

# 人类神经干细胞的长期培养和传代

郑佳坤<sup>1</sup>, 杨立业<sup>1</sup>, 惠国桢<sup>2</sup>

(1. 广东省潮州市中心医院神经外科, 广东 潮州 521021; 2. 苏州大学附属第一医院神经外科, 江苏 苏州 215007)

**摘要:**【目的】探讨人类神经干细胞的体外培养条件及其传代的方法。【方法】采用机械方法从胎脑中分离神经细胞, 应用 N2 培养基进行培养, 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和表皮生长因子(EGF)刺激细胞扩增; 传统方法和对神经球切割的方法进行传代培养; 应用免疫组织化学染色对培养的细胞及其分化的细胞进行鉴定。【结果】从流产胎脑当中成功培养出人类的神经干细胞, 培养条件下呈悬浮状态生长, 形成神经球, 绝大多数的细胞表达波形蛋白和 Musashi1 两种神经干细胞的标志物; 这种细胞可分化为神经元和星型胶质细胞, 早期的培养有少量的少突胶质细胞; 在这种培养条件下, 神经干细胞生长速度较慢, 而采用切割神经球的方法保持了细胞间的联系, 神经干细胞可获得较大的扩增速度。【结论】体外的培养条件下, 可从胎脑组织中培养出神经干细胞, 它可作为中枢神经系统疾病移植治疗的潜在细胞来源。

**关键词:** 神经干细胞; 胚胎; 细胞培养

中图分类号: R 35; R 74

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2002)06-0430-03

**The Long-Term Culture and Passaging of Human Neural Stem Cells** ZHENG Jia-kun<sup>1</sup>, YANG Li-ye<sup>1</sup>, HUI Guo-zhen<sup>2</sup>. (1. Department of Neurosurgery, Chaozhou Central Hospital, Chaozhou 521021; 2. First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215007, China)

**Abstract** 【Objectives】To explore the culture conditions for human neural stem cells and to investigate the passaging method. 【Methods】The cells from the embryonic human brain cortex were mechanically dissociated. Cells were cultured in N2 medium with bFGF and EGF, and identified by immunocytochemistry. 【Results】Neural stem cells from abortive embryonic humans had been successfully cultured. Typical neurospheres were developed in suspension, and majorities of the cells expressed vimentin and Musashi1, which were the markers for neural stem cells. The cells could differentiate into neurons and astrocytes. Neural stem cells multiplied very slowly under the culture conditions, and the best expansion was achieved when the neurospheres were dissected into several parts and the cell link was conserved when passaging. 【Conclusion】Human neural stem cells can be cultured from embryonic brains. They formed the typical neurospheres in suspension in vitro, which serves as potential source for transplantation in treating CNS disorders in humans.

**Key words:** neural stem cell; embryo; cell culture

对神经变性疾病和神经损伤的外科和药物治疗能取得一定疗效, 但在临床上长期应用药物治疗有严重的副作用, 外科治疗的长期疗效不理想。在对这些传统的治疗方法进行完善和优化的同时, 另一种治疗方法—细胞治疗, 现在已进行临床实验。将人胚胎组织来源的腹侧中脑移植到帕金森病人的纹状体, 可明显改善病人的疾病症状<sup>[1]</sup>。尸体解剖研究证实, 移植的多巴胺神经元存活, 并且与宿主的神经元建立了有功能的突触联系, 提示神经移植有广泛的应用前景<sup>[2]</sup>。但临床上应用的胚胎供体有限, 而且应用胚胎还涉及伦理道德和法律问题, 在临床上不可能大规模地开展。神经干细胞在体外有持续的增殖能力, 是将来移植的细胞较为理想的来源。它存在于中枢神经系统内, 可以分化为

神经元、少突胶质细胞和星型胶质细胞。由于其对临床移植有巨大的应用前景, 我们对其在体外的培养条件进行初步研究, 为将来的神经移植做准备工作。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

DMEM/F12 培养基(Gibco/BRL); 碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、多聚鸟氨酸、层粘连蛋白、肝素、胰岛素、腐胺、转铁蛋白、硒化钠和孕激素均为 Sigma 公司产品; 抗波形蛋白单克隆抗体(BD Biosciences, 1:100); 抗 Musashi1 抗体(由日本庆应义塾大学冈也

