

优化培养基加快骨髓间充质干细胞的诱导分化

李倩¹, 杨军²(¹重庆市第五人民医院神经内科, 重庆市 400062; ²重庆医科大学附属第一医院神经内科, 重庆市 400016)

文章亮点:

- 1 研究发现在诱导骨髓间充质干细胞向神经细胞分化时, 以神经元特异性烯醇化酶、微管相关蛋白 2 阳性率作为评估指标具有一定的可行性。
- 2 实验特点在于关注了诱导方案结果的比较, 作者认为, 影响骨髓间充质干细胞诱导分化的因素包括诱导剂和诱导时间等因素, 建议抗氧化剂选用 β -巯基乙醇联合维甲酸使用, 可提高诱导效率, 建议诱导时间为 10 d。

关键词:

干细胞; 骨髓间充质干细胞; 诱导剂; 骨髓间充质干细胞; 诱导分化; 维甲酸; β -巯基乙醇; 神经元特异性烯醇化酶; 微管相关蛋白 2; 重庆市自然科学基金

主题词:

骨髓; 间充质干细胞; 细胞分化; 维甲酸; 巯基乙醇

基金资助:

重庆市卫生局科学基金(09-2-335); 重庆市自然科学基金(CSTC, 2005BB5315)

摘要

背景: 研究发现骨髓间充质干细胞在一定的诱导条件下能分化成神经元、神经胶质等神经细胞, 一定程度上解决了种子细胞来源的难题。目前采用的诱导方法各有不同, 所诱导分化的效率也不尽相同。

目的: 观察不同抗氧化剂体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞向神经样细胞分化的效果。

方法: 将 Wistar 大鼠骨髓间充质干细胞分为 4 组, 使用不同神经细胞诱导剂诱导分化, 分别为未干预组、 β -巯基乙醇组、维甲酸组、 β -巯基乙醇联合维甲酸组, 诱导 5 h, 12 h, 1 d, 3 d, 5 d, 7 d, 10 d 后, 分别观察细胞形态变化及检测神经元细胞特异性抗原神经元特异性烯醇化酶、微管相关蛋白 2 阳性率表达差异。

结果与结论: 未干预组骨髓间充质干细胞形态无明显改变, 其他 3 组细胞逐渐变成纺锤形, 并生出多个小突起, 互相连接成网, 呈现神经元样细胞形态; 免疫细胞化学染色显示 β -巯基乙醇联合维甲酸组在诱导 10 d 后其效率最高, 神经元特异性烯醇化酶、微管相关蛋白 2 表达阳性率分别是 71.63% 和 79.72%。结果显示 β -巯基乙醇联合维甲酸可加快诱导骨髓间充质干细胞向神经样细胞分化。

李倩, 杨军. 优化培养基加快骨髓间充质干细胞的诱导分化[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(45):7246-7249.

Optimized medium accelerates differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells

Li Qian¹, Yang Jun² (¹Department of Neurology, the Fifth People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400062, China; ²Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract

BACKGROUND: Studies have found that bone marrow mesenchymal stem cells, under certain conditions, can be induced to differentiate into neurons and glial cells, which to some extent solves the problem of the source of seed cells. Induction methods currently used are different, and their efficiencies are not the same.

OBJECTIVE: To observe the effects of different antioxidants on differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells into neuron-like cells *in vitro*.

METHODS: Bone marrow mesenchymal stem cells from Wistar rats were divided into four groups: non-intervention group, β -mercaptoethanol group, retinoic acid group, β -mercaptoethanol+retinoic acid group. Changes in cell morphology and positive rate of neuron-specific enolase and microtubule-associated protein 2 were observed and detected at 5 hours, 12 hours, 1 day, 3 days, 5 days, 7 days, and 10 days after induction.

RESULTS AND CONCLUSION: Except non-intervention group, bone marrow mesenchymal stem cells in the other three groups were gradually becoming spindle-shaped, and gave birth to many small protrusions that were interconnected into a network, showing neuron-like cell morphology. Immunocytochemical staining showed that the efficiency of the β -mercaptoethanol+retinoic acid group was the highest at 10 days after induction, and the positive rates of neuron-specific enolase and microtubule-associated protein 2 were 71.63% and 79.72%, respectively. The results show that β -mercaptoethanol can be combined with retinoic acid to accelerate the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into neuron-like cells.

