DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.12.018
第23卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 12
2001年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2001

文章编号:1000-5404(2001)12-1425-03

论著

大鼠神经干细胞分离培养及基因转染研究

李 巍,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 建立基因工程化神经干细胞以便为生物医学应用提供材料。方法 ① 分离、培养胚鼠端脑神经干细胞,并用巢素(Nestin)免疫组化染色鉴定;诱导神经干细胞分化,用神经丝-200(NF-200)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)免疫组化染色鉴定分化细胞。②用含有脑源性神经营养因子(BDNF)的复制缺陷型腺病毒感染神经干细胞,并用原位杂交检测。结果 ① 获得了大量未分化、呈巢状悬浮生长的神经干细胞团,且能分化为神经元和神经胶质细胞。② 约80%~90%神经干细胞能被腺病毒感染,且经传代培养12代后仍具干细胞特性。结论 从胚鼠端脑分离培养的细胞具有自我更新能力和多潜能分化能力,为中枢神经系统的干细胞。经基因工程化及传代后,仍具干细胞特性,可作为基础研究及神经移植供体,具有广阔应用前景。

关键词:神经干细胞;基因工程;细胞培养
中图法分类号:R322.8;R-332 文献标识码:A

Isolation, culture and transfection of neural stem cells from fetal rat telencephalon

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

Abstract: **Objective** To establish the genetically engineered neural stem cells(NSCs) for further biomedical applications. **Methods** ① After isolated from fetal rat telencephalon and identified with nestin immunocytochemical staining, NSCs were induced to differentiate. The differentiated cells were detected respectively with neurofinament (NF-200) and glial fibrillary acidic protein(GFAP) immunocytochemical staining. ② Recombinant brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-adenovirus was used to infect the obtained cells and the results were identified with in situ hybridization. **Results** ① Nest-like clusters of neural stem cells were obtained in the suspension and the cells could be differentiated into neurons and astrocytes. ② About 80%-90% of NSCs were infected by recombinant BDNF-adenovirus, which retaining the main characteristics of NSCs after 12 passages of culture. **Conclusion** The cells from fetal rat telencephalon possess multipotency and self-renew ability and is believed to be BSCs of the central nervous system. Since they retain their characteristics and differentiation ability after passages and genetic engineering, they can be applied widely in basic research and as grafts in neural transplantation.

Key words: neural stem cells; genetic engineering; cell culture

自从90年代初科学家们分离、培养出神经干细胞以来,人们相继从各种动物及人的中枢神经系统内分离、培养了神经干细胞[1,2],因其具有很强的分裂、增殖及自我更新能力,打破了传统观点认为中枢神经系统细胞不能再生的观念,为中枢神经系统损伤修复及某些疾病的治疗带了新的希望。随着基因工程技术的发展,人们可根据不同的科研及治疗目的,对神经干细胞进行不同的遗传学修饰、以制成基因工程细胞,这些细胞极具科研和应用价值,受到广泛关注。本实验利用细胞培养、基因转染、免疫组化及原位杂交等技术,分离培养了大鼠神经干细胞,并对其进行基因修饰,建立了基因工程化的神经干细胞,以期为神经干细胞的基础研究和中枢神经损伤修复及疾病治疗提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 试剂

DMEM/F_{12}、B_{27}均购自Gibco公司;bFGF、NF-200抗体、GFAP抗体、Nestin抗体均购自Sigma公司,复制缺陷型腺病毒(由胡川闵博士赠送),BDNF载体(由英国皇家医学院柏学农赠送)。

1.2 材料

1.2.1 神经干细胞的分离培养 Wistar成年大鼠,约200~250 g/只,雌雄合笼后,检查阴栓,见阴栓后,计为E0 d,至E10.5 d,将动物麻醉后,常规碘酒、酒精消毒皮肤,打开腹腔,暴露两侧子宫,用眼科镊钳住子宫头端,顺子宫分离至子宫角处剪下,放入培养皿中,依次去除子宫壁及胎膜,在解剖显微镜下仔细分离获得胎鼠端脑,再用D-Hanks液漂洗,用手术刀反复切割组织,再用200目细胞筛过滤,去除血管、结缔组织和组织块,收集入小管中,再反复吹打,制成单细胞悬液,经细胞计数后,分装入50 ml培养瓶中,细胞数约为1×10^6/ml,培养条件:6 ml DMEM/F_{12}+120 μl B_{27}+12 μl bFGF,37 ℃,5% CO_2,每6.7 d传代1次。

