

人少突胶质前体细胞在不同细胞培养器皿中的比例和形态特征

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.2139>

2095-4344.2139

投稿日期: 2020-01-02

送审日期: 2020-01-07

采用日期: 2020-02-26

在线日期: 2020-05-15

中图分类号:

R459.9; R394.2; R741

文章编号:

2095-4344(2021)01-00044-06

文献标识码: B

叶豆^{1,2}, 马雪霞², 管倩^{1,2}, 栾佐², 杨印祥², 汪兆艳², 王倩², 何滢², 姚瑞芹¹

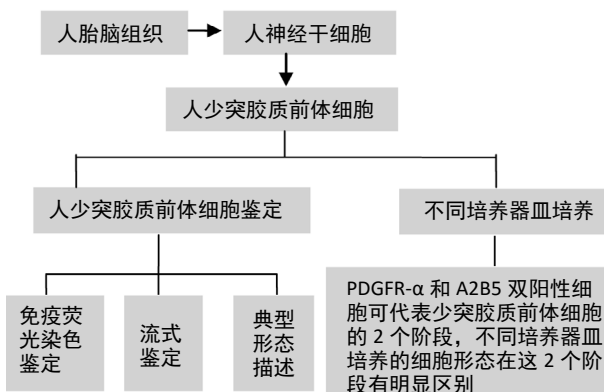
文章快速阅读:

文章特点—

△ 研究对象为人胎脑来源神经干细胞系诱导培养形成的少突胶质前体细胞;

△ 光学显微镜下区分少突胶质前体细胞和前少突胶质细胞形态;

△ 通过不同的培养器皿培养少突谱系细胞, 发现6孔板中少突胶质前体细胞比例最高, 24孔板中前少突胶质细胞比例最高, 肯定了6孔板在少突胶质前体细胞培养过程中的地位。



文题释义:

少突胶质前体细胞: 沿血管迁移, 广泛分布于中枢神经系统。中枢神经系统的髓鞘形成依赖少突胶质前体细胞的产生和分化为成熟的少突胶质细胞包绕轴突, 可用于治疗由脱髓鞘引起脑白质损伤的神经系统疾病。

前-少突胶质细胞: 早产儿脑白质损伤的关键靶细胞, 对缺氧缺血、自由基损伤、兴奋性氨基酸毒性和炎症因子高度敏感。前-少突胶质细胞受损, 进而发生坏死和凋亡, 导致成熟少突胶质细胞成熟障碍, 最终造成髓鞘化过程受损而形成脱髓鞘疾病。

摘要

背景: 少突胶质前体细胞移植是治疗早产儿脑白质损伤的关键措施之一, 目前国内外缺乏人胎脑来源神经干细胞诱导的少突胶质前体细胞在不同器皿中培养比较的研究。

目的: 观察不同细胞培养器皿(6孔板、24孔板和T25培养瓶)对人胎脑来源神经干细胞系诱导培养的人少突胶质前体细胞和前-少突胶质细胞形态的影响。

方法: 采用6孔板、24孔板和T25培养瓶作为培养器皿培养人少突胶质前体细胞和前-少突胶质细胞, 免疫荧光染色和流式细胞术对人少突胶质前体细胞的特性进行鉴定, 普通光学显微镜观察细胞形态, 依据细胞形态进行计数并统计分析。

结果与结论: ①少突胶质前体细胞胞体呈圆形, 双极突起呈串珠样结构; 前-少突胶质细胞突起多于2极但不分叉; ②与T25培养瓶、24孔板相比, 6孔板中双极串珠样的少突胶质前体细胞比例最高, 差异有显著性意义($P < 0.05$), 其次依次为T25培养瓶、24孔板; 与T25培养瓶、6孔板相比, 24孔板中前-少突胶质细胞的比例最高, 差异有显著性意义($P < 0.01$), 其次依次为T25培养瓶、6孔板; ③6孔板中培养的细胞渣滓少, 形态、活力和长势比其他培养皿更佳; ④从形态学角度分析, 6孔板更适宜于少突胶质前体细胞的生长, 24孔板更适宜于前-少突胶质细胞的生长。

关键词: 干细胞; 少突胶质前体细胞; 前-少突胶质细胞; 细胞形态; 细胞活力

缩略语: 少突胶质前体细胞: oligodendrocyte progenitor cell, OPC; 前-少突胶质细胞: pre-oligodendrocyte, Pre-OL

Proportion and morphological characteristics of human oligodendrocyte precursor cells in different cell culture vessels

Ye Dou^{1,2}, Ma Xuexia², Guan Qian^{1,2}, Luan Zuo², Yang Yinxiang², Wang Zhaoyan², Wang Qian², He Ying², Yao Ruiqin¹

¹Department of Cell Biology and Neurobiology, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China; ²Department of Pediatrics, The Sixth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100048, China

Ye Dou, Master candidate, Department of Cell Biology and Neurobiology, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China; Department of Pediatrics, The Sixth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100048, China

Corresponding author: Yao Ruiqin, MD, Professor, Department of Cell Biology and Neurobiology, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China

¹徐州医科大学细胞生物学与神经生物学教研室, 江苏省徐州市 221004; ²中国人民解放军总医院第六医学中心儿科, 北京市 100048

第一作者: 叶豆, 女, 1992年生, 湖北省汉川市人, 汉族, 徐州医科大学研究生在读(解放军总医院第六医学中心联合培养), 主要研究人少突胶质前体细胞治疗早产儿脑白质损伤的替代作用及调控机制。

通讯作者: 姚瑞芹, 博士, 教授, 徐州医科大学细胞生物学与神经生物学教研室, 江苏省徐州市 201004

<https://orcid.org/0000-0001-6683-871X>(叶豆)

基金资助: 国家重点研发计划干细胞及转化研究资助项目(2017YFA0104200), 项目负责人: 栾佐

引用本文: 叶豆, 马雪霞, 管倩, 栾佐, 杨印祥, 汪兆艳, 王倩, 何滢, 姚瑞芹. 人少突胶质前体细胞在不同细胞培养器皿中的比例和形态特征[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(1):44-49.



