

成人骨髓间质干细胞分化为神经元样细胞及与凋亡的关系

姚晓黎, 张成, 刘卫彬, 冯善伟, 柳太云, 卢锡林, 张为西, 黄文

(中山大学附属第一医院神经内科, 广东, 广州 510080)

摘要:【目的】探讨体外诱导成人骨髓间质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSC)向神经元样细胞分化过程中分化与凋亡的关系,为进一步研究延长神经元样细胞的存活时间提供基础。【方法】从成人骨髓分离MSC,培养扩增。以 β -巯基乙醇和参芪液诱导分化,于诱导后1、3、5 h分别进行免疫组化鉴定神经元烯醇化酶(NSE)、神经丝蛋白(NF)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)的表达,计数神经元样细胞,计算分化率。采用TUNEL方法分别检测诱导后1、3、5 h的细胞凋亡率,并分析两者是否相关。【结果】hMSC经 β -巯基乙醇和参芪液诱导后,可见神经元样细胞。免疫组化显示诱导出的神经元样细胞表达NSE、NF阳性、GFAP阴性。神经分化的定量分析显示诱导后1、3、5 h,经 β -巯基乙醇诱导NSE、NFH阳性细胞分别为 $43.5\% \pm 1.8\%$ 、 $59.3\% \pm 2.2\%$ 、 $76.5\% \pm 2.3\%$ 和 $42.6\% \pm 1.9\%$ 、 $55.1\% \pm 2.1\%$ 、 $73.5\% \pm 2.3\%$ 。参芪液诱导NSE、NFH阳性细胞分别为 $49.5\% \pm 1.9\%$ 、 $62.3\% \pm 2.1\%$ 、 $79.5\% \pm 2.5\%$ 和 $45.6\% \pm 1.9\%$ 、 $59.1\% \pm 2.1\%$ 、 $76.5\% \pm 2.3\%$ 。经两种诱导剂诱导后1、3、5 h,TUNEL检测两者的凋亡率分别为1.5%、6.5%、19.5%和0.5%、2.3%、12.5%。【结论】 β -巯基乙醇和参芪液均可在体外诱导hMSC分化为神经元样细胞。hMSC向神经元样细胞分化过程中也发生凋亡,分化率与凋亡率相关。参芪液可提高分化率,降低凋亡率。

关键词:骨髓间质干细胞;神经元;凋亡

中图分类号:R363

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2004)06-0516-05

Relationship Between Apoptosis and Differentiation from Human Mesenchymal Stem Cells into Neuron-like Cells

YAO Xiao-li, ZHANG Cheng, LIU Wei-bin, FENG Shan-wei, LIU Tai-yun,

LU Xi-lin, ZHANG Wei-xi, HUANG Wen

(Department of Neurology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To elongate the lifetime of neuron-like cells differentiated from human mesenchymal stem cells (hMSC), the relationship between apoptosis and differentiation in the process of induction was investigated. 【Methods】hMSC were separated from rib marrow and expanded to five passages in culture medium. hMSC were induced to differentiate with different inducers, β -mercaptoethanol and shenqiye. After 1 h, 3 h, and 5 h of induction, neuron-specific enolase (NSE), neurofilament (NF), and glial fibrillary acidic protein (GFAP) were examined by immunocytochemistry respectively. The ratio of neuron-like cells were counted by phase-contrast microscopy. At the same time, the ratio of apoptotic cells after induction was detected by TUNEL. 【Results】hMSC were expanded as undifferentiated cells in culture for more than 5 passages. When treated with inducers β -mercaptoethanol and shenqiye, hMSC exhibited neuronal phenotype. The expression of NSE and NF in the neuron-like cells were positive, but the glial astrocyte marker GFAP was not found. After 1 h, 3 h, and 5 h of induction with β -mercaptoethanol, the ratios of NSE positive cells were $43.5\% \pm 1.8\%$, $59.3\% \pm 2.2\%$, and $76.5\% \pm 2.3\%$, respectively, and all

