

羊膜脱细胞基质对脐血间质干细胞突触蛋白表达的影响☆

胡炜^{1,2}, 杨枫¹, 唐尤佳¹, 陈希兰¹, 杨波^{2,3}, 关方霞⁴

Effect of human acellular amniotic membrane matrix on synapsin expression of umbilical cord blood mesenchymal stem cells

Hu Wei^{1,2}, Yang Feng¹, Tang You-jia¹, Chen Xi-lan¹, Yang Bo^{2,3}, Guan Fang-xia⁴

Abstract

BACKGROUND: The effect of natural extracellular matrix on neural development of adult stem cell is a hot research spot currently. More studies on neural markers expression at home and abroad, few studies on synapse development.

OBJECTIVE: To investigate the effect of human acellular amniotic membrane matrix on synaptophysin expression of umbilical cord blood mesenchymal stem cells.

METHODS: The 3rd generation of human cord blood mesenchymal stem cells in experimental group was seeded in 24 orifice plate of coating membrane-like matrix cover glass. Time was counted when the inoculation, cells were cultured by basal medium for 4 days. There was no membrane-like matrix, the remaining procedures was the same as the experimental group. Morphologic changes of cells were observed by hematoxylin-eosin staining. Synaptophysin-related protein expression (SYN expression) was detected by immunohistochemical SP method at 2 and 4 days inoculation. SYN expression I, II, III of genetic transcription level was detected by RT-PCR method at 2 and 4 days before and after inoculation.

RESULTS AND CONCLUSION: Cells in control group was fibroblast-like, cells in experimental group extended the processes and connected each other. SYN expression in experimental group was higher compared with control group; there were significant differences ($P < 0.01$). SYN I, SYN II, SYN III did not express in transcriptional level both before inoculation and at 2, and 4 days in control group. At 2 and 4 days in experimental group, SYN II had low expression, SYN III had poor expression, and SYN I did not express in transcriptional level. The results indicated that acellular amniotic membrane matrix can promote the production and extension of the umbilical cord blood mesenchymal stem cells process, and connected each other, express SYN, and provide favorable conditions for neural differentiation of umbilical cord blood mesenchymal stem cells.

Hu W, Yang F, Tang YJ, Chen XL, Yang B, Guan FX. Effect of human acellular amniotic membrane matrix on synapsin expression of umbilical cord blood mesenchymal stem cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(14):2500-2503. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

摘要

背景: 天然细胞外基质对成体干细胞神经发育的影响, 是目前的研究热点, 国内外研究多侧重于神经标志物表达的研究, 针对突触发育的研究较少。

目的: 观察羊膜脱细胞基质对脐血间质干细胞突触素表达的影响。

方法: 实验组将第3代人脐血间质干细胞接种在包被膜样基质盖玻片的24孔板中, 以接种时开始计时, 细胞以基础培养基培养4 d。对照组无膜样基质, 余同实验组。苏木精-伊红染色观察细胞形态变化, 免疫组化SP法检测接种第2、4天细胞突触素相关蛋白表达, RT-PCR法检测接种前和接种后第2、4天细胞突触素相关蛋白I、II、III基因转录水平的表达。

结果与结论: 对照组呈成纤维细胞形态, 实验组细胞突起延伸, 相互连接; 第2、4天实验组突触素相关蛋白表达均明显高于对照组, 差异有显著性意义($P < 0.01$); 接种前及对照组第2、4天细胞突触素相关蛋白I、II、III基因转录水平无表达, 实验组第2、4天细胞突触素相关蛋白II基因转录水平低表达, 突触素相关蛋白III弱表达, 突触素相关蛋白I不表达。结果提示羊膜脱细胞基质可以促使人脐血间质干细胞突起的产生、延伸并部分相互连接, 表达突触素相关蛋白, 为脐血间质干细胞神经分化提供了有利的条件。

