

行政院國家科學委員會專題研究計畫報告

魚類神經幹細胞特性研究—石斑魚神經膠細胞株建立和特性研究(2/2)

計畫編號：NSC92-2313-B002-071

執行期間：92年8月1日至93年7月31日

主持人：陳秀男 教授

執行單位：國立臺灣大學漁業科學研究所

中文摘要

本計畫先前所建立的石斑魚腦組織來源的細胞株，經細胞免疫染色分析顯示具有keratin、vimentin和神經膠纖維酸性蛋白(GFAP)等未成熟星狀神經膠細胞的特，沒有神經纖維蛋白(NF)和酪胺酸羥基酶(TH)等神經元標記，也沒有幹細胞標 nestin 蛋白的存在。而穀胺醯胺合成酶(GS)和S100蛋白等成熟星狀神經膠細胞的標記，則會在較老的培養細胞出現，表示星狀神經膠細胞可以在體外培養過程中自然成熟。另外體外培養的細胞，有些除了有GFAP外，A2B5抗體和寡突觸神經細胞專一性抗體的免疫染色也呈現陽性，表示培養細胞有些是星狀神經膠細胞和寡突觸神經膠的前驅細胞。

為了建立具有幹細胞特性的細胞株，我們也建立了石斑魚的胚胎來源細胞株，並加以純系化。有的純系細胞株具有表現GFAP的特性，是否具有幹細胞的特性仍需持續分析。另外，我們也陸續建立了多株的吳郭魚腦組織的細胞株。其中TB-2的NF、TH、GFAP、A2B5、galactocerebroside (GalC)和nestin的免疫染色均呈陽性，顯示TB-2可能為神經幹細胞。在培養過程中，成熟的星狀神經膠細胞會隨培養的老化而增加。為了解魚類神經幹細胞分化的傾向，我們將嘗試以神經生長因子、纖維生長因子和甲狀腺素等生長因子或激素引導神經幹細胞分化的方向。

關鍵詞：幹細胞，神經膠纖維酸性蛋白，腦，穀胺醯胺合成酶，酪胺酸羥基酶、細胞株。

Abstract

GBC and GBC4 cell lines from the brain tissue of a brown spot grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*, Forsskål) were identified immunoreact with keratin、vimentin and glial fibrillary acidic protein (GFAP) which are characters of astroglia. The cells are negative immunoreaction for neurofilament proteins (NF), tyrosine hydroxylase (TH) and nestin, and thus indicate they are not stem cells and cannot be neuron progenitor cells. However, A2B5 and galactocerebroside antibodies reaction were observed in some of the cells, and this indicate the cells are O2A progenitor cells. Mature astrocytes that with start-like morphology and with glutamine synthetase (GS) and S-100 protein were observed in the older cultures.

For established a fish cell line that has stem cell characters, several cell lines were also established from grouper embryos. Some clones from the cell lines show immunoreactive with GFAP, and the stem cell characters are needed to be studied. On the other hand, a TB-2 cell line from tilapia brain tissue was identified immunoreactive with NF, TH, GFAP, A2B5, GalC and nestin. The

results show TB-2 cells may be stem cells. However, the conditions which induce the TB-2 cells differentiated into neurons, astrocytes or oligodendrocytes are needed to further investigation.

Key words: Cell line Glial fibrillary acidic protein, Glutamine synthetase neurofilament, Stem cell, Tyrosine hydroxylase.

前言

在高等哺乳動物，神經元、星狀神經膠細胞和寡突觸神經膠細胞發育自腦室和腦室下區 (Doetsch et al., 1999)，在此區域有許多具有多潛能性分化的室管膜細胞和星狀神經膠細胞當作神經幹細胞，由此處往下延伸，分化出放射狀神經膠細胞 (radial glia)。放射狀神經膠細胞為紡錘形具有兩個常的突起的雙極性神經膠細胞，會表現 nestin、vimentin、GFAP 等中間絲蛋白 (Hartfuss et al., 2001)。放射狀神經膠細胞為多潛能性幹細胞可分化為神經元和神經膠細胞的中間細胞。由於有的放射狀神經膠細胞可同時表現神經元和神經膠細胞的特性，有的放射狀神經膠細胞可同時表現星狀神經膠細胞或寡突觸神經膠細胞的特性，所以放射狀神經膠細胞間仍有不同程度分化的現象，所以有的放射狀神經膠細胞可為多潛能性神經幹細胞，有的為神經元的前驅細胞，有的為星狀神經膠細胞和寡突觸神經膠細胞的前驅細胞 (Hartfuss et al., 2001)。在高等脊椎動物，放射狀神經膠細胞在出生前就會分化為星狀神經膠細胞而消失 (St)，但在低等的脊椎動物如魚類，放射狀神經膠細胞在其一生中都會存在，所以低等的脊椎動物的腦神經元在動物個體成熟後仍可持續更替，而高等脊椎動物成熟後除了特定的區域仍保留些許幹細胞，可替補或增加神經元外，其神經元受損後無法再更新。

