DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.12.017
第26卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 12
2004年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2004

文章编号:1000-5404(2004)12-1075-04

论著

小鼠骨髓基质细胞诱导分化为神经细胞的实验研究

王宇飞,杨 萍,应大君 (第三军医大学基础医学部解剖学教研室,重庆市生物力学实验室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨小鼠骨髓基质细胞体外诱导及向神经细胞方向分化。方法 从小鼠骨髓中分离培养骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSC),应用碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF),维甲酸(retinoic acid, RA),二甲亚砜和神经生长因子(nerve growth factor, NGF)对细胞诱导分化,72 h后对细胞表达神经微丝蛋白(NF-200),胶质原性纤维酸性蛋白(GFAP),纤维结合素(fibronectin)的结果进行荧光和组化检测。结果 诱导72 h后细胞形态类似神经细胞改变,免疫组化显示约60%细胞分化为NF-200阳性细胞,约50%细胞分化为GFAP阳性细胞,同时细胞fibronectin表达明显降低,与对照组比较相差显著。结论 维甲酸,神经生长因子,二甲亚砜,碱性成纤维细胞生长因子的联合作用可体外诱导骨髓基质细胞向神经细胞分化。

关键词:骨髓基质细胞;诱导;分化
中图法分类号:R322.8;R329.24 文献标识码:A

Experimental study of the mouse bone marrow stromal cells differentiated into neural-like cells

WANG Yu-fei, YANG Ping, YING Da-jun (Department of Anatomy, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the growth and differentiation of the cultured mouse bone marrow stromal cells *in vitro* into neural-like cells. Methods Bone marrow stromal cells (BMSCs) isolated from mice were cultured according to the routine method, and induced to differentiate by basic fibroblast growth factor b (bFGF), retinoic acid (RA), nerve growth factor (NGF), and dimethylsulfoxide (DMSO). Expressions of neural microfilament protein (NF-200), glial fibrillary acidic protein (GFAP), and fibronectin at 72 h after inductin were determined by immunoflurenscence and immunocytochemicalmethod. Results At 72 h after inductin, neural-like changes were found in BMSCs. Immunohistochemical stain showed that 60% BMSCs differentiated into NF-200 positive cells, and about 50% BMSCs into GFAP-positive cells. Fibronectin expression was significantly lower as compared with that in the control group. Conclusion Combined action of RA, bFGF, NGF, and DMSO can induce BMSCs to differentiate into neural-like cells *in vitro*.

Key words: bone marrow stromal cell; induction; differentiation

骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSC)是成年个体骨髓细胞中去除造血干细胞(非黏附细胞)之外的细胞部分,近年来的研究证明其具有多向分化的潜能,包括向神经干细胞转化,并可进一步分化为神经元和神经胶质细胞[1,2]。本实验以小鼠BMSC为研究对象,观察其在体外向神经细胞诱导分化的情况,旨在为BMSC将来的应用做基础性研究。

1 材料与方法

1.1 材料

昆明小鼠8~10周龄(第三军医大学实验动物中心提供),DMEM/F12培养基(HyClone公司),D-Hanks液,碱性成纤维细胞生长因子(Invitrogen公司),维甲酸(Sigma公司),二甲亚砜,β-巯基乙醇BME(Sigma公司),神经生长因子NGF,胎牛血清FBS(HyClone公司),胰岛素,黄体酮,胶质原性纤维酸性蛋白GFAP抗体(Sigma公司),神经微丝蛋白抗体(Sigma公司),纤维结合素抗体工作液(中山公司)。

1.2 方法

1.2.1 BMSC分离与培养 根据Schwarz等[2]的方法适当改进,小鼠引颈处死75%乙醇浸泡10 min,无菌条件下取出小鼠的股骨和胫骨。将骨的两端剪去后,用含2%FBS的D-Hanks缓冲液冲洗骨髓2~3次,冰上放置,并用滴管吹打数次,70目滤网过滤。然后将细胞悬液移入离心管,1 000 r/min离心5 min。最后将细胞沉淀用20%FBS+DMEM/F12(含青霉素100 IU/ml,链霉素100 μg/ml)滴管吹打悬浮,进行细胞计数,调整细胞密度为4×10^5个/ml,接种于培养瓶内,放置于37 ℃,5%CO_2 95%湿

作者简介:王宇飞(1977-),男,云南省昆明市人,硕士研究生,主要从事干细胞方面的研究。电话:(023)66987577
通信作者:应大君,电话:(023)68752226,E-mail:ydj96@yahoo.com.cn
收稿日期:2004-03-25;修回日期:2004-05-30

