基础研究 文章编号:0253-3626(2010)06-0801-04

小鼠间充质祖细胞向神经元样细胞诱导分化的实验研究

杨 里[1],万立华[1],粟永萍[2],彭 毅[2],赵文勇[1]

(1.重庆医科大学基础医学院法医学教研室,重庆 400016;2.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,重庆 400038)

【摘 要】目的:体外培养 C57 小鼠密质骨碎片来源的间充质祖细胞(Mesenchymal progenitor cells,MPC),探讨 MPC 体外向神经元样细胞定向诱导分化的可行性。方法:取 C57 小鼠后肢长骨,剪成骨碎片,经Ⅱ型胶原酶消化后体外培养 MPC,流式细胞术检测鉴定其免疫学表型。取生长良好的第三代 MPC,神经元原代培养上清液定向诱导,对诱导后的 MPC,以神经元特异性标志物神经元特异性烯醇化酶(Neuron specific enolase,NSE)及神经丝蛋白(Neurofilament protein,NF)为对照,应用免疫细胞化学染色法,检测神经元标志物的表达。结果:成功培养原代 MPC,传代后生长良好,流式细胞术检测 CD29、CD44 组阳性率与其同型对照组相比有明显差异($P<0.05$)。经神经元原代培养上清液诱导后,MPC 可表达神经元特异性标志物 NSE 及 NF。结论:从小鼠密质骨碎片分离培养出的间充质祖细胞获得率高,并可诱导分化为神经元样细胞。

【关键词】间充质祖细胞;分化;神经元样细胞;诱导

【中国图书分类法分类号】Q254 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-03-09

Study on directed differentiation of mesenchymal progenitor cells into neuron-like cells in mice

YANG Li, et al

(*Department of Forensic Medicine, Basic Medicine College, Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To culture mesenchymal progenitor cells (MPC) from compact bone fragments in C57 mice in vitro and to study the feasibility of inducing directed differentiation of MPC into neuron-like cells in vitro. ***Methods***: Bones of hind limbs of C57 mice were sheared into bone fragments and digested by collagenase type Ⅱ. Then, MPC were cultured in vitro and analyzed by flow cytometry for identification of its immunology phenotype. MPC of P_3 in good growth were induced directionally by the supernatant cultured with primary neuron, and then detected the expression of neuronal specific markers neuron specific enolase (NSE) and neurofilament protein (NF) by immunocytochemical staining. ***Results***: The primary MPC were cultured successfully and they grew well after passage. Compared with that of the control group, the positive rate of CD29 and CD44 of MPC of antibody group had significant difference ($P<0.05$). Induced by supernatant cultured with primary neuron, MPC could express neuronal specific markers NSE and NF-H. ***Conclusion***: The harvest rate of MPC isolated and cultured from compact bone fragments of mice is high and MPC could be induced and differentiated into neuron-like cells.

【Key words】Mesenchymal progenitor cells; Differentiation; Neuron-like cells; Induce

干细胞(Stem cells)由于具有多向分化的潜能,成为基因治疗、细胞替代疗法及器官移植等应用研究中的热点[1,2]。神经干细胞的发现为中枢神经细胞变性疾病和中枢神经系统损伤的移植治疗提供了有效的移植物,但由于目前很难获得足够的神经干细胞,因此寻找一种新的移植细胞来源,对神经科学领域基础与应用研究的发展至关重要[3,4]。研究证实,间充质祖细胞(Mesenchymal progenitor cells,MPC)作为一种成体干细胞(Adult stem cells,ASC),具有可塑性,可诱导分化为神经元样细胞[5,6],但在实际操作中,由于通过骨髓来源进行小鼠 MPC 体外培养会受到造血干细胞的污染,而很难使 MPC 得到有效增殖[7],近来有研究者以密质骨碎片为来源进行小鼠 MPC 体外培养,取得较好的增殖效果[8],但对诱导其向神经细胞分化的研究并无报道,故本实验将采用 C57 小鼠密质骨碎片为来源进行 MPC 体外培养增殖及鉴定,并用神经元原代培养上清液诱导其向神经元样细胞定向分化,旨在为进一步研究 MPC 在神经损伤后的治疗作用提供了实验依据和理论基础。

