

# $\beta$ -巯基乙醇和 bFGF 分别诱导大鼠骨髓基质干细胞成神经元样细胞的生物学性状

冯 英<sup>1</sup>, 王会军<sup>2</sup>, 黄锦涛<sup>1</sup>, 谢富康<sup>1\*</sup>

(1. 中山大学中山医学院组胚教研室, 广东 广州 510080; 2. 黄河中心医院妇产科, 河南 郑州 450004)

**摘要:**【目的】比较  $\beta$ -巯基乙醇(BME)和 bFGF 分别诱导大鼠骨髓基质干细胞(MSC)所分化神经元样细胞的生物学性状。【方法】BME 和 bFGF 分别作用于大鼠的 MSC, 分别于 9 h 和 5 d 后, 进行神经元样细胞的细胞计数, 然后用免疫荧光进行神经元特异性蛋白 NF200 的鉴定, RT-PCR 的方法分析神经元特异性基因 NF 的表达; Western blotting 对检测神经元特异性蛋白 NF200 的表达。【结果】BME 诱导的细胞在加入药物 1 h 后形态发生改变, 9 h 时有突起伸出, 胞体变亮; bFGF 诱导的细胞在诱导后第 3 天开始有突起伸出, 呈神经元样, 第 5 天突起之间相互连接, 第 7 天胞体死亡; 而两种药物所分化的神经元样细胞 NF200 的免疫荧光均成阳性, 但 bFGF 诱导的神经元样细胞的阳性率要显著高于 BME 所诱导的神经元样细胞; 在 RT-PCR 中, bFGF 诱导的神经元样细胞神经元特异性基因 NF200 的表达要高于 BME 所诱导的细胞; western blotting 中, bFGF 诱导的神经元样细胞神经元特异性蛋白 NF200 的表达要高于 BME 所诱导的细胞。【结论】bFGF 和 BME 均可诱导 MSC 分化为神经元样细胞。但 bFGF 所诱导的神经元样细胞在从形态上更接近于神经元, 而神经元特异性基因 NF200 mRNA 及神经元特异性蛋白 NF200 蛋白的表达, 均高于 BME 所诱导的细胞。

**关键词:** 骨髓基质干细胞; 神经元; 诱导

中图分类号: R363

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2010)01-0028-05

## Biologic Characteristic Study of $\beta$ -mercaptoethanol and bFGF to Induce Rat Mesenchymal Stem Cells to Neuron-like Cells

FENG Ying<sup>1</sup>, WANG Hui-jun<sup>2</sup>, HUANG Jin-tao<sup>1</sup>, XIE Fu-kang<sup>1\*</sup>

(1. Department of Histology and Embryology, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

2. Department of Obstetrics and Gynecology, Central Hospital of Yellow River, Zhengzhou 450004, China)

**Abstract:** 【Objective】To compare the biological characteristics of neuron-like cells from rat mesenchymal stem cells (MSC) induced by  $\beta$ -mercaptoethanol (BME) and basic fibroblast growth factor (bFGF) respectively. 【Method】BME and bFGF were added to rat MSC respectively for 9 h and 5 days. The neuron-like cells from MSC with the neuron specific protein NF200 were identified using immunofluorescence. The gene expression of NF were analyzed using RT-PCR and the protein expression of NF200 were analyzed using Western blotting. 【Results】MSC induced by BME appeared morphology change in an hour and the neurite can be seen at six hour. Some cell bodies became lighter and died. MSC induced by bFGF had neurite in the third day, and appeared network structure in the fifth day, then cells died in the seventh day. At the same time, The result of immunofluorescence showed the NF200 expression of neuron-like cells induced by two ways were both positive, but MSC induced by bFGF were stronger than those induced by BME. The results of RT-PCR and western blotting were same as that of immunofluorescence. 【Conclusion】Both bFGF and BME can induce rat MSC to neuron-like cells, but the neuron-like cells induced by bFGF were more like real neurons in morphology and expression of neuron specific protein and mRNA.

