

小鼠胚胎干细胞在单层粘附培养中 向神经细胞的分化*

汤锋武 李宗金 范存刚 卢士红 刘 斌 韩忠朝**

(中国医学科学院中国协和医科大学血液学研究所实验血液学国家重点实验室 天津 300020)

摘要 目的: 探讨小鼠胚胎干(ES)细胞在无血清培养基中以单层粘附培养方式向神经分化的方法。方法: 比较 ES 细胞在不同培养基中的生长情况, 分析 ES 细胞在不同时间分化形成神经细胞的比例。结果: (1) DMEM/F12 和 Neurobasal/B27 的 1:1 混合培养基最适合 ES 的生长。(2) 单层粘附的 ES 细胞表达神经细胞粘附分子(NCAM)的比例随时间增长而增加, 而 nestin 的表达先增加后下降。(3) ES 细胞可在两周分化为神经胶质及神经元, 形成神经网络。结论: 小鼠 ES 细胞可在单层粘附培养中获得向神经的高效分化。

关键词 胚胎干细胞 分化 神经细胞 单层培养

小鼠胚胎干(ES)细胞能够产生各种细胞类型。但由于不能有效控制 ES 细胞的体外分化, 因此, 将其作为细胞移植治疗的一种细胞来源受到限制。对 ES 细胞而言, 将单细胞悬浮培养后开始出现神经分化, 但所获得的神经分化比例很低(0.1%~0.2%)^[1]。多数研究认为多细胞的聚集, 即形成胚胎小体(embryonic body, EB)或与诱导分化的基质细胞共培养, 是 ES 细胞向神经细胞有效分化起始的必需条件。通过 EB 形成后加入全反式维甲酸(RA)或者与特定的基质细胞共培养, 可获得向神经细胞的高效分化^[1, 2], 其中 RA 的作用是多方面的并具有不确定的生理相关性, 而基质细胞具有不明确神经诱导活性^[3]。这种分化条件较为复杂, 并且 EB 的外层细胞先分化而内层细胞仍保持未分化状态, 形成的细胞群分化不均一。本文报道一种在单层粘附培养中从 ES 细胞获得向神经细胞有效分化的方法。

1 实验材料和方法

1.1 未分化 ES 细胞的培养

小鼠 ES J1 细胞系由哈佛大学王征宇博士惠

赠, 该细胞系由 SNL 作为滋养层, 按 Orimo 等^[4]的方法培养, DMEM(Gibico)培养液中加入 0.1mmol/L 的非必需氨基酸, 小鼠的白血病抑制因子(mLIF)(Stemcell 公司) 10ng/ml, 100 μ mol/L 的硫代甘油(MTG)(Sigma 公司)及谷氨酰胺 2mmol/L, 每 24h 换培养液, 隔日传代。

1.2 ES 细胞分化的条件

首先将未分化的 ES 细胞利用差速贴壁法去除 SNL 滋养层细胞(SNL 在培养 1h 即可贴壁, ES 细胞贴壁需 4~6h), 使其在由 LIF 的培养液中继续生长达到 60% 汇合。将上述无 SNL 的 ES 细胞用 0.05%/0.02% 的胰酶/EDTA(Gibico) 消化后以 $1 \times 10^4/cm^2$ 种在用 1% 明胶包被的 6 孔及 24 孔培养板中(Coming 公司), 分别用 DMEM/F12/Neurobasal/B27(1:1 混合, Gibico)、DMEM/F12/B27(Gibico) 及 DMEM/F12 加 2% BSA(Sigma) 培养基同时添加 ITS(胰岛素、转铁蛋白和硒酸钠混合物, Gibico) 培养, 隔日半量换液。在 6、12、24、48、96h, 将 24 孔板中的 ES 细胞置于相差显微镜下观察, 并各选取三孔消化收集细胞, 用胎盘蓝染色后活细胞计数。

1.3 流式细胞检测

收集 6 孔板中第 2、4、8 天单层培养的细胞, 分别用 PE 标记的 CD31 单克隆抗体、IgG 对照(均购自 BD Biosciences 公司)和鼠源的 NCAM 单抗(Chemicon 公司)及相应的 FITC 标记的兔抗鼠二抗

