

猪神经干细胞分离培养研究进展*

汪亦男 丛义梅 张鑫淼 胡 魁 刘忠华[△]

(东北农业大学胚胎工程实验室 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要 神经干细胞用于神经学临床修复和基础理论研究的前提是首先完成神经干细胞的体外分离、培养、纯化并大量扩增。鼠、人、猪中都已成功分离出神经干细胞并已尝试用于动物神经系统损伤等疾病的治疗,尽管在鼠和人上的研究很多,相对于鼠神经干细胞在神经学临床应用上的局限和人神经干细胞在材料来源上的不便,猪作为神经干细胞临床应用和基础研究的模式动物有很大的潜力。但关于猪神经干细胞体外分离培养的研究非常少,本文对这方面的研究进展做一综述。

关键词 神经干细胞 分离 培养

中图分类号:Q95-3 Q813 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)01-186-03

Development of Isolation and Culture of Porcine Neural Stem Cells*

WANG Yi-nan, CONG Yi-mei, ZHANG Xin-miao, HU Kui, LIU Zhong-hua[△]

(Laboratory of Embryo Biotechnology of Northeast Agricultural University, Harbin, 150030, China)

ABSTRACT: The premise of neural stem cells used for clinical therapy in neuroscience and fundamental research is to accomplish isolation, culture, purification and amplification in vitro firstly. Some attempts have been taken to use them for repairing injuries and curing diseases in nervous system of model animals with the success of neural stem cells isolation from mice, human beings and porcine. Although more research about neural stem cells from mice and human beings has been reported, porcine would become more desirable model animal on fundamental and exploratory development because of a basic limitation of neurological applications on the use of rodent cell cultures and scarce source of human neural stem cells. Some research has revealed the possibility that porcine neural tissue would be an alternative source to human xenografted cells for transplantation in neurodegenerative disorders, but research about isolation and culture of porcine neural stem cells in vitro is parum. This article mainly discusses the recent advancement about this aspect.

Key words: Neural stem cells; Isolation; Culture

Chinese Library Classification: Q95-3, Q813 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)01-186-03

前言

神经干细胞是一种组织源干细胞,能自我更新并提供大量脑组织细胞的一类细胞的总称,具有分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的能力,有如下特点:(1)具有自我维持和更新能力,这是指在某一确定部位保持稳定的数量,和/或在必要时进行增殖的能力。(2)具有多向分化潜能,可生成中枢神经系统内各种类型分化成熟的子代细胞^[1]。(3)处于高度未分化状态,缺乏已分化细胞的抗原标志。(4)终生具有增殖分裂能力,在有损伤或局部环境信号变化的刺激下可以增殖^[2]。神经干细胞的应用前景广泛:(1)可通过体内移植实现受损部位的组织重建和功能恢复。(2)利用神经干细胞缺乏免疫源性,可较顺利地与宿主组织整合的特点,将其作为治疗性基因载体。(3)构建各种不同类型的神经干细胞株,用于神经生理、神经药理及神经病理等基础性研究^[3]。目前,在鼠和人上,已从成年期和胎儿期的多个部位分离出神经干细胞,采用免疫磁珠分离法或流式细胞仪分选法利用细胞表面标记纯化神经干细胞,培养方法也有多种,发展出悬浮培养法、贴壁培养法及生物反应器培养法;

在细胞移植治疗、基因载体治疗、神经损伤再生方面,通过动物试验已取得一些成果。相比之下,猪作为模式动物由于可畜养,器官大小与人的相似,免疫学和演化上与人接近,遗传与疾病研究资料丰富等特点而备受青睐。本文总结分析了近几年来国内外关于猪神经干细胞的基础研究(分离、培养、鉴定)的进展。

1 猪神经干细胞分离培养总体进展

神经分化是胚层特化后发生的早期胚胎事件,在发育的神经系统中存在多种不同类型的多能细胞,有胚胎干细胞、成体干细胞、视网膜干细胞、下丘脑-垂体干细胞、神经嵴干细胞、基板干细胞,不同脑区的细胞都具有多能性并且有共同特征,具有某些特异性的标志,如在体内或体外增殖需要成纤维细胞生长因子、表达巢素等标志性抗原^[4]。成体内也存在神经发生和胶质发生,并受外部环境的调节。成体内存在的多能细胞参与了正在进行的神经-胶质发生。由于每个区域存在不止一种类型的多能细胞,体外分离培养获得的细胞群体多是异质性的,因此,"神经前体细胞"用来概括所有可分裂的多能细胞,涵盖了干细胞和祖细胞两个阶段的细胞。祖细胞是由神经干细胞分

* 基金项目 国家"973项目"猪诱导多能干细胞及其分化发育研究(2009CB941000)

