论著

文章编号:1000-5404(2005)02-0098-04

bFGF促进大鼠骨髓间充质干细胞向神经元转化及机制

江和碧,卓本慧,代 英,瞿 平,李廷玉 (重庆医科大学儿童医院儿童保健科,重庆市儿童营养研究中心,重庆 400014)

提 要: 目的 探讨碱性成纤维生长因子对大鼠骨髓间充质干细胞分化为神经元的作用及信号通路。**方法** 利用bFGF与不同生长因子和化学诱导剂组合诱导间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)向神经元转化,观察分化过程中细胞形态、数目的变化,观察免疫细胞化学检测分化后细胞神经细胞标志蛋白和部分神经功能相关蛋白以及FGFR的表达情况,并计算转化率。**结果** ①3组不同条件诱导后,MSCs均能分化为具有典型神经元形态的细胞,并明显表达NSE、MAP2和5-HT_{1D},但不表达GFAP;②bFGF预诱导组的转化率明显高于未预诱导组;③诱导后的神经元样细胞FGFR3表达明显增强。**结论** 以DMSO和BHA为基础诱导剂,bFGF预处理可明显提高MSCs跨胚层分化为神经元样细胞的转化率,浓度为10 ng/ml的bFGF主要是通过FGFR3作用于MSCs。

关键词: 骨髓间充质干细胞;细胞分化 bFGF

中图法分类号: R322.85; R329.2; R977.6 **文献标识码**: A

bFGF promotes differentiation of mesenchymal stem cells into neurons and the related mechanisms

JIANG He-bi, ZHUO Ben-hui, DAI Ying, QU Ping, LI Ting-yu (Department of Child Health Care, College of Pediatrics, Chongqing University of Medical Sciences, Institute of Nutrition Research for Children, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To study the effects and signal pathway of basic fibroblast growth factor (bFGF) on mesenchymal stem cell (MSCs) differentiating into neuron-like cells. **Methods** MSCs were isolated from adult rat bone marrow, and expanded on the flask undifferentiated state for 6 passages. Different induction conditions were employed. Immunocytochemistry was used to detect the neuronal phenotype and the expressions of fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) and FGFR3 in pre- and post-differentiated cells. The transdifferentiation percentage was calculated. **Results** Under different induction conditions, MSCs resumed typical neuronal morphology. There was a higher transdifferentiation percentage in the group pretreated by bFGF than that of the control. The expression of FGFR3, not FGFR1, increased during differentiation. **Conclusion** bFGF can promote MSCs differentiating into neuron-like cells *in vitro*. This signal transduction is mainly mediated by FGFR3 pathway.

Key words: mesenchymal stem cell; cell differentiation; basic fibroblast growth factor

干细胞定向转化及机制的研究是当今干细胞研究领域的前沿课题。在骨髓中存在另一种间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs),又称骨髓基质干细胞(bone marrow stromal stem cells)。它具有跨胚层分化的潜能,在适宜条件下可转化为神经细胞,有望在治疗脑出血、脑损伤和神经系统退行性疾病方面发挥重要作用[1]。本研究组前期工作发现碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)和全反式视黄酸(all-trans retinoic acid, ATRA)预诱导能明显促进MSCs向神经元样细胞转化[2],但传导通路不清。本研究采用bFGF和各种不同因子组合诱导的方法首次探讨bFGF在MSCs向神经元转化中的作用及通路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 8~12周龄的Wistar大鼠,体质量200~250 g(由重庆医科大学动物中心提供)。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070382);重庆市科委科学基金(2001-54);重庆市卫生局科学基金(2001-46);教育部和重庆市教委基金(2002)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30070382), the Research Foundation of Scientific Committee of Chongqing (2001-54), the Research Foundation of Health Bureau of Chongqing (2001-46), and the Research Foundation of Ministry Education and Chongqing Municipal Education Commission (2002)

作者简介:江和碧(1979-),男,江西省九江市人,硕士,医师,主要从事骨髓间充质干细胞向神经元转化方面的研究。电话:(023)63632756-3566

通讯作者:李廷玉,电话:(023)63632756-3523,E-mail: tyli@vip.sina.com

收稿日期:2004-07-22;**修回日期**:2004-12-15

1.1.2　细胞培养试剂及诱导剂　DMEM/F12、胎牛血清、重组人碱性成纤维细胞生长因子（recombinant human bFGF, rh-bFGF）、ATRA、3-叔丁基-4 羟基茴香醚（butylated hydroxyanisole, BHA）、二甲基亚砜（dimethyl sulphoxide, DMSO）。

