

基础研究

共培养条件下嗅鞘细胞对骨髓间充质干细胞
向神经样细胞分化的影响

高 瑞, 袁 文, 王新伟, 杨立利, 陈华江

(第二军医大学附属长征医院脊柱外科 200003 上海市)

【摘要】目的:观察体外骨髓间充质干细胞(BMSC)和嗅鞘细胞(OEC)非接触共培养时,OEC对BMSC向神经样细胞诱导分化的影响。**方法:**采用5~6周龄、体重100g左右的SPF级雄性Sprague Dawley(SD)品系大鼠20只,分离培养大鼠BMSC和OEC,BMSC取自双侧股骨,OEC取自嗅上皮。使用6孔0.4 μ m的Transwell共培养系统进行培养。将 $2\times 10^4/\text{cm}^2$ 的第3代OEC置于共培养系统上层, $3\times 10^4/\text{cm}^2$ 的第3代BMSC置于下层。对共培养7d和14d后的BMSC行免疫组化染色,检测神经细胞特异性蛋白巢蛋白(Nestin)、神经元类型III β -微管蛋白(Tuj-1)和神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP)的表达情况。流式细胞仪检测Nestin、Tuj-1和GFAP阳性细胞的分布和所占的比例。**结果:**免疫组化检测显示,共培养7d和14d后BMSC均表达Nestin、Tuj-1和GFAP。流式细胞仪分析,共培养7d后Nestin、Tuj-1和GFAP阳性细胞比例分别为46.3%、76.5%和23.2%,共培养14d后分别为27.7%、89.1%和50%。**结论:**非接触共培养条件下,OEC能诱导BMSC向神经样细胞分化。

【关键词】骨髓间充质干细胞;嗅鞘细胞;共培养;分化

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2014.09.12

中图分类号:Q813.1 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2014)-09-0834-05

The effect of olfactory ensheathing cells on neural cell-like differentiation of bone mesenchymal stem cells in vitro co-culture system/GAO Rui, YUAN Wen, WANG Xinwei, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2014, 24(9): 834-838

【Abstract】Objectives: To investigate the differentiation of bone mesenchymal stem cell(BMSC) induced by co-culturing with olfactory ensheathing cell(OEC). **Methods:** BMSC and OEC were isolated and cultured from 20 5-6-week-old 100g male rats. BMSC was isolated from rat femur, and OEC was isolated from rat olfactory epithelium. The co-culture system used was 6-well 0.4 μ m Transwell co-culture system. The third generation cells were co-cultured within this system at a density of $2\times 10^4/\text{cm}^2$ and $3\times 10^4/\text{cm}^2$ for OEC and BMSC respectively. BMSC was processed for immunofluorescence and flow cytometry at 7d and 14d for the specific marker Nestin, neuronal class III β -tubulin (Tuj-1) and glial fibrillary acidic protein (GFAP). **Results:** Immunocytochemistry showed BMSC could express Nestin, Tuj-1 and GFAP after 7d and 14d co-culture. Flow cytometry revealed that the positive rate of Nestin, Tuj-1 and GFAP was 46.3%, 76.5% and 23.2% after 7d co-culture; and the positive rate of Nestin, Tuj-1 and GFAP was 27.7%, 89.1% and 50% after 14d co-culture. **Conclusions:** BMSC can efficiently differentiate into neural-like cells when coculturing with OEC.

【Key words】 Bone mesenchymal stem cell; Olfactory ensheathing cell; Co-culture; Differentiation

【Author's address】 Department of Spine Surgery, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai, 200003, China

脊髓损伤后其轴突不能自我再生,当前对脊髓损伤后神经修复尚无有效手段^[1]。随着基础和

临床研究的进展,组织工程细胞移植促进脊髓损伤后脊髓结构和功能重建逐渐成为可能^[2,3]。骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cell, BMSC)具有自我更新和多向分化的能力,已广泛应用于再生医学领域^[4]。但BMSC为多种细胞的前体细胞,如果能控制其向神经细胞定向分化,则