Abstract

BACKGROUND: Oligodendrocyte precursor cell transplantation is one of the keys to the treatment of white matter damage in premature infants. At present, there is a lack of research on the comparison of oligodendrocyte precursor cells induced by neural stem cells derived from human fetal brain cultured *in vitro* in different vessels worldwide.

OBJECTIVE: To observe the morphology of human oligodendrocyte progenitor cells and pre-oligodendrocytes in different cell culture vessels (6-well plates, 24-well plates and T25 flasks).

METHODS: The 6-well plates, 24-well plates and T25 flasks were used as culture vessels to culture human oligodendrocyte progenitor cells and pre-oligodendrocytes. The characteristics of human oligodendrocyte progenitor cells were identified by immunofluorescence staining and flow cytometry. The morphology of cells was observed by an ordinary light microscope. Cell counts were performed according to cell morphology and statistical analysis was performed.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The oligodendrocyte progenitor cell body was round and the bipolar protrusions were bead-like; the pre-oligodendrocyte protrusions were more than two poles, and did not bifurcate. (2) The ratios of oligodendrocyte progenitor cell morphology in the oligodendrocyte lines were significantly higher in the 6-well plates than those in the 24-well plates and T25 flasks ($P < 0.05$), followed by T25 flasks and 24-well plates. Morphological ratios of pre-oligodendrocytes were significantly higher in the 24-well plates compared to the 6-well plates and T25 flasks ($P < 0.01$), followed by T25 flasks and 6-well plates. (3) The cells cultured in the 6-well plate had fewer drugs, and the morphology, vigor and growth were better than those of the other culture vessels. (4) According to morphological view, 6-well plates are more suitable for oligodendrocyte progenitor cell growth, and 24-well plates are more suitable for pre-oligodendrocytes growth.

Key words: stem cells; oligodendrocyte precursor cells; pre-oligodendrocytes; cell morphology; cell viability

Funding: the National Key Research and Development Program for Stem Cell and Translational Research, No. 2017YFA0104200 (to LZ)

How to cite this article: YE D, MA XX, GUAN Q, LUAN Z, YANG YX, WANG ZY, WANG Q, HE Y, YAO RQ. Proportion and morphological characteristics of human oligodendrocyte precursor cells in different cell culture vessels. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(1):44-49.

0 引言 Introduction

早产儿脑白质损伤是早产儿最常见的脑损伤类型之一^[1]。目前临床上对于早产儿脑白质损伤的治疗尚无有效措施,患儿多伴有神经发育后遗症例如认知及行为功能障碍、脑瘫等^[2]。探索早产儿脑白质损伤有效的治疗方法,是国内外医学界共同面临的问题^[3-4]。少突胶质前体细胞 (oligodendrocyte progenitor cell, OPC) 移植是治疗早产儿脑损伤非常有前景的治疗措施之一^[5]。移植的 OPC 不仅可替代损伤细胞发挥髓鞘功能,还可通过营养支持和免疫调节来改善宿主环境,发挥神经保护作用^[6]。对于外源性 OPC 的优化培养已受到国际上越来越多的关注。国际上常见的体外诱导 OPC 的来源有人胚胎干细胞来源、人多能干细胞来源和人胎脑来源等^[6]。人胚胎干细胞和人多能干细胞来源的 OPC 具有耗时长和致癌性风险等缺点,人胎脑不易分选 OPC,且分选得到的 OPC 数量少,而人胎脑来源神经干细胞诱导的 OPC 致癌性风险低,具有时间短、效率高、易于转化等优点。目前,国际上缺乏对人胎脑来源神经干细胞诱导 OPC 的体外研究,另外 hOPC 和前-少突胶质细胞 (pre-oligodendrocyte, Pre-OL) 阶段没有明确的区分^[7-9]。课题组在体外人胎脑来源神经干细胞诱导的 OPC 培养及特性鉴定过程中, hOPC 和 Pre-OL 往往也难以区分。为了确认 hOPC 培养的最佳器皿和区分 hOPC 和 Pre-OL 的阶段,该实验观察 hOPC 和 Pre-OL 在 6 孔板、24 孔板和 T25 培养瓶等不同培养器皿培养时的比例和形态特征。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外实验。

1.2 时间及地点 实验于 2018 年 5 至 12 月在解放军总医院第六医学中心儿科实验室完成。

1.3 材料 OPC(解放军总医院第六医学中心儿科实验室由人胎脑来源神经干细胞系诱导培养形成^[10]); OPC 培养基、消化酶和包被液(解放军总医院第六医学中心儿科实验室研

