

人骨髓间充质干细胞体外定向诱导分化为神经元样细胞*★

王莹, 赵洪昌, 赵文静, 叶冬霞, 李晶, 罗速

Directional differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into neuron-like cells *in vitro*

Wang Ying, Zhao Hong-chang, Zhao Wen-jing, Ye Dong-xia, Li Jing, Luo Su

Medical Department,
Jilin Liver and
Gallbladder Diseases
Hospital, Changchun
130062, Jilin
Province, China

Wang Ying★, Master,
Associate chief
physician, Medical
Department, Jilin
Liver and Gallbladder
Diseases Hospital,
Changchun 130062,
Jilin Province, China
xingyuewj2@yahoo.
com.cn

Supported by: the
Science and
Technology
Development Project
of Changchun City,
No. 08SF07*

Received: 2010-08-26
Accepted: 2010-10-16

吉林省肝胆病医
院医务科, 吉林省
长春市 130062

王莹★, 1975年
生, 吉林省长春市
人, 汉族, 2009
年北华大学毕业,
硕士, 副主任医
师, 主要从事干
细胞治疗终末期肝
病的临床应用研
究。
xingyuewj2@
yahoo.com.cn

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225
(2010)49-09138-04

收稿日期: 2010-08-26
修回日期: 2010-10-16
(20100826022/M·Q)

Abstract

BACKGROUND: *In vitro* induced bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) differentiated into neuron-like cells mainly by polypeptide preparations such as nerve growth factor. Pure chemical inducer is not commonly found.

OBJECTIVE: To establish a system for isolation and culture of BMSCs and induce it directional differentiation into neuron-like cells *in vitro*.

METHODS: BMSCs were isolated, purified and identified by density gradient centrifugation, adherent culture and digestion time control. BMSCs were induced into neuron-like cells by β -mercaptoethanol and dimethyl sulfoxide. The morphology change was observed. The differentiation ratio analysis of differentiated neuron-like cells was detected by Nissl staining and immunochemical of neuron specific enolase and neurofilament-200.

RESULTS AND CONCLUSION: Separated BMSCs were fibroblast-like cells and they had several nucleoluses. BMSCs could differentiate into neuron-like cells, with the presence of long axons and dendrite-like processes after being induced by β -mercaptoethanol and dimethyl sulfoxide. Both Nissl's body, neurofilament -200 and neuron specific enolase of neurons after induction were positive and the positive rates of neuron specific enolase and neurofilament-200 were (85.6 \pm 6.7)% and (73.2 \pm 5.6)%, respectively. Results demonstrated that density gradient centrifugation, adherent culture and digestion time control can successfully isolate and culture human BMSCs. Human BMSCs can differentiate into neuron-like cells induced by β -mercaptoethanol and dimethyl sulfoxide *in vitro*.

Wang Y, Zhao HC, Zhao WJ, Ye DX, Li J, Luo S. Directional differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into neuron-like cells *in vitro*. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(49): 9138-9141. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

摘要

背景: 文献报道体外诱导骨髓间充质细胞定向分化为神经元样细胞多应用神经生长因子类多肽制剂, 选择纯化学诱导剂尚不多见。

目的: 建立人骨髓间充质干细胞分离培养体系, 体外定向诱导人骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞。

方法: 密度梯度离心、贴壁培养法和消化时间控制相结合分离纯化人骨髓间充质干细胞并鉴定, 采用 β -巯基乙醇和二甲基亚砷诱导分化为神经元样细胞, 观察细胞形态, 通过尼氏染色、NSE 和 NF-200 免疫细胞化学染色对已分化的神经元样细胞进行鉴定和分化率分析。

结果与结论: 分离得到的骨髓间充质干细胞为成纤维样细胞, 可见多个核仁, β -巯基乙醇和二甲基亚砷诱导后, 间充质干细胞分化为神经元样细胞, 伸出较长轴突样和树突样突起且有分支, 诱导后的神经元样细胞胞质中存在着深蓝色颗粒状的尼氏小体, NSE、NF-200 免疫荧光细胞化学染色均呈阳性, 阳性率分别为(85.6 \pm 6.7)%和(73.2 \pm 5.6)%。结果证实采用密度梯度离心、贴壁培养法和消化时间控制相结合能够成功分离和培养人骨髓间充质干细胞, 人骨髓间充质干细胞能够在诱导剂 β -巯基乙醇和二甲基亚砷的诱导下体外诱导分化为神经元样细胞。

