

人羊膜上皮细胞分泌神经营养因子诱导人脐血间充质干细胞向神经元样细胞的分化：可能性验证**

张晓明¹, 孙海梅¹, 杨慧², 季凤清¹

Human amniotic epithelial cells-secreted neurotrophic factors induces the differentiation of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neuron-like cells: Possibility verification

Zhang Xiao-ming¹, Sun Hai-mei¹, Yang Hui², Ji Feng-qing¹

Abstract

BACKGROUND: Group pre-test has confirmed that amnion endothelial cell conditioned medium can induce human umbilical cord blood mesenchymal stem cells into dopaminergic neuron-like cells. In this process, neurotrophic factors and their receptors may play an important role.

OBJECTIVE: To study the function of neurotrophic factors secreted by amniotic epithelial cells in the differentiation of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neurons.

METHODS: P1 human umbilical cord blood mesenchymal stem cells at 2×10^8 /L were incubated and assigned to 3 group. Control group was added with HG-DMEM medium. Induction group received human amniotic epithelial cell medium. Blocking agent group underwent blocking agent K252a fluid, and the incubated was conducted at 36 °C for 40 minutes, and then amniotic epithelial cell medium was added. Immunofluorescence chemistry was used to determine neuron specific enolase and dopamine transporter expression in human umbilical cord blood mesenchymal stem cells. Real-time quantitative PCR was employed to detect neuron specific enolase, dopamine transporter and tyrosine hydroxylase expression in human umbilical cord blood mesenchymal stem cells.

RESULTS AND CONCLUSION: Nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor were observed in human amniotic supernatant. P1 human umbilical cord blood mesenchymal stem cells expressed Trka and Trkb. Forty-eight hours following induction, compared with the control group, positive expression of neuron specific enolase and dopamine transporter was significantly increased in the induction and blocking agent groups ($P < 0.05$), especially in the induction group ($P < 0.05$). Neuron specific enolase, dopamine transporter and tyrosine hydroxylase mRNA levels were significantly greater in the induction and blocking agent groups compared with the control group ($P < 0.01$), and each gene mRNA levels were significantly greater in the induction group than in the blocking agent group ($P < 0.01$). Results verified that neurotrophic factor in the human amniotic epithelial cells plays important effects on differentiation of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neurons. The promotion effects are mediated by activating Trk receptor.

¹Department of Histology and Embryology, ²Institute for Neuroscience, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Zhang Xiao-ming★, Studying for master's degree, Department of Histology and Embryology, Capital Medical University, Beijing 100069, China
zxmailb@sohu.com

Correspondence to: Ji Feng-qing, Doctor, Associate professor, Department of Histology and Embryology, Capital Medical University, Beijing 100069, China
jfq@ccmu.edu.cn

Supported by: the Scientific Research Fund Projects of Beijing Educational Council, No. KM200610025005*; the Beijing Municipal Natural Science Foundation, No. 7082017*

Received: 2009-11-08
Accepted: 2009-12-28

Zhang XM, Sun HM, Yang H, Ji FQ. Human amniotic epithelial cells-secreted neurotrophic factors induces the differentiation of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neuron-like cells: Possibility verification. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(6): 973-978. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 课题组前期实验已证实人羊膜上皮细胞条件培养液可以诱导人脐血间充质干细胞分化为多巴胺能神经元样细胞, 在此过程中人羊膜上皮细胞分泌的神经营养因子及其受体可能起到了重要作用。

目的: 探讨人羊膜上皮细胞分泌的神经营养因子对人脐血间充质干细胞神经分化的作用。

方法: 将 P1 代人脐血间充质干细胞按 2×10^8 L⁻¹ 密度接种, 分为 3 组: 对照组加入 HG-DMEM 培养基; 诱导组加入人羊膜上皮细胞条件培养液; 阻断剂组预先加入阻断剂 K252a 工作液, 36 °C 孵育 40 min 后更换为羊膜上皮细胞条件培养液。免疫荧光化学检测诱导后人脐血间充质干细胞神经元特异性烯醇化酶及多巴胺转运体的表达, 实时定量 PCR 法检测诱导后人脐血间充质干细胞中神经元特异性烯醇化酶、多巴胺转运体及酪氨酸羟化酶的表达。

结果与结论: 人羊膜上清中有神经生长因子和脑源性神经营养因子的表达, 且 P1 代人脐血间充质干细胞表达神经营养因子高黏附性受体 Trka 及 Trkb。诱导 48 h 后与对照组比较, 诱导组及阻断剂组神经元特异性烯醇化酶、多巴胺转运体阳性细胞数均明显增加 ($P < 0.05$), 且诱导组阳性细胞数最多 ($P < 0.05$)。诱导组、阻断剂组神经元特异性烯醇化酶、多巴胺转运体及酪氨酸羟化酶 mRNA 含量均显著高于对照组 ($P < 0.01$), 且诱导组各基因 mRNA 含量明显高于阻断剂组 ($P < 0.01$)。结果证实人羊膜上皮细胞分泌的神经营养因子对人脐血间充质干细胞的神经分化有重要作用, 其促神经分化作用是通过酪氨酸激酶受体介导的。

