文章编号：1000-8608(2008)06-0811-08

神经球内神经干/祖细胞活性与代谢研究

刘天庆*，戴明舒，葛　丹，李香琴，马学虎，崔占峰

（大连理工大学 干细胞与组织工程研究室，辽宁 大连　116024）

摘要： 为定量研究静态无血清悬浮培养的神经球内神经干/祖细胞的活性及代谢情况，取孕14 d的小鼠胚胎，从海马脑组织分离出神经干/祖细胞，培养过程中跟踪测定神经球直径的分布变化，利用CCK-8法测定活细胞数，同时对培养上清进行葡萄糖、乳酸、谷氨酰胺和氨的定量测定，并对相关细胞代谢动力学参数进行计算和分析. 结果表明在培养过程中，神经球内细胞活性及细胞代谢均随着球直径的增加而减弱. 在神经球平均直径为100 μm左右，培养基中葡萄糖、谷氨酰胺浓度分别为36.38 mmol/L和1.33 mmol/L时，球心细胞生长开始受到抑制；而当神经球直径主体分布于100～150 μm，培养基中葡萄糖浓度为31.11 mmol/L、谷氨酰胺浓度为1.15 mmol/L时，神经球内部细胞死亡数开始大于增殖数，同时细胞代谢降低到很低水平. 表明随着神经球直径的增加而造成的传质困难对于其内部细胞的活性和代谢有重要影响.

关键词： 神经干细胞；神经球；代谢；传质

中图分类号： R782　　**文献标志码：** A

0　引　言

近年来神经干/祖细胞因其多向分化潜能及对神经系统的修复能力，受到研究者的极大关注. 神经干/祖细胞体外培养主要采用静态悬浮的方式[1～5]，利用转瓶及反应器扩增神经干细胞尚不能像其他细胞那样取得令人满意的效果. 究其原因，关键是人们对于神经干细胞体外生长的代谢状况没有充分了解，不能针对神经干细胞的生长特性合理设计反应器. 因此，对神经干细胞体外生长的代谢特点进行研究成为当务之急.

对于普通细胞代谢参数测量方面的研究已经比较成熟，而且利用细胞代谢来评价和改进生物反应器也逐渐成为反应器研究的常见模式[6～8]. 但是神经干细胞的研究时间较短，而且神经干细胞在体外成球生长、异质性强的特点给其代谢参数的测量带来了较大困难，因而对于神经干细胞代谢方面的研究很有限. 近来，有研究人员开始对神经干细胞的糖代谢进行定性研究[9]，也有对由神经干细胞诱导分化得到的细胞进行代谢研究的报道[10]，但对悬浮生长的神经球进行系统的定量代谢分析仍未见报道.

与其他种类细胞相比，葡萄糖为神经细胞提供的能量比例最高，并可为细胞生长提供充足的碳源. 同样，谷氨酰胺作为一种细胞生长必需的氨基酸，为细胞提供了氮源，并参与嘌呤、嘧啶、多肽和蛋白的合成[6]. 此外，神经干/祖细胞培养中使用的无血清培养基多属于高糖高谷氨酰胺类，在其代谢过程中会产生大量的有毒代谢副产物——乳酸和氨. 因此葡萄糖、谷氨酰胺以及乳酸和氨是研究神经干细胞代谢的几种重要物质.

在细胞培养过程中，营养物质的耗尽以及毒副产物的累积是影响细胞生长和增殖的主要原因，并且，悬浮培养的神经干/祖细胞体外有成球生长的特性，随着神经球尺寸的增长，营养物质渗入逐渐减少，会使得神经球内形成暗黑的核心，内部较易出现调亡、坏死以及吞噬细胞[11]，甚至可能出现神经球中空的情况[12]，这使得培养基中营养物质的浓度变化及其在神经球内的传质状况成为影响神经球内细胞生长的重要因素.

收稿日期： 2006-12-10；　**修回日期：** 2008-09-01.
基金项目： 国家自然科学基金资助项目(30670525).
作者简介： 刘天庆*(1959-)，男，教授，博士生导师，E-mail：liutq@dlut.edu.cn.

本文从胎龄为14 d的小鼠端脑分离出小鼠神经干/祖细胞,并在无血清培养基中悬浮培养.对培养细胞进行鉴定后,又对其对葡萄糖、谷氨酰胺的代谢情况进行研究,结合神经球直径变化进行分析,以期对此细胞的代谢特性有进一步的了解,并为优化体外培养条件、设计神经干细胞反应器以及神经球内部微结构研究提供依据.

