DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.11.003
第23卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 11
1260 2001年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)11-1260-04

小鼠胚胎干细胞体外分化为神经前体细胞的研究

吴 旋[1],黎海蒂[1],李树浓[2],徐海伟[1],徐 令[3] ([1]第三军医大学基础医学部生理学教研室,重庆 400038;[2]中山医科大学病理生理学教研室,广州 510089;[3]Department of Medicine, Beth Israel Deaconess Hospital, Harvard Medical School, USA)

提 要:目的 探索小鼠胚胎干细胞(Embryonic stem cell, ES cell)体外分化为神经前体细胞(Neural precursor cells, NPC)的无血清培养条件,比较人胚胎成纤维细胞(Human embryonic fibroblasts, HEF)与小鼠胚胎成纤维细胞(Mouse embryonic fibroblasts, MEF)对小鼠ES细胞生长的作用。方法 在MEF或HEF饲养层上培养ES细胞,培养液中含白血病抑制因子。采用无血清方法培养NPC,免疫组化方法检测巢蛋白(Nestin),用硝基四氮唑蓝/5-溴-4-氯-3-吲哚基磷酸(NBT/BCIP)显色检测碱性磷酸酶。结果 无血清培养可以获得86%的NPC。HEF与MEF一样能维持ES未分化状态。结论 无血清培养方法有利于ES细胞向NPC分化,HEF可用于小鼠ES细胞的培养,而且比MEF优越。

关键词:胚胎干细胞;神经前体细胞;无血清培养;人胚胎成纤维细胞
中图法分类号:R322.8;R329.1;R329.28 文献标识码:A

Differentiation of mouse embryonic stem cells to neural precursor cells *in vitro*

WU Xuan, LI Hai-di, LI Shu-nong, XU Hai-wei, XU Lin (Department of Physiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the serum-free culture condition of the differentiation of embryonic stem cells(ES) to neural precursor cells (NPC) and compare the effects of human embryonic fibroblasts (HEF) as the feeder layer of ES with that of mouse embryonic fibroblasts (MEF). Methods Mouse embryonic stem cells were cultured on the feeder layer of HEF or MEF in the medium containing leukemia inhibitory factor to inhibit differentiation. NPC were selectively cultured in serum-free medium. Nestin antigen was detected with immunocytochemical methods and alkaline phosphatase activity was visualized with NBT/BCIP. Results About 86% NPC were obtained from ES cells in the serum-free culture condition. HEF could be used as feeder layer to culture mouse ES cells and even better than MEF. Conclusion Results show that NPC of high purity could be cultured from ES cells with serum-free culture method. HEF can replace MEF and with more benefits.

Key words: embryonic stem cell; neural precursor cell; serum-free culture; human embryonic fibroblast

胚胎干细胞(Embryonic stem cells, ES cells)是从着床前胚胎的内细胞团中分离得到的具有分化全能性的细胞系[1]。ES细胞能分化成心肌、造血细胞和神经系统中所有类型的细胞[2]。随着人ES细胞系的建立[3],在实验室中大量生产人体神经组织有可能成为神经移植材料的新来源。

目前体外将ES诱导为神经细胞有两条途径[4]。研究较早且较多的方法是用全反式维甲酸(Retinoic acid, RA)诱导,另一途径是1996年Okabe[5]提出的无血清培养法。RA诱导ES细胞,得到的是神经元和神经胶质细胞,但是得不到正常神经发育过程中所具有的神经前体细胞(Neural precursor cells, NPC)。无血清的培养可获得较高纯度的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,故是较好的神经移植材料。无血清的体外培养体系使ES细胞经历了:ES-胚胎体-NPC-神经元/神经胶质细胞这样几个阶段,较之RA方法更接近于胚胎正常发育过程。对神经发育机制的研究是一个更好的体外模型。国外已采用无血清培养,将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[6]。但是在国内未见应用无血清培养法诱导ES细胞的报道,本实验首次采用无血清培养法成功地诱导小鼠ES细胞为NPC。NPC泛指神经干细胞和神经祖先细胞,它所表达的中间纤维丝蛋白-巢蛋白(Nestin),可以作为NPC的标志。

