

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00985

体外培养的嗅上皮神经干细胞具有多潜能性

高亮, 曹莉, 苏志达, 朱燕玲, 何成*

第二军医大学神经科学研究所, 上海 200433

[摘要] **目的:**探讨成体嗅上皮神经干细胞(olfactory epithelium neural stem cells)的培养方法及其体外分化的多潜能性。**方法:**使用中性和I型胶原酶分阶段酶解消化嗅上皮,富集嗅上皮神经干细胞,扩增细胞,用加入生长因子bFGF和EGF的无血清培养液促使其形成神经球。血清诱导神经球分化并用免疫细胞化学染色方法鉴定分化细胞。**结果:**原代培养的嗅上皮神经干细胞呈集落样增殖,集落中的细胞表达在体分子标记GBC2和细胞角蛋白5。传代细胞用含生长因子的无血清培养液培养可增殖形成神经球。用含血清的培养液可诱导神经球分化;从神经球迁移出的分化细胞具有很高的异质性,其中包含有TUJ1阳性的神经元、P75NGFR阳性的嗅鞘细胞、GFAP阳性的星形胶质细胞和NG2阳性的寡突胶前体细胞,同时也存在有nestin阳性的神经干细胞。**结论:**成体嗅上皮神经干细胞可体外培养增殖形成神经球,神经球细胞具有向神经元、星形胶质细胞和寡突胶前体细胞分化的潜能。

[关键词] 嗅上皮;神经干细胞;细胞分化;多潜能性

[中图分类号] R 321.58 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)09-0985-05

Multipotency of cultured olfactory epithelium neural stem cells

GAO Liang, CAO Li, SU Zhi-da, ZHU Yan-ling, HE Cheng*

Institute of Neuroscience, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the culture method for adult olfactory epithelium neural stem cells and their multipotency during *in vitro* differentiation. **Methods:** Olfactory epithelium was sequentially digested with neutral protease and collagenase I A, then the olfactory epithelium neural stem cells were enriched and amplified. Neurospheres were formed by culturing the cells with serum free medium containing bFGF and EGF. Differentiation of neurospheres was induced with medium containing serum; the differentiated cells were identified by immunocytochemistry. **Results:** Primary cultured olfactory epithelium neural stem cells proliferated and formed colonies. Cells in the colonies expressed the *in vivo* markers GBC2 and cytokeratin 5. Passaged cells proliferated and formed neurospheres when cultured with serum free medium containing bFGF and EGF. Medium containing serum induced the differentiation of neurospheres. TUJ1 positive neurons, P75NGFR positive olfactory ensheathing cells, GFAP positive astrocytes and NG2 positive oligodendrocyte progenitors were detected in the highly heterogeneous differentiated cells; besides, the cells also contained nestin positive neural stem cells. **Conclusion:** Cultured adult olfactory epithelium neural stem cells can proliferate and form neurospheres. The neurosphere cells have the multipotency to differentiate into neurons, astrocytes and oligodendrocyte progenitors.

[KEY WORDS] olfactory epithelium; neural stem cells; cell differentiation; multipotency

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(9):985-989]

脊椎动物的嗅神经元可终生不断再生,新生的嗅神经元由位于嗅上皮基层的嗅上皮神经干细胞分化而来。成年小鼠的嗅上皮神经干细胞形态上分为球状基底细胞(global basal cells, GBCs)和水平状基底细胞(horizontal basal cells, HBCs)^[1]。通常情况下嗅神经元的再生由GBCs完成;HBCs作为嗅上

皮的干细胞池(stem cell pool)只有在嗅上皮严重损伤的情况下才活化增殖,并最终分化为嗅上皮的多种细胞成分,以维持正常的嗅觉功能^[2]。嗅上皮神经干细胞具有多潜能性,其体内分化谱系中包括嗅神经元(olfactory receptor neuron)、支持细胞(sustentacular cells)、嗅鞘细胞(olfactory ensheathing cells)和鲍曼腺

[收稿日期] 2009-07-31 **[接受日期]** 2009-09-01

[基金项目] 国家自然科学基金(30770657, 30530240). Supported by National Natural Science Foundation of China (30770657, 30530240).

