

神经干细胞的单层培养及分化过程中 HES1 和 MASH1 的表达变化

刘菲菲¹, 徐丽萍¹, 龙大宏^{1*}, 陈艳¹, 张君度¹, 龙静怡²

(1.广州医科大学人体解剖教研室,广东 广州 510182;2.南方医科大学 2011 级临床医学本科班,广东 广州 510515)

摘要:【目的】建立神经干细胞(NSC)体外培养方案,使 NSC 的体外可以得到增殖和分化,并检测 NSC 分化过程中 HES1 和 MASH1 的表达变化。【方法】无菌条件下取 SD 大鼠胚胎端脑,无血清悬浮培养,形成 P2 代神经球后,将神经球消化成单细胞,分为神经球悬浮培养和单层贴壁培养,并对两种不同培养方式下的 NSC 进行干性鉴定和分化能力鉴定。用不同浓度(20、40、80 $\mu\text{g}/\text{L}$)的脑源性神经生长因子(BDNF)诱导 NSC 分化,选出最合适的浓度。用 BDNF 最佳诱导浓度诱导 NSC 分化,Q-PCR 检测分化过程中 HES1 和 MASH1 的表达变化。【结果】神经球悬浮培养和单层贴壁培养均可得到的 NSC;分化 3 d 后,在不加入任何诱导因素的情况下,单层贴壁培养的 NSC 能更高比例[(19.55 \pm 1.09)%]地分化为 β -tubulin III 阳性细胞;BDNF 40 $\mu\text{g}/\text{L}$ 能诱导出更多的 β -tubulin III 阳性细胞[(34.17 \pm 0.60)%];在分化 1、3 和 7 d 时,Q-PCR 结果表明 MASH1 在 BDNF 诱导下组较 NSC 和对照组表达水平明显上升。【结论】单层贴壁培养的神经干细胞更利于分化为神经元,BDNF 为 40 $\mu\text{g}/\text{L}$ 时能诱导出更高比例的神经元,BDNF 可以诱导 MASH1 在 NSC 分化过程中表达明显上升。

关键词:神经干细胞;神经球;单层贴壁培养;分化;脑源性神经生长因子

中图分类号:R322.8 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-3554(2014)01-0018-07

Culture of Neural Stem Cell in Vitro and the Expression Changes of HES1 and MASH1 during Differentiation

LIU Fei-fei¹, XU Li-ping¹, LONG Da-hong^{1*}, CHEN Yan¹, ZHANG Jun-du¹, LONG Jing-yi²

(1.Department of Human Anatomy, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510182, China; 2.Department of Clinic Medicine, Grade 2011, Nanfang Medical University 510515, Guangzhou)

Abstract: 【Objective】 Culturing of NSC in vitro were investigated, in which NSC could proliferate and differentiate. The expression changes of HES1 and MASH1 were detected during the differentiation of NSC. 【Methods】 The cerebrums of rat embryos were separated in sterile working condition and cultured in serum-free medium. When the secondary neurospheres were formed, Accutase digested them into single cells. Then they were divided into two parts, one was cultured with suspension neurospheres, the other was plated to adherent monolayer. And the abilities of “stem” and “differentiation” in two methods were examined. NSC were induced with different concentrations (20, 40, 80 $\mu\text{g}/\text{L}$) of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) to differentiation, the best one was determined. After induced differentiation of NSC in the presence of BDNF, the expression changes of HES1 and MASH1 were detected. 【Results】 NSC were obtain in both of two. β -tubulin III-positive cells was higher in adherent monolayer culture (19.55 \pm 1.09)% than in suspension neurospheres without any inducing factor. NSC were more induced to β -tubulin III-positive cells within the BDNF of 40 $\mu\text{g}/\text{L}$ (34.17 \pm 0.60)%. After differentiation 1, 3, and 7 d, results of Q-PCR were showed that the relative quantities of MASH1 in BDNF group were significant higher than NSC or control. 【Conclusion】 The adherent monolayer culture was a better method for differentiation of neurons from NSC; BDNF of 40 $\mu\text{g}/\text{L}$ was a better concentration than any others; the expression of MASH1 could be increased by BDNF during differentiation of NSC.