发); 兔抗人 PDGFR- α 多克隆抗体 (CST-5421S, 1 : 800); 小鼠抗 A2B5 单克隆抗体 (R&D-MAB1416, 1 : 50); Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG、donkey anti-rabbit IgG (Jackson, USA); PDGF-BV421-iso、A2B5-PE-iso、PDGF-BV421、A2B5-PE(BD, USA); EDTA、stain-buffer、Fix-perm-buffer、perm-wash-buffer (BD, USA); 多聚甲醛(索莱宝,北京); 牛血清白蛋白 (Sigma, USA); DAPI、Triton X-100(Biotopped, USA); 6 孔板、24 孔板和 25 cm² 透气型培养瓶 (Corning, USA); DMEM/F12、PBS(Gibco, USA); 三气恒温箱和细胞培养箱 (Thermo Fisher, USA); 倒置荧光显微镜 (Olympus, USA); 差速离心机 (K61715-F00, 日本)。

1.4 实验方法

1.4.1 培养器皿的包被 取出 6 孔板中的细胞,显微镜下观察,根据估算的细胞数量,提前按照表 1 包被 6 孔板、24 孔板和 T25 培养瓶等器皿,放入 37 °C、体积分数为 5%CO₂ 细胞培养箱中包板。

表 1 | 不同培养容器加入包被液以及培养液的体积

Table 1 | Volumes of coating solution and culture solution in different culture vessels

培养器皿	加包被液量 (mL)	加 OPC 培养基 (mL)
24 孔板	0.3	1
6 孔板	1.0	3
T25 培养瓶	2.0	6

1.4.2 OPC 的传代 待包板完毕,每孔加 OPC 消化酶,在显微镜下观察以板底无贴壁细胞为宜;消化完毕后,每孔加入 DMEM/F12 培养基(消化酶体积的 6 倍)终止消化;收集细胞入离心管以 2 000 r/min 离心 5 min,弃上清,用 OPC 培养基重悬;取 10 μ L 细胞悬液与 10 μ L 锥虫蓝染液混匀计数,24 孔板、6 孔板和 T25 培养瓶接种的细胞数目分别为 4×10^4 、 2×10^5 和 5×10^5 个,并加适量 OPC 培养基;显微镜下观察各器皿中 OPC 状况,以细胞分散于器皿底部,细胞密度适中、胞体饱满、视野清晰、无渣滓为宜;最后置于 37 °C、

体积分数为 5%CO₂ 细胞培养箱中培养。

1.4.3 OPC 的免疫荧光染色鉴定 在显微镜下观察细胞形态和贴壁情况，取状态良好的 6 孔板培养的第 6 代 OPC 用 40 g/L 多聚甲醛室温固定，PBS 洗涤，每孔加入含 3% 牛血清白蛋白的封闭液在 28–30 °C 的三气培养箱中封闭 2 h，每孔加入 PDGFR- α 抗体 (用 3%BSA 溶液稀释，1 : 800) 和 A2B5 抗体 (用 3%BSA 溶液稀释，1 : 50) 在 4 °C 冰箱孵育过夜，PBS 洗涤，每孔加入二抗 (用 3%BSA 溶液稀释，1 : 500) 室温孵育 2 h，PBS 洗涤后细胞核复染，每孔加入 1 mL 抗荧光淬灭封固剂 (抗荧光淬灭封固剂与 PBS 比例为 1 : 10)。荧光显微镜下取每孔东南西北中 5 个视野拍照并选取 5 张放大 200 倍照片计数阳性细胞并计算阳性率，取平均值，同组重复实验不少于 3 孔。

少突胶质前体细胞的培养及鉴定

细胞来源:	解放军总医院第六医学中心儿科实验室建立的人胎脑分离的神经干细胞系
基础培养基:	DMEM/F12 培养基
添加材料:	添加 N2、成纤维细胞生长因子、B27 等成分
原代培养时间:	神经干细胞诱导的原代细胞培养 3 d 第 1 次换液，每三四天换液 1 次，培养 7 d 传代
细胞传代:	细胞生长融合至 90% 左右 (一般 7 d) 用实验室配置的 OPC 消化酶消化后传至下 1 代，按照 1 : 3 比例传代，7 d 左右传 1 代，最长可以传至 15 代左右
细胞鉴定:	采用免疫荧光染色和细胞流式分析鉴定
伦理学批准:	该研究符合解放军总医院第六医学中心相关伦理要求
伦理学批准:	实验经过中国人民解放军联勤保障部队第 920 医院动物伦理委员会批准

1.4.4 OPC 的流式分析鉴定 将 6 孔板培养的第 6 代 OPC 消化后均分于流式管中，然后给予 1 800 r/min 离心 5 min，离心完毕后弃上清混匀，为防止细胞聚集每管加入 EDTA，胞膜抗体管中加入 stain-buffer，再次离心弃上清混匀，每管加入 Fc 受体阻断剂室温封闭 10 min，每管分别加入流式一抗 [PDGF-BV421-iso(1 : 400)、A2B5-PE-iso(1 : 30)、PDGF-BV421(1 : 100) 和 A2B5-PE(1 : 100)] 置于 4 °C 冰箱孵育 30 min，stain-buffer 洗涤，2 000 r/min 离心 5 min，离心完毕再次弃上清混匀，最后每管加入 1 mL stain-buffer 重悬细胞并计数，将流式管中细胞过筛，准备上机检测。

1.4.5 观察不同培养器皿中的细胞形态 取各器皿培养的第 6 代 OPC 在显微镜下观察拍照。每孔选取 5 个视野，放大 200 倍进行细胞计数，以每张照片细胞数不少于 40，总细胞数不少于 200，同组实验计数不低于 15 张照片为原则计数。以 OPC 胞体为圆形，突起双极呈串珠样结构；Pre-OL 突起多于 2 极，突起较细短且不分叉为形态学原则分类计数少突谱系细胞的形态。

