

· 论 著 ·

新生大鼠神经干细胞的分离培养

贾延劼 杨于嘉 宋建辉 刘丽旭 刘杰波 郑湘榕

(中南大学湘雅医院儿科 湖南 长沙 410008)

[摘 要] 目的 探讨新生大鼠神经干细胞的分离培养方法及其外源报告基因在神经干细胞中的表达情况。方法 采用无血清细胞培养技术,间接免疫细胞化学染色法及其绿色荧光蛋白转导技术。结果 从新生大鼠脑组织分离的细胞具有连续克隆能力,表达神经上皮干细胞蛋白,诱导分化后的细胞表达成熟神经细胞和星形胶质细胞特异性的蛋白。绿色荧光蛋白报告基因转导神经干细胞后能够有效表达。结论 该方法分离培养的神经干细胞保持了干细胞的未分化属性,具有自我更新、增殖能力和多分化潜能,而且外源报告基因在神经干细胞中能够有效表达。

[关 键 词] 神经干细胞 细胞培养 新生大鼠

[中图分类号] R329.2+8 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2002)02-0081-03

Isolation and Cultivation of Neural Stem Cells in neonatal Rats

JIA Yan-Jie, YANG Yu- Jia, SONG Jian-Hui, et al.

Department of Pediatrics, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China

Abstract: **Objective** To study the isolation and cultivation of neural stem cells in neonatal rats. **Methods** Cell culture, indirect immunofluorescence cytochemistry and gene transfection techniques were used. **Results** The neural stem cells isolated in newborn rats had the potential to form clones, express neuroepithelial stem cell protein (nestin) and differentiate into mature neurons and astrocytes. Moreover, green fluorescent protein vector could be efficiently transfected into this cell line. **Conclusions** Neural stems cells can only be characterized on a critical functional basis in terms of their undifferentiated features, capacity of self-renewal, proliferation and pluripotentiality, and can express ex vivo gene efficiently.

Key words: Neural stem cell; Cell culture; Neonatal rat

胚胎和成年哺乳动物脑内均存在神经干细胞,此类细胞具有不断分裂增殖和多分化潜能的生物学特性,如能被定向诱导分化为某种神经细胞以替代损伤的神经细胞,无疑将为中枢神经系统细胞移植和基因治疗带来新的希望^[1]。因此,利用细胞培养技术分离的神经干细胞成为近年神经科学研究热点之一。以往研究供体多选择胚胎小鼠或成年大鼠脑组织的某些部位(如:纹状体)分离神经干细胞^[2,3],步骤较为繁琐。我们采用新生大鼠作为供体,建立了一种较为简单的神经干细胞分离培养方法,现总结报道如下。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

DMEM 培养基,B₂₇ 脂质体 LipofectAMINE 购自 GibcoBRL 公司;胎牛血清购自 Hyclone 公司;成纤维生长因子 α (fibroblast growth factor 2, FGF2),表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)购自 Pepro TechEC 公司;小鼠抗大鼠神经上皮干细胞蛋白(neuroepithelial stem cell protein, nestin)单克隆抗体购自 Chemicon 公司;小鼠抗大鼠 MAP-1b, MAP-2, NeuN, Tau, GFAP, S-100 单克隆抗体购自 Neomarkers 公司;山羊抗小鼠 Cy3 抗体, G418,

[收稿日期] 2001-12-19; [修回日期] 2001-03-05
[基金项目] 中国博士后科学基金资助(第29期)
[作者简介] 贾延劼(1971-),男,博士后,主治医师。

Hoechst33258, 碘化丙啉 (PI) 购自 Sigma 公司; 绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 真核表达质粒 (pEGFP-N₁) 购自 Clontech 公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 实验动物

新生 SD 大鼠 (清洁级) 0~3 d, 由本校动物实验中心提供。

1.3 新生大鼠神经干细胞的分离培养

无菌条件下取新生大鼠全脑, 保留嗅脑, 去除小脑, D-Hanks 液冲洗干净, 仔细剥离血管和脑膜, 剪碎, 加 0.25% 胰酶 37℃ 消化 10~15 min, 500 g 离心 4 min, 去除上清液, 加入神经干细胞培养基 (DMEM 培养基, B₂₇, 10 ng/ml FGF2, 10 ng/ml EGF), 吹打成为单细胞悬液, 按照 $1 \sim 2 \times 10^5$ 个/ml 的比例接种于塑料培养瓶, 置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中悬浮培养。整个分离过程在 30 min 内完成。每隔 7 d 传代, 最长传至 8 代。原代或传代培养 72 h 后取少量细胞进行 Hoechst33258-PI 荧光双染色鉴定细胞存活情况。

