

豚鼠脂肪间充质干细胞向类神经元样细胞的分化**

郭伟¹, 吉彬¹, 马艳², 毕晓娟², 刘立中¹

Guinea pig adipose mesenchymal stem cells differentiate into neuron-like cells

Guo Wei¹, Ji Bin¹, Ma Yan², Bi Xiao-juan², Liu Li-zhong¹

Abstract

BACKGROUND: At present, most of the animal experiments about ear stem cells research are use the stem cells of the other animal species for the guinea pig model. The stem cells from guinea pig was rarely reported.

OBJECTIVE: To explore the differentiated potential of the guinea pig adipose mesenchymal stem cells into neuron-like cells.

METHODS: Guinea pigs adipose tissue were obtained, the adipose mesenchymal cells were isolated and cultured to the 3rd generation. (1) The absorbance values of cell proliferation from 1 to 10 days were tested by cck-8 kit. (2) The immunophenotype were detected by flow cytometry. (3) Differentiation of neuron-like cells was verified by nestin, glial fibrillary acidic protein (GFAP) and neurofilament protein 200 (NF200) immunofluorescence staining.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The growth curve of adipose mesenchymal stem cells proliferation was similar to S-shaped, the first 3 days was the incubation period after passage, the cell populations entered logarithmic growth phase from the 4th day, after the 8th day they entered into the platform period. (2) The expression rate cells immune phenotype CD29 was 86.3%, CD44 was 55.5%, CD45 was 0.4%. (3) After differentiation of nerve cells, the morphology of cells was similar to neural cells, the results of nestin, GFAP and NF200 staining were positive. Guinea pig adipose mesenchymal stem cells are easy to isolation, culture and amplification *in vitro*. They have the potential to differentiate into neuron-like cells.

Guo W, Ji B, Ma Y, Bi XJ, Liu LZ. Guinea pig adipose mesenchymal stem cells differentiate into neuron-like cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(1): 43-46. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 目前关于耳科干细胞研究的动物实验大多是将其他动物种属的干细胞用于豚鼠模型, 而对于豚鼠本身来源的干细胞研究报道极少。

目的: 探寻豚鼠脂肪间充质干细胞向神经细胞样分化的潜能。

方法: 取豚鼠脂肪, 分离脂肪间充质干细胞培养至第3代, cck-8 试剂盒检测第1~10天细胞增殖A值, 流式细胞仪检测细胞的免疫表型; 成神经诱导并行巢蛋白、胶质纤维酸性蛋白、神经丝蛋白200免疫荧光染色。

结果与结论: 豚鼠脂肪间充质干细胞增殖的生长曲线近似“S”形, 传代后经过3d的潜伏期, 3d后进入对数生长期, 8d后进入平台期, 其细胞的免疫表型CD29表达率86.3%, CD44表达率55.5%, CD45表达率为0.4%, 成神经细胞诱导后细胞形态与神经细胞类似, 巢蛋白、胶质纤维酸性蛋白、神经丝蛋白200染色均呈阳性。说明豚鼠脂肪间充质干细胞在体外易于分离、培养及扩增, 具有向神经细胞样分化的潜能。

关键词: 类神经元样细胞; 豚鼠; 脂肪间充质干细胞; 神经分化; 耳科; 细胞

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.01.009

郭伟, 吉彬, 马艳, 毕晓娟, 刘立中. 豚鼠脂肪间充质干细胞向类神经元样细胞的分化[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(1):43-46. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

脂肪间充质干细胞(adipose-derived mesenchymal stem cells, ADSCs)由于其来源丰富、获取容易、扩增迅速、具有向多种谱系细胞的分化潜能等优点, 成为继胚胎干细胞、骨髓间充质干细胞以外另一个研究热点^[1-2]。

