

# 从多潜能干细胞诱导成神经前体细胞及其分化探讨

武赞<sup>1,2</sup> 周舒雅<sup>3</sup> 徐群渊<sup>2\*</sup>

(1. 山西中医学院基础医学院解剖学教研室, 山西 晋中 030619; 2. 首都医科大学神经生物学系, 北京 100069; 3. 中国科学院动物研究所, 北京 100101)

**[摘要]** 目的 探讨诱导多潜能干细胞在体外分化为神经前体细胞。方法 采用 N2B27 作为选择培养基, 多步法贴壁培养把诱导多潜能干细胞诱导为神经前体细胞。结果 免疫荧光染色发现, 该细胞神经干细胞的标记物巢蛋白阳性, 有极个别的  $\beta$ -微管蛋白 III ( $\beta$ -Tub-III) 阳性细胞。在分化培养基内培养 7d 后,  $\beta$ -Tub-III 阳性细胞增多。结论 本实验初步表明, 诱导多潜能干细胞在体外可以被诱导为有一定神经特征的神经前体细胞, 该细胞有望用于细胞移植治疗缺血性脑损伤。

**[关键词]** 诱导多潜能干细胞; 神经前体细胞; 分化; 细胞培养; 免疫荧光; 小鼠

**[中图分类号]** Q189 **[文献标志码]** A **[DOI]** 10.16098/j.issn.0529-4356.2016.01.004

## Induction and differentiation of neural precursor cells from induced pluripotent stem cells

WU Yun<sup>1,2</sup>, ZHOU Shu-ya<sup>3</sup>, XU Qun-yuan<sup>2\*</sup>

(1. Department of Anatomy, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Shanxi Jinzhong 030619, China;  
2. Department of Neurobiology, Capital Medical University, Beijing 100069, China;  
3. Institute of Zoology, Chinese Academy of Science, Beijing 100101, China)

**[Abstract]** **Objective** Induced pluripotent stem cells (iPSCs) differentiate into neural precursor cells (NPCs) *in vitro*. **Methods** The N2B27 was used as medium in a multistep adherent culture to induce the iPSCs into the NPCs. **Results** Immunofluorescence staining showed that the Nestin, the neural stem cell marker, was positive in the NPCs. There were a few  $\beta$ -tubulin III ( $\beta$ -Tub-III) positive NPCs. After 7 days culture in the differentiation culture medium,  $\beta$ -Tub-III positive NPCs increased. **Conclusion** This study confirms that the iPSCs can be induced into the NPCs *in vitro*, which may be used in the treatment of ischemic brain injury.

**[Key words]** Induced pluripotent stem cell; Neural precursor cell; Differentiation; Cell culture; Immunofluorescence; Mouse

诱导多潜能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)是通过在分化的体细胞中表达特定转录因子,以诱导体细胞重编程而获得的可不断更新且具有多向分化潜能的细胞。iPSCs在功能上类似于胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs),增殖分化能力强,既能避免免疫排斥,又不涉及伦理道德问题,而且取材方便,具有重要潜在临床应用价值<sup>[1]</sup>。因此,自开始培养出 iPSCs<sup>[2,3]</sup>以来,全世界众多实验室都对 iPSCs 进行了研究并取得了很大进展。

但将 iPSCs 用于脑内移植治疗卒中动物模型后发现, iPSCs 极易形成肿瘤,也难以确定有无成熟神经元形成<sup>[4-6]</sup>,对模型动物行为学改善也报道不一<sup>[4-6]</sup>;即使将 iPSCs 植入正常小鼠脑内也一样具有成瘤性<sup>[7]</sup>。

由于 iPSCs 在形态及生物学功能上类似 ESCs 而会在移植后形成畸胎瘤<sup>[8]</sup>,故许多人认为如果移植前将 ESCs 在体外预先分化就可以减少肿瘤形成的危险性<sup>[9]</sup>。这可以先将 ESCs 诱导成神经前体细胞(neural precursor cells, NPCs),再把 ESCs 来源的

**[收稿日期]** 2015-07-29 **[修回日期]** 2015-10-13

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81070977, 81200931, 81271388)

**[作者简介]** 武赞(1981—),男(汉族),山西省侯马市人,博士,讲师。

\* 通讯作者(To whom correspondence should be addressed)