在ES细胞研究中,ES细胞的培养是最基本的部分。发展最早、最为成熟的建立和维持ES细胞系的方法是饲养层法[1],目前用得最为广泛的饲养层是原代培养的小鼠胚胎成纤维细胞(Mouse embryonic fibroblast, MEF)。这种细胞制作一次仅3~5代可用作饲养层,不但使工作量加大,而且不利于对饲养层细胞进行基因操作。为克服这些局限性,我们采用人胚胎成纤维细胞(Human embryonic fibroblast, HEF)作为饲养层,观察HEF对ES细胞生长的作用。细胞表面的碱性磷酸酶是ES细胞的未分化特性的标志[7]。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39900169,30070727)
作者简介:吴 旋(1969-),女,四川省安岳县人,博士,讲师,主要从事胚胎干细胞用于神经变性性疾病治疗的实验基础研究。电话:(023)68752254
收稿日期:2001-02-20;修回日期:2001-06-11

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

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　ES 细胞株 MESPU13 购自北大生命科学部。HEF 由中山医科大学附属第一医院生殖医学中心李晓红博士惠赠。

1.1.2　DMEM 为 Gibco 公司产品, DMEM/F_{12}、胎牛血清(Fetal calf serum, FCS)购自 Hyclone 公司, 重组人白血病抑制因子(Leukemia inhibitory factor, LIF)为 Pepro Tech 产品。

1.1.3　胰岛素、转铁蛋白、硒化钠、纤维连接蛋白(Fibronectin)、多聚鸟氨酸、β-巯基乙醇、胰蛋白酶、丝裂霉素 C 均购自 Sigma。

1.1.4　Nestin 抗体购自 PharMingen 公司, 二抗和三抗(Zymed laboratories Inc), 蓝色 DAB 显色试剂盒以及硝基四氮唑蓝(NBT)、5-溴-4 氯-3-吲哚基磷酸(BCIP)购自武汉博士德, 其余试剂为国产分析纯。

1.2　方法

1.2.1　人胚胎成纤维细胞(HEF)作为饲养层的制备　　HEF 在 DMEM-7.5%FCS 中培养, 细胞铺满培养瓶底壁后用含 10 μg/ml 丝裂霉素－C 的培养液处理 2 h, PBS 洗 3 次后用于 ES 细胞的培养。

1.2.2　ES 细胞培养　　ES 细胞在饲养层上培养, 培养液成分为 DMEM-15%FCS 中加入 LIF(1 000 IU/ml), β-巯基乙醇(100 μmol/L)。培养时每天更换培养液, 2～3 d 传代 1 次。

1.2.3　神经前体细胞的诱导　　①胚胎体的形成: 不用饲养层和 LIF, ES 细胞在含 β-巯基乙醇(100 μmol/L)的 DMEM-10% FCS 中悬浮培养 4 d; ②NPC 的培养: 将胚胎体转入经多聚鸟氨酸预处理的 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/F_{12}培养液, 每 2 天换液 1 次。

1.2.4　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。

1.2.5　碱性磷酸酶染色　　将盖玻片放于培养板的底壁, 待 HEF 和 ES 细胞长好后取出。4%多聚甲醛固定 10 min, PBS 漂洗 5 min×3, TSM_1、TSM_2中各漂洗 5 min×2, (TSM_1: 0.1 mol/L NaCl, 0.1 mol/L Tris, 10 mmol/L $MgCl_2$, 0.1 mol/L HCl 调 pH 到 8.0; TSM_2: 0.1 mol/L NaCl, 0.1 mol/L Tris, 50 mmol/L $MgCl_2$, 0.1 mol/L HCl 调 pH 到 9.5), 用 NBT/BICP 显色(45 μl NBT, 35 μl BICP/1 ml TSM_2): 室温避光显色 10～20 min。

