

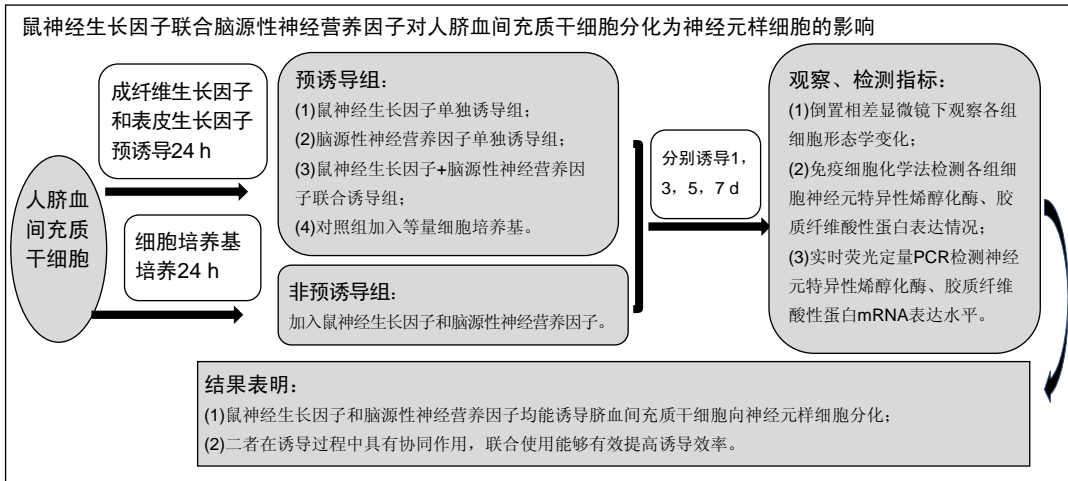
鼠神经生长因子联合脑源性神经营养因子诱导人脐血间充质干细胞向神经元样细胞分化

陈俊, 杨自金, 李红梅(徐州医科大学附属连云港医院(连云港市第一人民医院)儿内科, 江苏省连云港市 222002)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0482

ORCID: 0000-0002-3762-1586(陈俊)

文章快速阅读:



陈俊, 男, 1991年生, 湖北省随州市人, 汉族, 徐州医科大学在读硕士, 主要从事脐血间充质干细胞相关研究。

通讯作者: 杨自金, 主任医师, 硕士生导师, 徐州医科大学附属连云港医院(连云港市第一人民医院)儿内科, 江苏省连云港市 222002

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

稿件接受: 2017-11-25



文题释义:

鼠神经生长因子: 是从小鼠颌下腺分离纯化出的一种细胞因子, 能够促进神经系统损伤后的修复, 对中枢及周围神经元的生长、分化、再生和功能特性的表达均具有重要的调控作用。

脑源性神经营养因子: 是 1982 年 Barde 等首先在猪脑中的一种具有神经营养作用的蛋白质。脑源性神经营养因子及其受体在神经系统广泛表达, 其中海马和皮质的含量最高。

摘要

背景: 作者在前期研究中发现鼠神经生长因子具备诱导脐血间充质干细胞向神经元样细胞分化的能力, 为进一步探讨提高诱导效率的方法, 拟尝试使用多种细胞生长因子进行联合诱导。

目的: 探讨鼠神经生长因子联合脑源性神经营养因子在体外条件下对人脐血间充质干细胞向神经元样细胞诱导分化的作用。

方法: 复苏获赠的原代人脐血间充质干细胞并进行体外扩增培养, 取第 5 代脐血间充质干细胞分为 5 组, 其中前 4 组为预诱导组, 在加入成纤维生长因子和表皮生长因子预诱导 24 h 后, 再用鼠神经生长因子、脑源性神经营养因子及二者联合对脐血间充质干细胞进行诱导, 对照组仅使用等量细胞培养基培养; 最后一组为非预诱导组, 先用细胞培养基培养 24 h 后, 再加入鼠神经生长因子和脑源性神经营养因子进行联合诱导。倒置显微镜下观察诱导后细胞形态变化, 并用免疫细胞化学法检测神经元特异性烯醇化酶、胶质纤维酸性蛋白的表达, 实时荧光定量 PCR 技术检测神经元特异性烯醇化酶、胶质纤维酸性蛋白在 mRNA 水平的相对表达量。

结果与结论: ①脐血间充质干细胞形态为大小不一的长梭形、纺锤形, 经诱导后细胞胞体逐渐回缩变圆, 并向一侧或多侧发出突起, 呈现出神经元样细胞改变; ②免疫细胞化学及实时荧光定量 PCR 结果显示各实验组细胞均阳性表达神经元特异性烯醇化酶、胶质纤维酸性蛋白, 联合诱导组神经元特异性烯醇化酶、胶质纤维酸性蛋白阳性率及二者 mRNA 表达量均高于单独诱导组、对照组以及非预诱导组; ③鼠神经生长因子和脑源性神经营养因子均能诱导脐血间充质干细胞向神经元样细胞分化, 二者在诱导过程中具有协同作用, 联合使用能够有效提高诱导效率。

关键词:

干细胞; 脐血; 间充质干细胞; 鼠神经生长因子; 脑源性神经营养因子; 神经元样细胞; 诱导分化

主题词:

胎血; 间质干细胞; 神经生长因子; 脑源性神经营养因子; 细胞分化; 神经元; 组织工程

基金资助:

江苏省连云港市科技局重点科室建设(SH1117)

缩略语:

鼠神经生长因子: mouse nerve growth factor, mNGF; 脑源性神经营养因子: brain-derived neurotrophic factor, BDNF; 神经元特异性烯醇化酶: neuron-specific enolase, NSE; 胶质纤维酸性蛋白: glial fibrillary acidic protein, GFAP

Chen Jun, Master candidate, Department of Pediatrics, Lianyungang Hospital Affiliated to Xuzhou Medical University (First People's Hospital of Lianyungang), Lianyungang 222002, Jiangsu Province, China

Corresponding author: Yang Zi-jin, Chief physician, Master's supervisor, Department of Pediatrics, Lianyungang Hospital Affiliated to Xuzhou Medical University (First People's Hospital of Lianyungang), Lianyungang 222002, Jiangsu Province, China

Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells differentiate into neuron-like cells induced by combination of mouse nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor

Chen Jun, Yang Zi-jin, Li Hong-mei (Department of Pediatrics, Lianyungang Hospital Affiliated to Xuzhou Medical University (First People's Hospital of Lianyungang), Lianyungang 222002, Jiangsu Province, China)

Abstract

BACKGROUND: We have found that mouse nerve growth factor has the ability to induce differentiation of umbilical cord blood mesenchymal stem cells (UCB-MSCs) into neurons *in vitro*. In order to further explore the method of improving the induction efficiency of nerve cells, we attempt to combine a variety of cell growth factors for cell induction.

