

大鼠胚胎神经干细胞单克隆化及单层化培养和鉴定

丁道芳¹⁾ 邢三丽²⁾ 周鸣鸣¹⁾ 宋后燕^{1)*}

(¹⁾复旦大学分子医学教育部重点实验室, 上海 200032; (²⁾复旦大学神经生物国家重点实验室, 上海 200032)

摘要 采用原代培养 SD 胎鼠神经干细胞, 在形成神经球之后, 传代至 0.1%明胶包被的培养皿, 显微镜下挑取一个神经球贴壁后的细胞团, 吹打后贴壁培养. 同样方法挑细胞团并传代培养 5~6次, 得到纯化的由一个神经干细胞扩增的克隆, 对得到的神经干细胞进行鉴定以及分化能力的评估, 证明得到的细胞就是神经干细胞. 结果表明, 成功分离了 SD 胎鼠的神经干细胞, 进行单克隆化单层培养, 神经干细胞和分化后的细胞标志基因都可以检测到. 上述工作为疾病模型大鼠治疗及相关基础研究提供细胞来源及形态标准.

关键词 神经干细胞, 单克隆化, Nestin, Sox2, GFAP, Tuji
学科分类号 Q2-3

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00330

神经干细胞在神经发育和神经损伤修复疾病中发挥重要作用. 一直以来, 神经干细胞作为修复和代替受损脑组织的靶细胞来源, 能有效改善疾病症状. 除此之外, 外源基因转导至神经干细胞可用于颅内肿瘤和其他神经疾病的基因治疗. 神经干细胞对于判断药效及药物毒性等也发挥很重要的作用, 特别是对神经系统有毒性作用的药物, 利用神经干细胞培养技术可以观察到某些天然化合物和合成化合物的神经活性, 为发展小分子治疗药物提供理论基础.

神经干细胞通常以神经球的形式悬浮在无血清的培养基中生长, 但此种方式有其缺陷性. 首先, 形成球体的时候, 内部的细胞未能接触到培养基中抑制分化的因子和营养成分, 容易死亡和分化; 其次, 当研究某个基因功能的时候, 无法观察此基因对细胞形态是否有影响, 特别是促进分化和抑制分化相关基因, 无法观察细胞形态变化, 也无法消除干扰因素; 最后, 形成神经球的细胞有时不是单个细胞增殖而来, 所以对实验数据的可靠真实性有很大的影响. 为此有必要对悬浮生长的神经干细胞球进行驯化贴壁生长. 由于神经干细胞球贴壁后比较容易分化, 所以必须进行单克隆单层化扩大培养, 并且对扩大培养的细胞进行鉴定.

目前所建立神经干细胞的单层单克隆化培养仅有两篇报道^[1,2], 分别为人和小鼠神经干细胞的单层培养, 而且人和小鼠的神经干细胞均来自于胚胎

干细胞的分化. 本研究是首次从胎鼠中分离得到神经干细胞进行单克隆化单层培养, 在研究和实际应用方面来说, 从胎鼠中分离得到的神经干细胞更具有价值, 同时本文也进一步说明不同来源的不同种属的神经干细胞同样适用于贴壁单克隆化培养.

1 材料和方法

1.1 试剂

DMEM/F12、Neurobasal 培养基以及 N2 和 B27 购自 Gibco 公司, 表皮生长因子(EGF)及碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)购自 Peprotech 公司, DAPI、明胶购自 Sigma 公司, 兔来源的 Sox2 多克隆抗体、小鼠来源的单克隆抗体 Nestin、GFAP 和 Tuji 购自 Chemicon 公司.

1.2 细胞培养

取青春期 SD 大鼠一雌一雄合笼让其交配, 次日观察是否有白色的精栓形成, 若有记为孕 0.5 d. 至孕 12 d 取胎鼠, 脱臼处死, 75%乙醇喷洒躯干部位. 腹部“T”形切口, 拉出“Y”形的子宫, 可见胚胎成串珠样排列, 子宫颈处剪断, 置于 10 cm 培养皿中, PBS 反复冲洗去除血细胞. 细胞操作台上, 眼科剪小心剪开子宫, 取出胚胎, 去除胎盘和胞衣, 在解剖镜下轻轻固定住胚胎, 用眼科

* 通讯联系人.

