

多聚赖氨酸和明胶对神经干细胞增殖和分化的影响*

孙黎¹, 张力², 胡晓峰³, 张辉², 罗强¹, 王新生¹, 朱登祥¹, 薄爱华¹

Effect of polylysine and gelatin on proliferation and differentiation of neural stem cells

Sun Li¹, Zhang Li², Hu Xiao-feng³, Zhang Hui², Luo Qiang¹, Wang Xin-sheng¹, Zhu Deng-xiang¹, Bo Ai-hua¹

Abstract

BACKGROUND: Currently, there are plenty of the investigations regarding the induced differentiation of neural stem cells (NSCs) *in vitro*, but the process of differentiation is difficult to control, many methods are complicated to operate, and the proportions of differentiation are very low.

OBJECTIVE: To discuss *in vitro* cultivation of rat embryonic forebrain NSCs and to observe the differentiation rule of NSCs.

METHODS: The forebrains were isolated from fetal rats under aseptic conditions, to prepare monocell suspension, and cultured with DMEM/F₁₂ medium containing N₂ at the density of 1×10¹¹/L. In the process of cultivating, BrdU was added to mark NSC spheres. The induced differentiation experiment was divided into three groups: polylysine culture plate, gelatin plate and no plate culture groups. 20% volume fraction of embryonic bovine serum was used to stimulate the differentiation. Immunohistochemistry method was applied to detect the level of nestin and BrdU, as well as NSCs differentiation into nerve cells in the serum induction.

RESULTS AND CONCLUSION: The cells presented the NSC-like growth and continuous proliferative capacity, they can subculture. Nestin and BrdU were both positive in passaged neurospheres. The inducing differentiation effect of the polylysine culture plate group and the gelatin plate group was greater than no plate culture group ($P < 0.01$), and the polylysine culture plate group had a little higher percentage of neurons differentiating than the gelatin plate group ($P > 0.05$). The result of immunohistochemistry was glial fibrillary acidic protein-positive and microtubule-associated protein-2-positive. Rat embryonic forebrain is full of NSCs. The polylysine and the gelatin as cells holder in inducing NSCs differentiation can improve NSCs differentiation and mostly differentiate into the astrocytes through differentiation observation.

Sun L, Zhang L, Hu XF, Zhang H, Luo Q, Wang XS, Zhu DX, Bo AH. Effect of polylysine and gelatin on proliferation and differentiation of neural stem cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(47): 8755-8758. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 目前大鼠神经干细胞体外诱导分化的研究报道诸多,但其分化过程很难控制,很多实验的操作方法复杂,分化比率也很低。

目的: 探索大鼠胚胎前脑神经干细胞体外原代及传代培养方法,并观察其分化规律。

方法: 胎鼠在无菌条件下分离出前脑,制备单细胞悬液,以 1×10¹¹L⁻¹ 接种于含 N₂ 的 DMEM/F₁₂ 培养基中培养,传代培养过程中加入 BrdU,标记神经干细胞球。诱导分化实验分为多聚赖氨酸铺板组、明胶铺板组和无铺板组。采用体积分数 20% 胎牛血清刺激其分化。免疫细胞化学检测 nestin、BrdU 及在血清诱导条件下神经干细胞向神经细胞分化的能力。

结果与结论: 细胞呈神经干细胞样生长,具有连续增殖能力,可以传代培养。传代神经球中的细胞均呈 nestin 阳性和 BrdU 阳性。多聚赖氨酸铺板组和明胶铺板组贴壁后分化为神经细胞能力强于无铺板组 ($P < 0.01$)。多聚赖氨酸铺板组略强于明胶铺板组 ($P > 0.05$)。神经谱系标记物神经胶质纤维酸性蛋白和微管相关蛋白 2 的免疫细胞化学结果均阳性。结果表明,大鼠胚胎前脑富含神经干细胞,其分化观察,多聚赖氨酸和明胶在诱导神经干细胞分化中作为细胞贴壁支持物提高分化细胞数量的作用,且多分化为星形胶质细胞。

关键词: 多聚赖氨酸;神经干细胞;明胶;增殖分化;体外培养

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.47.004

孙黎, 张力, 胡晓峰, 张辉, 罗强, 王新生, 朱登祥, 薄爱华. 多聚赖氨酸和明胶对神经干细胞增殖和分化的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(47):8755-8758. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

