

碘对骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞存活时间的影响***

阎文柱, 秦书俭, 刘学政, 李德华

Iodine effect on survival time of neuron-like cells differentiated from bone marrow mesenchymal stem cells

Yan Wen-zhu, Qin Shu-jian, Liu Xue-zheng, Li De-hua

Department of
Anatomy, Liaoning
Medical University,
Jinzhou 121001,
Liaoning Province,
China

Yan Wen-zhu★,
Master, Associate
professor,
Department of
Anatomy, Liaoning
Medical University,
Jinzhou 121001,
Liaoning Province,
China
1078607311@qq.
com

Supported by: the
Foundation of
Department of
Education of Liaoning
Province, No.
2006T063, 2008422*

Received: 2010-01-06
Accepted: 2010-02-05

Abstract

BACKGROUND: *In vitro* experiment has shown that the survival time of conventional chemical induction-induced neuron-like cells differentiated from bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) was short, which limited its further application. With regard to the possibility of extension of iodine-induced neuron-like cells, the survival time has not yet been professionally reported.

OBJECTIVE: To research the effects of the micro-element iodine on the survival time of neuron-like cells differentiated by BMSCs.

METHODS: Rat mesenchymal stem cells at passage 3 were obtained under sterile condition, and divided into groups A-F. In group A, iodine ion was not added. In groups B-F, iodine ion at mass concentrations of 2, 55, 90, 125 and 2 500 mg/L was added respectively. An additional blank control group was established, and simultaneously the cells were induced into neuron-like cells with dimethyl sulphoxide (DMSO). Cells following induction were subjected to immunohistochemistry. Survival time of neuron-like cells was observed under different mass concentrations of iodine ion.

RESULTS AND CONCLUSION: When mass concentrations of iodine ion were between 55 - 125 mg/L, the survival time of neuron-like cells prolonged to about 5 days and structures of induced cells were intact. From then on, the number of dead cells was gradually increased till approximately one week, all neuron-like cells died. When mass concentrations of iodine ion were 2 mg/L and 2 500 mg/L, cell survival time was from 12-36 hours. No significant difference was determined compared with group A. Till 2 or 3 days, all neuron-like cells died. Above-described results indicated that an appropriated concentration of iodine iron added in the common chemical induction may be benefit for the survival time of the neuron-like cells differentiated by BMSCs, but the effect may be negligible for the survival time of neuron-like cells induced when the added concentration of iodine iron is too low or too high.

Yan WZ, Qin SJ, Liu XZ, Li DH. Iodine effect on survival time of neuron-like cells differentiated from bone marrow mesenchymal stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2010;14(10): 1716-1720.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 体外实验中人们发现, 常规化学诱导剂诱导骨髓间充质干细胞分化的神经元样细胞存活时间较短, 这就限制了其进一步的应用。关于碘是否可以延长诱导的神经元样细胞的存活时间尚未见系统报道。

目的: 观察微量元素碘对由骨髓间充质干细胞分化成的神经元样细胞存活时间的影响。

方法: 无菌条件下取大鼠第3代间充质干细胞, 分为A~F组: A组不加碘离子, B~F组中分别加入质量浓度为2, 55, 90, 125和2 500 mg/L的碘离子, 另设空白对照组, 同时加化学诱导剂二甲亚砜向神经元方向诱导分化。对诱导后的细胞进行免疫组织化学检测, 观察诱导的神经元样细胞在不同质量浓度碘离子下的存活时间。

结果与结论: 加入的碘离子质量浓度在55~125 mg/L时, 细胞存活时间可达到5 d, 镜下细胞结构完整, 5 d后随培养时间的延长, 死亡细胞逐渐增多, 至1周左右, 神经元样细胞几乎全部死亡。碘离子质量浓度为2 mg/L和2 500 mg/L时, 细胞存活时间为12~36 h, 和未加碘离子组差异无显著性意义, 至两三天, 神经元样细胞几乎全部死亡。提示适当浓度的碘离子加入到常规化学诱导剂中, 可延长骨髓间充质干细胞分化的神经元样细胞的存活时间; 加入到化学诱导剂中的碘离子质量浓度过低或过高时, 不改变骨髓间充质干细胞分化的神经元样细胞的存活时间。