Tel: 13512197411, E-mail: ximeng2876@sina.com

收稿日期: 2008-05-05, 接受日期: 2008-08-25

镊子夹取头部的组织, PBS 冲洗数次, 眼科剪刀稍微剪碎组织, 用吸管吹打 20 min 左右, 经过 200 目滤网过滤, 1 000 r/min 离心 5 min, 加入神经干细胞培养基 (N2B27 + DMEM/F12 + Neurobasal), bFGF 和 EGF 的浓度为 10 μ g/L. 培养至第 2、3 天时, 看到由几个细胞形成的球体, 隔天换液, 去除细胞碎片和死细胞, 一周左右有典型的神经球形成.

1.3 不同代数神经干细胞的阳性率检测

由于神经干细胞在低代数培养时具有相互聚集成团及贴壁后的细胞生长相互交错的特性, 因此为便于检测不同代数神经干细胞的百分比阳性率, 在神经干细胞 P1、P3 和 P5 挑克隆时以尽可能低的密度接种及明胶包被 24 孔板, 传代后约 6~8 h 进行 Nestin 细胞免疫荧光阳性率检测. 用 4%多聚甲醛室温固定 15 min, PBS 漂洗 3 次, 用 5%BSA 的封闭液(含 0.2%Triton X-100)室温封闭 1 h 后, 加入鼠来源的 Nestin 抗体(1:200), 37 $^{\circ}$ C 作用 2 h, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min, 加入 TRITC 标记的抗小鼠二抗(1:200), 避光 37 $^{\circ}$ C 反应 1 h, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min, 接着用 DAPI 染色, 室温 5 min, PBS 漂洗, 荧光显微镜观察拍照.

1.4 单克隆化单层培养神经干细胞

预先将 3.5 cm 培养皿用 0.1%明胶室温包被 1 h, 每个培养皿里, 吸取几个神经干细胞球置于其中, 24 h 后贴壁, 神经球内细胞碎片和死细胞漂浮在培养基中, 进行换液去除, 等贴壁神经球长大些, 显微镜下挑单个贴壁的神经球记为 P1 代, 用 10 μ l 的移液管头(eppendorf)进行吹打, 尽量使其成为单细胞悬液, 补足完全培养基至 2 ml 培养在明胶包被的培养皿里, 此时神经干细胞仍相互聚集成球贴壁, 再进行第 2 次的挑克隆, 尽量挑取小克隆. 反复进行此操作 4~5 次, 第六代时仍有部分成团贴壁, 但比起第二代明显细胞团变小, 第十代的神经干细胞不再自发聚集成团, 已经由神经球驯化成单层贴壁培养的神经干细胞. 高倍镜下观察到单个神经干细胞短小, 呈杆状.

1.5 神经干细胞鉴定

将培养所需要的神经干细胞以 1×10^5 的密度接种在含有盖玻片的 24 孔板中, 48 h 后, 进行细胞免疫荧光检测, Nestin 检测如方法 1.3, 二抗用 FITC 标记的小鼠二抗. Sox2 多抗检测神经干细胞免疫荧光同 Nestin, 二抗为 TRITC 标记的抗兔二抗.

1.6 神经干细胞分化潜能的鉴定

对得到的单层培养的神经干细胞进行简单的分化, 利用神经干细胞的增殖速度很快和易分化特性, 传代的第 3 天开始不换液, 至第 5 天进行检测, 方法如下: 爬片的细胞固定晾干后, 进行细胞免疫荧光检测, 具体方法如 1.3, 一抗分别为鼠来源的抗 GFAP 1:200 和鼠来源的抗 Tuji 1:200, 二抗分别为 TRITC 和 FITC 标记的抗小鼠二抗, 与 DAPI 进行免疫荧光双标, 甘油封片, 荧光显微镜观察.

2 结 果

2.1 细胞培养

神经干细胞原代培养第 2 天就有部分克隆球形成, 一周后克隆球增多增大, 细胞形态规则, 折光性强, 如图 1.

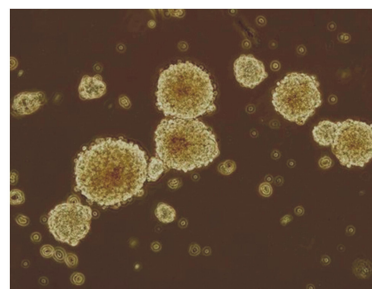


Fig. 1 Neurospheres

Isolated from the brain of rat embryos, culturing in DMEM/F12+N2B27 with 10 μ g/L bFGF and 10 μ g/L EGF.

