

- [7] Fujio, N. et al., 1987, *J Biochem.*, 101-106.
[8] 张顺利等, 2000, 解剖学杂志, 23(4): 329-332.
[9] Neuhoff, V. K. et al., 1979, *Z. Physiol Chem.*, 360: 1657-1670.
[10] 吴鹤龄等, 1982, 遗传, 4(2): 22-24.
[11] Chretien, P. et al., 1988, *J Cell Physiol.*, 137: 157-166.
[12] 张顺利等, 1998, 上海实验动物科学, 18: 73-76.

STUDY ON THE EXPRESSION OF HSP70 AND THE CHANGES OF LDH ISOZYMES OF MOUSE KIDNEY IN HEAT SHOCK RESPONSE

WEI Ji Dong ZHANG Shun Li ZHANG Xin Sheng ZHANG Wen Xue XU Cun Shuan

(College of Life Sciences, Henan Normal University; Henan Bioengineer Key Laboratory; Xinxiang 453002)

ABSTRACT

The immunochemical method and PAGE were used to analyze the changes of the expression of HSP70 and lactate dehydrogenase (LDH) isozymes of mouse kidney during the recovery period of heat shock (46°C, 30min). The results showed that: (1) the HSP70 positive immunoreactivity was localized in the renal tubule epithelial cytoplasm, while the nucleus was negative; (2) The HSP70 positive immunoreactivity of the renal medulla was stronger than that of the renal cortex, and the HSP70 positive immunoreactivity of the renal tubule was stronger than that of the renal corpuscle; (3) Heat shock induced increase in the activities of LDH isozymes in kidney. The results suggested that LDH isozymes may play an important role in the building of heat tolerance of cells.

Key words: Heat shock protein 70 (HSP70) LDH isozyme Heat shock response Immunohistochemistry Kidney

* China-France Advanced Technique Item (B96-11) and supported by Henan Province Zoology Key Subject

人神经干细胞的体外生物学特性*

刘 奔 李兰英 庞智玲

(天津医科大学内分泌研究所 天津 300070)

神经干细胞(NSCs)是一种具有分化潜能的原始细胞,其具备自我更新和增殖的能力,并在特定因素影响或诱导下,向神经元或胶质细胞(星形胶质细胞和少突胶质细胞)分化。某些具有丝分裂源活性的细胞因子可诱导神经干细胞的增殖,并影响其分化方向。碱性成纤维生长因子(bFGF)对胚胎海马、皮层,成年脑室下区、嗅球和脊髓的神经干细胞增殖均起重要作用^[1-4]。表皮生长因子(EGF)作用与bFGF相类似,但作用时间,影响方式不同^[5]。目前对bFGF和EGF的作用认识不一,且观察对象多为啮齿类动物,与人神经干细胞的生物学特性还存在一定差距。若要应用于临床,掌握人神经干细胞的诱导分化方法是必不可少的。

材料与方法

1. 材料

1) 人胎脑 取自因治疗目的引产的胎儿(经病人和家属同意并授权),胎龄10-22周,双亲无遗传性疾病。术后1h内无菌条件下,分离双侧大脑半球。

2) 主要试剂 粉剂培养基 DMEM/F12 (GIBCO); 胎牛血清(FCS)(中科院血研所); 胰岛素 (Insulin) (SIGMA); 转铁蛋白 (SIGMA); 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF) (邦定公司); 重组人表皮生长因子(EGF) (GIBCO); 抗增殖细胞核抗原 PCNA (CALBIOCHEM); 抗胶质纤维酸性蛋白 (GFAP, BIOGENEX); 抗 Nestin、NF-200、Gal-C 由 Louisville 大学邱猛生博士惠赠; 兔 GFAP 多抗 (BIOGENEX); FITC-抗小鼠 IgG (博士德)。SABC 双标免疫组化染色试剂盒及既用型 SABC 免疫组化染色试剂盒均购自武汉博士德公司。

2. 方法

1) 人脑神经干细胞的诱导培养 于无菌条件下取人胎两侧大脑半球,剥除脑膜,机械分散细胞,经100目不锈钢滤网过滤后接种,培养于37°C,5% CO₂,饱和湿度培养箱内。培养液为 DMEM/F12 无血清培养基,并加入 N2 添加剂。于接种之日起添加促有丝分裂因子 EGF (20ng/ml), bFGF (20ng/ml), 单独或联合作用。以上各组 2-3 日半量

