

肠与脑来源神经干细胞的增殖和分化特性比较

王永飏 朱利斌 刘征吉 夏立广 李仲荣

摘要 目的 探索肠神经干细胞(ENSCs)的增殖和分化特性,寻找神经干细胞移植治疗肠道神经元缺陷性疾病的合适干细胞源。**方法** 采用神经干细胞培养和分离技术,对来自同一大鼠肠道及大脑的神经干细胞(CNS-NSCs)进行体外培养,通过神经球生长直接观察法、CCK-8 细胞增殖测定法、流式细胞仪测定,比较研究两者的生长和增殖情况及成熟分化特性。**结果** 与 CNS-NSCs 相比,ENSCs 神经球增殖速度较慢;ENSCs 神经球表面常有长突起,并相互连接成网络状,显示早期成熟分化的迹象;CCK-8 法测得 ENSCs 的吸光度明显低于 CNS-NSCs ($P < 0.05$),提示其增殖速度慢于 CNS-NSCs。流式细胞仪测得 ENSCs 和 CNS-NSCs 的 TUJ-1 阳性细胞比例分别为 12.3% 和 11.4% ($P > 0.05$)、GFAP 阳性细胞比例分别为 21.7% 和 22.5% ($P > 0.05$)、Nestin 阳性细胞比例分别为 10.8% 和 10.8% ($P > 0.05$)。**结论** ENSCs 与 CNS-NSCs 具有类似的增殖、分化特性,但 ENSCs 增殖速度较慢,易于成熟分化。

关键词 神经干细胞 生物学特性 大鼠

The Comparative Study on the Proliferation and Differentiation of Neural Stem Cells from the Gut and Brain of Rats. Wang Yongbiao, Zhu Libin, Liu Zhengji, Xia Liguang, Li Zhongrong. Department of Pediatric Surgery, the Second Affiliated Hospital and Yuying Children's Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325027, China

Abstract Objective To explore the characteristics of proliferation and differentiation of enteric neural stem cells (ENSCs), and look for the suitable source of neural stem cells for transplantation treatment of developmental defects of enteric neuron. **Methods** We used the culture medium and isolation technique adopted in our laboratory to culture *in vitro* enteric neural stem cells (ENSCs) from gut and central nervous system-derived neural stem cells (CNS-NSCs) from brain obtained from the same embryonic rat. The state of growth, the characteristics of proliferation and differentiation of both neural stem cells were compared by direct observation of neurosphere growth, CCK-8 method and flow cytometry. **Results** Compared to the CNS-NSCs, the proliferation of ENSCs neurosphere was much slower. Some long dendrites often grew from the surface of the ENSCs neurosphere, and connected each other and formed a network, which seemed to differentiation in early stage. The growth rate of the ENSCs was much lower than that of CNS-NSCs ($P < 0.05$) by CCK-8 method. The percentage of TUJ-1 positive cells of ENSCs and CNS-NSCs were 12.3% and 11.4% respectively ($P > 0.05$) by flow cytometry. The percentage of GFAP positive cells of ENSCs and CNS-NSCs were 21.7% and 22.5% respectively ($P > 0.05$). The percentage of Nestin positive cells of ENSCs and CNS-NSCs were 10.8% and 10.8% respectively ($P > 0.05$). **Conclusion** ENSCs and CNS-NSCs have similar biological characteristics of proliferation and differentiation, but ENSCs are much slower in proliferation and easier to differentiate and mature.

Key words Neural stem cells; Biological characteristics; Rat

中枢神经系统来源的神经干细胞的生物学特性研究已较深入,而来自外周的肠神经干细胞(enteric neural stem cells, ENSCs)的研究才刚刚开展,不同来源的神经干细胞可能属于不同的干细胞亚群,相互之间存在相当大的差异,比较不同来源神经干细胞的生物学差异,对利用神经干细胞进行移植治疗、提高移

植效果有重要意义。为此,本研究通过对来自同一胎鼠的肠道和大脑的神经干细胞(central nervous system-derived neural stem cells, CNS-NSCs)进行体外培养比较,以探讨肠神经干细胞的增殖和分化特性。