关键词: 神经营养因子; 人脐血间充质干细胞; 羊膜上皮细胞; 诱导; 阻断; 干细胞

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.06.005

张晓明, 孙海梅, 杨慧, 季凤清. 人羊膜上皮细胞分泌神经营养因子诱导人脐血间充质干细胞向神经元样细胞的分化: 可能性验证[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(6):973-978. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

首都医科大学,
¹ 组织胚胎学系,
² 神经生物学系,
北京市 100069

张晓明★, 女,
1979年生, 江苏省阜宁县人, 汉族, 首都医科大学在读硕士, 主要从事脐血间充质干细胞方面的研究。
zmailb@sohu.com

通讯作者: 季凤清, 博士, 副教授, 首都医科大学组织胚胎学系, 北京市 100069
jq@ccmu.edu.cn

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225
(2010)06-00793-06

收稿日期: 2009-11-08
修回日期: 2009-12-28
(20091108004/
ZS-Q)

0 引言

细胞移植已成为治疗神经系统疾病的新思路, 如何在体外获取神经元是进行细胞移植和替代治疗的关键所在。

人脐血间充质干细胞具有自我更新和多向分化的潜能, 在体外诱导条件下能跨胚层横向分化为神经样细胞^[1-3]。为观察这一现象, 大量体外实验使用不同的诱导剂处理间充质干细胞, 使其向神经细胞方向分化。

目前常用的诱导物有化学诱导剂和各种细胞生长因子, 这些生长因子包括表皮生长因子、成纤维生长因子、脑源性神经营养因子、神经生长因子、神经营养因子3、胶质细胞源性神经生长因子等, 这些生长因子及其受体在神经细胞发育过程中起到了重要作用, 如脑源性神经营养因子对神经元, 尤其是多巴胺能神经元有显著的营养和保护活性, 能够促进其存活、分化^[4-6]; 神经生长因子对调节中枢和外周神经元生长、分化以及维持其正常的存活有重要作用^[7-8]。

神经营养因子有两种膜受体, 一类属于肿瘤坏死因子受体家族中的成员, 与所有神经营养因子都具有较低黏附性的P75; 另一类是高黏附性受体, 它们属酪氨酸激酶受体, 包括TrkA, B, C^[9-10]。其中TrkA与神经生长因子具有较高的结合性, TrkB与脑源性神经营养因子和NT4/5具有较高的黏附性, TrkC与神经营养因子3具有较高的特异性。

已有报道证实羊膜上皮细胞可以合成分泌脑源性神经营养因子、神经营养因子3、神经生长因子等多种因子, 并具有释放儿茶酚胺、乙酰胆碱等神经递质的功能^[11-13]。实验室前期工作已证明, 人羊膜上皮细胞条件培养液可以诱导人脐血间充质干细胞分化为神经元样细胞和多巴胺能神经元样细胞^[14], 而在这个过程中, 羊膜上皮细胞分泌的神经营养因子及其受体可能起到了重要作用。

为进一步验证这一推论的可信性, 实验使用神经营养因子高黏附性受体的特异性阻断剂K252a^[15-16], 观察细胞表型变化以及表达神经细胞表面标记物的变化。

1 材料和方法

设计: 细胞学体外观察。

时间及地点: 于2008-10/2009-09在首都医科大学组织胚胎学实验室完成。

材料: 脐带血和羊膜样本均取自健康育龄产妇足月正常产或剖宫产的婴儿, 由首都医科大学附属北京宣武医院产科提供, 产妇对实验均签署知情同意书, 实验经医院医学伦理委员会批准。

实验用主要试剂:

主要试剂	来源
HG-DMEM 培养基、胰蛋白酶	美国 Gibco 公司
肝素(Heparin, 粉剂, 140 U/mg)	北京双螺旋生物培养基制品厂
胎牛血清	Hyclone 公司
人淋巴细胞分离液	天津生物制品厂 TBD 公司
小鼠抗人 NSE 抗体、大鼠抗人 DAT 抗体、荧光二抗 FITC	Chemicon 公司
ELISA 试剂盒	武汉博士德生物工程公司
阻断剂 K252a、甲基纤维素 450、Hoechst 33342 核染料	Sigma 公司
反转录试剂盒	TaKaRa 公司
引物 TrkA, TrkB, NSE, DAT TH, 人 β -actin	赛百盛公司

