

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104087553 A

(43) 申请公布日 2014. 10. 08

(21) 申请号 201310450694. 4

(22) 申请日 2013. 09. 25

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 赫荣乔 刘纓 付晶鹏 莫炜川

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 王旭

(51) Int. Cl.

C12N 5/0797(2010. 01)

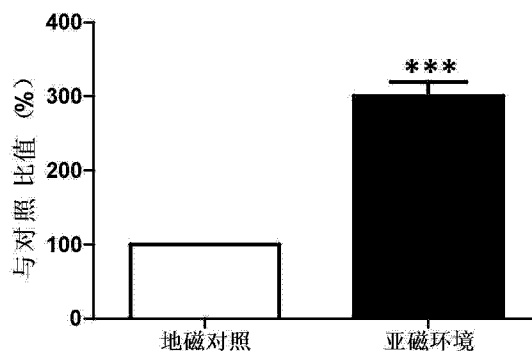
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

一种快速获取大量优质神经干细胞的培养方法

(57) 摘要

本发明提供一种提高干细胞培养效率的方法,所述方法包括在亚磁环境下培养干细胞。本发明使用的方法在不影响细胞性质的前提下快速获得大量优质的干细胞,不会对细胞造成任何额外生物或化学污染,对解决干细胞治疗中细胞数量稀少问题及提高干细胞相关产品产量有重要意义。



1. 一种提高干细胞培养效率的方法,所述方法包括在亚磁环境下培养干细胞。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述亚磁环境是通过屏蔽环境磁场产生的。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述亚磁环境的磁场总强度小于 500nT。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述干细胞来自于哺乳动物,所述哺乳动物选自人、狗、猫、马、牛、兔、猴、大鼠、小鼠。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述干细胞来自于人。
6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述干细胞是神经干细胞。
7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述神经干细胞包括原代培养脑来源神经干细胞、纯化的神经干细胞、大鼠 SVZ 来源神经干细胞,人胚胎来源神经干细胞。
8. 利用根据权利要求1-7中任一项所述的方法培养获得的神经干细胞。

一种快速获取大量优质神经干细胞的培养方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种能提高神经干细胞培养效率且不影响干细胞品质的培养方法。

背景技术

[0002] 当前对于神经干细胞的分离培养,主要是利用添加生长因子 EGF 和 bFGF 无血清培养基来维持细胞增殖,形成神经干细胞球,从而把干细胞从细胞混合物中分离并维持细胞的正常生长 [1-6]。但是,受细胞培养条件限制及组织来源等因素的限制,常规方法最终能够获得的细胞数量十分有限。此外,大部分神经干细胞在体外传代 20 代后都会出现退化,并且神经干细胞对培养环境要求比较严格,容易出现因环境变化导致的细胞品质改变等问题,所有这些因素都导致了神经干细胞的基础研究、临床应用以及工业化生产受到限制 [2, 5-6]。目前,已有研究发现一些化学分子或生物分子能促进神经干细胞的增殖,从而在短时间内获取大量细胞,但是,化学分子或生物分子除了对细胞增殖的效应,往往对干细胞的其他方面产生额外的效应,即它们在影响细胞增殖的同时也会可能会导致细胞自身品质的改变,所以存在风险 [7-10]。另外一个不可避免的问题是化学分子或生物分子的使用为后续的科学研究的临床及工业应用埋下隐患,难以祛除。

[0003] 亚磁环境是一种物理环境,是利用设备把环境中磁场屏蔽之后产生的一种磁场强度极低的环境。过去的研究中,科学界一直没有对亚磁环境的标准给出一个明确的定义,近期中国科学院生物物理所赫荣乔研究组发表的文章把亚地磁场定义为磁场总强度小于 500nT 的磁场环境 [11]。经过过去几十年的研究,科学家发现亚磁场对动物的生长、发育、行为,植物的生长、发育,微生物增殖、抗药性,细胞的增殖、形态等生物学过程产生不同的效应 [12-19]。这些结果说明亚磁拥有十分广泛的生物学效应,因此,亚磁相关研究引起了广泛的关注。

发明内容

[0004] 本发明的发明人发现在亚地磁场环境中生长的神经干细胞增殖速度显著增加,但细胞增殖能力和分化能力没有发生显著改变。由于细胞在培养过程中不引入额外化学分子或生物分子的干扰,并且在短时间内能得到与常规方法相比数倍的优质细胞,所以,这种方法极大的降低成本,提高效率。

