

· 基础研究 ·

## 胚胎干细胞源性与海马源性神经干细胞培养与分化的特性比较

陶靖<sup>1</sup>, 葛坚<sup>1</sup>, 黄冰<sup>2</sup>, 卓业鸿<sup>1</sup>, 陈慧怡<sup>1</sup>, 郭彦<sup>1</sup>, 陈系古<sup>2</sup>

(中山大学 1. 中山眼科中心, 2. 实验动物中心, 广东 广州 510060)

**摘要:**【目的】探讨胚胎干细胞(ESCs)源性神经干细胞(NSCs)与海马源性 NSCs 的培养条件与分化特性, 并进行比较研究。【方法】将拟胚体阶段视黄酸及视网膜 Müller 细胞诱导的 ESCs 和自 60 只 BALB/c 胎鼠海马组织分离的细胞(每次实验取 10 只), 分别在 NSCs 选择性培养基中进行 NSCs 培养筛选, 观察细胞形态变化, RT-PCR 法检测 Nestin 基因表达, 免疫细胞化学法检测 Nestin 等 NSCs 特异性标志物, 对其分化后细胞检测 Map2、Gap43、NF200、S100、GFAP 神经组织细胞标志抗原, 并对 6 次诱导结果进行观察比较。【结果】初级诱导的 ESCs 及海马细胞, 在 NSCs 选择性培养基中培养, 均形成大量呈 Nestin 抗原阳性, 整合 BrdU, 表达 Nestin 基因的神经球样结构, 且具有体外扩增传代及分化为神经元及神经胶质样细胞的能力。但 ESCs 源性 NSCs 增殖力更强, 且分化细胞中 NF200 阳性细胞率  $42.1\% \pm 3.6\%$  高于海马源性 NSCs 分化细胞中 NF200 阳性细胞率  $18.7\% \pm 5.1\%$ ,  $P < 0.01$ 。【结论】体外诱导可获得 ESCs 源性 NSCs, 与海马源性 NSCs 相比有更强的增殖力和向神经元分化的潜能, 可作为干细胞移植治疗青光眼等神经变性疾病研究新的种子细胞。

**关键词:**胚胎干细胞; 神经干细胞; 海马; 诱导; 青光眼**中图分类号:**R329.21;R775**文献标识码:**A**文章编号:**1672-3554(2003)03-0193-04

## Comparative Study on Culture and Differentiation of Neural Stem Cells Derived from Embryonic Stem Cells and Hippocampus

TAO Jing<sup>1</sup>, GE Jian<sup>1</sup>, HUANG Bing<sup>2</sup>, ZHUO Ye-hong<sup>1</sup>, CHEN Hui-yi<sup>1</sup>, GUO Yan<sup>1</sup>, CHEN Xi-gu<sup>2</sup>  
(1. Zhongshan Ophthalmic Center, 2. Experimental Animal Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

**Abstract:**【Objective】To explore the culture condition and differentiation of embryonic stem cells(ESCs)-derived neural stem cells(NSCs) and hippocampus-derived NSCs *in vitro*. 【Methods】Embryonic bodies induced by retinoic acid and retinal Müller cells were selected in NSCs-defined medium. So did cells isolated from hippocampus of 60 E18 BALB/c mice (10 mice in each experiment). The morphological changes and ability of expansion and differentiation of cells from two different origins were comparatively analyzed. Nestin antigen and BrdU incorporation were detected in the selected cells by immunocytochemistry and RT-PCR. 【Results】Large amount of neurospheres were derived from both embryonic body and hippocampus in the selected medium, which could be passaged and differentiated, stained positive with Nestin and BrdU, and expressed Nestin gene. The percentage of NF positive cells obtained from differentiation of ESCs-derived NSCs was  $42.1\% \pm 3.6\%$ , which was significantly higher than that from hippocampus-derived NSCs  $18.7\% \pm 5.1\%$ ,  $P < 0.01$ . 【Conclusion】NSCs derived from ESCs have potentially much more powerful ability than hippocampus-derived NSCs to expand and differentiate into neurons, and would play a new alternative role in stem cell transplantation to treat neuropathy of glaucoma and other retinal diseases.

