DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.11.004
第25卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 11
2003年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2003

文章编号:1000-5404(2003)11-0941-04

论著

成人骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞的体外研究

李云玲,陈 笛,王 璐,江和碧,卓本慧,梁 熙,李廷玉 (重庆医科大学附属儿童医院中心实验室,重庆 400014)

提 要:目的 探索成人骨髓间充质干细胞在体外定向分化为神经元样细胞的条件。方法 采用Ficoll-paque(1.077 g/ml)分离液密度梯度离心从人的骨髓分离出骨髓间充质干细胞,体外扩增到第10代,选择4组不同组合的神经分化诱导条件,分别诱导骨髓间充质干细胞向神经元细胞分化,通过免疫细胞化学鉴定诱导后细胞神经元烯醇化酶、神经丝蛋白、胶质纤维酸性蛋白的表达情况。结果 各组诱导剂诱导后,骨髓间充质干细胞分化为具有典型的神经元形态的细胞,免疫细胞化学显示、NF-M呈强阳性反应,NSE表达强度提高,在最佳的分化条件下,即加入bFGF、ATRA、BME、BHA、DMSO诱导条件下,大约80%细胞表达NF-M,86%的细胞为NSE强阳性。结论 成人MSCs在体外可定向诱导分化为神经元样细胞,且具有较高的阳性分化率。

关键词:骨髓间充质干细胞;神经分化
中图法分类号:R322.71;R329.21 文献标识码:A

Differentiation of human adult mesenchymal stem cells into neuron-like cells *in vitro*

LI Yun-ling, CHEN Di, WANG Lu, JIANG He-bi, ZHUO Ben-hui, LIANG Xi, LI Ting-yu (Central Lab, Children's Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To investigate the conditions of the oriented differentiation of human adult mesenchymal stem cells (MSCs) into neuron-like cells *in vitro*. Methods MSCs were isolated from human adult bone marrow through density gradient with Ficolll-paque (1.077 g/ml) and then amplified as undifferentiated cells for 10 generations. Four different groups of neural differentiation-inducing conditions were selected for the induction of MSCs differentiation into neuronal cells, respectively. The expressions of neuron-specific enolase (NSE), neurofilament protein (NF-M) and glial fibriliary acidic protein (GFAP) were detected by immunocytochemistry. Results MSCs were induced to differentiate into cells with a typical neuronal morphology, expressing NF-M and increased levels of NSE. The induced neuron-like cells extended long processes and filopodia. Under an optimal differentiation condition, i.e. after treatment with ATRA, bFGF, BME and DMSO, almost 80% of the cells expressed NF-M and 86% of the cells expressed intensively NSE. Conclusion MSCs can be induced to differentiate into neuron-like cells with high positive rate of induced differentiation.

Key words: mesenchymal stem cells; neural differentiation

骨髓中除存在造血干细胞,还含有另一类干细胞,即骨髓间充质干细胞(Mesenchymal stem cell, MSCs),其具有多向分化潜能,在不同的诱导条件下可分化为多种组织细胞,如成肌细胞、成骨细胞、脂肪细胞[1]、肝细胞[2]、心肌细胞[3]、肺细胞[4]。MSCs取材方便,在体外培养能保持未分化状态,遗传背景稳定,体内植入反应弱,是组织工程理想的细胞来源。神经细胞移植是治疗神经系统疾病有效的方法,MSCs有望成为神经移植的理想的供体细胞。近年来,国外多个实验组报道了MSCs能转化为神经元样细胞,但大部分报道存在的问题是体内外MSCs向神经元样细胞转化的阳性率较低,因此本研究的目的拟在探索体外提高MSCs定向分化为神经元样细胞阳性率的诱导条件,以便为临床运用MSCs治疗神经系统多种疾病提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 骨髓标本 来源于非造血系统疾病的胸外科手术中无菌条件下摘取的成人肋骨。

1.1.2 细胞培养试剂和诱导剂 DMEM/F12(Hyclone公司)、胎牛血清(Fetal bovine serum, Hyclone公司)、全反维甲酸(All-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070382);高等学校骨干教师资助项目(教技司2000-06);重庆市教委科学基金资助项目(99-0001)