收稿日期: 2002-03-26

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(012452)

作者简介: 郑佳坤(1953-), 男, 广东潮州人, 副主任医师。

荣之教授惠赠, 1:200); 抗波形蛋白(Dako, 1:100); 抗GFAP(Dako, 1:100); 抗NF(Dako, 1:100); FITC标记的兔抗鼠第二抗体(晶美, 1:100); 培养板和培养皿均为Nunc公司产品。

## 1.2 细胞培养

流产胎儿(胎龄为12~13周, 3次独立试验)在无菌条件下取出胚胎, 解剖镜下分离硬脑膜, 切取脑皮质, 将切下的组织放入含有6 g/L的葡萄糖的D-hanks液中。用吸管反复抽吸脑组织约20次, 使细胞分散成单细胞悬液, 离心5 min( $1\ 000\times g$ ), 弃上清。N2培养基重悬细胞, 细胞计数器下计数细胞, 将细胞种植在3.5 cm培养板上。细胞密度为 $2\times 10^6\sim 4\times 10^6/\text{cm}^2$ 。N2培养基配方如下<sup>[3]</sup>: DMEM/F12(1:1), 加入20 nmol/L孕激素、30 nmol/L碘化钠、100  $\mu\text{mol/L}$  腐胺、4.0 mmol/L谷氨酰胺、5 mg/L的胰岛素、100 mg/L的转铁蛋白、 $50\times 10^3\text{ U/L}$ 的青霉素、 $50\times 10^3\text{ U/L}$ 的链霉素、5 mmol/L HEPES和5 mg/L的肝素, 最后用碳酸氢钠将pH值调至7.3~7.6。最后在培养基中加入20  $\mu\text{g/L}$ 的bFGF和20  $\mu\text{g/L}$ 的EGF, 放在37  $^{\circ}\text{C}$ 含有体积分数为5%CO<sub>2</sub>的培养箱内培养。细胞生长较满时, 不用胰蛋白酶消化, 采用机械方法分离细胞, 离心弃上清, 再种植到培养板上传代培养。对于较大的神经球(大于400  $\mu\text{m}$ ), 有时采用显微切割的方法将一个神经球切割成4~8部分, 直接进行传代; 2~3 d换一半培养液, 加入bFGF和EGF使其终浓度为20  $\mu\text{g/L}$ 。细胞可以用常规方法液氮冻存、复苏, 冻存培养基为N2加入100 g/L的FBS。

## 1.3 免疫细胞化学检查

悬浮培养的细胞种植到经多聚鸟氨酸和层粘连蛋白处理的24孔培养板上, 经一段时间的培养后进行免疫细胞化学检查。0.01 mol/L PBS洗去培养液, 4 g/L的多聚甲醛固定15 min; PBS洗3次, 每次5 min; 2.5 g/L Triton X-100处理15 min; PBS洗3次, 每次5 min; 含有10 mL/L马血清的一抗37  $^{\circ}\text{C}$ 处理1.5 h, 4  $^{\circ}\text{C}$ 过夜; PBS洗3次, 每次5 min; FITC结合的兔抗鼠IgG二抗37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h; PBS洗3次, 每次5 min; 荧光染色直接在荧光显微镜下观察、照相。

## 2 结果

### 2.1 原代培养神经球的形成

原代培养细胞为小圆形细胞, 培养皿内培养3

d, 可见细胞开始聚集成球, 称为神经球(neurosphere), 成悬浮状态。15 d后可见神经球增大, 无细胞贴壁和长出突起(图1)。神经球增大到一定程度时, 球中心的细胞因营养成分不足而停止分裂。神经球周边细胞较亮, 中心区细胞密度高, 透光度差。细胞的生长速度与种植密度密切相关, 细胞密度较高时分裂速度快, 密度较低时(如 $1\ 000\sim 10\ 000/\text{cm}^2$ ), 细胞停止分裂甚至死亡。神经球较大时生长受限制, 必需及时传代, 将神经球分离成单细胞, 再加入培养基进行传代培养, 但在此过程中有大量的细胞死亡, 可能由于传代过程中对细胞的机械损伤所致, 培养的细胞在体外至少可维持3个月, 且维持干细胞状态, 增殖约4~5倍。如果采用将神经球切割的方法进行传代, 可获得更快的细胞增殖速度, 且细胞增殖的总的倍数也明显增加。

