

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00130

· 论 著 ·

大鼠寡突胶质前体细胞的体外培养、鉴定及其生物学特性观察

陈美兰,唐中俊,明健,王浩,胡春,蔡季平*

第二军医大学长征医院眼科,上海 200003

[摘要] **目的** 探讨体外培养条件下寡突胶质前体细胞增殖、迁移及分化特性。**方法** 取新生1 d SD大鼠大脑皮质混合胶质细胞培养10 d,分离纯化寡突胶质前体细胞。通过BrdU掺入实验对其增殖能力进行测定,采用经典的Transwell模型和重聚球模型对其迁移能力进行检验,并在分化培养基中观察其分化成为成熟寡突胶质细胞的能力。**结果** 混合培养胶质细胞在培养10 d后出现明显分层现象。初次振荡后,小胶质细胞脱落显示大量聚集成分的寡突胶质前体细胞散布于星形胶质细胞表面。分离的寡突胶质前体细胞NG2、A2B5表达阳性;阿糖胞苷可抑制其增殖($P < 0.01$);PDGF可明显促进其迁移($P < 0.01$);在分化培养条件下,MBP阳性的成熟寡突胶质细胞增多($P < 0.01$)。**结论** 寡突胶质前体细胞在体外培养条件下可以保持其增殖、迁移和分化的基本特性。

[关键词] 寡突胶质前体细胞;细胞增殖;细胞迁移;细胞分化;细胞培养技术

[中图分类号] R 329.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)02-0130-06

Culture, identification and characterization of rat oligodendrocyte precursor cells *in vitro*

CHEN Mei-lan, TANG Zhong-jun, MING Jian, WANG Hao, HU Chun, CAI Ji-ping*

Department of Ophthalmology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To observe the proliferation, migration and differentiation of highly enriched oligodendrocyte precursor cells (OPCs) *in vitro*. **Methods** OPCs were dissociated and purified by shaking method from cultured glia mixture, which was derived from postnatal 1 day SD rats. BrdU incorporation assay was applied to analyze the proliferation ability of OPCs. Transwell and reaggregation assay were employed to determine the migration ability of OPCs. In differentiation model, the maturation ability of OPCs was examined by immunostaining and Western blotting analysis of myelin basic protein (MBP). **Results** The stratification of glia mixture occurred 10 days after culture. The microglia was removed by first session of shaking, and there were multiple aggregated OPCs scattered on the surface of astrocyte layer. The separated OPCs were positive for NG2 and A2B5. Ara-C greatly inhibited the proliferation of OPCs as observed by BrdU incorporation assay. PDGF obviously promoted migration of OPCs in both Transwell assay and reaggregation models. The ratio of MBP positive cells (mature oligodendrocytes) was increased in the differentiation medium. Besides, Western blotting analysis showed that MBP in differentiation medium was greatly elevated compared to that in proliferation medium ($P < 0.01$). **Conclusion** The *in vitro* cultured and purified OPCs can maintain their fundamental characteristics of proliferation, migration and differentiation.

[Key words] oligodendrocyte precursor cells; cell proliferation; cell migration; cell differentiation; cell culture techniques

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(2):130-135]

中枢神经系统的髓鞘形成依赖于寡突胶质前体细胞(oligodendrocyte precursor cells, OPCs)的增殖、迁移和分化。研究表明,寡突胶质前体细胞起源局限,仅发生于腹侧脑室下区,需要经历长距离的迁移到达白质区分化并包绕轴突形成髓鞘^[1]。髓鞘对于维持正常神经动作电位传导具有重要意义,一旦发生变性或损伤将导致严重的神经功能障碍。由于

髓鞘损伤后的自然修复再生大多以失败告终,所以,筛选有效的外源因素对于促进髓鞘再生是目前研究的主要方向^[2]。但在体过程极其复杂,因此,体外培养高纯度的寡突胶质前体细胞是了解该类细胞特性的重要前提。而在此基础上对其增殖、迁移和分化等性质的探讨对髓鞘修复再生具有重要的参考价值。