基金项目:上海市自然科学基金青年项目(编号:12ZR1454500)

第一作者简介:男(1984-),讲师,主治医师,研究方向:脊柱外科
电话:(021)81886807 E-mail:gaoruidr@hotmail.com

通讯作者:袁文 E-mail:yuanwenspina@163.com

会取得更好的治疗效果。通过生物诱导的方法使 BMSC 分化,不仅可以节约成本提高效率,同时也拥有广阔的临床应用前景。目前已经证实成熟体细胞和干细胞共培养后能诱导干细胞向体细胞分化^[5]。嗅鞘细胞(olfactory ensheathing cell, OEC)是一种形态和功能上类似于少突胶质细胞、星形胶质细胞和雪旺氏细胞的神经胶质细胞,能同时存在于中枢和外周神经系统,近年来成为神经修复组织工程的热门细胞之一^[3,6]。本研究拟通过 OEC 和 BMSC 的非接触式共培养,观察 OEC 对 BMSC 向神经样细胞分化的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

5~6 周龄、体重 100g 左右的 SPF 级雄性 Sprague Dawley (SD) 品系大鼠 20 只,第二军医大学动物实验中心提供。动物实验由第二军医大学伦理委员会批准,符合实验动物福利的相关要求。

1.2 BMSC 的分离培养

参照全骨髓贴壁法提取并分离 BMSC^[7]。抽取 20 只大鼠双侧股骨髓腔内的骨髓,制成单细胞悬液后,以 1000r/min 离心 5min。弃上清,加入 80ml 含 10% 胎牛血清(Gibco 公司)的 DMEM/F-12 培养液(Gibco 公司)。细胞重悬后接种于 T75 培养瓶(Corning 公司)中,常规培养。待细胞 90% 融合时传代,每周传代一次,选用传代培养的第 3 代 BMSC 进行共培养。

1.3 OEC 的分离培养

提取原代嗅上皮来源的 OEC,采用差速贴壁法进行纯化^[8]。将 20 只大鼠嗅上皮组织剪碎后,用 0.25% 的胰酶消化 15min,加入含 15% 的胎牛血清 DMEM/F-12 培养液终止消化。1000r/min 离心 5min 后,弃上清,加入 OEC 专用培养液进行培养。OEC 专用培养液为含 20% 胎牛血清、10ng/ml FGF-basic (Peprotech 公司)和 2 μ M Forskolin (Sigma 公司)的 DMEM/F-12 培养液。将细胞种植于 T25 培养瓶(Corning 公司)中培养 36h。将未贴壁的细胞移至新的 T25 培养瓶继续培养 36h。然后种植于涂有 L-型多聚赖氨酸的 6 孔细胞培养板(Corning 公司)中培养。细胞培养过程中每 2d 换液一次,待细胞融合率达到 90% 时传代。选用传代培养的第 3 代 OEC 进行共培养。

1.4 BMSC 和 OEC 非接触共培养

采用 Transwell 细胞共培养小室 (0.4 μ m, 6 孔; Millipore 公司) 和 6 孔细胞培养板 (Corning 公司) 所共同构成的共培养系统。共培养过程持续 2 周,上层放置浓度为 $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的 OEC,下层放置浓度为 $3 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的 BMSC。使用 OEC 专用培养液进行培养,每 2d 换液 1 次。

