维普资讯 http://www.cqvip.com

局解手术学杂志 2004年第13卷第3期
J Regional Anat & Operative Surg, 2004, Vol.13, No.3



# bFGF对大鼠骨髓基质细胞的诱导分化作用

杨 萍, 宋 林, 李振强
(第三军医大学基础医学部解剖学教研室, 重庆 400038)

[摘 要] **目的** 观察bFGF对大鼠骨髓基质细胞的诱导分化作用。**方法** 从大鼠骨髓中分离培养基质细胞并传至第3代, 用含10 ng/ml碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的诱导培养基诱导, 然后观察细胞形态的变化, 并采用免疫组织化学法检测诱导后24 h、48 h、72 h、96 h细胞神经丝蛋白(NF-200)和胶质纤维酸性蛋白(GFAP)的表达。**结果** 诱导后24 h的部分细胞不仅在形态上表现为神经元样, 而且呈NF-200阳性表达, GFAP阴性。48 h、72 h、96 h NF-200阳性细胞数与24 h间无显著性差异($P>0.05$)。**结论** bFGF可以在体外诱导骨髓基质细胞向神经元样细胞分化。

[关键词] bFGF; 骨髓基质细胞; 细胞分化; 神经元样细胞; 大鼠
[中图分类号] Q254; Q813.11 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2004)03-0149-03

## Inducing effect of bFGF on the differentiation of rat bone marrow stromal cells *in vitro*

YANG Ping, SONG Lin, LI Zhen-qiang
(Department of Anatomy, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract: Objective** To investigate the inducing effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on the differentiation of rat bone marrow stromal cells (rBMSCs) in vitro. **Methods** rBMSCs from rats were isolated and cultured for 3 passages, and then were treated with inducing medium containing 10 ng/ml (bFGF), 10% FBS (fetal bovine serum), DMEM/F12, 5 μg/ml insulin, 20 nmol/L progesterone, 20 nM glucose, 100 IU/ml penicillin, and 100 μg/ml streptomycin for 24, 48, 72, and 96 h. The cells were stained immunocytochemically with anti neurofilament-200 (NF-200) and anti glial fibrillary acidic protein (GFAP) antibodies. The morphological changes of the cells were observed. **Results** At 24 h after induction, part of the rBMSCs became neuron-like cells and showed NF-200 positive. No GFAP expression was found in the neuron-like cells. Compared with that at 24 h after induction, there was no significant difference in the number of NF-200 positive cells at 48, 72, and 96 h ($P>0.05$). **Conclusion** bFGF can induce the differentiation of rBMSCs into neuron like-cells.

**Keywords:** basic fibroblast growth factor; bone marrow stromal cell; cell differentiation; neuron-like cell; rat

近年来有关胚胎干细胞、神经干细胞治疗神经系统病变已取得可喜的成绩, 已经逐渐为人们熟知并接受。而神经干细胞其取材来源少, 使其应用受到限制。同时, 免疫排斥也是干细胞用于异体替代治疗的一个重要问题。越来越多的证据表明, 成体干细胞移植入受体中, 它们表现出很强的可塑性。目前, 研究较多是骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)的诱导分化, 成体BMSCs可在体内和体外被诱导分化成神经元样细胞[1-5], 然而各实验室所用的诱导方法均无一致性, 且诱导分化的神经元所占比例仍不相同, 但相似之处是在进行诱导之前多用bFGF进行预诱导24 h。本文进行了相关诱导实验, 观察了bFGF的影响, 发现它同样能使BMSCs向神经元方向分化(另文发表), 为了明确预诱导对进一步定向诱导分化的影响, 本实验延长预诱导时间, 以明确bFGF对BMSCs的诱导分化作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

DMEM/F12(1:1)来自Gibco, 胎牛血清(FBS)为Hyclone产品, 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)为Invitrogen产品, 多聚赖氨酸、DAB、Insulin、Laminin、兔抗NF-200抗体和兔抗FGAP抗体为Sigma产品, 生物素标记抗兔IgG和辣根酶标记链霉卵白素为北京中山生物制剂有限公司产品, 余为国产分析纯试剂。

