

·基础研究·

大鼠骨髓间质干细胞定向分化为神经元的实验研究

王亚柱^{1,2}, 邓宇斌¹, 甘丹卉¹, 叶伟标¹, 叶美红¹, 陈永乐¹

(1.中山大学中山医学院病理生理学教研室, 广东 广州 510080;

2.中国医科大学附属第一医院血液科, 辽宁 沈阳 110001)

摘要:【目的】研究体外培养骨髓来源的表达 nestin 的成年大鼠骨髓间质干细胞(MSC)并诱导分化神经元样细胞的潜能, 为中枢神经系统疾病的细胞移植治疗提供理想的供体。【方法】采用全骨髓法分离培养成年 SD 大鼠 MSC, 传至第 6 代的 MSC 接种在前一天涂有 100 $\mu\text{g/L}$ 多聚赖氨酸的塑料培养瓶或培养皿中, 用含 100 mL/L FBS 的 DMEM/F12 培养液添加 10 ng/mL bFGF 的培养液培养并以 DMSO、BHA 与 Forskolin 等诱导剂联合诱导 MSC 分化为神经元。流式细胞仪鉴定诱导前 MSC 的细胞表面抗原, 免疫荧光检测诱导前及诱导后 6 h、12 h、24 h 神经元特异性抗原 nestin、NF-200 和 GFAP 表达率。【结果】流式细胞仪检测传至第 6 代 MSC 表面抗原 CD29 和 CD44 阳性率分别为 98.8%、96.6%, CD34 和 CD45 阴性。免疫荧光鉴定传至第 6 代的 MSC 表达 nestin 阳性率为 57.1% \pm 6.9%, 不表达 NF-200 和 GFAP。诱导后 30 min 可见神经元样细胞出现, 诱导后 6 h、12 h、24 h 经 nestin 和 NF-200 免疫荧光鉴定, 诱导后 6 h、12 h、24 h nestin 阳性率分别为 96.5% \pm 1.9%, 88.1% \pm 5.4%, 33.5% \pm 5.4%, NF-200 阳性率分别为 90.1% \pm 2.9%, 97.5% \pm 1.3%, 98.1% \pm 1.6%。【结论】骨髓来源的 nestin 阳性的 MSC 具有神经祖细胞特性并且可诱导分化为神经元样细胞, 可作为种子细胞用于神经系统疾病的治疗。

关键词:骨髓间质干细胞;分化;神经元样细胞;神经祖细胞

中图分类号:R363 文献标识码:A 文章编号:1672-3554(2008)04-0383-05

Differentiation of Nestin-positive Mesenchymal Stem Cells in Rats into Neuron-like Cells

WANG Ya-zhu^{1,2}, DENG Yu-bin¹, GAN Dan-hui¹, YE Wei-biao¹, YE Mei-hong¹, CHEN Yong-le¹

(1.Department of Pathophysiology, Zhongshan School of Medicine, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

2.Department of Hematology, The first Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: 【Objective】 To isolate and cultivate nestin-positive stromal stem cells (MSC) from rat bone marrow and to induce the potential of differentiation into neuron-like cells in vitro. The study lays the foundation for the neuron-transplantation treatment of central nervous system diseases, and the MSC can be the donor cells. 【Methods】 The MSC were isolated primarily from rat bone marrow, and purified by passage culture. The 5th passage of MSC were inoculated in a plastic flask coated by poly-lysine, and were cultured in DMEM/F12 medium containing 100 ml/L fetal bovine serum (FBS) and 10 ng/mL bFGF. The chemi-inductor, DMSO, BHA and Forskolin were used to MSC neural differentiation. To identify the surface antigens, MSC were analyzed by the flow cytometry; and to detect the rate of the nestin, NF-200 and GFAP before and after 6 h, 12 h and 6 h of induction by immunofluorescence. 【Results】 FACS analysis showed that MSC were negative for CD34 and CD45, but positive for CD29 (98.80%) and CD44(96.61%). Immunofluorescence analysis showed that MSC were negative for NF-200 and GFAP, but positive for nestin (57.1% \pm 6.9%). After half an hour following neuron induction, some cells turned neuron-like appearance, and the expression of nestin and NF-200 in the neuron-like cells was positive, but GFAP did not express. After 6 h, 12 h and 24 h induction, the ratios of nestin positive cells in P5 were 96.5% \pm 1.9%, 88.1% \pm 5.4%, and 33.5% \pm 5.4% and the ratios of NF-200 positive cells were 90.1% \pm 2.9%, 97.5% \pm 1.3%,