作者简介:李云玲(1974-),女,四川市南充市人,硕士研究生,助教,主要从事间充质干细胞和组织工程方面的研究,现在苏州大学附属儿童医院儿童保健科。电话:(023)63632756-3566

收稿日期:2002-03-01;修回日期:2002-08-01

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

trans-retinoic acid, ATRA Sigma 公司)、重组人碱性成纤维细胞生长因子(Recombinant human bFGF, rh-bFGF 邦定公司)、二巯基乙醇(β-mercaptoethanol, BME Sigma 公司)、3-叔丁基-4 羟基茴香醚(Butylated hydroxyanisole, BHA 中国医药集团上海化学试剂公司)、二甲亚砜(Dimethyl sulphoxide, DMSO 苏州工业园区正兴化工研究院)、Ficoll-Paque 分离液(密度 1.077 kg/m^{3}天津市 TBD 生物技术发展中心)。

1.1.3 主要抗体 小鼠抗人神经元特异性烯醇化酶单克隆抗体(Monoclonal mouse anti-human neuron specific enolase, NSE)、小鼠抗人神经丝蛋白单克隆抗体(Monoclonal mouse anti-human neurofilament, NF-M)、小鼠抗人胶质纤维酸性蛋白单克隆抗体(Monoclonal mouse anti-human glia fibrillary, GFAP)。以上抗体均购自北京中山生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 MSCs 的分离 无菌条件下挤出骨髓,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12,充分混合,转入离心管,1 000 r/min 离心,弃上清液及脂肪层,加入培养基充分混匀后,轻轻叠加到密度为 1.077 kg/m^3 的 Ficoll-Paque 分离液上,1 500 r/min 离心 20 min,取单核细胞层,用 DMEM/F12 洗两次。

1.2.2 MSCs 扩增和纯化 在细胞沉淀中加入 DMEM/F12 培养基,计数细胞数,调整细胞浓度,按 3×10^6/ml,接种于含 6 ml 10%FBS+DMEM/F12 培养基的 50 ml 的塑料培养瓶中,放置于 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度的 CO_2 孵箱内培养,4 d 后全量换液,弃掉未贴壁细胞,以后每 3、4 d 更换培养液 1 次,细胞达 80% 融合后用 0.25% 胰酶的消化液 37 ℃消化 5 min,1 000 r/min 离心,弃上清重新悬浮细胞,每瓶细胞重新接种到 3 个培养瓶,反复传代扩增纯化。

1.2.3 诱导骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞 选第 9 代细胞,调整细胞浓度为 3×10^5/ml,按 1 ml/孔,接种于放有消毒盖玻片的 24 孔板内,培养液仍为含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12,并分别加入以下 4 组神经分化诱导条件,见表 1,对照组不加任何诱导剂。

表 1 4 组不同的神经分化诱导条件

Tab 1 4 different groups of neural differentiation-inducing conditions

Group	Neuronal differentiation conditions		
	First day	Second day	Third day
1	1 mmol/L BME	5 mmol/L BME	200 μmol/L BHA+2% DMSO
2	0.5 μmol/L ATRA	5 mmol/L BME	200 μmol/L BHA+2% DMSO
3	10 ng/ml bFGF	5 mmol/L BME	200 μmol/L BHA+2% DMSO
4	0.5 μmol/L ATRA +10 ng/ml bFGF	5 mmol/L BME	200 μmol/L Ll BHA+2% DMSO

1.2.4 以第 4 组诱导剂为诱导条件观察不同时间 MSCs 转化为神经元样细胞形态、数目的变化 选择传代至 9 代的 MSCs,以 3×10^5/ml 接种于放有盖玻片的 24 孔板内,培养体系仍为含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12,并加入第 4 组诱导剂。观察诱导期间细胞形态数目的变化。以后每 3、4 天换含 DMSO、BHA 的新鲜的培养液,观察至加入 DMSO、BHA 后 10 d。

