

小鼠胚胎干细胞植入大鼠脑内存活和增殖

刘述¹, 谢瑶¹, 黄冰², 陈系古², 姚志彬¹

(中山大学中山医学院 1. 人体解剖学教研室, 2. 实验动物中心, 广东 广州 510089)

摘要:【目的】观察小鼠胚胎干细胞(ES 细胞)植入大鼠的隔区和海马内后存活和增殖的情况。【方法】以 SD 大鼠为宿主, 将 BrdU 标记的 ES 细胞植入宿主的隔区和海马内, 移植后 1、2、3、4 和 8 周后取脑, 冰冻切片, 进行尼氏、BrdU、PCNA 免疫组织化学染色, 观察 ES 细胞存活和增殖的情况。【结果】ES 细胞移植入大鼠隔区和海马内后, 从第 1 周到第 3 周, 移植物呈团块生长, 第 4 周移植物较第 3 周缩小, 第 8 周末未发现移植物; BrdU 和 PCNA (核增殖抗原) 免疫染色结果阳性。【结论】小鼠 ES 细胞移植入大鼠隔区和海马内后, 可以存活增殖 4 周左右。

关键词: 干细胞; 胚胎; 脑组织移植; 组织存活

中图分类号: R394.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-257X(2002)05-0328-03

Survival and Proliferation of Mouse Embryonic Stem Cells after Transplantation into the Adult Rat Brain

LIU Shu¹, XIE Yao¹, HUANG Bing², CHEN Xi-gu², YAO Zhi-bin¹. (1. Department of Anatomy, 2. Experimental Animal Center, Zhongshan Medical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510089, China)

Abstract 【Objective】To observe the survival and proliferation of embryonic stem cells (ES cells) of mice after transplantation into the adult rat brain. 【Methods】BrdU marked ES-BALB/C cells were implanted into the septum and hippocampus of adult rat brain and PCNA and BrdU were used to detect the implanted donor cells in the host brain. In addition, survival and proliferation of ES cells were observed in the rat brain. 【Results】From week 1 to week 3 after transplantation, the ES cells appeared either inside the septum or inside the hippocampus as a roundish mass. Compared with that at week 3, the grafts volume began to decrease at week 4. Both the BrdU marked cells and the PCNA positive cells appeared inside the mass. 【Conclusion】Transplanted ES cells can survive and proliferate for about 4 weeks in the septum and hippocampus of the rat brain after transplantation.

Key words: stem cells embryonic; brain tissue transplantation; tissue survival

组织工程学的核心是种子细胞和生物材料构建三维复合体, 而在我国种子细胞的研究进展明显滞后^[1], 作为构成组织器官的基本单元, 种子细胞在体外培养过程中其特有的表达功能逐渐丧失, 难以从少量的细胞经体外培养扩增后获取大量细胞, 胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES cell)具有发育的全能性, 经定向诱导后可分化为各种类型的干细胞, 成熟细胞, 并且在体外本质上可无限量的产生子代细胞^[2], 故可以作为组织工程研究中种子细胞的来源^[3], 目前大部分关于 ES 细胞的研究是在体外进行, 在体内环境中 ES 细胞能否存活, 增殖和分化的研究报道较少, 有人曾将 ES 细胞在体外诱导成神经干细胞后移入大鼠脑内^[4], 用 M6 抗体标记, 发现 ES 细胞在脑内存活, 增殖和分化, 并整合入大鼠脑中。本实验尝试将小鼠 ES-BALB/C 细胞直接移植入大鼠的隔区和海马内, 利用 BrdU 标记技术, 观察其在脑内存活和增殖的情况,

为通过组织工程治疗退行性疾病提供基础研究资料。

1 材料和方法

1.1 细胞悬液的制备

BALB/C 小鼠 ES 细胞系由陈系古教授提供^[5,6]。移植前 1 d, 在 ES 细胞培养液中加入 BrdU (5 mg/L) 培养 5 h, 去掉培养液, 用 DMEM 冲洗 2 遍后再用新鲜培养液培养 16 h, 准备移植用。移植当天, 培养的 ES 细胞经胰蛋白酶/EDTA 消化、吹打、细胞计数、离心等过程放入离心管等移植。

1.2 ES 细胞的立体定向移植

成年 SD 大鼠, 体质量 200~250 g, 雌雄不限。10 g/L 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 麻醉, 参照 Paxino 和 Watson 大鼠大脑图谱, 以前囟为坐标, 选出移植的靶点, 隔区: AP +0.4 mm, L 0.5 mm, V 6.5 mm。海马: AP -3.3 mm, L 2.5 mm, V 3.5 mm。

收稿日期: 2001-11-26

基金项目: 广东省重点攻关基金资助项目(203078)

作者简介: 刘述(1971-), 男, 安徽合肥人, 硕士。

用 5 μ L 微量注射器吸取 ES 细胞悬液 4.5 μ L (约 4 万个细胞) 分别注入大鼠的隔区和海马内, 注射速度 1 μ L/min。留针 10 min。等量 D-Hanks 液注入移植对照组的隔区和海马。