关键词: 碘; 骨髓间充质干细胞; 分化; 神经元样细胞; 存活时间

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.10.002

阎文柱, 秦书俭, 刘学政, 李德华. 碘对骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞存活时间的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(10):1716-1720. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

体外实验中人们发现, 常规化学诱导剂诱导骨髓间充质干细胞(BM-MSCs)分化的神经元样细胞存活时间较短, 这就限制了其进一步的应用, 所以人们开始致力于延长体外诱导的神

经元样细胞存活时间的研究。有学者用脑源性生长因子将间充质干细胞诱导分化为神经元样细胞^[1-4]; 余勤等^[5]用丹参注射液诱导骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞, 但生长因子和中药中发挥作用的成分还不清楚。近来人们发现, 微量元素碘可促进体外培养的神经细胞的存活和成熟。张占元^[6]发现碘化钾可促进胎脑

辽宁医学院解剖
学教研室, 辽宁省
锦州市 121001

阎文柱★, 男,
1964年生, 辽宁
省朝阳市人, 汉
族, 2003年东北
财经大学毕业, 硕
士, 副教授, 主要
从事神经生物学
研究。
1078607311@
qq.com

中图分类号:R394.2
文献标识码:A
文章编号:1673-8225
(2010)10-01716-05

收稿日期:2010-01-06
修回日期:2010-02-05
(20100106019/
G-Q)

细胞的增殖和DNA的合成; Glazner等^[7-10]发现碘可以促进胰岛素生长因子受体(IGFR)的表达, 胰岛素生长因子通过和胰岛素生长因子受体的结合可促进神经轴突的再生和生长; Von Agoston等^[11-16]发现碘可使立早基因*c-fos*的表达增强, 原癌基因*c-fos*的表达与神经元的成熟有关。

目前, 关于碘是否可以延长诱导的神经元样细胞的存活时间尚未见报道, 因此本实验将微量元素碘加入到常规化学诱导剂中, 观察其对由骨髓间充质干细胞分化的神经元样细胞存活时间的影响; 旨在为延长体外由骨髓间充质干细胞分化神经元样细胞的存活时间提供一条可行性途径。

1 材料和方法

设计: 细胞学体外对比观察。

时间及地点: 于2009-03/10在辽宁医学院解剖学实验室完成。

材料: SD大鼠20只, 体质量100~200 g, 雌雄不拘, 由辽宁医学院动物实验中心提供(医动字第SCXY(辽)2003-2007号)。实验过程中对动物处置方法符合动物伦理学要求^[17]。

KI(沈阳化学制药厂), Nestin兔抗大鼠多克隆抗体、NSE兔抗大鼠多克隆抗体(武汉博士德), Masson三色染色试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司)。

方法:

大鼠骨髓间充质干细胞原代培养和传代培养: 高糖培养基冲洗大鼠骨髓腔, 冲出液经过滤和离心种植于25 cm²培养瓶中, 种植密度为1×10⁹ L⁻¹, 细胞长至80%~90%融合时, 进行传代, 具体步骤参见参考文献[18]。

实验分组: 分组如下, 另设空白对照组, 碘离子质量浓度的设定参照文献[19]。

分组情况:

组别	处理方式
A组	诱导剂中不含碘离子
B组	诱导剂中含有 2 mg/L 的碘离子
C组	诱导剂中含有 55 mg/L 的碘离子
D组	诱导剂中含有 90 mg/L 的碘离子
E组	诱导剂中含有 125 mg/L 的碘离子
F组	诱导剂中含有 2 500 mg/L 的碘离子

二甲基亚砜(DMSO)对大鼠骨髓间充质干细胞的诱导: 取第3代细胞, 消化、吹打后种植于置有细胞爬片的六孔培养板中(细胞爬片事先经过多聚赖氨酸处理), 种植密度1×10⁸ L⁻¹, 加高糖培养基完全培养基(含有体积分数为10%的胎牛血清); 当细胞长至80%~90%融合时, 弃除培养基, 加入预诱导液(含高糖完全培养基、20 g/L的DMSO和体积分数为20%的胎牛血清), 培养24 h后, 去