**收稿日期:**2002-11-01**基金项目:**国家重点基础研究发展规划基金(1973)资助项目(G1999054301);国家自然科学基金资助项目(30000187, 39770789, 39700153, 30171001);广东省自然科学基金资助项目(990092, 010746);中山医科大学“211工程”基金资助项目(98010)**作者简介:**陶靖(1974-),女,山东潍坊人,博士;葛坚,教授,博士生导师,通讯作者,课题负责人。

**Key words:** embryonic stem cells; neural stem cells; hippocampus; induction; glaucoma

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2003, 24(3): 193 ~ 196]

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)是神经系统的先祖细胞,可分化为神经元、神经胶质细胞和少突胶质细胞,具有自我更新、增殖力强及多向分化的特性。虽然成年体内某些部位潜伏有 NSCs,但因数量少无法发挥代偿作用。因此,目前多采用组织分离 NSCs 后体外扩增再移植。这已用于帕金森病等神经变性疾病的研究,但仍存在取材困难及扩增能力有限等问题。胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)具有分化全能性及体外无限扩增能力,易于基因操作等特点,有望成为 NSCs 的新来源。本研究将 ESCs 源性 NSCs 与海马源性 NSCs 的培养与分化特性进行比较观察,为青光眼等神经疾病的治疗提供新思路。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

细胞: BALB/c ES 细胞株<sup>[1]</sup>, E18 BALB/c 胎鼠(中山大学实验动物中心)。ESCs 培养基: DMEM + 200 mL/L FBS + 0.55 mmol/L  $\beta$ -ME +  $10^6$  IU/L LIF(Gibco 公司); 拟胚体(embryonic body, EB)培养基: DMEM + 200 mL/L FBS + 0.55 mmol/L  $\beta$ -ME; NSCs 选择性培养基: DMEM/F12 + 20 mL/L B27 + 20 ng/mL bFGF(Peprotech 公司); NSCs 分化培养基: DMEM/F12 + 10 mL/L N2 + 10 mL/L FBS。消化液(2.5 g/L 胰酶 + 0.1 g/L EDTA), 中止液(0.1 g/L 胰酶抑制剂 + 0.1 g/L DNA 酶 + DMEM/F12), 视黄酸(retinoid acid, RA)(Sigma 公司)。单克隆抗体: Nestin(Chemicon 公司), NF200、BrdU、Map2(Sigma 公司), S100(Neomarkers 公司), 多克隆抗体 Gap 43、GFAP(Santa Cruze 公司), 二抗: cy3-goat anti mouse IgG(KPL 公司)。Trizol、二步法 RT-PCR 试剂盒(Invitrogen 公司)。引物: actin(569 bp); Nestin(327 bp)由上海生工生物工程技术有限公司合成。

### 1.2 ESCs 源性 NSCs 的培养<sup>[2]</sup>

ESCs 克隆消化为单细胞后,以  $2 \times 10^5/cm^2$  的密度种植于无粘附性的玻璃培养瓶中,用 EB 培养基进行 EB 的悬浮培养。2 d 后换液,同时加入  $1 \mu mol/L$  RA 并与 BALB/C 新生鼠视网膜 Müller 细胞共培养,诱导 2 d。培养 4 d 的 EB 以  $2 \times 10^5/cm^2$  的密度种植于 12 孔板。经 24 h 培养,细胞贴壁后

换为 NSCs 选择性培养基。每日换液进行 NSCs 的筛选培养扩增 7 d。

### 1.3 海马源性 NSCs 的培养<sup>[3]</sup>

将 10 只 E18 BALB/c 胎鼠取脑剥离脑膜,分离出海马。漂洗后剪碎,37 °C 消化 10 min,中止液中止消化后,离心去上清,加入 NSCs 培养基,200 目滤网过滤,使成单细胞。以  $2 \times 10^5/cm^2$  的密度种于培养瓶中,每 3 d 半量换液。

### 1.4 ESCs 源性及海马源性 NSCs 的分化与鉴定

收集培养 7 d 的细胞克隆球,消化为单细胞后,加入上述 NSCs 选择性培养基继续传代培养,观察体外扩增能力;取培养 7 d 的 NSCs 用 RT-PCR 法检测 NSCs 标志 Nestin 基因的表达<sup>[4]</sup>。用  $10 \mu mol/L$  BrdU 标记 24 h 后固定,免疫细胞化学法进行 Nestin 抗原<sup>[5]</sup>及细胞增殖期标志 BrdU、成熟神经组织细胞标志抗原 NF200、MAP2、GAP43、S100、GFAP 等的检测;将培养 7 d 的细胞克隆球,改用 NSCs 分化培养基,进行分化培养 7 d。固定后免疫荧光细胞化学法检测 Nestin、成熟神经元特异性标志抗原 NF200、MAP2、GAP43,神经胶质细胞标志抗原 S-100、GFAP 的表达。

