

# 神经前体细胞的分离培养及绿色荧光蛋白基因的转染

庄菁<sup>1</sup>, 曾园山<sup>1</sup>, 罗超权<sup>2</sup>, 李海标<sup>1</sup>

(中山医科大学 1. 组织胚胎学教研室神经科学研究室, 2. 生物化学教研室, 广东 广州 510089)

**摘要:**【目的】为替换中枢神经损伤后死亡的神经元提供方便追踪观察的神经前体细胞。【方法】应用含碱性成纤维生长因子(bFGF)的无血清培养技术, 从新生大鼠海马组织分离培养神经前体细胞, 并借助免疫组织化学技术检测这些细胞巢蛋白(nestin)的表达以及细胞分化后神经丝蛋白(NF)和胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)的表达。采用磷酸钙法将绿色荧光蛋白(GFP)基因转染目的细胞内。【结果】从海马组织分离的细胞具有分裂能力, 能表达 nestin。分化后一些细胞能表达 NF, 而另一些细胞则表达 GFAP。GFP 基因修饰的细胞能发出荧光。【结论】从海马组织分离的细胞能表达 nestin, 属于神经前体细胞, 它们具有明显的增殖能力。有些神经前体细胞已经分化为神经元和神经胶质细胞。GFP 基因已成功转染到神经前体细胞内, 并表达了 GFP。

**关键词:** 神经前体细胞; 细胞培养; 绿色荧光蛋白; 基因转染; 巢蛋白; 大鼠

中图分类号: Q831 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2001)05-0342-03

## Isolation and Culture of Neural Precursor Cells and Transfection of Green Fluorescence Protein Gene

ZHUANG Jing<sup>1</sup>, ZENG Yuan-shan<sup>1</sup>, LUO Chao-quan<sup>2</sup>, LI Hai-biao<sup>1</sup>

(1. Division of Neurosciences, Department of Histology and Embryology, 2. Department of Biochemistry, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

**Abstract:** 【Objective】To provide easily tracing and observing neural precursor cells for replacing dead neurons after central nervous system injured. 【Methods】Neural precursor cells from hippocampic tissue of neonate rat were isolated and cultured by serum-free medium containing basic fibroblast growth factor (bFGF). The expression of nestin of the cells and the expression of neurofilament (NF) or glial fibrillary acidic protein (GFAP) of differentiated cells were detected by immunohistochemistry. The gene of green fluorescence protein (GFP) was transfected to the target cells with calcium phosphate transfection. 【Results】The cells from hippocampic tissue had the potential of proliferation and expressed nestin. Some differentiated cells showed NF-positive, others were GFAP-positive. The cells modified by GFP gene showed fluorescence. 【Conclusion】The cells from hippocampic tissue of neonate rat cultured in vitro belong to the neural precursor cells which can express nestin and have the potential of proliferation. Some neural precursor cells had differentiated into neurons and neuroglial cells. The GFP gene has been successfully transfected to the neural precursor cells and effectively expressed.

**Key words:** neural precursor cell; cell culture; green fluorescence protein; gene transfection; nestin; rat

在成年哺乳动物脑内某些区域如室管膜、室管膜下层和海马仍存在着神经前体细胞。它们是一种具有自我更新能力和多分化潜能的干细胞, 在

特定条件下则具有明显的分裂能力, 产生许多子代细胞<sup>1, 2</sup>。在促分裂因子如碱性成纤维生长因子(bFGF)的作用下, 神经前体细胞能分裂增殖。这

收稿日期: 2000-12-29

基金项目: 国家重点基础研究资助项目(G1999054009)

作者简介: 庄菁(1967-), 女, 江西兴国人, 博士生, 讲师; 曾园山, 教授, 导师, 课题联系人

些神经前体细胞能被诱导分化成神经元或神经胶质细胞<sup>[3~6]</sup>。中枢神经损伤引起的神经元死亡一般是不能通过神经元的分裂增殖途径来替换,但有可能通过新生或成年动物中枢神经内存在的神经前体细胞增殖和分化来替换死亡的神经元。本研究从中枢神经分离出神经前体细胞,借助体外培养扩增并转染绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)基因,为替换中枢神经损伤后死亡神经元的提供方便追踪观察的神经前体细胞。

