

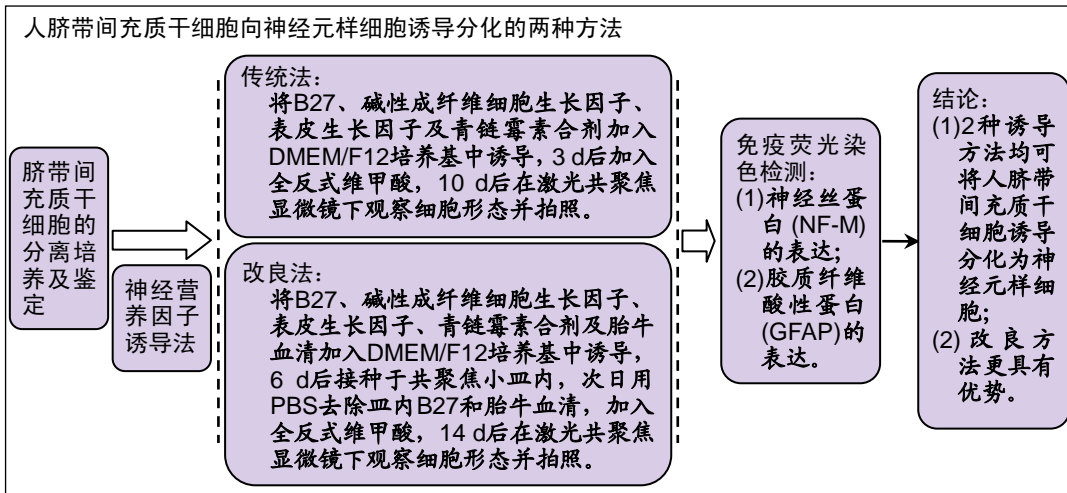
人脐带间充质干细胞向神经元样细胞诱导分化：两种方法的比较

王 武¹, 齐保军², 武忠炎¹, 崔 泳¹ (新疆医科大学第五附属医院骨一科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011; ²开封市中心医院骨科, 河南省开封市 475000)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1524

ORCID: 0000-0001-9791-9491(王武)

文章快速阅读:



王武, 男, 1982年生, 陕西省西安市人, 汉族, 中南大学湘雅医院在读博士, 主治医师, 主要从事创伤骨科及软骨损伤的相关研究。

并列第一作者: 齐保军, 男, 1984年生, 黑龙江省海伦市人, 汉族, 2015年新疆医科大学毕业, 硕士, 医师, 主要从事创伤骨科研究。

通讯作者: 崔泳, 副主任医师, 副教授, 硕士生导师, 新疆医科大学第五附属医院骨科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011

文献标识码:A

稿件接受: 2018-09-05



Wang Wu, Doctoral candidate, Attending physician, First Department Orthopedics, the Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Qi Baojun, Master, Physician, Department of Orthopedics, Kaifeng Central Hospital, Kaifeng 475000, Henan Province, China

Wang Wu and Qi Baojun contributed equally to this work.

Corresponding author: Cui Yong, Associate chief physician, Associate professor, Master's supervisor, First Department Orthopedics, the Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

文题释义:

脐带间充质干细胞: 是存在于新生儿脐带组织中的一种多能干细胞, 具有强大的增殖能力和多向分化潜能; 其具有来源丰富、免疫原性低、移植后不需应用免疫抑制剂可以长期存活等诸多特性, 在临床应用中具有广阔的前景。

干细胞向神经元样细胞诱导分化: 干细胞具有多向分化潜能, 其在诱导剂(2% B27、20 μg/L 碱性成纤维细胞生长因子、20 μg/L 表皮生长因子)的作用下可进行一系列分裂和分化, 并能发育成为成熟的神经元样细胞; 分化后的细胞可表现出神经细胞的形态特征(细胞呈星形, 部分细胞胞质收缩形成突起, 细胞胞体形成多样的神经样轴突, 细胞之间形成网络样连接), 并能表达神经细胞特异性标志物。