收稿日期:2004-06-29

基金项目:卫生部临床学科重点基金资助项目(2001321);广东省科技计划基金资助项目(2KM05501S)

作者简介:姚晓黎(1971-),女,福建莆田人,博士,讲师;张成,教授,导师,课题负责人。E-mail: yecaiheng@sina.com

that of NF positive cells were $42.6\% \pm 1.9\%$, $55.1\% \pm 2.1\%$, and $73.5\% \pm 2.3\%$, respectively. After 1 h, 3 h, and 5 h of induction with shenqiye, the ratios of NSE positive cells were $49.5\% \pm 1.9\%$, $62.3\% \pm 2.1\%$, and $79.5\% \pm 2.5\%$, respectively, and that of NF positive cells were $45.6\% \pm 1.9\%$, $59.1\% \pm 2.1\%$, and $76.5\% \pm 2.3\%$, respectively. After 1h, 3h, and 5h of induction with β -mercaptoethanol and shenqiye, the ratios of apoptotic cells were 1.5%, 6.5%, 19.5% and 0.5%, 2.3%, 12.5%, respectively. **【Conclusion】** β -mercaptoethanol and Shenqiye can induce hMSC to differentiate into neuron-like cells. Apoptosis is observed in the process of differentiation. The ratio of differentiation is correlated with apoptosis. Shenqiye could improve the ratio of differentiation and reduce the ratio of apoptosis.

Key words: mesenchymal stem cells; neurons; apoptosis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2004, 25(6): 516 - 520]

目前认为骨髓中至少含有两种干细胞:造血干细胞和间质干细胞。间质干细胞是维持机体正常造血微环境的重要组成部分。其本身在合适的体内外环境中可长期生长,在一定的环境条件下,也可分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞、骨髓基质细胞、血管内皮细胞、肝细胞和神经细胞等^[1]。通过 MSC 体内移植研究表明, MSC 具有形成神经元的能力,且具有可移植性^[2-4]。Woodbury 等^[5]使用巯基乙醇为诱导剂,在体外快速诱导骨髓干细胞分化成神经元样细胞。同时发现二甲基氧化硫(DMSO)羟基苯甲醚丁醛(BHA)也可以作为诱导剂。国内项鹏等^[6]也报道应用中药在体外定向诱导 MSC 分化为神经元样细胞。但是,由于神经元样细胞在体外存活时间短,并出现细胞凋亡,因此,有必要进行研究神经元样细胞在分化过程和凋亡的关系,以了解神经元样细胞的形成机理,对于治疗肌萎缩侧索硬化症等神经系统变性疾病都具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料与主要试剂

成人肋骨来源于非血液系统疾病的胸外科手术中摘取的肋骨。胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS, Hyclone 公司)达乐伯克改良必需基本培养剂(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM, Gibco 公司)Ficoll-paque 分离液(Pharmacia, 瑞典)碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblastic growth factor, bFGF, PeproTech)小鼠抗人神经元烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE, Maxim 公司)胶质纤维酸性蛋白(glia fibrillary acidic protein, GFAP, Maxim)、小鼠抗人神经丝蛋白单抗

(neurofilament, NF, Neomarkers 公司)超敏 SP(鼠)试剂盒(MBI 公司)DAB 显色试剂盒(DAKO 公司)TUNEL 试剂盒(DAKO 公司) β -巯基乙醇(β -mercaptoethanol, BME, Sigma 公司)参芪液(广东丽珠集团利民制药厂)。以上试剂如无说明,皆为美国产品。

1.2 hMSC 的分离、传代培养^[7]