[收稿日期] 2011-12-06 **[接受日期]** 2012-02-04

[作者简介] 陈美兰,硕士生. E-mail: meilanchen918@gmail.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81885922, E-mail: netpard@163.com

1 材料和方法

1.1 实验动物及试剂 新生1 d SD大鼠购自第二军医大学动物实验中心,雌雄不限。主要试剂:解剖液,PBS,B104条件培(养)液[当B104细胞系在DMEM/10%胎牛血清中增殖密度约75%时,将培液换成含2%B27的Neurobasal培液(NB/B27)中培养48 h后收集并过滤所得的培液],细胞培液:DMEM+10%FBS,OPCs增殖培液:NB/B27:B104条件培液(体积比7:3)(Gibco);OPCs分化培液:DMEM+30 ng/ml Triiodothyronine (T3) and 40 ng/ml Thyroxine (T4);考马斯亮蓝染色剂;先将2 g R-250考马斯亮蓝溶于120 ml ddH₂O,再加入240 ml 甲醇和80 ml 冰乙酸,最终用ddH₂O定容至800 ml,滤纸过滤;细胞裂解液,一抗:NG2、A2B5、Iba1、MBP (Chemicon),GFAP、anti-BrdU (Sigma);二抗:HRP偶联标记的二抗购自KangChen生物公司,FITC及罗丹明偶联的荧光二抗购自Jackson ImmunoResearch公司;阿糖胞苷(Ara-C)和BrdU (Sigma公司)。

1.2 OPCs的培养与鉴定

1.2.1 培养 所有动物实验均遵循第二军医大学动物保护和委员会规则操作。按McCarthy等^[3]的培养方法加以适当修饰。无菌分离暴露新生(P1)SD大鼠的脑,去除软脑膜,取出大脑皮质,置于解剖液中,用显微剪剪碎(最终体积约为1 mm³),加入与解剖液等量的0.25%胰酶(Gibco公司),37℃消化30 min,加入新鲜培液终止消化。用吸管将组织悬液转移至10 ml玻璃离心管中,700×g离心5 min,弃上清。重新加入新鲜培液,用火焰抛光的吸管吹打成细胞悬液,室温下静置5~10 min,并将细胞悬液种于铺被好多聚赖氨酸的培养瓶中。待绝大部分细胞贴壁后(约16 h),轻晃培养瓶数次去除未贴壁细胞或组织块,并换成新鲜培液,此后每3 d换液。培养10 d左右后,将其放入37℃摇床以250 r/min的转速振摇2~3 h去除小胶质细胞,并加入新鲜培液以290 r/min继续摇晃20 h。取细胞悬液用400目筛网过滤至没有涂布多聚赖氨酸的培养皿中,让其贴壁数小时后,吸取培液,即为OPCs悬液。OPCs悬液直接种植于铺被有多聚赖氨酸的培养板中,数小时后待OPCs已完全贴壁,将培液换成增殖

培液,培养数日,每2 d换一次培液。

1.2.2 鉴定 OPCs在增殖培液中数天后,用NG2、A2B5等OPCs表面标志物进行免疫细胞化学鉴定其纯度。细胞用PBS(0.01 mol/L,pH 7.4)洗涤2次,4%多聚甲醛室温固定20 min,PBS洗涤3次,每次5 min;用含0.3% Triton X-100的PBS室温处理10 min,10%羊血清室温孵育1 h,用10%羊血清稀释一抗于4℃过夜;用PBS洗去一抗,用5%羊血清稀释二抗,室温避光孵育1 h;用封片剂封片,荧光显微镜下观察拍照。