本文 2001 年 12 月 29 日收到, 2002 年 5 月 28 日接受。

* 本课题承天津市自然科学基金资助, 课题号 013611711。

换液(同时添加上述因素),7天左右传代一次。

2) 扫描电镜(SEM)和透射电镜(TEM)观察 用2.5%戊二醛固定液对干细胞球做前固定,1%四氧化锇溶液后固定40分钟,梯度酒精脱水。SEM采用HCP-II型临界点干燥仪行液态二氧化碳临界点干燥。JFC-1100型离子溅射仪金靶镀膜,厚度5-10nm。于JEOL,JSM-25s扫描电镜下观察。TEM采用Epon812环氧树脂包埋,LKB-V型超薄切片机制片,厚度50nm。于JEOL-100sx透射电镜下观察。

3) 克隆分析 将体外培养约10天的神经干细胞,0.1%胰酶/0.05%EDTA常规方法消化后,接种于L-多聚赖氨酸(SIGMA)包被的96孔板内,原始接种密度为 2×10^5 细胞/ml,稀释至每孔1-2个细胞。2天后观察细胞克隆形成数及分化情况。

4) 神经干细胞的分化 将体外培养7-10天的神经干细胞,常规方法消化后接种于涂有L-多聚赖氨酸的24孔板上。同时撤除促有丝分裂因子(EGF,bFGF)的作用,适当添加2%-10%血清。于培养7-10天后倒置显微镜下观察细胞分化情况。

5) 免疫细胞化学染色 对不同培养时段和实验组细胞经4%中性福尔马林固定后,进行免疫组化染色。计数方法:于40倍物镜下随机选取一个视野,计算阳性细胞占此视野全部细胞的百分率($n=6$)。

对于荧光染色的标本,一抗作用过夜后,FITC标记二抗作用2h,缓冲甘油封片,于荧光显微镜下观察。

6) 端粒酶活性分析 分别留取来自不同胎龄(12和22周)及体外培养不同时间(14-60天)的神经干细胞,按照端粒酶PCR ELISA试剂盒(ROCH)所述方法进行实验,结果用 $\Sigma 960$ 型ELISA仪于650nm处读数分析。阳性对照为人神经母细胞瘤细胞系(LA-N-5)。

结 果

1. 形态学观察与鉴定

在未涂基质的培养瓶中,细胞贴壁率较低,呈悬浮生长,并逐渐聚集成肉眼可见的细胞球(neurospheres)。当涂有L-多聚赖氨酸基质时,细胞开始成分散状态,球形,胞体小而核较大。细胞表面光滑,折光率高。培养2-3天后逐渐聚集成大小不一的球(插页2,图版图1)。EGF组、bFGF组与联合作用组之间细胞形态无明显差异,仅形成的细胞球大小不同。bFGF作用下细胞球较大,不太规则;EGF组则较小;bFGF+EGF组生成的细胞球最多,且体积更小。Nestin染色成阳性(插页2,图版图2)。

2. 电镜观察结果

1) SEM NSCs胞体球形,表面较光滑,聚集成簇,细胞之间有一定空隙(插页2,图版图3)。

2) TEM 胞浆极少而核较大,细胞器较少,

细胞表面无突起等分化后结构,较幼稚,呈典型的干细胞状态(插页2,图版图4)。

3. NSCs具有增殖能力

体外培养的NSCs在高倍镜下观察经常可见正处于分裂期的细胞,PCNA染色(插页2,图版图5)呈阳性。细胞计数(图1)显示在培养的最初(3d),各实验组之间PCNA阳性细胞数相差不大。随着培养天数的增加,添加因素的实验组处于增殖阶段的细胞数(PCNA⁺)明显高于对照组(8.3 ± 0.9)。至培养7天时,联合作用组细胞增殖最为旺盛(72.7 ± 3.8)。