1 材料和方法

1.1 细胞培养液

DMEM(Sigma)、F12(Gibco)和RPMI-1640(Sigma)以1∶1∶1比例混合作为基础培养基,添加生长因子及其他血清替代物构成神经干细胞的无血清培养基.其中,EGF和bFGF(Santa Cruz)分别为20 ng/mL和10 ng/mL;N_2添加剂(Gibco);Glucose(Gibco)76 mmol/L;GlutaMAX-1(Gibco)2 mmol/L.使用$NaHCO_3$(Sigma)调节pH至7.2.

1.2 仪 器

倒置显微镜(OLYMPUS IX70,日本);酶标仪(TECAN,瑞士);半自动生化分析仪(上海安泰仪器有限公司).

1.3 神经干细胞的培养

取孕14 d小鼠(昆明鼠,购自大连医科大学实验动物中心),引颈处死.取其海马组织,剪成约1 mm^3的组织碎块.加入Accutase™(Sigma)酶解,用吸管吹打组织匀浆20次左右,使其成为单细胞悬液.离心去酶后,将细胞重悬,计数,以1.0×10^5 cells/mL的密度接种于培养瓶中进行悬浮培养;悬浮培养的细胞在5～7 d后长成直径约200 μm的神经球,以Accutase™酶解传代.传代接种密度为2×10^5 cells/mL.

1.4 神经干细胞的定性检测

1.4.1 Nestin/Hoechst双染 实验方法参考文献[13].将悬浮培养的神经干细胞解离成单细胞,接种于经包被处理并置于24孔板中的圆形玻片上培养24～48 h.PBS清洗后,加入Nestin一抗(Chemicon)孵育,清洗;加入FITC交联的荧光二抗(Santa Cruz),PBS清洗;随后再加入Hoechst(Sigma),使其终浓度为10 ng/mL,孵育15 min,PBS清洗,甘油封片,荧光显微镜下观察.

1.4.2 BrdU荧光染色 实验方法如文献[14].将悬浮培养的神经干细胞解离成单细胞,接种于经包被处理并置于24孔板中的圆形玻片上培养24 h.在培养基中加入终浓度为30 μg/mL的溴化脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo-2-deoxyuridine,BrdU,Sigma),培养24 h.结束培养后吸出培养基,PBS清洗;加入4%的多聚甲醛覆盖圆形玻片表面,固定30 min后PBS清洗;用10%羊血清封闭20 min后用PBS清洗;加入100 ℃甲酰胺变性5 min,PBS清洗;加入anti-BrdU(Sigma)的单克隆抗体37 ℃孵育1.5 h,加入罗丹明交联荧光二抗(Santa Cruz)室温避光孵育1 h,甘油封片,荧光显微镜下观察.需要标注所用药品的来源.

1.5 生长曲线的测定

取足够量的神经干细胞离心后酶解吹散,台盼兰计数,配制8～10种细胞密度的悬液,各取100 μL加入96孔板中,同时加入10 μL CCK-8(日本同仁化学研究所),37 ℃孵育4 h后在酶标仪上测定吸光度值,做出CCK-8标准曲线.

每隔12 h从悬浮培养的神经干细胞中取100 μL细胞悬液接种到96孔板中,加入10 μL CCK-8,37 ℃孵育4 h后在酶标仪上测定吸光值.其吸光值与细胞的数量呈线性关系,根据吸光值可以得到相应的细胞数量.以细胞生长时间为横坐标,细胞数为纵坐标作细胞的生长曲线.

1.6 神经球直径分布

在细胞培养至12、36、60、72 h时,将所培养细胞置于显微镜下观察.任取10个不同视野,进行次级神经球直径的统计,统计范围分为0～50、50～100、100～150 μm.

1.7 葡萄糖、乳酸、谷氨酰胺、氨浓度曲线测定

在细胞培养过程中,每12 h从细胞培养液中取出1 mL左右进行葡萄糖、乳酸、谷氨酰胺及氨浓度的测量.

葡萄糖、乳酸、谷氨酰胺的浓度均由半自动生化分析仪配合相应的定量试剂盒(南京建成公司)直接测定.氨浓度用靛酚蓝比色法测定.