1.2.2 神经干细胞的诱导分化 取少量培养的神经干细胞,置入装有0.1%多聚赖氨酸处理过盖玻片的3.5 cm培养皿中,培养条件为:1.5 ml DMEM/F_{12}+30 μl B_{27},37 ℃,5% CO_2,培养12 d后收获细胞。

1.2.3 基因工程化神经干细胞的培养及诱导分化 取1瓶1.2.1中培养的神经干细胞,加入含BDNF复制缺陷型腺病毒(200 pfu/细胞)感染生长旺盛的神经干细胞,2 d后加入G418(600 μg/ml),继续培养,6.7 d后收集细胞,取少量作诱导分化实验,方法同1.2.2。

作者简介:李巍(1964-),女,四川省双流县人,博士研究生,实验师,主要从事神经发育和再生研究,发表论文10余篇。电话:(023)68752229
收稿日期:2001-03-18;修回日期:2001-06-30

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

1.3 方法

1.3.1 SABC-Cy3标记免疫荧光法检测Nestin免疫反应阳性神经干细胞 将悬浮培养的细胞团用4%多聚甲醛+3%饱和苦味酸固定后涂在载玻片上，烤干，10 mmol/L洗3次，5 min/次，操作方法由博士德试剂公司提供。

1.3.2 SABC-硫酸镍胺增强法检测NF-200免疫反应阳性神经元和GFAP免疫反应阳性神经胶质细胞 取1.2.2和1.2.3诱导分化的细胞盖片，用4%多聚甲醛+3%饱和苦味酸固定20 min后，10 mmol/L洗3次，5 min/次，操作方法由博士德试剂公司提供。

1.3.3 原位杂交，BDNFcRNA探针检测基因工程化神经干细胞 取少量由1.2.3收获的复制缺陷型腺病毒感染的神经干细胞，用4%多聚甲醛+3%饱和苦味酸固定20 min后，涂布在载玻片上，烤干，0.1 mol/L洗3次，5 min/次；0.4% Triton-X-100，37 ℃，30 min；0.1 mol/L洗3次，5 min/次；0.125%醋酸酐处理，室温，15 min；2× SSC洗1次，10 min；BDNFcRNA(0.5～5 μg/ml)探针杂交，43 ℃水浴，16 h；4× SSC洗1次；10 min；20 μg/ml RAN酶处理37 ℃，30 min；1× SSC，0.5× SSC分别洗1次；10 min/次；50 mmol/L PBS洗2次，10 min/次；地高辛精标记抗地高辛精抗体孵育(1∶1 000)，37 ℃，2～4 h；50 mmol/LPBS洗2次；TSM_1洗2次，10 min/次；TSM_2洗2次，10 min/次；NBT∶BICP显色，暗处，室温2～5 h。

2 结果

2.1 大鼠神经干细胞的分离、培养及鉴定

由胚10.5 d端脑分离，培养的细胞，经6～7 d无血清加bFGF培养后，细胞呈团状集落，且悬浮生长，细胞生长很快、活性很好见图1。细胞集落中的细胞数目，有数十、甚至数百个细胞不等。原代培养时，培养瓶中可见一些细胞碎片和一些贴壁的杂细胞但经传代后，这些杂质均减少甚至消失，细胞集落传12代以上仍具干细胞特性、且生长状态良好。神经干细胞经Nestin免疫荧光Cy3染色后，呈鲜红色强荧光见图2。无血清培养诱导分化后，细胞团2～4 h开始贴壁，分化的细胞贴壁，并由神经干细胞团发出呈放射状生长的细胞见图3。分化的细胞有的为1～2个或多个突起的呈NF-200免疫染色阳性的神经元，见图4；有的为多突起的呈GFAP免疫染色阳性的星型胶质细胞见图5。

2.2 基因工程神经干细胞的培养及筛选

培养数代的神经干细胞，用含有BDNF的复制缺陷型腺病毒感染24 h后，经G418筛选，用BDNFcRNA探针行原位杂交染色，结果显示，有80%～90%左右的神经干细胞感染了含有BDNF的复制缺陷型腺病毒见图6，经诱导分化后，能分化成神经元、星型胶质细胞和少突胶质细胞。