2　结果

2.1　小鼠 ES 细胞向神经前体细胞的分化

ES 细胞在含 β-巯基乙醇(100 μmol/L)的 DMEM-10%FCS 中悬浮培养 4 d 后形成了胚胎体(Embryoid bodies, EBs), 见图 1A。转移至经多聚鸟氨酸预处理的 6 孔板 24 h 后, 大部分胚胎体贴壁。更换成含胰岛素(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/F_{12}无血清培养液后, 72 h 内细胞大量死亡, 从底壁脱落。存活的细胞形态大多数由以前的上皮样变为细长的形态。取第 4 天的细胞作 Nestin 免疫组化染色, 86%的细胞为阳性, 而不加一抗的对照完全不着色, 见图 1B。

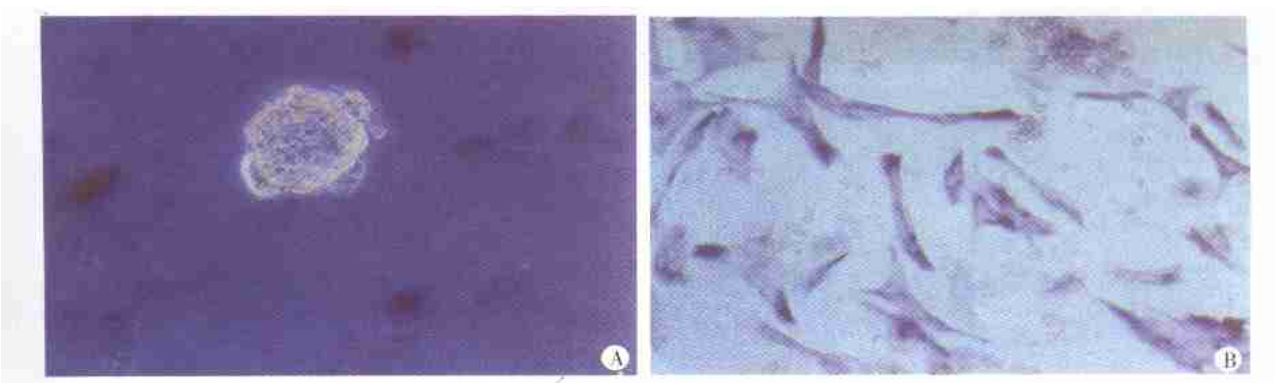


图 1　小鼠胚胎干细胞向巢蛋白阳性细胞的体外分化

A: 小鼠胚胎干细胞悬浮培养 4 d 形成胚胎体　(×200); B: 胚胎体贴壁后在 ITSFn 培养基中培养 4 d 细胞的巢蛋白阳性细胞　(ISH×200)

Fig 1　Differentiation of mouse ES cells to nestin positive cells *in vitro*

A: Embryonic body formation derived from floating ES cells on the 4th day of culture　(×200);

B: Nestin positive cells of attached embryonic body cultured in ITSFn medium for 4 d　(ISH×200)

2.2　MEF 和 HEF 对 ES 细胞生长的比较

MEF 的 1～2 代杂细胞多, 5 代以后生长缓慢, 故仅 3～5 代可作饲养层使用。用 MEF 培养的 ES 细胞呈集落突起状生长, 克隆周边清楚, 细胞小, 排列紧密, 界限清楚, 见图 2A。

HEF 形态较 MEF 细长, 我们从第 6 代传至第 30 代, 其间经历了冻存和复苏, HEF 仍然生长旺盛, 都可作饲养层细胞使用, 用 HEF 培养的 ES 细胞, 与 MEF 培养的 ES 细胞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, 而且生长旺盛, 见图 2B。用碱性磷酸酶染色 HEF 上生长的 ES 集落, 结果为阳性, 见图 2C。而且用 HEF 培养的 ES 细胞具有形成胚胎体和分化为 NPC 的能力。

