文章编号:1000-5404(2012)11-1067-04

论著

脂肪源性神经干细胞诱导分化为γ-氨基丁酸能神经元的体外研究

任红苗,王宜南,陈继川,张世昌 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所耳鼻咽喉-头颈外科)

[摘要] **目的** 探讨诱导脂肪源性神经干细胞(neural stem cells, NSCs)分化为GABA能神经元的体外培养方法,为细胞移植修复神经系统损伤提供种子细胞。**方法** 贴壁培养C57BL/6小鼠(附睾脂肪垫)脂肪来源的干细胞(adipose-derived stem cells,ADSCs),流式细胞仪进行表型鉴定(CD45、CD90、CD105)及标志物纤连蛋白(fibronectin)鉴定后,在碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、2% B27的Neurobasal培养基中诱导成NSCs。用免疫荧光细胞染色法进行NSC特异性标记物Nestin、增殖能力BrdU检测,再次添加脑源性神经营养因子、骨形成蛋白2后,维甲酸(RA)诱导分化为γ-氨基丁酸能神经元,并进行其标志物GABA的检测。**结果** 分离纯化的ADSCs CD90、CD105表达强阳性,CD45表达阴性;诱导后的干细胞球经Nestin及BrdU鉴定为NSCs,且具有较强的增殖能力;神经干细胞诱导分化后的神经元GABA抗体染色呈阳性。**结论** 在特定神经营养因子作用下,ADSCs在体外诱导生成的NSCs可被诱导分化为GABA能神经元。

[关键词] 脂肪来源干细胞;神经干细胞;γ-氨基丁酸能神经元
[中图法分类号] R322.8; R329-33; R329.24 [文献标志码] A

Differentiation of adipose-derived neural stem cells into GABAergic neurons *in vitro*

Ren Hongmiao, Wang Yinan, Chen Jichuan, Zhang Shichang (Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To provide the seed cells for the repair of nervous system after cell transplantation by studying how to induce the differentiation of adipose-derived neural stem cells (NSCs) into GABAergic neurons *in vitro*. **Methods** ADSCs, isolated from the epididymal fat pads in C57BL/6 mouse, were adherently cultured. After cell surface antigens (CD45, CD90 and CD105) and ADSCs marker (fibronectin) were identified by flow cytometry, NSCs were induced from neurobasal medium containing basic fibroblast growth factor (bFGF), epidermal growth factor (EGF) and 2% B27. Nestin, a specific marker of NSC, and its self-proliferation ability (BrdU) were detected with immunofluorescence staining. Differentiation of ADNSC into GABAergic neurons was induced with retinoic acid (RA) by adding neurotrophic factor and bone-formation protein 2. Marker of GABAergic neurons was then detected. **Results** The CD90, CD105 and fibronectin were positively expressed while the CD45 was negatively expressed in isolated and purified ADSCs. The stem cells, identified as NSCs with nestin and BrdU, showed a potential of self-proliferation ability. The antibody to GABAergic neurons was positively stained. **Conclusion** ADSCs-derived NSCs *in vitro* can differentiate into GABAergic neurons under the action of specific nerve growth factors.

[**Key words**] adipose derived stem cell; neural stem cell; γ-aminobutyric acid neurons

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BA5015). Corresponding author: Wang Yinan, E-mail: yinanwang.95@hotmail.com; Chen Jichuan, E-mail: chenjcmd@sina.com

GABA能神经元存在于中枢神经系统内,释放抑制性神经递质GABA,在调节中枢神经系统细胞间的电生理活动以及认知活动方面有十分重要的作用。近年来研究[1]表明GABA能神经元的丢失是导致老年性聋等神经退行性疾病的重要原因之一。因此,GABA能神经元的培养及其移植治疗为中枢神经系统退行性疾病的治疗带来了新的曙光。

脂肪来源的干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)有可能作为GABA能神经元的来源细胞。近

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2009BA5015)
[通信作者] 王宜南,E-mail:yinanwang.95@hotmail.com
陈继川,E-mail:chenjcmd@sina.com