## 1 材料和方法

### 1.1 神经前体细胞的分离及传代

取生后3 d SD大鼠(中山医科大学动物实验中心提供)海马组织, D-Hanks液漂洗,剪碎,用1.25 g/L胰蛋白酶(Sigma)消化15 min(恒温37℃)。用D-Hanks液清洗2次,去除胰蛋白酶,再加入4 mL DMEM/F12[含体积分数为2% B27(Gibco)和2 μg/L bFGF(Sigma)]培养液,吸管反复吹打约50次,经220目铜网滤过后调整细胞密度为 $5 \times 10^5$ 个/mL进行培养。每4天换一次培养液。每6~9 d机械分离细胞克隆球传代一次。

### 1.2 神经前体细胞及其分化的检测

两个月后取出部分传代细胞克隆球种植在预先涂有多聚赖氨酸的培养皿中,并加入含血清培养基[DMEM/F12+体积分数为20%的胎牛血清(杭州四季青生物材料研究所)]。在细胞贴壁生长2 h后用巢蛋白(nestin)免疫组织化学方法检测一部分细胞,另一部分贴壁生长的细胞在6 d后分别用神经丝蛋白(NF)和胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)免疫组织化学方法检测。

### 1.3 GFP基因的转染

取对数生长期的细胞( $1 \times 10^7$ 个),离心,弃上清,用2 mL PBS洗涤细胞,再将细胞重悬于25 μL HBS溶液内,加入混匀的质粒PEGFP-C1(该质粒由本校动物实验中心陈系古教授提供)-磷酸钙沉淀物,并吹打一次使之均匀,置室温10 min。然后加入5 mL无血清培养液,再转移到50 mL培养瓶内,37℃体积分数为5% CO<sub>2</sub>温箱培养2 h。500 r/min离心5 min(离心半径为8 cm),收集细胞,用PBS洗涤细胞一次,加5 mL无血清培养液重悬细胞,在培养箱培养。48 h后将原培养液更换成筛选培养液[含G418(Sigma)350 mg/L],维持筛选15

d。此后将基因转染细胞放在倒置荧光显微镜下观察。

## 2 结果

### 2.1 神经前体细胞的生长情况

在无血清培养的情况下,从新生大鼠海马组织分离培养的原代细胞在24 h内大部分死亡,仅少部分细胞分裂增殖形成细胞克隆球,并呈悬浮态生长。随着细胞分裂,克隆球增大,单个细胞则呈圆形,无突起生长。两周后,细胞数量迅速增多,肉眼也可见细胞克隆球。每6~9 d机械分离细胞克隆球传代一次。经多次传代后的细胞形态与原代相似(图1)。

### 2.2 神经前体细胞的Nestin表达及其分化

传代60 d后取出细胞克隆球种植在涂有多聚赖氨酸的培养皿中,加入含血清培养液培养。一部分细胞克隆球在培养2 h后,可见少量细胞外迁生长。用免疫组化法染色,结果显示细胞集落呈现nestin阳性反应(图3),单个细胞胞质被染成棕黄色,表明它们是神经前体细胞。另一部分细胞克隆球在培养12 h后,其中的细胞外迁生长明显,有些细胞长出细长突起,细胞集落间的突起相互连接(图2)。继续培养到第6天,用免疫组化法染色,显示一些细胞呈现NF阳性反应,其胞体较小,呈圆形或椭圆形,伸出2~3个突起,细胞核轮廓圆形浅染(图4)。而另一些则表现为GFAP阳性染色,细胞体较大,呈三角形或多边形,具有多个突起,细胞核轮廓不清(图5)。这些表明前者已分化成神经元,后者则分化为神经胶质细胞。

### 2.3 神经前体细胞的GFP表达

经G418筛选后获得的GFP基因修饰神经前体细胞,在倒置荧光显微镜下一些细胞能发出绿色荧光(图6),这提示GFP基因已成功地转染到神经前体细胞内,并表达了GFP。

## 3 讨论

神经前体细胞一般是泛指那些处于成熟神经元更早期的细胞,它们在特定的环境下能够分化为神经元或神经胶质细胞。Temple<sup>[7]</sup>是最早从13 d胚胎大鼠脑隔区取出少量细胞进行培养的学者,他发现由单细胞分裂增殖而来的细胞能发育成神经

