

胚胎大鼠中枢神经系统神经干细胞 分离培养方法研究*

吕欣¹ 王楠¹ 霍思维¹ 张尚立¹ 解琨² 苗俊英^{1**}

(1 山东大学生命科学院发育生物学研究所 济南 250100 2 山东金泰生物工程有限公司 济南 250100)

摘要 为了建立经济实用的神经干细胞培养方法,以 Wistar 大鼠胚龄 14~15 天的胚胎为实验材料,选取中枢神经系统的大脑和小脑神经组织,经 0.125% 胰酶消化处理,在生长因子(aFGF 和 bFGF)作用下,采用无血清培养法进行培养。通过倒置相差显微镜进行观察,可观察到明显的神经干细胞的不对称分裂图像。神经干细胞在培养一段时间后均出现细胞团,细胞团贴壁后可进行分化,形态上表现为神经元样和神经胶质样细胞。利用激光扫描共聚焦显微镜对其进行鉴定,可检测到神经干细胞标志性蛋白—Nestin 蛋白。采用此法可以分离得到具有干细胞特征和分化潜能神经干细胞,建立了一套神经干细胞的分离、培养和鉴定的方法,这将对更好地理解神经系统的发育机制,及临床治疗神经系统疾病具有重要意义。

关键词 神经干细胞 体外培养 生长因子

近 10 年的研究表明:中枢神经系统中存在部分细胞具有自我修复和增殖、分化为 3 种类型成人脑细胞(神经元、星型胶质细胞和少突胶质细胞)的能力^[1]。这些细胞具有干细胞的特点,称为神经干细胞(neural stem cells, NSCs)。神经干细胞发现最早、最直接的证据是 Stemple 1992 年从神经嵴分离、鉴定出能产生神经元和雪旺氏细胞的神经嵴干细胞,这些细胞可以自我更新,产生同样的具有分化潜能的细胞,还可产生仅能定向生成神经元或胶质细胞的成神经元细胞或成胶质细胞^[2]。对于神经干细胞的定义,McKay 1997 年提出神经干细胞就是指具有分化为神经元、星型胶质细胞和少突胶质细胞的能力,能自我更新并足以提供大量脑组织细胞的细胞^[3]。同时,研究表明成年哺乳动物的脑组织内不仅存在神经干细胞,而且还证实这些神经干细胞在细胞因子、激素或环境因素的调控下能体外分裂,并可进一步分化为神经元或神经胶质细胞,起到相应的生物学效应。

对于神经干细胞的研究已经成为神经科学领

域引人注目的前沿课题。目前,已经从鸟类、啮齿类、灵长类以及人类的胚胎和成年中枢神经系统的不同部位分离并证实了神经干细胞的存在,并对其在不同条件下的增殖、分化特性做了较为深入的研究,其意义在于:一是更好地了解 and 掌握神经系统的发育机制;另一个就是使其在治疗神经系统疾病方面发挥重要作用。基于此,对于神经干细胞方面的研究主要围绕确立神经干细胞的存在部位;建立神经干细胞体外培养的方法;研究神经干细胞在发育过程中的迁移、分化和发育机制及规律;将培养得到的神经干细胞用于动物模型及临床实验等课题而开展的。

这些课题的研究都依赖于神经干细胞的体外培养这一基本手段。故使神经干细胞在体外维持其干细胞样特性,即在体外培养、克隆神经干细胞,已成为研究的热点之一。利用生长因子刺激神经干细胞增殖是神经干细胞体外培养的常用方法^[4~6]。但是以往的研究报道中,对培养技术的描述比较简单,不同的研究小组采用的方法也不尽相同。本课题基于此,从提取生长因子入手,通过大量反复的实验,建立了一套神经干细胞的分离、培养和鉴定的方法,成功地从胚胎大鼠的大脑和小脑分离、培养得到神经干细胞。这对于深入研究神经

收稿日期: 2003 10 24

* 国家自然科学基金资助项目(30240044)

** 通讯作者, 电子信箱: miaojy@sdu.edu.cn

干细胞的增殖、分化、迁移等生物学特性,解决神经系统发育机制问题和利用神经干细胞治疗神经性疾病和脑损伤具有重要的意义。

1 材料和方法

1.1 材料

Wistar 雌性大鼠,体重 200~300g,雌雄鼠交配见阴道栓后记为胚胎起始日(embryonic day 0, E0),然后饲养 14~15d,取其胚胎(胚龄 14~15d, E14~E15)作为实验材料。

