

胎鼠脊髓神经干细胞分离方法的比较

马红梅¹ 郭筠秋² 张洪艳² 汪美琪²

(1 哈尔滨医科大学大庆校区基础部组胚教研室 大庆 163319 2 哈尔滨医科大学基础医学院组胚教研室)

摘要 目的:比较机械法和胰酶消化法对胎鼠脊髓源神经干细胞增殖分化的影响。方法:分别用机械法和胰酶消化法分离胎鼠脊髓组织获得神经干细胞,应用台盼蓝检测细胞成活率,用无血清培养技术培养神经干细胞,应用 MTT 法检测细胞分裂增殖能力,采用免疫细胞化学法鉴定神经干细胞和分化细胞。结果:机械法获得的细胞数量多于胰酶消化法。细胞经过培养其增殖能力机械法略强于胰酶消化法,但无统计学意义。培养形成的细胞球 Nestin 阳性,诱导分化后可见 NSE 和 GFAP 阳性细胞。结论:运用机械法比胰酶消化法分离胎鼠脊髓组织获得神经干细胞方法简单,容易操作,经过培养细胞增殖能力较强。并可提供健康的细胞来源。

关键词: 神经干细胞; 脊髓; 分离; 培养; 机械法; 胰酶消化法

The isolation of neural stem cells from fetal rat spinal cord and comparison of separation method

MA Hong-mei¹, GUO Jun-qiu², ZHANG Hong-yan², WANG Mei-qi²

1 Teaching & Research Office of Tissue & Embryo, Department of Preclinical Medicine,

Daqing School, Harbin Medical University, Daqing 163319, Heilongjiang, China

2 Teaching & Research Office of Tissue & Embryo, College of Preclinical Medicine, Harbin Medical University, Heilongjiang, China

ABSTRACT Objective: To compare the difference between mechanical method and trypsinization about fetal rat spinal cord neural stem cells multiplication and differentiation. **Methods:** The neural stem cells were isolated by mechanical method and trypsinization and cultivated with serum-free culture techniques. The survival rate of the cells were detected by trypanblau. The potential of division and expansion of the cells were analyzed by MTT method. Immunocytochemistry was used to identify neural stem cell and neurons and glia differentiated. **Results:** There is no difference obviously about the cellular activity between mechanical method and trypsinization. But the value of mechanical method was higher. **Conclusion:** Using mechanical method to isolate fetal rat spinal cord for getting neural stem cells is easier than using trypsinization, which can offer the source of healthy cells.

Key words: Neural stem cells; Spinal cord; Isolation; Cultivation; Mechanical method; Trypsinization

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)是近年来神经科学领域的研究热点之一,神经干细胞研究不仅可阐明神经发育机制,而且在神经系统损伤修复和神经退行性疾病的细胞替代治疗以及基因治疗中都有巨大的应用价值^[1]。在各项研究中,能有效的分离培养出脊髓神经干细胞已成为了至关重要的一步。根据目前文献报道,常用的细胞分离方法有两种,即机械分离法和胰酶消化法,但两种方法的比较未见报道。本实验对胎鼠脊髓经过两种分离方法获得的神经干细胞进行培养、观察、鉴定,进行对比研究。探索理想的 NSCS 分离技术,将为人们更好地研究和应用 NSCS 提供可靠的实验技术依据。

1 材料和方法

1.1 材料

3 月龄以上成年 Wistar 大鼠,(由哈尔滨医科大学第二附属医院实验动物中心提供);DMEM / F12(Sigma 公司),胎牛血清(杭州四季青生物公司),表皮生长因子(EGF)、成纤维细胞生长因子(bFGF)(Gibco 公司);Nestin 单克隆抗体、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、胶质纤维酸性蛋白抗体(GFAP)、MTT(四甲基偶氮唑蓝)、二甲亚砜(Sigma 公司);胰蛋白酶、SABC 试剂盒、DAB 显色液(Boster 公司)。

