维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2004)05-0588-04

体内外环境对骨髓间充质干细胞向神经细胞分化的影响

卓本慧[1], 万 东[2], 江和碧[1], 罗 勇[2], 李廷玉[1]

(1.重庆医科大学儿科学院儿保科,重庆 400014;2.重庆医科大学临床学院神内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨体内外环境对骨髓间充质干细胞(MSCs)向神经细胞分化的影响。方法:①DAPI 体外标记 MSCs 后,直接注入大鼠大脑中动脉梗塞(MACO)模型($n=6$)的脑内,2 周后取脑组织,用免疫荧光检测 MSCs 来源细胞的巢蛋白(nestin)、微管相关蛋白-2(MAP-2)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)的表达。②体外用全反式视黄酸(ATRA)预诱导 24h 后,换用改良的神经细胞培养基(MNM)培养 18h,免疫组化检测 nestin、MAP-2、GFAP 的表达。结果:①植入 2 周后,MSCs 在注射部位及其周围广泛分布,仅有少许细胞表达 nestin、MAP-2 和 GFAP。②MSCs 在体外诱导后,nestin、MAP-2 的阳性率分别为(92.3±3.4)%和(89.6+3.3)%,但不表达 GFAP。结论:MSCs 在脑内向神经细胞转化的转化率较低,而在体外转化为神经元的转化率相当高,体内外环境对 MSCs 向神经细胞的分化的过程及机理存在较大差异。

【关键词】骨髓间充质干细胞;神经细胞;分化

【中国图书分类法分类号】Q592.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2003-12-22

Effects of environment in vivo and in vitro on the differentiation of bone mesenchymal stem cells into neural cells

ZHUO Benhui, et al

(*Department of Child Health Care, College of Pediatrics, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of environment in vitro and in vivo on the differentiation of bone mesenchymal stem cells (MSCs) into neural cells. *Methods*: ①MSCs were labeled with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and injected into the right brain of the rats(n=6), which had suffered from middle cerebral artery occlusion(MACO) a day before. Two weeks later, immunofluorescent staining was used to detect the expression of nestin, microtubule-associated protein 2 (MAP-2) and glial fibrillary acidic protein (GFAP). ②In vitro, MSCs were cultured with modified neuronal medium(MNM) for 18 hours after being pretreated with 0.5umol/L all-trans retinoid acid (ATRA) for 24 hours. Immunocytochemistry was used to detect the expression of nestin, MAP-2 and GFAP. *Results*: ①After being injected into rats for 2 weeks, MSCs survived in the ischemic areas and a few cells expressed nestin, MAP-2 and GFAP respectively. ②In vitro, after ATRA and MNM treatment, the positive percentage of nestin and MAP-2 were (92.3±3.4)% and (89.6±3.3)% respectively, but no expression of GFAP was detected. *Conclusion*: The different ratio of MSCs differentiating into neural cells suggests that there is difference in the process and mechanism between environment in vitro and in vivo.

【Key words】Mesenchymal Stem Cells; Neural cells; Differentiation

骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一种多潜能的干细胞,在适宜条件下,可以向骨、软骨、脂肪、心、肝、肺、神经等组织细胞转化[1]。其取材方便,体外扩增容易,免疫排斥反应小,已成为干细胞研究领域的热点。而体内的实验表明 MSCs 能在脑组织中存活并改善神经损伤症状[2]。但体内外 MSCs 向神经细胞转化是否存在差异,这对 MSCs 在神经疾病治疗中的应用尤为重要,本研究对此进行探讨。

作者介绍:卓本慧(1976-),女,硕士,
主要研究方向:骨髓间充质干细胞向神经细胞分化。

基金项目:国家自然科学基金(NO:30070382),
重庆市科委科学基金(渝科委计(2001)54 号文),
重庆市卫生局科学基金(渝卫科教(2001)46 号文)。

1 材料和方法

1.1 MSCs 的分离培养及体外标记

无菌条件下取 Wistar 大鼠的股骨和胫骨,DMEM/F12

维普资讯 http://www.cqvip.com

培养基冲洗骨髓腔，离心、去脂肪和上清后，以 3×10^6/ml 接种于培养瓶，用含 20% 胎牛血清的完全培养基培养。3 天后全量换液，去除未贴壁细胞。在 10－12 天细胞达到融合时，用 0.25% 的胰酶消化传代。

移植前 12h，体外培养 5－7 代的 MSCs 参照 Wang 等[3]的方法，用荧光染料 4,6－二脒基－2－苯基吲哚(DAPI, Pierce 公司)体外标记。细胞换液后加入 DAPI(终末浓度为 10ng/ml)共同培养 12h，然后倒掉培养基，PBS 缓冲液洗 6 次，去除未结合的 DAPI。最后消化细胞计数，并用 PBS 缓冲液将细胞浓度调整到 2×10^4/μl 待用。