无菌条件下,用含 100 mL/L FCS 的 DMEM 冲出骨髓,充分混匀,转入离心管,1 500 r/min 离心(德国 5810R)10 min ($r = 16$ cm),弃上清及脂肪层,沉淀用 DMEM 充分混匀,轻轻叠加到密度为 1.077×10^3 g/L 的 Ficoll-Paque 分离液上,2 500 r/min 离心 30 min,收集单核细胞层,用 DMEM 洗涤两次。按 1×10^9 /L 密度接种,37 °C、体积分数 5% CO₂ 饱和湿度下培养,5 d 后更换培养液,弃去未贴壁细胞,3-4 d 换液 1 次,接近融合的 MSC 用含 0.1 mmol/L EDTA 的 0.025 g/L 胰酶室温消化 5-10 min,1 500 r/min 离心 20 min,弃上清,沉淀按 1:3 比例传代。

1.3 定向诱导 hMSC 分化为神经元样细胞

传至第 5 代的 MSC 按 4×10^8 /L 密度接种于有盖玻片的 6 孔板内制备细胞爬片。细胞用含 20% FBS、bFGF(10 ng/mL)的 DMEM 预诱导 24 h,更换培养液,PBS 洗涤 3 次,再分别加入 β -巯基乙醇(6 mmol/L)和参芪液的无血清 DMEM 诱导 1、3、5 h。对照组不加任何诱导剂。每组包括 18 个细胞爬片。

1.4 神经元样细胞的鉴定

诱导后细胞用 40 g/L 多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗涤,加入过氧化物酶阻断液阻断内源性过氧化物酶,5% 正常羊血清封闭,分别加入小鼠抗人神经元烯醇化酶(NSE)胶质纤维酸性蛋白(GFAP)单克隆抗体(即用型)小鼠抗人神经丝蛋白单抗(NFH, 1:100

稀释),室温孵育 1 h, PBS 洗涤,加入生物素标记的二抗(羊抗小鼠免疫球蛋白),室温下孵育 10 min,洗涤,加入链亲和素-过氧化物酶溶液,孵育 10 min,洗涤,DAB 溶液显色,中性树胶封固。神经元样细胞免疫组化染色后光镜下随机数取 10 个非重叠视野($\times 100$),计算 NSE 和 NFH 阳性细胞占总细胞数的比例,结果用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

1.5 DNA 末端转移酶介导的原位缺口末端标记法(TUNEL)

细胞固定后,加标记缓冲液 20 μ L/片,之后按每片取 TdT 和 DIG-d-UTP 各 1 μ L,加入 18 μ L 标记缓冲液,混匀后加入。置标本于湿盒中,37 $^{\circ}$ C 标记 2 h。0.1 mol/L TBS 清洗后,加封闭液 50 μ L/片,于室温 30 min。加生物素化地高辛抗体 50 μ L/片,置标本于湿盒中,37 $^{\circ}$ C 标记 30 min。0.1 mol/L TBS 洗 3 次,加链霉素亲和素-过氧化物酶(SABC)5 μ L/片,37 $^{\circ}$ C 反应 60 min。0.1 mol/L TBS 洗 4 次。DAB 显色,显微镜观察。随机数取 10 个非重叠视野($\times 100$),计算凋亡细胞占总神经元样细胞数的比例,结果用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

1.6 统计学处理

实验结果采用 SPSS10.0 软件包进行分析,组间均数比较采用 *t* 检验,指标间分析采用 Pearson's 相关分析。

2 结果

2.1 MSC 的分离、扩增结果

用 DMEM (含 200 mL/L FCS) 培养的骨髓细胞,3 d 后逐渐出现贴壁细胞,呈圆形或梭形,5 d 后完全换液除去大部分血细胞,此时贴壁细胞为单个或

几个细胞的克隆,细胞形态均一,为长梭形,贴壁的 MSC 增殖迅速,培养 10 d 左右每个克隆约有 150 个细胞,培养至 15~18 d 细胞接近融合,排列具有一定的方向性,呈漩涡样。传代后细胞于 24 h 内完全贴壁,7~10 d 达到完全融合。单个克隆体外扩增 5 代细胞数为 5×10^7 。