ADSCs可以分化成为脂肪细胞、成骨细胞、软骨细胞、肌细胞^[3-6], 广泛应用于骨重建、整形外科领域, 以及心肌、软骨、和软组织缺陷的修复^[4]。同时, ADSCs具有向神经细胞分化的潜能, 很多课题组使用人和啮齿类的脂肪干细胞成功证明了这一点^[7]。豚鼠一直以来作为耳科实验的首选模型, 是因为豚鼠的耳蜗比其他啮

齿类大, 豚鼠中耳和内耳的外科手术是比较容易开展的; 同时, 一些应用于在豚鼠的耳外科技术都已经非常成熟^[8]。目前, 大部分的耳科实验研究, 是将鼠类等物种的干细胞用于豚鼠模型^[9]。然而, 有些研究指出, 由于可能引起了宿主生物体的免疫应答, 植入的异体细胞存活时间非常有限^[10]。因此, 研究豚鼠自身来源的间充质干细胞的生物特性显得尤为重要。

实验通过对豚鼠ADSCs分离培养以及鉴定, 判断其干细胞特性, 并将其向神经细胞分化, 研究其向神经样细胞分化的潜能。

1 材料和方法

设计: 动物实验, 细胞形态学观察。

¹Department of Otolaryngology, ²Medical Research Center, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Guo Wei★, Studying for master's degree, Department of Otolaryngology, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
yiyi_5010@163.com

Correspondence to: Liu Li-zhong, Doctor, Chief physician, Department of Otolaryngology, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
lulizhongno. 1@163.com

Supported by: Graduate Innovation Fund of Xinjiang Medical University, No. MCR010-6*

Received: 2011-07-30
Accepted: 2011-11-08

新疆医科大学第一附属医院,¹耳鼻喉科,²医学研究中心, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054

郭伟★, 男, 1982年生, 山东省潍坊市人, 汉族, 新疆医科大学在读硕士, 主要从事耳鼻喉科组织工程与干细胞治疗方面的研究。
yiyi_5010@163.com

通讯作者: 刘立中, 博士, 主任医师, 新疆医科大学第一附属医院耳鼻喉科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054
lulizhongno.1@163.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2012)01-00043-04

收稿日期: 2011-07-30
修回日期: 2011-11-08
(20110530014/D · C)

时间及地点: 于2010-12/2011-07在新疆医科大学第一附属医院医学研究中心干细胞室。

材料: 健康豚鼠20只, 雄性, 体质量200~300 g, 实验动物许可证号: 伦申号A-2010102006。普通级, 实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部2006年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

试剂与仪器:

主要试剂、仪器	来源
低糖 DMEM 培养液(LG-DMEM)、Neural Basal 培养基、B27 添加剂、表皮生长因子、成纤维细胞生长因子碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)	GIBCO
胎牛血清(FBS)	Hyclone
I 型胶原酶	Worthington
CCK8	武汉博士德
兔抗巢蛋白多克隆抗体、兔抗 GPAF 多克隆抗体、小鼠抗神经丝蛋白 200 单克隆抗体、山羊抗兔 TRITC 二抗、山羊抗小鼠 FITC 二抗	北京中杉
小鼠抗 CD29-PE、小鼠抗 CD44-PE、小鼠抗 CD45-FITC	BIOLEGEND
正置、倒置相差荧光显微镜	LEICA
CO ₂ 培养箱	HEALFORE
超净工作台	苏州净化
流式细胞仪	BECKMAN

实验试剂的配制: ①麻醉液: 氯胺酮40 g/kg+地西洋5 g/kg+阿托品0.05 g/kg。②细胞消化液: 质量浓度为0.5 g/L胰蛋白酶+0.53 mmol/L EDTA。③生长液: LG-DMEM+10%FBS+10⁵ U/L P/S+2.5 mmol/L NaHCO₃。④成神经诱导培养液: Neural Basal培养基+20 μg/L bFGF+20 ng/mL表皮生长因子+2%B27添加剂+10⁵ U/L P/S+2.5 mmol/L NaHCO₃。⑤成神经分化培养液: Neural Basal培养基+1%FBS+10⁵ U/L P/S+2.5 mmol/L NaHCO₃。