期研究表明干细胞在体外可以跨系甚至跨胚层分化为某些成熟的细胞。Nagase 等[2]、Xu 等[3]将分离培养 ADSCs 成功诱导成为神经干细胞球。Xu 等[4]使用经典化学诱导法诱导神经干细胞分化为成熟的 GABA 能神经元。陈锦华等[5]、龙乾发等[6]研究发现 BMP2 等可以促进室管膜前下区神经干细胞向 GABA 能神经元方向分化。

细胞移植治疗后的微环境对移植细胞的生存及分化方向有相当重要的作用。前期研究[7]将脂肪来源的干细胞进行移植治疗,虽可降低移植后的免疫排斥反应,但移植细胞在体内分化方向的可控性不高,导致治疗特异性较低。众所周知,免疫排斥反应是现今移植治疗的瓶颈,有学者将胚胎神经干细胞分化为成熟的 GABA 能神经元进行移植治疗,虽在一定程度上提高了移植治疗的特异性,但仍然不能降低免疫排斥反应。为此本研究拟将 ADSCs 来源干细胞逐步诱导分化为 GABA 能神经元,既可提高移植治疗的特异性,又能在一定程度上降低移植治疗带来的免疫排斥问题,为 ADSCs 及其来源的 GABA 能神经元移植治疗中枢神经系统退行性疾病提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

C57BL/6 小鼠(体质量 15 ~ 16 g)由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。脂肪来源干细胞取自 C57BL/6 小鼠睾丸两侧脂肪垫。DMEM/F12(1∶1)培养基、胎牛血清(FBS)、Ⅰ型胶原酶、Neurobasal 培养基、碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、脑源性神经因子(brain derived neurotrophic factor,BDNF)、胰岛素(Insulin)、B27 添加剂均购自美国 Gibco 公司。青霉素、链霉素购自 HyClone 公司。CD45、CD90、CD105 抗体购自 BD 公司。骨形成蛋白(bone-formation protein 2, BMP2)购自 Roche 公司。小鼠来源 Fibronectin 抗体、兔来源巢蛋白(Nestin)抗体、5′-溴尿嘧啶核苷(5-bromodeoxyuridine,BrdU)、小鼠来源 5′-溴尿嘧啶(BrdU)抗体、小鼠来源 β 微管蛋白(microtubulinβprotein,β-tublin Ⅲ)抗体、兔来源胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein,GFAP)抗体、兔来源 γ-氨基丁酸(2-aminobutyric acid, GABA)抗体、多聚全反式视黄酸(RA)、4′,6-二脒基-苯基吲哚(4′6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride,DAPI)、多聚赖氨酸等均购自美国 Sigma 公司。各荧光标记二抗购自北京中杉金桥公司。

1.2 实验方法

1.2.1 ADSCs 制备和培养 取 C57BL/6 小鼠颈部离断法处死后,严格无菌条件下切开皮肤,分离附睾尾部的脂肪垫悬浮于 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)中剪碎。0.15% 胶原酶 37 ℃ 震荡消化 30 min,10% FBS 终止消化。1 000 r/min 离心 10 min,弃上清。用 5 ml 含有 10% FBS 的 DMEM/F12(含青霉素 100 U/ml + 链霉素 100 mg/L)培养基重悬,200 目筛网过滤。调整细胞密度为 1×10^4/ml 接种于接种到 25 cm^2 的培养瓶中,置于 37 ℃、5% CO_2、95% 湿度孵箱中贴壁培养。48 h 后首次换液,以后每 2 ~ 3 天换液 1 次,7 ~ 9 d 后细胞长满皿底即用 0.25% 胰酶消化后按 1∶2进行传代。

1.2.2 ADSCs 的表型鉴定 采用流式细胞仪,直接免疫荧光法检测细胞的免疫表型。传至第 3 代 ADSCs 经 0.25% 胰酶消化 3 ~ 5 min,1 000 r/min 离心 10 min 后用 0.01 mol/L PBS 冲洗 2 次后再次离心,弃上清,均加冷 PBA(PBS + 2% BSA),各管细胞中分别加入 CD90-FITC、CD45-FITC、CD105-PE 抗体,避光孵育 15 ~ 20 min。PBS 洗 2 次,弃掉上清,加 PBS 重悬后上机检测。

