

基础研究

同种异体共培养大鼠骨髓间充质
干细胞的神经分化诱导鉴定周 军¹, 杨惠林¹, 岑建农², 陈文明², 陈子兴²

(1 苏州大学附属第一医院骨科; 2 江苏省血液研究所 215006 江苏省苏州市)

【摘要】目的:探讨同种异体大鼠骨髓间充质干细胞(BMSC)在体外的共培养方法,并行神经分化诱导。**方法:**分别通过全骨髓直接培养法及密度梯度法分离培养大鼠骨髓间充质干细胞,各传至第3代后,取等量细胞混合后共培养,共培养的细胞再次传代后进行神经方向诱导,并行 Nestin、NSE、GFAP 免疫细胞化学染色鉴定。**结果:**共培养的大鼠骨髓间充质干细胞经诱导分化后出现神经元和胶质细胞形态,经 Nestin、NSE、GFAP 免疫细胞化学染色证实为神经细胞。**结论:**同种异体共培养的骨髓间充质干细胞可在体外定向诱导为神经元和胶质细胞等神经细胞。

【关键词】同种异体;骨髓间充质干细胞;神经分化;鉴定;大鼠

中图分类号:Q813.1 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2008)-02-0134-04

Neural differentiation potential and identification of co-cultured allogenic rat bone mesenchymal stem cells/ZHOU Jun, YANG Huilin, CEN Jiannong, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2008, 18(2):134-137

【Abstract】Objective:To investigate the co-cultured allogenic SD rat bone mesenchymal stem cells (BMSCs) in vitro, and to perform neural differentiation in vitro. **Method:** Rat's BMSCs were isolated and cultured by complete marrow direct culture method and density gradient isolation method respectively, and the 3rd generation cells were harvested and co-cultured with the same concentration. The passage cells of the co-cultured cells were obtained and induced to differentiate into neurocyte, then immunocytochemistry of Nestin, NSE, GFAP were performed. **Result:** After induction, the co-cultured cells appeared morphological changes of neuron and glial cell, which were confirmed by Nestin, NSE, GFAP immunostaining. **Conclusion:** The co-cultured allogenic BMSCs can be induced into neurocyte such as neuron and glial cell in vitro.

【Key words】 Allogenic; Bone mesenchymal stem cells; Neural differentiation; Characterization; Rat

【Author's address】 Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou, 215006, China

对严重脊髓损伤(SCI)的治疗至今没有理想的方法。1992年 Reynolds等^[1]从成年鼠脑中首先分离出神经干细胞(NSC), 1998年 Eriksson等^[2]证实成人脑部存在NSC, 人们对神经再生和神经疾病的治疗有了新的认识。然而内源性NSC在神经受损时因量少且缺乏正向信号的激活, 无法进行组织修复; 外源性NSC又不易获取, 从活体组织中获得NSC具有危险性, 而从胚胎中获得NSC又涉及伦理问题, 不能满足临床及实验需要。

骨髓间充质干细胞(BMSCs)在特定条件下可分化为多种组织谱系的细胞^[3-7], 取材方便、扩增

迅速、可自体移植, 其在组织工程和细胞治疗等方面具有广阔的应用前景, 但单一供体来源的BMSCs在数量上受到极大限制。我们对同种异体大鼠BMSCs体外共培养进行了研究^[8], 并对共培养细胞进行了多向分化潜能鉴定。在本研究中, 我们对同种异体共培养的大鼠BMSCs进行了神经分化诱导, 并采用免疫细胞化学染色法对诱导后细胞进行神经细胞标志物鉴定, 以期同种异体共培养BMSCs移植治疗脊髓损伤的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物及试剂

不同窝别雄性SD大鼠2只, 体重分别为93g

第一作者简介: 男(1979-), 医学博士, 研究方向: 脊柱脊髓损伤
电话: (0512)67780493 E-mail: sniperrifle@vip.sohu.com