1.4.6 OPC 的生长曲线测定 将第 6 代 OPC 传代消化后，分别接种于 24 孔板、6 孔板和 T25 培养瓶，每孔接种的细胞数目分别为 4×10^4 、 2×10^5 和 5×10^5 ，加入适量 OPC 培养基，置

于 37 °C、体积分数为 5%CO₂ 细胞培养箱中培养，每日消化各培养器皿中 OPC 并计数，以 24 孔板每日消化 5 孔细胞计数的平均值、6 孔板每日消化 2 孔细胞计数的平均值和 T25 每日消化 1 瓶的细胞数除以各器皿表面积商值为各个器皿每日每单位面积的 OPC 数目，绘制生长曲线。

1.5 主要观察指标 ① OPC 流式及免疫荧光染色鉴定；② OPC 和 Pre-OL 的形态学描述；③ 不同培养器皿培养的 OPC 增殖情况。

1.6 统计学分析 GraphPad Prism 5.0 软件作图，Adobe Illustrator CS6 软件组图；采用 SPSS 19.0 统计软件对数据进行统计学分析，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 SNK-*q* 检验，*P* < 0.05 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 OPC 特性鉴定结果 免疫荧光染色显示 PDGFR- α 和 A2B5 主要表达在细胞的细胞膜上，PDGFR- α 和 A2B5 阳性细胞的比率分别为 89.90% 和 96.30%，见图 1A。流式细胞术检测 PDGFR- α 和 A2B5 阳性率分别为 78.5% 和 54.6%，见图 1B。该结果表明 OPC 纯度较高，适用于该实验研究。

2.2 少突胶质谱系细胞的形态学特点 OPC 胞体为圆形且饱满，双极突起呈串珠样、突起较细长、无分叉，折光性强；Pre-OL 胞体清晰明亮较 OPC 增大，胞体的突起多于 2 极但不分叉，见图 2。

2.3 不同培养器皿对未成熟少突胶质细胞形态和数目的影响 6 孔板中无渣滓，无死细胞，无细胞聚团现象，见图 3A，D；双极串珠样细胞最多，胞体清晰明亮，突起细长，见图 3A；多极突起细胞较少，见图 3A，D；细胞分散度良好。

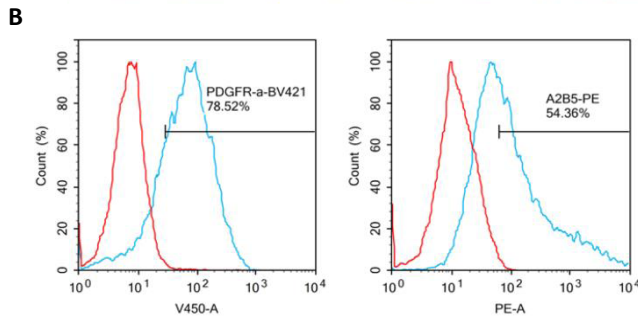
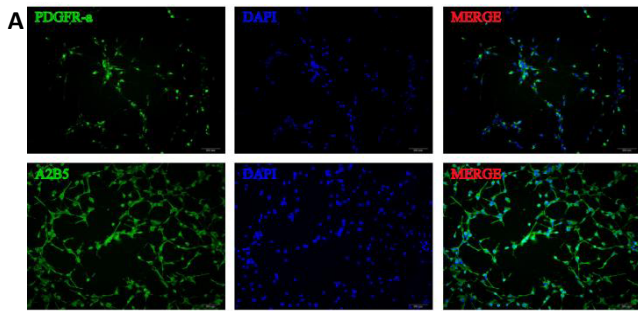
24 孔板中渣滓较少，有个别死细胞，见图 3B，E；细胞聚集现象多，见图 3B，E；双极串珠样细胞典型，胞体较大，突起粗壮，见图 3B；多极突起细胞较多，见图 3B，E；细胞分散度一般。

T25 培养瓶中有渣滓、个别死细胞，见图 3C，F；有细胞聚集现象，见图 3C，F；双极串珠样细胞同样典型，胞体较大，突起长且粗壮，见图 3C；可见典型的多极突起细胞，见图 3C，F；细胞分散度一般。

光学显微镜下对少突谱系细胞形态进行统计分析，见表 2，图 4，与 T25 培养瓶、24 孔板相比，6 孔板中双极串珠样的 OPC 比例最高，差异有显著性意义 (*P* < 0.05)，其次依次为 T25 培养瓶、24 孔板；与 T25 培养瓶、6 孔板相比，24 孔板中 Pre-OL 的比例最高，差异有显著性意义 (*P* < 0.01)，其次依次为 T25 培养瓶、6 孔板。

从光学显微镜下形态学角度分析，6 孔板培养的少突谱系细胞中 OPC 比例最高，24 孔板培养的 Pre-OL 比例最高。

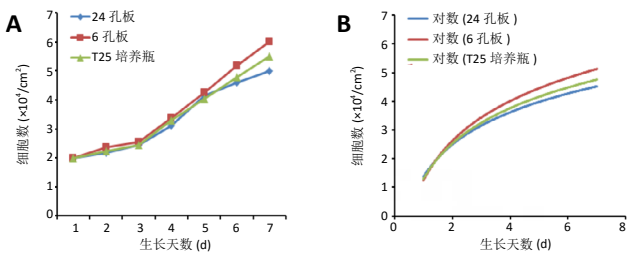
2.4 不同培养器皿中 OPC 的生长曲线 不同培养器皿中 OPC 在传代后的前 3 d 增殖不明显，在第 4 天开始增殖速度加快。6 孔板培养的 OPC 增殖速度最快，其次是 T25 培养瓶，而 24