2.2 不同代数神经干细胞的阳性率

神经干细胞 P1、P3 和 P5 代进行 Nestin 阳性率的检测, 阳性率随着神经干细胞单克隆化培养而提高, 分别约为 67%, 80%, 99%, 如图 2a~c.

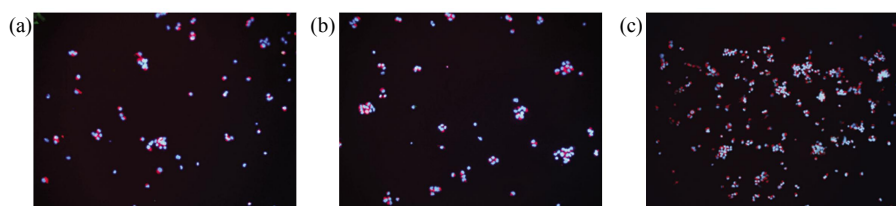


Fig. 2 The cyto-immunofluorescence detection of Nestin from different passages of neural stem cells

(a, b, c) The percentage of Nestin-positive cells is about 67%, 80% and 99% at P1, P3 and P5 respectively.

2.3 单克隆及单层化培养神经干细胞

神经干细胞第一代贴壁以单个球贴下去甚至几个球粘连一起贴壁, 形态类似胚胎干细胞, 边缘界线清楚, 需及时挑出来机械传代培养(图 3a). 镜下挑取克隆, 在挑过的地方, 残留一些如成纤维一类的杂细胞, 第二和第三代机械吹散神经干细胞仍会相互聚集成团贴壁(图 3b). 至第六代时仍有部分球相互聚集成团贴壁(图 3c), 至第十代时基本被驯化成网状生长的单层培养的神经干细胞(图 3d).

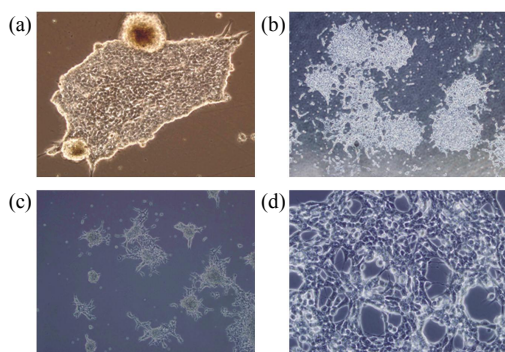


Fig. 3 Monolayer culture of the neural stem cells

(a) Neurosphere adhere to the dish coated with 0.1% gelatin. (b) Picking up single clone from (a) under microscope and passaging mechanically. (c) Repeating (b), Neural stem cells still form the neurospheres, but the size is smaller than former by passaging. (d) Neural stem cells at P10 are monolayer cultured.

2.4 神经干细胞的鉴定

对驯化贴壁单层培养的神经干细胞进行其标志基因 Sox2 和 Nestin 表达的检测, 分别对其进行 DAPI 染核及 Merge 后观察蛋白质表达的位置. 从图 4a~c, d~f 可以看出, Sox2 在细胞核中表达, 而 Nestin 在细胞浆中表达. Nestin 和 Sox2 的检测阳性率均为 100%.

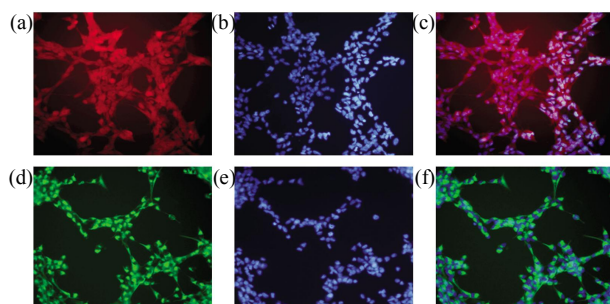


Fig. 4 Identification of neural stem cells

(a) Sox2 immunostained images of neural stem cells in monolayer culture. (b) DAPI. (c) Merge (a) and (b). (d) Nestin immunostained images of neural stem cells in monolayer culture. (e) DAPI. (f) Merge (d) and (e).

