

神经干细胞克隆球中干细胞的比例变化

王晓静¹, 张 衡^{2*}

(山东大学医学院, ¹细胞生物学研究所; ²生理学研究所, 济南 250012)

摘要: 为了定量研究神经干细胞体外产生的克隆结构“neurospheres”中干细胞的比例变化, 利用无血清培养、细胞克隆培养技术及免疫细胞化学染色方法, 观察不同代数神经干细胞克隆球中 nestin 阳性细胞的比例。发现随着传代次数增加, 克隆球中 nestin 阳性细胞的比例也在显著减少 ($P < 0.001$)。提示在体外培养体系中, 形成的克隆球具有异质性, 并且在不同代数间神经干细胞的比例也显著不同。

关键词: 神经干细胞; 细胞克隆培养; 免疫细胞化学染色; 异质性

中图分类号: Q329.28 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9977(2004)02-167-04

自从1992年 Reynolds^[1]提出神经干细胞的概念以来, 神经干细胞的研究是近年来生命科学研究的热点之一。神经干细胞的发现彻底改变了人们以往认为中枢神经系统神经元不能再生的认识, 给神经科学研究带来了曙光, 并为神经系统疾病与损伤修复的研究提供了一种新的治疗策略。神经干细胞可直接用于细胞治疗或作为基因治疗的载体来治疗神经系统疾病如帕金森病、脊髓损伤等。本研究从胚胎大鼠前脑分离神经干细胞, 按照本实验室建立的一套完整的方法^[2,3]来定量地观察悬浮的克隆球中神经干细胞的比例, 为进一步分离、纯化神经干细胞来进行基因治疗及细胞移植提供数据依据。

1 材料与方 法

1.1 动物与试剂

Wistar 孕大鼠(孕 13.5d)由山东大学西校区实验动物中心提供。DMEM/F12(1:1)和 B₂₇ 为 Gibco 公司产品, bFGF 和 EGF 为 Peprotech 公司产品, 抗 nestin IgG 为 Chemicon 公司产品。

1.2 取材及原代培养

按照本实验室所建立的具体实验步骤, 用无血清培养液^[2,3] (DMEM/F12 1:1, 20ng/ml EGF, 20ng/ml bFGF, 2% B₂₇) 培养神经干细胞, 3 天换液一次。

1.3 传代培养

离心收集原代培养 7d 的神经干细胞克隆球, 用 Paster 吸管吹打进行机械分离, 用无血清培养液重

新稀释为单细胞悬液, 台盼蓝染色并记数活细胞, 将细胞悬液按 10⁴ 个/ml 密度(活细胞数)传代培养, 每隔 3 天换液一次, 此后每隔 7d, 机械分离传代 1 次, 方法同前。另取部分单细胞悬液做免疫细胞化学染色及细胞克隆培养。

1.4 nestin 免疫细胞化学染色

分别取 P₀、P₁、P₃、P₅(P₀ 原代; P₁ 传代第一代; P₃ 传代第三代; P₅ 传代第五代)形成的神经干细胞克隆球机械分离的单细胞悬液滴在无菌盖玻片上, 冷风吹干, 0.01mol/L PBS(pH 7.2)洗涤; 4% 多聚甲醛固定 15min; 0.01mol/L PBS 冲洗 3 次, 每次 5min; 3% 过氧化氢/甲醇室温下作用 5min, 0.01mol/L PBS 冲洗 3 次, 每次 5min; 滴加 10% 正常山羊血清室温封闭 20min, 吸去多余液体, 加入一抗(nestin 小鼠单抗 Chemicon, 1:1000 稀释)放入湿盒中, 4℃过夜; 0.01mol/L PBS 冲洗 3 次, 每次 5min; 加入二抗(山羊抗鼠 IgG), 37℃温育 20min; 0.01mol/L PBS 冲洗 3 次, 每次 5min; 滴加 SABC, 37℃温育 20min; 0.01mol/L PBS 冲洗 3 次, 每次 5min; 滴加 DAB 显色剂, 镜下观察显色情况, 并用蒸馏水及时终止显色; 梯度酒精脱水, 二甲苯透明后树胶封片, 显微镜下观察、记数 nestin 阳性细胞, 随机选取 30 个视野, 计算阳性细胞比率。

收稿日期: 2003-06-12; 修回日期: 2003-09-11

山东省科技厅重点计划课题(012130102), 山东省自然科学基金资助(z2001c02)

