

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510023571.8

[51] Int. Cl.

C12N 5/06 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 10 月 24 日

[11] 授权公告号 CN 100344756C

[22] 申请日 2005.1.26

[21] 申请号 200510023571.8

[73] 专利权人 上海大学

地址 200072 上海市闸北区延长路 149 号

[72] 发明人 陈付学 任雯雯 杨 洋 过七根

宋红生 文铁桥

[56] 参考文献

CN1415751A 2003.5.7

一些神经营养因子对神经干细胞的增殖和分化的影响 谷平等,上海大学学报,第 7 卷第 2 期 2001

审查员 饶 刚

[74] 专利代理机构 上海上大专利事务所

代理人 王 正

权利要求书 1 页 说明书 5 页

[54] 发明名称

一种体外诱导神经干细胞定向分化为胆碱能神经元的方法

[57] 摘要

提供一种体外诱导神经干细胞定向分化为胆碱能神经元的方法,包括神经干细胞分离、培养和鉴定后,在含 1% B27 (v/v)、20ng/mL EGF 的 F12 - DMEM(1:1)培养基中加入 bFGF、肝素、层粘连蛋白后,于 37℃、50mL/L CO₂ 饱和湿度下诱导分化神经干细胞并体外培养 7 天,然后作胆碱能神经元的免疫鉴定。本发明的方法操作简单,重复性好,分化率达 30% 以上。是一种获得胆碱能神经元的新途径。

1. 体外诱导鼠神经干细胞定向分化为胆碱能神经元的方法，包括以下步骤：
 - (1) 鼠神经干细胞的诱导分化：在含体积比 1% B27、20 ng/mL EGF 的 1:1 的 F12-DMEM 培养基中加入 20ng/mL bFGF、5 μ g/mL 肝素、1 μ g/mL 层粘连蛋白后，于 37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO₂ 饱和湿度下将胎鼠神经干细胞诱导分化为胆碱能神经元；
 - (2) 胆碱能神经元的鉴定。
2. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述鼠神经干细胞的鉴定采用免疫荧光法。
3. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述鼠神经干细胞在诱导分化后再进行体外培养 7 天。
4. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述胆碱能神经元的鉴定采用免疫荧光法。

一种体外诱导神经干细胞定向分化为胆碱能神经元的方法

技术领域

本发明涉及生物工程和发育生物学，具体涉及神经干细胞的分化研究，更具体地涉及体外诱导神经干细胞定向分化为胆碱能神经元的方法。

背景技术

神经干细胞的发现是近年来神经科学领域研究的重大突破，已成为近期研究的热点，不仅因为其具有研究神经系统发育的重要性，更主要的是其潜在的治疗价值^[1]。Mckay^[2]等认为，神经干细胞指具有自我更新能力和分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞能力的细胞。自我更新和多分化能力是神经干细胞的2个基本属性。

神经干细胞的多分化潜能成为目前研究的热点之一。神经干细胞当移植到发育中枢神经系统或成年中枢神经系统的神经发生区域，就能分化成某些特别的神经元^[3]。但是当将神经干细胞移植到成年中枢神经系统非神经发生区域时，神经干细胞仍然保持未分化或大部分分化成神经胶质细胞。而神经元是一种非常重要的细胞，因此在移植前将神经干细胞在体外诱导分化成特定的神经元是非常必要的。

诱导神经干细胞分化的关键问题是如何才能将神经干细胞高效的诱导分化成产生专门递质的功能神经元或特定类型的神经胶质细胞，如：胆碱(Ach)能、多巴胺(DA)能、去甲肾上腺素(NE)能、 γ -氨基丁酸(GABA)能、甘氨酸(Glycine)能神经元，以及星形胶质细胞、少突胶质细胞等。但目前有关这方面研究的资料不多，仍然处在探索阶段。就科研工作者研究发现，神经干细胞的分化受外部环境和自身基因调控的影响。

影响神经干细胞增殖分化的因素是神经营养因子，它对中枢神经系统和周围神经系统的神经元均有一定的促进存活和刺激突起生长的作用。生长因子在神经干细胞和祖细胞的分化发育过程中的作用亦愈来愈受到重视，其中丝裂原样的生长因子信号在增殖过程中起着相当重要的作用。已用于维系干细胞特性的丝裂原信号主要包括表皮生长因子(EGF)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)^[6]。

神经干细胞的体外分离培养为研究神经系统的发育及神经系统疾病治疗提供了一条新的途径。目前，神经干细胞的来源较广，根据起源部位的不同，可以分为纹状体源、皮层源、脑干源、脊髓源以及骨髓源神经干细胞。但是起源不同的神经干细胞对不同的生长因子有不同的反应特性，根据一些前期研究发现，纹状体源的神经干细

