论著

文章编号:1000-5404(2013)08-0744-06

间充质祖细胞源性的神经元样细胞肌内移植后自身特性的维持

赵文勇[1],万立华[1],粟永萍[2],冉新泽[2] (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院法医学教研室[1];400038 重庆,第三军医大学军事预防医学院全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室[2])

[摘要] **目的** 探讨间充质祖细胞(mesenchymal progenitor cells,MPCs)源性的神经元样细胞肌内移植后能否维持其自身特性。**方法** 取3周龄健康GFP转基因C57小鼠后肢长骨进行MPC培养及鉴定,选取生长良好的第3代MPC,采用神经元原代培养上清液进行神经元样细胞诱导分化后收集细胞,并制备成5×10^5/μL细胞悬液备用。选取12周龄健康C57小鼠24只,按随机数字表法分为损伤+移植细胞组、损伤+生理盐水组、假手术+移植细胞组、假手术+生理盐水组。损伤+移植细胞组及假手术+移植细胞组:将制备的5 μL MPC悬液散点注入小鼠三头肌内;损伤+生理盐水组和假手术+生理盐水组:同法注入等量生理盐水。术后4周取材,荧光显微镜下观察肌内移植细胞存活情况,电镜观察肌肉超微结构的变化,免疫荧光染色检测神经元特异性标志物NSE、NeuN及神经胶质特异性标志物GFAP的表达情况。**结果** 肌内移植细胞生长良好且均匀分布于肌细胞间隙,并抑制了肌细胞核、线粒体、内质网的退变及肌肉纤维化的发生。损伤+移植细胞组定植存活的移植细胞阳性表达:NSE(58.35±1.37)%、NeuN(60.22±0.16)%及GFAP(13.32±1.65)%,损伤+生理盐水组、假手术+移植细胞组、假手术+生理盐水组均无阳性细胞表达。**结论** MPC具有良好的生物学活性,经体外诱导分化为神经元及神经胶质样细胞后移植于失神经支配肌内可定植存活,并能够维持神经元及神经胶质样细胞的特性,同时有效抑制了肌细胞核、线粒体、内质网的退变及肌肉纤维化的发生。

[关键词] 周围神经;间充质祖细胞;神经元样细胞;神经胶质样细胞
[中图法分类号] R322.74;R322.81;R329.28 [文献标志码] A

Characteristic maintenance of mesenchymal progenitor cells-derived neuron-like cells after being transplanted into muscle

Zhao Wenyong[1], Wan Lihua[1], Su Yongping[2], Ran Xinze[2] ([1]Department of Forensic Medicine, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the characteristic maintenance of mesenchymal progenitor cells (MPCs)-derived neuron-like cells after being transplanted into denervated muscle. **Methods** MPCs were separated from bones of hind limbs of GFP transgenic C57 mice mechanically, and were cultured and induced to differentiate *in vitro*. After being induced directionally by the supernatants from primary culture of neuron, MPCs at passage3 in good growth were collected and prepared into cell suspension (5×10^5/μL). Twenty-four 12-week-old C57 mice were randomized into four groups ($n=6$). In the injury + transplantation and the sham operation + transplantation groups, 5 μL of MPCs suspension was injected by points into triceps muscle of mice. In the injury + sodium chloride and the sham operation + sodium chloride group, 5 μL of sodium chloride was injected by points into triceps muscle of mice. At 4 weeks after operation, the survival of the transplanted MPC cells were observed by fluorescent microscopy, the ultrastructure was observed by electron microscopy, and the expression of neuronal specific markers of neuron-specific enolase (NSE) and neuronal nuclei protein (NeuN) and neuroglial specific marker of glial fibrillary acidic protein (GFAP) were detected by immunofluorescence staining. **Results** The transplanted cells grew well and distributed uniformly in the gap of muscle cells. The degeneration of myocyte nucleus, mitochondria and sarcoplasmic reticulum and the musculus fibration were inhibited. NSE [(58.35±1.37)%], NeuN [(60.22±0.16)%] and GFAP [(13.32±1.65)%] were positively expressed in the transplanted cells of the injury + transplantation group rather than

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划,2012CB518100)
[通信作者] 万立华,电话:(023)68485994,E-mail: ccsw@cqmu.edu.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130115.1727.010.html(2013-01-15)

in those of other groups. **Conclusion** MPCs have good biological activity. Neuron-like cells and neuroglia-like cells differentiated from MPCs *in vitro* can maintain their characteristics and inhibit the degeneration of myocyte nucleus, mitochondria and sarcoplasmic reticulum and musculus fibration after being transplanted into the denervated muscle.

