

神经干细胞和神经细胞的拉曼光谱分析

韩忠美¹,刁振琦¹,付莉²,王标¹,陈长青¹,饶凤飞¹,张建民¹,唐伟跃¹
(1. 郑州大学物理工程学院,河南 郑州 450001;2. 郑州铁路职业技术学院,河南 郑州 450002)

摘要:从光谱学角度研究神经干细胞(NSCs)与神经细胞(NCs),是一个新的干细胞研究方法,能够为临床应用提供一定的实验参考依据。本文通过体外培养 NSCs 和 NCs,应用激光共焦显微拉曼光谱仪测定两种细胞的拉曼光谱。实验结果显示,NSCs 的拉曼峰 646 cm^{-1} , 2917 cm^{-1} 与 NCs 的拉曼峰 652 cm^{-1} , 2908 cm^{-1} 处存在较大差异。NCs 核中 B 型 DNA 胸腺嘧啶和酪氨酸含量相对更丰,而 NSCs 核中具有 NO_2 成分而 NCs 核中较少或没有。NSCs 比 NCs 的 DNA、酪氨酸、蛋氨酸、腺嘌呤、苯基丙氨酸、胡萝卜素、酰胺 III 等含量更丰,其中以胡萝卜素和酰胺 III 的相对含量最高。本文从光谱学角度分析 NSCs 与 NCs 的光谱区别,以为临床应用提供一定的实验参考依据。

关键词:拉曼光谱;神经干细胞;神经细胞

中图分类号: O436 **文献标识码:** A

Raman spectral analysis of NSCs and NCs

HAN Zhong-mei¹, DIAO Zhen-qi¹, FU Li², WANG Biao¹

CHEN Chang-qing¹, RAO Feng-fei¹, ZHANG Jian-min¹, TANG Wei-yue¹

(1. The College of Physics and Engineering of Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;

2. Zhengzhou Railway Vocational & Technical College, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: Spectroscopy is a new technique to study stem cells. It can provide a certain reference for clinical application. We cultured NSCs and NCs in vitro respectively and achieved their Raman spectra using a laser confocal microscope Raman spectrometer. The results show that there is difference between 646 cm^{-1} , 2917 cm^{-1} of NSCs and 652 cm^{-1} , 2908 cm^{-1} of NCs. There are more thylakoid of DNA and casein in NCs nuclei while NSCs nuclei has some NO_2 which does not exist in NCs. NSCs seems to contain more DNA, tryptophan, adenine, carotenoid, amide III etc than NCs. This paper analyzes difference of Raman spectra of neural stem cells and neural cells in spectroscopy terms in order to provide some experimental reference for clinical application.

Key words: Raman spectra; neural stem cells; neural cells

1 引言

干细胞是一类具有自我复制能力的多潜能细胞,在一定条件下,可以分化成多种功能细胞^[1]。

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)是指分布于神经系统的具有自我更新和分化潜能的干细胞^[2]。用 NSCs 移植治疗神经退行性疾病是充满希望与挑战的生物工程,有着广泛的应用前景^[3]。近年来,利用拉曼光谱技术在细胞的结构、功能及细胞凋亡等方面的研究取得了迅速发展,该技术能在一定程

度上反映细胞内各种类型物质的成分、构象和含量变化^[4]。利用拉曼光谱技术来研究神经细胞(neural cells, NCs)与神经干细胞(NSCs)的光谱区别,目前国内尚无报道。本文利用体外培养 NSCs, NCs 和拉曼光谱技术,从光谱学角度分析 NSCs 与 NCs 的光谱区别,为临床应用提供一定的实验参考依据。

作者简介:韩忠美(1983-),女,硕士研究生。E-mail: hahah-an0312@163.com

收稿日期:2010-12-07;修订日期:2010-12-30

2 材料与方法

2.1 实验材料与仪器

新生 SD 大鼠购于河南省动物实验中心。DMEM/F12 培养基、B₂₇、胎牛血清、PBS 工作液、细胞消化液、双抗青链霉素、95% 乙醇等。37 °C, 5% CO₂ 培养箱(法国 Jouan 公司)、倒置显微镜及操作系统(日本 OLYMPUS 公司)、低速离心机(上海安亭科学仪器厂)、激光共焦显微拉曼光谱仪(英国 Renishaw 公司)等。

