

有的核注射小鼠均是雌性,后代小鼠与核供体小鼠属于同一基因型,说明后代小鼠确实是来自卵丘细胞核注射的克隆动物<sup>[7]</sup>。

卵丘细胞核注射后,卵母细胞放置0-6小时进行激活,发现核注射和卵母细胞激活的时间间隔影响卵母细胞的发育率。注射后立即激活、注射后1-3小时激活、注射后3-6小时激活,桑葚胚/囊胚的形成率分别是39.9%、58.4%、66.9%。Wakayama等(1998)认为:核注射后,把G<sub>0</sub>期卵丘细胞核暴露于卵母细胞质的时间延长,会使核染色质长时间凝聚,促进了核的重新修饰,有利于胚胎发育<sup>[7]</sup>。

目前,通过核移植生产克隆动物的方法有两种,即融合法和核注射法。Wilmut等把绵羊乳腺细胞与去核卵母细胞电融合,构成重组胚,用多个电脉冲来激活卵母细胞,最后获得了世界上第一只体细胞克隆羊Dolly<sup>[8]</sup>。Wakayama等采用了后一种方法,克隆出小鼠Cumulina。Wakayama认为:使用核注射的方法,相对于电融合法来说,对卵母细胞和供体核的操作变得快速有效,减轻了对两者的损伤,而且进入卵母细胞内的体细胞胞质的数量较少,从而减少了体细胞胞质对重组胚发育的不利影响<sup>[7]</sup>。

Onishi等把猪胎儿成纤维细胞的核注射到去核卵母细胞中,采用一个强电脉冲(1.5KV/cm, 100 $\mu$ s)激活卵母细胞,得到了克隆猪,命名为Xena,说明胞质内体细胞核注射的方法同样适用于大型动物的克隆<sup>[9]</sup>。

## 研究工作

# 中脑神经前体细胞的体外分离、培养和特性

孙秀 陈生弟 刘振国 刘卫国 梁梁 徐洁懿

(上海第二医科大学瑞金医院神经内科 上海 200025)

最初人们认为神经前体细胞仅存在于发育中的脑组织,神经细胞发育成熟后则停止分化,神经系统丧失再生功能。目前发现神经前体细胞不仅存在于发育中的脑组织,也存在于成熟的脑组织内。其分布较为广泛,已证实成熟脑组织的室下区、纹状体、海马齿状回、下丘脑、脊髓等处存在神经细胞<sup>[1-3]</sup>。长期以来体外培养神经前体细胞存在较大困难。为研究神经前体细胞的特性和了解神经前体细胞对外源性因子的反应,将逆转录病毒介导的癌基因myc

## 结 语

结构和功能上有缺陷的精子常常不能穿过透明带和卵膜,结果受精失败,在精子核正常的情况下,胞质内注射可解决这个问题,给不孕夫妇带来希望。通过核移植结合基因修饰的方法,来生产转基因克隆动物,使其制造人类所需要的蛋白质(如克隆牛乳腺制药)或供应排异性小的器官(如克隆猪的器官),进行异种移植,来替换人体受损或病变器官,应用前景十分广阔,在这方面,胞内体细胞核的注射提供了一种行之有效的方法。

## 摘 要

卵母细胞胞质内注射是体外生产胚胎的一种重要技术,本文对胞质内生殖细胞和体细胞核注射的研究状况进行了综述。

## 参 考 文 献

- [1] Kimura Y, et al., 1995, *Biol. Reprod.*, **52**:709-720.
- [2] Kuretake S, et al., 1996, *Biol. Reprod.*, **55**:789-795.
- [3] Perreault SD, et al., 1988, *Dev. Biol.*, **125**:181-186.
- [4] Perreault SD, et al., 1987, *Biol. Reprod.*, **36**:239-244.
- [5] Sasagawa I, et al., 1998, *Biol. Reprod.*, **58**:248-254.
- [6] Kimura Y, et al., 1995, *Biol. Reprod.*, **53**:855-862.
- [7] Wakayama T, et al., 1998, *Nature*, **394**:369-374.
- [8] Wilmut I, et al., 1997, *Nature*, **385**:810-813.
- [9] Onishi A, et al., 2000, *Science*, **289**:1188-1190.