及 96g, 由苏州大学医学院实验动物中心提供(动物许可证号 SYXK 苏 2002-0037)。低糖 Dulbecco 改良培养基(LG-DMEM)、胎牛血清(FBS)均为美国 Gibco 公司产品, MCDB-201 培养基、二甲基亚砷(dimethyl sulphoxide, DMSO)、丁羟基茴香醚(butylated hydroxyanisole, BHA)均为美国 Sigma 公司产品, 碱性成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor-basic, b-FGF, 以色列 Peprotech 公司), Ficoll 细胞分离液(上海试剂二厂), 水合氯醛(中国医药集团上海化学试剂公司, 分析纯), 巢蛋白(Nestin)、神经元特异性烯醇酶(neurone specific enolase, NSE)、神经胶质酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)兔多克隆抗体均为武汉博士德公司产品, 链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶(SP)免疫组化试剂盒、二氨基联苯胺(di-aminobenzidine, DAB)显色液(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.2 大鼠 BMSCs 的分离培养扩增及共培养

将 2 只大鼠以过量 4% 水合氯醛麻醉处死(1600mg/kg 体重), 75% 酒精浸泡 10min 后, 于超净台无菌取出大鼠双侧后肢股骨与胫骨, PBS 冲洗去除骨膜及残留软组织, 将骨的两端剪去, 露出骨髓腔。以无菌注射器吸取含 10% (体积分数) FBS 的 MSC 培养基(江苏省血液研究所经验培养基, 成分为 LG-DMEM 与 MCDB-201 按比例混合)将骨髓冲入无菌离心管中, 1000 转/min 离心 2 次, 每次 5min, 弃上清及脂肪层, 收集细胞。加入全培养基(含 10% FBS 的 MSC 培养基), 轻轻吹打制成细胞悬液。

1 只大鼠以全骨髓直接培养法获取细胞: 将前法获取之细胞悬液接种于 4 个底面积为 25cm² 的塑料培养瓶中, 培养基均补足至 5ml (全培养基), 编号后置于 37℃、饱和湿度、5% CO₂ 细胞培养箱培养。另 1 只大鼠以密度梯度离心法获取细胞: 取无菌离心管, 加入无菌 Ficoll 细胞分离液, 将细胞悬液沿管壁缓慢加入该离心管(细胞分离液与细胞悬液体积比为 1:2), 2000 转/min 离心 20min 后, 吸取白膜层(单个核细胞层), 移入另一离心管中, 加入全培养基轻轻吹打混匀, 1000 转/min 离心 2 次, 每次 5min, 弃上清, 收集细胞, 加入全培养基, 将细胞悬液接种于 2 个底面积为 25cm² 的塑料培养瓶中, 培养基均补足至 5ml (全培养基), 编号后, 置于 37℃、饱和湿度、5% CO₂

的细胞培养箱中培养。

取上述两种方法分离培养传至第 3 代细胞, 计数后等量混合, 按 1.0×10⁵ 个细胞/瓶分瓶接种于 25cm² 塑料培养瓶, 接种后每 3d 换液 1 次, 观察其生长情况。

1.3 共培养 BMSCs 的神经分化诱导

取传至第 2 代的共培养细胞, 以 0.5×10⁵ 个细胞/孔的密度接种于 6 孔塑料培养板中, 共 9 孔, 行神经诱导分化鉴定。每 3d 换液 1 次。

结合参考文献^[3,9,10]及江苏省血液研究所经验, 确定本实验神经分化预诱导培养基方案为: LG-DMEM+10% FBS+b-FGF 1μM, 诱导培养基方案为: LG-DMEM+2% DMSO+BHA 200μM。

细胞融合达 80%~90% 后, 选 6 孔作为诱导组, 另 3 孔为不行诱导的对照组。诱导组 6 孔在吸出培养基后, 加入神经分化预诱导培养基, 对照组加入含 10% FBS 的 MSC 培养基。各孔细胞预诱导 24h 后, 再次吸出培养基。诱导组加入神经分化诱导培养基, 对照组仍然加入含 10% FBS 的 MSC 培养基。

