

· 论 著 ·

GFP 标记成年大鼠表皮神经嵴干细胞的分离培养与形态学特征*

张洁元, 陈立朝, 段朝霞, 李兵仓[△]

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所/创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室, 重庆 400042)

摘要:目的 建立绿色荧光蛋白(GFP)标记大鼠表皮神经嵴干细胞(EPI-NCSC)的分离培养方法,为 EPI-NCSC 在体移植研究脊髓损伤修复奠定基础。方法 分离成年 GFP 大鼠胡须毛囊,取毛囊隆突部贴附于胶原包被的培养板上。在培养第 4 天有大量细胞游出,取出贴附的毛囊隆突部,细胞传代培养。细胞采用 SOX10 和 Nestin 免疫细胞化学染色鉴定,并计算细胞纯度。结果 EPI-NCSC 在胶原基质上从隆突部游出,细胞为圆形或梭形,呈强绿色荧光。免疫细胞化学染色 SOX10 和 Nestin 双阳性,纯度在 99% 以上。结论 本实验方法简便易行,能分离出高纯度的 GFP-EPI-NCSC,可作为一种有效的工具细胞用于损伤脊髓修复研究。

关键词: GFP 大鼠;表皮神经嵴干细胞;细胞培养技术;免疫细胞化学

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.33.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)33-3471-02

Culture and morphologic characteristics of epidermal neural crest stem cell isolated from GFP adult rat*

Zhang Jieyuan, Chen lizhao, Duan zhaoxia, Li Bingcang[△]

(Research Institute of Surgery, Daping Hospital/State Key Laboratory of Trauma,

Burns and Combined Injury, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To establish methods for isolating and culturing the epidermal neural crest stem cell (EPI-NCSC) from GFP adult rat, and to lay the foundation for tracking transplanted cell of spinal cord injury and repair. **Methods** We isolated whisker hair follicle, and took out of bulges from collagen capsule, setting several bulges on pre-incubate collagen-coated culture plates. Removed bulges, 4 days after onset of EPI-NCSC emigration from the bulge explants, and enrichment cultured the migratory cells. The EPI-NCSC were identified by the immunocytochemistry of SOX10 and Nestin, and its purity was calculated according to the positive rate. **Results** The EPI-NCSC emigrated from the blunge explants on collagen substratum, showed morphological types of round and spindle with strong green fluorescence. More than 99% cultured cells were identified to be EPI-NCSC, which expressed SOX10 and Nestin. **Conclusion** This method is simple. The high purity of GFP-EPI-NCSC can be harvested to be used as an effective tool cells, and widely used for researching on the spinal cord injury repairing.

Key words: GFP rat; epidermal neural crest stem cell; cell culture techniques; immunocytochemistry

脊髓损伤修复是神经科学领域的研究难题,目前用于修复的研究方法多为细胞替代疗法和组织工程疗法^[1-2]。表皮神经嵴干细胞(epidermal neural crest stem cell, EPI-NCSC)来源于胚胎神经嵴,具有体外扩增能力,可分化为多种神经嵴细胞衍生物。而 EPI-NCSC 又存在于成熟动物体内毛囊隆突部,取材方便,损伤小,可用于自体移植,不涉及免疫原性和伦理道德问题^[3]。但是,关于 EIP-NCSC 国内外的研究对象多为小鼠。本研究选用绿色荧光蛋白(GFP)标记成年大鼠 EPI-NCSC 为细胞来源,分离培养出的 EPI-NCSC 具有天然绿色荧光,有利于后期在体实验观察,为细胞替代疗法治疗脊髓损伤修复的研究提供了一种新的种子细胞。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 成年清洁级 GFP 转基因大鼠(由香港大学 Wuwu Tian 教授协议赠送),体质量 200 g 左右,雌雄不拘。

1.2 主要实验试剂 B27(GIBCO, 美国);碱性成纤维生长因子(bFGF, INVITROGEN, 美国);9-11 天鸡胚提取物(USBio-logical, 美国);鼠尾胶原(SIGMA, 美国);胰蛋白酶(GIBCO, 美国);兔单克隆抗体 SOX10(Abcam, 美国);鼠多克隆抗体 Nestin(Abcam, 美国);Alexa Flour 594 驴抗兔(Molecular Probes, 美国);CY5 山羊抗小鼠(碧云天, 中国)。