或SV40大T抗原转入神经前体细胞建立了若干永生细胞系,如HiB5, RN33B和RN46A,以了解神经前体细胞体外增殖和分化的有关特性。但永生细胞

本文2001年11月28日收到,2002年5月18日接受。  
基金项目:国家重点基础研究规划“脑功能和脑重大疾病的基础研究”;国家自然科学基金资助项目(G1999054008);国家自然科学基金资助项目(39970263);上海市卫生系统百名跨世纪优秀学科带头人培养计划(97BR001);上海二医大-上海生命科学中心科研项目。

系可能改变了原始细胞某些蛋白的表达和生长速度等基本特征,所以由永生细胞系获得的知识不全部适用于神经前体细胞。当发现生长因子 EGF 和 FGF 可促进原代培养神经细胞的生存和增殖后,人们应用添加有丝分裂源的无血清培养基成功在体外分离培养神经前体细胞。

中脑多巴胺(DA)神经元来源于胚胎中脑曲生发区,若能在体外分离培养中脑神经前体细胞和诱导其分化,获得大量有功能的 DA 能神经元,则可为帕金森病的移植治疗提供供体细胞。体外分离培养中脑神经前体细胞和研究神经前体细胞增殖和分化是这一工作的前提。本实验报道在体外分离、培养中脑神经前体细胞及其自我更新和多向分化的特性。

## 材料和方法

### 1. 中脑神经前体细胞的体外分离和培养

取 E14.5 天妊娠大鼠,水合氯醛 0.5g/kg 麻醉,无菌操作下取出胚胎,分离胚胎脑组织,在显微镜下钝性分离中脑组织,将分离的中脑组织置于 0.1% 胰蛋白酶液内,室温消化 30 分钟,短暂低速离心,弃上清, DNase(40 $\mu$ g/ml)37 $^{\circ}$ C 孵育 10 分钟,再次短暂低速离心,弃上清,在细胞内加入特定无血清培养基(defined medium, DM),用巴斯德吸管轻轻吹打成单细胞悬液,按  $3 \times 10^5$ /ml 接种于无包被的 25cm<sup>2</sup> 的培养瓶内,置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 温箱内培养。Defined Medium 的基本组分为 DMEM/F12(1:1), transferrin(100 $\mu$ g/ml), insulin(25 $\mu$ g/ml), progesteron(6.3ng/ml), putrescine(9.6g/ml), sodium selenite(5.2 $\mu$ g/ml), progesteron(6.3ng/ml), putrescine(9.6g/ml), sodium selenite(5.2ng/ml), 青霉素 100u/ml, 链霉素 100 $\mu$ g/ml 以及有丝分裂源即上皮细胞生长因子(EGF) 20ng/ml。培养一周后观察生长的悬浮神经细胞球大小及数目。收集神经细胞球,机械吹散打匀成单细胞悬液后,置于同样条件下培养。视生长状况决定是否传代。第 1 个月内每次传代时显微镜下计数台盼蓝拒染的活力细胞。同时观察无 EGF 作用的中脑神经前体细胞的生长速度。

### 2. 细胞克隆实验

将单个神经前体细胞球(直径约为 250 $\mu$ m)吹散打匀成单细胞悬液,以低细胞密度 50 个细胞/ml 种植于 DM 培养基内以防细胞聚集。观察细胞的生长和神经细胞球的数目。同时将来源于单个神经前体细胞球的后代细胞机械吹打成单细胞悬液后,置于多聚赖氨酸(poly-L-lysine, PLL)被覆的 48 孔板,细胞密度为  $1 \times 10^4$ /ml,培养基为完全培养基(complete medium, CM)。CM 的基本组分为 DMEM/F12(1:1), 10% FCS, 1% P/S。生长 3 小时后行 Nestin, GFAP,  $\beta$ -Tubulin III 免疫组织化学染色以了解细胞抗原。生长 7 天后行 GFAP,  $\beta$ -Tubulin III 免疫组织化学染色以了解细胞分化能力。

### 3. 5 溴尿嘧啶(BrdU)掺入试验

将神经前体细胞与含 100 $\mu$ M BrdU 的 DM 培养基孵育 24 小时,弃去培养基, DMEM/F-12(1:1)培养基漂洗神经前体细胞两次,将其置于 PLL 被覆的 48 孔板内,CM 内生长 24 小时后行 BrdU 免疫细胞化学染色。

