DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.01.012
第22卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 1
26 2000年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)01-0026-03

神经干细胞的分离培养及其鉴定

刘仕勇,张可成,杨 辉,何家全,石 军 (第三军医大学附属新桥医院神经外科,重庆 400037)

提 要 目的:从成年大鼠纹状体区和胎鼠皮层分离并鉴定神经干细胞。方法:利用无血清培养和单细胞克隆技术在成年大鼠纹状体区和胎鼠皮层分离具有单细胞克隆能力的细胞群,选取单个克隆进行连续传代培养获得大量亚克隆,采用免疫荧光细胞化学技术检测克隆细胞Nestin抗原和分化后特异性成熟神经细胞抗原的表达。结果:从纹状体区和皮层分离的细胞群具有连续克隆能力,胚胎早期细胞抗原-Nestin抗原阳性,分化后的细胞表达神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的特异性抗原。结论:我们分离的细胞具有自我更新能力和多分化潜能,属于胚胎早期细胞,有很强的增殖能力,是中枢神经系统的干细胞。

关键词 神经干细胞;克隆分析;细胞培养;分离
中图法分类号 R329.2 文献标识码 A

Isolation, incubation and identification of neural stem cells in rats

LIU Shi-yong, ZHANG Ke-cheng, YANG Hui, HE Jia-quan, SHI Jun (Department of Neurosurgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037)

Abstract **Objective**: To isolate the neural stem cells from the striatum of adult rats and the cortex of rat embryoes. **Methods**: Neural cells, which are able to form single-cell cloning, were isolated from the striatum of adult rats and the cortex of rat embryoes with serum-free incubation and single-cell cloning technique. A single clone was incubated in consecutive generations in order to obtain large numbers of subclones. Immunofluorescence technique was employed to detect Nestin antigen and specific antigen of mature neural cells after the clone was differentiated. **Results**: The neural cells isolated from the striatum of adult rats and the cortex of rat embryoes showed the expression of Nestin antigen and were able to differentiate into neurons, astrocytes and oligodendrocytes. **Conclusion**: Our cell line belongs to neural precursor and is multipotent, which has the ability to undergo self-renew. So, they are the stem cells of the central nervous system.

Key words neural stem cell; cloning assay; cell incubation; isolation

成年哺乳类动物神经系统通常被看作非再生性组织,但近年来的研究对此提出了疑问。首先,人们发现成年个体海马和室管膜下层细胞具有分裂产生新生神经元的能力,尤其是位于室管膜下层的祖细胞增殖后可以沿着一条比较固定的路径迁移到嗅脑并分化为中间神经元[1,2]。其次,在90年代从成年个体脑区分离了能不断分裂增殖且具有多种分化潜能的细胞群,并提出了神经干细胞的概念[3]。本实验首次采用单细胞克隆建立连续细胞系的方法获取大量亚克隆,在证实其自我更新能力和多分化潜能基础上,使用胚胎早期细胞特异性抗原Nestin,证明我们所分离的细胞群为神经干细胞,以期为进一步使用和研究神经干细胞奠定基础。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770756)
作者简介:刘仕勇(1973.10),男,四川省长宁县人,硕士研究生,住院医师,主要从事神经干细胞的诱导分化方面的研究,发表论文2篇。电话:(023)68755114-74610
收稿日期:1999-03-31;修回日期:1999-09-30

1 材料与方法

1.1 实验动物

Wistar大鼠,由第三军医大学动物实验中心提供。

1.2 细胞培养试剂和抗体

DMEM/F12和B27(Gibco)、bFGF(Sigma)、胎牛血清(杭州四季青生物材料研究所)。抗Nestin IgG(Mckay RDG惠赠,USA)、5-嗅尿嘧啶及其抗体(Bromodeoxyuridine, BrdU, Fluka公司提供)、抗NeuN IgG(Neuronal Nuclei, NeuN,由Dr Mcburney惠赠,USA)、抗GFAP和2,3-环核甘酸磷酸二脂酶IgG(Cyclic Nucleotide Phosphohydrolase, CNP)由Promega公司提供。

