维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)03－0352－04

脐血单个核细胞体外培养和诱导后神经干细胞标志物 mRNA 的表达

向 静[1], 江德鹏[2], 王昌铭[1], 王景周[1]

(1.第三军医大学大坪医院野战外科研究所神经内科,重庆 400042;2.第三军医大学西南医院急诊科,重庆 400038)

【摘 要】目的:探讨人脐血单个核细胞(human cord blood monocytes, HCMNCs)培养增殖过程中的形态变化及诱导后神经干细胞标志物 mRNA 的表达。方法:采用 OLYMPUS 倒置显微镜观察培养过程中 HCMNCs 形态的变化;RT－PCR 方法鉴定 MNCs 用神经生长因子(NGF)和维甲酸(RA)诱导前后神经干细胞(neural stem cells, NSCs)标志物巢蛋白(Nestin)及 Musashi－1 蛋白 mRNA 的表达。结果:HCMNCs 培养前,胞体较小,呈均一的圆形;培养后,细胞胞体增大,有破骨样细胞和间质样细胞两种形态。破骨样细胞胞体较大,呈圆形,多个核。间质样细胞胞体呈较均一的长梭形,形态类似于骨髓 MSCs,但较骨髓 MSCs 稍小。RT－PCR 检测提示,诱导前 HCMNCs 中 Nestin 弱表达,Musashi－1 无表达;诱导后两者均表达增强,之后逐渐减弱。结论:使用密度梯度离心法可以从脐血中分离得到具有多向分化潜能的 HCMNCs,经过 EGF 和 RA 诱导后,神经干细胞标志表达一过性增强后减弱。

【关键词】脐血单个核细胞;巢蛋白;Musashi－1;RT－PCR

【中国图书分类法分类号】R743 【文献标识码】A 【收稿日期】2004－04－08

Expression of neural stem cell－specific molecules cultured in vitro and induced mononuclear cells derived from human cord blood

XIANG Jing, et al

(*Department of Neurology, the Third Military Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the configuration changes of human cord blood monocytes (HCMNCs) under specific culture conditions and the expression of NSCs marker under induction. *Methods*: HCMNCs were prepared from normal placenta after full term normal delivery. Observe the shape by microscope and reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT－PCR) for nestin and musashi－1 antigen were performed to confirm nestin and musashi－1 antigen expression in HCMNCs. *Results*: RT－PCR demonstrated small amount of nestin expressed in HCMNCs but no musashi－1 antigen before induction, and both showed the strongest expression in 48h, then faded away gradually. The uncultivated MNCs were small and round. After culturing, the cells became larger, some cells change their shape into rhombic. *Conclusion*: The newly HCMNCs isolated by centrifugation over Lymphoprep densitgradient expressed nestin mRNA in low level and no musashi－1 show up, after induction, the former and musashi－1 increased intermittently and then decreased with the time of culturing.

【Key words】Human cord blood monocytes; Nestin; Musashi－1; RT－PCR

干细胞是具有自我复制和多向分化潜能的原始细胞,是形成生命机体各种组织器官的起源细胞。在成体干细胞的研究中,脐血干细胞由于易于采集、制备及保存,免疫反应性低,越来越受到关注。脐血单核细胞(HCMNCs)中包含多种具有多向分化潜能的细胞。在适宜的体内或体外环境下,可分化为神经元及神经胶质细胞,并在分化过程中表达神经干细胞(NSCs)特异性标志[1,2]。本研究通过密度梯度离心法得到 HCMNCs,采用 RT－PCR 方法比较 HCMNCs 诱导前后 Nestin 及 Musashi－1 的表达情况,并观察培养过程中 HCMNCs 的形态变化情况。

1 材料和方法

作者介绍:向 静(1978－),住院医师,硕士,主要研究方向:缺血性脑血管病。

基金项目:重庆市科委攻关项目(7830)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 主要试剂

高糖 IMDM 培养基购自 Gibco 公司；胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所；淋巴细胞分层液购自 Gibco 公司；RNA 提取试剂使用 invitrogen 公司的 TRIZOL 试剂；氯仿、异丙醇为国产分析纯试剂；DEPC 水购自 Sigma 公司；RT－PCR 试剂盒购自大连宝生物公司；琼脂糖为 Sigma 公司产品。

1.2 HCMNCs 的体外分离、纯化和扩增培养

无菌条件下采集健康产妇足月妊娠顺产或剖腹产的婴儿脐带血 50～100ml，肝素抗凝，与 0.01mol/L pH7.4 的 PBS 按 1∶1 混匀，再与 3% 的明胶 1∶1 混匀，静置 60min 沉降红细胞。吸上清离心，弃上清，用 PBS 制成单细胞悬液，叠加到相对密度 1.077 的淋巴细胞分离液上，2000r/min 离心 20min，取界面层，加 PBS 制成单细胞悬液，离心洗涤 3 次，弃上清。所得 MNCs 经台盼蓝染色、光学显微镜下计数，调整至适当细胞密度备用[2]。