胞既可以在 EGF 的刺激下分裂增殖，又可以在 bFGF 的刺激下分裂增殖；而脊髓源性的神经干细胞基本就丧失了对单独的 EGF 的反应，只对 bFGF 的刺激有反应，甚至只有在 EGF 和 bFGF 的协同作用下才能长出能够分裂传代的功能性神经干细胞团^[6]。研究证据表明神经营养因子对不同种类中枢神经元的存活、胞体发育和突起延伸具有促进作用。但神经元在发育分化增殖过程中存活的微环境及参与调控的因子十分复杂，绝非仅受一种神经营养因子的影响。迄今对神经营养因子之间的联合作用还不甚清楚。同一神经元上可以同时存在不同营养因子的受体，当不同神经营养因子共同作用于同一个神经元时，效果互补而增加营养效应。

由于胆碱能神经元是一种重要的神经元，能取代由于肌萎缩或脊髓损伤导致的运动神经元的损失，能改善人或动物的学习、记忆等能力，对老年痴呆、癫痫等也具有重要的调节作用。目前研究胆碱能神经元的分化主要是从基因调控方面来研究的，由于胆碱能神经元的分化可能受多个基因调控，故而用该方法来研究较为复杂。而且对这些神经元分化的研究，大多着重于胆碱乙酰转移酶（ChAT）的活力研究，而关于不同神经营养因子对神经元发育分化和突起发育生长的作用是否相同，以及神经营养因子间有否协同作用的研究较少。本发明者通过在培养基中添加几种神经营养因子，以不同的组合方式来改变外部培养条件，研究定向诱导分化胆碱能神经元的最佳组合，从而完成了本发明。

发明内容

本发明的目的是提供一种体外诱导神经干细胞定向分化为胆碱能神经元的方法。

本发明的方法包括以下步骤：

(1) 神经干细胞的分离、培养和鉴定；

(2) 神经干细胞的诱导分化：在含 1% B27(v/v)、20 ng/mL EGF 的 F12-DMEM(1:1) 培养基中加入 20 ng/mL bFGF、5 μg/mL 肝素、1 μg/mL 层粘连蛋白后，于 37 °C、50 mL/L CO₂ 饱和湿度下将神经干细胞诱导分化为胆碱能神经元；

(3) 胆碱能神经元的鉴定。

本发明方法中，神经干细胞较佳为从胎鼠纹状体分离得到。

所述神经干细胞的培养方法：将胎鼠纹状体在含有 1 % B27、20 ng/mL EGF、10 ng/mL bFGF 的 F12-DMEM(1:1) 培养基中，吹打制成细胞悬液，于 37 °C、50 mL/L CO₂ 饱和湿度下进行培养。

在将神经干细胞诱导分化为胆碱能神经元后，再进行体外培养7天。

所述神经干细胞和胆碱能神经元采用免疫荧光法进行鉴定。

本发明从胎鼠纹状体中分离培养了神经干细胞并确定了从骨髓中能分离培养出神经干细胞；同时，以胎鼠纹状体培养的神经干细胞为材料，从改变外部环境以及基因水平两个方面进行定向分化研究，提供了获得胆碱能神经元的一种新途径，为研究老年痴呆提供了一种重要的思路，为研究与神经干细胞分化相关基因功能并筛选与其定向分化相关基因提供了一种有力的工具，为探索其定向分化、调控机制提供了一定的线索，并为实现神经干细胞的移植和相关神经功能奠定了基础。

本发明的方法操作简单，重复性好，分化率达30%以上。

具体实施方式

1. 神经干细胞的分离培养

无菌条件下取出14天大鼠胚胎的纹状体，放入含有1% B27, 20 ng/mL EGF, 10 ng/mL bFGF的F12-DMEM(1:1)培养基中，吹打制成细胞悬液，于37℃, 50 mL/L CO₂饱和湿度下常规培养。

2. 神经干细胞的鉴定

将细胞贴附在载玻片上生长，2天后取出。吸出培养液，用PBS洗去残余培养液，4%(m/m)多聚甲醛固定20分钟。PBS洗2次(每隔10分钟1次)；10%正常山羊血清封闭1h；PBS洗3次；抗nestin抗体(v/v 1:100, 用抗体缓冲液稀释)4℃过夜，PBS洗3次；二抗(v/v 1:50, 用抗体缓冲液稀释)32℃孵育1小时，PBS洗3次；50%(v/v)甘油封片，观察荧光。

3. 从神经干细胞诱导分化成胆碱能神经元

本研究是将20ng/mL bFGF(简称F), 5 μg/mL 肝素(简称H), 1 μg/mL 层粘连蛋白(简称L)三种物质进行组合(即FHL, FH, FL, LH四种组合)后，加入到含1% B27(v/v), 20 ng/mL EGF的F12-DMEM(1:1)培养基中而构成四种不同成分的培养基，将神经干细胞置于四种不同的培养基中，于37℃、5% CO₂饱和湿度下进行诱导分化，同时做空白对照(培养基置于预先放有涂有多聚赖氨酸的载玻片的培养皿中)。