摘要

背景: 干细胞因其可向神经元样细胞诱导分化而在临床神经损伤疾病治疗中具有广阔的前景, 但干细胞向神经元样细胞诱导分化的效率不高, 为此作者对传统的诱导方法进行了改良。

目的: 探讨2种不同方法诱导人脐带间充质干细胞向神经元样细胞分化的潜能及2种诱导方法的优劣。

方法: 采用组织块法分离培养人脐带间充质干细胞, 显微镜下观察其形态并利用流式细胞仪进行干细胞鉴定, 在神经营养因子诱导方案下, 采用相同的诱导剂(2% B27、20 μg/L 碱性成纤维细胞生长因子、20 μg/L 表皮生长因子), 2种不同的诱导方法将其向神经元样细胞诱导分化(传统方法: 将B27、碱性成纤维细胞生长因子、表皮生长因子及青链霉素合剂加入DMEM/F12培养基中进行诱导, 3 d后加入全反式维甲酸, 共培养10 d; 改良方法: 将B27、碱性成纤维细胞生长因子、表皮生长因子、青链霉素合剂及胎牛血清加入DMEM/F12培养基中进行诱导, 6 d后用胰酶消化后重新接种于共聚焦小皿内, 次日去除B27和胎牛血清, 并加入全反式维甲酸, 共培养14 d)。应用免疫荧光染色对诱导分化后细胞表面神经标志物——神经丝蛋白(NF-M)和胶质纤维酸性蛋白(GFAP)进行检测, 比较2种方法诱导后细胞表面神经标志物的阳性表达率。

结果与结论: ①成功分离出人脐带间充质干细胞, 经流式细胞仪鉴定其高表达CD29、CD105, 低表达CD34、CD45, 符合干细胞特性; ②2种方法诱导后, 镜下观察到的细胞均可呈现神经细胞样改变, 免疫荧光检测提示2种方法诱导后细胞中神经丝蛋白与胶质纤维酸性蛋白均呈阳性表达; ③传统方法组神经丝蛋白与胶质纤维酸性蛋白的阳性率分别为18.73%和18.01%, 改良方法组二者的阳性率分别为27.48%和29.24%, 两组比较差异有显著性意义($P < 0.05$); ④结果表明, 2种诱导方法均可将人脐带间充质干细胞诱导分化为神经元样细胞; 但在诱导分化后的细胞形态、神经标志物(神经丝蛋白与胶质纤维酸性蛋白)的阳性表达率方面, 改良方法更具有优势。

关键词:

人脐带间充质干细胞; 诱导分化; 神经细胞; 神经丝蛋白; 胶质纤维酸性蛋白; 干细胞

主题词:

脐带; 间质干细胞; 细胞分化; 神经元; 组织工程

中图分类号: R459.9

基金资助:

新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2016D01C239), 项目负责人: 王武

缩略语:

人脐带间充质干细胞: human umbilical cord mesenchymal stem cells, HUMSCs; 神经丝蛋白: neurofilament protein, NF-M; 胶质纤维酸性蛋白: glial fiber acidic protein, GFAP

Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into neuron-like cells: a comparison of two induction methods

Wang Wu¹, Qi Baojun², Wu Zhongyan¹, Cui Yong¹ (¹First Department Orthopedics, the Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; ²Department of Orthopedics, Kaifeng Central Hospital, Kaifeng 475000, Henan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Stem cells are a promising treatment for nerve injury diseases due to its ability of differentiating into neuron-like cells. However, the differentiation efficacy is low, so we have make an advance based on the traditional induction method.

OBJECTIVE: To explore the potentiality of human umbilical cord mesenchymal stem cells differentiating into neuron-like cells induced by two methods and their merits.