[**Key words**] peripheral nerves; mesenchymal progenitor cells; neuron-like cells; neuroglia-like cells

Supported by the National Basic Research and Development Program of China (973 Program, 2012CB518100). Corresponding author: Wan Lihua, Tel: 86-23-68485994, E-mail: ccsw@cqmu.edu.cn

骨骼肌的失神经性萎缩是周围神经领域至今尚未解决的难题。如何延缓肌肉失神经萎缩是目前周围神经创伤与修复领域亟待解决的基础课题,也是提高创伤临床治疗水平的一个重要方向。研究表明:神经干细胞直接移植于受损的神经内或直接注射于肌肉内,移植细胞可长期存活,且部分分化为神经元及神经胶质细胞,并有效延缓了失神经性肌肉的萎缩[1-3],然而足量的神经干细胞获得途径有限且扩增困难,寻找新的移植细胞至关重要[4-5]。新近研究发现,间充质祖细胞(mesenchymal progenitor cells,MPCs)具有可塑性及易获取、易生长、增殖能力强等特点,并能体外诱导分化为神经元样细胞[5-7],有望成为神经干细胞的替代种子细胞[6]。既然MPC体外诱导可以分化为神经元样细胞,那么将这些神经元样细胞直接移植于肌肉内能否定植存活并维持神经元的特性呢?本研究培养GFP转基因C57小鼠密质骨碎片来源的间充质祖细胞,体外定向诱导分化为神经元样细胞后进行失神经支配肌内移植,探讨肌内移植细胞能否维持神经元样细胞的特性,以期为进一步分析肌内移植防治失神经肌肉萎缩提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)转基因C57小鼠6只,雌性,清洁级,3周龄,体质量(10±2)g;健康C57小鼠24只,雄性,清洁级,12周龄,体质量(20±1)g;均由第三军医大学实验动物中心提供。实验过程中善待实验动物,饲养及取材均遵守实验动物管理和保护的有关规定[8]。

1.2 主要试剂

DMEM/F12培养基(美国HyClone公司),胎牛血清、Ⅱ型胶原蛋白酶(美国Gibco公司),胰蛋白酶(美国DIFCO公司),兔抗鼠CD29、CD31、CD44、CD45、CD90、CD106抗体(美国BD公司),兔抗鼠NF、NSE(neurone specific enolase)、NeuN(neuronal nuclei protein)、GFAP(glial fibrillary acidic protein)抗体及羊抗兔荧光二抗(北京博奥森生物技术有限公司)。

1.3 MPC的体外诱导分化及鉴定

1.3.1 MPC的分离培养及鉴定[7] 断颈处死小鼠后,75%酒精浸泡20 min,分离股骨、胫骨,用PBS液反复冲洗骨髓腔后将其剪成约1 mm^3的小碎片,用含10%胎牛血清、1 mg/mL Ⅱ型胶原酶的DMEM/F-12培养基混悬,放入恒温摇床于37 ℃、200 r/min振荡2 h后,用培养液洗涤骨碎片3次,置入6孔板,加入含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素及链霉素的DMEM/F12培养液,最后放入37 ℃、5% CO_2的培养箱内进行培养。48 h后首次换液,以后每隔2~3天换液1次。当原代细胞贴壁达到孔板底面积80%~90%时吸出培养液,用含0.04% EDTA的0.25%胰蛋白酶消化、收集细胞,按1∶2比例进行传代培养。培养至第3代(P_3)时进行MPC纯度鉴定:分别加入FITC标记的兔抗鼠CD29、CD31、CD44、CD90和PE标记的CD45、CD106,于室温避光孵育30 min,PBS冲洗3次,用50 μL PBS重悬细胞,流式细胞术检测。

1.3.2 MPCs成骨及成脂分化[8-10] MPCs向骨细胞定向诱导分化:选取生长好、纯度高的第3代(P_3)MPCs以$5\times10^3/cm^2$传代入底部铺有8 mm×8 mm载玻片(作为细胞爬片)的6孔板,用原培养液培养至细胞贴壁超过50%,加入成骨诱导液(100 mL培养液+0.306 g β-磷酸甘油钠+20 μL维生素C+1 μL地塞米松)或成脂诱导液(100 mL培养液+10.328 mL地塞米松+0.65 mL胰岛素)进行诱导分化,镜下观察细胞贴壁超过80%时进行成骨或成脂分化检验。对照组不加诱导液培养。