收稿日期:2008-03-24

基金项目:广东省科技计划项目(2005B50301012);中国博士后基金(20060390752)

作者简介:王亚柱(1963-),男,辽宁葫芦岛人,博士,副研究员,E-mail:wangyazhu815@yahoo.com.cn;邓宇斌,通讯作者,教授,博士生导师,

E-mail:dengyub@mail.sysu.edu.cn

and $98.1\% \pm 1.6\%$, respectively. 【Conclusion】 The nestin-positive MSC from bone marrow possess the characteristics of neuron progenitor cells and they have the capability of differentiation into the neuron in vitro. Nestin-positive MSC can be used for the treatment of nervous system damage.

Key words: mesenchymal stem cells; differentiation; neuron-like cells; neuron progenitor cells

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008, 29(4):383-387, 392]

骨髓间质干细胞 (bone marrow stromal cells, MSC) 是一类存在于骨髓中的具有自我更新、活跃增殖和多向分化潜能的干细胞, 在一定条件下, 可分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞和成肌细胞^[1-4]。近年来的研究表明, MSC 可以向神经细胞分化^[5-7]。国内项鹏等^[8]也报道应用中药在体外定向诱导 MSC 分化为神经元样细胞。研究显示碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 具有促进神经干细胞增殖和分化的作用^[9]。本研究探讨了在涂有多聚赖氨酸的塑料培养瓶中, 用添加 bFGF 的培养液培养骨髓 MSC, 培养的 MSC 表达 nestin, 具有神经祖细胞的特性, 并且用 DMSO、BHA 与 Forskolin 等诱导剂联合诱导 MSC 定向分化为神经细胞。从成体骨髓中获取干细胞, 培养为神经祖细胞, 为临床神经系统疾病的细胞移植治疗提供理想的供体。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 动 物 SD 大鼠 (1.5 ~ 2 月大小, 购自中山大学实验动物中心)。

1.1.2 培养基及主要试剂 DMEM/F12 (Invitrogen, USA)、胎牛血清 (FBS, BIOLOGICAL, 以色列)、碱性成纤维细胞生长因子 (bovine basic fibroblast growth factor, bFGF, Pepro Tech, USA)、胰蛋白酶 (上海生化试剂厂)、EDTA (广州化学试剂厂)、谷氨酰胺 (L-glutamine, GIBCO 公司)、二甲基亚砷 (dimethylsulfoxide, DMSO, Sigma, USA)、丁羟茴醚 (butylated hydroxyanisole, BHA, Sigma, USA)、弗司可林 (Forskolin, Sigma, USA)、丙戊酸 (valproic acid, Sigma, USA)、胰岛素 (insulin, Sigma, USA)、FITC 标记兔抗大鼠 CD29 抗体 (BD Pharmingen USA)、FITC 标记兔抗大鼠 CD44 抗体 (SeroTec USA)、FITC 标记兔抗大鼠 CD45 抗体 (BD Pharmingen USA)、PE 标记兔抗大鼠 CD34 抗体 (BD Pharmingen USA)、兔抗大鼠巢蛋白 (nestin, 博士德,

中国) 单克隆抗体, 兔抗大鼠胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP, HEMICON, USA) 单克隆抗体, 兔抗大鼠神经丝蛋白 (neurofilament, 200KD, NF-200, CHEMICON, USA) 单克隆抗体, CY3 标记的羊抗兔荧光二抗 (CHEMICON 公司, USA), Hoechst 33342 (Sigma, USA)。