OBJECTIVE: To explore the effect of mouse nerve growth factor combined with brain-derived neurotrophic factor on the differentiation of UCB-MSCs into neuron-like cells *in vitro*.

METHODS: After the donated primary UCB-MSCs were resuscitated and cultured, the passage 5 UCB-MSCs were divided into five groups. The first four groups served as pre-induced groups, and fibroblast growth factor and epidermal growth factor were added to pre-induce cells for 24 hours, and mouse nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor, alone or in combination, were used thereafter to induce UCB-MSCs, while in control group, only the same amount of cell medium was added. The last group was non-pre-induced group, in which the cells were cultured in the cell culture medium for 24 hours, and then mouse nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor were both added to induce UCB-MSCs. The morphological changes of cells were observed under inverted microscope. The expression of neuron-specific enolase (NSE) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) was detected by immunocytochemistry technique. Real-time qPCR was used to detect the relative expression of NSE and GFAP at mRNA level.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The cell morphology of UCB-MSCs was in long shuttle shape and spindle shape with unequal size. After induction, the cell bodies gradually retracted and became rounded, and the projections extended to one-side or multi-sides, presenting with the neuron-like changes. (2) Immunocytochemistry and real-time qPCR results showed that NSE and GFAP were positive in each experimental group, and the positive rate and mRNA expression of NSE and GFAP in the combined induction group were higher than those in the other groups. (3) Either mouse nerve growth factor or brain-derived neurotrophic factor could induce UCB-MSCs to differentiate into neuron-like cells. Moreover, there was a cumulative effect between the two cytokines, and their combined use could effectively improve the efficiency of induction.

Subject headings: Fetal Blood; Mesenchymal Stem Cells; Nerve Growth Factor; Brain-Derived Neurotrophic Factor; Cell Differentiation; Neurons; Tissue Engineering

Funding: the Key Division Construction of Lianyungang Municipal Science and Technology Department, No. SH1117

0 引言 Introduction

神经系统疾病尤其是神经损伤性疾病和神经退行性疾病一直是困扰广大医务工作者的难题,同时也给患者带来沉重的经济负担。随着干细胞研究的不断深入,利用干细胞的多能分化能力,移植替代坏死神经成为治疗神经系统疾病的新曙光^[1]。神经干细胞是最早尝试用于修复受损神经的干细胞之一,在移植治疗脑卒中、脑性瘫痪、阿尔茨海默病等多种神经系统疾病中取得了一定的效果^[2-4],被认为是细胞移植治疗的种子细胞,但由于其供体来源少,存在免疫排斥、伦理纠纷等问题,发展空间有限。

脐血间充质干细胞(human umbilical cord blood mesenchymal stem cells, hUCB-MSCs)是一种具有旺盛自我更新能力和具备向多胚层细胞分化潜能的成体干细胞^[5]。在适宜的条件下,脐血间充质干细胞能分化为神经元样细胞,并分泌多种细胞活性因子,通过免疫调节、抑制炎症、减少凋亡、细胞替代等机制实现对神经系统功能的修复^[6-7]。相比神经干细胞,脐血间充质干细胞具有来源广泛、免疫原性低、伦理争议少等优点^[8],已替代神经干细胞成为一种新型种子细胞。

目前诱导脐血间充质干细胞分化为神经元样细胞的方法主要有化学试剂诱导法、细胞因子诱导法、共培养诱导法、基因转染诱导法、中药诱导法^[9-13],其中细胞因子法由于具有操作简便、应用安全等特点,是相对理想的细胞诱导方法。在前期研究中发现鼠神经生长因子(mouse nerve

growth factor, mNGF)能够诱导脐血间充质干细胞向神经元样细胞分化,但总体分化效率较低,本研究拟联合使用mNGF和脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)对脐血间充质干细胞进行诱导,以探讨更加高效的诱导方法。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学对比观察实验。

1.2 时间及地点 实验于2016年11月至2017年9月在徐州医科大学附属连云港医院中心实验室完成。

1.3 材料 人脐血间充质干细胞(江苏省博雅干细胞库馈赠,已经过流式细胞技术鉴定^[14]);澳洲优等胎牛血清(美国Clark公司);不完全DMEM低糖培养基(南京凯基生物科技有限公司);金路捷注射用鼠神经生长因子(武汉海特生物制药股份有限公司,产品批号:201607054098);重组人表皮生长因子、重组人成纤维生长因子、重组人脑源性神经营养因子(美国PeproTech公司);兔抗人神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)多克隆抗体、兔抗人胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)多克隆抗体(美国Proteintech公司);二步法抗兔/鼠通用型免疫组化试剂盒(美国Proteintech公司);实时荧光定量PCR试剂盒、反转录试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司)。

BCM-1000A超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);BSC-1100生物安全柜(山东博科公司);Thermo 3121