1.1.3　主要抗体　兔抗神经元特异性烯醇化酶多克隆抗体（1∶100）（polyclonal mouse anti- neuron specific enolase, NSE）（博士德公司）、小鼠抗微管相关球蛋白单克隆抗体（1∶100）（monoclonal mouse anti-microtube associated protein2, MAP2）（Neuro Markers 公司）、小鼠抗神经胶质纤维酸性蛋白单克隆抗体（1∶100）（monoclonal mouse anti- glial fibrillary acid protein, GFAP）（Neuromakers 公司）、羊抗 5-HT_{1D}受体单克隆抗体（1∶100）（Santa crwz 公司）、兔抗 FGFR1 多克隆抗体（1∶100）、兔抗 FGFR3 多克隆抗体（1∶100）（晶美公司），胎牛血清（My chone 公司），ATRA（Sigma 公司），BHA（Sigma 公司），DMSO（Sigma 公司）。

1.2　实验方法

1.2.1　rMSCs 的分离培养　无菌状态下分离出大鼠的股骨和胫骨，用针管吸取 10 ml 含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基冲洗骨髓腔，转入离心管，1 000 r/min 离心 5 min，弃上清后，在细胞沉淀中加入 DMEM/F12 培养基 2 ml，计数细胞，并调整细胞浓度。按单个核细胞 1×10^6/ml 的密度接种于含 7 ml 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基的 50 ml 塑料培养瓶中，放置于 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度的 CO_2 孵箱内培养。培养 3 d 后，更换培养基，弃掉未贴壁的细胞。以后每 4 d 换液 1 次。细胞达到 80% 融合后用 0.25% 胰酶 37 ℃消化 5 min，1 000 r/min 离心 5 min，弃上清重新悬浮细胞，以 3×10^5/ml 重新接种，反复传代扩增纯化。

1.2.2　rMSCs 向神经细胞分化的体外诱导方法　取第 6 代的 rMSCs，以 3×10^5/ml 浓度接种于六孔板内制备细胞爬片，培养液为含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12。24 h 后，全量换液，培养基不变，并分别加入 bFGF 或 bFGF + ATRA，24 h 后，再次换液，PBS 洗 3 次，加入只含 DMSO + BHA 诱导因子而不含血清的 DMEM/F12 培养液，见表 1。置 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度的 CO_2 孵箱内培养。

表 1　3 组不同的神经分化诱导条件

Tab 1　Conditions for neuronal differentiation in the 3 groups

Group	Conditions for neural differentiation	
	1 d	2 d
1	—	2% DMSO + 200 μmol/L BHA
2	10 ng/ml bFGF	2% DMSO + 200 μmol/L BHA
3	10 ng/ml bFGF + 0.5 μmol/L ATRA	2% DMSO + 200 μmol/L BHA

1.2.3　免疫细胞化学检测神经细胞标志蛋白和 5-HT_{1D}蛋白

取经 DMSO 和 BHA 诱导 24 h 的细胞盖片，采用 S-P 免疫细胞化学法检测，并设阴性对照，用 PBS 液代替一抗，细胞盖玻片用甲醇固定 5 min，3% 过氧化物氢封闭 10 min，山羊血清封闭 10 min，然后分别加入相应的一抗，4 ℃过夜，加入生物素标记的二抗，室温 10 min，再加入过氧化物酶标记链霉卵白素，室温孵育 10 min，DAB 显色，中性树胶封片。以细胞内出现棕黄色颗粒状着色为阳性，未着色为阴性。在光镜下随机选择 10 个非重叠视野（×100），计算免疫组化染色阳性的细胞数占总细胞的比例。

1.2.4　免疫组化检测 FGFR 的表达　取第 2 组的细胞爬片，检测 FGFR1，FGFR3 的表达，方法同前。

1.3　统计学分析

结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 SAS6.12 统计学软件作单因素方差分析。

2　结果

2.1　rMSCs 的培养特性

用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基，在塑料培养瓶中培养大鼠的骨髓细胞，3 d 后通过全量换液逐渐去除未贴壁细胞，此时可见散在的单个分散细胞呈扁平状，6～7 d 形成细胞克隆，9～10 d 可见相邻的克隆间拉网成片状，14 d 左右完全铺满瓶底。细胞传代后，1～10 代的增殖周期为 3～4 d。