### 2.2 神经干细胞的分化

神经球分散成单细胞后种植在多聚鸟氨酸和层粘连蛋白处理的培养板上, 贴壁后早期为小圆形细胞, 发出的突起多为2个, 少有3个以上突起; 贴壁时间较长时(如20 d), 孤立的细胞开始分化为终末细胞, 呈现为典型的神经元或胶质细胞的形态。种植4 d后进行免疫细胞化学检查, 接近100%的活细胞表达Musashi和波形蛋白(图2, 图3), 表明它们的神经干细胞属性。波形蛋白的阳性部位是胞质中, 早期伸出的突起也呈阳性表达, 细胞核无表达。Musashi的表达部位与波形蛋白类似。分离的单细胞贴壁后(体外培养一个月)加入含20 g/L胎牛血清的DMEM/F12培养基, 不加bFGF和EGF, 继续培养12 d, 细胞固定后行免疫细胞化学检查。可见散在的GFAP阳性细胞, 细胞呈多角形, 类似C6胶质瘤细胞形态; 部分细胞呈典型的神经元形态, 表达NF。另有少数细胞(约1%)既不表达GFAP也不表达NF, 而表达环核苷酸磷酸二酯酶, 为少突胶质细胞。

## 3 讨论

### 3.1 神经干细胞的长期培养方法的改进

最近对人类克隆和移植的报道很多, 但极少有文献对人类神经干细胞的增殖潜能进行系统研究。对胚胎小鼠的纹状体神经干细胞应用EGF培养可以形成神经球, 可以进行长期培养, 成指数生长, 在移植和分化后主要转化为星型胶质细胞<sup>[4]</sup>。然而在同样的生长条件下, 大鼠的神经干细胞在4~7

周的分裂后就停止增殖<sup>[5]</sup>。我们在研究中也发现,人类的神经干细胞在培养的早期阶段细胞分裂的速度较快,经过几次传代以后,细胞分裂速度明显减慢,此细胞对密度特别敏感,仅在神经球中有细胞分裂和增殖,很难见到孤立的细胞分裂,克隆实验没有成功。每次传代时,机械方法制成单细胞悬液后都有部分的细胞死亡,其余的细胞在48 h内形成神经球,以后又开始分裂和增殖。

神经球增大到一定程度时,位于中心区的细胞的营养供应必然缺乏,如果不进行传代,细胞必然凋亡或坏死,扫描电镜检查在神经球的中心有凋亡细胞<sup>[6]</sup>。Svendsen等<sup>[7]</sup>创立了新的方法对人的神经干细胞进行传代,当神经球生长较大、密度较高时,将大的神经球(大于200  $\mu\text{m}$ )切割成小块传代培养,这样就维持了细胞与细胞间的联系,可以维持细胞的指数生长,细胞在150 d内能增殖100万倍,单独应用FGF或EGF能维持细胞的体外存活和增殖。我们也用类似的传代方法进行尝试:对较大的神经球(直径大于400  $\mu\text{m}$ )直接在解剖镜下用手术刀片进行切割,可以获得较快的增殖速度,但这种方法较为耗时,切割的厚度也不均匀。我们的初步研究证明,从神经球分散的单细胞在去除促分裂因子后,约有15%的细胞分化为神经元,其余分化为胶质细胞。在早期的培养阶段,有少数的细胞分化为少突胶质细胞,经过多次传代以后,很难再见到少突胶质细胞<sup>[2]</sup>。我们在研究中也发现,早期培养(体外培养6周以内)的人类神经干细胞的神经球中有髓鞘形成<sup>[6]</sup>,说明神经球中有少突胶质细胞存在。

