

组织块法体外分离培养大鼠脊髓成体神经干细胞

张 辉¹ 张 硕² 江 正¹ 余 涛¹ 钟 林¹ 尹宗生¹

摘要 取8月龄SD大鼠脊髓,分组织块法和细胞悬液法培养,测量神经干细胞球出现的时间、数量、直径。MTT法鉴定增殖能力及免疫荧光染色鉴定分化神经元和星型胶质细胞的比例。组织块组在神经干细胞球出现的时间、数量及增殖能力上与细胞悬液组比较差异有统计学意义,两组在分化细胞比例上差异无统计学意义。

关键词 组织块培养;成体神经干细胞;脊髓;大鼠

中图分类号 R 681.54

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)12-1815-04

成体神经干细胞指的是在成体动物神经组织中存在的具有增殖及多向分化能力的神经干细胞,在胚胎神经干细胞受到广泛关注及研究的同时,由于

神经损伤更多发于成年人,对于成体神经干细胞的研究更具有临床意义^[1]。成体脊髓中存在有神经干细胞,但由于不是神经生发区,在体的脊髓成体神经干细胞的神经生发能力非常有限,体外分离培养的效率不高,限制了进一步细胞移植及基因工程的供体细胞的来源。经典的神经干细胞培养方法是采用组织悬液法,该研究设计使用组织块法来培养获得脊髓成体神经干细胞,并与组织悬液法进行多方面的比较。

1 材料与方法

1.1 材料 8月龄SD大鼠,雄性,体重550~650 g,SPF级;由安徽医科大学实验动物中心提供。DMEM/F12(1:1)培养基、B27添加剂均购自美国Gibco公司;重组大鼠表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)购自美国Peprotech公司;抗巢蛋白(Nestin)、抗胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein,GFAP)、抗微管相关蛋白-2(microtubule associated protein,MAP-2)均购自美国Santa Cruz公司;小鼠抗大鼠多克隆抗体,异硫氰酸荧光

2014-08-11 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号:81171173);安徽省自然科学基金(编号:11040606Q25)

作者单位: ¹安徽医科大学第一附属医院骨科,合肥 230022

²安徽医科大学第四附属医院骨科,合肥 230022

作者简介: 张 辉,男,副主任医师;

尹宗生,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: yinzongsheng1961@sina.com

Sorting sterile cell subpopulation with high purity on FACS Aria

Liu Xijuan, Ding Huirong, Tian Zhihua, et al

[Key Laboratory of Carcinogenesis and Translational Research (Ministry of Education), Center Lab, Peking University Cancer Hospital & Institute, Beijing 100142]

Abstract BGC823 cells were transiently transfected with green fluorescent protein (GFP) plasmids. Two days later, GFP positive and negative cells were sorted by FACS Aria. Separated cells were tested by FACS Aria for purity analysis and also cultured for sterile analysis. SMMC7721 cells were incubated with FITC-labeled commercial antibody and then sorted on FACS Aria for FITC positive and negative cells. All separated cells were cultured to sterile analysis. The purity for GFP positive and negative subpopulation sorted from GFP transfected BGC823 cells were 99.6% and 98.8% respectively. Detected by laser scanning confocal microscopy, the separated GFP positive cells were significantly enriched after sorting compared to parent cells. Sorted BGC823 cells and SMMC7721 cells were cultured conventionally and cells were all free from contamination with a good growth. FACS Aria flow cytometry is suitable to preparation of sterile cell subpopulation with high purity both from fluorescence plasmids transfected cells and fluorescence antibody labeled cells.