### 1.5 细胞计数与统计学处理

细胞免疫荧光染色后,随机选取 10 个非重叠视野( $100 \times$ ),计算荧光显微镜下免疫荧光阳性细胞数占同一视野相差显微镜下总细胞数的百分比,取 10 个百分比的平均值作为一次实验的阳性率。重复实验 6 次。记录结果用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 *t* 检验进行两组神经元样细胞阳性率的比较。

## 2 结 果

### 2.1 ESCs 源性 NSCs 的培养与分化特性

ESCs 消化为单细胞后,在 EB 培养基中形成悬浮生长的 EB 克隆球。将经初级诱导悬浮培养 4 d 的 EB 种植于培养板上,经 24 h 培养,EB 贴壁且周边有展平趋势。换为 NSCs 选择性培养基后第 1 天,EB 周围上皮样细胞迁移形成圆晕。第 2~4 天,EB 表面及周边大量上皮样细胞死亡脱落,中央可见致密而透亮的细胞克隆球生成。随后球体逐渐增大,克隆球数量增多,部分悬浮于培养基中。7 d 时形成大量形态规则一致,折光力强的细胞克隆球(图 1)。

筛选培养 7 d 的细胞克隆球, Nestin 基因呈高

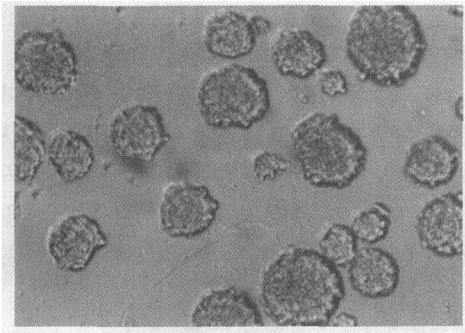


图1 ESCs源性NSCs克隆球

Fig. 1 ESCs-derived NSCs clones (100 ×)

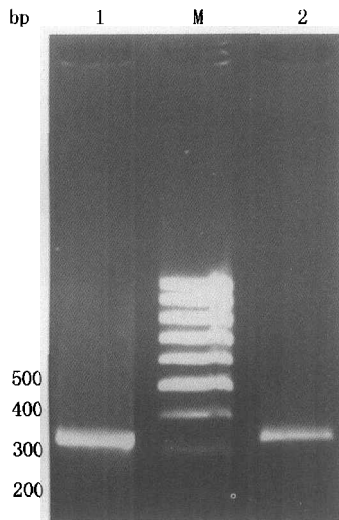


图2 ESCs源性NSCs和海马源性NSCs Nestin基因表达的RT-PCR结果

Fig. 2 RT-PCR results of Nestin gene in NSCs derived from ESCs and hippocampus

Lane 1: Nestin in ESC-derived NSCs; Lane M: 100 bp DNA ladder; Lane 2: Nestin in hippocampus-derived NSCs

表达(图2),而诱导前ESCs未测到相应表达。Nestin抗原染色呈强阳性,而成熟神经组织细胞抗原标志呈阴性,表明其处于NSCs的未分化阶段。BrdU染色阳性,表明其为分裂增殖期的细胞;消化为单细胞后3~4d,可再次形成与原代相似的细胞克隆球,表明具有体外扩增传代的能力;进行分化培养后,细胞克隆逐渐展平,且向周边迁移出大量神经上皮样细胞。第3~5天,迁移出的细胞逐渐伸出细小突起,呈双极状、多极状,克隆间突起的细丝相连成神经网络样结构。第7天时,分化的神经样细胞Nestin抗原阴性,可见成熟神经元标志抗原Map 2、Gap 43、NF 200阳性(图3),神经胶质细胞标志抗原S100、GFAP阳性(图4),表明筛选培养后的细胞具有向各种神经组织细胞分化的多向潜能性。细胞计数结果示,NF 200阳性细胞占42.1% ±

