

携带神经干细胞肌基膜管组织工程支架中神经干细胞的存活分化***

宋宇^{1,2}, 刘佳梅², 薛辉², 张秀英³, 田晓巍²

Survival and differentiation of neural stem cells adhered to muscle basal lamina tissue engineering scaffolds

Song Yu^{1,2}, Liu Jia-mei², Xue Hui², Zhang Xiu-ying³, Tian Xiao-wei²

Abstract

BACKGROUND: Many researches have shown that neural stem cell can promote the rat neural function recover of spinal injury. Muscle basal lamina has a good biocompatibility and degradability. Therefore the combination of muscle and neural stem cells to be a new nerve tissue engineering scaffold has been considered.

OBJECTIVE: To observe the survival and differentiation of neural stem cells as seed cells adhered to the muscle basal lamina as a scaffold.

METHODS: Rat neural stem cells were isolated, cultured and then identified *in vitro*. Following preparation of acellular bone muscle basal lamina scaffolds by chemical extraction method, the neural stem cells were implanted into the scaffolds. After seven days of cultivation, the survival and differentiation of neural stem cells were detected by immunohistochemical technique, and the ultra-structure was observed under a scanning electron microscope.

RESULTS AND CONCLUSION: On the fifth day of cultivation, a great amount of neurospheres were seen by Nestin immunofluorescence. Following 7-day culture and differentiation in serum medium, the neural stem cells were used for anti-NF and anti-GFAP immunofluorescent staining. NF and GFAP positive cells were found under the microscope, which indicated that the cultured neural stem cells owned multi-lineage differentiation potential. Hemotoxylin and eosin (HE) staining showed that myocytes disappeared from the muscle basal lamina and there were roughly parallel tunnels inside the muscle basal lamina scaffolds. Immunofluorescent staining showed that the neural stem cells adhered to the scaffolds still had the characteristics of stem cells and could differentiate into neurons and neurogliaocytes. The neural stem cells were firmly attached to the muscle basal lamina under the scanning electron microscope. These findings indicated that nerve tissue engineering scaffold has a good biocompatibility and can be used for *in vivo* transplantation to treat nervous system diseases, such as spinal cord injury.

Song Y, Liu JM, Xue H, Zhang XY, Tian XW. Survival and differentiation of neural stem cells adhered to muscle basal lamina tissue engineering scaffolds. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(47):8751-8754. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 多项研究已证实神经干细胞能促进脊髓损伤大鼠神经功能的恢复, 肌基膜管具有良好的细胞、组织相容性和降解性, 那么能否将二者结合起来构建一个新的神经组织工程支架?

目的: 以神经干细胞为种子细胞, 以肌基膜管为支架, 观察携带神经干细胞的肌基膜管组织工程支架中神经干细胞的存活与分化情况。

方法: 体外分离培养大鼠神经干细胞, 并进行鉴定。用化学萃取方法制作去细胞骨骼肌基膜管支架, 将神经干细胞移植入肌基膜管支架培养 7 d 后, 用免疫组织化学方法检测神经干细胞的存活及分化情况, 扫描电镜观察其超微结构。

结果与结论: 神经干细胞分离培养第 5 天, Nestin 免疫荧光染色可见大量神经球。加血清诱导神经干细胞分化至 7 d, 进行抗 NF、抗 GFAP 免疫荧光染色, 镜下可见 NF、GFAP 阳性细胞, 证明培养的神经干细胞具有多项分化潜能。苏木精-伊红染色法显示肌基膜管中肌细胞成分已消失, 肌基膜管支架内主要是大致平行的管道。携带神经干细胞的肌基膜管组织工程支架免疫荧光染色证明, 神经干细胞在支架内仍具有干细胞特性, 并可分化为神经元和神经胶质细胞。扫描电镜显示神经干细胞可以稳固地贴附在肌基膜管内, 提示制备的神经组织工程支架具有良好的生物相容性, 可以进行体内移植治疗脊髓损伤等神经系统疾病。