李倩, 女, 1984 年生, 硕士, 主要从事脑血管疾病的基础与临床研究。

通讯作者: 杨军, 重庆医科大学附属第一医院神经内科, 重庆市 400016

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.45.006
[http://www.crter.org]

中图分类号:R394.2
文献标识码:A
文章编号:2095-4344
(2014)45-07246-04
修回日期:2014-09-20

Li Qian, Master, Department of Neurology, the Fifth People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400062, China

Corresponding author: Yang Jun, Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Accepted: 2014-09-20

Subject headings: bone marrow; mesenchymal stem cells; cell differentiation; tretinoin; mercaptoethanol
Funding: the Science Foundation of Chongqing Health Bureau, No. 09-2-335; the Natural Science Foundation of Chongqing, No. CSTC, 2005BB5315

Li Q, Yang J. Optimized medium accelerates differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(45):7246-7249.

0 引言 Introduction

研究发现骨髓间充质干细胞在一定的诱导条件下能分化成神经元、神经胶质等神经细胞^[1-4], 这在一定程度上解决了种子细胞来源的难题。目前采用的诱导方法各有不同, 包括以细胞生长因子为基础的诱导、以提高胞内cAMP为基础的诱导、以抗氧化剂为基础的诱导及神经细胞培养上清液为基础的诱导。实验以抗氧化剂为基础, 诱导骨髓间充质干细胞向神经细胞方向分化, 以期能够为骨髓间充质干细胞诱导分化效率不理想及如何定向诱导骨髓间充质干细胞等问题带来帮助, 弥补了神经干细胞取材困难的缺点, 为中枢神经系统疾病的细胞治疗提供可靠的理论依据。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 细胞学体外实验。

材料:

骨髓间充质干细胞分离培养和免疫化学实验所用试剂和仪器:	
试剂和仪器	来源
Percoll 淋巴细胞分离液	Pharmacia公司
PBS、L-DMEM 培养基、胎牛血清	Gibco 公司
小牛血清	Hyclone公司
0.25%胰蛋白酶	Trypsin公司
抗鼠CD29、CD34、CD45、CD71、CD90、CD106单克隆抗体	Cedarlane 公司
兔抗神经元特异性烯醇化酶(NSE)抗体	武汉博士德公司
兔抗微管相关蛋白2(MAP2)抗体	美国Millipore公司
碱性成纤维生长因子、 β -巯基乙醇、全反式维甲酸、多聚赖氨酸	美国Sigma公司
离心机	长沙湘仪
CO ₂ 培养箱	德国宾德
倒置相差显微镜	重庆奥特
荧光显微镜	日本OLYMPUS

实验方法:

大鼠骨髓间充质干细胞的诱导分化过程: 按无菌操作取出Wistar大鼠下肢股骨和胫骨, 剪断两端, 置于PBS中, 浸泡5 min, 再用注射器吸引无血清的培养基来反复吹出股骨中的骨髓组织, 直到股骨颜色由红变白, 反复吹打使之均匀, 加于Percoll淋巴细胞分离液液面上, 移入10 mL离心管, 20 °C 2 500 r/min, 离心10 min, 去上清, 吸取白膜层, PBS冲洗3遍, 用含体积分数为10%小牛血清的

L-DMEM培养基悬浮细胞, 接种于培养瓶中, 调节细胞浓度, 抽吸以打散组织成为均匀的细胞悬液, 调细胞浓度为 $5 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 接种在25 cm²的培养瓶中, 置于37 °C、饱和湿度、体积分数为5%的CO₂培养箱内培养, 一两天后观察骨髓干细胞的贴壁情况, 当观察到大部分细胞贴壁生长且轻摇培养瓶不易脱落时, 将未贴壁的细胞去掉, 并半量更换新培养液, 2 d后第1次全部换液, 以后每3 d换液1次, 原代细胞培养约2周, 贴壁细胞全部贴满培养瓶, 呈纤维细胞样生长。

