

小鼠胚胎神经干细胞的体外培养与鉴定

张蓬勃¹ 李卫松¹ 高明¹ 李玲¹ 王妮¹ 雷珊¹ 吕海侠² 陈新林² 刘勇²

(1. 西安交通大学医学院第二附属医院麻醉科, 陕西 西安 710004;
2. 西安交通大学医学院神经生物研究所, 陕西 西安 710000)

[摘要] **目的** 通过改进和优化神经干细胞(NSCs)的体外培养方法,为进一步研究 NSCs 的生物学行为提供基础。**方法** 孕 14 d 的美国癌症研究所(ICR)小鼠,无菌条件下剪取前脑皮质,采用机械法分离原代细胞进行培养,采用机械法复合酶消化法对原代细胞进行传代和培养。以 1% 胎牛血清诱导分化。应用免疫荧光方法进行巢蛋白(nestin), β -微管蛋白Ⅲ(β -tubulin Ⅲ),胶质纤维酸性蛋白(GFAP)染色,对培养的细胞进行鉴定。**结果** 从胚胎小鼠前脑皮质中分离得到的细胞具有连续传代形成克隆球的能力,克隆球呈 nestin 免疫反应阳性;加入胎牛血清可诱导分化为 β -tubulin Ⅲ 和 GFAP 阳性细胞。**结论** 机械法分离胚胎小鼠前脑皮质细胞,机械法复合酶消化法对原代细胞进行传代和培养,能够成功获得胚胎小鼠前脑的 NSCs。

[中国当代儿科杂志,2011,13(3):244-247]

[关键词] 神经干细胞;胚胎;细胞培养;小鼠
[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)03-0244-04

Culture and identification of neural stem cells from mouse embryos

ZHANG Peng-Bo, LI Wei-Song, GAO Ming, LI Ling, WANG Ni, LEI Shan, LV Hai-Xia, CHEN Xin-Lin, LIU Yong. Department of Anesthesiology, Second Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University School of Medicine, Xi'an 710004, China (Email: zhpbo@163.com)

Abstract: Objective The purpose of this study was to culture and identify neural stem cells from mouse embryos *in vitro* using a modified method and provide a basis for further study of the biology of neural stem cells under hypoxia. **Methods** The cells were isolated mechanically from the front cortex of fetal Institute of Cancer Research (ICR) mice on embryonic day 14. They were passaged by mechanical dissociation and enzymatic digestion. The neurospheres were identified by immunofluorescent staining of nestin. Cell differentiation was induced by 1% fetal bovine serum and then the cells were identified by immunohistochemistry of β -tubulin III and GFAP. **Results** The cells obtained from the front cortex of fetal ICR mice had the capacity of forming neurospheres which showed nestin immunoreactive positivity. After being induced by 1% fetal bovine serum, the cells were differentiated into β -tubulin III-positive cells and GFAP-positive cells. **Conclusions** Using mechanical dissociation of primary cells and mechanical dissociation with enzymatic digestion of primary cells, the NSCs from the front cortex of mouse embryos can be obtained.

[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (3):244-247]

Key words: Neural stem cells; Embryo; Cell culture; Mice

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)是中枢神经系统内具有自我更新能力和多向分化潜能的细胞^[1-2]。现已发现,多种类型的中枢神经系统损伤后, NSCs 被激活并有利于组织的损伤修复和功能恢复^[3-6]。因此,研究 NSCs 的生物学对于神经系统损伤修复和退行性病变的治疗具有重要意义^[7]。近年来, NSCs 体外培养中营养因子的添加方案趋于能够

够将不同组织来源的 NSCs 进行一体化培养,但代价昂贵、步骤繁琐。本研究利用孕 14 d 的美国癌症研究所(Institute of Cancer Research, ICR)小鼠前脑皮质细胞,采用机械法分离原代细胞进行培养和鉴定,机械法复合酶消化法对原代细胞进行传代培养和鉴定,拟改进和优化胚胎小鼠 NSCs 的分离培养方法,为后续研究 NSCs 的生物学行为奠定基础。

[收稿日期]2010-08-12;[修回日期]2010-11-17
[基金项目]国家自然科学基金资助项目(No. 30772081, No. 81071071);教育部"新世纪优秀人才支持计划"(No. NECT-08-0436);陕西省科技计划项目[2007K15-01(17)]。
[作者简介]张蓬勃,男,博士,副主任医师。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂

孕14 d的ICR小鼠,由西安交通大学医学院动物实验中心提供。DMEM/F12(1:1)培养基(GIBCO, USA), bFGF(GIBCO, USA), EGF(GIBCO, USA), N2添加剂(GIBCO, USA), B27添加剂(GIBCO, USA), 胎牛血清(Thermo, USA), 兔抗小鼠 nestin(Millipore, USA), 兔抗小鼠 β -tubulin III(Millipore, USA), 兔抗小鼠 GFAP(Neomarkers, USA), FITC标记的山羊抗兔 IgG(北京中杉生物技术公司), TRITC标记的山羊抗兔 IgG(北京中杉生物技术公司), 多聚赖氨酸(SIGMA, USA)。

1.2 NSCs 分离及原代培养

将ICR孕鼠用10%水合氯醛麻醉后剖开腹腔, 无菌条件下取出胚胎置于冷0.01M PBS(pH 7.4)溶液中清洗2遍, 在DMEM/F12(1:1)培养基中剥离头皮及颅骨, 解剖显微镜下剥除脑膜。剪取部分前脑皮质置于另一含有少许冷DMEM/F12(1:1)容器中, 轻柔吹打30次, 1000 r/min离心6 min, 弃上清, 用NSCs培养基(DMEM/F12中含2% N2、1% B27、bFGF 20 ng/mL、EGF 20 ng/mL、肝素 25 μ g/mL、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 U/mL)重悬细胞, 以 2×10^5 /mL的密度将细胞接种于50 cm²玻璃培养瓶中, 24 h后追加1 mL NSCs培养基, 以后隔日半量换液, 培养4~6 d后传代, 培养条件为37℃, 5% CO₂浓度, pH 7.4。

1.3 NSCs 的传代培养

将原代培养形成的克隆球收集到离心管中, 600 r/min离心5 min, 弃上清, PBS冲洗, 再次离心后按每瓶细胞加入1 mL含0.01%的胰蛋白酶和200 μ M EDTA的复合消化液, 37℃消化5 min, 轻柔吹打30次, 加DMEM/F12(1:1)至10 mL终止消化, 1000 r/min离心6 min, 弃上清, 继续加DMEM/F12(1:1)培养基清洗一次, 离心, 弃上清, 加NSCs培养基重悬细胞, 调整细胞密度为 2×10^5 /mL。

1.4 神经球的鉴定

将NSCs克隆球收集于离心管中, 600 r/min离心5 min, 弃上清, PBS冲洗2次, 吸取少许滴于明胶处理过的载玻片上, 4%多聚甲醛固定20 min, 37℃烤干, 0.01 M PBS清洗后行nestin免疫细胞化学染色。步骤如下: PBS清洗后的细胞标本入2% H₂O₂ 10 min后, PBS洗3次, 每次5 min; 入0.3% Triton 30 min; PBS洗3次, 每次5 min; 正常羊血清

封闭30 min, 滴加兔抗小鼠 nestin(1:1000), 4℃孵育过夜, PBS洗3次, 每次5 min; 滴加FITC标记的山羊抗兔 IgG(1:200), 室温孵育4 h; PBS洗3次, 每次5 min; 滴加PI(1:1000), 室温孵育5 min; 0.01 M PBS洗3次, 每次5 min; 中性甘油封片, 激光共聚焦显微镜观察并照相。以PBS取代一抗作为阴性对照。

1.5 NSCs 的分化

将传代后的细胞种于放有多聚赖氨酸(10 μ g/mL)预处理玻片的24孔板中, 每孔加含1%胎牛血清的培养基500 μ L, 细胞总数以每孔 1×10^4 左右, 37℃, 5% CO₂浓度孵箱中孵育, 96 h后行 β -tubulin III(1:1000)、GFAP(1:400)的免疫细胞化学染色。除所用一抗、二抗不同和采用DAPI(1:1000)显示细胞核外其余步骤同上。

2 结果

2.1 NSCs 原代培养

分离来自孕14 d ICR小鼠前脑皮质的细胞接种于NSCs培养基后为单个圆形亮点(图1A); 培养24 h后, 可见大量形态不规则的细胞团以及部分贴于瓶壁生长的细胞(图1B), 3~4 d后, 细胞团生长为克隆球, 大小不一, 呈球形, 无突起, 悬浮生长, 折光性好(图1D)。

