

羊膜间充质干细胞向运动神经元前体细胞的分化☆

胡 炜^{1,2}, 杨 枫¹, 唐尤佳¹, 杨 波², 关方霞³

文章亮点: 研究了人羊膜间充质干细胞体外在膜样细胞外基质及因子共同作用下, 分步诱导后向运动神经元分化的过程, 证明羊膜间充质干细胞由一组具有不同表型的细胞亚群组成, 其中包含神经祖细胞亚群。分步诱导的方法可以使羊膜间充质干细胞向运动神经元前体细胞分化。

关键词: 动物模型; 脊髓损伤; 羊膜间充质干细胞; 神经分化; 干细胞膜

摘要

背景: 成体干细胞在细胞外基质、细胞因子分步诱导下的神经分化, 尚少见报道。

目的: 探索天然膜样细胞外基质加多种细胞因子诱导作用下, 人羊膜间充质干细胞体外的神经分化情况。

方法: 健康人羊膜分离培养羊膜间充质干细胞, 酶、化学方法制作膜样细胞外基质并检测其生物相容性。将细胞分为2组, 实验组细胞接种在包被膜样基质玻片的24孔板中, 更换不同培养基分步诱导分化; 对照组去除膜样基质, 其余方法同实验组。

结果与结论: 实验组细胞神经元特异性烯醇化酶、兔抗人突触蛋白表达升高, 神经胶质纤维酸性蛋白表达降低, 兔抗人突触蛋白表达明显高于对照组, 对照组神经元特异性烯醇化酶表达升高, 其余无明显变化。第1代羊膜间充质干细胞不同程度表达胚胎干细胞和神经祖细胞标志, 诱导后实验组各转录因子均有变化。说明实验所用方法提取的细胞外基质具有良好的生物相容性, 可以促进羊膜间充质干细胞神经分化过程中的突触成熟, 分步诱导的方法可以使羊膜间充质干细胞向运动神经元前体细胞分化。

Amniotic mesenchymal stem cells differentiate into motor neuron precursor cell

Hu Wei^{1,2}, Yang Feng¹, Tang You-jia¹, Yang Bo², Guan Fang-xia³

Abstract

BACKGROUND: The reports about neural differentiation of adult stem cells induced by extracellular matrix and cytokines are rarely reported.

OBJECTIVE: To explore the neural differentiation of human amniotic mesenchymal stem cells *in vitro* induced by natural membrane-like extracellular matrix.

METHODS: Amniotic mesenchymal stem cells were isolated from healthy human amnion, and membrane-like extracellular matrix was made by enzyme digestion and chemical method and biocompatibility was detected. The cells were divided into two groups. In the experimental group, the cells were seeded in 24-well plates collated with capsule-like matrix slides and culture medium was changed. In the control group, membrane-like matrix was removed and the other procedures were the same as the experimental group.

RESULTS AND CONCLUSION: After step-by-step induction in the experimental group, the expressions of neuron-specific enolase and rabbit anti-human synaptic proteins were increased and the expression of neuroglial fibrillary acidic protein was decreased, the expression of rabbit anti-human synaptic protein in the experimental group was significantly higher than that in the control group. In the control group, the expression of neuron-specific enolase was increased significantly and the expression of rabbit anti-human synaptic protein and neuroglial fibrillary acidic protein were not changed. Passage 1 amniotic mesenchymal stem cells could express the marker of embryonic stem cells and neural progenitor cells, the transcription factors in the experimental group were changed after induction. It indicates that the extracellular matrix extracted by step-by-step method had a good biocompatibility, which could promote the mature of synapses during the differentiation of amniotic mesenchymal stem cells. Induction by step-by-step method could enrich neural progenitor cells in amniotic mesenchymal stem cells and promote them to differentiate into motor neuron-like precursor cells.

Hu W, Yang F, Tang YJ, Yang B, Guan FX. Amniotic mesenchymal stem cells differentiate into motor neuron precursor cell. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(36): 6767-6773.

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 郑州大学生物工程系, 河南省郑州市 450001

胡炜☆, 男, 1971年生, 河南省开封县人, 汉族, 2009年郑州大学毕业, 博士, 副主任医师, 主要从事干细胞培养、移植和神经系统损伤修复方面的研究。
huwei18120@sina.com

通讯作者: 杨波, 博士, 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: B
文章编号: 2095-4344
(2012)36-06767-07

收稿日期: 2011-10-02
修回日期: 2011-11-16
(20110622005/D·C)

¹Department of
Neurosurgery, First
People's Hospital of
Jiujiang City, Jiujiang
332000, Jiangxi
Province, China;