关键词: 肌基膜管; 组织工程支架; 神经干细胞; 移植; 脊髓损伤
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.47.003

宋宇, 刘佳梅, 薛辉, 张秀英, 田晓巍. 携带神经干细胞肌基膜管组织工程支架中神经干细胞的存活分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(47):8751-8754. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

神经组织工程学技术的应用为治疗脊髓损伤提供了新的途径^[1]。组织工程学研究采用自体或异体移植物制作天然生物可降解材料的支架^[2], 其中去细胞移植物与机体有良好的生物

相容性, 不会引起宿主的排斥反应, 因而得到广泛应用。骨骼肌基膜管具备三维立体空间的结构^[3], 具有多孔性, 表面积大等特点, 有利于组织细胞的迁移、黏附及生长代谢, 能够为再生的轴突生长提供适宜的空间^[4]。神经干细胞移植入损伤脊髓后能分化为神经元及神经胶质细胞, 可以替代受损伤的神经元, 并分泌多种神经

¹Department of Anatomy, Changchun Medical College, Changchun 130031, Jilin Province, China;
²Department of Histology & Embryology, Norman Bethune College of Medicine, Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China;
³Department of Fundamental Nursing, School of Nursing, Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China.

Song Yu★, Studying for master's degree, Lecturer, Department of Anatomy, Changchun Medical College, Changchun 130031, Jilin Province, China; Department of Histology & Embryology, Norman Bethune College of Medicine, Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China songyumc@163.com

Correspondence to: Liu Jia-mei, Professor, Associate professor, Master's supervisor, Department of Histology & Embryology, Norman Bethune College of Medicine, Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China Liujiamei100@yahoo.com.cn

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30970739*; International Science and Technology Cooperation Program of Science and Technology Bureau of Jilin Province, No.20090726*

Received: 2010-06-22
Accepted: 2010-07-13

1 长春医学高等专科学校解剖教研室, 吉林省长春市130031; 2 吉林大学白求恩医学院组织胚胎学教研室, 吉林省长春市130021; 3 吉林大学护理学院基础护理教研室, 吉林省长春市130021

宋宇★, 男, 1977年生, 山东省平度市人, 汉族, 吉林大学白求恩医学院在读硕士, 讲师, 主要从事神经干细胞增殖及分化方面的研究。songyumc@yahoo.com 163.com

通讯作者: 刘佳梅, 博士, 副教授, 硕士生导师, 吉林大学白求恩医学院组织胚胎学教研室, 吉林省长春市130021 Liujiamei100@yahoo.com.cn

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225
(2010)47-08751-04

收稿日期: 2010-06-22
修回日期: 2010-07-13
(20100622016/GW·Y)

营养因子, 改善脊髓局部微环境使损伤轴突再生促进脊髓功能的恢复^[5]。

基于以上研究背景, 本文应用肌基膜管作为神经组织工程载体, 神经干细胞作为种子细胞, 构建携带神经干细胞的肌基膜管组织工程支架, 探讨神经干细胞与肌基膜管支架的相容性, 为开展神经组织工程治疗脊髓损伤等疾病提供新的尝试。

1 材料和方法

设计: 材料-细胞学体外观察。

时间及地点: 于2009-03/2010-03在吉林大学白求恩医学院中心实验室完成。

材料:

实验动物: 选取孕十三四天Wistar大鼠1只, 350 g左右, 由吉林大学实验动物中心提供。实验过程对动物处置符合动物伦理学要求。

主要试剂和仪器:

主要试剂和仪器	来源
DMEM / F12(1 : 1) 基础培养液	Gibco 公司
EGF、bFGF、B27 胎牛血清	Boehringer Mannheim 公司 Hyclone 公司
小鼠抗大鼠 Nestin 抗体	Parmingen 公司
兔抗大鼠 NF 抗体	Sigma 公司
小鼠抗大鼠 GFAP 抗体	Lab Vision 公司
羊抗兔 FITC 抗体、 羊抗小鼠 CY ₃ 抗体	Jackson 公司
JSM--5600LV 扫描 电子显微镜	JEOL 公司