除预诱导液, PBS冲洗, 加入诱导液(含无血清的高糖培养基、20 g/L的DMSO)进行诱导; 空白对照组培养液中不加DMSO。

诱导细胞的免疫组织化学检测: 细胞长至融合状态时, 取出细胞爬片, PBS洗涤3次, 40 g/L多聚甲醛固定30 min, PBS洗涤3次, 0.2%Triton-x100 PBS液渗透细胞10 min, 50 g/L山羊血清封闭30 min, 去除残液, 加入兔抗大鼠NSE、兔抗大鼠Nestin多克隆抗体, 4℃孵育12 h, PBS洗涤3次, 以后步骤按照试剂盒说明书进行操作; 倒置显微镜下观察并拍照, 阳性细胞胞浆呈棕色, 计算阳性细胞占细胞总数的百分比。

神经元样细胞存活时间的观察: 在培养的不同时间段(3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 4 d, 5 d), 用0.12 g/L锥虫蓝对神经元样细胞染色10 min, 40 g/L多聚甲醛固定30 min, 倒置显微镜(×100)下进行观察; 6孔培养板中每个孔随机观察10个视野并记录每个视野中未被染色的细胞数量, 取平均值作为存活细胞数。

主要观察指标: ①大鼠骨髓间充质干细胞培养形态变化。②诱导后细胞的免疫组化结果。③碘对诱导后细胞存活时间的影响。

设计、实施、评估者: 设计、实施、评估均为本文作者, 均经过正规培训, 采用盲法评估。

统计学分析: 由第一作者进行统计学处理。实验数据用SPSS 13.0软件进行分析, 采用随机区组设计的方差分析, 两两样本之间进行*q*检验, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 大鼠骨髓间充质干细胞培养结果 细胞经过传代以后, 形态均匀一致, 为典型的长梭形细胞, 7 d左右可长满瓶底, 见图1。通过更换培养液和传代, 细胞逐渐得以纯化; 当细胞传到6代以后, 随传代次的增加, 死亡细胞逐渐增多, 细胞传代能力逐渐下降。



Figure 1 The third passage of rat bone marrow mesenchymal stem cells following cultured for 7 days, with uniform cell morphology, showing a typical long spindle-shape (×200)

图1 大鼠骨髓间充质干细胞第3代培养7 d细胞形态。可见细胞形态均匀一致, 呈现典型的长梭形(×200)

2.2 诱导细胞的免疫组化鉴定 诱导5 h后的细胞中Nestin、NSE、GFAP均有表达(胞浆中有棕黄色颗粒者为阳性), 经统计, Nestin、NSE的表达率分别为(76.23±3.16)%, (74.48±0.69)%, 说明诱导后的细胞大部分为神经元样细胞, 见图2, 3; 空白对照组细胞不着色, 形态几乎没有变化。



Figure 2 Nestin immunohistochemical staining in rat bone marrow mesenchymal stem cells nerve-induced cells, positive cells stained brown cytoplasm (× 1 000)
图2 大鼠骨髓间充质干细胞神经诱导细胞免疫组化 Nestin 染色, 阳性细胞胞浆染成棕红色(×1 000)

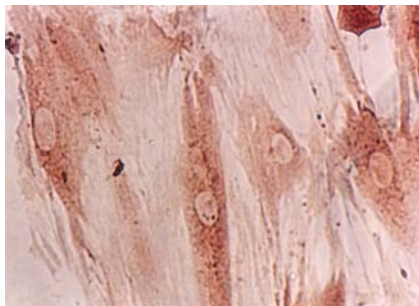


Figure 3 Neuron specific enolase (NSE) immunohistochemical staining in rat bone marrow mesenchymal stem cells nerve-induced cell, positive cells stained brown cytoplasm (× 1 000)
图3 大鼠骨髓间充质干细胞神经诱导细胞免疫组化 NSE 染色, 阳性细胞胞浆被染成棕黄色(×1 000)

