

# 大鼠胎儿神经干细胞的分离、培养及诱导分化\*

李 勇, 沈文正, 杨春荣, 窦忠英

(西北农林科技大学 国家干细胞工程技术研究中心陕西分中心, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 为了探讨神经干细胞(Neural stem cells, NSCs)在体外培养中的生物学特性, 研究不同细胞因子对NSCs分化的影响, 试验对大鼠胎儿神经干细胞进行了分离培养, 并研究了10、50和100 ng/mL的神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)和胶质源性神经生长因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)对NSCs的定向诱导分化作用。结果表明, 大鼠胎儿NSCs可在体外增殖并形成典型的神经球, 指数增长期在传代后的第4~5天; 10和50 ng/mL的NGF、BDNF和GDNF对NSCs的诱导分化作用不明显, 100 ng/mL的NGF、BDNF和GDNF可诱导NSCs分化为神经元或胶质细胞。说明NGF和BDNF可诱导NSCs向神经元方向分化, GDNF诱导其向胶质细胞分化。

[关键词] 大鼠; 胎儿神经干细胞; 神经生长因子; 生长曲线

[中图分类号] Q 813.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)03-0020-05

## Rat fetal neural stem cell separate, cultured and differentiated

LI Yong, SHEN Wen-zheng, YANG Chun-rong, DOU Zhong-ying

(Shaanxi Branch of National Stem Cell Engineering and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** To discuss the characteristics of neural stem cells biologic cultured *in vitro* and observe the effect of different growth factors on the differentiation of NSCs, the neural stem cells of rat fetal was separated and cultured, and then they were directional induced by NGF, BDNF and GDNF in the concentration grads of 10 ng/mL, 50 ng/mL and 100 ng/mL in the serum free medium and also identified. The result suggest that when cultured *in vitro*, NSCs can form typical spheres and proliferate, and the exponential growth occurred at the 4th-5th day after NSCs passaged, the effect of the neural factors was not obviously in low concentrations of 10 ng/mL or 50 ng/mL, but the NSCs can be differentiated into neurons and glial cells when they are cultured in the medium supplied with 100 ng/mL NGF, BDNF or GDNF. So in the serum free medium supplied with 20 ng/mL EGF and bFGF, the growth characteristic of NSCs would be definitely influenced, and NGF and BDNF could accelerate NSCs differentiating into neurons, however GDNF could induce them to glial cells.

**Key words:** rat; NSCs; neurotrophic factors; growth curve

自1992年Reynolds等<sup>[1]</sup>从成年鼠脑纹状体中首次分离出能在体外持续增殖且具有向神经元及星形胶质细胞分化潜能的神经干细胞(Neural stem cells, NSCs)后,人们又从其他成年哺乳动物的中枢神经系统中成功分离得到NSCs。NSCs实际上是一个不均一的细胞群体,包括神经干细胞、神经元祖细

胞和神经胶质细胞祖细胞,其广泛存在于胚胎和成体哺乳动物中枢神经系统(central nervous system, CNS)的脑室系统和脊髓组织中,具有自我更新和增殖能力,表达特殊标志蛋白巢蛋白(Nestin)。在体外适当条件下,NSCs可进行自我更新并增殖达到临床应用的数量,可以进行体内外生物学特性的鉴定、

\* [收稿日期] 2006-09-12

[基金项目] 国家“863”计划项目(2002AA 216161)

[作者简介] 李 勇(1977-),男,陕西西安人,在读博士,主要从事干细胞的研究。

[通讯作者] 窦忠英(1939-),男,陕西兴平人,教授,博士生导师,主要从事干细胞与胚胎工程研究。E-mail: douzhongying@china.com

冷冻保存,或者备用于临床治疗。当NSCs移植到体CNS时,其可与宿主组织发生结合,并根据所在部位的微环境分化为任意一种主要的CNS细胞类型(神经元、星形胶质细胞或少突胶质细胞)。这些特性使NSCs有望成为一种良好的细胞来源用于治疗神经系统疾病,如神经退行性疾病和脊髓损伤等。然而,要将NSCs用于临床,还必须在应用前依据靶组织神经细胞的类型对NSCs进行准确的定向诱导分化,并进行体外生物学特性研究及动物模型试验。目前,NSCs的定向分化已成为研究人员关注的焦点。为此,本试验对大鼠胎儿大脑皮层源性NSCs进行分离培养,并探讨其在血清和不同生长因子作用下的分化情况,以期NSCs的进一步临床应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试验动物 怀孕14~16d的SD大鼠,购自第四军医大学试验动物中心。