[作者简介] 高亮, 硕士. E-mail: lg_chn@hotmail.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-65515200, E-mail: chenghe@smmu.edu.cn

体细胞(Bowman's gland cells)^[1]。

由于干细胞具备自我更新能力和多向分化潜能,移植干细胞用于治疗中枢神经系统损伤和神经退行性疾病已经成为研究热点^[3-5]。但在干细胞的移植疗法中普遍存在干细胞来源不足、伦理上的争议以及异体移植细胞的免疫排斥问题等,而运用嗅上皮神经干细胞作为移植用的干细胞的来源则可以避免上述问题。嗅上皮神经干细胞可通过自体取材获得,并能通过体外培养进行扩增,体外培养的嗅上皮神经干细胞亦具有多向分化潜能^[6-7]。本研究通过原代富集并传代扩增嗅上皮神经干细胞,同时利用血清培养诱导其体外分化,最后通过免疫细胞化学染色方法鉴定分化细胞的种类,为进一步研究嗅上皮神经干细胞移植治疗中枢神经系统损伤和神经退行性疾病奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料及试剂

1.1.1 细胞培养 实验动物为成年(6周龄)雄性 C57BL/6 小鼠,购自上海斯莱克实验动物中心。DMEM/F12(1:1)培养液,胎牛血清(FBS),Hank's平衡盐溶液,胰岛素、转铁蛋白、硒(ITS)添加剂,0.25% trypsin 和青霉素-链霉素溶液(工作浓度为青霉素 100 U/ml,链霉素 0.1 mg/ml),均购自 Gibco 公司;2.4 U/ml 中性蛋白酶(neutral protease),10 μg/ml DNA 酶(DNase)购自 Worthington 公司;0.25% I 型胶原酶(collagenase I A)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF) 20 ng/ml、表皮生长因子(EGF) 40 ng/ml、多聚-L-赖氨酸(poly-L-lysine, PLL)(0.85 μg/cm²)均购自 Sigma 公司。

1.1.2 抗体 兔抗小鼠 cytokeratin 5 (Abcam),小鼠抗大鼠 GBC2 (J. E. Schwob 赠),鼠抗人 Neuronal Class III β-Tubulin (TUJ1) (Promega),兔抗人 P75NGFR (Santa Cruz Biotechnology),兔抗人 nestin (Abcam),鼠抗牛 S100β (武汉博士德生物工程有限公司),小鼠抗小鼠 GFAP (Sigma),兔抗大鼠 NG2 (Chemicon),FITC 标记驴抗兔、小鼠 IgG,TRITC 标记驴抗兔、小鼠 IgG (Jackson Immunoresearch)。

1.2 方法

1.2.1 成体嗅上皮神经干细胞原代培养 取 5~6 只成年(6周龄)雄性 C57BL/6 小鼠,CO₂室窒息死后摘取双侧鼻甲及鼻中隔,用显微镊将嗅黏膜从鼻甲及鼻中隔撕下(避免撕取呼吸上皮),嗅黏膜浸泡

于含青霉素-链霉素的 4℃ Hank's 平衡盐溶液中。用含抗生素新鲜 Hank's 液漂洗嗅黏膜 3 遍。2.4 U/ml 中性蛋白酶溶液 37℃消化嗅黏膜 45 min。后用 Hank's 液终止消化,在体视显微镜下用显微镊小心地将嗅黏膜的嗅上皮层和固有层分开。收集嗅上皮层组织,用火焰抛光的巴斯德管反复吹打,收集单细胞悬液。收集的固有层组织用 0.25% collagenase I A 37℃消化 10 min,用 Hank's 液终止消化,吹打收集单细胞悬液。合并上皮层和固有层的单细胞悬液,离心后用含青霉素-链霉素和 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液重悬细胞,37℃、5% CO₂ 贴壁培养,每两天更换培养液。

1.2.2 成体嗅上皮神经干细胞传代培养和形成神经球 原代培养 7~10 d 后,细胞可增殖长满培养皿。此时细胞用 0.25% trypsin 37℃消化 10 min,再用含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液终止消化,离心后细胞重悬于添加青霉素-链霉素、ITS 添加剂、bFGF 20 ng/ml、EGF 40 ng/ml 的 DMEM/F12 培养液中(传代培养液),以 5×10⁴ 个/cm² 的密度种于多聚-L-赖氨酸包被过的培养皿中,37℃、5% CO₂ 贴壁培养,每两天更换培养液。约 1 周后传代细胞增殖形成神经球。神经球用 2.4 U/ml 中性蛋白酶和 10 μg/ml DNase 37℃消化 15 min,吹打散后用传代培养液进行传代培养,每两天更换培养液一次。

