

大鼠骨髓细胞体外诱导分化神经细胞的演变规律

李战辉, 刘振华, 姜晓丹, 徐如祥

(第一军医大学珠江医院中国人民解放军神经医学研究所, 广东 广州 510282)

摘要: 【目的】摸索从全骨髓诱导培养分化神经细胞的方法, 并从神经巢蛋白 (nestin) 和神经核蛋白 (NeuN) 两种标记物上观察其分化的演变规律。【方法】抽取 SD 大鼠骨髓做全骨髓细胞培养, 采用免疫细胞化学和荧光激活细胞计数仪 (FACS) 追踪由骨髓到神经元样细胞不同阶段 nestin 和 NeuN 的表达趋势, 给予定性、定量分析。【结果】免疫细胞化学检测, 细胞培养 5 d 时对上述抗体呈弱阳性, 逐渐增强, 培养第 15 天细胞呈典型 nestin 强阳性反应, 而 NeuN 强阳性反应在 25 ~ 30 d 达到高峰, 发育成为神经元样细胞。FACS 同步追踪显示了 nestin 和 NeuN 在培养第 5 天时即有表达, 前者 3.4%, 后者 2.5%。随着骨髓细胞的分化, 在 15 d 时 nestin 阳性细胞为 22.7%, 达到高峰, 随后下降。NeuN 于 30 d 达到高峰为 41.2%, 而此时 nestin 阳性细胞为 5.9%。【结论】从神经干细胞和神经细胞特征性标记物演变探知骨髓细胞的分化发育规律; 骨髓细胞可分化为神经细胞; 骨髓源性神经前体细胞早期亦有 nestin 和 NeuN 的表达。

关键词: 骨髓; 造血干细胞; 巢蛋白; 神经核蛋白

中图分类号: R329.26

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2004)04-0295-04

Inducement and Differentiation of Rat Bone Marrow Cells into Nerve Cells *In Vitro*

LI Zhan-hui, LIU Zhen-hua, JIANG Xiao-dan, XU Ru-xiang

(Neuromedical Institute of PLA, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China)

Abstract: 【Objective】To explore a method of differentiating the whole bone marrow cells into nerve cells and observe the way of development; meanwhile, to determine the expression level of nerve cell specific antigen marker —nestin and neuronal nuclei protein (NeuN). 【Methods】The whole bone marrow cells from the femurs and tibias of albino Sprague-Dawley adult rats were cultured. The expression tendency of nestin and NeuN positive cells from bone marrow cells to nerve cells was traced by immunocytochemical method and the fluorescein activated cell sortor(FACS) analysis. 【Results】Weak positive nestin and NeuN cells on the fifth day after culture were detected by immunocytochemical staining. After inducement, strong positive nestin cells peaked on the 15th day after culture. However, NeuN positive cells peaked on the 25th ~ 30th day after culture. The fluorescein activated cell sortor synchronistically manifested nestin and NeuN positive cells. The expression rates of nestin and NeuN positive cells were 3.4% and 2.5% respectively on the 15th day after culture. As the bone marrow cell differentiation went on, the expression rate of nestin positive cells peaked to 22.7% on the 15th day and NeuN positive cell to 41.2% on the 30th day. Whereas, the percentage of nestin positive cells was 5.9% on the 30th day following the cell culture. The neurons and glial

收稿日期: 2003-10-15

基金项目: 军队“十五”重点攻关课题基金资助项目 (01Z054); 广东省“十五”科技计划重大专项基金资助项目 (2001367号, 2003209号); 广东省团队科研基金资助项目 (200025号)

作者简介: 李战辉 (1973 -) 男, 广东五华人, 硕士研究生, 主治医师, 刘振华, 副教授, 导师. E-mail: lzhu@163.com

cells were identified by immunocytochemistry. **Conclusion** The way of rat bone marrow cell differentiating into nerve cell may be explored by detection of markers of both neural stem cell and neuronal specific antigen by FACS analysis. The expression of nestin as well NeuN in earlier period can be shown in nerve precursor derived from bone marrow.