E-mail: xuqy@ccmu.edu.cn Tel: (010) 83911464

NPCs 植入脑内。研究发现,这种 NPCs 不但可以存活,而且能向神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞分化,甚至有的细胞具备成熟神经元的电学特性,重要的是没有出现肿瘤<sup>[10~12]</sup>。目前报道的将 ESCs 诱导成 NPCs 的方法有多种,但一般都难以重复。为此,本实验采用经拟胚体(embryoid bodies, EBs)以及 N2B27 为选择培养基,多步法贴壁培养诱导 NPCs,为国内从事本领域研究的同道提供借鉴,也为下一步细胞移植治疗缺血性脑损伤做准备。

## 材料和方法

### 1. 小鼠 iPSCs 的培养

本实验 iPSCs 由中国科学院动物研究所提供,培养方法参照文献[13]。

### 2. iPSCs 向 NPCs 的诱导

吸去 ESCs 培养液, PBS 洗 3 次后用 0.05% 的胰蛋白酶消化 2min, ESCs 培养液中中和,玻璃吸管吹打, 1000r/min 离心 5min, 去上清。添加新鲜的 ESCs 培养液,玻璃吸管吹打成单细胞悬液,接种到 0.1% 明胶包被的瓶内, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵育 30~60min, 去除胎鼠成纤维细胞(mouse embryo fibroblast, MEF)。吸取细胞悬液, 1000r/min 离心 5min, 吸去上清, 添加 N2B27 培养基重悬细胞,接种在无任何包被的瓶内,入 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养,次日观察 EBs 的形成。EBs 培养 4~7d, 每天换液。离心收集 EBs, 用 N2B27 培养基将其重悬,接种在 0.5% 明胶包被的塑料培养瓶内贴壁培养,隔天换液。10d 后 EBs 爬出神经干细胞样细胞, 0.05% 胰蛋白酶消化,接种在 0.1% 明胶包被的 6 孔板上,用 NPCs 培养基培养,每天换液 2~3d 传代。

N2B27 培养基 200ml 包括 DMEM/F12 99ml, N-2Supplement 1ml, 2% 牛血清清蛋白(BSA) 250μl, Neurobasal 98ml, B-27Supplement 2ml, 10g/L 胰岛素 200μl, 200mmol/L 谷氨酰胺 2ml, 10mmol/L β-巯基乙醇 2ml, 10<sup>5</sup> IU/L 青霉素 200μl。

### 3. NPCs 的培养

待细胞长满接近 95% 左右汇合时,吸去培养液, 0.05% 胰蛋白酶消化 2min, 立即用 MEF 培养基终止消化,吹打,离心。去上清,用 NPCs 培养基重悬细胞,接种在 0.1% 的明胶预先包被(37℃, 30min)的孔板(或培养瓶)内, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养。或去上清后,加适量的 NPCs 冻存液,放入梯度冻存盒 -80℃ 过夜,次日入液氮。

NPCs 培养基 200ml 是在 200ml N2B27 培养基的基础上添加 0.1g/L 的碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF) 40μl 和 0.1g/L 表皮生长因子(EGF) 40μl。

### 4. NPCs 的分化

将 NPCs 在原有 NPCs 培养基的基础上去掉 Neurobasal、B-27Supplement, 进行培养传代, 7d 后光学显微镜下观察细胞形态的改变,进行免疫荧光染色。

### 5. NPCs 的鉴定

采用免疫荧光染色进行鉴定。将 NPCs 与在分化培养基内培养的 NPCs 分别传代到 0.01% 多聚赖氨酸包被的放有小圆片的 24 孔板内,过夜,细胞贴壁。次日,弃去培养基, PBS 快速洗 1 次。4% 的多聚甲醛固定 30min, PBS 洗 3 次,每次 5min。0.3% PBST 打孔,室温孵育 30min。10% 正常山羊血清封闭 1h(用 0.3% PBST 稀释)。一抗小鼠抗巢蛋白(Nestin, 1:1000, Abcam 公司)抗体、兔抗 β-微管蛋白 III(β-tubulin III, β-Tub-III, 1:800, Sigma 公司)抗体孵育, 4℃ 冰箱过夜(用封闭液稀释一抗), PBS 洗 3 次,每次 5min。二抗(Alexa Fluor 594 山羊抗小鼠 IgG, Alexa Fluor 488 山羊抗兔 IgG, 用封闭液 1:500 稀释, Invitrogen 公司)室温避光孵育 1h, PBS 洗 3 次,每次 5min。Horchest33258(1:3000 PBS 稀释, Sigma 公司)复染细胞核 10min, PBS 洗 3 次,每次 5min。70% 的甘油封片,荧光显微镜下观察。对照组用 PBS 代替一抗。

