

· 论 著 ·

新生大鼠海马神经干细胞的离体培养及细胞连接的超微结构观察*

董富兴^{1#}, 胡莹莹^{2#}, 刘亚萍³, 于红丽¹, 赵玉⁴, 段现花², 董红燕¹, 徐铁军²

(徐州医学院:1. 神经生物学研究中心电镜室;2. 人体解剖与组织胚胎学教研室;3. 形态学实验教学中心, 江苏徐州 221004;4. 伊利诺依理工大学生命科学学院, 美国芝加哥伊利诺依 60616)

摘要:目的 观察体外培养的新生大鼠海马神经干细胞球的超微结构特点。方法 取处于指数期的原代培养 7 d 的新生大鼠海马神经干细胞, 常规制备透射电镜样品后, 用日立 H-600 透射电镜观察并摄片。结果 光镜下神经干细胞呈克隆球散在悬浮于培养基中, Nestin 免疫荧光阳性;电镜下观察到神经干细胞相互间排列比较松散、核浆比例高, 细胞间胞膜增厚, 形成特化的结构, 有的胞膜上可见胞吞/胞吐小泡。结论 体外培养的新生大鼠海马神经干细胞间的细胞连接有间隙连接样结构, 并可出现胞吞/胞吐功能, 提示细胞间可进行相互交流, 传递化学递质或电兴奋活动。

关键词:海马;神经干细胞;细胞连接;超微结构

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.11.001

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)11-1201-03

Culture of neonatal rats hippocampal neural stem cells and cell junction ultrastructure observation*

Dong Fuxing^{1#}, Hu Yingying^{2#}, Liu Yaping³, Zhao Yu⁴, Duan Xianhua², Dong Hongyan¹, Xu Tiejun²

(Xuzhou Medical College:1. Electron Microscope Laboratory of Research Center for Neurobiology, 2. Department of Human Anatomy and Embryology, 3. Experimental Teaching Center of Morphology, Xuzhou Jiangsu 221002, China; 4. Life Science College of Illinois Institute of Technology, Chicago Illinois 60616, United States)

Abstract: Objective To observe the ultrastructural characteristics of neural stem cells (NSCs) from neonatal rats hippocampal. **Methods** Taking the primary cultured neonatal rat hippocampus NSCs which were on the exponential phase and cultured 7 days, then we observe the ultrastructure of them and take photos with Hitachi H-600 transmission electron microscope after prepared for routine transmission electron microscope samples. **Results** NSCs were scattered in the suspension medium under Light microscopy, and were Nestin-positive; under electron microscopy, we can see the NSCs were loosely arranged with each other, high karyoplasmic ratio, cell membrane thickening, formation of special structure and some endocytosis/exocytosis of vesicles were visible on the membrane. **Conclusion** There were gap junction-like structure of the cell connection in cultured NSCs in vitro and endocytosis/exocytosis appeared which was suggesting that NSCs could communicate and pass chemical transmitters or electrical activity with each other.

Key words: hippocampus; neural stem cells; cell junction; ultrastructure

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的发现,为中枢神经系统疾病的治疗带来了新的手段。NSCs 是指中枢神经系统中具有自我更新、自我增殖及多向分化潜能的一类细胞^[1]。研究表明,胚胎、新生及成年哺乳动物的室管膜下区、海马、纹状体、中脑、嗅球和脊髓等部位都存在神经干细胞^[2-4]。随着 NSCs 研究的深入,离体培养的 NSCs 已经成为常用的一种的基础工具。细胞的形态和结构决定其生物学功能,离体培养的 NSCs 有着怎样的超微结构,尤其是 NSCs 之间的细胞间连接是怎样的,是否存在互相交流的结构基础,目前报道较少。本研究在成功分离、培养新生大鼠海马 NSCs 的基础上,应用透射电镜观察 NSCs 的超微结构及细胞间连接。为深入研究神经干细胞的生长特性和功能特点提供形态学基础。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 新生 1 d SD 大鼠,由徐州医学院实验动物中