Key words: neural stem cell; neurospheres; adherent monolayer culture; differentiation; brain-derived neurotrophic factor; notch signal pathway

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2014, 35(1): 18-24]

收稿日期:2013-08-20

基金项目:广东省自然科学基金(9151063101000016);广州市属高校科研计划项目(2012C042);广州医学院青年基金(L110526)

作者简介:刘菲菲,博士研究生,E-mail:feifeishui@sina.com; * 通信作者:龙大宏,教授,博士生导师,E-mail:dahonglong 88@aliyun.com

神经干细胞(neural stem cell, NSC)是一类可自我更新的多潜能细胞,有能力分化为神经元或神经胶质细胞,并在学习记忆和海马突触可塑性中起重要作用^[1]。在成体的一生中,NSC 都会经由神经发生而生成,它们可以分化、迁移,代替损伤、死亡或丢失的神经元^[2]。NSC 的这些性质,使它们在神经系统疾病中有很大的应用前景,可通过细胞移植代替疗法去治疗神经变性疾病^[3],如老年痴呆症。但是干细胞移植的临床应用仍存在很多问题^[4],首要面临的就用于移植的 NSC 来源。适合特定个体移植的 NSC 直接来源并不多,如果从供体直接移植到受体,少量的供体 NSC 很难达到有效的治疗效果,所以我们要建立 NSC 的体外培养方案,将获得的 NSC 在体外进行培养增殖,以得到足够量的可用于移植的 NSC。目前,神经干细胞的体外培养增殖多采用神经球悬浮培养和单层贴壁培养。神经球悬浮培养有很多优点,如神经球易于形成,且用起来较方便。但是随着神经球的体积越来越大,神经球内部的细胞由于无法接触到培养基,就会出现异质性;而且消化后的神经细胞较难再形成神经球^[5]。相比之下单层贴壁培养的 NSC 可以均一地与培养基接触,它们表现出更高的同质性。而且由于是单层细胞,更利于直接的检测和研究^[6-7]。NSC 分化受很多因素影响。研究表明,脑源性神经生长因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)不但可以维持神经元的生长和存活,还可以促进 NSC 增殖并诱导其分化为神经元^[8]。除了外界诱导因子外,NSC 内源基因的表达变化对其增殖和分化也有非常重要的调节作用。Notch 信号通路是 NSC 增殖分化过程中一个重要的调控通路^[9],研究表明,HES1 和 HES5 属于 bHLH 转录因子家族中的成员,有维持 NSC 增殖并抑制其分化的作用,另一个家庭成员 MASH1 则主要在 NSC 分化过程中表达。

本研究旨在建立 NSC 的体外培养方案,使 NSC 在体外得到较好的增殖。我们将神经球悬浮培养和单层贴壁培养两种方法结合应用并进行比较,试图寻找更好的体外培养方案,以得到纯度较高,增殖效果显著,且更利于分化为神经元的 NSC。然后在选定培养方案的基础上,用 BDNF 诱导 NSC 分化,选出最合适分化为神经元的浓度。最后在优化的培养方案和最佳诱导浓度下,检测 Notch 通路中相关基因的表达,初步探讨 NSC 的

分化机制。

1 材料与方法

1.1 动物和试剂

孕 14 ~ 16 d 的 SD 大鼠(购自广东省实验动物中心),Neurobasal 培养基 DMEM/F12 培养基、B27 添加剂、N2 添加剂(Gibco),bFGF 和 EGF (PrimeGene),Accutase,多聚赖氨酸(PDL)、兔抗 β -tubulin III 多抗,小鼠抗 GFAP 单抗(Sigma),兔抗 Nestin 多抗(Abcam),牛血清白蛋白(BSA, Sigma),TRITC 标记羊抗兔 IgG (Abcam),FITC 标记羊抗小鼠 IgG(北京博奥森生物技术有限公司),RNA 裂解液、反转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒(TaKaRa),其他试剂为国产分析纯。Q-PCR 中检测的基因及引物如表 1。

表 1 NSC 中所检测表达基因 Q-PCR 引物列表
Table 1 Q-PCR primers used to detect gene expression in NSC

Gene	Primer sequence
HES1	Forward 5'-TAACGCAGTGTGCGCTTCC-3'
	Reverse 5'-AGAGGTGGGCTAGGGAGTTTATG-3'
HES5	Forward 5'-AGCCGGTGGTGAGAAGAT-3'
	Reverse 5'-AGTTTGGAGTTGGGCTGGTG-3'
MASH1	Forward 5'-AGGCCCTACTGGGAATGGA-3'
	Reverse 5'-CCCTGTTGCTGAGAACATTGA-3'

1.2 NSC 的取材、培养和传代

孕 14 ~ 16 d SD 大鼠,颈椎脱臼处死后用 75% 的酒精常规消毒,迅速剖开腹部,拉出 Y 型子宫,用 75% 酒精消毒 2 次,置于预冷的 PBS 中,小心将全脑取出,用显微解剖镊分离出端脑,用预冷的 PBS 漂洗 2 次,置于预冷 DMEM/F12 中,将端脑剪碎(约 1 mm³),一起转移至 15 mL 离心管,并用巴斯特管小心吹打 100 ~ 200 次,制成单细胞悬液,25 °C,200 ×g 离心 5 min,弃上清,重复 3 次。用增殖培养基 DMEM/F12+B27 (20 mL/L)+bFGF+EGF (bFGF 和 EGF 终浓度为 20 μg/L)重新制成悬液,取 10 μL 与等体积 0.4% 台盼蓝混合均匀,活细胞计数。调整细胞密度至 5 × 10⁵ /mL,置于 37 °C、体积分数为 5% CO₂ 培养箱中培养。