* 通讯作者, E-mail: zhzheng@sdu.edu.cn



图1 (A)刚接种的细胞(400×); (B)培养24h后的细胞出现分裂相(400×); (C)体外培养5天形成直径大小不同的神经干细胞球(200×)

1.5 细胞克隆培养

分别取 P_0 、 P_1 、 P_3 、 P_5 形成的神经干细胞克隆球, 机械吹打成单细胞, 加无血清培养液用有限稀释法进行稀释到 1~2 个细胞/10 μ l 工作液, 再将 10 μ l 工作液加入 96 孔板中, 每孔加 200 μ l 培养液培养, 接种 2 小时后检查每孔中的细胞数目, 只记数含有单个细胞的孔(多于 1 个细胞或无细胞的孔弃之不用), 37 $^{\circ}$ C, 5%CO $_2$ 条件下静置培养 7d, 再观察单个细胞的孔中形成克隆的情况, 计算克隆形成率, 克隆形成率=克隆形成孔数/单细胞孔数 \times 100%。

1.6 统计学分析

组间差异显著分析用 χ^2 检验, 各代均与原代 P_0 进行组间比较。

2 结果

2.1 细胞形态观察

前脑组织经胰酶消化成单细胞后, 用无血清培养液调整细胞密度后, 接种于 60mm 培养皿中, 倒置相差显微镜下细胞折光性强, 周边有清晰的光晕(图 1A), 培养 24h 后, 可看到悬浮在培养液中单个细胞分裂相(图 1B)。随着原代培养时间的推移, 细胞分裂相逐渐多见, 开始出现神经干细胞克隆球, 在原代培养到 5~6 天时, 培养液中可见到悬浮的大小不一的神经干细胞克隆球, 从几个到几百个细胞不等(图 1C)。

2.2 nestin 阳性细胞的鉴定

为了定量地记数神经干细胞克隆球中 nestin 阳性细胞, 我们把原代培养及传代培养得到的神经干细胞克隆球机械吹散为单细胞再做免疫细胞化学染色(图 2), 结果显示不同代数之间, nestin 阳性细胞的比例显著不同。随着传代次数增加, nestin 阳性细胞的比例在显著下降(表 1)。

2.3 细胞克隆形成率分析

接种于 96 孔板中的细胞, 接种 2h 后确定只含有单个细胞的孔, 并做标记计数单细胞数目。培养



图2 nestin 免疫细胞化学染色(400×)

表1 不同代数神经干细胞克隆球中 nestin 阳性细胞的比例

代数	阳性细胞数	细胞总数	阳性细胞比率(%)
P_0	3096	6588	47.0
P_1	3527	6731	52.5***
P_3	1703	6452	26.4***
P_5	312	6230	5.0***

*** $P < 0.001$ 。 P_1 、 P_3 、 P_5 分别与 P_0 进行组间比较。

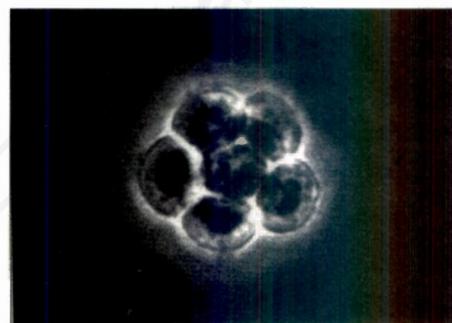


图3 细胞克隆培养形成的 P_5 代神经干细胞克隆球(400×)

表2 不同代数细胞克隆形成率

代数	单细胞接种孔数	克隆形成孔数	克隆形成率(%)
P_0	112	52	46.4
P_1	100	52	52.0
P_3	115	30	26.1***
P_5	120	6	5.0***

*** $P < 0.001$ 。 P_1 、 P_3 、 P_5 分别与 P_0 进行组间比较。

7 天后, 再对已做标记的含有单个细胞的孔进行观察, 发现有的孔中单个细胞增殖形成了克隆球(图

3), 呈悬浮状态生长; 而有的孔中细胞贴壁呈分化细胞状(神经细胞或神经胶质细胞), 有突起自胞体向外伸出; 还有的孔中细胞既不增殖, 也不分化, 仍是单细胞的状态, 这种情况比较少见。随着传代次数的增加, 克隆球中神经干细胞的数量在下降, 从而导致克隆形成率显著下降(表2)。