HEF 与 MEF 一样能维持 ES 细胞的未分化特性。两种饲养层上的 ES 细胞集落数和生长速度没有明显差异, 二者不同之处是: ①HEF 上生长的 ES 集落形态比 MEF 上的细长。②HEF 可作饲养层使用的代数远多于 MEF; ③在经丝裂霉素处理后, MEF 仅能存活 2～3 周, 而 HEF 可存活 3～4 周。

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

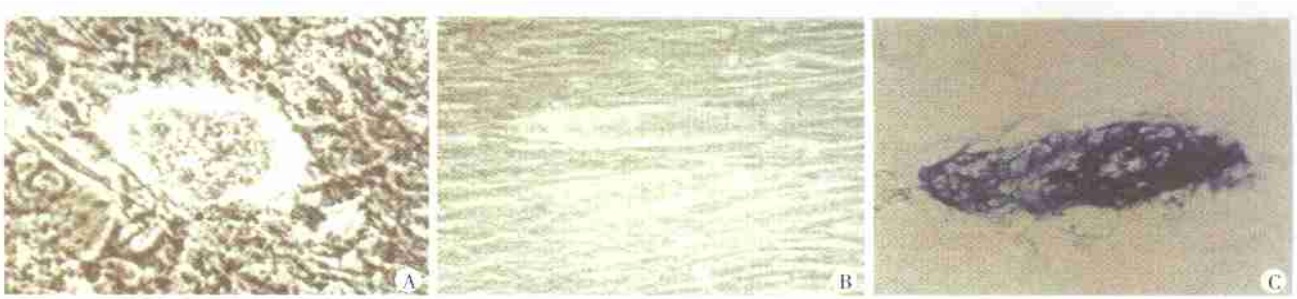


图 2 在小鼠胚胎成纤维细胞饲养层上(A× 100)和人胚胎成纤维细胞饲养层上生长的胚胎干细胞(B× 100),人胚胎成纤维细胞饲养层上生长的胚胎干细胞碱性磷酸酶染色为阳性(C× 200)

Fig 2 ES cells growing in monolayer culture on a background of MEF (A× 100) and HEF(B× 100). The ES colonies on the HEF positive to alkaline phosphatase (C× 200)

3 讨论

3.1 小鼠 ES 细胞向神经前体细胞的分化

ES 细胞在有饲养层和 LIF 存在的条件下保持它的增殖能力和分化全能性,撤去饲养层和 LIF,将其置于不贴附细胞的培养皿中培养,ES 细胞聚集成小体生长,称为胚胎体。β-巯基乙醇是在大多数细胞体外培养体系中所用的促进细胞生长的物质,它可与培养液中的半胱氨酸以二硫键结合形成复合物,使半胱氨酸更易进入胞浆,形成充足的谷胱甘肽。因此在培养液中添加β-巯基乙醇有利于胚胎体形成[8]。

胚胎体在无血清培养的培养基中可分化成 NPC。大多数无血清培养基中都补充了这些成分[9]。ES 细胞向NPC 的体外分化不需要特殊的细胞因子,这与心肌细胞和造血细胞的体外分化不同,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[8]。发育学的研究发现抑制某些信号传导可使各种胚层的细胞分化成神经细胞,研究还提示:如果去除导致胚胎细胞分化为表皮等其它类型细胞的因素,胚胎细胞将向神经细胞分化,因此神经细胞的分化被称为"内定"过程(Default state)[10]。

本实验结果 NPC 的纯度为 86%, 与国外报道相似[5]。分化的NPC 既可用作神经移植的材料,也可用于研究NPC 向各型神经元和神经胶质细胞分化的体外培养条件及其机制。Brustle 证实培养液中添加 PDGF、EGF 等细胞因子可将NPC 诱导为 A_2B_5阳性的神经胶质祖先细胞。ES 细胞体外分化为 NPC 细胞是研究胚胎神经发育机制的体外分化模型。