关键词: 神经细胞; 骨髓间充质干细胞; 分离培养; 诱导分化; β -巯基乙醇; 二甲基亚砷
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.49.004

王莹, 赵洪昌, 赵文静, 叶冬霞, 李晶, 罗速. 人骨髓间充质干细胞体外定向诱导分化为神经元样细胞[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(49):9138-9141. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

0 引言

骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cell, BMSCs) 是骨髓中一类具有多分化潜能的干细胞, 在一定诱导条件下不仅可分化为中胚层的骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、心肌细胞, 而且能分化成外胚层的神经元、神经胶质细胞及内胚层的肝细胞^[1-11]。BMSCs 向神经细胞的分化为神经退行性疾病、脑血管疾病等神经系统疾病的治疗带来新的希

望^[12]。另外 BMSCs 具有取材方便、易在体外分离培养和扩增等优点^[13-14], 自体 BMSCs 移植又避免了移植后的免疫排斥反应。本实验分离培养人 BMSCs, 并在体外诱导 BMSCs 向神经细胞定向分化, 为其应用于神经系统疾病的治疗提供实验基础。

1 材料和方法

设计: BMSCs 诱导分化体外观察。

时间及地点: 实验于 2009-08/2010-05 在

吉林省肝胆病医院科室完成。

材料:

成人骨髓: 来自胸外科手术中摘取的非血液系统疾病、非肿瘤及乙肝表面抗原阴性患者的肋骨。

主要仪器和试剂:

主要仪器和试剂	来源
1WCD-175 型 CO ₂ 培养箱	SANYO
CKX-41 相差显微镜	OLYMPUS
DMEM 低糖培养基	Gibco
胎牛血清	天津市灏洋生物制品 科技有限公司
胰蛋白酶、二甲基亚砜、 β-巯基乙醇	Sigma
淋巴细胞分离液	上海试剂二厂
鼠抗人 NSE、NF-200KD 单克隆抗体	DAKO 公司
免疫组化试剂盒	基因公司

实验方法:

人BMSCs的分离培养: 用含抗生素和肝素的PBS应用液冲洗肋骨3遍, L-DMEM培养液冲洗髓腔, 收集细胞洗涤2次, 淋巴细胞分离液2 200 r/min密度梯度离心, 收集白膜层, PBS洗涤2次, 加入含体积分数为15%胎牛血清、100 U/mL青霉素, 100 mg/L链霉素, 5 mg/L两性霉素的L-DMEM培养液悬浮细胞, 按 $2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 接种于50 mL培养瓶中, 37 °C 体积分数为5%CO₂饱和湿度孵箱培养。24 h后换液, 去除未贴壁细胞, 以后每3 d或4 d换液1次, 细胞达80%融合后按照1:4传代。传代过程中严格控制胰蛋白酶的量和消化时间。

人BMSCs的生长曲线测定: 取1, 3, 5代BMSCs接种于24孔培养板中, 每孔 1×10^4 个细胞, 每天各取3孔消化计数细胞个数, 计算均值。连续培养7 d, 以培养时间为横轴, 细胞数为纵轴, 描绘细胞生长曲线。

人BMSCs表型鉴定: 取第3代BMSCs接种于24孔培养板中(孔中预先放置无菌盖玻片), 每孔 1×10^4 个, 待细胞接近80%融合时, 取出盖玻片, PBS冲洗, 体积分数为10%中性甲醛固定15 min, 蒸馏水冲洗, 体积分数为3% H₂O₂/甲醇作用30 min, 蒸馏水冲洗, 滴加一抗(CD29、CD44、CD34)后于37 °C 孵育1 h, PBS冲洗, 滴加生物素二抗, 37 °C 30 min后PBS冲洗, 滴加SABC, 37 °C 30 min后PBS冲洗, DAB显色, 以PBS作为一抗阴性对照。

人BMSCs向脂肪细胞定向诱导实验: 根据文献[15]略做改进。取培养第3代的细胞, 调整细胞浓度为 $5.0 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 接种于铺有盖玻片的6孔板中, 2 mL/孔, 24 h后更换含体积分数为20%马血清, 100 U/mL青霉素, 100 mg/L链霉素, 5 mg/L两性霉素的L-DMEM培养基培养, 隔日换液, 观察细胞形态。对照组取同代细胞, 常规培养液