1.5 共培养后 BMSC 的免疫组化染色

分别对共培养 7d 和 14d 后的 BMSC 进行免疫荧光染色。主要步骤如下:胰酶消化后将细胞以 $5 \times 10^4/\text{孔}$ 接种于 24 孔板,放入盖玻片。多聚甲醛固定并漂洗后,0.1% 的 Triton X-100 (Sigma 公司,美国)打孔处理 15min,1% 胎牛血清蛋白封闭 1h。然后加入一抗,包括:巢蛋白(Nestin)抗体(浓度比为 1:400,Pharmingen 公司),神经元类型 III β -微管蛋白(Tuj-1)单克隆抗体(浓度比 1:500, Invitrogen 公司)和神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP)抗体(浓度比 1:400, Invitrogen 公司)。4 $^{\circ}\text{C}$ 室温过夜后, PBS 清洗 3 次,加入 1:1000 的 CY3 山羊抗小鼠红色荧光二抗(Invitrogen 公司),常温孵育 2h, Hoechst 33258 (1:20000) (Sigma 公司)染色 30min 后, PBS 清洗 3 次,封片后荧光显微镜观察。荧光显微镜观察的标准:红色表示 Nestin、Tuj-1 或 GFAP 染色阳性;蓝色表示细胞核染色阳性。

1.6 共培养后 BMSC 的流式细胞仪检测

分别对共培养 7d 和 14d 后的 BMSC 进行流式细胞仪分析,检测共培养后 BMSC 的 Nestin、Tuj-1 和 GFAP 阳性细胞的分布和所占的比例。流式细胞仪分析采用间接细胞标记方法,在 FITC 通道检测细胞的荧光强度。取不同时间点的 BMSC 各 3 孔(约 2×10^5 个/孔)。细胞准备方法同免疫荧光检测,加入一抗(Nestin、Tuj-1、GFAP),调整抗体浓度为 1:400。4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下过夜后, PBS 洗 3 遍。加入二抗(FITC 绿色荧光蛋白, Invitrogen 公司),浓度为 1:500。首先检测未染色的细胞作为阴性对照,设定细胞的大小范围,荧光的阳性、阴性范围。

2 结果

2.1 共培养后 BMSC 的免疫荧光染色结果

3 种与神经细胞分化相关的生物学标记物在共培养 7d 和 14d 后的 BMSC 中均有表达(图 1~3)。证实在共培养 7d 后 BMSC 即向神经样细胞分

化,并在整个共培养过程中保持了这种分化趋势。

2.2 共培养后 BMSC 神经分化转化率的流式细胞仪检测结果

BMSC 共培养 7d 后,神经前体细胞标记(Nestin)阳性的细胞占 46.3%,14d 后占 27.7%(图 4)。而神经元标记(Tuj-1)和神经胶质细胞标记(GFAP)阳性的细胞在共培养 7d 后分别占 76.5%和 23.2%,14d 后分别占 89.1%和 50%(图 5、6)。在共培养 7d 和 14d 后,表达上述 3 种蛋白的 BMSC 均呈现明显的细胞群落富集。随着共培养时间的延长,Nestin 阳性细胞比例下降 18.6%,

Tuj-1 阳性细胞比例增加 12.6%,GFAP 阳性细胞比例增加 26.8%。

3 讨论

目前体外诱导干细胞定向分化有化学诱导和细胞共培养诱导两种方法。徐丽丽等^[9]比较了化学方法诱导和细胞共培养诱导的 BMSC 向神经样细胞分化后发现,化学方法诱导 7d 后 43.6%的 BMSC 表达神经细胞的特异性抗体,而细胞共培养法诱导的 BMSC 在共培养 5d 后就有神经突触生成,且有 50.8%的 BMSC 表达神经细胞特异性

