

·基础研究·

人胚神经干细胞的长期贴壁培养和鉴定*

祝 畅¹ 张传汉¹ 刘志恒² 桂伶俐¹ 高 峰¹

摘要 目的:探讨人胚神经干细胞的长期贴壁培养条件及传代方法。**方法:**在多种培养条件下,分别从9周和16周人胚脑中分离培养神经干细胞,应用免疫细胞化学的方法对所分离细胞的巢蛋白表达、自我更新能力和多向分化潜能进行鉴定。**结果:**采用高密度悬浮培养法能有效地从两种胚龄的人胚脑或室管膜下区中分离出神经干细胞,而采用贴壁培养法的人胚神经干细胞能保持干细胞的特性稳定增殖4个月。**结论:**从大小胚龄的人胚中均可成功分离培养人胚神经干细胞,贴壁培养的人胚神经干细胞能稳定增殖,是进一步进行人胚神经干细胞转基因研究的良好模型。

关键词 人胚胎;神经干细胞;细胞培养

中图分类号:R49, R741, R329 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2006)-04-0322-03

Long-term adhere-wall culture and identification of human embryonic neural stem cell/ZHU Chang, ZHANG Chuanhan, LIU Zhiheng, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006, 21(4): 322-324

Abstract Objective: To establish the method of long-term adhere-wall culture and passage of human embryonic neural stem cell. **Method:** By means of different culture methods, neural stem cells were isolated from human miscarried embryonic brain (embryonic age 9 weeks and 16 weeks). The capabilities of self-renew, nestin expression and multipotentiality of the neural stem cells were isolated and identified with immunocytochemical staining. **Result:** Human embryonic neural stem cell with the capabilities of self-renewing and multipotentiality can be isolated from the brain or subependyma of human embryo at different embryonic age by high concentration suspension culture. Neural stem cells possessed their characters and proliferated for 4 months stably by adhere-wall culture. **Conclusion:** Human embryonic neural stem cell can be isolated from human embryo of different embryonic age successfully. Human embryonic neural stem cells cultured by adhere-wall method can proliferate stably for a long time, which serve as a good model for transgenic research of human embryonic neural stem cell.

Author's address Dept. of Anesthesiology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430030

Key words human embryo; neural stem cell; cell culture

自1992年Raynoid发现神经干细胞(neural stem cells, NSC)^[1]以来, NSC已成为神经科学领域的研究热点,国内外学者对其在中枢神经系统发育中的作用,以及应用于神经损伤修复、神经退行性疾病的治疗等方面进行了大量的研究^[2], NSC作为基因治疗的载体有着广泛的应用前景和独特的优势。本实验拟从不同胚龄的人胚脑中分离培养出具有自我更新能力和多分化潜能的人胚NSC,建立人胚NSC长期悬浮及贴壁培养方法,为进一步研究NSC特性以及进行基因操作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Neurobasal培养基、B27无血清培养添加剂(Gibco公司),白血病生长抑制因子(Santa Cruz公司),碱性成纤维细胞生长因子、表皮生长因子(Pepro Tech公司),DMEM/F12、胎牛血清(Hyclone公司)。谷氨酰胺、5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)、0.01%多聚

鸟氨酸及明胶(Sigma公司)。抗巢蛋白(nestin)单克隆抗体、抗BrdU单克隆抗体、抗微管相关蛋白2(Microtubule-associated protein2, MAP2)抗体、抗神经胶质酸性蛋白(glia fibrillary acidic protein, GFAP)抗体、抗2,3-环核苷酸磷酸二酯酶(cyclic nucleotide phosphodiesterase, CNP)抗体(neomarkers公司),免疫组化染色试剂盒(北京中杉公司,货号SP-9000)。

1.2 人胚NSC的分离和原代培养

采用胚龄8—9周(5次独立试验)及胚龄16周(2次独立试验)水囊引产胎儿(试验遵守人类干细胞研究的伦理原则)。无菌条件下取孕9周水囊引产

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30300328)

1 华中科技大学同济医学院附属同济医院麻醉学教研室,武汉市解放大道1095号,430030

2 广东省深圳市第二人民医院麻醉科

作者简介:祝畅,女,研究生

收稿日期:2005-05-26

胎儿的大脑和延髓组织, 孕 16 周人胚标本的大脑室管膜下区及延髓组织, 除去软脑膜及血管, 加入 D-hank's 液, 机械吹打制成单细胞悬液, 离心 5min (800r/min) 去上清, 加入人胚 NSC 培养基 (成分为: Neurobasal 培养基添加白血病生长抑制因子、碱性成纤维细胞生长因子、表皮生长因子各 20ng/ml, 谷氨酰胺 2nmol/mL, 1×B27, 青、链霉素各 100U/ml), 台盼蓝染色计数, 调整细胞密度分别为 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 及 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 各种于 25cm^2 的培养瓶中, 置 37°C 、5% CO_2 细胞培养箱培养。