## 结 果

### 1. iPSCs 的培养

iPSCs 在饲养层细胞上克隆性成团生长。每个 iPSCs 克隆大小基本一致,呈近似圆形、椭圆形或梨形均匀分布在交错呈网的 MEF 上,整个克隆形态饱满,透光性好(图 1)。

### 2. NPCs 的诱导

使用经 EBs 多步法将 iPSCs 诱导成 NPCs(中国科学院动物研究所)。图 2 是连续培养传代中的 NPCs,细胞以椭圆形为主,胞核大,胞体较圆,突起不发达,免疫荧光染色 Nestin 阳性(图 4~6),其中有极个别的 β-Tub-III 阳性细胞(图 7~9)。

### 3. NPCs 的分化

在分化培养基内培养 7d 的 NPCs 与在 NPCs 培养基内培养的细胞相比,细胞呈长梭形,多角形,细胞突起细长发达(图 3),免疫荧光染色 β-Tub-III 阳性细胞数增多,每个高倍视野 3~5 个(图 10~12)。

## 讨 论

### 1. 神经干细胞的判定

神经干细胞能够自我更新,分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞<sup>[14]</sup>。本实验发现,利用经 EBs, N2B27 作为选择培养基,多步法贴壁培养诱导

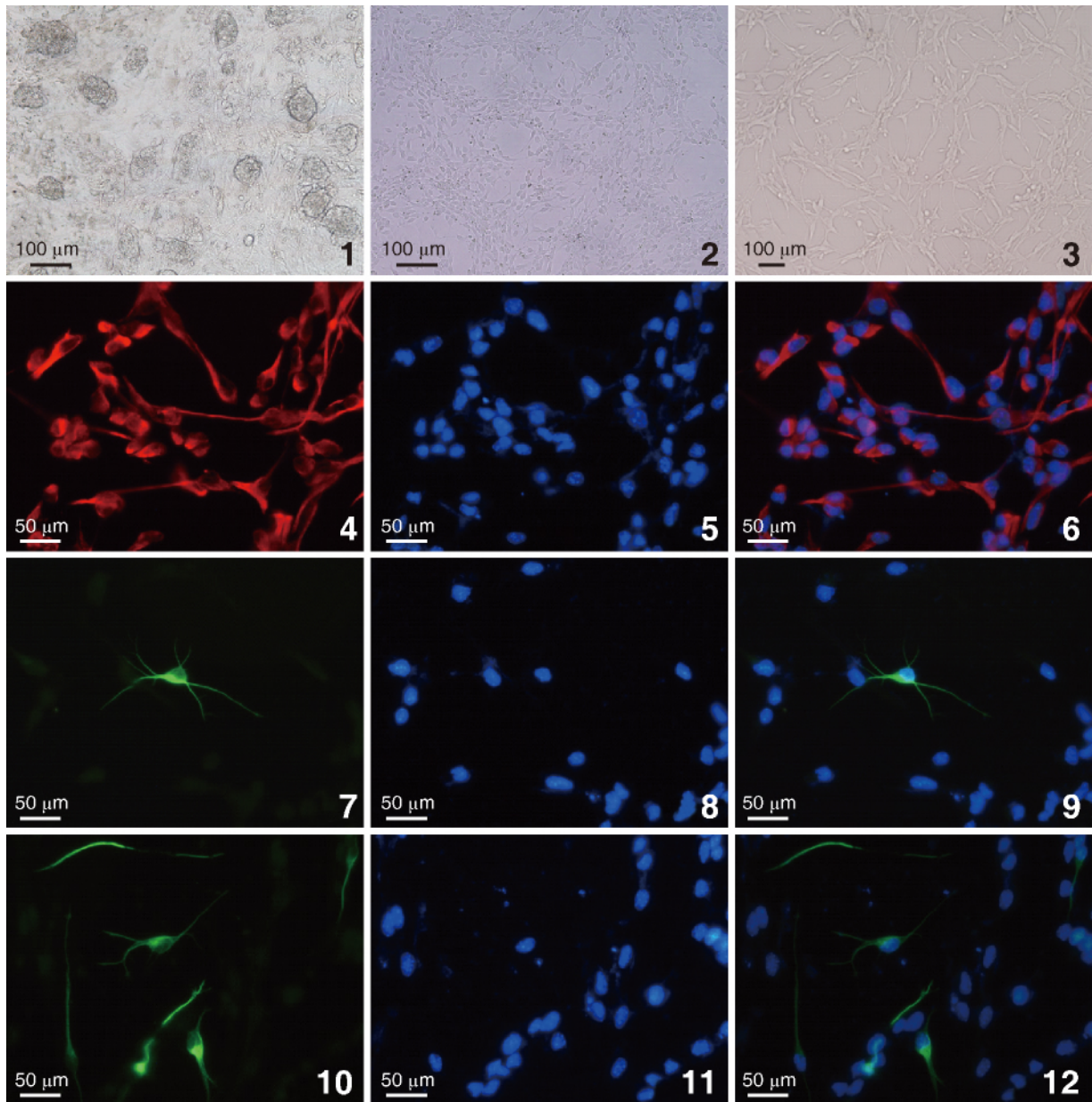


图1 体外培养的 iPSCs 标尺示 100μm  
 图2 体外培养 iPSCs 源的 NPCs 标尺示 100μm  
 图3 分化培养基内的 iPSCs 源 NPCs 标尺示 100μm  
 图4 iPSCs 源 NPCs 免疫荧光染色 红色显示巢蛋白 标尺示 50μm( 下同)  
 图5 iPSCs 源 NPCs 免疫荧光染色 蓝色显示细胞核  
 图6 图4 和图5 的叠加  
 图7 iPSCs 源 NPCs 免疫荧光染色 绿色显示 β-Tub-III  
 图8 iPSCs 源 NPCs 免疫荧光染色 蓝色显示细胞核  
 图9 图7 和图8 的叠加  
 图10 分化培养基内培养 7d 的 iPSCs 源 NPCs 免疫荧光染色 绿色显示 β-Tub-III  
 图11 分化培养基内培养 7d 的 iPSCs 源 NPCs 免疫荧光染色 蓝色显示细胞核  
 图12 图10 和图11 的叠加

Fig.1 iPSCs *in vitro* Bar = 100μm  
 Fig.2 NPCs derived from the iPSCs *in vitro* Bar = 100μm  
 Fig.3 NPCs derived from the iPSCs were cultured *in vitro* in the differentiation medium Bar = 100μm  
