

## 成年小鼠神经干细胞培养、鉴定以及多不饱和脂肪酸含量的测定

张正卫<sup>1,2</sup>,俞俊峰<sup>1</sup>,王荣根<sup>1</sup>,阮苗苗<sup>1</sup>,张润洁<sup>1</sup>,方斌<sup>1</sup>,王冠<sup>1</sup>,王盈<sup>1\*</sup>,戴一凡<sup>1\*</sup><sup>1</sup>南京医科大学江苏省异种移植重点实验室,江苏 南京 211166;<sup>2</sup>南京医科大学附属淮安市第一人民医院病理科,江苏 淮安 223300)

**[摘要]** 目的:探讨成年小鼠大脑室下区神经干细胞(neural stem cells, NSCs)体外分离培养和鉴定的方法,测定体外培养的神经干细胞多不饱和脂肪酸 n6/n3 的比例和二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)含量。方法:取 8~10 周龄的 C57BL/6 小鼠室下区细胞,进行体外悬浮培养,观察 NSCs 形成情况,免疫荧光鉴定 NSCs 干细胞特性及体外分化能力,气相色谱鉴定 NSCs 的多不饱和脂肪酸含量中 n6/n3 比例及 DHA 含量。结果:体外培养的细胞可以增殖,并可以连续传代;免疫荧光显示神经干细胞呈抗巢蛋白阳性,神经干细胞在分化培养基培养时可分化为 NeuN、TuJ1、GFAP、O4 阳性细胞;神经干细胞的多不饱和脂肪酸含量较鼠尾高。结论:采用无血清培养基成功获得成年小鼠室下区的神经干细胞,具有增殖、自我更新和分化的能力;神经干细胞的 n3 多不饱和脂肪酸含量明显高于鼠尾中的含量,且 DHA 多不饱和脂肪酸占较高比例。

**[关键词]** 神经干细胞;神经球;脑室下区;多不饱和脂肪酸**[中图分类号]** R714.256**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2017)04-394-05**doi:** 10.7655/NYDXBNS20170402

## Cultivation and identification of neural stem cells in adult mice and determination of polyunsaturated fatty acids

Zhang Zhengwei<sup>1,2</sup>, Yu Junfeng<sup>1</sup>, Wang Ronggen<sup>1</sup>, Ruan Miaomiao<sup>1</sup>, Zhang Runjie<sup>1</sup>, Fang Bin<sup>1</sup>, Wang Guan<sup>1</sup>, Wang Ying<sup>1\*</sup>, Dai Yifan<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Jiangsu Key Laboratory of Xenotransplantation, NJMU, Nanjing 211166; <sup>2</sup>Department of Pathology, Huaian First Hospital Affiliated to NJMU, Huaian 223300, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the method of culturing neural stem cells (NSCs) *in vitro* and measurement of n6/n3 ratios and DHA contents in these NSCs cultured from subventricular zone in adult mice. **Methods:** Subventricular zone was isolated from the brains of 8~10 weeks old C57BL/6 mice, and the NSCs were cultured in floating *in vitro*. Some marker genes of NSCs and differentiated cells were detected by immunofluorescence; polyunsaturated fatty acids and n6/n3 ratios were measured by gas chromatography. **Results:** NSCs proliferated continuously *in vitro*, most cells were Nestin positive. NeuN, TuJ1, GFAP and O4 positive cells were detected by immunofluorescence in differentiated neural cells. Polyunsaturated fatty acids were richer in NSCs. **Conclusion:** NSCs cultured from subventricular zone in adult mice have proliferation and self-renewal abilities. n3 polyunsaturated fatty acids and DHA in NSCs are significantly higher than those in tails.