当达到90%融合后, 配制含0.25%胰蛋白酶的消化液, 消化原代细胞约3 min, 倒置显微镜下可观察贴壁细胞基本收缩成圆形后, 用含胎牛血清的DMEM培养液终止消化, 并用针管将细胞液吹打均匀, 以 $5 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 细胞浓度接种传代, 进行扩增、纯化培养。在传代培养的细胞培养液中分别加入含碱性成纤维生长因子、多聚赖氨酸、二甲基亚砜与3组不同抗氧化剂(β -巯基乙醇、全反式维甲酸、 β -巯基乙醇+全反式维甲酸)的神经细胞诱导剂, 分别于1, 3, 5, 7, 10, 14 d各取6孔进行形态学观察、神经元特异性烯醇化酶、微管蛋白抗体免疫荧光染色检查。

免疫细胞荧光染色: 分别取诱导4 h, 12 h, 1 d, 3 d, 5 d, 7 d, 10 d, 14 d的细胞盖片, 用40 g/L多聚甲醛固定10 min, PBS洗涤3次, 分别加入神经元特异性烯醇化酶、微管蛋白抗体, 37 °C孵育1 h, PBS洗3次, 50%甘油缓冲液封固, 荧光显微镜观察成熟神经元标志物神经元特异性烯醇化酶和微管相关蛋白2(MAP-2)阳性的表达情况, 随机选取10个视野计数各组神经元特异性烯醇化酶、微管相关蛋白2阳性细胞数。

主要观察指标: 诱导后细胞形态, 神经元特异性烯醇化酶和微管相关蛋白2阳性表达率。

统计学分析: 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 利用SPSS 10.0软件进行组间one-way ANOVA分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义, $P < 0.01$ 为差异有非常显著性意义。

2 结果 Results

2.1 诱导神经样细胞形态观察 未干预组细胞无明显变化。

β -巯基乙醇组、维甲酸组、 β -巯基乙醇+维甲酸组在诱导5, 12 h时, 细胞呈分散、克隆集落方式增殖, 培养液中漂浮圆形细胞, 表面光亮; 诱导1-3 d, 胞体回缩成圆形、细胞折光率变高, 胞体由原来的长梭形变成多角形或不规则形(图1); 1周左右, 呈变大变圆细胞, 细胞分裂增强, 形成簇状; 培养10 d后, 形态变成纺锤形的成纤维细胞,

表 1 不同诱导时间各组细胞神经元特异性烯醇化酶、微管相关蛋白 2 阳性表达率

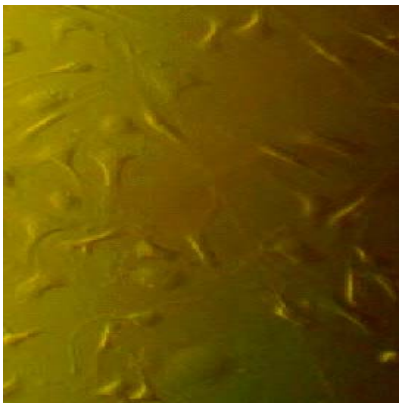
Table 1 Positive rates of neuron-specific enolase and microtubule-associated protein 2 at different time of induction ($\bar{x}\pm s, \%$)

项目	未干预组	β -巯基乙醇组	维甲酸组	β -巯基乙醇+维甲酸组
神经元特异性烯醇化酶				
7 d	-	16.18 \pm 3.21	11.12 \pm 2.19	30.72 \pm 2.67
10 d	-	52.49 \pm 7.17	34.76 \pm 3.29	71.63 \pm 9.67
14 d	-	32.81 \pm 5.44	30.11 \pm 3.21	42.40 \pm 5.47
微管相关蛋白2				
7 d	-	19.04 \pm 4.44	12.18 \pm 2.98	24.40 \pm 4.44
10 d	-	62.51 \pm 8.67	40.58 \pm 3.98	79.72 \pm 7.68
14 d	-	22.53 \pm 3.33	29.53 \pm 2.78	26.49 \pm 4.32