作者介绍:杨 里(1979-),男,硕士,
研究方向:法医病理学,法医现场学。

通讯作者:万立华,男,教授,E-mail: ccfw@cqmu.edu.cn。

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(编号:2005CB522605)。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 C57 小鼠 12 只，雌性，清洁级，3 周龄，体重（18 ± 2）g，由中国人民解放军第三军医大学动物中心提供。

1.2 主要试剂

DMEM/F-12 培养基购自美国 Hyclone 公司；胎牛血清购自美国 GIBCO 公司；Ⅱ型胶原蛋白酶购自美国 GIBCO 公司；胰蛋白酶购自美国 DIFCO 公司；兔抗鼠 CD29、CD31、CD44、CD45、CD90、CD106 抗体购自美国 BD 公司；NSE 及 NF 抗体、二抗及荧光二抗，DAB 显色液购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.3 MPC 的分离培养及鉴定

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/F-12 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 d 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。培养至第三代（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。

1.4 诱导液的制作

神经元原代培养上清液：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 1×10^3 个/cm^2 细胞浓度接种于 6 孔板中，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，免疫学检查神经元特异性标志物 NSE 和 NF 的表达。

1.5 MPC 体外向神经元样细胞的定向诱导分化

选取生长良好、纯度高的 P_3 代 MPC 以 5×10^3 个/cm^2 浓度接种于放有 8 mm × 8 mm 载玻片的 6 孔板中，培养至细胞融合超过 50%时，加入诱导液诱导 24 h 后，取细胞爬片对诱导后的 MPC 进行神经元特异性鉴定。对照组不加诱导液培养。

1.6 MPC 体外向神经元样细胞定向诱导分化的鉴定

免疫细胞化学检测：取细胞爬片用 PBS 洗涤 3 次，4%多聚甲醛室温固定 30 min 后，用 PBS 洗涤 3 次，而后按免疫组织化学染色试剂盒说明书进行操作，在显微镜下观察，以胞浆染色者为阳性细胞。

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 和 NF，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。

1.7 统计学处理

采用 SPSS10.0 统计分析软件对数据进行统计分析。数据资料分析以均值加减标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，进行单因素方差分析（one-way ANOVA），以 $P<0.05$ 表示有显著性差异。

2 结 果

2.1 MPC 的生长与形态学观察

原代（P_0）MPC 培养时在前 5 d 生长不明显，5 d 后开始看到骨片周围有少量细胞贴壁生长，此时细胞多呈圆形或扁圆形，第 10 d 生长速度加快，第 20 d 达到细胞融合 80%~90%，此时形态以梭形和多角形为主，形态饱满，折光性强，细胞间无重叠，有接触抑制现象。传代后的 MPC 生长速度加快，3~5 d 即可再次传代，形态上也趋于一致，大多为梭形。（图 1）

2.2 MPC 的免疫表型鉴定

流式细胞术检测显示：MPC 表达间质细胞标记 CD29、CD44、CD90、CD106，不表达造血细胞标记 CD31 和 CD45。（表 1，图 2）

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，核大而圆，可见有细小突起从胞体长出；3 d 后，细胞突起明显变长。免疫细胞化学检查，见细胞胞质深染，表明神经元特异性标志物 NF 和 NSE 阳性表达。结合细胞形态，可证明培养的细胞为神经元。（图 3）。

表 1 MPC 流式细胞术检测结果（$\bar{x} \pm s$，n=3）

组别	n	检测结果
FITC 同型对照组	3	0.49% ± 0.072%
PE 同型对照组	3	0.22% ± 0.046%
CD29 组	3	94.61% ± 4.51%▲
CD31 组	3	1.22% ± 0.436%
CD44 组	3	86.29% ± 1.23%▲
CD45 组	3	0.19% ± 0.125%
CD90 组	3	85.71% ± 4.3%▲
CD106 组	3	83.1% ± 4.23%■