### 1.2 大鼠BMSCs的分离培养

8~10周SD大鼠颈部离断处死, 75%酒精浸泡消毒, 取出股骨、胫骨和肱骨, 去除肌肉, 将骨放在含2% FBS的无钙、镁的D-Hank's平衡盐溶液(HBSS)中, 冰上放置, 去除骨尖, 用空针(内含1 ml冰冷2% FBS HBSS)插入骨髓腔, 冲洗骨髓到无菌小杯中, 悬液经无菌70目钢网过滤, 1 000 r/min离心10 min, 沉淀用20% FBS + DMEM/F12 (1 1) (含100 IU/ml penicillin和100 μg/ml streptomycin)重悬, 细胞密度调至$5\times10^7$/ml, 接种到25 $cm^2$培养瓶中, 37 ℃、5% $CO_2$、95%湿度孵箱中培养, 24 h后换液, 去除未贴壁细胞, 以后每隔2~3 d换液一次, 待贴壁细胞80%

[作者简介] 杨 萍(1967-), 女, 四川省阆中市人, 讲师, 博士, 主要从事神经创伤修复方面的研究。电话: (023)68752225
[收稿日期] 2004-03-09 [修回日期] 2004-04-20

维普资讯 http://www.cqvip.com



融合后，用0.125%胰酶消化1 min，含血清培养基终止消化传代，一般1瓶大鼠BMSCs(rBMSCs)传为2～3瓶，共传3代后进行诱导实验。

### 1.3 bFGF对rBMSCs定向分化成神经元样细胞的影响

将传至第3代的rBMSCs接种于事先放置有经多聚赖氨酸处理过的盖玻片的24孔培养板内，培养2 d，用10% FBS + DMEM/F12 + 5 μg/ml insulin + 20 nmol/L progesterone + 20 nmol/L glucose + 100 IU/ml penicillin + 100 μg/ml streptomycin + 10 ng/ml bFGF更换原培养基，培养24 h、48 h、72 h、96 h后进行以下免疫组织化学检测，并设对照组。

### 1.4 NF-200和GFAP免疫组织化学检测

诱导后细胞用4%多聚甲醛固定20 min，加入3%过氧化氢/甲醇溶液阻断内源性过氧化物酶20 min，正常羊血清封闭20 min，分别加入兔抗NF-200(1∶1 000)、兔抗GFAP(1∶100)，4 ℃孵育过夜，加入生物素标记的二抗(1∶100)，37 ℃孵育2 h，加入辣根酶标记链霉卵白素(1∶100)，37 ℃孵育2 h，各步间均用0.01 mol/L PBS洗涤3次，每次5 min，DAB溶液显色，二甲苯透明，中性树胶封固。对照实验以0.01 mol/L PBS液(pH7.4)代替一抗。

### 1.5 统计学处理

随机计数10个非重叠视野(×100)，计算NF-200和GFAP阳性细胞占总细胞数的百分比，所有数据用ANOVA分析和t检验进行差异显著性比较，数据均用($\bar{x} \pm s$)表示。

## 2 结果

### 2.1 rBMSCs的原代和传代培养

倒置显微镜下观察rBMSCs生长情况及诱导后的形态学变化。骨髓中体积较大的单个核细胞于接种后6 h开始贴壁，刚贴壁的细胞形态无变化，24 h后见大量未贴壁细胞，体积较小，圆形，多为造血细胞成分，而贴壁细胞已变形，长出突起，用HBSS尽量将未贴壁细胞洗掉，加入新鲜培养基继续培养，随着培养时间的延长及传代，未贴壁的细胞逐渐破碎或随换液而清除。贴壁细胞形态多样，既有呈梭样细胞，也有呈宽大扁平样细胞(图1)，分裂增殖较快，待细胞增殖到80%融合时进行传代，传到第3代，造血细胞成分已基本消失，开始进行诱导分化实验。

### 2.2 bFGF对rBMSCs形态变化的影响

经bFGF处理24 h，可见细胞分裂似乎减慢，部分原来宽大扁平的rBMSCs胞质向核收缩，细胞体积变小，折光性增强，突起变短，突起末端出现一级或二级分支(图2)，类似于神经元的形态，对照组细胞仍然保持原来的状态。继续培养，神经元样细胞数增加不明显，诱导72 h后视野中开始出现有空泡细胞，96 h这种细胞增多。