心提供。

1.2 试剂与仪器 DMEM/F12 培养基、B27、bFGF 和 EGF (Gibco 公司),胎牛血清(杭州四季青公司),Nestin 单克隆抗体(BD 公司),多聚赖氨酸、GFAP 单克隆抗体和 β -III tubulin 单克隆抗体(Sigma 公司),FITC 标记山羊抗小鼠 IgG (北京中杉金桥公司);一次性无菌培养瓶和培养板(corning 公司);二氧化碳培养箱(Thermo 3111),荧光倒置相差显微镜(Olympus IX-70),超薄切片机(LKB 2088),透射电镜(HITACHI H-600)。

1.3 实验方法

1.3.1 神经干细胞的分离培养 取新生 1d 的 SD 大鼠,无菌条件下断头取脑,分离海马组织,置于盛有少量高糖 DMEM/F12 基础培养液的无菌培养皿中;用眼科剪将组织尽量剪碎,加入基础培养液 5 mL,用巴氏吸管轻柔吹打,400 目筛网过滤,制成单细胞悬液,离心去上清液,加入含 bFGF (20 μ g/L)

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81171141);江苏省高校自然科学基金基础研究计划项目(07KJB310119);徐州医学院科研课题(2010KJ18;2012KJ09)。作者简介:董富兴(1982~),助理研究员,硕士,主要从事中枢神经系统的损伤与修复方面的研究。# 表示共同第一作者。

和 EGF(20 $\mu\text{g/L}$)的 DMEM/F12 完全培养基 2 mL 重悬细胞,台盼蓝染色,细胞计数,以 2×10^5 个细胞/L 接种到 25 cm^2 的培养瓶中,置 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 、95% 空气,平衡湿度培养箱中培养。2~3 d 换液 1 次,倒置显微镜观察细胞形态及生长状况。

1.3.2 神经干细胞的鉴定 选取部分培养的克隆球悬液种植于铺有多聚赖氨酸盖玻片的 24 孔培养板中。1h 后取部分盖玻片进行 Nestin 免疫荧光染色,更换为去除生长因子和血清浓度为 10% 的 DMEM/F12 培养基继续培养 7 d 后分别进行 GFAP 和 β -III tubulin 免疫荧光染色。

1.3.3 免疫荧光细胞染色 取贴有细胞且到时间点的盖玻片:(1)0.01 mmol/L PBS 洗,5 min \times 3 次;(2)4% 多聚甲醛固定,室温 15 min;(3)10% 正常羊血清(含 0.1% TritonX-100),室温 30 min;(4)吸弃血清,分别滴加一抗(Nestin 1 : 500, GFAP 1 : 1 000, β -III tubulin 1 : 800),抗体用含 0.1% 的 TritonX-100 的 0.1 mmol/L PBS 稀释,4 $^\circ\text{C}$ 过夜;(5)FITC 标记山羊抗小鼠 IgG(1 : 200),37 $^\circ\text{C}$ 1 h。除第(3)步骤之外其余各步完成后均以 0.01 mmol/L PBS 充分冲洗。荧光倒置显微镜下观察、拍照。

