

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.31.007

人胎脑源性神经前体细胞致瘤性评价*

姚先进¹ 栾佐^{2△} 杨印祥² 汪兆艳²

(1 安徽医科大学 安徽 合肥 230032; 2 海军总医院儿科 北京 100048)

摘要 目的:研究体外培养的人胎脑源性神经前体细胞的致瘤性。**方法:**将人胎脑源神经前体细胞体外培养至第1、25、40、60代,且每代细胞分别制备成神经球及单个细胞混悬液两种制剂,并取293T细胞作为阳性对照,共9组,每组5只,分别皮下接种于4~8周龄的BALB/C裸鼠,接种后饲养6个月,定期观察裸鼠精神状态、饮食、排便、以及接种局部有无出现结节或肿块,接种6个月后处死裸鼠,对接种局部及内脏进行组织病理切片及HE染色。**结果:**将人胎脑源性神经前体细胞接种于裸鼠皮下6个月未见肿瘤形成,且未见其他异常组织形成;而阳性对照组293T细胞接种于裸鼠皮下1个月后可见明显肿瘤形成。**结论:**人胎脑源神经前体细胞对裸鼠不具有体内致瘤性。

关键词:人胎脑源神经前体细胞;致瘤性;裸鼠

中图分类号:Q953;R73-35 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)31-6028-04

Tumorigenicity of Human Fetal Brain-derived Neural Precursor Cells*

YAO Xian-jin¹, LUAN Zuo^{2△}, YANG Yin-xiang², WANG Zhao-yan²

(1 Anhui Medical University, Hefei, Anhui, 230032, China;

2 Department of Pediatrics Navy General Hospital, Beijing, 100048, China)

ABSTRACT Objective: To study the tumorigenicity of the human fetal brain-derived neural precursor cells cultured in vitro.

Methods: The human fetal brain-derived neural precursor cells were cultured to passage 1, 25, 40 and 60 in vitro, and each passage of them were prepared as two types of preparations of neurospheres and single cell suspension, and then 293T cells were taken as a positive control. BALB/C nude mice aged 4-8 weeks were assigned to 9 groups, and each group has 5 ones. They underwent subcutaneous inoculation respectively. The nude mice were fed for 6 months after inoculation, and their mental state, diet, defecation as well as the presence of nodules or lumps in the local inoculation parts were observed. They were killed six months after inoculation, then local inoculation parts and viscera were treated with histopathologic slicing and HE staining. **Results:** No tumor or other abnormal tissue formed 6 months after the subcutaneous injection of human fetal brain-derived neural precursor cells in nude mice. However, visible tumor was formed 1 month after the subcutaneous injection of 293T cells in nude mice in positive control group. **Conclusion:** The human fetal brain-derived neural precursor cells in vivo in nude mice tumorigenicity experiments indicated no tumorigenicity.

Key words: Human fetal brain-derived neural precursor cells; Tumorigenicity; Nude mice

Chinese Library Classification(CLC): Q953, R73-35 **Document Code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)31-6028-04

前言

自从上个世纪九十年代,Reynolds 和 Weiss 在鼠的脑组织中分离出了神经干细胞,并很快在人的胚胎脑及成人脑组织中也分离得到了神经干细胞,人们对神经干细胞/神经前体细胞的研究越来越深入。近年来,针对神经干细胞/神经前体细胞的体外分离培养、分化、调控机制及脑内分布、迁移途径的研究均取得了明显的进展^[1-9]。神经干细胞具有的自我更新及多潜能分化等特性给多种难治性中枢神经系统疾病的治疗带来了新的希望。目前,人们已开始尝试将人胎脑源神经前体细胞移植治疗应用于临床治疗多种神经疾病并获得一定的效果^[10-13]。但

同时,人胎脑神经前体细胞移植的风险也受到了极大的关注,特别是人类胚胎干细胞(ESCs)在植入裸鼠体内形成畸胎瘤,人胎脑源神经前体细胞是否像胚胎干细胞一样具有较强的致瘤性,人们对此尚无明确的研究和认识。本实验研究通过将人胎脑源神经前体细胞皮下植入BALB/C裸鼠体内,观察有无肿瘤形成,旨在初步评估其致瘤性,为人胎脑源神经前体细胞临床移植治疗的安全性提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