目前，这些基因工程化神经干细胞，经传代培养12代后，能形成悬浮生长的仍具很强活性的细胞集落。

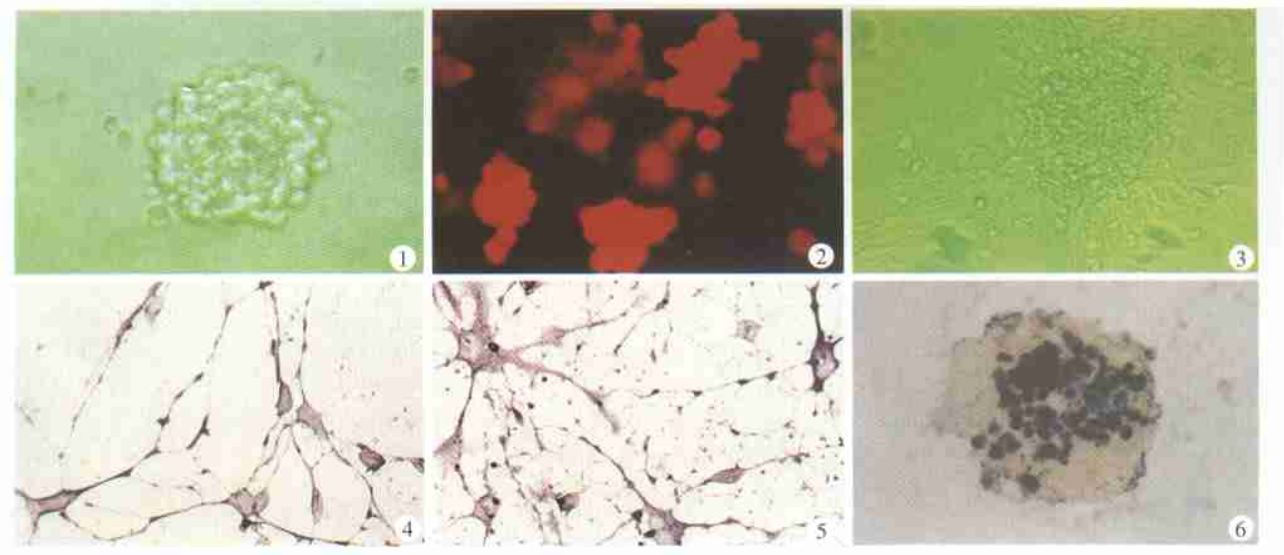


图1 大鼠神经干细胞集落，相差显微镜下 (×400)

Fig 1 Cluster of NSCs from fetal rat under a phase contrast microscope (×400)

图2 免疫组化(SABC-Cy3)，Nestin免疫反应阳性细胞 (×400)

Fig 2 Nestin-positive cells with SABC-Cy3 immnocytochemistry (×400)

图3 神经干细胞的分化(7 d)，相差显微镜下 (×400)

Fig 3 Differentiated NSCs 7 d after induction under a phase contrast microscope (×400)

图4 免疫组化(SABC-硫酸镍胺增强法)，NF-200免疫反应阳性细胞，分化12 d (×400)

Fig 4 NF-200-positive cells with SABC-Nickel ammonium sulfate staining 12 d after differentiation (×400)

图5 免疫组化(SABC-硫酸镍胺增强法)，GFAP免疫反应阳性细胞，分化12 d (×400)

Fig 5 GFAP-positive cells with SABC-Nickel ammonium sulfate staining 12 d after differentiation (×400)

图6 腺病毒感染神经干细胞团，BDNF mRNA阳性细胞 (×400)

Fig 6 BDNF mRNA positive cells after the infection of recombinant BDNF-adenovirus (×400)

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

3　讨论

3.1　神经干细胞的基本特性

自从 Davis[1] 和 Gage[3] 等提出神经干细胞及其概念以来, 各国科学家们纷纷对此进行研究和探索, 人们不仅在胚胎期的动物或人神经系统内分离, 纯化了神经干细胞, 而且在成年啮齿类动物或人的体内也相继发现了神经干细胞。

神经干细胞作为干细胞的一种, 它具有其它所有干细胞的基本特征: ①自我维持和自我更新能力; ②具有多种分化潜能, 具有分化为本系统大部分类型细胞的能力; ③增殖分裂能力; ④这种自我更新和分化潜能可以维持相当长的时间甚至终生; ⑤对损伤和疾病具有反应能力。本实验从 10.5 d 胚鼠端脑分离培养得来的细胞团, 在特定培养条件下, 具有很强的分裂、增殖及自我更新能力, 经传 12 代以上(> 2 月), 呈 Nestin 免疫反应阳性, 及经诱导分化后, 可分化为神经系统最主要的 3 种细胞, 即神经元, 星型胶质细胞和少突胶质细胞, 仍具神经干细胞的基本特征。以上证明, 我们分离、培养的细胞确为神经干细胞, 并与国内外文献报道[4,5] 基本一致。