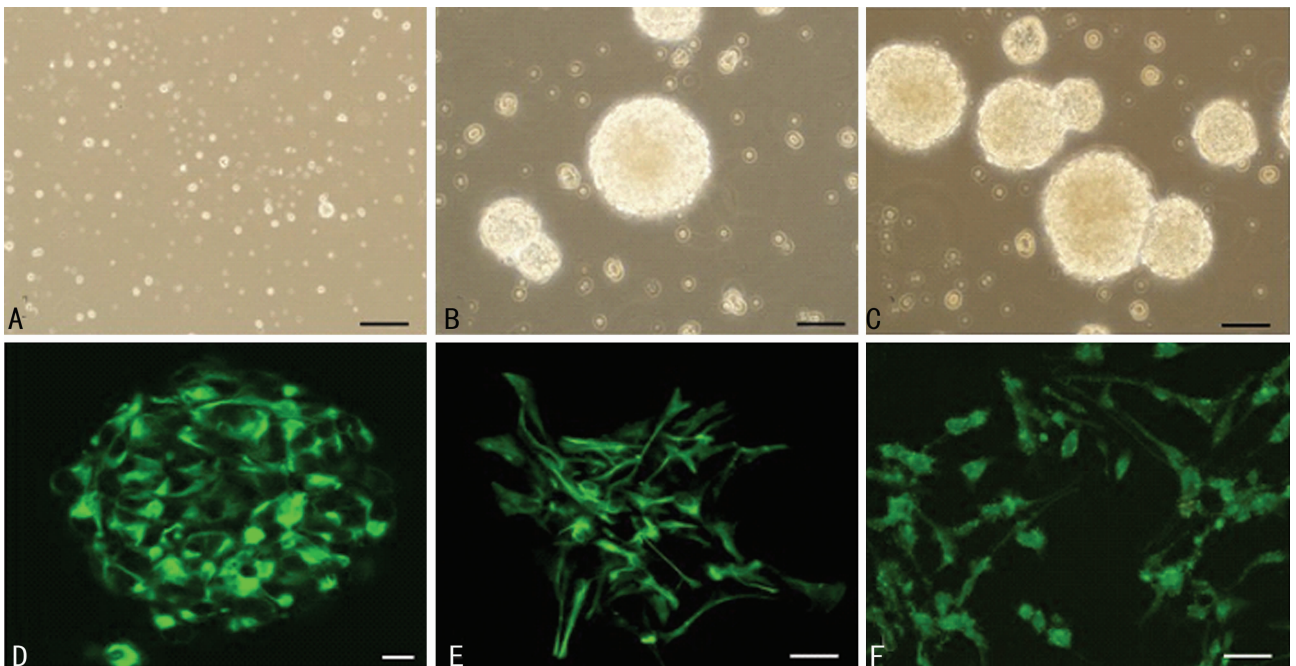
1.3.4 透射电镜标本的制作 取原代培养 7d 的神经干细胞:(1)3 000 r/min,4 $^\circ\text{C}$ 离心 15 min 后吸去上清,缓慢沿壁加入 2.5% 的戊二醛,4 $^\circ\text{C}$ 固定 3 h;(2)将细胞团块移入青霉素小瓶,0.1 mmol/L PBS 冲洗 3 次后,浸泡 3 h,中间每隔 20 min 换液 1 次;(3)1% 锇酸后固定 2 h;(4)双蒸水冲洗 3 次后,浸泡 2 h,中间每隔 20 min 换液 1 次;(5)梯度乙醇/丙酮脱水,依次加入 50% 乙醇、70% 乙醇、80% 乙醇、90% 乙醇、90% 乙醇+丙酮、90% 丙酮、100% 丙酮、无水丙酮(含无水硫酸钠的 100% 丙酮),每步 10 min,其中,70% 乙醇中含饱和醋酸铀、无水丙酮过

两道;(6)618 环氧树脂比无水丙酮(1 : 1 2 h,2 : 1 37 $^\circ\text{C}$ 2 h,纯树脂 37 $^\circ\text{C}$ 2 h)置换后纯树脂包埋;(7)修块;(8)超薄切片,片厚 50 nm;(9)柠檬酸铅染色,常温,10 min;(9)透射电镜观察、拍片。