培养 24 h 后,悬浮的细胞可形成 P1 代球,将

细胞转移至 50 mL 离心管,静置 30 min,使神经球自然沉淀,弃上清,加入新鲜的培养基,机械吹打传代。再培养 24 ~ 48 h 后可形成 P2 代球,200 ×g 离心 5 min,弃上清,加入 1 mL 的 Accutase 进行消化。消化 3 min 时,取少量液体到显微镜下观察,如果大部分细胞已成单细胞,即加入 ≥5 倍体积的 DMEM/F12 终止消化 (Accutase 被稀释后可自我消化);如果大部分细胞仍处未分开,可延长消化时间,但总时间不要超过 6 min。

将消化后的细胞分两部分,一部分悬浮培养,以 5×10^5 /mL 的密度接种到培养瓶中,每 48 h 半量换液。另外一部分单层贴壁培养,以 5×10^4 /cm² 的密度接种到 PDL 包被好的培养皿和 24 孔板中,每 48 h 半量换液,细胞融合度达到 80% 时用 Accutase 消化传代。

1.3 NSC 的分化

培养 48 h 后,悬浮培养的细胞可形成 P3 代球,200 ×g 离心 5 min 收集细胞,用分化培养基 DMEM/F12 (250 mL/L)+Neurobasal (750 mL/L)+B27 (10 mL/L)+N2 (5 mL/L)重悬细胞,接种到包有 PDL 的 24 孔板中。同时将之前接种到 24 孔板中单层培养的细胞培养基换成分化培养基。

1.4 NSC 的干性鉴定和分化能力鉴定

取培养 48 h 的 P3 代球悬浮液,接种到 PDL 包被的 24 孔板中,6 h 后,和单层贴壁培养的细胞同时行细胞免疫荧光 (immunofluorescence, IF) 染色,用 NSC 标记抗体 Nestin (1:200) 检测不同培养条件下是否得到 NSC。

分别提取培养 48 h 时的 P3 代球和单层贴壁细胞的 RNA,用荧光定量 PCR (Q-PCR) 技术检测 HES1 和 HES5 的相对表达量,比较不同培养方式下 Notch 信号通路的活化程度。

在 1.3 中,细胞在分化培养中培养 72 h 后,用神经元标记抗体 β -tubulin III (1:300) 和星形胶质细胞标记抗体 GFAP (1:600) 检测 NSC 的分化能力。

IF 染色步骤:①移去培养基,用预冷的多聚甲醛 (40 g/L) 固定 20 min;②BSA (100 g/L, PBS 配制) 室温封闭 30 min;③加入相应的一抗 (30 μ L/孔),贴上略小于孔的封口膜,4 $^{\circ}$ C 放置 36 h;④以下步骤开始避光,加入相应的结合荧光标记的二抗,室温 3 h;⑤加入 DAPI 溶液,室温 10 min;⑥加入适量甘油后,倒置荧光显微镜观察并拍照。以上①③④⑤每步之后用 PBS 洗 5 min × 3 次。

1.5 BDNF 诱导单层贴壁培养 NSC 分化

在选定单层贴壁培养为更好方案的前提下,我们用加入不同浓度 BDNF 的分化培养基处理单层贴壁培养的 NSC,诱导分化 72 h 后,用神经元标记抗体 β -tubulin III (1:300) 和星形胶质细胞标记抗体 GFAP (1:600) 检测 NSC 的分化能力。IF 染色步骤同 1.4。

1.6 HES1 和 MASH1 表达水平的变化

确定 BDNF 最佳浓度后,用 Q-PCR 的方法检测 BDNF 存在和不存在的条件下,相对 NSC, HES1 和 MASH1 表达水平的变化。

1.7 统计学分析

数据采用表示,用 SPSS17.0 进行统计学分析,主要统计方法是单因素方差分析和 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 NSC 的培养和增殖及干性鉴定

取自 14 ~ 16 d 胚胎鼠的 NSC 增殖迅速,原代培养的细胞可在 24 h 后形成 P1 代球,球与球之间会形成不同程度的融合,折光性好,细胞结合疏松,机械吹打可制成单细胞悬液。P2 代球可在传代后 24 ~ 48 h 形成,由十几个到几十个细胞组成,折光性好,细胞结合较之前紧密,已经不能通过机械吹打制成单细胞。P3 代球约 48 h 可形成,折光性好,由几个到十几个细胞组成,随着培养时间的延长可逐渐增大 1。单层培养的细胞在接种 2 h 后可贴壁。24 h 时观察细胞呈椭圆形,梭形或两极形态。48 h 后细胞多呈两极形态,少数呈梭形或 3 极形态。Nestin 染色结果表明,P2 代之后的两种培养方式都得到了纯度较高的 NSC,单层培养的 NSC 中, Nestin 阳性细胞率为 $(93.17 \pm 3.06)\%$ 。Q-PCR 结果表明,在不同培养方式之间,相对内参 β -actin 的表达量, HES1 ($P = 0.738, n = 3$) 和 HES5 ($P = 0.930, n = 3$) 的表达都没有显著性差异 (图 1)。