1.3 组织切片制备

手术后 1、2、3、4 和 8 周, 处死动物。每时间点 5 只, 对照组每时间点 2 只。10 g/L 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔麻醉下, 开胸主动脉插管, 灌注生理盐水 70~100 mL; 接着 40 g/L 多聚甲醛溶液 500 mL (0.1 mol/L PB 配制, 4 $^{\circ}$ C, pH 7.4), 开颅取脑, 后固定 12 h (4 $^{\circ}$ C), 然后入 0.3 kg/L 蔗糖溶液 (0.1 mol/L PB 配制) 中置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱至脑组织沉底。冰冻连续切片, 片厚 30 μ , 每例分为 3 套切片, 分别用于 BrdU、增殖细胞核抗原 (Proliferation cell nuclear antigen, PCNA) 免疫组化反应, 尼氏染色。

1.4 BrdU、PCNA 免疫组化染色

BrdU 单克隆抗体 (1:500 SIGMA); PCNA 单克隆抗体 (1:200 DAKO), 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。次日入生物素结合的 IgG (1:200 SIGMA) 反应溶液, 室温 2 h, 生物素-卵白素-辣根过氧化物酶复合物 (1:200 SIGMA) 反应溶液, 室温 2 h; 0.5 g/L DAB 显色。苏木素轻度核复染。阴性对照: 用正常血清代替一抗, 其余过程同上, 结果为阴性。

1.5 ES 细胞移植物体积分析

每只移植组大鼠取出含有典型移植形态的尼氏染色切片 5 张, 通过装在镜内的测试网格 (0.01 mm²) 记录每张切片的面积, 再利用积分体积公式 $\pi \int_a^b f(x)^2 dx$, 用 SPSS 统计软件包进行统计分析。

2 结果

尼氏染色显示: ES 细胞移植后主要局限在移植区域内呈团块状生长, 与周围宿主细胞界限较清楚, 从移植后第 1 周到移植后第 3 周, 细胞移植团块逐渐增大, 到第 4 周较第 3 周缩小, 至第 8 周未发现移植植物存在。移植团块的体积大小不等, 最大的在海马移植区内可达 5 mm³, 在隔区达 0.5 mm³ 左右。移植物体积测量结果见表 1。移植物的 ES 细胞与周围宿主细胞相比, 胞核大, 染色深, 细胞突起少, 细胞间排列紧密 (图 1)。

BrdU 免疫组化染色结果显示 BrdU 阳性细胞核于移植后 1~4 周均可见, 而第 8 周未发现 BrdU 阳性细胞核存在, BrdU 阳性细胞核主要位于移

植区内, 核大小不等, 染色深浅不均, 在移植后随着时间的推移, BrdU 阳性细胞核 1 周和 2 周时为圆形, 成簇排列, 每簇 4~5 核, 3~4 周为斑点状, 散在排列 (图 2)。

PCNA 免疫组化结果显示移植后 1~4 周, 在移植区内有许多 PCNA 阳性细胞核, 形状为圆形, 大小均一, 染色深浅不一。PCNA 阳性细胞第 1 周数量较多, 随时间推移数量逐渐减少, 第 8 周 PCNA 阴性 (图 3)。

表 1 海马移植组和隔区移植组在不同时间段体积的变化
Table 1 Variation of hippocampus groups and septum groups' volume at different times ($\bar{x} \pm s$), $V / (\times 10^{-4} \text{mm}^3)$

<i>t</i> / week	Hippocampus group	Septum group
1	30.6 \pm 9.9	15.0 \pm 5.1
2	69.6 \pm 30.9	32.4 \pm 9.3
3	159.6 \pm 32.7	50.7 \pm 17.1
4	70.2 \pm 20.8	10.7 \pm 3.3

From 1st to 3rd week the groups volume grewed larger gradually, $P < 0.05$; the volume at 4th week became smaller than that in all other groups, $P < 0.05$

3 讨论

ES 细胞自 1981 年建系以来^[7] 在细胞与个体之间架起了一座桥梁, 为组织工程, 器官移植等研究开辟了新的途径^[8], 本课题利用 BrdU 标记技术研究 ES 细胞在脑内存活, 增殖的情况, 结果显示 ES 细胞不但能在脑内存活, 而且能增殖。这为通过细胞生物工程向临床提供器官移植的材料奠定了一定的基础。

BrdU 是一种胸腺嘧啶类似物, 在 DNA 合成时可被细胞摄取利用而参与 DNA 组成, 利用 BrdU 标记技术可以识别外源性 ES 细胞和观察其在脑内分裂增殖的情况。本实验结果显示: BrdU 阳性细胞核主要位于移植区内, 核大小不等, 颜色深浅不均。随着移植后时间的推移, 阳性细胞核逐渐由移植后第 1 周的圆形, 成团排列演变斑点状的, 散在排列。这说明 ES 细胞在脑内还在不断分裂增殖, BrdU 抗原随着细胞的不断分裂而在每个细胞核内的量逐渐减少。第 8 周结果显示未发现 BrdU 阳性细胞核存在, 有可能是免疫排斥反应作用使移植植物死亡, BrdU 在脑内被清除, 或细胞不断分裂, 导致每个移植细胞 BrdU 含量极少, 以至于测不