实验方法:

神经干细胞的体外分离培养与鉴定: 按课题组以往报道的方法体外分离培养大鼠神经干细胞, 取生长良好的神经球离心后进行Nestin鉴定^[6]。一抗(Nestin1 : 1 000), CY₃标记的二抗(1 : 200)。用0.05%胰酶消化神经干细胞后, 在培养体系内撤去表皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子, 添加体积分数10%胎牛血清促使神经干细胞分化, 7 d后分别以兔抗大鼠NF抗体(1 : 400)和小鼠抗大鼠GFAP抗体(1 : 200), 行细胞免疫荧光染色, 观察神经干细胞分化情况。二抗为羊抗兔FITC抗体(1 : 200)和羊抗小鼠CY₃抗体(1 : 400)。

肌基膜管的制备: 按照实验室前期建立的制备方法^[7], 用化学去细胞方法制备大鼠肌基膜管。具体步骤如下: 选取大鼠脊柱两侧新鲜椎旁肌。在摇床50 r/min, 水温37 °C条件下, 依

次经蒸馏水48 h, 3%TritonX-100溶液48 h, 蒸馏水48 h, 1%SDS溶液48 h, PBS 24 h。

组织工程支架制备: 将神经干细胞用Hoechst33342标记24 h后, 用0.05%胰酶消化神经干细胞, 制备神经干细胞单细胞悬液, 将其注射入消毒后的肌基膜管中, 放入24孔板中密封培养^[8]。7 d后弃去培养液, 40 g/L多聚甲醛固定60 min, 蔗糖梯度脱水, OCT包埋, 冰冻切片。染色鉴定肌基膜管支架中神经干细胞活性及分化情况。

扫描电子显微镜鉴定神经干细胞在肌基膜管支架上的生长情况: 取生长良好的神经干细胞, 把神经干细胞种植到肌基膜管支架内, 放在24孔板中, 在37 °C、体积分数5%CO₂及饱和湿度条件下的细胞培养箱中培养7 d, 隔天换液。用2.5%戊二醛溶液前固定1 h后, 用缓冲液充分洗涤, 将残存的戊二醛洗掉, 再用1%锇酸溶液后固定1.5 h, 固定完成后用缓冲液洗15 min, 梯度丙酮逐级脱水, 醋酸异戊酯置换, 常规临界点干燥, 离子镀膜机喷金, 采用扫描电子显微镜观察并拍照。

主要观察指标: ①免疫荧光染色鉴定神经干细胞巢蛋白的表达。②加入含血清的DMEM/F12 培养基诱导分化7 d后免疫组织化学检测NF、GFAP表达情况。③苏木精-伊红染色和免疫荧光染色检测神经干细胞在肌基膜管内存活及分化情况。④扫描电镜观察神经干细胞在肌基膜管内附着生长情况。

设计、实施、评估者: 第一、二作者为实验设计及干预实施者, 第三、四作者为结果评估者, 第五作者为实验收集资料, 均经过科研培训, 未使用盲法评估。

2 结果

2.1 神经干细胞培养及鉴定 神经干细胞培养24 h可看见大量均匀分布的细胞, 大多数细胞成对出现, 并可见细胞分裂相。72 h开始出现许多细胞团, 由4~6个细胞聚集而成, 第7天开始出现许多悬浮生长的神经球, 每个神经球由几十甚至几百个排列紧凑的细胞聚集形成。将神经球进行抗巢蛋白免疫细胞化学染色, 镜下可见呈橘红色荧光的阳性细胞, 见图1。

2.2 神经干细胞的分化能力 神经干细胞加血清分化至7 d, 可见细胞从胞体长出许多突起, 分别行抗NF、抗GFAP免疫荧光染色, 镜下可见发绿色荧光的NF阳性细胞, 分支较多,