1.3 实验方法

1.3.1 神经干细胞的分离和传代 分别取成年大鼠(4月大小)纹状体和孕鼠(16 d胎儿)皮层组织,吸管吹打机械分离制作单细胞悬液,台盼蓝染色后细胞计数,于每培养瓶中(75 ml培养

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

瓶)加入 5×10⁵ 个细胞,使用 DMEM/F12(1∶1)加 B27 的无血清培养基,同时加用 bFGF(20 ng/ml)。待原代克隆形成后再次机械分离克隆制作单细胞悬液,每培养瓶中加入 5×10⁴ 个细胞。此后每 5~7 d 机械分离克隆传代一次,方法同前。

1.3.2　单细胞克隆及连续传代　　单细胞克隆采用有限稀释法。具体方法见参考文献[5]。选取最初只有一个细胞长成的单细胞克隆,机械分离成单细胞悬液,将一个克隆的所有细胞种入 25 ml 培养瓶中培养(培养基同前),待次代克隆长成后连续传代。

1.3.3　BrdU 标记　　将 BrdU 溶于无血清培养基,过滤除菌后种入上述的细胞克隆(BrdU 终浓度为 5 μmol/L),培养 7 d 待新的克隆后转移到培养板中(预先置有多聚赖氨酸涂布盖玻片),贴壁 2 h 行 BrdU 抗体免疫荧光染色。

1.3.4　克隆诱导分化　　选取部分上述的细胞克隆种植于预先置有多聚赖氨酸涂布盖玻片的 24 孔培养板,并加入有血清培养基(5%的胎牛血清+DMEM/F12),分别于 2 h 后和 7 d 后行免疫荧光实验。

1.3.5　免疫荧光单标和双标实验　　将贴壁 2 h 的细胞克隆行 Nestin 免疫荧光单标染色。将来自单细胞的克隆培养 7 d 后行免疫荧光单标染色,来自混合细胞培养的克隆培养 7 d 后行免疫荧光双标染色,具体方法参照蔡文琴教授的方法进行(针对 NeuN、GFAP 和 CNP)。

2　结果

2.1　克隆分析

无论是成年大鼠纹状体还是孕鼠皮层的原代培养细胞在上述的无血清培养基中生长 2 d 后大部分细胞死亡,部分细胞分裂形成 2~4 个细胞的细胞团,并随时间的推移细胞数目迅速增加,到 7 d 时生长成为数十个细胞到数百个细胞的集落,这些集落均成悬浮球形生长,细胞形态规则,未见到明显的突起生长,见图 1。原代克隆的次代培养及其亚克隆过程中,仍出现与原代培养相同的大量次代克隆。



图 1　在无血清培养液中呈悬浮球形生长的克隆　(×400)

Fig 1　A floating clone in sorum-free media　(×400)

采用有限稀释法标记仅有一个细胞的培养孔并动态观察,结果显示单个细胞在培养 2~3 d 后分裂为 2~4 个细胞的小克隆,4~5 d 出现 10~40 个细胞的中等大小的克隆,7~10 d 均发展为上百个细胞的大克隆,细胞形态同前。在原代培养中克隆形成率约为 0.5%~1%之间,而次代克隆及随后的亚克隆中克隆形成率则明显升高,波动在 10%~20%之间。经传代 20 代后的细胞仍具有克隆能力。成年大鼠纹状体与孕鼠皮层的克隆过程基本相同,但孕鼠的克隆形成率稍高。

2.2　Nestin 抗原的表达和 BrdU 标记

成年大鼠纹状体和孕鼠皮层的原代克隆及其亚克隆在有多聚赖氨酸涂布的盖玻片上贴壁 2 h 后行 Nestin 的免疫荧光染色,结果显示克隆呈 Nestin 抗原阳性,见图 2。在传代 20 代后的克隆仍显示为 Nestin 抗原阳性。在克隆培养 7 d(有血清培养)后行 Nestin 免疫荧光染色,未见到任何 Nestin 阳性细胞。BrdU 标记表明克隆的大部分细胞为 BrdU 阳性细胞。