出,至于细胞是否迁移至别处,有待进一步研究。

PCNA 是一种核内蛋白质,它的出现明显与细胞增殖有关。在静止细胞,其量很少,G1 晚期开始增加,S 期达到高峰,G2、M 期明显下降。因此认为它可以作为评价细胞增殖状态的一个指标^[9]。本实验结果显示在移植区内仍有许多散在的 PCNA 阳性细胞,与宿主细胞混杂排列。表明移植后 1~4 周脑内的 ES 细胞仍有增殖性,尚未完全分化成熟,但随时间推移增殖性逐渐减弱。

由我们的研究结果,分析 ES 细胞在脑内存活增殖的主要因素有 3 个方面:①ES 细胞是高度的未分化细胞,具有很强的增殖能力和生命力,在体外培养时 8~16 h 分裂 1 次。与神经前体细胞相比,移植后 ES 细胞存活和生长的机会更大。②已有的研究表明,在大鼠海马内含有大量的神经营养因子,如 NGF、BDNF、bFGF 等,还有丰富的血液供应,这种环境应当非常适合 ES 细胞的生长,增殖。此外,在海马内的移植物体积较隔区内的大,表明海马的内环境更有利于移植物的生长。③脑属于器官、组织移植的免疫赦免区,与其他植入部位比较,同种或异种移植物在脑内存活时间更长,存活率更高^[10]。另外 ES 细胞是高度未分化细胞,与免疫有关的 I 型 MHC 复合体尚未充分表达,这也为移植物存活提供了极大方便。本课题虽然将小鼠细胞移植进大鼠,但并未使用免疫抑制剂,结果表明短期内细胞仍然能较好的存活,增殖。但长期效果并不理想,因在本实验中,移植 8 周后的大鼠脑内未发现移植物存在,可能与异种 ES 细胞免疫排斥有关。

ES 细胞进行脑移植如应用于临床,有些移植问题仅通过动物实物无法回答:一是因为动物与人的分化发育机制有很大区别;二是因为 ES 细胞在脑内增殖,具有潜在的致瘤性,直到现在,还不清楚 ES 细胞在体内形成畸胎瘤的最小量,以及必需的

时间,小鼠、大鼠生命周期太短,无法提供足够的实验证据。本实验采用较小的细胞量移植,结果显示,移植进脑内的细胞存活情况良好,虽然有细胞增殖,但并未形成畸胎瘤,可能是不同种系间的移植,存在有一定的免疫排斥反应,我们研究室曾将 ES-BALB/C 细胞移植进同种系的小鼠脑中,结果 ES 细胞在小鼠脑内迅速增殖成一巨大的胚胎性组织,压迫宿主脑组织并使之变形,移植后 3 周,多数小鼠因移植物压迫而死亡(文章待发表)。

(本文图 1~3 见封 4 Fig. 1~3 Shown in back cover)

参考文献:

- [1] 翁雨来,商庆新,曹谊林. 生命科学的新增长点-组织工程[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2000, 10(5): 249.
- [2] Matsui Y, Zsebo K, Hogan B L. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture [J]. *Cell*, 1992, 70(5): 841.
- [3] 钟秀凤. 多能胚胎细胞作为种子细胞应用潜力的研究概况 [J]. 上海生物医学工程, 2000, 21(4): 51.
- [4] Brustle O, Maskos U, McKay R D. Host-guided migration allows targeted introduction of neurons into the embryonic brain [J]. *Neuron*, 1995, 15(6): 1275.
- [5] 陈系古,黄冰. BALB/Cj 小鼠胚胎干细胞系的建立及其嵌合体小鼠的产生 [J]. 中山医科大学学报, 2000, 21(2): 封 2.
- [6] 黄冰,陈系古,邓新燕,等. BALB/C 小鼠 ES 细胞系的建立及其嵌合体小鼠的获得 [J]. 细胞生物学杂志, 2001, 23(1): 28.
- [7] Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos [J]. *Nature*, 1981, 292(5189): 154.
- [8] Gardner R L, Brook F A. Reflections on the biology of embryonic stem (ES) cells [J]. *Int J Dev Biol*, 1997, 41(2): 235.
- [9] Bravo R, Frank R, Blundell P A, *et al.* Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase delta. [J]. *Nature*, 1987, 326(6112): 515.
- [10] Widner H, Brundin P, Bjorklund A, *et al.* Survival and immunogenicity of dissociated allogeneic fetal neural dopamine-rich grafts when implanted into the brains of adult mice [J]. *Exp Brain Res*, 1989, 76(1): 187.

(编辑 张恩健)