图注：图中 A 为 PDGFR- α 和 A2B5 免疫荧光鉴定 ($\times 200$)；B 为 PDGFR- α 和 A2B5 流式细胞术鉴定

图 1 | 6 孔板培养的少突胶质前体细胞特性鉴定

Figure 1 | Characterization of oligodendrocyte progenitor cells in 6-well plates



图注：图中 A 为 3 种培养器皿培养 1 周内的少突胶质前体细胞线性生长曲线；B 为 1 周内的对数生长曲线

图 5 | 不同培养器皿中少突胶质前体细胞的增殖情况

Figure 5 | Proliferation of oligodendrocyte precursor cells in different culture vessels

表 2 | 不同培养容器中少突系细胞比例 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Table 2 | Proportion of oligodendrocyte cell lines in different culture vessels

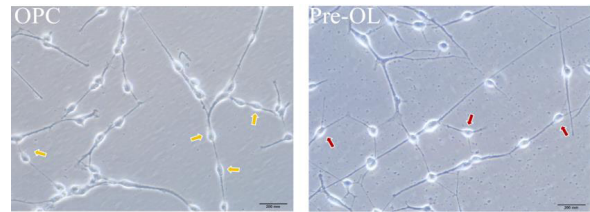
组别	少突胶质前体细胞	前-少突胶质细胞
6 孔板	0.708 $\pm$ 0.141 ^a	0.065 $\pm$ 0.010
24 孔板	0.233 $\pm$ 0.047	0.378 $\pm$ 0.156 ^b
T25 培养瓶	0.409 $\pm$ 0.090	0.267 $\pm$ 0.038

表注：与 T25 培养瓶、24 孔板比较，^a $P < 0.05$ ；与 T25 培养瓶、6 孔板比较，^b $P < 0.01$

孔板培养的 OPC 增殖速度最慢，见图 5。OPC 在 6 孔板传代培养过程中增殖倍数可达 3 倍，24 孔板培养中增殖倍数约为 2.45 倍，T25 培养瓶中 OPC 增殖倍数约为 2.7 倍。见表 3。

3 讨论 Discussion

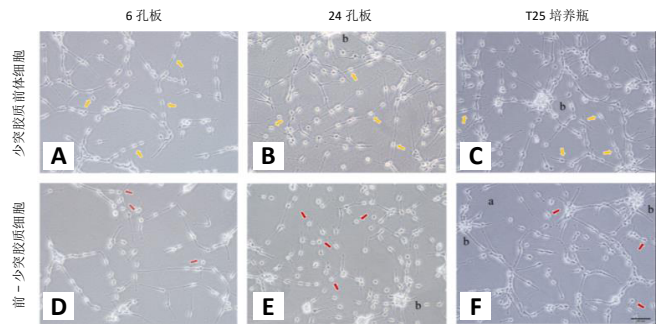
早产儿脑白质损伤导致的髓鞘形成障碍是引起神经退行性疾病的重要原因之一^[11-14]。OPC 分化的成熟少突胶质细胞作为中枢神经系统髓鞘细胞，其形成障碍或损伤是导致中枢神经系统髓鞘病变的重要原因^[15]。中枢神经系统中少突谱



图注：黄色箭头所指为少突胶质前体细胞 (OPC)，胞体为圆形且饱满，双极突起呈串珠样、突起较细长、无分叉，折光性强；红色箭头所指为前-少突胶质细胞 (Pre-OL)，胞体清晰明亮，胞体的突起多于 2 极但不分叉

图 2 | 少突胶质谱系细胞形态学特点

Figure 2 | Morphological characteristics of oligodendrocyte cell lines



图注：黄色箭头所指为少突胶质前体细胞 (A-C)，红色箭头所指为前-少突胶质细胞 (D-F)。a 指培养器皿中的渣滓，b 指细胞聚集现象

图 3 | 不同培养器皿中的少突胶质谱系细胞形态 ($\times 200$)

Figure 3 | Morphology of oligodendrocyte cell lines in different culture vessels ($\times 200$)

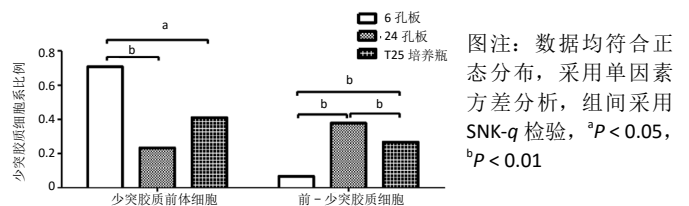


图 4 | 不同培养器皿中的少突胶质细胞系比例统计分析

Figure 4 | Statistical analysis of the proportion of oligodendrocyte lines in different culture vessels

表 3 | 不同培养容器中少突胶质前体细胞的生长情况 ($\times 10^4/\text{cm}^2$)
Table 3 | Growth of oligodendrocyte precursor cells in different culture vessels

组别	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
6 孔板	2	2.356 4	2.556 7	3.374 5	4.254 7	5.184 6	6.008 9
24 孔板	2	2.171 6	2.437 8	3.118 2	4.132 8	4.589 2	4.983 7
T25 培养瓶	2	2.222 9	2.434 6	3.287 4	4.029 8	4.787 4	5.498 2

