

· 论 著 ·

小鼠中脑神经干细胞体外培养方法的研究*

肖 莉¹, 石清明², 毕文杰¹, 苏炳银^{1△}

(1. 成都医学院人体解剖与组织胚胎学教研室/发育与再生四川省重点实验室, 成都 610083;

2. 成都军区疾病预防控制中心, 成都 610021)

摘 要:目的 改进小鼠中脑神经干细胞(NSCs)分离培养方法。方法 分别采用机械法和酶消化法分离出生 1~3 d 的小鼠中脑组织,在含体积分数为 2% B27 及 20 ng/mL 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的 DMEM/F12 培养基中进行原代和传代培养。采用巢蛋白(Nestin)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、及神经元特异性烯醇化酶(NSE)免疫细胞化学染色方法鉴定 NSCs 和分化细胞。结果 在含 bFGF 及 B27 的 DMEM/F12 培养基中,可形成悬浮生长 Nestin 呈阳性的神经球。诱导分化的细胞可见 GFAP 或 NSE 免疫反应阳性细胞。机械法较酶消化法可获得较多的 NSCs。结论 在 DMEM/F12 培养基中添加 2% B27 及 20 ng/mL 的 bFGF 可成功获得中脑 NSCs,机械法为一种简便而有效的 NSCs 分离方法。

关键词:小鼠;中脑神经干细胞;分离;培养

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.22.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)22-2240-02

Research of the mouse mesencephalic neural stem cells cultured in vitro*

Xiao Li¹, Shi Qingming², Bi Wenjie¹, Su Bingyin^{1△}

(1. Department of Anatomy and Histology and Embryology/Development and Regeneration Key Laboratory of Sichuan Province, Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan, 610083, China;

2. Center for Diseases Control of Chengdu Military Area, Chengdu, Sichuan, 610021, China)

Abstract: **Objective** To improve the separation and cultivation methods of the mouse mesencephalic neural stem cells. **Methods**

Using mechanical method and enzyme digestion methods, the mouse mesencephalic tissues were separated after birth from 1 to 3 days. After being cultured or subcultured in DMEM/F12 culture medium which had a volume fraction of 2% B27 and 20 ng/mL bFGF, immunocytochemical staining method such as Nestin, glial fibrillary acidic protein (GFAP), and neuron specific enolase (NSE) were used to identify neural stem cells and differentiated cells. **Results** In the DMEM/F12 culture medium which contain bFGF and B27, Nestin positive neurosphere was suspension growing. The GFAP or NSE immunoreactivity positive cells could be found in the cells after induction of differentiation. Compared with enzyme digestion method, the mechanical method could obtain more neural stem cells. **Conclusion** Adding 2% B27 and 20 ng/mL bFGF into DMEM/F12 culture medium can obtain mesencephalic neural stem cells successfully. The mechanical method is a more simple and more effective method in neural stem cells separation.

Key words: mouse; mesencephalic neural stem cells; separate; culture

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)是具有自我更新能力和多向分化潜能的一类细胞。随着 NSCs 鉴定、诱导、迁移、整合等技术的成熟,使得 NSCs 移植治疗帕金森病等神经变性疾病成为可能,且具有巨大的发展和应用前景^[1]。中脑源性 NSCs 因具有向多巴胺能神经元分化的潜能,已成为近年来兴起并得到快速发展的干细胞移植治疗帕金森病的理想种子细胞^[2]。已有许多研究小组报道了大鼠、小鼠和人胚胎中脑 NSCs 的分离和培养方法,但对新生小鼠中脑 NSCs 的分离培养方法则鲜有报道。本实验分别采用机械法和酶消化法对出生 1~3 d 的小鼠中脑 NSCs 进行了分离、培养和免疫组织化学鉴定,为研究 NSCs 增殖分化及临床应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 出生 1~3 d 的昆明种小鼠 SPF 级,由成都医学院实验动物中心提供。

1.2 主要试剂 DMEM/F12(1:1)培养基、胎牛血清(Hyclone 公司),B27 因子(Gibco,美国),碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)(Peprotech Inc, 美国);NSCs 标志物抗巢蛋白(Nestin)多克隆抗体、神经元标志物抗神经元特异性烯醇化酶(NSE)多克隆抗体、星形胶质细胞