1.4 共培养的 BMSCs 神经分化鉴定

各孔细胞诱导 24h 后, 吸出培养基, 以 4% 多聚甲醛 2ml 固定 30min, 流水洗净, 晾干, 诱导组中 3 孔及对照组 3 孔细胞按各抗体说明书, 采用 SP 法行 Nestin、NSE、GFAP 免疫细胞化学染色; 诱导组另 3 孔细胞作为阴性对照, 染色程序中, 以 PBS 代替一抗, 其余步骤同前述。

2 结果

2.1 大鼠 BMSCs 的分离培养扩增及共培养

以密度梯度法获得的 BMSCs 接种后 1d, 倒置显微镜下见大部分细胞贴壁生长, 但未见细胞变为梭形; 接种后 2d, 部分贴壁细胞呈梭形, 但仍可见极少量悬浮细胞; 接种后 10d, 约有 60% 融合, 直至第 14~15d 细胞融合达到 80%~90%。全骨髓直接培养法细胞接种后 6h 第 1 次换液, 换液后倒置显微镜下可见大量细胞贴壁生长, 但仍残留大量悬浮细胞; 48h 后第 2 次换液, 可见贴壁细胞数量增多, 部分聚集成片, 并有部分细胞呈梭形, 仍有部分悬浮细胞; 至第 6~8d, 仅有少量悬浮细胞, 贴壁细胞呈梭形, 细胞融合达 80%~90%。密度梯度法细胞传代接种后约 8~10d 细胞融合至 80%~90%; 而全骨髓直接培养法细胞传代接种后

5~7d 即有 80%~90% 融合, 可开始传代。

共培养的细胞增殖力较好, 细胞形态较为均一, 且不同大鼠来源细胞混合后细胞形态未发生异常变化, 细胞活力未受明显影响。共培养细胞接种后 24h 即大部贴壁, 且伸展呈梭形, 7d 左右即可融合至 80%~90%, 可开始传代。Wright-Giemsa 染色可见典型梭形细胞成层状或漩涡状排列 (图 1, 后插页 III)。

2.2 共培养的 BMSCs 神经分化诱导

诱导组细胞经预诱导 24h 后, 细胞形态开始发生变化, 宽大扁平的细胞体开始向胞核收缩; 诱导后 3h, 细胞形态发生明显变化, 胞质向胞核收缩, 呈典型的核周形态, 24h 后, 胞体折光性增强, 大量细胞出现长的突起, 出现双极及多极细胞。之后变形细胞增多, 突起变长, 细胞间或细胞自身的细长突起相互连接, 末端产生多级分支, 交织成网 (图 2a, 后插页 III)。表现为类似于神经元和胶质细胞的形态, 对照组细胞仍然保持典型梭形形态 (图 2b, 后插页 III)。

2.3 共培养的 BMSCs 神经分化鉴定

Nestin、NSE、GFAP 免疫细胞化学染色显示, 诱导组部分细胞诱导后形成神经干细胞样球形细胞团, 折光性强, Nestin(+) (图 3a, 后插页 III); 大量细胞出现长的突起, 出现双极及多极细胞, 突起变长, 细胞间或细胞自身的突起相互连接, 末端产生多级分支, 交织成网, 表现为类似于神经元和胶质细胞的形态, NSE(+)、GFAP(+) (图 3b、3c, 后插页 III)。对照组细胞仍然保持梭形形态, 部分伴有细胞老化现象, 但有散在 NSE 阳性细胞表达 (图 4, 后插页 III)。在对照实验中没有发现阳性物出现, 即无特异性反应。

3 讨论

严重的 SCI 通常导致损伤平面以下永久的感觉、运动及括约肌功能障碍。这类损伤的治疗, 至今对临床工作者来说仍然是一个重大挑战。随着干细胞研究的广泛深入开展, 使用干细胞移植治疗 SCI 以促进损伤脊髓再生的研究日益增多。BMSCs 是位于成年动物或人骨髓中的非造血组织干细胞, 它不表达造血干细胞的相关标志物, 具有向多种中胚层和神经外胚层来源组织细胞分化的能力。