2 结 果

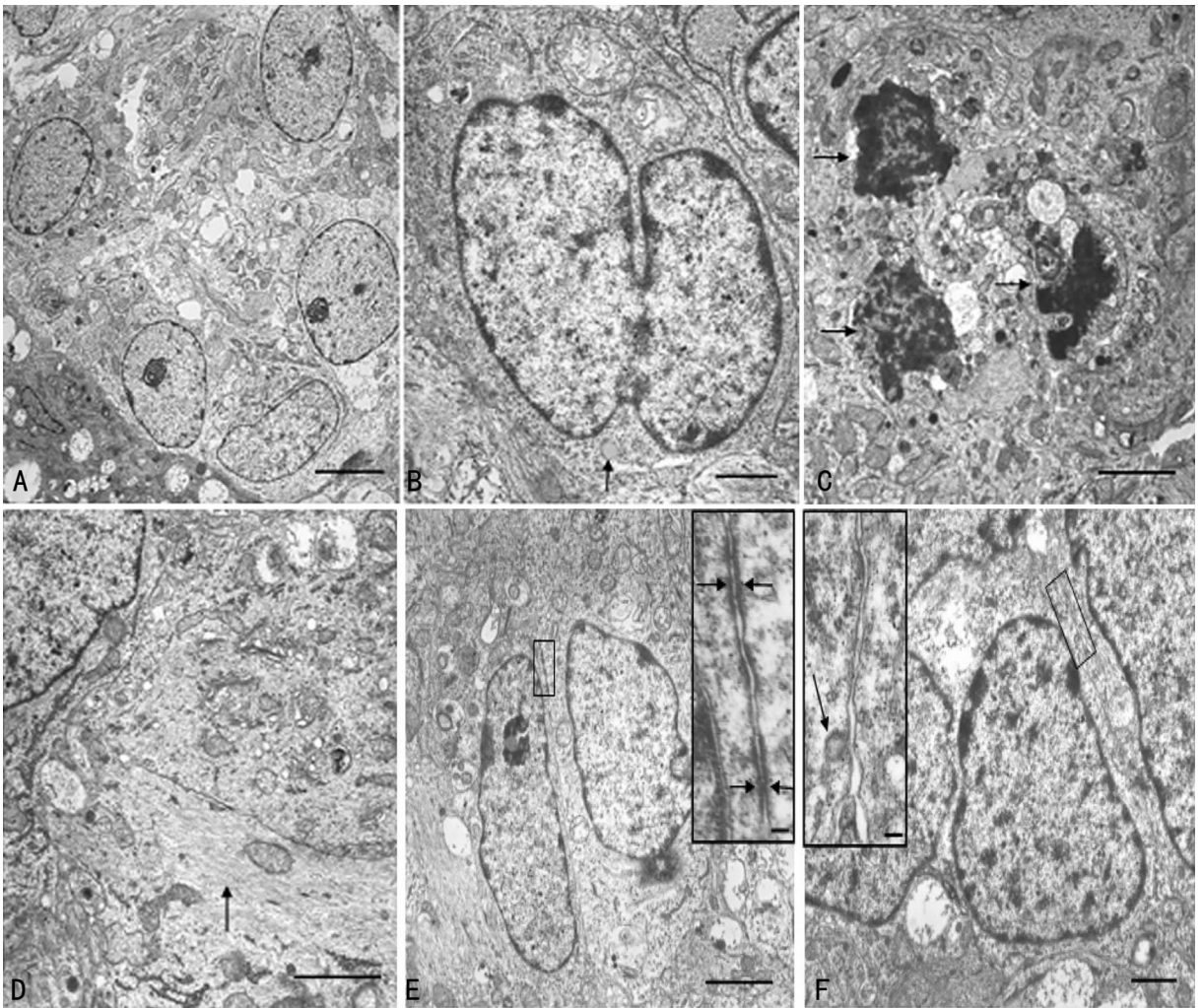
2.1 新生大鼠海马神经干细胞的形态学观察 原代培养 1 d 时,神经干细胞克隆球很少,几乎看不到,此时可见到折光性很强的单细胞(图 1A)。继续培养 3 d 后,可见到较多克隆球形成,体积大小不尽相同,形态以球形或卵圆形居多(图 1B)。培养至 7 d 时,这些克隆球数量进一步增多、体积增大,可见到正在分裂成两个克隆球的状态(图 1C)。细胞克隆球经 Nestin 免疫荧光染色呈强阳性,胞浆着色,整个克隆球呈绿色(图 1D)。加入血清诱导分化 7 d 后见多数细胞紧贴培养瓶并伸出长的突起,以克隆球为中心向外周呈放射状排列。对诱导分化的神经干细胞进行 GFAP(图 1E)及 β -III tubulin(图 1F)免疫荧光染色均阳性。