**[Key words]** neural stem cells; neurosphere; subventricular zone; PUFAs

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(04):394-398]

2000 年 Gage 提出了神经干细胞 (neural stem cells, NSCs) 的概念,并定义神经干细胞为一类来源于神经系统或可生成神经组织,具有自我更新能力,可通过细胞增殖、分化产生其他神经细胞类型

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81570402);南京医科大学科技发展基金(2011NJMU256)

\* 通信作者 (Corresponding author), E-mail: daiyifan@njmu.edu.cn; ywang@njmu.edu.cn

的细胞<sup>[1-2]</sup>。有研究表明,胚胎小鼠 NSCs 主要分布于海马、脊髓、嗅球、侧脑室室周;而成年小鼠的大脑里也存在 NSCs,主要分布于海马齿状回和脑室下区<sup>[3]</sup>。NSCs 具有自我更新能力、增殖潜能和多向分化潜能,可分化成神经元、少突胶质细胞和星形胶质细胞等<sup>[4]</sup>。虽然成年小鼠体内 NSCs 数量少,但是在一些病理条件下,成年小鼠大脑内的 NSCs 可以增殖分化,并向脑损伤灶迁移,起到治疗修复作

用<sup>[5]</sup>。NSCs 的增殖和分化潜能已经成为中枢神经系统疾病治疗的重要研究方向<sup>[6-7]</sup>。了解神经干细胞生物学特性前提是在体外分离培养鉴定神经干细胞。二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)是大脑中最丰富的脂肪酸,在维持大脑发育和功能中起到非常重要的作用,其中 DHA 常富集于中枢神经系统特别是在突触膜、突触小泡、生长锥<sup>[8-9]</sup>。此外有实验表明在体外 DHA 能够促进神经细胞的神经分化和增殖<sup>[10]</sup>。

目前悬浮神经球培养技术已作为经典的研究手段运用神经干细胞的分离、培养。本实验旨在通过无血清神经球悬浮培养法进行神经干细胞的分离、培养、鉴定,并测定神经干细胞中 PUFAs 的 n6/n3 比值和 DHA 等多不饱和脂肪酸的含量。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

实验用动物:8~10 周龄的 C57BL/6 小鼠,由南京大学动物模式所提供,实验过程中严格遵守南京医科大学动物伦理委员会的规定。DMEM/F12(1:1)+L 培养基、胎牛血清、D-PBS(Gibco 公司,美国);30% 葡萄糖、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、表皮生长因子(EGF)、Accutase、HEPES Buffer、Progesterone、Putrescine、Heparin、二甲基亚砷、Poly-D-Lysine(Sigma,公司,美国)、B27 Growth Supplement、胰岛素铁硒传递蛋白(ITSS)、胰酶(Invitrogen 公司,美国);胰酶抑制剂、Laminin(Roche 公司,德国);mouse anti-nestin(BD Biosciences 公司,美国);mouse anti-NeuN(Chemicon 公司,美国);mouse anti-TuJ1、mouse anti-GFAP、mouse anti-O4(Millipore 公司,美国);goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 (Invitrogen 公司,美国);DAPI(Vector 公司,美国);甲醇、氯仿、水、戊烷、庚烷(Tedia 公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 神经干细胞的采集和培养

用 1.5% 戊巴比妥钠进行小鼠腹腔注射麻醉,75%酒精消毒头颈部。断头,剪开头皮、颅骨,取出大脑,放置于装有冰 PBS 的无菌小皿中,纵切大脑 5 份,在显微镜下找到并切下侧脑室下区外两侧壁,并尽可能去除纤维结缔组织等,放置于含有 0.5 mL PBS 的 EP 管中,剪刀尽量剪碎,不见明显块状,移至培养皿中,加入 0.1% 的胰酶,轻柔混匀,37℃ 培养箱孵育约 20 min,消化成单个细胞。胰酶抑制剂终止消化,离心 1 000 r/min,5 min,去上清加入培养基