1.2.3 ADSCs 诱导为 NSCs 传至第 3 代的 ADSCs 弃上清后,0.25% 胰酶消化 3 ~ 5 min 后离心、去上清。加入 Neurobasal 培养基吹打至悬浮状态后将其以 1×10^4/L 种植于 6 孔板,滴加 bFGF(20 ng/ml)、EGF(20 ng/ml)、Insulin (100 μg/ml)、2% B27。每 3 天添加新鲜培养液,每周换液 1 次,神经球每 7 ~ 8 天传代 1 次。

1.2.4 NSCs 诱导分化为 GABA 能神经元 取传至第 3 代的 NSCs 种植入 6 孔培养板,分别加入 10 ng/ml 的 BMP2 细胞因子、10 ng/ml BDNF、5 μmol/L 的 RA, 5% FBS 贴壁培养,2 ~ 3 d 半量换液,7 ~ 8 d 后可见成熟的分化细胞。

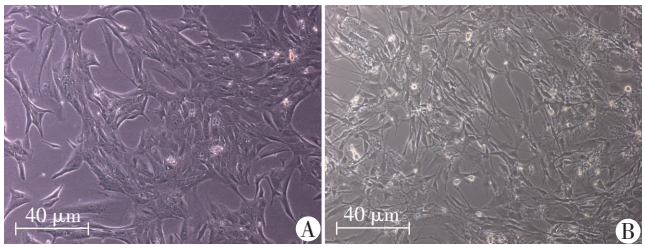
1.2.5 ADSCs、NSCs、GABA 能神经元免疫荧光鉴定 第 3 次传代细胞 ADSCs、NSCs 及 GABA 能神经元进行细胞表型鉴定。ADSCs、GABA 能神经元及预先处理的 NSCs(NSCs 及与 BrdU 共培养 24 h 的 NSCs 接种到预先铺有多聚赖氨酸的盖片上)弃上清。PBS 洗 2 次后 4% 多聚甲醛固定 30 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min,室温晾干(BrdU 鉴定的 NSCs 需 2 nmol/L HCl 室温作用 30 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min)。0.3% Triton X-100 浸泡 30 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min。10% 山羊血清(稀释于 PBS)室温封闭 20 min,倾去山羊血清封闭液勿洗。ADSCs 中滴加一抗小鼠来源 Fibronectin 抗体(Sigma 公司);NSCs 中滴加 1∶800 兔来源巢蛋白(Nestin)抗体(Sigma 公司)和 1∶1 000 小鼠来源 5′-溴尿嘧啶(BrdU)抗体(Sigma 公司)。诱导分化细胞中滴加 1∶400 兔来源胶质纤维酸性蛋白(GFAP)抗体(Sigma 公司)、1∶800 小鼠来源 β 微管蛋白(β-tublin Ⅲ)抗体(Sigma 公司)、兔来源 γ-氨基丁酸(GABA)抗体(Sigma 公司)。4 ℃冰箱过夜。37 ℃ 复温 60 min PBS 洗 3 次,每次 5 min。滴加二抗 1∶100 荧光染料 FITC 标记山羊抗小鼠 IgG 抗体(中杉金桥公司)和二抗 1∶100 罗丹明标记山羊抗兔 IgG 抗体(中杉金桥公司)、1∶100 荧光染料 FITC 标记山羊抗兔 IgG 抗体(中杉金桥公司)、1∶100 罗丹明标记山羊抗小鼠 IgG 抗体。PBS 稀释后室温下避光孵育 60 min。PBS 洗 3 次,每次 5 min DAPI(4′-6-Diamidino-2-phenylindoledihydrochloride,4′,6-二脒基-苯基吲哚;Sigma 公司)染核 20 min,封片,激光共聚焦显微镜(LeicaTCS SP2,德国)下观察。