1.3 细胞增殖实验 OPCs在增殖培液中培养2 d后,在正常组和阿糖胞苷处理组加入1 μmol/L BrdU标记细胞。4 h后进行染色,方法如下:4%多聚甲醛室温固定20~30 min;PBS洗涤10 min/次,3次;2 mol/L HCl室温孵育15 min;PBS洗涤10 min/次,3次;0.1 mol/L Na₂B₄O₇室温孵育15 min;PBS洗净;0.1% Triton X室温处理1~2 min;10%山羊血清中封闭45~60 min;加入一抗(稀释于5%山羊血清中)4℃过夜;PBS洗涤10 min/次,3次;加入二抗(稀释于10%山羊血清中)并室温孵育1 h;PBS洗涤3次;封片。共聚焦显微镜(Nikon)以40倍镜每组拍摄4~5个视野进行分析。实验重复2次。

1.4 细胞迁移模型 Boyden-Chamber Transwell迁移分析^[4]:迁移小室的滤膜两侧均预先涂布多聚赖氨酸,自然晾干(严禁紫外线照射)后,将迁移小室的滤膜浸泡于培液中(DMEM+10%FBS)至少2 h。将OPCs悬液(在未涂布多聚赖氨酸的培养皿中自然贴壁时间不得超过30 min,否则会出现明显聚球现象)种植于上层滤膜上,1~2 h后,将培液换成增殖培液,同时将处理试剂加入下层并置于培养箱中16 h。细胞染色:OPCs细胞直接用4%多聚甲醛固定20 min,PBS冲洗2~3次后,考马斯亮蓝室温下染色4 h,用PBS冲洗干净,棉签轻轻擦拭膜上层后,镜下观察细胞迁移情况。光镜下(Olympus),各组用20倍镜至少拍摄30个视野进行分析。计算每视野的平均数目,并与对照组相比。

重聚球迁移模型^[5]:OPCs悬液(在未涂布多聚赖氨酸的培养皿中自然贴壁,时间约为1~2 h)中含有大量重新聚集成球的团块,显微镜下吸取单个团块种植于涂布多聚赖氨酸的6孔板中,数小时待其

贴壁后,将其培液换成增殖培液并加入处理试剂继续培养。16 h后,去除培液于4%多聚甲醛中固定,光镜下拍照统计。迁移距离=(迁移后平均直径-迁移前平均直径)/2,每组实验至少统计5个 OPCs 聚球。

1.5 细胞分化模型建立 分离纯化的 OPCs 贴壁数小时后,将其培液置换成分化培液继续培养 3~4 d。并按照 OPCs 纯化鉴定的方法进行 NG2 和 MBP 共标染色。MBP 蛋白水平检测:冰浴收集 OPCs 细胞裂解液,超声破碎后于沸水中煮沸 5 min,离心后上样。10%SDS-PAGE 分离,含 15%甲醇的转膜缓冲液以恒流 0.35 A 转膜 2 h。10%脱脂奶粉室温封闭 1 h 后加入一抗 MBP(1:500)于 4℃过夜。TBST 冲洗 3 遍,每次 10 min。加入二抗(1:5000)室温 1.5 h, TBST 冲洗 4 次,每次 10 min。ECL 液显影,压片。用 ipip5 成像软件系统进行灰度扫描分析。实验结果重复 3 次。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 11.0 软件进行处理,组间比较采用 *t* 检验;检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 体外分离纯化培养 OPCs 的鉴定 根据胶质细胞不同的黏附性质,OPCs 可以通过混合胶质细胞培养并进行差速贴壁法进行分离纯化。原代培养皮质混合胶质细胞 4 d 后,可见星型胶质细胞迅速增殖。在其间散布体积较小、折光性强的细胞,并呈聚