**Key words:** mesenchymal stem cells; neuron; induction

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(1):28-32]

收稿日期: 2009-05-06

基金项目: 国家自然科学基金(39970273); 高等学校博士学科点专项基金(20060558002)

作者简介: 冯英, 博士研究生, 讲师, E-mail: fengying@mail.sysu.edu.cn; \* 通信作者: 谢富康, 教授, 博士生导师

骨髓基质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)是具有多向分化潜能的细胞,可分化成人体各个胚层的组织。如已得到确认的骨、软骨、肌腱、肌肉和心肌细胞等。而外胚层的组织如皮肤、神经细胞、眼和毛发等也有报道。同时,内胚层的细胞如肝、肺、胰腺、消化道等器官的细胞据报道也可来源于骨髓基质干细胞<sup>[1]</sup>。目前认为,骨髓基质干细胞可向神经元方向分化,并且诱导方法有很多种,如 Woodbury 等<sup>[2]</sup>用  $\beta$ -巯基乙醇(BME)等可诱导骨髓基质干细胞向神经元方向分化, Sanchez-Ramos 等<sup>[3]</sup>用含 RA(维甲酸)和 EGF(表皮细胞生长因子)的培养基诱导骨髓基质干细胞向神经元方向分化。Tropel 等<sup>[4]</sup>报道用 bFGF(碱性成纤维细胞生长因子)可诱导 MSC 向有功能的神经元分化,还有国内用中药诱导 MSC 分化为神经元样细胞。虽然有如此多的诱导方法,但目前对所得到的神经元样细胞存在很多争议。他们是否真的具有神经元的形态和蛋白表达?是否具有神经元的部分功能?为解决这些问题,本实验选择 BME 和 bFGF 诱导大鼠骨髓基质干细胞向神经元样细胞分化,比较这两种方法所诱导的神经元样细胞在形态及神经元特异性蛋白的表达和基因的 mRNA 表达是否有差异。

## 1 材料和方法

### 1.1 大鼠 MSC 的分离培养和鉴定

质量 50 g 左右 SD 大鼠,引颈处死,剪开后肢皮肤,分离组织,取出股骨,1 mL 注射器吸取正常培养基冲出骨髓。Percoll(密度 1.073 g/L)分离,将抽取的骨髓加入等量的无血清 L-DMEM 充分混匀,转入离心管,500  $\times$  g 离心 5 min,弃上清及脂肪层,沉淀用无血清 L-DMEM 充分混匀,轻轻叠加到密度为 1.073 g/L Percoll 分离液上,1 200  $\times$  g 离心 30 min,收集单核细胞层,DMEM 洗涤两次。收集细胞沉淀,用体积分数 15% 的胎牛血清(FBS)的  $\alpha$ -MEM 培养基重悬,调整细胞密度,按 1  $\times$  10<sup>6</sup> cells/cm<sup>2</sup> 密度接种。37  $^{\circ}$ C,体积分数为 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养。3 d 换液一次。待细胞铺满瓶底,1.25 g/L 胰酶加 0.2 g/L EDTA 消化后,完全培养基终止消化,按照 1:2 比例传代培养。将培养的第 3 代骨髓基质干细胞加入成骨诱导液(10% FBS L-DMEM 内含 0.1  $\mu$ mol/L 的地塞米

松、50  $\mu$ g/mL 维生素 C、10 mmol/L  $\beta$ -磷酸甘油)进行成骨诱导 3 周,3 d 换液。21 d Von Kossa's 矿化结节染色法鉴定。同时,将第 3 代骨髓基质干细胞加入成脂诱导液(A 液:1 mmol/L 地塞米松,0.5 mmol/L IBMX,10  $\mu$ g/mL 的胰岛素,0.2 mmol/L 的吲哚美辛;B 液:10  $\mu$ g/mL 的胰岛素。前 3 d 加 A 液、B 液 1 d、A 液 3 d,再换 B 液,依此 3 个循环。),油红染色鉴定(图 1)。

