

新生小鼠神经干细胞体外培养、分化及鉴定

代丽丽¹, 钟士江^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193
2. 武警后勤学院附属医院, 天津 300162

摘要: **目的** 简化神经干细胞原代培养的取材及步骤, 明确体外定向诱导分化条件, 为进一步神经干细胞移植相关实验提供基础条件。**方法** 新生 24 h 昆明种小鼠无菌条件下冰上取大脑组织, 经机械分离加胰酶消化吹打后, 加入含有碱性成纤维细胞生长因子、表皮细胞生长因子和 B27 的 DMEM/F12 培养基中培养; 加入不同浓度胎牛血清诱导其分化, 应用免疫荧光技术行巢蛋白、胶质纤维酸性蛋白、微管相关蛋白 2 染色, 对培养细胞鉴定。**结果** 新生小鼠提取神经干细胞可形成神经球, 并稳定增殖传代, 经诱导可定向分化为神经元及星形胶质细胞。**结论** 新生小鼠较胎鼠取材简单, 可培养高质量神经干细胞, 血清浓度同向星型胶质细胞方向的分化概率呈正相关。

关键词: 神经干细胞; 细胞培养; 分化; 鉴定

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2016)01-0071-03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.01.012

In vitro culture, differentiation, and identification of neural stem cells in neonatal mice

DAI Li-li¹, ZHONG Shi-jiang^{2*}

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China
2. Affiliated Hospital of Armed police Logistics College, Tianjin 300162, China

Abstract: Objective To simplify the original culture of neural stem cells *in vitro* and to determine the differentiation conditions. Provide basic conditions for the further study of neural stem cell transplantation. **Methods** The brain tissue of Kunming mice newborn for 24 h was isolated under sterile conditions on the ice, by mechanical separation and trypsin digestion and trituration, and added with alkaline fibroblast growth factor, epidermal growth factor, and B27 of DMEM/F12 culture medium; The brain tissue was also added with different concentration of fetal bovine serum to induce differentiation; The immune fluorescence technique for nestin, glial fibrillary acidic protein, and microtubule associated protein 2 staining of cell culture identification were also performed. **Results** The primary cultured cells of the neonatal mice could form the nerve bulb and proliferate and differentiate into neurons and astrocytes. **Conclusion** Compared with the fetal rats, the newborn mice are simple and neural stem cells with high quality could be cultured, and the serum concentration is positively correlated with the differentiation of the direction of the astrocytes.

Key words: neural stem cells; cell culture; differentiation; identification

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)是一种特定的干细胞,其基本生物学特性是自我更新能力和向神经细胞多向分化能力,可在多种刺激因素下分化为神经元、星型胶质细胞及少突胶质细胞^[1-3]。根据神经功能受损的恢复机制、神经元的不可再生性、体内内源性神经干细胞数量稀少的原因,当代

研究采用干细胞移植治疗以恢复或重建受损的中枢神经系统结构和功能^[4]。神经干细胞治疗是一种重要的新型治疗方法,用于治疗神经系统损伤和退行性病变是近期研究热点^[5]。本实验简化神经干细胞原代培养的取材及步骤,明确体外定向诱导分化条件,为进一步神经干细胞移植相关实验提供基础条件。

收稿日期: 2015-11-13

基金项目: 经鼻给予 NGF 联合 NSC 移植治疗运动神经元病的实验研究(13JCYBJC24100)

作者简介: 代丽丽,女,天津中医药大学,研究生在读。Tel: 13032238102 E-mail: jiayounxia@163.com

*通信作者: 钟士江(1962-),男,主任医师,教授,医学博士,博士后,硕士生导师,从事脑血管疾病及神经退行性疾病研究。

Tel: 13102296029 E-mail: zhongshijiang1@163.com

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 新生24 h昆明种小鼠由军事医学科学院动物中心提供,动物合格证号:SCXK-(军)2009-003。

1.1.2 主要试剂及耗材 DMEM/F12 (1:1)培养基(美国Gibco公司),B27复合物(美国Gibco公司),碱性成纤维细胞生长因子bFGF、表皮细胞生长因子EGF(美国Peprotech公司),胎牛血清(FBS)(美国Sigma公司),多聚赖氨酸(美国Sigma公司),PBS溶液(Hyclone公司),0.25% Trypsin/EDTA(Hyclone公司),青霉素-链霉素溶液(Hyclone公司),巢蛋白(nestin)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、微管相关蛋白2(MAP-2)抗体(美国Millipore公司),FITC山羊抗兔IgG(H+L)抗体、FITC山羊抗鼠IgG(H+L)抗体(康为世纪公司)。25 cm²细胞培养瓶、24孔板、15 mL离心管(nest公司)。