2.2 MSC 神经诱导

MSC 在含(10 μ g/mL bFGF、200 mL/L FCS)的 DMEM 预诱导液中处理 24 h 后,加入不同的诱导剂,1 h 后部分细胞形态发生变化,原来宽大扁平的 MSC 胞质向核收缩,呈典型的核周体形态,突起伸出(轴突),5 h 后,大多数 MSC 变为典型的神经元,胞体向细胞核收缩成圆锥形,且变得致密有折光性,突起越来越多,并在轴突末端出现一级和二级分支,类似树突(图 1);多个神经元样细胞突起可相互延伸并连成网状。对照组细胞仍然保持宽大扁平的状态。

2.3 神经元样细胞免疫组化鉴定

结果显示,诱导后,大多数细胞表现为 NSE 染色阳性,呈棕黄色,表现为简单的双极细胞或复杂的多极细胞,并可见部分神经元交织成网状(图 2),对照组则无阳性细胞出现(图 3)。NF 是一种神经元特异性的中间纤维,是神经元胞质的主要结构之一,NF 免疫组化结果与 NSE 结果类似(图 4)。同时 GFAP 免疫组化结果显示,无阳性细胞出现(图 5)。说明本研究诱导 MSC 分化为神经元而非星形胶质细胞。

2.4 神经分化的定量分析

随机记数 10 个视野计算结果显示诱导后大多数细胞均转变为神经元样细胞的细胞(表 1)。

表 1 两种诱导剂诱导 MSC 分化为神经元样细胞的阳性率

Table 1 The ratio of neuron-like cells differentiated from human mesenchymal stem cells (hMSC) by two inducers (%)

Inducers	1 h		3 h		5 h	
	NSE	NF	NSE	NF	NSE	NF
BME	43.5 \pm 1.8	42.6 \pm 1.9	59.3 \pm 2.2	55.1 \pm 2.1	76.5 \pm 2.3	73.5 \pm 2.3
Shenqiye	49.5 \pm 1.9 ¹⁾	45.6 \pm 1.9	62.3 \pm 2.1	59.1 \pm 2.1	79.5 \pm 2.5	76.5 \pm 2.3

NSE: neuron-specific enolase; NF: neurofilament; BME: β -mercaptoethanol ;1)Compared with BME, *P* < 0.05