Key words : bone marrow; hemopoietic stem cell; nestin; neuronal nuclei protein

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2004, 25(4): 295 - 298, 303]

在骨髓造血组织中,存在有血液、血管和间质三种组织的干细胞,分别称为造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)、血管干(母)细胞(angiolast)、间质干(基质)细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)。HSC和血管干细胞又来自一共同的干细胞,称原血干细胞或血液血管干细胞(hemangioblast)。骨髓细胞在不同的诱导条件下,具有向成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞、成纤维细胞、内皮细胞及神经细胞等分化的能力^[1,2]。本实验室摸索了由全骨髓培养分化神经细胞的最佳条件。我们采用免疫细胞化学和荧光激活细胞计数仪检测骨髓细胞在不同分化阶段神经巢蛋白(nestin)和神经核蛋白(neuronal nuclei protein, NeuN)的表达,观察其演变趋势,探知骨髓细胞诱导分化为神经细胞的发育规律。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及主要试剂

Sprague-Dawley (SD)大鼠 10 只(第一军医大学珠江医院实验动物所),雌雄不限,平均 25 d。nestin 抗体,微管相关蛋白抗体(microtubule associated protein-2, MAP-2), NeuN 抗体,神经胶质原纤维酸性蛋白抗体(glia fibrillary acidic protein, GFAP), 2, 3-环核苷酸磷酸二酯酶抗体(cyclic nucleotide phosphohydrolase, CNP),以上单克隆抗体系美国 Chemicon 公司产品。免疫细胞化学试剂盒(含山羊血清,生物素化羊抗小鼠 IgG,链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物)购自武汉博士德公司。3,3'-二氨基苯联胺(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB)和胎牛血清分别购自日本和光纯药工业株式会社和美国 HyClone 公司。

1.2 细胞培养

解剖出 SD 大鼠股骨,断骨抽取骨髓细胞,使用的注射器含 2 mL 生理盐水及 10 μ g 肝素钠,冰蒸水破红细胞后全部接种于培养板,悬浮于

“CYTOKINE·神经干细胞培养基”中(培养基系本实验室配制,专利申请中, No: 02134314, 4)。接种后滴加胎牛血清(体积分数 5%),置体积分数 5% 饱和湿度的 CO₂ 孵育箱 (Shel LAB, 美国) 37℃ 培养。第 10 天换液一次,加体积分数 5% 胎牛血清。此前尽量少取出观察,以免影响生长环境。

1.3 免疫细胞化学染色

对培养 5 d 的细胞,从培养孔收集至离心管进行一系列反应,DAB 显色后滴在载玻片上观察,往后的细胞直接在培养板孔中进行。将细胞以终浓度为 5 g/L 戊二醛 + 20 g/L 多聚甲醛室温固定 30 min,磷酸盐缓冲溶液(PBS)漂洗后用阻断液室温下孵育 30 min,以阻断对第一抗体的非特异性结合。漂洗后滴加适当一抗(nestin、GFAP、MAP-2、CNP 小鼠 IgG, 1:100) 4℃ 反应 48~72 h, PBS 洗 3 次,滴加生物素化山羊抗小鼠 IgG 室温孵育 20 min, PBS 洗 3 次,然后滴加链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物,室温孵育 20 min, PBS 洗 3 次。另用 PBS 替代第一抗体做空白对照。DAB 显色,倒置相差显微镜(OLYMPUS 日本)观察、照相。

1.4 荧光素激活细胞计数仪(fluorescein activated cell sortor, FACS)检测

收集不同培养阶段的细胞,1 000 r/min 离心(离心半径 $r = 12$ cm),分 3 份,制做悬液 0.5 mL,细胞数 1×10^6 。分别加 nestin 和 NeuN 单抗 50 μ L (1:100),及对照组用牛血清白蛋白(BSA),室温孵育 30 min,离心,弃上清,PBS 洗涤,加羊抗小鼠异硫氰酸荧光黄(fluorescein isothiocyanate, FITC, 美国 BD Biosciences 公司),室温孵育 30 min,洗涤重悬于 10 g/L 多聚甲醛中(PBS 配制)。采用荧光激活细胞计数仪(FACSCalibur, 美国 BD 公司)检测及其配套软件进行取数和分析。根据前向散射光(FSC)和侧向散射光(SSC)得到的 Dot Plot 直方图,框取细胞群,每标本依据同型对照调节光电倍增管的电压,限定其阳性表达率在 1% 以内,再检测样本的荧光表达率。