清洗 1 次,再次离心去上清,加入培养基重新悬浮细胞,移至 12 孔培养皿,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。培养基为每 100 mL 中含有 DMEM/F12 94.3 mL、30% Glucose 2 mL、bFGF 20 μL、EGF 20 μL、1 mol/L HEPES Buffer 0.5 mL、Progesterone(1 000×) 0.1 mL、Putrescine (100×) 1.0 mL、B27 Growth Supplement 2.0 mL、ITSS 100 μL、Heparin 7.32 μL。

#### 1.2.2 神经干细胞的传代分离培养

神经干细胞原代细胞在培养基中 5 d 左右可以形成神经球,进行半量换液,继续培养 2~3 d 开始传代。将原代培养细胞离心 300 g×5 min,弃上清,加入 500 μL Accutase,37℃ 培养箱消化 5 min,离心 300 g×5 min,弃上清,加入适量培养基轻轻吹打神经球,形成单细胞悬液置于 6 孔板中,细胞数量达到 2×10<sup>4</sup> 个/孔,重新放到 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,此细胞为 P1 代细胞,每 5~7 d 传代 1 次。

#### 1.2.3 单层神经干细胞的培养

将多聚赖氨酸(100 μg/mL)和层黏连蛋白(0.25 μg/mL)等比例混合均匀,加入到 24 孔板中,于 37℃ 培养箱孵育过夜。第 2 天除去包被液,超净台中干燥,PBS 清洗 2 遍后于 4℃ 冰箱备用。将 P3 代神经球消化成单细胞悬液,密度达 1×10<sup>5</sup> 个/mL,移至之前处理过的 24 孔板中,37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养。约 2 h 后神经干细胞开始贴壁,形成圆形;大概 4~6 h 后神经干细胞形态变为单极、双极或多极形。第 3 天贴壁神经干细胞进行换液,到第 5 天,贴壁神经干细胞长满培养皿开始细胞传代。

#### 1.2.4 免疫细胞荧光染色

去除培养基,0.1% Triton X-100 漂洗培养皿,再用 PBS 清洗 2 遍,4% 多聚甲醛溶液固定 10 min,PBS 清洗 3 遍,10% 山羊血清在室温下封闭 1 h,加入一抗 mouse anti-nestin(1:500),4℃ 过夜,PBS 清洗 3 遍,加入二抗 goat anti-mouse Alexa Fluor 488 (1:200),室温下 1 h,PBS 清洗 3 遍,荧光显微镜下观察、拍照。

#### 1.2.5 神经干细胞分化鉴定

将前面传代的神经干细胞转移到分化培养基(去掉 bFGF 和 EGF,并加入 10% 的血清)中培养,大概 7 d 后去除培养基,0.1% Triton X-100 漂洗培养皿,再用 PBS 清洗 2 遍,4% 多聚甲醛溶液固定 10 min,PBS 清洗 3 遍,10% 山羊血清在室温下封闭 1 h,分别加入一抗 mouse anti-TuJ1(1:50)、mouse anti-NeuN(1:500)、mouse anti-GFAP(1:500)、mouse anti-O4(1:500),4℃ 过夜,PBS 清洗 3 遍,加入二抗 goat an-