為了解魚類神經幹細胞的特性及其分化的機制，本計畫擬建立魚類神經幹細胞的持續性細胞株，以方便魚類神經幹細胞特性及其分化機制的研究。

材料和方法

細胞培養

取自棕點石斑魚的腦和胚胎組織的初代細胞株分別建立出可持續體外培養的GBC、GBC4和GE等細胞株。由吳郭魚的腦分別建立出TB和TB2細胞株。細胞株的培養基為含有10%胎牛血清的L15，培養在25°C的培養箱。

細胞免疫染色

要進行免疫染色的細胞先培養在12孔盤中。如要進行在細胞質內表現的抗原，如nestin蛋白、GFAP、NF蛋白、TH蛋白、S100蛋白和GS蛋白的免疫染色，細胞以甲醇固定，若進行細胞膜表面的抗原，如A2B5、Galc和髓鞘蛋白的免疫染色，細胞則用10%中性福馬林固定。固定的細胞經清洗後，以適當濃度的1次抗體作用1小時，清洗後以2次抗體作用。2次抗體使用FITC或Rhodamin螢光連結或HRP連結的山羊抗兔子Ig或山羊抗小鼠Ig的抗體。若使用HRP連結的抗體，使用DAB或TrueBlue呈色。

RT-PCR

吳郭魚之腦組織和TB細胞分別以TRizol抽取RNA。將抽取的RNA以隨機引子合成cDNA後再利用尼羅河吳郭魚GFAP引子對5'-TGGTATCGCTCGAAGTTTGC-3'和5'-AGGTCCTGGTACTCC TGCA-3'進行PCR。

西方點墨分析

將細胞以溶解緩衝液溶解後，離心收取上清液，加入電泳樣品液進行電泳，而後將蛋白質轉漬到PVDF膜上。以1次抗體，如抗S100、NF、GFAP、GS和TH等蛋白的作用1小時後，再用

HRP連結的山羊抗兔子Ig的2次抗體作用1小時，並以TrueBlue顯色。

結果

TB2細胞株以GFAP抗體螢光免疫染色顯示為陽性，而其形態為細長紡錘狀（圖1）。高密度培養時，有許多細胞會聚集成團，一邊伸出細長的突起，形成單極性放射狀細胞，類似Bergmner glia（圖2）。



圖1. TB-2 細胞之相位差和免疫螢光顯微圖。圖2. 高密度培養之TB2細胞，有的會呈現類似Bergmner glia的形態。圖3. 久未更換培養基的細胞由紡錘形變成星形（A），經更換培養基後，細胞聚集成團。

細胞若長時間（2星期）沒有繼代或更換培養基，會有多個小島狀區域出現細胞形態改變，由細長的紡錘形變成有許多細微突起，類似星狀細胞的形狀（圖3A），若將培養基更新，則島狀區的細胞會緊密的聚集成團（圖3B）。

以星狀神經膠細胞的標記—GFAP的抗體，寡突觸神經膠細胞和星狀神經

膠細胞標記抗體—A2B5，寡突觸神經膠細胞標記—galatocerebroside抗體，以及神經元標記—神經元纖維蛋白抗體進行免疫螢光染色，可發現大部分的TB-2細胞都可表現這些標記（圖4）。為確認表現星狀神經膠細胞標記的細胞是否也會表現神經元纖維蛋白，我們也進行此兩著的雙重螢光免疫染色，結果顯示培養的細胞可同時表現這兩種標記（圖5）。