2 结果

2.1 免疫细胞化学鉴定

2.1.1 不同阶段骨髓细胞对 nestin 和 NeuN 反应

骨髓细胞培养 5 d, 见多种形态细胞 (图 1), 其中大圆形细胞对 nestin 和 NeuN 抗体均有反应, 显色较淡, nestin 阳性细胞的阳性产物较均匀分部在胞浆 (图 1 a), NeuN 阳性细胞的阳性产物主要集中在细胞核 (图 1 b)。培养 7 d 的细胞也呈类似的显色反应和分布, nestin 和 NeuN 的阳性产物均增加 (图

1 c、d)。培养至 15 d 后, 镜下见占大比例的形态均一的细胞, 对 nestin 呈强阳性反应, 阳性产物主要集中在胞浆 (图 1 e)。培养至 25~30 d 时可见细胞胞体呈长梭形, 有两个或多个突起, 并有突起相互连接, 呈神经元样, NeuN 呈强阳性反应, 整个胞体和突起近端均见阳性产物 (图 1 f、g)。此外, 发现 NeuN 阳性细胞有形成克隆团现象 (图 1 h), 阳性产物在整个胞体, 分布均匀。对照干细胞 (nestin 阳性细胞) 的克隆团 (图 1 i), 其阳性产物主要分布在胞质, 中留一空白区 (细胞核位置), 单个细胞染色与 (图 1 e) 相近。

