

大鼠胚胎神经干细胞纹状体内移植后特性

马 骥 高安慧 夏趁意 袁崇刚*

(华东师范大学, 生命科学学院生理学科组, 上海 200062)

摘要 观察大鼠胚胎神经干细胞移植入成年大鼠纹状体后的存活、迁移和分化状况。自14天胎鼠脑室下区分离获得神经干细胞, 利用无血清培养基培养扩增并进行鉴定。经4~5代的扩增后, 以BrdU标记的神经干细胞通过脑立体定位注射移植入成年大鼠纹状体内, 然后分别于移植后2周、4周、6周和8周时做脑冰冻切片, 通过免疫组织化学和免疫荧光方法检测移植细胞的数量、定位和分化情况。8周后移植细胞的检出率约16%; 移植细胞向周围宿主组织有广泛的迁移表现, 尤以沿着白质束向头尾方向的迁移最为显著, 最远向后侧达到内囊; 纹状体中移植细胞主要分化为神经元和星形胶质细胞。星形胶质细胞数量最多, 主要位于移植区与宿主组织临界部位, 而神经元处于移植区中央。培养的大鼠胚胎神经干细胞可以作为移植替代治疗神经退行性疾病研究的供体细胞源, 而移植中的迁移现象值得注意。

关键词 神经干细胞; 移植; 迁移; 分化

神经干细胞是存在于胚胎和成年个体神经系统中的未分化细胞群^[1-6], 它具有: (1)多分化潜能, 能分化为神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞等各种神经系细胞; (2)自我更新能力, 能产生具有同样潜力的神经干细胞; (3)连续的增殖能力。因此, 神经干细胞的发现促进了人们对神经系统发育机制的研究, 同时也被认为细胞替代治疗帕金森病等神经退行性疾病研究提供了一条新的途径。但是在神经干细胞移植研究中依然存在着两个主要的问题: 一是神经干细胞是否能分化为特定单一类型的神经元, 如多巴胺能或肾上腺素能神经元。有关诱导分化的研究已经在广泛开展^[7-10]。二是神经干细胞是否具有移植后功能重建和神经通路修复的能力, 这是该治疗途径是否可行的关键, 因而了解神经干细胞在移植入宿主脑内后的存活、定位和分化是非常必要的。本实验取胚胎14天大鼠脑室下区(SVZ)分离获得神经干细胞, 经扩增及体外标记后通过脑立体定位移植入成年大鼠的单侧纹状体, 观察移植细胞在脑内的存活、定位及分化的情况, 为神经干细胞用于治疗中枢神经系统退行性病变和功能重建提供有价值的参考。

1 材料与方法

1.1 动物及试剂

E14的SD孕鼠和200~220g SD雄性大鼠, 由

复旦大学实验动物中心提供。

DMEM/F12 (1:1) 和 B27 (Gibco); bFGF (Chemicon); BrdU (Sigma); 小鼠抗 BrdU IgG、兔抗神经丝蛋白(neurofilament, NF) IgG、兔抗和小鼠抗胶质源纤维酸性蛋白(glial fibrillary acid protein, GFAP) IgG、兔抗 2, 3- 环核苷酸二酯酶(CNPase) IgG (Sigma); 兔抗 Nestin IgG (Chemicon); 羊抗兔和羊抗小鼠 IgG-FITC、ABC 免疫组化试剂盒 (华美生物工程公司); 兔抗小鼠 IgG-TRITC (Chemicon); 羊抗兔 IgG-TRITC (Jackson Immuno-Research); SABC 免疫组化双标试剂盒(博士德生物公司)

1.2 大鼠胚胎神经干细胞的分离、培养

在无菌环境下分离出 E14 大鼠胚胎脑室下区组织, 以吸管机械吹打分离为单细胞悬液, 台盼蓝染色计数后, 以 5.0×10^5 个/ml 的密度培养于 75 ml 培养瓶中。培养基为含 2%B27、bFGF (20 ng/ml) 的 DMEM/F12 (1:1) 无血清培养基。细胞培养于 37 °C, 5%CO₂, 95% 湿度培养箱内培养。原代克隆球团形成后传代以 5.0×10^4 个/ml 的密度培养, 每次传代中已发生贴壁的细胞球团不带入下一代的培养。每天以吸管轻微吹打一次, 防止球团凝聚; 3 天半量换培养基, 5~7 天传代一次。传代 4~5 次, 方法同前。

