

小鼠胚胎神经干细胞的体外培养及增强型绿色荧光蛋白基因转染研究*

武 强¹ 李露斯¹ 范文辉^{1,3} 杨 忠²

摘要 目的:探索小鼠胚胎神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的体外培养,探讨 NSCs 作为基因靶细胞,以及增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)标记 NSCs 的可行性。**方法**:胚胎小鼠脑组织分离神经干细胞,无血清细胞培养,免疫细胞荧光染色技术鉴定。Nucleofector™ 转染仪将增强型绿色荧光蛋白基因转入 NSCs,用 G418 筛选,在荧光显微镜下观察并挑选 EGFP 表达最强的克隆,并做免疫荧光鉴定及诱导分化细胞的鉴定。**结果**:从胚胎小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神经细胞和星形胶质细胞特异性的蛋白。增强型绿色荧光蛋白报告基因转染神经干细胞后能高效表达,且不影响其增殖、分化能力。**结论**:小鼠胚胎神经干细胞能够在体外适宜的条件下进行长期培养;神经干细胞可直接作为基因靶细胞;转染 EGFP 的神经干细胞表达稳定且对 NSCs 的增殖和分化无明显影响。

关键词 神经干细胞;增强型绿色荧光蛋白;转染

中图分类号:R338, R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2006)-10-0877-02

A study on culture of mice embryonic neural stem cells in vitro and transfection of enhanced green fluorescent protein/WU Qiang, LI Lusi, FAN Wenhui, et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006, 21 (10):877-878

Abstract **Objective**: To explore the culture of mice embryonic neural stem cells (NSCs) in vitro and the feasibility of NSCs being gene target cells and enhanced green fluorescent protein (EGFP) labeling NSCs. **Method**: The NSCs were isolated from brain tissue of embryonic mice, then cultured in serum free medium, and identified by immunocytochemistry. EGFP were transferred into NSCs by Nucleofector™. After selected by G418, the colonies with the best expression of EGFP were observed and selected using fluorescence microscope, and identified with immunocytochemistry technology. **Result**: The neural stem cells isolated newborn mice had the potential to form clones, express neuroepithelial stem cell protein (nestin) and differentiate into mature neurons and astrocytes. Moreover, enhanced green fluorescent protein vector could be efficiently transfected into this cell line. The capacity of self-renewal, proliferation and pluripotentiality of NSCs-EGFP were consistent with those of NSCs. **Conclusion**: The NSCs originated from brain tissue of embryonic mice can be cultured in vitro under appropriate conditions, and it can be directly used as gene target cells. Moreover, the biological features of the NSCs expressing EGFP were consistent with those of NSCs, which can be further applied for the transplantation study of labeling cells.

Author's address Dept. of Neurology, Southwest Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400038

Key words neural stem cells; enhanced green fluorescent protein; transfection

神经干细胞是一群具有自我更新、自我增殖和多向分化潜能的细胞^[1], 它的发现为人类深入研究中枢神经系统的发育、分化及探索治疗神经系统疾病的新途径开辟了新的思路^[2]。鉴于神经干细胞移植后能在宿主脑内定向迁移, 如何追踪移植的神经干细胞并分析其分化, 一直是研究的热点与难点^[3]。绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)由水母中克隆得到, 增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)是其人工改造型, 有其独特的优势, 是目前细胞生物示踪剂研究中的一种重要手段^[4-5]。本实验分离培养了胚胎小鼠神经干细胞,

并以 EGFP 标记神经干细胞, 探索其可行性, 为进一步做标记细胞移植研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30100058)

1 第三军医大学附属西南医院神经内科, 重庆, 400038

2 第三军医大学神经生物教研室

3 通讯作者: 范文辉(第三军医大学附属西南医院神经内科, 重庆, 400038)

