

基础研究

无血清培养骨髓基质干细胞向神经细胞
诱导分化条件的优化

吴 斌, 郑启新, 郭晓东, 吕 浩, 吴永超

(华中科技大学同济医学院附属协和医院骨科 430022 武汉市)

【摘要】目的:探索无血清培养的骨髓基质干细胞(BMSCs)向神经细胞诱导分化条件的优化方案,为 BMSCs 应用于脊髓损伤的临床治疗创造条件。**方法:**用含 2% Utroser G 的 UltraCULTURE 无血清培养体系体外扩增人 BMSCs,采用流式细胞仪检测培养细胞的表面标志,再以全反式维甲酸、 β -巯基乙醇和神经生长因子为主要成分组成 6 种诱导液诱导 BMSCs 向神经细胞分化,镜下观察细胞形态学变化,用抗人 β 微管蛋白(β -Tubulin)抗体和抗人胶质纤维酸性蛋白(GFAP)抗体进行免疫荧光染色鉴定诱导后的神经细胞,通过流式细胞仪检测诱导后细胞的凋亡率。**结果:**无血清培养的 BMSCs 在 6 种诱导条件下均可不同程度地分化为神经样细胞,镜下可见诱导后细胞表现为神经细胞形态特征,免疫荧光染色显示 β -Tubulin 和 GFAP 均有阳性表达,诱导后细胞发生不同程度的凋亡,其中全反式维甲酸和神经生长因子组成的复合诱导液的诱导效率较高,诱导后细胞凋亡率较低。**结论:**全反式维甲酸与神经生长因子联合应用可在体外高效、稳定地诱导无血清培养的 BMSCs 分化为神经样细胞,是较佳的诱导条件。

【关键词】骨髓基质干细胞;无血清;诱导分化;神经细胞;凋亡

中图分类号:Q813.5,R329.2 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2007)-05-0372-05

Optimization of induction and differentiation condition of neurocytes from bone marrow stromal cells cultured in serum-free medium/WU Bin,ZHENG Qixin,GUO Xiaodong,et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord,2007,17(5):372~375

【Abstract】 Objective:To study the optimization of induction and differentiation condition of neurocytes from bone marrow stromal cells(BMSCs) cultured in serum-free medium and lay the basis for clinical application of BMSCs on the therapy of spinal cord injury.**Method:**BMSCs were amplified in a serum-free medium(UltraCULTURE) supplemented with 2% Utroser G.Cell surface antigens were detected with flow cytometry.Six groups of revulsivum composed of all-trans-retinoic acid,nerve growth factor and beta-mercaptoethol were used to induce BMSCs into neurocytes.Morphological changes during the induction of BMSCs were observed under microscopes.The induced cell were stained immunofluorescently with β -Tubulin and GFAP.The rate of apoptosis of induced cells was evaluated by flow cytometry.**Result:**BMSCs cultured in serum-free medium could differentiate into neurocytes to some extent after respective induction of 6 groups of revulsivum.The induced cells showed neurocyte-like morphological changes under microscopes.These cells were positively stained with β -Tubulin and GFAP.The induced cells displayed apoptosis to some extent.The group of all-trans-retinoic acid combined with NGF was the optimization of induction and differentiation condition because of its higher inductive efficiency and its lower rate of apoptosis.**Conclusion:**BMSCs cultured in serum-free medium can effectively and stably differentiate into neurocytes induced by all-trans-retinoic acid combined with NGF in vitro.

【Key words】 Bone marrow stromal cells;Serum-free;Differentiation;Neurocyte;Apoptosis

【Author's address】 Department of Orthopaedics,the Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology,Wuhan,430022,China

基金项目:自然科学基金资助项目(项目号:30500511)

第一作者简介:男(1980-),医学硕士,研究方向:脊柱脊髓损伤

电话:(027)85726196 E-mail:tougao2004@163.com

骨髓基质干细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)又称骨髓间充质干细胞,存在于骨髓间质中,具有自我复制能力,可在特定条件下诱导分化