神经干细胞的发现,使人们对神经系统的发生、再生以及神经系统疾病治疗有了新的认识,为神经系统疾病治疗开拓了新的前景^[1-4]。在适宜的体外培养条件下,从胚胎和成年动物包括人的中枢神经系统培养得到的神经干细胞可以分化成神经胶质细胞和各种类型的神经元。神经干细胞存在固有的增殖分化规律,类

似于胚胎中枢神经系统自然发育过程,培养方法的改进和细胞因子的刺激只能部分影响神经干细胞的成熟过程^[5]。本课题利用无血清培养技术,在含N₂的DMEM/F₁₂培养基中加入表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)培养胎鼠前脑组织,将得到的神经干细胞,以多聚赖氨酸铺板或明胶铺板,胎牛血清刺激,观察分化规律,为深入研究神经干细胞的特性及分化机制提供基础。

¹Experimental Center,
²Department of Human Anatomy, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China;
³Department of General Surgery, First Affiliated Hospital, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China

Sun Li, Senior experimentalist, Experimental Center, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China sunli11011@yahoo.com.cn

Correspondence to: Zhang Hui, Master, Professor, Master's supervisor, Department of Human Anatomy, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China zhanghui6312@126.com

Supported by a grant by Hebei Provincial Education Bureau, No. 2007304*

Received: 2010-08-08 Accepted: 2010-10-16

河北北方学院,
1 实验中心, 2 人体
解剖学教研室,
3 附属第一医院普
通外科, 河北省张
家口市 075000

孙黎, 女, 1960
年生, 河北省徐水
县人, 汉族, 2000
年张家口医学院
毕业, 高级实验
师, 主要从事细胞
生物学研究。
sunli11011@
yahoo.com.cn

通讯作者: 张辉,
硕士, 教授, 硕士
生导师, 河北北方
学院人体解剖学
教研室, 河北省张
家口市 075000
zhanghui6312@
126.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225
(2010)47-08755-04

收稿日期: 2010-08-08
修回日期: 2010-10-16
(20100208007/W·Y)

1 材料和方法

设计: 单一样本观察。

时间及地点: 实验于2008-05/2009-10在河北北方学院实验中心完成。

材料: 清洁级Wistar孕16 d鼠2只, 由中国医学科学院实验动物研究所提供, 动物质量许可证编号: SCXK(京)2005-0013。实验过程中对动物处置符合2006年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》^[6]。

试剂:

试剂	来源
DMEM/F12(1:1)培养基、 N ₂ 无血清添加剂、胎牛血清	Gibco 公司
EGF、bFGF、poly-l-lysine、 青链双抗、兔抗鼠多克隆 nestin 抗体、BrdU、小鼠抗 大鼠 BrdU 单克隆抗体、 兔抗鼠神经胶质纤维酸性蛋白 多克隆抗体、小鼠抗大鼠微管 相关蛋白 2 单克隆抗体	Sigma 公司
明胶、SABC 试剂盒和 DAB 显色试剂盒	武汉博士德 生物工程公司

实验方法:

细胞培养^[7]: 取16 d Wistar胎鼠在无菌条件下取脑, 分离出前脑, 制成单细胞悬液。接种于盛有5 mL含N₂的DMEM/F₁₂培养基的50 mL培养瓶中, 接种密度为1×10¹¹ L⁻¹, 加EGF(终浓度为20 μg/L)和bFGF(终浓度为10 μg/L)。待原代克隆形成后机械分离成单细胞悬液, 按上述条件继续培养。以后每两三天半量换液, 5~7 d分离传代1次。

nestin抗原免疫细胞化学鉴定: 取部分神经球和单细胞悬液, 离心后直接涂片检测或者均匀地接种到预先置有涂布多聚赖氨酸盖玻片的6孔培养板中, 并加入含有体积分数20%胎牛血清的DMEM/F₁₂培养基, 孵育2 h后行nestin免疫细胞化学鉴定。