方法:

豚鼠ADSCs的获取、分离和培养: 采用是孙慧如等^[1]豚鼠ADSCs获取分离培养的方法, 取健康豚鼠进行腹腔注射麻醉液后, 将豚鼠置体积分数75%乙醇中浸泡5 min, 无菌条件下沿腹股沟切开3 cm长刀口, 取出腹股沟处脂肪组织, 再切开阴囊, 取出附睾处脂肪组织; 用PBS缓冲液洗去血细胞及组织碎屑; 用眼科剪及镊子剔除血管, 剪碎组织直至呈糊状; 加入0.1%

I 型胶原酶溶液, 置入37 °C水浴中振荡消化40 min; 加入与胶原酶溶液同体积的生长液, 257 g离心10 min, 可见分为3层, 上层: 漂浮的脂肪组织, 中层: 消化液, 底层: 细胞。将脂肪组织和消化液倾掉, 用生长液重悬细胞, 在正置显微镜下计数细胞数, 将细胞浓度调节为1×10⁹ L⁻¹, 接种细胞于25 cm²培养瓶中, 置入37 °C, 体积分数为5%的CO₂培养箱中孵育。48 h首次换液, 以后每三四天换液1次。

细胞传代: 当细胞生长汇合达70%~80%时吸弃培养液, 用PBS缓冲液洗涤1遍1次, 加入0.5 mL细胞消化液, 显微镜下观察, 大部分细胞开始回缩变圆, 加入1.5 mL生长液中中止消化, 100 g离心5 min, 弃上清, 加入生长液悬浮细胞, 计数, 调节细胞密度为(4~8)×10³/cm², 接种于100 mm培养皿内, 置入37 °C, 体积分数为5%的CO₂培养箱中孵育。

生长曲线测定: 培养第2代细胞, 消化后以每孔8×10³个细/200 μL生长液的浓度接种于96孔培养板内。每三四天换液1次。分别于24, 48 h、3~10 d将10 μL cck-8液加入测定孔(每次再做2个复孔)和对照孔(只加培养基, 不含细胞)中, 继续在CO₂培养箱中孵育4 h后, 用酶标仪在450 nm波长处检测其吸光度(A值), 每次取测定孔的均值, 用对照组A值调零, 整理数据, 绘制生长曲线。

流式细胞仪检测细胞表面特异性抗原: 收获培养第3代细胞, 257 g离心5 min, 弃上清, 冷PBS缓冲液洗涤2遍, 加入200 μL PBS缓冲液重悬细胞, 调整细胞的浓度至1×10⁹ L⁻¹, 分别加入一抗CD29、CD44、CD45室温避光孵育30 min, PBS冲洗, 加荧光标记II抗, 室温孵育30 min, 流式细胞仪检测。

向神经细胞元样诱导及鉴定: 收获培养第3代ADSCs按1×10⁸ L⁻¹细胞浓度接种于六孔板中, 加入成神经诱导培养液置于CO₂培养箱中孵育, 第3 d半量换液。第5~7天见培养液中形成15~20个悬浮的神经球后, 用滴管轻柔吹打神经球, 使之大部分离散成单个细胞, 4 °C下100 g离心5 min, 吸弃上清液, 加入成神经分化培养基重悬细胞, 种入铺有1%多聚赖氨酸的35 mm培养皿中, 每3 d使用成神经分化培养全量换液, 观察形态变化。巢蛋白、胶质纤维酸性蛋白、神经丝蛋白200免疫荧光染色: 诱导后细胞用40 g/L多聚甲醛固定30 min, PBS冲洗3遍, 室温下滴入体积分数3% H₂O₂ 30 min, PBS冲洗3遍, 滴入2 mol/L的HCl, 37 °C孵育1 h, PBS