1.4 单细胞克隆及连续传代

参考刘仕勇等^[3]的方法, 取原代克隆稀释制作的单细胞悬液, 加入 96 孔培养板, 动态观察克隆形成情况。当形成单克隆后, 传代形成次克隆, 然后连续传代, 最后得到单个细胞的亚克隆, 进行免疫荧光和分化实验。

1.5 神经干细胞的诱导分化

各代细胞接种预先置有鼠尾胶原涂布盖玻片的 6 孔培养板, 加入有血清的培养基 (DMEM 培养基, 20% 胎牛血清), 分别于 24 h, 3 d, 7 d 后行间接免疫荧光细胞化学染色检测。

1.6 间接免疫荧光细胞化学染色

各代细胞 4% 多聚甲醛固定, 0.5% H₂O₂-甲醇液处理 30 min, 1% 牛血清白蛋白-0.3% Triton X-100 37℃ 处理 30 min。加入各种一抗 (工作效价均为 1:100~200) 37℃ 孵育 30 min 后置于 4℃ 的冰箱 24 h, 再加入山羊抗小鼠 Cy3 (1:64) 37℃ 处理 30 min, 0.01 mol/L PBS 充分冲洗以终止反应。对照实验采用 0.01 mol/L PBS 和正常牛血清分别替代第一抗体进行免疫荧光染色, 用 0.01 mol/L PBS 替代二抗进行染色。

1.7 GFP 转导

质粒 DNA 转导由脂质体介导^[4], 方法简述如下: 转导前分别将 5 μg pEGFP-N₁ 质粒 DNA 及 10 μl LipofectAMINE 脂质体加入 200 μl DMEM 无血清培养基中, 室温放置 45 min, 然后加入 2 ml DMEM 无血清培养基混匀。转导时用无血清培养基漂洗取原代神

经干细胞 1~2 次, 加入 DNA-脂质体混合物, 37℃ 处理 5 h 后, 加等体积的神经干细胞培养基过夜。24~48 h 后 G418 筛选阳性克隆。

2 结果

2.1 生长情况

新生大鼠原代神经细胞在神经干细胞培养基生长 24 h 后大部分细胞死亡, 形成大量的细胞碎片。但是原代培养中更为明显的是, 部分细胞很快聚集或/和分裂形成细胞团 (< 24 h), 即原代克隆, 每个克隆从 2~4 个到数十个细胞不等。随着时间的推移, 细胞数目迅速增加, 7 d 时生长成为数十个细胞到数百个细胞的克隆, 生长特点为悬浮, 球形, 形态规则, 折光性强, 无突起生长, 其间夹杂有大量的散在细胞和细胞碎片 (图 1, 见封 III)。Hoechst33258-PI 染色发现原代克隆中绝大多数为活细胞 (> 80%), 混有少量坏死和凋亡的细胞, 而散在的细胞多为坏死的细胞 (70%~80%), 少量为凋亡的细胞 (10%~20%)。在原代培养中克隆形成率较低, 在 5%~8% 之间。

传代后出现与原代培养相同的大量次代克隆, 同时克隆形成率明显升高, 为 10%~20%。次代克隆在亚克隆培养过程中均出现相类似的过程, 而且保持了较高的克隆形成率, 为 10%~20%。

2.2 单细胞克隆及连续传代

原代克隆制备的单细胞悬液, 其次代克隆形成率为 $(12.2 \pm 4.1)\%$, 以后各代的亚克隆形成率在 10%~20% 之间波动。

2.3 神经干细胞的诱导分化及鉴定

原代及各代克隆接种于涂有鼠尾胶原的培养板后, 绝大多数细胞在 24 h 内贴壁, 并且从细胞团边缘伸出突起。诱导分化 2~3 d 后可以见到部分神经样细胞和突起, 7 d 后出现大量形态不同、新生的神经细胞或神经胶质细胞, 原有的细胞团消失。

间接免疫荧光细胞化学染色发现, 神经干细胞标记蛋白 nestin 在原代、次代、亚克隆及其单细胞克隆均有表达, 而且诱导分化 24 h 内 nestin 表达仍然很强, 诱导 3 d 后 nestin 表达消失。其余的蛋白在原代、次代、亚克隆和单细胞克隆均无表达, 诱导分化 3 d 后 MAP-1b, MAP-2, NeuN, Tau 表达很弱, 7 d 后部分分化的细胞出现表达 (图 2, 见封 III)。GFAP, S-100 诱导分化 3 d 后出现表达, 7 d 后许多分化细胞表达上述蛋白 (图 3, 见封 III), 说明神经干细胞具有多种分化潜能。

2.4 GFP 转导

GFP 转导原代神经干细胞 24 h 后 (65.5 ± 14.6)% 的细胞克隆发出绿色荧光蛋白(图 4, 见封 III)。选择阳性克隆传代后的次克隆保持了绿色荧光特性, 但是亚克隆培养过程中绿色荧光有一定程度的衰减, 第 4 代阳性克隆降至 (24.2 ± 7.9)%。此外, 转导后的神经干细胞诱导分化后仍能够发出绿色荧光。