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

度孵箱培养。24 h 后换液，尽量去除未贴壁细胞，每隔 2～3 d 换液 1 次，待贴壁细胞 90%融合后传代。传代采用机械吹打的方法将贴壁细胞吹下，按照 1∶2 方式传代。

1.2.2 诱导分组及诱导分化 取第 4 代培养细胞接种于 24 孔板中，先进行 24 h 预诱导，预诱导剂 1 ml 含 10%FBS，DMEM/F12，5 μg/ml 胰岛素，20 nmol/L 黄体酮，20 mmol/L 葡萄糖，10 ng/ml bFGF。诱导组以 10%FBS，DMEM/F12 为基础分别加入 0.5 μmol/ml RA，10 BU/ml NGF 和 2% DMSO。并设对照组（只含 10%FBS，DMEM/F12），诱导 72 h 后分别做荧光及组化鉴定。于倒置显微镜下观察细胞生长及分化。

1.2.3 免疫荧光细胞鉴定 室温下 4%多聚甲醛固定 15 min，PBS 冲洗后 NF-200 兔抗（1∶1 000），GFAP 兔抗（1∶100），fibronectin 人抗，孵育，4 ℃过夜，加 Cy3 荧光标记二抗，荧光显微镜观察，记录。

1.2.4 免疫组化细胞鉴定和检测 免疫组化鉴定：先室温下4%多聚甲醛固定 15 min，PBS 冲洗，3%甲醇过氧化氢 15 min，PBS 冲洗，0.4%TritonX-100 孵育 20 min，PBS 冲洗，分别加入一抗：NF-200 兔抗（1∶1 000），GFAP 兔抗（1∶100），fibronectin 人抗，4 ℃过夜，加生物素化二抗羊抗兔 IgG，湿盒 37 ℃，30 min，PBS 冲洗，加入酶联三抗，湿盒 37 ℃，30 min，PBS 冲洗，DAB 显色，脱水，透明，封片。光镜下随机选取 10 个非重叠视野（100 X），以明显棕色和深棕色细胞计为阳性，淡棕色和浅色细胞计为阴性，两者之和计为总细胞数。计算 GFAP，NF-200，fibronectin 阳性细胞分别占总细胞数的比例。

1.3 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 统计软件处理，两组间差异比较选用 t 检验。

2 结果

2.1 形态学观察

最初分离的细胞呈悬浮状态，6 h 后即可见开始有细胞贴壁，24 h 后贴壁细胞增多，胞体逐步呈扁平的梭形、多角形。4 d 左右，原代细胞可均匀长满瓶底，此时细胞的形态为长梭形，多角形，有不规则突起，进行传代。传至 3～4 代后贴壁细胞基本纯化。培养基置换为预诱导剂后细胞分裂减慢，突起变短。培养基置换为诱导剂后细胞出现收缩变圆，胞体透明。诱导 24 h 后，诱导组细胞突起伸出，变细，变长，呈双极和多极，部分细胞周围有光晕。诱导 72 h 后，诱导组细胞突起继续伸长，部分细胞出现类似于神经元轴突的单个长突起（图 1）。外形观察诱导组中神经元样细胞可继续长期生长。对照组细胞无明显形态改变，并可继续传代培养。

2.2 细胞鉴定

免疫荧光显示诱导 72 h 后，诱导组中出现明显 GFAP 和 NF-200 阳性细胞（图 2、3）。免疫组化显示诱导 72 h 后，诱导组中出现大量 GFAP 和 NF-200 阳性细胞（图 4、5），阳性细胞占总细胞数的比例较对照组有明显增加（表 1）。对照组 fibronectin 阳性细胞较多（图 6），而在诱导组中 fibronectin 阳性细胞比例则明显减少（$P<0.01$）。

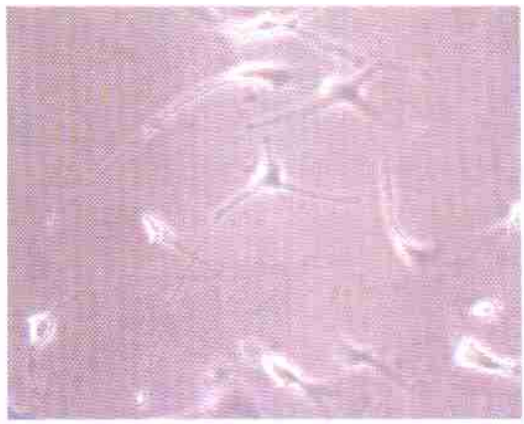


图 1 RA＋NGF＋DMSO 诱导组，诱导后 72 h （未染色，倒置显微镜下×200）

Fig 1 Differentiation of BMSC with RA＋NGF＋DMSO for 72 h (inverted light microscopy × 200)