细胞培养箱(美国Thermo Forma公司); Thermo ND2000超微量核酸蛋白测定仪(美国Thermo Forma公司); Allegra X-30R低温高速离心机(美国Beckman Coulter公司); IX-71倒置显微镜(日本OLYMPUS公司); DP73成像系统(日本OLYMPUS公司); 罗氏LightCycler[®] 480II 实时荧光定量PCR系统(瑞士Roche公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 脐血间充质干细胞的复苏 将冻存的原代人脐血间充质干细胞从液氮罐中取出,放入37℃水浴箱中迅速搅动直至完全融化,将细胞悬液转移至15 mL离心管中,1 000 r/min离心5 min后弃去上清液,加入适量细胞培养基(含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养基)重悬细胞,细胞计数后按 $2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 细胞浓度接种于T75培养瓶中进行传代扩增培养^[15]。

1.4.2 脐血间充质干细胞的传代培养 当细胞生长达80%融合后,弃去培养瓶中的细胞培养基,PBS清洗后加入1 mL含EDTA的胰酶消化液,倒置显微镜观察到细胞回缩变圆后加入细胞培养基终止消化,用吸管轻轻吹打使细胞从瓶壁完全脱落,将吹打后的细胞悬液转移到15 mL离心管中,1 000 r/min离心5 min后弃去上清液,细胞培养基重悬细胞后按1:3的比例传代分装到新培养瓶中,补加适量细胞培养基后转入培养箱中培养。

1.4.3 脐血间充质干细胞向神经元样细胞诱导分化

细胞爬片:取生长状态良好、形态均一的第5代脐血间充质干细胞,按 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度接种于铺有赖氨酸处理过的无菌盖玻片的6孔板中,以制备细胞爬片。

实验分组及诱导分化:根据是否加入成纤维生长因子(fibroblast growth factor, FGF)和表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)对脐血间充质干细胞进行预诱导,将实验组分为预诱导组和非预诱导组。预诱导组又根据不同的诱导方法分为mNGF组、BDNF组、mNGF+BDNF组、对照组。预诱导组在正式诱导前先用质量浓度为10 $\mu\text{g/L}$ 成纤维生长因子和10 $\mu\text{g/L}$ 表皮生长因子的细胞培养基预诱导24 h^[16],然后弃去预诱导液,用PBS冲洗3次,分别加入2 mL质量浓度为100 $\mu\text{g/L}$ mNGF、100 $\mu\text{g/L}$ BDNF、100 $\mu\text{g/L}$ mNGF+100 $\mu\text{g/L}$ BDNF的细胞培养基进行正式诱导,对照组仅加入2 mL不含任何诱导剂的细胞培养基;非预诱导组在使用细胞培养基培养24 h后,再加入2 mL质量浓度为100 $\mu\text{g/L}$ mNGF+100 $\mu\text{g/L}$ BDNF的细胞培养基对脐血间充质干细胞进行正式诱导。

1.4.4 细胞形态观察 倒置显微镜下观察各实验组细胞生长状态以及预诱导和正式诱导1, 3, 5, 7 d的细胞形态变化,并拍照记录。

1.4.5 免疫细胞化学染色对脐血间充质干细胞神经分化的鉴定 正式诱导第1, 3, 5, 7天进行免疫细胞化学染色,检测各组神经元样细胞表面标志物NSE和星形胶质细胞表面标志物GFAP的表达情况^[17-18]。操作步骤按照二步法抗兔/

鼠通用型免疫组化试剂盒说明书进行:将各组细胞爬片用PBS冲洗后放入40 g/L多聚甲醛中固定20 min;0.2% Triton-X-100透化处理5 min;体积分数为3% H₂O₂孵育10 min消除内源性过氧化物酶活性;山羊血清封闭20 min,甩干后滴加按比例稀释过的一抗NSE(1:100)、GFAP(1:200)置于湿盒中4℃过夜;次日取出细胞爬片,PBS清洗后滴加二抗,湿盒中37℃孵育30 min;去除二抗,PBS清洗后使用现配DAB显色剂显色3-5 min;蒸馏水冲洗后用苏木精复染3 min,脱水封固。光镜下随机取10个不重叠视野($\times 100$)拍照,被苏木精蓝染的胞核计数为细胞总数,胞浆被DAB染为棕黄色为阳性显色并计数为阳性细胞数,最后计算阳性细胞率,阳性细胞率=阳性细胞数/细胞总数。

1.4.6 实时荧光定量PCR检测诱导后NSE、GFAP mRNA相对表达量 正式诱导第1, 3, 5, 7天进行实时荧光定量PCR,检测NSE、GFAP mRNA的相对表达量:①RNA的提取及反转录:用Trizol法提取细胞总RNA,核酸蛋白测定仪上测定RNA样品浓度,按照200 ng的质量计算模板RNA所需体积,然后根据反转录试剂盒说明书操作反转录制备cDNA,总反应体系10 μL ,反转录条件为25℃ 10 min,50℃ 30 min,85℃ 5 min;②采用SYBR[®] Green I 荧光染料法进行实时定量PCR检测,根据荧光定量PCR试剂盒说明书配制反应体系,共20 μL ,其中AceQ[®] qPCR SYBR[®] Green Master Mix 10 μL 、Forward Primer 0.4 μL 、Reverse Primer 0.4 μL 、Template DNA 2 μL 、ddH₂O 7.2 μL 。采用两步法程序进行反应,设定反应条件为:95℃ 预变性5 min;95℃ 10 s,60℃ 30 s,40个循环;90℃ 15 s;60℃ 1 min。共重复3次实验并统计实验数据,数据分析采用2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 法。扩增引物使用primer5.0软件设计,由上海生工生物工程技术有限公司合成,见表1。

表1 实时荧光定量PCR引物序列
Table 1 RT-qPCR primer sequences

产物	引物序列	产物长度
β -actin	Forward primer 5'-TGA CGT GGA CAT CCG CAA AG-3'	205 bp
	Reverse primer 5'-CTG GAA GGT GGA CAG CGA GG-3'	
NSE	Forward primer 5'-TGC AAC TGT CTG CTG CTC AA-3'	111 bp
	Reverse primer 5'-TGA GCG ATG ACT CAC CAT GA-3'	
GFAP	Forward primer 5'-GAT CAA CTC ACC GCC AAC AG-3'	125 bp
	Reverse primer 5'-AGG TTG TTC TCG GCT TCC AG-3'	