培养。诱导培养2周后取出盖玻片, PBS冲洗3遍, 40 g/L多聚甲醛固定15 min, 油红O染色鉴定。

BMSCs体外定向诱导分化为神经元样细胞及鉴定: 第3代人BMSCs按 $1.5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 浓度接种于24孔培养板, 生长接近70%~80% 融合后直接做诱导。诱导方法^[16]: 细胞用含体积分数为10%胎牛血清, 1 mmol/L β-巯基乙醇, 1% L-谷氨酰胺的L-DMEM培养液预诱导24 h, 更换培养液, PBS洗涤3次, 再加入含3 mmol/L β-巯基乙醇, 2%二甲基亚砜, 1% L-谷氨酰胺的L-DMEM培养液(无血清)诱导6 h, 显微镜下观察细胞形态。对照组不加任何试剂常规培养。诱导6 h后取出细胞爬片, 40 g/L多聚甲醛固定15 min, 冲洗。

尼氏小体染色: 将细胞爬片浸于PBS中湿化后, 放入60 °C的甲苯胺蓝中染色40 min, 随后脱水、透明并封固, 光镜下观察并照相。

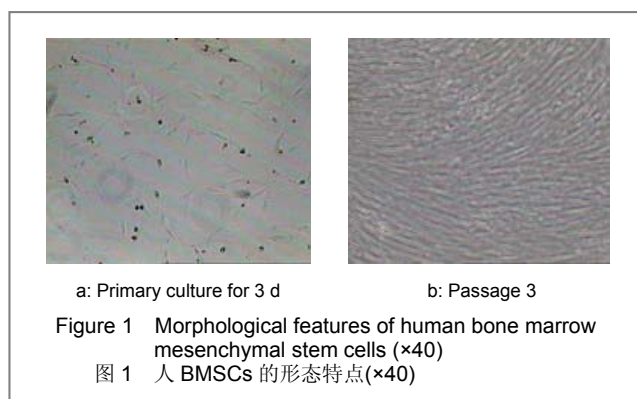
SP法染色检测 BMSCs 神经元烯醇化酶(neuronspacialenolase, NSE) 和神经丝蛋白(neurofilament 200KD, NF-200)表达。 具体方法参照说明书, 苏木精轻度复染。以胞浆内出现棕黄色颗粒为阳性细胞, 将染色强度和阳性细胞百分率相结合判断免疫组化染色结果。

主要观察指标: BMSCs形态变化及诱导前后神经元烯醇化酶和神经丝蛋白的表达。

统计学分析: 所有资料均采用SPSS13.0软件包进行t 检验统计学处理。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

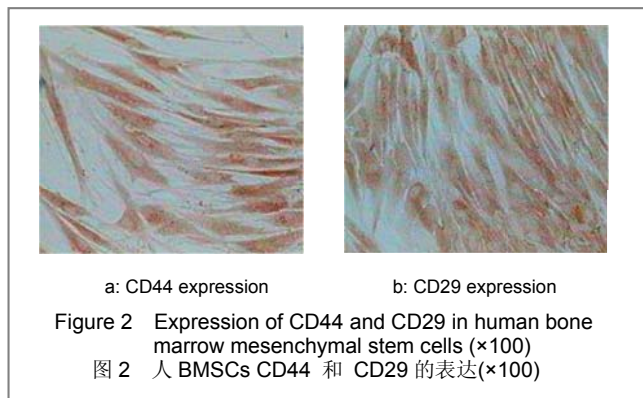
2 结果

2.1 人BMSCs的分离培养 淋巴细胞分离液密度梯度离心获得的单个核细胞培养48 h后换液, 大部分细胞贴壁, 并开始分裂增殖, 呈集落式生长。随着培养时间的延长, 集落不断增多, 扩大并互相融合, 10~14 d铺满瓶底; 传代细胞很快贴壁, 呈梭形均匀分布, 增殖迅速, 见图1。

