

转 EGFP 基因猪胎儿神经干细胞的体外分化

郑月茂^{1,2}, 赵雪^{1,2}, 贺小英^{1,2}, 权富生^{1,2}, 刘军^{1,2}, 张涌^{1,2}

(¹西北农林科技大学动物医学院, 陕西杨凌 712100; ²西北农林科技大学生物工程研究所, 陕西杨凌 712100)

摘要:【目的】获得转 EGFP 基因神经干细胞并监测其自我更新、增殖和多向分化潜能; 通过用 EGFP 对神经干细胞进行标记和体外追踪实验, 为 EGFP 作为示踪标记对神经干细胞进行体内移植研究奠定基础。【方法】利用神经干细胞培养技术体系, 从胎龄 30 d 猪胎儿脑组织中分离培养神经干细胞, 通过脂质体介导转染技术, 将 EGFP 基因导入神经干细胞, 诱导转基因神经干细胞贴壁分化, 观察其体外增殖、分化特点。采用 RT-PCR 技术检测干细胞和分化细胞表面标志或相关基因。【结果】成功分离培养出神经干细胞, 获得转 EGFP 基因神经干细胞, 神经干细胞在表达 EGFP 的同时仍具有多向分化潜能。神经干细胞中 Nestin 表达强阳性, NogoA、DCX、CyclinD2、CD133、Hes1、Oct4、CD-90、Nanog 和 Sox2 表达阳性; 体外诱导的神经干细胞可以分化为星形胶质细胞 (表达 GFAP)、少突胶质细胞 (表达 GalC) 和神经元细胞 (表达 NF、NSE 和 MAP2); 能分化为脂肪细胞 (表达 LPL 和 PPAR γ -D)、成骨细胞 (表达 Osteonectin 和 Osteocalcin)、肌细胞 (表达 myf-5、myf-6 和 myoD)、内皮细胞 (表达 CD31、CD34、CD144 和 eNOS) 和软骨细胞 (表达 COL2A1)。【结论】从猪胎儿大脑组织分离神经干细胞具有可行性和有效性, 转 EGFP 基因神经干细胞具有自我更新、增殖和多向分化潜能, 可以用 EGFP 对神经干细胞进行标记、追踪, 作为示踪标记进行神经干细胞体内移植研究。

关键词: 神经干细胞; EGFP 基因; 细胞标记; 细胞分化; 猪胎儿

In vitro Differentiation of EGFP Gene Transfected Porcine Fetal Neural Stem Cells

ZHENG Yue-mao^{1,2}, ZHAO Xue^{1,2}, HE Xiao-ying^{1,2}, QUAN Fu-sheng^{1,2}, LIU Jun^{1,2}, ZHANG Yong^{1,2}

(¹College of Veterinary Medicine, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling 712100, Shaanxi; ²Institute of Biotechnology, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling 712100, Shaanxi)

Abstract: 【Objective】 Despite the increasing importance of the pig as a large animal model, little is known about the porcine neural stem cells (NSCs). 【Method】 To evaluate the markers expressed by NSCs, expression of EGFP by the cells and *in vitro* differentiation of the cells, brains were dissected from 30-day fetuses, enzymatically dissociated, and grown in the presence of epidermal growth factor, basic fibroblast growth factor etc. Porcine NSCs could be grown as suspended spheres. Plasmid containing EGFP gene was transfected into NSCs by lipofection and selected by G418. The positive NSCs were obtained. NSCs were induced to differentiate into cell types representing each embryonic germ layer, including cells of adipogenic, osteogenic, myogenic, endothelial, neuronal and chondrogenic lineages. 【Result】 Expanded NSCs and differentiated cells were banked or harvested for analysis using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Cultured porcine NSCs widely expressed Nestin, NogoA, DCX, CyclinD2, CD133, Hes1, Oct4, CD-90, Nanog and Sox2. NSCs were differentiated into astrocyte (GFAP⁺), oligodendrocyte (GalC⁺), neuron (NF⁺, NSE⁺ and MAP2⁺), adipocyte (LPL⁺ and PPAR γ -D⁺), osteoblast (Osteonectin⁺ and Osteocalcin⁺), myocyte (myf-5⁺, myf-6⁺ and myoD⁺), endothelium (CD31⁺, CD34⁺, CD144⁺ and eNOS⁺) and chondrogenic cells (COL2A1⁺). 【Conclusion】 This study shows that porcine NSCs are broadly multipotent, thus, may be useful in porcine cell transplantation studies potentially

收稿日期: 2008-09-24; 接受日期: 2009-01-22

基金项目: 国家“863”计划(2004AA213072)、西北农林科技大学科研专项基金(07ZR001)

作者简介: 郑月茂(1972-), 男, 内蒙古呼和浩特人, 副研究员, 博士, 研究方向为发育生物学。E-mail: zhengyuemao@163.com。赵雪(1974-), 女, 陕西礼泉人, 博士研究生, 研究方向为分子生物学。E-mail: ylzhaox@163.com。郑月茂和赵雪为本文共同第一作者。通信作者张涌(1956-), 男, 内蒙古呼和浩特人, 教授, 博士, 研究方向为动物胚胎工程。Tel: 029-87080085; E-mail: Zhy1956@263.net

leading to the application of this strategy in the setting of nervous system disease and injury.