### 2.3 免疫组织化学鉴定

为进一步确定rBMSCs在bFGF的影响下是否有向神经元方向分化的趋势，本文采用神经元标记物NF-200，神经胶质细胞标志物GFAP进行鉴定。结果显示，bFGF诱导24 h、48 h、72 h、96 h后，均出现NF-200免疫染色阳性的细胞，呈棕黄色(图3)，GFAP阴性。随机计数10个非重叠视野(×100)，计算NF-200阳性细胞占总细胞数的百分比，统计结果表明各时相点NF-200阳性细胞数百分比间无显著性差异($P > 0.05$)，均数分别为(20.3 ± 2.52)%、(22.67 ± 3.52)%、(19.62 ± 2.92)%、(18 ± 3.32)%。对照组均为阴性。

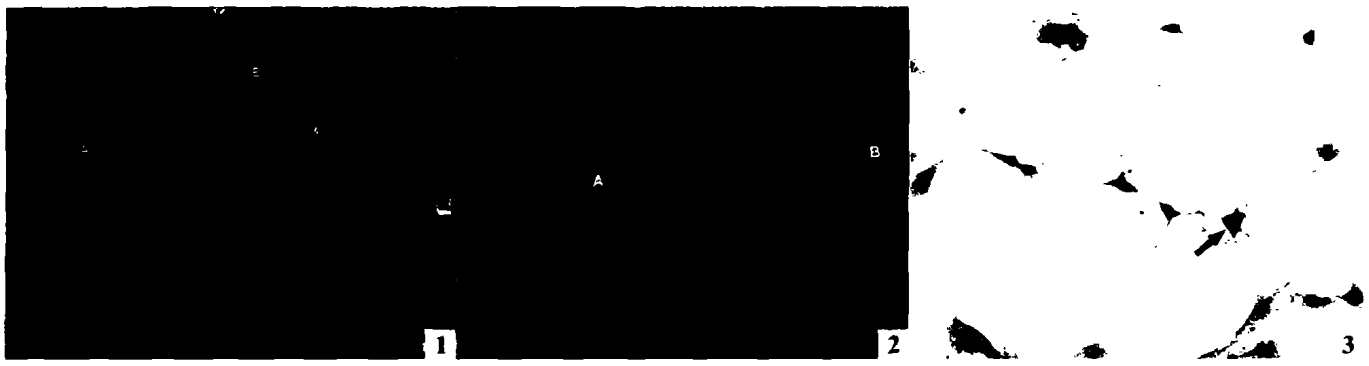



**图1** 相差显微镜所示未分化的rBMSCs，A示梭形细胞，B示扁平细胞(×200)

**图2** 相差显微镜所示经bFGF诱导24 h后，A示神经元样细胞，B示未分化的rBMSCs(×200)

**图3** bFGF诱导24 h后，出现NF-200免疫染色阳性细胞，呈棕黄色，箭头所示(×100)

## 3 讨论

### 3.1 骨髓基质细胞的特性

研究表明，成年动物骨髓中含有两类干细胞：一种是造血干细胞，另一种是非造血组织干细胞，后者是指间充质干细胞，或称之为骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)。BMSCs一方面支持骨髓中造血干细胞的生存、生长和分化，另一方面，BMSCs又具有干细胞的特性，可以被诱导分化成各种间充质组织，包括骨、软骨、脂肪、肌肉、肌腱等，还可以被诱导分化成非间充质组织，如神经元、神经胶质细胞等。由于它具有多向分化潜能，而倍受关注。首先是如何分离纯化成体BMSCs，其次才是定向诱导分化的问题 目前用于分离BMSCs方法主要有四种：差速贴壁筛选法、密

维普资讯 http://www.cqvip.com



度梯度离心法、流式细胞仪法和免疫磁珠法。各种方法都有利弊。本实验采用差速贴壁法分离大鼠BMSCs，第一次换液时间是接种后24 h，每次换液时尽量将未贴壁细胞冲洗掉，进行纯化。这种方法虽有原代培养纯度不高的缺点，但其简便易行，经传代后细胞纯度可达到90%左右。