实验方法:

人脐带血间充质干细胞的分离培养: 无菌条件下采集正常足月产胎儿的脐带血50~80 mL, 20 U/mL肝素抗凝。将标本血用等体积PBS溶液稀释, 然后与甲基纤维素溶液按1:4比例混匀, 静置40~60 min后, 红细胞沉于瓶底, 吸取血浆层离心, 弃上清后用PBS重悬制备成单细胞悬液, 将该细胞悬液轻轻地叠加至装有等体积人淋巴分离液的离心管中, 离心后小心吸取中间的白膜层至另一离心管中, 用PBS洗涤3次, 制成单细胞悬液。加入含体积分数为10%胎牛血清、 10^5 U/L青霉素和 10^5 U/L链霉素的HG-DMEM完全培养液, 以 $(3\sim5)\times 10^9$ L⁻¹密度接种于25 cm²培养瓶中, 置于37 °C、体积分数为5%的CO₂饱和湿度培养箱中培养^[17]。细胞完全贴壁后全量换液, 之后隔天换液, 至10 d左右进行传代。每天在倒置显微镜下观察细胞形态变化。

人羊膜上皮细胞的原代培养及其条件培养液的制备: 从健康产妇分娩的胎盘组织的胎儿面小心剥离部分羊膜全层, 置入预冷的PBS中彻底清洗干净后, 自羊膜与绒毛膜间的潜在空隙钝

性分离出羊膜上皮层, 浸于PBS中清洗2次, 眼科剪剪成糜状, 将剪成糜状的羊膜上皮组织移至含2 g/L胰蛋白酶的HG-DMEM培养液中消化30 min, 置于37 °C水浴摇床消化, 用等体积含FBS的HG-DMEM完全培养液终止消化, 150目筛网过滤2次, 收集细胞液, PBS重悬, 离心洗涤3次, 弃上清, HG-DMEM完全培养液重悬, 以 $5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 密度接种, 置于37 °C、体积分数为5%的CO₂饱和湿度培养箱中培养。细胞完全贴壁后全量换液, 以后每隔3 d收集细胞培养液, 离心取上清, 经0.22 μm的醋酸纤维膜过滤后分装, -20 °C冻存备用。使用前与HG-DMEM完全培养液按3/2(v/v)比例混合, 制成羊膜上皮细胞条件培养液。

人源羊膜上清中脑源性神经营养因子、神经生长因子的分泌量测定: 将收集的羊膜上清在室温融化, 使用ELISA法测量其脑源性神经营养因子、神经生长因子的分泌量, 测定波长为450 nm。采用无血清细胞培养基作为对照。

RT-PCR检测脐血间充质干细胞中神经营养因子高黏附性受体TrkA, TrkB的表达: 收集各组处于对数生长期的细胞, 离心后移至EP管中。提取细胞总RNA, 并且获得cDNA。TrkA上游引物5'-AGC TGA GAA ACC TCA CCA TCG T-3', 下游引物5'-GGA GTG AAA TGG AAG GCA TCT G-3'; TrkB上游引物5'-GGA CAC CAC GAA CAG AAG TAA TGA-3', 下游引物 5'-GTT CCC GAC CGG TTT TAT CA-3'。以β-actin作为内参, 检测靶基因的转录水平。所有结果使用不同人源的细胞重复三四次。PCR反应条件为94 °C预变性5 min, 94 °C变性30 s, 60 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 39个循环, 72 °C 10 min, 4 °C forever。PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

人羊膜上皮细胞条件培养液及加入阻断剂K252a的人羊膜上皮细胞条件培养液对人脐血间充质干细胞的诱导作用: 在24孔板中放置小玻片(预先经泡酸, 冲洗, 烤干, 高温消毒处理), 经L-多聚赖氨酸包被20 min后PBS清洗2次, 将P1代人脐血间充质干细胞按 $2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 密度接种于24孔板中。单层细胞贴壁培养24~48 h后, 全量更换细胞培养液, 分为3组: 对照组加入HG-DMEM培养基; 诱导组加入人羊膜上皮细胞条件培养液; 阻断剂组预先加入阻断剂K252a工作液, 36 °C孵育反应40 min后, 更换为羊膜上皮细胞条件培养液。每天观察各组细胞形态和生长状态, 48 h后终止诱导。