收稿日期: 2004-07-20 修回日期: 2004-09-27

* 国家重点基础研究发展规划“973”(001CB5101)、“863”

(2001AA215311, 2002AA 223354) 资助项目

** 通讯作者, 电子信箱: lhzch@public.tj.tj.cn

(SouthernBiotech 公司) 标记细胞, 用流式细胞仪(美国 BectonDickinson 公司) 检测阳性率。

1.4 免疫细胞化学染色

不同时间的培养细胞用 4% 的多聚甲醛固定 40min 后, 0. 1mol/L 的 PBS 冲洗 2 次, 用 1% Triton 100 透膜 15min, 0. 02% Tween20 PBS 洗 5min, 0. 02% Tween20/ 1% BSA/ PBS 洗 5min, 3% 的 BSA 孵育 1h 以便消除非特异染色。使用一抗为鼠源 nestin (1: 200) 单克隆抗体、兔源 GFAP (1: 1000) 多抗、鼠源 NCAM (1: 200) 单抗、兔源 NF (1: 200) 单抗、鼠源 β -tubulin (1: 400) 单抗 (均购自 Chemicon 公司) 及相应的抗鼠、抗兔的 FITC (1: 200)、TRITC (1: 200) (购自 SouthernBiotech 公司) 标记的二抗。用 3% BSA 将一

抗稀释为相应浓度在 4℃ 孵育过夜, 加相应二抗后室温避光 1h, 60% 甘油/ PBS 封片, 用 Olympus 7kx (Japan) 及 SPOT RT CCD (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI) 照像。

1.5 细胞计数及数据处理

活细胞用胎盘蓝染色后血球计数仪计数, 免疫荧光染色后的阳性细胞数用 SPOT 软件 (Diagnostic Instruments) 图像合成后计数, 数据用均数 \pm 标准差 (SD) 表示, 两组数据间用 *t* 检验, *P* < 0.05 时有显著差异。

2 结果

(1) 单层粘附的 ES 在三种无血清培养条件下的

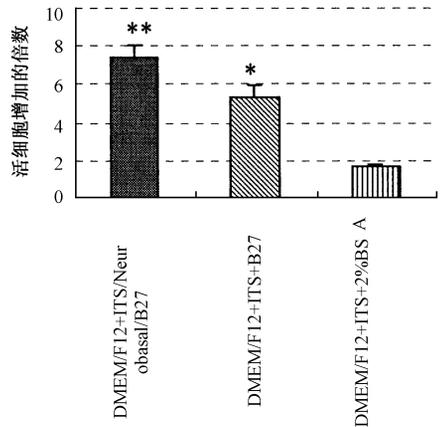
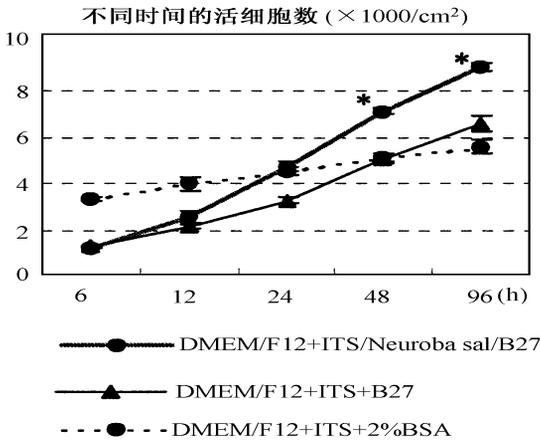


图 1 ES 细胞在不同培养基中的生长情况
在相同的接种密度下 ($1.0 \times 10^7/cm^2$), 在 48h 及 96h, DMEM/F12+ ITS/ Neurobasal/ B27 中的活细胞数较 DMEM/ F12+ IIS+ B27 中的多 (* *P* < 0.05)

图 2 在 96h, 不同培养基中活细胞增加的倍数
DMEM/ F12+ ITS/ Neurobasal/ B27 和 DMEM/ F12+ ITS/ Neurobasal/ B27 较 DMEM/ F12+ ITS+ 2% BSA 中存活的细胞数明显增多 (** *P* < 0.01, * *P* < 0.05)

