DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.01.003
第25卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 1
4 2003年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)01-0004-03

胎牛血清对人胚胎神经干细胞分化的影响

李 巍,李成仁,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 探索胎牛血清对人神经干细胞(NSCs)的影响。方法 采用细胞培养、免疫组化、流式细胞仪检测的方法,观察了不同浓度胎牛血清对人NSC分化的影响。结果 胎牛血清促进人NSC分化为神经系统的主要的3种细胞(神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞),且培养基中胎牛血清浓度为15%时,人NSC分化为星形胶质细胞的数量占80%~90%。结论 胎牛血清影响人NSC分化为神经元和神经胶质细胞的比例,并与胎牛血清的浓度有一定的关系。

关键词:神经干细胞;胎牛血清;人
中图法分类号:R392.7;R329.28;R322.8 文献标识码:A

Effects of fetal bovine serum on differentiation of human fetal neural stem cells *in vitro*

LI Wei, LI Cheng-ren, CAI Wen-qin, YAO Zhong-xiang (Department of Histology and Embryology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To observe the effects of fetal bovine serum (FBS) on differentiation of human neural stem cells (NSCs). **Methods** The effects of FBS with different concentrations on differentiation of human fetal NSCs were observed by cell culture, immunocytochemistry and flow cytometry. **Results** Human fetal NSCs could be induced to differentiate mainly three types of nerve system cells (neuron, astrocyte and oligodentrocyte). There were 80%~90% astrocytes of differentiated cells from human fetal NSCs with the concentration of 15% FBS induced. **Conclusion** Concentration-dependent FBS in culture medium may have effect on the ratio of neurons to glial cells differentiated from human NSCs *in vitro*.

Key words: neural stem cell; fetal bovine serum; human

随着神经干细胞的分离、培养成功,探索神经干细胞的增殖、分化机制,成为人们关注的焦点。首先,它将为阐明神经系统发育机制提供有力证据;其次,为神经干细胞的应用,提供更有价值的资料。许多退行性疾病、缺血、损伤等均有神经元的大量丢失。若能离体或在体诱导神经干细胞向神经元方向分化,提供相对于各种疾病的神经细胞,将成为治疗疾病的理想材料。目前已知,细胞因子、生长因子以及周围环境等因素的作用可诱导神经干细胞向不同的终末神经细胞分化,如睫状神经生长因子(Ciliary neurotrophic factor, CNTF)诱导神经干细胞向神经元方向分化[1];脑源性生长因子(Brain-derived neurotrophic factor, BDNF)和神经营养素3(Neurotrophic-3, NT-3)使其更多地分化为神经元[2];骨形成蛋白(Bone morphogenetic protein, BMP)可诱导神经干细胞向胶质细胞分化[3]。本实验利用分离培养第5代的人胚胎神经干细胞,用不同浓度的胎牛血清在培养条件下诱导神经干细胞分化,了解神经干细胞分化为神经元和神经胶质细胞的比例,为神经干细胞的定向分化,提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 分组

培养第5代的人胚胎神经干细胞分成4组:无血清培养组,5%胎牛血清组,10%胎牛血清组,15%胎牛血清组,每组的基础培养基均为DMEM/F12(Gibco公司),胎牛血清(Gibco公司)。

1.2 用于光镜免疫组化检测的诱导分化实验

将每组的神经干细胞分别置入(预先放有涂有多聚赖氨酸的盖玻片)35 mm培养皿中,1.5~2 ml培养液/皿,50~100个细胞集落/ml,培养7 d后收集各组贴有细胞的盖玻片,用4%多聚甲醛加3%饱和苦味酸固定液固定8~12 h后,行NF-200和GFAP免疫组化染色(常规免疫组化染色步骤),光镜观察。