2.2 NSC 的分化能力鉴定

两种培养方式在撤掉 bFGF 和 EGF 之后均可分化,分化 72 h 后 IF 结果显示,单层培养和悬浮神经球, β -tubulin III 阳性细胞率分别为 $(19.55 \pm 1.09)\%$ 和 $(11.91 \pm 2.73)\%$; GFAP 阳性细胞率分别为 $(25.41 \pm 2.26)\%$ 和 $(39.71 \pm 3.87)\%$; 统计学分

析表明, β -tubulin III 阳性细胞率($P < 0.001, n = 3$)和 GFAP 阳性细胞率($P < 0.001, n = 3$)在不同培养方式之间差异有统计学意义(图 2)。

2.3 BDNF 诱导单层贴壁培养 NSC 分化

在单层贴壁培养的基础上, 在分化培养基中加入不同浓度的 BDNF 诱导 NSC 分化, 72 h 后 IF 结果显示, 不同浓度的 BDNF 诱导 β -tubulin III 阳性细胞率分别为: 对照组($18.47 \pm 0.09\%$), BDNF 20 $\mu\text{g/L}$ 组 ($24.09 \pm 0.38\%$), BDNF 40 $\mu\text{g/L}$ 组 ($34.18 \pm 0.60\%$) 和 BDNF 80 $\mu\text{g/L}$ 组 ($34.32 \pm 0.05\%$); GFAP 阳性细胞率分别为: 对照组($27.31 \pm 2.33\%$), BDNF 20 $\mu\text{g/L}$ 组 ($23.82 \pm 0.49\%$), BDNF 40 $\mu\text{g/L}$ 组 ($22.64 \pm 0.39\%$) 和 BDNF 80 $\mu\text{g/L}$ 组 ($22.64 \pm 1.39\%$); 统计学分析表明, β -tubulin III 阳性细胞率在 BDNF 组与对照组之间差异有统计学意义($P < 0.001, n = 3$), 其中 BDNF 20 $\mu\text{g/L}$ 与其它两组间差异有统计学意义($P < 0.001, n = 3$); GFAP 阳性细胞率在 BDNF 组与对照组比较, 其中

BDNF 20 $\mu\text{g/L}$ 与对照组差异无统计学意义 ($P = 0.064, n = 3$), BDNF 40 $\mu\text{g/L}$ 和 BDNF 80 $\mu\text{g/L}$ 与对照组差异有统计学意义 (分别 $P = 0.049, P = 0.041, n = 3$), BDNF 各组间差异无统计学意义(图 3)。

2.4 HES1 和 MASH1 表达水平的变化

确定了单层贴壁培养的培养方式, 筛选到了 BDNF 的最佳诱导浓度, 我们在这样的基础上, 检测 Notch 通路中 HES1 和 MASH1 表达量相对 NSC 的变化, 结果表明, 对照组和 BDNF 组相对 NSC 差异都有统计学意义。在同一分化时间点, 对照组和 BDNF 组之间比较, HES1 差异无统计学意义, MASH1 差异有统计学意义。各组间检验 P 值如附表 1, 相对表达量如图 4。