2.5 TUNEL 检测细胞凋亡率

经两种诱导剂诱导 MSC 分化为神经元样细胞后,TUNEL 检测细胞凋亡,可见神经元样细胞出现典型的凋亡细胞核改变,细胞核固缩、浓染,核内出

现致密浓染颗粒,呈棕黄色,并有核碎裂迹象(图 6)。随机记数 10 个视野计算结果,显示诱导后出现的细胞凋亡率(表 2)。

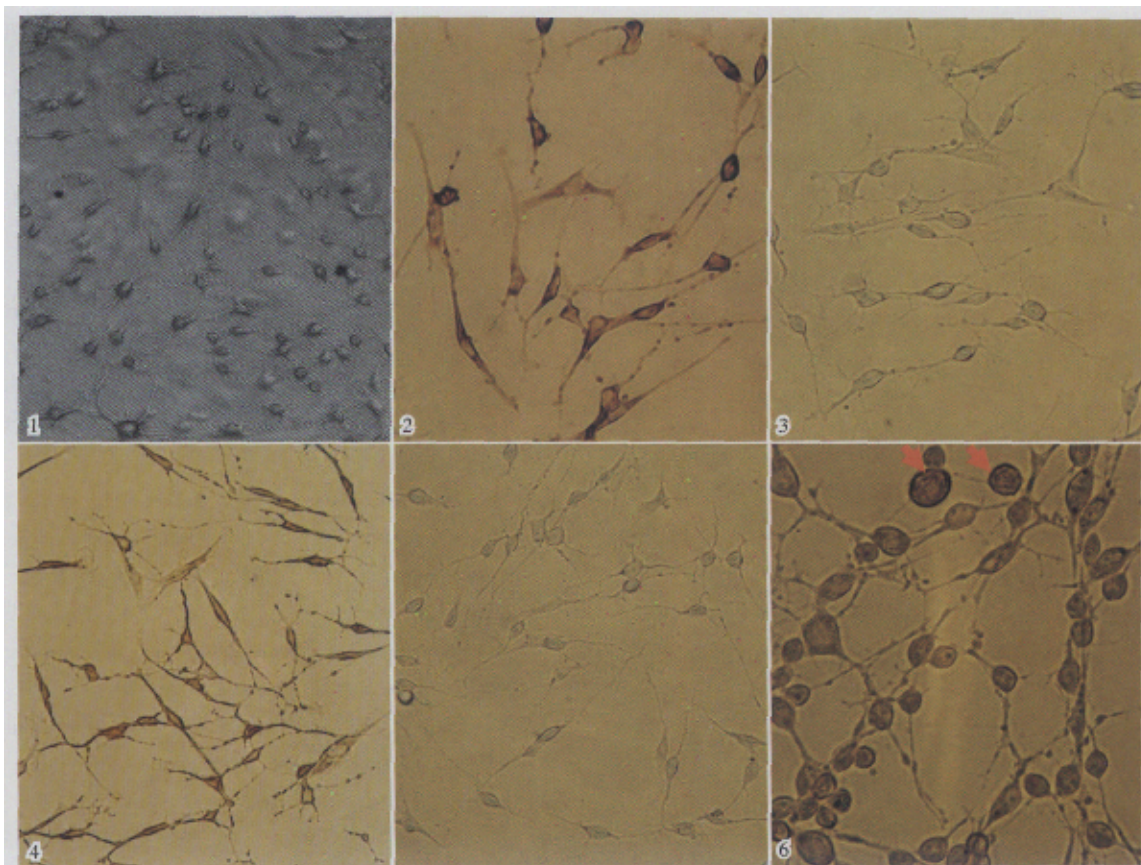


图 1 诱导后出现的神经元样细胞

图 2 NSE 阳性的神经元样细胞

图 3 对照组的神经元样细胞

Fig. 1 Induced neuron-like cells showing axons and dendrites

Fig. 2 Neuron-like cells expressing NSE It is present brown stains by immunohistochemical analysis

Fig. 3 Neuron-like cells in the contrast team It is not present brown stains by immunohistochemical analysis

图 4 NF 阳性的神经元样细胞

图 5 GFAP 阴性的神经元样细胞

图 6 凋亡的神经元样细胞

Fig. 4 Neuron-like cells expressing NF It is present brown stains by immunohistochemical analysis

Fig. 5 Neuron-like cells not expressing GFAP It is not present brown stains by immunohistochemical analysis

Fig. 6 Neuron-like cells in the stage of apoptosis showing the brown granules in the nucleus (arrowhead)

2.6 诱导 hMSC 分化为神经元样细胞的阳性率与凋亡率相关性

经 Pearson's 相关性检验,发现 hMSC 分化为神经元样细胞的阳性率与凋亡率相关,相关系数均大于 0.85。

表 2 不同诱导剂在诱导后 1 h, 3 h, 5 h 的凋亡率

Table 2 The ratio of apoptosis cells induced after 1 h, 3 h, and 5 h by two inducers (%)

Inducers	1 h	3 h	5 h
BME	1.5 ± 0.3	6.5 ± 0.9	19.5 ± 4.0
Shenqiye	0.5 ± 0.3 ¹⁾	2.3 ± 0.9 ²⁾	12.3 ± 5.0

BME: β -mercaptoethanol; 1) Compared with BME, $P < 0.05$;