2.5 神经干细胞分化及鉴定

培养中的神经干细胞在培养基中 bFGF 和 EGF 逐步消耗的情况下, 会自发向胶质细胞和神经元细胞分化, 从图 5a 可以看出, 分化后的细胞形态和神经干细胞有明显的差别, 主要是向纤维细胞形状的胶质细胞和少量的神经元细胞分化, 图 5b~g 是对这两种细胞进行细胞免疫荧光检测的结果.

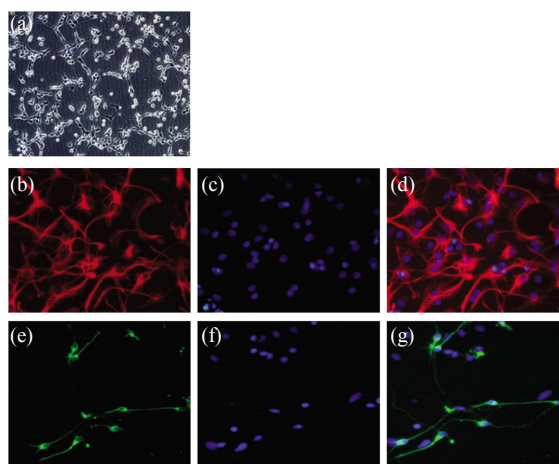


Fig. 5 Neuronal and glial differentiation in monolayer culture

(a) Phase contrast. (b) GFAP immunostained images of astrocytes generated from by the monolayer culture of neural stem cells. (c) DAPI. (d) Merge (b) and (c). (e) Tuji immunostaining of neurons generated by the monolayer culture of neural stem cells. (f) DAPI. (g) Merge (e) and (f).

3 讨 论

神经干细胞从来源上分, 主要有胚胎干细胞经过拟胚体在维甲酸(RA)作用下分化得到^[1], 其次从哺乳动物胚胎^[3~5]和成年^[6~9]的大脑中分离培养得到, 最后是来源于血液系统的骨髓间质干细胞^[10]、成年多能祖细胞^[11]及脐血细胞^[12]. 发育上来自外胚层的神经前体细胞由于具有自我更新能力和多向分化的潜能^[13], 这种特性和胚胎干细胞相近, 因此, 神经干细胞在治疗的应用上具有相当重要的地位, 神经干细胞不正常的分化会导致神经元和神经胶质细胞比例失调, 造成神经系统发育缺陷, 同时很多神经系统的疾病是因为某种神经细胞的数量不足或者是某些基因功能缺失导致, 因此把神经干细胞分化为特定类型的神经细胞或者用转基因的神经细胞来进行移植治疗, 如神经退行性疾病老年痴呆症, 可以把神经干细胞直接进行体内移植. 所以作为治疗应用的原始来源细胞, 很有必要得到纯化的单层化单克隆培养的神经干细胞.

本课题是首次进行大鼠的神经干细胞(NSC)单克隆化的贴壁培养, 目前, 国内所有的有关大鼠神经干细胞方面研究的文章都是在神经干细胞球上开展的. 正常情况下从胎鼠脑内取到的原代 NSC, 在离体的培养条件下, 会自发形成球体, 神经球内含有 NSC、正在分化的神经前体细胞、凋亡细胞, 甚至已分化的神经元和胶质细胞及其他杂细胞等. 本文检测了第一、第三和第五代神经球的 Nestin 的阳性率, 分别为 67%、80%和 99%, 说明早期的神经球不是细胞成分单一的球体, 同时也说明单克隆化单层培养是有效的得到纯神经干细胞的方法. 本课题参照以前对小鼠胚胎干细胞来源的 NSC 贴壁生长培养方法和条件^[1], 及最近发表的人胚胎干细胞来源的 NSC 的贴壁培养条件和方法^[2], 简单地建立了单克隆大鼠 NSC 干细胞的贴壁培养, 同时对神经干细胞中特异性表达的基因 Sox2 和 Nestin^[14]进行鉴定, 在单克隆化扩增的细胞检测结果几乎 100%阳性, 说明单克隆扩增的后代细胞比较均一. 利用神经干细胞的易自发分化特性, 自发分化为神经胶质细胞和神经元细胞, 分别对其特异性表达基因进行检测, 结果显示, 90%以上分化为神经胶质细胞, 其余的基本上分化为神经元细胞, 说明单克隆化培养的神经干细胞具有分化潜能.