3.6%,而GFAP阳性细胞占45.4% ± 2.7%。

## 2.2 海马源性NSCs培养与分化特性

取自海马组织的细胞在NSCs选择性培养基中培养第1天,绝大部分细胞贴壁,第3~4天,生成大小不一、悬浮生长的小细胞克隆球,胞体透亮、致密,较规则,同时伴有大量细胞死亡。部分克隆球贴壁后极易分化,伸出细长突起。第7天时,克隆球体积增大,数量增多(图5),球内细胞胞体变暗,如不传代则逐渐老化、崩解,传代后可再次形成大量神经球。培养7d时,可检测到神经球表达Nestin基因(图2),呈Nestin抗原阳性,成熟神经组织细胞标志抗原阴性,且可整合BrdU,表明克隆球的细胞为具有增殖能力的NSCs。

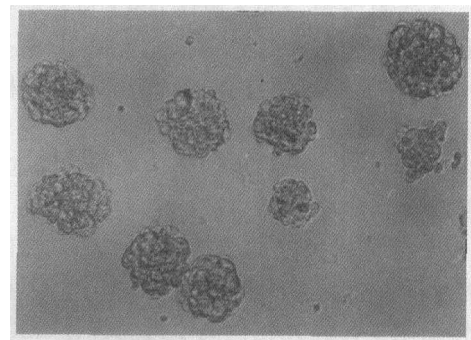


图5 海马源性NSCs克隆球

Fig. 5 Hippocampus-derived NSCs clones (100 ×)

将悬浮神经球置于有黏附性的培养板上,更换为分化培养基后,第2~3天,神经球变扁平,向周围伸出突起,细胞自球体迁移而出。第7天时,分化细胞主要呈现两种形态,一种胞体小而亮,呈圆形或卵圆形,有两个或多个细长突起,呈神经元标志抗原Map2、Gap43、NF200阳性(图6);另一种胞体扁平较大,呈三角形或不规则形,有多个短而粗大的突起并有分支,呈神经胶质细胞标志抗原S100、GFAP阳性(图7)。其中NF200阳性细胞占18.7% ± 5.1%,GFAP阳性细胞占66.3% ± 14.5%。神经元所占比例与ESCs源性NSCs相比差异有显著性( $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

### 3.1 ESCs源性与海马源性NSCs培养与分化的异同点

一方面,本研究中ESCs源性与海马源性NSCs比较有许多相同点。首先,二者均具有NSCs的基本特征:①呈现NSCs克隆球形态;②表达NSCs特异性标志Nestin基因及蛋白;③具有分裂增殖能力;

④具有自我更新及体外扩增传代能力;⑤可分化为神经元及神经胶质细胞。其次,二者均可通过 NSCs 无血清选择性培养基体外培养获得。体外诱导 ESCs 向 NSCs 分化的研究刚刚起步,目前多采用 Okabe 等建立的 ITSFn 无血清培养系统<sup>[6]</sup>,其诱导时间较长,需经十余天。本研究首次在 RA 对 EB 初级诱导后,借鉴海马分离 NSCs 培养方法,进行神经谱系干细胞的筛选培养扩增,7 d 即可获得大量纯度高的 NSCs,缩短了体外培养的时间,减少了基因改变的机率。

另一方面,本研究中 ESCs 源性与海马源性 NSCs 比较又有许多不同点。首先,就培养特性而言,ESCs 源性 NSCs 来源广,免疫源性低,易于基因操作。本研究发现,ESCs 源性 NSCs 可在贴壁及悬浮两种状态下生长,而海马源性 NSCs 只能呈悬浮态生长,贴壁后即使在 NSCs 培养基中也极易分化。这表明 ESCs 源性 NSCs 有更强的保持未分化状态并进行体外培养扩增的能力。但由于 ESCs 的潜在致瘤性,其来源的 NSCs 安全性不及海马源性 NSCs,今后可通过定向分化和纯化予以克服。其次,就分化特性而言,ESCs 源性 NSCs 可塑性更强,且分化细胞中神经元比例高于海马源性 NSCs 之神经元比例。已有学者将海马源性 NSCs 植入损伤的大鼠视网膜,未能测及视网膜特异性标志,分析海马源性 NSCs 可能存在分化能力的时空限定性<sup>[7]</sup>。ESCs 源性 NSCs 分化后细胞类型多样,形态上与海马源性 NSCs 相比尚不成熟,可塑性更强,易于对体内移植微环境产生应答。