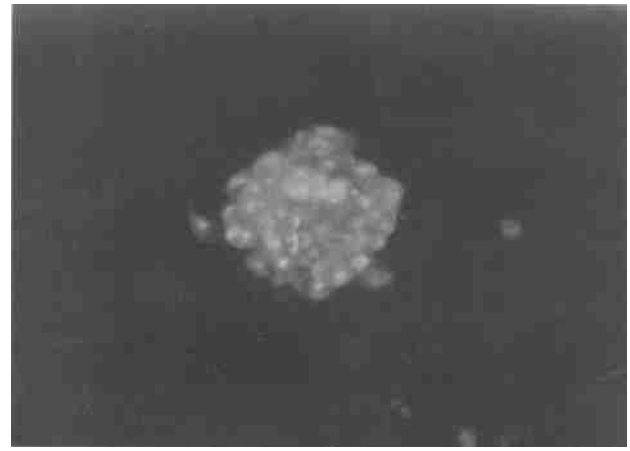


图 2　克隆细胞呈 **Nestin** 阳性　(FITC×200)

Fig 2　Nestin positive cells of clone　(FITC×200)

2.3　诱导分化结果

成年大鼠和孕鼠原代克隆及其亚克隆贴壁 2~4 h 后即发现有突起从团块边缘长出,2 d 后即有不同形态的细胞从克隆周围出现,7 d 后出现大量不同形态的分裂增殖新生神经细胞。细胞主要呈出 3 种形态,即具有一个或两个长突起胞体呈圆形或椭圆形的神经元样细胞,具有多个细突起且不断分枝的少突胶质细胞样细胞和具有多个粗长突起的星形胶质细胞样细胞。

免疫荧光单标和双标染色证实了克隆细胞的多分化潜能。NeuN 抗体为特异性识别神经元的核抗体,在原代克隆、亚克隆后代及单细胞克隆后代的细胞核内均得到显示。GFAP 阳性细胞显示了星形胶质细胞的粗长突起和多角形胞体。CNP 为少突胶质细胞的特异性抗原,在本实验中亦见到了较多的 CNP 阳性细胞。免疫荧光双标证实了不同类型细胞的同时存在。

3　讨论

1992 年,Reynolds 和 Weiss 从成年小鼠纹状体分离

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

了能在体外不断分裂增殖，具有多种分化潜能的细胞群，并由此引发了中枢神经系统是否存在神经干细胞(Neural stem cell)的争论[3~5]。作为干细胞，根据 Mckay 1997 年在 Science 上发表的文章认为，就是指具有分化为神经元细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞的能力，能自我更新并足以提供大量脑组织细胞的细胞[6]。祖细胞(Neural progenitor)是相对于干细胞而言，其分化能力和自我维持、自我更新能力受到限制，仅具有单潜能或双潜能分化能力或其干细胞样特性只能维持较短的时间。而前体细胞(Neural precursor)则是一个不太严格的术语，即某种前体细胞是在发育进程中较另一种细胞处于更早的阶段，可以统称干细胞和祖细胞[4~7]。总之，自我更新和多分化潜能是神经干细胞的两个基本属性。

自我更新是神经干细胞的一个基本属性。本实验中分离的细胞群显然具有很强的自我更新能力，在成年大鼠纹状体和胎儿皮层的原代克隆及其亚克隆实验中发现部分细胞具有克隆能力，在连续传代培养中依旧维持了这种克隆能力，即使是传代 20 代(>5 月)后仍具有形成克隆的能力。为排除多细胞聚集产生类似集落的可能性，我们采用了单细胞克隆的方法证明单个细胞能够分裂增殖成为克隆。尽管在 Hulspas 的实验中单细胞克隆未能成功，但我们的实验结果和 Reynolds 等的结果相同，即单细胞克隆是完全可能的[3,5,8]。克隆形成率实验表明一个克隆中大部分细胞不可避免死亡和分化(可能为祖细胞和成熟细胞)，但仍有 10%~20%的细胞具有克隆能力，表明这部分细胞具有自我更新能力。