2) Compared with BME, $P < 0.01$

3 讨论

本实验采用 β -巯基乙醇和参芪液诱导 hMSC 分化为神经元样细胞,这与以往报道一致。我们发现参芪液组在各诱导点的诱导分化率明显高于 β -巯基乙醇组,尤其在分化早期,两者差异存在统计学意义。 β -巯基乙醇的诱导作用可能与抗氧化作用有关。而参芪液为中成药,其主要成分为党参和黄芪,有研究认为,党参和黄芪具有补中益气、生津养血的功效,可以促进正常机体生长,有抗氧化、增强免疫和抑制细菌的作用^[8]。

在本实验中,诱导分化后的神经元样细胞表达

神经元特异性标志 NSE 和 NF, 说明细胞不仅是形态发生变化, 而且在神经元样细胞的基因表达水平也发生改变。神经丝蛋白是一种细胞骨架蛋白, 包括大、中、小 3 种亚单位, 它们是构成神经元胞体和突起的重要结构。本实验大部分神经元样细胞胞体和突起均为阳性, 另一些细胞只有胞体阳性, 可能该细胞尚处于神经元前体阶段。GFAP 标志物染色为阴性, 说明该神经元样细胞不是星形胶质细胞。

在本实验中, 诱导分化的神经元样细胞存活时间短, 在诱导后 24 h 大部分死亡。经 TUNEL 检测后发现, 分化后的神经元样细胞出现凋亡细胞核的形态: 细胞核固缩、浓染, 核内出现致密浓染颗粒, 呈棕黄色, 并有核碎裂迹象。随着分化时间的延长, 细胞分化率提高, 凋亡的细胞也越来越多。经统计分析, 两者呈相关。这说明诱导、分化后的神经元样细胞的死亡与凋亡有关, 但是凋亡原因有待进一步研究。这可能与只是单独使用 β - 巯基乙醇和参芪液有关, 未加入任何神经生长因子和促进神经生长的物质。如 Woodbury 使用特殊的诱导剂, 神经元样细胞可存活超过 72 h, 细胞凋亡率为低于 1%, 因此, 他们认为细胞选择在神经元诱导分化中不是最重要的因素, 而诱导剂很明显在诱导分化过程中起主要的作用^[9]。

本研究在 Friedenstein 等^[7]的方法上进行了些改进, 从成人骨髓中分离得到骨髓间质干细胞, 并在体外大量扩增, 这一发现可能为 MSC 的临床应用有较大的帮助, 因临床应用需要用 hMSC 细胞移植才可能有效。由于 MSC 取材方便, 可在体外长期培养、遗传背景稳定、免疫源性低下等特点, 因此在临床应用上比神经干细胞更有优越性。而神经系统疾病如脑血管病、痴呆、帕金森病、肌萎缩侧索硬化症等的治疗一直是个大难题, 因此, 同时, 建立体外定

向诱导模型, 有助于我们研究 MSC 分化为神经元的分子机理, 为 MSC 应用提供依据。

参考文献:

- [1] Pittenger M F, Mackay A M, Jaiawal S C, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(6411): 143-7.
- [2] Kopen G C, Prockop D J, Phinney D G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(19): 10711-6.
- [3] Brazelton T R, Rossi F W M, Keshet G I, et al. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice[J]. Science, 2000, 290(5497): 1775-9.
- [4] Mezey E, Chandross K J, Harta G, et al. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow[J]. Science, 2000, 290: 1779-82.
- [5] Woodbury D, Schwarz E J, Prockop D J, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons [J]. J Neurosci Res, 2000, 61(4): 364-70.
- [6] 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(6): 321-4.
- [7] Friedenstein A J, Chailakhyan R K, Gerasimov U V. Bone marrow osteogenic stem cells: *in vitro* cultivation and transplantation[J]. Cell Tissue Kinet, 1987; 20(3): 263-9.
- [8] 颜正华主编. 中药学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 731-4.
- [9] Guillermo M E, Woodbury D, Black I B. Marrow stromal cells, mitosis, and neuronal differentiation: stem cell and precursor functions[J]. Stem cells, 2003, 21(3): 437-48.

(编辑 刘清海)