²Department of
Neurosurgery, First
Affiliated Hospital of
Zhengzhou
University,
Zhengzhou 450052,
Henan Province,
China; ³Department
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
huwei18120@
sina.com

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

Received: 2011-10-02
Accepted: 2011-11-16

0 引言

干细胞分胚胎干细胞和成体干细胞。胚胎干细胞临床应用面临免疫排斥及伦理等方面的影响。成体干细胞取材方便、来源广、无免疫排斥和伦理学问题,易于临床应用。将成体干细胞定向诱导成所需的功能细胞后移植,可为组织缺损、功能障碍等细胞替代治疗提供新的细胞来源。目前,研究者多采用生长因子类、抗氧化剂类等进行诱导,多数诱导后的神经元样细胞阳性率不高。

神经系统细胞分化也是随外环境变化,细胞内特定基因在特定地点和时间获得表达,向各种类型细胞分化进而形成器官、个体的过程。“动力学相关性”模型和神经元分化模型及近来“干细胞巢”理论的提出^[1-3],证明了干细胞分化也遵循神经发育时的规律,与其周围微环境,即细胞因子、细胞外基质密切相关。因此,模拟神经发育过程的局部微环境,是诱导干细胞向神经系统细胞分化的基础,成体干细胞的神经分化是否可模拟神经发育的微环境,用分步诱导的方式呢?

以往的诱导方式是应用化学制剂或生物因子,细胞外基质与细胞因子作用下分步向神经系统细胞的分化,目前报道较少见^[4-6]。实验课题组研究了人羊膜间充质干细胞体外在膜样细胞外基质及因子共同作用下,分步诱导后向运动神经元分化的过程,为神经移植探索新的细胞来源,为成体干细胞的体外神经分化探索新的方法。

1 材料和方法

设计: 细胞形态学观察。

时间及地点: 于2008-06/09在郑州大学河南省重点实验室完成。

材料:

羊膜: 严格无菌条件下取健康(检测乙肝7项、HCV、HIV、梅毒等其他相关传染性指标均呈阴性)剖宫产产妇自愿捐献的羊膜,标本来源于郑州大学第一附属医院产科,产妇自愿参加,充分知情并签署“知情同意书”,标本采集获医院伦理委员会批准。

试剂:

试剂	来源
鼠抗巢蛋白抗体、鼠抗神经元特异性烯醇化酶、兔抗神经胶质纤维酸性蛋白、兔抗人突触蛋白、碱性成纤维细胞生长因子	北京中杉金桥生物技术有限公司
兔抗神经丝蛋白抗体	金思特科技有限公司

方法:

人羊膜间充质干细胞的分离与培养: 取胎盘羊膜约10 cm×10 cm大小, PBS充分冲洗、剪碎。2.5 g/L 胰酶37 ℃消化30 min, 终止消化后以1.0 g/L 胶原酶37 ℃消化60 min。过不锈钢网成单细胞悬液, 1 000 r/min离心10 min收集细胞, 锥虫蓝染色计数活细胞, 以 $2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 浓度接种于75 mL培养瓶。

细胞的培养、纯化及扩增: 培养基用DMEM:F12为1:1的DMEM/F12加体积分数为10%的胎牛血清、20 g/L碱性成纤维细胞生长因子, 细胞于75 mL培养瓶中, 37 ℃、饱和湿度、体积分数5%的CO₂培养箱培养, 三四天换液1次。达80%-90%融合时, 胰酶消化传代。

膜样基质的制备: 将羊膜修剪成3 cm×3 cm, 甘油浸泡, 4 ℃保存, 24 h×3次; 羊膜生理盐水反复冲洗, 细胞面向上, 贴于消毒的微孔滤膜上, 低渗溶液(生理盐水100 mL加入蒸馏水100 mL)浸泡3 min, 0.25% 胰酶4 ℃作用10 h; 生理盐水中摇床震荡1 h×3次; 生理盐水冲洗, 摇床振荡1 h×3次, 制成脱细胞膜样基质^[7]。

分组及细胞诱导分化: 将细胞分为实验组和对照组, 每组均设8个复孔为样本。

实验组: 人羊膜间充质干细胞进行分步诱导分化。①第1步: 人羊膜间充质干细胞在基础培养基中培养, 传代至第3代碱性成纤维细胞生长因子预诱导, 此步骤结束时计为day 0(d 0)。②第2步: 第3代人羊膜间充质干细胞以 $4 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 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B27替代血清培养2 d, 计为day 0-day 2(d 0-d 2)。③第3步: 细胞在膜上接近40%融合, 撤去碱性成纤维细胞生长因子, PBS洗, 加入维甲酸、神经生长因子, 在膜样基质上进一步培养24 h, 计为day 2-day 3(d2-d3)。④第4步: PBS洗, 撤去维甲酸, 加入碱性成纤维细胞生长因子继续培养3 d,

