文章编号:1000-5404(2006)21-2149-04

论著

大鼠骨髓基质干细胞的神经分化以及神经生长因子的表达

郜元军,钱 伟,汪步海,蔺 蓉,侯晓华 (华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科,武汉 430022)

提 要:目的 探讨大鼠骨髓基质干细胞神经分化以及神经生长因子的表达。**方法** 体外培养大鼠骨髓基质干细胞(bone marrow stromal cell,BMSC),传代至第6代,进行神经诱导分化。先以bFGF(10 ng/ml)预诱导24 h,然后以胶质细胞源神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor,GDNF)10 ng/ml在胎肠培养基(fetal gut condition midium,FGCM)条件下诱导10 d。免疫荧光法检测神经元标志神经特异性烯醇化酶(NSE)和神经丝蛋白(NF)的表达。RT-PCR法检测神经营养因子GDNF和神经生长因子(nerve growth factor,NGF) mRNA的表达。**结果** 流式细胞检测BMSC高表达CD90(99.7%),而CD45表达阴性。诱导10 d后,部分细胞在形态上表现出神经元样改变,免疫荧光染色神经元标志NSE和NF阳性,而胶质细胞标志GFAP阴性。RT-PCR检测显示,BMSC诱导前低表达神经营养因子NGF和GDNF mRNA,而诱导后表达水平显著增加。**结论** GDNF不仅能在体外诱导BMSC分化为神经样细胞,而且能促进神经营养因子表达显著增加。

关键词: 胶质细胞源神经营养因子;神经生长因子;骨髓基质干细胞;细胞分化;大鼠
中图法分类号: R322.8; R329.21; R329.26 **文献标识码:** A

Neural differentiation and neurotrophic factors expression in rat bone marrow stromal cell

GAO Yuan-jun, QIAN Wei, WANG Bu-hai, LIN Rong, HOU Xiao-hua (Division of Gastroenterology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract: Objective To investigate the neural differentiation potential and expression change of neurotrophic factors-glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and nerve growth factor (NGF) in rat bone marrow stromal cells (BMSC). **Methods** BMSC were harvested from male SD rats and cultured in DMEM supplemented with 20% fetal bovine serum, and characterized by flow cytometry. At passage 6, BMSC were pre-induced by bFGF (10 ng/ml) for 24 h, then induced with GDNF (10 ng/ml) in fetal gut condition medium (FGCM) for 10 d. The expressions of neuronal markers NSE (neural specific enolase), NF (neurofilament), and glial cell marker GFAP (glial fibrillary acidic protein) were detected by fluorescent immunohistochemistry. The expressions of mRNA of GDNF and NGF were detected by RT-PCR. **Results** The cultured BMSCs were positive for CD90(99.7%) and negative for CD45 on flow cytometry. After 10-day induction, a certain number of cells adopted neuron-like morphological changes and expressed NSE and NF, but no GFAP by fluorescent immunohistochemistry. BMSC expressed low level NGF and GDNF mRNA, while after induction, the expressions of NGF and GDNF mRNA were highly increased. **Conclusion** GDNF can not only induce neural differentiation of BMSC, but also increase the expression of NGF and GDNF significantly.

Key words: glial cell line-derived neurotrophic factor; nerve growth factor; bone marrow stromal cell; differentiation; rat

骨髓基质干细胞(bone marrow stromal cell, BMSC)能在体外分化为多个系列细胞如骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肌肉细胞以及神经样细胞,而具有干细胞特点。BMSC在神经系统疾病细胞治疗的研究已经广泛开展,许多研究表明BMSC在体外或移植到损伤的脑或脊髓均可分化为神经元和胶质细胞[1-3],为BMSC在神经系统疾病的细胞治疗的应用带来了较好的前景。但目前的研究主要集中在细胞分化方面,而对神经再生和修复中起重要作用的神经营养因子在BMSC的表达研究较少。本实验探索了用胶质细胞源神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor,