Key words: neural stem cells; *EGFP* gene; markers; differentiation; porcine fetus

0 引言

【研究意义】神经干细胞 (neural stem cells, NSCs) 是指一类具有自我更新、高度增殖和多向分化潜能的细胞。NSCs 的发现, 是神经科学的重大发展, 标志着多年来“中枢神经细胞不可再生”理论的结束, 对神经系统的损伤修复、退行性疾病的治疗以及深入研究动物的生长发育和分化具有重要意义。【前人研究进展】1989 年 Anderson 等^[1]首先提出了神经干细胞的概念, 并通过试验首先证实 NSCs 的存在, 随后 Cattaneo^[2]、Reynolds^[3]、Gage^[4]和 Temple^[5]等分别在 *Nature* 及 *Science* 上刊登了有关 NSCs 的发现及其有关特性的论著。神经干细胞的发现是神经系统疾病治疗的一个里程碑, 大部分神经缺损是由于疾病或损伤而使神经系统中的某些类型细胞的数目减少所致, 而这些细胞又不能自我修复, 如神经退行性疾病 (帕金森病) 和脱髓鞘疾病。由于神经干细胞特有的生物学特性是既在体外的可持续增殖, 又具有多分化的潜能, 给人类多年来一直未能解决的使损伤或病变的中枢神经组织恢复相应功能的治疗难题提供了可能的途径。Snyder 等^[6]从人胎儿全脑分离出神经干细胞并成功地灌注入发育中的小鼠大脑后, 细胞能存活、迁移, 毫无无缝地与宿主大脑组织连为一体并产生 3 种基本的神经细胞, 这些被灌注的细胞还能替补小鼠小脑神经元退行性变性神经元缺陷。李庆国等对人胚中脑神经干细胞的分离、增殖及分化进行了研究^[7]。张明等对神经干细胞诱导分化相关因素进行了研究^[8]。杨立业等研究了神经干细胞体外长期培养和外源基因表达^[9]。赵慧英等对神经干细胞定向诱导分化条件进行了研究^[10]。迄今为止, 国内外的神经科学工作者已经使用神经干细胞移植技术对脑缺血性疾病、脑出血性疾病、中枢神经系统创伤^[11]、中枢神经系统慢性退变性疾病 (帕金森病^[12]、亨廷顿病、阿尔茨海默病) 以及中枢神经系统肿瘤等进行动物治疗试验, 展示了十分诱人的临床应用前景。例如, 帕金森病是由于黑质多巴胺神经元变性引起的, 表现为典型的运动功能失调如僵直、颤抖等。但是, NSCs 在应用上还遇到许多问题, 如目前无论从 NSCs 的来源、特性研究以及临床应用上, 仍存在诸多的问题。例如, NSCs 的研究、应用、相关技术的发展还受到干细胞来源的影响,

其大部分 NSCs 由胚胎干细胞培养分化而来。胚胎干细胞有两种分离方法, 其一由体外受精治疗不孕症患者提供的临床需要之余的早期胚胎, 其二来自终止妊娠的死亡胎儿。采用该类来源的 NSCs 进行研究是否有伦理问题, 一直争论不休, 且胚胎来源非常有限。另外, 干细胞在动物实验及临床观察时, 均发现移植细胞存活时间较短、存活率不高、治疗效果不确切等缺陷, 帕金森病患者接受移植后数年内症状出现反复。因而笔者认为, 需要对 NSCs 进行更为广泛和深入的研究, 以期在较短时间内取得突破性进展。在探索及发展人类疾病新疗法的过程中, 动物模式扮演着重要角色。模式动物中以猪具有可畜养、演化上与人类接近、遗传与疾病研究资料丰富等特点而备受青睐。Philip 等曾对猪的神经前体细胞进行了研究^[13]。【本研究切入点】本研究的目的是获得转 EGFP (enhanced green fluorescence protein) 基因神经干细胞并监测其自我更新、增殖和多向分化潜能; 通过用 EGFP 对神经干细胞进行标记和体外追踪试验。【拟解决的关键问题】为 EGFP 作为示踪标记对神经干细胞进行体内移植研究奠定基础, 为利用猪神经干细胞建立人类猪疾病治疗研究模式奠定基础, 并为相关研究提供理论基础和技术保证。

1 材料与amp;方法

1.1 主要试剂

除特别说明外, 试剂均购自美国 Sigma 公司。含 EGFP 基因的质粒 (pEGFP-N1)。G418 购自 MBI 公司。基质胶 (Matrigel)。油红-O 染液。阳离子脂质体 LipofectamineTM2000 购自 Invitrogen 公司。

1.1.1 神经干细胞分离培养液配方及主要试剂 基础液: 98 mmol·L⁻¹ Na₂SO₄、30 mmol·L⁻¹ K₂SO₄、5.8 mmol·L⁻¹ MgCl₂、0.25 mmol·L⁻¹ CaCl₂、1 mmol·L⁻¹ Hepes、20 mmol·L⁻¹ 葡萄糖、0.001 % 酚红和 0.125 mmol·L⁻¹ NaOH。消化液: 20 ml 基础液添加 6.4 mg 半胱氨酸和 200 μl 木瓜蛋白酶。浓终止液: 6 ml 基础液添加 60 mg 牛血清白蛋白和 60 mg 胰蛋白酶抑制剂。稀终止液: 9 ml 基础液添加 1 ml 浓终止液。基础培养液: 500 ml 神经培养液 (Gibco) 添加 100 U·ml⁻¹ 青霉素、100 μg·ml⁻¹ 链霉素和 5 ml 100× L-谷氨酰胺。储备培养液: 48.5 ml 基础培养液添加 1 ml B27 (Gibco)

和 0.5 ml N2 (Gibco)。完全培养液: 10 ml 储备培养液添加 10 μl EGF (100 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) (Gibco) 和 10 μl bFGF (10 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) (Gibco)。

1.1.2 神经干细胞诱导液配方及主要试剂 诱导对照培养液: DMEM (低糖) 添加 100 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ 青霉素、100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 链霉素和 10% FBS (神经细胞对照培养液不添加 FBS)。神经细胞诱导液: 对照培养液添加 10% FBS 和 25 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ NGF。脂肪细胞诱导液: 对照培养液添加 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 地塞米松、1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX)、10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 胰岛素、0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 左旋维生素 C 和 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 吡啶美辛。成骨细胞诱导液: 对照培养液添加 100 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 地塞米松、10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -磷酸甘油和 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 左旋维生素 C。肌细胞诱导液: 对照培养液添加 3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 5-氮杂胞苷。内皮细胞诱导液: 内皮细胞培养液 (Clonetics) 添加 10% FBS、100 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ 青霉素、100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 链霉素和 2 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ bFGF。软骨细胞诱导液: DMEM (高糖) (Invitrogen) 添加 2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ L-谷氨酰胺 (Invitrogen)、100 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ 青霉素、100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 链霉素、1% ITS、100 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 地塞米松、40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ L-脯氨酸、50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 左旋维生素 C、10 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ TGF- β 1 和 100 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ IGF-1。