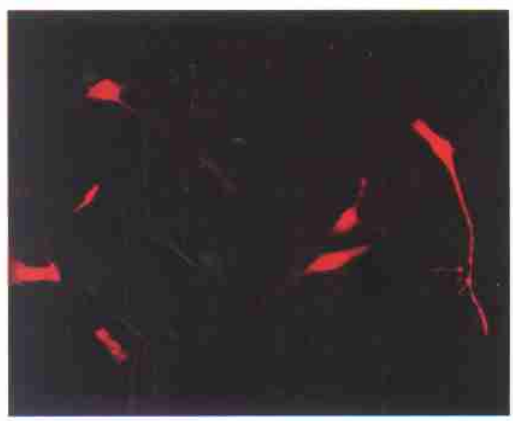


图 2 RA＋NGF＋DMSO 诱导组，诱导后 72 h，NF-200 阳性细胞（荧光染色×200）

Fig 2 NF-200 positive cells, differentiated from BMSC with RA＋NGF＋DMSO for 72 h (Fluorescein staining × 200)

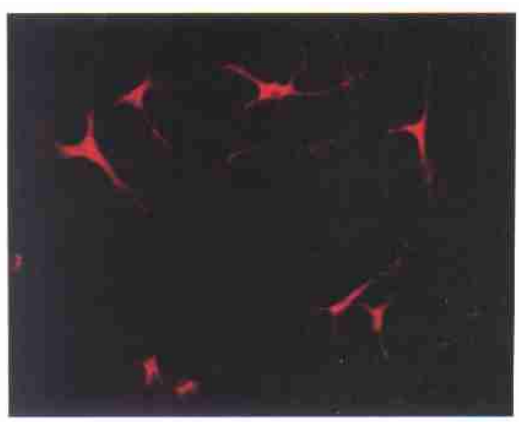


图 3 RA＋NGF＋DMSO 诱导组，诱导后 72 h，CFAP 阳性细胞（荧光染色×200）

Fig 3 GFAP postive cells, differentiated from BMSC with RA＋NGF＋DMSO induced for 72 h (Fluorescein staining × 200)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



图 4　RA＋NGF＋DMSO 诱导组, 诱导后 72 h, GFAP 免疫组化阳性细胞　(SABC× 200)

Fig 4　GFAP positive cells, differentiated from BMSC with RA＋NGF＋DMSO induced for 72 h　(SABC × 200)

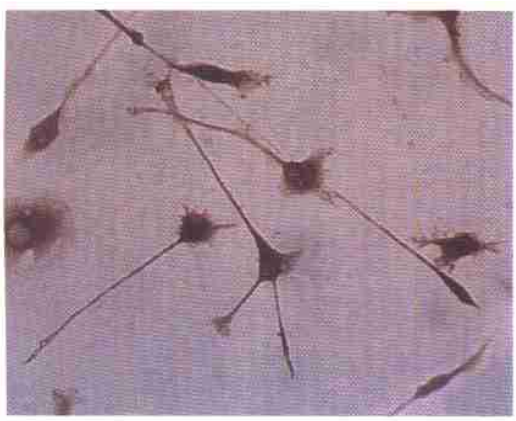


图 5　RA＋NGF＋DMSO 诱导组, 诱导后 72 h, NF-200 免疫组化阳性细胞　(SABC× 200)

Fig 5　NF-200 postive cells, differentiated from BMSC with RA＋NGF＋DMSO induced for 72 h　(SABC ×200)



图 6　对照组诱导后 72 h, Fibronectin 免疫组化阳性细胞, 免疫组化　(SABC× 100)

Fig 6　Differentiated from BMSC in control group for 72 h　(SABC ×200)

表 1　小鼠骨髓基质细胞分化为 GFAP, NF-200, fibronectin 免疫组化阳性细胞比例

Tab 1　Percentages of immunopositive BMSCs differentiated into GFAP, NF-200, and fibronetion (%)