1.2 大鼠大脑中动脉梗塞(middle cerebral artery occlusion, MACO)模型制作及 MSCs 植入

取成年雄性 Wistar 大鼠，体重 220－280g，水合氯醛(10%，0.3g/kg)腹腔注射麻醉后，采用经颈内动脉线栓法制备大鼠右侧 MACO 模型[4]。术后 1 天，用乌拉坦(10%，1ml/100g)腹腔注射麻醉后，切开大鼠头颅正中皮肤，分离筋膜，可见前囟和后囟。在右侧距正中线 2mm，与前囟同一水平处用 7 号针头打孔，有落空感即止。再用微量进样器在打孔处垂直进针 3mm，然后将含有约 1×10^6 MSCs 的 50ul 细胞悬液缓慢推注入脑组织(约 5min)。最后按压止血，缝合皮肤。术后大鼠普食单只分笼喂养。

在 MSCs 植入后 2 周，取右侧脑组织做冰冻切片，分别做 HE 染色和免疫荧光检测。一抗为小鼠抗大鼠巢蛋白(nestin, BD PharMingen 公司)、小鼠抗大鼠微管相关蛋－2(MAP－2, NeuroMarkers 公司)、小鼠抗大鼠胶质纤维酸性蛋白(GFAP, NeuroMarkers 公司)，二抗为 FITC 标记的羊抗小鼠 IgG(北京中山生物技术开发公司)。

1.3 体外诱导实验

体外培养 5－7 代的 MSCs，接种在放有消毒血盖片的 12 孔培养板中，达 70%－80% 融合时，进行 MSCs 向神经细胞分化的体外诱导实验。MSCs 在 0.5μmol/L 的 ATRA 预诱导 24h 后，换用改良的神经细胞培养基(Modified Neuronal Meudium, MNM, 由本实验室参照 Woodbury[5] 的方案自行配制)继续诱导 18h。然后检测 nestin、MAP－2、GFAP 的表达。一抗同前，免疫组化试剂盒和 DAB 显色盒购自北京中山生物技术开发公司。

2 结 果

2.1 MSCs 的体外标记

MSCs 与 DAPI 共同培养 12h 后，标记上的细胞在荧光显微镜下，核呈蓝色，其阳性率为 100%。

2.2 MACO 模型

大鼠接受 MACO 手术后 2h 左右苏醒，出现烦躁不安，左侧肢体无力，左前腿屈曲内旋，行走向

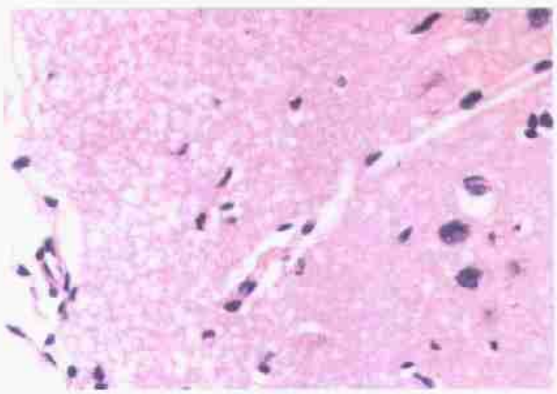


图 1A 正常对照 ×200

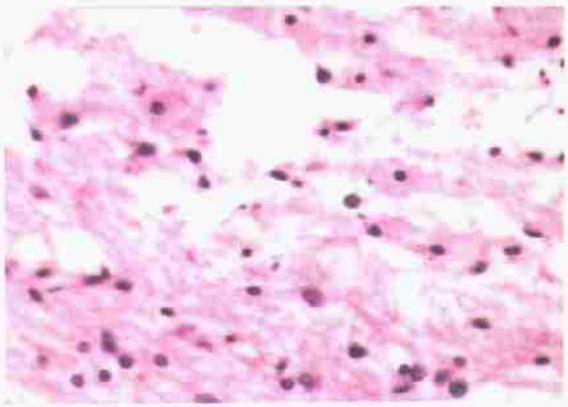


图 1B MACO 模型 2 周后的脑组织 HE 染色，可见明显坏死灶

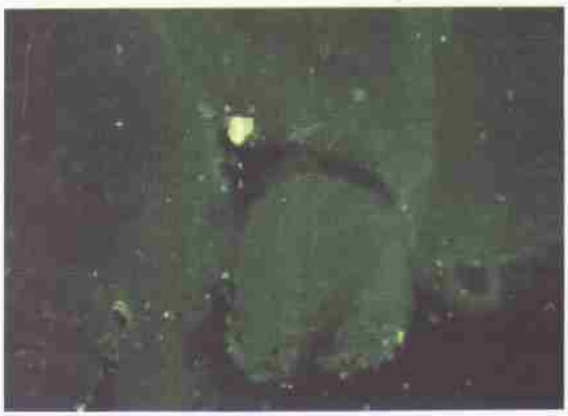


图 2A



图 2B 植入脑组织 2 周后，MSCs 存活并部份表达 MAP－2, GFAP (×100)(A、B 为同一视野)