突起长而明显, 细胞体相对较小。发橘红色荧光的GFAP阳性细胞, 突起多而宽短, 细胞体较大, 有的呈膜片状生长, 见图2。

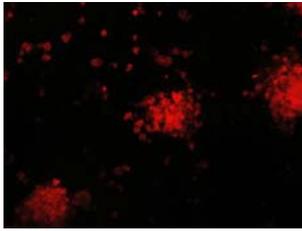


Figure 1 Nestin positive cells in the neural spheres (Immunofluorescence staining CY₃, ×100)
图1 神经球内大部分细胞呈巢蛋白阳性(免疫荧光染色CY₃, ×100)

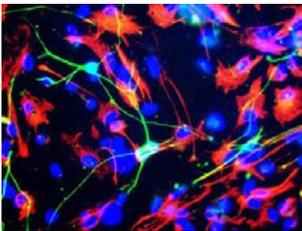


Figure 2 NF and GFAP positive cells of differentiated neural stem cells (Immunofluorescence FITC+CY₃+Hoechst mark, ×400)
图2 神经干细胞分化NF和GFAP阳性细胞(免疫荧光FITC+CY₃+Hoechst标记, ×400)

2.3 肌基膜管染色观察 苏木精-伊红染色支架纵切面观察: 支架内可见大量红色的纤维网状结构呈波浪状近似平行排列, 骨骼肌细胞成分已消失, 可以见到遗留的空隙。

2.4 神经干细胞在肌基膜管内的分化 将携带神经干细胞的肌基膜管组织工程支架体外培养7 d后, 苏木精-伊红染色可见支架内存在大量的细胞, 见图3。荧光显微镜观察肌基膜管支架中Hoechst33342标记的细胞均匀分布, 应用免疫组织化学抗Nestin、抗NF、抗GFAP染色, 可见Nestin(图4)、NF、GFAP阳性细胞(图5)。



Figure 3 Muscle basal lamina scaffolds with neural stem cells (Hemotoxylin-eosin staining, ×100)
图3 携带神经干细胞的肌基膜管支架(苏木精-伊红染色, ×100)

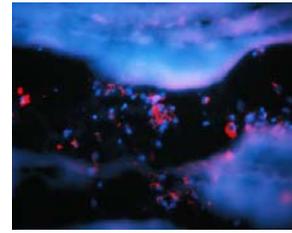


Figure 4 Nestin positive cells in muscle basallamina scaffolds with neural stem cells (Immunofluorescence CY₃+Hoechst mark, ×400)
图4 携带神经干细胞的肌基膜管支架 Nestin 阳性细胞(免疫荧光CY₃+Hoechst标记, ×400)

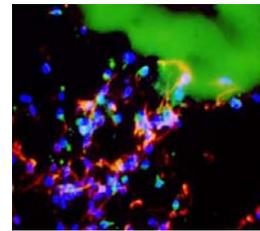


Figure 5 NF and GFAP positive cells in muscle basallamina scaffolds with neural stem cells (Immunofluorescence FITC+CY₃+Hoechst mark, ×400)
图5 携带神经干细胞的肌基膜管支架NF和GFAP阳性细胞(免疫荧光FITC+CY₃+Hoechst标记, ×400)

2.5 扫描电镜检测结果 扫描电镜观察, 肌基膜管支架呈规则平行的管道结构, 神经干细胞贴附于支架表面, 生长良好, 细胞呈凸起球状物, 表面有短小的突起, 细胞之间相互接触, 见图6。

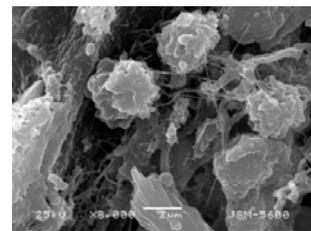


Figure 6 Electronic microscope scanning of muscle basal lamina scaffolds with neural stem cells (Scanning electron microscope, ×8 000)
图6 携带神经干细胞的肌基膜管支架电镜扫描(SEM, ×8 000)