计为day 4-day 6(d4-d6)。

对照组: 去除膜样基质, 余步骤与实验组相同。

脱细胞基质观察: ①形态学改变: 随机取少量膜样基质和新鲜羊膜, 40 g/L多聚甲醛固定后苏木精-伊红染色, 光镜观察是否有细胞残留。②细胞相容性: 脱细胞基质用培养液预湿, 将3代的人羊膜间充质干细胞悬液(细胞浓度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$)1 mL接种于脱细胞基质, 加入9 mL DMEM/F12培养液, 体积分数5%CO₂、饱和湿度培养, 隔日换液, 倒置相差显微镜下观察细胞的黏附、生长情况。③膜样基质对细胞增殖的影响: 第3代人羊膜间充质干细胞以 $4 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 细胞浓度接种在底部包被膜样基质的24孔板中, 以同样浓度接种的未包被膜样基质的24孔板作对照。用基础培养基培养, 每隔24 h取6孔, 胰酶消化混合后1 mL培养基重悬细胞, 锥虫蓝染液计数活细胞, 重复3次, 取均值为当天的细胞数, 共计4 d。

细胞形态及蛋白、基因水平检测: 接种前第1-3代细胞, 以及接种后两组1, 3, 6 d细胞24孔板各取6孔, 用PBS清洗, 40 g/L多聚甲醛固定。

形态变化: 固定好的接种后1, 3, 6 d细胞进行苏木精-伊红染色。OLMPUS倒置相差显微镜下观察染色前细胞形态, 摄取图像, OLMPUS荧光显微镜下观察染色后形态, 摄取图像。

免疫细胞化学检测: 固定好的接种前第1, 2, 3代细胞和接种后第1, 3, 6天的细胞, 免疫荧光检测兔抗人突触蛋白1、神经元特异性烯醇化酶表达的情况, 荧光显微镜检测荧光和照相。SP法检测巢蛋白、神经元特异性烯醇化酶、神经胶质纤维酸性蛋白、兔抗人突触蛋白1、BrdU的表达情况, 如下。

蛋白水平检测指标的意义:

指标	分布	功能
Nestin	中枢神经系统	鉴定神经祖细胞
NSE	神经元; 神经内分泌细胞	鉴定神经元
SYN	轴突终末; 胞体(发育时)	神经递质释放, 突触发生、延伸
GFAP	胶质细胞的胞浆	标记星形胶质细胞

Nestin: 巢蛋白; NSE: 神经元特异性烯醇化酶; GFAP: 神经胶质纤维酸性蛋白; SYN: 兔抗人突触蛋白

基因转录水平检测: 取第1代细胞和分化过程中第0, 2, 3, 6天时的细胞, PBS洗3遍, 进行RT-PCR检测基因转录水平表达。以GAPDH做内参。反应产物电泳后进行光密度定量分析, 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。引物在NCBI基因库中比对后, 由生物公司合成。各引物序列, 见表1。

表1 实验所用引物序列表
Table 1 Primers used in the experiment

Gene		Primer (sequences 5'-3')	bp	T.	Accession
Nanog	Sense:	GCT'ATT'CTT'CGG'	267	52.0	NM-024865
	Anti-sense	AAC'TGG'CCG'AAG'			
Sox2	Sense:	ACC TTT GTA GGC	131	64	NM-005634
	Anti-sense	TGG GAA TCG			
OCT4	Sense:	ATC ACG GCA GAA	167	52.6	NM-002701
	Anti-sense	ATC ACC AAC			
Nestin	Sense:	GTT'CCC'AAT'TCC'	197	52.6	NM-006617
	Anti-sense	TTC'CTT'A			
SYN I	Sense:	TAA'GGA'AGG'AAT'	188	54.2	NM-006950
	Anti-sense	TGG'GAA'C			
SYN II	Sense:	CCC'TTC'CAG'	214	52.8	NM-133625
	Anti-sense	ACT'CCA'CTC			
SYN III	Sense:	ACA'CTC'CTC'TTC'	235	53.2	AF-046873
	Anti-sense	TCC'CTC'C			
ISL-1	Sense:	GCC'TGG'TAT'TTG'	172	50.7	NM_002202
	Anti-sense	GGC'ACT'T			
Hb9	Sense:	AAG'TGC'CCA'AAT'	221	60.4	AF-107457
	Anti-sense	ACC'AGG'C			
SYN II	Sense:	CCA'CTA'AAA'CTC'	214	52.8	NM-133625
	Anti-sense	ACA'GCG'AAC			
SYN III	Sense:	GTT'CGC'TGT'GAG'	235	53.2	AF-046873
	Anti-sense	TTT'AGT'GG			
ISL-1	Sense:	CAC'GCT'GGT'GAT'	172	50.7	NM_002202
	Anti-sense	GTC'CTG			
Hb9	Sense:	CAG'GAC'ATC'ACC'	221	60.4	AF-107457
	Anti-sense	AGC'GTG			
ISL-1	Sense:	GAT'TAC'ACT'CCG'	172	50.7	NM_002202
	Anti-sense	CAC'ATT			
Hb9	Sense:	AAT'GTG'CGG'AGT'	221	60.4	AF-107457
	Anti-sense	GTA'ATC			
SYN II	Sense:	GCT'GCG'TTT'CCA'	221	60.4	AF-107457
	Anti-sense	TTT'CAT'CC			
SYN III	Sense:	GGA'TGA'AAT'GGA'	235	53.2	AF-046873
	Anti-sense	AAC'GCA'GC			