1.2.3 体外诱导分化 将传代 2~3 代后的神经球从培养皿上吹打下来,离心后重悬于含青霉素-链霉素和 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液中贴壁培养。培养 3~4 d 后,大多数细胞可从神经球中爬出。

1.2.4 免疫细胞化学染色鉴定原代和传代分化的细胞 原代培养 6 d 的嗅上皮神经干细胞和诱导分化后的神经球用 4% 多聚甲醛固定,正常山羊血清封闭后,分别加入一抗 cytokeratin 5 和 GBC2、TUJ1 和 P75 NGFR、nestin 和 S100β、GFAP 和 NG2 4℃孵育过夜。PBS 洗涤后用 FITC 和 TRITC 标记的二抗室温孵育 1 h。用 Hoechst 标记细胞核后封片拍照。

2 结果

2.1 原代培养的嗅上皮神经干细胞

2.1.1 呈集落状增殖 原代培养的嗅上皮细胞在体外培养 2 d 后可贴壁,贴壁细胞占 60% 左右。细胞贴壁后迅速增殖。在培养 4 d 以后,培养皿中开始出现许多致密的细胞集落(图 1A)。集落中细胞成

分多样,在集落边缘有呈梭形排列的细胞(图 1B);有细胞间隙很大、胞核不明显的细胞(图 1C);在集落中有胞体较小、细胞间隙不清晰,但胞核大且核仁

清晰的细胞(图 1D);有细胞胞体肥大、排列稀疏的细胞(图 1E)。这些细胞集落增殖迅速且无明显的分化,在原代培养 8~12 d 后即可覆盖满培养皿。

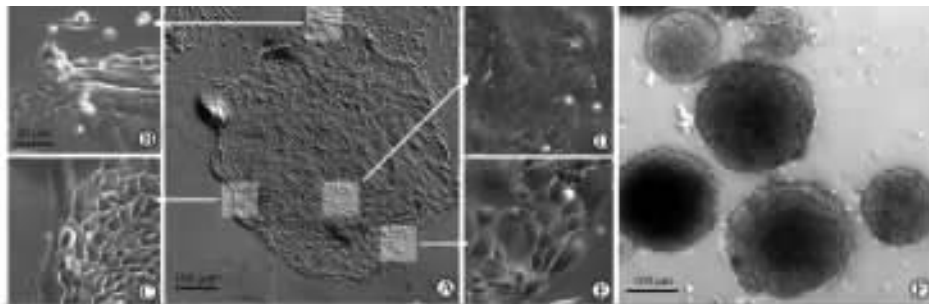


图 1 原代培养嗅上皮神经干细胞的形态特征

Fig 1 Morphology of primary cultured and passaged olfactory epithelium neural stem cells

A: Colony formed by primary cultured cells; B-E: Cells with different morphologies in the colony, zoomed from A; F: Passaged cells formed neurospheres. Scale bar in A=100 μm ; in B-E=20 μm ; in F=100 μm

2.1.2 表达体内分子标记 成年小鼠的嗅上皮神经干细胞依据形态分为球状基底细胞 GBCs 和水平状基底细胞 HBCs。在体 GBCs 表达特异性表面抗原 GBC2 等分子标记, HBCs 表达细胞角蛋白 5 等分子标记。免疫细胞化学染色显示,原代培养的嗅上皮细胞增殖形成的细胞集落呈 GBC2 和细胞角蛋白 5 阳性(图 2A、2B),其中细胞角蛋白 5 阳性细胞明显多于 GBC2 阳性细胞。着色细胞形态均为不规则菱形,占据集落总细胞的 90% 以上(图 2C),这说明原代培养的嗅上皮细胞中绝大多数为嗅上皮神经干细胞。

2.2 原代培养细胞传代后可增殖形成神经球 体外培养可形成神经球是神经干细胞的典型特征。原代培养的嗅上皮神经干细胞传代后用无血清的传代培养液培养 1 周后可增殖形成神经球(图 1F)。神经球大多数为悬浮状态,少部分为半贴壁状态。形成的神经球形态规则,边缘可见凸起的单个细胞。直径大多数为 200~300 μm 。部分直径较大的神经球由于细胞致密,球心细胞因养分供应不足而死亡,呈现出球心偏暗球周偏亮的特点(图 1F)。