收稿日期: 2005-11-28 接受日期: 2006-06-22

* 通讯作者。Tel: 021-62232729, E-mail: cgyuan@bio.ecnu.edu.cn

1.3 Nestin 免疫荧光检测

将传代中的神经干细胞克隆球团接种入预置有涂布多聚赖氨酸盖玻片的 24 孔板中, 培养贴壁 2 h 后固定, 进行 nestin 免疫荧光染色。

1.4 神经干细胞多分化潜能测定

参考刘仕勇等^[11]的方法取原代克隆通过有限稀释法获得单细胞亚克隆, 接种于预置有涂布多聚赖氨酸盖玻片的 24 孔板中, 加入含有 10% 小牛血清的 DMEM/F12 培养基(撤去 bFGF 和 B27)诱导分化。培养 7 天后, 进行 NF、GFAP 和 CNPase 的免疫单标和双标染色。

1.5 神经干细胞 BrdU 标记和纹状体内移植

大鼠胚胎神经干细胞连续培养 4~5 代, 于移植前 48 h 更换含 BrdU (终浓度 5 $\mu\text{mol/L}$) 的培养基;

将培养瓶中神经干细胞克隆(球团)吸取至离心管中, 待沉淀后弃去上清液, 加入含 0.1% 胰蛋白酶、0.05% DNase 的 DMEM 培养基在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 20 min 弃去上清液, 以含 0.05% DNase 的 DMEM 培养基清洗 4 遍; 以细口吹管机械吹打分离, 形成单细胞悬液后, 静置 5 min, 进行细胞计数。以 800 r/min 离心 5 min, 调整 DMEM 培养基量, 进行细胞再悬浮, 使细胞浓度浓缩至 5 000 个/ μl ;

以 3% 戊巴比妥钠麻醉实验大鼠; 将大鼠固定于立体定位仪上(设置定位仪为对耳线高于齿台 2.4 mm, 工作台周围温度控制于 37 $^{\circ}\text{C}$)。用手术刀切开颅顶皮肤, 暴露颅骨。寻找到前囟点, 以此为基准点确定移植位点(纹状体尾壳核 A: -1.0 mm; L: 3.0 mm; V: 5.5 mm。参照文献[12]), 于该点用骨钻钻透颅骨至硬脊膜; 用套接有开口直径约 70 μm 玻璃针的微量注射器吸取一定量(>10 μl) 的细胞悬液, 然后固定于移动架上, 通过调节移动架缓缓刺入移植点达所需深度, 以 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的速度向脑内注射细胞悬液, 共注射 4 μl 。

接受移植的大鼠一共 24 只, 分为 4 组于 2、4、6 和 8 周时间段进行取材。

1.6 脑组织冰冻切片

脑内移植后大鼠分别于 2、4、6、8 周处死, 作冰冻切片。快速开胸暴露心脏, 经左心室插管至升主动脉, 并剪开右心耳, 快速灌注 100 ml 生理盐水; 然后灌注 200 ml 含 4% 多聚甲醛的灌流液; 断头取脑, 去除脑膜, 置于 4% 多聚甲醛液后固定 4 h; 更换 30% 蔗糖溶液浸泡过夜至脑沉淀。将脑置于冰冻切片快速冷冻, 进行冠状和矢状连续切

片。切片直接贴于明胶涂布的载玻片上。

1.7 免疫组织化学检测

利用 ABC 法对脑切片进行 BrdU 单标记, 利用免疫荧光方法进行 BrdU/nestin, BrdU/NF 及 BrdU/GFAP 的双标记检测。完成后立即在荧光显微镜(Leica)下观察、拍照, 应用 UTHSCSA ImageTool 软件对脑片上的阳性细胞进行计数, 并使用 Excel 对结果统计, 进行显著性差异的 *t* 值检验。

2 结果

2.1 克隆 nestin 抗原的表达和诱导分化结果

取自 E14 大鼠 SVZ 的原代细胞加入含 bFGF 的无血清培养基进行培养。至 24 h 时, 发现有部分的细胞开始进行分裂, 形成了由 2~4 个细胞构成的小克隆球团。2 天后, 克隆中包含的细胞数已达 10~20 个。此时细胞增殖活动非常旺盛。至 5 天后, 培养瓶中绝大多数为含 200 个细胞以上的大克隆球团(图 1)。