Key words FACS; sterile sorting; high-purity

素(FITC)标记的兔抗小鼠二抗均购自武汉博士德生物工程有限公司;胎牛血清购自杭州四季青有限公司。

1.2 方法

1.2.1 脊髓成体神经干细胞的分离培养 大鼠颈椎脱臼法处死后置于75%乙醇溶液中浸泡消毒5~10 min,常规脊柱后路方法暴露并打开椎管,取全段胸椎脊髓实质,PBS冲洗2次,更换无菌器械,将脊髓自矢状位切开分为两等量组织块部分,一部分修建成约0.5 mm³组织块,另一部分研磨形成组织悬液,保证组织块与细胞悬液均由等量组织构成,组织块法作为组织块组,细胞悬液法作为细胞悬液组,分别放置于多聚赖氨酸处理过的培养瓶,培养液为含B27及和EGF(40 ng/ml)的DMEM/F12培养液,置于37℃、饱和湿度、5%的CO₂细胞培养箱进行培养,传代后分为等量的细胞瓶,同时计数同来源所有细胞瓶并取平均值。

1.2.2 脊髓成体神经干细胞的鉴定 取第3代分离培养获得的细胞进行免疫荧光法鉴定 Nestin 的表达。将培养获得的细胞球吸出,置于多聚赖氨酸预处理的载玻片上,滴加少量培养液,37℃、5%的CO₂条件下培养2 h,使其贴壁但不分化。吹干载玻片,用40 g/L多聚甲醛固定30 min,0.1 mol/L PBS冲洗3次,0.1% Triton 100作用10 min后,0.1 mol/L PBS洗3次,加入血清室温封闭30 min,倾去血清,0.1 mol/L PBS冲洗3次,加入一抗小鼠抗大鼠Nestin抗体(1:500),4℃孵育过夜,0.1 mol/L PBS冲洗3次,空白对照用PBS代替一抗。加入FITC标记的兔抗小鼠抗体,避光室温放置2 h,0.1 mol/L PBS洗3次,常规贴片,缓冲甘油封片,免疫荧光显微镜观察。

1.2.3 脊髓成体神经干细胞的增殖能力的鉴定 自原代分离培养开始,每日倒置显微镜下观察细胞生长情况,观察细胞球出现时间。在倒置显微镜下测量细胞球直径,每次随机选取5个视野测量细胞球直径,取平均值作为该时间点细胞球直径。同时吹打制作细胞悬液,计数神经干细胞数量。

MTT法检测细胞增殖能力。取生长状态良好的第3代细胞球制作成单细胞悬液,以 5×10^5 /ml的密度接种在5个96孔培养板中,每孔20 μ l。从第2天开始,每24 h随机取1板,每孔加入MTT液(5 mg/ml) 20 μ l,于37℃、饱和湿度、5%的CO₂细胞培养箱孵育2 h后,离心(1 000 r/min、5 min),弃去培养液,加入200 μ l DMSO,振荡15 min,使结晶

物充分溶解。置酶标仪上空白孔调零,选择570 nm波长下测各孔光密度(optical density, OD)值,连续测6 d,以时间为横轴,OD值为纵轴绘制细胞生长曲线。

1.2.4 脊髓成体神经干细胞分化能力的鉴定 取第3代分离培养获得的细胞进行免疫荧光法鉴定 GFAP 与 MAP-2 的表达。将细胞克隆移入预先置有多聚赖氨酸包被的盖玻片的24孔培养板中,加入有血清培养基(体积分数10%胎牛血清+DMEM/F12+B27),按前述方法培养2 d,行GFAP与MAP-2荧光染色,免疫荧光显微镜观察,除加入的抗体不同外,其余步骤同Nestin免疫荧光染色。用Hoechst33342做核染色。每次染色均设空白、阴性和阳性对照。随机选取5个视野,分别计数GFAP与MAP-2免疫染色阳性细胞数占Hoechst33342核染细胞总数的百分比,取平均值,计为该样本的分化比例。

1.3 统计学处理 采用SPSS 16.0软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较使用 t 检验。