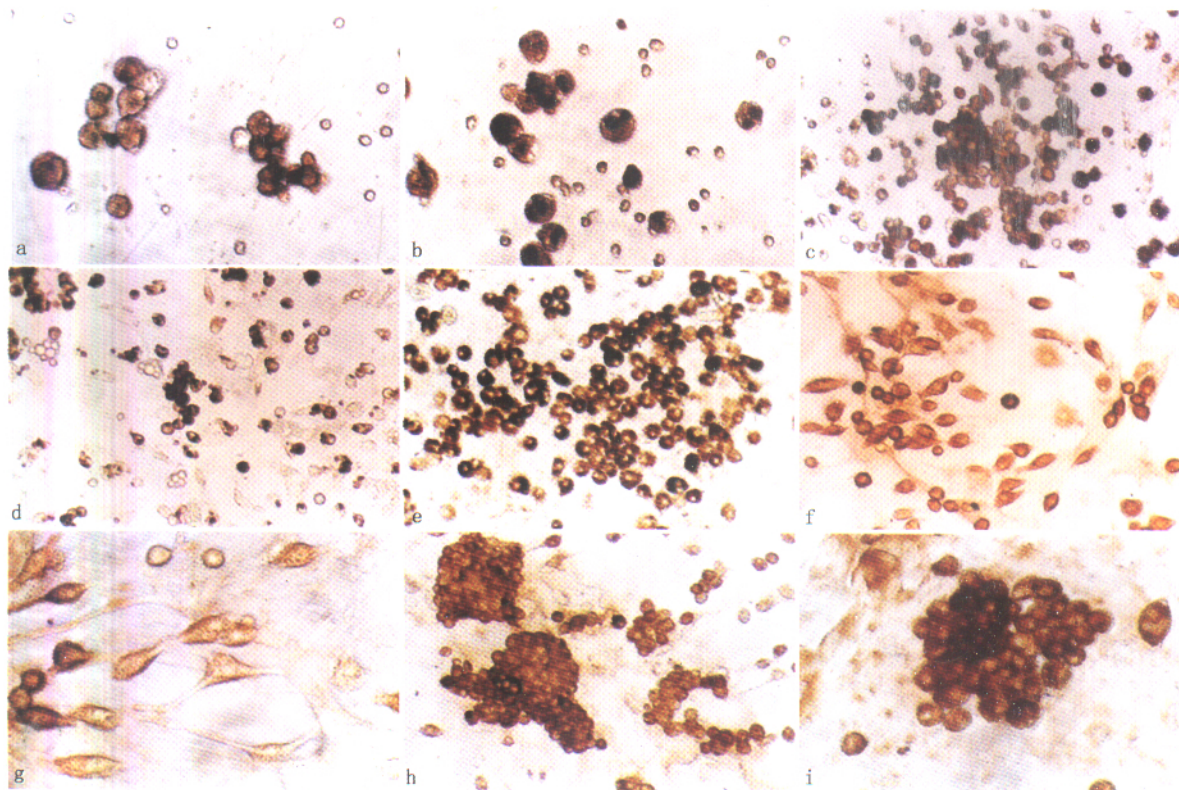


图 1 体外培养大鼠骨髓细胞不同阶段免疫细胞化学鉴定 (DAB 显色)

Fig. 1 Immunocytochemical identification of rat bone marrow cells cultured in different stages *in vitro* (chromogenic reaction of DAB)

a: Weakly positive nestin cells were cultured at the 5th day ($\times 400$); b: weakly positive NeuN cells were cultured at the 5th day ($\times 400$); c: Nestin positive cells were cultured at the 7th day ($\times 200$); d: NeuN positive cells were cultured at the 7th day ($\times 200$); e: Nestin positive cells were cultured at the 15th day ($\times 200$); f: NeuN positive cells showed fusiform shape and began to differentiate at the 25th day ($\times 200$); g: Neuro-like NeuN positive cells took on reticular structure at the 30th day following culture ($\times 400$); h: NeuN positive cells proliferated and formed into primary clone spheres at the 25th day after the culture ($\times 200$); i: Nestin positive cells proliferated and formed into primary clone spheres at the 15th day ($\times 400$)

2.1.2 神经细胞鉴定 细胞培养 30 d, 我们鉴定出神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞, 见图 2。MAP-2 阳性细胞呈典型神经元样, 有两个或多个突起, 包括形似树突和轴突的两种结构 (图

2a)。GFAP 阳性细胞胞体形态不规则, 突起无明显轴突、树突之分, 交织成网络状 (图 2 b)。CNP 阳性细胞胞体的形态较均一, 呈球形或梭形, 亦有突起与周围交织成网络状 (图 2 c)。

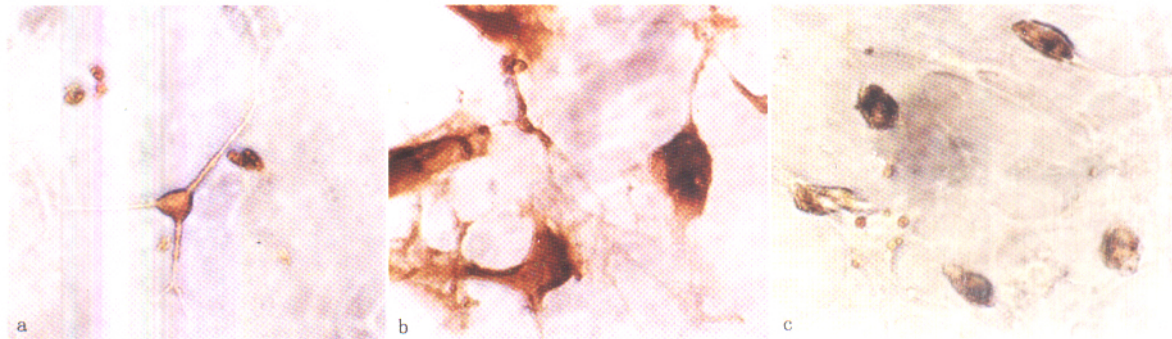


图 2 大鼠骨髓分化细胞免疫细胞化学鉴定

Fig. 2 Immunocytochemical stain of differentiating cells from rat bone marrow (chromogenic reaction of DAB)

a: MAP-2 positive cells were cultured at the 30th day, $\times 200$; b: GFAP positive cells were cultured at the 30th day, $\times 400$; c: CNP positive cells were cultured at the 30th day, $\times 400$