与 FITC 同型对照组相比，▲$P<0.05$；与 PE 同型对照组相比，■$P<0.05$

2.4 体外定向诱导 MPC 向神经元样细胞分化的鉴定

MPC 经神经元原代培养上清液诱导 24 h 后，可见细胞形态发生明显变化，部分细胞伸出长轴突，形成较典型的神经元样细胞。对照组未见此改变。免疫细胞化学检测显示 MPC 经神经元原代培养上清液诱导 24 h 后，NF（60.26% ± 7.19%）及 NSE（73.73% ± 9.88%）均呈阳性表达（表 2）。免疫荧光检测也显示 MPC 经诱导后阳性表达 NF 和 NSE（图 4、5）。

3 讨 论

长期以来，人们一直试图通过细胞替代疗法修复受损的神经组织，达到治疗目的[9]。目前，成体干细胞、胚胎干细胞等

表 2 免疫细胞化学检测结果（$\bar{x} \pm s$，n=3）

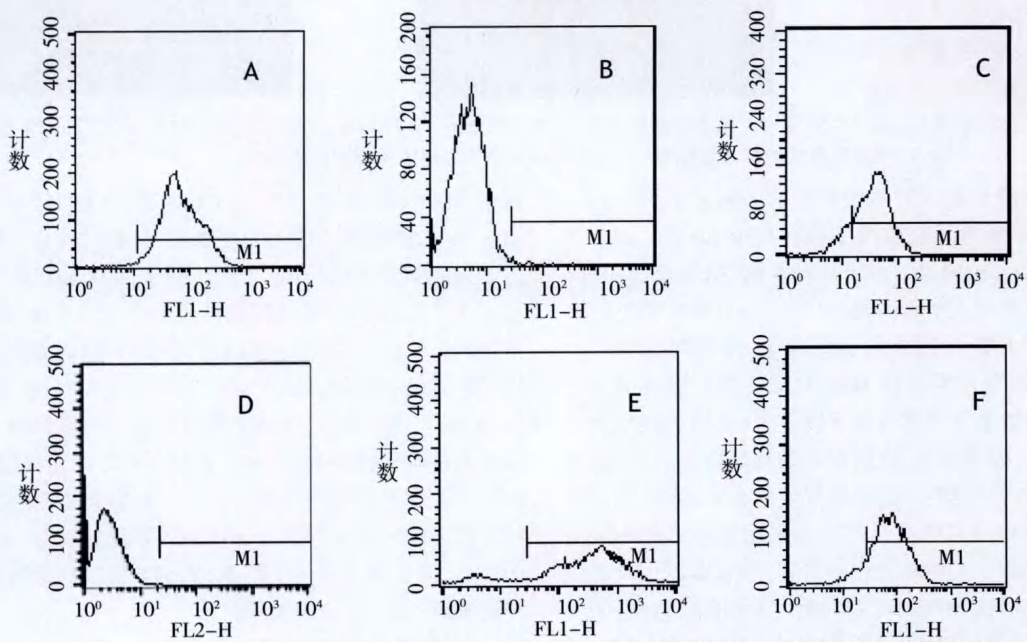
组别	n	阳性表达率
NSE 诱导组	3	73.73% ± 9.88%▲
NSE 对照组	3	4.23% ± 1.95%
NF 诱导组	3	60.26% ± 7.19%■
NF 对照组	3	1.78% ± 0.64%