1.1.2 主要试剂 磷酸盐缓冲液(PBS),DMEM/F12和B27 supplements 购自GIBCO公司;新生牛血清(NBS)、碱性成纤维生长因子(bFGF或FGF2)、ITS复合物(ITS)和牛血清白蛋白(BSA)均购自SIGMA;表皮生长因子(EGF)、神经生长因子(NGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)、胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)、小鼠抗Nestin单克隆抗体(Nestin)、Mouse anti-beta-Tubulin monoclonal antibody 和小鼠抗胶质纤维酸性蛋白单克隆抗体(GFAP)均购自CHENMICON公司;免疫组化染色试剂盒Histostain™-Plus Kits,购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2.3 NSCs培养液 细胞生长培养液为添加B27, 20 ng/mL EGF, 20 ng/mL bFGF, 10 ng/mL ITS, 0.1 g/L BSA, 100 IU/mL 青霉素, 100 IU/mL 链霉素的DMEM/F12;血清诱导培养时的培养液为添加体积分数5% NBS, 100 IU/mL 青霉素, 100 IU/mL 链霉素的DMEM/F12。

### 1.2 大鼠胎儿NSCs的分离

断颈法处死大鼠,取其胎儿,分离胎儿肌肉组织,取出整根脊柱,用双抗PBS冲洗3次;然后剪开脊柱,分离脊髓鞘膜,取出脊髓组织,洗去血细胞;再在含双抗的PBS中清洗以去除非脊髓组织,分离出胎儿脊髓,剪成小块,用机械法将组织碎块轻轻吹打成单细胞,用孔径为75 μm滤纱过滤,收集单细胞,铺皿生长。

### 1.3 大鼠胎儿NSCs的传代培养及多能性鉴定

在添加体积分数10% NBS的DMEM/F12中扩散细胞,以至少 $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 细胞密度铺于60 mm培养皿中培养;第2天,将过渡培养液换为生长培养液继续培养,每3~4 d换液一次,如果细胞密度低,则半量换液。待NSCs生长形成较大的NSCs球样集落(约200个细胞)时,用自制的玻璃吸管收集于10 mL带盖离心管中,用0.5 g/L的胰蛋白酶吹打消化成较小的NSCs集落(约十几个细胞),用等体积含体积分数10% NBS的DMEM/F12中和,500 g离心5 min,弃上清液,添加生长培养液制成细胞悬液,接种于质量分数0.1%明胶包被的培养皿中进行传代。将形成的小神经球样NSCs集落用自制玻璃吸管移到鼠尾胶原包被的96孔板中,每孔3~4个,用含体积分数5% NBS的DMEM/F12诱导分化培养3 d左右,用质量浓度40 g/L多聚甲醛固定,按照免疫组化试剂盒说明,用Nestin(体积比1:200倍稀释)、β-Tubulin(体积比1:500倍稀释)和GFAP(体积比1:200倍稀释)鉴定NSCs及其分化的神经元和星型胶质细胞。

### 1.4 大鼠胎儿NSCs生长曲线的绘制

将来自单克隆的大鼠胎儿NSCs消化成单细胞,并以单克隆密度(12-孔培养板, $1 \times 10^3 \text{ mL}^{-1}$ )接种于96孔板培养。终止培养前4 h每孔加入MTT溶液20 μL(MTT最终质量浓度为1 mg/mL),吸出溶液,加入溶解液DMSO 200 μL使得产物充分溶解,在酶标仪上测定各孔的OD值(波长590 nm,参比波长630 nm)。

### 1.5 大鼠胎儿NSCs的诱导分化及免疫组化鉴定

将经过鉴定的来自单克隆的大鼠胎儿NSCs小神经球样集落用自制的玻璃管接种到鼠尾胶原包被的96孔板中,每孔2~3个,分别用含10, 50和100 ng/mL的NGF、BDNF和GDNF培养液诱导培养3~4 d。终止诱导培养后,用PBS洗一次,40 g/L多聚甲醛固定,进行免疫组化染色鉴定。

## 2 结果与分析

### 2.1 大鼠胎儿NSCs的培养特性

来源于大鼠胎儿脊髓组织的原代细胞培养2~3 d时,可观察到由十几个到几十个细胞聚集形成的球形集落(图1A),继续培养,细胞球会进一步增大;在原代培养中也有时候也有小部分细胞呈半贴壁生长,未贴壁的神神经球体部分隆起较高;继续培养,小部分贴壁的细胞球便会一边增大一边分化(图1