2.2 细胞培养

NSCs 培养与传代:常规分离新生 SD 大鼠的脑组织, PBS 液漂洗 3 遍后, 剪成糊状, 加入 PBS 液, 用抛光的长颈吸管反复吹打成单细胞悬液, 用 400 目过滤网过滤, 800 rpm, 6 min 离心, 去上清, 用无血清培养基(DMEM/F12 + 2% B₂₇ + 双抗青链霉素)将细胞定容为 5×10^5 /mL 浓度, 将 10 mL 细胞悬液接种于培养面积为 75 cm² 的细胞培养瓶中, 5% CO₂ 培养箱中 37 °C 培养。每隔 3.5 d 半量换液, 7 ~ 9 d 传代。

NCs 培养与传代:常规分离新生 SD 大鼠的脑组织, PBS 液漂洗 3 遍后, 剪成糊状, 加入 PBS 液, 用抛光的长颈吸管反复吹打成单细胞悬液, 用 400 目过滤网过滤, 800 rpm, 6 min 离心, 去上清, 用培养基(DMEM/F12 + 10% 胎牛血清 + 双抗青链霉素)接种培养, 每 3 d 换液, 7 d 传代。培养的 NSCs 与 NCs 如图 1、图 2 所示。



图 1 NSCs 镜下照片(100 倍)

Fig. 1 neural stem cells in culture(×100)

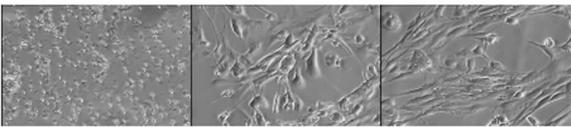


图 2 NCs 镜下照片(100 倍)

Fig. 2 neural cells in culture(×100)

2.3 拉曼光谱的采集

将细胞用消化液消化后, PBS 液冲洗离心 4 次, 95% 乙醇固定于载玻片, 略干时 PBS 液冲洗数次后, 用 Renishaw 激光共焦显微拉曼光谱仪采集细胞的拉曼光谱。拉曼光谱仪参数设定为激发波长 514 nm, 光谱扫描范围 500 ~ 2000 cm⁻¹ 扫描时间 20 s, 采集次数 1 次。

3 实验结果与讨论

采集的 NSCs 与 NCs 拉曼光谱图如图 3、图 4 所示。

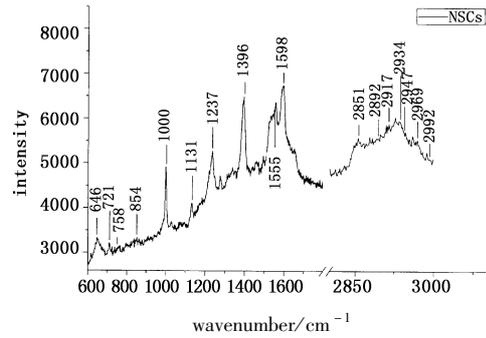


图 3 NSCs 拉曼光谱图

Fig. 3 Raman spectra of neural stem cells

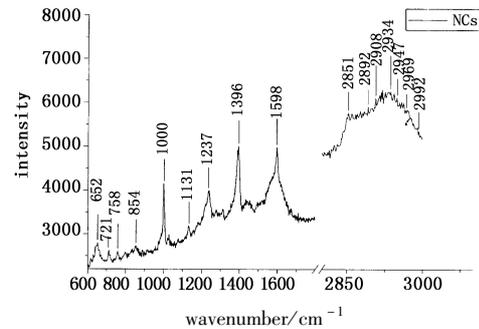


图 4 NCs 拉曼光谱图

Fig. 4 Raman spectra of neural cells

3.1 拉曼光谱的指认

通过对 NSCs 与 NCs 的拉曼特征峰的分析, 对各个峰所对应的可能物质进行了初步指认, 归属如表 1 所示^[5-9]。

表 1 细胞拉曼光谱特征峰归属

Tab. 1 peak position and assignment of Raman spectra

峰值位置/cm ⁻¹	物质归属初步指认
646	酪氨酸
652	蛋氨酸边链
721	腺嘌呤
758	B 型 DNA 胸腺嘧啶
854	酪氨酸标记
1000 ~ 1002	苯基丙氨酸对称振动
1131	脂肪 C - C 伸缩振动
1210	苯基丙氨酸 C - C ₆ H ₅ 伸缩振动、色氨酸
1236	酰胺 III
1395	C - H 变形振动
1555	NO ₂
1598	类胡萝卜素的 C = C
2851, 2892	C - H 伸缩振动
2908	脂质碳氢链
2917	葡萄糖的 C - H 键
2934	C - H 伸缩模型
2947	CH ₂ 伸缩模型
2969	终端 CH ₃ 基团的 C - H 伸缩振动
2992	C = C - H