1.2 方法

1.2.1 神经干细胞的分离和培养: 孕 13~ 15d Wistar 大鼠颈椎脱臼致死剖腹取出胎鼠,在无菌条件下分离出脊髓组织,放入盛有 DMEM / F12 培养液的培养皿中并分离出中央管周围的组织,将其剪成 1mm³ 的组织块后均匀分成两组。机械分离法(第一组):用抛光的直头细管轻轻吹打 50~ 80 次,并用 200 目筛网过滤,将收集到的细胞悬液 500rpm 离心 5min,弃上清液,加入适量 DMEM / F12 培养液,轻轻吹打数次即可获得脊髓神经干细胞的单细胞悬液。胰酶消化法(第二组):用 0.25% 胰蛋白酶在 37℃ 下消化 5~ 10min,轻轻震荡使其混匀,依细胞分离情况加入胰酶抑制剂终止消化,并用 200 目筛网过滤,500rpm 离心 5min,弃去上清液。加入适量 DEME/F12 培养液,轻轻吹打数次制成脊髓神经干细胞的单细胞悬液。两组分别经台盼蓝染色计数并统计活细胞比例。用神经干细胞培养液(DEME/F12 培养液加入 EGF20ng/ml 和 bFGF 20ng/ml)调整细胞密度至 2×10^5 /ml,接种于 50ml 塑料培养瓶,置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱内培养。每天观察记录细胞生活状态。隔 3 天半量补充神经干细胞培养液。当神经细胞球逐渐增大至 50~ 200 个细胞/球时,进行 Nestin 染色鉴定和传代。传代时将神经细胞球悬液移至离心管,经低速离心后,吸弃上清液,加

作者简介:马红梅,女,1964年生,黑龙江省明水县人,汉族,1995年哈尔滨师范大学毕业,组胚副教授

电话:0459- 5012617, E-mail: mhmj@163.com; mhmj@sina.com

(收稿日期:2006- 02- 12 接受日期:2006- 03- 10)

入神经干细胞培养液,吹打 100 次,使之成为单个细胞悬液,进行细胞计数和活力观察,调整细胞密度至 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 继续种瓶培养以备后用。

1.2.2 MTT 检测法:取两组传代的细胞悬液分别接种于 96 孔板中,每 24 小时进行一次细胞活力检测,将 $20 \mu\text{l}$ MTT ($5\text{mg}/\text{ml}$) 液加入每孔,置于 37°C 5% CO_2 培养箱中继续培养 4 小时。弃去培养清液加入 $100 \mu\text{l}$ 二甲基亚砷,振荡 10min 使结晶物充分溶解。应用 Model-680 型酶标仪上测定各孔光密度 (OD) 值,检测波长 595nm,参考波长 630nm。

1.2.3 神经干细胞的分化和鉴定:取传代的神经干细胞以 $5 \times 10^4/\text{片}$ 细胞密度种于经多聚赖氨酸包被的玻璃盖玻片上,滴加含有 10% 胎牛血清的 DMEM / F12 培养液,分化培养 7 天后,采用 SABC 法作免疫细胞化学染色,神经元、胶质细胞分别用抗 NSE 抗体、抗 GFAP 抗体来标记。如果作神经干细胞 Nestin 染色,滴加含有 10% 胎血清的 DMEM / F12 培养液使克隆球贴壁,2h 后即可进行固定染色,用抗 Nestin 单抗来标记神经干细胞,操作过程按照试剂盒使用说明书进行。

2 结果

2.1 细胞形态的观察

附表 MTT 比色法测定不同时期脊髓神经干细胞的 OD 值

	样本均值		概率值 P(双侧)	
	胰酶消化法	机械分离法	方差齐	方差不齐
第二天	0.2690±0.0134	0.2837±0.0214	0.185	0.190
第四天	0.2147±0.0272	0.2380±0.0385	0.253	0.256
第七天	0.4200±0.1694	0.4237±0.1087	0.965	0.965

2.4 神经干细胞鉴定及分化结果

胰酶消化组和机械分离组神经干细胞球均表达 Nestin 阳性(图 5)。传代后神经干细胞分化培养 1 周后,作免疫细胞化学染色,两组细胞均可显示 NSE 阳性(图 6)、GFAP 阳性(图 7)。

3 讨论

神经干细胞由于具有多向分化潜能,在中枢神经系统的损伤修复中具有广泛的应用前景而备受关注。中枢神经系统内神经干细胞分离方法的探索,对于深入研究神经干细胞的生物学特性及其分化机制是一个先决的条件^[2-4]。神经干细胞的分离培养国内外报道以单一酶消化法居多^[5-6],胰酶消化法操作相对复杂,酶作用的时间又受温度影响,故很难掌握消化的最佳时刻。机械分离法是通过吸管吹打,筛网过滤来获取脊髓神经干细胞。在吹打过程中只要注意用力轻柔,防止气泡产生即可获得单细胞悬液,操作方法简单易行并可缩短细胞分离时间,经台盼蓝染色活细胞达 89%。发现机械法细胞球的形成速度比胰酶消化早约 1~2d,说明其中 NSCs 成分较多或细胞结构破坏较少。而消化酶对 NSCs 生长的影响作用可能是多方面的,在实践操作中很难把握消化酶的最佳作用时间,容易造成细胞膜损伤导致其活性下降,其次 NSCs 表面具有多种生长因子受体,消化酶作用于细胞表面可能会损伤部分细胞膜受体^[4,7-9]。实验中也观察到经消化酶作用后形成的 NSCs 球个体大小差异较大,细胞透明度下降,表明细胞增殖活力下降。采用机械吹打分离的细胞球虽然不能获得满意的单细胞悬液,但可以避免细胞膜受体的化学损伤,保持细胞间联系,传代后细胞死亡较少,克隆球形成较快。培养液中 bFGF 和 EGF 对 NSCs 具有促进分裂和增殖的作用,其它细胞在这种无血清培养液中无法增殖、生存^[10]。因此,随着培