3 讨论

选择合适的组织工程材料关键在于种子细胞及生物支架的选择^[9]。由于神经干细胞可以从胚胎期及成年中枢神经系统中获得并可在体外培养条件下高度增殖,

且可分化为神经元、神经胶质细胞及少突胶质细胞^[10], 从而使其成为理想的供体细胞。

近年来, 有学者应用去细胞肌基膜管作为神经组织工程支架, 主要是因为其具有如下优势: ①去细胞肌基膜管支架在制备的过程中由于取材于生物体自身, 且进行了脱细胞处理, 减少了其抗原性, 因此移植后很少引起免疫排斥反应。②肌基膜管支架保留了完整的基膜, 平行的纤维管为轴突再生提供通道, 并能保护再生轴突免遭瘢痕组织侵袭。③骨骼肌基膜管与神经膜管类似, 所以再生的神经更规则、更有序, 再生纤维的走向更合理。④肌基膜管支架为神经干细胞的生长提供了适宜的空间和环境, 同时, 可桥接损伤的脊髓, 提供神经轴突再生的管道, 使神经轴突越过移植区到达脊髓损伤的远端^[11-12]。

本实验采用添加 B27、EGF 和 bFGF 因子的 DMEM-F12 培养基, 成功获得了神经干细胞, 并证明其具有多向分化潜能^[13]。同时以大鼠椎旁肌为原料, 利用化学萃取技术完全去除骨骼肌中的细胞成分制备了新型大鼠骨骼肌基膜管支架。应用此方法能有效去除膜脂和膜相关抗原以及可溶性蛋白并能有效的保留细胞外基质成分的原始空间结构。在实验过程中利用 3% TritonX-100 溶液和 1% SDS 溶液两种效力较强的化学消化剂破坏细胞并消化降解细胞碎片, 最终保留细胞外基质, 苏木精-伊红染色结果表明, 在支架内骨骼肌细胞成分已完全消失, 可见大量红色的纤维网状结构呈波浪状近似平行排列。本实验结果显示, 制备的去细胞肌基膜管具有良好的管形结构, 管内无细胞碎片, 细胞外基质的空间结构保留良好, 而且支架的纤维成分呈平行排布, 很好地保留了胶原纤维及弹性纤维成分。综上所述, 本文成功制备了肌基膜管生物支架, 符合神经组织工程支架材料的基本要求。

在上述实验的基础上, 作者以神经干细胞作为种子细胞, 肌基膜管作为移植细胞生长的支架, 通过体外联合培养观察二者的相容性。实验结果表明, Hoechst33342 标记的神经干细胞在支架中分布均匀, 证明神经干细胞可以稳固地贴附在肌基膜管内, 并沿管道有一定迁移。Nestin 阳性细胞说明神经干细胞能够在支架内存活, 具有神经生物学活性。NF、GFAP 阳性细胞证实支架中存在已分化的神经元和星型胶质细胞, 这说明作者制备的组织工程支架具有良好的生物相容性。在本实验基础上, 拟用此神经组织工程支架移植治疗脊髓损伤, 并进一步观察组织工程支架对脊髓损伤大鼠功能的恢复, 探讨脊髓损伤的局部环境与移植的神经干细胞相互作用的分子机制等问题。