1.3 用于流式细胞仪检测的诱导分化实验

将每组的神经干细胞分别置入50 ml培养瓶中,5~6 ml培养基/瓶,200~300个细胞集落/ml,培养7 d后,用0.25%胰酶

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30130110)
作者简介:李 巍(1964-),女,四川省双流县人,博士,实验师,主要从事神经发育和再生方面的研究。电话:(023)68752229
通信作者:蔡文琴,电话:(023)68752233,E-mail:wenqin@public.cta.cq.cn
收稿日期:2002-09-10;修回日期:2002-12-10

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

消化 20～30 min, 并用吸管反复吹打细胞使之脱落, 收集分化细胞于 10 ml 离心管中离心 5～10 min, 收集细胞用 4%多聚甲醛加3%饱和苦味酸固定液固定 8～12 h 后, 行 NF-200 和 GFAP 免疫荧光染色(常规免疫组化染色), 流式细胞仪检测, 数据采用SPSS 软件包进行统计学处理, 计算分化细胞的百分率(%), 并进行组间 χ^2 检验。

2　结果

2.1　相差显微镜下观察和免疫组化结果

在相差显微镜下, 未分化的神经干细胞呈集落样悬浮生长见图 1, 培养基中去除碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)以后, 有血清组神经干细胞很快贴壁(约 4 h), 而无血清培养组细胞贴壁则相对较慢, 培养 12 h 以后各组均见有贴壁的细胞, 并有突起长出。培养过程中可见有血清培养组的细胞长得很快、数量较多, 并可见到 3 种类型的细胞, 见图 2: ① 具有一个或两个突起、突起较长, 折光性很好, 细胞核圆形或椭圆形的神经元样细胞。② 具有多个粗、长突起, 细胞较大, 紧贴底部的星形胶质细胞。③ 具有多个细胞突起, 突起有分枝的少突胶质细胞, 此种细胞常成群分布在神经干细胞分化所形成放射状分化细胞团的周边。

用 SABC-硫酸镍铵增强法, 更进一步地证实了我们的以上观察, 即, 有 1～2 个长突起的, 折光性很强的为 NF-200 阳性神经元, 见图 3; 细胞较大、突起粗大, 细胞平贴在盖玻片上的为 GFAP 阳性星形胶质细胞, 见图 4; 细胞突起细、短、胞体体积较小的为少突胶质细胞。

2.2　流式细胞仪检测结果

流式细胞仪检测结果提示: 胎牛血清对神经干细胞的分化有非常明显的影响, 培养基中胎牛血清的浓度越高, 神经干细胞向胶质细胞方向分化的趋势越大, 在含 15%胎牛血清的培养液中, 神经干细胞所分化的细胞中, 80%～90%为 GFAP 阳性星形胶质细胞, 而在无血清培养基中, 却有 50%～60%的神经干细胞分化为NF-200 阳性神经元, 见图 5。

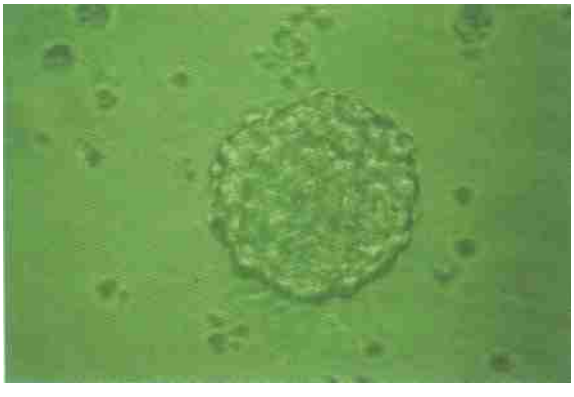


图 1　人神经干细胞集落　(第 5 代, 相差显微镜× 200)

Fig 1　A colony of human fetal NSCs (fifth generation, under the phase contrast light microscopy× 200)



图 2　10% FBS 诱导人神经干细胞分化 7 d　(相差显微镜× 200)

Fig 2　Differentiated cells from human fetal NSCs with 10% FBS induced at 7th day (under the phase contrast light microscopy× 200)