作者简介 汪亦男(1985-),女,硕士研究生,主要研究方向 猪成体神经干细胞分离、培养及鉴定。电话:15545583259

[△]通讯作者 刘忠华 电话:13796078908 E-mail: liu086@yahoo.com

(收稿日期 2011-03-26 接受日期 2011-04-20)

化而来的中间态细胞,其分化能力和自我维持、自我更新能力受到限制,仅具有单潜能或双潜能分化能力或其干细胞样特征只能维持较短的时间。在早期的研究中,分离的都是猪神经前体细胞用于体内细胞移植治疗,直至2009年,郑月茂等从胎猪脑组织中首次分离出猪神经干细胞,提示从猪胎儿脑组织分离神经干细胞具有可行性和有效性^[5]。同年,该实验室还获得了转EGFP的猪神经干细胞,证明了细胞在表达EGFP的同时仍具有多向分化潜能,为EGFP对猪神经干细胞进行标记、追踪,作为示踪标记进行猪神经干细胞体内移植的研究奠定基础^[6]。

影响神经干细胞分离培养效果的因素很多,下面从组织来源、个体年龄和培养体系三方面来介绍。

2 不同组织来源对神经干细胞分离培养的影响

鼠和人上的研究表明,神经干细胞可来源于多种组织,从脑、脊髓、骨髓、脐血、脂肪组织和脐带等均可分离得到神经干细胞,并可诱导分化为其他细胞。神经干细胞来源部位不同,其分离培养的方法及其特性均不同。目前,有研究表明可从胎龄30天的猪胎儿脑组织和妊娠35-50天的胎猪背部皮肤获得神经干细胞^[7],两种神经干细胞完全培养液中生长因子的浓度不同,提示二者对生长因子的依赖性有差异,是处于发育不同阶段的神经干细胞,但并未有研究来直接比较二者的差异。

神经干细胞的组织来源广泛,体外分离培养方法各异,各有其优缺点^[8]。胚胎脑组织来源的神经干细胞获取较容易,数量大,但局限于实验研究,要获取人类胎儿脑组织往往十分困难,除受技术条件、来源和数量的限制外,还涉及伦理道德、组织免疫排斥反应等一系列问题,使得人胚神经干细胞的临床应用受到制约。骨髓间充质干细胞来源广泛,容易获得,分离培养增殖速度快,不必进行永生化就能获得足够的细胞用于移植,避免了从脑部获取细胞所造成的损伤。骨髓间充质干细胞具有较强的自我增殖、多分化潜能、低免疫原性、迁移能力和良好的组织整合性的生物学特性。因此,体外诱导骨髓基质干细胞分化为神经干细胞成为神经科学研究的热点之一。脂肪间充质干细胞诱导分化为神经干细胞的方法与骨髓相同,由于脂肪组织来源更广泛,不产生排斥反应,避免了干细胞来源所引起的争议,也成为目前关注热点之一。脐血具有以下明显的优点:①来源丰富,易于获取;②采集方便,对供者无巨大痛苦;③脐血中免疫系统处于原始阶段,移植后免疫排斥反应小;④脐血中存在较原始的造血干细胞、间质干细胞以及内皮干细胞等,具有更强的增殖、分化能力;⑤脐血中各种病毒感染机会相对少。因此脐血MSC可能成为细胞移植治疗神经系统疾病的一种很好的细胞源,有着广阔的临床应用前景。

3 个体年龄对神经干细胞分离培养的影响

在胚胎期,可从鼠和人的多个不同脑区分离获得神经干细胞,至成年期,哺乳动物中枢神经系统内神经干细胞的位置被确认的目前有两处,分别是脑室下区和海马齿状回颗粒细胞下区。在鼠上的研究结果表明神经干细胞的发育具有时限性,神经干细胞的发生高峰在胚胎期,而大量的胶质细胞主要产生于出生后的一个月,早期的胎儿神经组织中神经干细胞比例很高,至出生时只有室周区、纹状体区含有一定比例的干细胞。个

体的年龄也会影响神经干细胞的增殖能力,根据冯敏等^[9]的实验发现,3-18周人胚胎大脑皮层和神经管组织中存在能在体外增殖分化的神经干细胞,但其增殖能力随胎龄的增加而逐步减弱。分析从30天的胎猪脑部和3月龄成猪脑的室下区取材培养获得的神经球,前者不仅表达干细胞标记,同时也表达定向分化的祖细胞标记^[10],表明成猪神经球内的多潜能细胞更趋于成熟,分化潜能受到限制,同时,胎猪神经球可检测到cyclin D2的表达,成猪不能,表明胎猪神经干细胞比成体神经球培养物扩增水平更高。