1.3 细胞培养、观察及分组收集

所得细胞以 1.0×10^6 cm^2（T－25 培养瓶）的密度接种于含有 15% 胎牛血清的 IMDM 培养液中，置于 37℃、5% 的 CO_2、饱和湿度的孵箱内培养。细胞分为两组培养，一组不加任何诱导剂，在培养过程中，用倒置显微镜观察细胞形态的改变并照相；另一组加入 20ng/ml NGF 和 RA[2] 联合诱导培养，收集分离后 1h、培养后 36h、48h、72h、5d 后的细胞，调整细胞密度备用。

1.4 引物设计与合成

采用相关软件设计引物，并由赛百盛生物工程公司合成。Nestin 上游引物：5′ TCCTTTGACTTTC-CTTGTCTACCTCC 3′，下游引物：5′ AAATCTGAAACT-CAAGCACCA3′，Musashi－1 上游引物 5′ TAATTCCT-GTCCAGCAGTCTC 3′ 下游引物 5′ GAACCATCCCGTC-CTGTATCAT3′。

1.5 RNA 提取

取分离后 1h 细胞和培养 36h、48h、72h、5d 的细胞各 3×10^6 个，融于 1ml TRIZOL 试剂中，用吸管反复吹打后室温下孵育 5min。加入 0.2ml 氯仿，剧烈振荡后室温下 10min。4℃，12000r/min 离心 15min 后将上层无色液体移入新的 EP 管中。加入异丙醇，室温下放置 10min，4℃，12000r/min 离心 10min 弃上清。加入 75% 乙醇，4℃，7500r/min 离心 5min，弃去上清液，风干，加入 DEPC 处理的纯净水 40μl 溶解后，55℃孵育 15min。

1.6 RT－PCR

对所提 RNA 进行定量，取 1μgRNA 转录成 cDNA，在 EP 管中先后加入 $MgCl_2$ 2μl，10×PCRbuffer 1μl，RNase free H_2O 3.75μl，dNTP 1μl，RNase inhibor 0.25μl，AMV 逆转录酶 0.5μl，Oligo－dT 接头引物 0.5μl，RNA 样品 1μg，按照如下条件进行逆转录反应 30℃ 10min，48℃ 50min，99℃ 5min，50℃ 5min。合成的 cDNA 进行 PCR 扩增。在 EP 管中依次加入下列物质：Taq 酶 0.25μl，10×PCR buffer 10μl，纯净水 27.75μl，特异性上下游引物各 0.5μl，内对照 G_3PDH 上下游引物各 0.5μl（30μmol/L），cDNA 产物 10μl，按照以下条件进行 PCR 反应。94℃ 预变性 5 min，94℃ 30s，57℃ 30s，72℃ 30s，30 个循环后，72℃ 延伸 7 min。

1.7 扩增产物的检测

取 5μl PCR 扩增产物加样至含溴化乙锭（EB），10g/L 的琼脂糖凝胶中，在 5V/cm 下电泳 60min，紫外透视仪下观察结果，并用凝胶扫描成像系统照相，PCR 定量分析软件进行分析。

2 结 果

2.1 HCMNCs 培养前后不同时相的形态改变



图 1 培养前脐血细胞（×100）



图 2 培养 72h 脐血细胞（×100）

黑箭头示破骨样细胞，白箭头示纤维样细胞

培养前，HCMNCs 胞体较小，呈大小均一的圆形，直径约 17μm，颜色较深，在高倍镜下可见其不停振动，可在原地旋转，可两两细胞间接触后再分离。培养后，细胞胞体增大，有破骨样细胞和成纤维样细胞两种形态。破骨样细胞胞体较大，呈圆形，多个核。成纤维样细胞胞体呈长梭形，大小不等。形态类似于骨髓 MSCs，但较骨髓 MSCs 稍小。随着