1.3 GFP 大鼠 EPI-NCSC 的原代培养

1.3.1 分离培养 3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉,断头,消毒后无菌条件下取其触须垫,并逐个分离单个完整毛囊(裹有结缔组织鞘),置于 4℃预冷的 D-Hanks 液中(青、链霉素各 100 U/L)。手术显微镜下用手术刀纵向剖开颈须囊,避免损坏毛球。有血液留出,反复用 D-Hanks 冲洗血迹,直至干净。在海绵窦上的层面做横向切口,紧接着在紧贴皮肤的环形窦内层面做第 2 个横向切口。用镊子打开已剖开的胶原蛋白囊,把囊内的毛囊隆突部挪出。把毛囊隆突部放入新的 D-Hanks 液中清洗,确保无其他组织的污染。将毛囊隆突部贴附于培养皿中(事先涂以鼠尾胶原),去掉多余的培养液。培养 30 min 后加入培养液(含 DMEM/F12, 10%胎牛血清, 5%鸡胚提取物, 2%B27, 10 ng/mL bFGF), 37℃, 5%CO₂ 孵箱静置培养。4 d 后剔除毛囊, 0.25%胰酶消化传代培养, 培养液同前, 每隔 2 d 换液 1 次。

1.3.2 形态学观察 每隔 2 d 在倒置显微镜和荧光显微镜下观察不同时期的 EPI-NCSC 的形态,并摄片记录细胞生长情况。

1.4 免疫细胞化学染色及纯度检测 采用 SOX10^[4-5] 和 Nestin^[6] 免疫荧光双染标记, 鉴定 EPI-NCSC 并检测其纯度。免疫

细胞化学染色鉴定在 6 孔培养板内进行。设空白对照组 1 孔, 实验组 5 孔, 空白对照组用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS) 代替一抗, 其余步骤不变。EPI-NCSC 传代培养至 80% 时用 PBS 洗 3 次, 4% 多聚甲醛室温下固定 30 min; 1% BSA 室温封闭 30 min; 加入一抗混合作液(小鼠抗 Nestin, 1:100; 兔抗 SOX10, 1:1000) 4 ℃ 冰箱过夜(>18 h); 二抗(Alexa Flour594 标记的驴抗兔 IgG, 1:500; CY5 标记的山羊抗小鼠 IgG, 1:300) 37 ℃ 避光孵育 1 h(除封闭外, 其余步骤后均需 PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min), 晾干封片, 荧光显微镜不同发射波长下观察。纯度检测: 用荧光倒置显微镜观察相同视野不同发射波长下阳性细胞数, 每孔随机选择 3 个视野进行阳性细胞计数, 细胞的纯度为 Nestin 和 SOX10 双阳性细胞数与相同视野绿色荧光细胞数的比值, 取均值。

2 结 果

2.1 形态学观察 光镜观察: 整个细胞培养观察期, GFP 大鼠来源的 EPI-NCSC 在荧光显微镜下均可观察到有天然稳定的亮绿色荧光。毛囊隆突块培养 2 d 后可见 0~15 个细胞从隆突部爬出, 3 d 后约 120 个细胞, 4 d 后细胞明显增多。细胞以隆突部为中心向外周伸展, 刚从隆突部游出或刚分裂出的细胞为圆形, 很快便伸出突起呈梭形, 镜下观察常可见细胞的分裂象, 呈哑铃形, 见封 2 图 1。传代培养的细胞周边光晕较强, 细胞形态更为多样, 以圆形居多, 也可见梭形和三角形。

2.2 免疫细胞化学染色及纯度检测结果 传代培养后, 细胞长至 80%, 进行免疫细胞化学染色鉴定。结果显示: 实验组细胞呈 SOX10 和 Nestin 免疫反应阳性, 空白对照组为阴性。实验组绝大部分细胞膜、细胞质及突起呈现红色和蓝色荧光, 细胞核无阳性表达, 见封 3 图 2。在显微镜下随机选择 30 个视野分别记数 SOX10 和 Nestin 染色双阳性细胞数和 GFP 阳性细胞数。SOX10 和 Nestin 细胞代表 EPI-NCSC, GFP 阳性细胞代表总细胞数, EPI-NCSC 纯度为两者之比。最终计算该方法培养 EPI-NCSC 纯度可达 99% 以上。