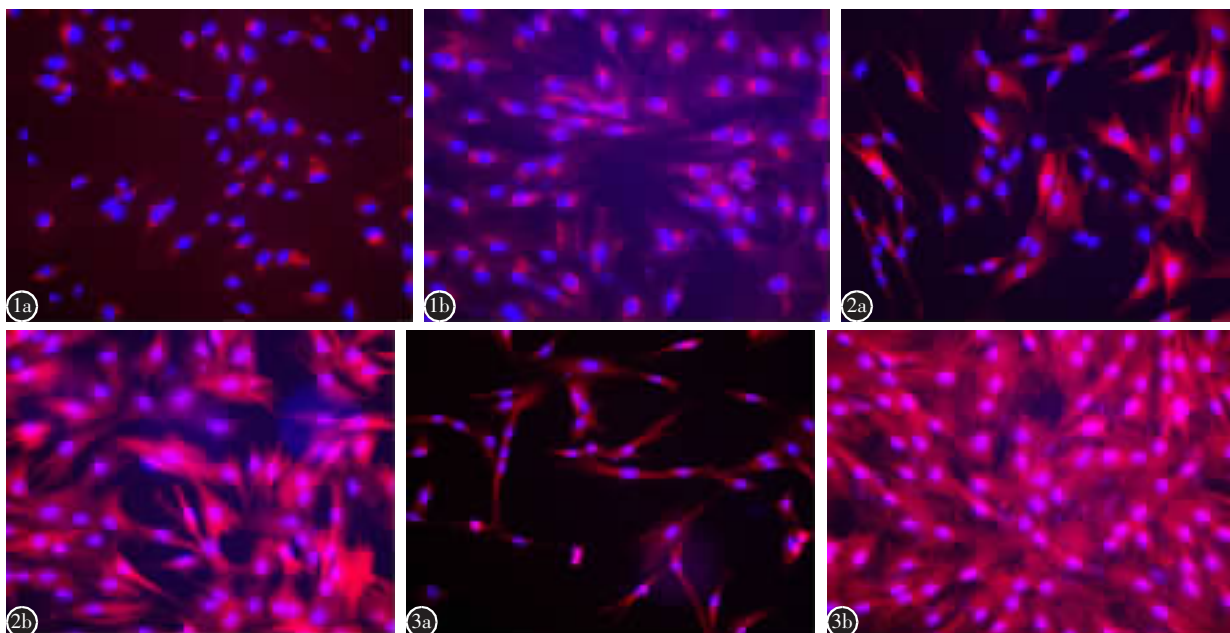


图 1 BMSC 的 Nestin 和 Hoechst 共定位免疫荧光,红色显示 Nestin 阳性,蓝色标记的是细胞核(×200) **a** 共培养 7d 的 BMSC,Nestin 阳性细胞表明 BMSC 向神经前体细胞分化 **b** 共培养 14d 的 BMSC,和共培养 7d 后相比 Nestin 阳性细胞数增多,荧光增强 **图 2** BMSC 的 Tuj-1 和 Hoechst 共定位免疫荧光,红色显示 Tuj-1 阳性,蓝色标记的是细胞核(×200) **a** 共培养 7d 的 BMSC,Tuj-1 阳性细胞表明 BMSC 向神经元分化 **b** 共培养 14d 的 BMSC,和共培养 7d 后相比 Tuj-1 阳性细胞数增多,荧光增强 **图 3** BMSC 的 GFAP 和 Hoechst 共定位免疫荧光,红色显示 GFAP 阳性,蓝色标记的是细胞核(×200) **a** 共培养 7d 的 BMSC,GFAP 阳性细胞表明 BMSC 向神经胶质细胞分化 **b** 共培养 14d 的 BMSC,和共培养 7d 后相比 GFAP 阳性细胞数增多,荧光增强

Figure 1 Combined immunolocalization of Nestin and Hoechst, red indicates positive Nestin and green indicates the cell nucleus(×200) **a** Indicates BMSC 7 days after co-culture. Nestin positive indicates the differentiation of BMSC to neuronal precursor cells **b** Indicates BMSC 14 days after co-culture, the number of Nestin-positive cells increased and the fluorescence intensity enhanced **Figure 2** Combined immunolocalization of Tuj-1 and Hoechst, red indicates positive Tuj-1 and green indicates the cell nucleus(×200) **a** Indicates BMSC 7 days after co-culture, Tuj-1 positive indicates the differentiation of BMSC to neuron **b** Indicates BMSC 14 days after co-culture, the number of Tuj-1-positive cells increased and the fluorescence intensity enhanced **Figure 3** Combined immunolocalization of GFAP and Hoechst, red indicates positive GFAP and green indicates the cell nucleus(×200) **a** Indicates BMSC 7 days after co-culture, GFAP positive indicates the differentiation of BMSC to neuroepithelial cells **b** Indicates BMSC 14 days after co-culture, the number of GFAP-positive cells increased and the fluorescence intensity enhanced