### 3.2 Musashi1 可作为鉴定神经干细胞的标志物

神经干细胞有其特异的标志物,可用于对其鉴定的标志物有波形蛋白、巢蛋白和Musashi1蛋白,其中Musashi1蛋白在种属间的构造特别保守,用小鼠的Musashi1抗体可以对人类、鸟类及低等的脊椎动物的神经干细胞进行鉴定<sup>[8]</sup>。本研究中应用Musashi1抗体对人类神经干细胞进行鉴定的结果与波形蛋白的鉴定结果基本相同,表达部位也相似。神经干细胞开始分化后,波形蛋白和Musashi1的表达均下调,GFAP和NF的表达同时上调。

### 3.3 成年脑内的神经干细胞对于组织修复的意义

近来的研究证明,不仅在胚胎期的脑组织中存在神经干细胞,在很多的成年的哺乳动物脑室下区,齿状回能持续产生神经元<sup>[9]</sup>。在体外培养各种

生长因子的刺激条件下,这种成体来源的神经干细胞如果能大量扩增,则可作为人神经组织移植的另一可靠的来源。体外研究已证实了成人脑内存在神经干细胞,在成人脑内究竟这种细胞能否分裂,Eriksson的研究对此问题给出了明确的答案。一个黑色素瘤病人在生前应用了大剂量的BrdU,目的是确定瘤细胞的增殖速度,病人死亡后的尸体解剖研究中,在海马齿状回中发现了BrdU阳性细胞<sup>[10]</sup>。这种细胞是新产生的,即成人脑内存在能持续分裂的细胞。但目前还不清楚这种细胞的多能性,它们可能代表一群处于静止状态的干细胞,或是能持续分裂的神经元前体细胞。Roy等从成年人的海马组织中分离提纯获得神经元前体细胞,这种细胞可以在体外培养的条件下增殖<sup>[11]</sup>。最近,Gage等采用贴壁培养的方法从尸体的脑组织中分离培养出神经干细胞,细胞增殖速度较慢,经多次传代后分裂次数减少,诱导分化后可分化为神经元和胶质细胞<sup>[12]</sup>。

总之,目前可以肯定的是在成人脑内的一定区域有神经元新生。因此,将来的一个治疗策略就是如何对成人的神经干细胞培养和扩增(理想状态是从需要移植的病人取出细胞培养,大量扩增后再移植给病人自身,这样可以免除免疫排斥)。另一个策略是刺激脑内的细胞在原位分裂,移行和修复受损的神经元。随着人类神经干细胞的体外培养和定向分化的技术的进步,神经细胞移植在不久的将来必将走向临床。

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

#### 参考文献:

- [1] Freed C R, Greene P E, Breeze R E, *et al.* Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease [J]. *New Engl J Med*, 2001, 344(10): 710.
- [2] Svendsen C N, Smith A G. New prospects for human stem cell therapy in the nervous system [J]. *Trends Neurosci*, 1999, 22(8): 357.
- [3] Carpenter M K, Cui X, Hu Z Y, *et al.* In vitro expansion of human neural progenitor cells [J]. *Exp Neurol*, 1999, 158(2): 265.
- [4] Reynolds B A, Weiss S C. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic precursor is a stem cell [J]. *Dev Biol*, 1996, 175(1): 1.
- [5] Svendsen C N, Fawcett J W, Bentlage C, *et al.* Increased survival of rat EGF-generated CNS progenitor cells using B27 supplemented medium [J]. *Dev Brain Res*, 1995, 102(3): 407.

(下转第454页 to page 454)

波的交汇处,即  $f_1$  与  $f_2$  之间的某一部位,产生了频率为  $mf_1 \pm nf_2$  ( $m, n$  均为正整数)的一类畸变产物,其中以频率为  $2f_1 - f_2$  的畸变产物最强,此类成分释入外耳道,即生成畸变产物耳声发射<sup>[1]</sup>。

耳声发射为研究耳蜗生理提供一个全新的工具和手段。以往对耳蜗功能的研究多采用电生理研究手段,观察诸如微音器电位、总和电位和动作电位等耳蜗电生理活动。这些方法常常需要打开听泡,安放电极,属有创性研究手段;同时对耳蜗内机械活动只能进行间接的观察、推测。而耳声发射检查提供了简便、快捷的直接观察耳蜗内机械活动的途径,有无创的“声学探子”之称,利用它可以研究耳蜗内结构及代谢、生理过程在不同条件下的反应,进一步揭示耳蜗生理和病理,为诊断、治疗内耳疾病提供指导。畸变产物耳声发射具有高度的内在稳定性,允许反复测试和观察对比;且具有频率特异性,可以直接地了解耳蜗上 0.5 ~ 8 kHz 范围内的功能的正常与否。