表 2 不同诱导时间各组细胞神经元特异性烯醇化酶、微管相关蛋白 2 阳性表达率的多因素方差分析结果

Table 2 Multi-factor analysis of variance results of positive rates of neuron-specific enolase and microtubule-associated protein 2 at different time of induction

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	66 026.21	17.00	3 883.89	144 612.34	0.00
Intercept	227 048.11	1.00	227 048.11	8 453 874.41	0.00
组别	11 564.16	2.00	5 782.08	215 289.14	0.00
特异性抗原种类	15.21	1.00	15.21	566.24	0.00
诱导时间	45 469.92	2.00	22 734.96	846 510.04	0.00
组别*特异性抗原种类	395.42	2.00	197.71	7 361.46	0.00
组别*诱导时间	5 951.93	4.00	1 487.98	55 403.33	0.00
特异性抗原种类*诱导时间	2 142.83	2.00	1 071.41	39 892.83	0.00
组别*特异性抗原种类*诱导时间	486.74	4.00	121.69	4 530.83	0.00
Error	4.35	162.00	0.03		
Total	29 3078.67	180.00			
Corrected Total	66 030.56	179.00			

图 1 骨髓间充质干细胞经维甲酸诱导 24 h 后的细胞形态($\times 400$)Figure 1 Morphology of bone marrow mesenchymal stem cells after 24 hours of retinoic acid induction ($\times 400$)

图注: 胞体回缩成圆形、细胞折光率变高, 胞体由原来的长梭形变成多角形或不规则形。

并逐渐生出多个小突起, 出现出芽现象; 2周后, 突起细胞变多, 突起延长且连接成网, 具备神经细胞的形态特征。

2.2 各时间点诱导率比较 细胞持续诱导7, 10, 14 d后开始出现成熟神经元标志物神经元特异性烯醇化酶、微管相关蛋白2阳性的表达(表1)。

利用SPSS软件进行不同组别不同时间神经元特异性烯醇化酶、微管相关蛋白2阳性率的多因素方差分析, 结果见表2。

由表2可知: ①因素组别: $F=215\ 289$, $P=0.00$, 按0.05检验水准, 可认为因素组别效应显著, 不同诱导剂组神经元特异性烯醇化酶、微管相关蛋白2阳性率的差异存在显著性意义, 提示选择合理诱导剂的重要性, 结果表明抗氧化剂选用 β -巯基乙醇联合维甲酸诱导为佳。②因素特异性抗原种类: $F=566$, $P=0.00$, 按0.05检验水准, 可认为因素特异神经元效应显著, 不同特异神经元种类的阳性率差异存在显著性意义, 表明骨髓间充质干细胞向神经元细胞分化神经元特异性烯醇化酶、微管相关蛋白2的表达存在差异, 提示使用神经元特异性烯醇化酶、微管相关蛋白2评估诱导分化效果的正确性。③因素诱导时间: $F=846\ 510$, $P=0.00$, 按0.05检验水准, 可认为因素诱导时间效应显著, 不同时间神经元特异性烯醇化酶、微管相关蛋白2阳性率的差异具有显著性意义, 表明在诱导分化时, 时间对诱导效果的重要作用。其他因素组别*特异性抗原种类、组别*诱导时间、特异性抗原种类*诱导时间、组别*特异性抗原种类*诱导时间的交互作用, $P=0.00$, 即表明不同诱导剂、不同时间、不同神经细胞特异性抗原种类存在交互作用。

3 讨论 Discussion

骨髓间充质干细胞神经分化潜能的发现为临床治疗神经退行性病变带来了希望,在缺血性脑损伤、神经系统变性疾病、创伤性脑损伤、脊髓损伤、外周神经损伤已有应用并得到人们的认可^[5-14],它为人类的神经系统疾病尤其是脑源性疾病的治疗提供了一条新的途径。骨髓间充质干细胞来源充足、容易获取、可体外培养扩增和静脉注射,自体移植还可避免移植物抗宿主反应以及伦理学限制,优于传统的胚胎干细胞移植。相信随着对其研究的深入,骨髓间充质干细胞向神经细胞诱导分化定会给神经系统疾病治疗带来光辉的前景。