免疫荧光化学染色检测诱导后人脐血间充质干细胞神经元特异性烯醇化酶、多巴胺转运体的表达: 将进行免疫荧光化学染色的细胞从培养箱中取出, PBS洗3遍, 正常羊血清封闭, 室温孵育30 min, 甩去正常羊血清, 滴加一抗4 °C过夜, 阴性对照不加一抗仅用PBS代替。PBS洗3遍, 滴加荧光二抗37 °C避光孵育30 min, PBS洗3遍, 滴加Hoechst 33342(0.05 g/L) 染细胞核, 室温避光孵育3 min, 封固后荧光显微镜下观察染色情况并记录结

果。光学显微镜下随机在每张玻片上取10个视野(×200), 共计3张, 计数Hoechst 33342 染色阳性的细胞核数目, 及各项检测指标染色阳性的细胞数。

$$\text{阳性细胞率(\%)} = \frac{\text{各项检测指标染色阳性的细胞数}}{\text{Hoechst 33342 染色阳性的细胞数}}$$

实时定量PCR检测: 收集各组处于对数生长期的细胞, 离心后移至EP管中。提取细胞内总RNA, 并且获得cDNA。神经元特异性烯醇化酶上游引物5'-GGG ACA AAC AGC GTT ACT T-3', 下游引物 5'- CAA TGT GGC GAT AGA GGG-3'。多巴胺转运体上游引物5'-GGA GCC ATA GAC GGC ATC A-3', 下游引物5'-CCT CGC AGA GCC GGT AGA-3'。TH上游引物5'-TGT GCG TCG GGT GTC TGA-3', 下游引物5'-AAT GTC CTG GGA GAA CTG G-3'。人-β-actin上游引物5'-ACC GAG CGC GGC TAC AG-3', 下游引物5'-CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC C-3'。应用Power SYBR Green PCR master mix 10 μL反应体系, 以β-actin作为内参, 检测靶基因的转录水平。所有结果使用不同人源的细胞重复四五次, 每次实验做3个复孔。PCR反应条件为50 °C 2 min, 95 °C 10 min, 96 °C预变性3 min, 94 °C变性15 s, 59 °C退火20 s, 72 °C延伸30 s, 40个循环^[18]。应用相对定量分析软件进行分析, 显示扩增曲线, 比较各组目的基因表达量。对于各组扩增后的复孔进一步做凝胶电泳分析。

主要观察指标: ①人源羊膜上清中神经生长因子、脑源性神经营养因子的质量浓度。②人脐血间充质干细胞神经营养因子高黏附性受体TrkA, TrkB的表达。③免疫荧光化学检测诱导后人脐血间充质干细胞的神经分化。④实时定量PCR检测诱导后人脐血间充质干细胞中神经元特异性烯醇化酶、多巴胺转运体及酪氨酸羟化酶的表达。

设计、实施、评估者: 设计为第一、三作者, 实施为第一、二作者, 评估为第四作者。均经过系统培训, 未使用盲法评估。

统计学分析: 由第一作者采用SPSS 13.0软件进行统计处理, 组间比较行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 人源羊膜上清中神经生长因子、脑源性神经营养因子质量浓度的测定 为检测羊膜上皮细胞分泌生长因子的情况, 使用ELISA法检测4份不同人源羊膜上清中神经生长因子和脑源性神经营养因子的质量浓度, 见表1。

表 1 四份不同人源羊膜上清中神经生长因子、脑源性神经营养因子的质量浓度
Table 1 Mass concentrations of nerve growth factor (NGF) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) secreted by 4 various kinds of human amniotic supernatant ($\bar{x}\pm s$, ng/L)

Factor	1	2
NGF	145.83±10.66	137.92±11.29
BDNF	256.16±6.93	263.08±13.46
Factor	3	4
NGF	134.27±3.56	143.44±6.83
BDNF	249.23±8.96	242.31±12.65

2.2 人脐血间充质干细胞神经营养因子高黏附性受体 Trka, Trkb 的表达 RT-PCR 检测结果显示, P1 代人脐血间充质干细胞表达神经营养因子高黏附性受体 Trka, Trkb, 见图 1。

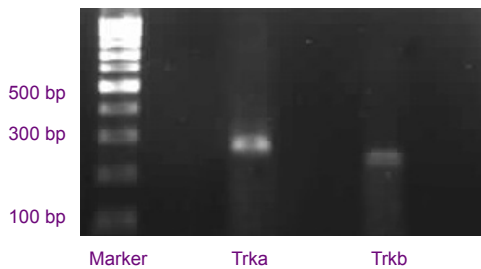
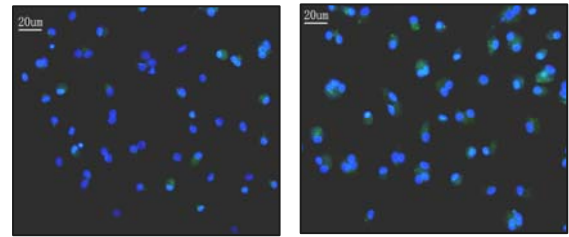