ti-mouse Alexa Fluor 488(1:200),室温下 1 h,PBS 清洗 3 遍,荧光显微镜下观察、拍照。

### 1.2.6 气相色谱检测多不饱和脂肪酸

把细胞移置玻璃管,加 4.0 mL 甲醇,2.0 mL 氯仿,1.5 mL 水,50  $\mu$ L 内参,混匀,涡旋 10 s,室温下避光静置 15 min,再次加入 2.0 mL 氯仿,2.0 mL 水,混匀,涡旋 10 s,静置 5 min,16 $^{\circ}$ C 的条件离心 1 500  $g \times 30$  min,去上清。将尽可能多的下层移置新的玻璃管,35 $^{\circ}$ C 水浴  $N_2$  吹干,加入 1.5 mL BF<sub>3</sub>(甲醛溶液 14%),混匀,90 $^{\circ}$ C 水浴 30 min,观察气泡,冷却静置 10 min,加入 4.0 mL 戊烷,2.0 mL 水,混匀,16 $^{\circ}$ C 的条件离心 1 500  $g \times 2$  min。将上清移置新的锥形玻璃管,35 $^{\circ}$ C 水浴  $N_2$  吹干,加入 200  $\mu$ L 庚烷,涡旋,进样。GC 参数:柱子 SP2380 100 m $\times$ 0.53 mm $\times$ 0.20  $\mu$ m,160 $^{\circ}$ C 静置 2 min,以 1 $^{\circ}$ C/min 160~210 $^{\circ}$ C 匀速上升,载气为 He。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS16.0 进行统计学分析,组间比较采用单因素方差分析方法, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 体外培养小鼠 NSCs 形态及鉴定

8~10 周龄小鼠脑室下区神经细胞体外培养,分

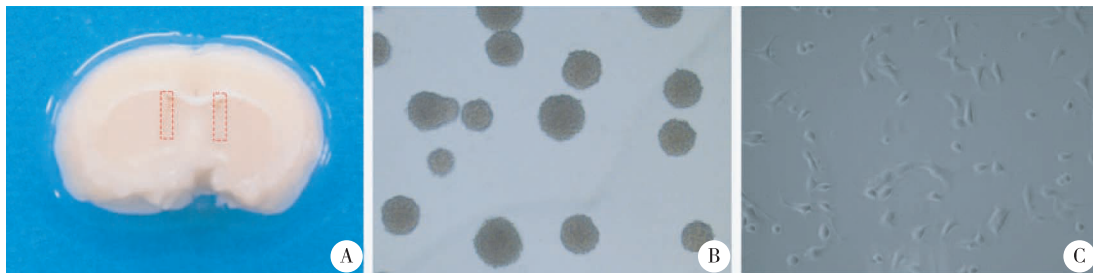
离红线区域(图 1A),剪碎,消化,去除胰酶后,加入无血清培养基,12 d 后,绝大多数组织细胞死亡,而留下来的细胞团即为神经干细胞球,直径可以达到几百微米(图 1B),在培养基中悬浮生长;把神经球移入多聚赖氨酸和层黏连蛋白处理的培养皿中,神经球开始贴壁生长,形成单层细胞(图 1C)。免疫荧光显示神经球细胞呈现 Nestin 阳性,说明神经干细胞还处于祖细胞状态,有分化潜能(图 2)。

### 2.2 NSCs 的分化及鉴定

贴壁培养的 NSCs 在分化培养基上培养,大概 3 d 后,细胞形态发生变化,生成很多突起,形成细胞间的细胞连接。NSCs 分化为多个形态,免疫荧光显示 NeuN(成熟神经元)、TuJ1(神经元)、GFAP(星形胶质细胞)和 O4(少突胶质细胞)阳性的细胞。检测分化 12 d 的 NSCs,结果表明 NSCs 在体外可以分化为神经细胞的 3 种细胞类型(图 3),且多次连续传代后,均可以检测到 3 种不同类型的神经细胞。