元及神经胶质细胞。后来的研究观察到,在 bFGF<sup>[3]</sup> 和表皮生长因子(EGF)<sup>[4]</sup> 的作用下,神经前体细胞能够分裂增殖,并能从单个细胞分裂增殖形成单细胞克隆球。本研究虽然没有应用单细胞克隆技术得到单细胞克隆球,但从我们培养的细胞分裂增殖状态来看,是具有神经前体细胞的特征的,即在 bFGF 的作用下,细胞增殖旺盛,连续 180 d(每 6~9 d 机械分离细胞克隆球传代 1 次)细胞生长状态依然很好,并且在它们分化前用免疫组化法可检测出有 nestin 的表达,这进一步证实它们是神经前体细胞。一般认为 nestin 存在于神经前体细胞的胞质中,是一种中间丝蛋白,待神经前体细胞分化成神经元或神经胶质细胞后,这种中间丝蛋白就会从胞质中逐渐消失<sup>[8]</sup>;然而分化成熟的神经元和神经胶质细胞则分别出现另两种中间丝蛋白:NF 和 GFAP。本研究用免疫组化法也检测到由神经前体细胞分化而来的神经元有 NF 的表达,神经胶质细胞则有 GFAP 的表达。

本研究的其中一个意义是,能为中枢神经损伤引起的神经元死亡提供治疗策略。已有文献报道<sup>[9]</sup>,将由胚胎干细胞分化而来的大量神经前体细胞移植到大鼠脊髓损伤处。2~5 周后进行免疫组化检测,发现神经前体细胞已分化为神经元和神经胶质细胞,并在脊髓内迁移了 8 mm(离移植处),这时可观察到后肢功能有部分恢复。本研究结果表明,从新生鼠海马组织分离培养神经前体细胞的方法方便可行,可为我们下一步进行脊髓损伤后的细胞治疗提供很好的目的细胞,去替换死亡的神经元并形成神经网络以及使再生的神经纤维再髓鞘化,促进损伤的脊髓结构和功能的修复。为了更方便地观察植入脊髓损伤处的神经前体细胞迁移和分化为神经元或神经胶质细胞的情况,本研究已成功地将报告基因-GFP 基因转入前体细胞内,并发出绿色荧光。但用磷酸钙方法转染 GFP 基因效率

较低,还不能大量制备带有 GFP 的神经前体细胞,还有待进一步改善基因转染方法。

(本文图 1~6 见插图 3)

#### 参考文献:

- [1] Gage R J, Fisher L J. Isolation characterization and use of stem cells from the CNS[J]. *Annu Rev Neurosci*, 1995, 18: 159.
- [2] 阮奕文,王传恩,董健尔,等. 大脑皮质机械损伤诱导 Nestin 表达和神经前体细胞增殖. *中山医科大学学报*, 1999, 20(3): 171.
- [3] Angela G, Parati E A, Cova L, *et al.* Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor[J]. *J Neurosci*, 1996, 16(3): 1091.
- [4] Reynolds B A, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system[J]. *Science*, 1992, 255(5052): 1707.
- [5] Johansson C B, Momma S, Clarke D L, *et al.* Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system[J]. *Cell*, 1999, 96(1): 25.
- [6] Craig C G, Tropepe V, Morshead C M, *et al.* In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain[J]. *J Neurosci*, 1996, 16(8): 2649.
- [7] Temple S. Division and differentiation of isolated CNS blast cells in microculture[J]. *Nature*, 1989, 340(6233): 471.
- [8] Lendahl U, Zimmerman L, McKay R. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein[J]. *Cell*, 1990, 60(4): 585.
- [9] McDonald J W, Liu X Z, Qu Y, *et al.* Transplanted embryonic stem survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord[J]. *Nature*, 1999, 12(5): 1410.

(编辑 刘清海)

#### · 简 讯 ·

### 广州抗癌协会成立神经肿瘤专业委员会

2001 年 5 月 25 日至 5 月 27 日,“2001 广州肿瘤学术大会”在广州金城宾馆召开。会议期间(5 月 27 日)举行了“神经肿瘤专题报告会”,就神经胶质瘤治疗的难点和对策、影像诊断、显微外科手术治疗、放射治疗、化疗、生物治疗等进行了研讨。同时成立了“神经肿瘤专业委员会”——我国第一个神经肿瘤学术组织。学会选举了第一届学术委员会,委员都是神经肿瘤基础研究和临床相关学科(神经外科、神经病理、神经影像、神经放疗、肿瘤化疗、生物治疗)的专家、教授。主任委员为中山医科大学肿瘤防治中心神经外科/神经肿瘤科陈忠平教授。

(学 讯)