2.3 嗅上皮神经干细胞的体外诱导分化 嗅上皮神经干细胞在体内可以分化为嗅神经元、支持细胞、嗅鞘细胞、鲍曼腺体细胞。我们的实验结果显示,体外培养的嗅上皮神经干细胞亦具有多分化潜能。传代 2~3 代后的神经球用含 10% FBS 的 DF12 培养液培养 3~4 d 后,神经球贴壁并且绝大多数细胞从球中爬出,爬出的细胞形态上出现明显分化(图 3A、3C、3E)。嗅神经元可表达 Neuronal Class III β -Tu-

bulin (TUJ1),嗅鞘细胞表达神经生长因子受体 P75NGFR。我们用 TUJ1 和 P75 抗体双标记分化后的细胞发现,从神经球中爬出的细胞有 TUJ1 阳性的神经元和 P75 NGFR 阳性的嗅鞘细胞(图 3A、3B)。由于 TUJ1 在神经元中广泛表达,所以分化出来的 TUJ1 阳性神经元为哪种神经元仍有待于进一步验证。Nestin 是一种中间丝蛋白,在神经干细胞中特异性表达, S100 β 是一种酸性钙离子结合蛋白,广泛表达于中枢和外周神经系统的胶质细胞中。用 nestin 和 S100 β 抗体双标记分化的嗅上皮干细胞显示分化细胞中有 nestin 和 S100 β 阳性细胞(图 3C、3D)。Nestin 阳性说明分化细胞中仍存在有多潜能性的干细胞, S100 β 阳性则提示向胶质细胞的分化;其中部分 S100 β 阳性细胞也同时表达 nestin, 这说明了分化细胞的异质性(图 3D)。胶质纤维酸性蛋白 GFAP (glial fibrillary acidic protein) 是星形胶质细胞特异性表达的蛋白,寡突胶前体细胞特异性表达 NG2 硫酸软骨素蛋白多糖。用 GFAP 和 NG2 的抗体双标分化细胞发现,嗅上皮干细胞体外可诱导分化为 GFAP 阳性的星形胶质细胞和 NG2 阳性的寡突胶前体细胞(图 3E、3F)。

3 讨论

中枢神经系统 (central nervous systems, CNS) 长期以来一直被认为是不可再生的。近期的研究显示,成体 CNS 中存在有神经干细胞 (neural stem cells, NSCs), 并且这些 NSCs 终生都处于神经发生

(neurogenesis)过程中,这一发现使得移植 NSCs 用于治疗 CNS 的损伤和退行性疾病成为研究热点^[8-9]。成体 CNS 的 NSCs 分布非常局限,仅存在于海马齿状回(dentate gyrus)、室管膜下区(subependymal zone)和脊髓中,这一分布特点使得获取足够成体 NSCs 非常困难。现在 NSCs 多来源于胚胎脑组织,来源有限并且应用上存在伦理方面的问题,同时异体移植的 NSCs 存在免疫排斥反应。嗅上皮神经干细胞由于可以自体获得并且具有多潜能性,已成为干细胞移植疗法的良好细胞来源^[10]。

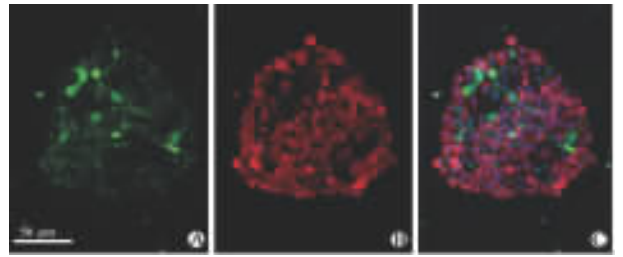


图 2 集落内细胞的免疫荧光鉴定

Fig 2 Identification of cells in colony by immuno-fluorescence A:GBC2 positive colony cells; B:Cytokeratin 5 positive colony cells; C:The combination of A and B. Nuclei were counterstained with Hoechst(blue). Scale bar=50 μm