系细胞按照 OPC、Pre-OL、未成熟少突胶质细胞的顺序最后分化为成熟的少突胶质细胞^[16-21]。此过程的正常进行对于髓鞘至关重要^[22]。OPC 在胚胎期位于脑室下区、尾侧神经节突起区和胚胎外侧^[23-25]，伴随迁移逐渐增殖和分化^[26]；与此同时，胞体发出的突起增多、延伸并围绕轴突形成同心圆样板层结构——髓鞘^[27]。此过程中某一个环节破坏即可导致髓鞘无法正常形成，最终导致中枢神经系统的先天脱髓鞘病变^[28]。内源性 OPC 在急性脱髓鞘病变中或可促进髓鞘再生^[29]，慢性脱髓鞘病变往往不能有效促进髓鞘但外源性 OPC 移植

能有效促进髓鞘修复^[30-31]。研发外源性 OPC 的培养对早产儿脑白质损伤的治疗具有特殊的临床意义。

用 PDGFR- α 和 A2B5 免疫荧光染色鉴定 OPC^[32-35], 可见典型的双极串珠样 OPC, 同时对 OPC 进行 PDGFR- α 和 A2B5 抗体流式鉴定均为阳性。免疫荧光染色和流式鉴定 OPC 纯度较高, 适用于该实验研究。流式细胞鉴定可以得到细胞的准确阳性率, 作为常用的鉴定细胞的定量手段; 免疫荧光染色也是鉴定细胞的常用定性手段之一, 可以粗略的计算阳性率的同时观察典型的阳性细胞形态。PDGFR- α 和 A2B5 双阳性细胞中也存在 Pre-OL 的多极形态。OPC 和 Pre-OL 往往难以区分, 且 2 种细胞均表达 PDGFR- α 和 A2B5^[7-9]。依据 OPC 和 Pre-OL 典型的形态学特点, 发现 3 种不同培养器皿中 OPC 和 Pre-OL 的比例有显著性差异。

国际上对于人多能干细胞来源 OPC 的培养^[36-38], 此 3 种培养器皿都有使用, 其中 6 孔板^[36, 38]、T25 培养瓶采用较多^[37]。该实验在国内外首次将人胎脑来源神经干细胞系诱导培养的 OPC 在以上 3 种培养皿中进行体外培养, 肯定了 6 孔板培养 OPC 的优越性。光学显微镜下形态学分析显示, 6 孔板培养少突谱系细胞可以显著增加 OPC 的比例, 6 孔板培养的细胞形态饱满, 典型双极串珠样细胞多, 胞体清晰明亮, 突起细长, 而用 24 孔板培养少突系细胞可以显著增加 Pre-OL 的比例, 24 孔板的细胞形态饱满, 胞体较大, 突起粗壮, 典型的多极突起细胞较多。因此选择合适的培养器皿培养少突谱系细胞是非常重要的。

除了从光学显微镜下对 OPC 形态学分析来选择培养器皿之外, 还需要考虑其他因素的影响。孔板在培养 OPC 过程中, 具有容易设计分组研究、占据培养箱空间小和通过显微镜可以迅速观察细胞生长状态等优点。比如 24 孔板在培养过程中, 由于表面积较小而液体表面张力大, 容易把 OPC 推向边缘聚集, 聚集的 OPC 在光学显微镜下对焦不良, 影响 OPC 典型形态的观察; 另外, 由于生长空间的局限, 导致传代时收集的 OPC 较少, 收集同等数目 OPC 时操作更频繁。培养瓶具有容易占据培养箱空间的缺点, T25 培养瓶表面积较大, OPC 可以有充分的生长空间, 但是 T25 培养瓶中的细胞往往因为贴壁不牢靠而出现脱落现象, 也会影响 OPC 的生长; 另外, T25 培养瓶中培养基较多, 即使不搅动, 由于液体的剪切力, 轻微的摇晃也会影响 OPC 的贴壁生长。6 孔板除了可以避免上述缺点外, 其培养的 OPC 增殖能力最强。6 孔板培养大批量 OPC 时, 由于贴壁表面积局限, 增殖大批量 OPC 用于临床时, 相较 T25 培养瓶存在缺陷; 矩形 6 孔板与外界接触的表面积大, 可能较 T25 培养瓶容易污染, 但是该实验使用的 6 孔板购自美国 CORNING 公司, 其特点为独特的迷宫式空气通道系统, 为气体交换提供了一条曲折的路径, 以最大程度减少污染的风险, 并且每个孔上方有单独的冷凝环, 以防止交叉污染; 另外细胞培养人员遵循无菌技术、对培养环境和培养设备定期消毒可以极大限度防止细胞污染, 进一步肯定了 6 孔板在 OPC 体外培养中的地位。

除了考虑各培养器皿在培养过程中的优缺点外, 还要考虑不同培养皿究竟存在何种差异, 才造成 OPC 生长的差异。由于不同培养器皿的表面积和体积的差异, 培养基在各培养器皿中的液体表面张力也不同。国内外有文献报道细胞的生物学响应可以被细胞所受力学刺激的方向、大小和分布所影响^[39]。流体剪切力可以引起细胞骨架重构从而增强细胞强度^[40]; 引力可以使软骨细胞蛋白多糖发生变化^[41]; 基底拉伸可以改变细胞的活性和取向^[42], 甚至重力的方向和大小的变化也可以引起细胞骨架的重排^[43]。干细胞的增殖和分化等与其所处的力学环境是分不开的, 干细胞能够发挥正常的生理功能与其所处的正常力学环境密切相关。干细胞的各种功能也随着周围力学环境变化而变化。近年来研究发现, 细胞内外的力学环境和其产生的力学信号可调控干细胞形态^[44]。各个培养器皿培养的 OPC 比例不同, 可能与不同培养器皿的表面张力差异有关。