1.2 主要仪器

PCR 仪 (MJ), 分光光度计及各种型号离心机 (SIGMA), 凝胶成像分析系统 (UVP), CO_2 恒温培养箱 (Thermo Forma), IMT-2 相差倒置显微镜 (OLYMPUS)。

1.3 猪胎儿神经干细胞分离培养

手术采集胎龄 30 d 的猪胎儿脑组织, 加入 4 ml 消化液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化, 出现絮状物时依次加入 2 ml 稀终止液和 2 ml 浓终止液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置 2 min; 转移絮状物到另一离心管中, 加入 2 ml 储备培养液, 轻弹几下离心管; 然后转移絮状物到培养板中, 加入 1 ml 完全培养液, 用吸管轻轻反复吹吸, 尽量使絮状物分散为单个细胞。将细胞悬液以 5×10^4 个细胞 $\cdot\text{ml}^{-1}$ 接种于专用六孔培养板, 加入 2 ml 完全培养液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 和饱和湿度下培养, 细胞球形成后, 每 2 d 在培养液中添加 10 μl EGF (100 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 10 μl bFGF (10 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$); 3 d 以后可以将干细胞球消化分离为单个细胞进行传代培养, 方法同上; 冻存大部分细胞, 解冻后培养。

1.4 将 EGFP 基因导入神经干细胞

利用脂质体包裹含 EGFP 基因的质粒, 将之导入神经干细胞, 经 G418 筛选获得阳性细胞。转染

方法按照脂质体 2000 试剂说明书进行, 将转染细胞于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱孵育, 48 h 后用 G418 筛选。

1.5 神经干细胞体外多向诱导分化

将消化分离为单细胞的第 3 代转基因神经干细胞接种于 24 孔培养板, 分别利用神经细胞诱导液、脂肪细胞诱导液、成骨细胞诱导液、肌细胞诱导液、内皮细胞诱导液和软骨细胞诱导液将神经干细胞向神经细胞、脂肪细胞、成骨细胞、肌细胞、内皮细胞和软骨细胞诱导分化。将培养板用纤粘连蛋白 (除特别说明外) 包被, 根据以下方法在 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 、饱和湿度的培养箱中对干细胞进行诱导分化培养。每个试验组设立 3 个重复, 添加诱导液; 同时设立对照组, 添加对照培养液。各诱导孔每周换液 2 次, 诱导 2~4 周后收获细胞, 利用 RT-PCR 技术鉴定细胞, 检测神经干细胞和已分化细胞的表面标志或相关基因表达。分化为神经细胞: 以 3×10^3 个细胞/ cm^2 接种, 用对照培养液培养 2 d 后用诱导液培养。分化为脂肪细胞: 以 3×10^3 个细胞/ cm^2 接种进行诱导培养。培养至第 15 天时用油红-O 染色法检测脂肪滴。分化为成骨细胞: 以 5×10^4 个细胞/孔接种, 诱导培养 21 d。分化为肌细胞: 培养板用基质胶包被, 以 3×10^3 个细胞/ cm^2 接种, 先用对照培养液培养 12 h 后更换为诱导液培养 24 h, 再用对照培养液继续培养 4 周。分化为内皮细胞: 培养板用基质胶包被, 以 3×10^3 个细胞/ cm^2 接种培养, 每 2 d 补充 bFGF。分化为软骨细胞: 以 3×10^3 个细胞/ cm^2 接种, 静态培养 2 周。

1.6 神经干细胞和已分化细胞鉴定

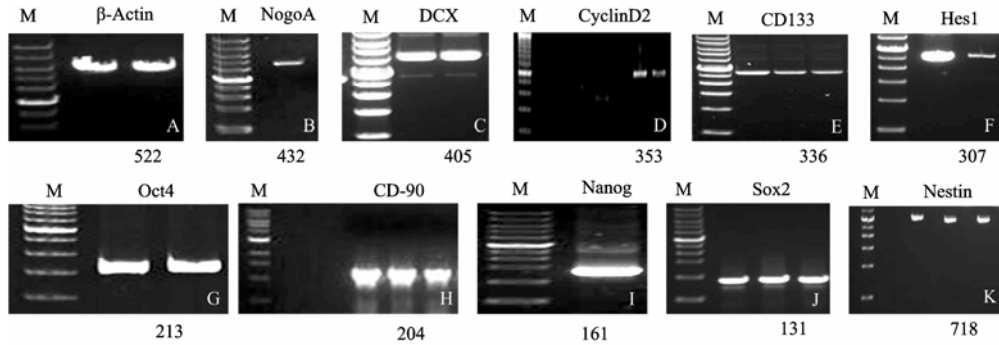
利用 RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 技术检测神经干细胞和已分化细胞的表面标志或相关基因 mRNA 的表达。内参照用管家基因 β -Actin。RT-PCR 操作步骤简述如下: 用 Trizol 试剂 (Invitrogen 公司) 提取待测细胞的总 RNA; 紫外吸收定量后, 进行 RT-PCR 反应, 采用 SuperscriptIII (Gibco BRL) 试剂盒反转录成 cDNA; 以 cDNA 为模板按照以下程序进行 PCR 扩增 (根据 GeneBank 的 cDNA 序列, 利用引物设计软件 primer 5.0 设计引物, 委托上海生物工程技术有限公司合成): 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ (引物不同退火温度亦不同) 退火 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 循环 40 次后, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。PCR 产物以 1.5% 的琼脂糖凝胶进行分离, 溴化乙锭染色后在紫外凝胶成像系统下分析产物条带。