Group	RA＋NGF＋DMSO	Control
NF-200 positive	60.8±5.7 **	8.9±2.3
GFAP positive	52.8±4.8 **	11.2±3.9
Fibronectin positive	12.3±6.9 **	83.2±6.4

**: $P<0.01$, *vs* control

3　讨论

传统观点认为骨髓基质细胞 BMSC 主要功能是参与造血干细胞的生存和分化的微环境, 近年来的研究表明 BMSC 可以定向分化为成骨细胞, 软骨细胞, 脂肪细胞, 肌肉细胞等[3], 最近的研究表明人和小鼠 BMSC 在一定条件下可诱导分化为神经细胞。这显示出 BMSC 具有超越同胚层分化限制, 向其他胚层细胞分化的更加广泛的多分化潜能。目前的研究中体内和体外实验, BMSC 分化为神经细胞的比例有很大差异[4~6], 说明这种分化还很不稳定。对于 BMSC 分化为神经细胞的机制尚不十分清楚, 目前有 4 种学说对于 BMSC 细胞所表现出来的多能性作出解释: ①骨髓组织中存在静息的多潜能干细胞; ②骨髓中有来源于其他组织的未被认识的多能祖细胞; ③细胞先去分化后的再分化或者转分化; ④细胞通过融合而获得多能性[7,8]。

本实验选取分离小鼠 BMSC, 培养中细胞贴壁迅速, 生长增殖能力很强, 连续传代 10 代后仍可保持旺盛分裂能力。运用 bFGF, RA, NGF, DMSO 等作为体外诱导剂, 成功使小鼠 BMSC 向 GFAP 和 NF-200 表达阳性细胞转化。诱导组中 GFAP 和 NF-200 阳性细胞比例阳性率达 50% ~ 60%, 与对照组差异显著 ($P<0.01$), 同时这些细胞的 fibronectin 表达显著降低, 说明它们已由成纤维细胞向其他细胞分化。通过多种因子运用证明了 BMSC 分化为神经细胞的可行性, 和本方法诱导的有效性。NF-200 是神经元标志物, GFAP 是星型胶质细胞标志, 本实验中 NF-200 阳性细胞比例与 GFAP 阳性细胞比例之和大于 100%, 说明有一部分细胞可能既表达 NF-200 也表达 GFAP, 这也许是细胞分化后一种不稳定的表现, 具体原因有待进一步研究证实。

RA 是一种强烈的分化诱导剂, 主要通过细胞表面 RA 受体 RARs 和 RXRs 起作用, 在 BMSC 中, 有 RA 受体的大量表达, RA 在体内对神经系统的分化发育具有多方面的作用, 能促进神经嵴前体细胞的生存、增殖及诱导其向神经元细胞分化[9]。实验中的 RA 浓度对小鼠 BMSC 向神经样细胞分化有明显的诱导作用。NGF 对交感和感觉神经元生长、分化、存活和功能特性的表达, 具有重要的调节作用, 对 MSC 向神经细胞诱

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

导可能起到支持和导向作用，能使神经样细胞诱导后长期存活。

近年 BMSC 跨胚层分化的研究有很大进展，骨髓基质细胞能在体内外分化为神经细胞，对治疗中枢系统疾病有很大的潜在运用价值，与其他干细胞应用于治疗相比有显著的优越性，首先，骨髓细胞容易获得；其次，BMSC 在体外增殖速度快，不必进行永生化就可得到足够量的细胞用于移植；第三，BMSC 能够进行自体移植，克服免疫障碍。但目前仍然有很多机制性的问题尚不清楚，对于体外分化的神经细胞是否能在体内发挥完整的生物学功能还是有待进一步研究探讨。

参考文献：

[1] Prockop D J. Marrow stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues[J]. Science, 1997, 276(5309): 71－74.

[2] Sanchez R J, Song S, Cardozo-Pelaez F, *et al*. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*[J]. Exp Neurol, 2000, 164(2): 247－256.

[3] 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.

[4] Munoz Elias G, Woodbury, Black I B, *et al*. Marrow stromal cells, mitosis and neuronal differentiation: stem cell and precursor functions[J]. Stem Cells, 2003, 21(4): 437－448.

[5] Weimann J M, Charlton C A, Brazelton T R, *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.

[6] Caplice N M, Bunch T J, Stalboerger P G, *et al*. Smooth muscle cells in human coronary atherosclerosis can originate from cells administered at marrow transplantation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(8): 4754－4759.

[7] Verfaillie C M. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency[J]. Trends Cell Biol, 2002, 12(11): 502－508.

