

大鼠神经干细胞的体外分离培养及分化研究

徐 鹏¹, 宋旒文¹, 章仁杰¹, 刘 超², 申才良¹

摘要 目的 建立新生 SD 大鼠神经干细胞(NSCs)的分离培养、体外分化、鉴定及体外长期培养的方法,并探讨血清浓度对 NSCs 分化的影响。方法 取新生 SD 大鼠大脑组织,用无血清培养技术培养 NSCs。采用免疫荧光技术对 NSCs 进行鉴定,检测其巢蛋白(Nestin)表达。用含有不同胎牛血清(FBS)浓度(2%、5%、10%)的 DMEM/F12 培养基诱导 NSCs 分化,分别用神经元特异性微管相关蛋白 2(MAP-2)抗体、神经胶质细胞特异性胶质纤维酸性蛋白(GFAP)抗体行免疫荧光染色鉴定分化细胞。通过 Western blot 法检测不同 FBS 浓度的分化条件下 MAP-2 与 GFAP 的表达情况。结果 获得大量未分化且悬浮生长的 NSCs 球,并能分化为神经元和神经胶质细胞。随着血清浓度的增加,各组 MAP-2 的表达逐渐增加($P < 0.05$),GFAP 的表达逐渐减少($P < 0.05$)。结论 应用无血清培养技术可成功在体外培养出具有增殖、自我更新及多潜能分化能力的新生大鼠 NSCs,可于含有不同 FBS 浓度(2%、5%、10%)的分化条件下进一步分化为神经元及神经胶质细胞,含低浓度血清的条件培养基促进 NSCs 向神经元方向分化,而高浓度血清则有利于 NSCs 向神经胶质细胞方向分化。

关键词 大鼠;神经干细胞;细胞培养;免疫印迹

中图分类号 R 651.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)04-0443-05

干细胞是一类可自我复制,同时又具有分化成多种组织细胞潜能的多能细胞。应用干细胞的多向分化潜能,尤其是神经干细胞(neural stem cells, NSCs)这一分布于神经系统的、具有自我更新和分化潜能的细胞,能生成多种神经细胞,特别是神经元细胞,可有效地修复损伤的脊髓组织,重新建立神经间的连接,治疗脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)。早在 1992 年 Reynolds et al^[1]及 Richards et al^[2]从成年大鼠纹状体及海马中分离出了 NSCs,随后又在成年哺乳动物大脑纹状体的室管膜下和海马

的颗粒层发现了 NSCs 聚集区。该实验采用无血清培养法进行大鼠 NSCs 体外分离培养,动态观察其在体外增殖、分化等一系列细胞形态学变化,同时研究血清浓度对 NSCs 分化的影响,为细胞移植治疗 SCI 的过程中如何进一步改善有利于 NSCs 神经生发的微环境提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 24 h 内新生 SD 大鼠幼鼠购于安徽医科大学实验动物中心,雌雄不限,共 10 只。

1.2 主要试剂 DMEM/F12 培养基购于美国 Gibco 公司;B-27 购于美国 Invitrogen 公司;表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)购于美国 PeproTech 公司;小鼠抗大鼠巢蛋白(Nestin)单克隆抗体、兔抗大鼠胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)抗体、小鼠抗微管相关蛋白 2(microtubule-associated protein 2, MAP-2)抗体、FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 购于美国 Santa Cruz 公司;TRITC 标记山羊抗兔 IgG、Triton X-100 购于北京中杉金桥;南美胎牛血清购于美国 HyClone 公司;多聚赖氨酸(Poly-L-Lysine)购于美国 Sigma 公司;即用型正常山羊血清购于武汉博士德公司;青链霉素溶液(100×)、Hoechst 33342、胰蛋白酶细胞消化液、免疫染色一抗稀释液、免疫荧光染色二抗稀释液、抗荧光淬灭封片液(强)购于碧云天公司;BCA 蛋白定量试剂盒、ECL 显影液试剂盒购于美国 Pierce 公司。

1.3 方法

1.3.1 NSCs 原代培养 取新生 24 h 内的 SD 大鼠幼鼠,颈椎脱臼法处死,经 75% 乙醇溶液浸泡 5 min。在无菌条件下断头,剪开头皮及颅骨,分离出大脑半球,预冷的无菌生理盐水漂洗 3 次后用显微镊剥除脑膜及血块^[3]。将组织块移入另一干净无菌培养皿中,加入 1 ml 生理盐水,然后用眼科剪将脑组织切碎,形成约 1 mm³ 组织小块,加入 1 ml 0.25% 胰蛋白酶细胞消化液,置于 37℃ 细胞培养箱中消化 10 min,移液枪轻轻吹打混匀细胞至不见组织碎片,经 200 目筛网过滤形成单细胞悬液,以 600 r/