2 结果

2.1 细胞形态学观察 原代培养2 d后,在组织块组中即可以观察到折光性强略呈曲面的局部隆起,此时细胞悬液组基本仍处于单细胞状态。4 d后,组织块组中已明显生长出直径大小不等的细胞球,细胞球周围组织已变薄崩解,细胞球由众多细胞聚集形成,呈悬浮生长。此时细胞悬液组可以看到细胞球,但在数量和大小上明显差于组织块组。原代培养6 d后,组织块组中细胞球已经明显增大,球团状外形典型,部分直径较大的细胞球中心部分出现折光性差,偏深色现象,考虑因周边细胞阻碍导致营养不良有关,已可以传代培养。细胞悬液组此时才开始出现大小不等细胞球,尚不具备传代培养条件。连续倒置显微镜观察发现,组织块组细胞球出现的时间上明显优于细胞悬液组。

2.2 成体神经干细胞的鉴定 分别取组织块组及细胞悬液组第3代细胞团进行免疫荧光染色,经免疫荧光显微镜观察可以见到明显的绿色荧光,图1,表示细胞球显示Nestin阳性,提示细胞球为神经干细胞球,两组均可以获得神经干细胞。

2.3 成体神经干细胞增殖能力的鉴定 原代培养中组织块组在成体神经干细胞球出现的时间上早于细胞悬液组24 h,在相同时间点上两组在成体神经干细胞球的直径($t = 3.012$, $P < 0.05$)及成体神经干细胞数量($t = 2.683$, $P < 0.05$)上差异有统计学

意义,见表1。

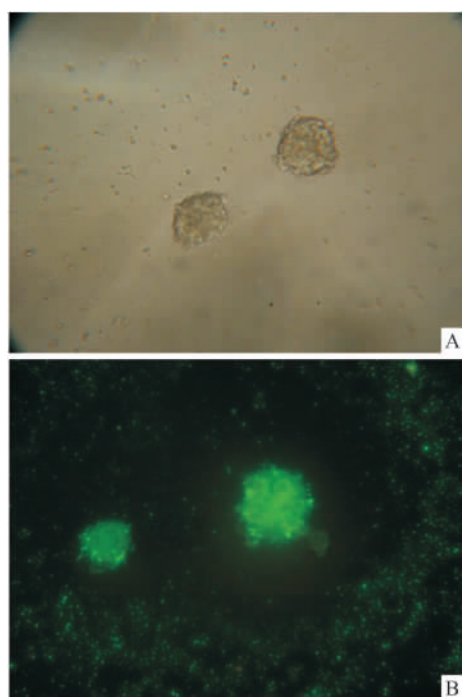


图1 神经干细胞鉴定 ×200

A: 倒置显微镜观察; B: Nestin 免疫荧光染色

表1 不同组别不同时间点神经干细胞直径和数量的比较

| 组别 | 神经干细胞直径(μm) | | | 神经干细胞数量(×10 ⁵ /ml) | | |
|------|-------------|-----|-----|-------------------------------|-------|-------|
| | 2 d | 4 d | 6 d | 2 d | 4 d | 6 d |
| 组织块 | 15* | 35* | 95* | 3.76* | 5.57* | 9.54* |
| 细胞悬液 | 7 | 20 | 60 | 1.35 | 3.02 | 6.75 |

与细胞悬液组比较: * $P < 0.05$

根据 MTT 法所绘制的生长曲线显示,组织块组 OD 值为 0.3183 ± 0.1240 ,细胞悬液组 OD 值为 0.1733 ± 0.0585 ,细胞原代培养后两组细胞增殖能力比较差异有统计学意义($t = 2.590$, $P < 0.05$),共同特点是最初的 1~2 d 神经干细胞生长较为缓慢,3 d 后细胞生长非常迅速,6 d 时细胞密度最高,特别是组织块组 MTT 值达 0.460,见图 2。