集状态。培养到第 7~8 天后,星型胶质细胞铺满整个培养瓶底部,并有成堆或呈葡萄串样生长的体积较小、折光性强的细胞散落其间。第 10 天,混合胶质细胞进行第一次机械振荡以分离小胶质细胞,处于混合培养体系最上层的小胶质细胞由于贴壁黏附能力较差最易被分离下来(胶质细胞贴壁黏附能力由强到弱:星型胶质细胞>OPCs>小胶质细胞)。接着将混合培养的细胞换成新鲜培液进行第 2 次机械振荡获取 OPCs。第 2 次振荡时结束后,培液中包括有 OPCs(并非全部 OPCs,因为该机械力不足以使一些贴壁较牢固的 OPCs 振荡下来)、小胶质细胞,一般来说星型胶质细胞不会污染其中,小胶质细胞可能是第 1 次振荡后尚未被振荡下来或换液时未能完全去除的小胶质细胞,所以将其放置于未涂布任何基质的培养皿中自然贴壁数小时(胶质细胞贴壁速度由快到慢顺序为:小胶质细胞>OPCs>星型胶质细胞),小胶质细胞最先贴壁,而 OPCs 则大多仍悬浮于培液中,轻轻吸取培液即可得到体外培养的 OPCs。

按经典的差速贴壁法分离纯化培养的 OPCs 呈明显的双极突起状态,胞体较小呈椭圆形,免疫细胞化学染色呈 NG2 和 A2B5 阳性;同时,发现经该培养体系纯化的 OPCs 中没有发现小胶质细胞(Iba1 阳性)和星形胶质细胞(GFAP 阳性)的存在(图 1),证明该培养细胞为 OPCs,同时表明该培养体系可以获得高纯度的 OPCs。

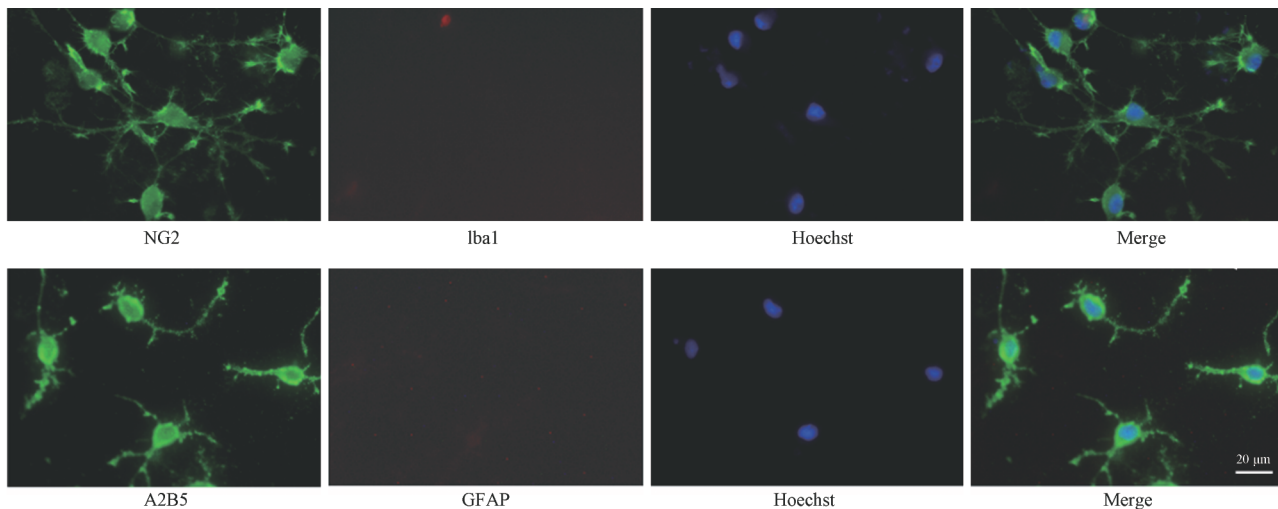


图 1 体外分离纯化培养 OPCs 的鉴定

Fig 1 Identification of OPCs cultured *in vitro*

Purified OPCs are small and bipolar and specifically immunostained for NG2 and A2B5. There are not microglia (Iba1) and astrocytes (GFAP). Hoechst labeled nuclei: the nuclei are blue. The last one is the merge of the nucleus and soma