### 1.2 MSC 向神经元分化的诱导

取第 3 代骨髓基质干细胞,以 2  $\times$  10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> 的密度接种于细胞培养板中。分别加入含 10% FBS 的 L-DMEM、无血清 L-DMEM(内含 1 mmol/L BME)、含 10% FBS 和 25 ng/mL bFGF 的 L-DMEM(接种细胞前用 10  $\mu$ g/mL 多聚赖氨酸包被)。BME 诱导的 MSC 9 h 时终止诱导,拍照;bFGF 诱导的 MSC 诱导 5 d 后拍照。

### 1.3 免疫荧光鉴定和神经元阳性细胞百分比

正常培养的大鼠 MSC、无血清 L-DMEM 和 1 mmol/L BME 诱导 9 h 的 MSC 及 10% FBS 和 25 ng/mL bFGF 诱导 5 d 的 MSC 分别加入 4% 多聚甲醛固定,PBS 洗涤,加入抗小鼠的 NF200 单克隆抗体,孵育过夜,然后加入兔抗大鼠 IgG(FITC 标记)常温下 2 h。DAPI 核荧光染色 10 min,PBS 洗涤,甘油封片。荧光显微镜观察,拍照,选取 3 个视野,对 NF200 阳性细胞进行计数,然后对比核荧光染色的阳性细胞数,计算分化百分率。SPSS 进行统计学分析。

### 1.4 RT-PCR

以上述诱导方式收集正常培养的大鼠 MSC、无血清 L-DMEM 和 1 mmol/L BME 诱导 9 h 细胞及 10% FBS 和 25 ng/mL bFGF 诱导 5 d 的细胞,Trizol 提取细胞总 RNA。以 3 种细胞的总 RNA 为模板,用 NF 的引物进行 RT-PCR 扩增。 $\beta$ -actin 用作内参。实验结果重复 3 次。

### 1.5 Western blotting

收集 3 组细胞,抽提液抽提蛋白,按照 Western blotting 基本步骤跑胶、转膜,加一抗(抗小鼠的 NF200 单克隆抗体)、二抗,显影,扫描。实验结果重复 3 次。

## 2 结 果

### 2.1 骨髓基质干细胞的培养及鉴定

经成骨和成脂诱导后,Von Kossa's 矿化结节

染色和油红染色均呈阳性。说明所分离的大鼠骨髓细胞具多向分化潜能,应为 MSC(图 1)。

## 2.2 MSC 向神经元分化的诱导

BME 和 bFGF 均可诱导 MSC 向神经元样细胞分化。BME 诱导的细胞在加入药物 1 h 后细胞形态就发生改变,9 h 时细胞有多个突起伸出,胞体变亮,之后细胞漂浮死亡;而 bFGF 诱导的细胞在诱导后第 3 天开始出现细胞逐渐变长,有突起出现,且突起明显长于 BME 诱导所产生的神经元样细胞,第 5 天神经元样细胞的突起之间相互连接,形成网络状结构,第 7 天细胞变圆,死亡(图 2)。

## 2.3 免疫荧光鉴定和神经元阳性细胞百分比

两种诱导剂所诱导的神经元样细胞分别 NF200(神经元特异性抗体)抗体的免疫荧光均呈阳性。但 bFGF 所诱导的神经元样细胞 NF200 的免疫荧光表达明显强于 BME 诱导所产生的神经元样细胞,且形态上更为接近神经元(图 3)。DAPI 进行核荧光染色后,对 NF200 阳性表达的细胞进行细胞计数。BME 诱导的 MSC NF200 阳性细胞百分比为  $(30.5 \pm 8.6)\%$ ,而 bFGF 所诱导的 MSC 阳性表达细胞达  $(64.2 \pm 6.5)\%$ ,两者存在显著差异(表 1)。