维普资讯 http://www.cqvip.com

时间的推移，破骨样细胞减少而间质样细胞增多，伸出的突起变得更长。见图 1～3。

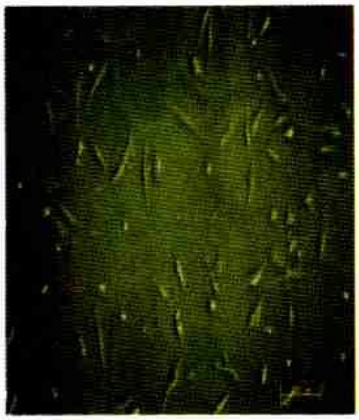


图 3 培养 5 天脐血细胞（×100）
箭头示梭形的成纤维样细胞

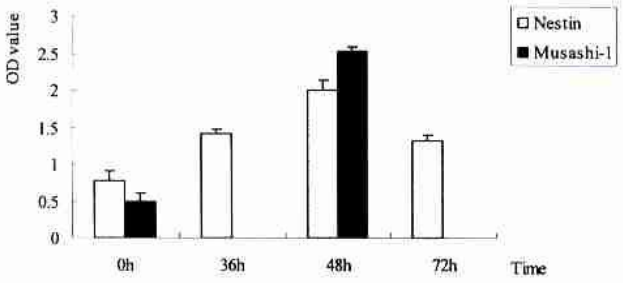


图 4 不同培养时间样本 PCR 光密度值

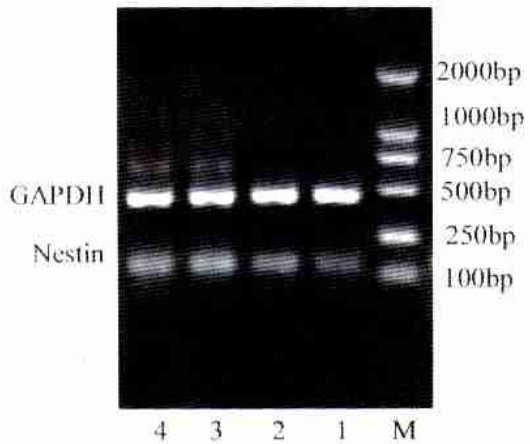


图 5 脐血单核细胞诱导前后 Nestin mRNA 的表达
1、诱导前的表达 2、诱导后 36h 的表达 3、诱导后 48h 的表达 4、诱导后 72h 的表达 M、PCR marker

2.2 PCR 结果统计学处理

将各样本的 PCR 光密度值除以各自内对照 GAPDH 的 PCR 平均光密度值，重复测量 5 次，以 $\bar{x} \pm s$ 表示各目的 mRNA。采用 SPSS 软件对数据进行重复测量数据的分析，显著性水准取 $\alpha = 0.05$。结果发现 Nestin RNA 在分离后 1h 细胞中低表达，培养后 36h 逐渐升高（$P < 0.05$），72h 后开始降低（$P < 0.05$）；Musashi－1RNA 在分离后 1h 细胞中低表达，培养 48h 后呈高表达（$P < 0.05$）。用 PCR 定量分析软件，分析各样本的 PCR 光密度，列表并建立柱形图。见表 1 及图 4。

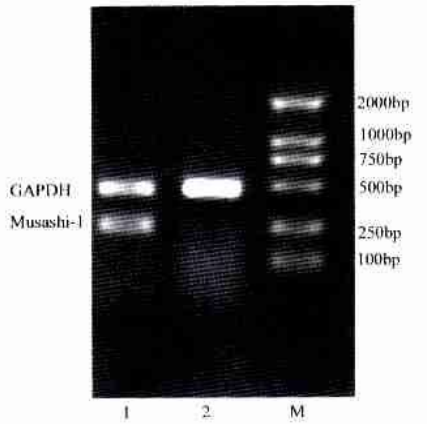


图 6 脐血细胞培养前后 Musashi－1mRNA 表达
1、诱导后 48h 的表达 2、诱导前的表达 M、PCR maker

表 1 不同培养时间样本 PCR 光密度值

	培养前	培养 36h	培养 48h	培养 72h
Nestin	0.78±0.12	1.42±0.05	2.00±0.13	1.32±0.08
Musashi－1	0.50±0.10		2.52±0.06	

3 讨 论

HCMNCs 是一个异质性的细胞群，其中含有大量间质来源和内皮来源的前体细胞及造血干细胞[2,3]，具有很强的的自我复制能力，能产生具有各种表型的子代细胞，在不同的诱导条件下可形成骨、软骨、脂肪、肌肉、肌腱、神经细胞等[4]，可作为组织工程的种子细胞。

国内外学者运用各种不同条件的培养方法从 HCMNCs 中分化出神经细胞。HCMNCs 在体外培养条件下，可向神经细胞转化[5]。如将 HCMNCs 植入发育中的大鼠脑内，可分化成神经元或神经胶质细胞[1]。这使 HCMNCs 移植治疗神经系统疾病成为可能。此外，有学者[6]采用负极免疫筛选及限制性稀释的方法，得到的细胞具有多系统分化潜能，表型与骨髓间质干细胞一致。证明可从脐血中分离出 MSCs，进而培养分化。同样可用流式细胞仪法和免疫磁珠法分离出脐血 MSCs，纯化后培养增殖，但操作方法复杂且花费高昂。本实验采用密度梯度离心法直接分离 HCMNCs，操作简便，保存了脐血干细胞的多种成分。