关键词: 细胞外基质; 脐血间质干细胞; 分化; 干细胞; 突触素相关蛋白

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.14.007

¹Department of Neurosurgery, First People's Hospital of Jiujiang City, Jiujiang 332000, Jiangxi Province, China; ²Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China; ³Open Laboratory of Key Disciplines, Clinical Medicine of Higher Education of Henan Province, Zhengzhou 450052, Henan Province, China; ⁴Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China

Hu Wei☆, Doctor, Associate chief physician, Department of Neurosurgery, First People's Hospital of Jiujiang City, Jiujiang 332000, Jiangxi Province, China; Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China zzdxbhuw@163.com

Correspondence to: Yang Bo, Chief physician, Professor, Doctoral supervisor, Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China yangbo96@126.com

Received: 2010-09-06
Accepted: 2010-11-18

胡炜, 杨枫, 唐尤佳, 陈希兰, 杨波, 关方霞. 羊膜脱细胞基质对脐血间质干细胞突触蛋白表达的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(14):2500-2503. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

0 引言

“干细胞巢”理论提示了干细胞分化与其周围的微环境, 即细胞因子、细胞外基质密切相关^[1-2]。天然细胞外基质对成体干细胞神经发育的影响是目前的研究热点, 国内外研究多侧重于神经标志物表达的研究, 针对突触发育的研究较少。

细胞外基质不仅是细胞黏附, 迁移的物理

性底物, 而且也明显影响了细胞的特性, 如细胞的分化等^[2-4]。本研究采用脱细胞羊膜基质作为底物, 接种脐血间质干细胞, 比较接种前后脐血间质干细胞突触素表达的不同, 旨在探讨脱细胞羊膜基质对干细胞神经分化过程中突触发育的影响。

1 材料和方法

设计: 体外对比观察实验。

时间及地点: 实验于2009-06/11在郑州大学河南省重点实验室完成。

材料:

组织来源: 严格无菌条件下取健康剖宫产产妇自愿捐献的羊膜, 检测乙肝七项、HCV、HIV、梅毒等其他相关传染性指标均呈阴性。标本来源于郑州大学第一附属医院产科。

试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
基础培养基(DMEM/F12, 体积分数为 10%胎牛血清, 20 μ g/L bFGF)	GIBCO 公司
兔抗突触素相关蛋白(synapsin, SYN)和通用型 SP 免疫组化试剂盒	北京中杉
RT-PCR 试剂盒	TaKaRa 公司
倒置相差显微镜	日本 OLMPUS 公司

实验方法:

脐血间质干细胞的分离与培养: 无菌条件下取正常足月产胎儿的脐带血40~60 mL, 肝素抗凝, 密度梯度离心法分离脐血单个核细胞。在基础培养基中经贴壁培养后渐渐纯化为脐血间充质干细胞, 传至第3代作为预诱导。

膜样基质的制备: 无菌条件下取正常足月剖宫产胎儿胎盘, 钝性分离羊膜约10 cm $\times$ 10 cm大小, 钝性分离去除绒毛膜组织, 保留羊膜层。生理盐水反复冲洗干净后置于1%tritonX-100溶液中, 振荡。置于恒温培养箱中保存36 h, 取出后用生理盐水漂洗干净。加入0.25%胰蛋白酶+0.02%EDTA中充分振荡, 37 $^{\circ}$ C保存4 h。取出后用生理盐水漂洗干净, 裁剪成1 cm $\times$ 1 cm大小后分装密封。

分组及细胞接种: 分为实验组和对照组。每组均设8个复孔为样本。

实验组: 将第3代人脐血间质干细胞以4 $\times$ 10⁷ L⁻¹浓度接种在有包被膜样基质盖玻片的24孔板中, 以接种时开始计时, 细胞以基础培养基培养4 d。

对照组: 无膜样基质, 余步骤同实验组。

细胞形态及蛋白、基因水平检测:

形态变化: 接种后, 倒置相差显微镜下观察细胞形态, 于接种第2, 4天从两组24孔板各取6孔, 40 g/L多聚甲醛固定, 苏木精-伊红染色, 显微镜下观察染色后形态, 摄取图像。

免疫细胞化学检测: 于第2, 4天从两组24孔板各取6孔, 用PBS清洗, 40 g/L多聚甲醛固定, 进行免疫细胞化学SP法检测SYN表达。显

色封固后, 选好位点, 每位点低倍镜($\times$ 100)选取阳性成分密集区域, 然后高倍镜($\times$ 400)摄取图像10张。图像分析采用Image pro plus 6.0彩色病理图像分析系统, 测每张图阳性成分的平均吸光度和相对面积(%), 以两者乘积代表阳性成分相对含量。重复实验3次。

基因转录水平检测: 接种前和接种后第2, 4天分别从两组取6孔, PBS洗3遍后进行RT-PCR。

反转录条件:

温度	时间
30 $^{\circ}$ C	10 min
42 $^{\circ}$ C	30 min
99 $^{\circ}$ C	5 min
5 $^{\circ}$ C	5 min

盖温103 $^{\circ}$ C, 1个循环。

PCR反应条件:

步骤	温度	时间
1	94 $^{\circ}$ C	5 min
2	94 $^{\circ}$ C	1 min
3	退火温度	40 s
4	72 $^{\circ}$ C	60 s
5	72 $^{\circ}$ C	5 min
6	4 $^{\circ}$ C	0 s

2~4步循环30~35次。

实验所用引物序列:

Genes		Primers (Sequences bp T($^{\circ}$ C) Accession 5'-3')			
SYN I	Sence:	GCC TGG TAT TTG GGC ACT T	188	54.2	NM-006950
	Anti-sence:	AAG TGC CCA AAT ACC AGG C			
SYN II	Sence:	CCA CTA AAA CTC ACA GCG AAC	214	52.8	NM-133625
	Anti-sence:	GTT CGC TGT GAG TTT AGT GG			
SYN III	Sence:	CAC GCT GGT GAT GTC CTG	235	53.2	AF-046873
	Anti-sence:	CAG GAC ATC ACC AGC GTG			

¹ 九江市第一人民医院神经外科; 江西省九江市332000; ² 郑州大学第一附属医院神经外科, 河南省郑州市450052; ³ 河南省高等学校临床医学重点学科开放实验室, 河南省郑州市450052; ⁴ 郑州大学生物工程系, 河南省郑州市450001

胡炜, 男, 1971年生, 河南省开封市人, 汉族, 博士, 副主任医师, 主要从事干细胞培养与移植及神经功能缺损修复方面的研究。
zzdxhuhw@163.com

通讯作者: 杨波, 主任医师, 教授, 博士生导师, 郑州大学第一附属医院神经外科, 河南省郑州市450052
yangbo96@126.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2011)14-02500-04

收稿日期: 2010-09-06
修回日期: 2010-11-18
(20100906011/M - L)

以GAPDH做内参照。凝胶电泳后凝胶成像分析仪对电泳条带进行定量分析, 将各条带灰度值与内参照GAPDH的灰度值比较, 得出实验组和对照组中各基因转录水平的相对含量。

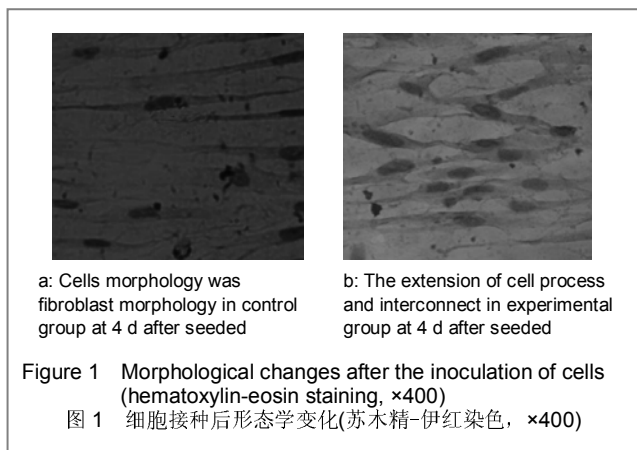
主要观察指标: 苏木精-伊红染色观察细胞形态变化, 免疫组化SP法检测接种第2, 4天细胞SYN表达, RT-PCR法检测接种前和接种后第2, 4天细胞SYN I、SYN II、SYN III基因转录水平的表达。