### 4. 免疫组织化学染色

3.7% 甲醛固定细胞 20 分钟,3% 马血清/0.1% Triton-X/PBS 室温封闭 1 小时,第一抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,第二抗体生物素标记马抗鼠 IgG(1:200, Invecton)37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟,与 ABC 液室温孵育 1 小时,DAB 和 Nickel 作用显色。BrdU 染色稍有不同,DAB 显色后,用 Mayers Haemalaun 复染细胞核,70% 酒精/25 $\mu$ M HCL 溶液差异显色。第一抗体分别为:

Nestin: 小鼠单克隆抗体(1:1,000, Chemicon)

GFAP: 小鼠单克隆抗体(1:1,000, Pharmagin)

$\beta$ -Tubulin III: 小鼠单克隆抗体(1:200, Sigma)

BrdU: 小鼠单克隆抗体(1:200, Boehringer Mannheim)

## 结果

### 1. 中脑神经前体细胞的体外生长情况

体外培养第 1 代细胞一周后,约 70% 细胞死亡,大部分存活细胞贴壁分化,存活细胞中约有 1% 的细胞分裂增殖成悬浮神经细胞球(proliferating neurosphere),每 cm<sup>2</sup> 约有 10-30 个神经细胞球,直径约为 150-350 $\mu$ m。在 EGF 有丝分裂源刺激下,神经细胞球体积持续增大。体外培养一周后将神经细胞球机械吹散成单细胞悬液,置于同样条件下培养。可观察到悬浮的单个细胞分裂增殖并形成细胞小球(见图 1、2);有些细胞在最初几周内增殖,随后逐渐贴壁分化,并最终死亡。初始 2 月神经前体细胞增殖较快,神经细胞球体积逐渐增大,平均 1 周需传代一次。2 月后神经前体细胞增殖速度减慢,2 至 4 周需传代一次。初始 1 月内每次传代时均计数显微镜下台盼蓝染色阴性的细胞,以了解细胞的生长速度。我们已成功传代神经前体细胞并保持其增殖和非分化特性(见后述)长达 6 月。有丝分裂源 EGF 可刺激神经前体细胞增殖,EGF 刺激下细胞增殖曲线(见图 3),EGF 作用下的细胞增长速率显著高于无 EGF 培养基的细胞增长速率。无 EGF 作用的神经前体细胞的生长速度明显减慢,细胞逐渐分化并趋向死亡。

### 2. 神经前体细胞具有自我更新能力

连续细胞克隆实验证实神经前体细胞具有自我更新能力。分别计数每代神经前体细胞球的数目,可推算出来源于单个初代神经细胞球的神经前体细胞可产生  $6 \pm 2$  个次代神经细胞球(直径约为 150 $\mu$ m),形态与初级神经细胞球类似。



图1 悬浮的单个神经前体细胞(×200)

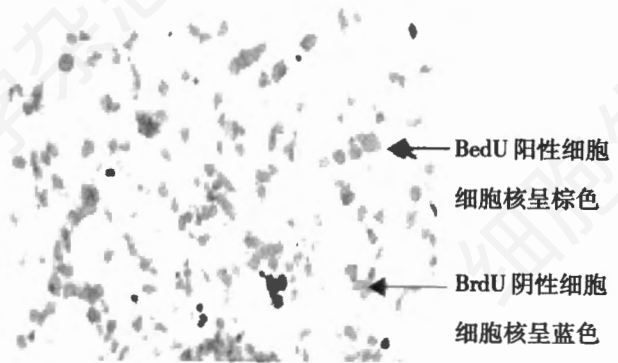


图4 BrdU 阳性的神经前体细胞(×200)  
阳性细胞细胞核呈棕色,阴性细胞细胞核呈蓝色。

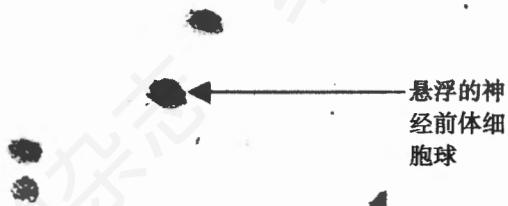


图2 悬浮的神经前体细胞球(×200)