2014-02-17 接收

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院骨科,合肥 230022

²安徽医科大学基础医学院组织学与胚胎学教研室,组织工程干细胞研究所,合肥 230032

作者简介:徐 鹏,男,硕士研究生;

申才良,男,副教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: shencailiang1616@163.com

min 离心 5 min 后弃上清液,加入 2 ml 无血清培养基(DMEM/F-12 + 2% B-27 + 20 ng/ml EGF + 20 ng/ml bFGF + 青霉素 100 U/ml + 链霉素 0.1 mg/ml) 再次 600 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入无血清培养基重悬,计数,以 10^5 /ml 接种于培养瓶中,置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,每 3 d 半量换液 1 次,约 1 周传代 1 次。

1.3.2 NSCs 传代培养 培养 2~3 d 后,逐渐有细胞球形成,呈悬浮生长,1 周后,600 r/min 离心 5 min 后吸弃旧培养基,加入新鲜培养基,用吸管轻柔吹打细胞球成为小细胞球和单细胞悬液,按量将细胞悬液分别接种到新培养瓶中, 1×10^5 个细胞/瓶,每 7 d 传代 1 次,每 3 d 离心更换半量培养基 1 次,培养条件不变。

1.3.3 NSCs 分化 取第 2 代培养 7 d 的细胞球,经 600 r/min 离心 5 min 后,吸弃旧的无血清培养基,分别加入去除 EGF、bFGF 且含有不同 FBS 浓度(2%、5%、10%)的新鲜培养基(DMEM/F-12 + 2% B-27 + 青霉素 100 U/ml + 链霉素 0.1 mg/ml) 重悬后,接种于放有 0.1 mg/ml 多聚赖氨酸包被处理盖玻片的 6 孔板中,置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中继续培养,每 3 d 半量换液,7 d 后行免疫荧光染色鉴定。

1.3.4 NSCs 及分化后的免疫荧光鉴定 第 2 代培养 7 d 的细胞球,接种于有 0.1 mg/ml 多聚赖氨酸包被处理盖玻片的 6 孔板中,置于 37 °C 培养箱 6 h,用 0.01 mol/L 的 PBS 洗 3 次,每次 5 min,4% 多聚甲醛常温下固定 20 min,吸去多余残液后用 0.01 mol/L 的 PBS 洗 3 次,每次 5 min,后在含 0.1% TritonX-100 的 PBS 液中孵育 20 min,PBS 液漂洗 3 次,每次 5 min,加入正常山羊血清工作液后置于 37 °C 培养箱内孵育 1 h,加入 Nestin 一抗(1:50) 4 °C 条件下孵育过夜,次日常温下放置 2 h,PBS 液漂洗 3 次,每次 5 min,加入 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG(1:100) 37 °C 细胞培养箱内避光孵育 1 h,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,最后加入终浓度为 10 μg/ml Hoechst 溶液避光状态下行细胞核染色 5 min,PBS 漂洗 3 次晾干后,抗荧光淬灭封片液封片,荧光显微镜观察及照相。

细胞球贴壁培养 7 d 后,取神经胶质细胞和神经元的特异性标志物 GFAP、MAP-2 行免疫荧光染色。重复以上步骤,MAP-2、GFAP 一抗(1:50) 混合稀释后加入各培养孔内,添加二抗 FITC 标记的