3.2 拉曼光谱的分析

从图3可以看到: NSCs与NCs的拉曼特征峰主要出现在 $600 \sim 1800 \text{ cm}^{-1}$ 的波数范围和 $2850 \sim 3000 \text{ cm}^{-1}$ 波数范围内,拉曼光谱的峰位和相对峰强存在一定差异。

3.2.1 拉曼光谱峰位的分析

NSCs的拉曼特征峰 646 cm^{-1} 与NCs的拉曼特征峰 652 cm^{-1} 处存在较大差异。由酪氨酸转变为蛋氨酸边链峰可能是细胞核内相应的蛋白质含量的变化。这一变化过程以及变化的关键时间点,需要在进一步的神经干细胞分化为神经细胞的过程中,采集各代的拉曼光谱,进行比对分析,这也是我研究组下一步的主要研究工作。特别是 646 cm^{-1} 不能作为NSCs独有的特征峰用来鉴别和确认NSCs,将是我研究组未来的重要工作。

NCs的拉曼谱 758 cm^{-1} , 854 cm^{-1} 峰相对NSCs拉曼谱明显,说明神经细胞B型DNA胸腺嘧啶和酪氨酸含量相对更丰。NSCs的拉曼谱中有明显的 1555 cm^{-1} 处的峰位,NCs基本上没有,说明神经干细胞细胞核中具有 NO_2 成分而神经细胞细胞核中较少或没有。

NSCs的拉曼特征峰 2917 cm^{-1} 与NCs的拉曼特征峰 2908 cm^{-1} 处存在较大差异。由脂质碳氢键改变为葡萄糖的C-H键,说明神经干细胞向神经细胞分化的过程中是核中脂类物质向糖类物质转化的过程,此说法是否正确,还需要进一步的实验观察以及生物化学理论和实验的支持。而NSCs与NCs在低波数段的拉曼峰 721 cm^{-1} , 1000 cm^{-1} , 1131 cm^{-1} , 1237 cm^{-1} , 1396 cm^{-1} , 1598 cm^{-1} 以及高波数段的 2851 cm^{-1} , 2892 cm^{-1} , 2934 cm^{-1} , 2947 cm^{-1} , 2969 cm^{-1} , 2992 cm^{-1} 的峰位基本上没有变化,说明神经干细胞分化为神经细胞的过程中,细胞核内部酰胺Ⅲ、C-H键、类胡萝卜素、 CH_2 键、 CH_3 键的结构不发生明显变化。

3.2.2 拉曼光谱峰强的分析

由图3、图4所示,低波数段 $600 \sim 1800 \text{ cm}^{-1}$ NSCs的拉曼峰值明显比NCs高,这是由于镜下观察,神经干细胞的细胞核体积较神经细胞的要大,说明DNA、酪氨酸、蛋氨酸、腺嘌呤、苯基丙氨酸、胡萝卜素等含量更丰。高波数段 $2850 \sim 3000 \text{ cm}^{-1}$ 时,NSCs与NCs波峰强度趋于接近,从图3、图4可见,NSCs的拉曼曲线相对较低,但差距不大,这是因为NCs中的某些相关蛋白和糖类含量比NSCs相对稍高^[10]。NSCs与NCs在低波数段的拉曼峰 721 cm^{-1} ,

1000 cm^{-1} , 1131 cm^{-1} , 1237 cm^{-1} , 1396 cm^{-1} , 1598 cm^{-1} 的峰位基本上没有变化,但相对强度差距较大。各相关峰位相对强度比如表2所示。相对强度比的变化曲线如图5所示。