为软骨细胞、成骨细胞、神经细胞、骨骼肌细胞、心肌细胞、肝细胞、胰腺 β 细胞等多种胚层起源的细胞^[1]。脊髓损伤是困扰医学界的一大难题。近年来细胞移植研究的不断深入使脊髓损伤的治疗看到了希望,其中 BMSCs 来源丰富,取材方便,自体移植无免疫排斥性,在一定条件下可迅速扩增并诱导分化为神经细胞,成为脊髓损伤后细胞替代治疗的理想移植细胞之一。本研究中我们以无血清培养的人 BMSCs 为研究对象,探讨其向神经细胞分化较佳的诱导方法,从而为 BMSCs 最终应用于脊髓损伤治疗创造条件。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

UltraCULTURE 无血清培养基 (Cambrex 公司), 谷氨酰胺 (Gibco 公司), Utroser G (Pall BioSeptra 公司), 表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 及神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) (晶美公司), 淋巴细胞分离液 (TDK 生物公司), 全反式维甲酸 (all-trans-retinoic acid, RA) (Hyclone 公司), PBS (Gibco 公司), 胰酶 (Sigma 公司), 多聚赖氨酸 (Sigma 公司), 小鼠抗人 β 微管蛋白 (β -Tubulin) 单克隆抗体, 兔抗人胶质纤维酸性蛋白 (glia fiber acid protein, GFAP) 多克隆抗体, 异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的羊抗小鼠二抗, 四甲基异硫氰酸罗丹明 (tetramethyl rhodamine isothiocyanate, TRITC) 标记的羊抗兔二抗 (博士德公司), CD44-FITC, CD45-FITC, CD90-FITC, CD34-FITC (eBioscience 公司), 碘化丙啶 (propidium iodide, PI) (Sigma 公司), β -巯基乙醇 (beta-mercaptoethanol, BME) (Sigma 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 BMSCs 的分离培养 无菌条件下从健康成人髂前上嵴抽取骨髓 15ml (自愿捐献), 快速置入含肝素 (100U/ml) 的无菌离心管中, 加入适量的 PBS 充分混匀, 用滴管缓慢滴加于淋巴细胞分离液 (密度为 1.077g/L) 上层, 离心收集云雾状细胞层, PBS 悬浮洗涤 3 次后, 用含 2% Utroser G 的 UltraCULTURE 无血清培养液吹打成均匀悬液后接种至 50ml 培养瓶。在 5% CO_2 、饱和湿度、37℃ 条件下培养, 3d 后首次换液, 弃去不贴壁细胞, 以

后每 2~3d 换液 1 次。细胞生长融合达 70%~80% 时, 用 0.25% 胰酶消化, 以 1:2 的比例传代培养。

1.2.2 BMSCs 的鉴定 选取第 3 代生长均一的细胞, 用 0.25% 的胰酶消化后制成单细胞悬液, PBS 洗涤 3 次后加入流式检测管, 每管 0.5ml, 在各管中分别加入 CD44-FITC、CD45-FITC、CD90-FITC 及 CD34-FITC 5 μ l, 4℃ 避光孵育 30min, PBS 洗涤重悬 3 次, 流式细胞仪检测, 以同种荧光标记的 IgG1 抗体作为阴性对照确定背景标记。

1.2.3 BMSCs 的诱导分化 共分为 7 个组, 每组 12 个孔, 将生长状态良好的第 3 代 BMSCs 经胰酶消化后, 按每孔 1×10^4 个/cm³ 的密度接种于放置盖玻片 (多聚赖氨酸包被) 的 12 孔板中, 当细胞融合达 50%~60% 时, 去掉旧培养液, 加入预诱导培养液 (含有 20ng/ml bFGF, 20ng/ml EGF 及含 2% Utroser G 的 UltraCULTURE 无血清培养液), 在 5% CO_2 、饱和湿度、37℃ 条件下培养 48h 后去除预诱导培养液, 加入不同的诱导培养液 (表 1)。以后每 3~4d 更换新鲜诱导培养液, 每隔 2h 镜下观察细胞形态变化。

1.2.4 免疫荧光染色鉴定 将各组诱导后 6h、48h、72h 及 96h 的细胞爬片用 4% 多聚甲醛固定, PBS 冲洗 3 次, 分别加入过氧化物酶阻断溶液和正常非免疫动物血清, 之后滴加一抗, 包括抗 β -Tubulin 抗体和抗 GFAP 抗体, 4℃ 湿盒过夜, PBS 冲洗 3 次, 之后滴加与两种一抗对应的荧光标记二抗, 置湿盒 45min, PBS 冲洗 3 次, 空白对照用 PBS 代替一抗。激光共聚焦显微镜下随机选取 10 个视野, 计算不同时间点各诱导条件组 β -Tubulin 阳性细胞比率。