### 2.3 气相色谱鉴定 NSCs 的多不饱和脂肪酸

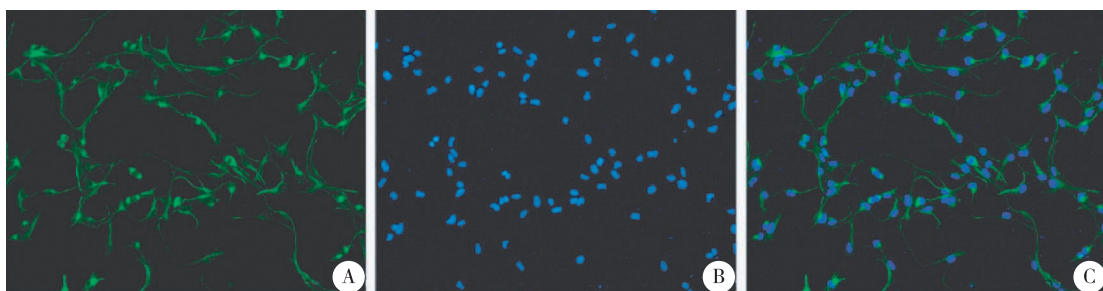
NSCs 悬浮培养,细胞数量增殖达到  $10^6$  时,收集细胞。气相色谱检测 NSCs 中多不饱和脂肪酸 n-6/n-3 比值和 DHA 的含量,结果显示 NSCs 中 n-6/n-3 比值明显低于鼠尾(图 4A),而 DHA 在 PUFAs 中比例明显高于小鼠尾中的含量(图 4B)。



A: 小鼠室下区示意图;B: 悬浮培养的神神经球( $\times 100$ );C: 贴壁培养的的单层神经干细胞( $\times 200$ )。

图 1 8~10 周龄小鼠神经干细胞体外培养的形态观察

Figure 1 Morphology of cultured neural stem cells from 8~10 weeks old mice



A: Nestin(绿色);B: DAPI(蓝色);C: Merge( $\times 200$ )。

图 2 免疫荧光显示神经干细胞为 Nestin 阳性

Figure 2 Neural stem cells are Nestin positive by immunofluorescence

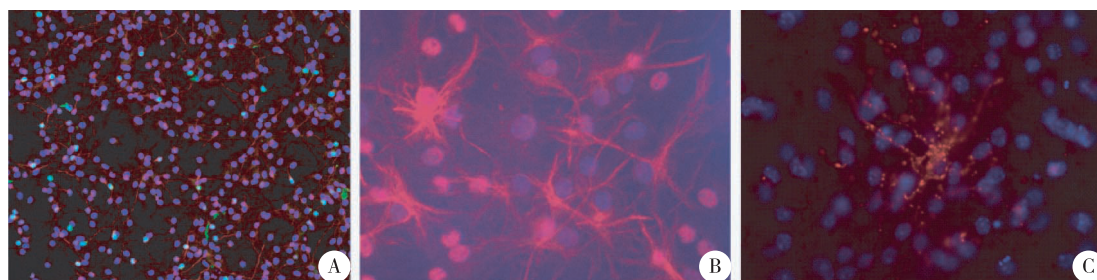


图 3 免疫荧光显示神经干细胞分化为 3 种神经细胞  
A: 神经元 (NeuN: 绿色;TuJ1: 红色;DAPI: 蓝色,×200);B: 星形胶质细胞 (GFAP: 红色;DAPI: 蓝色,×400);C: 少突胶质细胞 (O4: 红色; DAPI: 蓝色,×400)。

图 3 免疫荧光显示神经干细胞分化为 3 种神经细胞

Figure 3 Neural stem cells could differentiate into neurons, astrocytes and oligodendrocytes by immunofluorescence

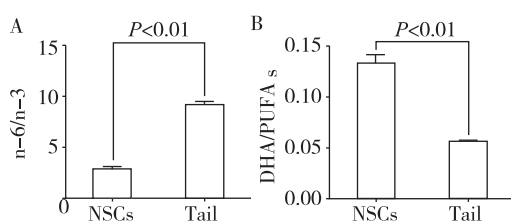


图 4 气相色谱检测神经干细胞的多不饱和脂肪酸和 DHA 的含量(鼠尾作为对照)  
A: NSCs 和鼠尾中 n-6/n-3 比值;B: DHA 在 PUFAs 中的比值;n=3。

Figure 4 Polyunsaturated fatty acids and DHA in neural stem cells were measured by gas chromatography (the tail was as control)