Figure 1 Expression of Trka and Trkb detected by RT-PCR in human umbilical cord blood mesenchymal stem cells
图 1 RT-PCR 检测人脐血间充质干细胞中 Trka 及 Trkb 的表达

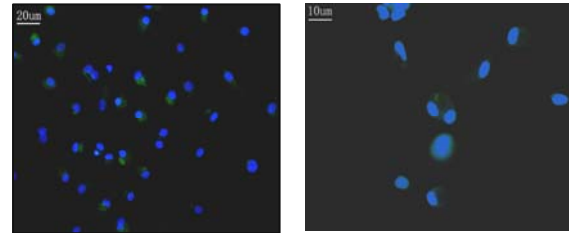
2.3 免疫荧光化学检测诱导后人脐血间充质干细胞的神经分化 P1 代脐血间充质干细胞诱导 48 h 后胞体变大, 并逐渐伸出突起, 对照组细胞呈均一的梭形, 诱导组细胞伸出较长突起且有分支, 阻断剂组细胞突起互相连接呈细网状。

诱导 48 h 后免疫荧光染色结果显示, 对照组、诱导组、阻断剂组神经元标记物神经元特异性烯醇化酶、多巴胺能神经元特异性标记物多巴胺转运体均呈阳性表达, 见图 2。

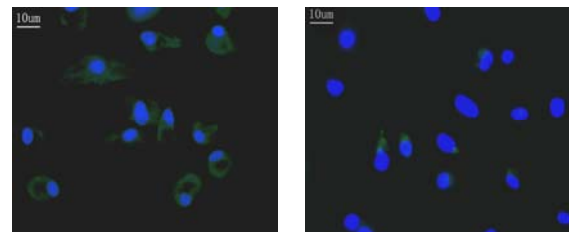
诱导 48 h 后与对照组比较, 诱导组及阻断剂组神经元特异性烯醇化酶、多巴胺转运体阳性细胞数均明显增加 ($P < 0.05$), 且诱导组阳性细胞数最多 ($P < 0.05$), 见图 3。



a: Control group (NSE) b: ACM group (NSE)



c: ACM+K252a group (NSE) d: Control group (DAT)

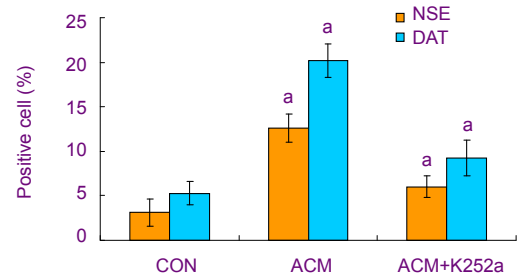


e: ACM group (DAT) f: ACM+K252a group (DAT)

NSE: neurone specific enolase; DAT: dopamine transporter; CB-MSCs: umbilical cord blood mesenchymal stem cells; ACM: amnion endothelial cell conditioned medium

Figure 2 Expression of NSE and DAT in CB-MSCs detected by immunofluorescence chemistry in human umbilical cord blood mesenchymal stem cells