3 讨论

神经干细胞是指能自我更新、具有分化为神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞能力的细胞, 它具有干细胞样基本生物学属性, 表达特异标志蛋白 *nestin*^[4]。分离发育中及成年大鼠各脑区细胞进行体外培养, 已证实胎脑的脑室周围、皮质、海马、隔区等处广泛存在神经干细胞, 而成年脑内神经干细胞分布于室下区、纹状体、海马齿状回、嗅球等处^[5]。

神经干细胞是一种终身具有自我更新能力的细胞, 即通过对称性或不对称性分裂产生新的神经干细胞。对称性分裂是指一个神经干细胞经过一次分裂产生两个完全相同的子代神经干细胞; 不对称性分裂是指一个神经干细胞经过一次分裂产生两个不同的子代细胞, 即一个神经干细胞和一个神经祖细胞(neural progenitor cell), 祖细胞是相对于干细胞而言, 其分化能力和自我更新能力受到一定限制, 仅具有单向或双向分化潜能, 或其干细胞特性只能维持较短的时间。在发育时间上, 应是神经干细胞早于神经祖细胞。前体细胞(neural precursor cell)则是一个不太严格的术语, 是指一类在发育进展中较其它细胞处于更早阶段的细胞, 可统称干细胞和祖细胞。神经祖细胞可自发分化生成神经元细胞和成胶质细胞等, 从而生成神经元及神经胶质细胞。不对称性分裂方式的存在导致了神经干细胞克隆球的异质性, 即有干细胞也有处于不同分化阶段的神经祖细胞^[6]。

本研究联合应用免疫细胞化学染色及细胞克隆培养技术来定量地研究不同代数之间神经干细胞克隆球中神经干细胞的比例。*Nestin*(巢蛋白)是一种VI类中间纤维, 是哺乳动物神经干细胞的主要细胞骨架蛋白, 被看作是神经干细胞的标记物。在神经系统发育过程中, *nestin* 表达逐渐下调^[7]。目前尚无特异的标志物对全能神经干细胞和单潜能或多潜能的神经祖细胞进行区分。以前只是用神经干细胞克隆球做抗 *nestin* 免疫细胞化学染色, 只能定性地

看到克隆球中有 *nestin* 阳性的细胞存在, 不能定量计数。本研究中应用将克隆球吹打成单细胞再做免疫细胞化学染色及单克隆培养技术能定量地研究原代培养及传代培养得到的神经干细胞克隆球中 *nestin* 阳性细胞的比率, 发现随着传代次数的增加, 神经干细胞克隆球中 *nestin* 阳性细胞的比率在显著下降 ($P < 0.001$), 且两种方法得出的比值在每一代大致是相同的。但是在两种方法中, P_1 克隆球中的 *nestin* 阳性细胞比例以及克隆形成率都高于 P_0 , 我们通过免疫细胞化学染色观察到, 在原代培养中除了神经干细胞自我更新形成克隆球外, 也有少量的神经细胞相互粘连形成球状结构, 其中没有神经干细胞, 它们不能在神经干细胞的无血清培养液中长期生存, 所以在传代培养中几乎没有这些神经细胞, 所有的克隆球都是由神经干细胞增殖而成的, 但是在原代收集悬浮的克隆球时把这一部分细胞也包括在内, 从而导致 P_0 中 *nestin* 阳性细胞数值及克隆形成率低于 P_1 。Reynolds^[8]原代培养形成的 spheres 中含有 20% 能形成次级 sphere 的 EGF 反应的细胞与本文大约是 45% 的结果不相符, 其主要原因可能是, 根据文献报道^[9]在鼠类前脑生发层及其成年残区和室管膜下区存在分别对 FGF 及 EGF 反应的干细胞群, 当在体外培养体系中含有 EGF 时, 就会产生直径比较大的神经干细胞克隆球; 存在 FGF 时, 产生的神经干细胞克隆球比较小; 若 EGF 和 FGF 同时存在时, 则两种类型的克隆球都会出现。我们的培养体系中生长因子 EGF、bFGF 联合应用, 在培养液中可见到大小不等悬浮的神经干细胞克隆球, 培养得到的是 EGF 和 bFGF 反应的两类干细胞, 而 Reynolds 培养体系中只加入 EGF, 培养得到的只是 EGF 反应的神经干细胞, 因此我们计数得到的神经干细胞的比例比他们的高很多。

