

• 基础研究 •

绿色荧光蛋白标记的大鼠神经干细胞移植于
损伤脊髓后的迁移和存活高川川^{1,2}, 夏雷², 郝淑煜², 历俊华², 万虹²

[摘要] 目的 观察神经干细胞在体内的迁移和存活。方法 体外培养胎鼠脊髓神经干细胞,用表达绿色荧光蛋白(GFP)的慢病毒载体进行转染,以乙交酯-丙交酯共聚物(PLGA)为支架移植入大鼠 T₉ 半横断脊髓损伤处。移植后 1 个月在荧光显微镜下观察神经干细胞在脊髓内的迁移,并计算其存活率。结果 神经干细胞表达强烈的绿色荧光。细胞移植后 1 个月,在损伤脊髓的头端和尾端都可见 GFP 阳性细胞,计算出的存活率为(1.4911 ± 0.0313) %。结论 GFP 标记的神经干细胞移植入大鼠损伤脊髓后向脊髓组织内迁移并有少数存活。

[关键词] 绿色荧光蛋白;慢病毒载体;神经干细胞

Migration and Survival of Rat Neural Stem Cells Marked by Green Fluorescent Protein after Transplanted to Injured Spinal Cord GAO Chuan-chuan, XIA Lei, HAO Shu-yu, et al. Postgraduate School of Capital Medical University, Beijing 100054, China

Abstract: **Objective** To investigate the migration and survival of neural stem cells (NSCs) in vivo. **Methods** NSCs cultured in vitro were transfected by lentiviral vectors expressing green fluorescent protein (GFP) to construct GFP-NSCs, then trans-seeded into lactide-co-glycolide (PLGA) scaffold and implanted into the injured site of T₉ spinal cord in rat. One month after transplantation, the migration of NSCs in spinal cord was examined by fluorescence microscope, and the survival rate of NSCs was counted out. **Results** NSCs labeled GFP had strong expression of green fluorescence. One month after transplanting, part of NSCs expressing GFP could be seen in PLGA scaffolds and rostral, caudal spinal core. The survival rate counted out was 1.4911 ± 0.0313 %. **Conclusion** NSCs marked by GFP and transplanted to rat injured spinal cord could migrate into the spinal cord tissues and the minority of them could survive.

Key words: green fluorescent protein; lentiviral vectors; neural stem cells

[中图分类号] R683.2 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2008)04-0341-02

[本文著录格式] 高川川,夏雷,郝淑煜,等. 绿色荧光蛋白标记的大鼠神经干细胞移植于损伤脊髓后的迁移和存活[J]. 中国康复理论与实践,2008,14(4):341—342.

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)广泛分布于哺乳动物的中枢神经系统,能够自我复制,并具有多分化潜能^[1]。NSCs 的发现为运用细胞替代疗法治疗神经系统损伤及疾病展示了良好的前景。随着研究的深入,了解移植后 NSCs 的迁移、分化等移植后生物特性尤为重要。本实验将绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)标记的 NSCs 移植到大鼠 T₉ 半横断脊髓损伤处,探讨 NSCs 在宿主体内的迁移及存活情况。

1 材料与方法

1.1 试剂及动物 构建慢病毒载体(lentiviral vectors, LV)所需质粒及 293 T 细胞由法国巴斯德研究所逆转录病毒及基因治疗实验室 Heard 博士惠赠。DMEM/F12 培养基、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)购自美国 Sigma 公司。B27 购自 Gibco 公司。乙交酯-丙交酯共聚物(poly

lactide-co-glycolide, PLGA)由中国科学院化学研究所王身国教授提供。孕 14~16 d 和成年 Wistar 雌性大鼠均购自中国医学科学院实验动物研究所。荧光显微镜为日本 Nikon 公司产品。

1.2 大鼠脊髓 NSCs 体外培养及纯化 取孕 14~16 d Wistar 大鼠,无菌条件下取胎鼠脊髓,解剖显微镜下剔除表面软膜和血管,剪碎,200 目铜网过滤,离心,加干细胞培养液 DMEM/F12(1:1) 1 × B27 12.5 ng/mL bFGF 及 20 ng/mL EGF, 37℃, 5% CO₂ 培养。2~3 d 半量换液。