METHODS: Human umbilical cord mesenchymal stem cells were isolated and cultured using tissue explant method. The cell morphology was observed under microscope, and the cultured cells were identified by flow cytometry. Human umbilical cord mesenchymal stem cells were differentiated into neuron-like cell under the neurotrophic factor inducing scheme. Two different methods but using the same inducers (2% B27, 20 µg/L basic fibroblast growth factor and 20 µg/L epidermal growth factor) were utilized. Traditional method: B27, basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor and penicillin streptomycin combination were added in the DMEM/F12 medium, 3 days later all-trans retinoic acid was added, followed by 10 days of culture. Advanced method: B27, basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, penicillin streptomycin combination and fetal bovine serum were added in the DMEM/F12 medium, 6 days later the cells underwent trypsinization and re-seeded in the confocal capsule, B27 and fetal bovine serum were removed next day, and all-trans retinoic acid was added, cultured for 14 days. Then the differentiated nerve cells were identified by immunofluorescence detection of neurofilament protein and glial fibrillary acidic protein. Meanwhile, the positive rate of the neuromarkers in the cells was compared between two methods.

RESULTS AND CONCLUSION: Primary human umbilical cord mesenchymal stem cells were isolated and cultured successfully, and highly expressed CD29 and CD105 whereas lowly expressed CD34 and CD45, which were the characteristics of the stem cell. The differentiated cells were presented as nerve cells in the morphology under microscope in both inducing methods. The results of the immunofluorescence indicated that the neurofilament protein and the glial fiber acidic protein in the differentiated cells were all expressed positive in both methods. The positive rates of neurofilament protein and glial fiber acidic protein were 18.73% and 18.01% for the traditional method, while 27.48% and 29.24% for the advanced methods, respectively ($P < 0.05$). In summary, human umbilical cord mesenchymal stem cells can differentiate into the neuron-like cells induced by two methods. Moreover, the advanced method is better than the traditional method in the morphology of the differentiated cells and the positive rate of neurofilament protein and glial fiber acidic protein.

Subject headings: Umbilical Cord; Mesenchymal Stem Cells; Cell Differentiation; Neurons; Tissue Engineering

Funding: the Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region, No. 2016D01C239 (to WW)

0 引言 Introduction

间充质干细胞是来源于中胚层的非造血干细胞, 其具有强大的自我更新、多向分化与免疫调节能力, 已成为一种理想的种子细胞, 并得到广泛应用^[1-4]。间充质干细胞广泛存在于身体的各种组织, 易于分离和体外扩增, 已在骨髓、滑膜、羊膜、脐带、胎盘、脐血、脂肪、肺脏、肝脏等组织中被提取出^[5-6]。目前已有研究证实人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, HUMSCs)能够分化为生殖细胞^[7]、汗腺细胞^[8]、前列腺样上皮细胞^[9]、心肌细胞^[10]、视网膜前体细胞^[11]、肝细胞^[12]、胰岛素分泌细胞^[13]、内皮细胞^[14]、神经组织^[15]、软骨组织等多种细胞和组织^[16]。HUMSCs的培养具有取材方便、不违背伦理道德和法律要求等优点^[17]。此外, 还有研究表明脐带中干细胞的含量较骨髓高, 故HUMSCs被广泛认可为替代骨髓间充质干细胞的最理想来源^[18]。目前, 将HUMSCs诱导分化为神经元样细胞, 在治疗神经退行性疾病、神经损伤、脑卒中等神经系统疾病中都取得了进展^[19-22]。

课题组前期实验采用了神经营养因子诱导法对HUMSCs向神经元样细胞诱导分化进行了初探, 应用含2% B27、20 µg/L碱性成纤维细胞生长因子、20 µg/L表皮生长因子的DMEM/F12培养基对HUMSCs进行诱导, 免疫荧光检测其表达神经干细胞特异性标志蛋白nestin^[23]。前期实验中作者发现HUMSCs向神经元样细胞诱导分化的效率较低, 为了探索一种安全、高效的诱导方法以满足以后科