1.5 主要观察指标 ①脐血间充质干细胞预诱导前后及正式诱导1, 3, 5, 7 d的形态学变化;②诱导后免疫细胞化学染色观察神经元细胞表面标志物NSE、神经胶质细胞表面标志物GFAP阳性表达情况;③诱导后通过实时荧光定量PCR检测各组细胞NSE、GFAP mRNA的表达水平。

1.6 统计学分析 采用SPSS 21.0统计分析软件进行数据处理分析,对实验数据进行正态性检验及方差齐性检验,符合正态分布且方差齐的多组均数比较用单因素方差分析

(ANOVA)、多组间均数两两比较用LSD-*t* 检验, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 脐血间充质干细胞的形态特征 倒置显微镜下观察第5代脐血间充质干细胞, 其形态为大小不一的长梭形、纺锤形(图1A)。传代培养五六天细胞可达80%融合状态, 此时镜下观察可见细胞集落呈漩涡状、放射状生长(图1B)。

2.2 诱导过程中脐血间充质干细胞形态学变化 加入成纤维生长因子及表皮生长因子预诱导24 h后, 细胞胞体回缩变圆, 细胞边缘伸出单个或多个突起, 而未经预诱导的脐血间充质干细胞则未见明显形态变化(图2)。正式诱导3 d后, 细胞胞体以胞核为中心进一步回缩, 细胞突起逐渐变细伸长, 形态类似长蝌蚪形、细长条形, 呈类神经元样细胞改变; 正式诱导5-7 d后, 可见局部区域内相邻细胞间通过突触相互连接。各实验组细胞有类似的形态变化, 但联合诱导组的细胞形态改变最为显著(图3)。在7 d诱导时间内所有实验组细胞生长状态均良好, 未见明显的细胞脱落、死亡现象。

2.3 免疫细胞化学染色鉴定 对诱导第1, 3, 5, 7天各实验组细胞行免疫细胞化学染色, 发现各实验组细胞NSE、GFAP均阳性表达, 表明经诱导后脐血间充质干细胞向神经元样细胞和星形胶质细胞分化。对相同诱导天数下各组细胞染色情况进行观察对比, 发现mNGF+BDNF组细胞染色最深, NSE、GFAP阳性细胞多于mNGF组、BDNF组, 对照组染色最浅, 阳性细胞数较少, 部分为非特异性染色(图4)。

对比各实验组细胞NSE、GFAP阳性率(表2, 3), 发现在7 d诱导时间内, mNGF组、BDNF组、mNGF+BDNF组、非预诱导组NSE、GFAP细胞阳性率均呈逐渐上升趋势, 而对照组则逐渐下降; 在诱导天数相同的情况下, mNGF+BDNF组NSE、GFAP细胞阳性率均高于mNGF组、BDNF组以及对照组, 且高于非预诱导组, 差异均有显著性意义($P < 0.05$)。

2.4 实时荧光定量PCR检测结果 各实验组细胞NSE mRNA和GFAP mRNA在诱导第1, 3, 5, 7天时均有表达, 且mNGF组、BDNF组、mNGF+BDNF组、非预诱导组二者表达量均呈上升趋势, 在第7天时表达量最高, 而对照组表达量则逐渐降低, 总体趋势同免疫细胞化学染色结果相一致。相同诱导天数下mNGF+BDNF组NSE mRNA和GFAP mRNA的表达量高于mNGF组、BDNF组以及对照组, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。另外, 进行预诱导的mNGF+BDNF组NSE mRNA和GFAP mRNA的表达量明显高于非预诱导组, 差异有显著性意义($P < 0.05$), 见图5, 6。

3 讨论 Discussion

BDNF是一种广泛分布于中枢神经系统中, 对神经元具有营养、促分化以及保护作用的细胞因子^[19-20]。Shi等^[21]将脐血间充质干细胞与星形胶质细胞共培养, 发现星形胶

质细胞分泌的BDNF能够促进脐血间充质干细胞向神经元样细胞分化; Ji等^[22]则直接使用BDNF成功诱导脐血间充质干细胞分化为GABA能神经元, 以上研究表明BDNF在神经分化过程中起到了重要作用。mNGF则是从小鼠颌下腺分离纯化出的一种细胞因子, 能够通过激活ERK1/2和PI3K/Akt通路来调节神经元的分化、存活^[23], 已临床用于脑性瘫痪、缺血缺氧性脑病、面神经炎、周围神经损伤等多种神经系统疾病的治疗, 均取得较好的疗效^[24-27]。在前期研究中发现mNGF也具备诱导脐血间充质干细胞向神经元样细胞分化的作用, 但无论是BDNF还是mNGF的诱导效率均偏低, 这也是单细胞因子诱导法普遍存在的缺点。

为了寻求更加高效的诱导方法, Salehinejad等^[28]使用细胞因子表皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子以及抗氧化剂维甲酸、二甲基亚砷联合诱导, 有效提高了脐血间充质干细胞向神经元样细胞分化的效率; Huat等^[29]使用3种细胞因子——表皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子和胰岛素生长因子对脐血间充质干细胞联合诱导, 成功诱导出神经元样细胞和神经胶质细胞, 且诱导效率较单独使用表皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子明显提高。以上研究表明, 使用联合诱导的方法来提高诱导效率具备一定的可行性。本实验中, 在使用mNGF和BDNF对脐血间充质干细胞进行单独和联合诱导后, 通过免疫细胞化学染色以及实时荧光定量PCR技术检测发现: 在诱导天数相同的条件下, mNGF+BDNF组的NSE、GFAP细胞阳性率以及NSE mRNA、GFAP mRNA的表达量均显著高于mNGF组、BDNF组($P < 0.05$), 说明mNGF和BDNF间存在一定的协同作用, 联合诱导比单独诱导效率更高。