1.2 试剂

DMEM(高糖)/F-12, B27 购于 Gibco 公司; anti-nestin IgG 购于 CHEMICON 公司; 荧光素 FITC 标记的二抗购于北京中山公司。

1.3 方法

1.3.1 成纤维细胞生长因子 FGF 的提取 采用 Lobb 等的方法从新生牛脑中提取 FGF^[7]。过滤灭菌,分装后储存于-80℃冰箱。

1.3.2 神经干细胞的分离 水浸法处死受孕 15d 的 Wistar 大鼠,无菌条件下分离子宫取出胎鼠,用 aCSF 液(4℃预冷)冲洗表面血迹,分离大脑、小脑组织,机械剪碎。0.125% 胰蛋白酶 37℃下消化 30min,用含 10% 小牛血清的 DMEM/F12 培养液终止消化,800r/min 离心 10min,弃上清;加入 DMEM/F12 培养液吹打混匀,100 目滤网过滤,800r/min 离心 10min,弃上清;反复冲洗 2 次,以确保残余的酶液及血清去除干净。

1.3.3 神经干细胞的培养 将细胞按 $4 \times 10^5/\text{ml}$ 的密度悬浮于含 80ng/ml FGF 的完全培养液中,接种于塑料培养皿,置于 37℃的 5% CO₂ 培养箱中悬浮培养,每隔 2d 换 1 次液,约 7d 传代。

1.3.4 死活细胞的分离 取培养的细胞悬液,800r/min 离心 10min,弃上清,加入 2ml 的 HPBS-FCS 悬浮沉淀,用 1ml 注射器(带 5 号针头)用力吹打混匀,200r/min 温和离心 0.5min,沉淀聚集物,将上层活细胞悬液转移,800r/min 离心 10min,弃上清,加入 DMEM/F12 培养液冲洗 2 次,回收细胞,加入完全培养液接种培养。

1.3.5 免疫细胞化学检测 Nestin 蛋白 将细胞悬液滴在放有盖玻片(涂有 0.1mg/ml 多聚赖氨酸)的 24 孔板中,继续培养 6h,细胞贴壁后,吸去细胞培养液,4% 多聚甲醛溶液室温下固定 15min,0.01

mol/L PBS 冲洗 3 次,每次 5min;3% 过氧化氢/甲醇溶液(现用现配)室温下作用 5min,0.01mol/L PBS 冲洗 3 次,每次 5min;滴加 10% 正常山羊血清封闭液室温下作用 20min;吸去多余液体,加入一抗(anti-nestin,小鼠抗大鼠)放入湿盒中,4℃低温作用过夜,0.01mol/L PBS 冲洗 3 次,每次 5min;加入相应的二抗(山羊 IgG,山羊抗小鼠),37℃温育 30min,0.01mol/L PBS 冲洗 4 次,每次 5min,在激光扫描共聚焦显微镜下观察。同时,用 A₅₄₉ 细胞作对照试验。

2 结果

2.1 细胞的形态学观察

用倒置相差显微镜观察,可见酶液消化得到的多为单细胞,细胞多呈圆形或椭圆形,大小不一,边缘发亮,折光性强。接种后 20h,部分细胞贴壁,贴壁细胞为已分化的神经细胞,培养液中大量存在的悬浮细胞则是神经干细胞。神经干细胞多为单细胞,可观察到大量的分裂相和较小的细胞团(图 1a)。培养 2~3d 后,可见大小不等的细胞团,较小的细胞团由 4~8 个细胞组成(图 1b),较大的细胞团则由数十个细胞组成。细胞团中的细胞有的细胞形态较好,边缘清晰,折光性强,内部有颗粒状结构,此为活细胞;有的细胞仅有轮廓,有褶皱折光性较弱内部无细胞结构,此为死细胞。随着细胞培养天数的增加,细胞团中死细胞数和细胞碎片逐渐增加。

2.2 细胞具有干细胞样的特征

用倒置相差显微镜观察,发现接种培养 24h 左右,细胞悬液中分裂相最多,细胞处于生长旺盛阶段。在众多的分裂相中,可以观察到部分正在进行或刚刚完成不对称分裂的细胞。不对称分裂被认为是干细胞的一个标志性的特征,即干细胞通过分裂可产生一个干细胞和一个祖细胞。在实验中可以在光镜下清楚地观察到不对称分裂(图 2),分裂形成 2 个大小形态明显不等的细胞。