直到目前，对脐血中 MSCs 的有无一直争论不休，有实验室证实可以从脐血中培养出 MSCs[7-9]，

维普资讯 http://www.cqvip.com

但有的研究人员认为脐血中根本没有 MSCs[10,11]。我们的实验观察到,培养后 HCMNCs 的形态上明显不同于未培养的细胞。培养后细胞形态不一,有的胞体较大,呈扁平的圆形,有的胞体呈梭形。少量细胞在培养 5 天时可见细胞胞突伸长,呈长梭形,有的细胞伸出更长的细丝状突起,可能为成纤维细胞。实验结果在形态学上支持脐血 MSCs 的存在。

为了在体外条件下原位鉴定神经干细胞,Lendahl[12]等鉴定出一种神经元中间丝蛋白(Intermediate Neurofilament Protein)即巢蛋白(Nestin),其表达始于神经胚形成时,当神经细胞迁移基本完成后,巢蛋白的表达逐渐减少,并随神经细胞分化的完成而停止表达。此外,Sakakibara[13]等亦鉴定出一种 RNA 结合蛋白即 Musashi,作为神经干细胞的标志物。Reynolds[14,15]用特殊的 Neurosphere 法从胎鼠纹状体分离、培养得到的 NSCs 标记时发现,Nestin 和 Musashi 呈双重阳性,且随着 NSCs 分化成为神经元,二者的标记作用也随即消失。这说明 Musashi 具有与 Nestin 相似的细胞特异性和物种间保守性。Nestin 和 Musashi 作为早期原始神经细胞的标志物已被广泛地应用于 NSCs 的鉴定。本实验 RT - PCR 检测到,新鲜分离的 HCMNCs 弱表达 Nestin,不表达 Musashi - 1;诱导后,HCMNCs 的 Nestin mRNA 和 Musashi - 1 mRNA 表达量逐渐增强,48h 达到最强,进而逐渐减弱。这表明脐血细胞具有向神经细胞分化的潜能,且提示在向神经细胞转化过程中,脐血干细胞先分化为神经干细胞,再转化为神经元或神经胶质细胞。本实验新鲜分离的 HCMNCs 即有 Nestin 的表达。我们分析,可能是因为,Nestin 虽然在中枢神经系统发育过程中表达在神经上皮细胞中,但它并不是 NSCs 特有的标志,因神经祖细胞分化成的肌细胞、内皮细胞及反应性星形胶质细胞均可表达 Nestin[16~18]。所以新鲜分离的 HCMNCs 有弱表达的 Nestin,可能来源于本来就存在于 HCMNCs 中的 NSCs,也可能就是脐血干/祖细胞的表面标志。

当前有关脐血干细胞的研究多采用未经纯化的干细胞群进行,单个的成体干细胞或基因型相同的成体干细胞群体是否也具有分化为别种细胞的能力,迄今尚未见报道。关于如何纯化分离的脐血干细胞,仍需进一步研究。

参 考 文 献

[1] Zigova T, song S, willing AE, et al. Human umbilical cord blood cells express neural antigens after transplantation into the developing rat brain[J]. Cell Transplant, 2002; 11(3): 265 - 271.

[2] Boyer M, Townsend LE, Vogel LM, et al. Isolation of endothelial cells and their progenitor cells from human peripheral blood[J]. Vasc Surg, 2000; 31(1): 181 - 189.

[3] Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood[J]. Br J Haematol, 2000; 109(1): 235 - 242.

[4] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999; 284(5411): 143 - 147.

[5] Ha Y, choi JU, Yoon DH, et al. Neural phenotype expression of cultured human cord blood cells in vitro[J]. Neuralreport, 2001; 12(16): 3523 - 3527.

[6] Lee OK, Kuo TK. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood[J]. Blood, 2004; 103(5): 1669 - 1675.

[7] Azizi SA, Stokes S, Augelli BJ, et al. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in brain of albino rats - similarities to astrocyte grafts[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998; 95(7): 3908 - 3913.

[8] Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte - like cells[J]. J Clin Invest, 2002; 109(10): 1291 - 1302.

[9] Makino S, Fukuda K, Migoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro[J]. J Clin Invest, 1999; 103(5): 697 - 705.