3.2 HEF 对ES 细胞生长的影响

1981 年 Evans[1] 首先建立小鼠 ES 细胞系,1998 年 Thomson[2,3] 成功建立了人的 ES 细胞系,他们均采用饲养层来培养 ES 细胞。在此期间人们也探索了不用饲养层的 ES 细胞培养条件,如采用各种条件培养基(BRL 条件培养基,大鼠心肌条件培养基等)以及 LIF 以取代饲养层,在这些条件培养基中都有相当高的 LIF 含量,而且目前用 LIF 代替饲养层培养 ES 细胞的结果并不稳定,Nichols 等[11] 人用此种条件建成的 15 个 ES 细胞系中,只有一个具有正常二倍体核型。在 ES 培养中饲养层结合 LIF 的方法是目前最成熟和应用最为广泛的方法。

我们比较HEF 和MEF 作为饲养层培养小鼠ES 细胞的研究表明,HEF 可用于小鼠 ES 细胞的培养,这一发现尚属首次。实验中发现,以HEF 代替MEF 具有很多优点:①使用简便,在 ES 细胞培养过程中,MEF 仅 3~5代可作饲养层使用,而 HEF 作为饲养层使用的代很多,我们已证明7~30代可作为饲养层使用(未作 30 代以后实验)。因此恰当地使用 HEF, 制备 1 次至少可用 1 年。避免了大量原代培养 MEF 的极其烦琐的工作。②直接取材于小鼠胚胎的成纤维细胞有可能带有支原体或病毒,而如果挑选出无支原体和病毒污染的HEF,就可避免使建成的 ES 细胞系带有支原体或病毒污染。③由于HEF 多次传代后仍能用于 ES 细胞的培养,方便对其进行基因操作,例如,转入 LIF 基因,以利于ES 细胞的培养;转入抗性基因,有利于对 ES 细胞进行转基因操作时的培养。④HEF 还具有经丝裂霉素处理后存活时间长的优点。

参考文献:

[1] Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos[J]. Nature, 1981, 292(5 819): 154—157.

[2] Thomson J A, Marshall V S, Trojianowski J Q. Neural differentiation of rhesus embryonic stem cells[J]. APMIS, 1998, 106(1): 149—156

[3] Thomson J A, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S S, *et al*. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts[J]. Science, 1998, 282(5 391): 1 145—1 147.

[4] Gottlieb D I, Huettner J E. An in vitro pathway from embryonic stem cells to neurons and glia[J]. Cell Tissue Organs, 1999, 165(3—4): 165—172.

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

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

[6] 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(5 428): 754—746.

[7] Zandstra P W, Le H, Daley G Q, *et al*. Leukemia inhibitory factor (LIF) concentration modulates embryonic stem cell self-renewal and differentiation independently of proliferation[J]. Biotechnol Bioeng, 2000, 69(6): 607—617.

[8] Xu L, Qiao C P, Huang S L, *et al*. Induction of embryonic stem cells to hematopoietic cells *in vitro*[J]. Chinese Science Bulletin, 2000, 45(8): 815—820.

[9] Defrancesco L. Serum-free cell culture: from art to science in 25 years[J]. The Scientist, 1998, 12(1): 19.

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

[11] Nichols J, Evans E P, Smith A G. Establishment of germline competent embryonic stem cells using differentiation inhibiting activity[J]. Development, 1990, 110(4): 1 341—1 348.

（编辑 郭建秀）

文章编号：1000-5404(2001)11-1263-01

个案与短篇

视网膜母细胞瘤延治及误诊分析

Analysis of delayed therapy and misdiagnosis of retinoblastoma

刘　勇，郑　汉，陈少军，王　一　（第三军医大学附属西南医院眼科，重庆 400038）

视网膜母细胞瘤（Retinoblastoma, RB）是婴幼儿最常见的一种眼内恶性肿瘤，对视力和生命有严重的威胁和危害。诊断和治疗的迟早与生命预后有直接关系。我院自 1991. 1—2001. 1 共收治 RB 患者 31 例，但 19 例已达到Ⅱ期以上阶段（分类标准按文献[1]），失去了最佳治疗时期，现就 19 例延治及误诊情况作一回顾性分析。