2.2　rMSC 向神经元样细胞分化

2.2.1　光镜下分化的神经元形态和数目变化　rMSC 经 10 ng/ml bFGF 作用后，生长速度明显加快，部分细胞克隆的大小明显增加。加入 DMSO 和 BHA 1 h 后观察到扁平细胞的胞体向内收缩，呈球形或圆形，并向周围长出较长的突起，有立体感，折光性增强，5 h 表现出典型的神经元样细胞形态，伴少量细胞开始死亡。随着时间的延长，神经元样细胞进一步出现多级分枝，形成网状，末端膨大呈生长锥样结构，有单极、双极和多极等各种形态，24 h 后死亡细胞明显增多。

2.2.2　神经元特异标志表达　rMSCs 呈 NSE 弱阳性（图 1），但不表达 MAP2、5-HT_{1D}。各组诱导 24 h 后的神经元 NSE 表达明显增强，出现成熟神经元标志 MAP2（图 2）和特异神经元的标志 5-HT_{1D}（图 3）。各组诱导后的神经元样细胞 NSE，MAP2 的表达情况见表 2，其中第 2、3 组即经 bFGF、ATRA + bFGF 预诱导组，NSE 和 MAP2 的阳性率明显高于第 1 组。诱导前后 GFAP 均呈阴性。

表 2　各组诱导后的神经元样细胞 NSE，MAP_2 的阳性情况（%，$\bar{x}\pm s$）

Tab 2　Percentage of positive expressions of NSE and MAP_2（%，$\bar{x}\pm s$）

Group	NSE rate	MAP_2 rate
1	57.50 ± 2.07	50.20 ± 2.45
2	83.24 ± 2.12	78.35 ± 2.29
3	90.35 ± 3.15	80.10 ± 3.23

$F=4.12$，$P=0.028\ 2$

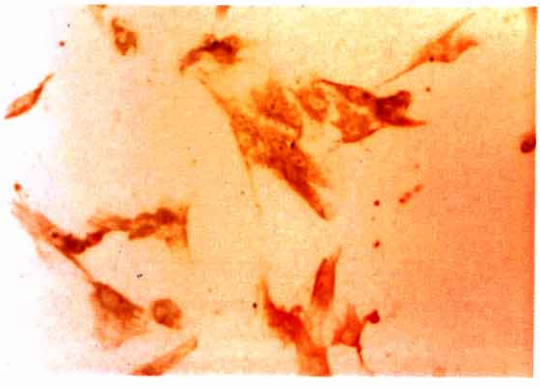


图 1　rMSCs 诱导前 NSE 的弱表达（S-P × 200）

Fig 1　Weak expression of NSE in undifferentiated rMSCs（S-P × 200）

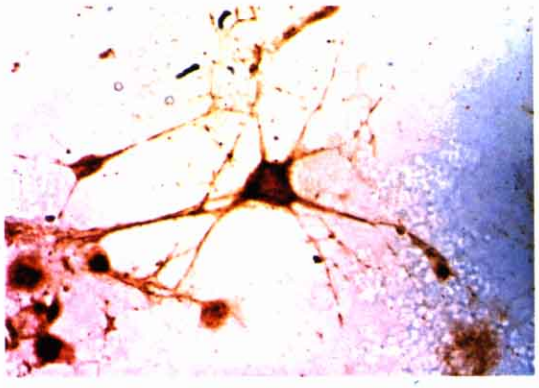


图2 rMSCs诱导后 MAP_2 的表达 (S-P×400)

Fig 2 Expression of MAP_2 after induction of rMSCs (S-P×400)

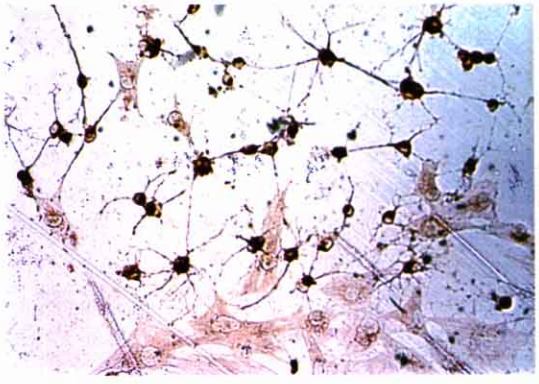


图3 rMSCs诱导后 $5\text{-}HT_{1D}$ 的表达 (S-P×200)

Fig 3 Expression of $5\text{-}HT_{1D}$ after induction of rMSCs (S-P×200)