3 讨 论

NSC 增殖和分化的机制非常复杂。研究表明,

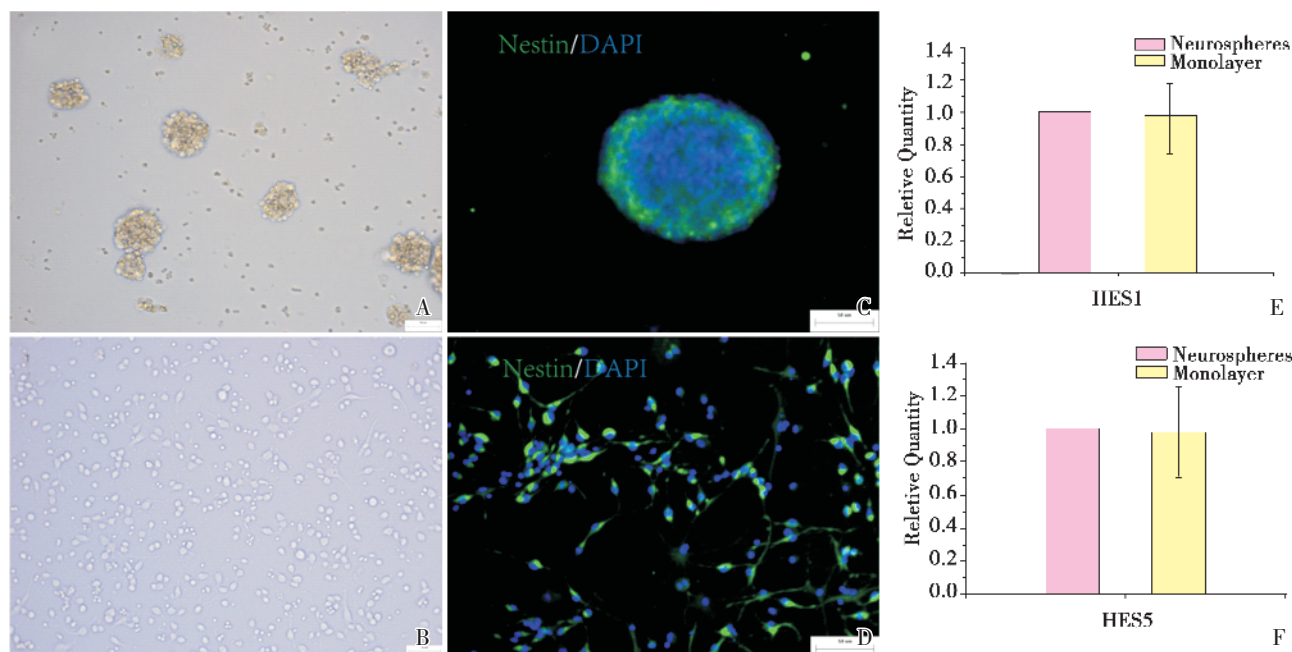


图 1 NSC 活细胞形态及干性鉴定

Fig. 1 Live cells morphology of NSC and identification the ability of "stem"

A: Tertiary neurospheres were formation from dissociated single cells at 2 d after digesting secondary neurospheres, but few of them aggregated. And there were some non-dividing adherent cells on the coat. B: Picture showed NSC at 2 d after being plated into PDL-coated wells. NSC in adherent monolayer culture were uniformity and separation in one single layer, morphology were oval, dipolar or few of them tripolar. C: Green color was brighter at the rim of sphere than in the middle, which suggested non-dividing cells were in the middle. D: Cells in monolayer were uniformly stained by distinct green color. E and F: β -actin was defined as endogenous gene and neurospheres as reference sample in each test. The relative quantity of RNA in monolayer was equivalent with the neurospheres, both HES1 and HES5.

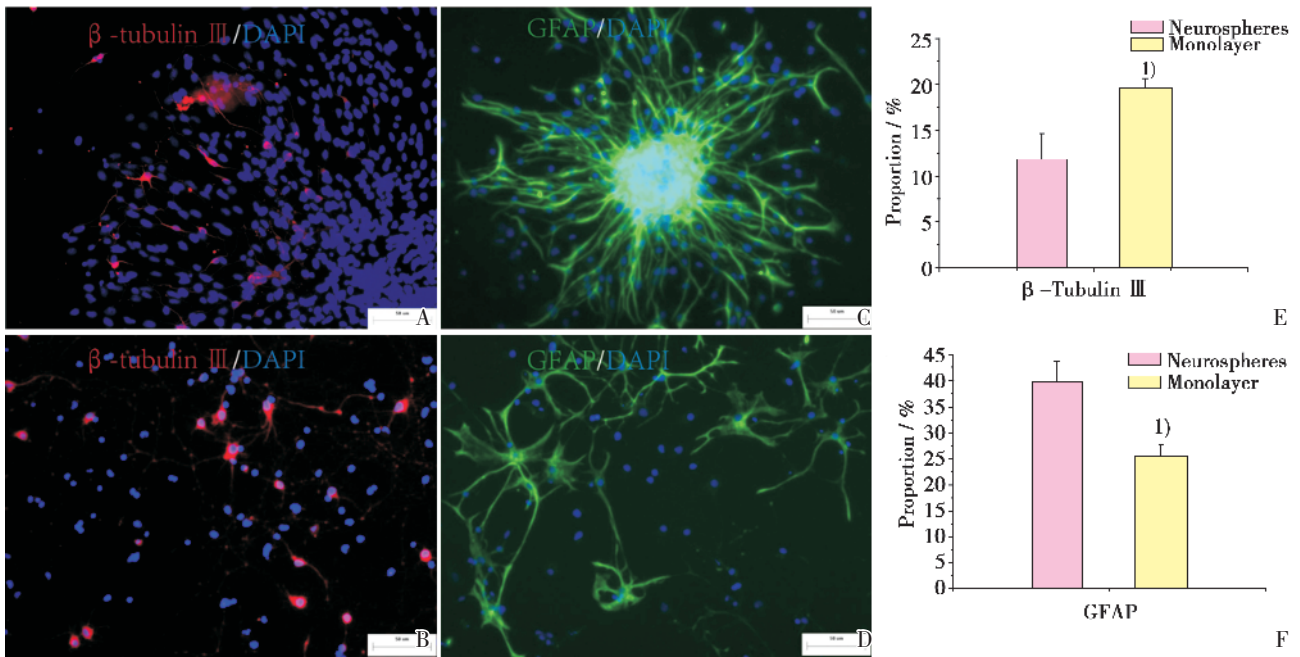


图 2 不同培养方式下 NSC 分化后的 β -tubulin III 和 GFAP 染色及比例

Fig.2 The stains and proportions of β -tubulin III and GFAP after differentiation of NSC in two culture modes