[0005] 更具体地,本发明提供以下各项:

[0006] 1. 一种提高干细胞培养效率的方法,所述方法包括在亚磁环境下培养干细胞。

[0007] 2. 根据 1 所述的方法,其中所述亚磁环境是通过屏蔽环境磁场产生的。

[0008] 3. 根据 1 所述的方法,其中所述亚磁环境的磁场总强度小于 500nT。

[0009] 4. 根据 1 所述的方法,其中所述干细胞来自于哺乳动物,所述哺乳动物选自人、狗、猫、马、牛、兔、猴、大鼠、小鼠。

[0010] 5. 根据 4 所述的方法,其中所述干细胞来自于人。

[0011] 6. 根据 1 所述的方法,其中所述干细胞是神经干细胞。

[0012] 7. 根据 6 所述的方法,其中所述神经干细胞包括原代培养脑来源神经干细胞、纯化的神经干细胞、大鼠 SVZ 来源神经干细胞,人胚胎来源神经干细胞。

[0013] 8. 利用根据 1-7 中任一项所述的方法培养获得的神经干细胞。

附图说明

[0014] 图 1:亚磁环境 (hypogeomagnetic field, HGMF) 磁场强度分布示意图,虚线标出为放置细胞的位置。

[0015] 图 2:地磁场 (geomagnetic field, GMF) 环境磁场强度分布示意图,虚线标出为放置细胞的位置。

[0016] 图 3:在地磁 (GMF) 或亚磁 (HGMF) 环境中生长的神经干细胞形成的神经球。

[0017] 图 4:培养 7 天后分别统计地磁 (GMF) 和亚磁 (HGMF) 环境中生长的神经干细胞细胞数目,发现亚磁中得到 3 倍于地磁数量的细胞,经统计分析有极显著差异 (t-test, ***, $P < 0.001$)。

[0018] 图 5:统计生长于 96 孔板中细胞球,结果显示亚磁中的细胞形成更多体积大神经球 (直径大于 $100 \mu\text{m}$)。

[0019] 图 6:统计每 1000 个原代细胞形成的神经球数目,结果成球率没有出现显著差异。

[0020] 图 7:连续亚磁处理两次的神经干细胞,其增殖能力与亚磁处理一次的细胞相同,但是,它们所获得细胞数量都高于地磁组。亚磁处理后的细胞重新种在地磁环境中,与持续地磁处理组相比,细胞数目没有出现显著差异。

[0021] 图 8:生长于亚磁中的神经球能连续传代 10 代以上。

[0022] 图 9:在地磁 (GMF) 和亚磁 (HGMF) 环境中生长的神经球经 4% 多聚甲醛固定后,免疫细胞化学显示细胞球为 Nestin 阳性 (红色),分化后能形成神经元 (β 3-Tubulin 阳性,绿色) 和神经胶质细胞 (GFAP 阳性,红色),所有细胞细胞核用 Hoechst 染色 (蓝色) (bar= $50 \mu\text{m}$)。

具体实施方式

[0023] 本发明中所指的“亚磁环境”是指通过磁屏蔽线圈或磁屏蔽箱获得的总磁场强度小于 500nT 的磁场环境。

[0024] 实施例 1、亚磁细胞培养环境控制

[0025] 在铝合金制作的支架上,用磁屏蔽金属坡莫合金 (厚度: 0.5mm ,磁通透性: 20000 ,购自北京首都钢铁有限公司) 包裹制作成磁屏蔽箱,缠绕层数 12 层,箱体最终尺寸为 $470\text{mm} \times 641\text{mm} \times 6511\text{mm}$ (长 * 宽 * 高)。在箱体顶部开数个小孔 (直径 0.5mm),分别安装进气扇和出气扇,箱体边侧开门。为了保持箱体内适合细胞生长的环境,亚磁屏蔽箱被放置在一个细胞培养箱 (HERA240, Thermo Fisher Scientific, USA) 中,细胞培养箱的环境保持为适宜细胞生长的条件:温度 37°C ,湿度 95% , CO_2 浓度 5% 。通过运行磁屏蔽箱顶部的风扇,箱体内部的环境与外部进行交换,保持内外环境一致 [12, 15]。用温度计和湿度计 (Smart Sensor AR827, Smart Sensor, HongKong) 检测温度和湿度,用 CO_2 计 (Labotec Incubator Control 1050, Labotec, Rosdorf, Germany) 检测箱体内 CO_2 浓度,发现内外环境一致。磁场总强度用三轴磁强计 (APS Model 520 3-Axis Fluxgate Magnetometer, Applied Physics Systems,