山羊抗小鼠 IgG(1:100) 及 TRITC 标记山羊抗兔 IgG(1:100) 荧光显微镜观察及照相。

1.3.5 Western blot 检测 NSCs 分化前后 Nestin、MAP-2、GFAP 蛋白的表达 提取 NSCs 分化前及不同分化条件下分化后细胞总蛋白,使用 BCA 法测定蛋白浓度,根据蛋白浓度选择上样量,依次行电泳、转膜、封闭,加一抗于 4 °C 孵育过夜,次日洗膜,加入相应二抗,室温孵育 2 h,充分洗涤后 ECL 化学发光显影并行胶片显影定影处理。所使用抗体及稀释度:Nestin(鼠单抗,1:500 稀释),MAP-2(鼠单抗,1:200 稀释),GFAP(兔多抗,1:500 稀释),β-actin(鼠单抗,1:1000 稀释),二抗(山羊抗小鼠,1:5000 稀释;山羊抗兔,1:5000 稀释)。胶片扫描后采用 Image J 软件分析各组条带的灰度值。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 11.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较采用单因素方差分析,组间比较采用 LSD 法,检验水平 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 原代细胞培养 原代细胞接种后,在显微镜下观察为悬浮的单个圆形细胞,边界清楚,折光性强。接种 2~3 d 后,部分细胞死亡,单个细胞减少,大多数细胞分裂成小的细胞球,由单个细胞增殖形成。随着时间的推移,细胞球的大小及数量明显增大、增多,到第 7 天时培养瓶内生长出数十个甚至上百个细胞的集落,多呈球形、桑葚状,折光性强,未见明显的细胞突起,部分细胞球因体积过大出现细胞球中心颜色暗淡、透光性较差。见图 1。

2.2 NSCs 鉴定 培养的细胞球贴壁 6 h 后,于显微镜下观察,部分细胞球外周细胞已伸出小突起,部分形态上已发生改变,行 NSCs 特异性 Nestin 抗体免疫荧光染色,结果显示原代培养形成的细胞球中大部分细胞表达 Nestin 阳性。见图 1、2。

2.3 NSCs 分化鉴定 培养过程中,观察到 NSCs 球逐渐贴壁,6 h 后已有部分细胞分化为具有 1~2 个短状突起的神经元样细胞,部分分化为具有多个长突起并呈梭样排列的神经胶质样细胞并随着培养时间的延长,突起逐渐变长、增多,与相邻的细胞构成网状结构,至分化培养第 7 天,显微镜下可见各细胞球分化后向四周放射状生长,排列紧密,各细胞间覆盖。免疫荧光染色结果可见 GFAP 阳性的神经胶质细胞及 MAP-2 阳性的神经元细胞。提示所培

养原代细胞具有多分化潜能,为 NSCs,可分化为神经元及神经胶质细胞。见图 1、2。

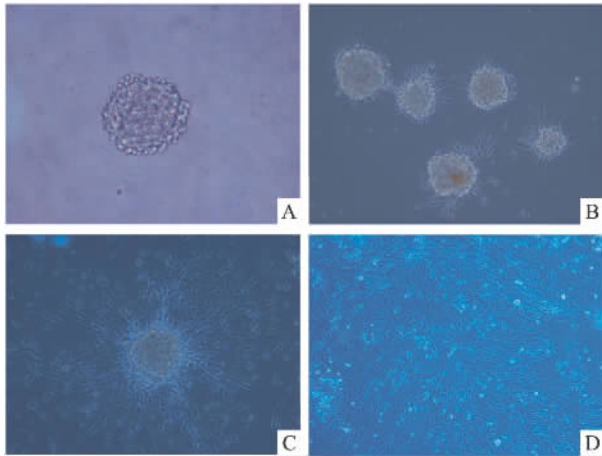


图 1 NSCs 原代培养及分化

A: 原代培养 NSCs 3 d $\times 400$; B: NSCs 贴壁 6 h (5% FBS) $\times 200$; C: NSCs 分化 2 d (2% FBS) $\times 200$; D: NSCs 分化 5 d (10% FBS) $\times 200$

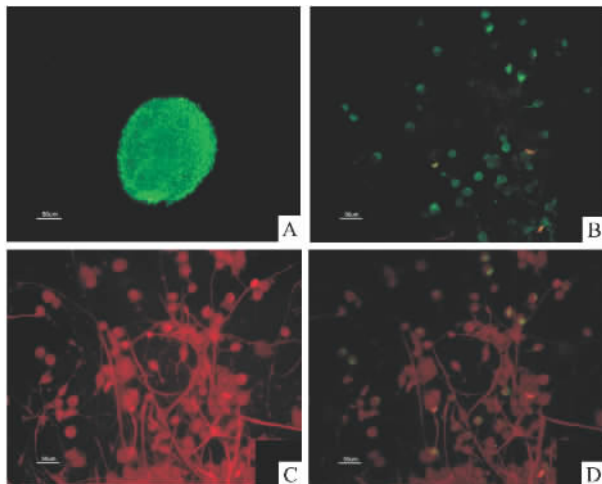


图 2 NSCs 及分化后的免疫荧光鉴定

A: NSCs 特异性 Nestin 染色 $\times 100$; B: NSCs 分化 7 d MAP-2 染色 阳性 (2% FBS) $\times 400$; C: NSCs 分化 7 d GFAP 染色 阳性 (2% FBS) $\times 400$; D: B、C 图片叠加提示 NSCs 分化为神经元和神经胶质细胞 (2% FBS) $\times 400$