作者简介: 武强, 男, 副主任医师, 在读博士

收稿日期: 2006-01-16

二级昆明孕小鼠(E12-13)由本校实验动物中心提供,DMEM/F12、胎牛血清、bFGF、B27(Gibco 公司),山羊抗小鼠 Nestin 抗体、兔抗小鼠 GFAP 抗体(Santa 公司),小鼠抗小鼠 MAP-2 抗体(Santa 公司),罗丹明标记山羊抗小鼠二抗、罗丹明标记山羊抗兔二抗、FITC 标记山羊抗兔二抗、罗丹明标记兔抗山羊二抗(中山公司),pEGFP 质粒由第三军医大学组织胚胎学教研室惠玲博士惠赠,电穿孔仪、小鼠神经干细胞转染试剂盒(Amaxa 公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠胚胎神经干细胞的分离、培养与鉴定:将孕小鼠脱颈处死,立即置入 750ml/L 酒精浸泡 15min,在无菌条件下剖腹取出胎鼠,胎头放入含有 3ml 无血清 DMEM 培养液的培养皿中。随后在解剖显微镜下分离胎鼠大脑皮质并剥离胎膜及血管,用眼科剪将组织块进一步剪碎。其后将上述脑组织液用滴管吸入离心管中,反复吹打至肉眼下看不到组织块为止,并通过 200 目的筛网过滤,以去除粘连的组织纤维,将收集到的细胞悬液离心后,重悬于条件培养液,使最终细胞浓度达 $1 \times 10^8/L$,置入 $37^\circ C$ 、50ml/L CO_2 培养箱,6—7d 传代 1 次,细胞传代:50ml 培养瓶细胞数为 3×10^5 个,培养条件同前,6—7d 传代 1 次。将培养第 3 代的细胞滴在多聚赖氨酸处理过的盖玻片上,950ml/L 酒精固定 1h 后,0.1mol/L PBS 冲洗,30ml/L H_2O_2 灭活内源性酶,正常兔血清封闭。加入 Nestin 单抗(1:200),室温 1h,4 $^\circ C$ 过夜,用 PBS 漂洗后,其余步骤按免疫荧光方法常规操作。传至第三代的神经干细胞加入含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养液(无 bFGF、B27),使其诱导分化为神经细胞,其中神经元、星形胶质细胞则分别用抗 MAP-2 单抗、抗 GFAP 单抗来标记。所采用的荧光抗体为罗丹明标记山羊抗小鼠二抗、罗丹明标记山羊抗兔二抗、FITC 标记山羊抗兔二抗。

1.2.2 EGFP 转染神经干细胞及阳性克隆的筛选:收集第 3 代的神经干细胞数目为 4×10^6 — 5×10^6 ,800r/min,离心 5min,去上清,依次加入 100 μ l 小鼠神经干细胞转染液和 5 μ g EGFP 质粒,Nucleofector 转染仪转染,使用 A-33 程序,成功后种植于 6 孔培养板,每孔种植 1×10^6 个细胞,G418(300—500mg/L)筛选 5d,细胞传代培养后加入 10%含胎牛血清的培养液中使神经干细胞贴壁分化。同样进行 Nestin、MAP-2 及 GFAP 的染色。

2 结果

2.1 小鼠神经干细胞的培养及鉴定

采用上述分离方法所获得的胚胎小鼠神经干细胞培养 6—7d 后见细胞集落以球形或卵圆形居多,还可见桑葚状,这些克隆呈悬浮生长,生活能力强。经 Nestin 免疫荧光染色呈强阳性,整个克隆呈亮红色。在加入含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养液(无 bFGF、B27)12h 后可见多数细胞克隆贴壁,2d 后见少数细胞分化成有突起的细胞,3—4d 后分化细胞显著增加,以克隆球为中心向外围呈放射状排列。10—14d 后克隆球基本消失,取之为形态各异的分化细胞。对诱导 2—4d 的细胞分别进行了 GFAP、MAP-2 免疫荧光染色及双标染色(图 1—2,见前置彩色插页 8)。

2.2 EGFP 转染神经干细胞及其对诱导分化的影响

小鼠胚胎神经干细胞转染 EGFP 约 4h 后发出绿色荧光,48h 达到高峰,G418(300—500mg/L)筛选 5d,荧光显微镜下观察约 60—70%转染率,转染阳性的神经干细胞再进行 Nestin 染色呈亮红色。诱导分化 2—4d 后再行 GFAP、MAP-2 免疫荧光染色(图 3—10,见前置彩色插页 8)。

3 讨论

神经干细胞在神经系统损伤和神经退行性疾病的细胞替代治疗和基因治疗中有巨大的应用价值^[6]。本实验以昆明孕小鼠为研究对象,探索了小鼠神经干细胞的分离、培养、传代及其鉴定。从胚胎小鼠大脑中分离培养的细胞团,在特定的培养条件下,具有很强的分裂、增殖及自我更新能力。传代及冻存复苏后神经干细胞基本特征与原代相似。免疫组化表明培养的神经团表达神经干细胞特异性抗原 Nestin。成功分离、培养的神经干细胞,为神经干细胞的进一步研究提供了基本条件。

神经干细胞脑内移植后能发生广泛迁移,如何追踪移植的神经干细胞并观察其分化状态成为细胞移植中急需解决的问题^[7]。常规采用的方法是对移植细胞进行标记^[8],包括:①细胞核标记,如 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(Bromodeoxyuridine,5-BrdU)标记,但 5-BrdU 随着细胞的分裂信号会减弱;②胞浆标记,其潜在的问题可能是染色受体细胞被标记而造成假象,随时间推移染色信号减弱;③细胞膜相关标记,其缺点是必须使用免疫抑制剂,否则跨种系的移植不容易存活。采用基因转染将 EGFP 整合入神经干细胞内使其表达绿色荧光,可以很好地显示移植后神经干细胞的迁移过程。同时利用绿色荧光标记及神经元和胶质细胞特异性细胞标记的免疫双荧光染

(下转 892 页)