3 讨论

神经干细胞与成熟的神经细胞和神经胶质细胞在生物学特性上明显不同: ①具有自我更新 (self-renewal) 的能力; ②具有多分化潜能 (pluripotentiality), 可以分化为神经细胞、星形胶质细胞, 甚至造血系统的各系细胞等; ③这些能力可以持续很长时间; ④在疾病或外界因素刺激下有一定的反应性^[5]。其中, 自我更新和多分化潜能最为重要。

本研究分离培养的神经干细胞显然具有自我更新能力, 通过连续传代和单细胞克隆实验, 证明子代细胞能够保持亲代细胞的干细胞属性, 如分裂增殖能力、多分化潜能和表达特异性蛋白 nestin。同时, 本研究显示各代克隆细胞在一定条件下, 均具有分化为成熟的神经细胞和星形胶质细胞的能力, 即多分化潜能。而且在诱导分化过程中, 随着时间的延长, nestin 的表达逐步消失, 与此同时, 出现成熟神经细胞标记蛋白 MAP-1b, MAP-2, NeuN, Tau 和成熟星形胶质细胞标记蛋白 GFAP, S-100 的表达, 并逐步增强, 符合神经干细胞分化规律^[5]。因此, 本研究中分离的细胞具备了神经干细胞的基本属性, 属于中枢神经系统的干细胞。

以往神经干细胞供体来源多采用胚胎或成熟脑组织的某些部位, 如纹状体、海马齿状回、脊髓等。虽然胚胎小鼠神经干细胞较多, 但是脑组织绝对量少, 细胞获得率有限^[2]。成年大鼠纹状体分离方法较复杂, 细胞获得率仍然有限^[3]。新生大鼠的神经干细胞数量介于前两者之间, 但是分离方法简单, 细胞获得率高。而且我们在预实验中发现, 不同天数的新生大鼠神经干细胞获得率也不尽相同, 出生天数越小, 细胞获得率越高。出生超过 7 d, 原代细胞克隆率远低于 1%, 不适合采用本研究的分离方法。

神经干细胞培养多采用无血清培养技术^[6], 主要目的是去除血清中可能诱导神经干细胞分化的生长因子等干扰因素, 同时添加了 FGF2 和 EGF 两种

生长因子。FGF2 和 EGF 在神经干细胞增殖及分化中的作用尚不清楚。已证实 FGF2 不仅是啮齿类动物神经干细胞的有丝分裂原, 也能够促进细胞分化并决定分化方向。EGF 同样参与调节神经干细胞分裂增殖。但两者作用不同, FGF2 对能分化成神经细胞、胶质细胞和胶质前体细胞多潜能的神经干细胞有增殖作用, EGF 仅刺激胶质前体细胞的增殖; FGF2 在胚胎发育早期可维持神经干细胞生存, 促进其增殖作用, EGF 在发育较晚期促进神经干细胞增殖和分化^[7]。本研究在血清培养基中同时添加了这两种生长因子, 主要目的是维持神经干细胞的稳定, 促进增殖, 抑制分化。撤离这两种生长因子, 恢复有血清的培养状态后, 神经干细胞迅速分化为神经细胞和神经胶质细胞等。

报告基因 GFP 是一种结构稳定、在受到蓝色或紫外光照射时可自发发出荧光的特殊蛋白质, 可以用于活细胞标记。常用的方法如脂质体、逆转录病毒、腺病毒均可介导 GFP 基因转导。GFP 阳性细胞不需要其他共刺激因子、底物或其他基因产物的协助, 直接用荧光显微镜或流式细胞仪即可检测^[4]。本研究采用脂质体介导 GFP 转导, 对原代神经干细胞的生物学行为没有明显影响, 而且传代和诱导分化后在一定时间范围内有效表达。因此可以利用神经干细胞作为一种广谱的细胞载体, 导入外源性基因, 脑移植后进行神经系统疾病的基因治疗。

[参 考 文 献]

- [1] Bjorklund A, Lindvall O. Cell replacement therapies for central nervous system disorder [J]. Nat Neurosci, 2000, 3(6): 537-544.
- [2] 唐炯, 喻红, 林丽珠, 等. 神经干细胞体外培养和外源基因在其中的表达 [J]. 科学通报, 2000, 45(21): 2303-2305.
- [3] 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.
- [4] 刘默芳, 王恩多. 绿色荧光蛋白 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(3): 238-243.
- [5] Gage FH. Mammalian neural stem cells [J]. Science, 2000, 287(5457): 1433-1438.
- [6] Brannen CL, Sugaya K. In vitro differentiation of multipotent human neural progenitors in serum-free medium [J]. Neuroreport, 2000, 11(5): 1123-1128.
- [7] Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, et al. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain [J]. J Neurosci, 1997, 17(15): 5820-5829.