2 结果与分析

2.1 获得转 EGFP 基因神经干细胞

从猪胎儿脑组织中分离得到神经干细胞，形成细胞球，将这些细胞球分离成单细胞并重新以克隆密度培养，单个细胞又很快形成新的神经球。细胞球形状

比较规则，边界清晰，折光性好，立体感强。神经干细胞 NogoA、DCX、CyclinD2、CD133、Hes1、Oct4、CD-90、Nanog 和 Sox2 表达阳性（图 1-A~J），Nestin 表达强阳性（图 1-K）。神经干细胞转染 2 d 后加 G418 进行筛选，阴性细胞生长变缓，逐渐死亡，阳性细胞克隆逐渐增大，形成阳性细胞球。消化回收转 EGFP



M 表示 DNA 标记；图 A-J M 为 50 bp 标记：50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 (最亮), 400, 450, 500, 550, 600 bp；图 K M 为 100 bp 标记：100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 (最亮), 800 bp
M indicates DNA markers. Fig. A-J M was 50 bp Marker: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 (the brightest), 400, 450, 500, 550, 600 bp; Fig. K M of 100 bp DNA Marker: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700(the brightest), 800 bp

图 1 NSCs 表面标志或相关基因 RT-PCR 产物电泳（图下数字表示产物长度，单位为 bp）

Fig. 1 NSCs markers by RT-PCR (Sizes of PCR products are shown under the figures)

基因神经干细胞球，扩增培养（图 2）。

2.2 神经干细胞的多系分化能力

向神经细胞分化：NSCs 贴壁后分化，部分细胞胞体增大并出芽（图 3-B），逐渐发育成为较成熟的长突出细胞，长突出相互连接，交织成网并建立有神经纤维样联系（图 3-C），部分神经细胞呈束状排列（图 3-D）。分化后的细胞表达 GFAP、GalC、NF、NSE 和 MAP2 等神经细胞特异性标志（图 3-E~I）。结果表明，体外诱导的 NSCs 可以分化为星形胶质细胞（表达 GFAP）、少突胶质细胞（表达 GalC）和神经元细胞（表达 NF、NSE 和 MAP2），说明 NSCs 可转变为神经的 3 种功能细胞。

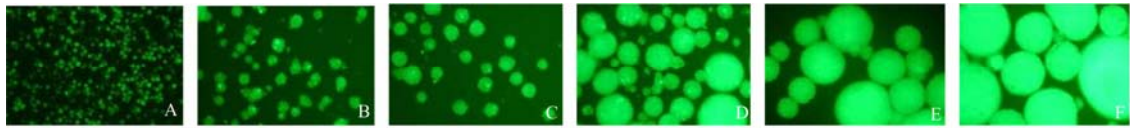
向脂肪细胞分化：NSCs 诱导分化 7 d，少数细胞表面出现细小的脂滴；14 d 时，原细小脂滴聚集成大脂滴，有的细胞表面完全被脂滴覆盖；培养 21 d，细胞胞浆中充满脂肪小泡（图 4-B），脂肪细胞呈短梭形或椭圆形，油红 O 染色显示脂滴为红色（图 4-D），对照组没有或只有个别细胞油红 O 染色阳性（图 4-C）。分化后的细胞表达 LPL 和 PPAR γ -D 等脂肪细胞表面标志或相关基因（图 4-E, F）。

向成骨细胞分化：在成骨培养体系中培养 2 周，神经干细胞由梭形变为多角形（图 7-B）。分化的细胞表达 Osteonectin 和 Osteocalcin 等成骨细胞表面标志或相关基因（图 7-C, D）。

向肌细胞分化：神经干细胞经 5-氮杂胞苷诱导后 3 周，细胞变长呈梭形，长条状（图 8-B, C）。分化后的细胞表达 *myf-5*、*myf-6* 和 *myoD* 等肌细胞表面标志或相关基因（图 8-D, E, F）。

向内皮细胞分化：细胞由圆形逐渐伸展成短梭形，细胞聚集成细胞簇，簇与簇之间连接，形成网格状；网格之间连线变细，由节点互相连接，形成网格样结构（图 7-B）。分化后的细胞表达 CD31、CD34、CD144 和 eNOS 等内皮细胞特异性标志（图 7-C, D, E, F）。

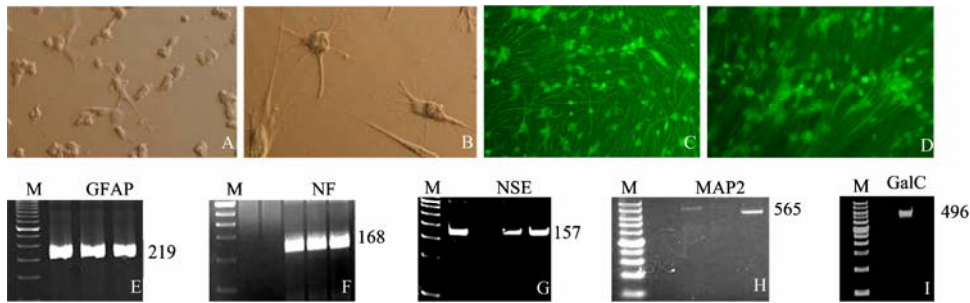
向软骨细胞分化：神经干细胞诱导培养 12 h 后少量贴壁；24 h 后大部分贴壁，贴壁细胞逐渐变成长梭形（图 8-B）；诱导 1 周后，长梭形的细胞明显向软骨的多角形方向变化（图 8-C）；诱导 2 周后，大部分细胞均已变成多角形（图 8-D）。对照组细胞形态未见变化（图 8-A）。分化后的细胞表达软骨特异性标志 COL2A1（图 8-E）。



10×. A: 培养 0 h; B: 培养 1 d; C: 培养 2 d; D: 培养 3 d; E: 培养 4 d; F: 培养 5 d
 10×. A: Cultured for 0 h; B: Cultured for 1 d; C: Cultured for 2 d; D: Cultured for 3 d; E: Cultured for 4 d; F: Cultured for 5 d

图 2 转 EGFP 基因 NSCs 扩增培养 (荧光显微镜下照片)