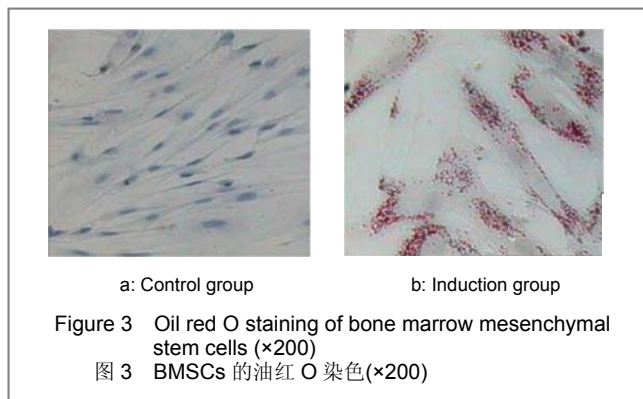


2.2 人BMSCs的生长曲线和表型特征 1, 3, 5代人

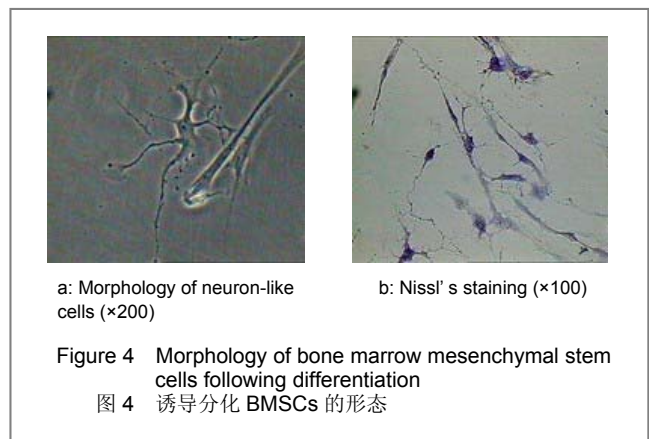
BMSCs生长曲线基本相同, 经过一两天潜伏期后, 第3天进入对数生长期, 在第7天左右进入平台期, 随着传代次数增加, 培养的BMSCs生长呈减慢趋势。BMSCs具有特征性的表面标志, 其特点是不表达CD34、CD45, 而只表达CD29、CD44、CD105、CD166等基质细胞和间充质干细胞的特异性表面标志, 本实验免疫细胞化学染色结果表明: 人BMSCs高表达CD44和CD29, 不表达CD34, 见图2。



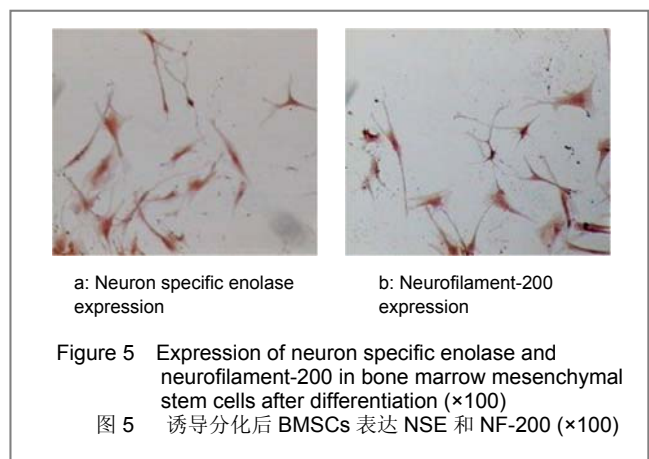
2.3 人BMSCs体外诱导分化为脂肪细胞 人BMSCs经马血清诱导培养后实现了向脂肪细胞的定向分化, 镜下观察细胞变得大而扁平; 经油红O染色, 苏木精复染后, 细胞核呈浅蓝色, 胞浆内可见橘红色脂肪滴。对照组细胞未发生形态改变, 染色后细胞核浅蓝色, 胞内无橘红色脂肪滴, 见图3。



2.4 人BMSCs向神经元样细胞分化 预诱导的24 h内, 少部分细胞形态发生改变, 细胞变长, 开始有少量突起长出; 经血清剥夺及高浓度 β -巯基乙醇联合诱导后, 部分细胞死亡脱落, 存活的贴壁细胞形态出现明显变化, 表现为胞浆回缩, 胞体由梭形变为紧密的圆形, 胞膜突出, 出现类似轴突的细长的两极或多极突起, 细胞之间有时以突起相接触, 诱导5 h细胞形态变化最明显。对照组BMSCs无形态变化。甲苯胺蓝染色后镜下观察, 未诱导BMSCs胞浆内无尼氏小体, 诱导56 h后大部分细胞染色阳性, 胞质中存在着深蓝色颗粒状的尼氏小体, 见图4。



SP染色结果显示, 对照组BMSCs无NSE和NF-200表达, 诱导组BMSCs NSE和NF-200呈阳性表达, 其阳性率分别为 $(85.6\pm 6.7)\%$ 和 $(73.2\pm 5.6)\%$, 与对照组比较差异有显著性意义, 表明诱导后细胞已具备部分神经元的特征, 见图5。