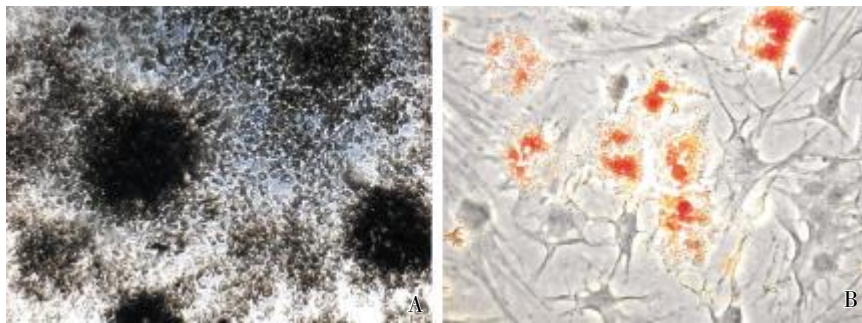


图 1 大鼠骨髓基质干细胞向成骨细胞及脂肪细胞方向分化

Fig.1 Osteogenic and Osteogenic differentiation of MSC

A: Osteogenic differentiation of MSC; B: Osteogenic differentiation of MSC;  $\times 100$



图 2  $\beta$ -巯基乙醇和 bFGF 分别诱导大鼠 MSC 后所分化的神经元样细胞

Fig.2 MSC induced by  $\beta$ -mercaptoethanol and bFGF to neuron-like cells

A: MSC before induction; B: MSC induced by  $\beta$ -mercaptoethanol for 9 h; C: MSC induced by bFGF for 5 d;  $\times 100$



图 3 BME 和 bFGF 分别诱导大鼠 MSC 后所分化的神经元样细胞 NF-200 的免疫荧光染色

Fig.3 NF 200 immunofluorescence of MSC induced by  $\beta$ -mercaptoethanol and bFGF to neuron-like cells

A: MSC before induction; B: MSC induced by  $\beta$ -mercaptoethanol for 9 h; C: MSC induced by bFGF for 5 d;  $\times 100$

## 2.4 RT-PCR

RT-PCR 结果显示,未经诱导的 MSC 无 NF 基因的表达,而 BME 和 bFGF 所诱导的 MSC 表达 NF,但 bFGF 所诱导的 MSC 表达的 NF 要高于 BME 所诱导的 MSC(图 4)。

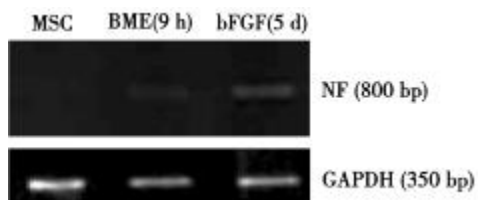


图 4  $\beta$ -巯基乙醇和 bFGF 分别诱导大鼠 MSC 诱导成神经元样细胞后 NF 基因的 RT-PCR

Fig.4 NF gene impression of MSC induced by BME and bFGF to neuron-like cells (RT-PCR)

## 2.5 Western blotting 结果

Western blotting 结果显示,未经诱导的 MSC 无 NF200 蛋白的表达,而  $\beta$ -巯基乙醇和 bFGF 所诱导的 MSC 表达 NF,但 bFGF 所诱导的 MSC 表达的 NF 要高于  $\beta$ -巯基乙醇所诱导的 MSC(图 5)。

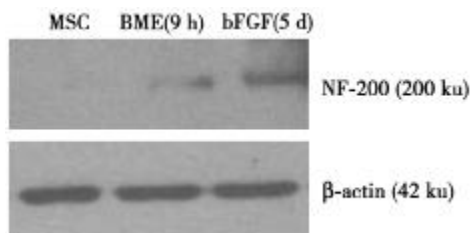


图 5 BME 和 bFGF 分别诱导大鼠 MSC 诱导成神经元后 NF200 的 Western blotting

Fig.5 NF200 protein expression of MSC induced by  $\beta$ -mercaptoethanol and bFGF to neuron-like cells (Western blotting)