冲洗3遍, 室温下滴0.1% TritonX-100 30 min, PBS冲洗3遍, 用10%正常山羊血清工作液室温孵育20 min, 吸弃工作液, 滴加相应比例稀释的一抗: 兔抗胶质纤维酸性蛋白(1:100稀释)、小鼠抗神经丝蛋白200(1:100稀释), 放入湿盒, 避光, 4 °C过夜。次日用PBS冲洗3次, 每次3 min, 滴加二抗工作液, 37 °C避光孵育30 min, PBS冲洗3次, 每次3 min。倒置显微镜下观察。

主要观察指标: 豚鼠ADSCs的生长特性及鉴定, 和向神经细胞元样诱导后的特性鉴定。

2 结果

2.1 ADSCs形态学 接种的原代细胞培养, 2~4 h后细胞开始贴壁, 呈短梭形、三角形、多角形等, 四五天细胞形态逐渐呈成纤维样细胞外观, 并成集落样生长, 7~9 d细胞集落相互汇合达90%, 呈漩涡状生长, 10~12 d细胞长满瓶底; 细胞传代稳定, 各代细胞形态均一。第10代内细胞形态及生长速度无明显改变。第12、13代后出现细胞形态变得宽大、不规则, 细胞内颗粒状物增多, 增殖速度变慢等衰老现象, 并且传代周期逐渐延长。

2.2 ADSCs生长曲线 细胞的生长曲线近似“S”形。传代后经过3 d的潜伏期后, 进入对数生长期, 8 d后进入平台期, 见图1。

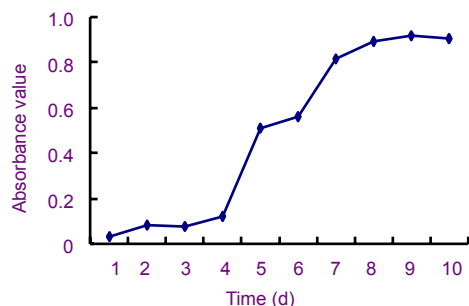


Figure 1 Growth curve of passage 3 guinea pig adipose mesenchymal stem cells
图1 第3代豚鼠ADSCs生长曲线

2.3 ADSCs免疫表型 流式细胞仪检测结果显示, 细胞均一性较好, CD29表达率为86.3%, CD44表达率55.5%, CD45表达率为0.4%, 见图2。

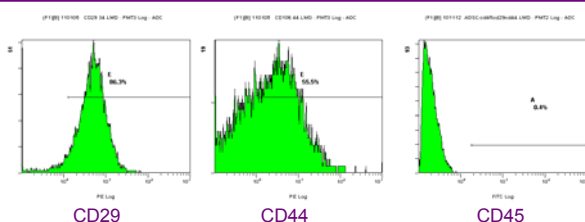
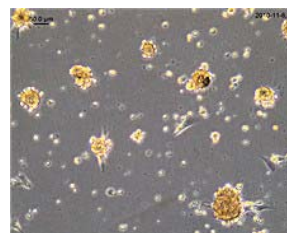


Figure 2 Surface marker of passage 3 adipose mesenchymal stem cells identified by CD29, CD44 and CD45
图2 CD29、CD44、CD45对P3细胞表面标记物的鉴定

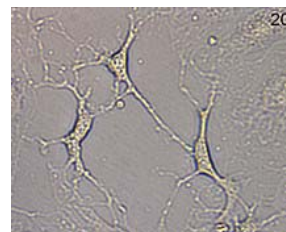
2.4 向神经细胞元样诱导 见图3, 4。



a: 3 d after induction, a large amount of neurospheres were formed (×50)

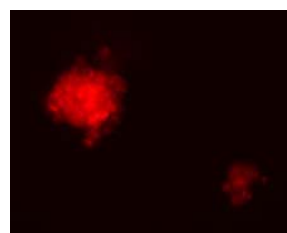


b: Cell division and proliferation was significant, neurospheres were formed (×200)