与 NSE 对照组相比，▲P<0.05；与 NF 对照组相比，■P<0.05



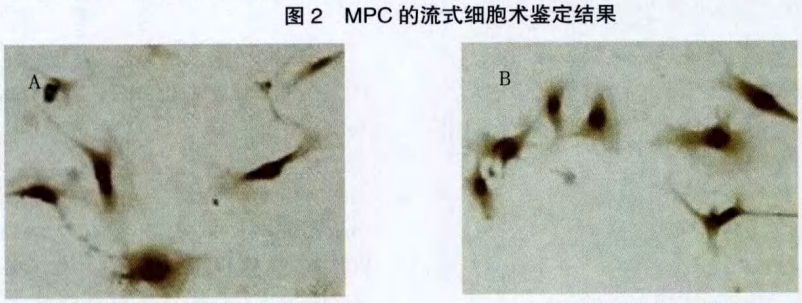
A. P3 代 MPC（×100） B. P3 代 MPC（×200）

图 1 MPC 的形态学观察



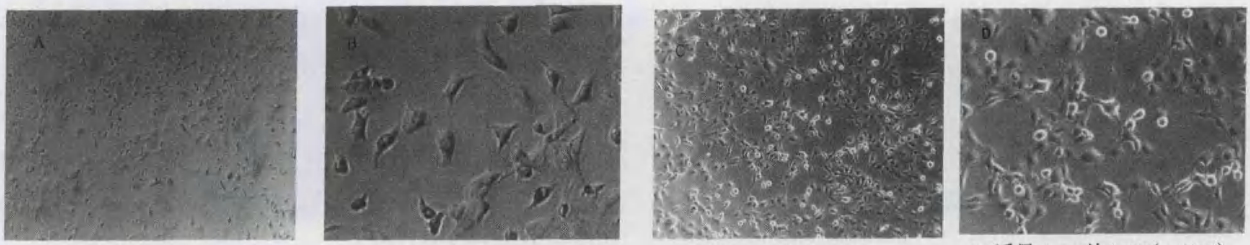
A. CD29-FITC；B. CD31-FITC；C. CD44-FITC；D. CD45-PE；E. CD90-FITC；F. CD106-PE