Kim 等^[11]将纯化的人 MSCs (hMSCs) 传 4~9

代后, 置于含 DMEM/F12 培养基、10% FBS 及 bFGF、表皮生长因子 (EGF)、神经生长因子 (NGF) 及维甲酸 (RA) 的培养板中培养 3~10d, 发现 hMSCs 在含有 FGF 培养基中培养 3d 即对 cAMP 刺激产生动态反应, 数小时内形态即变为多重树突-轴突之神经样细胞。相反, 在含 EGF、NGF 或 RA 培养基中的 hMSCs 则对 cAMP 刺激不产生明显形态学改变。免疫细胞化学染色发现在 FGF 刺激前后, hMSCs 阳性表达微管蛋白-1 (TuJ-1) 与中间丝波形蛋白, 而未观察到 GFAP、微管相关蛋白-1 (Tau-1) 或酪氨酸羟化酶阳性的细胞, 表明 FGF 刺激的 hMSCs 不分化为神经胶质细胞或成熟神经元。但经 FGF 刺激后, hMSCs 的中链神经丝蛋白 (NF-M) 表达显著增加。

Arnhold 等^[12]将体外分离培养的人 BMSCs, 分别使用标准培养基 (α -MEM 培养基加入 2mg/ml L-谷氨酰胺、50mg/ml 链霉素以及 20% 体积分数非热灭活 FBS)、选择培养基 (无血清 DMEM/F12 加入 2% 体积分数的 B27 培养基与 20ng/ml EGF、20ng/ml bFGF 以及 5mg/ml 肝素)、分化培养基 (无血清 DMEM/F12、2% DMSO 及 1mM 福斯高林) 培养, 观察到使用选择培养基培养后, 其 β -III-微管蛋白和 GFAP 免疫阳性细胞分别占总数的约 90% 与 85%, 阳性表达神经干细胞标记物 Nestin 的细胞占 (30.6 $\pm$ 3.3)%。使用分化培养基培养后, Nestin 阳性细胞降低到 (11.7 $\pm$ 4.5)%。在选择培养基中, 少突胶质细胞/II 型星形胶质细胞 (O2A) 前体标记物 A2B5-免疫阳性细胞 [(31.7 $\pm$ 9.35)%] 较标准培养基 [(10.7 $\pm$ 6.8)%] 多。在分化培养基中培养后, A2B5 阳性细胞比例增高 [(36.7 $\pm$ 3.7)%], 并伴有轻度形态学改变。选择培养基中, 表达神经递质 γ -氨基丁酸的细胞增加至 (69.9 $\pm$ 36.8)%, 在分化培养基中, 这一比例更高 [(81.7 $\pm$ 13.5)%]。

本实验结合文献和江苏省血液研究所经验, 确定生长因子 bFGF 和化学诱导剂 DMSO、BHA 相结合的神经营养因子, 在胚胎期脑内的含量很高^[13]。在 BMSCs 的神经分化诱导中, bFGF 参与 BMSCs 向神经分化的启动^[1]。有研究表明, bFGF 能促进神经元前体细胞的存活或使 NSC 向神经元前体细胞分化增殖^[14]。虽然 bFGF 诱导 BMSCs 向神经方向的分化所需时间较长, 但细胞诱导后的神经样

变化可以维持较长时间,且不易发生细胞增殖、死亡及逆分化现象^[15]。DMSO 与 BHA 均为抗氧化剂,其促进 BMSCs 向神经细胞分化的机制目前尚不完全清楚,可能与决定分化方向的转录因子的启动有关系^[16]。bFGF 与 DMSO 和 BHA 联用,可以提高 DMSO 和 BHA 诱导 BMSCs 跨胚层分化为神经元的转化率,这可能与维持细胞处于更幼稚的状态,从而更有助于细胞的分化有关^[9]。本实验采用 bFGF 结合 DMSO、BHA 的诱导方案,结合了生长因子与化学诱导剂的优点,增加了诱导速度,同时减少了诱导所使用的试剂种类,且操作简单,仅需 2 次换液,简化了诱导过程。