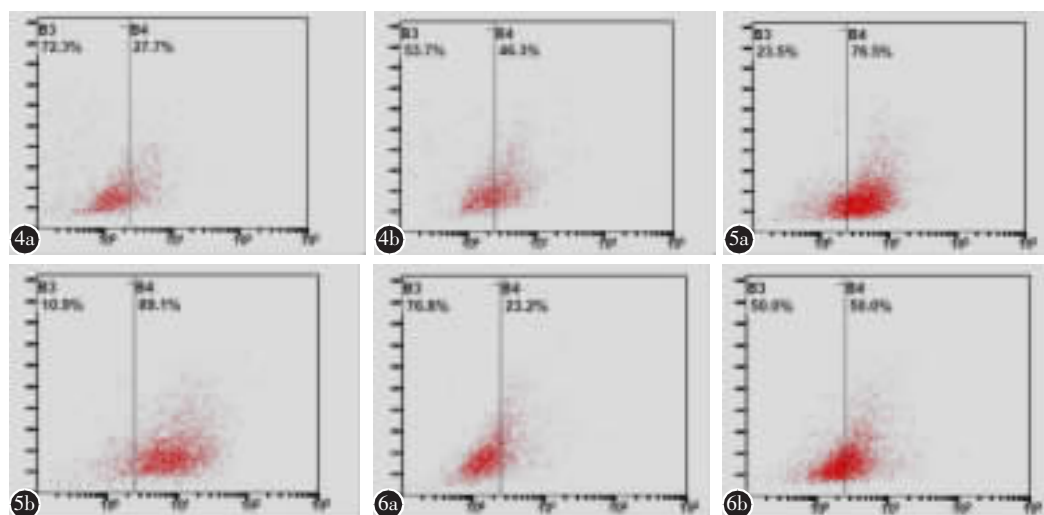


图 4 流式细胞仪检测 Nestin 阳性细胞所占的比例。横坐标表示荧光强度,纵坐标表示细胞的复杂程度;B3/B4 的界值是根据未染色的细胞测定的结果设定的阳性界值,B3 表示细胞染色后阴性细胞的比例,B4 表示细胞染色后阳性细胞的比例,下同 **a** 共培养 7d 的 BMSC,Nestin 阳性细胞占总数的 46.3% **b** 共培养 14d 的 BMSC,Nestin 阳性细胞占总数的 27.7% **图 5** 流式细胞仪检测 Tuj-1 阳性细胞所占的比例 **a** 共培养 7d 的 BMSC,Tuj-1 阳性细胞占总数的 76.5% **b** 共培养 14d 的 BMSC,Tuj-1 阳性细胞占总数的 89.1% **图 6** 流式细胞仪检测 GFAP 阳性细胞所占的比例 **a** 共培养 7d 的 BMSC,GFAP 阳性细胞占总数的 23.2% **b** 共培养 14d 的 BMSC,GFAP 阳性细胞占总数的 50.0%

Figure 4 The percentage of cells with positive Nestin under flow cytometry. x-coordinate indicates the fluorescence value and y-coordinate indicates the complexity of the cells; the cutoff value of B3/B4 is set according to the results of controlled unstained cells, B3 indicates the percentage of negative cells and B4 indicate the percentage of positive cells after stained **a** Indicates BMSC 7 days after co-culture, the percentage of positive nestin cells is 46.3% **b** Indicates BMSC 14 days after co-culture, the percentage of positive nestin cells is 27.7% **Figure 5** The percentage of cells with positive Tuj-1 under flow cytometry **a** Indicates BMSC 7 days after co-culture, the percentage of positive Tuj-1 cells is 76.5% **b** Indicates BMSC 14 days after co-culture, the percentage of positive Tuj-1 cells is 89.1% **Figure 6** The percentage of cells with positive GFAP under flow cytometry **a** Indicates BMSC 7 days after co-culture, the percentage of positive GFAP cells is 23.2% **b** Indicates BMSC 14 days after co-culture, the percentage of positive GFAP cells is 50.0%