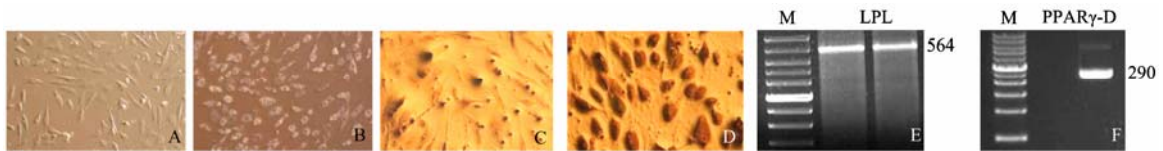
Fig. 2 EGFP gene transfected NSCs in culture (under green fluorescence microscope)



10×; A: 对照组细胞; B, C, D: 试验组细胞 (C, D 为荧光显微镜下照片); E-I: 神经细胞表面标志或相关基因 RT-PCR 产物电泳结果 (图右数字示产物长度, 单位为 bp); M 为 50 bp DNA 标记: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 (最亮), 400, 450, 500, 550, 600 bp
 10×; A: Control group; B, C, D: Treated group (C, D under green fluorescence microscope); E-I: Results of neurogenic markers by RT-PCR (Sizes of PCR products are shown on the right of the figures); M indicates size markers (50 bp):50, 100, 150, 200, 250, 300, 350(the brightest), 400, 450, 500, 550, 600 bp

图 3 NSCs 诱导分化为神经细胞

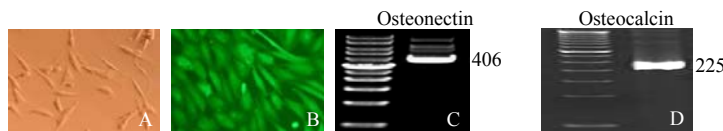
Fig. 3 Neurogenic differentiation of NSCs in culture



A, C: 对照组细胞; B, D: 试验组细胞; A, B: 10×; C, D: 油红 O 染色, 20×; E, F: 脂肪细胞表面标志或相关基因 RT-PCR 产物电泳结果 (图右数字表示产物长度, 单位为 bp); M 为 50 bp DNA 标记: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 (最亮), 400, 450, 500, 550, 600 bp
 A, C: Control group; B, D:Treated group; A, B. 10×; C, D: Oil Red O stained, 20×; E, F: Results of adipogenic markers by RT-PCR (Sizes of PCR products are shown on the right of the figures); M indicates DNA markers (50 bp):50, 100, 150, 200, 250, 300, 350(the brightest) 400, 450, 500, 550, 600 bp

图 4 NSCs 诱导分化为脂肪细胞

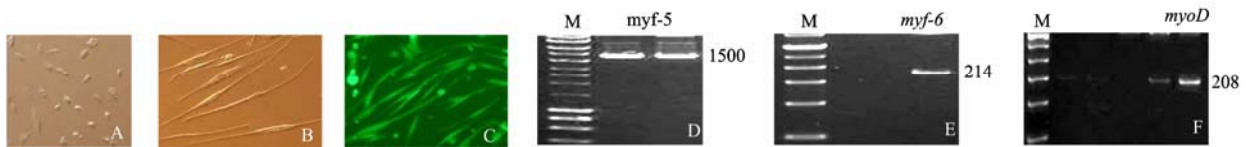
Fig. 4 Adipogenic differentiation of NSCs in culture



20×. A: 对照组 B.试验组 (荧光显微镜下照片); C, D: 成骨细胞表面标志或相关基因 RT-PCR 产物电泳结果 (图右数字表示产物长度, 单位为 bp); M 为 50 bp DNA 标记: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 (最亮), 400, 450, 500, 550, 600 bp
 20×. A: Control group; B: Treated group (under green fluorescence microscope); C, D: Results of osteogenic markers by RT-PCR (Sizes of PCR products are shown on the right of the figures); M indicates DNA markers (50 bp):50, 100, 150, 200, 250, 300, 350(the brightest), 400, 450, 500, 550, 600 bp

图 5 NSCs 诱导分化为成骨细胞

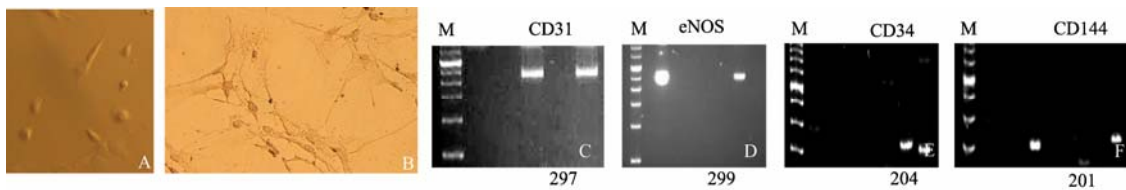
Fig. 5 Osteogenic differentiation of NSCs in culture



10×. A: 对照组; B, C: 试验组 (C 为荧光显微镜下照片); D, E, F: 肌细胞表面标志或相关基因 RT-PCR 产物电泳结果 (图右数字表示产物长度, 单位为 bp); 图 D. M 为 100 bp DNA 标记: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 (最亮), 800 bp; 图 E, F: M 为 50 bp DNA Marker: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 (最亮), 400, 450, 500, 550, 600 bp
10×. A: Control group; B, C, D: Treated group (C, D. under green fluorescence microscope); E-I: Results of myogenic markers by RT-PCR (Sizes of PCR products are shown on the right of the figures); Fig. L M indicates size markers (100 bp):100, 200, 300, 400, 500, 600, 700(the brightest), 800 bp; Fig. E, F M indicates size markers (50 bp):50, 100, 150, 200, 250, 300, 350(the brightest), 400, 450, 500, 550, 600 bp

图 6 NSCs 诱导分化为肌细胞

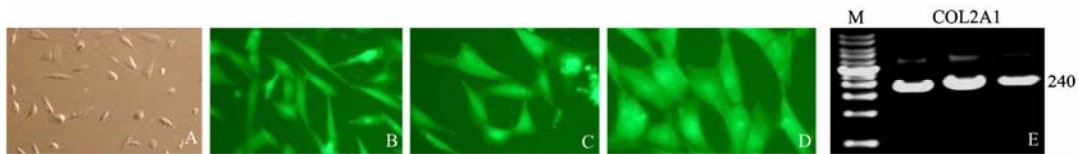
Fig. 6 Myogenic differentiation of NSCs in culture