### 3 讨论

成体神经干细胞的自我更新能力、高增殖潜能以及多向分化潜能使得神经干细胞成为研究的热点。神经干细胞体外成功培养为研究神经系统发育、分化以及神经系统疾病,提供了新的思路。随着研究的深入,神经干细胞有可能成为治疗神经变性疾病和脑损伤的有效手段。

本实验采用无血清培养,加入生长因子 bFGF 和 EGF,能够刺激神经干细胞增殖,前者主要促进神经干细胞长期存活,后者可能对神经干细胞分化神经元等起一定作用<sup>[11]</sup>,两者共同维持神经干细胞的丝裂原<sup>[12]</sup>。根据神经干细胞自我更新和增殖潜能的特性,从 8~10 周龄的小鼠大脑室下区成功分离并培养了神经干细胞,细胞既可以悬浮在培养基中生长,也可以贴壁培养,均可在体外大量增殖和长期传代。

巢蛋白(Nestin)是属于 IV 类中间丝蛋白,又称为细胞骨架蛋白,在神经上皮细胞中特异表达。但神经前体细胞分化时,Nestin 表达停止,所以表达 Nestin 的细胞显示了祖细胞的特性,比如高增殖潜能和多向分化潜能,因此 Nestin 被当作神经干细胞

的分子标记,用于神经干细胞的鉴定<sup>[13]</sup>。Nestin 在胚胎早期中广泛表达,不仅在成年动物大脑的室下区、海马齿状回等中表达,在未成熟的神经元以及肌肉和胰岛素中均可表达,因此 Nestin 不能单独用来鉴定神经干细胞。

神经干细胞的分化受到多重因素的调节,比如遗传因素和外界微环境等。当去除生长因子时,神经球开始贴壁生长,进而分化出多种成熟的神经细胞,包括神经元、神经胶质细胞和少突细胞,分化的细胞之间也存在着趋向生长的特点<sup>[14]</sup>。本实验中分化后的神经细胞能够表达 NeuN、GFAP 和 O4 这 3 种特异性标志物,说明实验中获得神经细胞具有多分化潜能的神经干细胞。

PUFAs 由饱和脂肪酸经过不同脱氢酶和延伸酶调节合成而来,哺乳动物既没有合成 PUFAs 所需的前体亚油酸(n-6)和  $\alpha$ -亚麻酸(n-3)的去饱和酶,也没有把 n-6 PUFAs 转换为 n-3 PUFAs 的脱氢酶,所以这些不饱和脂肪酸必须从饮食中摄取<sup>[15]</sup>。n-3 多不饱和脂肪酸对视网膜、精子和中枢神经系统的发育和功能起到非常重要作用<sup>[16-17]</sup>。在神经干细胞中 n-3 多不饱和脂肪酸含量要高于一般组织,本实验也进一步验证了这个结论。

n-3 PUFAs 多不饱和中的 EPA 和 DHA 在大脑中非常丰富,EPA 和 DHA 能提高神经球的生长,当神经球分化后,很难在分化的细胞中检测到 EPA 和 DHA 的存在<sup>[18]</sup>。饮食中添加 DHA 能够提高大鼠海马区的神经元数量和成熟神经再生<sup>[19]</sup>,此外 ARA 或者 DHA 能够通过磷脂酶 C/三磷酸肌醇(GPR40-PLC/IP3)神经信号途径激活  $Ca^{2+}$  的释放,促进神经生长<sup>[20]</sup>。说明 DHA 对于神经干细胞的增殖能力和分化能力有着非常重要的作用,DHA 对神经干细胞的增殖和分化方面是一个研究方向。

体外培养神经干细胞对细胞移植治疗神经性疾

病具有重大意义。此外,神经干细胞还是非常好的基因载体,可为异种嵌合提供理想的基因工具<sup>[21]</sup>。本实验成功地从8~10周龄小鼠大脑室下区分离了神经干细胞,并采用无血清进行体外培养,方法简单易于操作,重复性好,为进一步研究神经干细胞的本质、基因分化及调控靶基因提供了基础。