1.3 免疫细胞化学检测神经细胞的抗原表达

取生长有细胞的盖玻片,采用 SP 方法进行免疫细胞化学染色,细胞盖玻片用 4% 多聚甲醛固定 30 min,3% H_2O_2 封闭 10 min,山羊血清封闭 10 min,分别加入小鼠抗人 NSE、NF-M、GFAP 单克隆抗体,并设阴性对照,用 PBS 液代替一抗,37 ℃孵育 1 h,加入生物素标记的二抗,室温 10 min,再加入辣根过氧化物酶标记链霉卵白素,室温孵育 10 min,DAB 显色,中性树胶封片。

1.4 统计学处理

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验和方差分析。

2 结果

2.1 MSCs 分离、扩增纯化

用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基,在塑料培养瓶中培养骨髓单个核细胞,第 4 天通过全量换液逐渐去除未贴壁细胞,此时贴壁细胞呈单个分散或几个细胞的克隆,细胞形态较均匀,呈长梭形,贴壁的 MSCs 迅速增殖,14 d 左右每个克隆约含 200~300 个细胞,培养至 18~21 d 细胞达 80%~90% 融合,见图 1,传代后细胞 24 h 内完全贴壁,7~10 d 达到完全融合,传至 6 代,细胞形态很均匀。



图 1 20 d 贴壁的原代 MSCs (S-P×400)

Fig 1 Primary passage of MSCs on 20th day (S-P×400)

2.2 神经分化情况

2.2.1 不同的神经分化条件诱导 MSCs 分化为神经元样细胞的情况 在光镜下随机选择视野(×100),每张载片计数 300 个细胞,共计数 10 张载片,计算 NSE(阳性强度为++计算为阳性)、NF-M 阳性细胞数占总细胞数的比例,将 10 组数据输入计算机,求出阳性率。各组诱导条件诱导后 NF-M 的阳性率见表 2,并由此得出结论,各组的诱导阳性率都较高,在 4 组中,第 4 组诱导剂诱导后阳性率最高($P<0.05$)。

表 2 诱导后的细胞 NF-M 的阳性情况($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Positive rate of NF-M in cells after induction($\bar{x}\pm s$)

Group	Positive rate of cell for NF-M(%)
1	60.13±2.02
2	69.58±2.21
3	74.01±3.15
4	80.52±2.07*

*: $P<0.05$ *vs* group 1, 2 and 3

2.2.2 诱导分化后观察细胞形态、数目的变化 加入 BME 5 h 后观察到扁平宽大的长梭形细胞胞质向核收缩,变为不规则形和圆形,加入 DMSO、BHA 5 h 后细胞变为多角形、梭形,并观察到部分细胞死亡,加入 DMSO、BHA 36 h 后呈神经元样细胞形态,细胞长出较长的突起,呈双极、多极型,但细胞数目无明显

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

增加。对照组细胞形态无变化, 仍呈扁平宽大的长梭形。

2.2.3　神经元样细胞表达 NF-M 和 NSE 的情况　　MSCs 对诱导剂反应快速, 在第 4 组诱导条件下, 加入诱 ATRA/ bFGF 诱导 1 d 后约 30%的细胞 NF-M 阳性, 诱导 3 d 阳性率达约 80%, 见图 2, 以后较稳定地表达 NF-M; 对照组 MSCs 较弱的表达 NSE, 但实验组 NSE 的阳性强度显著提高, 84 h 后阳性率为 86.13% ±2.23%, 见图 3; 对照组 NF-M 阴性; 各个诱导时期 GFAP 均为阴性, 见图 4。诱导后的细胞在含 DMSO、BHA 的培养液中 10 d 仍然能存活, 而且能持续表达 NSE、NF-M。



图 2　神经元样细胞 NF-M 染色阳性　(S-P× 100)

Fig 2　Positively stained for NF-M to neuron-like cell　(S-P× 100)



图 3　神经元样细胞 NSE 染色阳性　(S-P× 400)

Fig 3　Positively stained for NSE to neuron-like cell　(S-P× 400)

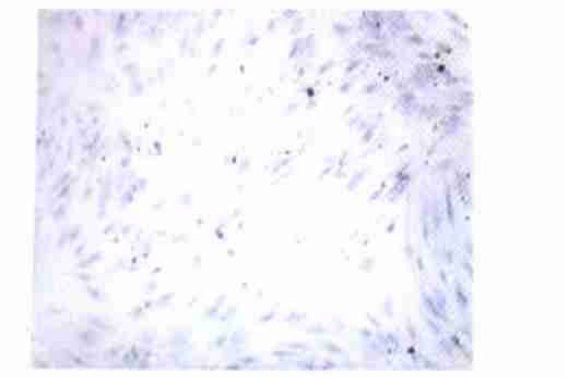


图 4　神经元样细胞 GFAP 染色阴性　(S-P× 100)