另外, 确定最佳的培养器皿还需要从各个培养容器培养的 OPC 贴壁能力、分化能力和冻存与复苏的存活率等多个方面全面评估^[45-46], 未来会进行深入的研究。

综上所述, 从光学显微镜下细胞形态学角度和增殖能力来分析, 6 孔板较适宜 OPC 的培养, 有利于 OPC 充分的生长, 获得更高纯度的 OPC, 以便给动物实验和临床移植提供细胞。

作者贡献: 实验设计为栾佐、杨印祥, 实验实施为叶豆、马雪霞, 实验评估、资料收集为叶豆, 实验统计分析为叶豆、管倩, 叶豆成文, 栾佐、杨印祥、姚瑞芹校对。

经费支持: 该文章接受了“国家重点研发计划干细胞及转化研究项目(2017YFA0104200)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 该研究的实施符合解放军总医院第六医学中心相关伦理要求(20180428)。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经通过徐州医科大学和解放军总医院第六医学中心生物统计专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] VAN TILBORG E, DE THEIJE CGM, VAN HAL M, et al. Origin and dynamics of oligodendrocytes in the developing brain: Implications for perinatal white matter injury. *Glia*. 2018;66(2): 221-238.
- [2] BACK SA. White matter injury in the preterm infant: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol*. 2017;134(3):331-349.