研及临床的需要, 作者对前期的诱导方法进行了改良, 采用相同的诱导剂, 对部分诱导剂的添加时间以及应用时间进行了调整, 取得了一定的成效。另外, 前期实验仅检测了nestin蛋白, 为进一步明确诱导HUMSCs分化后的细胞是否为更加成熟的神经元细胞, 作者在此次实验中选用了常用的神经标志物—神经丝蛋白(neurofilament protein, NF-M)和胶质纤维酸性蛋白(glial fiber acidic protein, GFAP)作为检测指标, 旨在探索一种更高效的诱导分化方法, 并对HUMSCs向神经元样细胞分化的潜能进行初步探讨。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外观察实验。

1.2 时间及地点 实验于2014年5月至2015年6月在新疆医科大学第一附属医院干细胞室及分子生物实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 脐带 由新疆医科大学第五附属医院产科获得足月分娩的健康新生儿脐带, 经医院伦理委员会审查通过, 经产妇及家属同意并签署知情同意书, 将其放入装有无菌生理盐水的50 mL离心管内, 4 h内处理。

1.3.2 实验设备 倒置荧光显微镜、Leica Logo型荧光显微镜及成像系统(德国Leica公司); 流式细胞仪(美国Beckman公司); 含有体积分数为5%CO₂培养箱(HF420)(力新仪器上海有限公司)。

1.3.3 实验试剂 0.25%胰蛋白酶溶液和胎牛血清(Hyclone公司);青链霉素合剂(Sigma公司);FITC标记的抗人CD105、CD29、CD45和CD34抗体(BD公司);表皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子(PeproTech公司);B27、DMEM/F12(Gibco公司);小鼠抗NF-M多克隆抗体(H, M, R)(Cell Signaling公司);小鼠抗GFAP多克隆抗体(BD公司);山羊抗小鼠IgG二抗(Alexa Flour 488)(Abcam公司);40 g/L多聚甲醛(上海生工公司);Hoechst33342、TritonX-100、全反式维甲酸(Sigma公司);体积分数为10%山羊血清(GIBCO公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 HUMSCs的分离培养 采集足月分娩的健康胎儿脐带,用0.1 mol/L PBS充分冲洗,去掉残留血液。采用组织块法培养^[23]:剔除脐带内动静脉血管(1根脐静脉,2根脐动脉),将剩余间质剪成大小约1 mm³的组织块,均匀地放置在盛有DMEM培养基的培养皿(55 mm)中,然后加入2 mL胎牛血清固定组织块。2 h后,按比例将含有青链霉素、维生素C、谷氨酰胺及碳酸氢钠的试剂约8 mL加入低糖DMEM培养基内,放置于37 °C,体积分数为5%CO₂培养箱中进行培养。间隔3 d给予半量换液,镜下观察贴壁组织块周围的细胞生长情况。当细胞生长达到80%~90%汇合度时,采用0.25%胰酶消化并传代,将组织块移至另一个新的培养皿中,按照上述方法继续进行培养。

1.4.2 流式细胞仪检测细胞表面分子标志物 收集第3代HUMSCs,经胰酶消化后离心(1 200 r/min×5 min)使细胞重悬,调整细胞浓度为1×10⁶ L⁻¹,分别加入各种流式抗体:CD105、CD29、CD34、CD45等,常温下孵育30 min,0.1 mol/L PBS冲洗数次后,将其与FITC标记(或PE)的二抗在避光条件下作用30 min, PBS充分洗涤后立即送检。

1.4.3 HUMSCs诱导分化为神经元样细胞 取第3代HUMSCs,以4 000/cm²接种在直径为3 cm的小皿内。按如下2种方法进行HUMSCs向神经元样细胞的诱导分化。

①诱导法一(前期实验的诱导方法):将2% B27、20 μg/L碱性成纤维细胞生长因子、20 μg/L表皮生长因子及青链霉素合剂加入DMEM/F12培养基中进行诱导,3 d后加入0.5 μmol/L全反式维甲酸,隔日换液,10 d后在光学显微镜下观察诱导分化后的细胞形态;②诱导法二(改良的诱导方法):将2% B27、20 μg/L碱性成纤维细胞生长因子、20 μg/L表皮生长因子、青链霉素合剂及体积分数为2%胎牛血清加入DMEM/F12培养基中进行诱导,6 d后用胰酶消化,以4 000/cm²传代,接种于直径为3 cm的共聚焦小皿内,次日用0.1 mol/L PBS清洗去除小皿内2% B27和胎牛血清,并加入浓度为0.5 μmol/L全反式维甲酸,隔日半量换液1次,14 d后在光学显微镜下观察诱导分化后的细胞形态。