1.8 参数计算方法

细胞比生长速率

$$\mu=\frac{\mathrm{d}Q(t)}{Q(t)\mathrm{d}t}$$

底物比消耗速率

$$q_{glu} = V\frac{dc_{glu}}{Q(t)dt};\ q_{gln} = V\frac{dc_{gln}}{Q(t)dt}$$

产物比生成速率

$$P_{lac} = V\frac{dc_{lac}}{Q(t)dt};\ P_{NH_3} = V\frac{dc_{NH_3}}{Q(t)dt}$$

细胞得率系数

$$Y_{\mu/q_{glu}} = \frac{\mu}{q_{glu}};\ Y_{\mu/q_{gln}} = \frac{\mu}{q_{gln}}$$

产物得率系数

$$Y_{lac/glu} = \frac{P_{lac}}{q_{glu}};\ Y_{NH_3/gln} = \frac{P_{NH_3}}{q_{gln}}$$

其中 Q 为活细胞数；V 为培养体积，L；c 为浓度，mmol/L.

1.9　统计分析

数据处理全部使用 Origin 软件，生长曲线及葡萄糖浓度等曲线中的数据均为 3 组平行实验所得数据的平均值±方差.

2　结果与讨论

2.1　神经干细胞的生物学特性

2.1.1　细胞培养及形态观察　从胚胎小鼠脑组织海马中分离的细胞用无血清培养基培养 2 d 后可见神经球的出现，随着时间的推移神经球的直径迅速增加，至 5～6 d 后，可形成很多的悬浮细胞克隆，呈规则球形，折光性强，平均直径约为 150 μm. 培养的神经球可连续传代获得大量克隆细胞. 图 1 为继代培养第三代的神经干细胞球.

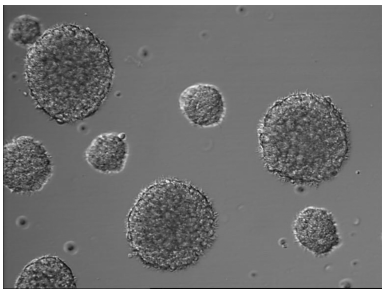

图 1　第三代神经干细胞形成的神经球（微分干涉，5 d）

Fig. 1　Neurospheres formed by the Passage3 neural stem cells (Dic, 5 d)

2.1.2　神经干细胞生物学特性及其增殖能力　Nestin（巢蛋白）是神经干细胞的主要标识物之一，是纤维骨架蛋白家族成员之一，属于第Ⅳ类中间丝蛋白. 认为这种蛋白是神经系统前体细胞的标记蛋白，并将其命名为神经上皮干细胞蛋白. 它的表达起始于神经胚形成时，当神经细胞的迁移基本完成后，Nestin 的表达量开始下降，并随着神经干细胞的分化完成而停止表达. Nestin 作为早期原始神经细胞的标志物，已被广泛用于神经干细胞的鉴定[15]. Hoechst 可与细胞核 DNA 以非嵌入式结合，进而标记细胞核.

干细胞增殖、自我更新能力是其基本特征之一. 细胞增殖标记物 BrdU 为胸腺嘧啶的衍生物，可代替胸腺嘧啶在 DNA 合成期（S 期），活体注射或细胞培养加入，而后利用抗 BrdU 单克隆抗体，荧光染色，显示增殖细胞.

将神经球解离成单细胞，进行 Nestin/Hoechst双染，及 BrdU 染色，结果如图 2、3 所示. 从图中可以看出，本实验悬浮培养的细胞中有大量的细胞呈 Nestin 阳性表达，同时显现 BrdU 阳性，有增殖能力，具备神经干细胞生物学特征，可以用于以后的代谢参数的测定.

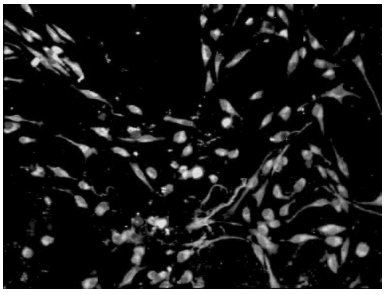

图 2　Nestin/Hoechst 荧光双染

Fig. 2　Nestin/Hoechst fluorescence double stain

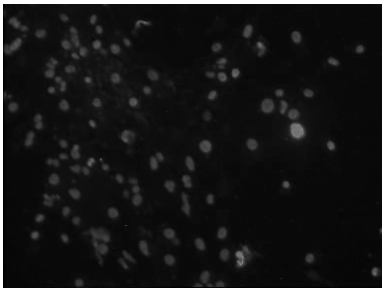

图 3　BrdU 荧光染色

Fig. 3　BrdU fluorescence stain

2.2　神经球内细胞活性与直径的关系

在细胞的连续培养中，营养物质的耗尽以及

有毒副产物的积累是细胞持续快速增长的最大障碍.神经干细胞体外悬浮培养时成球生长,并且随着时间的增长,神经球直径逐渐增大.处于神经球内部的细胞会随着所处位置的逐步深入而得到逐步减少的营养供给,其中包括葡萄糖、谷氨酰胺以及生长因子和溶解氧等.因此,有文献报道[11]当神经球在直径长至 150～200 μm 时,球心出现大量坏死细胞,进而引起神经球内大量细胞死亡.因此研究神经球增长过程中其直径与细胞活性间的对应关系非常重要.