在联合诱导的基础上, 为了更进一步的提高诱导效率, Rafieemehr等^[30]使用了预诱导的方法, 即先用维甲酸、表皮生长因子、成纤维细胞生长因子对脐血间充质干细胞进行预诱导, 弃去预诱导剂后再加入NGF、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、抗坏血酸正式诱导6 d, 并通过RT-PCR法检测到神经细胞标志物MAP2、MBP和GFAP高表达, 使诱导效率明显提高。以上研究选用的诱导剂成纤维细胞生长因子和表皮生长因子是两种广谱神经营养因子, 二者均具有促进脐血间充质干细胞向神经元样细胞分化的作用^[31-32], 本实验在加入成纤维细胞生长因子和表皮生长因子对脐血间充质干细胞预诱导24 h后, 细胞形态开始向神经元样细胞发生改变, 且在7 d的诱导时间内, 无论是NSE、GFAP阳性细胞率还是NSE、GFAP mRNA表达量, 经过预诱导的mNGF+BDNF组均高于未预诱导组, 表明成纤维细胞生长因子和表皮生长因子作为预诱导剂能够有效提升诱导效率。

目前已知BDNF可通过激活ERK、PI3K/Akt通路来促进脐血间充质干细胞向神经元样细胞分化^[33-34], 而mNGF的诱导机制尚不明确, 可能也与ERK、PI3K/Akt信号通路的激活密切相关^[22], 以调控相关基因的表达水平来实现细胞的定向分化。本实验在mNGF和BDNF的持续诱导作用

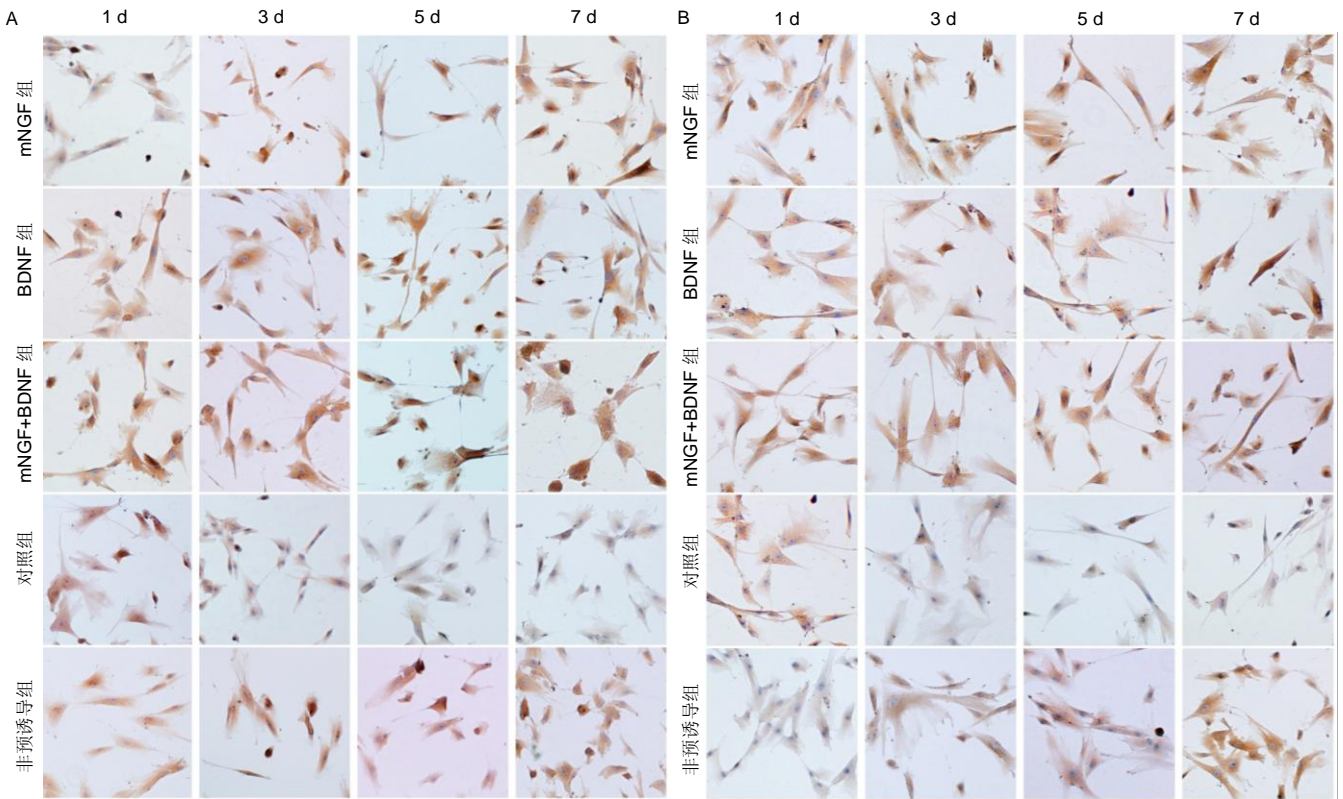


图4 免疫细胞化学染色检测神经元特异性烯醇化酶、胶质纤维酸性蛋白表达(DAB染色, $\times 100$)

Figure 4 Immunocytochemical detection of neuron-specific enolase and glial fibrillary acidic protein (DAB staining, $\times 100$)

图注: 诱导第 1, 3, 5, 7 天可见各组细胞神经元特异性烯醇化酶(A)、胶质纤维酸性蛋白(B)均阳性表达, 阳性细胞胞浆被 DAB 染为棕褐色, 所有细胞胞核被苏木精染为蓝紫色。相同诱导天数下, mNGF+BDNF 组细胞染色最深, 阳性细胞数多; 对照组染色最浅, 阳性细胞数少, 部分为非特异性染色。mNGF: 鼠神经生长因子; BDNF: 脑源性神经营养因子。

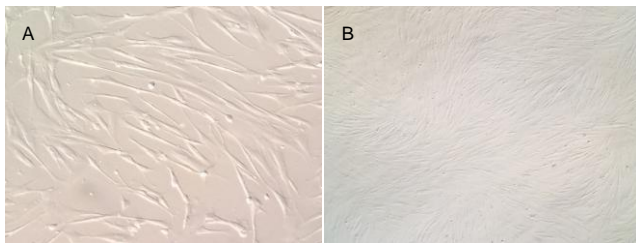


图1 人脐血间充质干细胞形态

Figure 1 Morphology of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells

图注: 图中 A 为第 5 代脐血间充质干细胞, 其形态为大小不一的长梭形、纺锤形($\times 100$); B 为脐血间充质干细胞生长达 80% 融合($\times 40$)。