2.2 透射电镜观察 电镜下观察到细胞间排列较为疏松,相邻胞间有空隙(图 2A);大部分神经干细胞胞核较大,胞质较少,核浆比很高,胞质中有少量较幼稚的线粒体、粗面内质网、核糖体等细胞器,偶见脂滴(图 2B);可见到少量正处于分裂末期的细胞(图 2B);部分处于克隆球内部的细胞出现空泡样变性,有的胞核内可见染色质凝集、边集现象,甚至出现凋亡小体(图 2C);少量细胞胞质内可观察到类突触样结构和微丝样结构(图 2D)。在电镜下,有些相邻神经干细胞胞膜增厚,细胞间隙变窄,形成特化的连接结构(图 2E);而有些神经干细胞细胞间隙相对增宽,胞膜无增厚,并可观察到有胞膜上有类似胞吞/胞吐样的小泡(图 2F)。



A: 培养 1 d 的神经干细胞, Bar=200 μm ; B: 培养 3 d 的神经干细胞, Bar=100 μm ; C: 培养 7 d 的神经干细胞, Bar=100 μm ; D: 培养 7 d 的神经干细胞 Nestin 免疫荧光阳性, Bar=10 μm ; E: 分化的神经干细胞 GFAP 免疫荧光阳性, Bar=50 μm ; F: 分化的神经干细胞 β -III tubulin 免疫荧光阳性, Bar=50 μm 。

图 1 新生大鼠海马神经干细胞镜下照片



A: 神经干细胞间排列比较松散, Bar=5 μm ; B: 处于分裂末期的神经干细胞, 细胞器比较少, 脂滴(箭头所示), Bar=1 μm ; C: 神经干细胞球内部出现凋亡细胞(箭头所示), Bar=2 μm ; D: 某些细胞内可见到微丝样结构(箭头所示), Bar=2 μm ; E: 神经干细胞间的细胞连接, 可见胞膜增厚, 出现间隙连接样结构(箭头所示), Bar=2.5 μm , 插图 Bar=100 nm; F: 神经干细胞间的细胞连接, 胞膜无增厚, 间隙变宽, 可见到胞吞/胞吐小泡(箭头所示), Bar=1 μm , 插图 Bar=100 nm。

图 2 透射电镜下新生大鼠海马神经干细胞

3 讨论

制备原代培养 NCSs 单细胞悬液一般常用机械分离法^[5-6]和酶消化法^[7-8]。在本实验中, 作者使用巴氏吸管吹打机械分离法。本课题组前期研究发现, 使用酶消化法时, 若消化时间短, 无法使呈球状生长的细胞团完全分散为单细胞, 若延长消化时间, 虽能使细胞团分散为单细胞, 但会造成大部分细胞死亡, 相反, 机械分离法细胞的成活率和克隆球的形成率均远高于酶消化法^[9]。由此推测是否神经干细胞之间存在着特殊的连接结构, 而用酶消化时破坏了这种细胞连接, 导致了细胞生长缓慢甚至死亡。