1.2.5 诱导后细胞凋亡的检测 分别将各实验组及对照组诱导 6h、48h 和 72h 后的细胞用胰酶消化, 吹打成单细胞悬液, PBS 洗涤重悬, 加入预冷的 70% 乙醇固定, 4℃ 保存过夜。次日, 加入 5 μ l 浓

表 1 各组不同诱导培养液的组成

分组	诱导成份	培养基
A组	5mmol/L BME(a)	含 2% Utroser G 的 UltraCULTURE
B组	0.5 μ g/ml RA(b)	含 2% Utroser G 的 UltraCULTURE
C组	30ng/ml NGF(c)	含 2% Utroser G 的 UltraCULTURE
D组	a+b	含 2% Utroser G 的 UltraCULTURE
E组	b+c	含 2% Utroser G 的 UltraCULTURE
F组	a+c	含 2% Utroser G 的 UltraCULTURE
对照组	/	含 2% Utroser G 的 UltraCULTURE

度为 50 μ g/ml 的 PI 静置 1h 后, 通过流式细胞仪检测凋亡细胞的比例。

1.3 统计学处理

全部数据用均数 $\pm$ 标准差表示, SPSS 11.5 统计学软件对数据进行方差分析。

2 结果

2.1 BMSCs 无血清培养生长情况

原代细胞接种于培养瓶后初始, 细胞全部呈球形、悬浮状, 混有大量红细胞, 接种 12h 后, 可见部分细胞贴壁, 呈椭圆形, 3d 后首次换液, 清除未贴壁的细胞, 可见部分贴壁细胞呈典型的成纤维细胞样外观, 以后 2~3d 换液, 可见贴壁细胞不断增多, 并呈集落生长趋势, 至 7~10d 贴壁细胞融合成单层, 贴壁生长, 呈漩涡状排列(图 1, 后插页 II)。传代后细胞于 24h 内完全贴壁, 形态与原代细胞类似, 生长迅速, 5~7d 融合可达 90% 以上。

2.2 BMSCs 的鉴定

流式细胞仪检测细胞表面标志 CD44、CD90、CD34 和 CD45 的阳性率分别为 91.92%、93.38%、2.05% 和 1.23%(图 2, 后插页 II)。表明所培养的 BMSCs 纯度达到 91% 以上。

2.3 BMSCs 向神经细胞诱导分化的形态学观察

加入诱导培养液 2h 后, A、D 组的 BMSCs 最先开始出现肉眼可见的形态学变化, 表现为胞质收缩, 伸出树枝状突起, 折光性增强, 呈现典型的神经细胞样形态, 镜下可见细胞出现较长的树突和轴突, 形成单极、双极和多极神经元形态, 随着诱导时间的延长, 其余各组细胞也发生类似的形态变化(图 3, 后插页 II), 对照组无明显变化。诱导 6h 后 A、D 组有部分细胞漂浮死亡, 诱导 48h 大多数细胞死亡, 诱导 3~4d 后 B、F 组也开始出现漂浮死亡细胞, C、E 组细胞在诱导后 14d 时仍有 90% 以上的细胞存活。

2.4 免疫荧光染色鉴定

诱导 6h 细胞免疫荧光染色显示只有 A、D 及 F 组存在 β -Tubulin 阳性和 GFAP 阳性细胞, 随着诱导时间的延长, 其余各组细胞也出现 β -Tubulin 阳性和 GFAP 阳性细胞(图 4、5, 后插页 II), 对照组无阳性细胞。不同时间点各诱导条件组 β -Tubulin 阳性细胞比率见表 2。诱导后 6h 和 48h D 组 β -Tubulin 阳性率最高, 诱导后 72h 和 96h E 组 β -Tubulin 阳性率最高, 与同一时间点其余

组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.5 诱导后细胞凋亡的检测

BMSCs 在各条件组下诱导 6h、48h 和 72h 后均有不同程度的凋亡(表 3), 在各时间点凋亡率最高的均为 D 组, 而 E 组是除了 C 组外凋亡率最低的组, 以上两组与同一时间点其他组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 2 不同时间点不同诱导方法诱导 BMSCs 后 β -Tubulin 阳性率 ($n=10, \bar{x}\pm s, \%$)