Mountain View, CA, USA) 检测,检测结果见图 1、图 2。

[0026] 实施例 2、神经干细胞原代培养

[0027] 材料:C57BL/6 小鼠(购自北京斯贝福公司)

[0028] 溶液:HEM 溶液, MEM(GIBCO, 41500-018) 一袋, HEPES(Sigma, H4034) 3.813g, 加 ddH₂O 至 0.875L, 添加 2% 双抗 (Penicillin/Streptomycin, Gibco, 14140-122)

[0029] NSA 溶液, (DMEM/F12(Gibco, 12500-062) 一袋, Glucose(Sigma, G7021) 3.75g, 碳酸氢钠(Sigma, S5761) 1.125g, HEPES 1.192g, 加 ddH₂O 至 0.9L。

[0030] NSA^{-/-} 溶液, (50mL), NSA 44mL, 10%BSA(Roche, 10711454001) 1mL, Proliferation Supplement(Stem Cell Technologies, 05701) 5mL, 双抗 1%。

[0031] NSA^{+/+} 溶液, (50mL), NSA^{-/-} 50mL, Heparin(Sigma, H3149, 3.78mg/mL) 50 μ L, EGF(BD Bioscience, 354010, 1 μ g/mL) 100 μ L, bFGF(Roche, 11104616001, 0.1 μ g/mL) 50 μ L。

[0032] 0.05%胰蛋白酶溶液, 胰蛋白酶(Sigma, T5266) 0.05g, EDTA(Sigma, E6158) 0.004g, 加 PBS 100mL。

[0033] 胰蛋白酶抑制剂溶液, 胰蛋白酶抑制剂(Sigma, T6522) 11.2mg, DNase I (Roche, 10104159001, 1mg/mL) 0.8mL, HEM 79.2mL。

[0034] 操作步骤:

[0035] 1. 新生 P2 小鼠, 用 70% 酒精消毒后, 压迫颈椎处死, 在无菌环境中完整取出脑, 浸泡在冰冷的 HEM 溶液中。

[0036] 2. P15 或成年小鼠, 70% 酒精消毒后, 颈椎脱臼处死, 在无菌环境中取出脑, 浸泡在冰冷的 HEM 中。在体视显微镜下, 取出 SVZ 区组织放在冰冷的 HEM 溶液中(操作视频 <http://www.stemcell.com/en/Technical-Resources/Multimedia.aspx>)。

[0037] 3. 用剪刀将组织破碎成大块, 加 6mL 0.05% 胰酶后转移到 15mL 离心管中, 37℃ 消化 10min。

[0038] 4. 在混悬液中加入等体积的胰蛋白酶抑制剂终止消化, 室温静止 3 分钟后在 100g 离心 5 分钟。

[0039] 5. 去上清液, 在沉淀物中加入 2mL NSA^{+/+}, 反复吹打把组织打散成单细胞悬液。

[0040] 6. 细胞悬液用 40 μ m 滤网 (BD Bioscience, 354020) 过滤, 用额外 2mL NSA^{+/+} 冲洗离心管和滤网, 获得的所有滤液转移到新的离心管中。

[0041] 7. 再次在 100g 离心 5 分钟, 去上清液, 沉淀物用 1-2mL NSA^{+/+} 重悬获得细胞悬液。

[0042] 8. 用血球计数板数计算细胞密度。按照 80 万细胞每 T25 细胞培养瓶 (BD Falcon) 接种, 添加 5mL NSA^{+/+}; 1000 个细胞/孔, 200 μ L NSA^{+/+}, 分别放在地磁和实施例 1 中的亚磁环境中培养, 7 天后计数细胞数目或统计神经球数目和大小。

[0043] 结果分析:

[0044] 结果显示, 生活在地磁和亚磁中的细胞都能形成形态正常的神经球(图 3), 统计细胞数目发现, 亚磁中获得 3 倍于地磁的细胞数量, 经统计分析有极显著差异 (***, P 值 < 0.001) (图 4), 结果说明, 亚磁处理能获得更多数量的神经干细胞。统计生长在 96 孔板中的细胞球发现, 原代神经干细胞细胞的成球率(原代细胞形成的神经球数量与接种细胞