2.2 不同阶段骨髓细胞对 Nestin 和 NeuN 的 FACS 检测

骨髓细胞培养后第 5 天即有 nestin 和 NeuN 的表达, 培养第 15 天 nestin 阳性细胞达到高峰为 22.7%, 此时 NeuN 阳性细胞为 16.7%。第 30 天 NeuN 阳性细胞达到高峰为 41.2%, 而 nestin 阳性细胞为 5.9% (图 3)。

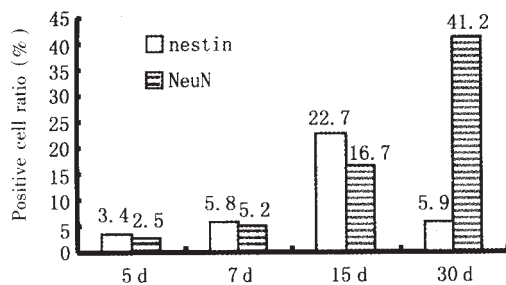


图 3 大鼠骨髓细胞不同培养时间阳性细胞比率

Fig. 3 The expression rate of nerve cell specific antigen marker (nestin and NeuN) during the induction and differentiation of rat whole bone marrow cells into nerve cells by FACS analysis

3 讨论

3.1 骨髓细胞可分化为神经细胞

我们采用全骨髓接种的方法, 先用冰蒸水裂解一次红细胞, 应用本实验室的干细胞培养基进行有血清培养, 未加其它干预因素, 甚至尽可能减少不必要的孵箱内外移动, 诱导出了神经干细胞, 并进一步分化为神经元和神经胶质细胞。FACS 检测, 骨髓细胞培养至 15 d 时神经干细胞分化达到高峰,

占 22.7%, 而表达神经核蛋白的细胞于 30 d 达到高峰, 占 41.2%。再次说明骨髓细胞能分化为神经细胞。本方法具有以下优势: ①方法简捷; ②高分化率, 假定神经样细胞是来源于 MSCs, 全骨髓接种将保留了全部的 MSCs, 提高了种子细胞。

3.2 骨髓细胞分化神经细胞的发育规律

Nestin 是在某些类型神经细胞发育晚期表达或低水平表达的 IV 型中间丝蛋白。在中枢神经系统 (CNS) 发育过程中, nestin 只在特定的一段时期表达, 然后分别被神经元的特异中间纤维和星型胶质细胞的 GFAP 取代。尽管 nestin 并非 CNS 所独有, 但由于神经干细胞对其具有高亲和性, 故目前神经科学界还是把它作为神经干细胞的主要标记物^[3]。本实验室用免疫细胞化学方法和 FACS 追踪骨髓细胞分化成神经元样细胞的不同阶段 nestin 的表达, 可确定骨髓中存在一类成体干细胞 (6 d 前), 在外因诱导下能增殖分化为神经元样细胞的前体细胞。这种前体细胞培养第 15 天免疫细胞化学鉴定出 nestin 表达强阳性, 提示已分化为神经干细胞。因这类细胞是来自骨髓, 且具有自我增殖和分裂的特性并最终发育为表达 NeuN 和 MAP-2 的神经元样细胞, 有别于胚胎源性和脑源性, 故可称为骨髓源性神经干细胞。至于分化为骨髓源性神经干细胞的成体干细胞是来源于 HSC 或者 MSCs, 还是两者兼有, 目前国内外较倾向于 MSCs^[1, 4]。骨髓源性神经干细胞在培养 15 d 时达到高峰, 可考虑利用此期的细胞行进一步的移植实验。

NeuN 是神经细胞特有的蛋白质, 是与神经元 DNA 结合的特异标记物, 出现在绝大多数脊椎动物中枢神经和周围神经的神经细胞中^[5]。在胎儿和

(下转第 303 页 to page 303)

在前列腺癌,尤其是在激素非依赖性前列腺癌细胞、转移癌及复发癌中高表达,所以在前列腺癌的特异性放射免疫显像诊断及导向治疗方面具有重要的临床意义。并且我们制备的是与PSMA胞外区特异结合的抗体,会进一步提高该抗体的显像与治疗效果,为前列腺癌特别是激素不敏感性前列腺癌及多发、微小、不能切除的转移灶的治疗开拓广阔的前景。