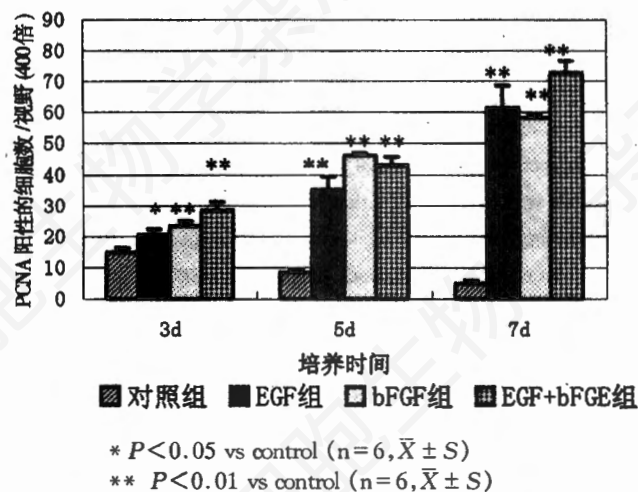


图1 不同因素作用下PCNA阳性的NSC数量

1) 克隆分析 细胞克隆数的形成呈细胞密度依赖性(插页2,图版图2)。在接种密度为 $1-2 \times 10^5$ 细胞/ml时,细胞克隆形成高于低密度(5×10^4 细胞/ml以下)。在极低密度下(小于1000细胞/ml),则无克隆形成,细胞增殖极慢,几乎处于静止。在 2×10^5 细胞/ml密度下,细胞很快分化(2h)。随密度降低,分化逐渐减少,单细胞状态则根本不分化。

方差分析结果显示高密度组($1-2 \times 10^5$ 细胞/ml)与较低密度组之间(5×10^4 细胞/ml以下)的克隆形成数存在显著性差异($P < 0.01$)。

2) 传代后,NSCs仍保持未分化状态,聚集成球,悬浮生长。当将其种于涂有基质的24孔板上时,仍有分化能力。

4. 撤除有丝分裂因子作用后,NSCs可向三种不同神经细胞方向分化。

1) 形态学观察显示经EGF诱导的NSCs分化后,胞体较大,胞浆丰富,突起粗壮,交织成网。经bFGF诱导的NSCs分化后(插页2,图版图6),胞体相对较小,突起纤细而较长,形成更为密集的网络。

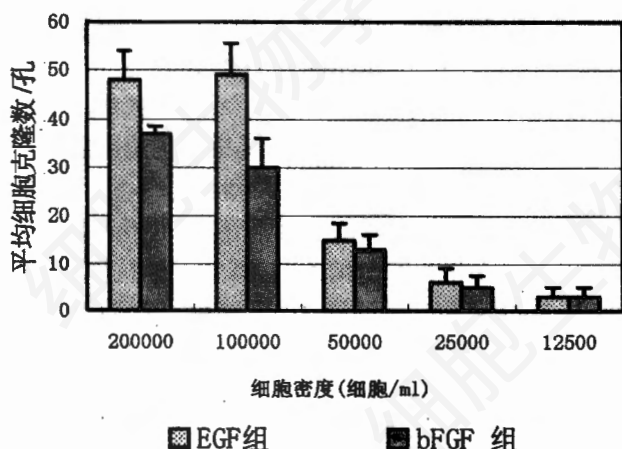


图2 不同细胞密度下的克隆形成数(n=3)

联合作用组介于前两者之间。

2) 免疫细胞化学染色证实了 NSCs 分化方向是多潜能的。免疫双标实验(插图 2, 图版图 7)显示邻近的和同一细胞团的干细胞可向神经元(NF-200⁺)或胶质细胞分化(GFAP⁺)。同时,神经干细胞也可向少突胶质细胞(Gal-C⁺, 插图 2, 图版图 8)分化。

3) 细胞计数 结果(表 1)显示,EGF 诱导的 NSCs 以星形胶质细胞为主(70.3%),bFGF 诱导的 NSCs 以神经元为主(58.6%)。

表 1 不同培养条件下对人胎脑 NSCs 分化的影响
(n=6, $\bar{X} \pm S$)