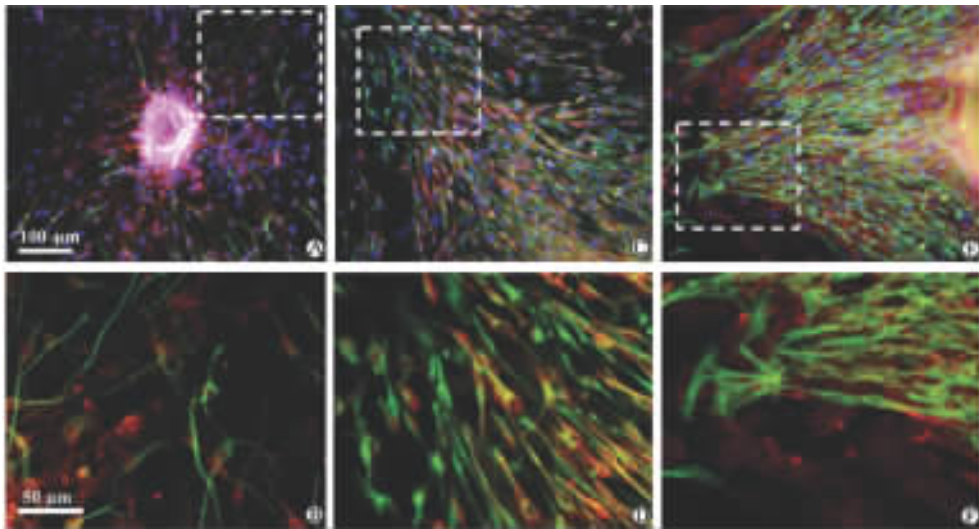


图 3 免疫荧光鉴定嗅上皮神经干细胞的体外诱导分化

Fig 3 Induced differentiation of olfactory epithelium neural stem cells identified by immuno-fluorescence

A: TUJ1 (green) and P75 NGFR (red) cells were detected in the differentiated cells; B:Zoomed from A; C:Nestin (green) and S100β (red) cells were detected in the differentiated cells; D:Zoomed from C; E:NG2 (green) and GFAP (red) cells were detected in the differentiated cells; F:Zoomed from E. Nuclei were counterstained with Hoechst(blue) in A,C,F. Scale bar in A,C,E=100 μm; in B,D,F=50 μm

运用嗅上皮神经干细胞作为移植细胞来源的主要问题在于细胞的富集、扩增和诱导分化的方法。按照文献报道的方法^[11],原代培养时将嗅黏膜用酶整体消化,获得的单细胞悬液中难免混杂有固有层的成纤维细胞和嗅鞘细胞等杂细胞,这些细胞在血清培养条件下亦增殖迅速。嗅上皮为假复层状上皮结构,嗅上皮神经干细胞位于嗅上皮的基底层。根据这一特点,在原代富集嗅上皮神经干细胞时我们用不同消化酶分阶段消化,得到的细胞培养后呈集落状生长,集落中的细胞表达嗅上皮神经干细胞在体的分子标记 GBC2 和细胞角蛋白 5,并且染色阳性细胞占总细胞数目的 90%以上。这一结果提示用不同消化酶分阶段消化的方法可以富集到纯度较高的嗅上皮神经干细胞。实验结果亦显示,运用含生长因子的无血清培养液培养可维持嗅上皮神经干

细胞的增殖活力和多潜能性。传代培养得到的神经球在血清诱导下显示出多分化潜能,分化后绝大多数细胞从神经球中爬出,免疫细胞化学染色发现爬出细胞包括神经元、星形胶质细胞和寡突胶前体细胞;从神经球爬出的细胞中亦可检测到 nestin 阳性的神经干细胞,而体内嗅上皮神经干细胞是不表达 nestin 的,这说明了体外培养的干细胞与体内的干细胞存在差异。对于诱导嗅上皮神经干细胞向特定种类的细胞分化的条件,比如向多巴胺能神经元的分化,仍有待于进一步研究。

综上所述,本实验使用的原代培养方法可以获得纯度较高的嗅上皮神经干细胞,并且培养的干细胞可形成神经球并具备多潜能性,为运用嗅上皮神经干细胞作为干细胞移植治疗的来源奠定了实验基础。

(志谢 感谢 Tufts 大学的 James E. Schwob 教授无私赠予单克隆小鼠抗大鼠 GBC2 抗体!)