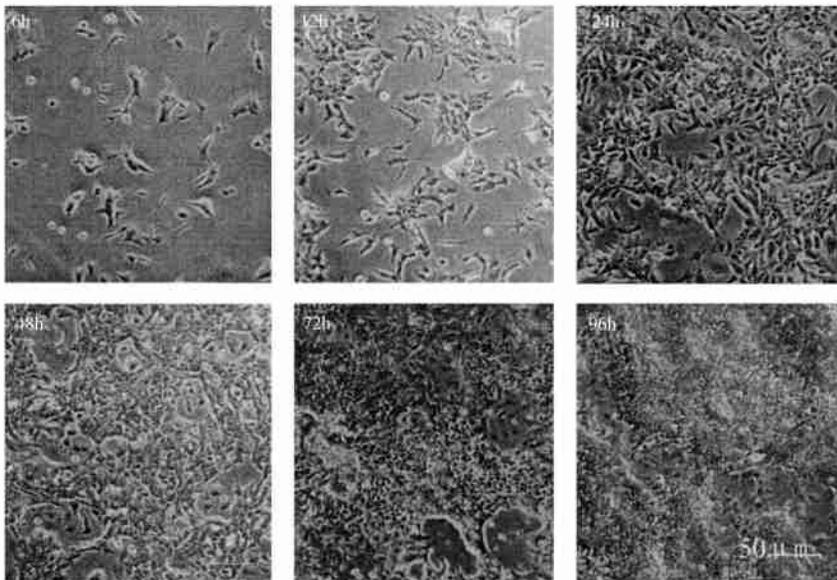


图 3 单层粘附生长的 ES 细胞在无血清培养基 DMEM/ F12+ ITS/ Neurobasal/ B27 中不同时间的生长状态

生长情况不同。在相同的接种密度下 ($1.0 \times 10^4/\text{cm}^2$), ES 细胞生长 48h 及 96h 后活细胞计数显示, DMEM/F12+ ITS/Neurobasal/B27 中的细胞数较 DMEM/F12+ ITS+ B27 中的多 (* $P < 0.05$) (图 1)。计算在 96h 三种无血清培养基中活细胞增加的倍数。结果显示, DMEM/F12+ ITS/Neurobasal/B27 和 DMEM/F12+ ITS/Neurobasal/B27 无血清培养基较 DMEM/F12+ ITS+ 2% BSA 中存活的细胞数明显增多 (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$) (图 2)。用相差显微镜观察单层粘附生长的 ES 细胞在无血清培养基 DMEM/F12+ ITS/Neurobasal/B27 中的生长状态。6h ES 以 $1.0 \times 10^4/\text{cm}^2$ 接种, 随时间增加, 单层粘附生

长的细胞集落逐渐增大, 到 96h 已汇合, 并开始复层生长, 表层有少量死细胞(图 3)。

(2) 流式细胞检测显示, 单层粘附的 ES 细胞, 在 DMEM/F12/Neurobasal/B27 无血清培养基中生长 48h 后, 出现 NCAM 表达阳性的细胞, 阳性率为 $18.7\% \pm 5.7\%$, 并且 NCAM 表达阳性细胞的比例随时间增长而增加, 第 4 天时为 $31.5\% \pm 6.1\%$, 在第 8 天时, 可达 $73.2\% \pm 4.3\%$ 。而 ES 细胞 CD31 的表达随时间增长而下降, 第 2 天时 $82.3\% \pm 7.2\%$, 第 4 天为 $50.1\% \pm 6.4\%$, 在第 8 天时下降为 $17.6\% \pm 5.2\%$ (图 4)。