BrdU标记及其检测^[8]: 将BrdU加入传代培养的细胞培养基中, 终浓度为6 mg/L, 同时加入EGF(终浓度为20 μg/L)和bFGF(终浓度为10 μg/L), 按上述条件继续培养5 d。新克隆形成后, 将神经球均匀地接种到预先置放涂有多聚赖氨酸盖玻片的6孔培养板中, 待神经球贴壁2 h后行免疫细胞化学鉴定。

制板与诱导分化实验分组:

诱导分化实验分组: 多聚赖氨酸铺板组、

明胶铺板组和无铺板组。取5 mg的poly-l-lysine加入50 mL PBS液, 即为100 mg/L的储备液-20 ℃保存, 用时4倍稀释配制25 mg/L的多聚赖氨酸溶液。取0.2 g明胶溶于100 mL三蒸水中消毒灭菌, 配制成2 g/L明胶。两种溶液分别均匀铺板。方法: 用加样器将24孔板中加入100 μL, 水平振荡板底, 使平铺于各孔, 静置于室温超净工作台, 紫外照射6 h。接种细胞前D-Hanks液冲洗3次。加入含有体积分数20%FBS的培养液, 37 ℃, 体积分数5%CO₂饱和湿度培养箱中孵育4 h后使用。无铺板组只加入含有体积分数20%FBS的培养液, 37 ℃, 体积分数5%CO₂饱和湿度培养箱孵育4 h使用。

神经细胞免疫细胞化学检测: 取克隆细胞球, 制成单细胞悬液, 接种到预先置放涂有浓度为25 mg/L的多聚赖氨酸盖玻片的24孔培养板中, 并加入含有体积分数20%胎牛血清的DMEM/F₁₂培养基, 动态观察10 d神经干细胞分化情况及形态学变化。按上述条件继续培养10 d后行神经胶质纤维酸性蛋白和微管相关蛋白2免疫细胞化学检测。明胶铺板组同此方法操作。

主要观察指标: ①细胞培养结果。②nestin抗原的表达。③BrdU标记及检测结果。④诱导分化结果。⑤免疫细胞化学检测结果。

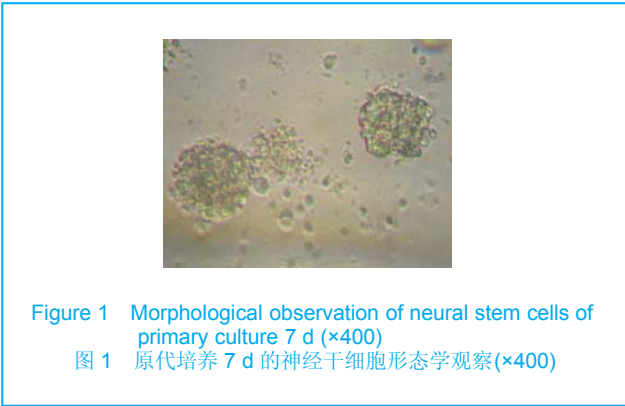
设计、实施、评估者: 实验由第一、四作者设计, 第二、三、五、七作者实施, 第六、八作者进行结果评估, 均经过系统培训, 未使用盲法评估。

统计学分析: 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用SPSS 11.0统计软件进行t检验, 以P < 0.05表示差异有显著性意义, P < 0.01表示差异有非常显著性意义。

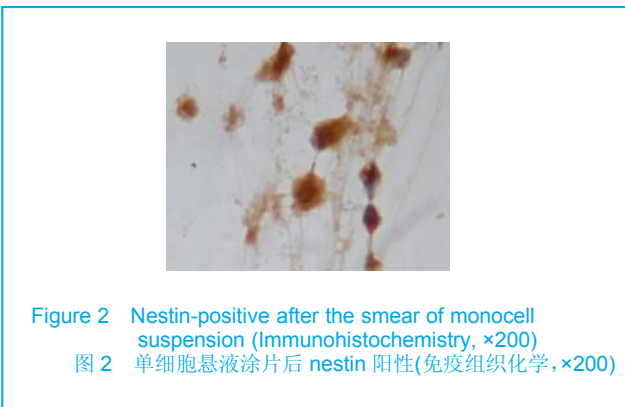
2 结果

2.1 细胞培养结果 原代培养的前脑细胞成透亮的圆球形, 悬浮生长, 细胞形态规则, 边界清楚, 体积较小, 折光性较强, 胞浆颜色较深, 核/浆比值大, 1周左右培养瓶中出现有许多由数十到数百个细胞组成的呈悬浮生长的细胞球。