2.3 碘对诱导细胞存活时间影响的结果 碘离子质量浓度为55~125 mg/L时, 细胞存活时间可达到5 d, 镜下细胞结构完整, 5 d后随培养时间的延长, 死亡细胞逐渐增多, 至1周左右, 神经元样细胞几乎全部死亡; 未加碘离子对照组细胞存活时间约12~36 h, 镜下细胞结构基本正常, 以后随培养时间的延长, 死亡细胞逐渐增多, 至两三天时, 神经元样细胞几乎全部死亡; 加入的碘离子质量浓度为2 mg/L和2 500 mg/L时, 细胞存活时间和未加碘离子对照组差异无显著性意义。碘对诱导细胞存活时间的影响见表1~4。

表1 诱导的神经元样细胞在培养不同时间的存活数量
Table 1 Survival number of induced neuron-like cells at various time points (x̄±s, n=10, cells)

Group	t (culture)			
	3 h	6 h	12 h	24 h
A	75.02±2.14	81.09±0.26	51.05±2.08	37.24±1.19
B	79.42±2.47	79.89±1.81	60.13±0.32	42.16±2.18
C	82.42±1.35	84.79±1.28	89.04±2.14	98.87±3.77
D	68.02±1.07	72.13±0.42	69.34±2.13	95.46±2.09
E	76.08±0.46	78.16±1.26	83.22±2.04	95.06±0.13
F	73.26±2.12	75.16±1.13	53.05±1.83	40.28±0.14

Group	t (culture)			
	48 h	72 h	4 d	5 d
A	8.15±0.37	2.04±1.26	1.08±0.21	1.02±0.13
B	15.43±1.39	4.06±3.07	1.98±0.41	0.94±0.05
C	96.53±2.02	86.04±1.16	70.49±0.95	38.04±1.21
D	92.38±0.71	96.25±1.14	73.83±1.15	41.95±2.21
E	95.17±1.24	88.04±2.13	71.02±0.11	38.87±1.49
F	11.43±1.27	7.95±2.40	3.17±0.48	0

A, B, C, D, E, F groups: without iodine ion, inductors containing 2, 55, 90, 125, 2 500 mg/L iodine ion groups respectively

表2 碘和培养时间对神经元样细胞存活数量的影响(随机区组方差分析)

Table 2 Iodine and culture time effects on survival number of neuron-like cells (randomized blocks analysis of variance)

Variation source	SS	V	MS	F	F _{0.05}	F _{0.01}
Total variation	43 388.71	59				
Culture time	17 486.40	7	2 498.06	2.68	2.21	3.04
Various iodine ion concentrations	24 244.85	5	4 848.97	6.68	2.41	3.42
Error	1 657.46	47				

表3 各加碘组与对照组之间的神经元样细胞存活时间对比结果

Table 3 Comparison results of survival time of neuron-like cells between groups (q test)

Comparison group	a (number of group)	Q	q critical value		P
			P=0.05	P=0.01	
B and A groups	2	0.90	2.86	3.82	> 0.05
C and A groups	3	14.21	3.44	4.37	< 0.01
D and A groups	4	15.07	3.79	4.70	< 0.01
E and A groups	5	15.33	4.04	4.93	< 0.01
F and A groups	6	2.46	4.23	5.11	> 0.05

A, B, C, D, E, F groups: without iodine ion, inductors containing 2, 55, 90, 125, 2 500 mg/L iodine ion groups respectively

由表1统计结果可看出, 碘离子质量浓度在55~125 mg/L时, 细胞存活时间较长; 碘离子质量浓度为

2 mg/L和2 500 mg/L时, 细胞存活时间较短。

由表2统计结果可看出, 对于培养时间来说, $F_{0.05(7,47)}=2.21<2.68$, $P<0.05$, 按照 $\alpha=0.05$ 水平, 可认为神经元样细胞在不同培养时间的存活数量差异有显著性意义; 对于不同碘离子质量浓度来说, $F_{0.01(5,47)}=3.42<6.68$, $P<0.05$, 按照 $\alpha=0.05$ 水平, 可认为不同的碘离子浓度对神经元样细胞的存活数量有明显影响。

由表3统计结果可看出, 按照 $\alpha=0.05$ 水平, 尚不能认为B组和A组之间神经元样细胞的存活时间不同; 按照 $\alpha=0.05$ 水平, 尚不能认为F组与A组之间细胞存活时间不同; 按照 $\alpha=0.05$ 水平, 可认为C组与A组、D组与A组、E组与A组之间细胞存活时间明显不同。