(3) 免疫细胞化学染色显示, 在单层粘附的 ES

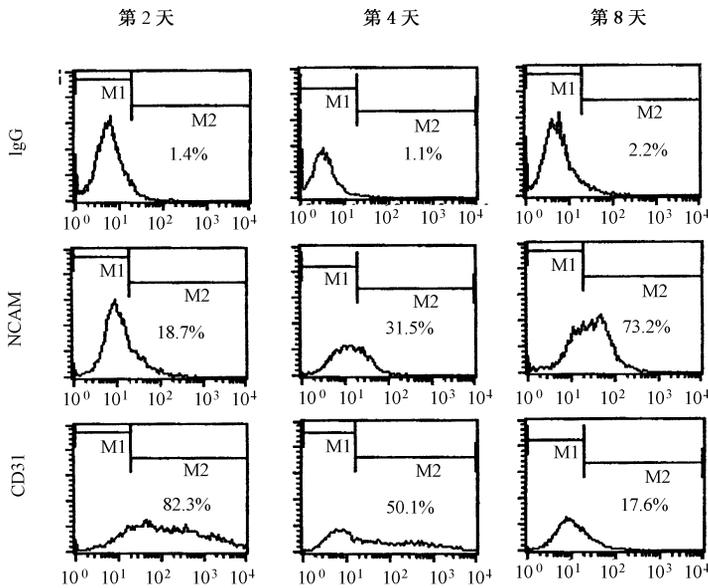


图 4 流式细胞检测显示, 单层粘附的 ES 细胞, 在 DMEM F12 Neurobasal/ B27 无血清培养基中生长 48h 后, 出现 NCAM 表达阳性的细胞, 并且 NCAM 表达阳性的细胞比例随时间增长而增加, 而 CD31 的表达随时间增长而下降

细胞中, nestin 的表达在第 4 天时升高 ($44\% \pm 10\%$), 第 6 天时达到最高比例 ($72.7\% \pm 4.8\%$), 第 8 天时开始下降 ($66\% \pm 4.0\%$)。推测上述 ES 细胞分化的 nestin 阳性的神经祖细胞在第 8 天时开始向神经胶质细胞及神经元分化(图 5)。单层粘附的 ES 培养两周后, 相差显微镜下可见大部分细胞有细长突起长出, 相互间形成神经网络(图 6)。免疫细胞化学染色后显示, GFAP 阳性的细胞达到 $63.6\% \pm 7.8\%$, $44.7\% \pm 6.8\%$ 的细胞表达 NF, 而 $35.7\% \pm 6.9\%$ 的细胞表达 β -tubulin(图 7, 8)。上述结果说明, 在单层粘附培养体系中, 从 ES 细胞分化为表达 nestin 的神经祖细胞需要 4~6 天。经两周时间, 神经祖细胞已分化为神经胶质及神经元,

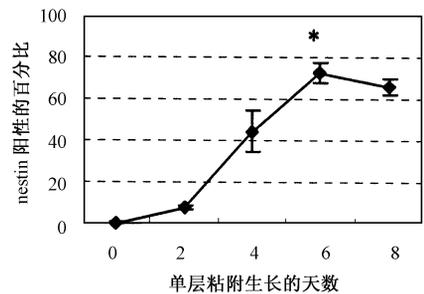


图 5 单层粘附生长的 ES 细胞在无血清培养基 DMEM/F12+ ITS/Neurobasal/B27 中生长, 在不同天数, nestin 阳性细胞的百分比的变化, 第 4 天时 nestin 阳性细胞开始增多, 第 6 天最高, 到第 8 天开始下降