## [参考文献]

- [1] Gage FH. Mammalian neural stem cells[J]. *Science*, 2000,287(5457):1433-1438
- [2] Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis[J]. *Cell*, 2008, 132(4): 645-660
- [3] Ahmed S. The culture of neural stem cells[J]. *J Cell Biochem*, 2009, 106(1): 1-6
- [4] Crane JF, Trainor PA. Neural crest stem and progenitor cells[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2006, 22: 267-286
- [5] Arvidsson A, Collin T, Kirik D, et al. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke[J]. *Nat Med*, 2002, 8(9): 963-970
- [6] Zhu Z, Khan MA, Weiler M, et al. Targeting self-renewal in high-grade brain tumors leads to loss of brain tumor stem cells and prolonged survival[J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(2): 185-198
- [7] Le Grand JN, Gonzalez-Cano L, Pavlou MA, et al. Neural stem cells in Parkinson's disease: a role for neurogenesis defects in onset and progression[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(4): 773-797
- [8] Denis I, Potier B, Vancassel S, et al. Omega-3 fatty acids and brain resistance to ageing and stress: Body of evidence and possible mechanisms[J]. *Ageing Res Rev*, 2013, 12(2): 579-594
- [9] Hashimoto M, Maekawa M, Katakura M, et al. Possibility of polyunsaturated fatty acids for the prevention and treatment of neuropsychiatric illnesses[J]. *J Pharmacol Sci*, 2014, 124(3): 294-300
- [10] Goustard-Langelier B, Koch M, Lavielle M, et al. Rat neural stem cell proliferation and differentiation are durably altered by the in utero polyunsaturated fatty acid supply[J]. *J Nutr Biochem*, 2013, 24(1): 380-387
- [11] Kondo T, Raff M. Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells[J]. *Science*, 2000, 289(5485): 1754-1757
- [12] Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, et al. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain[J]. *J Neurosci*, 1997, 17(15): 5820-5829
- [13] Wiese C, Rolletschek A, Kania G, et al. Nestin expression - a property of multi-lineage progenitor cells?[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61(19-20): 2510-2522
- [14] Lachyankar MB, Condon PJ, Quesenberry PJ, et al. Embryonic precursor cells that Express Trk receptors: induction of different cell fates by NGF, BDNF, NT-3, and CNTF[J]. *Exp Neurol*, 1997, 144(2): 350-360
- [15] Defilippis AP, Sperling LS. Understanding omega-3's[J]. *Am Heart J*, 2006, 151(3): 564-570
- [16] Simopoulos AP. Importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids: evolutionary aspects[J]. *World Rev Nutr Diet*, 2003, 92: 1-22
- [17] Lin DS, Connor WE, Wolf DP, et al. Unique lipids of primate spermatozoa: desmosterol and docosahexaenoic acid[J]. *J Lipid Res*, 1993, 34(3): 491-499
- [18] Sakayori N, Maekawa M, Numayama-Tsuruta K, et al. Distinctive effects of arachidonic acid and docosahexaenoic acid on neural stem/progenitor cells[J]. *Genes Cells*, 2011, 16(7): 778-90
- [19] Tanabe Y, Hashimoto M, Sugioka K, et al. Improvement of spatial cognition with dietary docosahexaenoic acid is associated with an increase in Fos expression in rat CA1 hippocampus[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2004, 31(10): 700-703
- [20] Ma D, Zhang M, Larsen CP, et al. DHA promotes the neuronal differentiation of rat neural stem cells transfected with GPR40 gene[J]. *Brain Res*, 2010, 1330: 1-8
- [21] Quevedo HC, Hatzistergos KE, Oskouei BN, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells restore cardiac function in chronic ischemic cardiomyopathy via trilineage differentiating capacity[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(33): 14022-14027

[收稿日期] 2016-10-25

欢迎投稿 欢迎订阅