材料与方法

1. 实验材料:清洁级 SD 大鼠,孕 20 天,由温州医学院实验动物中心提供。主要试剂:TUJ-1 (R&D System 产品),Alexa Flour@ 647 anti-rat CD49d (Biolegend 产品),Alexa488-Labeled 192-IgG (Advanced Targeting Systems 产品),Rabbit anti-Nestin 与 Rabbit anti-GFAP (Chimicon 产品)。本实验设计符合动物保护条例规定,并经过温州医学院动物保护委员会批准。100ml 培养液配制参考本实验室朱利斌等^[1]的

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(Y207272)

作者单位:325027 温州医学院附属第二医院、育英儿童医院小儿外科

通讯作者:李仲荣,医学博士,教授,主任医师,博士生导师。电子邮箱:wmclzr@yahoo.com.cn.

配方并适当改良用等量 DMEM/F12 替代其中的鸡胚提取物,且两种神经干细胞使用同一种配方培养液。NSCs 培养液配方(100ml 培养液中实际含量):95ml DMEM/F12、50 μ mol/L 2-Mercaptoethanol、35ng/ml (110nmol/L) Retinoic acid、20ng/ml Human recombinant bFGF、1ml N2-supplement、2ml B27-supplement、2ml Penicillin-Streptomycin、20ng/ml EGF。

2. 实验方法:大鼠肠神经干细胞的原代培养:孕鼠颈椎脱臼处死,常规消毒后剖取胎鼠。解剖显微镜下取胎鼠小肠至结肠放入 D-Hanks 溶液的培养皿中备用。用显微手术器械除去肠管浆膜及周围结缔组织,剥取外纵肌;将其放入另一 D-Hanks 溶液的培养皿中,使用眼科剪将组织剪碎至 0.5~1mm³ 大小。将上述组织碎块悬液移入 15ml 离心管中,0.5mg/ml 胶原酶(工作液浓度)37℃ 孵育 30min,200 目筛网过滤,1000r/min 离心 5min。取沉淀,DMEM-low 细胞重悬,制成肠管组织的单细胞悬液。再以 1000r/min 离心 5min,沉淀。加入 NSCs 培养液重悬,吹打均匀,台盼蓝染色细胞计数并调整细胞密度为 10⁶/ml 后接种到 HFN(2 μ g/cm²)包被的培养瓶。每隔 2 天半量换液 1 次,观察细胞密度及时传代。

肠神经干细胞传代培养:37℃ 预热 0.25% 胰酶-EDTA。吸取悬浮生长的神经球入离心管,1000r/min 离心 4min 后,取沉淀。加入 0.25% 胰酶-EDTA 消化,机械吹打,尽量避免气泡产生。约 2~3min 后倒置相差显微镜下观察神经球分散情况。用含 10% 胎牛血清的 DMEM-low 中和胰酶,200 目筛网过滤,1000r/min 离心 5min,取沉淀,D-Hanks 液细胞重悬,再 500r/min 离心 5min。沉淀加入 NSCs 培养液重悬,吹打均匀,台盼蓝染色细胞计数并调整细胞密度为 10⁶/ml 后接种到 HFN(2 μ g/cm²)包被的培养瓶。

大鼠脑神经干细胞的原代培养:鼠颈椎脱臼处死,常规消毒后剖取胎鼠(与上述同一胎鼠)。解剖显微镜下剥除胎鼠硬脑膜,取前脑脑皮质放入 D-Hanks 溶液的培养皿中备用。解剖显微镜下用显微手术器械将其剪碎(0.5~1mm³ 大小)。将上述组织碎块悬液移入 15ml 离心管中,充分吹打成单细胞悬液,200 目筛网过滤,1000r/min 离心 5min。取沉淀,DMEM/F12 细胞重悬,制成脑组织的单细胞悬液。再 1500r/min 离心 5min,沉淀。加入 NSCs 无血清培养液重悬,吹打均匀,台盼蓝染色细胞计数并调整细胞密度为 10⁶/ml 后,接种于 25cm² 的培养瓶内,在 37℃,5% CO₂ 条件下培养。每隔 2 天半量换液 1 次,观察细胞生长及密度及时传代。

脑神经干细胞的传代培养:37℃ 预热 0.25% 胰酶-EDTA。吸取悬浮生长的神经球入离心管,1000r/min 离心 4min 后,取沉淀。加入 0.25% 胰酶-EDTA 消化,机械吹打,尽量避免气泡产生。约 3~5min 后倒置相差显微镜下观察神经球分散情况。用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 中和胰酶,200 目筛网过滤,1000r/min 离心 5min,取沉淀,D-Hank's 液细胞重悬,再 500r/min 离心 5min。沉淀加入 NSCs 无血清培养液重悬,吹打均匀,台盼蓝染色细胞计数并调整细胞密度为 10⁶/ml 后接种到培养瓶,每隔两天半量换液,并观察细胞生长情况。

3. 观察项目:(1)形态学动态观察:神经干细胞行原代接种以后,从接种时间起,每隔 24h 行倒置显微镜下观察细胞在培养瓶中的生长情况,并采集图像。记录两种细胞出现神经球的时间,从形态上对两者进行比较。(2)免疫学鉴定:传代培养 10 天后的神经球悬液滴加到多聚赖氨酸处理后的盖玻片上,加入培养液后 37℃,5% CO₂ 条件下培养 1~2 天。待神经球内细胞爬片形成后,4% 多聚甲醛固定,PBS 冲洗后加入封闭液(含 1% 牛血清清蛋白、0.5% 正常羊血清和 0.3% Triton-X 100 的 PBS)。加入相应的一抗 Nestin、Tuj-1、GFAP 及 SMA,以不加入一抗作为阴性对照,其他操作按照试剂说明书进行。普通荧光显微镜和激光共聚焦显微镜下观察结果并采集图像。(3)增生能力测定:取上述原代培养后的肠/脑神经干细胞悬液。分组如下,A1-A10 为空白对照孔,B1-B10 细胞浓度为 2.25 $\times$ 10⁵ 个/毫升,C 组细胞浓度:1/2B,D 组细胞浓度:1/4B,E 组细胞浓度 1/8B,F 组细胞浓度 1/16B。每孔加入 100 μ l 肠/脑神经干细胞悬液。以上按浓度比例换算分别 B=16 $\times$ 750 个/孔,C=8 $\times$ 750 个/孔,D=4 $\times$ 750 个/孔,E=2 $\times$ 750 个/孔,F=1 $\times$ 750 个/孔。CO₂ 培养箱预孵育培养板过夜。次日向各孔中加入 10 μ l 的 CCK-8 溶液;37℃ 下孵育 4h。测定 450nm 处的 OD 值,参比波长 630nm。同法检测脑神经干细胞 OD 值。数据处理,组内比较用方差分析,方差齐性用 LSD,方差不齐用 Dunnett's T3 检验,以 P<0.05 作为有统计学意义。(4)流式细胞仪测定:对两种神经干细胞 GFAP、Nestin、Tuj-1 标记后进行流式细胞测定。传代培养 6~10 天后得到的神经细胞球,经低速离心(800r/min,5min)后得到细胞沉淀;细胞沉淀以预热(37℃ 水浴)的 0.5% 胰酶/EDTA 消化,同时滴管间断性轻微吹打。3min 后含 10% 胎牛血清 DMEM 培养液中中止消化;400 目筛网过滤,以高速离心(1200r/min,5min)得到细胞沉淀;DMEM-Low 培养液重悬,1200r/min,5min,5min,取沉淀;沉淀中加入 D-Hank's 液重悬,细胞计数 10⁶ 级;吹打得到单细胞悬液,调整细胞密度为 1.0 $\times$ 10⁵/ml;依据说明书,依次加入抗体鼠抗 GFAP、鼠抗 Nestin、鼠抗 Tuj-1,室温孵育 1h,PBS 洗涤 2 次,加入相应的荧光素标记二抗。各组以不加入一抗作为阴性对照(空白对照)。PBS 洗涤 2 次,细胞重悬,上机检测。

结 果

1. 两种神经干细胞原代培养的形态学比较观察:采用上述分离方法,可成功培养出肠神经干细胞和脑神经干细胞。分离的两组原代细胞,台盼蓝染色活细胞计数细胞活力均在 70% 左右。