10×. A: 对照组; B: 试验组; C, D, E, F: 内皮细胞表面标志或相关基因 RT-PCR 产物电泳结果 (图下数字表示产物长度, 单位为 bp); M 为 50 bp DNA 标记: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 (最亮), 400, 450, 500, 550, 600 bp
10×. A: Control group; B: Treated group; C, D, E, F: Results of endothelial markers by RT-PCR (Sizes of PCR products are shown under the figures); M indicates DNA markers (50 bp): 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 (the brightest), 400, 450, 500, 550, 600 bp

图 7 NSCs 诱导分化为内皮细胞

Fig. 7 Endothelial differentiation of NSCs in culture



10×. A: 对照组; B, C, D: 试验组 (荧光显微镜下照片); E: 软骨细胞表面标志或相关基因 RT-PCR 产物电泳结果 (图右数字示产物长度, 单位为 bp); M 为 50 bp DNA 标记: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 (最亮), 400, 450, 500, 550, 600 bp
10×. A: Control group; B, C, D: Treated group (under green fluorescence microscope); E: Results of chondrogenic markers by RT-PCR (Sizes of PCR products are shown on the right of the figure); M indicates size markers (50 bp):50, 100, 150, 200, 250, 300, 350(the brightest), 400, 450, 500, 550, 600 bp

图 8 NSCs 诱导分化为软骨细胞

Fig. 8 Chondrogenic differentiation of NSCs in culture

3 讨论

神经干细胞是一组具有自我更新并能分化成神经元、星型胶质细胞与少突胶质细胞等的细胞。现在, NSCs 通常通过 NSCs 表面标记分子与分化表型的缺少来鉴定。神经巢蛋白 (Nestin) 是细胞的骨架蛋白, 是一种中间丝蛋白, 主要在神经干细胞表达, 随着神经干细胞逐渐分化成熟, Nestin 表达减弱, 故可用于

神经干细胞的鉴定^[14]。此外, 还有一些与神经干细胞或神经前体细胞相关的标记, 如 *Sox2* 和 *Hes1*^[15-16], *cyclin D2* 在猪和人的神经前体细胞中都有表达^[17]。Schwartz 等在猪神经前体细胞中检测到的标记有 β -Actin、NogoA、DCX、CyclinD2、Pbx1、Vimentin、Nucleostemin、Hes1 和 *Sox2*^[13]。本研究检测到的猪胎儿神经干细胞表面标志或相关基因有 NogoA、DCX、CyclinD2、CD133、Hes1、Oct4、CD-90、Nanog 和

Sox2, Nestin 表达强阳性。Oct4、Nanog 和 Sox2 是调节胚胎干细胞基因转录的 3 个具有代表性的转录因子, 对维持细胞多能性具有重要作用^[18]。胚胎干细胞通过表达一系列的转录因子来抑制促分化基因的表达, 从而能通过防止分化来维持其自我更新能力。胚胎干细胞在发育过程中的第一个分化是滋养层的形成。滋养层的形成是由于 Oct4 的表达下调来实现的。所以, Oct4 的主要功能之一是抑制一系列细胞分化因子的表达来维持其自我更新。Nanog 基因是促进干细胞自我更新的重要因子。Nanog 是最新发现的一个在维持 ES 细胞自我更新和保持全能性中发挥重要作用的转录因子, 独立于白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF) 途径和骨形成蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 途径, 与 Oct4, Sox2 共同位于细胞全能性调控网络的顶端^[19]。转录因子 Sox2 是 Sox 基因家族的一个成员, 由于它在早期胚胎发生、神经分化和晶状体发育等多种重要的发育事件中起着关键的作用, 从而引起了越来越广泛的关注^[20]。CD90 (Thy-1) 作为肝干细胞与前体细胞标记物在成熟肝细胞中很少表达, Yang 等^[21]在研究肝癌细胞系中发现 CD90⁺细胞具有肿瘤干细胞性质, 之后又通过对肝癌组织与肝癌患者外周血的研究发现 CD45-CD90⁺细胞为肝癌干细胞的标记物。

神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 是神经元和神经内分泌细胞所特有的一种酸性蛋白酶, 主要存在于大脑神经元和神经内分泌细胞内, 是神经元的特异性标记物^[14]。胶质纤维酸性蛋白 (GFA P) 属于三型中间丝蛋白家族成员, 为星形胶质细胞特异性蛋白^[14]。本研究结果显示, 猪胎儿神经干细胞可以分化为胶质细胞 (表达 GFAP)、少突胶质细胞 (表达半乳糖苷神经酰胺 GalC) 和神经元细胞 (表达神经丝蛋白 NF、NSE 和 MAP2), 说明 NSC 可转变为神经的 3 种功能细胞。猪胎儿神经干细胞来源的脂肪细胞表达脂蛋白脂肪酶 (lipoprotein lipase, LPL) 和 PPAR γ 2D 等脂肪细胞表面标志或相关基因。骨连接蛋白 (osteonectin) 由纤维原细胞、成骨细胞、软骨细胞、上皮细胞和血小板等产生。本研究结果显示, 猪胎儿神经干细胞来源的成骨细胞表达骨连接蛋白 (osteonectin) 和骨钙素 (osteocalcin, OCN) 等成骨细胞表面标志或相关基因。

生肌决定基因 (myogenic determination gene, *MyoD*) 家族由 4 个转录因子组成: *myoD*, *myogenin* (*myf-4*), *myf-5* 和 *myf-6*。由于 5-氮杂胞苷是胞嘧