### 3.2 ESCs 源性与海马源性 NSCs 的临床应用前景

青光眼是世界上第二位不可逆致盲性眼病,其视功能损害以视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 的丧失为主要特征,目前的治疗措施只能遏制部分早期疾病的发展,对于大部分 RGCs 已严重损害的晚期及绝对期患者,只有获取大量具有 RGCs 特性的细胞才可能从根本上解决问题<sup>[8,9]</sup>。近年来利用干细胞向神经组织细胞定向分化的研究取得了很大进展,如我们已往的研究发现,将胚胎干细胞注入特定的眼内环境,可以形成视网膜样结构,产生 RGCs 样细胞<sup>[10,11]</sup>,为青光眼视神经损害的治疗提供了新的契机。而体外诱导的 ESCs 源性 NSCs,较 ESCs 安全性高<sup>[6]</sup>、更易向神经元细胞定向分化,存活力及增殖分化潜能远高于终末阶段的细胞,且避免了海马源性 NSCs 取材及可塑性上的限定性,有望为青光眼等视网膜神经病变细胞移植提供新的种子细胞。

目前,干细胞在神经再生领域的应用仍然存在

许多问题,如移植细胞的免疫源性、永生化及纯化、与宿主建立有序整合、实现有效功能连接等。利用 ESCs 易于基因操作的特点,联合基因调控或治疗性克隆的方法,将使建立具有低免疫源性或无免疫源性的永生化 NSCs 系成为可能。因此,与海马源性 NSCs 相比,ESCs 源性 NSCs 在神经再生与修复的基础研究与临床治疗中可能具有更为广阔的应用前景。

(本文图 3,4,6,7 见插页 1. Fig. 3,4,6,7 shown in back coloured page 1)

### 参考文献:

- [1] 黄冰,陈系古,邓新燕,等. BALB/c 小鼠胚胎干细胞系的建立及其嵌和体小鼠的获得 [J]. 细胞生物学杂志, 2001, 23(1): 28.
- [2] 邱观婷,黄冰,唐仕波,等. 探讨保持胚胎干细胞全能性的体外培养条件 [J]. 中山医科大学学报, 2000, 21(2): 100.
- [3] 庄菁,曾园山,罗超权,等. 神经前体细胞的分离培养及绿色荧光蛋白基因的转染 [J]. 中山医科大学学报, 2000, 22(5): 342.
- [4] Lee S H, Lumelsky N, Studer L, et al. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells [J]. Nature Biotechnol, 2000, 18(6): 675.
- [5] Lendahl U, Zimmerman L B, Macky R D. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein [J]. Cell, 1990, 60(4): 585.
- [6] Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro A C, et al. Development of neural precursor cells and functional post-mitotic neurons from embryonic stem cells *in vitro* [J]. Mech Dev, 1996, 59(1): 89.
- [7] Nishida A, Takahashi M, Tanihara H, et al. Incorporation and differentiation of hippocampus-derived neural stem cells transplanted in injured adult rat retina [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41(13): 4268.
- [8] Ge J, Li Y Y, Zhuo Y H, et al. Peripheral nerve and transgene cells transplantation in the treatment of experimental neuropathy of SD rats [J]. Eye Science, 1998, 14(3): 121.
- [9] 杨智宽,葛坚,刘海泉,等. 大鼠雪旺细胞对视网膜神经细胞成活及突起生长的影响 [J]. 中山医科大学学报, 2000, 21(4s): 64.
- [10] Ge J, Guo Y, Wang Z C, et al. Preliminary study on *in vitro* induced differentiation of embryonic stem cells into neurons [J]. Eye Science, 2000, 16(1): 1.
- [11] Li Y P, Ge J, Yan J H, et al. Differentiation of embryonic stem cells into neurons and retina-like structure in nude mice [J]. Eye Science, 1999, 15(3): 131.

(编辑 刘清海)

胚胎干细胞源性与海马源性神经干细胞培养与分化的特性比较 (正文见第 193 页)

Comparative Study on Culture and Differentiation of Neural Stem Cells Derived from Embryonic Stem Cells and Hippocampus (Text in page 193)