4. 胆碱能神经元的免疫鉴定

培养7天后，将含有细胞的载玻片取出，用PBS洗去残余培养液，4%(m/m)多聚甲醛固定20分钟。PBS洗2次(每隔10分钟1次)；10%正常山羊血清封闭1小时；PBS洗3次；抗胆碱乙酰基转移酶(ChAT)抗体(v/v 1:500, 用抗体缓冲液稀释)

4 ℃过夜, PBS 洗 3 次; 二抗 (v/v 1:50, 用抗体缓冲液稀释) 32 ℃孵育 1 小时, PBS 洗 3 次; 50 % (v/v) 甘油封片, 观察荧光。

5. 结果

神经干细胞在分别含 FHL、FH、FL 和 LH 的四种基础培养基中培养 1 天后, 显微镜下观察, 结果在含 FHL 的基础培养基中培养的细胞的分散程度明显大于其它三种培养基培养的细胞。培养第三天后, 在含 FHL 的基础培养基中培养的细胞有部分开始分化, 而在分别含 FH、FL、LH 的基础培养基中的细胞仍然处于未分化状态。培养 7 天后, 经 ChAT 免疫反应, 发现只有含 FHL、FH 的培养基诱导的细胞才检测到 ChAT⁺即观察到绿色荧光。取十个视野分别在荧光和明光下观察, FHL 混合物诱导的胆碱能神经元占总细胞的 30%, 但 FH 混合物诱导的胆碱能神经元仅占 10%。

由于 bFGF、肝素以及层粘连蛋白可作为胆碱能神经元分化调节因子, 这可能对临床胆碱能神经元性疾病有治疗作用。FHL 和 FH 两种培养液能分化为较多的胆碱能神经元其原因可能有两点: 第一, bFGF 能促进神经干细胞的分化[7]; 第二, bFGF 因与肝素亲和力高, 故又称为肝素结合生长因子, 其对各种体外培养神经元具有神经营养作用, 表现为促进神经元的存活与生长[8]。

参考文献:

- [1] Gage F H, Ray J, Fisher L J.: CNS 干细胞的分离、鉴定和使用, *Annu. Rev. Neurosci.*, 1995, 18:159.
- [2] McKay R.: 中枢神经中的干细胞, *Science*, 1997, 276(5309): 66-71.
- [3] Zhang S C, Wernig M, Duncan I D, Brustle O & Thomson J. A.: 来自人胚胎干细胞的可移植神经前体的体外分化, *Nat. Biotechnol.*, 2001, 19:1129-1133.
- [4] Shihabuddin L S, Horner P J, Ray J, Gage F H.: 成人脊髓干细胞在成人齿状回移植后神经元的产生, *Neurosci.*, 2000, 20:8727-8735.
- [5] Craig C G, Tropepe V, Morshead CM.: 成年小鼠脑中内源性室管膜下神经元前体细胞群的体内生长因子扩张, *Neurosci.*, 1996, 16(6): 2649-2653.
- [6] 孟晋宏, Bartsch U, Schachner M 等: 脊髓神经干细胞的培养和鉴定, *第四军医大学学报*, 2000, 21 (8): 1026-1030.
- [7] Shihabuddin L S, Ray J & Gage F H.: 基础科学和临床应用中的干细胞

技术, Arch. Neurol., 1999, 56:29-32。

[8] 邵宁生: 成纤维细胞生长因子与神经元再生, 神经解剖学杂志, 1994, 10(3):274。

专利名称(译)	一种体外诱导神经干细胞定向分化为胆碱能神经元的方法		
公开(公告)号	CN100344756C	公开(公告)日	2007-10-24
申请号	CN200510023571.8	申请日	2005-01-26
[标]申请(专利权)人(译)	上海大学		
申请(专利权)人(译)	上海大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海大学		
[标]发明人	陈付学 任雯雯 杨洋 过七根 宋红生 文铁桥		
发明人	陈付学 任雯雯 杨洋 过七根 宋红生 文铁桥		
IPC分类号	C12N5/06 G01N33/533		
代理人(译)	王正		
审查员(译)	饶刚		
其他公开文献	CN1673356A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

提供一种体外诱导神经干细胞定向分化为胆碱能神经元的方法，包括神经干细胞分离、培养和鉴定后，在含1%B27(v/v)、20ng/mL EGF的F12-DMEM(1:1)培养基中加入bFGF、肝素、层粘连蛋白后，于37°C、50mL/L CO2饱和湿度下诱导分化神经干细胞并体外培养7天，然后作胆碱能神经元的免疫鉴定。本发明的方法操作简单，重复性好，分化率达30%以上。是一种获得胆碱能神经元的新途径。