2.2 OPCs 的体外增殖 OPCs 在脑室下区产生后, 需要先经历增殖过程。为探讨体外培养的 OPCs 增殖能力, 在增殖培养条件下加入 $1 \mu\text{mol/L}$ BrdU。作为阴性对照, $1 \mu\text{mol/L}$ 阿糖胞苷 (Ara-C) 同时加入处理组。4 h 后, 细胞固定染色。结果显示, 正常

分离纯化培养的 OPCs 的增殖率约为 20%; 加入 Ara-C 后, OPCs 增殖被抑制, 增殖率仅约 0.1% (图 2), 两组差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。这表明体外培养的 OPCs 具有增殖能力, 并且可被外源因素所影响。

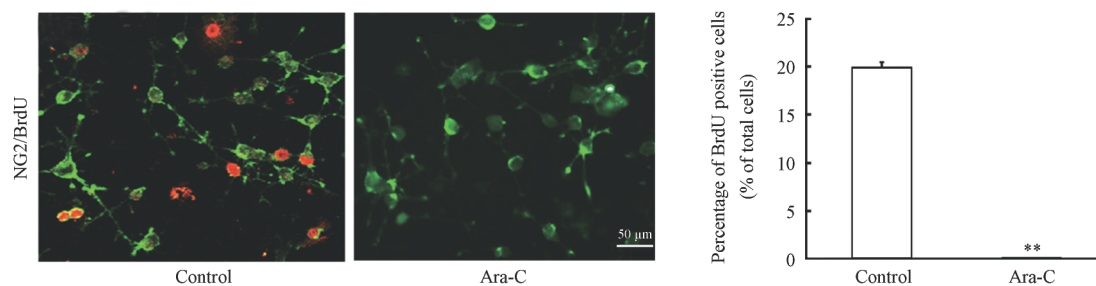


图 2 OPC 的增殖

Fig 2 Proliferation of OPCs

BrdU is incorporated; Ara-C can significantly inhibited the OPCs proliferation. ** $P < 0.01$ vs control group; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.3 OPCs 的体外迁移 由于 OPCs 起源局限, OPCs 在增殖后需要经历长距离的迁移过程才能到达白质区域。Boyden-Chamber Transwell 体外迁移模型可操作性强, 非常敏感, 具有很好的重现性。OPCs 具有一定的自发迁移能力, 在种植密度为 5 000/孔时, 自发迁移 16 h 的迁移率约为 10%。PDGF 可以有效促进 OPCs 迁移, 作为阳性对照, 其

可以将 OPCs 迁移率提高 4 倍左右 (图 3A)。为更好地模拟在体情况, 我们采用重聚球模型 (reaggregation assay) 对其迁移能力进行了分析。结果发现, 聚集成球的 OPCs 可以向外迁移, 16 h 内平均迁移路径约为 $80 \mu\text{m}$, 而 PDGF 可以促进其迁移能力, 平均迁移距离为 $450 \mu\text{m}$ 左右 (图 3B), 两组差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