1.2 方 法

1.2.1 MSC 的分离培养、纯化和扩增 取纯种 Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠 (1.5 ~ 2 月龄, 中山大学实验动物中心提供), 颈椎脱臼处死后, 750 mL/L 酒精浸泡 5 min, 无菌条件下分离 SD 大鼠两侧股骨和胫骨, 剪开股骨和胫骨两端, 暴露骨髓腔, 用 5 mL 注射器吸取含 100 mL/L FBS 的 DMEM/F12 培养液反复冲洗骨髓腔, 将骨髓细胞用含 100 mL/L FBS 的 DMEM/F12 培养液洗一遍, 再用含 100 mL/L FBS 的 DMEM/F12 培养液重新悬浮细胞, 以 1×10^4 /mL 细胞密度接种于 25 cm² 的塑料培养瓶中 (Corning, USA), 37 °C, 饱和湿度, 5% 体积分数 CO₂ 恒温培养箱中培养。第 3 天首次换液, 以后每 3 d 换液 1 次。至贴壁细胞融合达 90% 以上, 吸出培养液, PBS 洗 3 次, 用 2.5 g/L 胰酶 (含 1 mmol/L EDTA) 孵育消化 2 min, 再加入等量含 100 mL/L FBS 的 DMEM/F12 培养液终止消化, 轻轻吹打使所有细胞脱落, 收集细胞悬液, 1 000 r/min ($r = 15$ cm) 离心 5 min, 弃上清液, 用含 100 mL/L FBS 的 DMEM/F12 培养液悬浮细胞, 以 1:3 的比例接种于 25 cm² 的塑料培养瓶中, DMEM/F12 培养液 (添加终浓度为 2 mmol/L 谷氨酰胺) 传代培养, 隔 3 d 换液 1 次。传至第 6 代的 MSC 接种在前一天涂有 100 μg/L 多聚赖氨酸的塑料培养瓶或培养皿中, 用含 100 mL/L FBS 的 DMEM/F12 培养液添加 10 ng/mL bFGF 的培养液培养。

1.2.2 流式细胞仪检测诱导前 MSC 的细胞表面抗原 传至第 6 代的 MSC 生长约 90% 融合后, 吸去培养基, PBS 洗 3 次, 2.5 g/L 胰酶消化 2 min, 加入等量含 100 mL/L FBS 的 DMEM/F12 培养液

终止消化,轻轻吹打使所有细胞脱落,收集细胞悬液,1 000 r/min($r=15$ cm)离心5 min,弃上清液,20 mL/L冰甲醛固定30 min,PBS洗涤2遍后,加入流式细胞仪缓冲液,上流式细胞仪(FACS Calibur, BD公司, USA)检测MSC细胞表面抗原CD29、CD34、CD44、CD45,检测抗体见表1。

1.2.3 MSC向神经元样细胞的定向分化 将传至第6代的MSC待贴壁细胞融合达80%时,进行神经元细胞的定向诱导,诱导方法参照[10]。预诱导:吸出培养液,加入含100 mL/L FBS和10 ng/mL bFGF的DMEM/F12培养液进行预诱导24 h。神经元诱导:吸出培养液,用PBS洗3次,加入含20 mL/L DMSO, 10 ng/mL bFGF, 100 μ mol/L BHA, 10 μ mol/L Forskolin, 25 mmol/L KCl, 2 mmol/L 丙戊酸, 5 μ g/mL胰岛素的无血清DMEM/F12诱导剂,每24 h诱导剂半量换液。

1.2.4 免疫荧光检测 分别对35 mm的塑料培养皿中培养的第6代MSC及诱导后6 h、12 h、24 h的细胞,用PBS洗涤3次,以40 g/L多聚甲醛固定30 min,再以PBS洗涤3次,在冰上1 mL/L Triton X-100透化2 min,PBS洗涤3次,30 mL/L H₂O₂封闭以消除内源性过氧化物酶,正常非免疫性30 mL/L山羊血清封闭1 h,PBS洗涤3次后分别滴加一抗,包括nestin,GFAP,NF-200,加PBS作空白对照,4 $^{\circ}$ C过夜,第2天取出后室温孵育1 h,PBS洗涤3次,分别加入羊抗兔荧光二抗37 $^{\circ}$ C避光孵育1 h,PBS洗涤3次,加入Hoechst33342,37 $^{\circ}$ C避光孵育15 min,PBS洗涤3次后荧光倒置显微镜下观察并用数码相机采集图像后利用Adobe Photoshop 610软件进行叠加。机数取10个非重叠视野($\times 100$ 倍),计算总细胞数Hoechst33342(胞核发蓝色荧光)和nestin、NF-200和GFAP阳性细胞(胞浆发红色荧光),计算阳性率,结果用均数 \pm 标准差表示。

1.2.5 统计学处理 显著性检验采用两独立样本 t 检验(所有分析均使用SPSS统计软件包)。

2 结果

2.1 MSC的培养和纯化

骨髓细胞接种24 h后,可见少数细胞贴壁,随着时间延长,贴壁细胞增多,分布不均。第5天,

细胞增殖迅速,以梭形为主,也可见一些多角形和大而圆的细胞散在或成行分布。细胞呈集落趋势生长,集落中心细胞体积变小,轮廓不清。接种8-9 d,细胞基本达90%融合,此时行传代培养。传代后细胞生长潜伏期短,12 h即贴壁,增殖迅速,3~5 d细胞即融合90%。传代后细胞生长均匀,大部分呈长梭形或扁平,排列规则,表现为流线形或漩涡状生长。传至第6代,细胞形态基本一致,呈长梭形,漩涡状排列(图1)。