B)。分化的神经元和胶质细胞以细胞球为中心成辐射状分布,最后相互交织形成特有的神经细胞网状结构(图 1 C)。

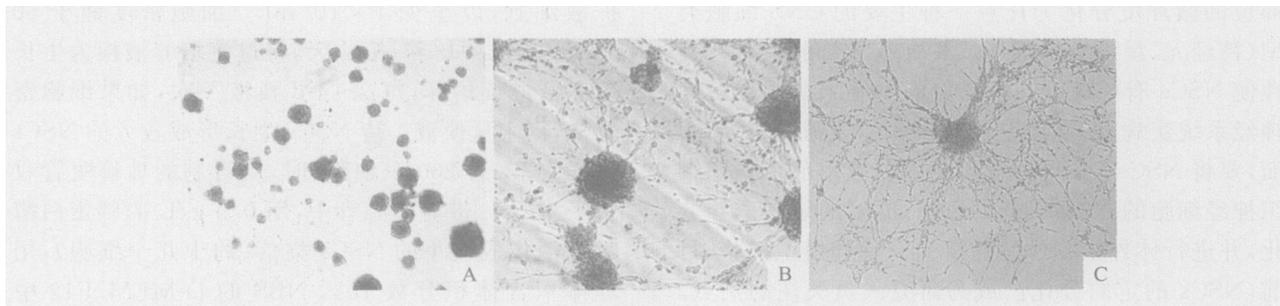


图 1 大鼠胎儿 NSCs 培养特性

A. 原代细胞聚集形成的神经球(50×);B. 部分贴壁生长的神经球(100×);C. 神经细胞网状结构(50×)

Fig 1 NSCs of rat culturing characteristics

A. original cells congregate into neural spheres(50×); B. part of NSCs adhering the wall (100×); C. NSCs form reticulate structure(50×)

### 2.2 大鼠胎儿 NSCs 的多能性

血清诱导培养时, NSCs 可自发分化为神经系统中主要的神经细胞类型,如神经元和胶质细胞等。添加体积分数 5% NBS 诱导液诱导时,神经球贴壁迁移较快,在接种 24 h 左右就可观察到贴壁的神经

球细胞开始伸出突起;第 3 天便可看到神经球大部分细胞已分化为神经系统中的神经元、少突胶质细胞和星形胶质细胞等(图 2 A);大鼠胎儿 NSCs(图 2 B)及其分化的神经元(图 2 C)和星型胶质细胞(图 2 D)免疫细胞化学染色均呈褐色,判为阳性。

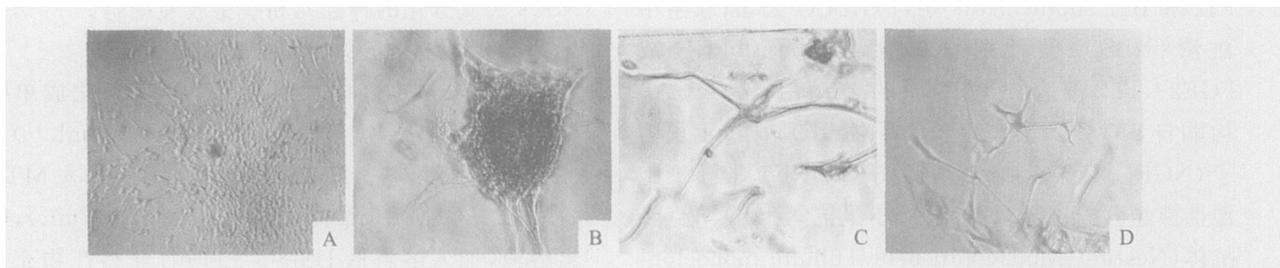


图 2 大鼠 NSCs 生物学特性鉴定结果

A. NSCs 血清诱导 72 h(100×);B. Nestin 阳性 NSCs(100×);C. 分化的  $\beta$ Tubulin 阳性神经元(200×); D. GFAP 阳性神经胶质细胞(200×)

Fig 2 Identification of rat NSCs characteristic

A. NSCs induced by NBS for 72 h(100×);B. NSCs staining is Nestin positive (100×); C. differentiated neurons staining is  $\beta$ Tubulin positive(200×);D. differentiated astroglial staining is GFAP positive (200×)