维普资讯 http://www.cqvip.com

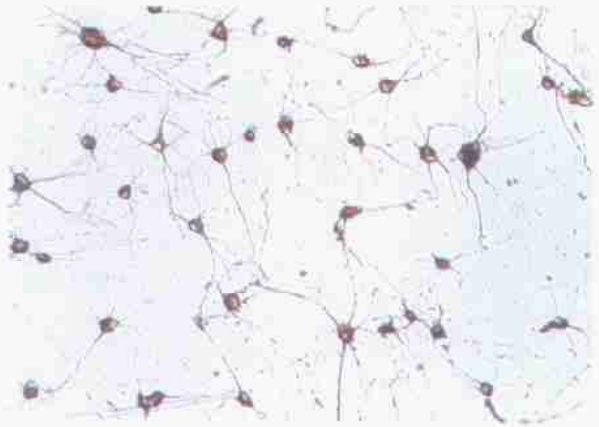


图 3A nestin (DAB 显色)



图 3B MAP－2 ×200 (DAB 显色,苏木素复梁核)

图 3 MSCs 体外诱导后,表达 nestin,MAP－2(×200)

左画圈,甚至跌倒,大鼠的神经损伤症状在术后 1～3 天中尤为明显。2 周后的脑组织 HE 染色,可见神经细胞的胞体缩小,胞浆呈均匀伊红着色,胞核浓缩深染,结构消失,神经组织灶性坏死和液化,呈疏松网状(图 1)。

2.3 在 MACO 大鼠脑内,部分 MSCs 存活、迁移并分化

MSCs 植入后的 1～2 天,大鼠的精神稍萎靡,进食较少,但在 2 -3 天后逐渐恢复。植入 2 周后,脑组织 HE 染色显示梗塞部位无淋巴细胞和中性粒细胞浸润;在荧光显微镜下,可见 MSCs 广泛分布在注射部位及周围;免疫荧光显示少许细胞 nestin、MAP－2 和 GFAP 染色阳性(图 2)。

2.4 在 ATRA 和 MNM 体外诱导后,MSCs 转变为神经细胞

在 ATRA 和 MNM 共同诱导后,MSCs 呈典型神经细胞样形态,伸出较多的突起,并有多级分支,细胞间及细胞自身突起间相互连接,呈网络状。但诱导过程中,可见到部分细胞漂浮、脱落、最终死亡。免疫组化显示 nestin、MAP－2 染色阳性,阳性率分别为(92.3±3.4)%和(89.6±3.3)%;GFAP 染色阴性(图 3)。

3 讨 论

标记外源性的 MSCs,是 MSCs 体内移植研究中的重要环节。DAPI 是一种蓝色荧光染料,可被不同时期的细胞摄取,标记细胞直接在荧光显微镜下识别。通过多次实验证实 DAPI 体外标记的阳性率达 100%,这与 Wang 等[3]DAPI 标记 MSCs 进行心脏移植研究的结果一致,提示 DAPI 标记细胞是一种行之有效的方法,这为进一步研究 MSCs 在脑内的存活迁移及分化奠定了基础。

经颈内动脉线栓法制备 MACO 模型是神经学中较常使用的模型。本实验大鼠在术后出现明显的神经损伤症状,脑组织 HE 染色可见梗塞灶,提示模型制作是成功的。国外学者报道:MSCs 在脑内的迁移方式与神经干细胞类似[6],而且能够通过血脑屏障到达脑组织,并大多集中在损伤脑组织[2]。在实验中,MSCs 植入 MACO 模型后 2 周,在注射部位及其周围广泛分布,提示 MSCs 在损伤的脑组织内能够存活并能向周围迁移。我们检测发现,在 MACO 脑组织中存活的 MSCs,仅有较少部分细胞表达神经细胞标志蛋白 nestin、MAP－2 及 GFAP,这与国外学者 Mahmood 等[7],Chopp[8]等的结果一致,Azizi 等[6]将 MSCs 植入正常脑组织,其 NeuN 的阳性率也仅为 1%～3%,提示植入脑内的 MSCs 仅少数分化为神经细胞。