抗体。他们推测共培养时对 BMSC 生长微环境的改变更有助于干细胞分化。细胞共培养的理论基础是细胞与细胞相互接触或相互支持,同时有细胞分泌的细胞因子、神经营养因子和神经递质参与,促进干细胞向成体细胞定向分化。细胞共培养又分为接触式共培养和非接触式共培养两种^[10]。Buzanska 等^[11]用接触式培养的方法将 Nestin 阳性细胞和大脑皮层细胞共培养 4d 后发现,有 40% 的 Nestin 阳性细胞分化为神经样细胞,包括 30% 的星形胶质细胞和 11% 的少突胶质细胞。Joannides 等^[12]用来自海马的星形胶质细胞和 BMSC 进行共培养后发现,BMSC 能分化为神经丝蛋白/ β 微管蛋白 (NF/ β -tubulin) 阳性的细胞。Sanchez-Ramos 等^[13]报道将 BMSC 和脑细胞进行共培养后,BMSC 能更好地分化为 GFAP 阳性的

神经胶质细胞。上述 3 个研究用的都是细胞接触式共培养,所以不能排除上述变化是由细胞之间的融合引起的。非接触式共培养主要是指 Transwell 共培养体系下的共培养,细胞与细胞之间通过分泌的细胞小分子而相互作用,其间上下层的细胞不直接接触^[14]。Wei 等^[15]利用 Transwell 培养系统法共培养兔 BMSC 和椎间盘组织细胞,发现 BMSC 能显现出椎间盘组织细胞的特征,如细胞外基质和蛋白聚糖,并能合成胶原蛋白。Zurita 等^[16]用 Transwell 培养系统对 BMSC 和雪旺氏细胞共培养后证实,细胞之间的非接触式共培养也能诱导 BMSC 向神经前体细胞分化。

本研究结果显示,随着共培养时间的延长,共培养后 BMSC 中 Nestin 阳性的细胞比例下降,而 Tuj-1 和 GFAP 阳性的细胞比例上升,与 Ni 等^[17]

和 Xie 等^[18]的结果相一致。根据共培养 7d 和 14d 后的不同标记物阳性细胞比例变化可以发现,在共培养的初期,神经前体细胞的比例较高,随着共培养时间的进一步延长,神经前体细胞逐渐成熟,分化为神经元及神经胶质细胞,Tuj-1 和 GFAP 阳性细胞的比例上升,而 Nestin 阳性细胞的比例开始下降。使用 OEC 共培养诱导 BMSC 向神经样细胞分化的研究已有报道。但是目前对于 BMSC 神经分化的转化率主要通过荧光显微镜照片下染色阳性细胞的比例来表示。该方法随意性较强,受操作者主观影响较大,可能无法准确描述细胞分化的转化率。为此,本研究使用间接细胞标记对不同时间点共培养后的 BMSC 神经分化转化率进行测定。流式细胞仪检测更为精确客观,避免了操作者对实验结果的干扰,在判定阳性细胞率方面更为准确。

本研究证实,OEC 能诱导 BMSC 向神经样细胞分化,特别是向神经元分化。其机制很可能是通过 OEC 分泌的大量不同的神经营养因子、粘附分子等可溶性的物质及细胞外基质以诱导、刺激 BMSC 自分泌或旁分泌增加来实现的。OEC 不仅能分泌血小板来源增殖因子(PDGF)、神经肽 Y、钙离子结合蛋白 S100 (S100)、神经生长因子(NGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)、神经营养素-3(NT-3)等神经营养因子,还能表达许多与轴突生长相关的分子,如神经细胞粘附分子(N-CAM)、纤维连接蛋白(fibronectin)、多唾液酸神经细胞粘连分子(PSA-N-CAM)和层粘连素(laminin)等。在各种小分子的相互作用下,BMSC 启动了向神经样细胞分化的程序^[12,13]。