啶核苷的同工异构体, 具有去甲基的作用, 它可能通过对 NSCs 的 DNA 中一些胞嘧啶核苷去甲基的作用, 起到了激活表达肌细胞基因的作用^[22-23]。本研究结果显示, 猪胎儿神经干细胞来源的肌细胞表达 *myf-5*、*myf-6* 和 *myoD* 等肌细胞表面标志或相关基因。曹莹等分离培养的成体干细胞在 bFGF 等诱导下表达内皮细胞标志 CD31、CD34、CD144 和内皮一氧化氮合成酶 (e-NOS)^[24]。本研究结果显示, 猪胎儿神经干细胞来源的内皮细胞表达内皮细胞标志 CD31、CD34、CD144 和 eNOS。II 型胶原特异性增殖基因 Col2a1 (II 型胶原 $\alpha 1$ 基因) 是软骨细胞增殖时不可取代的, COL2A1 (II 型胶原) 也是软骨细胞的特异性标志蛋白之一。本研究表明, 从猪胎儿大脑组织分离的神经干细胞在向软骨细胞诱导分化后, 细胞表达软骨特异性标志 COL2A1。

增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 是一种优化的突变型绿色荧光蛋白, 其荧光比野生型强 35 倍, 具有结构稳定、高效表达、无种系依赖性等特点, 更适用于细胞基因表达和蛋白定位检测及细胞示踪标记。本试验表明, EGFP 在猪胎儿神经干细胞内的长期表达对细胞的生长发育没有产生不利影响, 这表明, 它不但可以作为一个瞬时表达用的标记物, 而且也完全可以用于长久的高水平表达的标记物。这一研究结果, 为 EGFP 作为良好的示踪标记用于体内移植的研究奠定了坚实基础。

综上所述, 本研究在国内首次对猪胎儿神经干细胞多向分化潜能进行了较系统的研究; 在国内首次证实了脂质体转染外源性 EGFP 对 NSCs 分化没有明显的影响, 可以采用脂质体转染 EGFP 的方法标记猪胎儿神经干细胞, 为 NSCs 的体内追踪和研究找到了一种成本低廉、操作简单、转染效率高、细胞毒性小的标记方法, 将会推动和促进 NSCs 的广泛深入研究。

4 结论

从猪胎儿大脑组织分离神经干细胞具有可行性和有效性, 神经干细胞具有自我更新、增殖和多向分化潜能, 而且 NSCs 特性稳定, 易于获得及扩增, 连续传代培养和冷冻保存后仍具有多向分化潜能, 多次传代后细胞冻存对细胞的存活力无明显影响, 多向分化潜力表现出稳定性, 在组织工程中具有良好的应用前景。可以用 EGFP 对神经干细胞进行标记、追踪, 用于神经干细胞体内移植研究。

References

- [1] Anderson D J, Michelsohn A. Role of glucocorticoids in the chromaffin neuron developmental decision. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 1989, 7(5): 475-487.
- [2] Cattaneo E, McKay R. Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor. *Nature*, 1990, 347: 762-765.
- [3] Reynolds B A, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 1992, 255: 1707-1710.
- [4] Gage F H. Mammalian neural stem cells. *Science*, 2000, 287(5457): 1433-1438.
- [5] Temple S. The development of neural stem cells. *Nature*, 2001, 414 (6859): 112-117.
- [6] Snyder E Y, Park K I, Flax J D, Liu S, Rosario C M, Yandava B D, Aurora S. Potential of neural "stem-like" cells for gene therapy and repair of the degenerating central nervous system. *Advanced Neurology*, 1997, 72:121-132.
- [7] 李庆国, 梁 鹏, 武俏丽, 林志国, 刘恩重, 戴钦舜. 人胚中神经干细胞的分离、增殖及分化的研究. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2002, 1(2): 153-154.
Li Q G, Liang P, Wu Q L, Lin Z G, Liu E Z, Dai Q S. Isolation, proliferation and differentiation of neural stem cells from ventral mesencephalon of human fetal. *Chinese Journal of Neurdsurgical Disease Research*, 2002, 1(2): 153-154. (in Chinese)
- [8] 张 明, 孙晓川. 神经干细胞诱导分化相关因素的研究. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(1): 2133-2139.
Zhang M, Sun X C. Relevant factors for the induction of neural stem cell differentiation. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2007, 11(1): 2133-2139. (in Chinese)
- [9] 杨立业, 惠国桢, 包大士, 蒋丽珍, 费 俭, 郭礼和. 神经干细胞体外长期培养和外源基因表达. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2002, 1(3): 262-265.
Yang L Y, Hui G Z, Bao D S, Jiang L Z, Fei J, Guo L H. The long-term culture *in vitro* and exogenous gene expression of neural stem cells. *Chinese Journal of Neurdsurgical Disease Research*, 2002, 1(3): 262-265. (in Chinese)
- [10] 赵慧英, 张 涌. 神经干细胞定向诱导分化条件研究. *安徽农业大学学报*, 2005, 32(3): 298-300.
Zhao H Y, Zhang Y. Conditions of inducing neuron stem cells into specific neurons *in vitro*. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2005, 32(3): 298-300. (in Chinese)
- [11] Pincus D W, Goodman R R, Fraser R A, Nedergaard M, Goldman S A. Neural stem and progenitor cells: a strategy for gene therapy and brain repair. *Neurosurgery*, 1998, 42(4): 858-868.
- [12] Armstrong R J, Hurelbrink C B, Tyers P, Ratcliffe E L, Richards A, Dunnett S B, Rosser A E, Barker R A. The potential for circuit reconstruction by expanded neural precursor cells explored through porcine xenografts in a rat model of Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 2002, 175: 98-111.
- [13] Schwartz P H, Nethercott H, Ivan I, Ziacian K B, Michael J, Klassen Y H. Expression of neurodevelopmental markers by cultured porcine neural precursor cells. *Stem Cells*, 2005, 23: 9: 1286-1294.
- [14] 王 勇, 陆长青, 王 凡. 丹参诱导大鼠骨髓间充质干细胞向神经样细胞分化. *解剖学杂志*, 2007, 30(2): 207-210.
Wang Y, Lu C Q, Wang F. Differentiation of rat bone marrow stromal stem cells into neuron-like cells induced by *Salvia miltiorrhiza*. *Chinese Journal of Anatomy*, 2007, 30(2): 207-210. (in Chinese)
- [15] Cai J, Wu Y, Mirua T, Pierce J L, Lucero M T, Albertine K H, Spangrude G J, Rao M S. Properties of a fetal multipotent neural stem cell (NEP cell). *Developmental Biology*, 2002, 251: 221-240.
- [16] Schwartz P H, Bryant P, Fuja T J, Su H, O'Dowd D K, Klassen H. Isolation and characterization of neural progenitor cells from post-mortem human cortex. *Journal of Neuroscience Research*, 2003, 74: 838-851.
- [17] Tsai R Y, McKay R D. A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells. *Genes & Development*, 2002, 16: 2991-3003.
- [18] 李东伟, 李文雍. 转录因子 Oct4, Sox2 和 Nanog 在早期胚胎发育过程中的表达调控. *生物学杂志*, 2007, 24(3): 6-8.
Li D W, Li W Y. Advances in the studies of transcription factors Oct4, Sox2 and Nanog. *Journal of Biology*, 2007, 24(3): 6-8. (in Chinese)
- [19] 耿嘉璐, 孙莹璞. 胚胎干细胞转录因子 Nanog 研究进展. *国外医学(计划生育生殖健康分册)*, 2006, 25(6): 299-302.
Geng J X, Sun Y P. Advances in the studies of ES cells transcription factor Nanog. *Foreign Medical Sciences Family Planning/Reproduction Health Fascicle*, 2006, 25(6): 299-302. (in Chinese)
- [20] 陈艳玫, 姚 鑫. 转录因子 Sox2 的研究进展. *生命科学*, 2004, 16(3): 129-134.
Chen Y M, Yao Z. Advances in the studies of transcription factor Sox2. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2004, 16(3): 129-134. (in Chinese)
- [21] Yang Z F, Ngai P, Ho D W, Yu W C, Ng M N, Lau C K, Li M L, Tam K H, Lam C T, Poon R T, Fan S T. Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer. *Hepatology*, 2008, 47(3): 919-928.
- [22] Taylor S M. 5-Aza-2-deoxycytidine: cell differentiation and DNA