用 ATRA 和 MNM 体外诱导 MSCs,其 nestin、MAP－2 的阳性率分别为(92.3±3.4)%和(89.6±3.3)%,不表达 GFAP,提示在本条件下 MSCs 在体外大多分化为神经元细胞;在体外诱导不到 2 天即可见细胞出现明显的死亡,与 MSCs 在脑组织中可存活 2 周有较大区别。以上提示 MSCs 在体内外环境中向神经细胞分化的过程及机理可能完全不同,存在较大的差异。

理论上大脑微环境能够提供神经细胞生存、分化所需的营养物质和细胞因子,是向神经细胞分化的最佳条件。为什么 MSCs 在此条件下,神经细胞的分化率较低目前尚不清楚,尚待进一步研究。尽管 MSCs 容易得到并易扩增,体外可跨胚层分化为神经细胞,可能成为神经细胞替代治(下转第 628 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

据。

综上所述,LVFX 注入球结膜下,在眼各组织中的峰浓度高,存留时间长,较滴入法更有利于治疗严重的细菌性角膜炎。但是,球结膜下注射是一种有创性的用药方式,反复球结膜下注射 LVFX,在局部是否会产生坏死或更严重的组织损伤,还有待于今后进一步研究。

参 考 文 献

[1] 王洪权,郭惠元.喹诺酮研究新进展[J].国外医药抗生素分册,1996;17(5):367-379.

[2] 陈 樱,喻长泰,甘晓萍.左氧氟沙星治疗细菌性角结膜炎的疗效[J].中国新药杂志,2001;10(3):216-218.

[3] 雷嘉川,张如鸿,罗顺德,等.反相高效液相色谱法测定洛氟沙星的血药浓度[J].药物分析杂志,1997;17(5):295-297.

[4] Fu KP, Lafredo SC, Foleno B, et al. In vitro and in vivo antibacterial activities of levofloxacin(L-ofloxacin), an optically active ofloxacin[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1992;36(4):860-866.

[5] Fiscella RG, Nguyen TK, Cwik MJ, et al. Aqueous and vitreous penetration of levofloxacin after oral administration[J]. Ophthalmology, 1999;106(12):2286-2290.

[6] 孙 航,杨淑群,周远大,等.左旋氧氟沙星的兔眼通透性研究[J].重庆医学,1998;27(6):398-399.

[7] 陈 悦,张俊杰,陈祖基.左氧氟沙星滴眼液的兔眼内药代动力学研究[J].眼科研究,2001;19(5):429-431.

[8] Marrakchi-Benjaafar S, Cochereau I, D'Hermies F, et al. Tolerability, kinetics, and efficacy of subconjunctival pefloxacin in pigmented rabbits[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1995;39(4):834-838.

[9] Lee TW, Robinson JR. Drug delivery to the posterior segment of the eye: some insights on the penetration pathways after subconjunctival injection[J]. J Ocul Pharmacol Ther, 2001;17(6):565-572.

(上接第 590 页)疗的供体细胞,但是其在体内脑组织中的分化及作用机制显然有较大差异。因此,MSCs 在体内外的定向诱导及机制研究仍是未来干细胞研究的热点。

值得注意的是,本实验为同种异体移植,但在实验中没有使用免疫抑制剂,而大鼠在 MSCs 植入后并没有出现不适的症状,在脑组织切片中也没有发现明显的炎性反应和淋巴细胞浸润。本课题组曾将人的 MSCs 从尾静脉植入 BALB/c 小鼠体内,小鼠存活 1 月并未观察到任何异常症状(资料未列出)。以上提示 MSCs 引起的免疫排斥反应小,机体可以耐受,有望用于神经细胞替代治疗。

参 考 文 献

[1] Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, et al. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potemial applications[J]. Stem cells, 2001;19(3):180-192.

[2] Chen J, Li Y, Wang L, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats[J]. Stroke, 2001;32(4):1005-1011.

[3] Wang JS, hum-Tim D, Galipeau J, et al. Marrow stromal cells for celluar cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2000;120(5):999-1005.

[4] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989;20(1):84-91.

[5] Woodbury D, Schwardz EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differemiate into neurons[J]. J Neuronsci Res, 2000;61(4):364-370.

[6] Azizi SA, Strokes D, Augelli BJ, et al. Engraftment and migrate of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats similarities to astrocytes grafts[J]. Proc. Natl Acad SciUSA, 1998;95(7):3908-3913.

[7] Mahmood A, Lu D, Yi L, et al. Intracranial bone marrow transplantation after traumatic brain injury improving functional outcome in adult rats[J]. J Neurosurg, 2001;94(4):589-595.

[8] Chopp M, Zhang XH, Li Y, et al. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation[J]. Neuroreport, 2000;11(13):3001-3005.