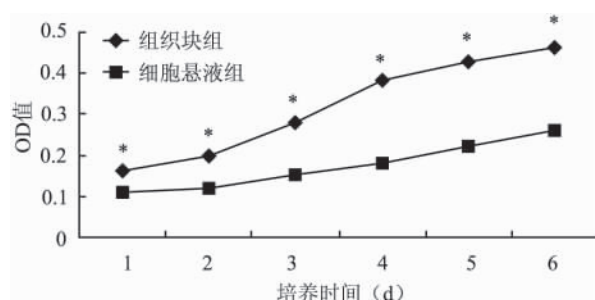


图2 MTT 法检测神经干细胞增殖能力

与细胞悬液组比较: * $P < 0.05$

2.4 成体神经干细胞分化观察 从培养液中撤去 EGF 并加入胎牛血清后培养 48 h 后,成体神经干细胞球基本贴壁分化,细胞主要呈现具有 1 个或 2 个长突起胞体呈圆形或椭圆形的神经元样细胞和具有多个粗长突起的星形胶质细胞样细胞两种形态,MAP-2 抗体为特异性识别神经元的抗体,GFAP 抗体为特异性识别星形胶质细胞,见图 3。本研究中两组细胞免疫荧光染色后计数提示组织块组 MAP-2 阳性细胞率为 $(9.30 \pm 3.65)\%$,细胞悬液组为 $(10.30 \pm 2.15)\%$,组织块组 GFAP 阳性细胞率为 $(90.70 \pm 3.35)\%$,细胞悬液组为 $(89.70 \pm 2.75)\%$,两组相比差异无统计学意义。

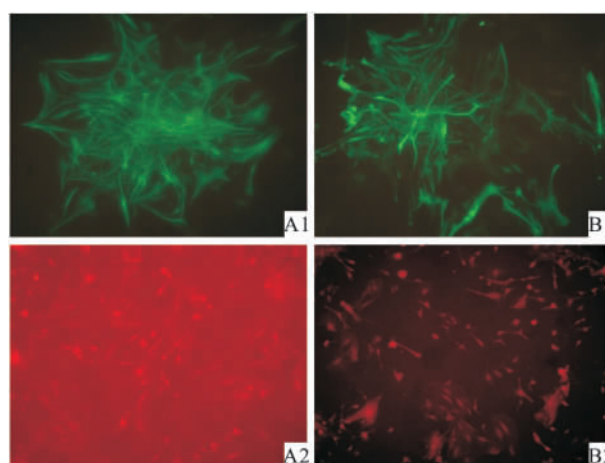


图3 两组神经干细胞分化免疫荧光鉴定 ×200

A: 组织块组; B: 细胞悬液组; 1: GFAP 免疫荧光染色; 2: MAP2 免疫荧光染色

3 讨论

自从神经干细胞首次被分离获得到现在,应用神经干细胞的修复神经损伤的已经获得了长足的进步,但相关的研究集中于针对胚胎来源的神经干细胞在脑组织中的应用,而对于成体神经干细胞特别是成体脊髓来源的神经干细胞的研究相对较少^[1]。由于成体脊髓属于非神经生发区,生理状态下几乎没有神经生发,脊髓成体神经干细胞的培养效率不高^[2]。

由于神经干细胞培养基为无血清培养基,带有高度的选择性,仅允许干细胞生长增殖,培养 24 h 后其余细胞基本上坏死崩解,24 h 即可在组织块组中看到神经干细胞在组织块中出现,48 h 已可以和细胞悬液组表现出明显差别,所以在组织处理上无需进行吹打过筛,而且研究同时显示神经球本身即

相当于“niche”,为神经干细胞的生长提供了一个相对良好的微环境^[3]。由于周围组织的存在,神经干细胞通过自分泌或者旁分泌产生的一些神经营养因子可以在局部形成一个相对较高的浓度^[4],对神经干细胞的生长增殖起到了明显的促进作用。