图 2 MPC 的流式细胞术鉴定结果



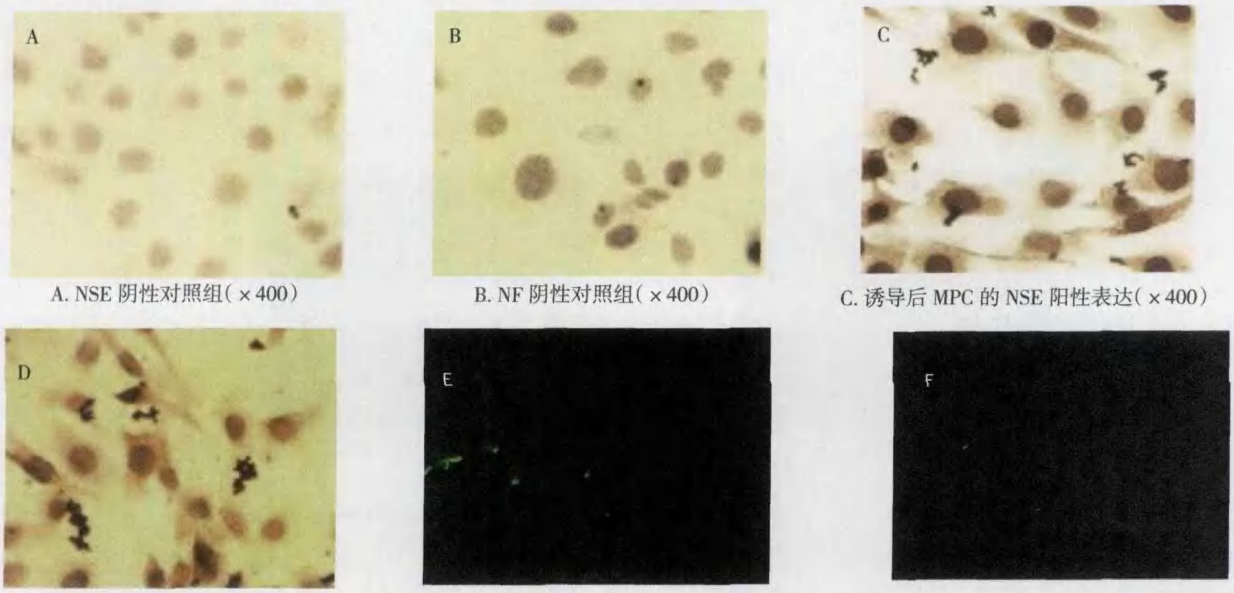
A. NF 表达阳性（×400） B. NSE 表达阳性（×400）

图 3 神经元原代培养第 3 d NSE 和 NF 阳性表达



A. MPC 诱导对照组（×100）　B. MPC 诱导对照组（×200）　C. 诱导 24 h 的 MPC（×100）　D. 诱导 24 h 的 MPC（×200）

图 4　神经元原代培养上清液诱导对 MPC 向神经元样细胞分化的影响



A. NSE 阴性对照组（×400）　B. NF 阴性对照组（×400）　C. 诱导后 MPC 的 NSE 阳性表达（×400）

D. 诱导后 MPC 的 NF 阳性表达（×400）　E. 免疫荧光鉴定诱导后 MPC 的 NSE 标记（×200）　F. 免疫荧光鉴定诱导后 MPC 的 NF 标记（×200）

图 5　神经元原代培养上清液诱导对 MPC 定向分化为神经元样细胞的影响

在细胞移植或者神经细胞成形术中作用的研究已取得了确实的成果。骨髓来源的间充质祖细胞（Bone marrow mesenchymal progenitor cells，bMPC）由于其易获取、易生长、有较强的增值能力而成为最近的研究热点[10]，运用骨髓来源进行细胞培养的方法已广泛运用于人、猪、大鼠、兔和狗等 MPC 的体外培养，但在体外培养小鼠 MPC 时却易受到造血干细胞的污染而使增殖效果不理想[7]；郭子宽等[8]以密质骨碎片为来源进行小鼠 MPC 体外培养，取得较好的增殖效果，并成功诱导其向骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞等定向分化，弥补了以往的不足。但尚无涉及对密质骨碎片为来源培养出的小鼠 MPC 进行向神经细胞定向诱导分化的研究。本实验以小鼠密质骨碎片为来源培养出 MPC，探讨其神经分化的可能性，以便掌握成熟条件后应用于 MPC 的分化研究。目前诱导 MPC 在体外分化成为神经元的方法多为抗氧化剂诱导和生长因子诱导[11,12]，本实验采用的是微环境体液诱导法，将神经元原代培养上清液作为诱导液，诱导小鼠骨碎片来源的 MPC 向神经元样细胞分化[13]，为进一步研究 MPC 的定向诱导分化提供实验依据。

我们采用密质骨碎片培养法体外培养小鼠 MPC，经过严格的条件控制进行传代培养后，保持了 MPC 的低分化增殖特性。培养过程中发现，与原代培养细胞相比，传代细胞的增殖能力更强。流式细胞仪分析鉴定 MPC 的免疫表型，传代后的 MPC 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 MPC 从第 3 代后，细胞增殖能力趋于稳定，且相对纯化，已消除了造血干细胞对试验的影响，可用于后来的试验研究[14]。同时对法医遗传学研究与法医损伤修复具有意义。在我们的实验中，经神经元原代培养上清液诱导 24 h 后的 MPC 可阳性表达神经元特异性标志物 NSE（73.73% ± 9.88%）和 NF（60.26% ± 7.19%），表明 MPC 在特定微环境体液因素影响下，能定向分化为神经元样细胞，为进一步以小鼠为动物模型研究 MPC 在神经损伤后的治疗作用提供了实验依据和理论基础。由于特定微环境体液诱导的具体影响因素比较复杂，包含细胞因子、生长因子等多种分子因素，其诱导机制尚未明确，国内外鲜见报道，需进一步实验研究。

参 考 文 献

[1] Matikainen T, Laine J. Placenta an alternative source of stem cells[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2005, 207(2 Suppl): 544-549.

[2] Chai L H, Wu S X, Yan W H. Human bone marrow mesenchymal stem cells differentiated into dopaminergenic neurons in vitro[J]. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao, 2007, 23(2): 252-226.

[3] Belegu V, Oudega M, Gary D S, et al. Restoring function after spinal cord injury: promoting sponatneous regneration with stem cells and activity based therapies[J]. Neurosurg Clin N Am, 2007, 18(1): 143-168.