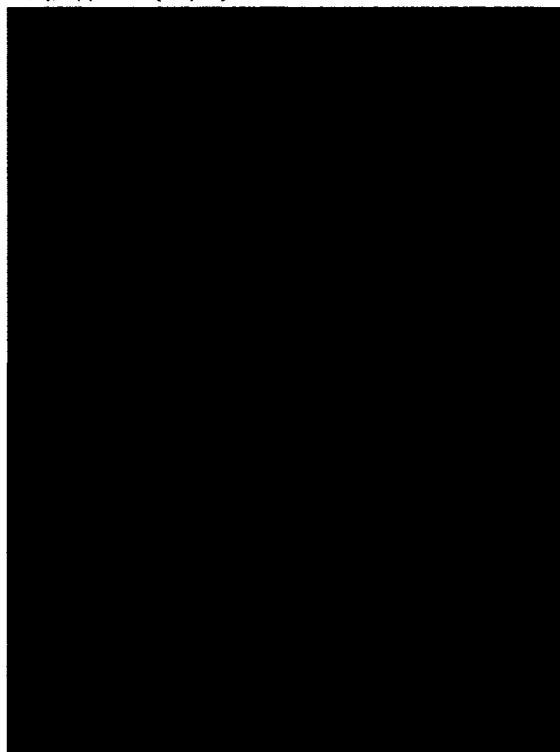


圖4. 左側為TB2細胞螢光免疫染色，右側為相對的相位差圖。由上而下依序為神經膠纖維酸性蛋白、galatocerebroside (GalC)、A2B5和神經元纖維蛋白抗體免疫染色。

利用 RTP-CR 分析 TB2 細胞 GFAP 基因表現的結果顯示 TB-2 會表現 GFAP（圖6），其 290 個鹼基對的 PCR 產物的序列和基因庫中尼羅河吳郭魚的 GFAP 基因也完全符合。



圖5. 神經膠纖維酸性蛋白 (A) 和神經元纖維蛋白 (B) 之雙重螢光免疫染色。圖C為相對應的相位差圖。

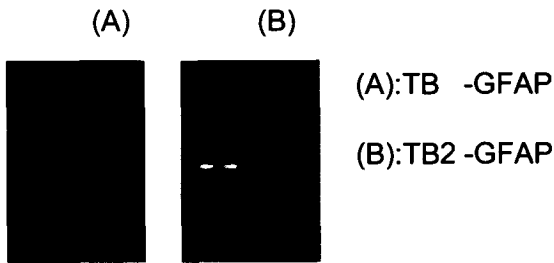


圖6. 吳郭魚腦組織和TB2細胞GFAP RT-PCR之結果。在290鹼基對位置有產物。

另外,如同先前之觀察結果, TB2細胞若培養較久而沒有更換培養基或進行繼代,會發現許多如星狀的細胞。這些星狀的細胞經免疫染色發現可表現大量的穀胺醯胺合成酶(GS)和S100蛋白(圖7)。由於GS和S100蛋白為成熟星狀神經膠細胞的標記,所以我們認為些星狀細胞為成熟的星狀神經膠細胞。