	星形胶质细胞 (GFAP ⁺) %	神经元 (NF ⁺) %	少突胶质细胞 (Gal-C ⁺) %
EGF 组	70.3 ± 4.3	21.6 ± 8.3	35.7 ± 3.2
bFGF 组	31.3 ± 3.5	58.6 ± 6.7	25.1 ± 4.7
EGF + bFGF 组	63.8 ± 3.6	30.3 ± 3.8	37.1 ± 6.4

5. 端粒酶活性

以人神经母细胞瘤细胞系(LA-N-5)为阳性对照,其结果(酶标仪读数)定为 100,其他实验组结果以其为参照进行比较(表 2)。

表 2 体外扩增的人神经干细胞端粒酶活性水平(n=3)

标本胎龄	作用因素	体外培养时间 (天)	端粒酶活性 (% RCB)
阳性对照	血清	—	100
22 周	EGF	18	4.0
22 周	bFGF	18	4.3
12 周	EGF	60	1.0
12 周	bFGF	60	3.7
12 周	EGF	14	7.9
12 周	EGF + bFGF	14	6.4
12 周	EGF + bFGF	30	5.8

各实验组端粒酶活性 = 各实验组/阳性对照组酶标仪读数

结果显示在培养天数相差不大时(18 天和 14 天),标本胎龄越大(22 周 vs. 12 周),端粒酶活性越低。在标本胎龄相同时(均为 12 周),随着体外培养时间延长(14-60 天),端粒酶活性降低。

讨 论

目前,限于标本来源的困难,有关人 NSCs 的研究还不够深入。但鉴于人和啮齿动物 NSCs 生长特性有许多不同,对人 NSCs 的研究已日益成为热点之一。本实验分离、诱导的人神经干细胞,同时具有干细胞的几个基本特性。

1. 增殖和分裂潜能

本实验发现单独或联合使用 bFGF 和 EGF,均可维持 NSCs 的增殖,但用 EGF 和 bFGF 联合作用的效果更好。而 Vesćovi 等^[6]发现单独用 EGF 或 bFGF 作用,不能维持人 NSCs 持续增殖,而用 EGF 和 bFGF 联合作用,却可延长其有丝分裂的时间。EGF 和 bFGF 都可诱导来自胚胎和成年动物不同脑区 NSCs 的增殖,但应答 EGF 和应答 bFGF 细胞之间的关系还不十分清楚。目前有两种可能的机制被提出^[7]:一种认为在 E8.5 时,只有 FGFR1 信号起作用。但在 E14.5-15.5 时,EGFR 和 FGFR1 信号均起作用。即 EGF, bFGF 分别调节两种不同的细胞分裂信号系统。另一种假说认为 EGF 应答的细胞来自于 bFGF 应答的细胞,且 EGF 和 bFGF 共同作用有协同作用^[8]。

2. 自我更新能力

神经干细胞的最基本特征自我更新的能力,即在分裂过程中产生的子代细胞仍保留 NSCs 的全部特性^[9]。EGF 和 bFGF 均可促进来源于成年和胚胎 CNS 干细胞的增殖,同时可以使其产生的子代细胞维持在干细胞状态^[9,1,2]。自我更新状态的维持受内外因素的调节。除了外源性的生长因子作用外,某些基因,如同源盒基因 Notch1 等均参与其调控过程。目前已发现了一系列可促使静止的干细胞进入细胞周期的因子,但是这其中还没发现这样一种因子:其单独或联合作用时只维持干细胞自我更新状态而不促其进入分化。

3. 端粒酶活性

端粒酶的活性也是一个重要调控因素。在多种细胞类型中,端粒酶的表达都与自我更新能力密切相关。例如在骨髓 HSCs 或胎肝中,约有 70% 细胞

的细胞数量比胶原酶Ⅲ消化组织 20 小时所得的细胞数多,但胰蛋白酶消化组织得到的细胞的死细胞比率要高于胶原酶Ⅲ。这说明胎牛成纤维细胞对胰蛋白酶较敏感,而胶原酶Ⅲ消化组织则较温和。组织块贴壁培养法较消化培养法简便经济,细胞生长快,且污染机率小,我们认为是一种行之有效的细胞培养方法。