3 讨论

间充质干细胞来源广泛, 除来源于骨髓外, 也可从脐血和外周血中获得, 具有低免疫原性, 可以分化为多种组织细胞, 分离培养较为容易等优点, 是一种良好的替代治疗的靶细胞, 在组织器官损伤性疾病、组织器官退行性疾病、遗传缺陷疾病等领域具有重要的应用前景。分离BMSCs的方法主要有密度梯度离心法、流式细胞仪分选法、贴壁培养法、免疫磁珠分选法。本实验采用淋巴细胞分离液梯度离心法, 将骨髓单个核分离出来, 再根据贴壁性差异, 随换液去除悬浮生长的造血细胞, 贴壁细胞主要是BMSCs, 也可能混有单核细胞, 淋巴细胞, 每次传代严格掌握消化酶的量 and 消化时间, 保证BMSCs在短暂的作用时间内与培养瓶底分开, 淋巴细胞、单核细胞则因贴壁性强仍贴附于瓶底, 从而使BMSCs得到纯化。目前检测BMSCs的方法主要是根据细胞的形态和培养特性、表面细胞标志的表达, 以及分

化潜能等进行检测^[17-18]。本实验分离得到的细胞呈梭形,核浆比大,体外生长状态稳定,连续传代培养9代,细胞形态无明显变化,无衰老征象;SP染色显示3代细胞高表达CD29和CD44,不表达CD34,用含体积分数20%马血清的L-DMEM培养基诱导培养,实现了向脂肪细胞的定向分化,以上结果表明实验所分离培养的细胞是BMSCs。本实验把密度梯度离心,贴壁培养和消化时间控制相结合,为一种较为有效的分离纯化BMSCs的方法。

间充质干细胞是多一种能干细胞,具有高度可塑性,在相应的诱导条件下能分化为骨、脂肪、软骨、肌肉和肝细胞等不同胚层来源的细胞。2000年Woodbury等^[19]首次采用抗氧化剂 β -巯基乙醇、二甲基亚砷和4-羟基茴香醚,在体外成功诱导BMSCs分化形成神经元和神经胶质细胞,诱导后的细胞可表达NSE、NF、nestin和神经生长因子受体Trk A。NSE是在哺乳动物中发现的3种烯醇同功酶之一,主要表达于成熟神经元细胞、某些神经元内分泌细胞及神经内分泌细胞,在阳性细胞表现为弥漫性胞浆着色。神经丝蛋白是构成神经轴突和树突的主要结构成分,有NF-1、NF-M、NF-H 3种亚单位构成神经丝三联体,相对分子质量分别为68 000、160 000、200 000,在阳性细胞中表现为弥漫性轴突细胞浆着色^[20]。本实验结果显示,在化学诱导剂 β -巯基乙醇、二甲基亚砷作用下,人BMSCs形态发生明显变化,表现为胞浆回缩,胞体由梭形变为紧密的圆形,胞膜突出,出现类似轴突的细长的两极或多极突起,SP染色鉴定结果显示,诱导后细胞NSE和NF-200均呈阳性表达,且具有神经元的特有结构——尼氏体,表明诱导分化后的神经元样细胞已具备神经元的抗原特性,细胞已经诱导分化为神经元样细胞。

综上所述,实验结果证实人BMSCs在化学诱导剂作用下能跨胚层分化为神经细胞,为应用自体BMSCs治疗神经系统疾病奠定了基础,相关深入研究正在进行。

4 参考文献

- [1] Li HP,Liu CR,Zhang YL. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2007;11(28):5622-5625. 李焕萍,刘春蓉,张永亮.骨髓间充质干细胞在医学领域中的应用[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(28):5622-5625.
- [2] Hu ZB,Zeng R,Guo WT,et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008;12(43):8561-8566. 胡资兵,曾荣,郭伟韬,等.骨髓间充质干细胞诱导分化特征[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(43):8561-8566.
- [3] Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. Circ Res. 2004;95(1):9-20.
- [4] Jin HJ, Park SK, Oh W,et al. Down-regulation of CD105 is associated with multi-lineage differentiation in human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. Biochem Biophys Res Commun. 2009;381(4):676-681.
- [5] Woodbury D, Reynolds K, Black IB. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. J Neurosci Res. 2002; 69(6):908-917.
- [6] Sun W,Hu L,Zhao X,et al.Anhui Nongye Kexue. 2010;38(7): 3492-3530. 孙伟,胡亮,赵兴,等.体外定向诱导小鼠骨髓间充质干细胞分化为神