研究中神经干细胞培养液采用的是 EGF (40 ng/ml),而并非经典的 EGF 和 bFGF 各 20 ng/ml 的配方,这在既往的研究^[5]中已经获得证实,在胚胎发育的早期干细胞倾向于 bFGF 反应性和神经元分化,而在发育较为成熟的阶段干细胞则倾向于 EGF 反应性和胶质细胞分化^[6]。脊髓来源的神经干细胞更倾向于 EGF 反应性,EGF 较 bFGF 相比更能刺激脊髓来源的神经干细胞增殖^[7],所以本研究采用 EGF 配方,组织块组和细胞悬液组均成功培养获得成体神经干细胞。

组织块组和细胞悬液组获得的神经干细胞在诱导分化后,在神经元和星型胶质细胞的分化上差异无统计学意义。神经干细胞移植的本质是通过其分化成为神经元从而细胞替代重建神经通路,而大量星型胶质细胞的分化实际阻碍了重建。成体脊髓系非神经生发区,生理状态下神经元的生发比例极低^[8]。本研究显示神经元的分化比例有所提高,但改变原代培养方法并不能改变其分化的方向,虽然组织块组获得的神经干细胞在细胞活力及增殖能力上明显优于细胞悬液组,但神经干细胞的分化方向主要受制于自身特点和微环境^[9],由于这两点因素并未改变,所以导致神经干细胞的分化比例上差异

无统计学意义,但由于组织块组的细胞增殖快,相同时间内获得的神经干细胞绝对数增多,从而获得分化细胞绝对数增多的优势。

参考文献

- [1] Bellenchi G C, Volpicelli F, Piscopo V, et al. Adult neural stem cells: an endogenous tool to repair brain injury? [J]. J Neurochem, 2013, 124(2): 159–67.
- [2] Butti E, Cusimano M, Bacigaluppi M, et al. Neurogenic and non-neurogenic functions of endogenous neural stem cells [J]. Front Neurosci, 2014, 8: 92.
- [3] Mori H, Kanemura Y, Onaya J, et al. Effects of heparin and its 6-O- and 2-O-desulfated derivatives with low anticoagulant activity on proliferation of human neural stem/progenitor cells [J]. J Biosci Bioeng, 2005, 100(1): 54–61.
- [4] Kang S S, Keasey M P, Arnold S A, et al. Endogenous CNTF mediates stroke-induced adult CNS neurogenesis in mice [J]. Neurobiol Dis, 2012, 49C: 68–78.
- [5] Hugnot J P. Isolate and culture neural stem cells from the mouse adult spinal cord [J]. Methods Mol Biol, 2013, 1059: 53–63.
- [6] Letcher J M, Cox D N. Adult neural stem cells: isolation and propagation [J]. Methods Mol Biol, 2012, 823: 279–93.
- [7] Mothe A J, Zahir T, Santaguida C, et al. Neural stem/progenitor cells from the adult human spinal cord are multipotent and self-renewing and differentiate after transplantation [J]. PLoS One, 2011, 6(11): e27079.
- [8] 胡博,尹宗生. 内源性神经干细胞治疗脊髓损伤的研究进展 [J]. 安徽医科大学学报, 2011, 46(1): 83–6.
- [9] Sabelström H, Stenudd M, Frisén J. Neural stem cells in the adult spinal cord [J]. Exp Neurol, 2014, 260C: 44–9.

In vitro explant culture of adult neural stem cells of rat spinal cord

Zhang Hui¹, Zhang Shuo², Jiang Zheng¹, et al

(¹Dept of Orthopaedics, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Orthopaedics, The Fourth Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract The spinal cord of 8 months old rat was divided into two parts, the spinal cord tissue nubbles and cell suspension were cultured *in vitro*, measure the time when neurosphere first emerged, number and diameter of neurosphere in the groups. The proliferation of neural stem cells was examined by MTT method, the ratio of neurons and astrocytes differentiation of neural stem cells identified by immunofluorescence staining was calculated. The time when neurosphere first emerged, number and diameter of neurosphere in tissue nubbles group were significantly than those in cell suspension group, and no difference in the ratio of neural stem cells differentiation.

Key words explant culture; adult neural stem cell; spinal cord; rat