作者简介:郜元军(1973-),男,湖北省十堰市人,博士,主治医师,主要从事干细胞和肠神经方面的研究,现在郧阳医学院附属太和医院消化内科,电话:(0719)6779891, E-mail:gyjjyn@yahoo.com.cn
通讯作者:侯晓华, E-mail: houxh@public.wh.hb.Cn
收稿日期:2005-11-22;修回日期:2006-01-15

GDNF)在胎肠培养基(fetal gut culture medium, FGCM)条件下诱导 BMSC 定向分化为神经元样细胞的可行性,以及诱导前后神经营养因子表达变化,以期从细胞分化和神经营养因子表达两方面为 BMSC 在神经系统疾病细胞治疗领域的应用提供进一步的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 雄性 SD 大鼠 6 只,体质量 120 ~ 150 g,购自华中科技大学同济医学院实验动物中心。

1.1.2 主要试剂和仪器 DMEM 培养基(Gibco/BRL),胎牛血清(Gibco/BRL),胰蛋白酶、胶原酶、bFGF、GDNF、小鼠抗大鼠 GFAP 抗体(Sigma),PE 结合的抗大鼠 CD90 单抗、FITC 结合的抗大鼠 CD45 单抗(eBioscience),小鼠抗大鼠 NSE 抗体、兔抗大鼠 NF 抗体(Chemicon),羊抗小鼠 IgG-Cy3 二抗、羊抗兔 IgG-Cy3 二抗(Molecelar Probes),倒置相差显微镜(IX70 Olympus),CO_2 培养箱(德国 Herseus)。

Taq DNA 聚合酶、MMLV 逆转录酶、Oligo(dT)$_{15}$、$MgCl_2$(25 mmol/L)购于美国 Promega 有限公司,Mix dNTP 购于 Sangon 公司,RNA 酶抑制剂购于华美生物工程公司,Tripure 购于 Roche 诊断有限公司,琼脂糖购于上海东海制药厂,DNA Marker DL2000 购于大连宝生物工程有限公司。GDNF 引物、NGF 引物和 β-actin 引物由上海 Invitrogen 公司合成。Eppendorf 低温离心机,GeneAmp PCR System2400PCR 扩增仪,上海培清科技有限公司的 JS-380 自动凝胶图像分析系统,北京沃德生物医学仪器公司的紫外透射反射仪,Pharmacia 电泳仪。

1.2 方法

1.2.1 胎肠培养基(FGCM)的制备 参考 Natarajan 等[4]的方法制备。取 E15 的 Sprague-Dawley 孕鼠 1 只,戊巴比妥(80 mg/100 g)麻醉后,无菌条件下取 8 ~ 10 条胎肠,以无 Ca^{2+}、Mg^{2+} 的 PBS 洗 2 次,然后在室温下在 1 mg/ml 胶原酶中孵育 15 min。胶原酶消化后的胎肠组织以 PBS 洗 2 次,吸管吹打,接种于培养瓶中在 DMEM 中培养。培养 3 d 后收集培养基,离心(84 × *g*, 5 min),取上清过滤(0.2 μm 滤器)后即获得 FGCM。FGCM 按1∶1比例稀释使用。

1.2.2 BMSC 的培养和鉴定 取 120 g SD 大鼠,断颈处死,无菌条件下取双侧股骨和胫骨,置于 0.01 mol/L 的 PBS 液中清洗表面软组织,剪去两端骨骺端显露骨髓腔,以 α-MEM 完全培养液(含 20% 胎牛血清,2 mmol/L L-谷氨酰胺,100 U/ml 青霉素,100 μg/ml 链霉素)冲洗骨髓腔,以 4 号针头打散细胞团块,200 目网筛过滤,所得细胞悬液以 4×10^6/ml 密度加入 25 ml 培养瓶中,于 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度条件下培养。24 h 后首次换液,去除未贴壁细胞。以后每隔 3 ~ 4 天换液 1 次,待贴壁细胞融合 90% 时以 0.25% 胰蛋白酶/1 mmol/L EDTA 消化、在 DMEM 中传代培养至第 6 代。

流式细胞方法检测培养细胞表面的骨髓基质细胞标志 CD90 和造血细胞标志 CD45。BMSC 以 0.25% 胰蛋白酶/1 mmol/L EDTA 消化,PBS 洗 2 次,离心后以 PBS 重悬(10^6/100μl)。细胞孵育在 PE 结合的抗大鼠 CD90 单抗(0.06 μg/ 10^6细胞)和 FITC 结合的抗大鼠 CD45 单抗(0.125 μg/10^6 细胞)中 30 min(置于冰盒中)。孵育后 PBS 洗 2 次,然后进行流式细胞分析。

1.2.3 BMSC 的诱导 第 6 代 BMSC 消化后按 2×10^5/ml 密度以相同细胞数接种至 12 孔培养板,培养 24 h 后吸去完全培养液,按以下 2 组每组 1 板进行诱导分化:1 GDNF 联合 FGCM 诱导组:用含 10 ng/ml bFGF 的 L-DMEM 完全培养液预诱导 24 h 以促分裂,然后用 0.01mol/L 的 PBS 液洗涤 3 次,每孔加入 10 ng/ml GDNF 及 FGCM/ DMEM(1∶1)培养液 1 ml 诱导 10 d。2 完全培养液对照组:方法同上,只是每孔加入不含任何诱导剂的 L-DMEM 完全培养液 1 ml。

1.2.4 神经标志的免疫荧光染色 诱导后细胞固定于 4 ℃ 的 4% 多聚甲醛中 30 min。PBS 洗涤 2 次,非免疫动物血清封闭,分别加入小鼠抗大鼠 NSE 抗体(1∶200)、兔抗大鼠 NF 抗体(1∶200)、小鼠抗大鼠 GFAP 抗体(1∶200) 4 ℃过夜。室温下复温 30 min,PBS 洗涤 3 次,分别加入荧光二抗羊抗小鼠 IgG-Cy3 二抗、羊抗兔 IgG-Cy3 二抗(1∶500)室温下孵育 6h。PBS 洗涤 3 次后,用倒置相差显微镜观察。

1.2.5 GDNF 和 NGF mRNA 表达检测

1.2.5.1 细胞总 mRNA 的提取 10^6细胞加 Tripure 0.5 ml 吸管吹打裂解细胞,4 ℃离心(12 000 × *g*, 10 min);取上清,加 0.1 ml 的氯仿,室温放置 15 min,4 ℃ 离心(12 000 × *g*, 15 min);取上清,加 0.25 ml 的异丙醇,4 ℃离心(12 000 × *g*, 10 min)。去上清,加 0.5 ml 75% 乙醇,4 ℃ 离心(75 000 × *g*, 5 min)。去上清,干燥后用 DEPC 处理 ddH_2O 40 μl 溶解。

1.2.5.2 RT 在 EP 管中加 ddH_2O 8 μl,mRNA 4 μl,500 μg/ml 的 Oligo(dT) 1 μl,石蜡油 10 μl,70 ℃ 6 min 解链;加 50 U/μl RNsin 0.5 μl,25 mmol/L dNTP 2μl,5 × 逆转录缓冲液 4 μl,200 U/μl 逆转录酶 0.5 μl,置 37 ℃ 60 min 逆转录,95 ℃ 5 min灭活转录酶。

1.2.5.3 PCR 引物设计 GDNF 和 NGF 引物参考 Garcia 等[5]的设计。GDNF:上游链 5′-gactctaagatgaagttatgggatgtc-3′,下游链 5′-gggtcagatacatccacacgtttagc-3′;NGF: 上游链 5′-tcaacaggactcacagg-3′, 下游链 5′-cgcggatccttatctcacagccttcctgctgag-3′; β-actin:上游链5′-agggaaatcgtgcgtgac -3′,下游链5′-acccaggaaggaaggct -3′。在 EP 管中加 ddH_2O 13 μl,10 × 缓冲液 2.5 μl,25 mmol/L $MgCl_2$ 1.5 μl,GDNF 或 NGF 上下游引物(75 pmol/μl)各 0.3 μl,β-actin 上下游引物(75 pmol/μl)各 0.3 μl,25 mmol/L dNTP 0.3 μl,cDNA 1 μl,石蜡油 8 μl,置 95 ℃ 6 min 后,再加 ddH_2O 5 μl 及 *Taq* 酶 0.5 μl(总反应体积 25 μl)。94 ℃变性 30 s,62 ℃(NGF 的退火温度为 50 ℃)退火 1 min,68 ℃ 延伸 2 min,扩增 35 个循环;最后于 68 ℃ 10 min。取 4 μl PCR 产物加 1 μl 的溴芬蓝电泳缓冲液电泳观察,并用 JS-380 凝胶图像分析系统计算 GDNF 和 NGF mRNA 及 β-actin mRNA 的积分光密度值。

1.3 统计学方法

将每个样本所测得的 GDNF 或 NGF mRNA 与 β-actin mRNA 的积分光密度值相比,计算出二者积分光密度比值(G/B 值和 N/B 值),结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计分析软件分析,两组间比较用 *t* 检验。

2 结果

2.1 大鼠 BMSC 的体外分离、培养及鉴定

在原代培养过程中,约 24 h 细胞出现贴壁生长,去除大量

悬浮细胞后可见贴壁细胞呈圆型，散在分布，增殖缓慢。第 2 次换液后细胞急剧增多，开始呈集落生长，并出现以梭形为主的多种形态，1 ~ 2 周后细胞可达 90% 融合。反复换液和传代培养去除非贴壁细胞，至第 5 ~ 6 代的 BMSC 形态基本单一——梭形或扁平形，增殖至细胞融合时，倒置相差显微镜下观察呈漩涡状排列（图 1）。



图 1　BMSC 培养至第 6 代时的形态特点　（倒置相差显微镜 ×100）

流式细胞方法检测显示，第 6 代 BMSC 高表达 BMSC 标志 CD90（99.7%），而不表达造血细胞标志 CD45，表明大鼠 BMSC 传代至第 6 代后基本纯化，去除了造血细胞的污染。

2.2　BMSC 的神经分化

分化至第 3 天即可见极少量细胞呈神经细胞样形态—细胞体变圆或锥形，立体感增强，倒置相差显微镜下可见光晕，细胞伸出明显突起，呈 2 ~ 3 极，少数多极。诱导 6 d 后，神经样细胞明显增加，第 9 ~ 10 天最多（图 2）。



图 2　GDNF 和胎肠培养基分化后 BMSC 的形态特点
（倒置相差显微镜 ×200）

神经标志检测进一步证实了神经细胞的分化：GDNF 和 FGCM 诱导分化组神经元标志 NSE（47.6 ± 7.5）% 和 NF（75.6 ± 8.4）% 阳性，而神经胶质细胞标志 GFAP 表达阴性（图 3）。DMEM 培养基对照组表达均阴性。

2.3　神经营养因子 GDNF 和 NGF 在诱导后的变化

电泳图上显示 648 bp GDNF 和 395 bp NGF 的 PCR 产物条带（图 4）。诱导组和对照组的 G/B 值 和 N/B 值见表 1，诱导组 NGF 和 GDNF mRNA 的表达水平显著高于对照组 $P < 0.05$（表 1）。

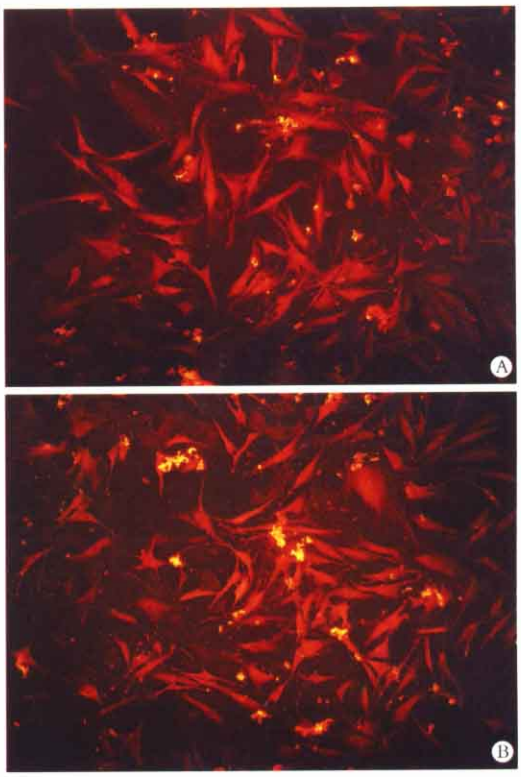
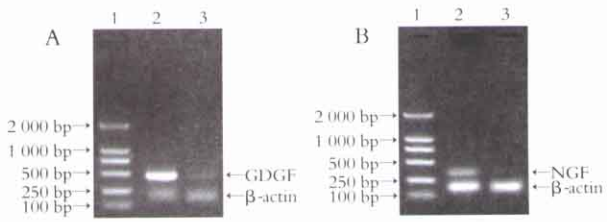


图 3　用 GDNF 和胎肠培养基分化后，部分 BMSC 神经元标志 NSE（A）和 NF（B）染色阳性　（免疫荧光 ×200）



A：GDNF；B：NGF
1：标准；2：诱导组；3：对照组

图 4　RT-PCR 产物电泳结果

表 1　GDNF 诱导对 GDNF 和 NGF mRNA 表达水平的影响

组别	GDNF（G/B）	NGF（N/B）
GDNF 诱导组	0.778 5 ± 0.030 8[a]	0.419 1 ± 0.024 8[a]
对照组	1.562 8 ± 0.018 4	0.647 4 ± 0.016 9

a：$P < 0.05$，与对照组比较

3　讨论

我们研究结果发现，BMSC 在体外易于分离培养、扩增、纯化，经 GDNF 和 FGCM 诱导分化，BMSC 可分化为神经样细胞并表达神经元标志 NSE 和 NF，不表达胶质细胞标志 GFAP，并且 BMSC 诱导后表达 NGF

和 GDNF 显著增加。

许多研究表明 BMSC 在体外一定条件下可分化为神经样细胞，移植于损伤脑或脊髓以可分化为神经细胞，提示 BMSC 治疗神经系统疾病有一定前景。GDNF 诱导 BMSC 分化的研究报道尚不多见。我们的分化比例比 Guo 等[6]高，可能与诱导分化条件不同有关。我们首次应用 GDNF 和胚胎肠组织培养液诱导 BMSC 分化为神经细胞成功，表明神经营养因子和局部环境对 BMSC 分化起重要作用。

BMSC 治疗神经系统疾病的研究目前主要集中在如何将 BMSC 分化为具有特定功能的神经细胞，而神经营养因子的作用也渐渐受到重视。一方面，神经营养因子可在一定培养条件下诱导 BMSC 向神经细胞分化[1]；另一方面，神经营养因子具有神经保护和促进神经突起生长的作用，缺乏神经营养因子的支持可能导致神经细胞的凋亡发生[7]，因此在神经再生修复中起重要作用。

我们发现 BMSC 在诱导后神经营养因子 NGF 和 GDNF 的信使 RNA 表达水平显著增加。GDNF 在中脑多巴胺能神经分化形成和神经嵴干细胞向肠神经元分化和迁移中起重要作用[8]，GDNF 突变的大鼠肠神经节发育障碍[4,9,10]。NGF 是第 1 个发现和研究最清楚的神经营养因子，它主要存在于神经嵴来源的神经支配的器官，对胃肠神经等外周神经具有重要的神经营养和促进神经突起生长的作用[11,12]。而 BMSC 在诱导后神经营养因子 NGF 和 GDNF 的表达水平的增加这可能在细胞移植后对损伤神经发挥神经保护作用，从而促进 BMSC 治疗神经病变的效果。

GDNF 如何诱导 BMSC 向神经细胞分化以及表达自身和 NGF 增加的机制尚不清楚。有研究表明 BMSC 表达 GDNF 受体 RET[13,14]，而 RET 信号通路在肠神经元的分化过程中起重要作用，因此改信号通路可能参与 GDNF 对 BMSC 诱导和促进神经营养因子的表达，这有待于进一步研究。此外，本实验联合应用了胎肠培养基（FGCM）作为诱导条件，FGCM 含有胚胎肠道分泌的与肠神经元前体细胞分化迁移密切相关的因子如 GDNF、内皮素 3（endothelin-3）、neurturin、神经营养因子 3（neurotrophin 3）、NGF 等以及细胞外介质如层粘蛋白等[4,15]，提供了神经分化的微环境，有助于 BMSC 的分化和神经营养因子的表达。

总之，GDNF 在 FGCM 培养条件下不仅可诱导 BMSC 向神经细胞分化，而且能促进神经营养因子的表达。本实验将 BMSC 的神经分化和神经营养因子的表达结合起来，从而有可能从分化细胞移植替代作用和神经营养因子的神经保护作用两方面发挥作用，为 BMSC 治疗神经病变提供了一定的理论基础。

参考文献：

[1] JIANG Y, JAHAGIRDAR B N, REINHARDT R L, *et al*. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. Nature, 2002, 418(6893): 41-49.

[2] RISMANCHI N, FLOYD C L, BERMAN R F, *et al*. Cell death and long-term maintenance of neuron-like state after differentiation of rat bone marrow stromal cells: a comparison of protocols[J]. Brain Res, 2003, 991(1-2): 46-55.

[3] 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]. Neuropathology, 2003, 23(3): 169-180.

[4] NATARAJAN D, MARCOS-GUTIERREZ C, PACHNIS V, *et al*. Requirement of signalling by receptor tyrosine kinase RET for the directed migration of enteric nervous system progenitor cells during mammalian embryogenesis[J]. Development, 2002, 129(22): 5151-5160.

[5] GARCIA R, AGUIAR J, ALBERTI E, *et al*. Bone marrow stromal cells produce nerve growth factor and glial cell line-derived neurotrophic factors[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 316(3):753-754.

[6] GUO L, YIN F, MENG H Q, *et al*. Differentiation of mesenchymal stem cells into dopaminergic neuron-like cells in vitro[J]. Biomed Environ Sci, 2005, 18(1): 36-42.

[7] SIEGEL G J, CHAUHAN N B. Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain[J]. Brain Res Brain Res Rev, 2000, 33(2-3): 199-227.

[8] LIN L F, ZHANG T J, COLLINS F, *et al*. Purification and initial characterization of rat B49 glial cell line-derived neurotrophic factor[J]. J Neurochem, 1994, 63(2): 758-768.

[9] PETERS R J, OSINSKI M A, HONGO J A, *et al*. GDNF is abundant in the adult rat gut[J]. J Auton Nerv Syst, 1998, 70(1-2): 115-122.

[10] YOUNG H M, HEARN C J, FARLIE P G, *et al*. GDNF is a chemoattractant for enteric neural cells[J]. Dev Biol, 2001, 229(2): 503-516.

[11] CORRENTE G, GUARDAVACCARO G D, TIRONE F. PC3 potentiates NGF-induced differentiation and protects neurons from apoptosis[J]. Neuroreport, 2002, 13(4): 417-422.

[12] LIN A, LOURENSSEN S, STANZEL R D, *et al*. Nerve growth factor sensitivity is broadly distributed among myenteric neurons of the rat colon[J]. J Comp Neurol, 2005, 490(2): 194-206.

[13] GATTEI V, CELETTI A, CERRATO A, *et al*. Expression of the RET receptor tyrosine kinase and GDNFR-alpha in normal and leukemic human hematopoietic cells and stromal cells of the bone marrow microenvironment[J]. Blood, 1997, 89(8): 2925-2937.

[14] 王永刚，张 勇，张 骐，等. 大鼠脊髓中神经生长因子受体 TrkA 的表达与分布[J]. 郑州大学学报：医学版, 2004, 39(3): 421-422.

[15] NEWGREEN D, YOUNG H M. Enteric nervous system: development and developmental disturbances-part 1[J]. Pediatr Dev Pathol, 2002, 5(3): 224-247.

（编辑 周 芳）