2.2 NSCs 传代培养

原代生长的克隆球经过酶消化后成为单细胞(图1E), 随着时间推移逐渐分裂形成新的克隆球(图1F~H), 说明分离的细胞能够自我更新和复制, 并有可传代培养的能力。

2.3 克隆球的 nestin 免疫荧光染色

免疫荧光染色结果显示, 克隆球内细胞浆被染成绿色, 而细胞核被PI染成红色, 说明克隆球细胞呈nestin免疫反应阳性(图2A), 提示体外培养的细胞为NSCs。

2.4 NSCs 的分化结果

将培养的细胞用分化培养基重悬, 以100 μ L的体积滴于玻片上, 2 h后倒置相差显微镜下观察到细胞贴于玻璃片上, 补全分化培养基至500 μ L。24 h后细胞表面发生突起, 并随着时间推移突起逐渐增多变长, 不同细胞的突起彼此相互交联成网(图2C), 96 h后进行免疫荧光染色显示, 培养的细胞呈GFAP(图2B)或 β -tubulin III(图2D)免疫反应阳性, 提示培养的细胞分化为星形胶质细胞和神经元。

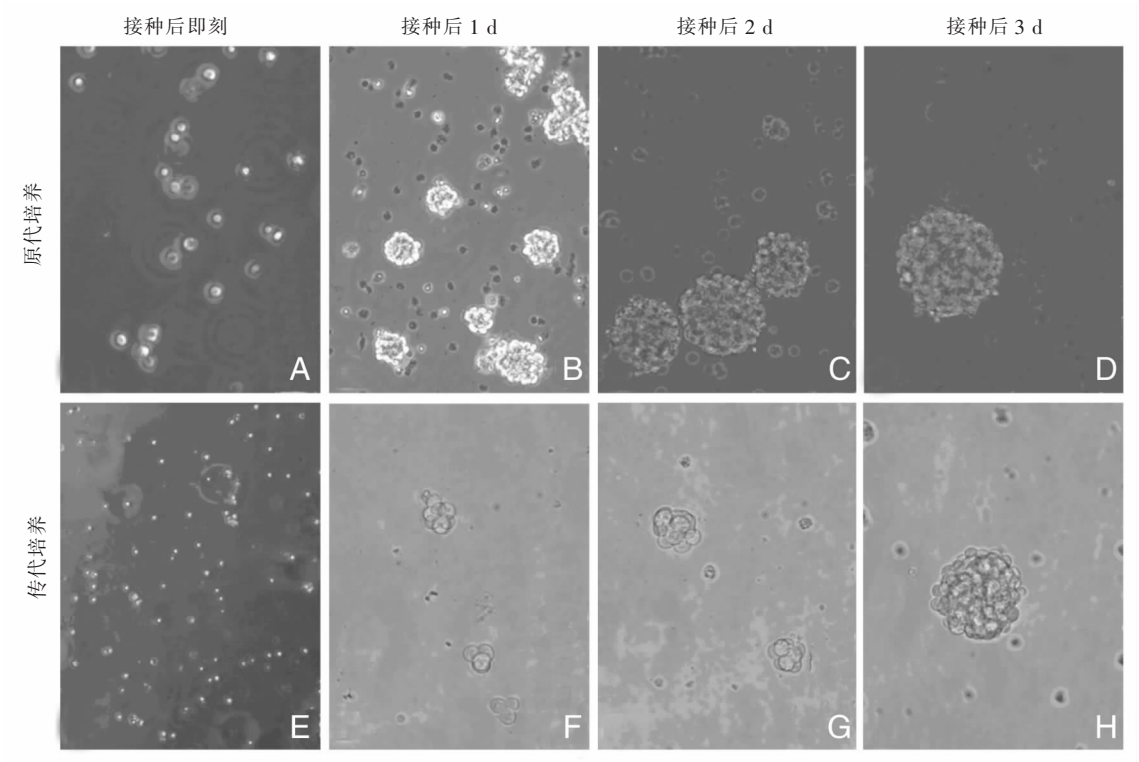


图 1 培养细胞的倒置相差显微镜观察 A:细胞分离后接种于培养基中(×20);B:细胞培养 1 d(×20);C:细胞培养 2 d(×20);D:细胞培养 3 d(×20);E:细胞传代后接种于培养基中(×10);F:细胞传代后培养 1 d(×40);G:细胞传代后培养 2 d(×40);H:细胞传代后培养 3 d(×40)。显示培养的细胞具有形成"克隆球"的能力,提示分离培养的细胞为 NSCs。