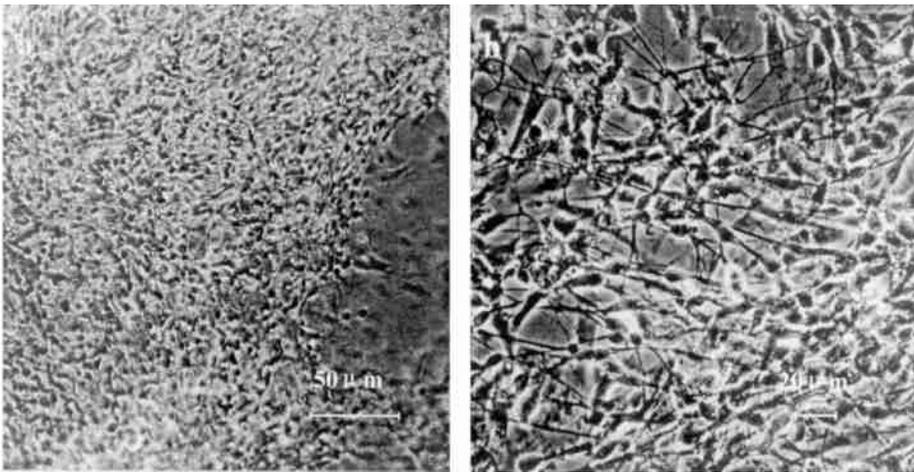


图 6 单层粘附生长的 ES 细胞在无血清培养基 DMEM/ F12+ ITS Neurobasal/ B27 中生长分化两周时, 大部分细胞长出细长突起, 呈神经样细胞 (a), 高倍镜下可见细胞间有神经网络形成 (b)

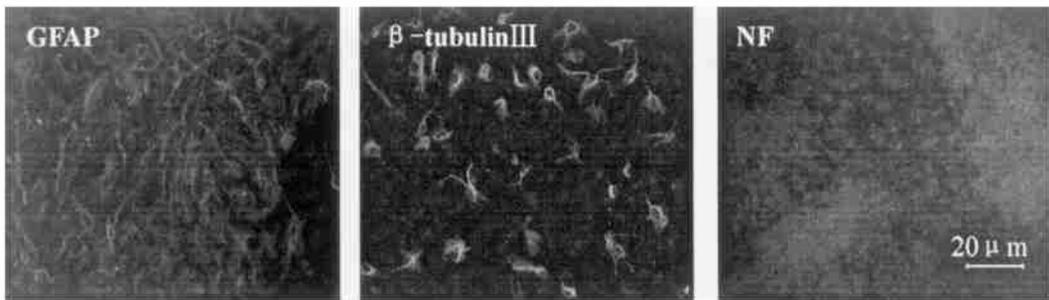


图 7 单层粘附生长的 ES 细胞在无血清培养基 DMEM/ F12+ ITS Neurobasal/ B27 中生长分化两周时, 用免疫组化染色检测星形胶质细胞的标志 (GFAP) 及神经元标志 (NF, β -tubulin III) 阳性细胞用红色 (TRITC) 及绿色 (FITC) 显示, 蓝色的胞核用 DAPI 复染

形成神经网络。在无外源细胞因子存在时, 形成的胶质细胞与神经元细胞比例恒定, 前者多于后者。

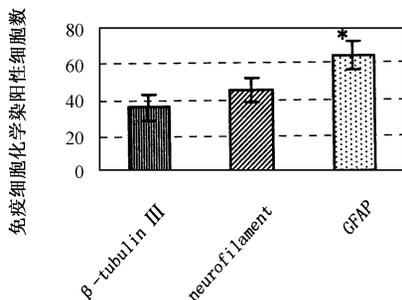


图 8 单层粘附生长的 ES 细胞在无血清培养基 DMEM/ F12+ ITS Neurobasal/ B27 中生长分化两周时, 用免疫组化染色检测星形胶质细胞的标志 (GFAP) 及神经元标志 (NF, β -tubulin III)。显示在无外源细胞因子时, 表达 GFAP 的星形胶质细胞多于表达 NF 和 β -tubulin III 的神经元细胞 (* $P < 0.05$)

3 讨论

如何诱导 ES 细胞向特定的细胞表型分化, 也是研究阐明脊椎动物胚胎系分化多样性所面临的挑战。从全能的 ES 细胞分化形成神经外胚层的机制并不很清楚。从鸡胚研究表明, 这种胚系的形成可能是一种缺省途径也可能是一种指导途径^[5, 6]。Ying 等^[7]发现, 多细胞的聚集对于激活鼠胚中神经外胚层的特异基因 *Sox 1* 的表达并不是必需的, 当 ES 细胞在明胶包被的培养板上生长而撤去白血病抑制因子 (LIF) 时, 细胞分化被启动, 但分化细胞在有血清存在时并不表达神经外胚层特异的基因-*Sox 1* 基因, 而在无血清时出现该基因的表达。ES 细胞在早期就有内皮细胞的表面标志 CD31 的表达^[8, 9], 我们发现, ES 细胞在无血清分化的第二天, 82.3% 的细胞表达 CD31, 到第 8 天时下降至 17.6%, 推测血清中含有的一些细胞因子促使