表4 各适度加碘组细胞存活时间之间的对比结果
Table 4 Comparison results of survival time among each group (q test)

Comparison group	a (number of group)	Q	q critical value		P
			P=0.05	P=0.01	
C and D groups	2	1.50	2.86	3.82	> 0.05
D and E groups	2	0.37	2.86	3.82	> 0.05
C and E groups	3	1.12	3.44	4.37	> 0.05

C, D, E groups: inductors containing 55, 90, 125 mg/L iodine ion groups respectively

由表4统计结果可看出, 按照 $\alpha=0.05$ 水平, 尚不能认为C、D、E组之间细胞存活时间有差别。

3 讨论

本实验中将微量元素碘加入到化学诱导剂二甲基亚砷中, 观察到当碘离子质量浓度在55~125 mg/L时, 细胞的存活时间可达5 d左右, 细胞边界清晰, 内部结构正常, 而未加碘离子的对照组存活时间为12~36 h, 推测碘可能主要通过参与细胞信号传导和消除氧自由基这两条途径延长神经元样细胞的存活时间。

碘参与酪氨酸蛋白激酶受体信号的传导过程。本实验中也发现, C组、D组和E组诱导细胞形成了较为明显的突起; 胰岛素生长因子的这些功能可以通过胰岛素生长因子受体的表达增强得以体现, Glazner等^[20-27]发现, 碘能明显促进胰岛素生长因子受体的表达, 特别是神经元轴突内胰岛素生长因子受体的表达。研究发现, 碘可以和硒协同作用, 增强谷胱甘肽过氧化物酶的抗氧化作用, 谷胱甘肽过氧化物酶通过清除氧自由基, 进而减缓细胞衰老的过程; 某些细胞的线粒体内膜表面存在甲状腺激素受体, 甲状腺激素和其受体结合以后, 可能会抑制氧自由基的释放, 碘则参与甲状腺激素的形成。但是碘延长诱导的神经元样细胞存活时间的具体机制还不

十分清楚, 有待于进一步的研究。

碘离子质量浓度过高或者过低时, 对培养的细胞会造成不同程度的损害。本实验中发现骨髓间充质干细胞的常规化学诱导剂中加入碘离子质量浓度过低(2 mg/L)和过高(2 500 mg/L)时, 都会影响神经元样细胞的存活, 和高秋菊等^[28]的报道一致; 国内的流行病学调查也表明, 摄碘量的安全范围为100~1 000 $\mu\text{g/d}$, 如果摄碘量超过1 000 $\mu\text{g/d}$, 就会引起疾病, 超过2 000 $\mu\text{g/d}$ 就可能发生碘中毒^[29]。

高秋菊等^[28]发现, 低碘可引起神经细胞染色质的异常: 常染色质可以有不同程度的减少, 异染色质有不同程度的解聚; 高碘可引起神经元胞核的浓缩, 核周围细胞质的减少。他们指出, 低碘和高碘均可以引起神经细胞一定程度的退行性病变和过早凋亡; 有学者也提出正常细胞中, 有转录活性的单拷贝基因序列主要存在于常染色质上, 由于常染色质的减少, 在一定程度上影响了基因的活化和表达功能, 因而对神经细胞的形态和行使功能产生了一定的影响。碘缺乏或碘过量时, 均可引起脑神经细胞中DNA和RNA含量发生变化, 造成其发育和形态变化以及某些病理改变, 这些病理改变, 尤其是某些重要的蛋白质的改变, 可能会影响脑内第二信号系统, 进而影响脑的功能。闫玉芹等^[30-31]也发现, 缺碘可以引起大鼠小脑中的神经丝、髓鞘、微管、胶质纤维酸性蛋白等物质的减少, 他们指出, 细胞骨架的破坏影响了神经细胞的功能: 缺碘对微丝、微管和神经细胞髓鞘有不同程度的影响, 并且缺碘也可以影响到细胞中一些重要的细胞器比如线粒体、核糖体、高尔基体等的功能, 由于这些细胞器的功能受阻, 神经细胞的突触联系、信息传递等功能均可能受到不同程度的影响。