Nestin 是神经干(祖)细胞的特异性蛋白, 克隆球团贴壁 2 h 后, 进行 nestin 的免疫荧光染色。结果显示次代克隆及数代后的单细胞克隆球团均呈 nestin 抗原阳性(图 2)。

单细胞克隆从培养瓶转入预置有涂布多聚赖氨酸盖玻片的 24 孔板, 加入含 1% 小牛血清的 DMEM 培养基诱导其分化。细胞克隆在 24 h 内贴壁并在第二天开始从边缘向各个方向长出突起。第 3 天时, 已有部分细胞开始向外迁出。至 7 天时, 球团基本解体, 出现了大量形态各异的细胞。经过免疫细胞化学单标及双标染色, 结果证实克隆球团中的细胞贴壁分化后能分别表达出神经元标记蛋白 NF, 星形胶质细胞标记蛋白 GFAP(图 3A) 以及少突胶质细胞标记物 CNPase(图 3B)。

2.2 移植细胞的存活和迁移

分别于脑内移植后 2、4、6、8 周取材, 对脑片上检出的 BrdU 阳性细胞进行了统计。2 周时 BrdU 阳性细胞数为移植细胞数的 29.8%, 而至 4 周时检出细胞数下降为移植细胞数的 19.5%。6 周与 8 周时检出的存活细胞比率则变化不大, 分别为 16.2% 与 16.8%(表 1)。

在移植动物的冠状脑片上均发现, 移植入纹状体的细胞在移植部位形成长条带状的细胞团(束)(图 4A)。除了纹状体尾壳核的头部, 在靠近皮层处及胼胝体前联合部位也有少量的 BrdU 阳性细胞存在,

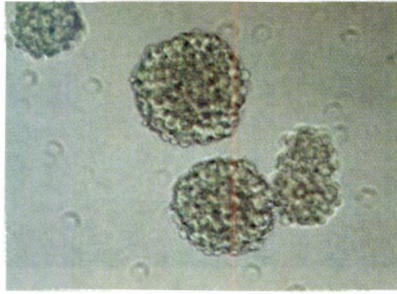


Fig.1 Primary neural stem cell colony for 5 days (20 ×)

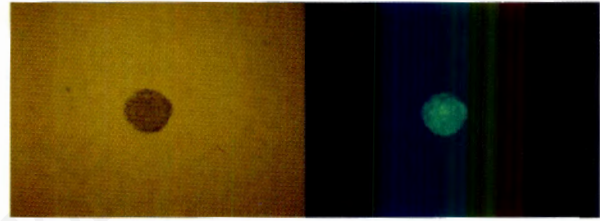


Fig.2 Immunofluorescent staining (FITC) with anti-nestin IgG on single cell colony (10 ×)

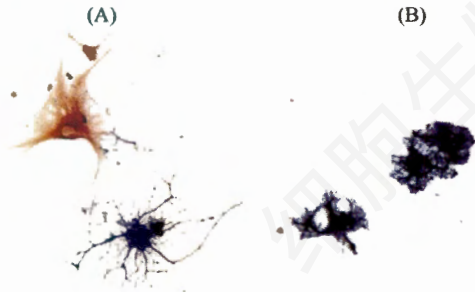


Fig.3 Neural stem cell colony cultured in 10% FCS and fixed at day 7, most differentiated cells show astrocyte marker GFAP (deep blue in A) and neuronal marker NF (red in A). Few of cells express oligodendrocyte marker CNPase (deep blue in B) (40 ×)

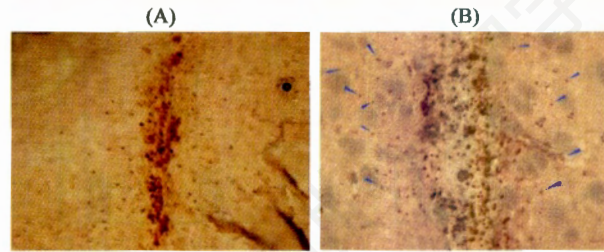


Fig.4 BrdU-labeled cells detected migration from graft core on coronal sections 2 days (A) and 4 weeks (B) after transplantation in intact striatum (10 ×) .