标志物抗胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary noidic protein, GFAP)多克隆抗体、SABC 免疫组织化学试剂盒(均购自 Boster 公司);0.25%胰蛋白酶和 0.02% EDTA 购自 Hyclone 公司,其余试剂均为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 NSCs 的分离、培养及传代 取出生 1~3 d 昆明种小鼠,脱颈椎处死后,浸入 75%乙醇中 5~10 min,用含有双抗的 PBS 液浸洗 2~3 次。在超净台中剥离颅骨,无菌条件下取出脑组织,解剖显微镜下,仔细分离中脑组织,剥离脑膜和血管, PBS 液浸洗,置于无菌培养皿中,采用机械法和酶消化法 2 种分离培养方法。(1)机械法:用眼科剪将中脑组织反复剪碎,加入 DMEM/F12 培养基,混匀后移至离心管中,用吸管反复吹打 5~10 min,制成单细胞悬液,1 000 r/min 离心 10 min,去除上清液,加入 DMEM/F12 培养基,经 200 目尼龙滤网过滤,调整细胞浓度为 5×10^5 /mL,接种于 25 cm² 的培养瓶中,在培养基中加入 2% B27 和 20 ng/mL bFGF,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,3 d 半定量换液,7 d 传代。(2)酶消化法:用眼科剪反复剪碎中脑组织后,加入 0.25%胰酶-0.02% EDTA(1:1)的消化液(覆盖组织为宜),37℃的培养箱中消化 5~8 min,

加入含有 10% 胎牛血清的培养基终止消化, 吸管吹打混匀, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入 DMEM/F12 培养基, 经 200 目尼龙滤网过滤, 调整细胞浓度为 5×10^5 /mL, 接种于 25 cm² 的培养瓶中, 在 DMEM/F12 培养基中加入 2% B27 和 20 ng/mL bFGF, 其余培养方法同前。原代培养第 7 天, 在低倍镜($\times 100$)下随机选取 5 个视野进行细胞计数, 对上述 2 种方法进行统计学分析。原代培养第 7 天, 用吸管反复吹打瓶底, 将液体移入离心管中, 1 000 r/min 离心 5 min, 吸弃上清液, 加入 DMEM/F12 培养基, 2% B27 和 20 ng/mL bFGF, 将神经球吹打成单个细胞或小细胞团, 以 5×10^5 /mL 密度接种于培养瓶中继续培养, 每隔 5~7 天传代 1 次。

1.3.2 NSCs 的诱导分化 将生长状态良好的第 2 代 NSCs, 吸管反复吹打, 离心后用含有 10% 胎牛血清的培养基诱导分化, 接种于 6 孔板中, 倒置显微镜下观察细胞的形态和生长状况。诱导分化 7 d 后进行免疫细胞化学检测。

1.3.3 NSCs 及分化细胞的免疫细胞化学鉴定 将原代培养 7 d 的 NSCs, 离心后加入含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基, 在 6 孔培养板中培养 2~3 h, 贴壁后进行 Nestin 免疫细胞化学的检测。具体方法: 吸弃孔内的培养液, 用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 0.1 mol/L PBS 漂洗 3 次, 每次 2 min。质量分数 30% H₂O₂ 和纯甲醇按 1:50 混合, 室温浸泡 5~10 min, 以灭活内源性过氧化物酶; 0.1 mol/L PBS 漂洗 3 次, 每次 2 min; 滴加正常山羊血清封闭液, 室温 20 min, 湿盒中, 去除多余液体, 不洗; 滴加 1:200 的抗 Nestin 抗体, 置于湿盒内, 4℃ 过夜, 0.1 mol/L PBS 漂洗 3 次, 每次 2 min; 滴加生物素化二抗, 置于湿盒内, 37℃ 孵箱中 20 min, 0.1 mol/L PBS 漂洗 3 次, 每次 2 min; 滴加 SABC 试剂, 置于湿盒内, 37℃ 孵箱中 20 min, 0.1 mol/L PBS 漂洗 4 次, 每次 5 min; DAB 显色(取 1 mL 蒸馏水, 加入试剂盒中 A、B、C 试剂各一滴, 混匀)室温显色 8~10 min; 蒸馏水冲洗, 阴性对照不加一抗以 0.1 mol/L PBS 代替。倒置显微镜下随机选取 5 个高倍视野($\times 200$), 计算平均每个视野的阳性神经球数, 用 $\bar{x} \pm s$ 表示。诱导分化的细胞操作步骤同上, 一抗浓度分别是: NSE(1:200), GFAP(1:200)。其余方法同前。