机械法分离出的细胞形态呈均匀球形核大而清晰,细胞轮廓明显,折光性好,杂质少,细胞以单体和少许细胞团形式悬浮于培养液中(图 1)。胰酶消化分离的部分细胞形态不规则,轮廓模糊,杂质较多,细胞悬液中细胞以单体形式出现(图 2)。随着培养时间延长胰酶消化法细胞数量及长势均不如机械法,酶消化法神经球形成较晚并以小细胞团为主,形状不规则且贴壁细胞较多(图 3)。机械法形成的神经球数量多,形态规则,折光性好(图 4)。由上述对比可看出,机械分离法在脊髓神经干细胞的分离培养中效果较为理想。

2.2 台盼蓝检测细胞活力

台盼蓝染色的结果显示,机械分离法获得的脊髓神经干细胞悬液其细胞成活率是 89%。胰酶消化法获得的细胞成活率是 77%。

2.3 MTT 比色法检测神经干细胞数目变化情况

经过 MTT 比色法检测两组细胞的 OD 值在第 4d 时均表现下降趋势,两组 OD 值比较机械分离组始终略高于胰酶消化组。经 SPSS 统计软件分析得出,同一时期的两组数据间并无统计学意义(见附表),即两种分离方法对细胞的增殖情况的影响没有明显差别。

养时间的延续,在 4d 左右出现大量死亡细胞,然后 NSCs 增殖、聚合形成细胞球。在培养过程中发现神经干细胞球生长时间过长,体积过大,中央部分的细胞将会因缺乏营养而死亡,部分细胞自行分化,与相关报道一致^[11]。

细胞换液时借鉴富赛里^[12]补充培养液而不吸弃,防止悬浮生长的 NSCs 和细胞生长过程中可能分泌细胞因子随换液丢失,更适合于 NSCs 的培养。因此,无论是从操作难易程度,还是对细胞的损害程度来看,机械法都要优于胰酶消化法。

MTT 比色法用于检测细胞生长和增殖状况的常用方法。其原理是当培养细胞中加入 MTT 后,活细胞中的线粒体琥珀酸脱氢酶可将 MTT 分子还原,产生紫色结晶物 MTT 甲瓖。该结晶物可溶于二甲基亚砷、异丙醇等有机溶剂。由于结晶形成量与细胞数量及活性有关,故通过比色测定吸收值,即可间接反应细胞的生长和增殖情况。实验中测得的 OD 值机械组高于胰酶组。其原因可能在于所用于分离神经干细胞的消化酶对细胞都存在潜在的损害作用。经 SPSS 统计软件对实验数据的分析,用胰酶消化法或机械消化法分离脊髓神经干细胞对细胞增殖分化影响不明显。但机械法获得的 NSCs 可提供健康的细胞来源。

在本实验中采用无血清培养技术在体外大量扩增了神经干细胞,通过免疫鉴定表达神经上皮的特异性抗原 Nestin 蛋白。在特定条件下能分化为神经元和神经胶质细胞,并表达相应的标记蛋白 NSE 和 GFAP 阳性。因此,我们分离培养的细胞是脊髓来源的神经干细胞。

参考文献

[1] Teng YD, Lavik EB, Qu X, et al. Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cell[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(5): 3024-3029