[8] Song S, Sanchez Ramos J. Brain as the Sea of Marrow[J]. Exp Neurol, 2003, 184(1): 54－60.

[9] Carpenter M K, Cui X, Hu Z Y, *et al*. *In vitro* expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells[J]. Exp Neurol, 1999, 158(2): 265－278.

（编辑 汪勤俭）

（上接 1070 页）

3.2.2 人工气腹并发症 ①高碳酸血症：因 CO_2 弥散入血发生。出现呼吸浅慢、CO_2 分压升高，吸氧可促进 CO_2 的吸收；②皮下气肿：主要是穿刺孔切口过大或腹膜被切开，使气体漏至皮下，多发生于胸腹部，局部有捻发音、握血感，一般毋须特别处理，24～48 h 多能自行吸收[3]。

3.2.3 肛门护理 由于术后多出现水样泻，对肛门周围的皮肤有一定的刺激，定时检查肛门，随时清洁排泄物，并用皮肤保护膜（3M 公司）喷洒肛周，减少肠液对肛周皮肤的刺激，保持肛周清洁，防止皮肤破溃或感染。

3.3 管道护理

妥善固定各管道，防止堵塞、扭曲、受压，保持通畅，记录引流液的量或性状。术后 2～3 d，待肠蠕动恢复，肛门排气后拔除胃管。术后 3～4 d，若尿量、颜色、性状正常，拔除尿管。拔管前先间断夹管，每 4 小时开放一次，训练膀胱张力。进食流质 1～2 d 后，若腹腔引流液无脓性液体、引流量明显减少或无，可拔除腹腔引流管。

3.4 饮食指导

在术后早期会出现大便次数增多，由每日 10 余次到每日 20 余次不等，可口服异蒙停对症处理，具体剂量应根据病人对药物的反应情况作出个体化调整，使大便次数保持在 3～4 次/d，必要时肛周涂抹皮肤保护膜防治皮肤糜烂。注意饮食的调节，防止进食纤维过多而引起排便次数增加，也不可进食过精而再至便秘[4]。平时应少吃辛辣等刺激性过强的食物，以免刺激肠蠕动过强而至腹泻。

4 讨论

腹腔镜全结肠切除治疗慢传输性便秘在国内属微创外科首创，开展时间短、项目新。围手术期护理无现成的经验可借鉴，因此围手术期的护理尚处于临床探索阶段，我科在心理护理、肠道准备、饮食指导及肛门的护理已取得了一些成功的经验。

顽固性慢传输性便秘患者往往病史较长，存在不同程度的心理障碍，如焦虑、抑郁、烦躁等。术前应仔细了解不同病人的心理需求，耐心疏导。向患者讲解手术治疗的必要性和目的，让患者了解过去的成功病例，使之建立信心。

术后对腹泻的及时处理也是护理的关键点。应提前准备好异蒙停备用。一旦患者出现腹泻，及时予以口服异蒙停。针对不同患者患者个体化调整剂量，争取用最小的剂量将患者的大便次数控制在 5 次/d 以下，切不可剂量过大[5]。

腹腔镜全结肠切除创伤小、恢复快、住院时间短[6]。本组病人出院时大便次数每日 1～5 次，生活能自理。围手术期周到细致的护理不仅是手术成功的重要保证，同时也提高了病人的生活质量。

关键词：腹腔镜；全结肠切除术；慢传输性便秘；护理
中图法分类号：R473.6 文献标识码：B

参考文献：

[1] 刘宝华. 便秘的诊断及治疗[M]. 北京：军事医学科学出版社，2002. 165－181.

[2] 童卫东，刘宝华，张胜本，等. 顽固性慢传输性便秘的外科治疗及病因研究[J]. 中华胃肠外科杂志，2002，5(4)：266－268.

[3] 陈增蓉，戴红霞，成翼娟，等. 腹腔镜低位直肠癌全直肠系膜切除保肛根治术的护理[J]. 中华护理杂志，2002，37(12)：897－899.

[4] 张胜本. 便秘临床基础[M]. 北京：科学技术文献出版社，1997. 62.

[5] 黄显凯，张胜本，张连阳，等. 慢传输性便秘手术治疗的评价[J]. 第三军医大学学报，2000，22(5)：462－464.

[6] 丁 婷，韩逮宇，巩 芬. 全结肠切除围手术期的护理[J]. 齐鲁护理杂志，2002，12(8)：922.

（编辑 张 宁）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net