NSE: neuron-specific enolase; GFAP: glial fibrillary acidic protein; SYN: synuclein

RT反应条件: 30 °C, 10 min; 42 °C, 30 min; 99 °C, 5 min; 5 °C, 5 min。盖温47 °C, 1个循环。

PCR反应条件: 94 °C, 5 min; 94 °C, 1 min; 退火温度, 40 s; 72 °C, 60 s; 72 °C, 5 min; 4 °C, 0 s。2-4步循环30-35次。

主要观察指标: 阳性细胞计数: 染色后, 各取6张阳性表达玻片, 镜下($\times 100$)每张选取4个视野, 网格计数法计数阳性细胞表达(阳性细胞数/细胞总数 $\times 100\%$), 重复实验3次。

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 脱细胞基质形态变化

新鲜羊膜: 倒置显微镜下可见紧密连接在一起的扁平上皮细胞, 见图1a; 苏木精-伊红染色后可见在致密层

上紧密连接的细胞, 蓝色的细胞核, 浅红色的胞浆和橘红色的基质, 见图1b。

脱细胞羊膜: 倒置显微镜下可见脱去细胞后的羊膜表面凹凸不平, 为三维立体结构, 看不到细胞形态, 见图1c; 苏木精-伊红染色可见无蓝染的胞核和浅红色的胞浆, 无细胞结构, 无残留细胞碎片, 仅剩橘红色的基质, 见图1d。



Figure 1 Morphology of natural amniotic membrane and membrane-like matrix after treatment ($\times 400$)
图1 新鲜羊膜及脱细胞后膜样基质的形态变化($\times 400$)

2.2 脱细胞基质细胞相容性 见图2。



Figure 2 Morphology of passage 3 amniotic mesenchymal stem cells after seeding on the material (inverted phase contrast microscope, $\times 400$)

图2 第3代人羊膜间充质干细胞接种于材料后的形态变化(倒置相差显微镜, $\times 400$)

第3代人羊膜间充质干细胞接种于材料12 h后, 下可见细胞紧密黏附于材料表面, 见图1a; 接种于材料

24 h, 部分细胞在膜样基质上已展开, 见图2b; 材料上培养 4 d, 细胞数量明显增加, 见图2c。

2.3 对细胞增殖的影响 人羊膜间充质干细胞在贴膜上增殖良好, 第4天时, 膜样基质上生长的细胞增殖明显优于24孔板内生长的细胞($P=0.003$), 见图3。

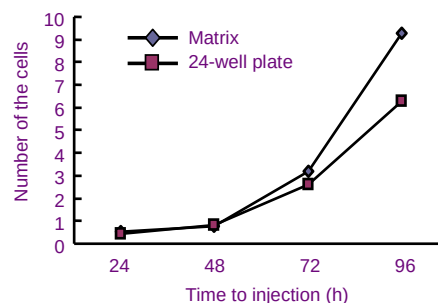


Figure 3 Comparison of proliferation between experimental group and control group: the proliferation of amniotic mesenchymal stem cells in the matrix was good, and 4 d later, the proliferation in the matrix was significantly better than that in 24-well plate ($P=0.003$)

图3 实验组、对照组的增殖情况对比: 基质组的人羊膜间充质干细胞在膜上增殖良好, 第4天时, 基质组细胞增殖明显优于24孔板组($P=0.003$)