2.3 细胞 Nestin 蛋白的检测

培养得到的神经干细胞经过免疫细胞化学方法处理后,在激光扫描共聚焦显微镜下观察可以观察到明显的绿色荧光,即细胞 Nestin 蛋白表达呈阳性(图 3),而对照组 A₅₄₉ 细胞观察不到绿色荧光,蛋白表达呈阴性。

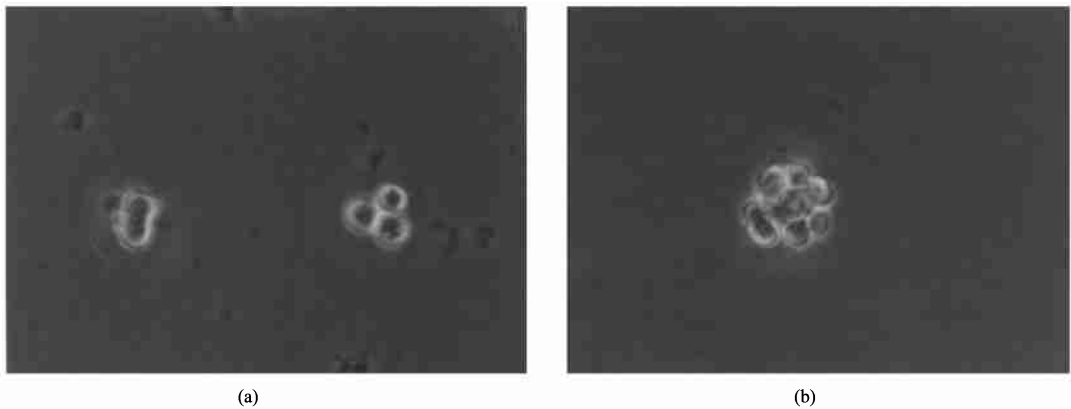


图 1 培养得到的神经干细胞团(10× 20)
a: 24h 时的小细胞团及分裂相; b: 48h 时的大细胞团

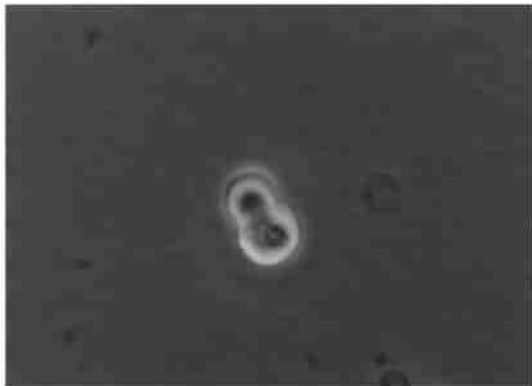


图 2 神经干细胞的不对称分裂图像(10× 20)

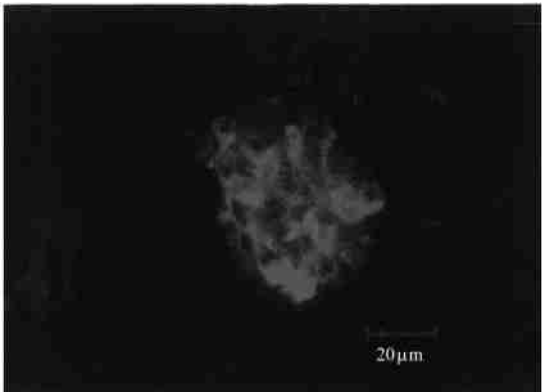


图 3 神经干细胞 Nestin 蛋白阳性的图像
(FITC 绿色荧光标记)

2.4 细胞具有多种分化潜能

从接种培养的第 2 天开始,在倒置相差显微镜下就可以观察到贴壁分化的神经细胞(图 4a)。这些细胞都平铺在培养皿皿底,较为铺展,形态各异,多伸有突触。在形态上可观察到神经元和神经胶质细胞的特征。随着细胞培养天数的增加,贴壁

2.5 细胞团贴壁后逐渐分化

大多数细胞团贴壁后 1d,便可见少数细胞从细胞团中游走出来,多为不规则的多边形,细胞较小,突起不明显,亦有少数细胞呈枣核形,胞体饱满,边缘发亮,折光性强,且伸出细长的突触。继续培养至 6~ 8d 左右,细胞团的细胞基本全部贴壁,单层平铺于培养皿皿底,细胞排列紧密,多有突起。细胞团之间建立了广泛的联系。随着培养时间的延长,可见皿底出现神经网络样结构(图 4b)。