1.5 主要观察指标 诱导分化后免疫荧光染色检测NF-M、GFAP的表达:使用40 g/L多聚甲醛对诱导分化后的细胞予以固定,山羊血清封闭,分别加入NF-M抗体(1:500)和GFAP抗体(1:500)并在4 °C下孵育过夜,0.1 mol/L PBS洗涤后加入山羊抗鼠二抗(1:100)于室温

孵育60 min,0.1 mol/L PBS洗涤后Hoechst33342(0.5 mg/L)复染细胞核,Leica倒置荧光显微镜观察,应用共聚焦显微镜进行拍照。重复实验至少3次以上,每次分别采集共聚焦图片15张(放大250倍),采用Image-Pro Plus6.0图像处理软件分别计算2种方法诱导后的阳性细胞百分数,以计量资料形式表示。2种方法分别设阴性对照(未加入NF-M及GFAP),应用免疫荧光法检测其细胞标志物NF-M、GFAP的表达。

1.6 统计学分析 应用SPSS 17.0软件进行统计分析,因资料不符合正态性,故采用秩和检验,检验水准 $\alpha=0.05$, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 HUMSCs形态 原代培养第3天,倒置荧光显微镜观察可见组织块外周有散在的细胞游出。培养第5~7天,大量细胞由组织块中爬出,贴在皿底,呈长梭状,类似于成纤维细胞,汇聚后细胞排列紧密,呈群落样生长,聚合的细胞呈漩涡状。组织块法培养原代细胞达90%~95%融合的时间为14~16 d,可进行传代培养,见图1。传代数小时后HUMSCs快速贴壁,3~5 d后细胞可再次达到80%~90%的汇合度。经过数代培养后,细胞形状无明显变化,增殖能力无明显变化。

2.2 HUMSCs表型鉴定结果 流式细胞仪检测结果显示CD34、CD45表达为阴性,而CD29和CD105表达为阳性(阳性率分别为35.3%和95.9%),符合HUMSCs的特征性标记物表达,见图2,提示组织块法培养可获得HUMSCs。

2.3 诱导HUMSCs分化为神经元样细胞 HUMSCs通过2种方法诱导后均可分化成为神经元样细胞,部分细胞形态发生变化、胞体收缩形成突起呈星形,细胞之间网状连接,形态与神经元或神经胶质细胞近似。细胞生长状态良好,可存活时间较长,改良方案诱导分化后的细胞形态学变化尤为明显,细胞之间相互联系的神经微丝结构明显增多,明显优于前期实验的诱导方法,见图3。

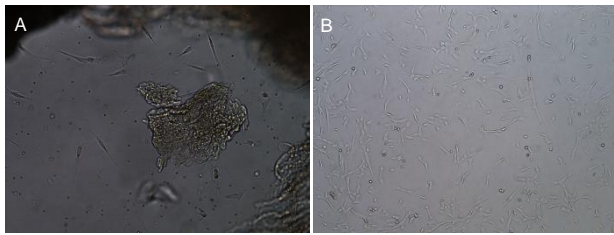
2.4 免疫荧光染色检测诱导分化后细胞NF-M、GFAP的表达 免疫荧光染色提示HUMSCs用2种方法诱导后均可见NF-M和GFAP呈阳性表达,表明诱导分化后的细胞具有神经细胞的功能活性,见图4、5。

2.5 免疫荧光定量NF-M与GFAP阳性表达 传统方法组NF-M和GFAP的阳性表达率分别为18.73%和18.01%;改良方法组NF-M和GFAP的阳性表达率分别为27.48%和29.24%,后者明显优于前者,差异有显著性意义($P < 0.05$),见表1。