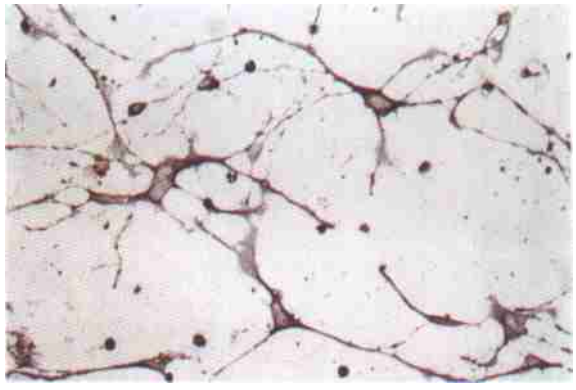


图 3　5% FBS 诱导人神经干细胞分化 14 d 后, NF-200 免疫组化阳性反应细胞　(SABC-硫酸镍铵增强法× 200)

Fig 3　After 14 days of differentiation of HNSCs with 5% FBS induced, NF-200 immunopositve cells (SABC-Nickel ammonium sulfate enhancement× 200)

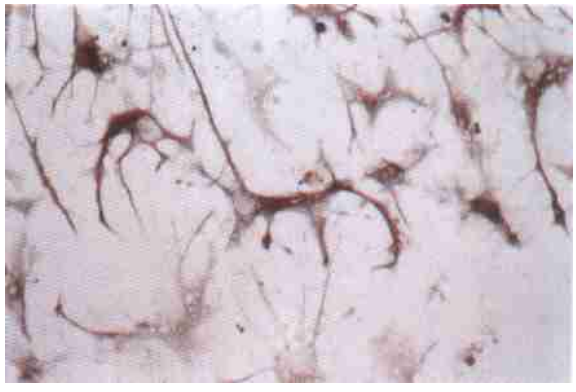


图 4　5% FBS 诱导人神经干细胞分化 14 d 后, GFAP 免疫组化阳性反应细胞　(SABC-硫酸镍铵增强法×400)

Fig 4　After 14 days of differentiation of HNSCs with 5% FBS induced, GFAP immunopositve cells (SABC-Nickel ammonium sulfate enhancedment× 400)

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

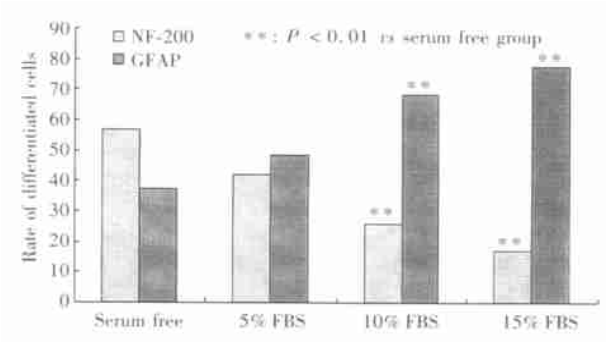


图5 胎牛血清对神经干细胞分化的影响(%)

Fig 5 Effects of fetal bovine serum on differentiation of NSCs (%)

3 讨论

神经干细胞的分化受到许多因素的影响,目前认为神经营养因子、生长因子、细胞粘附因子、周围环境等均可影响神经干细胞的分化。但其确切机制仍不清楚。探索神经干细胞的分化机制,以便使其向着人们所需要的方向分化,更好地为患者服务。

3.1 神经干细胞的自行分化

有资料显示:将丝裂原从神经干细胞培养液中撤除后,NSC 即进入分化阶段。其中 EGF 反应性干细胞绝大多数分化为胶质细胞,分化为神经元的比例不足 1 %,随传代数目增加,这个比例还将进一步下降[4];有人从胚龄 16 d 的大鼠海马取出的多能干细胞体外 bFGF 扩增后,发现 bFGF 神经干细胞则更多分化为神经元表型祖细胞[5,6]。研究者将这一现象称为"缺席分化(Default differentiation)",其机制不清。有趣的是,许多研究已证实正常胚胎发育过程中 bFGF 反应性干细胞早于 EGF 反应性干细胞出现,而神经元发生恰恰早于胶质细胞发生。以上两种现象间可能存在某种必然联系。本实验用的是 bFGF 作为有丝分裂原培养的人胚胎神经干细胞,在去除 bFGF 后,神经干细胞自行分化,从免疫组化和流式细胞仪检测结果看,神经干细胞自行分化成神经元的比例较高,达到 56.89±3.17。与以上报道结果基本一致。