Nestin 是神经干细胞的一种标志物^[17],NSE 是神经元的标志物^[18],而 GFAP 是神经胶质细胞^[19]的标志物。本实验对诱导分化的细胞进行了 Nestin、NSE、GFAP 免疫细胞化学染色,均为阳性表达,结合其形态,表明同种异体大鼠来源共培养的 BMSCs 可向神经细胞诱导分化。表明本实验使用的诱导方案可靠。本实验中,未诱导的 BMSCs 亦有散在 NSE 阳性表达细胞,结合阳性细胞形态,提示由于 BMSCs 具有多向分化潜能,极少量的 BMSCs 即使未加诱导,仍然有可能自发分化为神经样细胞。

本实验结果表明,同种异体来源的 BMSCs 共培养并不影响其分化潜能,其与单一供体来源的 BMSCs 一样具有成神经分化潜能,但这种潜能同样需要在特定条件下才能实现。诱导培养基为其分化提供了条件。但共培养 BMSCs 诱导分化成的神经细胞如何才能具有神经细胞的功能,以及其向神经分化的确切机制仍有待进一步研究。

4 参考文献

1. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system[J]. *Science*, 1992, 255(5052): 1707-1710.
2. Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus [J]. *Nat Med*, 1998, 4(11): 1313-1317.
3. 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.
4. Hassan HT, El-Sheemy M. Adult bone-marrow stem cells and their potential in medicine [J]. *J R Soc Med*, 2004, 97(10): 465-471.
5. Luk JM, Wang PP, Lee CK, et al. Hepatic potential of bone marrow stromal cells: development of in vitro co-culture and intra-portal transplantation models [J]. *J Immunol Methods*, 2005, 305(1): 39-47.
6. Park J, Gelse K, Frank S, et al. Transgene-activated mesenchymal cells for articular cartilage repair: a comparison of primary bone marrow-, perichondrium/periosteum- and fat- derived cells[J]. *J Gene Med*, 2006, 8(1): 112-125.
7. Li H, Yu B, Zhang Y, et al. Jagged1 protein enhances the differentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 341(2): 320-325.
8. 周军, 杨惠林, 岑建农, 等. 同种异体大鼠骨髓间充质干细胞共培养及多向分化潜能鉴定[J]. *苏州大学学报(医学版)*, 2007, 27(2): 196-199, 206.
9. 许予明, 秦洁, 邢莹, 等. 体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞向神经细胞分化[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2004, 39(2): 269-271.
10. 江和碧, 卓本慧, 代英, 等. bFGF 促进大鼠骨髓间充质干细胞向神经元转化及机制[J]. *第三军医大学学报*, 2005, 27(2): 98-101.
11. 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.
12. Arnold S, Klein H, Klinz FJ, et al. Human bone marrow stroma cells display certain neural characteristics and integrate in the subventricular compartment after injection into the liquor system[J]. *Eur J Cell Biol*, 2006, 85(6): 551-565.
13. Fuxe K, Tinner B, Zoli M, et al. Computer-assisted mapping of basic fibroblast growth factor immunoreactive nerve cell populations in the rat brain [J]. *J Chem Neuroanat*, 1996, 11(1): 13-35.
14. Uchida N, Buck DW, He D, et al. Direct isolation of human central nervous system stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(26): 14720-14725.
15. Tao H, Rao R, Ma DD. Cytokine-induced stable neuronal differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in a serum/feeder cell-free condition [J]. *Dev Growth Differ*, 2005, 47(6): 423-433.
16. Justesen J, Stenderup K, Kassem MS. Mesenchymal stem cells. potential use in cell and gene therapy of bone loss caused by aging and osteoporosis [J]. *Ugeskr Laeger*, 2001, 163(40): 5491-5495.
17. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein[J]. *Cell*, 1990, 60(4): 585-595.
18. Pillai R, Scintu F, Scorciapino L, et al. Human astrocytes can be induced to differentiate into cells with neuronal phenotype[J]. *Exp Cell Res*, 2006, 312(12): 2336-2346.
19. Tohill M, Mantovani C, Wiberg M, et al. Rat bone marrow mesenchymal stem cells express glial markers and stimulate nerve regeneration[J]. *Neurosci Lett*, 2004, 362(3): 200-203.

(收稿日期: 2007-05-21 修回日期: 2007-07-30)
(英文编审 蒋欣)
(本文编辑 卢庆霞)