1.4 统计学处理 实验数据分析采用 SPSS11.50 软件进行 *t* 检验, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 检验标准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 机械法与酶消化法对原代细胞生长的影响 原代培养至 24 h 后, 两组细胞均呈悬浮生长, 圆形, 大小不等, 胞体透明, 可见少量细胞碎片。72 h 后细胞碎片增多, 部分悬浮生长的细胞分裂或聚集为细胞团, 即为神经球。每个神经球由 2~4 个到数十个细胞组成(封 2 图 1)。原代细胞不断增殖, 培养至 5~7 d, 培养基中可见胞体较大, 圆形或椭圆形的神经球, 其边界清楚, 折光性强。每个神经球是由十个至数百个细胞组成, 细胞排列紧密, 呈“桑葚胚样”(封 2 图 2)。在低倍镜($\times 100$)下观察神经球的数量, 机械法的细胞球的数量(34.4 ± 2.07)明显高于酶消化法(24.6 ± 2.88), 差异有统计学意义($P < 0.05$), 且酶消化法可见较多的细胞碎片和部分贴壁细胞。

2.2 传代培养 原代细胞培养第 6~7 天, 由于细胞体积较大, 中央部由于缺乏营养而影响细胞的生长, 因此需要及时传代。采用酶消化法, 发现随着传代次数的增加, 神经球数量无明显增加, 部分神经球出现贴壁分化, 少数体积较大的细胞由于中央缺乏营养, 神经球增殖力明显减弱。采用机械吹打法, 细胞生长状态良好, 可传至第 5 代。

2.3 NSCs 的鉴定 将原代培养 7 d 的神经球进行免疫细胞

化学检测, 发现绝大多数神经球在含有 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中, 2~3 h 即可贴壁, 神经球 Nestin 免疫反应呈阳性(封 2 图 3、4)。在高倍镜($\times 200$)下观察, 机械法的阳性神经球的数量(14.2 ± 1.92)显著高于酶消化法(8.2 ± 2.17), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 NSCs 诱导分化细胞的免疫细胞化学鉴定 将原代或传代培养 7 d 的神经球在有血清的培养基中进行诱导分化, 2~3 h 贴壁, 4~5 d 后可见细胞从神经球中迁移出来, 胞体呈星形、锥体形或不规则形(封 2 图 5)。继续培养, 细胞伸出突起, 7~9 d 后突起相互交织成网状(封 2 图 6)。免疫细胞化学染色显示 GFAP 或 NSE 免疫反应阳性细胞(封 2 图 7、8)。

3 讨 论

NSCs 是一种具有自我增殖及多向分化潜能的前体细胞, 近年来已成为治疗中枢神经系统退行性疾病和损伤性疾病的新途径^[3-6]。研究发现, NSCs 不仅存在于胚胎发育阶段, 而且终生存在; 不仅存在于最初认为的两个生发区(脑室下区和海马颗粒下区), 还存在于中脑、皮层等脑区。目前, 绝大多数研究是从小鼠、大鼠和人的胚胎脑中分离培养中脑 NSCs。但前期实验中发现采用胚胎小鼠存在操作方法复杂、容易导致污染, 且中脑组织相对量较少、分离取材部位不易明确等缺点。本实验选用出生 1~3 d 的小鼠, 成功培养出中脑组织 NSCs, 具有操作简单、重复性好的特点。

细胞分离分别采用机械法和酶消化法。实验初期用 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 消化中脑组织。细胞培养 72 h, 可见悬浮生长的神经球, 但数量较少。随着传代次数的增加, 神经球数量无明显增加, 部分神经球出现贴壁分化, 少数体积较大的细胞由于中央缺乏营养, 神经球增殖力明显减弱。实验中还发现酶消化法对时间的控制非常严格, 消化时间最好控制在 5~8 min, 若消化时间过长即出现消化液的颜色变得清亮, 无组织碎块, 会影响细胞的生长, 甚至由于细胞碎片较多而导致细胞死亡。此外, NSCs 表面具有多种生长因子受体, 酶消化作用于细胞表面可能会损伤部分细胞膜受体^[7]。而机械法操作步骤简便, 减少了胰蛋白酶及反复离心对细胞的损伤, 免疫组织化学显示原代培养第 7 天的细胞巢蛋白染色阳性, 且神经球的数目明显高于酶消化法, 传代后细胞生长状态良好, 有利于今后诱导分化及细胞移植实验中对于神经球数量的要求。