2.4 细胞的诱导分化结果 实验组第3代人羊膜间充质干细胞呈纤维细胞形态, 接种到膜样基质后的形态变化见图4, 对照组形态变化见图5。

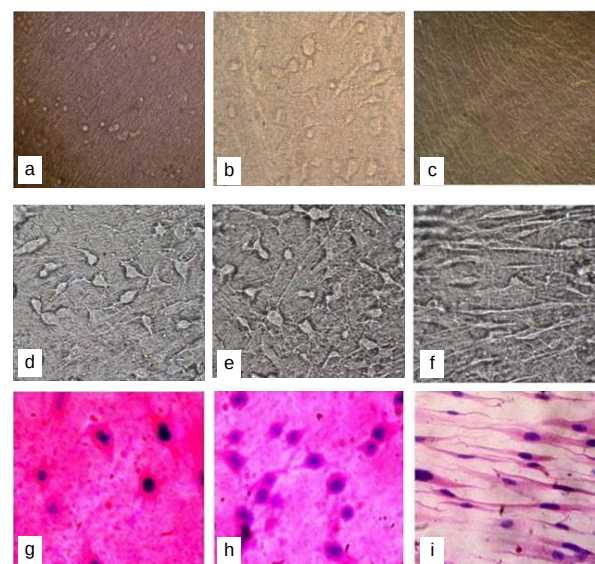
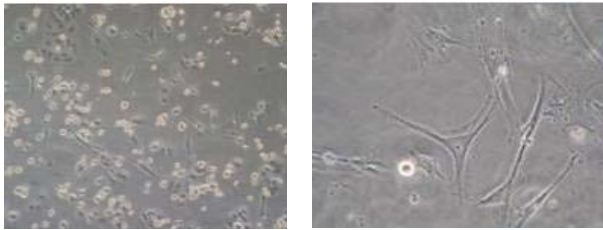
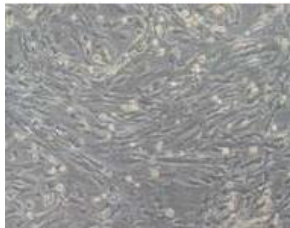


Figure 4 Morphology of passage 3 amniotic mesenchymal stem cells in the experimental group
图4 实验组第3代人羊膜间充质干细胞形态变化



a: Cells were partially adherent, and the shape was irregular (×40)

b: After adding retinoic acid, many apophyses could be seen in cells and the proliferation was not obvious (×200)



c: After retinoic acid was removed, the apophyses disappeared, the proliferation was obvious and the morphology was fibroblast-like (×40)

Figure 5 Morphological observation of passage 3 amniotic mesenchymal stem cells in the control group under inverted microscope

图5 对照组第3代人羊膜间充质干细胞形态倒置显微镜下观察

2.5 免疫组织化学检测结果 免疫组化检测1-3代人羊膜间充质干细胞及实验组、对照组第2-4步细胞巢蛋白、神经元特异性烯醇化酶、兔抗人突触蛋白、神经胶质纤维酸性蛋白表达, 免疫荧光双染检测诱导分化后第6天神经元特异性烯醇化酶、兔抗人突触蛋白的表达。

经第一步后, 第3代人羊膜间充质干细胞的巢蛋白、神经元特异性烯醇化酶的表达较第1代明显增高($P < 0.01$), 见表2, 3, 见图6, 兔抗人突触蛋白、神经胶质纤维酸性蛋白的表达无明显变化($P > 0.05$)。

表2 第1-3代人羊膜间充质干细胞巢蛋白、兔抗人突触蛋白、神经元特异性烯醇化酶、神经胶质纤维酸性蛋白表达
Table 2 Expression of nestin, rabbit anti-human synaptic proteins (SYN), neuron-specific enolase (NSE) and neuroglial fibrillary acidic protein (GFAP) in passages 1-3 amniotic mesenchymal stem cells ($\bar{x} \pm s$, %)

Index	Passage 1	Passage 2	Passage 3
Nestin	35.13±6.85	67.11±7.22	86.52±2.20 ^a
NSE	9.69±1.29	39.27±2.75	47.10±10.06 ^a
SYN	3.01±0.52	3.53±0.73	3.09±0.52
GFAP	7.81±0.70	5.16±0.82	8.67±1.72

^a $P < 0.01$, vs. passage 1 cells

之后经3步诱导, 实验组第6天与第1天对比, 巢蛋白表达降低, 差异无显著性意义($P > 0.05$), 神经元特异性烯醇化酶、兔抗人突触蛋白表达升高, 神经胶质纤维酸性蛋白表达降低, 差异有显著性意义($P < 0.01$);

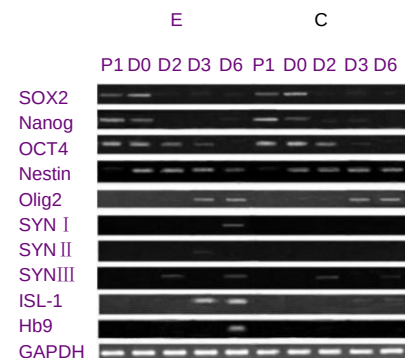
对照组巢蛋白、兔抗人突触蛋白、神经胶质纤维酸性蛋白的表达差异无显著性意义($P > 0.05$), 神经元特异性烯醇化酶的表达升高且差异有非常显著性意义($P < 0.01$)。6 d时两组间各指标比较, 神经元特异性烯醇化酶表达的差异无显著性意义($P > 0.05$), 兔抗人突触蛋白表达明显高于对照组, 巢蛋白、神经胶质纤维酸性蛋白表达低于对照组, 差异均有显著性意义($P < 0.01$), 见表4。