1.3.3 成神经元样细胞诱导液的制作[11] 取小鼠大脑,剥去脑膜,将大脑皮质剪成小块,置0.125%胰酶中,于37 ℃消化30 min后,加入含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基终止消化,用培养基洗涤3次,再用吸管轻轻吹打成细胞悬液,以$1\times10^3/cm^2$接种于6孔板,最后置入37 ℃、5% CO_2的培养箱内进行培养。24 h后换液,继续培养3 d后收集培养上清液,免疫荧光检测神经元特异性标志物NSE和NF的表达(细胞质染成棕色)。

1.3.4 MPCs体外诱导分化为神经元样细胞的鉴定 实验组选取生长良好、纯度高的P_3代MPCs以$5\times10^3/cm^2$接种于放有8 mm×8 mm载玻片的6孔板,培养至细胞融合超过50%时,加入诱导液诱导24 h,取细胞爬片对诱导后的MPCs进行神经元及神经胶质特异性标志物免疫荧光染色鉴定,以细胞质(NSE、GFAP)或细胞核(NeuN)染为红色者为阳性细胞。对照组不加诱导液培养。免疫荧光检测:荧光检测标本用含10%羊血清的PBS室温封闭30 min,不洗,加入一抗(NSE、NeuN和GFAP,1∶100稀释),4 ℃过夜,PBS洗涤3次,再加入含荧光标记的二抗(1∶100稀释),置于37 ℃培养箱内孵育1 h,取出后充分洗涤,在荧光显微镜下观察。

1.4 MPCs成神经元样细胞诱导后体内定植存活及其特性的鉴定

1.4.1 周围神经损伤动物模型的建立[12] C57小鼠共24只,按随机数字表法分为损伤+移植细胞组、损伤+生理盐

水组、假手术+移植细胞组、假手术+生理盐水组，每组6只小鼠。采用1%戊巴比妥钠40 mg/kg腹腔注射麻醉后在无菌条件下手术：右后肢背侧部纵向切口，于股二头肌与股外侧肌之间钝性分离，游离坐骨神经，切除距梨状肌下缘2 mm以下长约5 mm的坐骨神经，远近两端反折缝合固定，建立小鼠三头肌失神经支配模型；假手术组仅分离坐骨神经但不做切断处理。

1.4.2 体内移植[13] 选取生长良好的第3代MPCs，采用神经元原代培养上清液进行神经元样细胞诱导分化后收集细胞，生理盐水调整为5×10^5/μL细胞悬液备用。损伤+移植细胞组及假手术+移植细胞组：应用微量注射器吸取MPCs悬液5 μL，散点注射入三头肌肉内。损伤+生理盐水组及假手术+生理盐水组：同法注入等量生理盐水。移植前后进行台盼蓝染色、活性细胞计数，确保细胞移植前活细胞数大于90%。

1.4.3 取材与鉴定 细胞移植后4周，断颈处死小鼠并取右侧三头肌做连续冰冻10 μm切片，4%多聚甲醛室温固定30 min，PBS洗涤3次，抗原修复液修复15 min，PBS洗涤3次，用含10%羊血清的PBS室温封闭30 min，不洗，加入一抗（NSE、NeuN、GFAP，1∶100稀释），4 ℃过夜；PBS洗涤3次，再加入含荧光标记的二抗（1∶100稀释），置于37 ℃培养箱内孵育1 h，取出后充分洗涤，加DAPI标记细胞核，室温避光作用2 h，PBS洗涤3次，抗荧光淬灭封片剂封片，荧光显微镜下观察，以细胞质（NSE、GFAP）或细胞核（NeuN）发出红光者为阳性细胞。

1.4.4 超微结构的观察 于小鼠右后肢腓肠肌中份切取少量组织，2.5%戊二醛固定，再经1%锇酸后固定，梯度乙醇脱水，618环氧树脂包埋，超薄切片。经醋酸铀和枸橼酸铅双染色后JEM-1200EX透射电镜观察退变的肌细胞核、内移的肌细胞核、线粒体、内质网、肌丝肌节的形态及肌纤维间隙胶原纤维。

1.5 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 10.0统计软件进行单因素方差分析。

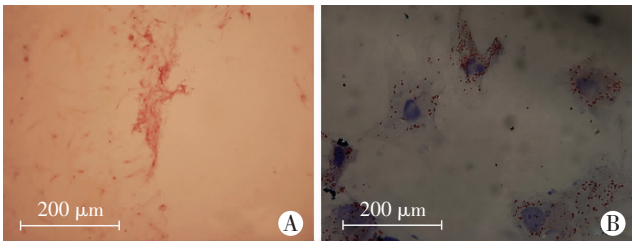
2 结果

2.1 MPCs的免疫表型鉴定

流式细胞术检测显示：CD29、CD44和CD90细胞阳性表达率分别为（94.61±4.51）%、（86.29±1.23）%、（85.71±4.30）%，与FITC同型对照组（0.49±0.07）%比较，差异有统计学意义（$P<0.05$）；CD106细胞阳性表达率为（83.10±4.23）%，与PE同型对照组（0.22±0.05）%比较，差异有统计学意义（$P<0.05$）；然而，CD31和CD45细胞阳性表达率分别为（1.22±0.44）%、（0.19±0.13）%。提示我们通过小鼠密质骨碎片培养获得的MPCs生长良好、纯度高且消除了造血干细胞的污染。