本研究重在从方法学上建立大鼠的 NSC 贴壁培养, 通过对神经干细胞不同代数的标志基因的阳性率检测, 和分化后的胶质细胞及神经元细胞的标志基因的检测, 说明单克隆单层培养神经干细胞是一种有效的方法. 神经干细胞对环境的依赖性比较强, 各种因素都会引起分化和形态的变化, 此种方法为以后的神经干细胞在基础研究方面提供形态学标准. 在临床实际应用上也发挥很重要作用, 临床药物的筛选通常用到干细胞, 人的胚胎干细胞由于受伦理的限制无法应用于药物的筛选, 小鼠的胚胎干细胞虽然已经建株成功并得到深入的理论研究, 但作为药物筛选的靶细胞, 由于和人的生理特性方面有很大区别, 还远远达不到要求. 相对来说, 大鼠在生理药理以及毒理方面和人很接近是很理想的药物筛选靶细胞, 但大鼠的胚胎干细胞由于种种原因未建株成功, 因此大鼠神经干细胞是很有希望的替代, 有望在神经药物方面起筛选作用.

参 考 文 献

- 1 Ying Q L, Stavridis M, Griffiths D, *et al.* Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat Biotechnol*, 2003, **21** (2): 183~186
- 2 Daadi M M, Maag A L, Steinberg G K. Adherent self-renewable human embryonic stem cell-derived neural stem cell line: functional engraftment in experimental stroke model. *PLoS ONE*, 2008, **3** (2): e1644
- 3 Johe K K, Hazel T G, Muller T, *et al.* Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev*, 1996, **10** (24): 3129~3140
- 4 Vescovi A L, Parati E A, Gritti A, *et al.* Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human neural stem cell lines by epigenetic stimulation. *Exp Neurol*, 1999, **156** (1): 71~83
- 5 Uchida N, Buck D W, He D, *et al.* Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(26): 14720~14725
- 6 Weiss S, Dunne C, Hewson J, *et al.* Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci*, 1996, **16** (23): 7599~7609
- 7 Gritti A, Parati E A, Cova L, *et al.* Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J Neurosci*, 1996, **16** (3): 1091~1100
- 8 Palmer T D, Takahashi J, Gage F H. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci*, 1997, **8** (6): 389~404
- 9 Johansson C B, Momma S, Clarke D L, *et al.* Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell*, 1999, **96** (1): 25~34
- 10 Sanchez Ramos J, Song S, Cardozo Pelaez F, *et al.* Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*. *Exp Neurol*, 2000, **164** (2): 247~256
- 11 Jiang Y, Jahagirdar B N, Reinhardt R L, *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 2002, **418** (6893): 41~49
- 12 Chen J, Sanberg P R, Li Y, *et al.* Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke*, 2001, **32** (11): 2682~2688
- 13 Glaser T, Pollard S M, Smith A, *et al.* Tripotential differentiation of adherently expandable neural stem (NS) cells. *PLoS ONE*, 2007, **2** (3): e298
- 14 Lendahl U, Zimmerman L B, McKay R D. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*, 1990, **60** (4): 585~595

The Monolayer Culturing of The Neural Stem Cell Clone and Its Qualification

DING Dao-Fang¹⁾, XING San-Li²⁾, ZHOU Ming-Ming¹⁾, SONG Hou-Yan^{1)*}

¹⁾The Key Laboratory of Molecular Medicine, The Ministry of Education, Fudan University, Shanghai 200032, China;

²⁾State Key Laboratory of Medical Neurobiology, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract The primary neural stem cells were isolated from SD rat and formed the neurospheres, the neurospheres were passaged and planted on the dish coated with 0.1% gelatin, the colony was picked up under the microscope, then dispersed and cultured, to obtain the clone proliferated from one cell, passaging and picking up the cells 5~6 times at least. The NSC and its differentiated cells were identified with the marker genes respectively. The results showed that the neural stem cells were isolated from the SD rat embryos and the real clone were obtained by picking up the cells again and again, and then cultured in the form of monolayer. The marker genes of the neural stem cells and its differentiated cells could be detected at last. It will provide the rat model the resource of the cells for the treatment and the basic research for the morphology standard.

Key words neural stem cells, cloning, Nestin, Sox2, GFAP, Tuji

*Corresponding author.

Tel: 13512197411, E-mail: ximeng2876@sina.com

Received: May 5, 2008 Accepted: August 25, 2008