3 讨 论

2004 年 Sieber Blum 在成年小鼠毛囊隆突内发现了一种神经嵴来源的多潜能干细胞, 该细胞结合了胚胎干细胞和成熟干细胞的优点^[7], 具有高度生理可塑性和体外扩增能力, 体外可扩增至数百万倍, 仍有 80% 维持干细胞标记未分化。在特殊培养条件下可定向诱导分化, 如人骨成形成蛋白-2 的存在诱导 EPI-NCSC 优先分化为骨/软骨细胞, 神经调节蛋白-1 诱导分化为施万细胞。在 mRNA 水平上, EPI-NCSC 和胚胎干细胞有高度类似的基因表达型, 表达 Myc, Klf4, Sox2, Lin28 等基因。

目前细胞替代疗法是脊髓损伤修复的热点之一, 而 EPI-NCSC 作为一种在成熟毛囊区域的胚胎衍生物, 其显示了几个吸引人的特性: (1) EPI-NCSC 作为一种多能干细胞, 能够分化为多种神经嵴衍生物, 包括神经元, 神经支持细胞, 平滑肌细胞, 骨/软骨细胞和黑素细胞。(2) 具有体外增殖分裂能力, 但在受体组织内不会致瘤。(3) 表达多种神经营养因子和其他营养因子、血管源性因子和细胞外蛋白酶, 具有支持细胞存活、血管再生和调节瘢痕形成的能力。(4) 可自体取材用于自体移植, 这也避免了移植排斥反应和伦理学问题^[8-10]。这些特性奠定了其作为种子细胞在脊髓损伤修复中的重要作用。

EPI-NCSC 位于毛囊隆突部, 是由胚胎神经嵴细胞来源的是一种多能干细胞。该细胞不仅存在于触须毛囊, 也存在于背部皮肤毛囊。然而, 依照常规方法培养背部皮肤毛囊形成两种

类型的快速生长集落, 包括了嵴来源细胞和非嵴细胞。因为这个原因, 本研究选择这种特殊毛囊。隆突部是毛囊外根鞘内的一个特殊区域, 能够产生皮肤、头发和皮脂腺^[11]。事实上毛囊隆突部包含了两种类型的细胞, 表皮干细胞和 EPI-NCSC。本实验之前尝试了将毛囊接种在普通培养板或包被多聚赖氨酸的培养板上, 均未获得成功。之后改良实验方法, 利用 EPI-NCSC 具有区别于表皮干细胞在胶原基质上生长及迁移的独特能力, 采用胶原包被培养板。隆突部的移植改变了干细胞生存环境, 从而激活了 EPI-NCSC 的增殖和迁移能力。移植后 2~4 d, EPI-NCSC 区别于表皮干细胞开始从移植的隆突部中迁移到胶原基质上, 然后快速扩增, 从而轻松获得高纯度的细胞^[12]。

目前对 EPI-NCSC 的研究国内罕见相关文献报道, 而国外的研究对象多为小鼠。本实验选用了 GFP 转基因大鼠为细胞来源, 分离的细胞具有天然稳定的绿色荧光标记, 使得日后研究细胞移植后的存活、迁移和分布的观察都更为直观、简便。高纯度 GFP 来源的 EPI-NCSC 的成功提取为进一步利用 EPI-NCSC 进行相关领域的研究奠定了重要的方法学基础。

EPI-NCSC 的发现为脊髓损伤的细胞替代治疗或转基因治疗带来了新的尝试, 但 EPI-NCSC 的研究中仍有许多问题亟待解决, 如 EPI-NCSC 定向分化的诱导信号通路及其相关作用机制; 移植后 EPI-NCSC 的功能状态及移植后迁移、分化的调控等, 这些问题有待下一步研究解决。

参 考 文 献:

- [1] Cho JS, Park HW, Park SK, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells enhances axonal outgrowth and cell survival in an organotypic spinal cord slice culture[J]. *Neurosci Lett*, 2009, 454(1): 43-48.
- [2] Dasari VR, Spomar DG, Li L, et al. Umbilical cord blood stem cell mediated down regulation of fas improves functional recovery of rats after spinal cord injury[J]. *Neurochem Res*, 2008, 33(1): 134-149.
- [3] Sieber-Blum M, Schnell L, Grim M, et al. Characterization of epidermal neural crest stem cell(EPI-NCSC) grafts in the lesioned spinal cord[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2006, 32(1/2): 67-81.
- [4] Britsch S, Goerich DE, Riethmacher D, et al. The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development[J]. *Genes Dev*, 2001, 15(1): 66-78.
- [5] Rehberg S, Lischka P, Glaser G, et al. Sox10 is an active nucleocytoplasmic shuttle protein, and shuttling is crucial for Sox10-mediated transactivation[J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(16): 5826-5834.
- [6] Mokry J, Cizková D, Filip S, et al. Nestin expression by newly formed human blood vessels[J]. *Stem Cells Dev*, 2004, 13(6): 658-664.
- [7] Sieber-Blum M, Grim M, Hu YF, et al. Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle[J]. *Dev Dyn*, 2004, 231(2): 258-269.
- [8] Hu YF, Zhang ZJ, Sieber-Blum M. An epidermal neural crest stem cell(EPI-NCSC) molecular signature[J]. *Stem Cells*, 2006, 24(12): 2692-2702.
- [9] Sieber-Blum M, Hu Y. Epidermal neural (下转第 3475 页)

与 HSV-2 病毒感染对照组比较,其余各多肽处理组的临床症状轻且病情发展缓慢。HD-5/N 处理组的临床症状最轻,外阴感染症状评分显著低于病毒对照组与 HD-5/Acm 处理组 ($P < 0.01$),见图 4。表明 HD-5/N 多肽在体内可发挥显著的抗 HSV-2 感染作用,而 HD-5/Acm 的体内治疗效果并不明显。

3 讨论

防御素是一类由中性粒细胞和上皮细胞产生、富含半胱氨酸的内源阳离子抗微生物肽,借助二硫键由 α -螺旋、 β -片层和肽环形成的三维立体结构。近年来研究发现,大部分防御素都具有抗真菌、抗螺旋体以及抗病毒的作用。研究表明防御素分子可以通过阻碍病毒颗粒黏附和侵入靶细胞、抑制病毒复制以及直接破坏病毒包膜等多环节、多层次发挥抗病毒作用,这就使得防御素被用来进行抗病毒时基本不会产生耐药现象^[8-9]。因此,防御素的研制与开发在病毒感染防治方面有良好的应用前景。

人防御素分子内含有三对二硫键, α 、 β 防御素的三对二硫键的连接方式是不同的。 α 防御素连接方式为 1-6,2-4,3-5; β 防御素连接方式为 1-5,2-4,3-6。既往人们认为,防御素的抗微生物活性不仅受时间、pH 值、离子强度和温度等因素的影响,而且还与分子内二硫键的紧密程度有关^[10]。但近来有研究表明,HBD-3 的抗菌作用不受分子内二硫键存在与否的影响,但却与其中的某些半胱氨酸存在与否密切相关。

HD-5 主要由小肠 Peneth 细胞、女性生殖道和男性尿道黏膜上皮分泌。而 HSV-2 主要的感染途径是生殖道,其感染与先天性畸形、流产、宫颈癌、脑炎等多种疾病相关。因此,推测 HD-5 可能对肠道致病菌和生殖道传播病毒具有显著抑制作用,从而参与肠道菌群稳态和生殖道免疫功能的调节^[11-12]。本实验室前期对 HD-5 多肽抗 HSV-2 病毒的作用效果和起效环节进行了初步探讨,结果表明 HD-5 多肽在体外具有显著的抗 HSV-2 感染活性,其作用机制主要是通过干扰病毒对宿主细胞的黏附、侵入而发挥作用。为了探索二硫键及半胱氨酸对 HD-5 多肽抗病毒活性的影响,本次实验在前期实验结果基础上,分别观察 3 种不同构型的 HD-5 多肽在体外和体内的抗 HSV-2 感染作用。结果发现半胱氨酸被丙氨酸替换的 HD-5 多肽基本失去抗 HSV-2 病毒能力,HD-5/N 及 HD-5/Acm 在体外均有显著的抗 HSV-2 病毒感染作用,但 HD-5/N 的体内抗 HSV-2 病毒的作用显著强于 HD-5/Acm。体外研究结果表明 HD-5 分子中的半胱氨酸残基在其抗病毒作用中占有重要位置,对于体内 HD-5/Acm 的抗病毒作用显著减弱的原因,本研究推测可能是因为二硫键缺失后 HD-5 结构不稳定,在体内多种酶的作用下容易被降解,但具体机制尚需以后进一步的研究证实。