3.2　基因工程化神经干细胞及应用前景

所谓基因工程细胞, 即在体外对供体细胞用基因重组技术导入或删除某一或某些基因以改变细胞的表型(包括生长特性、对毒物的抵抗力以及生产分泌某些治疗性蛋白)等, 即进行遗传修饰过的细胞。目前, 人们可以根据不同的目的, 对细胞进行遗传学修饰。对神经干细胞而言, 常用 myc、neu、p53、腺病毒, 逆转录病毒等等使神经干细胞永生化, 所形成的永生化细胞其性能就象细胞系, 无论在体外还是体内都非常稳定。这些细胞系作为植入和基因转移而使用有不少优点: ①它们能自我更新并能在培养中大量增殖; ②易于表达外源性基因; ③可被分离成单一的克隆, 从而更好地研究细胞的各种特征; ④为细胞移植提供丰富的供体资源。这种细胞可以长期培养或冻存, 对某些急性损伤的救治非常有利。

对中枢神经系统的损伤或病变部位实行细胞替代或基因治疗是目前极具发展前景和神经病学治疗战略, 对发育中或成年中枢神经系统内植入胚胎神经组织的一些实验已经证明, 某些部位的神经母细胞或分裂后的年幼神经元能够部分重建神经环路和功能[6]。Renfranz 等[7] 及 Snyder 等[8] 首先发现, 经过 tsA58 或 V-myc 永生化的神经干细胞系在移植到新生大、小鼠脑内特定部位后, 可以分化为神经元和胶质细胞, 且不形成肿瘤。Martinez-Serrano[9] 利用条件温度敏感性 HiB5 永生化细胞系建立高效(NGF)分泌细胞, 这种 NGF 分泌细胞在移植到被全切断穹隆的鼠纹状体及中隔, 仍能持续分泌 NGF, 并使 90%胆碱能神经元得到恢复。同时, 移植细胞能良好存在于脑组织中, 主要分化成胶质形态的细胞, 并与宿主脑组织整合而并未发生过度生长和产生肿瘤。因此, 将神经干细胞移植入受损脑组织不仅可以补充, 替代受损的神经组织, 而且还能将外源性基因导入, 使其在体内有效表达。因而神经干细胞对中枢神经系统的损伤修复及其它疾病的治疗有着广泛的应用前景。

本实验根据国外文献, 再结合本国的实际情况, 建立了由复制缺陷型腺病毒介导的能分泌 BDNF 的神经干细胞, 此细胞已培养近 12 代, 仍具干细胞特性且能分泌 BDNF, 希望能在今后的移植治疗中取得良好的结果, 为我国在这方面的基础研究奠定基础。

参考文献:

[1] Davis A A, Temple S. A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex[J]. Nature, 1994, 372(6503): 263—266.

[2] Villa A, Snyder E Y, Vescovi A, *et al*. Establishment and properties of a growth factor-dependent perpetual neural stem cell line from the human CNS [J]. Exp Neurol, 2000, 161(1): 67—84.

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

[4] 刘仕勇, 张可成, 杨　辉, 等. 成年大鼠纹状体区神经干细胞的分离培养[J]. 解剖学报, 2000, 31(1): 17—20.

[5] Kalyani A, Hobson K, Rao M S. Neuroepithelial stem cells from the embryonic spinal cord: Isolation, characterization and clonal analysis[J]. Developmental Biology, 1997, 186(2): 202—223.

[6] Kalb R G, Strittmatter S M. Neurobiology of spinal cord injury[M]. Totowa: New Jersey Humana Press INC, 2000. 80—94.

[7] Renfranz P J, Cunningham M G, McKar R D. Region-specific differentiation of the hippocampal stem cell line HiB5 upon implantation into the developing mammalian brain[J]. Cell, 1991, 66(4): 713—729.

[8] Snyder E Y, Deitcher D L, Walsh C, *et al*. Multipotent neural stem cell lines can engraft and participate in development of mouse cerebellum[J]. Cell, 1992, 68(1): 33—51.

[9] Martinez-Serrano A, Fischer W, Soderstrom S, *et al*. Long-term functional recovery from age-induced spatial memory impairments by nerve growth factor gene transfer to the rat basal forebrain[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(13): 6355—6360.

（编辑　陈聪连）

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