本研究通过构建非接触式 BMSC 和 OEC 的共培养体系,证实 OEC 能诱导 BMSC 分化为神经样细胞,尤其是神经元细胞。为进一步动物体内实验和将来的临床应用提供了实验依据。

4 参考文献

1. Geisler FH, Coleman WP, Benzel E, et al. Spinal cord injury [J]. Lancet, 2002, 360(9348): 1883.
2. 姚帅辉, 钟德君. 诱导多能干细胞移植在脊髓损伤修复中的应用及研究进展 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2013, 23 (11): 1015-1018.
3. 王飞, 陈智, 魏显招, 等. 嗅鞘细胞移植治疗脊髓损伤的研究进展[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2012, 22(10): 943-946.
4. 王蕾, 白海. 骨髓间充质干细胞在组织修复中的作用[J]. 中国

医药指南, 2013, 11(17): 69-71.

5. 姜刚强, 阮狄克. 共培养技术促干细胞向类髓核细胞分化的研究进展[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2013, 23(9): 856-859.
6. Choi D, Law S, Raisman G, et al. Olfactory ensheathing cells in the nasal mucosa of the rat and human[J]. Br J Neurosurg, 2008, 22(2): 301-302.
7. 陆奕, 高军, 吴洪玉, 等. 同种异体骨髓间充质干细胞在急性坏死性胰腺炎大鼠中的迁移和分化 [J]. 中华胰腺病杂志, 2011, 11(1): 40-42.
8. Li Y, Field PM, Raisman G. Regeneration of adult rat corticospinal axons induced by transplanted olfactory ensheathing cells[J]. J Neurosci, 1998, 18(24): 10514-10524.
9. 徐丽丽, 匡弢, 张佳. 体外诱导骨髓间充质干细胞向神经样细胞分化: 两种方法的比较[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17 (45): 7821-7826.
10. 苏尼尔, 特日格乐, 金焰. 细胞共培养技术及其在干细胞临床研究中的应用[J]. 国际遗传学杂志, 2013, 36(1): 1-5.
11. Buzanska L, Ruiz A, Zychowicz M, et al. Patterned growth and differentiation of human cord blood-derived neural stem cells on bio-functionalized surfaces [J]. Acta Neurobiol Exp (Wars), 2009, 69(1): 24-36.
12. Joannides AJ, Webber DJ, Raineteau O, et al. Environmental signals regulate lineage choice and temporal maturation of neural stem cells from human embryonic stem cells[J]. Brain, 2007, 130(Pt 5): 1263-1275.
13. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro[J]. Exp Neurol, 2000, 164(2): 247-256.
14. Mardani M, Kabiri A, Esfandiari E, et al. The effect of platelet rich plasma on chondrogenic differentiation of human adipose derived stem cells in transwell culture [J]. Iran J Basic Med Sci, 2013, 16(11): 1163-1169.
15. Wei A, Chung SA, Tao H, et al. Differentiation of rodent bone marrow mesenchymal stem cells into intervertebral disc-like cells following coculture with rat disc tissue [J]. Tissue Eng Part A, 2009, 15(9): 2581-2595.
16. Zurita M, Vaquero J, Oya S, et al. Neurotrophic Schwann-cell factors induce neural differentiation of bone marrow stromal cells [J]. Neuroreport, 2007, 18 (16): 1713-1717.
17. Ni WF, Yin LH, Lu J, et al. In vitro neural differentiation of bone marrow stromal cells induced by cocultured olfactory ensheathing cells[J]. Neurosci Lett, 2010, 475(2): 99-103.
18. Xie ST, Lu F, Zhang XJ, et al. Retinoic acid and human olfactory ensheathing cells cooperate to promote neural induction from human bone marrow stromal stem cells [J]. Neuromolecular Med, 2013, 15(2): 252-264.

(收稿日期:2014-05-19 修回日期:2014-07-28)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 李伟霞)