1.3 人胚 NSC 的传代及贴壁培养

原代培养出现大量悬浮人胚 NSC 球 (简称神经球) 后, 用吸管稍加吹打, 更换新鲜培养基并调整细胞密度, 一部分细胞继续悬浮培养, 另一部分细胞种入用 0.001% 多聚鸟氨酸和 0.2% 明胶包被的培养瓶中贴壁培养。根据细胞的生长状况, 悬浮 NSC 以机械吹打法传代。贴壁培养的 NSC, 当其生长接触率达 90% 时, 用胰蛋白酶消化法传代, 传代的 NSC 亦种入包被过的培养瓶中继续培养。

1.4 人胚 NSC 的鉴定及其分化

在培养 8—10 代的人胚 NSC 的培养液中加入 $10\mu\text{mol/L}$ 的 BrdU 或 5% 胎牛血清, 培养 7 天后, 无水甲醇固定; 应用抗 Nestin 及抗 BrdU 作为人胚 NSC 的初步鉴定, 应用抗 GFAP、MAP2 和 CNP 抗体检测其分化, SABC 法进行免疫细胞化学染色 (按免疫组化染色试剂盒产品说明操作)。

2 结果

2.1 不同初始密度及胚龄的原代人胚 NSC 的生长特性

原代培养的细胞接种后第一天便有少量细胞贴壁生长, 其他细胞聚集成不规则悬浮细胞团, 该细胞团经机械吹打或振荡易于分离。在以 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 密度进行的原代培养物中, 3 周后仅在取自 9 周人胚大脑皮层的培养物中形成少量神经球, 神经球由几十个至数百个细胞组成, 呈桑椹状。其余各低密度培养组均未见神经球形成。各高密度 ($1 \times 10^7/\text{ml}$) 培养组培养 10 天左右, 可见少量桑椹状神经球形成, 同时存在大量不规则悬浮细胞团片, 其中可见大量折光性强的细胞, 对该培养物进行轻柔的机械吹打, 细胞团片容易分散, 释放出大量悬浮神经球及其他杂细胞。用 0.25% 胰蛋白酶对这些不规则的细胞团片短暂消化, 除去部分活力较差的细胞及细胞碎片, 同时将细胞密度调整为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 左右, 神经球的形成和生长明显增快。传代后形成的神经球表面附着的杂

细胞少, 形态规则, 边界清晰, 折光性强 (图 1)。相同胚龄及培养密度的 NSC, 源自延髓的神经球形成较大脑晚 4—5 天, 且数量较少; 相同取材部位高起始密度培养的 NSC, 不同的胚龄对神经球的形成影响不明显。细胞聚集成不规则团片的现象在传代 1—2 次后消失。

2.2 人胚 NSC 的悬浮及贴壁培养

悬浮培养的人胚 NSC 用机械吹打法传代, 猛烈的吹打可造成大量细胞死亡, 而神经球形成后, 细胞间结合较紧密, 轻柔吹打不能将之有效分散。持续增殖的神经球直径可达 1mm 以上, 这类神经球外层的细胞折光性好, 增殖快, 而中心部分细胞折光性差, 呈棕黑色, 增殖慢, 细胞间界限不清。悬浮培养的人胚 NSC 培养至第 6 代时 (约 2 个月), 这类增殖不良的大神经球占较大比例, 人胚 NSC 整体表现为增殖受限, 细胞活力下降。

贴壁培养的人胚 NSC 可在诱导贴壁的次日见神经球附壁, 较多的梭形细胞开始从神经球的中心向周围放射状展开, 3—4 天可展开呈菊花状, 较小的神经球可展开成单层, 较大的神经球贴壁后, 中心部分仍含多层细胞 (图 2)。增殖的细胞不断从神经球中心向四周迁出, 神经球逐渐增大。胰酶消化法传代时, 神经球较易分散, 细胞死亡相对较少, 本实验室贴壁培养的人 NSC 已传至 15 代 (稳定培养 4 月余)。

2.3 人胚 NSC 的鉴定和分化

悬浮培养及贴壁培养的人胚 NSC, 培养基中加入 BrdU 7 天后, 经抗 nestin 及 BrdU 免疫细胞化学染色, 均显示阳性 (图 3—4)。

培养基中加入 5% 胎牛血清诱导分化, 24h 后细胞开始不断从悬浮培养的神经球迁出, 逐渐展开呈单层, 一周后细胞可分化为梭形、多角形等多种形态, 彼此交织呈网状。贴壁培养的神经球血清诱导分化后, 主要表现为细胞体积增大, 细胞形态由梭形为主趋向于多种细胞形态。一周后固定行免疫细胞化学染色, 可见 MAP2、GFAP 染色阳性的细胞 (图 5—6), 未见 CNP 染色阳性的细胞。

3 讨论

NSC 具有自我更新的能力和双向分化的潜能, 尤其是它能分化成神经元, 这种特殊的生物学性状, 使它在神经系统退行性变及中枢神经损伤患者的功能恢复等方面有着广泛的应用前景, 同时 NSC 在作为基因治疗的载体时也具有独特的优势^[3]。在欧洲, 源于胚胎组织的 NSC 已成功应用于帕金森病患者