统计学分析: 应用SPSS 12.0软件处理, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多个样本均数间的比较用方差分析, 两均数间比较用独立样本 t 检验。 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 细胞形态变化 对照组接种第2, 4天细胞呈纤维细胞形态, 梭形, 核大, 呈漩涡状生长或成簇生长, 胞体细长, 类似成纤维细胞, 见图1a。

实验组接种第2天可见所种植细胞呈球形, 胞体伸出突起; 第4天时部分细胞的突起延伸, 相互连接, 见图1b。



2.2 免疫组化检测 组内第4天与第2天比较, 对照组SYN表达无明显变化, 实验组SYN表达升高且有明显差异($P < 0.01$)。第2, 4天实验组SYN表达均明显高于对照组, 差异有显著性意义($P < 0.01$)。

表1 两组细胞 SYN 相对含量比较 Table 1 Comparison of the relative amount of SYN in two group ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)		
Group	2 d	4 d
Experimental	13.01 $\pm$ 1.52 ^a	23.53 $\pm$ 2.73 ^{ab}
Control	5.81 $\pm$ 0.70	6.16 $\pm$ 0.82

^a $P < 0.01$, vs. control group; ^b $P < 0.01$, vs. the second day

2.3 RT-PCR结果 接种前和接种第2, 4天, RT-PCR方法检测两组细胞SYN I、SYN II、SYN III基因转录水平的表达, 见图2。接种前和对照组第2, 4天: SYN I、

SYN II、SYN III均不表达; 实验组第2, 4天: SYN II 低表达, SYN III弱表达, SYN I 不表达, 见表2。

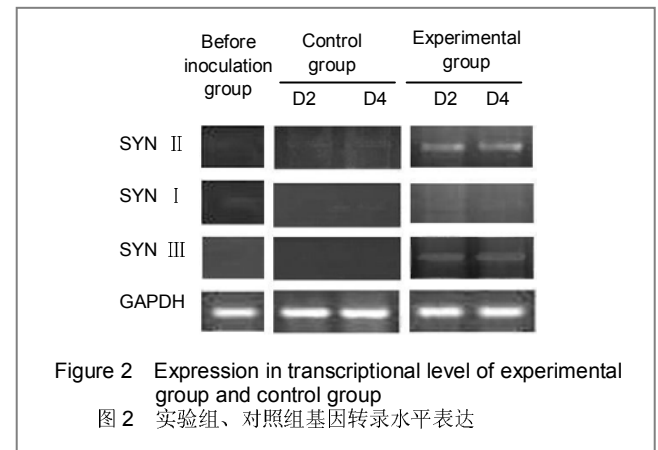


表2 细胞 SYN I、SYN II、SYN III mRNA 相对表达水平 Table 2 mRNA expression level of SYN I, SYN II, SYN III ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)			
Group	SYN I	SYN II	SYN III
Before inoculation	0.13 $\pm$ 0.01	0.19 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.01
Control group			
2 d	0.13 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.02
4 d	0.12 $\pm$ 0.02	0.16 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.02
Experimental			
2 d	0.11 $\pm$ 0.03	0.75 $\pm$ 0.03 ^a	0.62 $\pm$ 0.02 ^a
4 d	0.11 $\pm$ 0.02	0.76 $\pm$ 0.02 ^a	0.54 $\pm$ 0.02 ^a