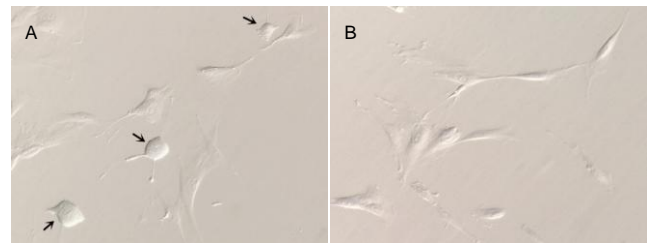


图2 人脐血间充质干细胞预诱导 24 h 倒置显微镜下细胞形态($\times 100$)

Figure 2 Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells were pre-induced for 24 hours and then observed under the inverted microscope ($\times 100$)

图注: 图中 A 为加入成纤维生长因子及表皮生长因子预诱导 24 h, 可见细胞形态发生改变——胞体回缩变圆, 细胞边缘伸出突起(箭头所示); B 为仅加入等量细胞培养基培养 24 h, 细胞形态较前未见明显变化。

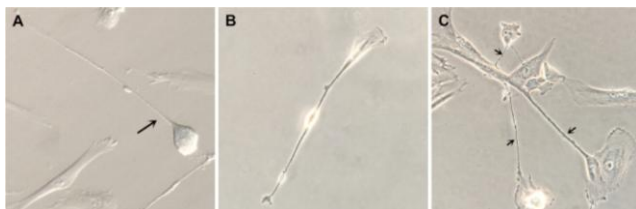


图3 鼠神经生长因子联合脑源性神经营养因子诱导后脐血间充质干细胞形态变化($\times 100$)

Figure 3 Morphological changes of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells induced by mouse nerve growth factor combined with brain-derived neurotrophic factor ($\times 100$)

图注: 联合诱导 3 d 后, 倒置显微镜观察可见细胞胞体较前进一步回缩、突起变细伸长, 形状类似长蝌蚪形(A, 箭头示)和细长条形(B); 诱导 5-7 d 后, 可见局部区域内相邻细胞间通过突触相互连接(C, 箭头示)。

下, 胞内基因NSE、GFAP的mRNA表达水平逐渐升高, 从而促使细胞不断向神经元和胶质细胞分化, 最终表现为细胞形态的改变和NSE、GFAP蛋白的高表达。相反, 对照组细胞在撤去成纤维细胞生长因子和表皮生长因子的诱导环境后, NSE、GFAP mRNA表达量呈逐渐下降的趋势, NSE、GFAP蛋白的表达也不断降低, 表明经过成纤维细胞生长因子和表皮生长因子短时间诱导的神经元样细胞并不稳定, 在撤去诱导条件后并不能长期维持神经元样细胞的特性。有研究发现成纤维细胞生长因子具有加强中枢神经系统不同区域神经元前体细胞增殖和再生的能力^[35], 而

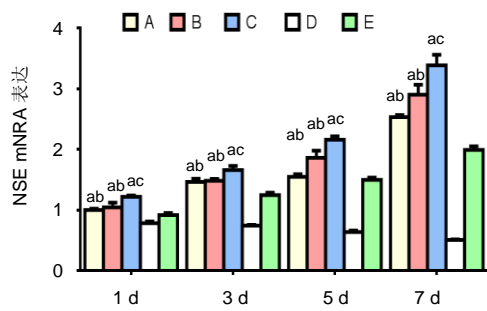


图5 诱导第1, 3, 5, 7天各组神经特异性烯醇化酶(NSE)mRNA水平相对表达量($2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法, $n=3$)

Figure 5 Relative expression level of neuron-specific enolase mRNA in each group at 1, 3, 5, 7 days of induction

图注: 图中 A, B, C, D, E 分别为 mNGF 组、BDNF 组、mNGF+BDNF 组、对照组、非预诱导组。与对照组比较, $^aP < 0.05$; 与 mNGF+BDNF 组比较, $^bP < 0.01$; 与非预诱导组比较, $^cP < 0.01$ 。mNGF: 鼠神经生长因子; BDNF: 脑源性神经营养因子。

表2 诱导第1, 3, 5, 7天各组神经特异性烯醇化酶阳性细胞表达率比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$, %)

Table 2 Comparison of the expression of neuron-specific enolase-positive cells at 1, 3, 5, 7 days of induction

组别	1 d	3 d	5 d	7 d
mNGF 组	53.77±6.47 ^{ab}	64.73±7.89 ^{ab}	66.82±6.99 ^{ab}	71.61±4.53 ^{ab}
BDNF 组	54.22±10.89 ^{ab}	65.04±11.35 ^{ab}	69.28±7.98 ^{ab}	78.57±6.70 ^{ab}
mNGF+BDNF 组	67.71±8.48 ^{ac}	75.25±6.99 ^{ac}	78.48±7.59 ^{ac}	90.04±3.66 ^{ac}
对照组	44.45±8.05	40.18±5.44	32.35±6.88	30.62±6.36
非预诱导组	34.96±7.17	45.07±7.90	56.04±8.83	65.80±8.56
F 值	21.424	33.019	52.937	130.449
P 值	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

表注: 与对照组比较, $^aP < 0.05$; 与 mNGF+BDNF 组比较, $^bP < 0.01$; 与非预诱导组比较, $^cP < 0.01$ 。mNGF: 鼠神经生长因子; BDNF: 脑源性神经营养因子。

表皮生长因子则能够维持神经元的存活并促进神经元轴突的延长^[36], 因此, 推测对照组神经元样细胞去分化的原因可能与成纤维细胞生长因子促神经分化作用以及表皮生长因子维持神经元存活的作用消失有关。