2.4 NSCs 分化前后 Nestin、MAP-2、GFAP 蛋白的表达 NSCs 组 Nestin 蛋白明显表达,2% FBS、5% FBS、10% FBS 3 组未检测出 Nestin 蛋白的表达。各组间 MAP-2 蛋白表达差异有统计学意义 ($F = 80.440, P < 0.05$),两两比较显示,NSCs 组 MAP-2 蛋白的表达显著低于 2% FBS 组、5% FBS 组、10% FBS 组 ($P < 0.05$);与 5% FBS 组和 10% FBS 组相比较,2% FBS 组的 MAP-2 表达显著增加 ($P <$

0.05);5% FBS 组的 MAP-2 表达较 10% FBS 组明显增加 ($P < 0.05$)。各组间 GFAP 蛋白表达差异有统计学意义 ($F = 580.018, P < 0.05$),两两比较显示,NSCs 组 GFAP 蛋白的表达显著低于 2% FBS 组、5% FBS 组、10% FBS 组 ($P < 0.05$);与 5% FBS 组和 10% FBS 组相比较,2% FBS 组的 GFAP 表达显著减少 ($P < 0.05$);10% FBS 组的 GFAP 表达较 5% FBS 组明显增加 ($P < 0.05$)。见图 3。

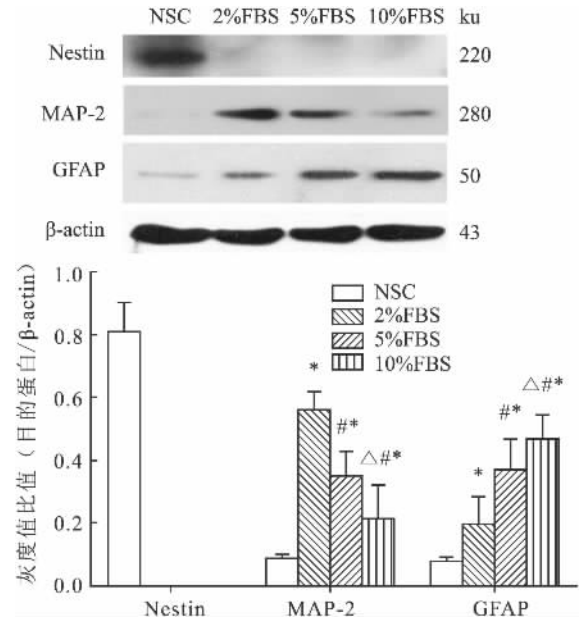


图 3 Western blot 检测 NSCs 分化前后各组 Nestin、MAP-2、GFAP 蛋白的表达水平

与 NSC 组比较: * $P < 0.05$; 与 2% FBS 组比较: # $P < 0.05$; 与 5% FBS 组比较: △ $P < 0.05$

3 讨论

在 NSCs 治疗 SCI 的相关研究中,移植外源性 NSCs 一直是主要的研究手段,此类方法多是通过促进移植到 SCI 部位的 NSCs 有效地向神经元分化,促进其神经生发,从而形成彼此间的神经通路,促进脊髓重建及神经修复的作用^[4]。NSCs 在移植到 SCI 区域后可分化为神经元、星型胶质细胞及少突胶质细胞,桥接脊髓断端并重建脊髓传导通路,改善损伤平面以下的运动及感觉功能^[5-6]。有研究^[7-8]表明,将 NSCs 体外分化为胶质细胞后移植,可促进脊髓区空洞的修复,而将 NSCs 诱导分化为少突胶质细胞后移植到 SCI 区域,可有效促进损伤区脱髓鞘神经的髓鞘化,但是有实验研究^[9]显示:移植到脊髓中的 NSCs 最终绝大部分分化成为星型胶质细胞

形成瘢痕,神经生发的比例较低,进一步阻碍了 SCI 区域神经通路的建立。由此可见,如何正确处理 NSCs 体内移植后的分化问题是解决 NSCs 治疗 SCI 的关键。