Fig 4　Negatively stained for GFAP to neuron-like cell　(S-P× 100)

3　讨论

在骨髓中 1×10^5 ~ 1×10^6 个单核细胞约含有 1 个 MSCs, 所以体外扩增纯化 MSCs 显得很重要, 由于当前尚未发现 MSCs 的特异性表面标记, 目前对 MSCs 的分离培养仍是在 Friedenstein 方法基础上进行改进, 根据 MSCs 贴壁生长特性去除未贴壁细胞, 随着 MSCs 传代扩增, 逐渐去除其他少量贴壁的造血细胞和成纤维细胞, 并通过反复传代, MSCs 呈优势生长, 细胞形态趋于一致, MSCs 得自然纯化, 实验中观察到细胞传至第 6 代后细胞形态均匀, 纯度高, 用于诱导阳性转化效率高, 本实验的诱导分化的细胞均选纯度高的第 9 代细胞。MSCs 在体外培养能保持未分化状态, 本实验 MSCs 扩增到第 10 代, 观察到 MSCs 向神经元细胞分化的潜能并未随扩增代数增加而消失, 这为脑功能重建所需足够的细胞数提供了可能。

迄今为止, 国内外有少许关于 MSCs 体外向神经细胞转化的报道, Sanchez-Ramos 等[5] 用神经营养因子及 ATRA 为诱导剂建立了体外诱导大鼠和人的 MSCs 向神经细胞分化的培养体系, 但神经元样细胞的阳性转化率仅 0.5%; Deng 等[6] 用 IBMX/ dbCAMP 为诱导剂, 诱导人的 MSCs 向神经元样细胞分化的阳性率为 25%; Woodbury 等[7] 以 bFGF、DMSO、BME、BHA 为诱导剂, 诱导大鼠的 MSCs 向神经元样细胞分化, 阳性率为 78%。项鹏等[8] 分别用硫代甘油、二巯基乙醇为诱导剂诱导人的 MSCs, NSE 的阳性率为(76.8±2.7)%、NF-M 为(75.2±2.3)%, 但是该方法仅观察中加入 BME 后 5 h 神经元样细胞表达 NF-M、NSE 的情况, 本实验诱导后加入 BHA 和 DMSO, 诱导后的神经元样细胞在 BHA、DMSO 的维持下能存活至少 10 d, 而且持续稳定的表达 NSE、NF-M, 本实验未做更长时间的观察。本实验不同组的诱导条件均取得较好的诱导结果, 在 MSCs 定向诱导分化为神经元样细胞的较佳诱导条件, 即第 4 组诱导条件下, NF-M 的阳性率达到 80%, NSE 的阳性率达到 86%。我们的研究结果与其他实验小组的报道吻合, 证明了 MSCs 能定向诱导分化为神经元样细胞, 但本实验在 Woodbury 的基础上加入了 ATRA, 提高了 MSCs 向神经元样细胞分化的阳性率, 阳性率高于其他作者的报道, 可能的原因是由于加入了不同的诱导剂, 不同的诱导剂诱导 MSCs 向神经元样细胞转化的能力不一样。由于 Sanchez 等[5] 用 ATRA 和神经营养因子成功的将 MSCs 诱导分化为神经细胞, 以及 Li 等[9] 用 ATRA 诱导胚胎干细胞向神经细胞分化的成功, 而且 ATRA 在脑发育的早期, 对脑各部分