- methylation. *Leukemia*, 1993, 7(Suppl. 1): 3-8.
- [23] 马国涛, 任 华, 赵 明, 张超纪, 裴 铭. 骨髓间质干细胞体外转分化为肌细胞的实验研究. *基础医学与临床*, 2005, 25(1): 66-69.
Ma G T, Ren H, Zhao M, Zhang C J, Pei M. Study on transdifferentiation of mesenchymal stem cells into myogenic cells *in vitro*. *Basic Medical Sciences and Clinics*, 2005, 25(1): 66-69. (in Chinese)
- [24] 曹 莹, 孟 艳, 孙 昭, 廖联明, 韩 钦, 李 静, 刘艳宁, 赵春 华. 脂肪来源成体干细胞分化为内皮细胞的潜能. *中国医学科学院学报*, 2005, 27(6): 678-682.
Cao Y, Meng Y, Sun Z, Liao L M, Han Q, Li J, Liu Y N, Zhao C H. Potential of human adipose tissue derived adult stem cells differentiate into endothelial cells. *Acta Academiae Medicinae Sinicae*, 2005, 27(6): 678-682. (in Chinese)
- (责任编辑 林鉴非)

欢迎订阅 2010 年《大豆科学》

《大豆科学》是由黑龙江省农业科学院主管主办国内外公开发行的我国大豆专业领域学术性期刊,也是被国内外多家重要数据库和文摘收录源收录的重点核心期刊,反映大豆科学研究的最新成果。主要刊登有关大豆遗传育种、品种资源、生理生态、耕作栽培、植物保护、营养肥料、生物技术、食品加工、药用功能及工业用途等方面的学术论文、科研报告、研究简报、国内外研究述评、学术活动简讯和新品种介绍等。

《大豆科学》主要面向从事大豆科学研究的科技工作者,大专院校师生、各级农业技术推广部门的技术人员及科技种田的农民。

国内外公开发行,双月刊,16开本,每期180页。国内每期订价:10.00元,全年60.00元,邮发代号:14-95。国外每期订价:10.00美元(包括邮资),全年60美元。国外由中国国际图书贸易总公司发行,北京399信箱。国外代号:Q5587。

本刊热忱欢迎广大科研及有关企事业单位刊登广告,广告经营许可证号:2301030000004。

地址:哈尔滨市南岗区学府路368号《大豆科学》编辑部(邮编:150086)

电话:0451-86668735; E-mail: dadoukx@sina.com, ddkexue@126.com

欢迎订阅 2010 年《中国生态农业学报》

《中国生态农业学报》由中国科学院遗传与发育生物学研究所和中国生态经济学会主办,中国科学院主管,科学出版社出版。中文核心期刊、中国科技核心期刊,被美国化学文摘、国际农业生物学文摘、美国乌利希国际期刊指南以及中国科学引文数据库、中国期刊全文数据库等多家检索系统和数据库收录。荣获第三届、四届全国农业优秀期刊一等奖和首届北方优秀期刊奖,连续三届获得河北省优秀期刊奖。

《中国生态农业学报》主要报道农业生态学、生态学、农业资源与环境保护、农业生态经济学及生态农业建设等领域创新性研究成果。适于从事农业生态学、生态学、生态经济学以及环境保护等领域科技人员、高等院校有关专业师生,农业及环境管理工作者和基层从事生态农业建设的广大技术人员阅读与投稿。

《中国生态农业学报》国内外公开发行,国内刊号 CN13-1315/S,国际刊号 ISSN1671-3990。双月刊,国际标准大16开本,192页,每期定价35元,全年210元。邮发代号:82-973,全国各地邮局均可订阅。漏订者可直接汇款至编辑部补订(需另加邮资24.00元)。

地址:(050021)河北省石家庄市槐中路286号 《中国生态农业学报》编辑部

电话:0311-85818007; 传真:0311-85815093; 网址: <http://www.ecoagri.ac.cn>, E-mail: editor@sjziam.ac.cn