原代培养的培养第 1 天:ENSCs 可见各种不同形态的贴壁细胞和一些细胞碎片(图 1)。CNS-NSCs24h 后可见细胞沉向培养瓶底部,部分细胞存在聚集生长的倾向(图 2)。培养第 2 天:ENSCs 有细胞集落形成,死亡细胞增加,部分区域可见类球状的细胞团块,有长突起出现。CNS-NSCs 培养液中的细

胞碎屑增多,死亡细胞的数量逐渐增加,部分细胞折光性增强,胞体增大,出现分裂相,逐渐形成由多个细胞组成的小细胞球。培养 4 天,ENSCs 低倍镜下见细胞密度较前下降,活细胞可见分裂象,贴壁细胞集落增大,形成小神经球,有部分细胞迁出,细胞间出现极长的连接(图 3)。CNS - NSCs 细胞死亡达到高峰,大部分细胞呈碎渣样死亡,少数细胞以单细胞或细胞球形式在培养液中悬浮生长,存活的细胞分裂形成由更多细胞组成较大的细胞球,细胞球数量及体积明显大于 ENSCs(图 4)。培养第 6 天,ENSCs 贴壁细胞形成

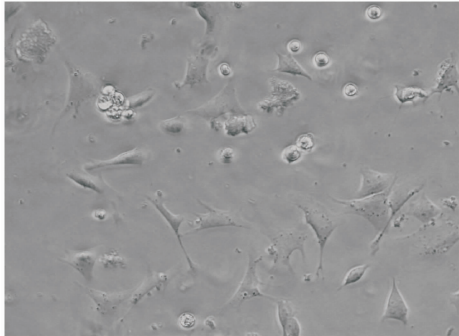


图 1 ENSCs 培养第 1 天,见贴壁细胞(×200)

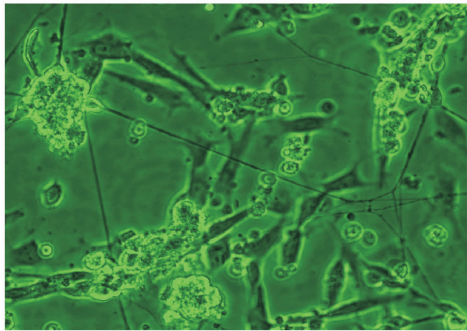


图 3 ENSCs 培养第 4 天,见小神经球及细小连接(×200)

2. 免疫学鉴定:传代细胞培养 10 天后,经 Nestin、TUJ - 1、GFAP 免疫组织化学染色,肠神经球免疫荧光显示 Nestin 阳性,提示神经球内含有神经干细胞;正在分化的神经球出现神经元早期标志 TUJ - 1 阳性,已分化的神经球显示 TUJ - 1、GFAP 双标染色阳性,说明神经球能分化为神经元、神经胶质细胞。分化后的神经胶质细胞免染荧光染色呈阳性,部分肠神经干细胞朝平滑肌方向分化,结果参见文献[2]。

3. 两种神经干细胞的增生能力 CCK - 8 法测定:在相同条件下,两种神经干细胞在各个不同浓度层面,经 24h 培育后,通过 CCK - 8 方法测定两种细胞增生情况如表 1。CCK - 8 法测得 ENSCs 的吸光度明显低于 CNS - NSCs($P < 0.05$),提示其增生速度慢于 CNS - NSCs。

的神经球样体增大。CNS - NSCs 肉眼下即可见到细胞球,显微镜下可见数量更多较大的细胞球形成,同时可见到部分细胞球相互聚集排列,这些增生形成的细胞呈圆形,大小较均一,折光性良好,未见明显的细胞突起。培养第 10 天,ENSCs 较大神经球形成,呈悬浮生长,有长长的突起“锚”在培养瓶底面,数日后该处有次级神经丛出现,与周围贴壁细胞相互形成网络状连接。CNS - NSCs 神经球数目明显多于,但部分神经球中心部发暗,提示细胞活力有所降低。