2 结果

2.1 ADSCs 培养

倒置相差显微镜下原代 ADSCs 24 h 后可见贴壁生长,细

胞形态不一,大多数呈短梭型,有少数呈三角形或扁平状的细胞,折光性较好,5 ~7 d 后可见大量长梭型细胞(图 1)。

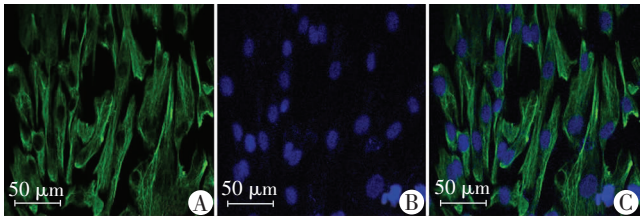


A:ADSCs 培养 3 d;B:ADSCs 培养 7 d

图 1 原代脂肪来源干细胞倒置相差显微镜观察

2.2 ADSCs 鉴定

流式细胞仪鉴定显示 ADSCs 表面分子 CD90、CD105 呈阳性表达,CD45 呈阴性表达(CD105:95.22%, CD45:0.34%, CD90: 99.48%)。Fibronectin 抗体鉴定阳性(图 2),提示其为 ADSCs。



A:ADSCs 的 Fibronectin 抗体色阳性;B:ADSCs DAPI 标记细胞核;C:图 A 与图 B 的合成图

图 2 ADSCs 免疫荧光鉴定结果

2.3 NSCs 及增殖能力

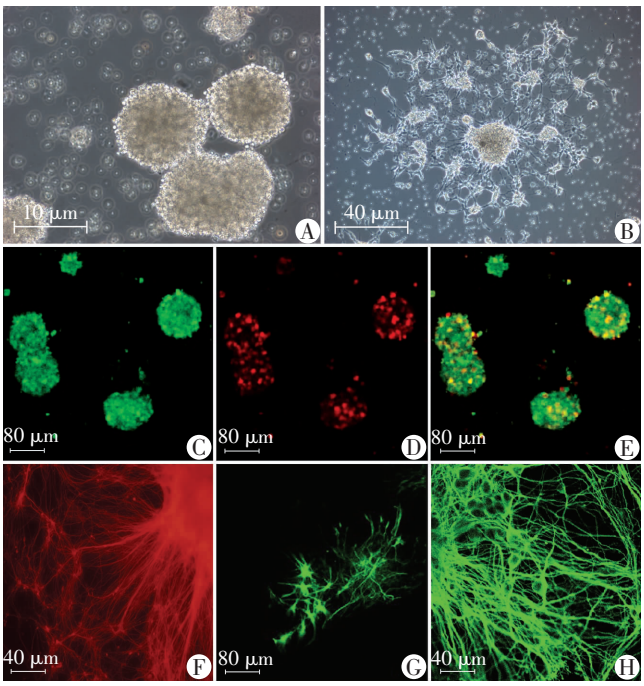
诱导 ADSC 形成的 NSCs 大小、数量不等,形态规则,细胞排列紧密,球体生长较快,折光性好(图 3A)。培养的细胞球中可见大量细胞 BrdU 免疫荧光染色阳性(图 3C),表明神经干细胞具有自我复制的增殖能力。免疫荧光显示该细胞 Nestin 染色阳性(图 3D、E),提示其具有神经干细胞特性。

2.4 GABA 能神经元的诱导分化及鉴定情况

诱导分化的神经干细胞在 2 ~3 d 后,部分神经干细胞球开始贴壁,数小时后伸出少量较短的突起,24 h 后大部分细胞球贴壁生长,突起长度及数量不断增加,并交织成网状,7 ~8 d 后神经元生长较成熟(图 3B)即可进行 β-tublin Ⅲ、GFAP、GABA 鉴定。免疫荧光结果表明几乎所有贴壁分化细胞均呈现 β-tublin Ⅲ和 GABA 强阳性细胞(图 3F ~ H),进一步证实了诱导成的 NSCs 在体外分化为 GABA 能神经元。而 GFAP 阳性细胞(图 3G)极少,即分化成的细胞只有极个别细胞为胶质细胞。

3 讨论

ADSCs 作为细胞治疗与组织工程的种子细胞由于其来源丰富、取材及体外扩增容易、低免疫原性且具有免疫调节功能[8]、可避免胚胎干细胞等应用产生的伦理问题及严重移植物排斥反应[9],显示出在组织工程及基因治疗中的良好应用前景[10]。ADSCs 具有较