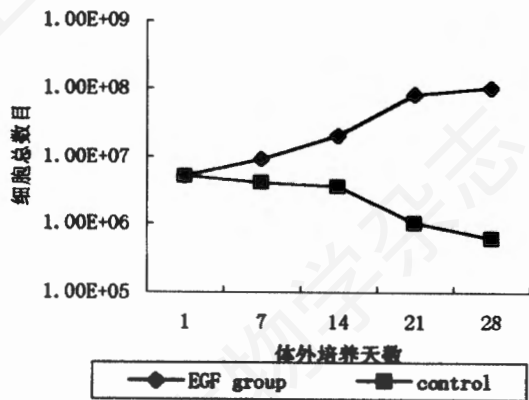


图3 体外中脑神经前体细胞的生长  
EGF作用下神经前体细胞稳定增长,无EGF作用的神经前体细胞生长缓慢,渐趋死亡。

### 3. 中脑神经前体细胞的增殖特性

神经前体细胞的 BrdU 免疫细胞化学实验结果显示 90% ± 5% 的细胞呈 BrdU 免疫染色阳性(见图4),提示中脑神经前体细胞具有增殖能力。

### 4. 中脑神经前体细胞的非分化特性

因中脑神经前体细胞在无包被的培养瓶内呈悬浮状态,为便于免疫细胞化学分析,需把中脑神经前体细胞转移至易于贴壁且不失神经前体细胞特性的环境。有实验证实将中脑神经前体细胞转移至含完全培养基的被覆 PLL 培养皿内生长 3 小时后,神经前体细胞贴壁且仍保持其神经前体细胞的特性<sup>[4]</sup>。我们培养的细胞呈神经前体细胞特征性标志巢丝

(Nestin)阳性(图5),分化细胞特征性标志微管蛋白( $\beta$ -Tubulin III)和胶质纤维酸性蛋白(GFAP)阴性。巢丝是细胞内中间丝蛋白,仅表达于未分化的神经前体细胞,随着神经前体细胞的分化消失,因此巢丝是神经前体细胞的特征性标志。微管蛋白  $\beta$ -Tubulin III 是神经细胞的特征性标志。GFAP 是一种中间丝蛋白,只在星形胶质细胞内表达,是星形胶质细胞的特征性标志。神经前体细胞缺乏分化细胞的生物标志提示神经前体细胞呈未分化状态。

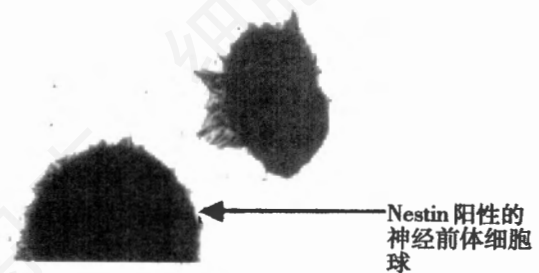


图5 Nestin 阳性的神经前体细胞球(×40)

### 5. 中脑神经前体细胞的多向分化潜能

将中脑神经前体细胞置于被覆 poly-L-lysine (PLL)的培养皿内,添加含血清的完全培养基生长 24 小时后,神经前体细胞开始贴壁分化,并逐渐表达分化细胞系的抗原。生长 7 天后,可观察到一部分细胞表达  $\beta$ -Tubulin III (图6),大部分细胞表达 GFAP(图7)。结果提示中脑神经前体细胞具有多向分化潜能,即在含血清的培养基内可至少分化成神经细胞和星形胶质细胞两种主要细胞类型。实验观察到来源于二代神经细胞球的神经前体细胞可分化成神经元和星形胶质细胞,也可继续增殖成三代神经细胞球。继续按连续克隆分化法培养细胞,可产生大量与自身特性一致的后代细胞,即具有非分化特性和多向分化潜能的后代细胞。



图6 分化的神经前体细胞呈  $\beta$ -Tubulin III 免疫阳性 ( $\times 200$ )

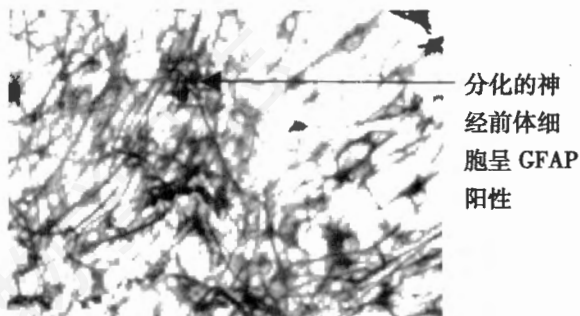


图7 分化的神经前体细胞呈 GFAP 阳性 ( $\times 200$ )