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

沿神经板头尾轴区域性分布，神经嵴的形成、迁移、分化，菱脑、小脑、中脑的发育均有重要作用，而 bFGF 与神经系统的发生、发育有十分重要的作用，其参与神经板诱导，具有抑制 BMP 的作用，促进外胚层细胞向神经元分化，因而认为 ATRA 和 bFGF 对神经系统的发生、发育起重要作用，所以本实验模拟神经系统发生、发育的条件，发现ATRA 与 bFGF 联合使用为较佳的神经分化诱导条件，能协同作用诱导 MSCs 向神经元样细胞分化，MSCs 对 ATRA/bFGF 作用反应快速，ATRA/bFGF 诱导 MSCs1 d 后，显现约 30％的 NF-M 阳性。BME 与 BHA 均为抗氧化剂，既可部分诱导 MSCs 向神经元样细胞分化的作用，同时在抗氧化剂存在的条件下适合神经细胞的生长，实验中观察到 BME、BHA、DMSO 为维持诱导后的神经元样细胞存活和持续表达神经元样细胞标志的条件，在诱导分化后如果撤除这些成分，细胞大部分死亡和表现为NSE、NF-M 阴性。

有实验报道MSCs较弱地表达NSE，本实验也显示未分化 MSCs很弱地表达NSE，加入诱导剂后，NSE 阳性强度显著提高；NF-M 仅在神经元表达，实验组 NF-M 呈阳性，并随着神经元分化及成熟，含量逐渐提高；诱导后的细胞呈神经元样形态，而且随着神经元分化成熟，神经元不再增殖，数量不再增加；诱导后的细胞 GFAP 阴性，证明诱导后的细胞是神经元样细胞，而非神经胶质细胞。

综上述实验结果，提示 MSCs 成功地转化成了神经元样细胞，但是，需要进一步通过电生理学、细胞超微结构等手段进一步鉴定转化后的神经元样细胞是否具有神经元的功能。

这是国内外首次报道了ATRA 与 bFGF 联合运用，诱导人 MSCs 分化为神经元样细胞，并具有较高阳性率。

参考文献：

[1] Bianco P, Pobey P G. Marrow stromal stem cells[J]. J Clin Invest, 2000, 15(12): 1663－1668.

[2] Petersen B E, Bowen W C. Bone marrow as a source of hepatic ovalcells [J]. Science, 1992, 284(5417): 1168－1170.

[3] 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.

[4] Pereira R F, O'Hara M D, Halford K W, *et al*. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone and lung in irradiated mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(11): 4857－4861.

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

[6] 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 Commum, 2001, 282(1): 148－152.

[7] Woodbury D, Schwarz E J, Prockp D J, *et al*. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons[J]. J Neurosci Res, 2000, 61(4): 364－370.

[8] 项 鹏，夏文杰，张振光，等. 成人骨髓间充质干细胞定向诱导为神经元样细胞的研究[J]. 中国病理生理杂志，2001，17(5)：385－387.

[9] Li M, Pevny L, Lovel-Badge R, *et al*. Generation of purified neural precursors from embryonic stem cell by lineage selection[J]. Curr Biology, 1998, 8(17): 971－976.

（编辑 冷怀明）

（上接 937 页）

2 结果

200例患者前牙隐形义齿修复后，经 3 年以上随访观察，效果满意 192 例占 96％；义齿脱落 4 例占 2％；牙龈糜烂 1 例占 0.5％；隐形卡环折断 3 例占 1.5％。

3 讨论

由于前牙缺失的患者很多，其中大多数人对仪容要求高。前牙隐形义齿修复方法，因其体积小、无金属卡环外露、真实感强、基托薄、异物感小、不影响发音，隐形义齿的形态合适、色泽自然等等优势，从而能满足患者的特殊要求。

前牙隐形义齿在临床应用中也有其利弊，最常见的是对牙龈的压迫。由于长期的使用，基托边缘相应的粘膜易红肿、充血。其次是因经常取戴而引起的卡环逐渐变形折断，不利于隐形义齿的固位。

为防止患者初戴隐形义齿时义齿对牙龈的压迫痛，基托边缘在转入粘膜组织面处，应适当调磨。变形的卡环可在 60 ℃左右的水温中泡上 5 min，待卡环和基托软化后，用手指将卡环和基托固定在合适的位置就可以复位。

关键词：前牙；隐形义齿；卡环

中图法分类号：R783.6 文献标识码：B

参考文献：

[1] 李新春，席建成. 口腔修复新技术－全塑弹性义齿(隐形义齿)[J]. 口腔医学，1997，17(1)：50.

（编辑 薛国文）

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