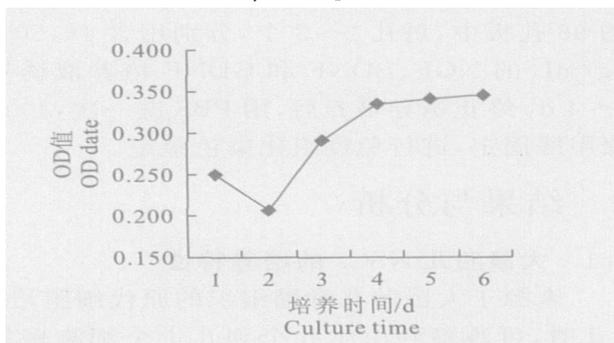


图 3 大鼠胎儿 NSCs 的生长曲线

Fig 3 Neural stem cells growth curve

### 2.3 大鼠胎儿 NSCs 的生长曲线

由图 3 可以看出,在第 2 天细胞有部分死亡,在

第 4~ 5 天,细胞生长达到指数生长期,此时应该及时地进行换液或传代。

### 2.4 大鼠胎儿 NSCs 的诱导分化及免疫组化鉴定结果

2.4.1 诱导分化 分别在含有 100 ng/mL 细胞因子 NGF、BDNF 和 GDNF 的培养液中诱导 24 h 后,贴壁的神经球周围开始有各种不同形态的细胞向外迁移,随着时间的延长,细胞不断向神经球外周迁移;48~ 72 h 后,添加 NGF 和 BDNF 的诱导培养液中, NSCs 主要分化为神经元(图 4 A、B),而在添加 GDNF 的诱导培养液中, NSCs 主要分化为少突胶质细胞(图 4 C)。在添加 10 和 50 ng/mL NGF、BDNF 和 GDNF 溶液中,大鼠胎儿 NSCs 的分化特征不

明显。结果表明,NGF、BDNF 和 GDNF 对体外培养的大鼠胎儿NSCs 均有不同程度的诱导分化作用。

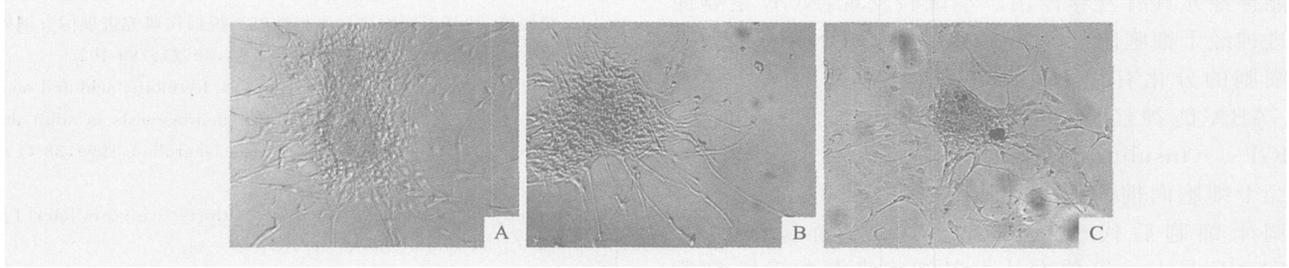


图4 不同细胞因子诱导分化的大鼠胎儿NSCs( $\times 100$ )

A. 100 ng/mL NGF 诱导 72 h 的大鼠胎儿NSCs; B. 100 ng/mL BDNF 诱导 72 h 的大鼠胎儿NSCs; C. 100 ng/mL GDNF 诱导 72 h 的大鼠胎儿NSCs

Fig. 4 Differentiation of rat fetal NSCs in the different cytokines ( $\times 100$ )

A. NSCs induced by 100 ng/mL NGF for 72 h; B. NSCs induced by 100 ng/mL NGF for 72 h; C. NSCs induced by 100 ng/mL NGF for 72 h

2.4.2 免疫组化鉴定 在添加有不同细胞因子的无血清培养液中,NSCs 的分化方向受高浓度细胞因子的影响。在添加 100 ng/mL NGF 和 BDNF 的无血清培养液中,NSCs  $\beta$ Tublin 染色呈阳性,表明

其主要向神经元分化(图 5 A, B); 而在添加 100 ng/mL GDNF 的培养液中 NSCs GFAP 染色呈阳性,表明其主要向胶质细胞分化(图 5 C)。