A: β -tubulin III-positive cells were stained at the migrated cells of the sphere. B: β -tubulin III-positive cells were stained uniformly in monolayer. C: GFAP-positive cells were stained both at the migrated and middle cells of the sphere. D: GFAP-positive cells were stained uniformly in monolayer. E: Proportion of β -Tubulin III is higher in monolayer than in neurospheres. F: Proportion of GFAP is lower in monolayer. 1) $P < 0.05$ (vs. Neurospheres group).

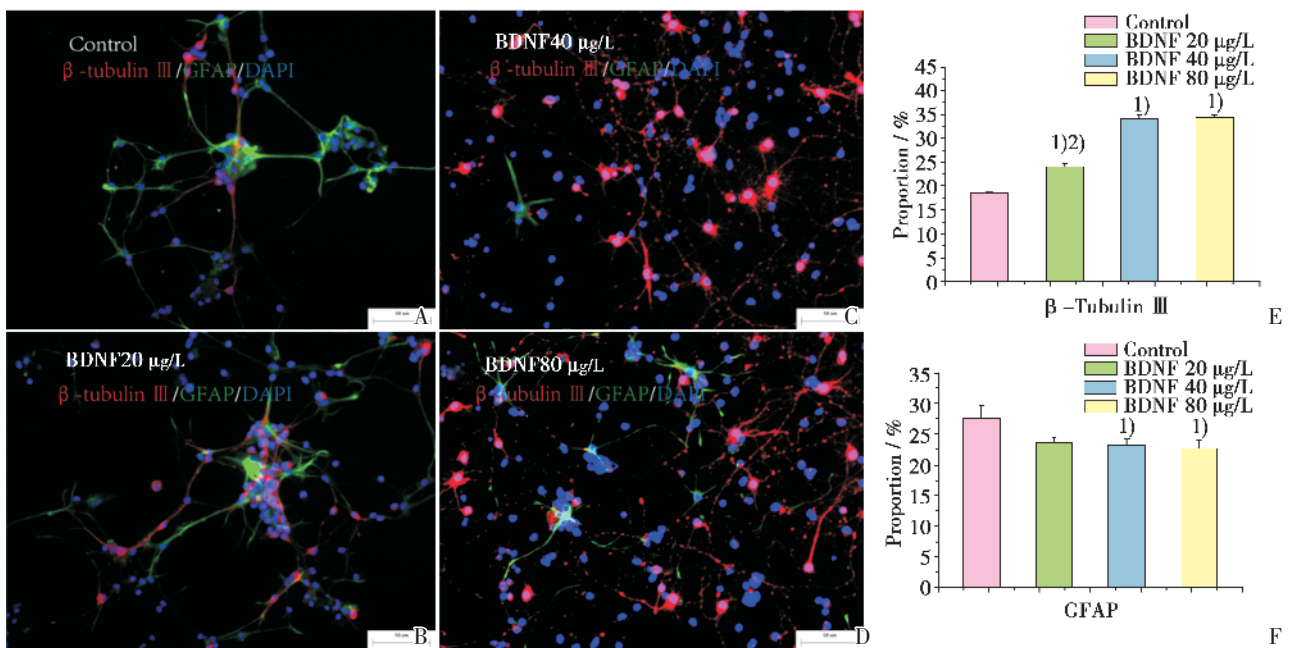


图 3 不同浓度 BDNF 诱导 NSC 分化后 IF 双染及比例

Fig.3 Double-stains and proportions of differentiation cells of NSC in different concentrations of BDNF (20 x)

After differentiation 72 h, β -Tubulin III and GFAP-positive cells were stained brightly. As the disperse cells, counts of different stains became easy. E: Proportions of β -Tubulin III in BDNF groups are higher than control. It is lower in BDNF 20 $\mu\text{g/L}$ than other two BDNF groups, there is no significant difference between BDNF 40 $\mu\text{g/L}$ and BDNF 80 $\mu\text{g/L}$. F: Proportion of GFAP in BDNF groups are lower than control, but there is no significant difference among BDNF groups. 1) $P < 0.05$ (vs. Control group), 2) $P < 0.05$ (vs. BDNF 40 $\mu\text{g/L}$).