选用健康BALB/C裸鼠45只(由中国人民解放军军事医

* 基金项目:国际合作专项项目《干细胞移植治疗新生儿脑损伤的合作研究》(2012DFA30880)

作者简介:姚先进(1987-),男,硕士研究生,住院医师,主要研究方向:人胎脑源神经前体细胞致瘤性研究,电话:13121514499,

E-mail: yaoxianjin0407@hotmail.com

△通讯作者:栾佐,教授,博士生导师, E-mail: luanzuo@aliyun.com

(收稿日期:2014-03-14 接受日期:2014-04-10)

学科学院实验动物中心提供,动物质量合格证号:0000684),雌雄兼用,开始实验时鼠龄(1.5± 0.5)月,体重(24± 4) g,全部裸鼠均饲养在空气净化 <10000 级的屏障级环境中的独立通气笼盒(IVC)笼内(中国人民解放军总医院第一附属医院实验动物中心屏障级饲养室),饲料及垫料均经灭菌消毒处理后进入屏障级饲养室内使用。将 45 只裸鼠随机分成 9 组,每组 5 只,分别皮下接种第 1、25、40、60 代 hNSCs 细胞球或单细胞混悬液,以 293T 细胞为致瘤性阳性对照,接种后定期观察。

1.2 hNPCs 的培养与鉴定

选取孕龄 10~14 周流产的人胚胎脑组织,无菌条件下采用机械分散法制备成细胞悬液,并计数活细胞量,接种于 T25 培养瓶,活细胞浓度为 $5 \times 10^5/5$ mL。N2 培养液中添加 20 ng/mL EGF+10 ng/mL LIF+10 ng/mL FGF,于 37℃,5% CO₂ 孵箱中静置培养,第 4、7 天均换液一次,培养 10 d 时获取生长旺盛的细胞球,即为第一代神经球,用神经干细胞消化液消化细胞球,离心并接种于 T75 培养瓶培养,制成细胞悬液,即为第 1 代单细胞悬液,并按此传代方法传代至第 25、40、60 代细胞球和单细胞悬液,调整细胞终浓度为 $5 \times 10^7/\text{mL}$ 以备用。皮下接种前需对干细胞活性鉴定、干细胞分化潜能和干细胞表面标志物 Nestin 进行检测。

1.3 细胞皮下接种

选取裸鼠右下侧腹部为接种部位,采用皮下接种方式,根据分组情况分别移植各代 hNSCs 细胞球、单细胞悬液及 293T 细胞,细胞量为 1×10^7 只,接种后于接种局部作标记。

1.4 动物观察及组织处理

裸鼠在细胞接种后饲养 6 个月,定期观察接种裸鼠的接种部位有无出现肿块,有无发生疾病,精神及饮食情况。处死移植 6 个月后存活的裸鼠,解剖饲养过程中病死及接种满 6 个月后处死的裸鼠,取出接种局部的组织(若接种局部形成肿块则取下肿块组织)及肝脏、脾脏、心脏、肾脏进行组织病理切片和 HE 染色,并请资深病理学专家阅片,检测是否形成原位及异位肿瘤。

2 结果

各组裸鼠接种细胞后在各时间点的存活情况见表 1。阳性对照组裸鼠接种 293T 细胞后精神及饮食无明显异常;接种 20 天后,5 只裸鼠接种细胞的局部先后可触及质地较韧的小结节,移动度差,后结节的体积逐渐增大;接种 60 天后,5 只裸鼠的接种局部可见明显的肿块形成,质硬,活动度差,类圆形,直径约 1.0~1.3 cm(图 1a);接种 180 天后,将裸鼠处死,解剖取出肿块,经病理切片及 HE 染色后证实是肿瘤(图 2a)。各组裸鼠接种 hNSCs 后均能存活至 90 天以上,接种 90 天后,各组裸鼠除有 1~2 只病死外,均有 3 只以上存活至 180 天,具体死因尚不明确,推测感染可能性大。病死的裸鼠死前数日出现精神萎靡,饮食减少。余各组裸鼠精神及饮食均无明显异常。各组裸鼠接种 hNSCs 后接种部位的局部未见异常情况,未见肿块或结节形成(图 1b)。对饲养过程中病死的裸鼠及时取回,对存活至 180 天的裸鼠进行处死,对病死及处死的裸鼠进行解剖,取出接种局部的组织及肝脏、脾脏、心脏、肾脏进行固定,并行组织病理切片和 HE 染色(图 2b、图 2c、图 2d、图 2e、图 2f)。