- [3] BARATEIRO A, BRITES D, FERNANDES A. Oligodendrocyte Development and Myelination in Neurodevelopment: Molecular Mechanisms in Health and Disease. *Curr Pharm Des*. 2016;22(6):656-679.
- [4] SALMASO N, JABLONSKA B, SCAFIDI J, et al. Neurobiology of premature brain injury. *Nat Neurosci*. 2014;17(3):341-346.
- [5] ALIZADEH A, DYCK SM, KARIMI-ABDOLREZAEE S. Myelin damage and repair in pathologic CNS: challenges and prospects. *Front Mol Neurosci*. 2015;8:35.
- [6] DIETZ KC, POLANCO JJ, POL SU, et al. Targeting human oligodendrocyte progenitors for myelin repair. *Exp Neurol*. 2016;283(Pt B):489-500.
- [7] WANG S, BATES J, LI X, et al. Human iPSC-derived oligodendrocyte progenitor cells can myelinate and rescue a mouse model of congenital hypomyelination. *Cell Stem Cell*. 2013;12(2):252-264.
- [8] YAMASHITA T, MIYAMOTO Y, BANDO Y, et al. Differentiation of oligodendrocyte progenitor cells from dissociated monolayer and feeder-free cultured pluripotent stem cells. *PLoS One*. 2017;12(2):e0171947.
- [9] MCLANE LE, BOURNE JN, EVANGELOU AV, et al. Loss of Tuberous Sclerosis Complex1 in Adult Oligodendrocyte Progenitor Cells Enhances Axon Remyelination and Increases Myelin Thickness after a Focal Demyelination. *J Neurosci*. 2017;37(31):7534-7546.
- [10] WANG C, LUAN Z, YANG Y, et al. High purity of human oligodendrocyte progenitor cells obtained from neural stem cells: suitable for clinical application. *J Neurosci Methods*. 2015;240:61-66.
- [11] BUNGE RP. Glial cells and the central myelin sheath. *Physiol Rev*. 1968;48(1):197-251.
- [12] FILLEY CM, FIELDS RD. White matter and cognition: making the connection. *J Neurophysiol*. 2016;116(5):2093-2104.
- [13] LESCA G, VANIER MT, CREISSON E, et al. X-linked adrenoleukodystrophy in a female proband: clinical presentation, biological diagnosis and family consequences. *Arch Pediatr*. 2005;12(8):1237-1240.
- [14] Van der Knaap MS, Bugiani M. Leukodystrophies: a proposed classification system based on pathological changes and pathogenetic mechanisms. *Acta Neuropathol*. 2017;134(3): 351-382.
- [15] KEOUGH MB, YONG VW. Remyelination therapy for multiple sclerosis. *Neurotherapeutics*. 2013;10(1):44-54.
- [16] NISHIYAMA A, KOMITOVA M, SUZUKI R, et al. Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(1):9-22.
- [17] PAYNE SC, BARTLETT CA, SAVIGNI DL, et al. Early proliferation does not prevent the loss of oligodendrocyte progenitor cells during the chronic phase of secondary degeneration in a CNS white matter tract. *PLoS One*. 2013;8(6):e65710.
- [18] ESPINOSA-JEFFREY A, BLANCHI B, BIANCOTTI JC, et al. Efficient Generation of Viral and Integration-Free Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Oligodendrocytes. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2016;39(1):2D.18.1-2D.18.28.
- [19] HU BY, DU ZW, ZHANG SC. Differentiation of human oligodendrocytes from pluripotent stem cells. *Nat Protoc*. 2009;4(11):1614-1622.
- [20] SANTOS AK, VIEIRA MS, VASCONCELLOS R, et al. Decoding cell signalling and regulation of oligodendrocyte differentiation. *Semin Cell Dev Biol*. 2019;95:54-73.
- [21] NEWVILLE J, JANTZIE LL, CUNNINGHAM LA. Embracing oligodendrocyte diversity in the context of perinatal injury. *Neural Regen Res*. 2017;12(10):1575-1585.
- [22] BARATEIRO A, FERNANDES A. Temporal oligodendrocyte lineage progression: in vitro models of proliferation, differentiation and myelination. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843(9):1917-1929.
- [23] HUGHES EG, KANG SH, FUKAYA M, et al. Oligodendrocyte progenitors balance growth with self-repulsion to achieve homeostasis in the adult brain. *Nat Neurosci*. 2013;16(6): 668-676.
- [24] BERGLES DE, RICHARDSON WD. Oligodendrocyte Development and Plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;8(2):a020453.
- [25] YEUNG MS, ZDUNEK S, BERGMANN O, et al. Dynamics of oligodendrocyte generation and myelination in the human brain. *Cell*. 2014;159(4):766-774.
- [26] EL WALY B, MACCHI M, CAYRE M, et al. Oligodendrogenesis in the normal and pathological central nervous system. *Front Neurosci*. 2014;8:145.
- [27] NAVE KA, WERNER HB. Myelination of the nervous system: mechanisms and functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30: 503-533.
- [28] BULLER B, CHOPP M, UENO Y, et al. Regulation of serum response factor by miRNA-200 and miRNA-9 modulates oligodendrocyte progenitor cell differentiation. *Glia*. 2012; 60(12):1906-1914.
- [29] MCMURRAN CE, KODALI S, YOUNG A, et al. Clinical implications of myelin regeneration in the central nervous system. *Expert Rev Neurother*. 2018;18(2):111-123.
- [30] CZEPIEL M, BODDEKE E, COPRAY S. Human oligodendrocytes in remyelination research. *Glia*. 2015;63(4): 513-530.
- [31] OSORIO MJ, ROWITCH DH, TESAR P, et al. Concise Review: Stem Cell-Based Treatment of Pelizaeus- Merzbacher Disease. *Stem Cells*. 2017;35(2):311-315.
- [32] DOUVARAS P, RUSIELEWICZ T, KIM KH, et al. Epigenetic Modulation of Human Induced Pluripotent Stem Cell Differentiation to Oligodendrocytes. *Int J Mol Sci*. 2016;17(4). pii: E614.
- [33] THIRUVALLUVAN A, CZEPIEL M, KAP YA, et al. Survival and Functionality of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Oligodendrocytes in a Nonhuman Primate Model for Multiple Sclerosis. *Stem Cells Transl Med*. 2016;5(11): 1550-1561.
- [34] PIAO J, MAJOR T, AU YEUNG G, et al. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitors remyelinate the brain and rescue behavioral deficits following radiation. *Cell Stem Cell*. 2015;16(2): 198-210.
- [35] MARTEYN A, SARRAZIN N, YAN J, et al. Modulation of the Innate Immune Response by Human Neural Precursors Prevails over Oligodendrocyte Progenitor Remyelination to Rescue a Severe Model of Pelizaeus-Merzbacher Disease. *Stem Cells*. 2016;34(4):984-996.
- [36] MAGNANI D, CHANDRAN S, WYLLIE DJA, et al. In Vitro Generation and Electrophysiological Characterization of OPCs and Oligodendrocytes from Human Pluripotent Stem Cells. *Methods Mol Biol*. 2019;1936: 65-77.
- [37] PRASAD A, TEH DBL, BLASIAK A, et al. Static Magnetic Field Stimulation Enhances Oligodendrocyte Differentiation and Secretion of Neurotrophic Factors. *Sci Rep*. 2017;7(1): 6743.
- [38] WANG C, ZHANG CJ, MARTIN BN, et al. IL-17 induced NOTCH1 activation in oligodendrocyte progenitor cells enhances proliferation and inflammatory gene expression. *Nat Commun*. 2017;8:15508.
- [39] LIM CT, ZHOU EH, QUEK ST. Mechanical models for living cells--a review. *J Biomech*. 2006;39(2):195-216.
- [40] JEN CJ, JHIANG SJ, CHEN HI. Invited review: effects of flow on vascular endothelial intracellular calcium signaling of rat aortas ex vivo. *J Appl Physiol* (1985). 2000;89(4):1657-1662, 1656.
- [41] BACHRACH NM, VALHMU WB, STAZZONE E, et al. Changes in proteoglycan synthesis of chondrocytes in articular cartilage are associated with the time-dependent changes in their mechanical environment. *J Biomech*. 1995;28(12):1561-1569.
- [42] LIU SQ. Influence of tensile strain on smooth muscle cell orientation in rat blood vessels. *J Biomech Eng*. 1998;120(3): 313-320.
- [43] ZHANG C, ZHOU L, ZHANG F, et al. Mechanical remodeling of normally sized mammalian cells under a gravity vector. *FASEB J*. 2017;31(2): 802-813.
- [44] 吕东媛, 周吕文, 龙勉. 干细胞的生物力学研究 [J]. *力学进展*, 2017, 47(1): 534-585.
- [45] WANG CY, DENEEN B, TZENG SF. BRCA1/BRCA2- containing complex subunit 3 controls oligodendrocyte differentiation by dynamically regulating lysine 63-linked ubiquitination. *Glia*. 2019;67(9):1775-1792.
- [46] KAINDL J, MEISER I, MAJER J, et al. Zooming in on Cryopreservation of hiPSCs and Neural Derivatives: A Dual-Center Study Using Adherent Vitrification. *Stem Cells Transl Med*. 2019;8(3):247-259.