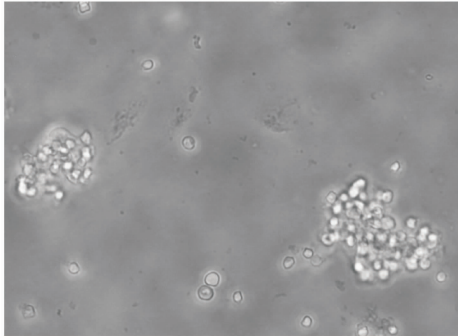


图 2 CNS - NSCs 培养第 1 天,见细胞聚集(×200)

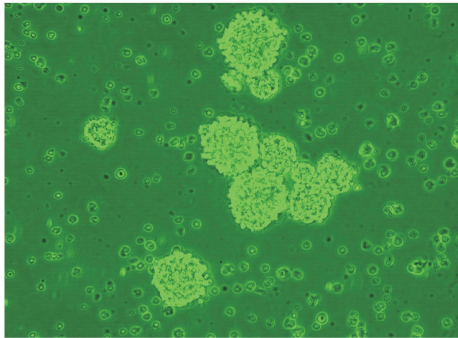


图 4 CNS - NSCs 培养第 4 天,见较大神经球(×200)

表 1 两种神经干细胞增生能力比较(CCK - 8 法)

分组 (×750 个/孔)	孔数	吸光度	
		ENSCs	CNS - NSCs
1	10	0.024 ± 0.007	0.026 ± 0.042
2	10	0.054 ± 0.009	0.060 ± 0.017
4	10	0.101 ± 0.011▲	0.143 ± 0.043
8	10	0.175 ± 0.027▲▲	0.237 ± 0.034
16	10	0.268 ± 0.028▲▲	0.379 ± 0.0148

与同浓度的 CNS - NSCs 组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$

4. 神经干细胞神经标志物流式细胞仪测定结果: TUJ - 1 组肠神经干细胞组测定的细胞数为 674 个, TUJ - 1 阳性细胞 83 个,占 12.3%。脑神经干细胞组测定的细胞数为 1054 个,所有细胞中,阳性表达 TUJ - 1 的细胞数 120 个,占 11.4%。两组数据比较

$P > 0.05$, 表明肠神经干细胞组阳性表达 TUJ-1 的细胞与脑神经干细胞组比较无显著性差别。GFAP 组测定肠神经干细胞为 3291 个, GFAP 阳性细胞 713 个, 占 21.7%。脑神经干细胞组测定的细胞数为 887 个, GFAP 阳性细胞 200 个, 占 22.5%。两组数据比较, $P > 0.05$, 表明肠神经干细胞组阳性表达 GFAP 的细胞与脑神经干细胞组比较无显著性差别。Nestin 组肠神经干细胞组测定的细胞数为 1255 个, Nestin 阳性细胞 135 个, 占 10.8%。脑神经干细胞组测定的细胞数为 1329 个, Nestin 阳性细胞 143 个, 占 10.8%。两组数据比较, $P > 0.05$, 表明肠神经干细胞组阳性表达 Nestin 的细胞与脑神经干细胞组比较无显著性差别。

讨 论

肠神经系统起源于神经嵴来源的干细胞^[3]。在胚胎发育中, 神经嵴细胞通过迷走神经在胚胎早期迁移入肠道, 从头至尾逐渐分化成熟, 变成神经元和神经胶质细胞, 发育形成肠神经系统。各种原因引起神经嵴细胞迁移和分化异常均可导致小儿先天性肠神经缺陷性疾病如先天性巨结肠等, 治疗这些疾病理想的方法是用发育正常的神经元来替换缺陷或功能失常的神经元。从消化道可获得不同发育阶段的神经元, 表明肠道壁内存在神经干细胞池, 这些细胞在出生时只有 1.7% ~ 4.7%, 且随个体发育成熟而逐渐减少^[4]。同时, 肠壁除神经源性细胞外, 还有其他组织细胞和干细胞混杂, 如肠管的间充质干细胞和黏膜干细胞^[5], 技术要求高, 故 ENSCs 提取困难。