2.2 MPCs成骨及成脂分化的鉴定

MPCs经成骨定向诱导及茜素红染色后可见细胞外基质中有钙盐沉积，提示培养的MPCs能够向骨细胞方向进行分化，对照组无此变化；MPCs经成脂定向诱导后变为椭圆形、三角形，经油红O染色后可见细胞中的圆形脂滴被染成点状红色，提示培养的MPCs能够向脂肪细胞方向进行分化，对照组无此变化（图1）。

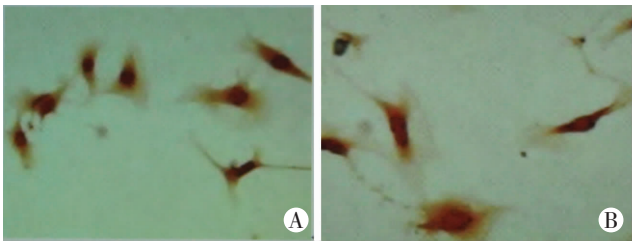


A：MPCs成骨分化（茜素红染色）；B：MPCs成脂分化（油红O染色）

图1 MPCs成骨及成脂分化鉴定

2.3 神经元原代培养上清液的鉴定

将小鼠大脑皮层细胞进行培养，24 h时大部分细胞已贴壁生长，细胞胞体呈圆形或长杆状，细胞核大而圆，可见有细小突起从细胞体长出；3 d后，细胞突起明显变长。免疫细胞化学检测见有神经元特异性标志物NF和NSE表达（细胞质染成棕色）。结合细胞形态可证明培养的细胞为神经元（图2）。



A：NSE表达阳性；B：NF表达阳性

图2 免疫荧光检测神经元原代培养第3天NSE和NF的表达（×400）

2.4 MPCs体外成神经元样细胞分化的鉴定

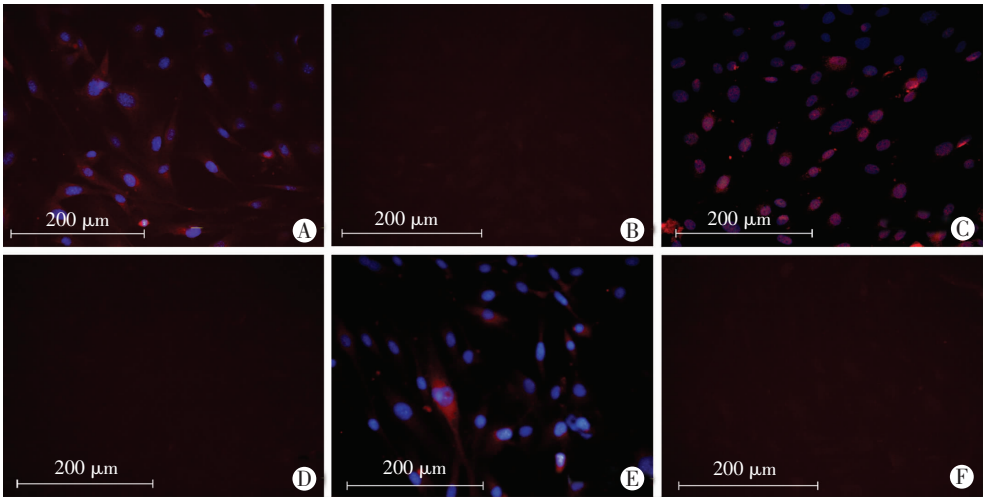
MPCs经神经元原代培养上清液诱导24 h后，阳性表达NSE、NeuN、GFAP的细胞数分别为（88.56±0.55）%、（89.12±0.41）%、（12.62±1.37）%；对照组免疫荧光染色检测未见确切阳性表达细胞（图3）。表明MPCs经体外定向诱导后具备神经元某些特性。