表1 免疫荧光定量NF-M与GFAP阳性表达率 (%)
Table 1 Immunofluorescence quantification of positive rate of neurofilament protein and glial fibrillary acidic protein

检测指标	样本量	传统方法	改良方法	Z值	P值
NF-M	45	18.73(16.23, 19.89)	27.48(24.57, 27.87)	-2.02	0.04
GFAP	45	18.01(14.56, 21.64)	29.24(24.24, 29.46)	-2.02	0.04

表注: NF-M: 神经丝蛋白; GFAP: 胶质纤维酸性蛋白。



图注: 图中 A 为培养 5 d, 原代细胞从组织块中迁移出; B 为培养 10 d, 可见逐渐增多的贴壁细胞。

图 1 组织块法获得的原代人脐带间充质干细胞(x20)

Figure 1 Morphology of primary human umbilical cord mesenchymal stem cells obtained by tissue explant method (x20)

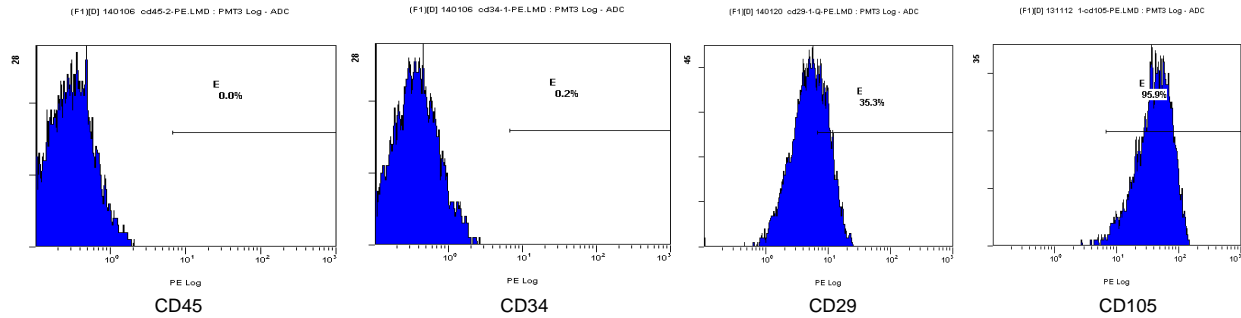
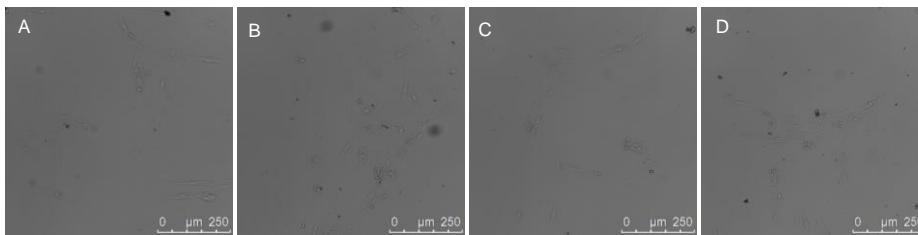


图 2 流式细胞仪鉴定第 3 代人脐带间充质干细胞的表面标记物

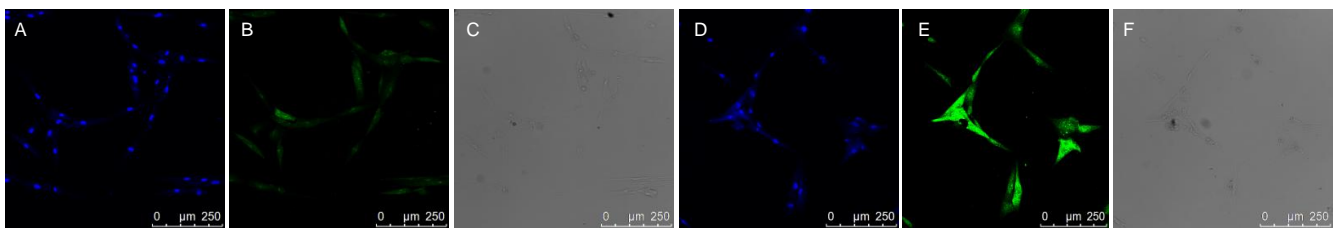
Figure 2 Surface markers of the third-generation human umbilical cord mesenchymal stem cells identified by flow cytometry