3.2 骨髓基质细胞的诱导分化

从细胞遗传学来看，定向分化都是含有相同基因组的细胞不同基因表达的结果，是细胞发育的不同阶段。基因表达需一定的条件，多种因素包括细胞外环境因素如细胞因子、激素等均参与调节，并影响细胞的定向分化。在这些因素中，神经营养因子的作用尤为关键。碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)在胚胎时的含量很高[6]，新生鼠皮下注射bFGF可促进海马、室管膜下区等处神经干细胞的分裂增殖[7]，因此，bFGF是一种高效的神经营养因子。在体外培养中，bFGF可诱导来自胚胎的神经干细胞增殖，产生由未分化细胞组成的细胞球，这些细胞能表达神经上皮细胞特有的Nestin。另外，bFGF对神经干细胞的存活、增殖和分化具有剂量依赖性，在含有一种低浓度的bFGF的基本培养液中，神经干细胞呈现神经元的分化特征，随着bFGF水平的增加则分化为胶质细胞[8]。Jiang等[9]研究表明神经前体细胞在去除PDGF和EGF后加入bFGF培养14 d后有(68±9)%表现出神经元形态和表型。

基于以上对bGFG的研究结果，近年来，大量研究BMSCs定向诱导为神经元的实验中均用bFGF预诱导24 h。为了明确预诱导对进一步定向诱导的影响，本实验延长预诱导时间，通过神经元特异性标记物(NF-200)验证转化的神经元样细胞。结果显示bFGF确实能使BMSCs向神经元方向分化。但发现延长诱导时间并未增加神经元样细胞所占百分比。同时，诱导72 h后视野中开始出现有空泡细胞，96 h这种细胞增多。考虑是因为bFGF作用时间有限，诱导72 h后出现变性细胞，因未换液，培养基酸化所致。本文认为预诱导24 h是可取的。目前，BMSCs向神经元定向分化仍然是研究的重点，能否从定性表达过渡到定量高表达，是迄待解决的瓶颈问题[10]。因此，通过对体外诱导因素进行逐步筛选，优化诱导条件，力求使神经元样细胞所占比例达最大，进而研究这些细胞的功能，使它们能够替代体内丢失的神经元，重建功能。

[参考文献]

[1] Weimann JM, Charlton CA, Brazelton TR, et al. Contribution of transplanted bone marrow cells to Purkinje neurons in human adult brains[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(4): 2088 - 2093.
[2] Munoz-Elias G, Woodbury D, Black IB. Marrow stromal cells, mitosis, and neuronal differentiation: stem cell and precursor functions[J]. Stem Cells, 2003, 21(4): 437 - 448.
[3] Woodburg D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons[J]. J Neurosci Res, 2000, 61(4): 364 - 370.
[4] Sanchez Ramos J, Song S, Cardozo Pelaez F, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neuronal cells in vitro[J]. Exp Neurol, 2000, 164(2): 247 - 256.
[5] Deng W, Obrocka M, Fischer I, et al. In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 282(1): 148 - 152.
[6] Mckay R. Stem cells in the central nervous system[J]. Science, 1997, 276(5309): 66 - 71.
[7] Tao Y, Black IB, DiCicco Bloom E. In vivo neurogenesis is inhibited by neutralizing antibodies to basic fibroblast growth factor [J]. J Neurobiol, 1997, 33(3): 289 - 296.
[8] Qian X, Davis AA, Goderie SK, et al. FGF2 concentration regulates the generation of neurons and glia from multipotent cortical stem cells[J]. Neuron, 1997, 18(1): 81 - 93.
[9] Jiang Yuehua, Jahagirdar Balkrishna N, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow [J]. Nature, 2002, 418(6893): 41 - 49.
[10] 张成. 骨髓干细胞移植在神经疾病中的应用前景[J]. 医学文选, 2003, 22(1): 1 - 3.

(编辑:余汇洋)

# 关于统计学符号的使用

统计学符号不论用哪种字母，也不论大写或小写一律都用斜体。要注意区分拉丁字母和希腊字母。例如均数的符号是字母 $\bar{x}$，卡方的符号是希腊字母 $\chi^2$，自由度的符号是希腊文"υ"，不是拉丁文"V"。样本的相关系数是英文"$r$"，不能误为希腊文"γ"。

(本刊编辑部)