牛胎儿成纤维细胞在体外培养时成贴附型生长,原代和早期传代细胞是上皮样和成纤维样细胞的混合物。上皮样细胞由表皮生发层的细胞分裂增殖而来,是源于外胚层的细胞;成纤维样细胞是由真皮层细胞分裂增殖而来,源于中胚层。在体内,生发层的细胞由于要不断地分裂产生新的表皮细胞以补充表层角化脱落的细胞,因而具有较强的增生能力。组织块培养初期,由于细胞仍基于原组织生长,还保持着强增殖能力,所以可见首先移出生长的主要是上皮样细胞。真皮层是一层致密的结缔组织,细胞成分较少,因此在组织块培养的最初几天,成纤维样细胞由于母细胞数量少而显得增加数量较慢。成纤维样细胞在体外的生存能力强,生长迅速,3-4 天后转呈优势生长。这一特征与人皮肤组织细胞体外生长特征相似。

成纤维细胞在体外培养存活时间取决于动物种类,人胚成纤维细胞约可培养 50 代,恒河猴皮肤成纤维细胞传代超过 40 代,小鼠成纤维细胞寿命最短,多数生长 8 代左右。长期反复传代,细胞可逐渐失去二倍体性,进入衰退期^[7]。本实验表明,经冷冻解冻传至 9 代、12 代的牛胎儿成纤维细胞染色体倍性正常,与初期传代生长相比未见衰退。

摘 要

分别用胶原酶Ⅲ和胰蛋白酶成功地分离了牛胎儿成纤维细胞,并对其进行了体外培养,同时探讨了两种酶消化分离牛胎儿组织的时间对牛胎儿成纤维细胞原代培养的影响。用组织块直接培养也成功得到了牛胎儿成纤维细胞,并探讨了不同组织块大小对牛胎儿成纤维细胞原代培养的影响。通过绘制生长曲线,可以研究牛胎儿成纤维细胞增殖规律;通过制备牛胎儿成纤维细胞的细胞染色体发现,经过传代(12 代)、冷冻保存、解冻,牛胎儿成纤维细胞染色体数目不变。

关键词:牛胎儿成纤维细胞 体外培养 染色体

参 考 文 献

- [1] 北京农业大学编. 1961, 家畜解剖学及组织胚胎学, 农业出版社, 北京.
- [2] Paul FK, Patterson MK(eds)., 1973, Tissue culture: methods and application. , Academic Press, New York.
- [3] 鄂征, 1995, 组织培养和分子细胞学技术, 北京出版社, 北京.
- [4] David WB, David AS, Gordon HS(eds)., 1984, Cell culture methods for molecular and cell biology, Vol: Methods for serum free culture of cells of the endocrine system. , 47 - 61, Alan R Liss Inc, New York.
- [5] Boris Z, Marilyn van D, Warren S, et al. , 1996, Establishment and characterization of a bovine mammary myoepithelial cell line. , In Vitro Cell Dev Biol, 1996, 32: 138 - 148.
- [6] 戴定威、吴圣楣、李敏等, 1997, 新生大鼠小肠上皮细胞分离培养研究, 细胞生物学杂志, 19: 31 - 34.
- [7] 司徒镇强、吴军正, 1997, 细胞培养, 世界图书出版社, 西安.

DISSOCIATION AND IN VITRO CULTURE OF BOVINE FIBROBLASTS

LI Yang GUO Ji Tong WU Kai Feng BAO Shorgan

(The Research Center for Laboratory Animal Science of Inner Mongolia University The Key Laboratory of Ministry of Education of China for Mammal Reproduction Biology and Biotechnology, Huhhot 010021)

ABSTRACT

The bovine fetal fibroblasts were successfully dissociated and cultured in vitro by using trypsin and collagenase Ⅲ. It was indicated that the digestion time of two kinds of enzyme had great influence on the primary culture of the bovine fetal fibroblasts. The bovine fetal fibroblasts could also be obtained by tissue block culture, and the size of tissue block had influence on the primary culture of the bovine fetal fibroblasts. Through analyzing the growth curve, the proliferation - promoting law of the bovine fetal fibroblasts could be studied; after the cell chromosomes were prepared, it was found that there were no changes in the chromosome number of the bovine fetal fibroblasts, which were subcultured for 12 passages, cryo-preserved and thawed.

Key words: Bovine fetal fibroblasts Culture in vitro Chromosomes