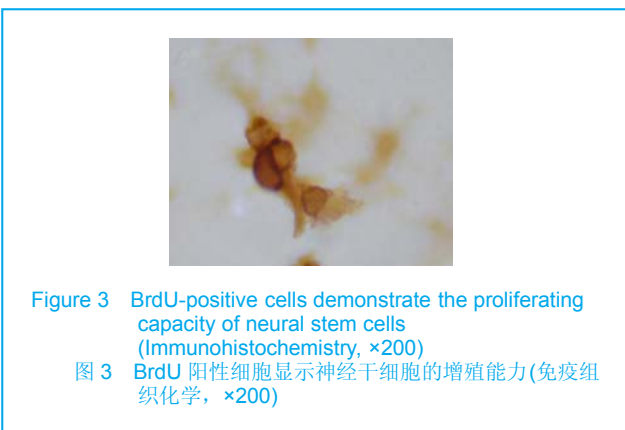
传代的神经干细胞培养出现与原代培养相同的克隆细胞球, 细胞形态不变, 见图1。传代后, 加入血清分化10 d, 有突起从贴壁细胞缘团边长出, 并铺展开来。



2.2 nestin抗原的表达 直接涂片检测的神经球未发现有突起从细胞团边缘长出, 其形态保持完好。贴附于盖玻片上的神经球2 h后发现有突起从细胞团边缘长出, 发现传代的神经球中的细胞均呈现nestin阳性, 表明培养得到的神经球中的细胞具有胚胎源性。见图2。

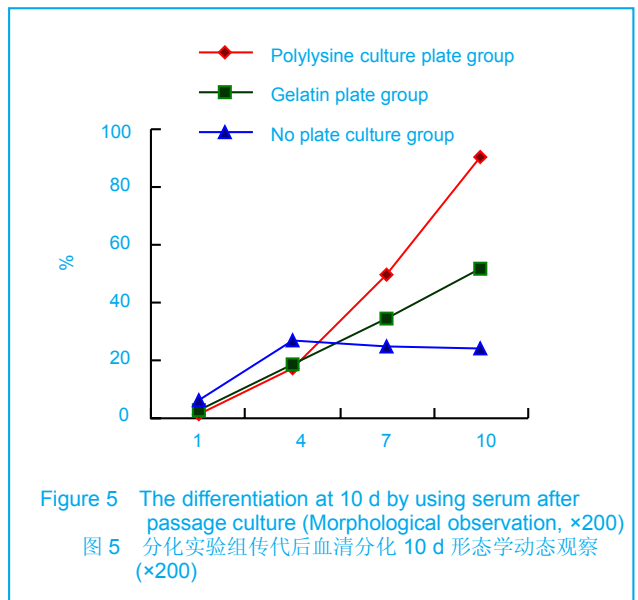
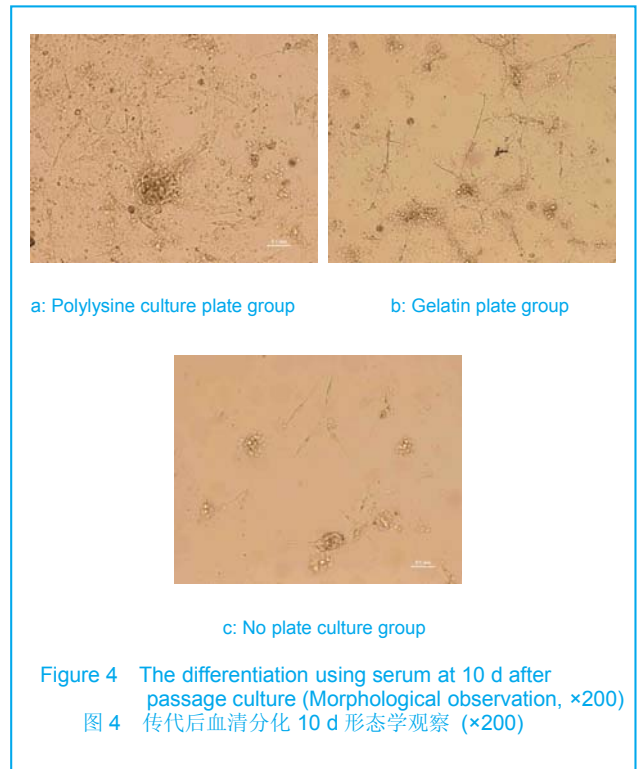