2.5 MPCs成神经元样细胞诱导后体内定植存活及其特性的鉴定

荧光显微镜下观察：损伤+移植细胞组及假手术+移植细胞组三头肌内可见发绿色荧光的移植细胞均匀分布于肌纤维间隙，损伤+生理盐水组及假手术+生理盐水组肌内未见发绿色荧光的细胞；损伤+移植细胞组部分移植细胞伸出轴突样的突起且互相连接，其余各组无此现象。免疫荧光检测：损伤+移植细胞组中阳性表达NSE、NeuN、GFAP的移植细胞数分别为（58.35±1.37）%、（60.22±0.16）%、（13.32±1.65）%，其余各组均无NSE、NeuN、GFAP阳性表达细胞（图4）。表明MPCs经体外诱导后失神经支配肌内移植可定植存活，且能够保持移植前神经元及神经胶质样细胞的特性。

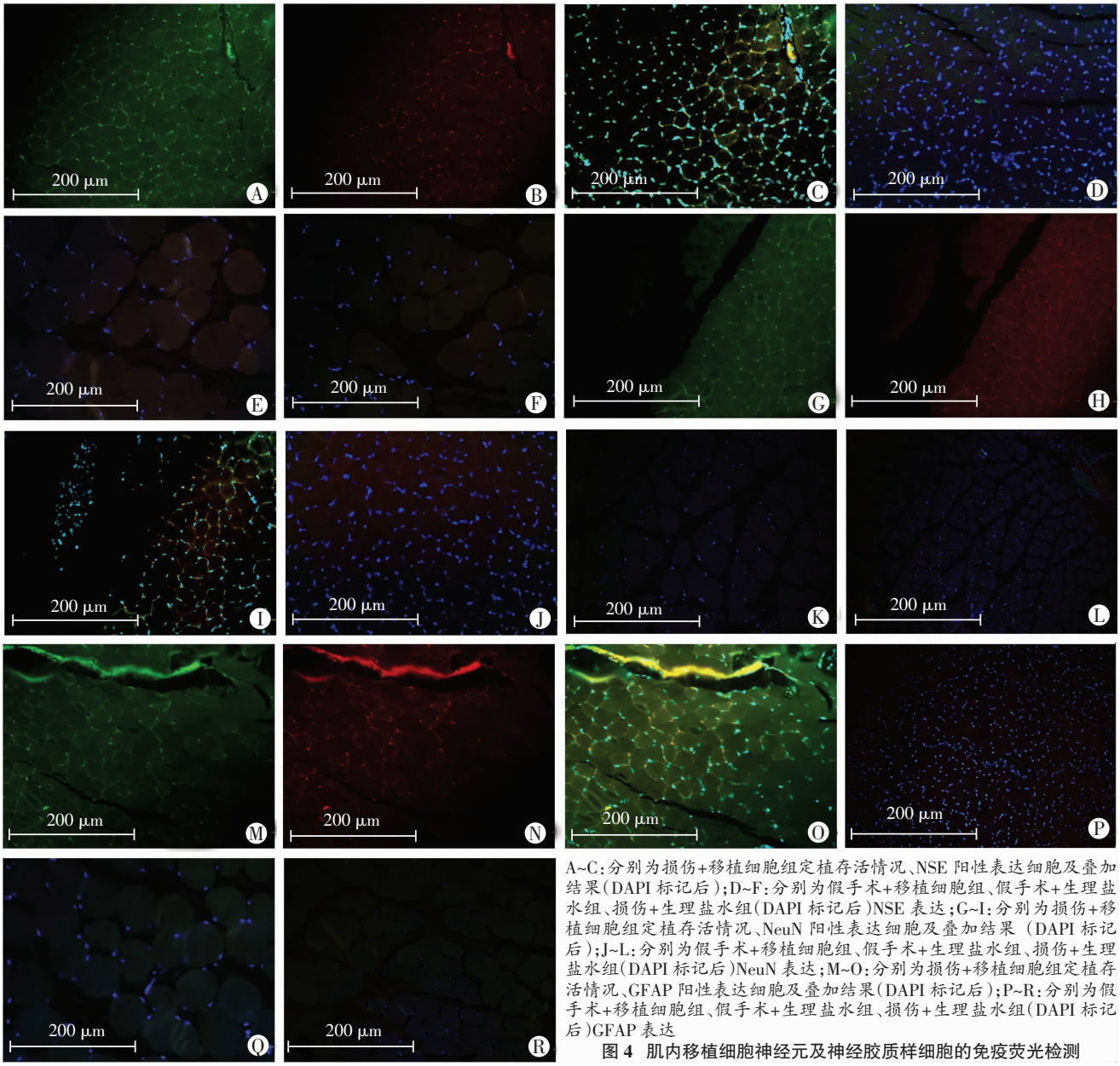
2.6 移植后肌肉超微结构变化

术后4周，与损伤+生理盐水组比较，损伤+移植细胞组肌细胞核增大，核质染色均匀，异染色质发达，线粒体数量增多，肿胀不明显，线粒体脊较多，形状相对正常，内质网扩张少，肌丝肌节排列整齐，无明显的融合，肌纤维间隙胶原纤维量少（图5）。