细胞连接分为封闭连接、锚定连接和通讯连接(又分为间隙连接、化学突触和胞间连丝)^[10]。细胞连接的体积很小, 只有在电镜下才能观察到。间隙连接是相邻细胞间允许细胞间离子, 代谢产物和其他信号分子交换的通道。这些细胞间通道由独特的结构单位间隙连接蛋白组成^[11]。在神经系统的发育过程中, 间隙连接可以使得发育中细胞间进行信息的相互交换, 从而影响到细胞的功能。对细胞的正常增殖和分化起着重要的调控作用。本实验在电镜下发现, 相邻两个神经干细胞之

间的胞膜出现了增厚, 在连接处相邻细胞间有极小的缝隙, 在间隙与两层质膜中有少量颗粒并有部分胞膜相互镶嵌, 出现了类似间隙连接样结构; 有的神经干细胞细胞间隙稍增宽, 胞膜无增厚, 细胞膜上出现了胞吞/胞吐小泡。细胞内的小分子, 如无机盐离子、糖、氨基酸、核苷酸和维生素等有可能通过间隙连接相互传递, 同时, 这种连接对细胞也是一种保护, 当细胞破损时, 大量钙离子进入, 导致间隙连接关闭, 以免正常细胞受到伤害^[12]。

总之, 本课题组成功分离培养出新生大鼠海马神经干细胞, 并通过透射电镜对其进行观察, 初步揭示了神经干细胞之间的细胞间连接状态, 为神经干细胞的生物学功能的研究提供了一定的形态学依据。至于细胞间连接中是否有类似间隙连接蛋白之类的蛋白, 可能会是何种类别的蛋白质, 以及对神经干细胞增殖与分化进程的影响如何等, 还有待于进一步探索。

参考文献:

[1] Gage FH. Mammalian neural stem cell[J]. Science, 2000, 287(5457):1433-1438. (下转第 1206 页)

Periostin 是一种主要由成纤维细胞分泌的细胞外基质蛋白,在成年正常心肌中不表达,但心脏受到损伤时就会大量表达^[2]。最早研究的主要是其在肿瘤病理进程的作用,还有报道其在皮肤^[3]、肾脏及心脏瓣膜^[4]、肌肉损伤等条件下亦有表达。压力负荷、应激、炎症等均可引起骨膜蛋白表达上调。Periostin 蛋白可与胶原-I、胶原-V、粘连蛋白等基质蛋白结合参与生理性及病理性纤维化的形成^[3]。有研究表明,Periostin 蛋白参与病毒性心肌炎心肌纤维化的发生、发展,并与 Ang-II 及 TGF- β 1 有关^[5]。Periostin 蛋白还可通过血管生长调节等途径促进动脉粥样硬化斑块的生长及不稳定性,从而参与冠心病的发生、发展过程^[6]。Iekushi 等^[7]在 AMI 大鼠中使用缬沙坦治疗后发现,缬沙坦可通过抑制 Periostin 表达来改善心功能及心肌梗死后心室重塑。李佳彧等^[8]发现芪蒯强心胶囊和雷米普利均能通过降低心肌梗死区 Periostin mRNA 表达改善心室重构。然而他汀类药物对 AMI 后心室重构的影响是否也与 Periostin 信号通路有关,目前仍未见报道。

本研究以检测心肌 Periostin 的变化来反映 ROS 的抗心肌重构作用。结果发现,与 AMI 组相比,ROS 组心肌 Periostin、TGF- β 1 表达明显降低,胶原容积分数降低。实验结果证实,ROS 能够降低梗死交界区心肌 Periostin 的表达,可改善 AMI 后心室重塑,其机制可能为 ROS 通过降低 TGF- β 1 的水平,调节 Periostin 的表达,从而减少胶原的沉积,这为治疗 AMI 后心室重构提供了实验依据,但深入的其他机制尚待进一步探讨。

参考文献:

[1] 王勇,高大中,殷跃辉,等. 大鼠心肌梗死模型建立方法选择及心电图表现[J]. 中国实验动物学报,2011,9(6):525-

529.