(本文编辑 刘丽旭)

新生大鼠神经干细胞的分离培养

(见正文第 81 页)



图 1 原代培养 3 d 的神经干细胞
($\times 100$)

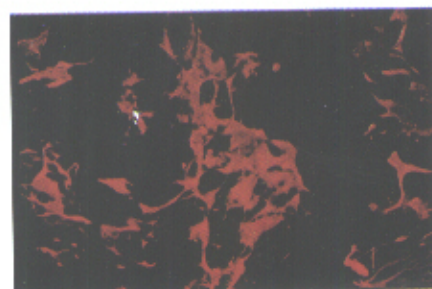


图 2 传代培养的神经干细胞诱导分化
7 d, 免疫荧光染色 MAP-2 阳性($\times 300$)

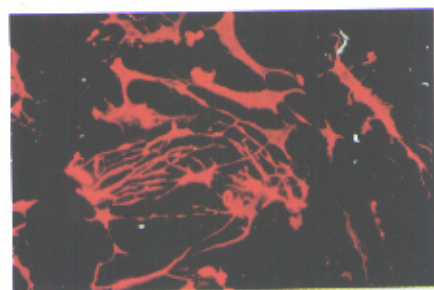


图 3 传代培养的神经干细胞诱导分化
7 d, 免疫荧光染色 S-100 阳性($\times 300$)

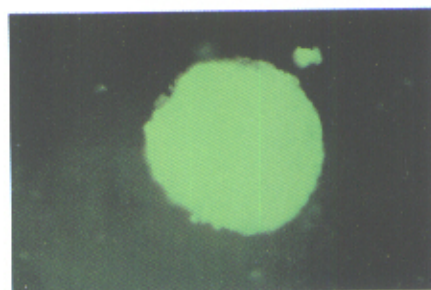


图 4 原代培养的神经干细胞 GFP 转导
24 h($\times 300$)

碱性成纤维细胞生长因子对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤的保护作用

(见正文第 84 页)

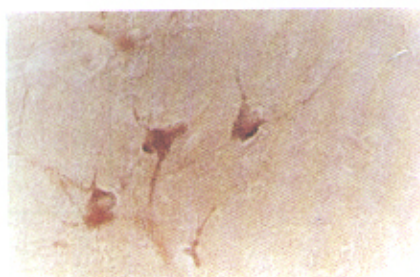


图 1 正常纹状体胆碱能神经元, 胞核
染色较浅, 胞浆中有较多的棕红色颗粒,
突起清晰可见(AChE 染色, $\times 400$)



图 2 HIBD 后 14 d 纹状体, 可见胆碱能
神经元丢失, 胞体及突起均模糊不清, 染
色变浅(AChE 染色, $\times 400$)



图 3 bFGF 小剂量组, 可见纹状体内胆
碱能神经元, 胞浆内颗粒增多, 突起隐约
可见(AChE 染色, $\times 400$)

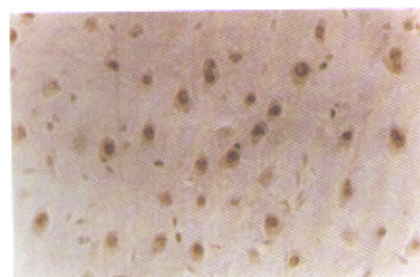


图 4 正常纹状体内 ACP 活性较弱, 酶
反应颗粒细小, 均匀分布于胞质中(ACP
染色, $\times 400$)

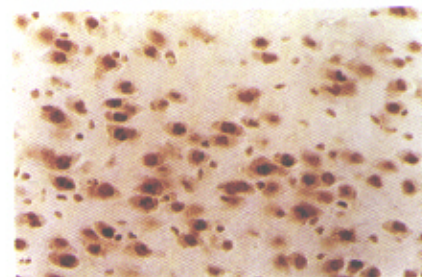


图 5 HIBD 后 14 d, 纹状体 ACP 活性明
显增强, 酶反应颗粒粗大, 呈棕黑色(ACP
染色, $\times 400$)

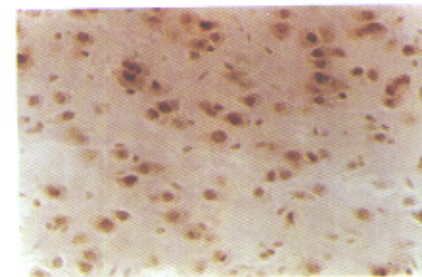


图 6 bFGF 小剂量组, 纹状体 ACP 阳性
细胞数减少, 染色浅, 颗粒少(ACP 染色,
 $\times 400$)