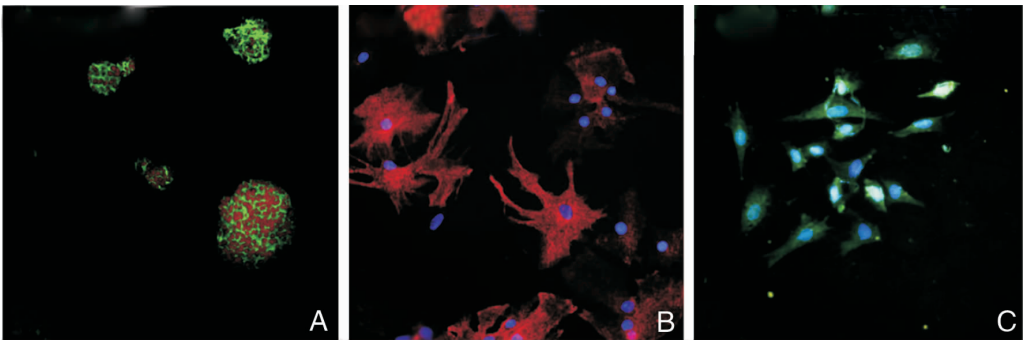


图 2 培养细胞的鉴定结果 A:克隆球细胞呈 nestin 免疫反应阳性(×20);B:培养的细胞呈 GFAP 免疫反应阳性(×40);C:培养的细胞呈 β -tubulin III 免疫反应阳性(×40)。

3 讨论

NSCs 拥有自我更新倾向并能在体外培养条件下形成“神经球”,它可能为中枢神经系统损伤,如脑缺血和缺氧的修复提供新策略^[8]。本研究以 Reynolds 等^[9] 1992 年建立的 NSCs 培养方法为基础,以小鼠胚胎前脑皮质为来源,并改进和优化操作方法,培养获得了较纯的、能够快速增殖的多潜能

NSCs。Nestin 是第六种中间纤维蛋白,特异性的表达于神经外胚层,在干细胞增殖旺盛的阶段大量表达,对维持 NSCs 的多分化潜能有重要意义^[10-11],本研究发现,培养的神神经球细胞表达 nestin。GFAP 是星形胶质细胞内特有的骨架蛋白,属中间丝的一种成分,被公认为星形胶质细胞的特征性标志物^[12],而 β 微管蛋白(β -tubulin-III)是神经元中含量最多的蛋白^[13]。本研究采用分化培养基培养传代的细胞,贴壁后得到 GFAP 阳性或 β -tubulin III 阳性细胞,说明培养的细胞表达 NSCs 的标志并具有良好的

的向星形胶质细胞和神经元分化的潜能。

体外培养条件下, NSCs 的行为受多种因素, 如来源物的种属和生长发育时期、生长介质、传代方法等的影响^[1]。近年来, NSCs 培养中营养因子的添加方案趋于能够将胚胎鼠、新生鼠、成年鼠的 NSCs 进行一体化培养, 但代价极其昂贵。鉴于胚胎鼠 NSCs 相对新生鼠尤其是成年鼠更易存活, 本研究选择了培养小鼠胚胎 NSCs; 同时在原代培养中, 舍弃了腐氨等非必须的添加物对胚胎鼠 NSCs 的影响并去除了繁琐的酶消化方法。此外, 在培养细胞的分化实验中, 常用 1% ~ 10% 的血清进行诱导, 目的是为了细胞易于贴壁, 但高浓度血清有促进干细胞向胶质细胞方向分化的能力, 干扰正常的细胞分化比例, 本研究采用最低的血清浓度以尽量减轻其对分化表型比例的影响。对于 NSCs 的传代方法, 主要有机械法和酶消化法^[12, 14], 这两种方法各有其优缺点。酶消化法步骤繁琐, 耗时长, 涉及多次离心、洗涤使得细胞在不同的器皿中转移, 损失与损伤颇大且酶对细胞的伤害较大, 使得分离后的细胞状态恢复较慢, 24 h 后观察可见一个细胞分裂为几个的不规则球体, 甚至很多细胞仍维持单细胞形态; 机械分离法步骤简单, 损失损伤细胞都较少, 分离后的细胞状态恢复快, 24 h 后常见到很多细胞聚集在一起形成的细胞球, 缩短了传代所需时间, 减少了为提高 NSCs 比例而提高传代次数所需时间太长的影响, 更容易大规模快速扩增细胞。酶消化法更适合结构致密的组织或是准备处理前的一次传代, 容易得到单细胞, 以利于干预因素均衡的作用在所有细胞上, 减少差异; 而靠机械分离不容易将细胞剥下来, 加大吹打力度会对细胞损伤较大。本研究在原代培养及第一次传代时采用的是机械分离法, 第二次传代时采用酶消化法, 结果显示, 传代的细胞保持了 NSCs 的特性。