2.3 BrdU标记及检测结果 加入BrdU 5 d后可见新的克隆球已经形成, 之后将神经球均匀地接种到预先置放涂有多聚赖氨酸盖玻片的6孔培养板中。待克隆球贴壁后, 免疫组织化学显示新形成克隆球中的细胞均为BrdU阳性, 表明克隆球具有不断分裂增殖的生物学特性。见图3。

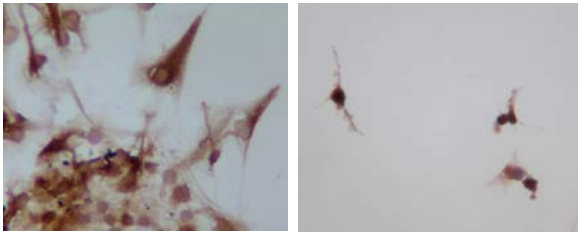


2.4 诱导分化结果 细胞贴壁后形态变为不规则, 部

分细胞长出突起; 有的突起相互交织成网状, 建立起形态上的联系。多聚赖氨酸铺板组和明胶铺板组贴壁后分化为神经元及神经胶质细胞能力强于无铺板组 ($P < 0.01$)。多聚赖氨酸铺板组略强于明胶铺板组 ($P > 0.05$)。见图4, 5。



2.5 免疫细胞化学检测结果 在从培养基中除去EGF和bFGF之后, 加入FBS进行有血清培养的条件下, 神经干细胞能分化出神经元或神经胶质细胞。免疫组织化学及免疫荧光检测显示细胞分化后呈神经胶质纤维酸性蛋白、微管相关蛋白2阳性反应, 胞浆被染成棕黄色, 经苏木精复染, 细胞核染成蓝紫色。见图6。



a: Glial fibrillary acidic protein b: Microtubule-associated protein-2

Figure 6 The differentiation of neural stem cells *in vitro* (Immunohistochemistry, ×400)
图6 体外诱导后神经干细胞的分化(免疫组织化学, ×400)

3 讨论

实验结果表明,从胎鼠分离培养出的神经干细胞在无血清培养条件下,由EGF和bFGF刺激后,这种神经干细胞能不断分裂增殖,形成神经球;在同样条件下,能不断传代形成新的神经球。

在体外贴壁分化过程中nestin的表达越来越少,出现了神经元的标志性蛋白——星形胶质细胞特征性蛋白—神经胶质纤维酸性蛋白和微管相关蛋白2。免疫组织化学结果与免疫荧光结果均为阳性。证明了培养得到的细胞具有较强的增殖能力,而且具有多向分化潜能,能够分化为神经元和胶质细胞。

中间丝蛋白nestin已作为神经干细胞的特征性生物学标志被广泛应用于神经干细胞的鉴定^[9]。作者在神经干细胞生长的稳定增殖期,即原代培养或传代培养的7~10 d,获取神经干细胞克隆球,对克隆球和贴壁分化的细胞进行免疫组织化学及荧光染色,细胞球均为nestin阳性。表明本实验中培养得到的细胞为神经干细胞。

多分化潜能是神经干细胞的一个基本属性,在从培养基中除去EGF和bFGF之后,加入FBS进行有血清培养的条件下,神经干细胞能分化出神经元或神经胶质细胞。

最新研究发现胶质细胞除作为神经元赖以生存的“土壤”,给神经元提供营养代谢支持外,还在癫痫、脑外伤、脑缺血和Alzheimer病等神经系统疾病的发病过程中起着至关重要的作用^[10-15]。本实验中观察到在有多聚赖氨酸和明胶的培养板上贴壁生长的细胞生长速度先慢后快,多聚赖氨酸铺板组和明胶铺板组贴壁后分化为神经元及神经胶质细胞能力强于无铺板组($P < 0.01$)。多聚赖氨酸铺板组略强于明胶铺板组($P > 0.05$)。细胞之间结合紧密,说明贴壁状态下加入多聚赖氨酸、明胶能够促进神经干细胞增殖。观察培养10 d的干细胞球分化,发现多聚赖氨酸能够诱导神经干细胞分化且多为星形胶质细胞。神经干细胞取材时和神经球传代时,都需要将聚集在一起的细胞分散。很多报道采用酶消化法分散细胞团,本实验经过反复实验比较发现,酶消化短时间无法使细胞团完全分散,延