实验成功制备了携带神经干细胞的肌基膜管神经组织工程支架, 神经干细胞可以在肌基膜管中存活与分化, 二者具有良好的相容性。

4 参考文献

- [1] Schwab ME. Repairing the injured spinal cord. *Science*. 2002; 295: 1029-1031.
- [2] Potter W, Kalil RE, Kao WJ. Biomimetic material systems for neural progenitor cell-based therapy. *Front Biosci*. 2008; 13:806-821.
- [3] Sanes JR, Marshall LM, Mcmahon UJ. Reinnervation of muscle fiber basal lamina after removal of myofibers: differentiation of regenerating axons at original synaptic sites. *J Cell Biol*. 1978; 78:175-182.
- [4] Fansa H, Schneider W, Wolf G, et al. Host responses after acellular muscle basal lamina allografting used as a matrix for tissue engineered nerve grafts. *Transplantation*. 2002; 74(3):381-387.
- [5] Ogawa T, Sawamoto K, Miyata T, et al. Transplantation of in vitro expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord injury in adult rats. *J Neurosci Res*. 2002; 69(6):925-933.
- [6] Liu JM, Chen D, Meng XT. *Zhongguo Kangfu Lilun yu Shijian*. 2004; 10(1):19-20.
刘佳梅, 陈东, 孟晓婷. 一种获得神经干细胞单细胞的新方法[J]. *中国康复理论与实践*, 2004, 10(1): 19-20.
- [7] Xue H, Chen D, Zhang XY, et al. *Xian Jiaotong Daxue Xuebao: Yixueban*. 2009; 30(2): 154-158.
薛辉, 陈东, 张秀英, 等. 化学去细胞肌肉促进大鼠脊髓半横断后的轴突再生[J]. *西安交通大学学报: 医学版*, 2009, 30(2): 154-158.
- [8] Xue H, Chen D, Liu JM, et al. *Zhongguo Laonianxue Zazhi*. 2009; 29(20): 2598-2600.
薛辉, 陈东, 刘佳梅, 等. 去细胞肌肉组织工程支架与人羊膜上皮细胞的相容性研究[J]. *中国老年学杂志*, 2009, 29(20): 2598-2600.
- [9] Suh JK, Matthew HW. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: A review. *Biomaterials*. 2000; 21(24):2589-2598.
- [10] Rieske P, Azizi SA, Augelli B, et al. A population of human brain parenchymal cells express markers of glial, neuronal and early neural cells and differentiate into cells of neuronal and glial lineages. *Eur J Neurosci*. 2007; 25(1):31-37.
- [11] Bourne L. The Microscopic Anatomy of the Human Amnion and Chorion. *Am J Obstet Gynecol*. 1960; 79: 1070-1073.
- [12] Pollard SM, Aue NN, Symonds EM. Scanning electron microscope appearances of normal human amnion and umbilical cord at term. *Br J Obstet Gynaecol*. 1976; 83(6):470-477.
- [13] Lee SH, Chung YN, Kim YH, et al. Effects of human neural stem cell transplantation in canine spinal cord hemisection. *Neural Res*. 2009; 31(9):996-1002.

来自本文课题的更多信息—

基金资助: 国家自然科学基金资助项目(30970739); 吉林省科技厅国际科技合作项目(20090726)。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的创新点: 本课题在携带神经干细胞的肌基膜管组织工程支架制备中, 用化学去细胞法制备肌基膜管, 在材料制备方法上进行了改进, 使用大鼠神经干细胞移植入肌基膜管, 检测二者的相容性, 具有一定的创新性, 国内未见相关报道。

课题评估的“金标准”: 目前关于组织工程材料与细胞复合体方面的研究还处于探索阶段, 本实验以文献中的相关内容作为参考。

设计或课题的偏倚与不足: 课题仅能从形态学上说明携带神经干细胞的肌基膜管组织工程支架可以使神经干细胞在肌基膜管大量附着生长, 而不能使用定向诱导的方法来增加神经元在支架内部分化的数量。

提供临床借鉴的价值: 脊髓损伤后的再生修复一直是困扰神经科学工作者的一大难题, 携带种子细胞的组织工程支架植入或或许是最有可能达到这一理想要求的有效途径。由于肌基膜管的排列结构与神经膜管类似, 可以作为其替代物促进轴突再生, 肌基膜管作为桥接物连接断裂的神经, 保护再生轴突免遭瘢痕组织侵袭, 应用于中枢及外周神经损伤, 此研究成果可以应用于较广泛的患者群, 具有很好的应用前景及社会作用。