作者研究发现在诱导骨髓间充质干细胞向神经细胞分化时,以神经元特异性烯醇化酶、微管相关蛋白2阳性率作为评估指标具有一定的可行性,影响骨髓间充质干细胞诱导分化的因素包括诱导剂和诱导时间,根据实验的诱导方案的结果比较,建议抗氧化剂选用 β -巯基乙醇联合维甲酸使用,可提高诱导效率,建议诱导时间为10 d。

作者贡献: 实验设计、实施、评估均为本文作者。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 神经元特异性烯醇化酶—参与糖酵解途径的烯醇化酶中的一种,存在于神经组织和神经内分泌组织中。在脑组织细胞的活性最高,外周神经和神经分泌组织的活性水平居中,最低值见于非神经组织、血清和脊髓液,可用于诱导的神经干细胞的评价。

作者声明: 文章为原创作品,无抄袭剽窃,无泄密及署名和专利争议,内容及数据真实,文责自负。

4 参考文献 References

- [1] 贾延劫,孙吉平,朱晓峰,等. Notch-1在骨髓间充质干细胞分化为神经细胞中的作用[J]. 中华医学杂志, 2006, 86(41): 2916-2921.
- [2] 李东正,王倩,李俊娜,等. 骨髓间充质干细胞向神经细胞分化的研究[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(5): 986-988.
- [3] 鞠文博,李淑波,周艳. β -巯基乙醇在大鼠骨髓基质细胞向神经干细胞诱导分化中的作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(20): 3991-3994.
- [4] 程峰,郝怀勇,田和平. 体外诱导骨髓间充质干细胞向神经细胞分化及凋亡的研究[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2010, 30(1): 54-58.
- [5] Wu J, Sun Z, Sun HS, et al. Intravenously administered bone marrow cells migrate to damaged brain tissue and improve neural function in ischemic rats. Cell Transplant. 2008; 16(10): 993-1005.
- [6] Wu QY, Li J, Feng ZT, et al. Bone marrow stromal cells of transgenic mice can improve the cognitive ability of an Alzheimer's disease rat model. Neurosci Lett. 2007; 417(3): 281-285.
- [7] Lu D, Mahmood A, Wang L, et al. Adult bone marrow stromal cells administered intravenously to rats after traumatic brain injury migrate into brain and improve neurological outcome. Neuroreport. 2001; 12(3): 559-563.
- [8] Lu D, Li Y, Wang L, et al. Intraarterial administration of marrow stromal cells in a rat model of traumatic brain injury. J Neurotrauma. 2001; 18(8): 813-819.
- [9] Kamada T, Koda M, Dezawa M, et al. Transplantation of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells promotes axonal regeneration and functional recovery after complete transection of adult rat spinal cord. J Neuropathol Exp Neurol. 2005; 64(1): 37-45.
- [10] Zhang P, He X, Liu K, et al. Bone marrow stromal cells differentiated into functional Schwann cells in injured rats sciatic nerve. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol. 2004; 32(4): 509-518.
- [11] 高平,孙占胜,王伯珉,等. 骨髓间充质干细胞诱导成神经元样细胞移植治疗脊髓损伤[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(23): 4256-4263.
- [12] 张瑞平,李健丁,刘强,等. 蛛网膜下腔移植磁标骨髓间充质干细胞治疗脊髓损伤[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(1): 74-78.
- [13] Zhang C, He XJ, Li HP, et al. Chondroitinase ABC plus bone marrow mesenchymal stem cells for repair of spinal cord injury. Neural Regen Res. 2013; 8(11): 965-974.
- [14] Wu YX, Zhang JH, Ben XM. Neuronal-like cell differentiation of non-adherent bone marrow cell-derived mesenchymal stem cells. Neural Regen Res. 2013, 8(22): 2078-2085.