数量比值),地磁为 $2.96\% \pm 0.24\%$,亚磁为 $3.34\% \pm 0.16\%$,二者之间没有显著差异(图6),这说明亚磁处理没有影响到细胞的成球能力。干细胞的成球能力反应了细胞的干性水平[20],这个结果说明亚磁处理没有影响到细胞的干性。另外,统计细胞球的大小,我们发现生长在亚磁中细胞形成直径大细胞球(直径大于 $100 \mu\text{m}$)的数量高于地磁,地磁环境中形成的神经球大球比例为 $22.16\% \pm 1.42\%$,亚磁环境中大球的比率为 $42.56\% \pm 1.16\%$,二者之间存在极显著差异(t-test, ***, P 值 < 0.001) (图3,图5),该结果说明亚磁是通过促进细胞增殖来获得更多数量的细胞。

[0045] 实施例3、神经干细胞传代

[0046] 操作步骤

[0047] 1. 原代神经干细胞细胞在亚磁环境中培养7天(如在实施例2中所述)后,收集所有的神经球,在100g离心5分钟。

[0048] 2. 添加0.05%胰酶或 accutase 在常温消化3分钟,加入等量胰蛋白酶抑制剂,轻轻混匀。在100g离心5分钟。

[0049] 3. 吸去上清后,加入1-2mL NSA+/,反复吹打制成成单细胞悬液。

[0050] 4. 按照10万细胞接种到60mm细胞培养皿(Corning),添加5mLNSA+/,1000个细胞每孔,200 μL NSA+/,分别放在地磁和亚磁环境中培养,7天后计数细胞数目或统计神经球数目和大小。

[0051] 结果分析:

[0052] 结果显示,生长在地磁和亚磁中的神经球都能正常传代,生长于亚磁中的细胞分别接种在地磁和亚磁环境中,7天后计数结果显示,亚磁处理一次和两次的细胞数量没有显著差异,但是,它们的数量都高于地磁中获得细胞数量。亚磁中细胞重新种在地磁环境中后,细胞数量与地磁相比没有显著差异(图7),说明亚磁效应不会出现累积,并且一旦脱离亚磁环境,亚磁效应消失。亚磁大神经球能连续传代10代以上(图8),显示亚磁处理并不会降低细胞的增殖能力。

[0053] 实施例4、神经球分化与免疫组化染色

[0054] 操作步骤

[0055] 1. 玻片预处理,直径10mm的玻片用酸液处理后,流水洗净,灭菌。玻片放到24孔板中,每孔一个,添加0.5mL包埋液(15mL包埋液包含12.45mL PBS,0.3mL Laminin(Invitrogen,23017-015),2.25mL Poly-Ornithine(Sigma,P4957)),在37°C孵育至少三个小时。包埋结束后吸去包埋液,用PBS清洗6遍备用。

[0056] 2. 神经球分化,分别收集在地磁和亚磁中生长7天的神经球(如在实施例2中所述),在100g离心3分钟后,除去上清,用NSA-/-重悬细胞球。

[0057] 3. 根据细胞球的密度把细胞球种到玻片上,每孔细胞球的数量在50-100之间。

[0058] 4. 免疫组化染色,分化的细胞球用4%多聚甲醛固定30分钟,PBS清洗三遍,37°C封闭液(包含5%山羊血清,5%胎牛血清,0.1%Tween-20)孵育60分钟。用封闭液稀释的一抗抗体Nestin(1:100,R&D Systems,MAB2736)或 β 3-Tubulin(1:200,CST,5666)与GFAP(1:200,CST,3670)在4°C孵育过夜,PBST(PBS,添加0.1%Tween-20)清洗5分钟,共三次。封闭液稀释的二抗抗体Alexa Fluor 568抗小鼠抗体(1:1000;Invitrogen,A11061),Alexa Fluor488抗兔抗体(1:1000;Invitrogen,A11008),以及DAPI(1:2000;Sigma-Aldrich,

D9564) 在常温孵育 3 小时或在 4℃ 孵育过夜。PBST 清洗 5 分钟,共三次,用封闭液封闭。封闭后的片子用荧光显微镜观察并拍照。

[0059] 结果分析:

[0060] 免疫组织化学显示,生长在地磁或亚磁中的细胞球都显示 Nestin 阳性(神经干细胞特异性标记,荧光为红色)(图 7a,b),显示地磁和亚磁中的神经球中含有神经干细胞。神经球分化后,分化产物中包含神经元(β 3-Tubulin 阳性,荧光为红色)和神经胶质细胞(GFAP 阳性,荧光为绿色)。DAPI 用于染核(荧光显示蓝色)(图 7c,d),结果说明获得的神经球是有多向分化能力的。这些结果证明在亚磁中生长的细胞没有失去干细胞的性质。

[0061] 参考文献:

[0062] 1. Reynolds, B. A. & Weiss, S., Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255 (5052):1707-1710(1992)

[0063] 2. Walker, T. L., White, A., Black, D. M., Wallace, R. H., Sah, P., Bartlett, P. F., 2008, Latent stem and progenitor cells in the hippocampus are activated by neural excitation, *J Neurosci*, 28(20):5240 - 5247

[0064] 3. Azari H., Rahman M., Sharififar S., Reynolds B. A. Isolation and Expansion of the Adult Mouse Neural Stem Cells Using the Neurosphere Assay. *JoVE*. 45 (2010).

[0065] 4. XIE Zongping, ZHENG Qixin, GUO Xiaodong, YI Chengqing, WU Yongehao, Isolation, Culture and Identification of Neural Stem Cells in New-born Rats. *Journal of Huazhong University of Science and Technology*[Med Sell23(2):75—78(2003)

[0066] 5. A. L. Vescovi, B. A. Reynolds, D. D. Fraser, S. Weiss, bFGF regulates the proliferative fate of unipotent(neuronal)and bipotent(neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells. *Neuron*11:951-966(1993)

[0067] 6. B. A. Reynolds, S. Weiss, Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev. Biol.* 175:1 - 13(1996).

[0068] 7. DANIEL G. BLACKMORE, MOHAMMAD G. GOLMOHAMMADI, BEATRICE LARGE, MICHAEL J. WATERS, RODNEY L. RIETZE, Exercise Increases Neural Stem Cell Number in a Growth Hormone-Dependent Manner, Augmenting the Regenerative Response in Aged Mice *STEM CELLS*. 27:2044 - 2052, (2009)

[0069] 8. Dhanisha J. Jhaveri, Eirinn W. Mackay, Adam S. Hamlin, Swananda V. Marathe, L. Sanjay Nandam, Vidita A. Vaidya, and Perry F. Bartlett, Norepinephrine Directly Activates Adult Hippocampal Precursors via β 3-Adrenergic Receptors. *The Journal of Neuroscience*, 30(7):2795 - 2806 • 2795, (2010)

[0070] 9. A. ARMESILLA-DIAZ, P. BRAGADO, a I. DEL VALLE, E. CUEVAS, a I. LAZARO, C. MARTIN, J. C. CIGUDOSA AND A. SILVA, p53 REGULATES THE SELF-RENEWAL AND DIFFERENTIATION OF NEURAL PRECURSORS. *Neuroscience*, 158:1378 - 1389 (2009)