4 培养体系对神经干细胞分离培养的影响

神经干细胞体外培养扩增过程中,EGF和FGF是普遍添加的两种生长因子,区别主要在于添加生长因子浓度的不同。不同时期分离得到的干细胞对两种生长因子的依赖性存在差异。脊髓和胚胎发生早期的干细胞需要FGF才能生存,现在,胚胎FGF-依赖性神经上皮干细胞和稍后出现的EGF-依赖性神经球已建立了直接的谱系关系。细胞培养和嵌合鼠实验证明FGF依赖性细胞产生EGF依赖性细胞^[4],研究发现,最初只存在FGF依赖性的细胞,但随后出现了对EGF(来自FGF依赖的细胞)和FGF分别具有依赖性的细胞。目前,这些研究结果尚未在猪上证实。

培养液的另一区别是营养成分的不同,在猪神经前体细胞培养过程中,有三种添加物(B27、N2、BIT9500)被分别或组合使用,B27主要由21种物质组成,N2含有其中的6种成分,BIT9500含有N2 6种成分中的3种。在大鼠海马区成体神经干细胞的扩增实验上已证实B27的培养效果最优,其次是BIT9500,添加N2进行扩增的细胞成球率极低^[11]。但在猪上并未系统的比较过三种添加物的扩增效率,因此,如要大量扩增细胞,培养液成分还有待优化。

5 猪神经干细胞的鉴定

目前,神经干细胞的鉴定主要依据三个方面,持续的自我更新和增殖能力、多能性干细胞标记的表达以及可分化为中枢神经系统内三种主要的细胞类型(神经细胞、星形胶质细胞和少突胶质细胞)。从形态学上观察,无血清悬浮培养条件下神经干细胞会形成神经球,随着培养时间的延长,球体直径增大,细胞数量增多,将神经球消化成单细胞传代培养,单细胞分裂增殖再次形成神经球,贴壁培养条件下神经干细胞以单层贴壁细胞的形式增殖,由于分离的时间、部位、包被基质和神经干细胞种类的不同,贴壁细胞的形态也不尽相同,无论以哪种方式扩增培养,神经干细胞的干性维持稳定不变。体外培养的神经干细胞鉴定依据的标记应用最广泛的主要是Nestin。Nestin属于第Ⅰ类中间丝蛋白,仅在胚胎早期神经上皮表达,出生后停止表达。在神经前体细胞最先表达的是Nestin, Vimentin次之,随后两者共存。一旦神经前体细胞朝向终末方向分化,Nestin便停止表达。Vimentin是一种波形蛋白,属于第Ⅲ类中间丝蛋白。由于波形蛋白的表达比较早,起始于神经迁移完成时,分化完成后表达下降,因此也被一些人作为神经祖细胞的标志物。GFAP属于第Ⅳ类中间纤维,是星形胶质细胞的标志蛋白,报道发现位于室管膜下区表达GFAP的细胞显示出神经干细胞

的特性,因此有人提出也可用来标示部分神经干细胞。此外,有研究表明胎儿脑内神经祖细胞的维持需要 Hes1 的表达^[12]; Sox2 阳性的海马祖细胞可在体内生成神经元和星形胶质细胞^[13]; 对比表达 GFAP 的成体神经干细胞,CD133 阳性的室管膜细胞代表了另一种哺乳动物干细胞群体,也许他们的休眠性更强^[14]。总之,现在的研究证实神经干细胞存在于发育和成年大脑的多个脑区,不同脑区的细胞都具有多能性并且有共同特征,可根据对生长因子的依赖性、分离的时间、细胞表面受体标志、转录因子的表达以及分化为特定类型细胞的能力而相互区别^[4]。

6 展望

通过对异体移植细胞的长期跟踪,检测细胞的存活水平和整合情况,T.P. Harrower 等首次证明扩增后猪神经前体细胞异体移植到帕金森模式鼠脑中后,可长期存活并发育成熟整合到宿主脑组织内,提示猪神经干细胞作为人神经系统疾病细胞移植治疗替代物的极大可能性^[15]。转 EGFP 的猪神经干细胞可用于核移植生产克隆动物,选取猪的神经干细胞、羊水来源的干细胞、胎儿成纤维细胞、成体成纤维细胞和乳腺上皮细胞共 5 种细胞系来比较核移植重构胚的体外发育能力和体内妊娠率,结果表明干细胞核移植重构胚的桑葚胚形成比率和妊娠率远高于体细胞核移植重构胚的体外和体内发育能力^[16]。目前的研究结果表明了猪神经干细胞在细胞替代治疗和克隆动物生产方面的优势,但还有很多问题亟待解决:如何获取大量可以用于移植的神经干细胞,如何保障神经干细胞移植后的安全性,如何解决异体移植免疫排斥反应,如何系统地对神经干细胞进行分类和鉴定,神经干细胞自我更新、增殖、分化和重编程的机制是什么,如何调控神经干细胞定向分化成所需要的细胞类型等等,只有理论研究的日益加深和完善,才能促进应用的发展,保证应用的安全性和高效性。