长消化时间却使细胞粘连成索状(DNA释出所致)或大量死亡。本实验用巴氏吸管反复机械吹打(10~20次),手法尽量轻柔,并采用400目细胞筛网过滤,神经干细胞生长良好,经传代后仍具有增殖和分化能力。

4 参考文献

- [1] Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 1992;255(5052):1707-1710.
- [2] Bacigaluppi M, Pluchino S, Martino G, et al. Neural stem/precursor cells for the treatment of ischemic stroke. *J Neurol Sci*. 2008;265(1-2):73-77.
- [3] Takagi N. Pathology and strategies for the treatment of ischemic brain injury. *Yakugaku Zasshi*. 2009;129(10):1215-1219.
- [4] Nakayama D, Matsuyama T, Ishibashi-Ueda H, et al. Injury-induced neural stem/progenitor cells in post-stroke human cerebral cortex. *Eur J Neurosci*. 2010;31(1):90-98.
- [5] Garavaglia A, Moiana A, Camnasio S, et al. Adaptation of NS cells growth and differentiation to high-throughput screening-compatible plates. *BMC Neurosci*. 2010;11(1):7.
- [6] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30. 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [7] Rietze RL, Reynolds BA. Neural stem cell isolation and characterization. *Methods Enzymol*. 2006;419(1):3-23.
- [8] Knobloch J, Kunz W, Grevelding CG. Quantification of DNA synthesis in multicellular organisms by a combined DAPI and BrdU technique. *Dev Growth Differ*. 2002;44(6):559-563.
- [9] Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*. 1990;60(4):585-595.
- [10] Aschuer M, Sonnewald U, Tan KH. A astrocyte modulation of neurotoxic injury. *Brain Pathol*. 2002;12: 475-481.
- [11] Swanson RA, Ying W, Kauppinen TM. A astrocyte influences on ischemic neuronal death. *Curr Mol Med*. 2004;4: 193-205.
- [12] Nagai M, Re DB, Nagata T, et al. A astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD 1 releases factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci*. 2007;10:625-622.
- [13] Giaume C, Kirchhoff F, Matute C, et al. Glia the fulcrum of brain diseases. *Cell Death Differ*. 2007;14:1324-1335.
- [14] Tejina E, Zhao BQ, Tsuji K, et al. A astrocytic induction of matrix metalloproteinase-9 and edema in brain hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007;27:460-468.
- [15] Maragakis NJ, Rothstein JD. Mechanisms of Disease astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol*. 2006;2:679-681.

来自本文课题的更多信息—

基金资助: 课题为河北省教育厅资助课题(2007304), 课题名称: 胚胎神经干细胞修复脑损伤的实验研究。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的创新点: 实验分离培养了胎鼠前脑神经干细胞, 证实其具有自我更新和多分化潜能, 多聚赖氨酸和明胶在诱导神经干细胞分化中作为细胞贴壁支持物提高分化细胞数量的作用, 且多为星形胶质细胞。

课题评估的“金标准”: 检测神经干细胞在体外的存活、增殖和分化时, 分别采用 nestin, BrdU, 神经胶质纤维酸性蛋白, 微管相关蛋白 2 免疫组织化学。

设计或课题的偏倚与不足: 细胞在体外培养条件下增殖分化良好, 植入后受体体内微环境、内源性诱导因子等作用, 其增殖、迁移、分化状况难以准确分析。拟在后续实验中检测其分化为神经元的细胞, 分析其分化潜能, 并进一步观察基因表达情况。

提供临床借鉴的价值: 实验为深入研究神经干细胞的特性及分化机制提供基础。