2.3 bFGF预诱导组FGFR的表达

rMSCs不表达FGFR1、FGFR3,经bFGF和DMSO、BHA等因子作用后的神经元FGFR3表达明显增强(图4),而FGFR1无改变。

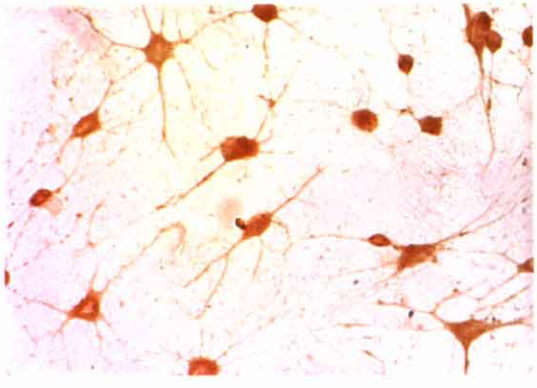


图4 rMSCs诱导后FGFR3的表达 (S-P×200)

Fig 4 Expression of FGFR3 after induction of rMSCs (S-P×200)

3 讨论

MSCs是一群存在骨髓间隙的异源的细胞群体,许多体内实验表明将MSCs植入受损部位,局部的微环境能够刺激其分化成为相应的子代细胞[3]。体外的培养条件中,生长因子和化学诱导剂对干细胞分化的影响最为广泛。

Woodbury等[4]报道在未分化MSCs能够检测到代表不同胚层基因的表达。本实验显示rMSCs经诱导剂后的神经元样细胞明显表达NSE和MAP2等一些神经元特异的标志蛋白,但不表达GFAP,提示诱导后的细胞是神经元样细胞,而非神经胶质细胞,同Woodbury等[5]报道基本一致。在本实验条件下,MSCs向神经元方向分化,未见神经胶质细胞,可能与本实验诱导条件有关,具体机制尚需进一步研究。

脑内神经元、交感神经、副交感神经和肠神经的突触前膜都存在受体 $5\text{-}HT_{1D}$,其中主要分布在基底神经节,在大脑的其它部位也有散在分布,该受体的功能可能与第二信使腺苷酸环化酶的活性相偶联。本实验中诱导24 h后的神经元样细胞亦表达受体 $5\text{-}HT_{1D}$,提示MSCs经本组条件诱导后,神经元样细胞可向具有特异功能的神经元方向分化。

bFGF是一种促细胞生长作用很强的多肽因子,又是重要的致有丝分裂原,在神经系统早期发育中起重要作用,因而日益受到人们的重视。在胚胎干细胞向神经细胞分化过程中,bFGF在促进神经外胚层向神经前体细胞转化这个环节有重要作用[6]。本实验结果显示bFGF促进rMSCs的增殖,第2组(bFGF预诱导组)阳性率明显高于未诱导组达30%之多,提示bFGF能够提高DMSO和BHA诱导rMSCs跨胚层分化为神经元的转化率。这可能与其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。第3组我们采用了联合应用bFGF和ATRA预诱导rMSCs向神经元转化的方法,其阳性率高于第2组,比其它类似文献报道的阳性率高,提示本实验诱导条件为促进rMSCs向神经元转化的优化条件。这可能与ATRA增强细胞的粘附,调节神经系统发育相关基因有关。并且,在神经系统发育早期,bFGF与ATRA两者之间可能还存在交叉作用,两者在促进MSCs向神经元样细胞转化过程中可能有协同作用。

bFGF作用信号传导通路与其作用浓度有关,Qian等[7]报道对体外培养的神经干细胞,浓度为0.1 ng/ml bFGF主要激活FGFR1和FGFR2启动分裂信号,而不激活FGFR3,浓度为1~10 ng/ml bFGF激活FGFR3启动分裂和分化信号。本研究第2组诱导方案显示,浓度为10 ng/ml bFGF诱导后FGFR3的表达明显增强,而FGFR1无明显改变,提示浓度为10 ng/ml的bFGF主要通过FGFR3作用于MSCs,与Qian等报道的bFGF对神

经干细胞作用通道一致，提示 MSCs 向神经元转分化的过程可作为研究神经细胞发育的模型。

参考文献：

[1] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, *et al*. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. Science, 1999, 284(5411): 143 - 147.

[2] 李云玲，陈　笛，王　璐，等. 成人骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞的体外研究[J]. 第三军医大学学报，2003，25(11)：941 - 943.

[3] Bianchi G, Muraglia A, Daga A, *et al*. Microenvironment and stem properties of bone marrow-derived mesenchymal cells [J]. Wound Repair Regen, 2001, 9(6): 460 - 466.

[4] 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 - 370.

[5] Woodbury D, Reynolds K, Black I B. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis[J]. J Neurosci Res, 2002, 69(6): 908 - 917.

[6] Guan K, Chang H, Rolletschek A, *et al*. Embryonic stem cell-derived neurogenesis. Retinoic acid induction and lineage selection of neuronal cells [J]. Cell Tissue Res, 2001, 305(2): 171 - 176.

[7] Qian X, Davis A A, Goderie S K, *et al*. FGF2 concentration regulaters the generation of neurons and glia from multipotent cortical stem cells [J]. Neuron, 1997, 18(1): 81 - 93.

（编辑　汪勤俭）

文章编号：1000-5404(2005)02-0101-01

个案与短篇

焦虑症患者人格特质的调查

Investigation of personality trait of patients with anxiety disorder

瞿　玮，覃国国　（第三军医大学西南医院神经内科临床心理咨询中心，重庆 400038）

许多研究显示，焦虑症的发生与病前人格特征有着密切的联系。但在过去的文献中，人们更多用艾森克的人格维度来研究焦虑症与人格的关系，而不是用人格特质来研究焦虑症与人格的关系。本研究采用卡特尔 16PF 人格因素问卷及 Zung 焦虑自评量表对焦虑症患者进行测试，探讨焦虑症患者与其自身人格特质内在对应的关系。

1　资料与方法

1.1　临床资料

焦虑症组患者 100 人，均系 2003 年 8 月至 2004 年 3 月在本院心理门诊首次就诊，符合 CCMD-3[1] 焦虑症诊断标准，Zung SAS 评分（标准分）为平均（65.31 ± 7.90）分。所有患者均为初中文化以上的成年人，其中男性 40 人，女性 60 人；文化程度：初中以上 43 人，大专以上 57 人，年龄 18 ~ 47 岁，平均（28.6 ± 8.8）岁。

正常人常模选自华东师范大学戴忠恒、祝蓓里于 1987 年修定的中国人正常人卡特尔 16PF 人格问卷常模[2]。

1.2　方法

采用北京大学 Insight Group 研制的心理测评工具箱（标准版 V2.3）[3] 对焦虑症患者进行卡特尔 16PF 人格问卷测评，16 种人格因素（特质）分别为：因素 A 乐群性、因素 B 聪慧性、因素 C 稳定性、因素 E 持强性、因素 F 兴奋性、因素 G 有恒性、因素 H 敢为性、因素 I 敏感性、因素 L 怀疑性、因素 M 幻想性、因素 N 世故性、因素 O 忧虑性、因素 Q1 实验性、因素 Q2 独立性、因素 Q3 自律、因素 Q4 紧张性；以及 Zung 氏焦虑自评量表（SAS）的测试，然后电脑测评系统自动评出各项指标的标准分。

1.3　统计方法

所有数据用 SPSS10.0 统计软件进行，两样本均数进行 t 检验及 Pearson 相关分析。

2　结果

2.1　焦虑症组与正常人常模卡特尔 16PF 各因子标准分比较见表 1

表 1　焦虑症组与正常人常模卡特尔 16PF 各因素标准分比较（$\bar{x} \pm s$）

	焦虑症组（$n = 100$）	正常人常模（$n = 2\,391$）
因素 A	6.19 ± 1.68**	5.48 ± 1.75
因素 B	5.22 ± 1.46**	5.92 ± 1.96
因素 C	3.48 ± 1.64**	5.51 ± 1.75
因素 E	4.86 ± 1.59**	5.52 ± 1.82
因素 F	5.01 ± 2.22*	5.50 ± 1.88
因素 G	4.42 ± 1.59**	5.53 ± 1.65
因素 H	4.58 ± 1.65**	5.56 ± 1.84
因素 I	6.63 ± 1.46	5.53 ± 1.83**
因素 L	5.84 ± 1.52*	5.47 ± 1.78
因素 M	6.22 ± 1.54**	5.42 ± 1.61
因素 N	5.55 ± 1.47	5.53 ± 1.66
因素 O	8.32 ± 1.53**	5.48 ± 1.81
因素 Q1	4.64 ± 1.29**	5.50 ± 1.72
因素 Q2	4.73 ± 1.79**	5.50 ± 1.72
因素 Q3	4.21 ± 1.61**	5.50 ± 1.90
因素 Q4	8.10 ± 1.26**	5.60 ± 1.98

与正常人组比较，*：$P < 0.05$，**：$P < 0.01$

作者简介：瞿　玮（1963 - ），女，重庆市涪陵区人，硕士，副主任医师，副教授，主要从事综合医院情绪障碍的原因及心理咨询与治疗方法方面的研究。电话：(023)68765106

收稿日期：2004-03-30；修回日期：2004-06-24

（下转 105 页）