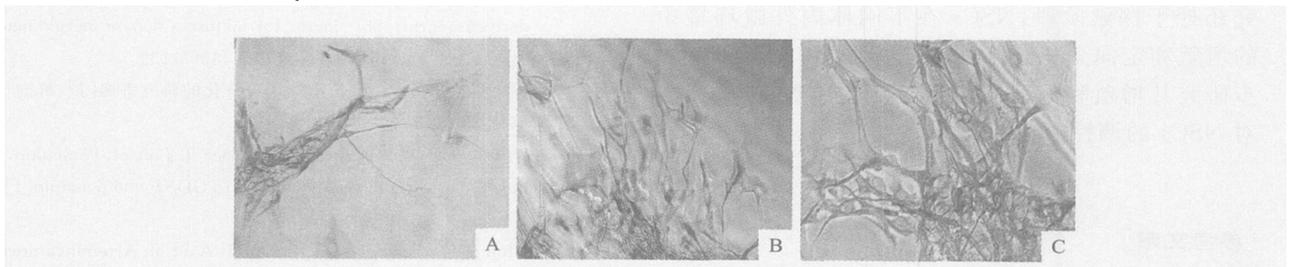


图5 不同细胞因子诱导分化大鼠NSCs 鉴定结果( $\times 200$ )

A. NGF 诱导的 NSCs,  $\beta$ Tublin 染色呈阳性; B. BDNF 诱导的 NSCs,  $\beta$ Tublin 染色呈阳性; C. GDNF 诱导的 NSCs, GFAP 染色呈阳性

Fig. 5 Identification of rat NSCs differentiation in different cytokines ( $\times 200$ )

A. NSCs induced by NGF and  $\beta$ Tublin staining positive; B. NSCs induced by BDNF and  $\beta$ Tublin staining positive; C. NSCs induced by GDNF and GFAP staining positive

### 3 讨论

神经干细胞的分化是目前神经学科研究的一个重要方面,在不同因子、不同微环境条件下其分化方向也不同<sup>[2]</sup>。NSCs 的生存微环境决定了干细胞分化的命运,同一起来源的 NSCs 移植到不同的分化部位其分化结果也不相同,但均与接受移植部位的细胞相似<sup>[3]</sup>,其最终分化命运决定于其所在部位的壁龛<sup>[4]</sup>,在体外培养条件下则取决于培养液的组分。在 NSCs 分化过程中,因子类物质起着很重要的作用。

有研究表明,EGF 和 bFGF 是神经干细胞增殖的丝裂原,由于它们的存在,神经干细胞得以不断的更新增殖,去除丝裂原后则神经干细胞进入自行分

化阶段<sup>[5]</sup>。所以本试验在培养液中添加了较高浓度的 EGF 和 bFGF (20 ng/mL),以利于神经干细胞增殖。本试验发现,NGF、BDNF 和 GDNF 在 10 和 50 ng/mL 时,对神经干细胞体外短期内的诱导分化效果不明显,但当其质量浓度增大为 100 ng/mL 时,则对神经干细胞有一定的诱导作用。NGF 是最早被纯化并确定了分子结构的典型细胞因子,兼有神经元营养因子(Neuro trophic factors, NTFs)和促进神经突起生长因子(Neurite promoting factors, NPFs)双重作用<sup>[6]</sup>。NGF 是神经系统中重要的生物活性物质之一,对神经系统的正常发育及促进再生等方面均有重要的生物学作用,可诱导 NSCs 向胆碱能神经元分化<sup>[7-8]</sup>,还可促进新生动物中枢胆碱能

神经元的发育成熟<sup>[9-10]</sup>,并对交感、感觉及中枢胆碱能神经元具有营养作用。本试验发现,NGF 主要促进神经干细胞向神经元方向分化。BDNF 对神经干细胞的分化有促进作用,可使神经干细胞分化为 GABA 能神经元的比例达 70%<sup>[11]</sup>,加入 BDNF、IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) 主要诱导神经干细胞向神经元方向分化,其机理可能是通过上调干细胞后代中转录因子 Bm-4 而起作用<sup>[6]</sup>。GDNF 是 Lin 等首次从大鼠细胞来源的 B49 细胞株的条件培养基中分离纯化得到的<sup>[12]</sup>,目前对其诱导分化作用结果报道不一。有研究表明,GDNF 对多巴胺能神经元有特异性营养作用,能促进体内外多巴胺能神经元分化,使神经元胞体增大、轴突延长<sup>[13-14]</sup>。但也有文献报道,GDNF 主要诱导 NSCs 向神经胶质细胞和少突胶质细胞分化<sup>[15]</sup>。本试验发现,高浓度的 GDNF 可诱导神经干细胞向神经胶质细胞方向分化。