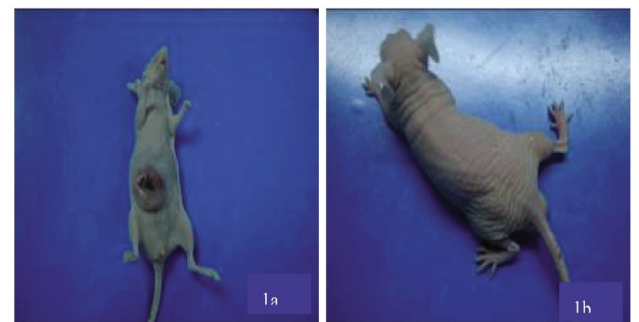


图 1a 接种 293T 细胞 60 天后可见明显肿块形成;图 1b 接种 hNSCs (60 代 细胞球)180 天后未见明显肿瘤形成

Fig. 1a Clearly visible tumor formed 60 days after inoculation of 293T cells. Fig. 1b No clear tumor formed 180 days after inoculation of hNSCs (60 passage's cell spheres)

表 1 细胞接种后各时间点各组裸鼠的存活情况

Table 1 The survival of mice in each group at each time point after cell inoculation

	1 days	30 days	60 days	90 days	120 days	150 days	180 days
293T cells	5	5	5	5	5	5	5
N1	5	5	5	5	4	4	3
S1	5	5	5	5	4	3	3
N25	5	5	5	5	4	4	4
S25	5	5	5	5	4	4	3
N40	5	5	5	5	5	5	5
S40	5	5	5	5	5	4	3
N60	5	5	5	5	4	3	3
S60	5	5	5	5	4	4	3

注:N1:第 1 代神经球;S1:第 1 代单细胞悬液;N25:第 25 代神经球;S25:第 25 代单细胞悬液;N40:第 40 代神经球;S40:第 40 代单细胞悬液;N60:第 60 代神经球;S60:第 60 代单细胞悬液。

Note: N1: the 1st passage's neurospheres; S1: the 1st passage's single cell suspension; N25: the 25th passage's neurospheres; S25: the 25th passage's single cell suspension; N40: the 40th passage's neurospheres; S40: the 40th passage's single cell suspension; N60: the 60th passage's neurospheres; S60: the 60th passage's single cell suspension.