## 3 讨 论

自从 2000 年 Woodbury 和 Sanchez-Ramos 报道 MSC 在体外可向神经元方向分化之后,有关这方面的研究就成为一个热点<sup>[4-6]</sup>。多个实验证实,多种方法可诱导骨髓基质干细胞向神经元样方向分化<sup>[7]</sup>。如 Woodbury 等<sup>[2]</sup>报道,在含有 BME、DMSO、BHA(特丁基-4 羟基茴香醚)的 DMEM 的诱导下,MSC 开始具有神经元特征。Kim 等<sup>[8]</sup>研究

了培养基质在 MSC 向神经元方向分化中的作用。他用 bFGF、NGF(神经营养因子)、RA、不同的培养基和细胞外成分,如层粘连蛋白(laminin)、明胶(gelatine)、胶原(collagen)、纤连蛋白(fibronectin)和多鸟氨酸(polyornithine)作为人 MSC 的神经诱导剂。其中 RA 和 bFGF 与纤粘连蛋白联合应用具有最好的诱导效能。而在国内,黄芩苷、丹参、黄芪、鹿茸等据说都可诱导骨髓基质干细胞向神经元方向分化<sup>[9-12]</sup>。

面对如此多种的诱导方法,有科学家提出质疑:我们所诱导的神经元是否是真正的神经元?还是仅仅是由细胞融合、其它类型的细胞污染或者是细胞毒性所引起的细胞改变<sup>[13]</sup>。像 Woodbury 的神经元诱导方案,细胞在几个小时内就可发生明显的形态改变,在如此短的时间内产生新的蛋白质是不太可能的,与分化相关的细胞构架、基因和蛋白表达在短时间的诱导中也不可能发生改变。由营养因子或神经生长因子诱导的神经元样细胞存活时间较长,那他们就具有神经元的特性吗?

以往我们的实验曾经用 BME 诱导骨髓基质干细胞向神经元方向分化,并从蛋白水平及基因水平证实所诱导的细胞有神经元特异性蛋白的表达。难道这些细胞形态的改变仅仅是细胞毒性的一种反应?那么用其它方法所诱导的神经元与之相比有什么分别吗?2006 年,Tropel 用 bFGF 诱导 MSC 产生了功能性的神经元<sup>[9]</sup>。于是,本研究采用这两种方法分别诱导大鼠 MSC 分化为神经元样细胞,并比较其在形态及神经元特异性蛋白和基因表达方面的差异,观察哪种方法可以产生更接近真正意义神经元,从而在众多纷繁芜杂的方法中选择更为可靠的神经元诱导方案。

本研究结果表明,Percoll 分离的大鼠骨髓细胞在贴壁生长后可传代向脂肪细胞和成骨细胞分化,因此具有成体干细胞的特性。在向神经元的诱导实验中,BME 所诱导的 MSC 在几个小时之内就可出现神经元样的形态改变,9 h 达高峰,12 h 左右漂浮死亡;而 bFGF 所诱导的神经元在第 2 天细胞开始变长,第 5 天出现典型神经元的长突起,7 d 后有分化的细胞死亡。但 BME 所诱导的神经元样细胞突起较短,且很快死亡,bFGF 所诱导的神经元样细胞的突起较长,且可存活大约 1 周的时间。因此,在进行免疫荧光鉴定、RT-PCR 和 Western blotting,本研究分别选择了 9 h 和 5 d 作

为检测的时间点。在蛋白表达方面, NF200 作为神经元特异性的蛋白, 在 bFGF 所诱导的神经元样细胞中高表达, 而 BME 所诱导产生的神经元样细胞中虽有表达, 但表达量较低。免疫荧光和 western blotting 的结果都证实了这一结论。在基因表达方面, RT-PCR 的结果与蛋白表达相似。分析原因, BME 所诱导的 MSC 在短时间出现神经元的形态改变, 原因可能是细胞毒性引起的细胞内微管和微丝的破坏, 致使细胞出现形态上的改变; 并暂时性的表达一些神经元特异性的蛋白, 但并不是真正意义上的神经元; 而 bFGF 属于神经营养因子, 在 1 周左右的时间内, 它是可能诱导 MSC 产生神经元的蛋白质, 并表达神经元的一些特性, 但其是否真正具有神经元的功能, 还需要我们进一步从电生理及神经递质的产生等方面进行进一步研究。