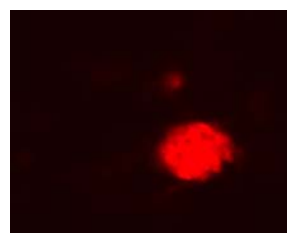
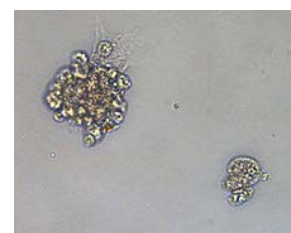


c: A small amount of slender processes were expanded from cells and showed neuron-like changes at 5 d after adherent differentiation into neurons (×200)

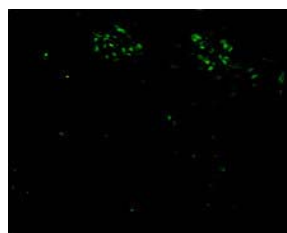
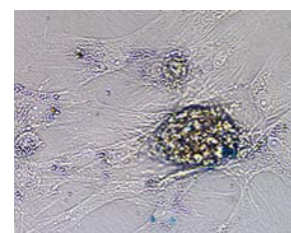
Figure 3 Morphologic changes of guinea pig adipose mesenchymal cells after neural induction
图3 豚鼠ADSCs向神经元样细胞诱导后形态变化



a, b: Positive staining of nestin at 5 d after adherent neural induction (×200)



c, d: Positive staining of glial fibrillary acidic protein at 5 d after adherent neural induction (×200)



e, f: A small amount of neurofilament protein 200 were positive stained at 7 d after adherent neural induction (×100)

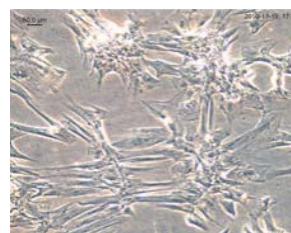


Figure 4 Identification of guinea pig adipose mesenchymal cells after induced into neuron-like cells
图4 豚鼠ADSCs向神经细胞元样诱导后鉴定

光镜下, 添加成神经诱导培养基接种的原代细胞后培养4 h后开始慢慢聚成团状, 悬浮在培养液中, 第3天细胞分裂增殖明显, 见图3a。迅速形成团状的类神经球, 见图3b。贴壁后成神经分化3~5 d后, 部分细胞胞体稍有回缩, 并伸出少量细长突起, 呈现类神经元样改变, 见图3c。免疫荧光鉴定, 贴壁3~5 d后, 免疫荧光染色巢蛋白阳性, 见图4a, b, 和胶质纤维酸性蛋白阳性, 见图4c, d。培养后第5~7天, 这些细胞少部分为神经丝蛋白200阳性表达, 见图4e, f。

3 讨论

大部分ADSCs向神经诱导方法是源于2000年Woodbury等^[12]用 β -巯基乙醇、二甲基亚砷和羟基茴香醚等化学因子作为诱导剂, 在体外诱导成年大鼠和人的骨髓间充质干细胞分化为神经样细胞的方法。然而, 新的研究认为, 使用化学因子进行诱导产生的细胞毒性和物理压力致使细胞变性收缩是细胞形态神经样变化和表达特异神经样细胞表型的原因^[13]。虽然诱导后的细胞能表现部分神经元细胞的免疫标记, 但是不能表现其他的神经元标记和神经胶质细胞的标记(胶质纤维酸性蛋白、神经微管结合蛋白、Tuj)^[14], 因此不能说明细胞真正变成了神经元。在本实验中并没有使用化学因子, 而是使用的细胞生长因子。bFGF能促进交感和副交感神经元的轴突生长, 具有促细胞丝裂原样作用^[15]。表皮生长因子可促进神经元轴突的延长和维持神经元的存活^[16]。而表皮生长因子能促使神经干细胞存活和增殖^[17]。因此, 细胞生长因子被视为将神经干细胞从神经组织中分离出来的关键因素, 它们能够促使成体脑组织中的祖细胞增殖成神经球的形态^[18]。ADSCs在加入细胞生长因子的无血清培养基中形成神经球, 能够表达神经干细胞/祖细胞的特异标记物巢蛋白和神经分化的标记神经微丝。此外, 用去掉生长因子的低血清培养基培养14 d以后, 分离的神经球不仅表达胶质纤维酸性蛋白、神经丝蛋白200, 而且出现神经突触长出的形态变化, 说明ADSCs中的某些细胞可以表达神经细胞的表型, 证明其具有成神经分化的能力。