参考文献(References)

- [1] 王娜,刘砚星,连易水,等.神经干细胞研究进展[J].生物学杂志,2009,26(1):55-58
Wang Na, Liu Yan-xing, Lian Yi-shui, et al. Development of research on neural stem cells[J]. Journal of Biology, 2009, 26(1):55-58
- [2] 顾恩妍,哈福,李林凤,等.神经干细胞分离培养方法的介绍[J].中国比较医学杂志,2008,18(11): 53-57
Gu En-yan, Ha Fu, Li Lin-feng, et al. Introduction of Isolation and Cultivation Method of Neural Stem Cells[J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2008, 18(11): 53-57
- [3] 王廷华,冯忠堂.神经细胞培养理论与技术[M].2版.北京:科学出版社,2009:116-122
Wang Ting-hua, Feng Zhong-tang. Theory and technology of neural cells culture [M]. 2nd edition. Beijing: Science Publishing Company, 2009:116-122
- [4] 丹尼尔·理查德·大卫.干细胞生物学[M].1版.北京:化学工业出版社,2004:347-352

- Daniel, Richard, David. Stem Cell Biology[M]. Beijing: Chemical Industry Publishing Company, 2004:347-352
- [5] 郑月茂,兰志刚,赵晓娥,等.猪胎儿神经干细胞的分离培养和分化[J].畜牧兽医学报,2009,40(11): 1686-1689
Zheng Yue-mao, Lan Zhi-gang, Zhao Xiao-e, et al. Differentiation and Isolation of Porcine Fetal Neural Stem Cells [J]. Acta Veterinaria et Zoot echnica Sinica, 2009, 40(11): 1686-1689
- [6] 郑月茂,赵雪,贺小英,等.转 EGFP 基因猪胎儿神经干细胞的体外分化[J].中国农业科学,2009, 42(9):3305-3313
Zheng Yue-mao, Zhao Xue, He Xiao-ying, et al. In vitro Differentiation of EGFP Gene Transfected Porcine Fetal Neural Stem Cells[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2009, 42(9):3305-3313
- [7] Paul W. Dyce, Hai Zhu, Jesse Craig, et al. Stem cells with multilineage potential derived from porcine skin [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, (316): 651-658
- [8] 李秀凤,管英俊,于丽.不同部位来源的神经干细胞的研究进展[J].解剖科学进展,2008, 14(3): 324-327
Li Xiu-feng, Guan Ying-jun, Yu Li. Progress of Neural Stem Cells Derived from Different Locations [J]. Progress of Anatomical Sciences, 2008, 14(3): 324-327
- [9] 冯敏,胡晶,王莎莎,等.3-18 周胎龄人胚胎神经干细胞的分离、培养及增殖[J].重庆医科大学学报,2007,32(4):366-370
Feng min, Hu jing, Wang Sha-sha, et al. Isolation, culture and proliferation of human embryonic neural stem cells at 3-18 week gestational age, 2007, 32(4):366-370
- [10] Olivier Liarda, Sté phanie Segurab, Auré lie Pascualc, et al. In vitro isolation of neural precursor cells from the adult pig subventricular zone[J]. Journal of Neuroscience Methods, 2009, (182):172-179
- [11] Frank-Peter Wachs, Sebastien Couillard-Despres, Maren Engelhardt, et al. High Efficacy of Clonal Growth and Expansion of Adult Neural Stem Cells[J]. Laboratory Investigation, 2003, 83(7):949-962
- [12] Hiromi Shimojo, Toshiyuki Ohtsuka, Ryoichiro Kageyama. Oscillations in Notch Signaling Regulate Maintenance of Neural Progenitors [J]. Cell Neuron, 2008, (58):52-64
- [13] Hoonkyo Suh, Antonella Consiglio, Jasodhara Ray, et al. In Vivo Fate Analysis Reveals the Multipotent and Self-Renewal Capacities of Sox2+ Neural Stem Cells in the Adult Hippocampus [J]. Cell Stem Cell, 2007, (1):515-528
- [14] Volkan Coskun, Hao Wu, Bruno Bianchi, et al. CD133+ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain [J]. PNAS, 2008, 105(3):1026-1031
- [15] T.P. Harrower, P. Tyers, Y. Hooks, et al. Long-term survival and integration of porcine expanded neural precursor cell grafts in a rat model of Parkinson's disease[J]. Experimental Neurology, 2006, (197):56-69
- [16] Yue-Mao Zheng, Hui-Ying Zhao, Xiao-E Zhao, et al. Development of cloned embryos from porcine neural stem cells and amniotic fluid-derived stem cells transfected with enhanced green fluorescence protein gene[J]. Reproduction, 2009, (137):793-801