西方點墨分析也證實 TB2細胞具有 GFAP、S100蛋白、GS、TH、NF蛋白和vimentin(圖8)。顯示 TB2同時可表現神經元和神經膠的標記。

討論

TB2細胞可同時被GFAP、GalC和A2B5抗體反應,所以我們可以推測

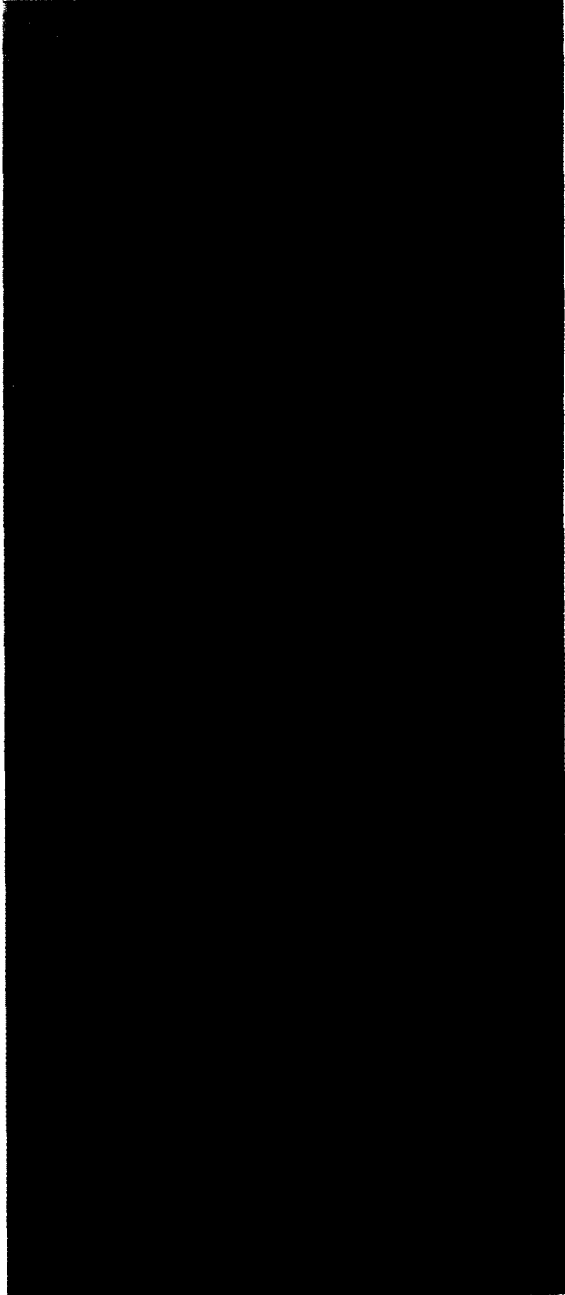


圖7. TB2細胞之酵素免疫染色。A. GS, B. GFAP(棕色)和 GS(藍色),C. S100蛋白。

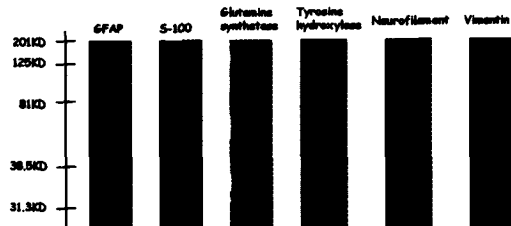


圖8. TB2細胞的西方點墨分析。

TB2是星狀神經膠細胞和寡突觸神經膠細胞(O2A)的前驅細胞(Raff et al., 1984)。然而,到目前為止並沒有文獻顯示星狀神經膠細胞和寡突觸神經膠細胞的前驅細胞會表現神經元的特性,所以我們認為TB2細胞應比O2A前驅細胞更原始,有可能是放射狀神經膠細胞。

放射狀神經膠細胞為單極性或雙極性的長紡錘狀的細胞,並且會表現神經幹細胞的標記—nestin蛋白質。而且放射狀神經膠細胞中也可能有不同的分化成次,有的可分化為神經元或神經膠細胞,有的則只能分化為神經元,有的只能分化為神經膠細胞。TB2細胞的形狀類似成纖維母細胞為紡錘形,有的細胞兩端具有長的突起類似放射狀神經膠細胞,有的突起較短。在高密度的培養過程中,我們可以發現一些TB2細胞會聚集並產生一長的突起而形成類似Bergmann神經膠—單極性放射狀神經膠細胞。由於TB2細胞同時會表現神經元和神經膠細胞的特性,且具有nestin蛋白,形態也類似放射狀神經膠細胞,所以我們認為TB2是一種放射狀神經膠細胞,也是神經元和神經膠細胞共同的幹細胞。此外,我們認為在我們的培養條件下,TB2會有許多放射狀神經膠細胞分化走向星狀神經膠細胞。所以在培養比較老化的細胞的形態輝出現星形,並且GS和S100蛋白的合成增加,出現成熟的Type II星狀神經膠細胞的特徵(Raff et al., 1979; Wicht et al., 1994)。

放射狀神經膠細胞分化為神經元,或星狀神經膠細胞,或寡突觸神經膠細胞的條件至今並不十分清楚。一些生長因子如鹼性成纖維生長因子、細胞因子和激素都會影響放射狀神經膠細胞分化的趨向。如今我們已經證實TB2為放射狀神經膠細胞,我們就可以更容易的在體外以各種生長因子、細胞因子或激素誘導其分化(Gago et al. 2001