然而一个成熟的神经细胞不但要具有神经细胞的形态、极性和表达特定位置的特异蛋白, 而且更重要的是要具有满足兴奋性, 或者是激发动作电位的能力, 和通过突触释放神经递质与其他细胞联系的能力^[19]。因此, 在未来的研究中, 应更深入确定由ADSCs转化的类神经细胞元样的神经特性。

4 参考文献

- [1] Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*. 2007;100(9):1249-1260.

- [2] Zhu Y, Liu T, Song K, et al. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Biochem Funct*. 2008;26(6):664-675.
- [3] Neupane M, Chang CC, Kiupel M, et al. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2008;14(6):1007-1015.
- [4] Schaffer A, Büchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*. 2007;25(4):818-827.
- [5] Strem BM, Hickok KC, Zhu M, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med*. 2005;54(3):132-141.
- [6] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7(2):211-228.
- [7] Franco Lambert AP, Fraga Zandonai A, Bonatto D, et al. Differentiation of human adipose-derived adult stem cells into neuronal tissue: does it work? *Differentiation*. 2009;77(3):221-228.
- [8] Fröhlich K, Scherzed A, Mlynski R, et al. Multipotent stromal cells for autologous cell therapy approaches in the guinea pig model. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 2011;73(1):9-16.
- [9] Okano T, Nakagawa T, Endo T, et al. Engraftment of embryonic stem cell-derived neurons into the cochlear modiolus. *Neuroreport*. 2005;16(17):1919-1922.
- [10] Hu Z, Wei D, Johansson CB, et al. Survival and neural differentiation of adult neural stem cells transplanted into the mature inner ear. *Exp Cell Res*. 2005;302(1):40-47.
- [11] Sun HR, Wang Y, Dong MM. ZHONGGUO ZUZHONGCHENG YANJIU YU LINCHUANG KANGFU. 2007;11(7):1213-1215. 孙慧如, 王英, 董明敏. 豚鼠脂肪干细胞的分离培养与鉴定[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(7): 1213-1215.
- [12] Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *Neurosci Res*. 2000;61(4):364-370.
- [13] Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells*. 2007;25(11):2896-2902.
- [14] Lu P, Blesch A, Tuszynski MH. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *J Neurosci Res*. 2004;77(2):174-191.
- [15] Sieber-Blum M, Zhang JM. Growth factor action in neural crest cell diversification. *J Anat*. 1997;191(Pt 4):493-439.
- [16] Newman MB, Davis CD, Kuzmin-Nichols N, et al. Human umbilical cord blood (HUCB) cells for central nervous system repair. *Neurotox Res*. 2003;5(5):355-368.
- [17] Ciccolini F. Identification of two distinct types of multipotent neural precursors that appear sequentially during CNS development. *Mol Cell Neurosci*. 2001;17(5):895-907.
- [18] Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 1992;255(5052):1707-1710.
- [19] Lu P, Tuszynski MH. Can bone marrow-derived stem cells differentiate into functional neurons? *Exp Neurol*. 2005;193(2):273-278.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 新疆医科大学研究生创新基金(MCR010-6)。

作者贡献: 第一作者进行实验设计, 第三、四、五作者进行实施, 第五作者进行实验评估, 资料收集为第一、四、五作者, 第一作者成文, 第五作者审校, 第一、五作者对文章负责。

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: 实验符合中华人民共和国科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

本文创新性: 用去掉生长因子的低血清培养基培养 14 d 以后, 分离的神经球不仅表达胶质纤维酸性蛋白、神经丝蛋白 200, 而且出现神经突触长出的形态变化, 说明 ADSCs 中的某些细胞可以表达神经细胞的表型。