本实验对连续培养 5 d 的神经干/祖细胞进行了生长曲线以及神经球直径的测量,实验结果如图 4、5 所示.可以看出在连续培养的前 80 h 内,细胞呈现典型的对数生长状态,细胞数量约增加了 3 倍;同时,神经球直径由最初的主要分布于 0～50 μm 转为 50～100 μm.这些都说明,在 0～80 h 细胞球直径小于 100 μm 时,神经球内细胞的生长状态相对比较稳定.而在 80～108 h 期间,神经球直径的主体分布达到了 100～150 μm,神经干/祖细胞的数量呈现出快速下滑的趋势.细胞数量在度过高峰期后急剧减少,这是在其他细胞的生长曲线中很少出现的现象.如前文所述,推测这是神经干/祖细胞特殊的生长方式引起的.由此可见,神经干细胞连续生长至此时,细胞球内部的营养供给或代谢产物排出已经明显不足,造成了球内神经干细胞大量、快速的死亡.

另外,本文进行了比生长速率的计算,计算结果见图 4.比生长速率更直接地表明了细胞的增殖状况.从比生长速率来看,在 0～48 h 内,神经

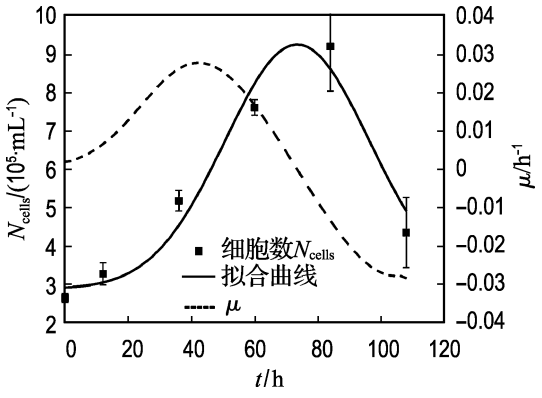

图 4 细胞生长曲线及对应的比生长速率

Fig. 4 Growth curve and the specific growth rates of NSCs

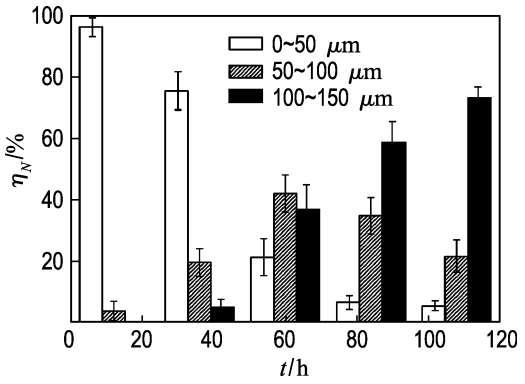

图 5 神经球直径分布

Fig. 5 Diameter distribution of neurospheres

球直径主体分布于小于 100 μm,此时比生长速率持续增大,细胞的增殖能力呈现增强趋势;在 48～72 h 内,神经球直径主体分布于 100 μm 左右,此时细胞的比生长速率仍然为正值,即细胞仍处于增殖状态,但增殖能力已经逐渐降低;直至约 80 h 之后,神经球直径主体分布大于 100 μm,细胞比生长速率出现负值,表明此时神经干细胞数量开始减少.

分析比生长速率的变化,有理由相信,处于神经球内部的细胞早在比生长速率开始减小时,即第 48 h、神经球直径主要分布于 50～100 μm 的时候,就已经受到营养物质供给的限制,从而造成了细胞活力减小,增殖能力降低,甚至细胞死亡.其后,这种情况随着神经球直径的增加而恶化,最终在 80 h 左右,显现出整体细胞数的减少.

需要指出的是,在神经球直径增至某一尺度之后其内部细胞出现坏死可能是葡萄糖和谷氨酰胺以及溶解氧等供应不足,也可能是氨等代谢产物积累过多造成的.因此分析和测定这些物质在培养基中以及神经球内的浓度分布是关键.本文以下主要测定和计算了培养基中相关组分的浓度变化以及神经球细胞对这些物质的代谢参数.