 Fig.4 NPCs derived from the iPSCs were dyed red to show Nestin Immunofluorescence staining , Bar = 50μm( The same below)  
 Fig.5 The nuclei of NPCs derived from the iPSCs Hoechst 33258 staining  
 Fig.6 The merged images of Fig. 4 and Fig. 5  
 Fig.7 NPCs derived from the iPSCs were dyed green to show β-Tub-III Immunofluorescence staining

Fig. 8 The nuclei of NPCs derived from the iPSCs were stained blue. Hoechst 33258 staining.

Fig. 9 The merged images of Fig. 7 and Fig. 8.

Fig. 10 NPCs derived from the iPSCs were cultured *in vitro* in the differentiation medium for 7 days; The  $\beta$ -Tub-III was stained green. Immunofluorescence staining.

Fig. 11 NPCs derived from the iPSCs were cultured *in vitro* in the differentiation medium for 7 days; The nuclei were stained blue. Hoechst 33258 staining.

Fig. 12 The merged images of Fig. 10 and Fig. 11.

的 NPCs 在体外可以不断地增殖传代,神经干细胞的标记 Nestin 阳性,极个别的细胞表达早期分化神经细胞的标记  $\beta$ -Tub-III。经适当处理后, $\beta$ -Tub-III 阳性细胞增多。由于 NPCs 培养基成分复杂,Neurobasal、B-27 Supplement 内的成分同样复杂,所以很难解释去除 Neurobasal、B-27 Supplement 后  $\beta$ -Tub-III 阳性细胞增多的原因。目前的实验数据,该方法诱导的 NPCs 有神经前体细胞的特征,但还达不到 NSCs 的标准。