图 2 免疫荧光化学法检测人脐带血间充质干细胞中神经元特异性烯醇化酶、多巴胺转运体的表达

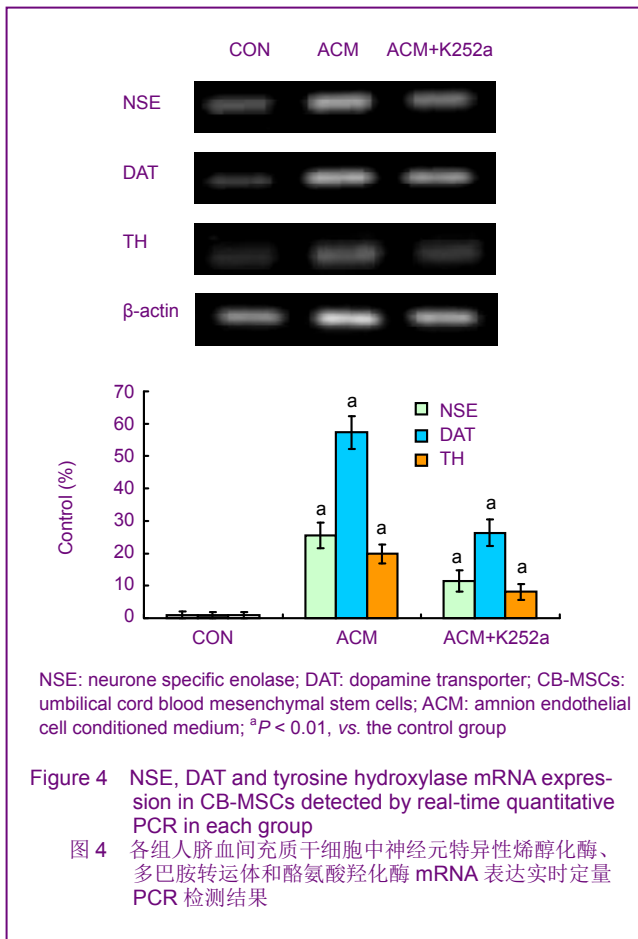


NSE: neurone specific enolase; DAT: dopamine transporter; CB-MSCs: umbilical cord blood mesenchymal stem cells; ACM: amnion endothelial cell conditioned medium; ^a $P < 0.05$, vs. the control group

Figure 3 Quantitative analysis of NSE and DAT in each group in CB-MSCs

图 3 各组脐带血间充质干细胞中神经元特异性烯醇化酶、多巴胺转运体表达的定量分析

2.4 实时定量PCR检测诱导后人脐血间充质干细胞中神经元特异性烯醇化酶、多巴胺转运体及酪氨酸羟化酶的表达 应用实时定量PCR法进一步检测各组中神经元特异性烯醇化酶、多巴胺转运体及酪氨酸羟化酶mRNA的含量。以对照组细胞中各基因的含量作为1, 诱导组、阻断剂组各基因mRNA含量均显著高于对照组 ($P < 0.01$), 且诱导组各基因mRNA的含量明显高于阻断剂组 ($P < 0.01$), 见图4。



3 讨论

实验主要目的是了解人羊膜上皮细胞分泌的神经营养因子对人脐血间充质干细胞神经分化的作用。研究显示神经营养因子的作用主要与其Trk受体的结合有关, Trk是一个跨膜酪氨酸激酶受体, 神经营养因子诱导的周围及中枢神经元细胞的生存及分化活性, 是由配体依赖的Trk自磷酸化及随后的细胞内信号级联反应所引发的^[19-21]。因此推测当羊膜上清中的神经营养因子神经生长因子和脑源性神经营养因子分别与其受体TrkA和TrkB结合后, 可诱导脐血间充质干细胞内神经元表面标志物神经元特异性烯醇化酶及多巴胺神经元表面标志物多巴胺转运体、酪氨酸羟化酶的表达增加。

为验证这种可能, 实验对羊膜上皮细胞条件培养液

中脑源性神经营养因子、神经生长因子的表达和分泌情况进行分析, 结果检测到人羊膜上皮细胞培养液中表达神经营养因子脑源性神经营养因子、神经生长因子。而前人又已经报道过大鼠骨髓基质细胞可以表达神经营养因子高黏附性受体(trk受体)^[22], 所以实验亦检测了人脐血间充质干细胞中Trka, Trkb的表达, 结果证实人脐血间充质干细胞也表达Trka和Trkb。

为进一步验证羊膜上皮细胞分泌的神经营养因子及其受体在人脐血间充质干细胞向神经细胞方向分化过程中的作用, 使用K252a进行神经营养因子高黏附性受体(trk受体)的阻断实验。结果发现, 细胞表达神经细胞表面标志物神经元特异性烯醇化酶和多巴胺能神经元的表面标志物多巴胺转运体的阳性细胞数明显减少, 而细胞内神经元特异性烯醇化酶、多巴胺转运体以及酪氨酸羟化酶mRNA水平较未阻断的人羊膜上皮细胞条件培养液组细胞也显著下降。以上结果证实羊膜上皮细胞分泌的神经营养因子对人脐血间充质干细胞神经分化有重要作用, 以特异性抑制剂K252a阻断结合后, 可明显抑制神经营养因子诱导人脐血间充质干细胞神经分化的作用, 提示其促神经分化的作用是由酪氨酸激酶受体介导的。该类受体属于膜受体, 本身含有TPK结构域。神经营养因子与Trk受体结合后, TPK被激活, 可经过PI3K通路(导致Akt磷酸化)、Ras通路(导致ERK1/2磷酸化)及磷脂酶C通路进行信号的传导^[23-24]。

实验只选择神经营养因子及其受体进行检测, 这主要是由于以往很多实验使用了脑源性神经营养因子、神经生长因子、NT3等因子进行诱导实验, 而且神经营养因子对中枢和外周神经系统多种类型神经元的生长、发育、分化、再生和正常状态下神经细胞的存活都具有重要作用^[25-27]。实验不排除羊膜上皮细胞条件培养液中其他一些细胞生长因子对人脐血间充质干细胞的神经分化有作用, 且实验结果也证实在阻断神经营养因子的作用后, 阻断组细胞的神经元及多巴胺能神经元的表面标志物表达仍高于对照组。研究表明羊膜上皮细胞还可以分泌表皮生长因子、胰岛素样生长因子、成纤维细胞生长因子等细胞因子^[28-30], 这些因子将有待进一步分析。