2.3 葡萄糖/乳酸代谢参数

动物细胞培养中葡萄糖的代谢途径[6]主要为①经糖酵解后,不完全氧化生成乳酸,1 mol 葡萄糖生成 2 mol ATP;②经三羧酸循环完全氧化生成二氧化碳和水,1 mol 葡萄糖生成 36～38 mol ATP;③经磷酸戊糖途径参与核酸代谢.

本文所测定的神经干细胞球生长过程中对葡萄糖消耗和乳酸的生成情况如图 6、7 所示.初始

一段时间内葡萄糖浓度由 40.8 mmol/L 缓慢减小，经过一段快速下降期，最后慢慢缓和至 27.3 mmol/L. 对应的，葡萄糖的比消耗速率则呈现出先增长后降低的趋势，最高点达到 3.27×10^{-10} mmol/(cell·h)，最低点为 0.15×10^{-10} mmol/(cell·h). 图 7 表明在整个培养过程中，乳酸含量的增加呈现出逐步减缓的趋势，由最初的 0 增至 7.4 mmol/L，同时，乳酸的比生成速率则从 4.00×10^{-10} mmol/(cell·h)迅速下降，然后缓慢平稳于 0.31×10^{-10} mmol/(cell·h).

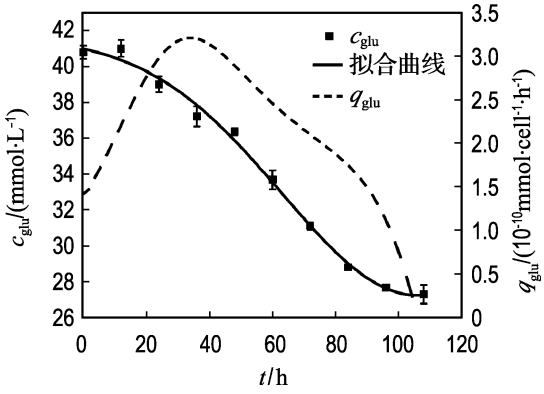

图 6　葡萄糖浓度及其比消耗速率曲线

Fig. 6　Glucose concentration curve and its specific consuming rates

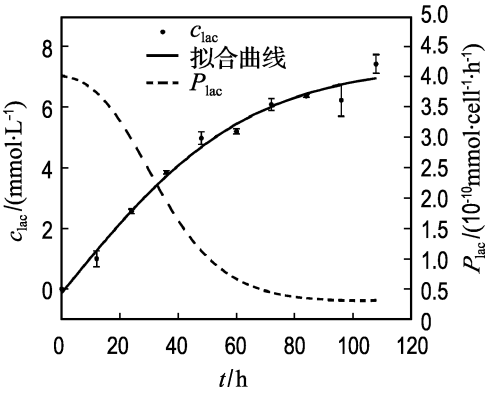

图 7　乳酸浓度及其比生成速率曲线

Fig. 7　Lactic acid concentration curve and its specific productive rates

在 0～36 h，神经球直径主体分布小于 50 μm 期间，葡萄糖的比消耗速率快速增大，这和比生长速率的变化趋势一致，说明在此期间，细胞大量增殖，生长迅速，需要大量的能量供给，而此时培养基中的葡萄糖浓度高，神经球直径小，传质迅速，不存在浓度抑制，因而葡萄糖的比消耗速率呈现了大幅上升的趋势. 但是另一方面，高浓度的葡萄糖有利于细胞通过糖酵解生成乳酸的代谢途径，导致大部分葡萄糖未被完全利用，且乳酸的比生成速率较高. 在随后的培养过程中，神经球直径的主体分布逐渐转移至 100 μm 以上，细胞的比生成速率减小，单位细胞所需的能量减少，并且随着培养基内葡萄糖浓度的降低及神经球直径的增大，神经球内的葡萄糖浓度更为降低，这导致了葡萄糖的比消耗速率缓慢下降. 乳酸的产生受到葡萄糖浓度的直接影响，因而随着葡萄糖浓度的下降，乳酸的比生成速率减小.

2.4　谷氨酰胺/氨代谢参数

谷氨酰胺的代谢首先是在谷氨酰胺酶作用下生成谷氨酸和氨，然后在谷氨酸脱氢酶或谷氨酸转氨酶的作用下生成 α-酮戊二酸和氨或 α-酮戊二酸和丙氨酸，从而进入三羧酸循环. 脱氢反应和转氨反应中谷氨酰胺的能量得率分别为每 mol gln 27 mol 和 9 mol ATP[16]；另外，谷氨酰胺在培养基中可以水解生成氨，有文献报道[6]其降解反应符合一级动力学方程.