A:由 ADSCs 诱导而来的 NSCs;B:NSCs 贴壁分化细胞;C:NSCs BrdU 抗体染色阳性(绿色);D:NSCs Nestin 抗体染色阳性(红色);E:图 C、D 的合成图;F:ADSCs 来源的 NSCs 诱导分化后 β-tublin Ⅲ抗体染色阳性(红色);G:ADSCs 来源的 NSCs 诱导分化后 GFAP 抗体染色阳性(绿色)GABA 能神经元 GABA 抗体染色阳性(绿色);H:ADSCs 来源的 NSCs 诱导分化后 GABA 抗体染色阳性(绿色)

图 3 NSCs 及 GABA 能神经元鉴定结果

强的自我更新能力和多向分化潜能。本研究中分离培养的 ADSCs 增殖速度较快, 且 Fibronectin 表达阳性证实了 ADSCs 及其相应的生物学特性. 为此 ADSCs 能否作为 NSCs 甚至是 GABA 能神经元的来源细胞成为该领域的热点。

以往的 GABA 神经元移植治疗因 GABA 能神经元引起的神经退行性疾病大部分是来源于中枢神经系统内分离培养的 NSCs,其在移植部位存活并分化为 GABA 能神经元,而此种方法不仅移植特异性低(神经干细胞在局部微环境中可分化为多种神经元)而且免疫排斥反应大甚至来源有限。为此,许多学者研究将 ADSCs 作为 NSCs 的来源以期尽量减少上述问题的发生。ADSCs 因其低免疫原性且具有免疫调节特性而作为细胞移植治疗的种子细胞具有远大的发展前景。Kang 等[11]在研究中发现 ADSCs 可诱导为 NSCs。有研究将分离培养 ADSCs 成功诱导成为神经干细胞球[2-3,12]。Xu 等[4]使用经典化学诱导法诱导神经干细胞分化为成熟的 GABA 能神经元。有学者研究指出 ADSCs 来源的神经球具有周围神经系统的特征[2]。在本实验中,ADSCs 来源的神经干细胞在特定化学诱导剂的作用下诱导分化的 GABA 能神经元不仅能降低以往细胞移植治疗中的免疫排斥反应,在一定程度

上增加移植细胞的存活率及存活时间,而且直接以GABA能神经元移植治疗也提高了移植细胞分化的可控性,从而使细胞移植的特异性大大提高。因此,ADSCs来源的神经干细胞诱导分化的GABA能神经元为今后进行低免疫排斥反应的移植治疗提供了可靠且广泛的细胞来源。

BDNF和BMP2在NSCs向GABA能神经元诱导分化中起主要作用。BDNF是神经营养因子家族成员,最早由Leibrock等[13]从猪脑中分离并克隆了BDNF相应的cDNA。Rage等[14]进一步指出BDNF对GABA能神经元的营养作用,支持神经板起源的感觉神经元的存活与生长。BMP2是骨形成蛋白家族中的成员,Sailer等[15]研究中发现:1~10 ng/ml浓度的BMP2在孕16 d大鼠大脑皮层发育中呈浓度依赖性分离细胞,BMP2可快速促进体外分离培养的新皮层神经前体细胞向神经元的分化。有研究[5,16]已成功应用BMP2等将NSCs诱导分化为GABA能神经元。本实验中将ADSCs高效率的诱导为NSCs后在BDNF及BMP2等因子的作用下将NSCs诱导分化为GABA能神经元并通过对神经元、胶质细胞、GABA能神经元特异性标志抗原的免疫荧光鉴定发现ADSCs来源的神经干细胞诱导贴壁分化后几乎全部分化成GABA能神经元,只有极少的胶质细胞形成。与原代培养的神经干细胞贴壁分化细胞[17]相比,本研究分化形成的神经元胞体呈圆形或卵圆形,轴突细长。偶尔可见到胞体呈圆形或椭圆形,并带有数个叫粗短的突起。同时分化形成的神经元的轴突和胞体相互交织成网状以参与神经网络的形成。体外培养的ADSCs来源的神经干细胞通过上述的方法诱导后,贴壁分化形成的细胞类型中,几乎所有的细胞均为γ-氨基丁酸能神经元,极少观察到星形胶质细胞,这可能是微环境中的细胞因子可能通过培养细胞中内在的、固有的分化调控因子决定了来源干细胞的体外分化潜能和分化模式。