综上所述, 成纤维细胞生长因子和表皮生长因子作为预诱导剂能够有效提升神经诱导效率, mNGF、BDNF在诱导过程中具有协同作用, 二者联合诱导相比单独诱导效率更高, 为今后脐血间充质干细胞的实验研究和临床应用提供了新的思路。另外, 尽管从细胞形态学变化、表面标志物NSE、GFAP的检测以及二者mRNA表达水平证明了脐血间充质干细胞经诱导后能够分化为神经元样细胞和星形胶质细胞, 但mNGF诱导的具体机制、mNGF和BDNF协同作用的方式以及诱导后细胞是否具备神经生物学功能等问题仍有待更进一步研究去探讨验证。

致谢: 感谢徐州医科大学附属连云港医院中心实验室及江苏省博雅干细胞库提供的支持。

作者贡献: 实验设计为杨自金、陈俊, 实验实施为陈俊, 实验评估为杨自金, 资料收集为李红梅。

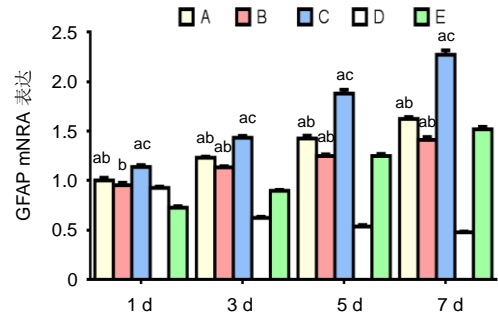


图6 诱导第1, 3, 5, 7天各组胶质纤维酸性蛋白(GFAP)mRNA水平相对表达量($2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法, $n=3$)

Figure 6 Relative expression level of glial fibrillary acidic protein mRNA in each group at 1, 3, 5, 7 days of induction

图注: 图中 A, B, C, D, E 分别为 mNGF 组、BDNF 组、mNGF+BDNF 组、对照组、非预诱导组。与对照组比较, $^aP < 0.05$; 与 mNGF+BDNF 组比较, $^bP < 0.01$; 与非预诱导组比较, $^cP < 0.01$ 。mNGF: 鼠神经生长因子; BDNF: 脑源性神经营养因子。

表3 诱导第1, 3, 5, 7天各组胶质纤维酸性蛋白阳性细胞表达率比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$, %)

Table 3 Comparison of the expression of glial fibrillary acidic protein-positive cells at 1, 3, 5, 7 days of induction

组别	1 d	3 d	5 d	7 d
mNGF 组	36.00±7.74 ^b	46.74±6.97 ^{ab}	53.82±9.67 ^{ab}	56.34±8.97 ^{ab}
BDNF 组	35.08±7.37 ^b	41.95±5.12 ^{ab}	46.58±5.89 ^{ab}	50.88±8.84 ^{ab}
mNGF+BDNF 组	47.93±6.76 ^{ac}	55.53±9.20 ^{ac}	60.30±5.12 ^{ac}	64.22±6.48 ^{ac}
对照组	34.06±4.79	31.77±5.35	27.48±5.22	25.14±7.86
非预诱导组	28.89±5.05	35.83±7.14	47.50±8.06	54.81±8.36
F 值	11.794	18.180	30.654	33.274
P 值	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

表注: 与对照组比较, $^aP < 0.05$; 与 mNGF+BDNF 组比较, $^bP < 0.01$; 与非预诱导组比较, $^cP < 0.01$ 。mNGF: 鼠神经生长因子; BDNF: 脑源性神经营养因子。

经费支持: 该文章接受了“江苏省连云港市科技局重点科室建设(SH1117)”的基金资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。文章中的干预手段应用了“注射用鼠神经生长因子”药品, 但是所有作者声明没有接受相关的经费支持, 不存在利益冲突。同时声明在稿件准备过程中所受的资助研究设计和实施, 数据收集、分析和阐释、药物或仪器、软件等的使用, 语言润色, 写作等均不影响作者观点和对数据结果的报道。

伦理问题: 研究用细胞的实验方案符合相关伦理学要求, 文章的撰写与编辑修改后文章遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款, 在合理引用的情