神经干细胞球生长过程中培养基内谷氨酰胺消耗和氨的生成情况如图 8 和图 9 所示. 可以看出，谷氨酰胺的浓度变化呈现出平稳下降的趋势，由初始的 2.09 mmol/L 最终降至 0.8 mmol/L. 对应的，其比消耗速率整体趋势逐渐减小，由5.02×10^{-11} mmol/(cell·h)减至 1.67×10^{-11} mmol/(cell·h)，并且在初始 24 h 内下降的趋势

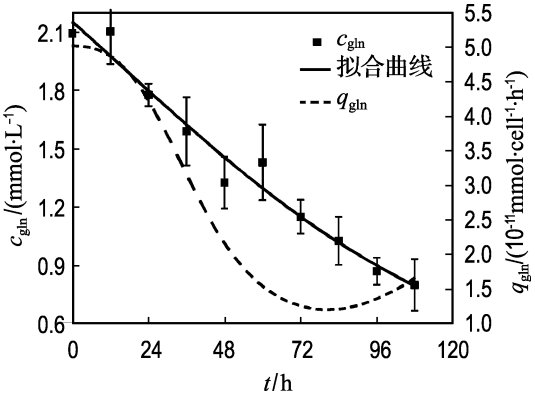

图 8　谷氨酰胺浓度及其比消耗速率曲线

Fig. 8　Gln concentration curve and its specific consuming rates

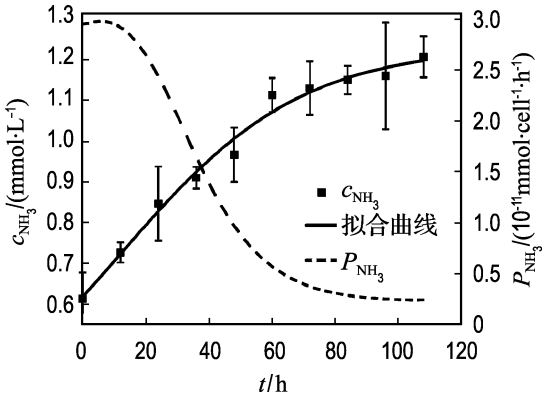

图 9 氨浓度及其比生成速率曲线

Fig. 9 NH_3 concentration curve and its specific productive rates

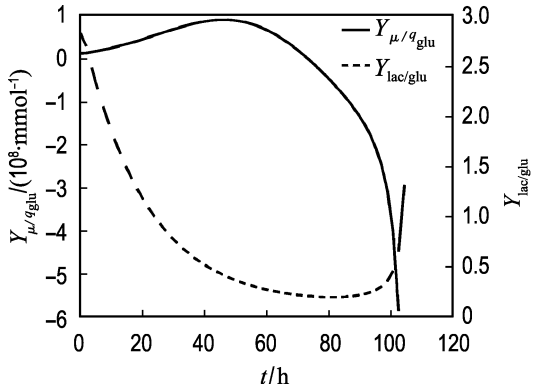

图 10 细胞对葡萄糖的得率系数及乳酸对葡萄糖的得率系数曲线

Fig. 10 Curves of $Y_{\mu/q_{glu}}$ and $Y_{lac/glu}$

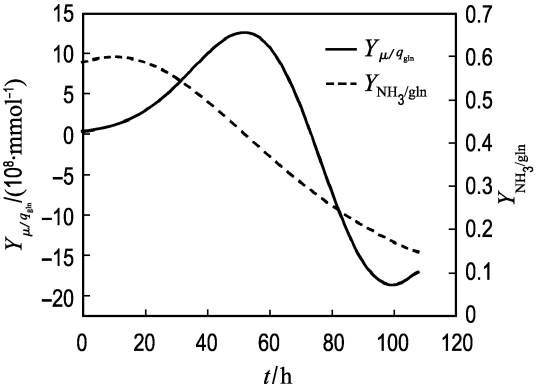

图 11 细胞对谷氨酰胺的得率系数及氨对谷氨酰胺的得率系数曲线

Fig. 11 Curves of $Y_{\mu/q_{gln}}$ and $Y_{NH_3/gln}$

较为缓和. 氨浓度的走势从图 9 中看表现为从 0 开始迅速增加，达到 1.11 mmol/L 后趋于稳定；同时其比生成速率逐渐降低，从峰值 2.95×10^{-11} mmol/(cell·h)快速下降至 0.25×10^{-11} mmol/(cell·h)，达到最低点.