2.2 MSC细胞表型

流式细胞仪检测第6代MSC表面抗原CD29和CD44阳性,CD34和CD45阴性,结果详见表1,其流式细胞仪检测见图2。

表1 MSC细胞表面抗原检测结果

Table 1 MSC surface antigens results

Antigens	Connection Markers	Firms of Antibodies	Results
CD29	FITC	BD	98.80%(+)
CD34	PE	BD	0.45%(+)
CD44	FITC	SeroTec	96.61%(+)
CD45	FITC	BD	0.57%(+)

2.3 MSC向神经元的定向诱导分化

第6代MSC诱导30 min后细胞形态发生明显改变,出现神经元样细胞。这些细胞胞体变小,胞质向核周收缩,由原来的梭形变成圆形,折光性增强,并且伸出类似神经元样突起,突起末端发出次级分支,突起与相邻细胞胞体或突起相连,形成网络样结构。随着时间延长,神经元样细胞增多。到第24小时,98.0%分化成神经元样细胞,有少量神经元样细胞漂浮死亡(图3)。

2.4 诱导后的神经元样细胞免疫荧光鉴定及阳性细胞计数

第6代MSC及诱导后行免疫荧光检测nestin、NF-200和GFAP表达。MSC诱导前nestin阳性率为57.1% \pm 6.9%,诱导分化后6 h、12 h、24 h阳性率分别为96.5% \pm 1.9%,88.1% \pm 5.4%,33.5% \pm 5.4%,MSC诱导分化后6 h与未诱导MSC有显著差异($P < 0.01$,图4)。诱导分化过程中nestin呈一过性增加。诱导前NF-200是阴性,经诱导分化后6 h、12 h、24 h的神经元样细胞NF-200阳性率随时间延长而增加,阳性率分别90.1% \pm 2.9%,97.5% \pm 1.3%,98.1% \pm 1.6%。GFAP在诱导前和诱导后均不表达。对照组均无阳性表达(图5)。

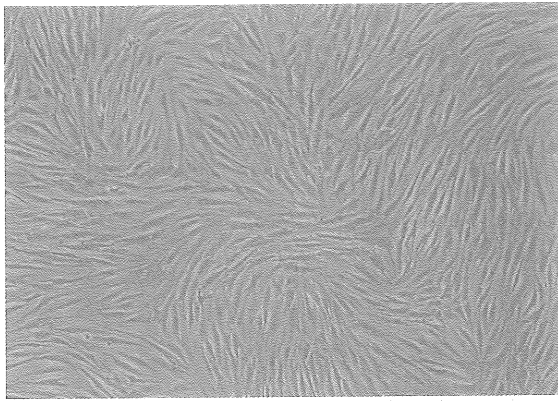


图 1 第 6 代已达融合状态的 MSC

Fig.1 The 6th passage MSC fusion state

Similar form, long fusiform, whirlpool arrangement, high light refraction(inverted phase contrast microscope, $\times 100$)

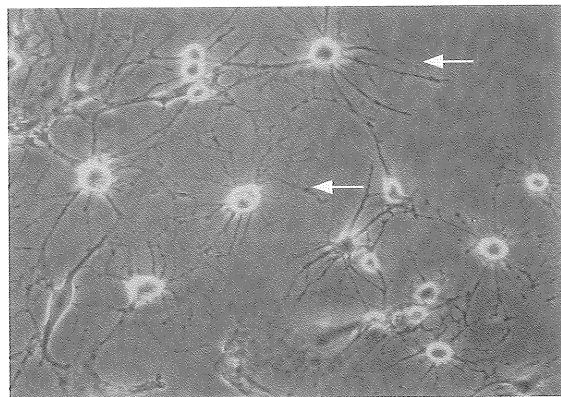


图 3 MSC 诱导后表现出典型的多极神经元样细胞形态

Fig.3 After neuron induction, the expression of typical neuron-like cells($\times 400$)