图注: 图中 A, B 为传统方法诱导下细胞的形态变化, 细胞呈短梭形, 漩涡状密集生长, 有较少细胞形成神经微丝结构; C, D 为改良方法诱导下细胞的形态变化, 细胞呈长梭形, 有较多细胞形成较长的神经微丝, 并可形成网状结构。

图 3 激光共聚焦显微镜下的细胞形态变化(神经微丝结构变化)

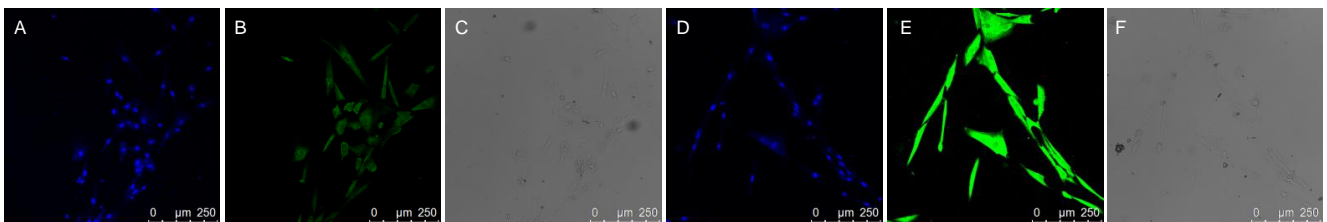
Figure 3 Changes in cell morphology (neurofilament structure) under laser scanning confocal microscope



图注: 图中 A 为传统方法诱导 10 d 后 Hoechst33342 染色细胞核标记为蓝色; B 为免疫荧光显示神经丝蛋白阳性表达; C 为普通镜下诱导分化后的细胞形态; D 为改良方法诱导 14 d 后 Hoechst33342 染色细胞核标记为蓝色; E 为免疫荧光显示神经丝蛋白阳性表达; F 为普通镜下诱导分化后的细胞形态。

图 4 免疫荧光染色检测 2 种方法诱导分化后细胞神经丝蛋白的表达

Figure 4 Immunofluorescence detection of neurofilament protein in the differentiated cells induced by two methods



图注: 图中 A 为传统方法诱导 10 d 后 Hoechst33342 染色细胞核标记为蓝色; B 为免疫荧光显示胶质纤维酸性蛋白阳性表达; C 为普通镜下诱导分化后的细胞形态; D 为改良方法诱导 14 d 后 Hoechst33342 染色细胞核标记为蓝色; E 为免疫荧光显示胶质纤维酸性蛋白阳性表达; F 为普通镜下诱导分化后的细胞形态。

图 5 免疫荧光染色检测 2 种方法诱导分化后细胞胶质纤维酸性蛋白的表达

Figure 5 Immunofluorescence detection of glial fibrillary acidic protein in the differentiated cells induced by two methods

3 讨论 Discussion

HUMSCs最早由McElreavey等^[24]于1991年在脐带华尔通氏胶的黏液结缔组织中分离获得,因其培养取材方便、免疫原性低,并且在体外有较强的自我增殖与多向分化潜能等特点,已经成为种子细胞的理想来源,其在细胞移植、组织工程材料、基因靶向治疗等方面具有广泛的临床应用价值^[17]。