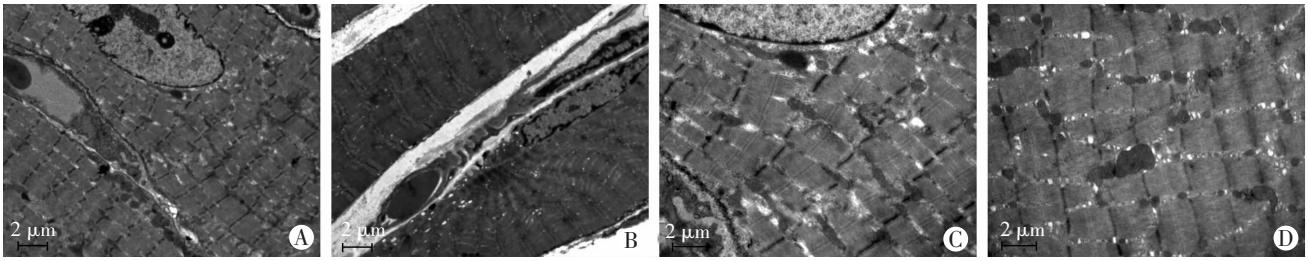
A:NSE 表达阳性;B:NSE 阴性对照;C:NeuN 表达阳性;D:NeuN 阴性对照;E:GFAP 表达阳性;F:GFAP 阴性对照

图 3　MPCs 体外诱导分化为神经元及神经胶质样细胞的免疫荧光检测



A~C:分别为损伤+移植细胞组定植存活情况、NSE 阳性表达细胞及叠加结果(DAPI 标记后);D~F:分别为假手术+移植细胞组、假手术+生理盐水组、损伤+生理盐水组(DAPI 标记后)NSE 表达;G~I:分别为损伤+移植细胞组定植存活情况、NeuN 阳性表达细胞及叠加结果 (DAPI 标记后);J~L:分别为假手术+移植细胞组、假手术+生理盐水组、损伤+生理盐水组(DAPI 标记后)NeuN 表达;M~O:分别为损伤+移植细胞组定植存活情况、GFAP 阳性表达细胞及叠加结果(DAPI 标记后);P~R:分别为假手术+移植细胞组、假手术+生理盐水组、损伤+生理盐水组(DAPI 标记后)GFAP 表达

图 4　肌内移植细胞神经元及神经胶质样细胞的免疫荧光检测



A:损伤+移植细胞组;B:损伤+生理盐水组;C:假手术+移植细胞组;D:假手术+生理盐水组

图5 透射电镜观察术后4周各组小鼠右后肢三头肌超微结构变化

3 讨论

神经干细胞移植于受损的神经内或注射于靶肌肉中,部分细胞可分化为神经元及神经胶质样细胞,并可有效延缓失神经性肌肉的萎缩,但神经干细胞获得途径有限且扩增困难,寻找新的移植细胞至关重要。尽管骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)具有多向分化潜能、来源广泛、取材方便、危险性低、无免疫排斥反应及体外可定向分化为神经元样细胞[13-17]等特点,但体外培养小鼠MPCs时却极易受到造血干细胞的污染而使增殖效果不理想[18],其用来肌内移植治疗失神经性骨骼肌萎缩难免受到造血干细胞的干扰。近年研究发现,MPCs同样具有BMSCs的特点,由于其来源于密质骨,体外培养时可避免造血干细胞的污染,不失为神经干细胞的可选种子细胞[19]。如果将MPCs体外定向诱导分化为神经元及神经胶质样细胞后直接移植于失神经支配肌肉中,是否能够定植存活并维持移植前的细胞特性、抑制肌纤维化的发生呢?