	6h	48h	72h	96h
A组	16.05 $\pm$ 2.34	41.15 $\pm$ 3.25	43.17 $\pm$ 1.83	43.20 $\pm$ 4.52
B组	0	35.59 $\pm$ 4.39	39.65 $\pm$ 2.41	46.23 $\pm$ 2.83
C组	0	1.27 $\pm$ 0.43	2.01 $\pm$ 0.71	2.85 $\pm$ 0.55
D组	24.35 $\pm$ 4.31 ^①	50.74 $\pm$ 2.48 ^①	58.03 $\pm$ 3.76	60.51 $\pm$ 2.78
E组	0	34.66 $\pm$ 4.97	65.67 $\pm$ 1.32 ^①	69.32 $\pm$ 3.42 ^①
F组	8.74 $\pm$ 3.56	42.32 $\pm$ 4.00	51.31 $\pm$ 2.24	57.75 $\pm$ 3.15
对照组	0	0	0	0

注: ①与同一时间点的其他组比较 $P<0.05$

表 3 不同时间点不同诱导方法诱导 BMSCs 后的凋亡率 ($n=10, \bar{x}\pm s, \%$)

	6h	48h	72h
A组	13.55 $\pm$ 1.21	19.12 $\pm$ 3.87	24.54 $\pm$ 2.29
B组	7.59 $\pm$ 0.97	12.07 $\pm$ 2.16	18.45 $\pm$ 2.11
C组	0.62 $\pm$ 0.22	0.93 $\pm$ 0.33	1.67 $\pm$ 0.26
D组	17.27 $\pm$ 1.43 ^①	25.23 $\pm$ 4.11 ^①	32.21 $\pm$ 3.17 ^①
E组	1.81 $\pm$ 0.35 ^①	3.35 $\pm$ 0.63 ^①	5.76 $\pm$ 0.49 ^①
F组	5.17 $\pm$ 1.08	8.05 $\pm$ 1.70	11.98 $\pm$ 2.73
对照组	0	0	0

注: ①与同一时间点的其他组比较 $P<0.05$

3 讨论

BMSCs 是骨髓造血微环境的重要组成部分, 具有支持和调控造血的作用, 同时其具有自我复制能力和多向分化潜能, 体内的大量研究已经证明 BMSCs 在一定条件下可诱导分化为神经细胞^[2,3], 这是 BMSCs 应用于脊髓损伤治疗的先决条件。但是 BMSCs 在骨髓中含量很低, 需要进行体外扩增纯化, 目前 BMSCs 体外扩增体系主要包括两类, 即有血清培养体系和无血清培养体系。有血清培养体系方法成熟, 但是血清成分复杂, 可能存在未知人类易感病原体及引起人体免疫反应的异种蛋白, 并且其扩增效果不够稳定。相比较而言, 无血清培养体系成分明确, 性质稳定, 重复性高, 不存在未知人类易感病原体及异种蛋白, 因此无

血清培养体系更适合临床应用。在本实验中我们采用含 2% Utroser G 的 UltraCULTURE 无血清培养体系体外扩增人 BMSCs, 在接种 12h 后即可见部分细胞贴壁, 2~3d 后贴壁细胞呈典型的成纤维细胞样外观, 7d 细胞可长至传代水平, 传代后细胞于 24h 内完全贴壁, 5~7d 融合可达 90% 以上, 细胞倍增时间与文献记载的有血清培养方法相似^[4]。流式细胞仪检测第 3 代 BMSCs 的表面标志 CD44、CD90、CD34 和 CD45 的阳性率分别为 91.92%、93.38%、2.05% 和 1.23%, 说明本实验所培养的骨髓基质干细胞纯度达到 91% 以上。