- [0071] 10. Lia S. Campos, Dino P. Leone, Joao B. Relvas, Cord Brakebusch, Reinhard Fässler, Ueli Suter and Charles French-Constant, *bl* integrins activate a MAPK signalling pathway in neural stem cells that contributes to their maintenance. *Development*, 131:3433-3444, (2004)
- [0072] 11. 莫炜川, 刘纓, 赫荣乔. 亚磁场极其生物响应机制. *生物化学与生物物理进展*. 39(9):835-842, (2012)
- [0073] 12. Mo W-c, Zhang Z-j, Liu Y, Bartlett PF, He R-q, Magnetic Shielding Accelerates the Proliferation of Human Neuroblastoma Cell by Promoting G1-Phase Progression. *PLoS ONE* 8(1):e54775(2013).
- [0074] 13. Wei-chuan Mo, Ying Liu, Helen M. Cooper, and Rong-qiao He, Altered Development of *Xenopus* Embryos in a Hypogeomagnetic Field. *Bioelectromagnetics* 33:238-246(2012)
- [0075] 14. Bliss V L, Heppner F H. Circadian activity rhythm influenced by near zero magnetic field. *Nature*, 261:411 ~ 412, (1979)
- [0076] 15. Mo W C, Zhang Z J, Liu Y, et al. Effects of a hypogeomagnetic field on gravitropism and germination in soybean. *Adv Space Res*, 47(9):1616 ~ 1621, (2011)
- [0077] 16. 王学斌, 徐慕玲, 李兵, 等. 亚磁空间中孵化的一日龄小鸡味觉回避长时记忆受损. *科学通报*, 48(19):2042 ~ 2045, (2003)
- [0078] 17. Zhang B, Lu H, Xi W, et al. Exposure to hypomagnetic field space for multiple generations causes amnesia in *Drosophila melanogaster*. *Neurosci Lett*, 371(2-3):190 ~ 195, (2004)
- [0079] 18. Asashima M, Shimada K, Pfeiffer C J. Magnetic shielding induces early developmental abnormalities in the newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Bioelectromagnetics*, 12:215 ~ 224, (1991)
- [0080] 19. Creanga D E, Poiata A, Morariu V V, et al. Zero-magnetic field effect in pathogen bacteria. *J Magn Magn Mater*, 272:2442 ~ 2444, (2004)
- [0081] 20 Brent A Reynolds & Rodney L Rietze. Neural stem cells and neurospheres—re-evaluating the relationship. *NATURE METHODS*, 2(5):333-336, (2005)