谷氨酰胺在细胞培养中既参与生物量的合成，又参与能量代谢. 由于谷氨酰胺的初始浓度在 2 mmol/L 左右，与初始葡萄糖的浓度相比较低，葡萄糖酵解已经提供了大量的能量，细胞对谷氨酰胺的利用受到限制，谷氨酰胺代谢多为不完全氧化途径，代谢生成较多的氨. 随后细胞的比生长速率迅速降低，生物量合成减少，且神经球直径逐渐增大，谷氨酰胺传质出现困难，导致谷氨酰胺的比消耗速率继续减小，但此时葡萄糖的浓度也在减小，供能减少，因而需要完全氧化谷氨酰胺补充供能，从而生成较少的氨[17,18].

2.5 细胞得率系数及产物得率系数

如图 10、11 所示，整个连续培养过程中，细胞对葡萄糖和谷氨酰胺的得率系数有着相似的变化趋势：先逐步增加，48 h 时达到峰值(0.88×10^8 mmol^{-1}、12.19×10^8 mmol^{-1})，随后快速下降，至 72 h 出现负值. 在产物得率系数中，乳酸对葡萄糖的得率系数变化呈现出不断减小的趋势，变化范围在 2.80～0.22；而氨对谷氨酰胺的得率系数则从峰值 0.59 后逐步下降至最低点 0.15.

结合比生长速率结果和神经球直径变化进行分析，在 0～48 h 内，神经球直径主体分布由 10 μm 增至 50～100 μm，细胞对葡萄糖的得率系数逐步增长，乳酸对葡萄糖的得率系数在显著下降，提示此时细胞对葡萄糖的代谢途径逐步发生转换，由最初的糖酵解占主要部分，逐渐加大了三羧酸循环的比例，从而降低了乳酸的产生，并提供大量的能量参与生物量的合成[8]. 同时，在 48 h 时，培养基中葡萄糖的浓度为 36.38 mmol/L，此浓度为细胞培养中的高糖浓度，因此在 0～48 h 期间，主要是神经球直径的增加导致葡萄糖传质阻碍，减小了神经球内部葡萄糖的浓度，最终引起细胞代谢途径的转化；谷氨酰胺代谢同葡萄糖大体一致，48 h 时，培养基中谷氨酰胺的浓度为 1.33 mmol/L.

在 48～72 h 期间，神经球直径的主体分布由

50 μm 增至 100～150 μm，细胞的比生长速率以及细胞得率系数逐渐减小，说明此时神经球内部的细胞代谢开始受到营养物质的限制，导致细胞活性变弱，增殖能力下降.

在 72 h 之后，随着神经球直径主体分布增至 150 μm 左右，以及培养基中葡萄糖/谷氨酰胺浓度的进一步降低，推测葡萄糖/谷氨酰胺在神经球内的浓度受到传质阻力的影响而快速降低，较低的糖和谷氨酰胺浓度减少了神经球内细胞糖酵解和谷氨酰胺不完全氧化的比例，因此，乳酸和氨的得率系数维持在较低的水平. 另外，结合比生长速率可知，从 72 h 开始，细胞比生长速率出现负值，即球内细胞死亡数目开始大于增殖数目，此时神经球直径主体分布于 100～150 μm，培养基中各物质浓度为葡萄糖 31.11 mmol/L，谷氨酰胺 1.15 mmol/L.

3　结　论

以无血清高糖培养基静态悬浮培养神经干细胞时，神经球内细胞活性及其代谢均随着神经球直径的增加而逐渐变弱. 当培养基中葡萄糖和谷氨酰胺浓度分别降至 36.38 mmol/L 和 1.33 mmol/L、平均直径达到 100 μm 左右时，球心处细胞生长开始受到抑制，建议此时可以进行传代以维持全体细胞活性及状态. 当神经球直径主体分布为 100～150 μm、培养基中葡萄糖浓度为 31.11 mmol/L、谷氨酰胺浓度为 1.15 mmol/L 时，神经球内部细胞死亡数开始大于增殖数.

结合培养基中葡萄糖和谷氨酰胺浓度及对应的两种得率系数，可以认为神经球直径较大而造成的传质困难并不能够通过简单地提高外界培养基内营养物质浓度而解决，因为此时神经球内物质的传递阻力已经成为控制步骤.