[10] Kadiyala S, Young RG, Thide MA. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro[J]. Cell Transplant, 1997; 6(2): 125 - 134.

[11] Bicknese AR, Henderson V, Sinclair - Goodwin HS, et al. Cells derived from human fetal cord blood express markers for neurons, astrocytes and oligodendrocytes[J]. Exp Neurol, 2001; 170(2): 199 - 207.

[12] Lendahl U, Zimmerman LB, Mckay RDG. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein[J]. Cell, 1990; 60(4): 585 - 595.

[13] Sakakibara S, Okano H. Mouse - Musashi - 1: a neural RNA - binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cells[J]. Dev Bio, 1996; 176(2): 230 - 242.

[14] Reynold BA, Tetzlaff W, Weiss S, et al. A multipotent EGF - responsive striaal embryonic progenitor cell produce

(下转第 401 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

亦参与了肾脏高灌注、高滤过的形成[7]。本实验姜黄素治疗组大鼠肾脏 NO 含量较糖尿病组明显降低,表明姜黄素能降低早期糖尿病大鼠肾脏 NO 水平,这可能在其减轻糖尿病大鼠肾脏高滤过和肾脏肥大、改善肾脏结构和功能中发挥一定作用。已知姜黄素是一种 iNOS 抑制剂,同时它又是一种天然抗氧化剂,能清除各种自由基,Sreejayan 等报道它对超氧阴离子、NO 等都有很强的清除能力[8,9],所以姜黄素可能通过抑制 NO 合成或加速其清除从而使其在肾脏中含量降低。

另外,本研究发现,姜黄素治疗组大鼠与糖尿病组大鼠间血糖和糖化血红蛋白水平无明显差异,这表明姜黄素不能纠正糖尿病大鼠的糖代谢紊乱,它对糖尿病大鼠的肾脏保护作用与血糖水平无关。

总之,本研究表明姜黄素使早期糖尿病大鼠肾脏 NO 水平降低,这可能是其纠正糖尿病早期肾血流动学紊乱,减轻肾脏肥大,降低蛋白尿,改善肾功能的作用机制。

参 考 文 献

[1] Suresh Babu P, Srinivasan K. Amelioration of renal lesions associated with diabetes by curcumin in streptozocin diabetic rats [J]. Mol Cell Biochem, 1998; 181(1-2): 87-96.

[2] Suresh Babu P, Srinivasan K. Influence of dietary curcumin and cholesterol on the progression of experimentally induced diabetes in albino rat[J]. Mol Cell Biochem, 1995; 152(1): 13-21.

[3] 于德民,吴 锐,尹 潍,等. 实验性链脲佐菌素糖尿病动物模型的研究[J]. 中国糖尿病杂志, 1995; 3(2): 105-109.

[4] Wolf G, Ziyadeh FN. Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy[J]. Kidney Int, 1999; 56(2): 393-340.

[5] Chiarelli F, Cipollone F, Romano F, et al. Increased circulating nitric oxide in young patients with type 1 diabetes and persistent microalbuminuria: relation to glomerular hyperfiltration[J]. Diabetes, 2000; 49(7): 1258-1263.

[6] Veelken R, Hilgers KF, Hartner A, et al. Nitric oxide synthase isoforms and glomerular hyperfiltration in early diabetic nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2000; 11(1): 71-79.

[7] Thorup C, Ollerstam A, Persson AE, et al. Increased tubuloglomerular feedback reactivity is associated with increased NO production in the streptozotocin-diabetic rat[J]. J Diabet Complic, 2000; 14(1): 46-52.

[8] Zheng M, Ekmekcioglu S, Walch ET, et al. Inhibition of nuclear factor-kappaB and nitric oxide by curcumin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human melanoma cells [J]. Melanoma Res, 2004; 14(3): 165-171.

[9] Sreejayan, Rao IN. Nitric Oxide scavenging by curcuminoids[J]. J Pharm Pharmacol, 1997; 49(1): 105-107.

(上接第 355 页)

neurons and astrocytes[J]. Neurosci, 1992; 12(11): 4565-4574.

[15] Reynold BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian nervous system [J]. Science, 1992; 255(5052): 1707-1710.

[16] Clarke SR, Shetty AK, Bradley JL, et al. Reactive astrocytes express the embryonic intermediate neurofilament nestin [J]. Neuroreport, 1994; 5(15): 1885-1888.

[17] Frise´n J, Johansson CB, To ro k C, et al. Rapid, widespread, and longlasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury[J]. Cell Biol 1995; 131(2): 453-464.

[18] Johansson CB, Momma S, Clarke DL, et al, Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system[J]. Cell, 1999; 96(1): 25-34.