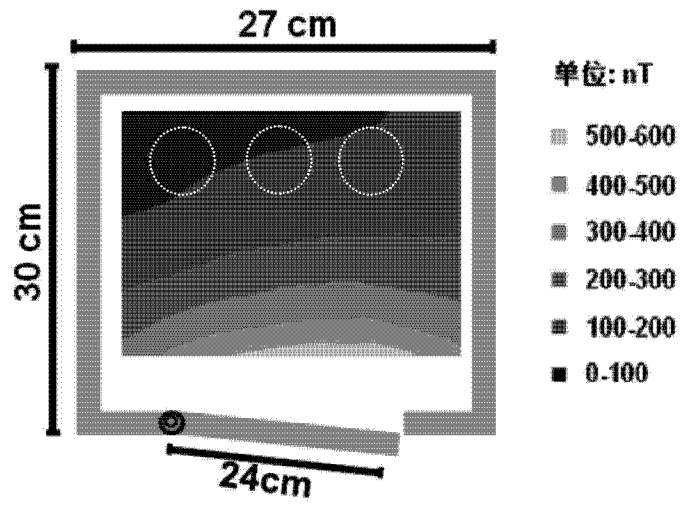


图 1

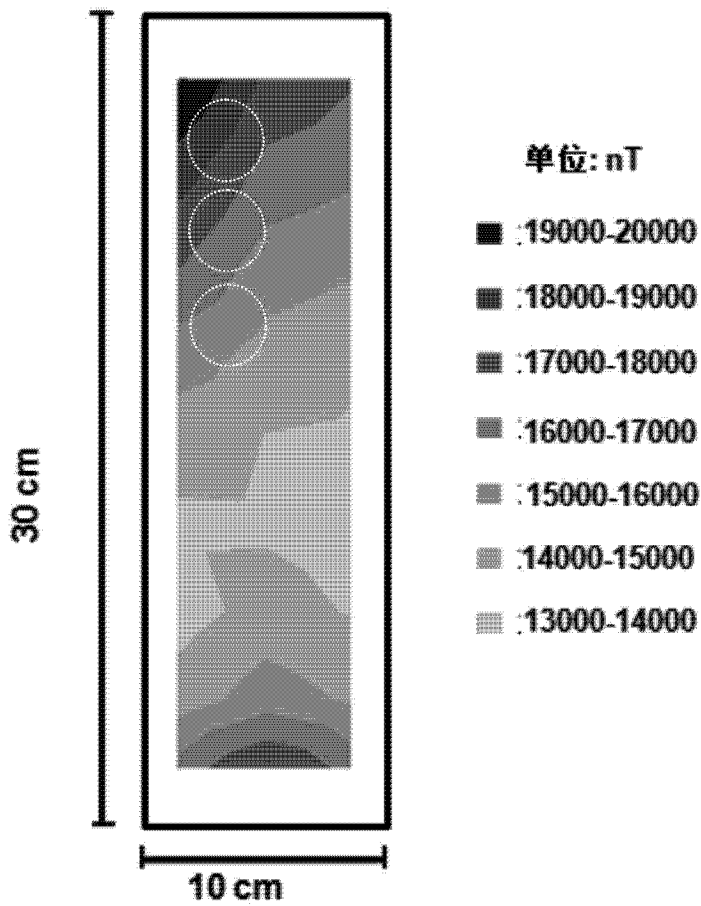


图 2

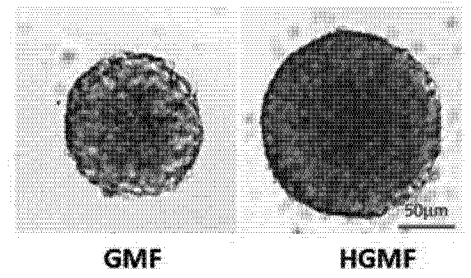


图 3

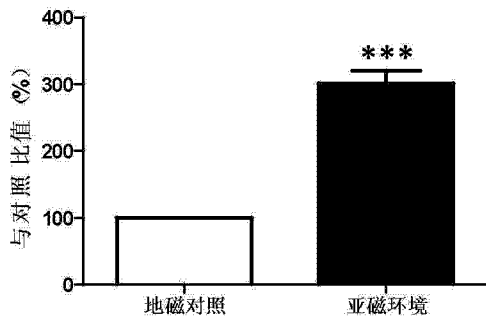


图 4

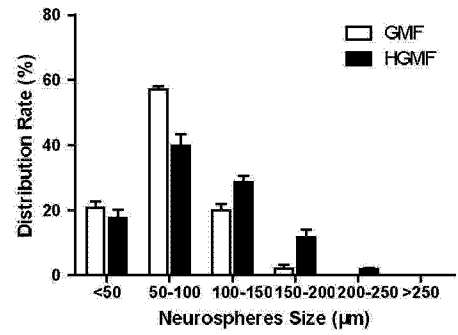


图 5

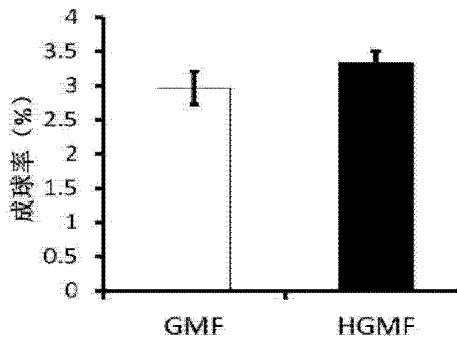


图 6

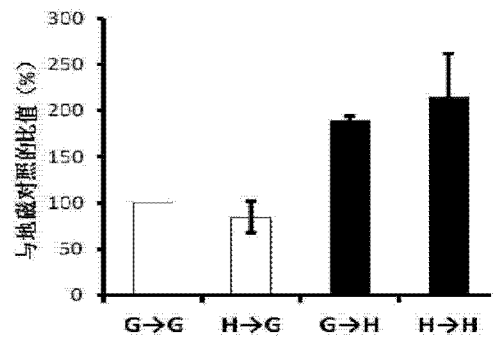


图 7

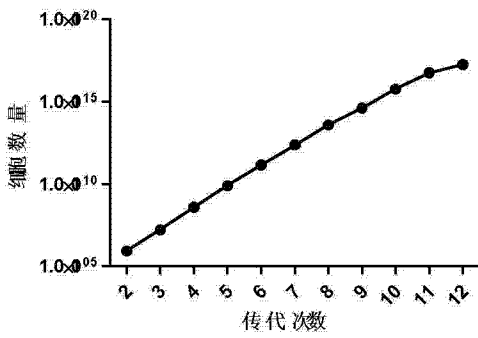


图 8

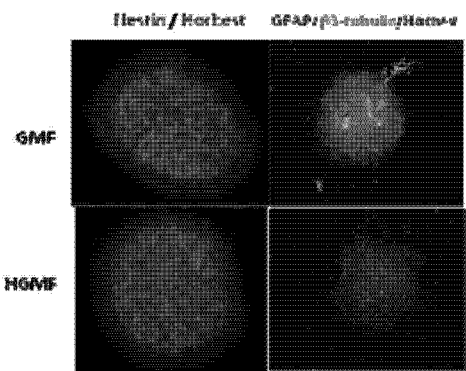


图 9