以往的动物模型在耳蜗对电离辐射的敏感性方面存在争议<sup>[2~5]</sup>,但大多数的研究提示电离辐射所致的内耳损伤主要是一种迟发反应。较有代表性的研究报导,在国外有 Bohne 等<sup>[5]</sup>的动物形态研究证实:常规分割剂量放射后 3 周耳蜗病变轻微,两年后加重;而国内杨新明等<sup>[3]</sup>研究指出放射后 3 个月内耳变化处在早期阶段,听力损害轻,随着时间的推移,耳蜗功能和形态的损害逐渐加重。在放疗对耳蜗损害的临床研究观察中,一方面由于耳蜗解剖结构及功能的复杂性,另一方面是临床上缺乏一些无创的客观检测耳蜗功能的方法,所以多采用纯音测听、听性脑干电反应等方法来间接判断耳蜗

功能是否受损及其受损害的程度。但近年来,由于耳声发射具有快速、客观、简便、灵敏及无创等优点,且 DPOAE 因具有较为准确的频率定位的特点,目前多用于耳蜗功能完整性的监测,其敏感性优于纯音测听,可早期判断出耳蜗功能的损害。因此耳声发射在临床上已广泛用于耳蜗功能的监测。电离辐射后如果直接有大量的外毛细胞变性或缺失, DPOAE 呈消失的趋势,其幅值显著低于放疗前。DPOAE 可在一定条件下反映鼻咽癌患者放疗后的外毛细胞受损状况,提示受损的基底膜节段。这样,就可以及早发现耳蜗功能的损害,为临床防护及早期干预提供依据。本研究在鼻咽癌常规放疗后一年内的追踪观察中,未能检测到 DPOAE 的幅值有明显的变化,与纯音听阈的结果一致,这与以往的 Bohne 及杨新明的动物基础研究结果是基本一致的<sup>[4,5]</sup>。这提示,该法有望作为一种快速、简便、客观、无创的方法应用于放疗后早期耳蜗功能损害的检测。

#### 参考文献:

- [1] 姜泗长, 顾 瑞. 临床听力学[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1999. 306.
- [2] 蒋爱云, 苏振忠, 朱兰才. 鼻咽癌放射治疗对患者中耳的影响[J]. 中山医科大学学报, 2000, 21(6): 470.
- [3] 杨新明, 卢永德, 陈 忠. 电离辐射对内耳的迟发性损害[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 1997, 32(4): 222.
- [4] Kim D T. Stimulated acoustic emissions from within the human auditory system[J]. J Acoust Soc Am, 1978, 64(2): 1386.
- [5] Bohne B A, Marks J E, Glasgow G P. Delayed effects of ionizing radiation on the ear[J]. Laryngoscope, 1985, 95(5): 818.

(编辑 刘清海)

(上接第 432 页 from page 432)

- [6] 杨立业, 惠国栋, 赵文娟, 等. 体外培养人类神经干细胞神经球中髓鞘的形成[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2002, 1(1): 47.
- [7] Svendsen C N, ter Borg M G, Armstrong R J E, *et al.* A new method for the rapid and long term growth of human neural precursor cells[J]. J Neurosci Methods, 1998, 85(2): 141.
- [8] Kaneko Y, Sakakihara S, Imai T, *et al.* Musashi: An evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells[J]. Dev Neurosci, 2000, 22(1-2): 139.
- [9] Gage F H. Mammalian neural stem cells[J]. Science, 2000, 287(5457): 1433.
- [10] Eriksson P S, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, *et al.* Neurogenesis in the adult human hippocampus[J]. Nat Med, 1998, 4(11): 1313.
- [11] Roy N S, Wang S, Jiang L, *et al.* In vitro neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult human hippocampus[J]. Nat Med, 2000, 6(3): 271.
- [12] Palmer T D, Schwartz P H, Gage F H, *et al.* Progenitor cells from human brain after death[J]. Nature, 2001, 411(6833): 42.

(编辑 刘清海)