随着细胞生物学、免疫学和分子生物学的飞速发展,ADSCs的研究也会更加深入,促进、支持ADSCs生长分化的各种生物因子,模拟体内微环境的细胞外基质将ADSCs向GABA神经元诱导分化,而GABA能神经元的凋亡及退行性病变是老年性皮层聋的主要发病机制,就预示着如果能模拟中枢神经系统中听皮层的微环境,移植细胞有可能朝着听皮层的GABA能神经细胞分化,从而为治疗老年性聋等神经退行性疾病带来新的希望。

参考文献:

[1] Hughes L F, Turner J G, Parrish J L, *et al*. Processing of broadband stimuli across A1 layers in young and aged rats[J]. Hear Res, 2010, 264(1/2): 79-85.

[2] Nagase T, Matsumoto D, Nagase M, *et al*. Neurospheres from human adipose tissue transplanted into cultured mouse embryos can contribute to craniofacial morphogenesis: a preliminary report[J]. J Craniofac Surg, 2007, 18(1): 49-53.

[3] Xu Y, Liu Z, Liu L, *et al*. Neurospheres from rat adipose-derived stem cells could be induced into functional Schwann cell-like cells *in vitro*[J]. BMC Neurosci, 2008, 9: 21-31.

[4] Xu R, Jiang X, Guo Z, *et al*. Functional analysis of neuron-like cells differentiated from neural stem cells derived from bone marrow stroma cells *in vitro*[J]. Cell Mol Neurobiol, 2008, 28(4): 545-558.

[5] 陈锦华, 杨辉, 尹昌林, 等. BMP2在SVZa神经干细胞向GABA能神经元分化中的调控作用[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(8): 699-701.

[6] 龙乾发, 刘卫平. bHLH和Hox基因对GABA能神经元诱导分化研究进展[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2010, 9(6): 564-566.

[7] Lopatina T, Kalinina N, Karagyaur M, *et al*. Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves: BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth *de novo*[J]. PLoS One, 2011, 6(3): e17899.

[8] Kuo Y R, Chen C C, Goto S, *et al*. Modulation of immune response and T-cell regulation by donor adipose-derived stem cells in a rodent hind-limb allotransplant model[J]. Plast Reconstr Surg, 2011, 128(6): 661e-672e.

[9] Philips B J, Marra K G, Rubin J P. Adipose stem cell-based soft tissue regeneration[J]. Expert Opin Biol Ther, 2012, 12(2): 155-163.

[10] Yang C, Li D, Wen Z, *et al*. Transplanted adipose-derived stem cells delay D-galactose-induced aging in rats[J]. Neural Regen Res, 2011, 6(34): 2673-2680.

[11] Kang S K, Putnam L A, Ylostalo J, *et al*. Neurogenesis of Rhesus adipose stromal cells[J]. J Cell Sci, 2004, 117(Pt 18): 4289-4299.

[12] Adams A M, Arruda E M, Larkin L M. Use of adipose-derived stem cells to fabricate scaffoldless tissue-engineered neural conduits *in vitro*[J]. Neuroscience, 2012, 201: 349-356.

[13] Leibrock J, Lottspeich F, Hohn A, *et al*. Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor[J]. Nature, 1989, 341(6238): 149-152.

[14] Rage F, Riteau B, Alonso G, *et al*. Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 enhance somatostatin gene expression through a likely direct effect on hypothalamic somatostatin neurons[J]. Endocrinology, 1999, 140(2): 909-916.

[15] Sailer M H, Hazel T G, Panchision D M, *et al*. BMP2 and FGF2 cooperate to induce neural-crest-like fates from fetal and adult CNS stem cells[J]. J Cell Sci, 2005, 118(Pt 24): 5849-5860.

[16] 杨忠旭, 历俊华, 万虹, 等. 神经干细胞向γ-氨基丁酸能神经元的诱导分化[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2010, 9(4): 295-298.

[17] 任红苗, 王宜南, 陈继川, 等. 胚胎小鼠听皮层区域神经干细胞的分离培养及鉴定[J]. 中华耳科学杂志, 2011, 9(4): 433-437.

(**收稿**:2012-03-05;**修回**:2012-03-27)

(编辑 张 维)