目前, NSCs 多采用无血清的基础培养基, 目的是去除血清中可能诱导 NSCs 分化的生长因子等干扰因素。同时需添加神经营养添加剂, B27 含有必需脂肪酸、抗氧化剂、维生素等成分, 是无血清培养基的理想添加剂^[8]。此外, 还需添加促进细胞有丝分裂的生长因子, 已证实 bFGF 对 NSCs 增殖的早期阶段发挥促有丝分裂的作用^[9]。本实验采用含有 2% B27 和 20 ng/mL bFGF 的 DMEM/F12 培养基, 成功地培养出了中脑 NSCs。

巢蛋白是在中枢神经系统干细胞中发现的一种神经元中间丝蛋白, 其表达始于神经胚形成时, 成熟的神经元和胶质细胞中无此蛋白, 是目前最常用的 NSCs 特异性分子标志^[10-15]。本实验对贴壁 2~3 h 的神经球行 Nestin 免疫细胞化学染色, 结果显示呈阳性反应。当加入含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中继续培养 4~5 d 后, 神经球发生贴壁分化, 免疫细胞化学显示 NSE 和 GFAP 呈阳性。表明获得的细胞为 NSCs, 具有分化为神经元和神经胶质细胞潜能的 NSCs。

综上所述, 本实验成功分离培养出新生小鼠中脑 NSCs, 并观察其生物学特性。在以后的研究中, 将重点探讨中脑 NSCs 体外定向诱导分化为多巴胺能神经元(下转第 2244 页)

TPS-2 诊断胰腺炎的总 PPV 为 1.98%, 而消化道溃疡、肾脏疾病多有腹痛或腹胀等消化道症状, 因此, 如果单凭尿 TPS-2 检测结果及症状就诊断为胰腺炎, 那么在这些人群中就会导致大量的误诊。当然, 本研究的标本量不是很充足, 所涉相关人群的 TPS-2 诊断 AP 的准确 PPV 还有待于进一步进行大样本统计分析获得, 而本研究外的其他人群的 TPS-2 诊断 AP 的价值评价也有待于进一步研究。

总之, 不同人群中尿 TPS-2 诊断胰腺炎的 PPV 差异较大, 如果不考虑胰腺炎的验前概率、不结合 CT 影像学检查及血尿淀粉酶检测结果, 而单凭尿 TPS-2 结果进行诊断, 可能会导致误诊。

参考文献:

- [1] 曾方银, 王前, 刘杰, 等. 尿胰蛋白酶原-2 与尿液淀粉酶早期诊断急性胰腺炎的循证评估[J]. 热带医学, 2009, 9(11): 1250-1255.
- [2] 吴丽颖, 李鹏, 凌明德, 等. 尿胰蛋白酶原-2 检测对急性胰腺炎的诊断价值[J]. 胃肠病学和肝脏病学杂志, 2009, 18(7): 665-667.
- [3] 吴尚农, 马天恒, 严伟, 等. 尿胰蛋白酶原-2 诊断急性胰腺炎的价值[J]. 南京医科大学学报, 2010, 30(12): 1802-1803.
- [4] 夏涵, 府伟灵. 尿淀粉酶/尿肌酐及尿胰蛋白酶原-2 诊断急性胰腺炎的评价[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2005, 26(4): 206-208.
- [5] Koshikawa N, Hasegawa S, Nagashima Y, et al. Expres-

sion of trypsin by epithelial cells of various tissues, leukocytes, and neurons in human and mouse[J]. Am J Pathol, 1988, 153(3): 937-944.