目前,对 NSCs 的定向分化及干细胞可塑性研究还处于探索阶段,NSCs 在不同体内外微环境中的增殖和定向分化还不能完全控制,还有待于进一步研究其增殖和分化的信号激活途径等,进而实现对 NSCs 的调控。

### [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: 1707-1710
- [2] Brannen C L, Sugaya S O. *In vitro* differentiation of multipotent human neural progenitors in serum-free medium [J]. *Neuroreport*, 2000, 11(5): 1123-1128
- [3] Meltzer H, Hatton J D, Sang U H. Cell type-specific development of rodent central nervous system progenitor cells in culture [J]. *J NeuroSurg*, 1998, 88(1): 93-98
- [4] 曹锐峰. 神经干细胞修复中枢神经系统损伤研究进展 [J]. *国外医学神经病学神经外科学分册*, 2003, 30(2): 189-192
- [5] Takahashi T, Palmer T D, Gage F H. Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult derived neural stem cell cultures [J]. *J Neurobiol*, 1999, 38(1): 65-81.
- [6] Levi M R. The nerve growth factor thirty five years later [J]. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1987, 23: 227-238
- [7] Reilly J O, Karavanova I D, Williams K P, et al. Cooperative effect of Sonic Hedgehog and NGF on basal forebrain cholinergic neurons [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2002, 19: 88-96
- [8] Hayashi M, Yamashita A, Shimizu K. Expression of the gene for nerve growth factor (NGF) in the monkey central nervous system [J]. *Brain Res*, 1993, 618: 142-148
- [9] 刘佳梅, 陈东, 孟晓婷. 神经生长因子诱导神经干细胞向胆碱能神经元的分化 [J]. *神经解剖学杂志*, 2005, 21(6): 603-606
- [10] Biciari-Abejón C, Collin C, Tsoulfas P, et al. Hippocampal stem cells differentiate into excitatory and inhibitory neurons [J]. *Eur J Neurosci*, 2000, 12(2): 677-688
- [11] Lin L F, Doherty D H, Lile J D, et al. GDNF: A glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons [J]. *Science*, 1993, 260(511): 1130-1132
- [12] 纪家武, 王玮. 神经干细胞诱导分化的研究进展 [J]. *解剖与临床*, 2004, 9(4): 286-288
- [13] Milbrandt J, Desauvage F J, Fahrner T J, et al. Persephin, a novel neurotrophic factor related to GDNF and neurturin [J]. *Neuron*, 1998, 20: 245-263
- [14] Baloh R H, Tansaey M G, Lampe P A, et al. Artemin, a novel member of the GDNF ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GFR $\alpha$ 3RET receptor complex [J]. *Neuron*, 1998, 21: 1291-1302
- [15] Bjorklund A, Lindvall O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders [J]. *Nat Neurosci*, 2000, 3: 537-544

### (上接第 19 页)

- [4] 朱邦武. 渭源县南部“羊瞎眼病”调查 [J]. *甘肃畜牧兽医*, 1992, 22(2): 14
- [5] 陈宗繁, 索兴峰, 尹凤琴, 等. 绒山羊萱草根中毒的调查 [J]. *中国兽医科技*, 2003, 33(1): 65-66
- [6] 金锋. 耕牛萱草根中毒病例报告 [J]. *中国兽医杂志*, 1992, 18(7): 33
- [7] 杨禄明, 卢旺银, 李世恩, 等. 甘肃省庆阳市犊牛瞎眼病的调查与预防 [J]. *中国兽医科技*, 2003, 33(9): 26-28
- [8] 赵英, 赵娟. 超大剂量服用萱草根致双目失明死亡案 [J]. *山东中医杂志*, 2000, 19(9): 564
- [9] 王建华. 萱草根素的定性检验-薄层层析法 [J]. *西北农学院学报*, 1983, 11(3): 110-117
- [10] 王建华. 不同种萱草根的毒性研究 [D]. 陕西杨陵: 西北农学院, 1981.
- [11] 王建华. 萱草属不同种植物根的研究 [J]. *西北农学院学报*, 1982, 10(2): 89-103
- [12] 王建华, Barlow R M. 萱草根素的毒性及结构再鉴定 [J]. *动物毒物学*, 1991, 6(2): 9-12