ES 细胞向非神经细胞如向内皮、造血分化, 而无血清存在时, 相关的信号途径不再被激活, 基因表达下调或关闭。研究表明, 胚胎在神经分化时, 需要成纤维生长因子 FGF 的信号, 而 ES 细胞表达一定量的 FGF4 蛋白^[10-12]。因此, 上述单层粘附的 ES 细胞向神经细胞的分化并非必需外源诱导信号的刺激, ES 细胞在培养过程中自分泌产生 FGF 可能是诱导 ES 细胞向神经分化的主要原因。由此可见, 去除血清是单层粘附 ES 细胞自发向神经分化的必需条件。

为了使 ES 细胞在无血清时也能得到更好的生长, 我们用 DMEM/F12 和 Neurobasal/B27 的 1:1 混合培养基、DMEM/F12/B27 及 DMEM/F12 加 2% BSA 三种培养基并添加 ITS 对 ES 细胞进行单层粘附培养, 并对不同时间的生长情况进行分析。结果显示, 在无血清时, DMEM/F12 和 Neurobasal/B27 的 1:1 混合培养基最适合 ES 的生长, DMEM/F12/B27 次之, 而 DMEM/F12 加 2% BSA 最差, 生成的活细胞数在两周时分别为接种时的 7.4、5.3 和 1.7 倍。因此, 无血清时, 通过优化培养基的配方仍能够获得 ES 细胞的良好生长。

我们发现单层培养的小鼠 ES 细胞在向神经分化时, 第 2 天既有 NCAM 的表达, 到第 8 天时比例可达到 73.2%。由于 NCAM 表达在细胞表面, 容易与其抗体结合, 因此, NCAM 可作为用荧光激活的流式细胞分选(FACS)的细胞表面标志, 从 ES 细胞中分选分化的神经细胞。nestin 的表达在第 2 天即出现, 第 4 天升高, 到第 6 天时达最高, 第 8 天后开始降低。从上述 nestin 表达比率的变化推测, 在此培养条件下, 从 ES 细胞分化的 nestin 阳性的神经祖细胞在第 8 天时已进一步分化为成熟的神经细胞, 从而使 nestin 表达比率下调。分化两周的 ES 细胞用免疫细胞化学染色发现, 有 63.6% ± 7.8% 的分化为 GFAP 阳性的星形胶质细胞, 而 44.7% ± 6.8% 表达 NF, 35.7% ± 6.9% 的表达 β -tubulin, 后两者均为神经元的标志。说明由 ES 分化的 nestin 阳性的神经祖细胞在没有外源细胞因子作用时, 既能分化为神经胶质细胞又能分化为神经元, 但前者的比例较后者多。

总之, 用粘附单层培养小鼠 ES 细胞, 可获得高

比例的神经细胞, 在分化第 6~8 天时以 nestin 阳性的神经祖细胞为主, 分化两周时产生大量表达 GFAP 的星形胶质细胞及表达 NF、 β -tubulin 的神经元。这一分化培养体系可为进一步研究神经细胞分化的分子机制以及为获得大量神经祖细胞作为细胞移植治疗的细胞来源提供一种技术平台。