Nestin 是一种中间丝蛋白,又称之为细胞骨架蛋白,该蛋白在多潜能的神神经外胚层细胞表达,但 Nestin 并非只在 NSCs 中表达,肌肉和胰岛细胞中也有相应的表达,因此并不能将其作为高特异性的表面标志物来单独鉴定 NSCs^[10]。一旦神经前体细胞朝向终末方向分化成神经元和胶质细胞时,Nestin 停止表达,神经元和神经胶质细胞分别表达其特异性蛋白: MAP-2、GFAP。

在本实验过程中,采用了去除 bFGF、EGF 且含有不同 FBS 浓度(2%、5%、10%)的 DMEM/F-12 培养基诱导 NSCs 分化,免疫荧光染色示 Nestin 表达(+)的细胞球贴壁分化后含有 GFAP 表达(+)的神经胶质细胞及 MAP-2 表达(+)的神经元。这间接显示了之前聚集形成的细胞球是由能够自主分化形成神经胶质细胞及神经元的 NSCs 组成,同时在 NSCs 的分化过程中,随着血清浓度的增加,MAP-2 蛋白表达量逐渐减少,GFAP 蛋白表达量逐渐增多。这也直接表明血清浓度的高低决定 NSCs 的分化情况,低浓度血清的条件培养基促进 NSCs 更多地向神经元方向分化,而高浓度血清则有利于 NSCs 向神经胶质细胞方向分化。

目前在 NSCs 的原代培养及增殖分化方面的研究已经取得一定进展,在本次体外实验中,可以通过调整条件培养基中血清含量的高低来影响 NSCs 分化的结果,以提高神经元所占分化后细胞中的比例,但对于体内实验中 NSCs 的具体定位、迁移分化过

程及其规律仍缺乏全面的认识。如何更好地解决 NSCs 移植后的定向分化问题仍是提高 NSCs 移植疗效所必须面对的难题。

参考文献

- [1] Reynolds B A, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system [J]. *Science*, 1992, 255(5052): 1707-10.
- [2] Richards L J, Kilpatrick T J, Bartlett P F. De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89(18): 8591-5.
- [3] 刘萍,涂彧. 表皮生长因子在新生大鼠神经干细胞培养中的作用 [J]. *苏州大学学报(医学版)*, 2010, 30(2): 310-2.
- [4] Kan E M, Ling E A, Lu J. Stem cell therapy for spinal cord injury [J]. *Curr Med Chem*, 2010, 17(36): 4492-510.
- [5] Tarasenko Y I, Gao J, Nie L, et al. Human fetal neural stem cells grafted into contusion-injured rat spinal cords improve behavior [J]. *J Neurosci Res*, 2007, 85(1): 47-57.
- [6] Du C, Yang D, Zhang P, et al. Single neural progenitor cells derived from EGFP expressing mice is useful after spinal cord injury in mice [J]. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 2007, 35(4): 405-14.
- [7] Nakamura M, Okada S, Toyama Y, et al. Role of IL-6 in spinal cord injury in a mouse model [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2005, 28(3): 197-204.
- [8] Gao J, Coggeshall R E, Tarasenko Y I, et al. Human neural stem cell-derived cholinergic neurons innervate muscle in motoneuron deficient adult rats [J]. *Neuroscience*, 2005, 131(2): 257-62.
- [9] Pluchino S, Cusimano M, Bacigaluppi M, et al. Remodelling the injured CNS through the establishment of atypical ectopic perivascular neural stem cell niches [J]. *Arch Ital Biol*, 2010, 148(2): 173-83.
- [10] 张蕾,李晓莉. 神经干细胞的分离培养和鉴定及体外长期培养 [J]. *中国现代医学杂志*, 2012, 22(20): 52-5.

Isolation, cultivation *in vitro* and differentiation of rat neural stem cells

Xu Peng, Song Peiwen, Zhang Renjie, et al.

(Dept of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To establish the isolation, differentiation, identification and long-term cultivation *in vitro* of the neural stem cells (NSCs) from neonatal SD rats, and to investigate the effect of the serum concentration on the differentiation of NSCs. **Methods** Brain tissue was isolated from neonatal SD rats and NSCs were cultured in serum free medium. To identify NSCs and detect Nestin expression in NSCs by immunofluorescence. In the condition of DMEM/F-12 containing different concentrations (2%, 5%, 10%) of FBS to induct the differentiation of NSCs, to identify the differentiated cells with the antibodies of neuron specific microtubule-associated protein 2 (MAP-2) and glial cell specific glial fibrillary acidic protein (GFAP) by immunofluorescence. In the differentiation conditions