本研究中, 我们采用的 BME、RA 和 NGF 均为常用的诱导 BMSCs 向神经细胞分化的诱导剂。BME 诱导 BMSCs 向神经细胞分化的作用机制与其抗氧化作用有关, 有学者发现除了 BME, 还有很多其他抗氧化剂可以诱导 BMSCs 分化为神经样细胞^[5]。RA 是维生素 A 的衍生物, 对细胞的分化和增殖有重要影响, 尤其是对体内外神经细胞的分化。在体外的研究中发现 RA 能维持神经前体细胞的生存并促进其增殖和向神经元分化^[6]。早期有学者将其与神经生长因子联合应用于诱导胚胎干细胞向神经干细胞分化, 取得了良好的效果^[7]。近年来又有学者在无血清培养条件下用 RA 和 β -巯基乙醇成功将 BMSCs 诱导分化为神经细胞^[8]。说明 RA 是一种能有效促 BMSCs 分化为神经细胞的诱导剂, 其诱导分化的作用机制可能与其核内受体同相应靶基因上的顺式作用因子结合, 调节基因转录, 促进与分化相关基因的表达有关。NGF 是一种作用广泛的细胞因子, 其对神经系统的主要作用是促进神经细胞存活和神经纤维生长以及保护分化后神经细胞的功能^[9]。在本实验中我们发现经 RA 和 NGF 联合诱导后的细胞可以存活 14d, 远高于单独使用化学诱导剂的 A、B 和 D 组诱导后细胞的存活时间, 说明 NGF 具有较强的促进诱导后神经细胞存活的作用。

目前诱导 BMSCs 向神经细胞分化的方法很多, 大体可以分为三类: 化学药物诱导法、细胞因子诱导法及共培养诱导法, 其中以前两者较为常用。化学药物诱导法诱导效率较高, 但诱导后的神经细胞存活时间很短, 无法满足进一步的研究需要。细胞因子诱导作用缓和, 但是诱导时间长、效率低, 因此多数学者倾向于将两种方法结合以扬长避短, 但是如何结合效果最好还没有定论。本研究

采用化学诱导剂 BME、RA 和细胞因子 NGF 组合出 6 个不同诱导条件组, 通过综合考虑诱导效率及诱导后细胞凋亡率两项指标, 以探索较佳诱导条件。我们发现单纯使用化学诱导剂的 A、B 和 D 组诱导效率较高, 但诱导后细胞的凋亡率也很高, 特别是使用 BME 和 RA 的 D 组, 在各时间点诱导后细胞凋亡率均为最高; 而单独使用细胞因子 NGF 的 C 组细胞虽可存活较长时间, 但其诱导分化作用很有限, 因此单纯使用化学诱导剂或细胞因子不是最佳诱导方案。E 组和 F 组采用化学诱导剂和细胞因子联合应用的方法, 获得了较高的诱导效率和较低的诱导后凋亡率, 诱导效果优于其他 4 组, 其中 F 组虽然在 6h 和 48h 两个时间点诱导后 β -Tubulin 阳性细胞率高于 E 组, 但是 E 组诱导后 72h 和 96h 两个时间点 β -Tubulin 阳性细胞率高于 F 组, 且诱导后细胞的凋亡率明显低于 F 组, 因此 E 组的诱导效果优于 F 组。表明本研究所采用的 6 种诱导条件中由 RA 和 NGF 组成的 E 组是较佳的诱导条件组。

4 参考文献

1. Grove JE, Bruscia E, Krause DS. Plasticity of bone marrow derived stem cells[J]. Stem Cells, 2004, 22(4): 487-500.
2. Lee J, Kuroda S, Shichinohe H, et al. Migration and differentiation of nuclear fluorescence-labeled bone marrow stromal cells after transplantation into cerebral infarct and spinal cord injury in mice[J]. Neuropathol, 2003, 23 (3): 169-180.
3. Deng W, Obrocka M, Fischer I, et al. In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 282(1): 148-152.
4. Long X, Olszewski M, Huang W, et al. Neural cell differentiation in vitro from adult human bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells Dev, 2005, 14(1): 65-69.
5. 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(4): 364-370.
6. Kelley MW, Turner JK, Reh TA. Retinoic acid promotes differentiation of photoreceptors in vitro [J]. Develop, 1994, 120(10): 2091-2102.
7. Li M, Pevny L, Lovell-Badge R, et al. Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection[J]. Current Biology, 1998, 8(17): 971-974.
8. Hung SC, Cheng H, Pan CY, et al. In vitro differentiation of size-sieved stem cells into electrically active neural cells[J]. Stem Cells, 2002, 20(6): 522-529.
9. Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair [J]. Annu Rev Neurosci, 2001, 24(3): 1217-81.

(收稿日期: 2006-05-08 修回日期: 2007-01-11)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 彭向峰)