表2 各峰位相对强度比

Tab.2 intensity ratios of neural stem cells and neural cells

峰值位置/ cm^{-1}	$I_{\text{NSCs}}/I_{\text{NCs}}$
721	1.166
1000	1.184
1131	1.288
1237	1.322
1396	1.297
1598	1.353

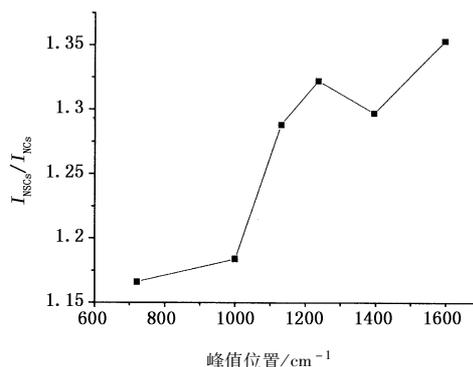


图5 相对强度比的变化曲线

Fig.5 relative intensity ratio of $I_{\text{NSCs}}/I_{\text{NCs}}$

从相对强度变化曲线中可以看到,NSCs细胞核中类胡萝卜素、酰胺Ⅲ与NCs相比,相对含量更高。

4 结论

综上所述,利用体外培养NSCs、NCs和拉曼光谱技术,得到的NSCs与NCs的拉曼光谱存在差异,主要表现在NSCs的拉曼峰 646 cm^{-1} , 2917 cm^{-1} 与NCs的拉曼峰 652 cm^{-1} , 2908 cm^{-1} 处存在较大差异;NCs核中B型DNA胸腺嘧啶和酪氨酸含量相对更丰,而NSCs核中具有 NO_2 成分而NCs核中较少或没有;NSCs比NCs的DNA、酪氨酸、蛋氨酸、腺嘌呤、苯基丙氨酸、胡萝卜素、酰胺Ⅲ等含量更丰。说明从光谱学角度研究NSCs与NCs,是一个新的干细胞研究方法,能够为临床应用提供一定的实验参考依据。

参考文献:

- [1] Watt M, Brigid H. Out of Eden: stem cells and their niches[J]. Science, 2000, 287: 1427-1430.
- [2] Kornblum HI. Introduction to neural stem cells [J].

- Stroke,2007,38(Suppl2):810-816.
- [3] Zhang Jiashu, Jia Qian. General situation and expectation of stem cell biology research [J]. Journal of Biology, 2001, 18: 11-13. (in Chinese)
张家树, 贾茜. 干细胞生物学研究概况与展望 [J]. 生物学杂志, 2001, 18: 11-13.
- [4] Petry R, Schmit M, Popp J. Raman spectroscopy-a prospective tool in the life science [J]. Chemphyschem, 2003, 4(1): 14-30.
- [5] I Notingher, et al. In situ spectroscopic study of nucleic acids in differentiating embryonic stem cells [J]. Vibrational Spectroscopy, 2004, 35: 199-203.
- [6] M S Noh, et al. Magnetic surface-enhanced raman spectroscopic (M-SERS) dots for the identification of bronchioalveolar stem cells in normal and lung cancer mice [J]. Biomaterials, 2009, 30: 3915-3925.
- [7] Chan, et al. Label-free separation of human embryonic stem cells (hESCs) and their cardiac derivatives using raman spectroscopy [J]. Anal Chem, 2009, 81(4): 1324-1331.
- [8] Pully, et al. Microbioreactors for raman microscopy of stromal cell differentiation [J]. Anal Chem, 2010, 82: 1844-1850.
- [9] Qi Jian, Guo Zhengyuan, Zhang Guangshui, et al. Raman spectra study on radiation damage in EC9706 cells by ^{60}Co γ rays [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2009, 29: 1896-1900. (in Chinese)
齐健, 郭郑元, 张广水, 等. 利用拉曼光谱研究 ^{60}Co γ 射线对 EC9706 细胞的辐射损伤 [J]. 光谱学与光谱分析, 2009, 29: 1896-1900.
- [10] Wang Juguang, Xiang Peng, Yu Xinbing. Proteomic analysis of mesenchymal stem cells differentiation into adipocytes [J]. Chin J Public Health, 2008, 24: 1204-1206. (in Chinese)
王菊光, 项鹏, 余新炳. 间充质干细胞分化为脂肪细胞蛋白组学分析 [J]. 中国公共卫生, 2008, 24: 1204-1206.