表3 诱导分化后两组人羊膜间充质干细胞中的巢蛋白、神经元特异性烯醇化酶、兔抗人突触蛋白、神经胶质纤维酸性蛋白表达
Table 3 Expression of nestin, rabbit anti-human synaptic proteins (SYN), neuron-specific enolase (NSE) and neuroglial fibrillary acidic protein (GFAP) of amniotic mesenchymal stem cells in two groups after induction ($\bar{x} \pm s$, $n=10$, %)

Group	Index	1 d	3 d	6 d
Control	Nestin	86.87±4.86	80.92±6.58	87.72±5.34
	NSE	45.98±8.74	87.36±11.83	83.82± 8.33 ^a
	SYN	5.09±1.03	8.14±0.83	10.36±1.26
	GFAP	9.05±1.03	6.22±0.25	7.43±0.71
Experimental	Nestin	80.69±16.18	73.05±10.12	70.87±14.31 ^b
	NSE	57.63±5.98	83.18±5.90	88.26±10.85 ^a
	SYN	4.35±1.37	33.03±5.58	65.71±6.97 ^{ab}
	GFAP	7.76±1.40	3.11±0.75	3.06±0.91 ^{ab}

^a $P < 0.05$, vs. 1 d; ^b $P < 0.05$, vs. control group

2.6 RT-PCR结果 分步诱导分化前及诱导分化过程中, 取第1代人羊膜间充质干细胞和分化过程中第0, 2, 3, 6天时的人羊膜间充质干细胞用RT-PCR的方法检测了细胞Nanog、SOX2、OCT4、巢蛋白、Olig2、兔抗人突触蛋白 I, II, III、ISL-1、Hb9等指标基因转录水平的变化, 结果见图6。



P1: passage 1 amniotic mesenchymal stem cells; D0: before injection after amniotic mesenchymal stem cells induction; D2: 2 d after injection; D3: 3 d after injection; D6: 6 d after injection; E: experimental group; C: control group

Figure 6 Changes of gene transcription in two groups
图6 两组细胞基因转录水平变化

由图6可知, 实验组第1代人羊膜间充质干细胞的Nanog、SOX2、OCT4、巢蛋白有不同程度表达, Olig2、

兔抗人突触蛋白 I, II, III、ISL-1、Hb9 不表达; 预诱导后 Nanog 表达降低, SOX2、巢蛋白表达增强, Olig2、兔抗人突触蛋白 I, II, III、ISL-1、Hb9 不表达; 接种后 2 d Nanog、SOX2 表达消失, 巢蛋白表达不变, OCT4、兔抗人突触蛋白 III 弱表达, Olig2、兔抗人突触蛋白 I, II、ISL-1、Hb9 均不表达; 种后 3 d Nanog、SOX2 无表达, Olig2、OCT4 弱表达, 巢蛋白、兔抗人突触蛋白 II、ISL-1 明显表达, Hb9、兔抗人突触蛋白 I 不表达; 接种后 6 d Nanog、OCT4、SOX2 不表达, 巢蛋白较低表达, 兔抗人突触蛋白 I, III、ISL-1、Hb9 明显表达, Olig2 弱表达。与实验组比较, 对照组兔抗人突触蛋白 I, II、Hb9 不表达。