1.3 含 GFP 的 LV 构建及转染大鼠 NSCs 见参考文献^[2]。

1.4 PLGA-GFP-NSCs 复合体构建 将 GFP-NSCs 球吹打成单细胞和微球,计数。将 PLGA 制成约 3 × 1.5 × 1.2 mm 大小,环氧乙烷灭菌后备用。吸取 1 × 10⁶ 个 GFP-NSCs(10 μl)接种于 PLGA 支架内,置于 DMEM/F12 培养液中,培养 2 h 后移植。

1.5 脊髓半横断损伤模型制作及 PLGA-GFP-NSCs 复合体移植 脊髓半横断损伤模型的制作见参考文献^[3]。10 只 Wistar 大鼠在 T₉ 段制成脊髓半横断损伤模型,于脊髓缺损处轻柔植入 PLGA-GFP-NSCs 复合体,10-0 纤维线缝合硬膜,固定植入的 PLGA 支架,逐

基金项目:国家自然科学基金国际合作研究项目(No. 30540450581)

作者单位:1. 首都医科大学 2005 级研究生,北京市 100054;2. 首都医科大学北京市神经外科研究所,北京市 100050。作者简介:高川川(1982-),女,福建福安市人,硕士研究生,主要研究方向:中枢神经系统损伤及修复机理。通讯作者:万虹。

层缝合切口,术后每日腹部按摩人工排尿,进行截瘫护理。

1.6 荧光显微镜观察 NSCs 的迁移及计算存活率 移植后 1 个月,用 10% 水合氯醛腹腔麻醉大鼠,4% 多聚甲醛心脏灌注固定,脊髓原切口切开,取出含有移植物上下各 1 cm 长度的脊髓组织。冰冻切片连续冠状切片 30 μ m/片,每隔 4 片取 1 张切片,荧光显微镜下观察 GFP 阳性细胞的分布,同时计算每张片子 GFP 阳性细胞的数量,将每张切片的计算结果相加后乘以 5 算出每只大鼠体内的标记细胞数,再除以原移植细胞数(1×10^6 个),即为每只大鼠 NSCs 存活率,将 10 只大鼠的 NSCs 存活率取平均值,结果采用($\bar{x} \pm s$)的方式表示。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 11.5 统计软件对所得数据进行统计学分析。

2 结果

2.1 表达 GFP 的大鼠 NSCs 荧光显微镜下,NSCs 球及散在的 NSCs 呈强烈的绿色荧光,各个部位深浅不一(见插页 1 图 4.1)。

2.2 NSCs 的迁移 移植后 1 个月,在脊髓损伤的头端(见插页 1 图 4.2a)和尾端(见插页 1 图 4.2b)可见发绿色荧光的 NSCs。

2.3 NSCs 的存活率 移植后 1 个月,支架及脊髓组织内表达 GFP 的 NSCs 占原始注入 NSCs 细胞的百分比为(1.4911 ± 0.0313)%,大部分细胞死亡,呈黄绿色碎片。

3 讨论

细胞移植首先遇到的问题是标记待移植的细胞,进而观察其在体内存活、生长及分化的过程。目前最常用于细胞标记的是 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromodeoxyuridine, BrdU)和 GFP。BrdU 是一种胸腺嘧啶核苷的类似物,当细胞处于 DNA 合成期时, BrdU 会专一替代胸腺嘧啶掺入新合成的 DNA 中,只要细胞不消亡,这种 BrdU 就在胞核的 DNA 中长期存留^[4]。BrdU 抗体不与胸腺嘧啶发生交叉反应,故可用免疫组织化学方法观察 BrdU 掺入情况。但是由于 BrdU 掺入情况不能被直接观察,所以需要通过免疫组织化学的方法来反映,因此容易受免疫组化操作影响,而且其仅能掺入新合成的 DNA 中,定位在细胞核中,位置比较局限,不能显示出细胞的整体形态和应用于细胞活体研究。而且在细胞长期移植入组织之后,细胞可被巨噬细胞吞噬,吞噬后的巨噬细胞也将呈现 BrdU 阳性,因此假阳性率较高。GFP 是一种独特的蛋白,在蓝色光激发下发出绿色荧光,且所表达的绿色荧光蛋白发光强度高,时间长不易褪色,可以广泛应用于基因表达、转基因动物和蛋白质定位等研究中^[5]。

