文章编号:1000-5404(2005)08-0773-03

论著

人脐血单个核细胞中 Nestin 阳性细胞表达及其临床意义

周 毅[1],王景周[1],周 萍[2],王昌铭[1] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1] 神经内科,[2] 第七研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

提 要:目的 观察脐血单个核细胞是否表达 nestin 抗原及表达量的多少;探讨人脐血单个核细胞(human cord blood mononuclear cells, HCMNCs)对神经系统疾病治疗的潜能。**方法** 采集正常分娩胎儿的脐血。以淋巴细胞密度梯度离心法分离人脐血细胞(human cord blood cells, HUCBCs)。用免疫组化法测定 HCMNCs 及外周血细胞(human peripheral blood cells, HPBCs)中 nestin 阳性细胞;流式细胞仪(flow cytometer, FCM)分析 HCMNCs 中 nestin 阳性细胞的比例及细胞周期。**结果** 脐血中有 nestin 阳性细胞,约占 HCMNCs 的(4.32±0.66)%。HCMNCs 的 G1/0 期细胞显著少于外周血而 S 期细胞则显著多于外周血,G2/M 期细胞无显著差异。**结论** 人脐血单个核细胞确能表达 nestin 抗原。这将为 HCMNCs 在神经系统应用提供一定的理论依据。

关键词:脐血;单个核细胞;nestin;细胞周期;流式细胞术
中图法分类号:R329.24; R394.2; R714.51 **文献标识码**:A

Expression and significance of nestin in human cord blood mononuclear cells

ZHOU Yi[1], WANG Jing-zhou[1], ZHOU Ping[2], WANG Chang-ming[1] ([1]Department of Neurology, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 7, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of nestin in human cord mononuclear cells (HCMNCs) and discuss the relevance of this finding upon future therapeutic application of HCMNCs in neurological diseases. **Methods** The cord blood from fetus after normal labor was collected and the human umbilical cord blood was isolated by density gradient contrifugation. The nestin-positive cells in the HCMNCs and the peripheral blood were detected by immunocytochemistry. The nestin-positive cell ratio of HCMNCs and cell cycle were analyzed with flow cytometer. **Results** The nestin-positive cell ratio in HCMNCs was about (4.32±0.66)%. The ratio of G1/0 and S of HCMNCs had a significant difference with that of human peripheral blood cells. **Conclusion** HCMNCs expressed nestin, which supports the idea that cord blood cells could adopt a neural fate, and they can be applied in central nervous system.

Key words: human umbilical cord blood; mononuclear cells; nestin; cell cycle; flow cytometry

哺乳动物中枢神经系统受损后的修复是有限的,受损的神经元几乎不能再生。目前,越来越多的研究将重点放在细胞移植治疗脑和脊髓病变[1]。胚胎干细胞移植是治疗神经系统疾病最有希望的手段之一[2]。哺乳动物中枢神经系统能够同所移植胚胎组织形成纤维联系,其中所移植细胞可以促进受损大脑功能的改善。但广泛应用受到组织来源、伦理学及免疫排斥等诸方面的限制。骨髓干细胞在体外培养可以分化为神经元和胶质细胞;将骨髓细胞经过一定条件培养后可以表达 nestin 抗原[4];骨髓干细胞治疗神经系统疾病取得了明显效果[3]。脐血也富含干细胞,且这些干细胞更原始,更易获得,传播血液性疾病的危险性更低,免疫原性更低。脐血富含间充质祖细胞、内皮前体细胞和造血干细胞。此外,脐血单个核细胞经过一定条件培养可以表达神经细胞的特异性标志物[5,6]。那么,脐血中是否有 nestin 阳性单个核细胞表达国内鲜见报道。本实验拟观察脐血单个核细胞中 nestin 阳性细胞表达及其可能的临床意义。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

一抗 nestin(巢蛋白抗体,美国 Santa Cruz 公司);FITC 荧光二抗(Jackson ImmunoResearch 公司);流式细胞仪(ELITE ESP 型,美国 COULTER 公司);免疫组化二抗试剂盒(北京中山公司);DMEM 培养基(美国 GIBCO 公司);光学显微镜(E-20P 型,日本 Olympus 公司);DAB 显色剂(北京中山公司);淋巴细胞分离液(相对质量密度 1.077,天津 TBD 公司);专用 DNA 染色液(PI 50 mg/L,Coulter 公司)。

基金项目:重庆市科委科研基金攻关项目[7830 (2003-2005)]
Supported by the Sci & Tech Research Project Foundation of Scientific Committee of Chongqing [7830 (2003-2005)]
作者简介:周 毅(1977-),女,河北省石家庄市人,硕士研究生,医师,主要从事血管性痴呆方面的研究。电话:13102328223
通讯作者:王景周,电话:(023)68757363
收稿日期:2004-10-19;修回日期:2005-01-25

1.2 标本的采集和分离

脐血和成人外周血均由第三军医大学大坪医院提供。脐血采自足月妊娠产妇，除外感染性疾病，非高危妊娠。于胎儿娩出后，胎盘娩出前，消毒脐带胎盘端，将装有抗凝剂的血袋刺入脐静脉，每份收集脐血约 50～100 ml，共 10 份。成人外周血 10 份(取自大坪医院输血科)。脐血与成人外周血处理方法相同：于标本收集后 12 h 内立即处理。将血标本等体积的 Hank's 溶液稀释。用滴管沿管壁缓慢叠加于淋巴细胞分离液上，2 000 r/min 离心 20 min，收集界面白膜层，用 PBS 液洗涤 2 次。细胞洗涤后重悬于 DMEM 培养基中调整浓度为 1×10^6/ml。

1.3 免疫细胞化学

将脐血单核细胞悬液均匀涂于载玻片上。将细胞置于 37 ℃，5% CO_2，饱和湿度的孵箱中孵育 2 h。以 4% 的多聚甲醛固定细胞。将一抗 nestin(1∶200)加于细胞上 4 ℃过夜。次日用 PBS 清洗，之后严格按照二抗试剂盒说明书的步骤操作(S-P 染色法)。最后以 DAB 显色。显微镜下观察显色情况。外周血细胞也以同样的方法处理，之后观察显色情况。

1.4 流式细胞仪检测

吸取脐血单核细胞悬液 1 ml，离心后，加 100 μl PBS 制成悬液；加一抗 nestin(1∶200)20 μl，4 ℃孵育 30 min；后 PBS 洗涤 2 次，制成 100 μl 细胞悬液；加 4 μl FITC 荧光二抗，4 ℃孵育 30 min，PBS 洗涤 2 次。设同型对照，只加二抗，不加一抗。外周血单核细胞也以同样的方法处理。用流式细胞仪进行检测(激发波长为 488 nm，发射波长为 525 nm)。

细胞周期检测时将细胞以专用 DNA 染色液(PI 液)0.5 ml 避光染色 30 min 再进行检测(激发波长为 488 nm，发射波长为 610 nm)。

1.5 统计学方法

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表达，应用 SPSS 10.0 统计软件行进行配对 t 检验。

2 结果

2.1 免疫细胞化学

染色显示 nestin 抗原在 HCMNCs 中有表达。Nestin 阳性染色为细胞质棕黄色着色(图 1)。而成人外周血单个核细胞中无 nestin 阳性细胞。用光学显微镜可观察到显色情况。

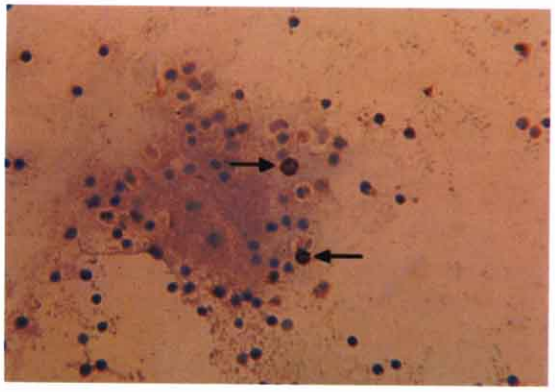


图 1 nestin 阳性染色细胞 (S-P×200)

Fig 1 The cells expressing nestin indicated by the arrows (S-P×200)

2.2 流式细胞仪对 nestin 阳性细胞计数

流式细胞检测显示 nestin 阳性细胞占人脐血单个核细胞总数的(4.32±0.66)%(图 2,3)。成人外周血单个核细胞则未检测出 nestin 阳性细胞。

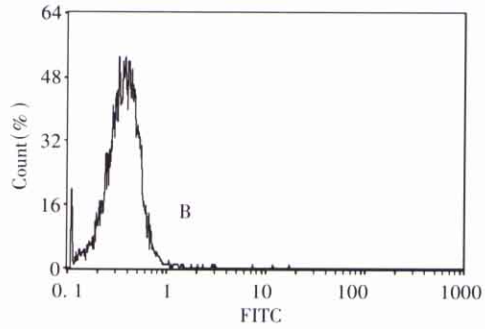
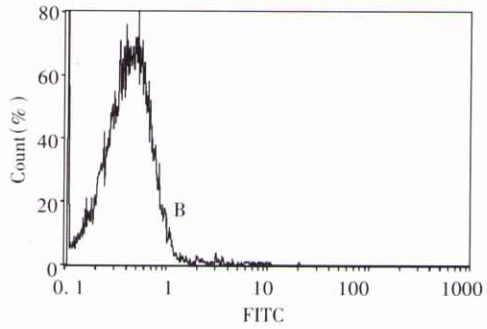


图 2 FCM 检测 HCMNCs 中 nestin 细胞含量的阴性对照

Fig 2 FCM analysis of HCMNCs from negative control group



The expression of cells was about 4.8%

图 3 FCM 检测 HCMNCs 中 nestin 细胞含量的阳性结果

Fig 3 FCM analysis of HUMNCs

2.3 HCMNCs 与成人外周血单个核细胞细胞周期分析

流式细胞仪对细胞周期分析(Multicycle 软件)显示 HCMNCs 处于静止期的细胞明显少于成人外周血 MNCs；而 HCMNCs 处于分裂期的细胞数明显高于成人外周血 MNCs，两组数据均有显著差异($P<0.01$)。HCMNCs 处于 G2/M 期的细胞高于成人外周血 MNCs，但无显著差异($P>0.05$)(表 1)。

表 1 脐血、外周血各期细胞比率 [$n=10$, ($\bar{x}\pm s$)%]

Tab 1 Cell ratio of HCMNCs and HPBCs in different phages of cell cycle [$n=10$, ($\bar{x}\pm s$)%]

	G1/G0	S	G2/M
HCMNCs	85.0±3.8*	12.3±3.4*	2.7±1.8
HPBCs	94.8±2.3	3.8±1.7	1.3±1.2

*: $P<0.01$, *vs* HPBCs

3 讨论

本研究观察人脐血单个核细胞是否表达 nestin 抗原，以及 HCMNCs 中 nestin 阳性细胞的比例。研究表

明人脐血单个核细胞的胞浆中的确表达 nestin 抗原。Nestin 是新近发现的第 6 类中间丝蛋白[7]，是神经干细胞的标志物[8,9]，在神经干细胞中表达。神经干细胞分化为神经细胞后转化成为细胞的骨架蛋白，如胶质纤维酸性蛋白，神经丝(neurofilament)。细胞移植治疗神经系统疾病是目前神经科学研究重点。以往，人们利用胚胎源性 NSCs[10] 进行神经系统疾病治疗的研究。移植的 NSCs 可以在脑内分化并代替受损的神经细胞，从而重建 CNS 的功能[11]。提示 NSCs 移植治疗有着光明的前景，然而仍存在诸多法律、社会、伦理及排异反应等诸多问题。近年来，大量研究表明骨髓间质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)可以分化成为神经细胞。将骨髓 MSCs 在特定的条件下培养，可以产生表达神经细胞特异性标记物的细胞[5]。将骨髓 MSCs 通过不同的途径移植到神经系统受损的动物模型中同样也观察到了动物损伤组织的修复及行为功能的改善。研究证明，如果将骨髓干细胞在体外加入特定的培养液中，培养后可以表达 nestin 抗原。本实验用流式细胞仪检测了经过短期培养的 HUMNCs，证实其中存在约 4% 的 nestin 阳性细胞，这与 Ha 等[12] 用 PCR 检测出的 HUMNCs 中 nestin 阳性细胞的比例相似。Sanchez-Ramos 将人脐血细胞经体外培养后能表达神经细胞标志物。Palmer 等证实成体海马有血管通路能够作为造血细胞参与神经发生的进入位点。这些报道都证明 CNS 的神经再生不仅来自于 CNS 的神经干细胞，也可能来自于造血系统。出生后早期的神经发育是很旺盛的，新生儿胚胎基质层的神经干细胞的神经发生是很旺盛的。但是新生儿的造血系统是否参与神经再生还不是很明确。这些报道显示新生儿的神经发育可能与造血系统有关。

本实验观察到人脐血单个核细胞的细胞周期与外周血单核细胞的细胞周期有所不同。HCMNCs 的 G1/0 期细胞显著少于外周血细胞而 S 期细胞则显著多于外周血，G2/M 期细胞无显著差异。分析可能的原因为，HCMNCs 干细胞含量丰富，处于分裂期的细胞数较多，而处于静止期的细胞明显少。与骨髓及外周血相比，脐带血具有干细胞含量丰富、免疫原性弱、淋巴细胞不成熟、来源丰富、易于采集及保存、无肿瘤细胞污染等优点，且不涉及社会及法律问题。脐血已逐步应用于临床治疗各种急慢性恶性血液病、重症免疫缺陷病及骨髓瘤的儿童。脐带血较骨髓含有更多的干细胞，而且这些干细胞也更原始。这些发现证实脐血源性干细胞比骨髓源性干细胞更有治疗的应用价值。目前也有一些研究报道将 HCMNCs 移植到中枢神经系统受损(如脑缺血或脊髓损伤)的动物模型中，并从组织修复及行为改善方面证实了其有效性。Zigova 等[13] 将分离的人脐带血单个核细胞移植到新生大鼠的脑内，发现这些细胞能够存活并能够表达神经细胞标志物。这些研究证明人脐血单个核细胞存在神经干细胞特性的细胞。将 HCMNCs 移植到受损的脑或脊髓是否能够分化成为成熟的神经元和胶质细胞，并能修复损伤组织，改善行为缺失需要进一步研究。本研究观察到脐血细胞确有 nestin 阳性细胞的表达。若以后能够对这部分细胞进行更深入、细致的研究，观察其在移植治疗神经系统疾病方面的作用，这将会给细胞移植治疗神经系统疾病带来新的思路。

总之，本研究证实了 nestin 阳性细胞在人脐血中的存在，为人脐血干细胞培养、转化为神经细胞，并应用于神经系统疾病的治疗提供了一定的依据。

参考文献：

[1] Qu T, Brannen C L, Kim H M, *et al*. Human neural stem cell improve cognitive function of aged brain[J]. Neuroreport, 2001, 12(6): 1127 - 1132.

[2] Park K I. Transplantation of neural stem cells: cellular and gene therapy for hypoxic-ischemic brain injury[J]. Yonsei Med J, 2000, 41(6): 825 - 835.

[3] Li Y, Chopp M, Chen J, *et al*. Intrastriatal transplantation of bone marrow nonhematopoietic metab cells improves functional recovery after stroke in adult mice[J]. J Cereb Blood Flow, 2000, 20(9): 1311 - 1319.

[4] 姜晓丹，徐如祥，张世忠，等. 成人骨髓源性神经干细胞诱导分化实验研究[J]. 解放军医学杂志，2002, 27(11): 947 - 949.

[5] Bicknese A R, Goodwin H S, Quinn C O, *et al*. Human umbilical cord blood cells can be induced to express markers for neurons and glia[J]. Cell Transplant, 2002, 11(3): 261 - 264.

[6] Buzanska L, Machaj E K, Zablocka B, *et al*. Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features *in vitro*[J]. J Cell Sci, 2002, 115 (Pt 10): 2131 - 2138.

[7] Lendahl U, Zimmerman L B, McKay R D. CNS stem cells express a new class of in termediate filament protein[J]. Cell, 1990, 60(3): 585 - 595.

[8] Kawaguchi A, Miyata T, Sawamoto K, *et al*. Nestin-EGFP transgenic mice: visualization of the self-renewal and multipotency of CNS stem cells [J]. Mol Cell Neurosci, 2001, 17(2): 259 - 273.

[9] Yamaguchi M, Saito H, Suzuki M, *et al*. Visualization of neurogenesis in the central nervous system using nestin promoter-GFP transgenic mice[J]. Neuroreport, 2000, 11(9): 191 - 196.

[10] Liu S, Qu Y, Stewart T J, *et al*. Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(11): 6126 - 6131.

[11] Bjorklund A, Lindvall O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders[J]. Nat Neurosci, 2000, 3(6): 537 - 544.

[12] Ha Y, Lee J E, Kim K N, *et al*. Intermediate filament nestin expressions in human cord blood monocytes (HCMNCs)[J]. Acta Neurochir Wien, 2003, 145(6): 483 - 487.

[13] Zigova T, Song S, Willing A E, *et al*. Human umbilical cord blood cells express neural antigens after treunsplaniation into the developing rat brain [J]. Cell Transplant, 2002, 11(3): 265 - 274.

(编辑　薛国文)