3 讨论

实验用天然细胞外基质结合神经发育过程中常见的化学因子和细胞因子^[8-10], 模拟体内分化的环境, 研究了人羊膜间充质干细胞在此环境的神经分化。

第1步碱性成纤维细胞生长因子预诱导后, 从第1代到第3代细胞巢蛋白、神经元特异性烯醇化酶表达上调且有显著差异, 兔抗人突触蛋白表达无明显变化, 预诱导 24-48 h 可看到一些短突起。但 7 d 时, 细胞增殖, 胞体间相互接触后, 形态又恢复到纤维细胞形态。本研究结果提示: 人羊膜间充质干细胞中的某个/些亚群可能具有神经祖细胞和/或前体细胞的特性, 在碱性成纤维细胞生长因子作用下, 其中具有神经祖细胞特性的细胞亚群迅速向神经前体细胞分化并增殖^[11-12]。因而, 在碱性成纤维细胞生长因子作用后, 巢蛋白阳性表达上调, 相当于胚胎的神经祖细胞增殖阶段, 部分细胞神经元特异性烯醇化酶表达但不表达兔抗人突触蛋白, 没有出现神经元形态学典型变化, 说明仅碱性成纤维细胞生长因子诱导不足以使人羊膜间充质干细胞向较成熟的神经前体细胞分化。第2步诱导, 用 B27 替代血清, 使细胞周围环境恢复到神经发育时的无血清状态。碱性成纤维细胞生长因子可以使神经前体细胞的维甲酸受体表达增加^[13], 为下一步诱导做好准备。接种 1 天, 实验组巢蛋白、兔抗人突触蛋白、神经胶质纤维酸性蛋白表达与第1步比较差异不明显, 神经元特异性烯醇化酶表达较第1步比较有明显差异。与对照组比较, 神经元特异性烯醇化酶表达显著增加。提示细胞外基质有助于神经前体细胞向神经元定向分化。此步骤细胞在细胞外基质上共培养 2 d, 可以观察到细胞增殖速度减慢, 可能是由于撤去血清的原因, 细胞的某些神经标记蛋白

表达升高, 细胞圆形或类圆形, 核大饱满, 仅有少量突起。相互之间未形成网络结构。第3步, 撤去碱性成纤维细胞生长因子, 加入维甲酸、神经生长因子。此时细胞核已有丰富维甲酸受体表达, 和维甲酸形成维甲酸-维甲酸受体复合物, 发挥基因调控作用。维甲酸可以促进细胞的胆碱乙酰转移酶 (ChAT) 和乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性提高, 向胆碱能神经元方向分化^[14], 可以上调细胞表面多种神经营养因子受体的表达, 而神经营养因子及其受体是干细胞分化的重要调控因子^[15]。接种 3 天时, 实验组巢蛋白、神经胶质纤维酸性蛋白表达与 day 0、day 1 比较表达明显降低, 神经元特异性烯醇化酶、兔抗人突触蛋白表达与 day 0、day 1 比较明显提高; 实验组与对照组比较, 兔抗人突触蛋白表达显著增强, 神经胶质纤维酸性蛋白表达显著降低; 对照组内比较, 神经元特异性烯醇化酶、兔抗人突触蛋白表达与 day 0、day 1 比较明显提高 ($P < 0.05$)。表明应用维甲酸和神经生长因子协同作用, 可以促进干细胞向神经元方向分化并抑制向胶质细胞分化, 维甲酸、神经生长因子、细胞外基质的协同作用更明显。此时可以见到部分细胞伸出突起并相互连接, 并未形成网络状。第4步, 撤去维甲酸, 加入碱性成纤维细胞生长因子。第6天时, 相对于对照组, 实验组神经元特异性烯醇化酶未见明显差异, 兔抗人突触蛋白表达显著增加, 神经胶质纤维酸性蛋白表达显著降低。此时, 碱性成纤维细胞生长因子作用下细胞增殖明显, 达到 80% 融合时, 细胞、胞膜受体、膜蛋白、细胞外基质、生长因子间形成一个整体, 细胞相互接触, 突起伸出 2 级分支, 形成网络结构, 与第3步的形态变化明显不同。可见, 细胞突触形成除需诱导因子外, 细胞外基质和细胞间接触也十分重要, 这和神经发育时的情况相似^[16-17]。此时细胞在决定分化方向基础上, 进一步分化成熟, 表达兔抗人突触蛋白并形成网络状结构。

和对照组比较, 对照组缺乏兔抗人突触蛋白 I, II 的表达, 并且其 ISL-1 和 Hb9 的表达明显低于实验组, RT-PCR 结果见图 7。从形态学观察, 对照组没有形成网络样结构。本实验诱导程序包括细胞分化的诸多因素, 人羊膜间充质干细胞基质加因子的分步诱导下, 分化并显示了成熟的突触素和运动神经元前体细胞的标记, 形态学上出现网络样结构。结果提示在模拟胚胎神经发育的模式下, 分步的诱导分化可以使人羊膜间充质干细胞具有向运动神经元分化的潜力^[18-21]。