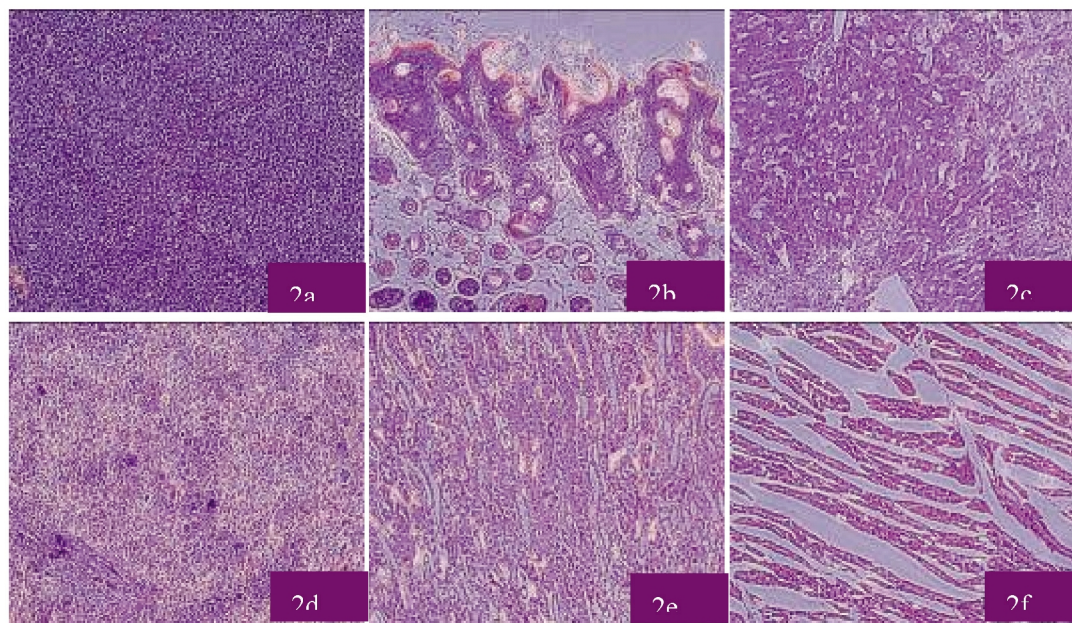


图 2a 接种 293T 细胞后形成的肿块组织(HE 染色 光镜× 20);图 2b 接种 hNSCs(60 代 细胞球)180 天后切取的原位组织(HE 染色 光镜× 20);图 2c 接种 hNSCs(60 代 细胞球)180 天后切取的肝脏组织(HE 染色 光镜× 20);图 2d 接种 hNSCs(60 代 细胞球)180 天后切取的脾脏组织(HE 染色 光镜× 20);图 2e 接种 hNSCs(60 代 细胞球)180 天后切取的肾脏组织(HE 染色 光镜× 20);图 2f 接种 hNSCs(60 代 细胞球)180 天后切取的心脏组织 (HE 染色 光镜× 20)

Fig. 2a Lump tissue formed after inoculation of 293T cells (HE staining, light microscopy × 20). Fig.2b Tissues of situ 180 days after inoculation of hNSCs(HE staining, light microscopy × 20). Fig.2c Tissues of liver 180 days after inoculation of hNSCs(HE staining, light microscopy × 20). Fig.2d Tissues of spleen 180 days after inoculation of hNSCs(HE staining, light microscopy × 20). Fig.2e Tissues of kidneys 180 days after inoculation of hNSCs (HE staining, light microscopy × 20). Fig.2f Tissues of heart 180 days after inoculation of hNSCs(HE staining, light microscopy × 20)

3 讨论

尽管干细胞具有巨大的临床应用前景,为一些难治性疾病治疗带来了突破性进展的可能性。但干细胞的安全性特别是其致瘤性越来越受到人们的关注和担忧,尤其是在 ESCs 移植入体内后易于发生畸胎瘤的现象之后。人胎脑源神经前体细胞是否像胚胎干细胞一样易于致瘤,目前国内外医学界对此尚未形成统一的认识。因此,在胎脑源神经前体细胞应用于临床之前,有必要对其致瘤性进行全面的评估。

裸鼠已成为检测细胞体内致瘤性的一种有效动物模型^[14-16]。由于裸鼠先天性缺失胸腺,导致胸腺依赖性免疫功能缺失,异种细胞移植时不产生免疫排斥反应。裸鼠在免疫、肿瘤、细胞移植及药品安全性评估方面的重要性越来越受到人们的重视。国内外诸多学者多选用裸鼠作为动物或人类的组织、细胞移植的动物模型,操作性强,结果真实可靠,重复性强。已有实验证明,裸鼠皮下接种致瘤性强的细胞,在特定环境下可生长成实体瘤,并能保持原发瘤的组织形态和染色体组型,而正常鼠皮下接种致瘤性细胞却无肿瘤形成。

有学者^[17]认为长期体外培养的人神经干细胞具有自发恶性转化的倾向,提示人神经干细胞在体外培养所传的代数越高,其致瘤性越高。另外,在培养、制备神经干细胞的过程中,会出现细胞球及单细胞悬液两种制剂,这两种制剂的致瘤性是否也有差别,目前仍无相关的研究。因此,在本实验研究中,我们将人胎脑源神经前体细胞体外培养至第 1、25、40、60 代,并且