众所周知羊膜上皮细胞分泌多种细胞生长因子, 能够促进神经干细胞的生长和分化。同时在近年来的诱导分化实验中, 人们使用不同的细胞生长因子处理人脐血间充质干细胞, 使其发生向神经细胞方向的分化。与单纯应用各种细胞因子作为诱导剂相比, 应用羊膜上皮细胞条件培养液更有利于模拟早期神经细胞形成的微环境, 同时又克服了营养因子的量和比例不易掌握的问题; 且人羊膜组织来源丰富, 取材方便, 免疫原性低, 不涉及伦理道德问题。总之, 由人羊膜组织进行脐血间充质干细胞定向诱导有一定的应用前景和实用价值, 其将为老年性痴呆等神经系统疾病提供细胞替代治疗的

新思路。

4 参考文献

- [1] Choong PF, Mok PL, Cheong SK, et al. Generating neuron-like cells from BM-derived mesenchymal stromal cells in vitro. *Cytotherapy*.2007;9(2):170-183.
- [2] Goodwin HS, Bicknese AR, Chien SN, et al. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. *Biol Blood Marrow Transplant*.2001;7(11):581-588.
- [3] Jeong JA, Ganfg EJ, Hong SH, et al. Rapid neural differentiation of human cord blood derived mesenchymal stem cells. *Neuroreport*. 2004;15:1731-1734.
- [4] Chen LW, Zhang JP, Kwok-Yan SD, et al. Localization of nerve growth factor, neurotrophin-3, and glial cell line-derived neurotrophic factor in nestin-expressing reactive astrocytes in the caudate-putamen of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated C57/Bl mice. *J Comp Neurol*.2006;497: 898-909.
- [5] Dluzen DE, Mcdermott JL, Anderson LI, et al. Age-related changes in nigrostriatal dopaminergic function are accentuated in +/- brain-derived neurotrophic factor mice. *Neuroscience*.2004;128: 201-208.
- [6] Skup M, Dwornik A, Macias M, et al. Long-term locomotor training up-regulates TrkB(FL) receptor-like proteins, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin 4 with different topographies of expression in oligodendroglia and neurons in the spinal cord. *Exp Neurol*.2002;176(2):289-307.
- [7] Kamei N, Tanaka N, Oishi Y. BDNF, NT-3, and NGF Released from Transplanted Neural Progenitor Cells Promote Corticospinal Axon Growth in Organotypic Cocultures. *Spine(S1547-5654)*. 2007; 32(12):1272-1278.
- [8] Giraldi-Guimaraes A, Bittencourt-Navarrete RE, Nascimento IC, et al. Postnatal expression of the plasticity-related nerve growth factor-induced gene A (NGFI-A) protein in the superficial layers of the rat superior colliculus: relation to N-methyl-D-aspartate receptor function. *Neuroscience*.2004;129(2):371-380.
- [9] Cho TT, Farbman AI. Neurotrophin receptors in the geniculate ganglion. *Molecular Brain Research*.1999;68:1-13.
- [10] Micera A, Lambiase A, Stampachiachiere B, et al. Nerve growth factor and tissue repair remodeling: trkA(NGFR) and p75(NTR), two receptors one fate. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2007;18(3-4): 245-256.
- [11] Uchida S, Inanaga Y, Kobayashi M, et al. Neurotrophic function of conditioned medium from human amniotic epithelial cells. *Neurosci Res*.2000;62(4):585-590.
- [12] Marvin KW, Keelan JA, Eykhoit RL, et al. Expression of angiogenic and Neurotrophic factors in the human amnion and choriondecidua. *Am J Obstet Gynecol*.2002;187(3):728-734.
- [13] Sakuragawa N, Elwan MA, Uchida S, et al. Non-neuronal neurotransmitters and neurotrophic factors in amniotic epithelial cells: expression and function in humans and monkey. *Jpn J Pharmacol*.2001;85(1):20-23.
- [14] Li RP, Ji FQ, Sun HM, et al. Jiepou Xuebao.2008;39(6):790-794. 李荣平, 季凤清, 孙海梅, 等. 羊膜对人脐血干细胞分化为多巴胺能神经元的作用[J]. *解剖学报*, 2008, 39(6): 790-794.
- [15] Roux PP, Dorval G, Boudreau M, et al. K252a and CEP1347 are neuroprotective compounds that inhibit mixed-lineage kinase-3 and induce activation of Akt and ERK. *J Biol Chem*. 2002; 277(51): 49473-49480.
- [16] Serres F, Carney SL. Nicotin regulates SH-SY5Y neuroblastoma cell proliferation through the release of brain-derived neurotrophic factor. *Brain Res*.2006;1101(1): 36-42.
- [17] Gang EJ, Hong SH, Jeong JA, et al. In vitro mesengenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;321:102-108.
- [18] Fallahi-Sichani M, Soleimani M, Kiani J, et al. In vitro differentiation of cord blood unrestricted somatic stem cells expressing dopamine-associated genes into neuron-like cells. *Cell Biology International*.2007;31:299-303.
- [19] Segal RA. Selectivity in neurotrophin signaling: theme and variations. *Annu Rev Neurosci*.2003;26:299-330.
- [20] Neef KE, Campenot RB. Receptor binding, internalization, and retro-grade transport of neurotrophic factors. *Cell Mol Life Sci*.2001;58(8):1021-1035.
- [21] Balkowiec A, Kunze DL, Katz DM. Brain-derived neurotrophic factor acutely inhibits AMPA-mediated currents in developing sensory relay neurons. *J Neurosci*. 2000;20(5):1904-1911.
- [22] Yaghoobi MM, Mowla SJ. Differential gene expression pattern of neurotrophins and their receptors during neuronal differentiation of rat bone marrow stromal cells. *Neurosci. Lett*.2006;397: 149-154.
- [23] Kaplan DR, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol*.2000;10(3):381-391.
- [24] Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans RSoc Lond B Biol Sci*. 2006; 361(1473): 1545-1564.
- [25] Barbacid M. Neurotrophic factors and their receptors. *Curr Opin Cell Biol*.1995;7:148-155.
- [26] Hayakawa N, Abe M, Eto R, et al. Age-related changes of NGF, BDNF, parvalbumin and neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity in the mouse hippocampal CA1 sector. *Metab Brain Dis*.2008;23(2):199-211.
- [27] Bimonte-Nelson HA, Granholm AC, Nelson ME, et al. Patterns of neurotrophin protein levels in male and female Fischer 344 rats from adulthood to senescence: how young is "young" and how old is "old"? *Exp Aging Res*.2008;34(1):13-26.
- [28] Koizumi NJ, Inatomi TJ. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res*.2000;20(3): 173-177.
- [29] Whittle WL, Gibb W, Challis JR. The characterization of human amnion epithelial and mesenchymal cells: the cellular expression, activity and glucocorticoid regulation of prostaglandin output. *Placenta*.2000;21(4):394-401.
- [30] Tahara M, Tasaka K, Masumoto N, et al. Expression of messenger ribonucleic acid for epidermal growth factor(EGF), transforming growth factor-alpha(TGF alpha), and EGF receptor in human amnion cells: possible role of TGF alpha in prostaglandin in E2 synthesis and cell proliferation. *Clin Endocrinol Metab*.1995;80(1): 138-146.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 北京市教委科技发展计划项目(KM200610025005), 课题名称“脐带血间充质干细胞移植治疗帕金森病的实验研究”; 北京市自然科学基金(7082017), 课题名称“人脐带血 CD166⁺细胞在帕金森病治疗中的作用”。