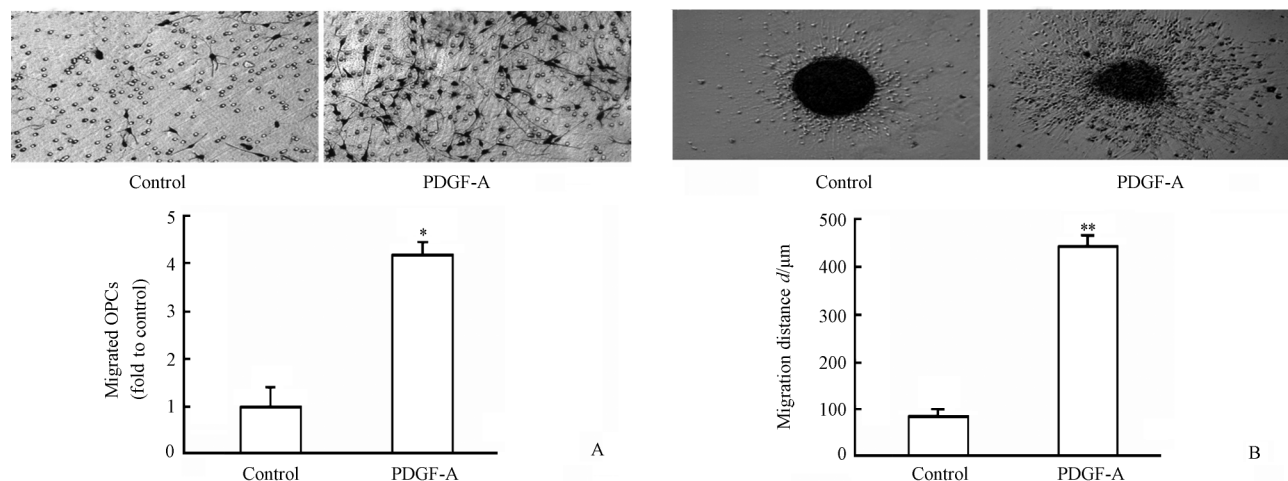


图 3 OPCs 的迁移

Fig 3 Migration of OPCs

OPCs have self-migration ability. A: Boyden-Chamber Transwell model, compared with control, PDGF could obviously promote its migration. B: Reaggregation assay model, the average migration speed of OPCs was $80 \mu\text{m}$ (16 h). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.4 OPCs 的体外分化 OPCs 需要先分化成熟为寡突胶质细胞才可包绕轴突形成髓鞘。髓鞘再生困难主要与 OPCs 的分化成熟障碍有关^[6]。因此, 建

立有效的体外分化模型对寻找合适的靶点非常重要。体外培养的 OPCs 在增殖培养液中培养 3~4 d 后, 免疫组化和 Western blotting 结果均表

明只有很少部分分化成熟为 MBP 阳性的成熟寡突胶质细胞;而在分化培养液中培养 3~4 d 后发现,绝大多数(>80%)的 OPCs 均分化成为成熟的寡突胶

质细胞,并且 MBP 表达量增加(图 4, $P<0.01$)。结果提示,体外纯化培养的 OPCs 具有很强的分化能力,可以用于相应的体外研究。实验均重复 3 次。