Raff et al. 1983),找出神經幹細胞分化為神經元、寡突觸神經膠細胞或星狀神經膠細胞所需的條件。之後,利用其分化條件,我們就可以隨心所欲的大量培養神經元、寡突觸神經膠細胞或星狀神經膠細胞,進而研究這些細胞的特性和功能並將這些細胞應用組織再生或感測器之開發。

計畫成果自評

成功建立出魚腦組織來源的具有神經幹特徵的持續性細胞株。這些細胞株同時具有神經元和神經膠細胞的特性,所以若有合適的分化誘導條件應可分化為神經元、寡突觸神經膠細胞或星狀神經膠細胞。今後之研究方向,應著重於分化誘導因子之研究,以了解魚類神經幹細胞分化為神經元或寡突觸神經膠細胞或分化為星狀神經膠細胞的條件。

參考文獻

- Bastmeyer M, Beckmann M, Nona SM, Cronly-Dillon JR, Stuermer CAO. 1989. Identification of astrocyte- and oligodendrocyte-like cells of gold fish optic nerves in culture. *Neurosci Lett* 101:127-132.
- Bell JG, Tocher DR, Sargent JR. 1994. Effect of supplementation with 20:3(n-6), 20:4(n-6) and 20:5(n-3) on the production of prostaglandins E and F of the 1-, 2- and 3-series in turbot (*Scophthalmus maximus*) brain astroglial cells in primary culture. *Biochimica et Biophysica Acta* 1211:355-342.
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97:703-716.
- Gago N, Akwa Y, Sananes N, Guennoun R, Baulieu EE, ElpEtr M, Schumacher M. 2001 Progesteron

- and the oligodendroglial lineage: stage-dependent biosynthesis and metabolism. *Glia* 36:295-308
- Groves AK, Entwistle A, Jat PS, Noble M. 1993. The characterization of astrocyte cell lines that display properties of glial scar tissue. *Dev Biol* 159:87-104.
- Hartfuss E, Galli R, Heins N, Gotz M. Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Developmental Biology* 229:15-30.
- Jeserich G, Rauen T. 1990. Cell cultures enriched in oligodendrocytes from the central nervous system of trout in term of phenotypic expression exhibit parallels with cultured rat Schwann cells. *Glia* 3:65-74.
- Levine, RL, Tsang A, Verdone-Smitj C. 1985. Two populations of astrocytes in the goldfish central nervous system. *Soc Neurosci Abs* 11:84.
- Nona SM, Swhab SAS, Stafford CA, Cronly-Dillon JR. 1989. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) from the goldfish: Its localization in the visual pathways. *Glia* 2:189-200.
- Raff M C, Miller RH, Noble M. 1983. A glial progenitor cell that develops *in vitro* into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* 303:390-396.
- Raff MC, Fields KL, Hakomori S-I, Mirsky R, Pruss RM, Winter J. 1979. Cell-type-specific markers for distinguishing and studying neurons and the major classes of glial cells in culture. *Brain Res* 174:283-308.
- Raff MC, Williams BP, Miller RH 1984. The *in vitro* differentiation of a bipotential glial progenitor cell. *EMBO* 3:1857-1864.
- Sivron T, Eitan S, Schreyer DJ, Schwartz M. 1993. Astrocytes play a major role in the control of neuronal proliferation *in vitro*. *Brain Res* 629:199-208.
- Sivron T, Jeserich G, Nona S, Schwartz M. 1992. Characteristics of fish glial cells in culture: possible implications as their lineage. *Glia* 6:52-66.
- Stensaas LJ. 1977. The ultrastructure of astrocytes, oligodendrocytes and microglia in the optic nerve of urodele amphibians. *J Neurocytol* 6:269-286.
- Tocher DR. 1993. Effects of growth factors on the metabolism of linolenate (18:3n-3) and eicosapentaenoate (20:5n-3) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) astroglial cells in primary culture. *Comp Biochem Physiol* 105B:743-748.
- Wicht H, Derouiche A, Korf H-W. 1994. An immunocytochemical investigation of glial morphology in the Pacific hagfish: radial and astrocyte-like glia have the same phylogenetic age. *J Neurocytol* 23:565-576.