均制备成神经球及单细胞混悬液两种制剂,全面观察人胎脑源神经前体细胞的致瘤性,并选取 293T 细胞作为阳性对照,实验共分九组,接种于裸鼠皮下,每组接种五只裸鼠,观察 180 天未见肿瘤形成,亦未见其他异常结节或肿块形成,并取出肝、脾等脏器进行病理切片和 HE 染色,亦未发现肿瘤形成;而阳性对照 293T 细胞接种于裸鼠 20 天后可见明显肿瘤形成。人胎脑源神经前体细胞接种裸鼠后接种局部及内脏均未发现肿瘤形成,未提示其具有体内致瘤性。此外,本实验室所采用的培养方法没有使人胎脑源神经前体细胞发生恶性转化,从致瘤性方面初步证实了其临床移植的安全性。

近年来,在神经干细胞的研究取得一定进展的基础上,有学者提出了脑肿瘤干细胞的概念,其在分离、分化及发生学上与神经干细胞均有诸多类同^[18-21]。Nestin 在神经干细胞、神经前体细胞及瘤性神经细胞中均有表达,提示三者之间在细胞发生学上可能具有渊源关系。目前,脑肿瘤干细胞的研究尚处于起始阶段,对其的一些认识存在诸多争议,尚无直接证据证明脑肿瘤来源于神经干细胞。

本实验研究初步探索了体外培养的人胎脑源神经前体细胞的致瘤性,结果提示人胎脑源神经前体细胞不具有体内致瘤性。但由于本实验每组的细胞只接种了五只裸鼠,尚不能充分证明体外培养的人胎脑源神经前体细胞完全没有致瘤性,不能说明人胎脑源神经前体细胞用于临床细胞移植治疗绝对安全,大规模的临床实验仍需要继续研究探索。

参 考 文 献(References)