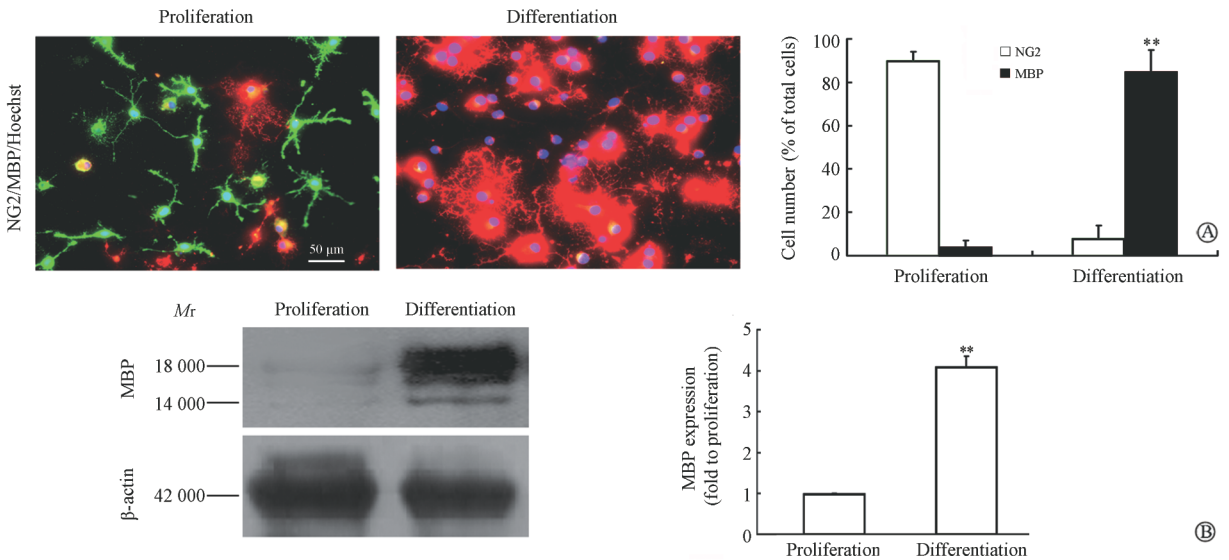


图 4 OPCs 的分化

Fig 4 Differentiation of OPCs

A: The ratio of MBP positive cells (mature oligodendrocytes) was increased in differentiation medium compared to the ratio of NG2 positive ones (OPCs); B: Western blotting analysis: MBP was significantly elevated in differentiation medium cultured for days compared to that cultured in proliferation medium. * * $P<0.01$ vs proliferation; $n=3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

本研究采用经典差速贴壁法进行体外分离纯化培养寡突胶质前体细胞,并系统地对其增殖、迁移和分化特性进行了研究。结果表明,体外培养的 OPCs 可保持增殖、迁移和分化的基本特性,并且可被外源因素影响。体外分离纯化培养 OPCs 有多种方法,包括密度梯度法、差速振荡纯化法、免疫吸附法、神经干细胞定向分化培养法等^[7],但每种方法都有其不完善的地方。本研究按 McCarthy 等^[3]的差速贴壁法进行分离纯化。要取得该实验的成功,我们发现以下几点非常重要:(1)大鼠需在新生 2 d 内,大脑皮质应尽量剪碎,胰酶消化时间不能太长,吹打成悬浮液后必须静置 5~10 min;(2)原代混合胶质细胞种植密度适中,一般按经验是 1.5 只老鼠的大脑皮质种植于 1 个 T75 的培养瓶中;(3)一定要维持培养箱 CO₂ 浓度在 5%,我们发现,在偏碱性条件下很难培养分离出高纯度的 OPCs;(4)B104 条件培养液一定要在 B104 细胞系增殖能力旺盛(融合度为 70% 左右)时加入新鲜 NB/B27 培养 48 h 后收集过滤。我们的实验发现,B104 条件培养液的质量直接影响

OPCs 的活力和增殖能力。

寡突胶质前体细胞需经历增殖、迁移和分化等过程最终才能包绕轴突形成髓鞘^[8]。本实验中,采用 B104 条件培养液方法维系 OPCs 的前体状态,对其增殖和迁移能力进行了系统分析。增殖实验表明,分离纯化培养的 OPCs 具有明显的增殖能力,BrdU 掺入 4 h 后约有 20% OPCs 被标记,而阿糖胞苷可以明显抑制其增殖。一旦发生损伤,OPCs 增殖能力对产生大量的修复细胞起到极其重要的作用。事实上,在成体中也存在一些具有增殖能力的 OPCs,但其功能仍不十分清楚^[9]。OPCs 的长距离迁移无疑是形成髓鞘的前提。由于 OPCs 起源局限,它必须要经历长距离的迁移过程到达白质区域分化形成髓鞘。体外结果表明,OPCs 具有一定的自发迁移能力,在外界因素 PDGF-A 的影响下可以明显加速其迁移速率和数目。迁移小室模型中,PDGF-A 可以明显促进迁移 OPCs 的数量。此模型中需要注意两点:一是 OPCs 悬液中的 OPCs 尽量不要聚集成球,最好都是单细胞悬液,所以二次贴壁的时间不宜过长(<20 min),种植前也可以轻轻吹打数次;二是种植密度应该一致且大概保持在 5 000/孔,太多则