图 1 悬浮培养的人胚 NSC 图 2 贴壁培养的人胚 NSC
(×200) (×200)

图 3 悬浮培养的人胚 NSC 图 4 贴壁培养的人胚 NSC
nestin 染色 (×200) BrdU 染色 (×200)

图 5 血清诱导分化后 GFAP 染色 (×800) 图 6 血清诱导分化后 MAP
II 染色 (×800)

的治疗,并取得一定疗效^[4],国内亦有将神经干细胞用于截瘫患者的相关研究^[5]。干细胞移植治疗能促进损伤大脑的内源性修复作用,帮助血管神经的再生及神经功能的重建^[6]。体外快速获得大量 NSC 是细胞移植治疗的一项关键技术^[7]。

有研究者发现,悬浮培养的 NSC 培养 1 个月以上,神经球内部分细胞即出现变性及分化的现象,分析原因,可能为细胞分裂因子难以进入直径较大的神经球内部所引起^[8]。本实验成功地从 9 周及 16 周胚龄的标本中分离培养出 NSC,发现用高密度悬浮原代培养,中等密度贴壁维持培养的方法可从大胚龄的人胚中成功分离并长期稳定培养 NSC,为细胞移植治疗提供充足的细胞来源。同时本实验参考国外学者采用层粘连蛋白包被贴壁培养来源于人的 NSC 的方法^[9],首次采用明胶及多聚鸟氨酸包被进行人胚 NSC 的贴壁培养,此种方法经济易行,在保持了人胚 NSC 自我更新和多向分化特性的同时,显著增加了细胞平均暴露面积,有利于 NSC 获取细胞分裂因子的充分刺激长期稳定增殖。同时 NSC 的贴壁培养,可为一些效率依赖于细胞平均暴露面积的转基因操作(如:脂质体法、各类病毒感染等)提供方便,有利于提高基因转移效率。

本实验根据 NSC 的三个基本属性对所培养的 NSC 进行了鉴定,包括表达 nestin 抗原的能力,分裂增殖能力和多分化潜能,证实本试验所培养的细胞为 NSC。人胚 NSC 分化时,可观察到具有少突胶质细胞形态特点的细胞,但免疫细胞化学染色并未观察到 CNP 染色阳性的细胞,国外的一些研究也得出了相似的结果。这可能是由于人胚 NSC 分化为少突胶质细胞数量极少,且并非所有的少突胶质细胞都

充分表达 CNP^[10],也有可能取材的时机及部位有关^[11]。

NSC 存在于胚胎期哺乳动物脑皮质、纹状体、海马、室管膜下层和中脑等区域,侧脑室附近的室管膜下区及海马是胚胎及成年哺乳动物神经系统中 NSC 最为集中的部位^[12]。本实验从小胚龄人胚的全脑皮层和较大胚龄人胚的室管膜下区分离得到了大量的神经球,同时发现从延髓分离的神经球数量较少,不易培养。NSC 分离培养的难易程度与 NSC 的分布密度一致。

本实验成功从大小胚龄的人胚分离培养人胚 NSC,同时建立了人胚 NSC 的长期贴壁培养方法,为进一步研究人胚 NSC 的特性及进行细胞移植治疗奠定了良好的基础。

参考文献

- [1] 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.
- [2] Galvin KA, Jones DG. Adult human neural stem cells for cell-replacement therapies in the central nervous system [J]. Med J Aust, 2002, 16,177(6): 316—318.
- [3] Ehteshami M, Kabos P, Gutierrez MA, et al. Induction of glioblastoma apoptosis using neural stem cell-mediated delivery of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand[J]. Cancer Res, 2002,62(24):7170—7174.
- [4] Barinaga M. Fetal neuron grafts pave the way for stem cell therapies[J]. Science, 2000, 287(5457):1421—1422.
- [5] 周青, 张世忠, 徐如祥, 等. 截瘫患者应用神经干细胞移植术后性功能的恢复: 3 例分析 [J]. 中国临床康复, 2004, 8(26):5478—5479.
- [6] Harvey RL, Chopp M. The therapeutic effects of cellular therapy for functional recovery after brain injury [J]. Phys Med Rehabil Clin N Am, 2003,14(1 Suppl):S143—S151.
- [7] 潘凤华, 丁新生, 杨渝珍. 人神经干细胞的研究现状及应用前景 [J]. 国外医学·物理医学与康复学分册, 2004, 24(4):186—187.
- [8] 唐少锋, 汤逊, 蔡景霞, 等. 人胚胎神经干细胞的分离培养及鉴定研究[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2003, 13(9):523—525.
- [9] Palmer TD, Schwartz PH, Taupin P, et al. Cell culture. Progenitor cells from human brain after death [J]. Nature, 2001, 411(6833): 42—43.
- [10] Uchida N, Buck DW, He D, et al. Direct isolation of human central nervous system stem cells [J]. Pnas, 2000, 97 (26): 14720—14725.
- [11] Temple S. The development of neural stem cells [J]. Nature, 2001, 414(6859): 112—117.
- [12] Vescovi AL, Parati EA, 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[J]. Exp Neurol, 1999, 156(1):71—83.