- [7] 经元样细胞[J].安徽农业科学,2010,38(7):3492-3530. Sun Y,Duan FL,Chen XY,et al.Weichangbingxue he Ganbingxue Zazhi. 2004;13(3):244-248. 孙嫣,段芳龄,陈香宇,等.人骨髓间充质干细胞体外分化为肝细胞样细胞[J].胃肠病学和肝病杂志,2004,13(3):244-248.
- [8] Zhao WJ,Chen YJ,Zhang ZG,et al.Zhonghua Ganzhangbing Zazhi. 2006;14(4):300-301. 赵文静,陈亚洁,赵振国,等.肝病患者血清诱导人骨髓间充质干细胞表达甲胎蛋白和白蛋白的实验研究[J].中华肝脏病杂志,2006,14(4): 300-301.
- [9] Zhan, SQ,Ye DX,Liu SR. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(27):5041-5045. 张淑芹,叶东霞,刘淑荣.肝细胞生长因子诱导骨髓间充质干细胞表达甲胎蛋白和白蛋白[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(27): 5041-5045.
- [10] Lu XH,Ma L,Liu P.Zhongguo Yike Daxue Xuebao. 2007;36(3): 256-258. 鲁学恒,马力,刘沛.体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞向肝细胞分化的实验研究[J].中国医科大学学报,2007,36(3):256-258.
- [11] Zhou BJ,Zhong CP,Gu YD,et al.Zhonghua Ganzhangbing Zazhi. 2004;12(12):730-733. 周播江,钟翠萍,顾云娣,等.肝再生大鼠血清诱导骨髓间充质干细胞向肝细胞分化的实验研究[J].中华肝脏病杂志,2004,12(12):730-733.
- [12] Dezawa M, Kanno H, Hoshino M,et al. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. J Clin Invest. 2004;113(12):1701-1710.
- [13] Fan HQ,Sun HS,Liu ZQ,et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2007;11(10):1818-1822. 范红旗,孙辉生,刘振旗,等.复方接骨中药对骨髓间充质干细胞体外增殖及向成骨细胞分化的影响[J].中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(10):1818-1822.
- [14] Deng FG,Zhang XY,Wang XR,et al.Jilin Daxue Xuebao. 2007; 33(2):257-259. 邓方阁,张秀英,王心蕊,等.体外模拟心肌微环境中人骨髓间充质干 细胞向心肌细胞的分化[J].吉林大学学报,2007,33(2):257-259.
- [15] Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD,et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. Science. 1999;284(5417): 1168-1170.
- [16] Wang XL,Mi BJ,Wang HL,et al.Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2007;11(33):6525-6529. 王相利,寇宝杰,王海立,等.骨髓间充质干细胞向神经细胞转化过程 中神经生长因子及受体的表达[J].中国组织工程研究与临床康复, 2007,11(33):6525-6529.
- [17] Satija NK, Gurudutta GU, Sharma S,et al. Mesenchymal stem cells: molecular targets for tissue engineering. Stem Cells Dev. 2007;16(1):7-23.
- [18] Shin M, Yoshimoto H, Vacanti JP. In vivo bone tissue engineering using mesenchymal stem cells on a novel electrospun nanofibrous scaffold. Tissue Eng. 2004;10(1-2):33-41.
- [19] Woodbury D, Reynolds K, Black IB. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. J Neurosci Res. 2002; 69(6):908-917.
- [20] Sun W,Hu L,Zhao X,et al.Anhui Nongye Kexue. 2010;38(7):3492- 3530. 孙伟,胡亮,赵兴,等.体外定向诱导小鼠骨髓间充质干细胞分化为神 经元样细胞[J].安徽农业科学,2010,38(7):3492-3530.

来自本文课题的更多信息—

基金资助: 长春市科技发展计划项目(08SF07)。

作者贡献: 实验设计为赵文静,实验实施为王莹,实验 评估为赵洪昌,资料收集为王莹。王莹成文,赵文静审核, 王莹对文章负责。

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。

伦理批准: 实验中所用肋骨来源为外科手术弃骨,患者 完全知情并同意其弃肋骨用于实验研究。

本文创新性: 以“MSCs, Separation and culture, Induction and differentiation, Neural cells”,“骨髓间充质 干细胞;分离培养;诱导分化;神经细胞”为检索词,检索 PubMed 数据库、万方数据库、清华同方数据库 1980/2010 的相关文献。目前国内报道完全应用化学诱导剂诱导人骨髓 间充质细胞定向分化为神经元样细胞的研究尚不多见,学术 水平国内领先。