缺氧预处理对创伤性脑损伤大鼠脑组织 HIF-1 α 、VEGF 表达的影响

张 磊, 刘家传, 杨艳艳, 王金标, 张永明, 张 星, 王春琳, 黄振山

摘要 目的 研究缺氧预处理(HPC)对创伤性脑损伤大鼠挫伤周围脑组织缺氧诱导因子(HIF-1 α)及血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响,探讨缺氧预处理对创伤性脑损伤保护机制。方法 Sprague-Dawley 大鼠 102 只,随机分为对照组(Con 组, $n=6$)、创伤组(TBI 组, $n=48$)和 HPC 组($n=48$)。HPC 组大鼠首先置于低压氧舱中进行 HPC(50.47 kPa 3 d 3 h/d),随后 HPC 组和 TBI 组分别采用改良自由落体打击建立大鼠创伤性脑损伤模型。颅脑创伤后 1、4、8、12 h 和 1、3、7、14 d,分别采用 RT-PCR 和 Western blot 法检测各个时间点挫伤周围脑组织 HIF-1 α 、VEGF 表达变化。结果 TBI 组与 Con 组比较, HIF-1 α 表达在伤后 4、8、12 h 和 1、3 d 均明显上升($P<0.05$); VEGF 表达在伤后 4、8、12 h 和 1、3、7 d 均明显上升($P<0.05$)。HPC 组与 TBI 组比较, HIF-1 α 和 VEGF 表达在伤后 1 h 逐渐上升,伤后 4、8、12 h 和 1、3 d 显著上升,直至伤后 7 d($P<0.05$)。结论 HPC 可提高创伤性脑损伤对缺氧耐受性,诱导血管内皮细胞功能活化,发挥早期脑保护,其机制可能涉及 HPC 在创伤性脑损伤早期促进 HIF-1 α 、VEGF 高表达。

关键词 缺氧预处理; 颅脑损伤; HIF-1 α ; VEGF; 大鼠; 脑组织

中图分类号 R 651.15

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)04-0447-05

缺氧预处理(hypoxic preconditioning, HPC)是指预先给予机体短时间的重复轻程度的缺氧,能够显著提高机体对随后严重缺血缺氧的耐受力,为机体提供有效神经保护^[1-2]。缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)是依赖氧浓度调节主要因子,对周围氧环境具有较强敏感性。研究^[3-4]表明 HIF-1 α 能通过对靶蛋白调节产生神经保护作用。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是 HIF-1 α 下游编码靶蛋白,可参与神经血管重塑而达到脑保护作用^[5]。目前关于 HPC 在创伤性脑损伤神经保护作用机制尚不完全清楚。该研究通过检测 HPC 后创伤性脑损伤脑组织中 HIF-1 α 、VEGF 表达变化,探讨 HPC 对创伤性脑损伤的脑保护机制。

2013-10-28 接收

基金项目: 全军医学科技“十二五”科研项目(面上)(编号: CWS11J262); 2009 年南京军区医学科技创新重点课题(编号: 09Z009)

作者单位: 安徽医科大学解放军临床学院(中国人民解放军第 105 医院) 神经外科, 合肥 230031

作者简介: 张 磊, 男, 硕士研究生;

刘家传, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: ljcs71017@sina.com

1 材料与方法

1.1 实验动物 102 只健康清洁级雄性 Sprague-Dawley 大鼠, 8~10 周龄, 体重 250~300 g, 由安徽医科大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂与仪器 兔抗 HIF-1 α 单克隆抗体(货号: ab51608)、鼠抗 VEGF 单克隆抗体(货号:

containing different concentrations of FBS, to detect the expression of MAP-2 and GFAP by Western blot. **Results**

A mass of undifferentiated neurospheres were obtained and cultured in suspension, those NSCs could differentiate into neurons and astrocytes. With increasing serum concentrations, the expression of MAP-2 in each group gradually increased ($P<0.05$), and the expression of GFAP gradually decreased ($P<0.05$). **Conclusion** We successfully obtain the fetal rat NSCs *in vitro*, which have the capacities of proliferation, self-renew and pluripotentiality with the application of serum free cultivation. In the differentiation conditions containing different concentrations (2%, 5%, 10%) of FBS, NSCs differentiate into neurons and glial cells, the conditioned medium containing low concentration of serum promote the differentiation of NSCs into neurons, the high concentration of serum is conducive to the differentiation of NSCs into neural glial cells.

Key words rat; neural stem cell; cell culture; Western blot