参考文献

- [1] Tropepe V, Hitoshi S, Sirard C, et al. Direct neural fate specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism. *Neuron*, 2001, 30: 65~78
- [2] Wiles MV, Johansson BM. Embryonic stem cell development in a chemically defined medium. *Exp Cell Res*, 1999, 247: 241~248
- [3] Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, et al. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron*, 2000, 28: 31~40
- [4] Orimo A, Tominaga N, Suzuki M, et al. Successful germline transmission of chimeras generated by coculture aggregation with J1 ES cells and eight cell embryos. *Anal Biochem*, 1999, 269: 204~207
- [5] Bain G, Kitchens D, Yao M, et al. Embryonic stem cells express neuronal properties *in vitro*. *Dev Biol*, 1995, 168: 342~357
- [6] Munoz-Sanjuan I, Brivanlou AH. Neural induction, the default model and embryonic stem cells. *Nat Rev Neurosci*, 2002, 3: 271~280
- [7] Ying QL, Stavridis M, Griffiths D, et al. Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 183~186
- [8] Marchetti S, Gimond C, Iljin K, et al. Endothelial cells genetically selected from differentiating mouse embryonic stem cells incorporate at sites of neovascularization *in vivo*. *J Cell Sci*, 2002, 115: 2075~2085
- [9] Wartenberg M, Gunther J, Hescheler J, et al. The embryoid body as a novel *in vitro* assay system for antiangiogenic agents. *Lab Invest*, 1998, 78: 1301~1314
- [10] Streit A, Berliner AJ, Papanayotou C, et al. Initiation of neural induction by FGF signalling before gastrulation. *Nature*, 2000, 406: 74~78
- [11] Wilson SI, Graziano E, Harland R, et al. An early requirement for FGF signalling in the acquisition of neural cell fate in the chick embryo. *Curr Biol*, 2000, 10: 421~429
- [12] Feldman B, Pouymirou W, Papaioannou VE, et al. Requirement of FGF4 for postimplantation mouse development. *Science*, 1995, 267: 246~249

Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells into Neural Cells in Adherent Monoculture

TANG Feng-wu LI Zong-jing FAN Cuir-gang LIU Shi-hong LIU Bin HAN Zhong-chao
(State Key Laboratory of Experimental Hematology, National Research Center for Stem Cell Engineering & Technology,
Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

Abstract Objective : To evaluate different methods of adherent monocultured mouse embryonic stem (ES) cells' differentiation into neural cells in serum-free medium. **Methods:** We selected the best medium fitted for ES cells culture, and analyzed the neural differentiation of ES cells by comparing increased number of viable cells among different serum-free medium. **Results:** (1) DMEM/F12/Neurobasal/B27 was the optimal serum-free medium suitable for ES cells monoculture. (2) The percentage of cells positive for neural cell adhesion molecule (NCAM) increased along with the time, while the percentage of nestin positive cells began to increase at day 4 and then dropped at day 8. (3) Two weeks later, $63.6\% \pm 7.8\%$ of cultured cells expressed glial fibrillary acidic protein (GFAP), $44.7\% \pm 6.8\%$ cells expressed neurofilament (NF) and $35.7\% \pm 6.9\%$ cells expressed β -tubulin. **Conclusion:** In adherent serum-free monoculture, ES cells can sufficiently develop into neural precursors and then differentiate into astrocytes and neurons.

Key words Embryonic stem (ES) cells Differentiation Neural cells Monoculture

(上接第 77 页)

Comparison of the Expression Properties of Three Mammary Gland-specific Expression Vectors

LI Guo-cai¹ SUN Huai-chang² ZHU Qiu-ju² ZHANG Quan² JU Xing-zhu¹ CHEN Gang²
XUE Fang-ming² YU Ke-xiang²

(1 College of Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225001, China)

(2 College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract To compare the expression properties of self-constructed mammary gland-specific vector p205C3 with vectors pBJ41 and pBC1 obtained from abroad, hLYZ cDNA was subcloned into the three vectors. After mixing with 25kDa polyethylenimine (PEI), the three recombinant vectors, p205C3LYZ, pBJLYZ and pBCLYZ, were injected into mice in lactation via tail vein route, respectively. Micrococcal lysis assay of the milk samples showed that the cDNA was efficiently expressed in the mammary glands with similar expression levels ranging from 60 to 87mg/L. Different tissues of each vector-injected mouse were assayed for transcription of hLYZ mRNA by dot blotting and for expression of hLYZ activity by Micrococcal lysis assay. The results showed that expression of the three recombinant vectors was mainly restricted to mammary glands with some degrees of ectopic expression in spleen, intestines and/or kidney. These data indicate that expression properties of the self-constructed mammary gland-specific vector p205C3 were similar to other two vectors obtained from abroad and usable for developing mammary gland bioreactors.

Key words Human lysozyme cDNA Mammary gland-specific expression vectors Transient expression