^a $P < 0.01$, vs. control group

3 讨论

天然细胞外基质对成体干细胞神经发育的影响, 是目前的研究热点, 国内外研究多侧重于神经标志物表达的研究, 针对突触发育的研究较少。本实验就羊膜细胞外基质对突触相关蛋白表达的影响进行了研究, 探讨了天然细胞外基质对突触发育的影响, 后期实验拟采用神经基质进一步研究。

将成体干细胞准确诱导分化为神经系细胞, 是应用成体干细胞治疗神经系统疾病的基础。因而, 研究成体干细胞分化的调控, 特别是神经分化的调控成为神经科学工作者研究的重点。目前, 研究者采用多种因素, 包括生长因子类、抗氧化剂类、细胞生存微环境等进行神经诱导。

依据胚胎发育、细胞遗传学的理论, 以及“干细胞巢”理论的提出^[1-2], 证明了干细胞的分化与其周围的微环境, 即细胞因子、细胞外基质密切相关, 干细胞对微环境中特定的调节信号做出反应, 进而进一步分化为不同类型的细胞。

目前, 人们已经发现细胞外基质上培养的胚胎干细胞能够分化成各种类型的细胞^[5], 但是细胞外基质对于

成体干细胞分化的影响,特别是向神经细胞分化的影响目前报道较少。因此,本实验提取天然的脱细胞外基质,接种人脐血间质干细胞,研究接种前后细胞形态学变化和SYN表达的变化。

细胞外基质主要由胶原蛋白、弹力蛋白、纤维连接蛋白、糖蛋白、层粘连蛋白组成。具有多种功能,包括:提供结构性支持并保持足够的张力;作为细胞黏附和迁移的基质;调节细胞的分化和代谢^[6];髓鞘形成^[7]、保护神经元,并且调节突触的整合^[8];其特异性组分的改变可影响细胞生长因子对干细胞存活、增殖和分化的调控。

实验发现,实验组细胞培养4 d后,细胞突起的生长明显优于对照组,并且伸出多个突起,部分细胞间形成网状结构。接种前和对照组第2、4天,SYN I、SYN II、SYN III均不表达;实验组第2、4天,SYN II低表达,SYN III弱表达,SYN I不表达。研究表明,SYN III的表达提示细胞生长锥的形成^[9],而SYN II的表达同时伴随着细胞突起的延伸,及部分细胞突起的相互接触^[10]。

细胞分化过程中需要细胞外信号与细胞外基质协调作用才能够决定细胞的命运。细胞外基质在中枢神经系统的发育和损伤的修复过程中起着重要的作用^[11],神经突起的伸长、回缩与细胞生长端及细胞外基质黏着相关。生长端表面的跨膜糖蛋白与细胞外基质能够形成短暂的黏着连接,引起细胞形态改变,胞内细胞骨架蛋白发生重构,引起神经突起生长。

本实验结果也说明羊膜脱细胞基质可以激发和引导细胞突起的延伸,这与细胞外基质中的层粘连蛋白密切相关^[12]。层粘连蛋白是构成细胞外基质的主要非胶原蛋白,为基膜的重要成分,层粘连蛋白通过表面受体为细胞提供一种黏附表面支持和引导生长锥前行,促进神经突起生长和延伸,影响着神经元发育^[13],在营造神经再生微环境和神经再生中起重要作用。

实验组细胞SYN I不表达,目前已经有研究表明在SYN II的表达使细胞产生突起并逐渐延长之后,SYN I的表达使细胞轴突生长、维持,形成一、二级分支并最终成熟^[14]。这说明在提取的细胞外基质上接种人脐血间质干细胞,可以促使细胞突起的产生、延伸并部分相互连接,为人脐血间质干细胞向神经细胞分化提供了有利的基础。然而,人脐血间质干细胞并未表达SYN I,即没有产生分化成熟的轴突,分析原因可能因为神经细胞的分化、神经轴突的生长不仅仅需要相关的细胞外基质,而且与其周围的微环境,包括细胞因子、细胞间的直接接触和间接联系(旁分泌、细胞因子等)等密切相关,是一个极其复杂的微环境,这需要进一步深入研究神经细胞分化的相关条件,为神经损伤提供充足的细胞来源。