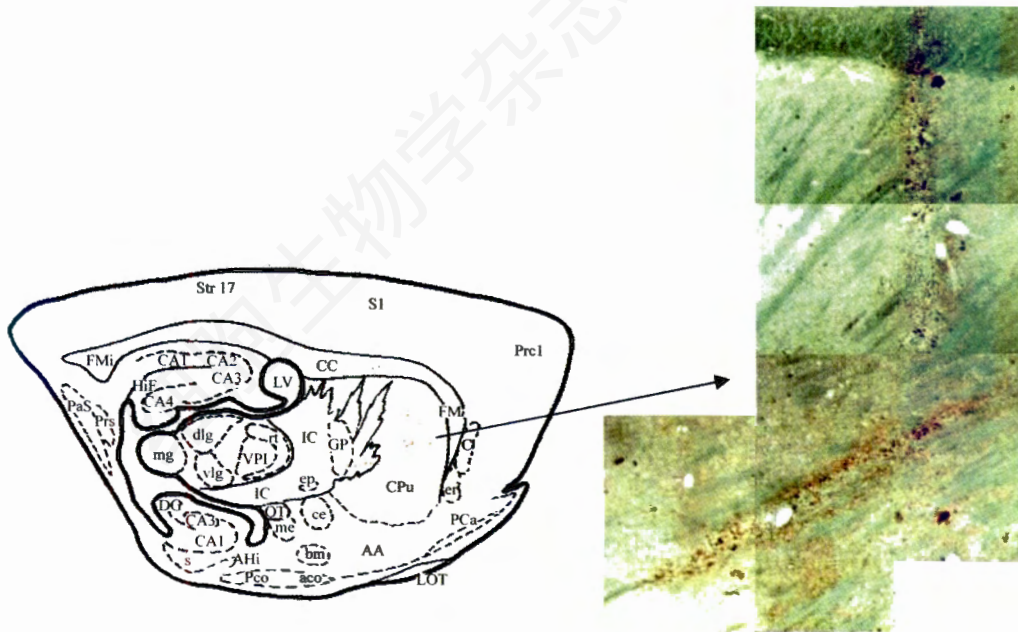


Fig.5 BrdU-labeled positive cells detected migration from graft core on sagittal sections at week 8. Some of them still located at the graft core, but others migrated rostrally and caudally along the white matter structures.

Table 1 The number of BrdU-labeled cells detected in intact rats' striatum at different survival time (Value represent the mean±SEM of three independent experiments)

	Week 2	Week 4	Week 6	Week 8
BrdU positive cells	5962±963	3895±684	3232±412	3354±422

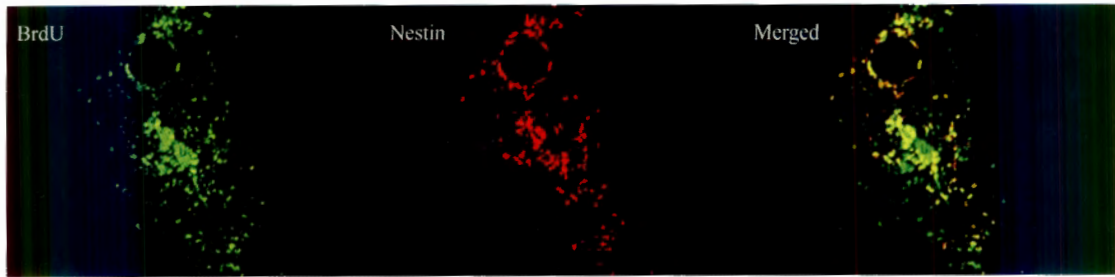


Fig.6 There were still many Nestin/BrdU double stained cells at the graft core after 2 weeks (10 ×)

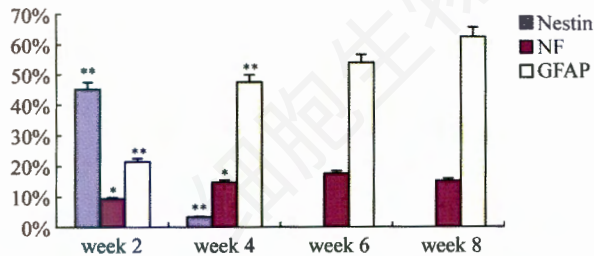


Fig.7 The differentiation proportion of BrdU-labeled cells revealed by double immunostaining at different survival time

after week 6, no nestin positive cell was found (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, Student's t test).