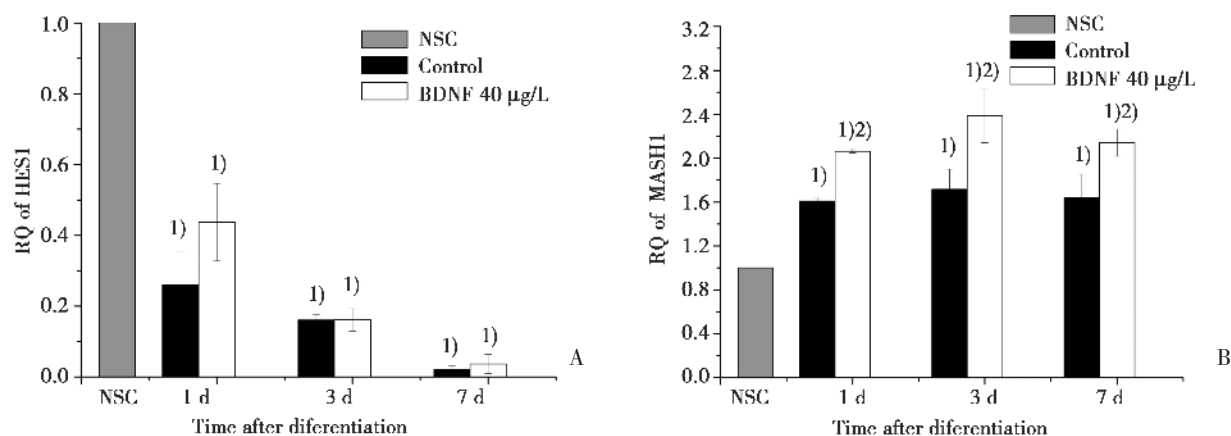


图 4 HES1 和 MASH1 相对表达量的变化

Fig. 4 Relative quantity changes of HES1 and MASH1

β -actin was defined as endogenous gene and NSC as reference sample in each test. A: The relative quantities of HES1 in differentiated groups were significant lower than in NSC in all time points, but there were no significant difference between control and BDNF group in each time point. B: The relative quantities of MASH1 in differentiated groups were significant higher than in NSC in all time points, and they were significant higher in BDNF than control in all time points. 1) $P < 0.05$ (vs. NSC), 2) $P < 0.05$ (vs. Control).

FGF和EGF等有丝分裂原可以促进NSC增殖^[10]。本实验IF结果表明,两种培养方式都得到了NSC。神经球不方便计数,因此我们用Q-PCR的方法,进一步比较了两种培养方式中Notch信号通路中相关基因的表达。Q-PCR结果表明,HES1和HES5在两种培养方式没有显著性差异,结合IF结果和活细胞观察结果,提示了两种培养方式都得到了高效增殖的NSC。

我们在实验中发现,如果将原代细胞直接进行单层贴壁培养,细胞中会有一定量的杂细胞,由于底面有PDL包被,使得NSC和杂细胞不能有效分开,而且培养48h后可发现,本来单层的细胞被聚在一起,可能是杂细胞中的胶质细胞的作用^[6]。悬浮培养时,杂细胞会贴在底面,而处于增殖状态的NSC悬浮在培养基中,培养几天后,可纯化去掉大部分的杂细胞。因此先悬浮培养几天后再进行单层培养,是一种比较高效可行NSC的纯化方式。之前有实验室用单克隆化及单层化的培养方式纯化细胞,纯化5代后,得到了Nestin阳性率达99%的高纯度神经球,不过这种方式在之后分化为神经元的过程中是否依然保持优势,文中只给了细胞分化的图片,并没有给出具体的数据^[11]。

但是无论是悬浮培养,还是单层贴壁培养,传代到一定程度后,细胞增殖都变得缓慢。悬浮培养的神经球传到P6代以后,细胞增殖开始变得缓

慢,培养7d后,神经球一般也只有增殖来的几个到十几个细胞组成,而且细胞结合紧密,不易再消化使之分离。单层贴壁细胞传代3次以后,细胞增殖变得缓慢,在底面分布不均,培养4d后,有些地方融合度可达80%以上,有些地方却仍保持在20%左右,几乎没有增殖。

虽然NSC的实验室培养技术已经变得普遍。它们在临床的广泛应用仍未解决。不仅是来源的问题,一个很重要原因是NSC很难分化为人们所期望的神经细胞,不能得到足够量的所期望的神经元类型,使NSC在细胞移植治疗中受到很大的限制^[12]。

本研究发现,P2代神经球形成时,大部分杂细胞已经被纯化去掉,而且由于生长时间不长,球内部细胞很少出现分化或死亡,因此由P2代神经球消化而来的细胞,在单层贴壁培养条件下,最有利于细胞的进一步增殖或下一步分化,且要比再悬浮培养的神经球更有利于向神经元方向分化。可能的原因是:细胞是一个同质较高的群体,分化过程不会受到杂细胞的影响;细胞均匀地暴露在培养基中,均匀地接触营养物质,更有利于自身基因的表达。细胞更多地分化为神经元,不但为我们得到更多预期神经元提供前提条件,更为我们研究NSC分化奠定基础。