同时，我们使用免疫单标和双标染色证明了克隆细胞具有分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的能力，即多分化潜能，这与多家实验室的结果相同[3~5]。但事实上，即使是使用免疫三标染色也不能完全证明其多分化潜能，因为在混合细胞培养中单潜能克隆的细胞完全有可能离开原来的克隆并聚集到其它克隆而形成混杂的集落，更何况在体外诱导分化过程中细胞可以长入相邻的克隆。为确实证明神经干细胞的多分化潜能，本实验使用单个细胞形成的克隆连续传代得到大量克隆以证实单个细胞的多分化潜能，国内外尚未见有类似报道。此外，我们尚使用神经上皮的特异性抗原——Nestin 的抗体来证明我们所分离的细胞为胚胎早期细胞，因为 Nestin 的表达起始于神经板的形成，在神经迁移及神经分化开始后逐渐消失[9]。BrdU 标记实验亦表明克隆的大部分细胞为分裂增殖产生的新生神经细胞。因此，本实验中分离的细胞群具有自我更新能力和多分化潜能，具备了神经干细胞的基本属性，是中枢神经系统的干细胞。

神经干细胞的分离为神经发育研究和中枢神经功能重建提供了一条新的思路。从神经板的出现、神经管的形成到脑泡的发育都经历了从神经干细胞到祖细胞再到成熟神经细胞的发育过程，因此，研究神经干细胞和祖细胞的增殖、迁移和分化将为阐明神经系统发育的机制提供有力的证据[1,2,7]。其次，神经干细胞的出现为神经退行性疾病如帕金森病、阿尔海默病的功能重建带来了希望，无论是作为脑组织移植的供体，还是作为体内诱导分化的靶细胞，神经干细胞都为中枢神经系统功能重建和神经再生提供了一条新的途径[2,10]。尽管目前尚不能诱导神经干细胞特异性地、完全地分化为某种特定的神经元，但随着人们为胚胎发育机制认识的不断加深和新的细胞因子、化学信号的不断发现，必将推动上述研究的进一步深入。

参考文献

[1] Goldman S A, Luskin M B. Strategies utilized by migrating neurons of the postnatal vertebrate forebrain[J]. TINS, 1998, 21(3):107—114.

[2] Zigova T, Pencea V, Betarbet R, *et al*. Neuronal progenitor cells of the neonatal subventricular zone differentiate and disperse following transplantation into the adult rat striatum[J]. Cell transplantation, 1998, 7(2):137—154.

[3] Reynolds B A, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous sytem[J]. Science, 1992, 255(5052):1707—1709.

[4] Weiss S, Reynolds B A, Vescovi A L, *et al*. Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain[J]. TINS, 1996, 19(9):387—393.

[5] Reynolds B A, Weiss S. Clonal and population analysis demonstrate that and EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell[J]. Dev Biol, 1996, 175(1):1—13.

[6] Mckay R. Stem cells in the central nervous system[J]. Science, 1997, 276(5309):66—71.

[7] Morrison S J, Shah M N, Anderson D J, *et al*. Regulatory mechanisms in stem cell biology[J]. Cell, 1997, 88(3):287—298.

[8] Hulspas R, Tiarks C, Reilly J, *et al*. *In vitro* cell density-dependent clonal growth of EGF-responsive murine neural progenitor cells under serum-free conditions[J]. Exp Neurol, 1997, 148(1):147—156.

[9] 冬向军, 陈建国, 翟中和, 等. 神经丝的结构和功能[J]. 细胞生物学, 1998, 20(2):63—68.

[10] Deacon T, Dinsmore J, Costantini L C, *et al*. Blastalastage stem cells can differentiate into dopaminergic and serotonergic neuron after transplantation[J]. Exp Neurol, 1998, 149(1):28—41.

(编辑 薛国文)

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