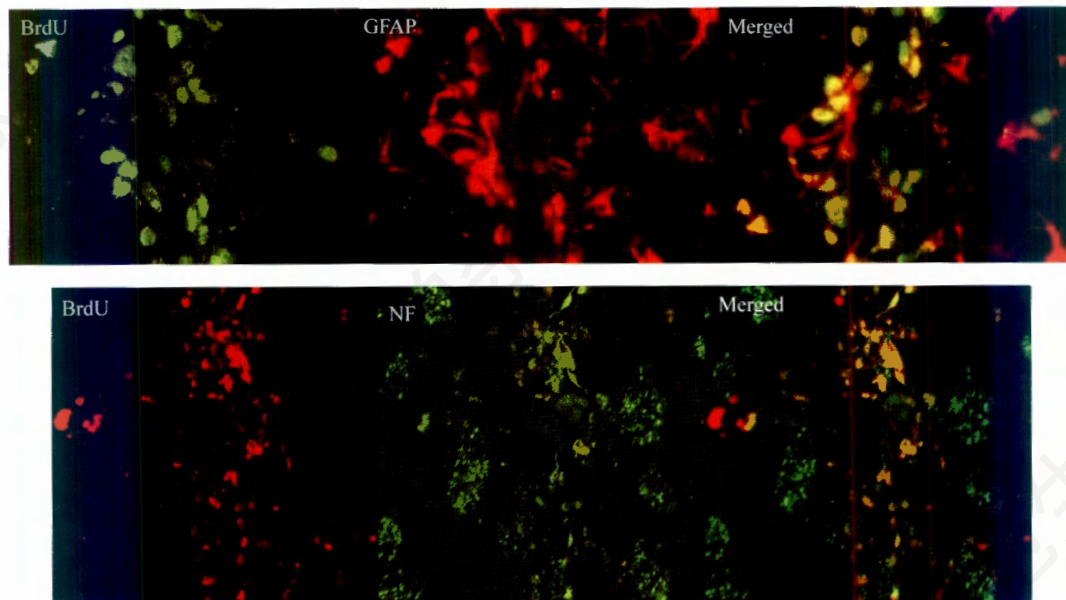


Fig.8 In week 2, the majority of the grafted cells were GFAP positive cells (40 ×) mainly located at the graft-host border, while NF positive cells (20 ×) were in the graft core

可能是由于这些部位的注射轨迹处的移植细胞向周围扩散所致。2周时，已经有部分的细胞以移植部位为中心向周围迁出，可达100 μm 。这种迁移在各个方向上程度都比较接近，无明显方向性。4周时，细胞向外迁出现象更为明显，有的细胞向外迁移可达300~450 μm (图4B)。6~8周时，细胞向外迁移的距离变化不大，分布处于较稳定的状况。而在矢状切片上除同样表现出移植细胞从移植区向周围迁出现象之外，还发现移植细胞出现了

有方向性的迁移。在2周时，一部分位于尾壳核(CPu)中央的移植区的细胞开始向头端和尾端两个方向沿着白质束迁移。4~8周间，细胞的迁移距离不断地在延伸，尤其部分细胞向尾端迁移进入了苍白球(GP)，甚至有的迁入了内囊(IC)的部分(图5)。至8周时，细胞迁移距离达1~2 mm。

2.3 移植后细胞的分化

我们利用免疫组化荧光双标记的方法对移植后的神经干细胞分化结果进行初步分析。分别使用

nestin 标记处于未分化干细胞阶段的细胞; NF 标记成熟神经元; GFAP 以确定星形胶质细胞。

2 周时发现于移植区核心部位依然有大量的 BrdU 阳性细胞同时呈 nestin 阳性(45.2±6.3%)(图 6, 图 7), 这些细胞仍然处于未分化状态, 甚至可能具有分裂能力。移植区也出现了一定数量的 NF 阳性细胞, 主要位于中央部位, 而分化出的 GFAP 阳性细胞则主要位于移植区周边与宿主纹状体组织相邻的区域(图 8), 4 周时, nestin 阳性细胞数量则已经很少, 神经元和星形胶质细胞数量都有上升, 其中星形胶质细胞增加更为显著。6~8 周, 神经元与星形胶质细胞的比例相对较稳定, 神经元在 14%~17% 之间, 而星形胶质细胞则达到了 53.9%~62.4%(图 7)。位于移植区的 BrdU 阳性细胞中, NF 阳性细胞多处于近中央的位置, GFAP 阳性细胞主要位于移植细胞团的外周部分, 有明显的胞突伸向宿主组织。而由移植区向头端及尾端迁出的带状细胞团中, NF 阳性细胞同样主要位于迁移细胞带的中央, GFAP 阳性细胞位于周围。在迁移带的头端有一些 BrdU 阳性细胞无法确定其细胞的性质, 可能还处在未完全成熟的前体细胞阶段。