4 参考文献

- [1] Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol*. 2000;164(2):247-256.
- [2] Yang T, Tsang KS, Poon WS, et al. Neurotrophism of bone marrow stromal cells to embryonic stem cells: noncontact induction and transplantation to a mouse ischemic stroke model. *Cell Transplant*. 2009;18(4):391-404.
- [3] Li DH, Shan W, Qin SJ, et al. *Shenjing Jiepouxue Zazhi*. 2007;23(5):554-558.
李德华, 单伟, 秦书俭, 等. 体外诱导人脐静脉间充质干细胞分化为神经元样细胞的实验研究[J]. *神经解剖学杂志*, 2007, 23(5):554-558.
- [4] Li DH, Shan W, Qin SJ, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2008;12(8):1472-1476.
李德华, 单伟, 秦书俭, 等. 人脐静脉间充质干细胞体外诱导分化为神经元的可行性[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(8):1472-1476.
- [5] Yu Q, Lian JL, Guo Y, et al. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Jijiu Zazhi*. 2006;13(4):210-213.
余勤, 连俊兰, 郭莹, 等. 丹参注射液诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞的实验研究[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2006, 13(4):210-213.
- [6] Zhang ZY. *Zhongguo Difangbingxue Zazhi*. 1990;5(6): 325-327.
张占元. 甲状腺素、碘、硒、氟对体外培养人胚细胞增殖及3H-TDR掺入的影响[J]. *中国地方病学杂志*, 1990, 5(6): 325-327.
- [7] Glazner GW, Lupien S, Miller JA, et al. Insulin like growth factor II increase the rate of sciatic nerve regeneration in rats. *Neuroscience*. 1993;54(3):791-797.