- [2] Gobbel GT, Choi SJ, Beier S, et al. Long-term cultivation of multipotential stem cells from adult rat subependyma [J]. Brain Res, 2003, 980(2): 221-232
- [3] 姬西团, 章翔, 林绿标, 等. 人神经干细胞体外培养、鉴定及电镜观察[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2003, 2(4): 347-350
- [4] 吕欣, 王楠, 霍思维, 等. 胚胎大鼠中枢神经系统神经干细胞分离培养方法研究[J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(1): 38-41
- [5] Carpenter MK, Cui X, Hu ZY, et al. In vitro expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells[J]. Exp Neurol, 1999, 158: 265-278
- [6] Whitemore SR, Morassutti DJ, Waters WM, et al. Mitogen and substrate differentially affect the lineage restriction of adult rat subventricular zone neural precursor cell populations[J]. Exp cell Res, 1999, 252: 75-95
- [7] 梁鹏, 卫淑静, 徐薇, 等. 人神经干细胞体外长期培养系统的建立[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2005, 4(1): 41-43
- [8] Wachs FP, Couillard-Despres S, Engelhard M, et al. High efficacy of clonal growth and expansion of adult neural stem cells [J]. Lab Invest, 2003, 83(7): 949-962
- [9] Chang MY, Park CH, Lee SH. Embryonic cortical stem cells secrete diffusible factors to enhance their survival [J]. Neuroreport, 2003, 14(9): 1191-1195
- [10] Tropepe V, Sibilia M, Cinura BG, et al. Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon [J]. Dev Biol, 1999, 208(1): 166-188
- [11] Suslov ON, Kukekov VG, Ignatova TN, et al. Neural stem cell heterogeneity demonstrated by molecular phenotyping of clonal neurospheres [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(22): 14506-14511
- [12] 富赛里, 马政文, 尹岚, 等. 胚胎大鼠脑和脊髓神经干细胞的分离和培养[J]. 生理学报, 2003, 55(3): 278-283

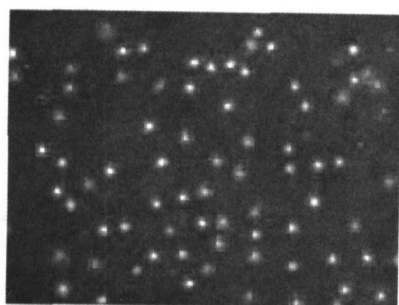


图1 机械消化法 1h 细胞 (×100)

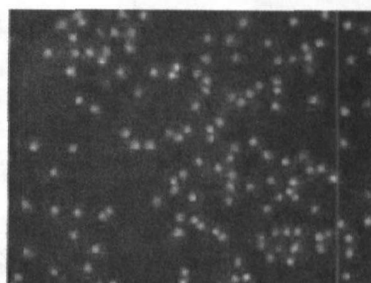


图2 胰酶消化法 1h 细胞 (×100)

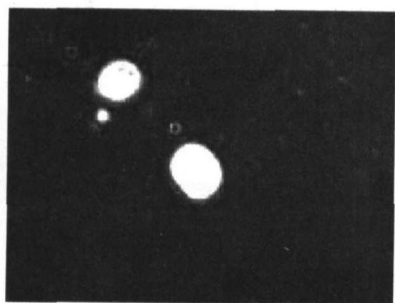


图3 胰酶消化法培养 5 天形成的神经干细胞球 (×200)

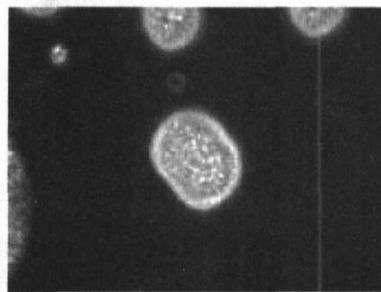


图4 机械消化法培养 5 天形成的神经干细胞球 (×100)

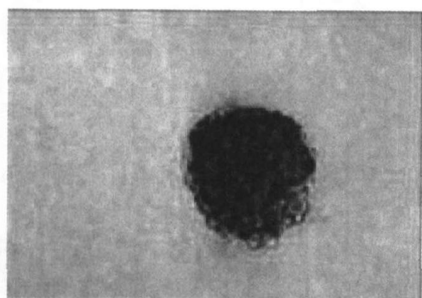


图5 神经干细胞球 Nestine 染色 (×400)

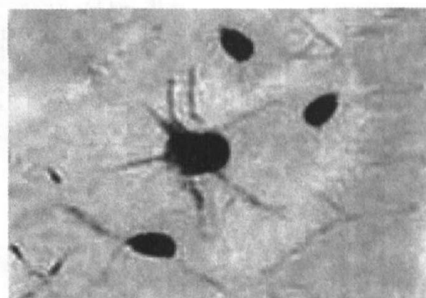


图6 神经干细胞贴壁分化 7 天 NSE 阳性 (×100)

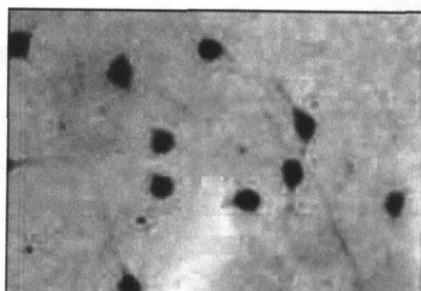


图7 神经干细胞贴壁分化 7 天 GFAP 阳性 (×100)