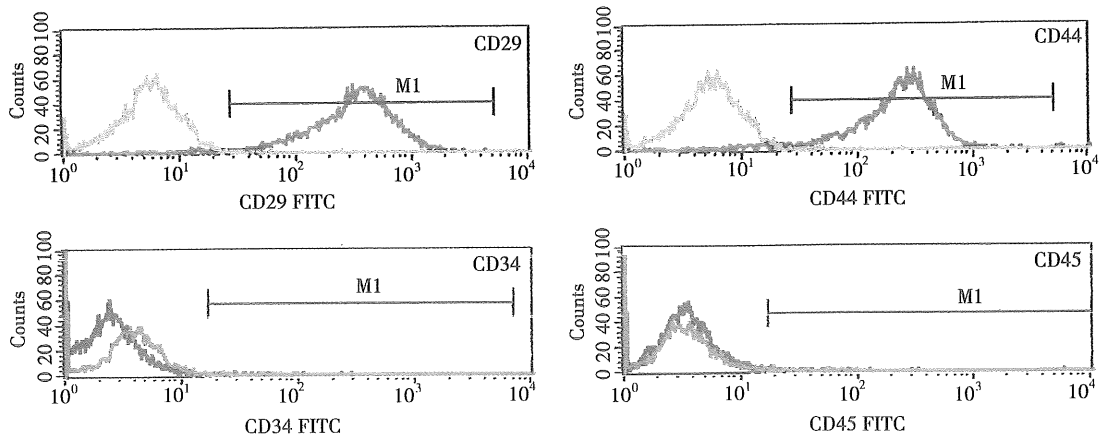


图 2 流式细胞仪检测第 6 代 MSC 细胞表面抗原结果

Fig.2 FACS detects the results of the 6th passage MSC surface antigens

Positive for CD29 (98.80%) and CD44(96.61%), Negative for CD34 and CD45

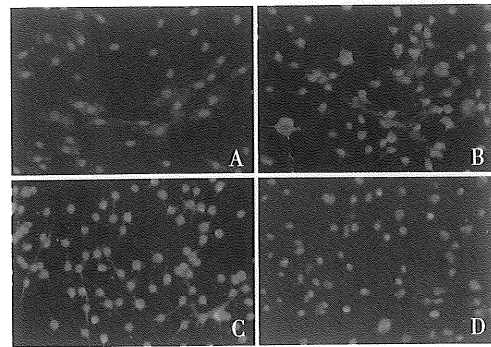


图 4 免疫荧光检测 MSC 在诱导前和诱导后 nestin 表达结果

Fig.4 The nestin expression before and after the MSC induction by immunofluorescence ($\times 100$)

A:MSC expression before induction;B:MSC expression 6h after induction;C:MSC expression 12 h after induction;D:MSC expression 24 h after induction

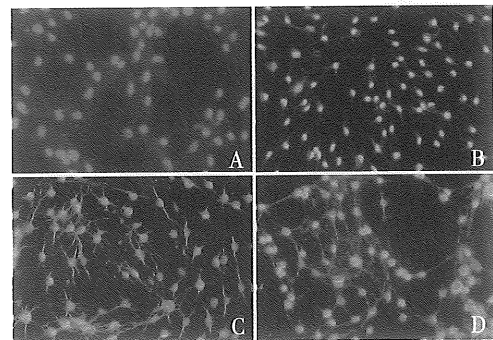


图 5 免疫荧光检测 MSC 在诱导前和诱导后 NF-200 表达结果

Fig.5 The NF-200 before and after the MSC induction by immunofluorescence ($\times 100$)

A:MSC expression before induction;B:MSC expression 6h after induction;C:MSC expression 12 h after induction;D:MSC expression 24 h after induction

3 讨论

目前有关干细胞向神经元的诱导分化,主要采用多种细胞因子、基因转染以及化学诱导剂诱导的方法,但是前两者诱导时间长,获得神经元样细胞的百分率较低^[9]。本实验中采用细胞因子 bFGF 和 BHA+DMSO 联合诱导方法,在经过了约 1 h 的诱导后,约 95% 的成年大鼠 MSC 诱导分化为具有典型的神经元形态的细胞,图 3。

Nestin 是一种中间丝蛋白,主要在神经元和神经胶质细胞的共同前体-神经干细胞表达^[11]。免疫荧光染色的方法检测用含 100 mL/L FBS 的 DMEM/F12 培养液添加 10 ng/mL bFGF 的培养液培养的 MSC, nestin 呈阳性表达,而 NF-200 和 GFAP 均为阴性。说明表达 nestin 的 MSC 是神经前体细胞。