3 讨论

帕金森病是最为常见的神经系统变性疾病之一, 至今未有效果非常理想的治疗手段。现在较为成功的方法是分离胚胎中脑所含的多巴胺神经元移植入患者的纹状体区, 这在细胞存活、多巴胺表达及相关的功能恢复方面都有令人欣喜的结果^[13-16]。但由于多巴胺能细胞的来源有限以及伦理学问题, 该方法的广泛应用受到了限制。神经干细胞的发现无疑为神经退行性病变的功能重建和神经再生提供了一条新的途径。神经干细胞已经具备了作为一种理想的移植细胞供体来源的条件。理由之一是其自我增殖的特性, 可以通过给予 bFGF 或 EGF 等有丝分裂原, 在体外进行不断地分裂扩增^[6,7], 各子代克隆的增殖能力随传代依然保持, 这使供体细胞的数量得到保证。另一重要的特点是它的多分化潜能, 能在体外或体内分化成神经元或神经胶质细胞, 可在受环境因素影响下分化为与移植部位相应的细胞^[8-10]。本实验分离的细胞具有较强的连续分裂增殖能力, 能表达神经干(祖)细胞特异性蛋白 Nestin, 并且具有在一定条件下分化为成熟神经元和神经胶质细胞的多分化潜能。结果表明我们从大

鼠胚胎 SVZ 分离的细胞属于胚胎早期未分化细胞, 是中枢神经系统干细胞。

本实验中利用 BrdU 作为移植细胞的示踪标记, 通过免疫组织化学方法及荧光双标记法对移植细胞的存活、定位及分化进行检测。8 周时检测到的 BrdU 阳性细胞数量约为移植前数量的 16%, 而在 2~6 周时有一定程度的减少, 这可能是由于在移植过程中的细胞损伤与组织排斥所造成。尽管脑部组织是免疫特许部位, 但手术后的一段时间血脑屏障会出现功能下降, 这会造成因免疫反应而引起的细胞死亡。这可以通过免疫抑制剂等方法加以解决。同时, 部分细胞的分裂也会使细胞核中标记的 BrdU 因稀释作用而无法被检出。

实验中大多数细胞都发生了分化, 主要形成神经元与星形胶质细胞。其中星形胶质细胞数量最多(>50%), 而且大多位于移植区与宿主组织相邻的部位。星形胶质细胞主要是参与中枢神经系统的损伤反应, 具有保护修复功能, 这表明相当部分的移植细胞参与了宿主组织对于移植过程中造成的损伤的反应过程。神经元主要位于移植区近中央部位。到了 6~8 周, 神经元数量基本稳定在 16% 左右。移植细胞的神经元分化表明脑内除了海马、SVZ 等神经元发生区域之外, 纹状体等非神经元发生部位也能诱发干细胞神经元的分化。移植治疗中神经元的数量和类型依然是关键。因而如果能充分结合定向诱导分化研究, 提高特定神经元的分化比例, 神经干细胞完全能够成为细胞移植治疗神经疾病的理想来源。

本实验中发现移植入纹状体的神经干细胞表现出明显的由移植区向外的迁移特性, 尤其是矢状方向。细胞迁出在以前的移植研究中也有提到, 但未见有关如此明显方向性迁移的报道。造成这种情况的原因之一可能是由于神经干细胞与常用的胚胎中脑神经细胞在特性上的差异, 即在细胞完成分裂之后的较短期间, 未成熟的前体细胞将处于较为活跃的迁移阶段。实验中细胞在冠状面各个方向的迁出距离短, 较分散, 迁移细胞中也确实发现部分性质未确定可能为前体阶段的细胞, 这可能更多地是由于这种原因而在较短时间中完成。除此之外, 也可能有脑内微环境诱导的因素。在矢状方向细胞迁出的数量多, 较集中, 距离大, 这显然不只是干细胞短时迁移特性的表现, 其原因可能存在一定的导向机制, 类似脑内源性干(祖)细胞迁移的情况。研