神经球直接贴壁分化时,我们只能计数从球

上迁移出来的细胞的分化比例,而处于球内部的细胞团聚重叠在一起,无法计数,这种情况下得到的数据不能代表整体分化水平,不能为我们下一步研究提供可靠的依据。相比之下,单层贴壁培养的细胞互相分散,计数时不受干扰,可以更大程度地提供更准备科学的数据。我们在单层培养的基础上,用不同浓度的 BDNF 诱导分化,更科学更准备的计数为我们筛选 BDNF 的浓度提供了实验依据。

由于单层贴壁培养的细胞可以均匀地接触培养基,使得我们不仅在形态学上得到更准确科学的数字,在分子生物学水平,同样可以得到更准确科学的数字。我们的结果表明,HES1 在分化组中表达水平明显下降,但是 BDNF 的存在与否,对它的下降程度影响不大。MASH1 在分化组中表达水平明显上升,而且 BDNF 存在的情况下,其上升程度明显比对照组要高。可以看出 MASH1 从 NSC 开始分化到分化后期,一直保持着较高水平的表达。它的表达可以被 BDNF 诱导,与 IF 结果保持一致。

本研究首次创新性地应用神经球悬浮培养和单层贴壁培养相结合的方式,并且比较了 P2 代之后悬浮培养和贴壁培养在维持细胞干性和分化能力方面的差别。最终得出:原代细胞经过短暂的神经球悬浮培养,再进行单层贴壁培养的方案,不仅可以在较短的时间内纯化、得到高效增殖的 NSC,同时 NSC 自然分化时神经元的比例也有显著性提高。这一结论为我们下一步研究 BDNF 对 NSC 的诱导分化提供技术支持。HES1 和 MASH1 在 BDNF 诱导分化过程中表达变化的结果,为我们进一步研究 NSC 诱导分化机制奠定了基础。

参考文献

- [1] Song J, Kimberly C, Ming GL, et al. Modification of hippocampal circuitry by adult neurogenesis [J]. *Dev Neurobiol*, 2012, 72(7): 1032-1043.
- [2] Paspala SA, Murthy TV, Mahaboob VS, et al. Pluripotent stem cells—a review of the current status in neural regeneration [J]. *Neurol India*, 2011, 59(4): 558-565.
- [3] Farshad HM, Mohammad HNE, Hossein B, et al. Transplantation of primed or unprimed mouse embryonic stem cell-derived neural precursor cells improves cognitive function in Alzheimerian rats [J]. *Differentiation*, 2009, 78(9): 68-79.
- [4] Feng ZL, Gao F. Stem cell challenges in the treatment of neurodegenerative disease [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2012, 18(7): 142-148.
- [5] Singec I, Knoth R, Meyer RP, et al. Defining the actual sensitivity and specificity of the neurosphere assay in stem cell biology [J]. *Nat. Methods*, 2006, 11(3): 801-806.
- [6] Harish B, Jan HC, Suresh K, et al. A protocol for isolation and enriched monolayer cultivation of neural precursor cells from mouse dentate gyrus [J]. *Front in Neurosci*, 2011, 5: 1-10.
- [7] Michelle HT, Jerome R, Daniel JL. Reproducible expansion and characterization of mouse neural stem/progenitor cells in adherent cultures derived from the adult subventricular zone [J]. *Curr Protoc Stem Cell Biol*, 2012: Epub.
- [8] Chen BY, Chen LY, Luo ZJ, et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor Stimulates Proliferation and Differentiation of Neural Stem Cells, Possibly by Triggering the Wnt/b-Catenin Signaling Pathway [J]. *Neurosci Res*, 2013, 91(9): 30-41.
- [9] Alexandros K, Michalis K, Athanasios M, et al. Modelling the Delta1/Notch1 pathway: in search of the mediator(s) of neural stem cell differentiation [J]. *PLoS One*, 2011, 6(2): 1-13.
- [10] Nieto EV, Pignatelli J, Vicario AC, et al. A global transcriptome analysis reveals molecular hallmarks of neural stem cell death, survival, and differentiation in response to partial FGF-2 and EGF deprivation [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53594.
- [11] 丁道芳,邢三丽,宋后燕,等.大鼠胚胎神经干细胞单克隆化及单层化培养和鉴定[J].*生物化学与生物物理进展*, 2009, 36(1): 72-76.
- [12] Lia P, Elisabet A, Johan E, et al. Transcription factor-induced lineage selection of stem-cell-derived neural progenitor cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2011, 8(5): 663-675.
- Ding DF, Xing SL, Zhou MM, et al. The monolayer culturing of the neural stem cell clone and its qualification [J]. *Prog Biochem Biophys*, 2009, 36(1): 72-76.

(编辑 徐杰)