3 讨 论

神经干细胞作为干细胞的一种,具有干细胞的一般特性和重要特征——不对称分裂。神经干细胞增殖的方式包括对称分裂和不对称分裂。对称分裂指一个神经干细胞分裂形成 2 个大小形态相同的子细胞;不对称分裂指神经干细胞分裂产生 2 个形态大小不等的细胞,即 1 个干细胞和 1 个祖细胞。祖细胞在外界的刺激因子作用下可向多个细胞系的终末期分化。对于神经干细胞来说,通过对称分裂维持细胞数目的恒定,通过不对称分裂维持细胞种类的恒定。实验中,我们利用倒置相差显微镜直接观察到神经干细胞的不对称分裂的图像,有力地证明了其干细胞的性质。

神经巢蛋白(Nestin 蛋白)属于第 IV 类中等纤维,是哺乳动物神经干细胞的主要细胞骨架。它的表达起始于神经胚形成时,在神经板上皮细胞就开

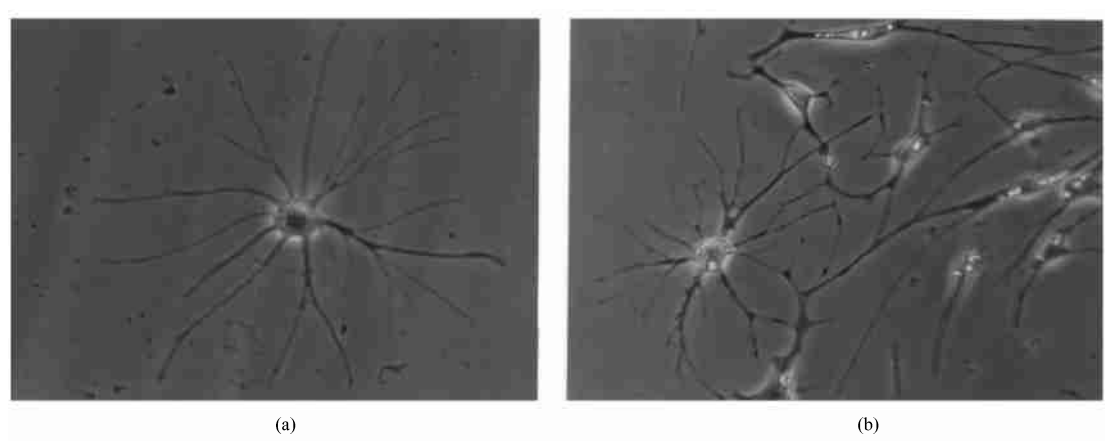


图 4 神经干细胞分化潜能(10× 20)
a: 贴壁分化的神经元样细胞; b: 神经网络样结构

始表达,当神经细胞的迁移基本完成后,Nestin 蛋白的表达量就开始下降,并随着神经细胞分化的完成而停止表达^[8]。因此,Nestin 蛋白是神经干细胞的标志蛋白。实验中,我们利用激光扫描共聚焦显微镜观察到较好的 Nestin 蛋白阳性的图像,有力证明其神经干细胞的性质。

在实验中,我们选择了胚龄 14~ 15d(E14~ E15)的胎鼠为实验材料。一般地,按照胚胎发育过程来看,发育早期较易获得神经干细胞,且其在体外培养时干细胞样特征会保持得较为长久,但是在实验过程中发现,早期的胚胎(胚龄小于 13d)在操作上很难较纯地分离出中枢神经系统。更重要的是,体外培养所必须的生长因子 FGF 的受体表达峰值出现在胚胎发育的中期^[9]。在 E14~ E15 生长因子的作用能够很好地发挥,在实验操作上较为容易,故选择这一时期的胚胎为实验材料。

生长因子是神经干细胞体外培养必须的因素。一般的研究小组常用的是表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF) 和碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)。但是这两种生长因子一起使用价格昂贵,且作用效果并不理想。本课题根据具体情况,从提取生长因子入手,从新生牛脑中提取了成纤维生长因子混合物(包括 aFGF 和 bFGF),共同作用于神经干细胞,作用效果显著,经