## 2. 神经前体细胞的分化

关于 NPCs 的分化,根据文献 [15, 16],当去掉生长因子后 NPCs 向神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞分化。但我们先后在原有 NPCs 培养基的基础上分别去除 bFGF、EGF 或同时去除 bFGF、EGF,或在去除 bFGF、EGF 的基础上添加血清等,于培养 3~5d 后均出现 NPCs 死亡的现象。有研究表明,只用 bFGF 诱导随着传代次数的增加,细胞向胶质细胞分化<sup>[17]</sup>;而 EGF 在 NPCs 诱导过程中至少发挥两个作用:首先,与单独使用 bFGF 相比,EGF 有赋予细胞形成神经的能力,不会使细胞随着传代次数的增加向胶质分化;其次,EGF 通过抑制凋亡维持细胞的自我更新,故本实验联合使用 bFGF 与 EGF。有实验表明,在 EGF 缺失的情况下层黏连蛋白(laminin, LN)可以维持细胞存活;但去除 EGF 后,在 LN 上单独使用 bFGF 不能维持细胞增殖,这可以部分解释本实验去除 EGF 后,单独使用 bFGF 细胞死亡的原因。Okabe 等<sup>[15]</sup>在诱导 ESCs 分化为 NPCs 的研究中使用 mN3FL 培养基对 NPCs 进行扩增,由于 LN 比纤维连接蛋白(fibronectin, FN)对细胞的增殖有更高的刺激,所以 mN3FL 培养基内添加了 LN 和 bFGF,去掉 bFGF 后 NPCs 向神经元和胶质细胞分化。而本实验在去掉 bFGF 后,细胞的死亡可能与缺少 LN 有关,这也提示单独 EGF 可能不足以维持细胞存活。如果单独 1 种因子不足以维持细胞存活,当两种因子去除后没有任何因子,细胞难以存活就更可以理解了。虽然更换分化培养基后  $\beta$ -Tub-III 阳性细胞增多,但就目前的资料,尚无法解释本方法诱导的 NPCs 没有分化的原因。

## 3. 拟胚体的培养

EBs 是 ESCs 在体外悬浮培养,生长增殖聚集,

形成的具有三维特征的球状体(或称之为多细胞聚集物),由于这种球状体与其被植入体内后所形成的胚胎组织十分相似,故将其称之为拟胚体或类胚体。在这些聚集物内,不同种类细胞之间的复杂相互作用,可以诱导干细胞向 3 个胚层分化。拟胚体通常由具有 3 个胚层特性的衍生物所组成,可以认为是大多数成熟体细胞系的前体细胞。EBs 的重新接种将导致进一步的分化和生长。

与 ESCs 相类似,体外 iPSCs 未分化状态的维持,依靠细胞因子,比如白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF),与 gp130 受体结合产生的作用。一旦这种自我更新的刺激去除后, iPSCs 很快失去未分化的表型开始分化。EBs 的形成就是抑制因子去除后 iPSCs 分化的结果。

最早通过 EBs 诱导 NPCs 的实验是在不同的时间窗用维甲酸(retinoic acid, RA)处理 EBs,然后接种到不同介质的表面,接种后细胞出现神经元的形态,表达神经元特异的基因。诱导 EBs 形成的培养基是 DMEM(高糖,含有谷氨酰胺,没有丙酮酸)添加 10% 的胎牛血清(FBS)和 10% 的新生牛血清,但是没有 LIF,没有  $\beta$ -巯基乙醇<sup>[18]</sup>。

Wernig 等<sup>[16]</sup>诱导 iPSCs 形成 EBs,使用的培养基是 DMEM 含有 10% 的 FBS、谷氨酰胺、非必需氨基酸、Hepes、 $\beta$ -巯基乙醇、青链霉素。我们使用的是 N2B27 培养基。该培养基的成分很复杂,但共同点是都不含有 LIF,这是保证 iPSCs 分化为 EBs 的先决条件。我们的培养基内不含有血清,可见血清不是 EBs 形成的必要条件。由此可见 EBs 的形成对培养基成分的要求不严格,在上述的各种培养基内,都能形成 EBs。如果 N2B27 培养基不是后续实验的先决条件的话,我们可以考虑换一种简单廉价的培养基进行诱导。