3.2 牛血清对神经干细胞分化的影响

去除有丝分裂原后,在培养基中加入不同浓度的胎牛血清,发现胎牛血清的含量对神经干细胞分化的影响很大,且有一定的倾向性,即胎牛血清含量越高,分化成胶质细胞的比例增大,血清浓度在 15%时,星形胶质细胞达到 87.71±2.58。这一结果与刘士勇等[7]报道基本相似。胎牛血清的成分十分复杂,包括一些对细胞的增殖、分化具有重要作用的已知细胞因子和未知因子,可能是导致神经干细胞更多地分化为胶质细胞的影响因素。已知的因子包括神经营养因子、生长因子、细胞粘附分子以及其它具有营养作用的细胞因子,如神经生长因子、白介素-1、维甲酸等,未知的因子目前尚知之甚少,如一些存在于细胞条件培养液的因子[8]。因此,是何种单一因子或是多种因子联合作用,导致人胚胎神经干细胞的分化差异,还有待进一步研究。

参考文献:

[1] Johe K K, Hazel T G, Muller T, *et al*. Single factor direct the differentiation of stem cell from the fetal and adult central nervous system[J]. Genes Dev, 1996, 10(24): 3129—3140.

[2] Ghosh A, Greenberg M E. Distinct roles for bFGF and NT-3 in the regulation of cortical neurogenesis[J]. Neuron, 1995, 15(1): 89—103.

[3] Bartlett P F, Brooker G J, Faux C H, *et al*. Regulation of neural stem cell differentiation in the forebrain[J]. Immunol Cell Biol, 1998, 76(5): 414—418.

[4] Gage F H, Ray J, Fisher L J. Isolation, characterization and use of stem cells from the CNS[J]. Ann Rev Neurosci, 1995, 18: 159—192.

[5] Takahashi T, Palmer T D, Gage F H. Retinoitic acid and neurotrophins collaborater to regulate neurogenesis in adult derived neural stem cell cultures [J]. J Neurobiol, 1999, 38(1): 65—81.

[6] Tatebayashi Y, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Dynamic regulation of expression and phosphorylation of tau by fibroblast growth factor-2 in neural progenitor cells from adult rat hippocampus[J]. J Neurosci, 1999, 19(13): 5245—5254.

[7] 刘士勇, 张可成, 杨 辉 等. IL-1β 和胎牛血清对大鼠神经干细胞分化的影响[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2000, 9(4): 432—435.

[8] Lundberg C, Martinez-Serrano A, Cattaneo E, *et al*. Survival integration and diffentiation of neural stem cell lines after transplantiation to the adult rat striatum[J]. Exp Neurol, 1997, 145(2 Pt 1): 260—342.

(编辑 冯崇英)

(上接 3 页)

关键词: 坏疽性脓皮病; 诊断

中图法分类号: R753 文献标识码: B

参考文献:

[1] Bennett M L, Jackson J M, Jorizzo J L, *et al*. Pyoderma gangrenosum: A comparison of typical and atypical forms with an emphasis on time to remission Case review of 86 patients from 2 institutions[J]. Medicine (Baltimore) 2000, 79(1): 37—46

[2] Riahi I, Mokni M, Haouet S, *et al*. Pyoderma gangrenosum: 15 cases[J]. Ann Med Interne (Paris), 2001, 152(1): 3—9

[3] Delbrel X, Germain P, Fach J, *et al*. Cutaneous pyoderma gangrenosum with hepatosplenic localization and monoclonal gammapathy. A case report [J]. Ann Med Interne (Paris), 2001, 152(1): 65—67.

(编辑 王 红)

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