济实惠。但是其具体的作用机理尚不清楚,有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Morrison S J, Shah N M, Anderson D J. Stem cells in the central nervous system. *Science*, 1997, 276(5309): 66~ 79
- [2] Stemple D L, Anderson D J. Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell*, 1992, 71(6): 973~ 985
- [3] McKay R. Stem cells in the central nervous system. *Science*, 1997, 276(5309): 66
- [4] Gage F H, Ray J, Fisher L J. Isolation, characterization, and use of stem cell from the CNS. *Annu Rev Neurosci*, 1995, 18: 159~ 192
- [5] Steghaus, Kovac S. Stem cells as potential nerve therapy. *Science*, 1999, 285(5428): 650~ 651
- [6] Brustle O, Jones K N, Lianish R D, et al. Embryonic stem cell derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science*, 1999, 285(5428): 754~ 756
- [7] Lobb R R, Fett J W. Purification of two distinct growth factors from bovine neural tissue by heparin affinity chromatography. *Biochemistry*, 1984, 23: 6295~ 6296
- [8] Lendahl U, Zimmelman L B, McKay R D G. CNS Stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*, 1990, 60: 585~ 595
- [9] Weiss B, Janet T, Grothe C. Localization of bFGF and FGF receptor in the developing nervous system of the embryonic and newborn rat. *J Neurosci Res*, 1993, 34: 442~ 453

(下转第 61 页)

Expression of Human β -IFN Using Yeast *Pichia pastoris* Fermentation Strategy Optimization

LI Ning-li¹ MA An-lun¹ YU Qi-wen¹ SHEN Ba-hua¹ ZHANG Ji-ying¹ NIE Hong¹ BAI Jun¹
SHEN Tian-wei¹ XI Bo² LI Guang-shan³ ZHANG Dong-qing¹

(1 Shanghai Second Medical University¹, Shanghai Institute of Immunology¹, Shanghai 200025, China)

(2 Dalian Golden Genetech Com., Dalian 116001, China 3 Beijing Zicheng Medicine and Biology Com. Lmt, Beijing 100071, China)

Abstract Aim: To study on procession and optimization of large scale expression of human β -interferon in 15 liter bioreactors with yeast *pichia* system. Method: How long the glycerol using phase will take with different of density of seed yeast was studied by inoculating two density of yeast. The best time of starting glycerol feed phase was identified by dissolved oxygen (DO). The methanol concentration was controlled by different feed speed. Optimized pH in yeast growth phase and protein expression phase were confirmed by compared β -IFN yield in different pH. The collecting time of high yield of protein was demonstrated by comparing protein concentration in different time after induction phase. Result: The weight of wet cells could reach 157g/L in 18 hours fermentation. The 219g/L of wet cells could be gotten in 5 hours when starting another glycerol feed by returning DO to 67%. The protein expression was higher using very low Methanol feed starting speed (methanol concentration was 0.03%). The ideal β -IFN yield was gotten using 0.5% of final methanol concentration. pH6.0 was much good for yeast growth during growth phase but high β -IFN will get when pH3.0 was kept in all of the process of protein expression phase. The high yield of β -IFN was reached after 70 hours from starting feed methanol. Conclusion: High density seed cells could enhance the growth of yeast. Yeast growth was faster in glycerol feed phase when starting to add glycerol at 67% of DO. High protein yield will get by feeding methanol slowly, kept pH3.0 after methanol feeding. The protein concentration will reach highest peak at 70 hours after feeding methanol.

Key words β -INF Fermentation Yeast *Pichia Pastoris*

(上接第41页)

Research About the Isolation and Culture Methods of Neural Stem Cells from the Embryonic Rat Central Nervous System

LU Xin¹ WANG Nan¹ HUO Si-wei¹ ZAHNG Shang-li¹ XUE Kun² MIAO Jurr-ying^{1*}

(1 Institute of Developmental Biology School of Life Science, Shangdong University, Jinan 250100, China)

(2 Shandong Jintai Biotechnology Co. Ltd., Jinan 250100, China)

Abstract In the presence of FGF, using serum free culture method to isolate and culture neural stem cells from embryonic day 14~15 of rats cerebra and cerebellum. The inverted phase contrast microscope was applied to observe the characteristics of neural stem cells, the cells showed stem cell like unsymmetric division. After attachment, they were able to differentiate into neuron-like and astrocyte-like cells. And the immunofluorescence was used to detect nestin antigen of the cells. Methods are established to isolate and culture neural stem cells. The NSCs maintained the characteristics of stem cells.

Key words Neural stem cells Cell culture Growth factor