综上所述, 本实验通过改进和优化操作方法, 成功分离培养了小鼠胚胎前脑皮质的 NSCs, 为后续研究低氧条件下 NSCs 的生物学行为以及药物干预的影响提供基础。

[参 考 文 献]

- [1] Gage FH. Mammalian neural stem cells[J]. Science, 2000, 287(5457): 1433-1438.
- [2] Ma W, Fitzgerald W, Liu QY, O'shaughnessy TJ, Maric D, Lin HJ, et al. CNS stem and progenitor cell differentiation into functional neuronal circuits in three-dimensional collagen gels[J]. Exp Neurol, 2004, 190(2): 276-288.
- [3] Zhang P, Liu Y, Li J, Kang Q, Tian Y, Chen X, et al. Cell proliferation in ependymal/subventricular zone and nNOS expression following focal cerebral ischemia in adult rats[J]. Neurol Res, 2006, 28(1): 91-96.
- [4] Nakayama D, Matsuyama T, Ishibashi-Ueda H, Nakagomi T, Kasahara Y, Hirose H, et al. Injury-induced neural stem/progenitor cells in post-stroke human cerebral cortex[J]. Eur J Neurosci, 2010, 31(1): 90-98.
- [5] Kernie SG, Parent JM. Forebrain neurogenesis after focal Ischemic and traumatic brain injury[J]. Neurobiol Dis, 2010, 37(2): 267-274.
- [6] Alagappan D, Lazzarino DA, Felling RJ, Balan M, Kotenko SV, Levison SW. Brain injury expands the numbers of neural stem cells and progenitors in the SVZ by enhancing their responsiveness to EGF[J]. ASN Neuro, 2009, 1(2): Pii: e00009.
- [7] Richardson RM, Singh A, Sun D, Fillmore HL, Dietrich DW 3rd, Bullock MR. Stem cell biology in traumatic brain injury: effects of injury and strategies for repair[J]. J Neurosurg, 2010, 112(5): 1125-1138.
- [8] Qu Q, Shi Y. Neural stem cells in the developing and adult brains[J]. J Cell Physiol, 2009, 221(1): 5-9.
- [9] Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system[J]. Science, 1992, 255(5052): 1707-1710.
- [10] Zhang P, Li J, Liu Y, Chen X, Kang Q. Transplanted human embryonic neural stem cells survive, migrate, differentiate and increase endogenous nestin expression in adult rat cortical peri-infarction zone[J]. Neuropathology, 2009, 29(4): 410-421.
- [11] 周细中, 封志纯, 王斌, 安舰, 李进. 人胎脑 Nestin 阳性神经元的发育[J]. 中国当代儿科杂志, 2003, 5(4): 311-313.
- [12] 胡继良, 姜晓丹, 邹雨汐, 郭燕舞, 周德祥, 徐如祥. 成年小鼠脑室下区神经干细胞培养与鉴定体系的建立[J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(11): 1942-1946.
- [13] Sun L, Lee J, Fine HA. Neuronally expressed stem cell factor induces neural stem cell migration to areas of brain injury[J]. J Clin Invest, 2004, 113(9): 1364-1374.
- [14] 胡燕荣, 陈刚, 魏雁, 万虹, 历俊华, 常文菊, 等. 鼠胚胎神经干细胞的体外培养及诱导分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(19): 3651-3655.

(本文编辑: 王霞)