1.2 方法

1.2.1 神经干细胞分离及培养 新生24 h昆明种小鼠断头处死,头部冰冻后PBS溶液中漂洗去血迹,无菌条件下冰上取出双侧大脑,放入盛有PBS溶液培养皿中漂洗,仔细剥离脑膜及血管后将脑组织剪碎至2 mm左右,加入0.25% Trypsin/EDTA 2 mL,37℃消化10 min后用枪头轻柔吹打,加入10% FBS终止消化,200目筛网滤过后成细胞悬液,将细胞悬液1 000 r/min离心5 min,弃上清后加入2 mL PBS清洗细胞,将细胞悬液再次1 000 r/min离心5 min,弃上清,加入神经干细胞完全培养基(DMEM/F12、20 ng/mL bFGF、20 ng/mL EGF、20 ng/mL B27、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素),以细胞浓度为 2×10^6 /mL接种于25 cm²细胞培养瓶,37℃、5% CO₂条件下培养,每2 d补充1次bFGF+EGF,每4 d半量换液,7 d左右传代。

1.2.2 神经干细胞传代培养 无菌条件下将细胞悬液转移至离心管中,1 000 r/min离心5 min后弃上清,加入0.05% Trypsin/EDTA复合消化酶500 μL,37℃消化10 min后用枪头轻柔吹打20次左右,加入2 mL PBS稀释消化酶,1 000 r/min离心5 min后弃上清,加入神经干细胞完全培养基重悬细胞,调整细胞浓度为 2×10^6 /mL。

1.2.3 神经干细胞诱导分化 事先将24孔板以多聚赖氨酸包被,将细胞浓度调整为 1×10^5 /mL接种至24孔板,FBS按0%、1%、3%、5%、7%、10%

6个浓度组,每组4个孔加入并标记,37℃、5% CO₂条件下培养2 d后,0%组加入10%FBS,3 h后行免疫荧光法鉴定。

1.2.4 神经干细胞及分化细胞免疫荧光法鉴定: ①取出孔板,吸出上清,PBS清洗2次。②4%多聚甲醛固定30 min,后PBS慢速摇床清洗(500 μL/孔×5 min×3次)。③0.1% Triton X-100通透20 min,后PBS慢速摇床清洗(500 μL/孔×5 min×3次)。④用封闭液(PBS含3% BSA)室温封闭1 h,后吸出上清液,给与1:250稀释的一抗(分别包括nestin、GFAP、MAP-2抗体),湿盒中4℃过夜孵育。⑤吸出抗体后PBS慢速摇床清洗(500 μL/孔×5 min×3次),加入1:80稀释的山羊抗鼠IgG、山羊抗兔IgG的FITC荧光二抗,室温避光孵育1 h。⑥吸出二抗后,避光PBS慢速摇床清洗(500 μL/孔×5 min×3次),加入DAPI进行细胞核染色,室温避光孵育5 min。⑦PBS慢速摇床清洗(500 μL/孔×5 min×3次),加入抗荧光淬灭封片剂,荧光显微镜下观察细胞影像。

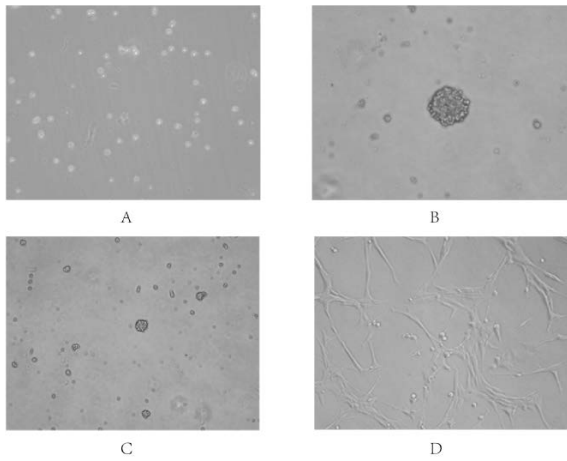
2 结果

2.1 神经干细胞原代培养结果

分离来自新生24 h小鼠脑组织的细胞培养于无血清神经干细胞完全培养基中(DMEM/F12、20 ng/mL bFGF、20 ng/mL EGF、20 ng/mL B27、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素),24 h后可见单个悬浮细胞、不规则悬浮细胞团及部分贴壁细胞(图1A),2~3 d后可见由不同数目细胞组成的,大小不等的细胞球,形态规则,细胞的折光性强,无突起形成,称之为神经细胞球(neurosphere),呈悬浮生长(图1B)。7 d后可见大量神经细胞球,部分神经细胞球可见中心变暗并且细胞生长状态不良,如约一半以上神经细胞球出现这种状况需要及时传代,传代使用胰酶消化结合机械吹打的方法,将细胞团吹散为悬浮单细胞,传代48 h后仍可聚集为神经细胞球(图1)。

2.2 神经干细胞诱导分化及免疫荧光法鉴定结果

神经干细胞接种至24孔板并以此按分组浓度加入FBS,48 h后3%、5%、7%、10% FBS组可见细胞球贴壁并长出突起(图1),大量细胞迁出神经球并分化,每个浓度组均行nestin、GFAP、MAP-2免疫荧光法鉴定,结果为0%、1%组表达nestin,3%、5%组表达MAP-2,7%、10%组表达GFAP(图2)。