结论: 实验所用方法提取的细胞外基质具有良好的生物相容性, 可以促进人羊膜间充质干细胞神经分化

过程中的突触成熟。人羊膜间充质干细胞由一组具有不同表型的细胞亚群组成, 其中包含神经祖细胞亚群。分步诱导的方法可以使人羊膜间充质干细胞向运动神经元前体细胞分化。

4 参考文献

- [1] Bissell MJ, Hall HG, Parry G. How does the extracellular matrix direct gene expression? J Theor Biol. 1982;99(1): 31-68.
- [2] Sun Y, Nadal-Vicens M, Misono S, et al. Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. Cell. 2001;104(3):365-376.
- [3] Moore KA, Lemischka IR. Stem cells and their niches. Science. 2006;311(5769):1880-1885.
- [4] Shen LH, Li Y, Chen J, et al. Therapeutic benefit of bone marrow stromal cells administered 1 month after stroke. J Cereb Blood Flow Metab. 2007;27(1):6-13.
- [5] Munoz JR, Stoutenger BR, Robinson AP, et al. Human stem/progenitor cells from bone marrow promote neurogenesis of endogenous neural stem cells in the hippocampus of mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102(50):18171-18176.
- [6] Black IB, Woodbury D. Adult rat and human bone marrow stromal stem cells differentiate into neurons. Blood Cells Mol Dis. 2001;27(3):632-636.
- [7] Srivastava N, Seth K, Khanna VK, et al. ng-term functional restoration by neural progenitor cell transplantation in rat model of cognitive dysfunction: co-transplantation with olfactory ensheathing cells for neurotrophic factor support. Int J Dev Neurosci. 2009;27(1):103-110.
- [8] Wang J, Shang LX, Li YL, et al. Dier Junyi Daxue Xuebao. 2008;29(10):1141-1146.
王晶,尚丽新,李亚里,等.体外诱导人胚胎干细胞定向分化为神经干细胞[J].第二军医大学学报,2008,29(10):1141-1146.
- [9] Li XJ, Du ZW, Zarnowska ED, et al. Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. Nat Biotechnol. 2005;23(2):215-221.
- [10] Raballo R, Rhee J, Lyn-Cook R, et al. Basic fibroblast growth factor (Fgf2) is necessary for cell proliferation and neurogenesis in the developing cerebral cortex. J Neurosci. 2000;20(13):5012-5023.
- [11] Nakano T, Windrem M, Zappavigna V, et al. Identification of a conserved 125 base-pair Hb9 enhancer that specifies gene expression to spinal motor neurons. Dev Biol. 2005;283(2): 474-485
- [12] Chin LS, Li L, Ferreira A, et al. Impairment of axonal development and of synaptogenesis in hippocampal neurons of synapsin I-deficient mice. Proc Natl Acad Sci USA. 1995; 92(20):9230-9234
- [13] Shiotsugu J, Katsuyama Y, Arima K, et al. Multiple points of interaction between retinoic acid and FGF signaling during embryonic axis formation. Development. 2004;131(11): 2653-2667.
- [14] Matsuoka I, Mizuno N, Kurihara K. Cholinergic differentiation of clonal rat pheochromocytoma cells (PC12) induced by retinoic acid: increase of choline acetyltransferase activity and decrease of tyrosine hydroxylase activity. Brain Res. 1989; 502(1):53-60.
- [15] Chen YZ, Lu CL. Hubei: Hubei Science&Technology Press. 2002:55.
陈宜张,路长林.神经元表型的决定-神经发育分子生物学[M]. 湖北:湖北科学技术出版社,2002:55.
- [16] Shiotsugu J, Katsuyama Y, Arima K, et al. Multiple points of interaction between retinoic acid and FGF signaling during embryonic axis formation. Development. 2004;131(11):2653-2667.
- [17] Chambers I, Colby D, Robertson M, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. Cell. 2003;113(5):643-655.
- [18] Miyagi S, Nishimoto M, Saito T, et al. The Sox2 regulatory region 2 functions as a neural stem cell-specific enhancer in the telencephalon. J Biol Chem. 2006;281(19):13374-13381.
- [19] Wegner M. From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. Nucleic Acids Res. 1999;27(6):1409-1420.
- [20] 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.

来自本文课题的更多信息--

作者贡献: 第一作者进行实验设计, 第二、三、五作者进行实施, 第四作者进行实验评估, 资料收集为第一、二、三作者, 第一作者成文, 第四作者审校, 第一、四作者对文章负责。

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。

伦理要求: 参与实验的患病个体及其家属自愿参加, 在充分了解本治疗方案的前提下签署“知情同意书”; 治疗方案获医院伦理委员会批准。

本文创新性: 实验用天然细胞外基质结合神经发育过程中常见的化学因子和细胞因子, 模拟体内分化的环境, 研究了人羊膜间充质干细胞在此环境的神经分化。结果显示, 人羊膜间充质干细胞由一组具有不同表型的细胞亚群组成, 其中包含神经祖细胞亚群; 细胞外基质加细胞因子的分步诱导方法可以富集人羊膜间充质干细胞中的神经祖细胞, 并进一步促使其向运动神经元前体细胞分化, 诱导后的细胞外基质加运动神经元前体细胞的膜样结构组成干细胞膜。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。