参考文献：

[1] REYNOLDS B A, WEISS S. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell [J]. **Developmental Biology**, 1996, **175**:1-13

[2] SVENDSEN C N, BORG M G, ARMSTRONG R J E, *et al*. A new method for the rapid and long term growth of human neural precursor cells [J]. **Journal of Neuroscience Methods**, 1998, **85**:141-152

[3] GRITTI A, PARATI E A, COVA L, *et al*. Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor [J]. **Journal of Neuroscience**, 1996, **16**(3):1091-1110

[4] CAI J, WU Y, MIRUA T, *et al*. Properties of a fetal multipotent neural stem cell (NEP Cell) [J]. **Developmental Biology**, 2002, **251**:221-240

[5] JOHANSSON C B, MOMMA S, CLARKE D L, *et al*. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system [J]. **Cell**, 1999, **96**:25-34

[6] 张淑香，李东晓，朱明龙，等. 杂交瘤细胞流加培养中葡萄糖和谷氨酰胺的代谢控制[J]. 化工学报，2004，**55**(2):248-252

[7] 辛　艳，杨　艳，李　强，等. 谷氨酰胺在杂交瘤细胞培养中的降解与代谢[J]. 生物工程学报，2001，**17**(4):478-480

[8] 李东晓，张淑香，朱明龙，等. 葡萄糖和谷氨酰胺浓度对杂交瘤细胞生长代谢的影响[J]. 华东理工大学学报，2003，**29**(4):359-362

[9] HORIE N, MORIYA T, MITOME M, *et al*. Lowered glucose suppressed the proliferation and increased the differentiation of murine neural stem cells in vitro [J]. **FEBS Letters**, 2004, **571**:237-242

[10] ABE T, TAKAHASHI S, SUZUKI N. Metabolic properties of astrocytes differentiated from rat neurospheres [J]. **Brain Research**, 2006, **1101**:5-11

[11] MILOSEVIC J, STORCH A, SCHWARZ J. Spontaneous apoptosis in murine free-floating neurospheres [J]. **Experimental Cell Research**, 2004, **294**:9-17

[12] MOELLER M L, DINITRIJECICH S D. A new strategy for phenotype marker antigens in hollow neurospheres [J]. **Journal of Neuroscience Methods**, 2004, **139**:43-50

[13] LAYWELL E D, RAKIC P, KUKEKOV V G, *et al*. Identification of a multipotent astrocytic stem

cell in the immature and adult mouse brain proc [J]. **Proceedings of National Academic Science of USA**, 2000, **97**(25):13883-13888

[14] BEZ A, CORSINI E, CURTI D, *et al*. Neurosphere and neurosphere-forming cells: morpholigical and ultrastructural characterization [J]. **Brain Research**, 2003, **993**:18-29

[15] DAHLSTRAND J, LARDELLI M, LENDAHL U. Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system [J]. **Development of Brain Research**, 1995, **84**: 109-129

[16] LJUNGGREN J, HAGGSTROM L. Catabolic control of hybridoma cells by glucose and glutamine limited fed batch cultures [J]. **Biotechnology Bioengineering**, 1994, **44**(7):808-818

[17] XIE L Z, WANG D I C. Stoichiometric analysis of animal cell growth and its application in medium design [J]. **Biotechnology Bioengineering**, 1994, **43**: 1164-1174

[18] XIE L Z, WANG D I C. Material balance studies on animal cell metabolism using a stoichiometrically based reaction network [J]. **Biotechnology Bioengineering**, 1996, **52**(5):579-590

Study of viability and metabolism parameters of NSPCs

LIU Tian-qing*, DAI Ming-shu, GE Dan, LI Xiang-qin, MA Xue-hu, CUI Zhan-feng

(Stem Cell and Tissue Engineering Laboratory, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: The aim of this study is to understand how the metabolism and viability of the cells in neurospheres changed with the increase of neurospheres′ diameters, the NSPCs (neural stem progenitor cells) were dissociated from the hippocampus tissue of embryonic 14 d (E14) mouse. During the culture, the diameter distribution of neurospheres and the cell viability were detected. Meanwhile, the concentrations of glucose, lactic acid, glutamine and ammonium in the media were measured, and the corresponding cellular metabolic rates were calculated and analyzed. The results show that the cell viability decreases with the increase of neurospheres′ diameters. When the diameter reaches about 100 μm, and the concentrations of glucose and glutamine are 36.38 mmol/L and 1.33 mmol/L, the growing of central cells in neurospheres begins to be inhibited. Furthermore, when the diameter reaches about 100-150 μm, and the concentrations of glucose and glutamine are 31.11 mmol/L and 1.15 mmol/L, the number of dead cells inside neurospheres exceeds that of proliferative cells. And the metabolism of the cells declines to very low level. In conclusion, the mass transfer limitation caused by the increase of neurospheres′ diameters has serious impact on the cell viability and metabolism.

Key words: neural stem cells(NSCs); neurosphere; metabolism; mass transfer