参考文献:

- [1] Kang A S, Jone T M, Burten D R. Antibody redesign by chain shuffling from random combinational immunoglobulin libraries[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(24): 11120-3.
- [2] 田学军,寿成超,孟麟,等. PCR条件及程序改变对抗体库多样性的影响[J]. 生物化学与生物进展, 1999, 26(6): 172-6.
- [3] Wu B P, Xiao B, Wan T M, et al. Construction and selection of the natural immune Fab antibody phage display library from patients with colorectal cancer[J]. World J Gastroenterol, 2001, 7(6): 811-5.
- [4] Zhang Z C, Hu X J, Yang Q. Generation of high affinity

human single-chain antibody against PreS1 of hepatitis B virus from immune phage-display antibody library[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2004, 3(1): 77-81.

- [5] Osbourn J, Jermutus L, Duncan A. Current methods for the generation of human antibodies for the treatment of autoimmune diseases[J]. Drug Discov Today, 2003, 8(18): 845-51.
- [6] 赵禹,侯秉璋,乔玲,等. 电转化技术在噬菌体抗体库构建中的应用[J]. 天津医科大学学报, 2002, 8(4): 413-5.
- [7] Soderlind E, Lagerkvist A C, Duenas M, et al. Chaperonin assisted phage display of antibody fragments on filamentous bacteriophages[J]. Bio Technology, 1993, 11(4): 503-7.
- [8] Chaudhary V K, Batra J K, Gallo M G, et al. A rapid method of cloning functional variable-region antibody gene in *Escherichia coli* as single-chain immunotoxins[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(3): 1066-70.
- [9] 叶传忠,唐群业,张永康. 前列腺特异膜抗原(PSMA)的检测及临床应用进展[J]. 国外医学临床生物化学与检测学分册, 2001, 22(1): 46-7.

(编辑 张敏瑞)

(上接第298页 from page 298)

成体脑中,NeuN严格分布在神经核、核周体和一些近端神经元突起中。但在检测骨髓细胞nestin的同时做NeuN检测,不论从免疫细胞化学还是FACS角度均证实骨髓细胞早期(6d)即有NeuN表达,且伴随nestin表达而增强,细胞有形成克隆团样倾向。培养15d后与nestin表达存在此长彼消趋势,到表达高峰期(30d)已呈神经元样细胞。以上现象说明:表达NeuN的细胞在成为神经元样细胞之前,形态上是大圆形细胞,但已具备神经元的生物学基础,同时具有增殖分裂特性。也可认为,NeuN阳性细胞和nestin阳性细胞本质上是同一种细胞,只是发育阶段不同。为此,神经细胞移植时可否考虑择选此类细胞移植,理论上应该比表达nestin的神经干细胞移植更直接。

3.3 骨髓细胞分化为神经细胞的前景

骨髓在未来的组织工程技术发展中将处于核心位置^[6],不仅它是两种类型干细胞(HSCs和MSCs)的定居器官,而且它的优点在于:①容易从成体中收集和培养;②与胚胎干细胞相比,既不存在伦理、道德问题,也不存在来源及数量有限等问题。骨髓细胞向神经细胞(神经元及胶质细胞)方向诱导分化的成功,可较好地解决移植中的免疫排斥

问题和供体数量有限等问题,为神经干细胞移植疗法提供丰富的种子细胞源。

参考文献:

- [1] Azizi S A, Stokes D, Augelli B J, et al. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(7): 3908-13.
- [2] Eglitis M A, Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(8): 4080-5.
- [3] Mokry J, Nemecek S. Angiogenesis of extra- and intra-embryonic blood vessels is associated with expression of nestin in endothelial cells[J]. Folia Biol (Praha), 1998, 44(5): 155-61.
- [4] 项鹏,夏文杰,王连荣,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): 321-4.
- [5] Wolf H K, Buslei R, Schmidt-Kastner R, et al. NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology[J]. J Histochem Cytochem, 1996, 44(10): 1167-71.
- [6] Bianco P, Robey P G. Stem cells in tissue engineering[J]. Nature, 2001, 414(6859): 118-21.

(编辑 刘清海)