倍体积的 DMEM 培养液，离心（1 000 r/min）5 min，弃上清，加入 ES 培养液（DMEM 培养基，15% FCS，100 μmol/Lβ-巯基乙醇，1 000 U/ml LIF）。悬浮成单细胞，再移至经丝裂霉素-C 处理的饲养层细胞上，补加培养液，置 5% CO_2 的 37℃培养箱中培养。每天换液，长满后按 1∶3 传代。

1.3 胚体的培养

1.3.1 细菌培养皿培养 将培养的 ES 细胞用胰酶/EDTA 消化，吹打成单细胞悬液后以 1.5×10^5/个培养皿的细胞密度加入细菌培养皿（直径 7 cm），培养于含 10% FCS，100 μmol/Lβ-巯基乙醇的 DMEM 培养基中，37℃，5% CO_2 培养。

1.3.2 悬滴法 ES 细胞消化，吹打成单细胞，离心后用含 10% FCS，100 μmol/Lβ－巯基乙醇的 DMEM 培养基调整 ES 细胞密度为 1×10^3/ml。以液滴的形式滴加在培养皿的盖子上，培养皿中加入 PBS 保持湿度，37℃，5% CO_2 培养。

1.3.3 胚体的贴壁方式 消化后贴壁：收集第 4 天的胚体于离心管中，1 000 r/min 离心 5 min，加入 0.05% 胰酶，轻轻吹散，37℃消化 2 min，加入 10% FCS 培养基终止反应，吹打后移入组织培养皿中。完整胚体贴壁：收集第 4 天的胚体于离心管中，1 000 r/min 离心 5 min，调整胚体密度后移入组织培养皿中。

1.4 由胚体向神经前体细胞分化的培养

1.4.1 ITSF 培养基培养 将第 4 天的胚体转入经纤维连接蛋白预处理的 6 孔板中，在 DMEM-10%FCS 中培养 24 h 以使其贴壁。然后换成含胰岛素（5 μg/ml）、转铁蛋白（50 μg/ml）、硒化钠（30 nmol/L）、纤维连接蛋白（5 μg/ml）的 DMEM/F12 培养液，每 2 d 换液一次。

1.4.2 N_2 培养基培养 将第 4 天的胚体转入经纤维连接蛋白预处理的 6 孔板中，在 DMEM-10%FCS 中培养 24 h 以使其贴壁。然后换成含 N-2 supplement、纤维连接蛋白（5 μg/ml）的 DMEM/F12 培养液，每 2 d 换液一次。

1.5 碱性磷酸酶染色

将载有生长良好的 HEF 和 ES 细胞的盖玻片用 4% 多聚甲醛固定 10 min，PBS 漂洗 5 min×3，TSM1、TSM2 中各漂洗 5 min×2，在盖破片上滴加适量的 NBT/BICP 显色液，室温避光显色 10～20 min。

1.6 免疫组化

用 4% 多聚甲醛固定细胞 10 min，0.2% Triton X-100 处理 10 min，5% 正常羊血清封闭 10 min，用 0.3% H_2O_2 封闭内源性过氧化物酶 10 min，加入 Nestin 一抗（1∶100）室温 1 h，4℃过夜，用 PBS 漂洗后，其余步骤按 ABC 方法常规操作。

1.7 统计学分析

采用 SPSS（Ver 10.0）中的 t 检验进行显著性分析。

2 结果

2.1 以 HEF 为饲养层培养的小鼠 ES 细胞形态观察及碱性磷酸酶鉴定

消化成单细胞的 ES 细胞传入 HEF 饲养层后 24 h，细胞已贴壁生长在饲养层细胞上，48 h 后集落细长、体积迅速增大，其长轴与 HEF 的纤维方向走行一致。与小鼠胚胎成纤维饲养层上培养的 ES 集落一样，呈集落突起状生长，克隆周边清楚，细胞小，排列紧密，界限清楚，生长旺盛。在 HEF 饲养层上培养的 ES 细胞经碱性磷酸酶染色为阳性，ES 集落周围的 HEF 细胞完全不着色，见图 1A。

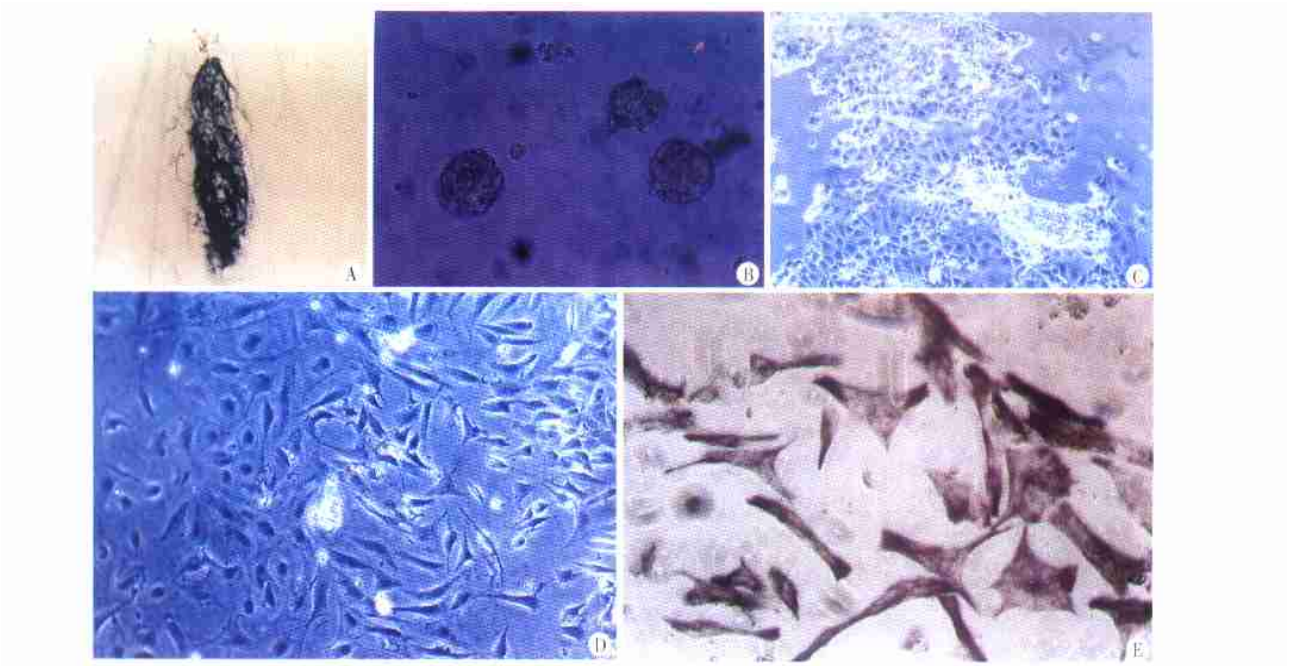
2.2 胚体的形成

去除饲养层和 LIF，ES 细胞在含β-巯基乙醇（100 μmol/L）的 DMEM-10%FCS 的细菌培养皿中或悬滴法悬浮培养，第 2 天，单细胞分裂生长为由数个细胞组成的细胞团，体积小。第 3 天，细胞继续生长，体积增大数倍。培养至第 4 天，体积进一步增大，形成由上百个细胞组成的胚体，其形态基本为圆球形，表面不光滑，光镜下见多个细胞突起，见图 1B。在倒挂的悬滴中，ES 细胞分裂、生长，呈球形。体积逐渐增大，其生长和形态与细菌培养皿法无明显差别。

2.3 由胚体诱导神经前体细胞

胚体贴壁后，胚体边缘部位的细胞为单层上皮样形态，中心部位为多层细胞。更换成无血清选择性培养基 ITSF 或 N_2 后培养 24 h，多层细胞覆盖的部位大多变为单层，单层细胞死亡不明显，贴壁细胞形态无变化，见图 1C。48 h 后，细胞大量死亡，从底壁脱落，贴壁细胞形态大部分发生变化，少部分细胞仍为上皮样。72 h 后观察，仍有死细胞漂浮，存活的细胞形态多数为细长形，无上皮样形态的细胞存在，见图 1D。96 h 观察，细胞无明显死亡。取第 5 天的细胞作 Nestin 免疫组化染色，86% 的细胞为阳性细胞，阳性细胞形态以细长形居多，有少数呈三角形和不规则形，细长和三角形细胞着色最深，多角形片状细胞染色较浅，见图 1E，对照完全不着色。ITSF 或 N_2 无血清培养基对小鼠的神经诱导作用无明显差异。

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



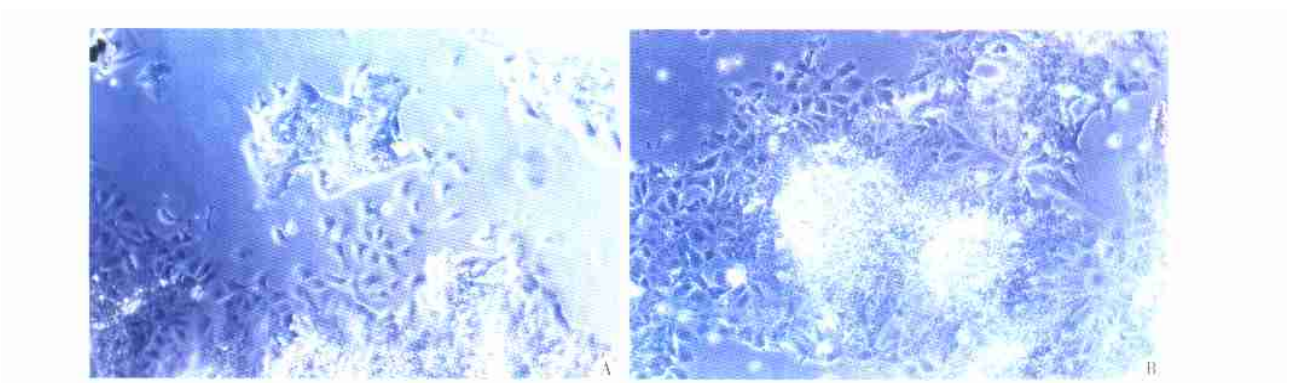
A: Murine embryonic stem cells were cultured on the feeder of human embryonic fibroblast (alkaline phosphatase-positive, NBT/BCIP stained× 50); B: Embryonic bodies produced in the bacterial dishes(× 50); C: The shape of the cells 24 h after attachment of embryonic bodies(× 100); D: The shape of the cells 72 h after attachment of embryonic bodies(× 160); E: The Nestin immunocytochemistry staining of the cells 5 d after attachment of embryonic bodies(DAB-H_2O_2 Stained× 200)

图 1　小鼠胚胎干细胞的培养及向神经前体细胞的诱导

Fig 1　Culturing of murine embryonic stem cell and its neuronal differeniation

2.4　纤维连接蛋白对神经诱导的影响

用纤维连接蛋白预处理培养表面, 对胚体的贴壁情况影响不大, 但能使无血清培养后存活的细胞增多。在 N_2 培养基中添加纤维连接蛋白(5 μg/ml), 72 h 后存活细胞增多, 见图 2。在无血清培养基中添加刀豆胰蛋白酶抑制剂(Soybean trypsin inhibitor)或β-巯基乙醇(100 μmol/L)对存活细胞数量无明显影响。



A: Without fibronectin; B: Treated with fibronectin

图 2　纤维连接蛋白促进贴壁 **72 h** 后 N_2 无血清培养细胞的存活　(× 160)

Fig 2　Fibronectin promoted the survival of cells 72 h after attachment in the N_2 serum-free media　(× 160)

3　讨论

ES 细胞自身的特点决定了它可以作为神经移植材料的理想来源。通过无血清培养的途径可以获得较高纯度的神经前体细胞, 由它分化的神经元符合成熟的有功能神经元的标准: 如能形成轴突、树突等神经元特殊结构并形成突触联系; 表达各种神经递质及其受体; 具有激活谷氨酸受体的信号通路的能力。这些神经前体细胞具有双向分化潜能, 除向神经元分化外, 还能在体外分化为胶质祖先细胞, 移植后形成结构正常的髓鞘。采用无血清途径获得的神经前体细胞在 bFGF 存在条件下, 可以大量扩增, Hancock 等[6] 用含 10%

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

DMSO 的无血清培养基将扩增的神经前体细胞冻存在－80 ℃, 复苏后这些细胞仍然具备分化成神经元和胶质细胞的能力。总之, 在 ES 细胞的神经移植研究中, 无血清的途径受到广泛的采用, 并已在神经移植研究中获得初步成功。

胚体的培养是 ES 细胞分化的第一步。悬滴法中 ES 细胞在倒挂的液滴中生长, 由于重力的作用, 胚体不可能贴壁, 培养的胚体始终保持球形。采用悬滴法的缺陷是制备的胚体数量有限, 不适合大规模的培养。采用不粘附细胞的细菌培养皿培养胚体操作简单, 培养一次可以获得大量的胚体。

在胚体的贴壁方式上, 比较了将完整的胚体直接贴壁培养以及胚体用胰酶消化后再贴壁培养两种方法, 在其它培养条件相同的情况下, 前一种方法得到的神经前体细胞明显多于后者。可能在完整的胚体贴壁的 24 h 内有神经前体细胞的生长, 或者有细胞进一步向神经前体细胞分化。消化成单细胞后不利于这个过程。

Okabe 的研究表明, 在 ITSF 培养基的 4 种成分中, 转铁蛋白和纤维连接蛋白对促进细胞存活是普遍效应, 胰岛素对 Nestin 阳性细胞的存活有特异效应。在胚体贴壁前, 用纤维连接蛋白处理培养表面, 无论是采用含 ITSF 的培养基, 还是 N_2 的培养基, 纤维连接蛋白的预处理都能增加 NPC 的数量。由于 N_2 添加剂中缺少纤维连接蛋白成分, 在使用 N_2 培养时, 在培养液中补加纤维连接蛋白也能增加 NPC 的数量。

ES 细胞向 NPC 的体外分化不需要特殊的细胞因子, 这与 ES 细胞向其它类型细胞的分化不同。ES 细胞在体外向造血细胞的分化需要特殊的细胞因子 SCF 或 IL-6[7], 分化成 $Flk1^+$ 的血管祖先细胞需要血管内皮生长因子和血小板源性生长因子[8]。ITSF 和 N_2 培养基不含任何"神经诱导因子"却被作为神经前体细胞选择性生长的培养基。现在认为, 这是由于神经的发生是由外胚层的"内定"机制所引导[9,10], 这一神经发生机制被 BMP-4 所抑制, 而当 BMP-4 的作用被 noggin 或 chordin 阻断时, 神经发生则得以进行[11]。

参考文献:

[1] Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos[J]. Nature, 1981, 292(1): 154－157.

[2] Thomson J A, Kalishman J, Golos C G, *et al*. Isolation of a primate embryonic stem cell line[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(12): 7844－7848.

[3] Gottlieb D I, Huettner J E. An *in vitro* pathway from embryonic stem cells to neurons and glia[J]. Cells Tissues Organs, 1999, 165(1): 165－172.

[4] Okabe S, Forsberg N 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.

[5] 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.

[6] Hancock C R, Wetherington J P, Lambert N A, *et al*. Neuronal differentiation of cryopreserved neural progenitor cells derived from mouse embryonic stem cells[J]. Biochem Biophy Res Commun, 2000, 271(2): 418－421.

[7] Xu L, Qiao C P, Huang S L, *et al*. Induction of embryonic stem cells to hematopoietic cells *in vitro*[J]. Chin Sci Bull, 2000, 45(8): 815－820.

[8] Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, *et al*. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular proginitors[J]. Nature, 2000, 408(6808): 92－96.

[9] Gratacos E, Checa N, Alberch J. Bone morphogenetic protein-2, but not bone morphogenetic protein-7, promotes dendritic growth and calbindin phenotype in cultured rat striatal neurons[J]. Neuroscience, 2001, 104(3): 783－790.

[10] Stull N D, Jung J W, Iacovitti L. Induction of a dopaminergic phenotype in cultured striatal neurons by bone morphogenetic proteins[J]. Developmental Brain Res, 2001, 130(1): 91－98.

[11] Hemmati-Brivanlou A, Melton D. Vertebrate embryonic cells will become nerve cells unless told otherwise[J]. Cell, 1997, 88(1): 13－17.

(编辑 郭建秀)

(上接 196 页)

病长期控制的良好指标[2]。

测定糖化血红蛋白方法有多种。以前常规是离子交换层析法, 该方法要严格控制标本用量和试验的温度, 试验条件要求高。电泳法能分离和定量 HbA1c, 但操作繁琐, 需用特殊设备。比色法用于自动生化学分析仪, 但要选择稳定、准确的标准液不易, 且耗时及样品用量大。最新的亲和层析法快速, 但需用特殊设备。这些方法因诸多原因, 临床使用不便, 不适用于常规检测。

免疫抑制比浊法是目前较理想的方法。原理为在第一步反应中, 样品的 HbA1c 与抗 HbA1c 抗体反应形成抗原抗体复合物, HbA1c 特异性抗原决定簇仅与β 链发生一次反应形成聚合物, 因此抗原抗体复合物只形成一次。再加入载有数个 HbA1c 抗原决定簇的多簇半抗原, 该分子与第一步反应中的过剩抗体反应形成不溶性的三维免疫复合物, 在 340 nm 测量其浊度, 如果样品中 HbA1c 浓度增高, 则不溶性的三维免疫复合物的形成减少, 浊度下降[3]。该法最大的优点为高度的特异性, 保证了结果的准确性, 且样品用量少, 快速省时, 适用于临床大量的常规检测。

随着生活水平提高, 近年来糖尿病发病率逐年增高, 如何运用有效方法监控糖尿病的治疗效果是今后医学界关注的问题。

关键词: 糖化血红蛋白; 免疫抑制; 糖尿病

中图法分类号: R446.61 文献标识码: B

参考文献:

[1] 沈克勤, 杨俊伟. 糖基化终产物与血管病变及糖尿病肾病[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 1996, (6): 51.

[2] Tzamaloukas A H. The use of glycosylated hemoglobin in dialysis patients [J]. Semin Dialy, 1998, 11(3): 141.

[3] Jarausch J, Lotz J, Hafner G, *et al*. Reference values for the Tina-quant HbA1c Assay[J]. Clin Chem, 1996, 42(2): 116.

(编辑 陈聪连)

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