A-细胞分离培养 24 h 后; B-细胞培养 3 d 后; C-细胞传代培养 2 d 后; D-细胞诱导分化后

图 1 培养细胞倒置显微镜观察

Fig.1 Observation of cultured cells under inverted microscope

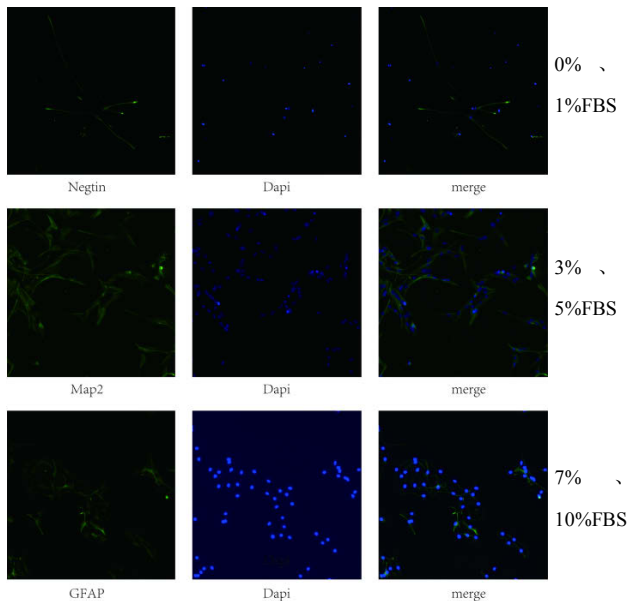


图 2 培养细胞及诱导分化细胞鉴定结果

Fig.2 Identification of cultured cells and induced differentiation cells

3 讨论

神经系统具有组织复杂性和再生困难性,一旦有损伤则形成不可逆性的神经功能破坏,严重影响患者健康及生活^[6]。神经系统损伤时会启动自我修复,但成年人内源性 NSCs 较少,且损伤自我修复多分化为胶质细胞,对促进神经功能恢复的作用有限,在这种情况下,外源性 NSCs 移植非常重要^[7]。神经干细胞移植能通过减轻损伤后的脑水肿、细胞凋亡和炎症反应,以及促进内生性的神经再生等方

式刺激其神经功能恢复^[8]。

本实验采用新生 24 h 小鼠,在取材时较胎鼠容易,且全程在冰上进行,可以维持细胞活性,培养基选择 DMEM /F12 (1:1),含有丰富营养和维生素,B27、bFGF、EGF 可促进细胞有丝分裂及长期生存,添加合适浓度双抗防止细胞污染。因 NSCs 需一定时间聚集成团,并且细胞受外界温度环境影响较大,所以换液不宜频繁且需半量换液;NSCs 传代主要采用胰酶消化或机械吹打方式^[9],因神经球结合紧密,单独采用任意一种方法不能使神经球分散,故传代采用胰酶消化结合机械吹打的方式。实验结果可见经此方法培养的 NSCs 生长状态良好并可连续传代。在诱导 NSCs 方面采用不同浓度血清诱导,并对诱导后分化细胞行免疫荧光法鉴定,结果表明血清浓度同神经干细胞向星型胶质细胞方向的分化概率呈正相关,免疫荧光法结果表达 nestin、GFAP 及 MAP-2。综上所述,本实验通过改进、优化实验方法,成功体外培养了新生 24 h 小鼠神经干细胞,并且生长状态和生物学特性良好稳定,为进一步研究神经干细胞移植及临床应用奠定基础。

参考文献

- [1] Gage F H. Mammalian neural stem cells [J]. *Science*, 2000, 287(5457): 1433-1438.
- [2] Kornack D R, Rakic P. Cell proliferation without neurogenesis in adult primate neocortex [J]. *Science*, 2001, 294(5549): 2127-2130.
- [3] Van P H, Schinder A F, Christie B R, et al. Functional neurogenesis in the adult hippocampus [J]. *Nature*, 2002, 415(6875): 1030-1034.
- [4] Keep R F, Hua Y, Xi G. Intracerebral haemorrhage: Mechanisms of injury and therapeutic targets [J]. *Lancet neurology*, 2012, 11:720-731
- [5] Richardson R M, Singh A, Sun D, et al. Stem cell biology in traumatic brain injury: effects of injury and strategies for repair [J]. *J Neurosurg*, 2010, 112(5): 1125-1138.
- [6] Andres R H, Guzman R, Ducray A D, et al. Cell replacement therapy for intracerebral hemorrhage [J]. *Neurosurgical focus*, 2008, 24(3-4): E16.
- [7] 秦杰. 诱导多能干细胞来源的神经干细胞移植治疗脑出血的实验研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2014.
- [8] Ding D C, Lin C H, Shyu W C, et al. Neural stem cells and stroke [J]. *Cell Transplantation*, 2013, 22: 619-630.
- [9] 胡燕荣, 陈刚, 魏雁, 等. 鼠胚胎神经干细胞的体外培养及诱导分化 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(19): 3651-3655.