不宜统计,太少则迁移数目过少,导致变异很大。在聚球实验中,PDGF-A可以明显促进OPCs的迁移速率和数目。此实验较为困难,二次贴壁时间可以适当延长至1~2h,让其充分聚集成球。而每组种植数目可以尽量多些,进而从中选取大小相对一致并呈球形的样本分析。除了PDGF-A之外,谷氨酸和ATP等多种神经递质和众多黏附分子都可影响OPCs的迁移^[10]。

OPCs分化为成熟的寡突胶质细胞是髓鞘形成的关键。一般认为,髓鞘再生失败主要是因为OPCs的分化受阻。体外培养的OPCs在撤去增殖培养液B104的条件下可以自发向寡突胶质细胞分化,但其分化能力局限,仅有一小部分可分化为MBP阳性的寡突胶质细胞。在加入T3和T4的情况下,OPCs分化能力明显被诱导增强,约有80%的细胞都可以被MBP标记,而且MBP蛋白表达水平也明显增加。实验结果表明,寡突胶质前体细胞在体外培养条件下仍保持着进一步分化为成熟寡突胶质细胞的潜能。NT-3、Neuregulins、LIF和ATP等都可以促进OPCs分化成髓鞘,而PDGF、Lingo、BMP和NGF可以抑制OPCs的分化。作为阳性对照,甾体激素T3和T4可以促进OPCs分化^[8]。

综上所述,本研究表明,采用振荡分离能够有效获得寡突胶质前体细胞。实验结果表明在体外条件下,B104条件培养液可以维系OPCs的前体状态,维持其增殖和迁移能力;在分化培养条件下,OPCs可以分化为成熟的寡突胶质细胞,为系统研究寡突胶质前体细胞的特性奠定了基础。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

(志谢 本研究得到第二军医大学长征医院神经科学中心及基础部神经生物学教研室肖林、胡春、李翠、郭卫等的大力支持和帮助,在此一并表示感谢!)

[参考文献]

- [1] Richardson W D, Kessaris N, Pringle N. Oligodendrocyte wars [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2006, 7: 11-18.
- [2] Miller R H, Mi S. Dissecting demyelination [J]. *Nat Neurosci*, 2007, 10: 1351-1354.
- [3] McCarthy K D, de Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue [J]. *J Cell Biol*, 1980, 85: 890-902.
- [4] Gudz T I, Komuro H, Macklin W B. Glutamate stimulates oligodendrocyte progenitor migration mediated *via* an alpha integrin/myelin proteolipid protein complex [J]. *J Neurosci*, 2006, 26: 2458-2466.
- [5] Miyamoto Y, Yamauchi J, Tanoue A. Cdk5 phosphorylation of WAVE2 regulates oligodendrocyte precursor cell migration through nonreceptor tyrosine kinase Fyn [J]. *J Neurosci*, 2008, 28: 8326-8337.
- [6] Kuhlmann T, Miron V, Cui Q, Wegner C, Antel J, Brück W. Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis [J]. *Brain*, 2008, 131(Pt 7): 1749-1758.
- [7] Chen Y, Balasubramaniyan V, Peng J, Hurlock E C, Tallquist M, Li J, et al. Isolation and culture of rat and mouse oligodendrocyte precursor cells [J]. *Nat Protoc*, 2007, 2: 1044-1051.
- [8] McTigue D M, Tripathi R B. The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS [J]. *J Neurochem*, 2008, 107: 1-19.
- [9] Nave K A, Trapp B D. Axon-glia signaling and the glial support of axon function [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2008, 31: 535-561.
- [10] Jarjour A A, Kennedy T E. Oligodendrocyte precursors on the move: mechanisms directing migration [J]. *Neuroscientist*, 2004, 10: 99-105.

[本文编辑] 贾泽军