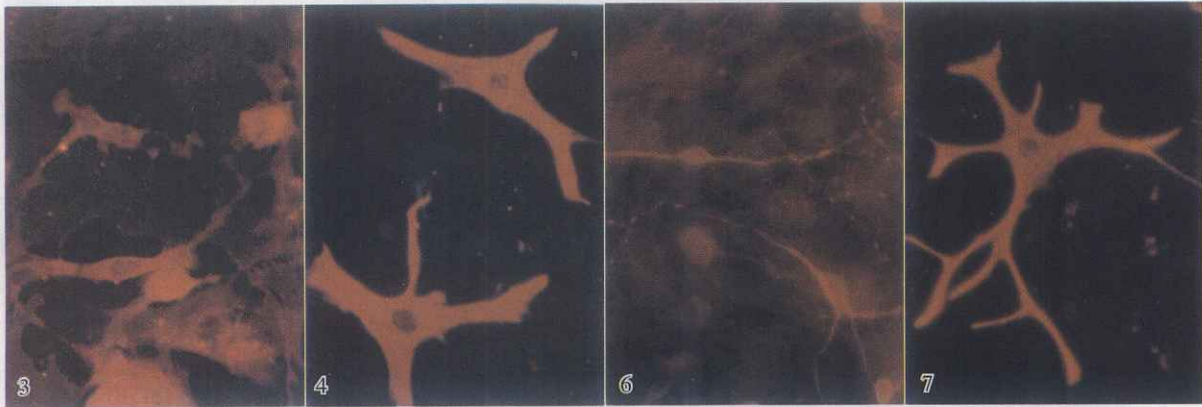


图 3 呈 NF200 阳性的 ESCs 源性 NSCs 分化的神经元样细胞  
 图 4 呈 GFAP 阳性的 ESCs 源性 NSCs 分化的神经胶质样细胞  
 图 6 呈 NF200 阳性的海马源性 NSCs 分化的神经元样细胞  
 图 7 呈 GFAP 阳性的海马源性 NSCs 分化的神经胶质样细胞  
 Fig. 3 Positive expression of NF200 in neuron-like cells differentiated from ESCs-derived NSCs (200 ×)  
 Fig. 4 Positive expression of GFAP in astrocyte differentiated from ESCs-derived NSCs (200 ×)  
 Fig. 6 Positive expression of NF200 in neuron-like cells differentiated from hippocampus-derived NSCs (200 ×)  
 Fig. 7 Positive expression of GFAP in astrocyte cells differentiated from hippocampus-derived NSCs (200 ×)

CD134 及核因子  $\kappa$ B 在狼疮性肾炎肾组织的表达及意义 (正文见第 224 页)

Expression and Role of CD134 and NF- $\kappa$ B in Renal Tissue of Lupus Nephritis (Text in page 224)

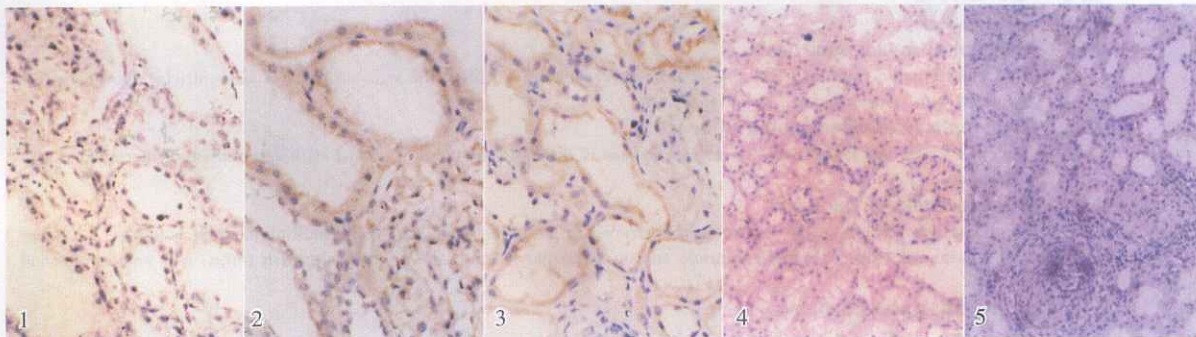


图 1 正常肾组织 CD134 表达  
 图 2 IV 型 LN 患者肾组织 CD134 表达  
 图 3 II 型 LN 患者肾组织 CD134 表达  
 图 4 正常肾组织 NF- $\kappa$ B 表达  
 图 5 IV 型 LN 患者肾组织 NF- $\kappa$ B 表达  
 Fig. 1 CD134 expression in normal renal tissue (DAB,  $\times 200$ )  
 Fig. 2 Renal in situ CD134 expression in class IV LN patients (DAB,  $\times 200$ )  
 Fig. 3 Renal in situ CD134 expression in class II LN patients (DAB,  $\times 200$ )  
 Fig. 4 The expression of NF- $\kappa$ B P65 in normal renal tissue (APAAP,  $\times 100$ )  
 Fig. 5 The expression of NF- $\kappa$ B P65 in renal tissue of class IV LN patients (APAAP,  $\times 100$ )