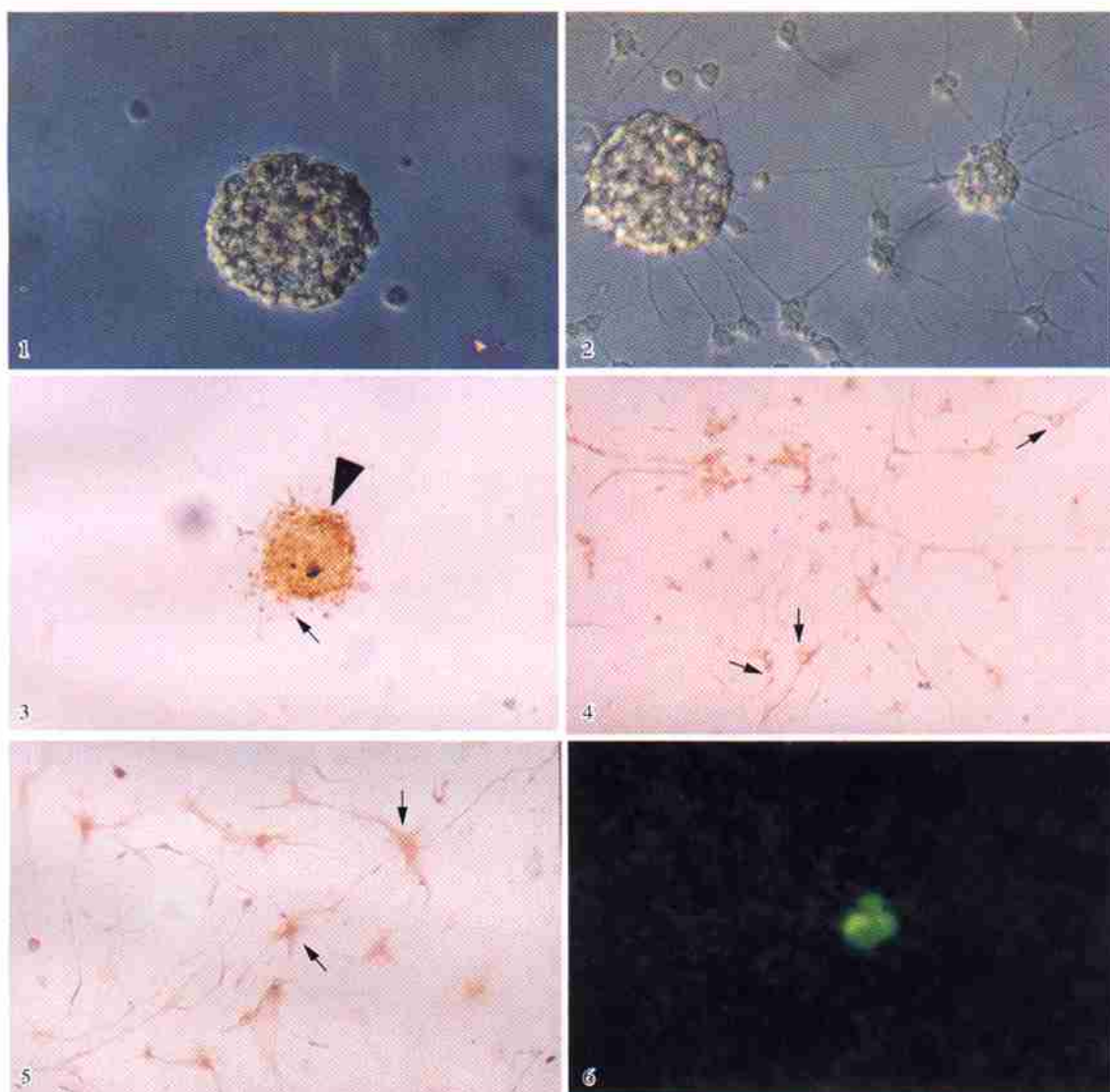


图 1 无血清培养液中原代培养的细胞克隆球

图 2 生长出细长突起的细胞克隆球

图 3 细胞克隆球呈 Nestin 阳性反应

图 4 一些细胞呈现 NF 阳性反应

图 5 一些细胞呈现 GFAP 阳性反应

图 6 倒置荧光显微镜下 GFP 基因转染成功的细胞

Fig. 1 A cell clone of primary culture in serum-free media cultured for 5 d,  $\times 200$

Fig. 2 The cell clone growing thinner longer processes 12 h after attachment *in vitro*,  $\times 200$

Fig. 3 Nestin positive reaction of a cell clone (▲)  
▲: positive cells; . positive cells →: 2 h after attachment *in vitro*,  $\times 100$

Fig. 4 Some NF positive cells (→)  
6 d after attachment *in vitro*,  $\times 100$

Fig. 5 Some GFAP positive cells (→)  
6 d after attachment *in vitro*,  $\times 100$

Fig. 6 The cells transfected successfully with the GFP gene under the inverted fluorescence microscope showing green fluorescence,  $\times 400$