FGF 是神经干细胞增殖分化的重要物质^[10],在体内 FGF 缺乏时,神经发育障碍^[12]。最近对 FGF 促进 MSC 的增殖和分化进行了广泛的研究,如成骨,成脂及神经分化^[13-16]。Satomura 等^[17]利用 DNA 测序方法检出 MSC 表面存在 EGF 受体 (EGFR)、FGF 受体 (FGFR)、血小板衍生生长因子受体 (platelet derived growth factor receptor, PDGFR), EGF、PDGF 可以促进 MSC 的增殖,并且会诱导细胞内酪氨酸及 EGFR、PDGFR 磷酸化。当以上生长因子单独或联合作用于 MSC 时,可以与具有多向分化潜能的 MSC 的表面受体结合,进一步激活一系列的胞内反应,促使骨髓间质干细胞向神经元样细胞横向分化。bFGF 的受体系统是双受体系统,有低、高亲和力受体。Tassi 等^[18,19], bFGF 必须先与细胞表面低亲和力 bFGF 受体及胞外硫酸乙酰肝素蛋白聚糖 (heparan sulfate proteoglycans, HSPG) 结合,然后连接、激活细胞表面高亲和力 bFGF 受体,高亲和力 bFGF 受体出现二聚化和自磷酸化,自磷酸化的 bFGF 受体顺次激活下游能与 bFGF 受体上 SH2 区结合的信号转导分子;而且,激活的 bFGF 受体被转接蛋白联接到 Ras/MAPK,完成细胞外信息向细胞内传递而发挥其生物学活性作用。在体外培养体系中, bFGF 和组蛋白 H1 紧密结合,激活蛋白激酶 CK II,参与不同的基因表达调控^[20]。本研究培养的表达 nestin 的 MSC 可能是多聚赖氨酸作用结果,是多聚赖氨酸调整或转换 FGF 信号机制。

实验观察到 Nestin 阳性的 MSC 诱导分化过

程中一过性表达 nestin 增加,从 57.1% ± 6.9% 到诱导 6 h 98.5% ± 1.9%,以后随时间延长逐渐减低。说明其具有类似神经干细胞的特性,故可用于神经干细胞的鉴定^[11]。NF-200 是神经细胞成熟的标志,在正常情况下只存在于轴索中,而胞体不含或很少含有^[21]。本研究结果显示 NF-200 在 6 h 阳性率达 90%, 12 h 和 24 h 阳性率达 98%, GFAP 是星形胶质细胞的特异性标志蛋白,实验中我们一直未发现 GFAP 阳性结果,提示 MSC 向神经元方向分化,而不是向胶质细胞转化,这与 Woodbury^[6] 的研究结果一致。以上结果提示 MSC 在诱导过程中,蛋白分子的表达与神经元发育过程相同。因此, MSC 经细胞因子 bFGF 和 BHA + DMSO 联合诱导作用后,其神经细胞蛋白分子的表达顺序与神经干细胞分化成熟过程一致,且此种诱导方法可以在短时间内获得较高百分率的神经元样细胞。这为神经细胞的发育研究提供了一个较好的体外模型。值得注意的是,我们的研究从 6 h 开始存在 Nestin 和 NF-200 的共同表达,提示神经元发育过程中存在早晚标志蛋白表达的交叉,不能仅凭一个成熟标志决定其是否分化成熟。

MSC 以其自身的优势和向神经细胞分化的可塑性被认为是中枢神经系统疾病细胞治疗理想的种子细胞。但目前大多数 MSC 移植实验中所使用的细胞都是未经诱导的^[13],因为 MSC 体外诱导分化后的细胞一般存活时间短,不能有效增殖,尚不能满足移植的需要。在体外培养了骨髓来源的神经祖细胞并成功的诱导了向神经元细胞的分化,表达 nestin 的 MSC 为今后 MSC 移植治疗神经系统疾病提供新的细胞来源。

参考文献:

- [1] Maniopoulos C, Sodek J, Melcher AH. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rat [J]. *Cell Tissue Res*, 1988, 254(2): 317-330.
- [2] Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, et al. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage [J]. *J Bone and Joint Surgery*, 1994, 76(4): 579-592.
- [3] Awad HA, Butler DL, Boivin GP, et al. Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon [J]. *Tissue Eng*, 1999, 5(3): 267-277.
- [4] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage