文章编号:1000-5404(2010)09-0879-04

论著

携带小鼠 *noggin* 基因的重组腺病毒载体对人骨髓间充质干细胞的神经样诱导作用

陶玉香[1],徐海伟[2],阴正勤[1] (400038 重庆,第三军医大学:西南医院全军眼科中心[1],基础医学部生理学教研室,重庆市神经科学研究所[2])

[摘要] **目的** 观察 *noggin* 基因能否单独将人骨髓间充质干细胞诱导为神经细胞以成为挽救神经退行性病变的"种子细胞"。**方法** 原代培养人骨髓间充质干细胞,分为对照组、空白载体转染的 Ad 组和含有 *noggin* 基因的腺病毒载体转染的 Ad-*noggin* 组,观察转染后 48 h、4、7、10 d 等时相点各组细胞的形态学变化并行统计学分析。**结果** 2 种载体皆可成功转染人骨髓间充质干细胞使其自发绿色荧光,但 Ad 组形态无显著变化,而 Ad-*noggin* 组细胞在转染后 48 h 即可见少量细胞分化为神经样细胞,转染后 4 d 可见神经样细胞数目增多且伸出少量神经细胞样突起,10 d 时分化的细胞明显增多。与转染后 7 d 相比,Ad-*noggin* 组转染 10 d 时胞体直经和树突直径明显增加($P<0.05$),但形态无改变。**结论** 单独以含 *noggin* 基因的腺病毒载体转染人骨髓间充质干细胞可以使其向神经样细胞分化。

[关键词] 间充质干细胞;*noggin*;分化;腺病毒
[中图法分类号] R322.8; R329.21; R394.2 **[文献标志码]** A

Noggin induces human bone marrow-derived mesenchymal stem cells to differentiate into neural cells

Tao Yuxiang[1], Xu Haiwei[2], Yin Zhengqin[1] ([1]Ophthalmology Research Center, Southwest Hospital, [2]Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To study whether *noggin* alone can induce human bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) to differentiate into neural cells for the treatment of neural degenerative diseases. **Methods** Human bone marrow MSCs were primarily cultured and then divided into control, Ad group of empty adenovirus vector and Ad-*noggin* group of adenovirus vector with *noggin* gene. Their morphological changes were observed with fluorescence microscopy and laser confocal microscopy, and the results of 48 h, 4, 7, 10 d were analyzed with statistical methods. **Results** Both the vector made human bone marrow MSCs carry green fluorescence. Ad group didn't show any morphological changes. While for Ad-*noggin* group, a few neural-like cells appeared in 48 h after transfection. The number of such cells was increased, and there were some neurites around the cells after 4 d. The cells amplified greatly after 10 d. Compared to those of 7 d after transfection, the soma and dendritic diameters of Ad-*noggin* group were significantly increased after 10 d ($P<0.05$), but there was no change in morphology. **Conclusion** Adenovirus vector with *noggin* gene alone induces human bone marrow MSCs to differentiate into neuron-like cells.

[Key words] mesenchymal stem cells; *noggin*; differentiate; adenovirus

Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China (973 Program, 2007CB512203). Correspond author: Yin Zhengqin, Tel: 86-23-68754401, E-mail: yinzq@mail.tmmu.com.cn

神经发生分子机制的突破性进展是发现了多种神经诱导因子,已初步确认胚胎期的神经发生与微环境中诱导神经组织或模式形成的内分泌因子的作用有关。其中 *noggin* 基因是胚胎期神经发生的重要调控分子,在原肠胚期参与了神经板与神经管的发生过程。noggin 主要是作为骨形态蛋白(bone morphological protein, BMP)中 BMP4/BMP2 的拮抗结合蛋白促进细胞向神经元分化[1]。体外对神经上皮的研究表明,BMP4 表达于神经上皮并通过激活 Smads (Smad1、Smad5、Smad8)与 Id3、Hes5 的启动子而强烈抑制神经上皮向神经元的分化,并促进神经上皮向星形胶质细胞的分化,noggin 能够有效拮抗这一效应促使神经上皮细胞向神经元分化[2]。此外,研究显示 noggin 与 BMP2/

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划,2007CB512203)
[通信作者] 阴正勤,电话:(023)68754401,E-mail: yinzq@mail.tmmu.com.cn

BMP4在生后及成年的中枢神经系统亦有表达,并对不同脑区神经干细胞增殖与分化有重要调控作用[3]。

人骨髓间充质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSCs)具有可自体供给、易分离培养等优点,有极大的应用潜力,而noggin蛋白具有类似神经诱导剂的作用。为此,本实验将已经构建*noggin*重组腺病毒载体pAdEasy-1-*noggin*[4]转染hMSCs,使其自发绿色荧光,观察是否能将其诱导为神经细胞而成为挽救神经退行性病变的"种子细胞"。

1 材料与方法

1.1 实验分组

从骨科手术取得的健康成人骨髓中分离培养出hMSCs至第3代,分为3组:空白对照组(control)、空白载体转染组(Ad)、含*noggin*基因载体转染组(Ad-*noggin*)。

1.2 主要试剂与仪器

胎牛血清(HyClone),DMEM/F12培养基(HyClone),离心机(5810R,Eppendorf,德国),二氧化碳培养箱,荧光光学显微镜、照相显微镜(日本Olympus公司)。

1.3 方法

1.3.1 人骨髓间充质干细胞的原代培养 人骨髓间充质干细胞的原代培养参照本院骨科的方法[5]。将骨科手术取得的健康成人骨髓与等量人淋巴细胞分离液混匀,以3 500 r/min离心30 min,吸取中间云雾状乳白色物质,PBS漂洗后,加入含15%胎牛血清的DMEM/F12培养基孵育,24 h后换液处理以除去未贴壁细胞,之后每3天换1次液,约1周后细胞长满90%予以传代。

1.3.2 空白腺病毒载体、pAdEasy-1-*noggin*腺病毒载体的扩增培养 293细胞至其在培养瓶中长满90%后,在其中滴加100 μl不同滴度的空白腺病毒载体或pAdEasy-1-*noggin*腺病毒载体,在培养箱中孵育,因2种载体皆携带绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)基因,故转染后的细胞皆可自发绿色荧光。直到100%细胞出现脱落,收集细胞及其培养液,经37 ℃和-4 ℃之间反复冻融后,离心收集上清备用。

1.3.3 hMSCs的诱导 以0.05%的胰酶将细胞消化成细胞悬液,然后种植于已铺有经0.01%明胶处理过的载玻片的24孔板中。对照组继续以含15%胎牛血清的DMEM/F12培养基培养,Ad组和Ad-*noggin*组分别以不带*noggin*基因的空白载体和携带*noggin*基因的pAdEasy-1-*noggin*转染hMSCs,于转染后8 h和24 h换液,在荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下观察并照相。

1.4 统计学分析

实验数据以$\bar{x} \pm s$表示,各组数据采用SPSS 12.0软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 hMSCs的原代培养

原代培养刚分离接种时培养瓶中有大量呈圆形的悬浮细胞,大小不一,数目较多,胞体折光性强。24 h后可观察到少量细胞贴壁,贴壁的细胞较悬浮的圆形细胞大,多为圆形、椭圆形,有少数伸出突起的细胞。48~72 h后可以观察到贴壁的细胞大部分呈纤维状,也有少量的为宽阔、平坦的三角状、星状等,且形成小集落。在原代培养约72 h时予以换液,未贴壁的细胞在换液过程中被除去。接种约12 d,可见明显的集落形成,待铺满90%瓶底予以传代培养。第3代细胞已基本纯化,生长状态良好,因此本实验所用均为第3代细胞(图1)。

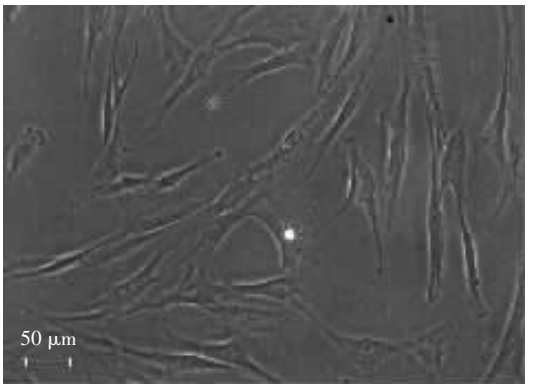
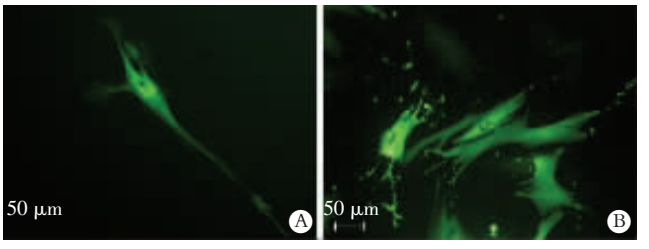


图1 倒置显微镜观察原代培养第3代的hMSCs

2.2 腺病毒载体转染hMSCs

我们分别以MOI为1、10、20、50的病毒液转染hMSCs,发现以上MOI皆可以使细胞发出绿色荧光且荧光在细胞培养过程中并无衰减。经过5次转染重复实验后发现,以不同滴度的病毒液转染hMSCs后3 d部分细胞即可自发绿色荧光(图2)。随着病毒滴度的增加、转染时间的延长,自发绿色荧光的细胞逐渐增多,在转染后10 d达高峰稳定。



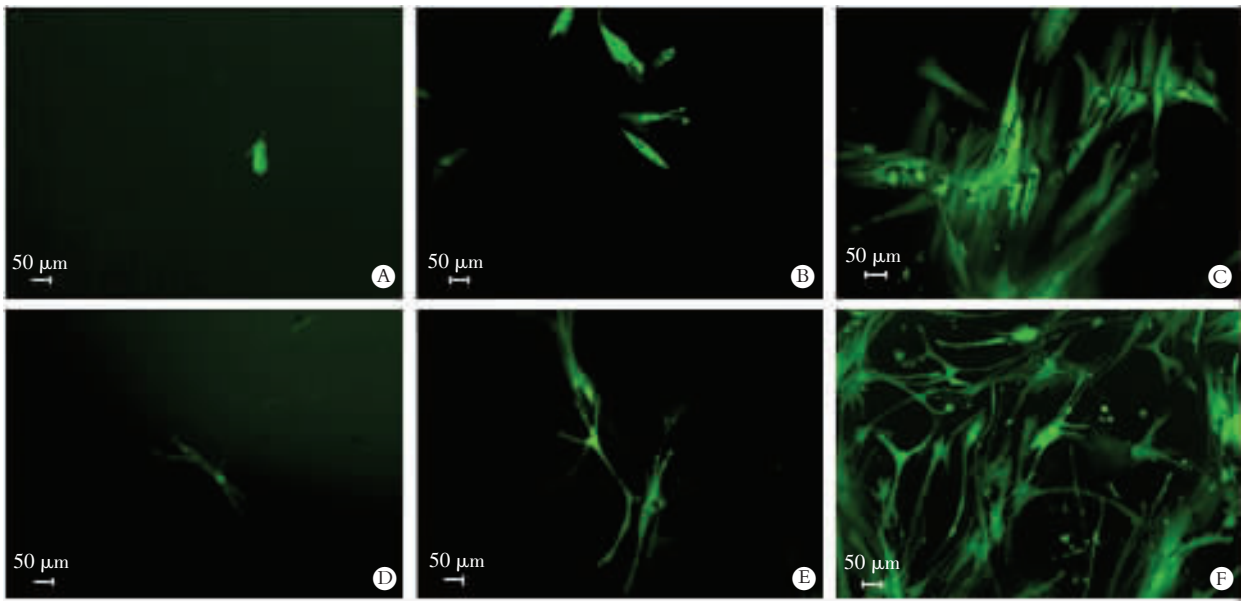
A:MOI为1;B:MOI为50

图2 荧光显微镜观察腺病毒载体转染3 d后hMSCs

2.3 经*noggin*转染hMSCs的形态学改变

对照组hMSCs继续培养10 d后形态较为均一,较10 d前稍变扁平、肥大,但无明显变化。Ad组细胞在转染的过程中形态无明显变化,均类似于同期的对照组细胞,所以腺病毒载体本身并不能改变细胞形态。而Ad-*noggin*组细胞在转染后48 h即可见少量细胞分化为神经样细胞,转染后4 d可见神经样细胞数目增多且伸出少量神经细胞样突起,10 d时分化的细胞明显增多(图3)。

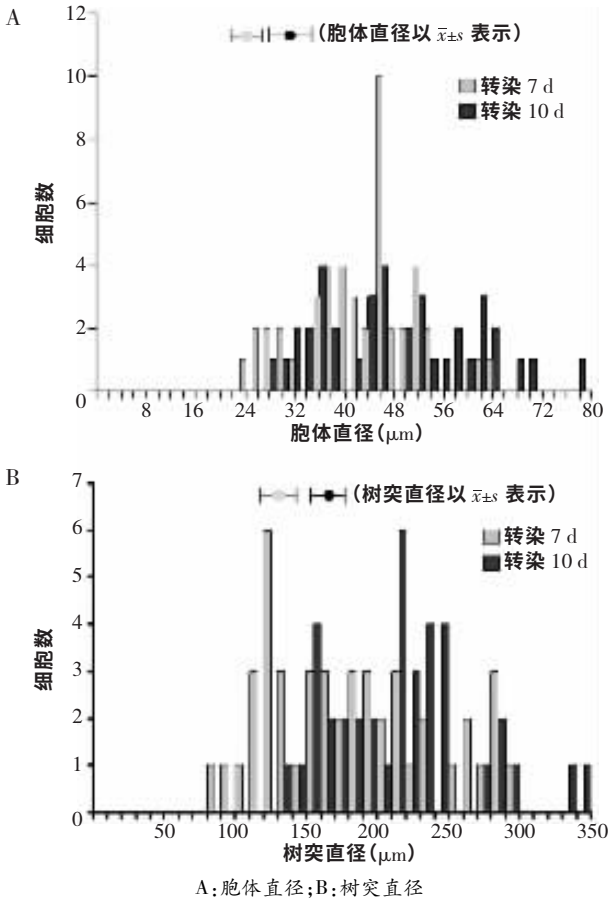
在*noggin*基因转染诱导下,hMSCs发生了逐渐而显著的形态学变化,此变化与在体神经细胞的发育极为类似。转染4 d时,细胞突起较少,形态相对比较简单;然而到第5~6天时,许多细胞的突起数目都有所增加且形态类似于树突发育的初始阶段;到第7天时,许多细胞都有了发育良好的突起,尽管数目并不是很多,此时难以严格区分树突和轴突,然而细胞的大体形态表明生成的突起主要是树突。部分细胞的突起此时继续增多,10 d时已经有了相对复杂的突起在胞体周围。



A～C:Ad 组细胞转染 48 h、4、10 d;D～F:Ad-*noggin* 组细胞转染 48 h、4、10 d

图 3　Ad 组和 Ad-*noggin* 组转染不同时间 hMSCs 形态学观察　（荧光显微镜）

我们对转染后 7、10 d 胞体和树突长度的增加进行了量化（图 4），结果表明至第 10 天时，胞体直径和树突直径较 7 d 时明显增加（$P<0.05$）。然而，胞体和突起的比例却没有明显变化（$P>0.05$），说明细胞形态并未改变。



A:胞体直径;B:树突直径

图 4　Ad-*noggin* 组细胞在转染 7 d 和 10 d 时胞体和树突的直径

3　讨论

我们的实验表明将 *noggin* 基因插入人骨髓间充质干细胞能明显诱导间充质干细胞发生神经细胞所特有的形态学变化。神经细胞样突起的出现表明在 *noggin* 基因的作用下，培养的细胞以典型的神经细胞的方式生长且在培养 10 d 时，已表现出一定的成熟度。

当以 MOI 为 20 的病毒液感染培养的 MSCs 时，细胞的活性等生物学特性无明显改变[6]，当以超过 100 的 MOI 感染细胞时，细胞的活性显著受损[7]。Gordon 等[6]以 20 的 MOI 作为腺病毒感染滴度时发现，感染后 7 d 约 45% 的细胞是 GFP 阳性细胞，且细胞传代 6 代后自发荧光仍然可以保持。我们运用 50 的 MOI 后发现约 70% 的细胞呈 GFP 阳性且细胞无病理反应。GFP-*noggin* 复合体的运用以及 GFP 阳性细胞的出现表明 *noggin* 可以在细胞培养过程中持续表达。

以前的有关剂量反应分析表明如果在胚胎发育过程中要完全避免囊胚结构形成，那么所运用的 *noggin* 浓度应该是在 100～700 ng/ml[8,9]。我们的实验中 hMSCs 并未形成囊胚及神经球结构说明外胚层和中胚层基因受抑[9]。我们的实验中所用 MOI 为 50，已足够抑制囊胚形成和内胚层分化，同时又可以诱导 hMSCs 向神经细胞分化。

hMSCs 并非均质细胞群，它可能包含多种亚细胞群，分别有不同的增生能力和分化潜能[10]。我们没有尝试形成 hMSCs 的亚克隆，所以根据诱导条件的不同

和传代次数的不同,诱导的结果也会有所不同。有时对于细胞发生神经细胞样的结构变化人们会认为有其他原因,比如细胞皱缩、细胞骨架蛋白受损,从而导致培养细胞的高死亡率[11]。另外,神经细胞标记物的表达可能位于细胞的非正常部位,不能以分子技术确定。我们的实验中细胞类型的多样性以及其持久活性说明细胞毒性作用所导致的细胞形态变化不是本实验中细胞形态变化的原因。

诱导10 d的细胞有不同的成熟度,这可以从细胞突起的不同看出,故我们以Ad-*noggin*组细胞的荧光照片为原型、利用photoshop软件原样描记出细胞形态[12,13]的这种多样性,来说明体外培养的细胞正经历在体神经细胞发育同样的过程。以前有关视网膜和大脑的研究表明神经细胞发育经历3个典型步骤:无突起简单生长,突起增多,最后生成大量的突起[14]。神经细胞发育过程中的成熟度似乎与突起的特征紧密相关,另外即使是在诸如中央丘脑区细胞高度同源的核团,细胞体积和突起的数目亦多种多样。因此,*noggin*诱导后的hMSCs呈现出多种成熟程度,这符合一般规律。*noggin*诱导hMSCs后约10 d时,细胞呈现出相对成熟的形态。在体实验表明,尽管有多样性,突起增多阶段一般持续15~30 d,这与我们在细胞培养中观察到的形态的成熟度及生理参数一致。人们发现在小鼠的MSCs中加入神经诱导剂后72 h内,70%~80%的细胞发生了形态的巨变,从扁平的间充质细胞变为有圆形胞体和神经突起的细胞,而第3代的细胞在培养4~5周后具有了相同的成熟度。这些差异有可能是细胞的代数和*noggin*诱导的结果。

*noggin*转染后的细胞亦有未形成突起的,这些细胞看上去很像相对成熟的丧失树突棘的GABA能的丘脑细胞。树突棘的生长和丧失有多种机制[15],人们并不清楚这样的细胞在细胞接触方面是否仍然同其他神经细胞一样有复杂的机制,是否仍然有神经递质来促使棘突生成或诱导发育过程中棘突的变迁。以上结果说明在缺乏外部刺激分子和细胞接触的情况下,这些细胞启动了内在的树突生长方式并具有了一种非典型的神经细胞类型。还有学者认为神经细胞的终末分化需要胶质细胞分泌的特定的因子,然而我们的实验证明单独以*noggin*即可诱导向神经细胞方向高度发育成熟。本研究中通过*noggin*转染hMSCs可以使其向神经样细胞分化,具有临床应用前景,其内在机制仍有待进一步研究。

参考文献:

[1] 范晓棠,蔡文琴,徐海伟,等. Noggin基因对成年大鼠海马神经前体细胞增殖的影响[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(15): 1311-1314.

[2] Anitha M, Shahnavaz N, Qayed E, *et al*. BMP2 promotes differentiation of nitrergic and catecholaminergic enteric neurons through a Smad1-dependent pathway[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010, 298(3): G375-G383.

[3] Valenzuela D M, Economides A N, Rojas E, *et al*. Identification of mammalian noggin and its expression in the adult nervous system[J]. J Neurosci, 1995, 15(9): 6077-6084.

[4] 余资江, 应大君, 董世武, 等. 小鼠noggin基因的重组腺病毒构建与鉴定[J]. 解剖学杂志, 2006, 29(1): 51-54.

[5] Dai F, Shi D, He W, *et al*. hCTLA4-gene modified human bone marrow-derived mesenchymal stem cells as allogeneic seed cells in bone tissue engineering[J]. Tissue Eng, 2006, 12(9): 2583-2590.

[6] Gordon D, Glover C P, Merrison A M, *et al*. Enhanced green fluorescent protein-expressing human mesenchymal stem cells retain neural marker expression[J]. J Neuroimmunol, 2008, 193(1-2): 59-67.

[7] Lin Y, Liu L, Li Z, *et al*. Pluripotency potential of human adipose-derived stem cells marked with exogenous green fluorescent protein[J]. Mol Cell Biochem, 2006, 291(1-2): 1-10.

[8] Itsykson P, Ilouz N, Turetsky T, *et al*. Derivation of neural precursors from human embryonic stem cells in the presence of noggin[J]. Mol Cell Neurosci, 2005, 30(1): 24-36.

[9] Gerrard L, Rodgers L, Cui W. Differentiation of human embryonic stem cells to neural lineages in adherent culture by blocking bone morphogenetic protein signaling[J]. Stem Cells, 2005, 23(9): 1234-1241.

[10] Jiang Y, Henderson D, Blackstad M, *et al*. Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(Suppl 1): 11854-11860.

[11] Lu P, Blesch A, Tuszynski M H. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact?[J]. J Neurosci Res, 2004, 77(2): 174-191.

[12] Fitzgibbon T. Do first order and higher order regions of the thalamic reticular nucleus have different developmental timetables?[J]. Exp Neurol, 2007, 204(1): 339-354.

[13] Masih E, Kang Y S, Fitzgibbon T. A study of tree pruning bares food for thought: kitten LGNd development[J]. Proceedings Aus Neurosci Soc, 2004, 15(1): 88-94.

[14] Yamasaki E N, Ramoa A S. Dendritic remodelling of retinal ganglion cells during development of the rat[J]. J Comp Neurol, 1993, 329(2): 277-289.

[15] 陈秀, 吴万福, 胡长林, 等. 成年大鼠缺氧性脑损伤后亚临床痫性发作及海马苔藓纤维出芽[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(1): 49-52.

(**收稿**:2010-03-09;**修回**:2010-03-29)

(编辑 张 维)