## 讨 论

本实验在体外成功分离、培养中脑神经前体细胞并对中脑神经前体细胞的特性进行了研究。经克隆分析实验, BrdU 增殖实验和细胞分化前后进行免疫细胞化学实验证实我们分离培养的细胞是神经前体细胞, 即具有增殖及自我更新能力, 非分化特性(缺乏分化细胞的生物学标记)和多向分化潜能(向神经元和星形胶质细胞方向分化)。而且有可能在体外大量扩增中脑神经前体细胞。

细胞的自我更新能力是神经前体细胞最重要的特性, 即一个细胞周期内单个细胞可产生一个与自身特性一致的子细胞。基于这一机制中脑神经前体细胞数目稳定增长。此外未分化和多向分化潜能也是神经前体细胞的重要特性。

DNA 是细胞遗传的基本物质, 其结构包括 4 种碱基。5 溴尿嘧啶(BrdU)的结构与 DNA 合成的必需碱基胸腺嘧啶结构相似, BrdU 可作为细胞 DNA 合成的前体碱基被细胞摄入参与 DNA 的合成代谢过程。因此 BrdU 免疫细胞化学实验可以反映细胞代谢和增殖情况。实验研究发现中脑神经前体细胞在 EGF 刺激下增殖生长, 当撤去 EGF 后, 细胞增殖速度明显减慢, 最后停止增殖并渐趋死亡。提示 EGF 对 E14.5 大鼠中脑神经前体细胞增殖的必要性。而人神经前体细胞在含 EGF 或 FGF 的特定培

养基内仅能短暂增殖, 5-6 周后停止增殖。人神经前体细胞只有在 EGF 和 FGF 同时作用下才能持续增殖。这可能与细胞表面的 EGF 和 FGF 受体的表达水平和功能有关<sup>[5]</sup>。

世界上有若干实验室成功在体外培养中脑神经前体细胞。其中 Ling 在中脑神经前体细胞的研究方面做了大量工作<sup>[4]</sup>, Ling 在体外分离培养中脑神经前体细胞采用含 B27(Gibco)的无血清培养基, 我们发现用此种培养基培养细胞, 尽管能促进神经前体细胞存活, 但经 5-6 次传代后细胞易于贴壁分化。在细胞培养过程中, 抑制神经细胞球的贴壁是一重要环节。含高糖(4.5g/L)的 DMEM 培养基密度较大, 神经细胞球易于悬浮。因此我们采用添加各种营养因子的高糖 DMEM:F-12(1:1)的特定的培养基能够较好的抑制细胞贴壁和分化。但我们分离培养的神经前体细胞是多克隆细胞, 若能分离单克隆细胞, 并建立细胞系, 细胞冻存后仍具有增殖和分化特性, 则能为体内外实验提供稳定的细胞来源。

神经前体细胞系建立后来源将不受限制, 这将为实验和临床移植治疗研究提供若干便利。可直接将未分化的神经前体细胞移植入宿主某一特定脑区, 观察其在宿主体内微环境调控下的分化情况。也可在体外采用改变培养基成分, 转基因等方法对神经前体细胞的分化进行调控, 再将预先分化的特定类型细胞移植入宿主体内。还可将有治疗效应的基因转入神经前体细胞内, 再将基因修饰的神经前体细胞移植入宿主体内。神经前体细胞因其未分化状态、神经源性、易于和神经细胞形成功能性连接、作为基因工程细胞治疗神经系统疾病, 具有非神经源性细胞无可比拟的优点。

此外, 中脑神经前体细胞可为中脑多巴胺神经系统再生的基础研究和药物筛选提供恰当的模式。运用差异显示法研究中脑神经前体细胞的体外分化有利于发现与多巴胺神经元发育有关的新基因。

## 摘 要

为了解中脑神经前体细胞的体外培养特性和建立中脑神经前体细胞的体外分化调控机制提供细胞模型。本实验采用含有丝分裂源表皮生长因子(EGF)的无血清培养基培养来源于大鼠胚胎 E14.5 天的中脑神经前体细胞, 应用免疫细胞化学方法了解其前体细胞特性。结果发现中脑神经前体细胞呈神经前体细胞特征性标记 Nestin 免疫染色阳性, 无分化细胞标记; 细胞克隆实验证实中脑神经前体细