本研究从胎鼠肠道分离获得包含肌间神经丛的纵肌层, 制成单细胞悬液, 利用 NSCs 培养液的自然筛选作用, 这些细胞逐渐增殖, 悬浮生长形成神经球。将这些神经球制成细胞悬液, 再进行培养传代, 可继续获得类似的神神经球, 表明提取的细胞具有自我更新和增殖能力。经免疫学鉴定证实, 这些从肠道来源的神经球, 能表达 Nestin 和 TUJ-1、GFAP 和 SMA, 可确定本研究所提取的具有增殖更新能力和多向分化潜能的细胞为 ENSCs。我们在肠管组织剪碎前, 将肠管浆膜和周围结缔组织去除, 剥取外纵肌, 弃去内层环肌及肠管黏膜层, 仅将外层纵肌及其黏附其上的肌间神经组织丛保留, 从而提高了组织细胞中神经源细胞的含量, 提高了提取成功率。

本研究比较了从同一胎鼠 SD 胎鼠来源的肠神经干细胞和脑神经干细胞, 发现 ENSCs 所形成的神经细胞团在早期呈贴壁生长, 常有长的突起, 相互连

接成网络状, 与 CNS-NSCs 有所不同。培养 7 ~ 8 天后, 同 CNS-NSCs 一样形成悬浮生长的神经球, 但大小比 CNS-NSCs 来源的神经球要小、数量也少, 提示 CNS-NSCs 细胞增殖速度要快于 ENSCs。这与我们使用 CCK-8 方法测定两种细胞增殖情况相一致。将同一来源的两种神经干细胞经 Tuj-1、GFAP 和 Nestin 免疫荧光标记后, 进行流式细胞仪测定比较发现, Tuj-1、GFAP、Nestin 阳性细胞比例在 CNS-NSCs 和 ENSCs 间无显著意义的差别。Tuj-1 是神经元特异性 β III 微管蛋白, 其抗体常用于标记分化早期的神经元, 包括有丝分裂中的神经母细胞及分裂后的神经元, 故被认为是干细胞向神经元分化的最早标志之一^[6]。GFAP(神经胶质细胞酸性蛋白), 是神经胶质细胞特异性标志物。Nestin 是一种中间丝状蛋白-神经巢蛋白, 是早期胚胎神经上皮干细胞和神经干细胞的特征性的生物学标志物, 神经干细胞表达阳性。在这两种神经干细胞流式细胞仪测定中, 上述 3 种免疫学阳性细胞间无显著性差别, 提示在单位细胞数量内, 分化为神经元和神经胶质细胞的比例类似。但对特定的某一阶段的神经干细胞, 从增殖状态的神经干细胞到有丝分裂后期形成神经元的这一过渡期间, 伴随着神经元(Tuj-1)、神经胶质细胞(GFAP)表达的增加, nestin 表达水平可能会下调。值得注意的是, 神经标志物可能随胚胎年龄改变而有所改变, 而且与迁徙细胞所在的位置有关。不同胎龄或生后年龄个体 ENSCs 和 CNS-NSCs 的神经标志物表达情况有待今后进一步研究, 更详细地了解移植细胞源的状况将有助于提高移植效果。

参考文献

- 1 朱利斌, 刘征吉, 王爱和, 等. 大鼠肠神经干细胞体外培养和鉴定[J]. 中华实验外科杂志, 2007, 24(1): 122
 - 2 朱利斌, 刘征吉, 李仲荣, 等. 大鼠肠神经干细胞分离和体外培养的初步研究[J]. 温州医学院学报, 2007, 37(1): 5-8
 - 3 Druckenbrod NR, Epstein ML. Age-dependent changes in the gut environment restrict the invasion of the hindgut by enteric neural progenitors[J]. Development, 2009, 136(18): 3195-203
 - 4 Estrada-Mondaca S, Carreon-Rodriguez A, Belkind-Gerson J. Biology of the adult enteric neural stem cell. Dev Dyn, 2007, 236(1): 20-32
 - 5 Suarez-Rodriguez R, Belkind-Gerson J. Cultured nestin-positive cells from postnatal mouse small bowel differentiate ex vivo into neurons, glia, and smooth muscle[J]. Stem Cells, 2004, 22(7): 1373-1385
 - 6 Jacobs JS, Miller MW. Cell cycle kinetics and immunohistochemical characterization of dissociated fetal neocortical cultures: evidence that differentiated neurons have mitotic capacity. Brain Res Dev Brain Res, 2000, 122(1): 67-80
- (收稿: 2010-10-21)