综上所述,本研究通过体外细胞实验及体内动物实验证实

了不同构型 HD-5 多肽抗病毒作用的差异,为 HD-5 多肽的进一步开发和合理应用提供了一定的理论依据。

参考文献:

- [1] 杨荣,嵇武.防御素的生物学活性及与疾病的关系[J].肠外与肠内营养,2011,18(3):185-188.
- [2] 赵亚华,徐来祥,黄蓬亮,等.人类防御素的结构与功能研究进展[J].中国比较医学杂志,2006,16(7):436-441.
- [3] Porter E, Yang H, Yavagal S, et al. Distinct defensin profiles in *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* urethritis reveal novel epithelial cell-neutrophil interactions[J]. *Infect Immun*, 2005, 73(8):4823-4833.
- [4] 陈芳,王艾平,申明强,等.人 α 防御素-5 多肽体外抗单纯疱疹 II 型病毒作用的研究[J].第三军医大学学报,2010,32(18):1925-1928.
- [5] Wu Z, Hoover DM, Yang D, et al. Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human beta-defensin 3[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(15):8880-8885.
- [6] Taylor K, Clarke DJ, McCullough B, et al. Analysis and separation of residues important for the chemoattractant and antimicrobial activities of beta-defensin 3[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(11):6631-6639.
- [7] 李振洁,张毅,张奉学,等.四黄虎胶囊抗豚鼠生殖器疱疹病毒感染实验研究[J].岭南皮肤性病科杂志,2008,15(6):336-338.
- [8] Chang TL, Vargas J, DelPortillo A, et al. Dual role of alpha-defensin-1 in anti-HIV-1 innate immunity[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(3):765-773.
- [9] Dugan AS, Maginnis MS, Jordan JA, et al. Human alpha-defensins inhibit BK virus infection by aggregating virions and blocking binding to host cells[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(45):31125-31132.
- [10] Zhao FL, Zhu LQ, Qiao YL. Research progress of β -defensin[J]. *Feed Ind*, 2007, 28(10):6-8.
- [11] Wehkamp J, Bevins CL, Stange EF. Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease[J]. *Gut*, 2009, 58(6):884-884.
- [12] Klotman ME, Chang TL. Defensins in innate antiviral immunity[J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6(6):447-456.

(收稿日期:2012-02-14 修回日期:2012-09-29)

(上接第 3472 页)

Crest Stem Cells(EPI-NCSC) and Pluripotency[J]. *Stem Cell Rev*, 2008, 4(4):256-260.

[10] 刘芳,许家军,张传森,等.成年大鼠毛囊神经嵴干细胞的培养、鉴定及初步诱导分化[J].解剖学杂志,2006,29(5):647-649.

[11] Hu YF, Gourab K, Wells C, et al. Epidermal neural crest stem cell(EPI-NCSC) mediated recovery of sensory function in a mouse model of spinal cord injury[J]. *Stem Cell*

Rev, 2010, 6(2):186-198.

[12] Tumber T, Guasch G, Greco V, et al. Defining the epithelial stem cell niche in skin[J]. *Science*, 2004, 303(5656):359-363.

[13] Sieber-Blum M, Grim M. The adult hair follicle: cradle for pluripotent neural crest stem cells[J]. *Birth Defects Research Part C (Embryo Today)*, 2004, 72(2):162-172.

(收稿日期:2012-02-08 修回日期:2012-09-23)