基础研究 文章编号:0253-3626(2010)06-0805-05

基于脂代谢靶点蛋白 hPPARγ-LBD 的抗肿瘤药物筛选模型的研究

段 雯[1],李 伟[1],靳红卫[2],夏 铸[3],程训官[3],张昕宇[2],郑小红[2],余 瑜[1]

(1.重庆医科大学药学院药物化学教研室,重庆 400016;2.重庆市生物化学与分子药理学重点实验室,重庆 400016;3.重庆市药物工程研究中心,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立一种以脂代谢靶点蛋白 hPPARγ-LBD 重组蛋白进行抗肿瘤药物筛选的方法。方法:采用 pReceiver-B01-PPARγ-LBD 表达质粒转至 *E.coli* $BL_{21}(DE_3)$细胞,进行表达与纯化得到可溶性靶点蛋白 hPPARγ-LBD 重组蛋白,以罗格列酮为 hPPARγ-LBD 的阳性配体,以 GW9662 作拮抗剂,采用分子排阻色谱-高效液相色谱法(SEC-HPLC)测定 hPPARγ-LBD 重组蛋白与配体药物的结合活性。结果:在优化条件(16℃、0.6 mmol/L IPTG、诱导 20 h)下,能可溶性表达 hPPARγ-LBD 重组蛋白;经镍亲和色谱纯化后,以每升 LB 培养基计可获得 41 mg、纯度为 95%的 hPPARγ-LBD 重组蛋白;该重组蛋白与罗格列酮特异性结合率约 65%,K_d 值为 625 nmol/L;与德氮吡格(Tetrazanbigen,TNBG)特异性结合率约 60%,K_d 值为 1 000 nmol/L。结论:本文基于脂代谢靶点蛋白 hPPARγ-LBD 建立了抗肿瘤药物体外筛选模型的方法,该方法快速、稳定、安全及简便,能应用于抗肿瘤药物的筛选。

【关键词】脂代谢;靶点蛋白;hPPARγ-LBD;抗肿瘤药物;药物筛选模型;罗格列酮;德氮吡格

【中国图书分类法分类号】R965.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-12-07

Research of drug screening model based on recombinant hPPARγ-LBD as a target protein for lipid metabolism

DUAN Wen, et al

(*Chongqing Key Molecular Pharmacology, Chongqing Medical University*)

作者介绍:段 雯(1986-),女,硕士,
研究方向:重组蛋白的表达、纯化和功能表征以及药物构效关系。

通讯作者:余 瑜,男,教授,E-mail:yuyu3519@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30371632 和 30772595)。

【Abstract】*Objective*: To establish a method of antitumor drug screening model based on recombinant hPPARγ-LBD as a target protein for lipid metabolism. *Methods*: pReceiver-B01-PPARγ-LBD expression plasmid was constructed and transferred into *Escherichia coli* $BL_{21}(DE_3)$ competent cells. Growth conditions

[4] Faijerson J, Tinstey R B, Aprico K, et al. Reactive astrogliosis induces astrocytic differentiation of adult neural stem/progenitor cells vitro [J]. Neurosci Ras, 2006, 84(7): 1415-1424.

[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 Ras 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] 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]. Cell Biochem, 1999, 72(4): 570-585.

[8] Guo Z K, Li H, Li X S, et al. Invitro characteristics and invivo immunosuppressive activity of compact bone-derived murine mesenchymal progenitor cells[J]. Stem Cells, 2006, 24(5): 992-1000.

[9] 纪家武,王 玮.神经干细胞在修复脊髓损伤中的应用[J].局解手术学杂志,2004,9(3):445-452.

[10] Faijerson J, Tinstey R B, Aprico K, et al. Reactive astrogliosis induces astrocytic differentiation of adult neural stem/progenitor cells vitro [J]. Neurosci Ras, 2006, 84(7): 1415-1424.

[11] Deng Y B, Yuan Q T, Liu X G, et al. Functional recovery after rhesus-monkey spinal cord injury by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cell derived neurons[J]. Chin Med J(Engl), 2005, 118(18): 1533-1541.

[12] Cho K J, Trzaska K A, Grčco S J, et al. Neurons derived from human mesenchymal stem cells show synaptic transmission and can be induced to produce the neurotransmitter substance P by interleukin-1 alpha[J]. Stem Cells, 2005, 23(3): 383-391.

[13] 邓 均,艾国平,王军平,等.C3H1OT 1/2 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(7):1221-1227.

[14] Romanov Y A, Darevskaya A N, Merzlikina N V, et al. Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: islation, characterization and diferentiation potentialities[J]. Bull Exp Biol Med, 2005, 140(1): 138-143.

(责任编辑:关蕴良)