胞有自我更新能力;在 EGF 刺激下增殖迅速;当撤去 EGF 后置于含胎牛血清的培养基和被覆多聚赖氨酸(PLL)的培养皿内,中脑神经前体细胞可分化成神经元和星形胶质细胞。本试验证明我们培养的中脑神经前体细胞具有增殖、自我更新能力和多向分化潜能特性。

关键词:中脑神经前体细胞 表皮生长因子

## 参 考 文 献

- [1] Gage, F. H., et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **92**:11879-11883.
- [2] Gritti, A. et al., 1996, *J. Neurosci.*, **16**:1091-1100.
- [3] Palmer, T. D. et al., 1995, *Mol. Cell. Neurosci.*, **8**:389-404.
- [4] Ling, Z. D., et al., 1998, *Exp. Neurol.*, **149**:411-423.
- [5] Vescovi, A. L., et al., 1999, *Exp. Neurol.*, **156**:71-83.

## ISOLATION, CULTURE AND CHARACTERIZATION OF MESENCEPHALIC PROGENITOR CELLS IN VITRO

SUN Xiu CHEN Sheng Di LIU Zhen Guo LIU WEI Guo LIANG Liang XU Jie Yi

(Department of Neurology, Ruijin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China)

### ABSTRACT

To understand the characterization of neural progenitor cells in vitro and provide a cell model for studying differentiation of mesencephalic progenitor cells. The rat embryonic E14.5 mesencephalic progenitor cells were isolated and cultured in serum-free medium containing the mitogen epidermal growth factor(EGF). The characterization of progenitor cells was investigated by immunocytochemistry. The cultured mesencephalic cells were positively immunoreactive for progenitor cell marker Nestin, immunonegative for differentiated cell markers, and remained mitotically active. Clonal and population analyses showed their extensive self-renew capacity. The cells are EGF reactive, i. e. proliferate quickly in the medium containing EGF. When growing on poly-L-lysine coated plastic in serum contained medium, the mesencephalic progenitor cells spontaneously differentiate into both neurons and astroglia cells. Our research showed the cultured mesencephalic cells preserved critical characteristics of progenitor cell, including proliferation, self-renew and multipotency.

Key Words: Mesencephalic progenitor cell Epidermal growth factor(EGF)

## 乳猪肝细胞短期培养后的低温保存\*

陈 钟 丁义涛

张鹤云

(南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科 南京 210008) (南京大学生化系 南京 210093)

初步临床试验表明生物人工肝是暴发性肝衰竭的一种有效的治疗手段,但尚有一些问题有待解决。肝细胞作为其中的主要成分面临着来源、数量及储存等问题<sup>[1]</sup>。新鲜分离肝细胞的保存是直接冻存还是短期培养后冻存尚有争议<sup>[2]</sup>。乳猪肝细胞为目前生物人工肝较理想的肝细胞来源,因此,我们以乳猪肝细胞为对象,采用阶段性冻存的方法,对直接冻存法和短期培养后冻存法进行了对比研究,报告如下。

### 材料和方法

#### 1. 材料

本地杂种小猪5头,雌雄不限,出生后10-15天,体重2.5-2.9kg。主要试剂中胶原酶IV、EDTA、RPMI1640为

Gibco公司产品,新生牛血清(NBS)为杭州四季青生物工程研究所产品,二甲亚砜(DMSO)购自MERCK公司,CO<sub>2</sub>培养箱为日本IKEMOTO RK110-2,冻存管购自Nunc公司。

#### 2. 肝细胞的分离

采用改良Seglen原位两步胶原酶灌注法分离肝细胞。收集的肝细胞用RPMI1640悬浮成悬液备用。计数肝细胞总数,台盼蓝拒染试验测肝细胞成活率。

#### 3. 实验分组

每只乳猪分离的肝细胞按是否冻存及冻存方法的不同分为A、B、C三组,A、B两组再按低温保存时间的不同各分两小组。各冻存组采用同一冻存方法:将肝细胞按 $1 \times 10^7$ /ml接种至含10% NBS、200 $\mu$ g/L氢化可的松、200 $\mu$ g/L

本文2001年12月3日收到,2002年5月20日接受。

\*本研究受江苏省卫生厅重点项目基金(BQ200020)、南京市科委科技发展计划(20012095)资助。