- [2] Stansfield WE, Andersen NM, Tang RH, et al. Periostin is a novel factor in cardiac remodeling after experimental and clinical unloading of the failing heart[J]. *Ann Thorac Surg*, 2009, 88(6):1916-1921.
- [3] Zhou HM, Wang J, Elliott C, et al. Spatiotemporal expression of Periostin during skin development and incisional wound healing: lessons for human fibrotic scar formation [J]. *J Cell Commun Signal*, 2010, 4(2):99-107.
- [4] Norris RA, Moreno-Rodriguez RA, Sugi Y, et al. Periostin regulates atrioventricular valve maturation[J]. *Dev Biol*, 2008, 316(2):200-213.
- [5] 吴岚,宋丽君,王朝霞,等. 骨膜蛋白在实验性病毒性心肌炎小鼠的表达及意义[J]. 临床儿科杂志,2011,29(7):661-664.
- [6] 杨余,丁志坚,朱傲霜,等. 冠心病患者血浆 Periostin 蛋白与血管内皮生长因子的相关性[J]. 中国动脉硬化杂志,2011,19(2):135-138.
- [7] Iekushi K, Taniyama Y, Azuma J, et al. Novel mechanisms of valsartan on the treatment of acute myocardial infarction through inhibition of the antiadhesion molecule Periostin[J]. *Hypertension*, 2007, 49(6):1409-1414.
- [8] 李佳彧,杨萍. 芪蒯强心胶囊对心梗后心力衰竭大鼠 Periostin 蛋白表达干预作用的研究[J]. 中国实验诊断学,2009,13(2):170-172.

(收稿日期:2012-11-08 修回日期:2013-01-22)

(上接第 1203 页)

- [2] Kazanis I, French-Constant C. The number of stem cells in the subependymal zone of the adult rodent brain is correlated with the number of ependymal cells and not with the volume of the niche[J]. *Stem Cells Dev*, 2012, 21(7):1090-1096.
- [3] Fletcher RB, Prasol MS, Estrada J, et al. p63 regulates olfactory stem cell self-renewal and differentiation[J]. *Neuron*, 2011, 72(5):748-759.
- [4] Zou L, Jin G, Zhang X, et al. Proliferation, migration, and neuronal differentiation of the endogenous neural progenitors in hippocampus after fimbria fornix transection[J]. *Int J Neurosci*, 2010, 120(3):192-200.
- [5] 王振宇,季丽莉,佟雷,等. 不同鼠龄生后大鼠海马神经干细胞的传代和分化[J]. 解剖科学进展,2008,14(1):28-31.
- [6] 葛岩,王医术,张丽红,等. Wistar 大鼠胚胎脑源性神经干细胞分离、培养及其鉴定[J]. 中风与神经疾病杂志,2009,26(3):266-269.
- [7] Wang S, Roy NS, Benraiss A, et al. Promoter-based isolation and fluorescence-activated sorting of mitotic neuronal progenitor cells from the adult mammalian ependymal/subependyma zone[J]. *Dev Neurosci*, 2000, 22(1/2):167-176.
- [8] Bajpai R, Lesperance J, Kim M, et al. Efficient propagation of single cells Accutase-dissociated human embryonic stem cells[J]. *Mol Reprod Dev*, 2008, 75(5):818-827.
- [9] 姚瑞芹,朱海宾,徐铁军,等. 不同分离方法对人胚胎海马区神经干细胞体外生长的影响[J]. 徐州医学院学报,2003,23(4):298-302.
- [10] 翟中和,王喜忠,丁明孝. 细胞生物学[M]. 北京:高等教育出版社,2000:87-94.
- [11] 刘耀,张曦. 间隙连接细胞间通讯在造血调控中的作用[J]. 重庆医学,2011,40(30):3046-3047.
- [12] Jöderstad J, Jöderstad LM, Li J, et al. Communication via gap junctions underlies early functional and beneficial interactions between grafted neural stem cells and the host [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(11):5184-5189.

(收稿日期:2012-11-06 修回日期:2013-01-22)