- [6] 张慕淳, 孔祥波. 肿瘤相关胰蛋白酶原在前列腺癌中的表达及意义[J]. 中国老年学杂志, 2007, 4(27): 669-670.
- [7] Paju A, Sorsa T, Tervahartiala T, et al. The levels of trypsinogen isoenzymes in ovarian tumour cyst fluids are associated with promatrix metalloproteinase-9 but not promatrix metalloproteinase-2 activation[J]. Br J Cancer, 2001, 84(1): 1363-1371.
- [8] Williams SJ, Gotley DC, Antalis TM. Human trypsinogen in colorectal cancer[J]. Int J Cancer, 2001, 93(1): 67-73.
- [9] 中华医学会消化病学分会胰腺疾病学组. 中国急性胰腺炎诊治指南(草案)[J]. 中华内科杂志, 2004, 43(3): 236-238.
- [10] Jang T, Uzbielion A, Sineff S, et al. Point-of-care urine trypsinogen testing for the diagnosis of pancreatitis[J]. ACAD Emerg Med, 2007, 14(1): 29-34.
- [11] 谢放. 慢性肾功能衰竭并发急性胰腺炎 25 例临床分析[J]. 医学信息, 2011, 24(1): 78-78.
- [12] 刘才金, 袁柳仙, 何晓凤. 慢性肾功能衰竭误诊为消化性溃疡 3 例病例分析[J]. 中外医学研究, 2011, 9(6): 115-115.

(收稿日期: 2011-10-09 修回日期: 2012-01-06)

(上接第 2241 页)

的条件, 分析其调控机制, 为其作为种子细胞进行体内移植治疗帕金森病提供实验学基础。

参考文献:

- [1] Arias-Carrion O, Yuan TF. Autologous neural stem cell transplantation: a new treatment option for Parkinson's disease? [J]. Med Hypotheses, 2009, 73(5): 757-759.
- [2] 丁继固. 中脑神经干细胞转基因治疗帕金森病: 可能与否? [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(10): 1855-1860.
- [3] Taupin P. Stem cell engineering for cell-based therapy [J]. Neural Eng, 2007, 4(3): R59-63.
- [4] Fauza DO, Jennings RW, Teng YD, et al. Neural stem cell delivery to the spinal cord in an ovine model of fetal surgery for spina bifida[J]. Surgery, 2008, 144(3): 367-373.
- [5] Gritti A, Bonfanti L. Neuronal-glial interactions in central nervous system neurogenesis: the neural stem cell perspective[J]. Neuron Glia Biol, 2007, 3(4): 309-323.
- [6] Bithell A, Williams BP. Neural stem cells and cell replacement therapy: making the right cells[J]. Clin Sci(Lond), 2005, 108(1): 13-22.
- [7] Wachs FP, Couillard-Despres S, Engelhardt M, et al. High efficacy of clonal growth and expansion of adult neural stem cells[J]. Lab Invest, 2003, 83(7): 949-962.
- [8] Willerth SM, Fixel TE, Gottlieb DI, et al. The effects of soluble growth factors on embryonic stem cell differentiation inside of fibrin scaffolds[J]. Stem Cells, 2007, 25(9):

2235-2244.

- [9] Wachs FP, Couillard-Despres S, Engelhardt M, et al. High efficacy of clonal growth and expansion of adult neural stem cells[J]. Lab Invest, 2003, 83(7): 949-962.
- [10] Shafey D, Mackenzie AE, Kothary R. Neuro developmental abnormalities in neuro Sphere-derived neural stem cells from SMN-depleted mice[J]. Neuro Sci Res, 2008, 86(13): 2839-2847.
- [11] Corti S, Nizzardo M, Nardini M, et al. Isolation and characterization of murine neural stem/progenitor cells. based on Prolamin-1 expression[J]. Exp Neurol, 2007, 205(2): 547-562.
- [12] Cacci E, Villa A, Parmar M, et al. Generation of human cortical neurons from a new immortal fetal neural stem cell line[J]. Exp Cell Res, 2007, 313(3): 588-601.
- [13] Lagace DC, Whitman MC, Noonan MA, et al. Dynamic contribution of nestin-expressing stem cells to adult neurogenesis[J]. Neurosci, 2007, 27(46): 12623-12629.
- [14] Oshima K, Teo DT, Senn P, et al. LIF promotes neurogenesis and maintains neural precursors in cell populations derived from spiral ganglion stem cells[J]. BMC Dev Biol, 2007, 12(7): 112-116.
- [15] Wang TT, Jing AH, Luo XY, et al. Neural stem cells: isolation and differentiation into cholinergic neurons [J]. Neuro Report, 2006, 17(13): 1433-1436.

(收稿日期: 2012-02-08 修回日期: 2012-05-11)