由以上的结果, 可以得知在神经干细胞克隆球中只有一部分细胞是 *nestin* 阳性细胞, 根据神经干细胞不对称分裂的特点及文献报道^[8]可知, 克隆球中其余的细胞是处于不同分化阶段的神经祖细胞。在现在的体外培养体系中, 虽然加入生长因子 EGF 和 bFGF, 随着传代次数的增加, 克隆球中 *nestin* 阳性细胞的比例显著下降, 也就是说体外神经干细胞随着传代代数的增加, 干细胞比例减小, 这与体内随着神经干细胞增殖次数的增加, 神经干细胞的终末分化逐渐增加相一致。体外培养的神经干细胞表现出来的这种现象对于神经干细胞在临床疾病治

疗中的实际应用是一个障碍,这说明在目前的培养体系中神经干细胞只具有有限的增殖能力,因此,探索更完善的培养方法来保持体外神经干细胞的增殖和干细胞特性是一件十分有意义的工作,而本文则为该项研究提供了一个可靠的、易于操作的检测神经干细胞比例的方法。

对中枢神经系统的损伤或病变部位实行神经干细胞替代或转基因治疗是新发展起来并极有前景的神经病学治疗战略,但这些方法需要高纯度的神经干细胞。根据我们的研究结果,在P₁形成的神经干细胞克隆球中干细胞的比例是很高的,可以用这时候形成的克隆球直接进行细胞移植或基因治疗。神经干细胞的诱导、分化、迁移机制还有待进一步研究,神经干细胞的临床应用更有很多问题需要解决,但我们相信,神经干细胞在神经系统疾病与损伤的治疗方面的应用前景是良好的。

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**: 1707 - 1709.
- [2] 辛 华,魏东光,王 茜等. 胚胎大鼠中枢神经系统神经干细胞的分离培养与观察[J]. *山东医科大学学报*, 2002, **39**(3): 197 - 200.
- [3] 王晓静,辛 华,张 衡等. 胚胎大鼠脊髓源性神经干细胞的分离培养及分化观察[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2003, **41**(1): 41 - 44.
- [4] LENDAHL U, ZIMMERMAN L B, MCKAY R D G. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein [J]. *Cell*, 1990, **60**: 585 - 595.
- [5] 韩 燕,郑惠民. 神经干细胞及其在神经科学领域应用展望[J]. *国外医学神经病学神经外科学分册*, 2001, **28**(2): 99 - 102.
- [6] OLEG N S, VALERY G K, TATYANA N I, et al. Neural stem cell heterogeneity demonstrated by molecular phenotyping of clonal neurospheres [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(22): 14506 - 14511.
- [7] 佟向军,陈建国,翟中和. 神经丝的结构与功能[J]. *细胞生物学杂志*, 1998, **20**(2): 63 - 68.
- [8] REYNOLDS B A, WEISS S. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell[J]. *Deve Bio*, 1996, **175**: 1 - 13.
- [9] MARTEN D J, TROPEPE V, VAN D K. Separate proliferation kinetics of fibroblast growth factor-responsive and epidermal growth factor-responsive neural stem cells within the embryonic forebrain germinal zone[J]. *J Neurosci*, 2000, **20**: 1085 - 1095.

The Different Percentage of Neural Stem Cells in Neurospheres

WANG Xiao Jing¹, ZHANG Heng^{2*}

(¹Institute of Cell Biology, Shandong University Medical School, Jinan 250012; ²Institute of Physiology, Shandong University Medical School, Jinan 250012, China)

Abstract: To study the different percentage of neural stem cells quantitatively in clonal structures, "neurospheres", which are generated by neural stem cells (NSCs) *in vitro*. The percentage of nestin-positive cells in neurospheres of different passages was observed by the technology of serum free and cell clone culturing and immunocytochemistry. We found that the more the passages, the less is the percentage of nestin-positive cells in neurospheres. It suggests that the neurospheres generated *in vitro* system are heterogeneous, and the percentage of neural stem cells in neurospheres varies significantly in different passages.

Key words: neural stem cells; cell clone culture; immunocytochemistry; heterogeneity

This study was supported by grants from Department of Science and Technology of Shandong Province (012130102) and Natural Science Foundation of Shandong Province (Z2001c02)

*Corresponding author, E-mail: zheng@sdu.edu.cn