究表明新生或成年的动物在 SVZ 产生的内源性神经前体细胞将沿着侧脑室前角的一条非常固定的线路——头端迁移渠道(rostral migratory stream, RMS)进行迁移直至嗅球^[17,18], 这一过程可能是由中枢神经系统局部特异信号所介导的。我们的实验中, 尽管迁移部位因移植位置而略有所不同, 但现象却与之很相似。细胞沿白质束向头端或尾端迁移, 外围包围有星形胶质细胞。本实验室也曾对 NGF 体外诱导神经干细胞迁移进行过相关研究^[19]。移植或受损后的局部环境产生的特定的信号, 星形胶质细胞和内囊的轴束以及组织中普遍存在的各种细胞外基质、细胞表面黏附因子等都可能为细胞迁移提供了依靠和导向的作用。定向可控的迁移可以使之参与神经环路结构的重建, 而无方向性的扩散则可能使移植达不到预期的效果, 因而了解导致这种现象的诱因是什么, 通过何种机制来完成, 最终迁移至何处, 对于移植研究是非常有意义的, 也有待于下一步长时移植实验中进行探讨。如仅从实验结果来看, 这种迁移必然造成部分移植细胞离开目标移植区, 这会对替代移植的效果造成影响。如要更好地达到目

的, 避免其移出目标区域, 应对移植方法进行调整, 可以结合诸如微囊包被移植的方法。

参考文献 (References)

- [1] Reynolds BA *et al. Science*, 1992, **255**: 1707
- [2] McKay R. *Science*, 1997, **276**: 66
- [3] Eriksson PS *et al. Nat Med*, 1998, **4**: 1313
- [4] Gage FH. *Science*, 2000, **287**: 1433
- [5] Johansson CB *et al. Exp Cell Res*, 1999, **253**: 733
- [6] Craig CG *et al. J Neurosci*, 1996, **16**: 2649
- [7] Kuhn HG *et al. J Neurosci*, 1997, **17**: 5820
- [8] Takahashi j *et al. J Neurobiol*, 1999, **38**: 65
- [9] Ling Z D *et al. Exp Neurol*, 1998, **149**: 411
- [10] Kawasaki H *et al. Neuron*, 2000, **28**: 31
- [11] 刘仕勇等. *第三军医大学学报*, 2000, **22**: 26
- [12] 包新民等. *大鼠脑立体定位图谱*, 北京: 人民卫生出版社, 1991, 12
- [13] Kordower JH *et al. N Eng J Med*, 1995, **332**: 1118
- [14] Alexi T *et al. Prog Neurobiol*, 2000, **60**: 409
- [15] Martinez-Serrano A *et al. Neuron* 1995, **15**: 473
- [16] Martinez-Serrano A *et al. J Neurosci*, 1995, **15**: 5668
- [17] Lois C *et al. Science*, 1994, **264**: 145
- [18] Luskin MB *et al. Neuron*, 1993, **11**: 173
- [19] 施英唐等. *解剖学报*, 2004, **35**: 22

Characteristics of Embryonic Rat Neural Stem Cells Transplanted to Striatum of Adult Rats

Ji Ma, An-Hui Gao, Chen-Yi Xia, Chong-Gang Yuan*

(Department of Physiology, School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract The survival, migration and differentiation of neural stem cells (NSCs) from embryonic rat after transplantation to striatum of adult rats were investigated. NSCs isolated from subventricular zone (SVZ) of E14 SD rats, were cultured with serum-free media and identified with nestin staining. After 4–5 passages, NSCs prelabeled by BrdU were transplanted to the striatum of adult rats. Recipient brains were examined at 2, 4, 6 and 8 weeks after transplantation. Immunocytochemistry and immunohistofluorescence techniques were employed to detect the localization and differentiation of the grafts in striatum. About 16% labeled cells were found after 8 weeks and they exhibited extensive migration from the injection site, especially rostral and caudal along the white matter tracts. Some of them reached the internal capsule. In striatum, the labeled cells differentiated into neurons and glia. A significant proportion of the cells developed into glial fibrillary acid protein (GFAP) positive cells which mainly located at the border of the graft, whereas neurofilament (NF) positive cells were observed in the core of the grafts. The results suggest that cultured embryonic NSCs can provide a potential source of cell for neuroreplacement therapy on neurodegenerative disorders such as PD, and cell migration should be considered.

Key words neural stem cell; transplantation; migration; differentiation

Received: November 28, 2005 Accepted: June 22, 2006

*Corresponding author. Tel: 86-21-62232729, E-mail: cgyuan@bio.ecnu.edu.cn