在本实验条件下,羊膜脱细胞基质可以促使人脐血间质干细胞突起的产生、延伸并部分相互连接,表达SYN,为脐血间质干细胞神经分化提供了有利的条件。然而,干细胞神经分化的调控是一个复杂的过程,对其微环境的研究有望进一步阐明此过程。

4 参考文献

- [1] Moore KA, Lemischka IR. Stem cells and their niches. *Science*. 2006;311(5769):1880-1885.
- [2] Li L, Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005;21:605-631.
- [3] Avram MM, Avram AS, James WD. Subcutaneous fat in normal and diseased states 3. Adipogenesis: from stem cell to fat cell. *J Am Acad Dermatol*. 2007;56(3):472-492.
- [4] Taleb S, Cancelli R, Clément K, et al. Cathepsin s promotes human preadipocyte differentiation: possible involvement of fibronectin degradation. *Endocrinology*. 2006;147(10):4950-4959.
- [5] Levenberg S, Huang NF, Lavik E, et al. Differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymer scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(22):12741-12746.
- [6] Mirsky R, Jessen KR, Brennan A, et al. Schwann cells as regulators of nerve development. *J Physiol Paris*. 2002;96(1-2):17-24.
- [7] Hari A, Djohar B, Skutella T, et al. Neurotrophins and extracellular matrix molecules modulate sensory axon outgrowth. *Int J Dev Neurosci*. 2004;22(2):113-117.
- [8] Ard MD, Bunge RP, Bunge MB. Comparison of the Schwann cell surface and Schwann cell extracellular matrix as promoters of neurite growth. *J Neurocytol*. 1987;16(4):539-555.
- [9] Ferreira A, Kao HT, Feng J, et al. Synapsin III: developmental expression, subcellular localization, and role in axon formation. *J Neurosci*. 2000;20(10):3736-3744.
- [10] Ferreira A, Kosik KS, Greengard P, et al. Aberrant neurites and synaptic vesicle protein deficiency in synapsin II-depleted neurons. *Science*. 1994;264(5161):977-979.
- [11] Busch SA, Silver J. The role of extracellular matrix in CNS regeneration. *Curr Opin Neurobiol*. 2007;17(1):120-127.
- [12] Torigoe K, Hashimoto K, Lundborg G. A role of migratory Schwann cells in a conditioning effect of peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol*. 1999;160(1):99-108.
- [13] Davis GE, Manthorpe M, Engvall E, et al. Isolation and characterization of rat schwannoma neurite-promoting factor: evidence that the factor contains laminin. *J Neurosci*. 1985;5(10):2662-2671.
- [14] Chin LS, Li L, Ferreira A, Kosik KS, et al. Impairment of axonal development and of synaptogenesis in hippocampal neurons of synapsin I-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(20):9230-9234.

来自本文课题的更多信息--

作者贡献: 实验设计为胡炜, 杨波; 实验实施为胡炜, 杨枫; 实验评估为唐允佳; 资料搜集为胡炜, 陈希兰。胡炜成文, 关方霞校审, 胡炜对文章负责。

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: 实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。

本文创新性: 以“extracellular matrix; differentiation; stem cell; synapsin”为检索词检索 medline 数据库和以“细胞外基质、分化、干细胞、突触蛋白”为检索词检索 CNKI 数据库, 国内外同类研究多侧重于神经标志物表达的研究, 针对突触发育的研究较少。课题设计应用羊膜脱细胞基质, 研究其对脐血间质干细胞突触素表达的影响, 为干细胞的体外分化提供了新的思路。