从以上的实验结果可以看出, BME 和 bFGF 均可诱导 MSC 向神经元方向分化, 并表达神经元特异性的蛋白和基因。但 bFGF 所诱导的神经元从形态和蛋白表达和基因表达上均有更典型的神经元的特征。因此, bFGF 所诱导的神经元样细胞更接近于真正的神经元, 而 BME 所诱导的神经元样细胞有可能是细胞毒性所引起的细胞收缩。但它们是否真正具有神经元的功能, 则需要进一步的研究。

长期以来, 中枢神经系统损伤及退行性疾病(帕金森氏病、老年性痴呆)的治疗一直是人类面临的难题<sup>[14]</sup>。诱导真正意义上的神经元进行细胞移植将有助于中枢神经系统损伤和退行性疾病的治疗。本实验对比两种诱导方法, 找出更优的诱导方法, 这将为骨髓基质干细胞向神经元分化的诱导提供实验依据, 也为临床中枢神经退行性疾病的治疗提供了理论依据。

#### 参考文献:

- [1] Chen Y, Teng FY, Tang BL, et al. Coaxing bone marrow stromal mesenchymal stem cells towards neuronal differentiation: progress and uncertainties [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63(14):1649-1657.
- [2] Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons [J]. *J Neurosci Res*, 2000, 61(9):364-370.
- [3] Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro [J]. *Exp Neurol*, 2000, 164(9):247-256.
- [4] Chou SC, Ko TL, Fu YY, et al. Identification of genetic networks during mesenchymal stem cell transformation into neurons [J]. *Chin J Physiol*, 2008, 51(4):230-246.
- [5] Khoo ML, Shen B, Tao H, et al. Long-term serial passage and neuronal differentiation capability of human bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2008, 17(5):883-896.
- [6] Kohyama J, Abe H, Shimazaki T, et al. Brain from bone: efficient 'meta-differentiation' of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent [J]. *Differentiation*, 2001, 68(9):235-244.
- [7] Wislet-Gendebien S, Wautier F, Leprince P, et al. Astrocytic and neuronal fate of mesenchymal stem cells expressing nestin [J]. *Brain Res Bull*, 2005, 68(1-2):95-102.
- [8] Kim BJ, Seo JH, Bubien JK, et al. Differentiation of adult bone marrow stem cells into neuroprogenitor cells in vitro [J]. *Neuroreport*, 2002, 13(9):1185-1188.
- [9] Tropel P, Platet N, Platel JC, et al. Functional neuronal differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *Stem cells*, 2006, 24(12):2868-2876.
- [10] 项鹏, 夏文杰, 王连容, 等. 丹参注射液诱导间质干细胞分化为神经元样细胞 [J]. *中山医科大学学报*, 2001, 22(5):321-324.
- [11] 常宏, 蒋绍艳, 史玉朋, 等. 丹参注射液诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞的研究 [J]. *中国药房*, 2008, 19(30):2323-2325.
- [12] Yang XW, Wang Y. Differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells into neuron-like cells induced by astragalus mongholicus [J]. *J Clin Rehabil Tissue Eng Res*, 2008, 12(25):4996-5000.
- [13] Neuhuber B, Gallo G, Howard L, et al. Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype [J]. *J Neurosci Res*, 2004, 77(2):192-204.
- [14] Tani J, Umbas R. Recent progressions in stem cell research: breakthroughs achieved and challenges faced [J]. *Acta Med Indones*, 2009, 41(1):30-35.

(编辑 徐杰)