[参考文献]

- [1] Schwob J E. Neural regeneration and the peripheral olfactory system[J]. *Anat Rec*,2002,269:33-49.
- [2] Leung C T,Coulombe P A,Reed R R. Contribution of olfactory neural stem cells to tissue maintenance and regeneration[J]. *Nat Neurosci*,2007,10:720-726.
- [3] Srivastava A S,Malhotra R,Sharp J,Berggren T. Potentials of ES cell therapy in neurodegenerative diseases[J]. *Curr Pharm Des*,2008,14:3873-3879.
- [4] Barnabé-Heider F,Frissen J. Stem cells for spinal cord repair [J]. *Cell Stem Cell*,2008,3:16-24.
- [5] Andres R H,Choi R,Steinberg G K,Guzman R. Potential of adult neural stem cells in stroke therapy[J]. *Regen Med*,2008,3:893-905.
- [6] Roisen F J,Klueber K M,Lu C L,Hatcher L M,Doziera A, Shields C B,et al. Adult human olfactory stem cells[J]. *Brain Res*,2001,890:11-22.
- [7] Zhang X D,Klueber K M,Guo Z F,Cai J,Lu C L,Winstead W I,et al. Induction of neuronal differentiation of adult human olfactory neuroepithelial-derived progenitors [J]. *Brain Res*,2006,1073:109-119.
- [8] Deacon T,Dinsmore J,Constantini L C,Ratliff J,Isacson O. Blastula-stage stem cells can differentiate into dopaminergic and serotonergic neurons after transplantation[J]. *Exp Neurol*,1998,149:28-41.
- [9] Rao M S. Multipotent and restricted precursors in the central nervous system[J]. *Anat Rec*,1999,257:137-148.
- [10] Marshall C T,Lu C,Winstead W,Zhang X,Xiao M,Harding G,et al. The therapeutic potential of human olfactory-derived stem cells[J]. *Histol Histopathol*,2006,21:633-643.
- [11] Zhang X D,Klueber K M,Guo Z F,Lu C L,Roisen F J. Adult human olfactory neural progenitors cultured in defined medium [J]. *Exp Neurol*,2004,186:112-123.

[本文编辑] 陈波

· 消息 ·

《第二军医大学学报》征订启事

《第二军医大学学报》(CN31-1001/R,ISSN 0258-879X)是由第二军医大学主办的国内外公开发行的综合性医药卫生类学术期刊,1980年6月创刊。本刊面向全国和海外作者征稿,主要报道基础、临床、预防、军事医学、药学和中国医学等领域的最新科研成果。由著名肝胆外科专家、国家最高科技奖获得者吴孟超院士任主编。辟有:院士论坛、专家论坛、专题报道、论著、研究快报、临床病理(例)讨论、病例报告等栏目。读者对象主要为从事医药卫生工作的中高级科研、医疗、教学、预防机构和高等医药院校的师生。

本刊一直被《中文核心期刊要目总览》确认为“中国综合性医药卫生类核心期刊”;是“中国科学引文数据库统计源期刊”、“中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊”;被包括中国学术期刊综合评价数据库、万方数据——中国数字化期刊群等在内的国内所有重要检索系统收录,并被荷兰《医学文摘》(EMBASE)、美国《化学文摘》(CA)、剑桥科学文摘(CSA)、英国《国际农业与生物科学中心(CABI)文摘》数据库、英国《公共健康研究数据库》(Global Health)、俄罗斯《文摘杂志》(VINITI Abstracts Journal)、波兰《哥白尼索引》等国际检索系统收录。先后获得“第二届国家期刊奖百种重点期刊奖”、“第三届国家期刊奖提名奖”和“全国高校精品科技期刊奖”,并被评为“2008年中国精品科技期刊”。

本刊为月刊,A4开本,80g铜版纸彩色印刷,每期定价15元,全年180元。可在当地邮局订阅(邮发代号4-373),漏订者可来函本刊编辑部办理邮购。

地址:上海市翔殷路800号《第二军医大学学报》编辑部,邮编:200433

联系人:魏学丽 电话:021-81870787 转 826 分机 E-mail:bxue@smmu.edu.cn 或 bxue304@yahoo.com.cn

<http://www.ajsmmu.cn> 或 <http://journals.smmu.edu.cn>