- [1] Temple S. CNS development: the obscure origins of adult stem cells [J]. *Current Biol*, 1999, 9(11): 397-399
- [2] Chi asson BJ, Tropepe V, Morshead CM, et al. Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics[J]. *J Neurosci*, 1999, 19(11): 4462-4471
- [3] Ourednik V, Ourednik J, Flax JD, et al. Segregation of human neural stem cell in the developing primate forebrain [J]. *Science*, 2001, 293(5536): 1820-1824
- [4] 马献昆, 李建华, 宋丽惠, 等. 成人脑神经干细胞体内外增殖、分化和迁移研究[J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2013, 12(5): 421-425
Ma Xian-kun, Li Jian-hua, Song Li-hui, et al. Study on the proliferation, differentiation and migration of neural stem cells derived from adult brain in vitro and in vivo [J]. *Chin J Neurosurg Dis Res*, 2013, 12(5): 421-425
- [5] 徐富翠, 邹礼乐, 梅欣明, 等. 神经干细胞培养及其影响因素[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 7(10): 1835-1840
Xu Fu-cui, Zou Li-le, Mei Xin-ming, et al. Culture of neural stem cells and the influencing factors [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research (CJTER)*, 2013, 17(10): 1835-1840
- [6] 岳英杰, 费昶, 张健. 神经干细胞向神经元分化调控的研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2012, 03: 584-587
Yue Ying-jie, Fei Chang, Zhang Jian. The development of Neural Stem Cells Differentiated to Neurons [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2012, 12(03): 584-587
- [7] Fan Ming-chao, Wang Qiao-ling, Liu Ke, et al. In vitro culture of human embryonic striatum-derived neural stem cells [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research (CJTER)*, 2013, 17(27): 5048 - 5056
- [8] 吴凌峰, 吴晓牧. 成体神经干细胞与微环境[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(19): 3538-3545
Wu Ling-feng, Wu Xiao-mu. Adult neural stem cells and the microenvironment [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research(CJTER)*, 2013, 17(19): 3538-3545
- [9] 尹国才, 栗佐, 胡晓红, 等. 人神经干细胞异种移植示踪检测分析[J]. *中华检验医学杂志*, 2006, 29(3): 254-257
Yin Guo-cai, Luan Zuo, Hu Xiao-hong, et al. Exploration of tracing and detecting xenografts derived from human neural stem cells[J]. *Chin J Lab Med*, 2006, 29(3): 254-257
- [10] 刘晓峰, 吴迪, 吴岩. 干细胞治疗阿尔茨海默病的现状及未来[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(40): 7132-7137
Liu Xiao-feng, Wu Di, Wu Yan. Stem cells for the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research(CJTER)*, 2013, 17(40): 7132-7137
- [11] 熊杰, 宁丽娜, 王再领, 等. 干细胞治疗神经退行性疾病的前景与问题[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(19): 3573-3580
Xiong Jie, Ning Li-na, Wang Zai-ling, et al. Prospects and problems of stem cells in the treatment of neurodegenerative diseases [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research (CJTER)*, 2013, 17(19): 3573-3580
- [12] 邢亮, 蒋正方. 神经干细胞治疗胶质瘤的实验研究进展[J]. *中国现代药物应用*, 2013, 7(10): 177-179
Xing Liang, Jiang Zheng-fang. The experimental research progress of the treatment of gliomas by neural stem cell [J]. *Chin J Mod Drug Apple*, 2013, 7(10): 177-179
- [13] 王向野, 张志友, 杨小鹏, 等. 神经干细胞侧脑室内移植治疗脑瘫鼠的实验研究[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2012, 17(6): 354-357
Wang Xiang-ye, Zhang Zhi-you, Yang Xiao-peng, et al. Treatment of cerebral palsy by transplantation of neural stem cells into the lateral ventricles in rats[J]. *Chin J Clin Neurosurg*, 2012, 17(6): 354-357
- [14] 谢富华, 王润秀, 李昌武, 等. BALB/C 小鼠乳腺癌移植模型的研究[J]. *赣南医学院学报*, 2008, 28(3): 316-317
Xie Fu-hua, Wang Run-xiu, Li Chang-wu, et al. Research on Hunman Breast Cancer Model in Nude Mice [J]. *Journal of Gannan Medical University*, 2008, 28(3): 316-317
- [15] 张洪, 鲍波. 浅谈国内 BALB/c 小鼠及 KM 小鼠的基本生物学特性[J]. *中国实用医药*, 2010, 5(3): 252-254
Zhang Hong, Bao Bo. The biological characters of BALB/c mice and KM mice in China[J]. *China Prac Med*, 2010, 5(3): 252-254
- [16] 白建华, 李立, 李晓延, 等. BALB/c 裸鼠与 SCID 小鼠皮下种植人肝癌模型的比较 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(31): 5843-5845
Bai Jian-hua, Li Li, Li Xiao-yan, et al. Subcutaneous implantation of human liver neoplasms in BALB/c naked mice and SCID mice [J]. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2011, 15(31): 5843-5845
- [17] Wu Wei-hua, He Qi-hua, Li Xiao-xia, et al. Long-term Cultured Human Neural Stem Cells Undergo Spontaneous Transformation to Tumor-Initiating Cells[J]. *International Journal of Biological Science*, 2011, 7(6): 892-901
- [18] 齐玲, 金宏, 丁丽娟, 等. 脑肿瘤干细胞的培养及生物学特性研究[J]. *中国实验诊断学*, 2011, 15(2): 227-228
Qi ling, Jin Hong, Ding Li-juan, et al. Culture and biological characteristics of brain tumor stem cells [J]. *Chin J Lab Diagn*, 2011, 15(2): 227-228
- [19] 王欣欣, 刘季平. 脑肿瘤干细胞的研究现状[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(14): 2637-2640
Wang xin-xin, Liu Ji-ping. Research progress in brain tumor stem cells [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2012, 16(14): 2637-2640
- [20] 彭硕, 龚熹, 汪艳璐, 等. 脑肿瘤干细胞分子生物学研究进展[J]. *江西科学*, 2011, 29(1): 55-58
Peng Shuo, Gong Xi, Wang Yan-lu, et al. Progress in the Molecular Biology Study of Brain Tumor Stem Cells [J]. *Jiangxi Science*, 2011, 29(1): 55-58
- [21] 邱实, 谭晓华, 黄辉. 脑肿瘤干细胞来源及表面标记物研究的新进展[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(6): 1095-1098
Qiu Shi, Tan Xiao-hua, Huang Hui. Progress in the source and surface markers of brain tumor stem cells [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2012, 16(6): 1095-1098