1　临床资料

患者男 12 例，女 7 例，左眼 6 例，右眼 11 例，双眼 2 例，平均年龄 2. 6 岁（1～5 岁）年龄 1～5 岁，中位数年龄 2. 6 岁，其中Ⅱ期（青光眼期）11 例，Ⅲ期（眼外扩展期）7 例，Ⅳ期（全身转移期）1 例。

院外初诊情况：初诊医院级别：乡镇级 10 家，县（市）级 7 家，省（市）级 2 家。初诊散瞳查眼底 1 例，CT 检查 0 例，B 超检查 5 例（均提示肿瘤）。初诊误诊为白内障 5 例、炎症 3 例、斜视 1 例；待查、建议观察或到上级医院就诊 4 例；待查、怀疑肿瘤并建议进一步治疗 6 例。

2　治疗情况

2.1　院外治疗情况

19 例病例中，患儿早期发现至本院就诊的平均延误时间为 9. 2 月（3～23 月）。在误诊的 9 例中，患儿父母均相信诊断而延至Ⅱ、Ⅲ期行手术治疗，平均延误 5. 4 月；已发现“猫眼”征，但患儿父母未在意而致视力丧失方就诊者 4 例，平均延误时间 4 月；院外诊为肿瘤，患儿父母不愿手术而拖延者 2 例（分别拖延 2、6 月）。

2.2　我院治疗情况

Ⅱ、Ⅲ期（共 18 例）均行眼球摘除术，术后病检证实（7 例Ⅲ期患儿报告视神经受侵犯），Ⅳ期患者 1 例放弃手术。

3　讨论

由于诊断和治疗技术的改进，目前在欧美及其他发达国家 RB 死亡率下降到 10%以下[2]，Magramm 等[3]对 240 名患儿调查发现，肿瘤侵及巩膜筛板，死亡率为 29%，超过巩膜筛板，则达 42%。临床上按 Reese-Ellsworth 分类法作预后估计，Ⅳ期（肿瘤＞10PD 达锯齿缘）预后不良，Ⅴ期（肿瘤占 1/2 眼底，玻璃体播散）预后很差[1]。而本组病员均已超过这种分类法的Ⅴ期。目前对中晚期 RB 尚无有效根治措施，故早期发现、早期治疗十分重要。本组患儿父母早期发现至本院手术时间间隔为 9. 2 月，最长为 23 月，大大延误了治疗时机。

本组病例中，初诊误诊率高达 47. 4%，其中误诊为白内障、炎症者最多，这与首次接诊的医师医疗水平及医疗条件有极大关系。患儿初次就诊时，行充分散瞳查眼底及 B 超辅助检查，可发现玻璃体腔病灶，大大提高本病早期诊断率。本组病例初诊时，仅 1 例行眼底散瞳检查（散瞳查眼底在基层医院能做到），因此提高基层五官科医师医疗水平及对本病的认识极为重要。5 例 B 超检查提示肿瘤，建议到上级医院就诊，但患儿父母缺乏认识、讳疾忌医，认为视力未受影响而延误至青光眼期，因此提高青年父母对婴幼儿常见肿瘤的认识亦极为重要。

关键词：视网膜母细胞瘤；误诊；延治
中图法分类号：R739. 72　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 李安仁，罗成仁. 神经外胚层肿瘤[A]. 见：李凤鸣 主编. 眼科全书[M]. 北京：人民卫生出版社，1996. 2 381—2 391.

[2] Moll A C, Kuik D J, Bouter L M, *et al*. Incidence and survival of retinoblastoma in The Netherlands: a register based study 1862—1995[J]. Br J Ophthalmol, 1997, 81(7): 559—562.

[3] Magramm I, Abramson D H, Ellsworth R M. Optic nerve involvement in retinoblastoma[J]. Ophthalmology, 1989, 96(2): 217—222.

（编辑　陈聪连）

作者简介：刘　勇（1972—），男，湖北省枝城市人，硕士，医师，主要从事玻璃体视网膜疾病的研究　电话：65222589

收稿日期：2000-04-27；修回日期：2000-10-25

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