利益冲突: 无利益冲突。

课题的创新点: 以往实验多采用单独的神经营养因子诱导细胞分化, 而用羊膜上皮细胞条件培养液直接诱导人脐血间充质干细胞分化的报道较少。实验在总结以往研究的基础上, 进一步优化诱导方案, 首次探讨羊膜上皮细胞分泌的多种神经营养因子对人脐血间充质干细胞神经分化的影响。

课题评估的“金标准”: 形态学上, 人脐血间充质干细胞在诱导四五天后可见巢样克隆生成, 其周边胞体伸出突起; 关于神经特异性标记物, 运用免疫荧光染色和 PCR 技术, 可见细胞表达神经特异性烯醇化酶、多巴胺转运体和酪氨酸羟化酶等神经元及多巴胺能神经元的标记物。

课题的偏倚与不足: 实验初步证实人羊膜上皮细胞分泌的神经营养因子对人脐血间充质干细胞的神经分化有重要作用, 其作用是通过酪氨酸激酶受体介导的。但人羊膜上皮细胞还可以分泌许多细胞生长因子, 其在诱导人脐血间充质干细胞的神经分化过程中的作用及机制仍需进一步分析。

提供临床借鉴的价值: 课题已成功诱导脐带血间充质干细胞向神经元及多巴胺能神经元方向分化。由于脐带血来源广泛, 易于获得, 免疫原性弱, 可进行自体 and 亲代移植, 因此脐带血间充质干细胞将会成为临床细胞替代治疗帕金森等疾病的主要细胞来源。