GFP 能够扩散至整个细胞,显示出细胞的完整形态,且不影响活细胞正常功能,可以直接在活细胞状态下进行分析,能够方便地进行细胞水平上的各种科学研究。GFP 可以对活细胞中的蛋白质进行准确定位及动态观察,实时原位跟踪细胞生长、分裂、分化过程,避免了其他方法带来的非特异性染色、荧光时间短以及其他细胞吞噬染料等缺陷。检测 GFP 不需要抗体、酶底物等其他成分,一般转染 24 h 后就能在荧光显微镜下直接观察到绿色荧光,可进行活细胞的实时定位监测,直观易用,具有较高的灵敏度和准确性。GFP 是目前具有很好应用前景的标记基因。

以往我们都是用 BrdU 标记移植的细胞^[6],但假阳性率高,尤其是被吞噬细胞吞噬后更无法判断移植细胞的迁移和存活,为此我们改进了实验技术,通过表达 GFP 的 LV 标记移植细胞,荧光显微镜下很易辨认 GFP 标记细胞的存活和迁移(死亡的细胞为黄绿色碎片),使观察结果更直观、更客观。

本实验结果显示,NSCs 移植到大鼠脊髓后,不只局限在移植位点,可远离移植位点向周围迁移。随着移植后时间的延长,有更多的细胞迁移到脊髓周围,迁移的 NSCs 基本分布在脊髓白质中。在细胞迁移过程中, GFP 标记细胞在脊髓内的分布不均匀,可能与其迁移的方向性有关。

NSCs 体内移植后是否存活,是研究者首先关注的热点。本实验结果显示,脊髓损伤后急性移植,1 个月后只有约 1.5% 的细胞存活,大部分细胞死亡,表明 NSCs 非常脆弱,也提示脊髓损伤后的急性期不利于细胞移植。

虽然距 NSCs 的临床应用还有相当长的时间,但是随着科学研究及研究技术的不断发展,相信将来会有一个满意的结果。

[参考文献]

- [1] Gage FH. Mammalian neural stem cells[J]. Science, 2000, 287:1433—1441.
- [2] 万虹,刘松,陈刚,等. HIV-1 来源的慢病毒载体转染大鼠脊髓神经干细胞[J]. 中华神经外科杂志, 2006, 22(12):753—755.
- [3] 陈刚,万虹,杨飞,等. 乙交酯-丙交酯共聚物与大鼠脊髓组织的生物相容性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(1):176—177.
- [4] Nakamura S, Takeda Y, Kanno M, et al. Application of bromodeoxyuridine (BrdU) and anti-BrdU monoclonal antibody for the in vivo analysis of proliferative characteristics of human leukemia cells in bone marrow[J]. Oncology, 1991, 48(4):285—289.
- [5] Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration[J]. Cell, 2003, 114(6):763—776.
- [6] 万虹,李德志,杨飞,等. 施万细胞长期植入中枢神经系统后存活及迁移的实验研究[J]. 中国康复理论与实践, 2006, 12(8):645—646.

(收稿日期:2008-01-22)

图3.4 TSG 50.0 $\mu\text{mol/L}$ 组

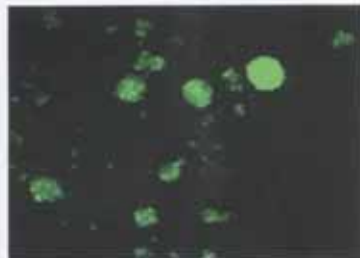


图4.1 表达GFP的大鼠NSCs (100 \times)。NSCs球及散在的NSCs呈强烈的绿色荧光，各个部位深浅不一

图3.5 TSG 100.0 $\mu\text{mol/L}$ 组

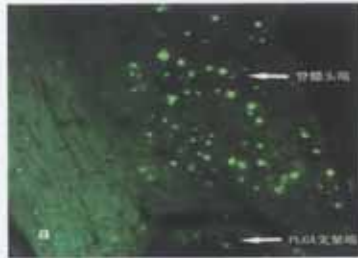
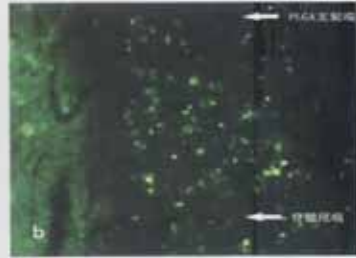


图4.2 NSCs向损伤脊髓内迁移 (100 \times)。
a. 示向损伤脊髓头端迁移。

图3.6 TSG 200.0 $\mu\text{mol/L}$ 组



b. 示向损伤脊髓尾端迁移