## 4. NPCs 诱导培养基的选择

本实验诱导 EBs 成为 NPCs 使用的是无血清选择培养基 N2B27 培养基,Okabe 等<sup>[15]</sup>相同的实验使用的是 ITSFn 培养基,其成分是在 DMEM/F12 (1:1)的基础上补充了胰岛素(5mg/L)、转铁蛋白(50mg/L)、硒酸钠(30 nmol/L)和 FN(5mg/L)。Oki 等<sup>[19]</sup>使用的是 DMEM/F12, 2mmol/L L-谷氨酸, 1.6g/L 葡萄糖,和 N2supplement。N2supplement 的成分有

转铁蛋白 (10g/L)、胰岛素 (500mg/L)、孕酮 (0.63mg/L)、腐胺 (1.611g/L)、亚硒酸盐 (0.52mg/L)。由此可见,虽然各个实验室所用的方法不同,但转铁蛋白、胰岛素、硒酸钠是它们共有的成分。转铁蛋白对细胞存活有普遍效应,胰岛素对 Nestin 阳性的细胞存活更特异<sup>[15]</sup>。如果最终目的一致,第3种方案相对更简单。

本实验仅对 iPSCs 向 NPCs 的分化进行了初步地探讨,使用经 EBs,以 N2B27 作为选择培养基,多步法贴壁培养可将 iPSCs 诱导为有一定神经特征的前体细胞。

### 参 考 文 献

- [1] Chen LY, Liu L. Current progress and prospects of induced pluripotent stem cells [J]. *Sci China Ser C-Life Sci*, 2009, 52 (7): 622-636.
- [2] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663-676.
- [3] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors [J]. *Cell*, 2007, 131(5): 861-872.
- [4] Kawai H, Yamashita T, Ohta Y, et al. Tridermal tumorigenesis of induced pluripotent stem cells transplanted in ischemic brain [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2010, 30(8): 1487-1493.
- [5] Chen SJ, Chang CM, Tsai SK, et al. Functional improvement of focal cerebral ischemia injury by subdural transplantation of induced pluripotent stem cells with fibrin glue [J]. *Stem Cells Dev*, 2010, 19(11): 1757-1767.
- [6] Jiang M, Lü L, Ji H, et al. Induction of pluripotent stem cells transplantation therapy for ischemic stroke [J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 354(1-2): 67-75.
- [7] Wu Y, Wu J, Ju R, et al. Comparison of intracerebral transplantation effects of different stem cells on rodent stroke models [J]. *Cell Biochem Funct* 2015, 33(4): 174-182.
- [8] Erdö F, Bührle C, Blunk J, et al. Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003, 23(7): 780-785.
- [9] Moon SY, Park YB, Kim DS, et al. Generation, culture, and differentiation of human embryonic stem cells for therapeutic applications [J]. *Mol Ther*, 2006, 13(1): 5-14.
- [10] Takagi Y, Nishimura M, Morizane A, et al. Survival and differentiation of neural progenitor cells derived from embryonic stem cells and transplanted into ischemic brain [J]. *J Neurosurg*, 2005, 103(2): 304-310.
- [11] Kang HC, Kim DS, Kim JY, et al. Behavioral improvement after transplantation of neural precursors derived from embryonic stem cells into the globally ischemic brain of adolescent rats [J]. *Brain Dev*, 2010, 32(8): 658-668.
- [12] Buhnemann C, Scholz A, Bernreuther C, et al. Neuronal differentiation of transplanted embryonic stem cell-derived precursors in stroke lesions of adult rats [J]. *Brain*, 2006, 129 (Pt12): 3238-3248.
- [13] Zhao XY, Lü Z, Li W, et al. Production of mice using iPS cells and tetraploid complementation [J]. *Nat Protoc*, 2010, 5(5): 963-971.
- [14] Gage FH. Mammalian neural stem cells [J]. *Science*, 2000, 287 (5457): 1433-1438.
- [15] Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, et al. Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro [J]. *Mech Dev*, 1996, 59(1): 89-102.
- [16] Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, et al. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(15): 5856-5861.
- [17] Conti L, Pollard SM, Gorba T, et al. Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell [J]. *PLoS Biol*, 2005, 3(9): e283.
- [18] Bain G, Kitchens D, Yao M, et al. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro [J]. *Dev Biol*, 1995, 168(2): 342-357.
- [19] Oki K, Tatarishvili J, Wood J, et al. Human-induced pluripotent stem cells form functional neurons and improve recovery after grafting in stroke-damaged brain [J]. *Stem Cells*, 2012, 30(6): 1120-1133.

(编辑 张立克)