况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Singh S, Srivastava A, Srivastava P, et al. Advances in Stem Cell Research- A Ray of Hope in Better Diagnosis and Prognosis in Neurodegenerative Diseases. *Front Mol Biosci.* 2016;3:72.
- [2] Mine Y, Tatarishvili J, Oki K, et al. Grafted human neural stem cells enhance several steps of endogenous neurogenesis and improve behavioral recovery after middle cerebral artery occlusion in rats. *Neurobiol Dis.* 2013;52:191-203.
- [3] 刘俊华,王大斌,顾教伟,等. 神经干细胞移植治疗脑性瘫痪:神经修复的效果和安全性评估[J]. 中国组织工程研究, 2015,19(19):3032-3036.
- [4] Ager RR, Davis JL, Agazaryan A, et al. Human neural stem cells improve cognition and promote synaptic growth in two complementary transgenic models of Alzheimer's disease and neuronal loss. *Hippocampus.* 2015;25(7):813-826.
- [5] Taran R, Mamidi MK, Singh G, et al. In vitro and in vivo neurogenic potential of mesenchymal stem cells isolated from different sources. *J Biosci.* 2014;39(1):157-169.
- [6] Lunn JS, Sakowski SA, Feldman EL. Concise review: Stem cell therapies for amyotrophic lateral sclerosis: recent advances and prospects for the future. *Stem Cells.* 2014;32(5):1099-1109.
- [7] Zhu Y, Guan YM, Huang HL, et al. Human umbilical cord blood mesenchymal stem cell transplantation suppresses inflammatory responses and neuronal apoptosis during early stage of focal cerebral ischemia in rabbits. *Acta Pharmacol Sin.* 2014;35(5):585-591.
- [8] Wang L, Lu M. Regulation and direction of umbilical cord blood mesenchymal stem cells to adopt neuronal fate. *Int J Neurosci.* 2014;124(3):149-159.
- [9] Shahbazi A, Safa M, Alikarami F, et al. Rapid Induction of Neural Differentiation in Human Umbilical Cord Matrix Mesenchymal Stem Cells by cAMP-elevating Agents. *Int J Mol Cell Med.* 2016;5(3):167-177.
- [10] Rafieemehr H, Kheirandish M, Soleimani M. Improving the neuronal differentiation efficiency of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells cultivated under appropriate conditions. *Iran J Basic Med Sci.* 2015;18(11):1100-1106.
- [11] Zeng Y, Rong M, Liu Y, et al. Electrophysiological characterisation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells induced by olfactory ensheathing cell-conditioned medium. *Neurochem Res.* 2013;38(12):2483-2489.
- [12] Hei WH, Almansoori AA, Sung MA, et al. Adenovirus vector-mediated ex vivo gene transfer of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) to human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells (UCB-MSCs) promotes crush-injured rat sciatic nerve regeneration. *Neurosci Lett.* 2017;643:111-120.
- [13] Nan C, Guo L, Zhao Z, et al. Tetramethylpyrazine induces differentiation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells into neuron-like cells in vitro. *Int J Oncol.* 2016;48(6):2287-2294.
- [14] 杨自金,郭佳丽,卢思广,等. 人脐血间充质干细胞移植联合神经节苷脂注射治疗脑性瘫痪[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(19):2803-2809.
- [15] Can A, Balci D. Isolation, culture, and characterization of human umbilical cord stroma-derived mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol.* 2011;698:51-62.
- [16] Khoo ML, Shen B, Tao H, et al. Long-term serial passage and neuronal differentiation capability of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2008;17(5):883-896.
- [17] Duan P, Sun S, Li B, et al. miR-29a modulates neuronal differentiation through targeting REST in mesenchymal stem cells. *PLoS One.* 2014;9(5):e97684.
- [18] Zhuang H, Zhang R, Zhang S, et al. Altered expression of microRNAs in the neuronal differentiation of human Wharton's Jelly mesenchymal stem cells. *Neurosci Lett.* 2015;600:69-74.
- [19] Paczkowska E, Łuczowska K, Piecyk K, et al. The influence of BDNF on human umbilical cord blood stem/progenitor cells: implications for stem cell-based therapy of neurodegenerative disorders. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2015;75(2):172-191.
- [20] Takemoto T, Ishihara Y, Ishida A, et al. Neuroprotection elicited by nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor released from astrocytes in response to methylmercury. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2015;40(1):199-205.
- [21] Shi W, Huang CJ, Xu XD, et al. Transplantation of RADA16-BDNF peptide scaffold with human umbilical cord mesenchymal stem cells forced with CXCR4 and activated astrocytes for repair of traumatic brain injury. *Acta Biomater.* 2016;45:247-261.
- [22] Ji HY, Kim MS, Lee MY, et al. GABAergic neuronal differentiation induced by brain-derived neurotrophic factor in human mesenchymal stem cells. *Animal Cells & Systems.* 2014; 18(1):17-24.
- [23] Zhao J, Cheng YY, Fan W, et al. Botanical drug puerarin coordinates with nerve growth factor in the regulation of neuronal survival and neuriteogenesis via activating ERK1/2 and PI3K/Akt signaling pathways in the neurite extension process. *CNS Neurosci Ther.* 2015;21(1):61-70.
- [24] 郝冬荣,厉红,庞保东.鼠神经生长因子治疗小儿面神经炎42例[J]. 中国药业,2014, 23(1):82-84.
- [25] 许马利,王杨. 鼠神经生长因子治疗新生儿缺氧缺血性脑病的Meta分析[J]. 中国临床药理学杂志,2016, 32(7):652-654.
- [26] 李巧秀,张俊清,翟红印,等. 鼠神经生长因子运动区注射治疗小儿脑瘫疗效观察[J]. 中国妇幼保健,2015, 30(28):4889-4891.
- [27] Liu YR1, Liu Q. Meta-analysis of mNGF therapy for peripheral nerve injury: a systematic review. *Chin J Traumatol.* 2012;15(2):86-91.
- [28] Salehinejad P, Alitheen NB, Ali AM, et al. Neural differentiation of human umbilical cord matrix-derived mesenchymal cells under special culture conditions. *Cytotechnology.* 2015;67(3):449-460.
- [29] Huat TJ, Khan AA, Pati S, et al. IGF-1 enhances cell proliferation and survival during early differentiation of mesenchymal stem cells to neural progenitor-like cells. *BMC Neurosci.* 2014;15:91.
- [30] Rafieemehr H, Kheirandish M, Soleimani M. A new two-step induction protocol for neural differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Iranian Journal of Blood & Cancer.* 2015; 7(2):111-116.
- [31] Sanalkumar R, Vidyanand S, Lalitha Indulekha C, et al. Neuronal vs. glial fate of embryonic stem cell-derived neural progenitors (ES-NPs) is determined by FGF2/EGF during proliferation. *J Mol Neurosci.* 2010;42(1):17-27.
- [32] Salehinejad P, Alitheen NB, Ali AM, et al. Neural differentiation of human umbilical cord matrix-derived mesenchymal cells under special culture conditions. *Cytotechnology.* 2015;67(3):449-460.
- [33] Lim JY, Park SI, Kim SM, et al. Neural differentiation of brain-derived neurotrophic factor-expressing human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in culture via TrkB-mediated ERK and β -catenin phosphorylation and following transplantation into the developing brain. *Cell Transplant.* 2011;20(11-12):1855-1866.
- [34] Lim JY, Park SI, Oh JH, et al. Brain-derived neurotrophic factor stimulates the neural differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells and survival of differentiated cells through MAPK/ERK and PI3K/Akt-dependent signaling pathways. *J Neurosci Res.* 2008;86(10):2168-2178.
- [35] Santa-Olalla J, Covarrubias L. Basic fibroblast growth factor promotes epidermal growth factor responsiveness and survival of mesencephalic neural precursor cells. *J Neurobiol.* 1999;40(1):14-27.
- [36] Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol.* 2000;164(2):247-256.