- [8] Pu SF, Zhuang HX, Marsh DJ, et al. Time-dependent alteration of insulin-like growth factor gene expression during nerve regeneration in regions of muscle enriched with neuromuscular junctions. *Brain Res Mol Brain Res*. 1999;63(2):207-216.
- [9] Glazner GW, Morrison AE, Ishii DN. Elevated insulin-like growth factor (IGF) gene expression in sciatic nerves during IGF-supported nerve regeneration. *Brain Res Mol Brain Res*. 1994;25(3-4):265-272.
- [10] Caplan J, Tiangco DA, Terzis JK. Effects of IGF-II in a new end-to-side model. *J Reconstr Microsurg*. 1999;15(5):351-358.
- [11] Von Agoston DV, Palkovits CG, Fitzgerald SF, et al. Developmental changes in the inducibility of fos-like immunoreactivity in primary embryonic spinal cultures. *Brian Res Dev Brian Res*. 1995;89:173-186.
- [12] Fujiwara H, Ueta Y, Suzuki H, et al. Robust up-regulation of nuclear red fluorescent-tagged fos marks neuronal activation in green fluorescent vasopressin neurons after osmotic stimulation in a double-transgenic rat. *Endocrinology*. 2009;150(12):5633-5638.
- [13] Ishida Y, Kawai K, Magata Y, et al. Differential expression of Fos and Zif268 in the nigrostriatal system after methamphetamine administration in a rat model of Parkinson's disease. *Synapse*. 2008;62(12):920-926.
- [14] Turner MS, Gray TS, Mickiewicz AL, et al. Fos expression following activation of the ventral pallidum in normal rats and in a model of Parkinson's Disease: implications for limbic system and basal ganglia interactions. *Brain Struct Funct*. 2008;213(1-2):197-213.
- [15] Park JH, Dark J. Fos-like immunoreactivity in Siberian hamster brain during initiation of torpor-like hypothermia induced by 2DG. *Brain Res*. 2007;1161:38-45.
- [16] Raboin SJ, Gulley S, Henley SC, et al. Effect of adrenalectomy on cholecystokinin-8-induced Fos-like immunoreactivity in myenteric neurons and the dorsal vagal complex in rats. *Am J Vet Res*. 2006;67(9):1552-1556.
- [17] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.
中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [18] Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*. 2000;61:364-370.
- [19] Bourre JM. The role of nutritional factors on the structure and function of the brain: an update on dietary requirements. *Revue neurologique(Paris)*. 2004;60(8-9):767-792.
- [20] Glazner GW, Ishii DN. Insulin like growth factor gene expression in rat muscle during reinnervation. *Muscle Nerve*. 1995;18(12):1433-1442.
- [21] Verma S, Kumar GP, Laloraya M, et al. Activation of iodine into a free-radical intermediate by superoxide: a physiologically significant step in the iodination of tyrosine. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;170(3):1026-1034.
- [22] Illy C, Thielens NM, Gagnon J, et al. Effect of lactoperoxidase-catalyzed iodination on the Ca²⁺-dependent interactions of human CIs. Location of the iodination sites. *Biochemistry*. 1991;30(29):7135-7141.
- [23] Nguyen T, Lindner R, Tedeschi A, et al. NFAT-3 is a transcriptional repressor of the growth-associated protein 43 during neuronal maturation. *J Biol Chem*. 2009;284(28):18816-18823.
- [24] Tedeschi A, Nguyen T, Puttagunta R, et al. A p53-CBP/p300 transcription module is required for GAP-43 expression, axon outgrowth, and regeneration. *Cell Death Differ*. 2009;16(4):543-554.
- [25] Fujimori KE, Kawasaki T, Deguchi T, et al. Characterization of a nervous system-specific promoter for growth-associated protein 43 gene in Medaka (*Oryzias latipes*). *Brain Res*. 2008;1245:1-15.
- [26] Shen LH, Li Y, Gao Q, et al. Down-regulation of neurocan expression in reactive astrocytes promotes axonal regeneration and facilitates the neurorestorative effects of bone marrow stromal cells in the ischemic rat brain. *Glia*. 2008;56(16):1747-1754.
- [27] Camarillo C, Miranda RC. Ethanol exposure during neurogenesis induces persistent effects on neural maturation: evidence from an ex vivo model of fetal cerebral cortical neuroepithelial progenitor maturation. *Gene Expr*. 2008;14(3):159-171.
- [28] Gao QJ, Zhang SY, Liu TP, et al. Zhongguo Difangbing Fangzhi Zazhi. 2000;15(5):270-272.
高秋菊, 张世勇, 刘天鹏, 等. 高碘对小鼠大脑神经细胞超微结构的影响[J]. 中国地方病防治杂志, 2000, 15(5): 270-272.
- [29] Wang AG, Xia T, Chen XM. Yixue yu Shehui. 2001;14(4):13-14.
王爱国, 夏涛, 陈学敏. 碘过量对健康的危害[J]. 医学与社会, 2001, 14(4): 13-14.
- [30] Yan YQ, Liu JH, Zhang GH, et al. Zhongguo Difangbing Fangzhi Zazhi. 1997;16(2):65-67.
闫玉芹, 刘家慧, 张桂华, 等. 碘缺乏对仔鼠大脑烯醇化酶发育的影响[J]. 中国地方病防治杂志, 1997, 16(2): 65-67.
- [31] Friednstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected in vitro by the colony assay method. *Exp Hematol*. 1974;2(2):83-92.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 课题为辽宁省教育厅基金资助项目(2006T063, 2008422)。课题名称分别为“RNAi 沉默种子细胞抗原表达对修复骨缺损的影响(2006T063); 基因转染人脐带间充质干细胞移植治疗脑缺血大鼠的研究(2008422)”。

利益冲突: 无其他利益冲突。

课题的创新点: 常规化学诱导剂诱导骨髓间充质干细胞分化的神经元样细胞存活时间较短, 限制其进一步应用, 所以文章致力于研究不同浓度碘延长体外诱导神经元样细胞存活时间的研究。

课题评估的“金标准”: 骨髓间充质干细胞分化的神经元样细胞的免疫组化检测以及诱导后神经元样细胞的存活时间观察采用锥虫蓝染色。

设计或课题的偏倚与不足: 诱导的神经元样细胞仅是形态和细胞免疫组化鉴定和神经元相似, 由于实验条件的限制, 并未对诱导后的细胞做神经电生理、突触树、突触分泌物质等进一步的研究和鉴定, 只有做了这些分析之后, 才可认为诱导后的细胞为神经元。并且微量元素碘对诱导的神经元样细胞存活时间影响的具体机制仍需做进一步的研究。

提供临床借鉴的价值: 实验结果可为骨髓间充质干细胞移植治疗神经系统疾病的临床应用提供理论依据。