我们采用密质骨碎片培养法体外培养小鼠MPCs,稳定传代3次后,能够定向诱导分化为骨细胞及脂肪细胞,流式细胞仪免疫表型分析鉴定表明:传代后的MPCs不表达造血细胞标记CD31和CD45,表达间质细胞标记CD29、CD44、CD90和CD106,提示我们培养的MPCs具有多向分化潜能且增殖能力趋于稳定、纯度高,并消除了造血干细胞对后期实验的影响。经神经元原代培养上清液体外诱导3 d后,MPCs可阳性表达神经元特异性标志物NSE、NeuN和GFAP。该结果与我们前期研究的结果相似[7],表明大部分MPCs已分化为神经元样细胞,少量MPCs分化为神经胶质样细胞,符合我们后期实验的要求。将MPCs体外诱导分化获得的神经元及神经胶质样细胞直接移植于小鼠三头肌内,免疫荧光检测示损伤+移植细胞组肌内移植细胞可定植存活并均匀分布于肌细胞间隙,部分移植细胞阳性表达神经元特异性标志物(NSE、NeuN),少量细胞阳性表达神经胶质特异性标志物(GFAP);假手术+移植细胞组肌内移植细胞虽可定植存活且均匀分布于肌细胞间隙,但未发现神经元及神经胶质特异性标志物表达;其他2组均无阳性细胞表达。电镜观察发现:与损伤+生理盐水组相比较,损伤+移植细胞组肌细胞核增大,核质染色均匀,异染色质发达,线粒体数量增多,肿胀不明显,线粒体脊较多,形状相对正常,内质网扩张少,肌丝肌节排列整齐,无明显的融合,肌纤维间隙胶原纤维量少。表明体外成神经元样细胞诱导后失神经支配肌内移植可定植存活,能够稳定保持神经元及神经胶质样细胞的特性,并有效抑制了肌细胞核、线粒体、内质网的退变及肌肉纤维化的发生,为进一步研究MPCs成神经元及神经胶质诱导后体内移植延缓失神经性骨骼肌萎缩及其作用机制奠定了实验基础。并且失神经支配肌内定植存活的移植细胞很好地维持了移植前的神经元及神经胶质细胞的特性,相反,未切断神经的假手术组定植存活的移植细胞则完全失去了移植前的特性,为何会出现此种现象呢?这可能与失去神经支配骨骼肌萎缩这一特定微环境存在某种联系,目前尚少见相关文献报道,其具体机制有待进一步实验予以佐证。

参考文献:

[1] Yasuhara T, Matsukawa N, Hara K, *et al*. Transplantation of human neural stem cells exerts neuroprotection in a rat model of Parkinson's disease [J]. J Neurosci, 2006, 26(48): 12497-12511.

[2] 王岩峰, 吕刚, 李雷, 等. 神经干细胞移植对大鼠脊髓损伤后胶质细胞源性神经营养因子与生长相关蛋白43基因表达的影响[J]. 中国修复重建外科杂志, 2005, 19(6): 416-419.

[3] 沈云东, 徐建光, 徐文东, 等. 神经干细胞移植延缓失神经肌肉萎缩的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2008, 22(9): 1051-1055.

[4] Kim S U. Genetically engineered human neural stem cells for brain repair in neurological diseases[J]. Brain Dev, 2007, 29(4): 193-201.

[5] Choi C B, Cho Y K, Prakash K V, *et al*. Analysis of neuron-like differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 350(1): 138-146.

[6] Tropel P, Platet N, Platel J C, *et al*. Functional neuronal differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells, 2006, 24(12): 2868-2876

[7] 杨里, 万立华, 粟永萍, 等. 小鼠间充质祖细胞向神经元样细胞诱

导分化的实验研究[J]. 重庆医科大学学报, 2010, 35(6): 801 - 805.
[8] 北京市科学技术委员会. 北京市实验动物管理条例[J]. 实验动物科学与管理, 1997, 14(1): 1 - 3.
[9] Kadiyala S, Young R G, Thiede M A, *et al*. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential *in vivo* and *in vitro* [J]. Cell Transplant, 1997, 6(2): 125 - 134.
[10] 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.
[11] 邓均, 艾国平, 王军平, 等. C3H1OT1/2 细胞向神经元诱导分化的方法研究[J]. 中国修复重建外科杂志,2007,21(6): 638 - 641.
[12] 赵文勇, 王涛, 王军平, 等. 肌肉特异性 microRNAs 在失神经肌肉萎缩中表达变化的研究[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(21): 2034 - 2036.
[13] 沈云东, 徐建光, 徐文东, 等. 绿色荧光蛋白转基因大鼠神经干细胞体外分化与体内移植的实验研究[J]. 中华手外科杂志, 2007, 23(4): 196 - 199.
[14] Faijerson J, Tinstey R B, Aprico K, *et al*. Reactive astrogliosis induces astrocytic differentiation of adult neural stem/progenitor cells *in vitro*[J]. J Neurosci Res, 2006, 84(7): 1415 - 1424.
[15] 管让宪, 颜小华, 陈启文. 中药单体黄芩苷体外诱导人脐血间充质干细胞向神经元样细胞的分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(14): 2787 - 2792.
[16] 张晓明,孙海梅,杨慧, 等. 人羊膜上皮细胞分泌神经营养因子诱导人脐血间充质干细胞向神经元样细胞的分化:可能性验证[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(6): 973 - 978.
[17] 金钧, 黄坚, 王俊, 等. 体外羊膜间充质干细胞分离培养及向神经元样细胞的分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(32): 5939 - 5943.
[18] Phinney D G, Kopen G, Isaacson R L, *et al*. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation[J]. J Cell Biochem, 1999, 72(4): 570 - 585.
[19] Guo Z, Li H, Li X, *et al*. *In vitro* characteristics and *in vivo* immunosuppressive activity of compact bone-derived murine mesenchymal progenitor cells[J]. Stem Cells, 2006, 24(4): 992 - 1000.

(**收稿**:2012-10-23;**修回**:2012-12-17)
(编辑 龙 亮)

(上接 743 页)

表 1 不同年龄、性别间甲状腺结节患病率比较

年龄(岁)	男性			女性			*P* 值	总患病率(%)
	体检例数	结节例数	患病率(%)	体检例数	结节例数	患病率(%)		
20 ~ 30	693	37	5.34(37/693)	964	174	18.05(174/964)	<0.05	12.73
>30 ~ 40	1 846	231	12.51(231/1 846)	2 119	617	29.12(617/2 119)	<0.05	21.39
>40 ~ 50	3 079	643	20.88(643/3 079)	3 614	1 328	36.75(1 328/3 614)	<0.05	29.45
>50 ~ 60	2 438	739	30.31(739/2 438)	1 782	794	44.56(794/1 782)	<0.05	36.32
>60 ~ 70	852	315	36.97(315/852)	1 375	813	59.13(813/1 375)	<0.05	50.65
>70	307	142	46.25(142/307)	468	325	69.44(325/468)	<0.05	60.26
合计	9 215	2 107	22.86(2 107/9 215)	10 322	4 051	39.25(4 051/10 322)	<0.05	31.52

表 2 不同职业间甲状腺结节患病率比较(%)

职业	男性	女性
教师	27.52(693/2 518)[a]	51.26(1 407/2 745)[a]
政府工作人员	15.07(357/2 369)	18.31(410/2 239)
工人及职员	15.62(124/794)	20.07(217/1 081)
离退休人员	39.72(539/1 357)[a]	61.71(1 528/2 476)[a]
私营业主	21.06(323/1 534)[a]	41.64(386/927)[a]
自由职业及其他	11.04(71/643)	12.06(103/854)

a:$P<0.05$,与政府工作人员、工人及职员、自由职业及其他比较

3 讨论

随着人民生活水平的逐步提高,大众对于健康状况的要求也越来越高,多数人在体检时主动要求行甲状腺超声检查,体检人群的增加可能也是近年来甲状腺结节发病率增高的因素之一。甲状腺结节的病因尚不明确,目前多认为与种族、性别、年龄、接触放射线、自身免疫、遗传等综合因素有关。研究提示女性患病率明显高于男性,甲状腺结节的患病率与年龄呈正相关[3-4]。本研究表明,重庆三峡库区健康体检人群甲状腺结节患病率为 31.52%,其中女性患病率明显高于男性;各年龄阶段女性患病率均高于男性。因此,应该对重庆三峡库区正常健康体检人群加强甲状腺结节的彩超筛查,尤其是女性,这对甲状腺疾病的早诊断和早治疗尤为重要。另外,从事教师及私营业主者人群甲状腺结节的患病率明显高于其他职业,尽管目前没有证据表明职业和心理状况与甲状腺结节的发病直接相关,但这两类人群的甲状腺结节患病率升高提示脑力劳动和工作压力大可能与甲状腺结节的病因有关。

本研究样本量较大,可以代表重庆三峡库区健康体检成人甲状腺结节的流行状况,但上述诸因素是否与本地区甲状腺疾病高发有关,同时对高危群体碘盐使用与否,值得进一步探讨。

参考文献:

[1] 姜军, 齐晓伟. 甲状腺结节诊断方法合理选择及评价[J]. 中国实用外科杂志, 2010, 30(10): 842 - 844.
[2] Kang H W, No J H, Chung J H, *et al*. Prevalence, clinical and ultrasonographic characteristics of thyroid incidentalomas [J]. Thyroid, 2004, 14(1): 29 - 33.
[3] 杨卫平, 邵堂雷. 老年甲状腺结节的诊治经验[J]. 医学与哲学:临床决策论坛版, 2010, 31(6): 17 - 18.
[4] 杨春明. 甲状腺结节的评估[J]. 医学与哲学:临床决策论坛版, 2010, 31(6): 7 - 9,12.

(**收稿**:2013-01-06;**修回**:2013-02-06)
(编辑 王小寒)