间充质干细胞的分离方法有贴壁培养法、胰酶或胶原酶消化法、免疫磁珠法、流式细胞仪分选法、密度梯度离心法等多种,但目前尚无一种完美的方法,通常需要多种方法结合起来。课题组前期采用组织块法和胰酶冷消化法体外培养HUMSCs进行实验研究,结果表明组织块法培养出的HUMSCs形态保持良好的长梭形,而且增殖率快,可作为获取充足数量干细胞的理想培养方法^[23]。考虑到胰酶或胶原酶消化法容易对细胞造成损伤,流式细胞仪分选法成本高、操作复杂、实验条件要求高,此次研究中HUMSCs的培养仍采用成本低廉、操作简单、对细胞损伤小的组织块贴壁培养法。该研究对组织块法分离培养的HUMSCs表面标志物进行流式细胞仪检测,结果表明CD29、CD105高表达(分别为35.3%和95.9%,且CD105表达大于95%),而CD34、CD45低表达,故其具有干细胞的显著特征;课题组前期实验将HUMSCs培养传代数次后观察其仍具有很强的增殖能力,并通过EdU标记证实其具有增殖功能活性^[25],这与既往报道的骨髓间充质干细胞、脂肪间充质干细胞及胎盘间充质干细胞的生物学特性相似^[26-28]。

近年来,间充质干细胞在骨、软骨、脊髓损伤及多发性硬化、克罗恩病等疾病的临床研究中愈来愈受重视^[29],目前HUMSCs已用于临床2型糖尿病^[30]、重度收缩性心力衰竭等疾病的治疗^[31]。干细胞对神经系统损伤和修复一直是临床关注的焦点^[19-22],研究发现间充质干细胞能分泌多种免疫调节因子和神经营养因子,可促进受损部位的神经再生,安全有效地改善了神经系统疾病的预后,其临床疗效已在脑瘫、帕金森病、脊髓变性疾病、脑血管疾病等临床试验中得到验证^[32]。目前认为HUMSCs修复外周神经系统受损的关键机制为其旁分泌作用^[33],也有学者认为HUMSCs可以通过白细胞介素8介导的分泌机制促进受损的神经功能恢复^[34]。

当前,体外诱导HUMSCs向神经元样细胞分化的方式包括化学法、中药、神经营养因子法、共培养法,还有学者利用脑脊液等进行诱导分化的方法^[35]。化学因子诱导的细胞存活时间短^[36],且其诱导的神经元样细胞的特征性形态学变化表明其具有细胞毒性作用,可能不适用体内移植。中药可诱导HUMSCs分化为神经元样细胞,但是中药发挥诱导分化的作用机制尚需更近一步研究。而神经营养因子诱导剂为生物制剂,对细胞损伤小,安全性相对较高,为目前广泛应用的经典诱导方法。

基于前期HUMSCs培养及其生物学特性观察的实验研究基础^[23-25],该实验采用同样的诱导剂,2种不同的诱导方法将HUMSCs向神经元样细胞诱导分化,并对2种诱导方法进行了评价和比较。作者经过多次重复实验证实了2

种方法诱导后细胞的形态均呈神经细胞样改变,免疫荧光化学检测NF-M及GFAP均呈阳性表达,同时,在进行NF-M及GFAP免疫荧光染色时分别设置了PBS阴性对照组,除免疫荧光假阳性的可能,故实验证实了HUMSCs具有向神经元样细胞分化的潜能。通过镜下观察及统计学分析发现改良方法的细胞形态改变及神经细胞标志物(NF-M和GFAP)的阳性率明显优于传统方法,故改良方法是对前期诱导方法的有效改良。此结论可为后续HUMSCs向神经元样细胞诱导分化提供理论支持。

该实验2种诱导方法的主要不同之处在于改良方法的试剂中含有体积分数为2%的胎牛血清以及2种诱导法应用B27的时间长短不同。改良方法中体积分数为2%的胎牛血清在实验早期有助于促进细胞贴壁生长,为HUMSCs向神经元样细胞分化提供了充足的营养物质,在7 d后及时去除胎牛血清,B27又可以减缓细胞生长,避免细胞生长过快、浓度过大而影响干细胞向神经元样细胞分化过程中的形态变化及免疫荧光染色效果。传统方法的试剂中虽然不含体积分数为2%的胎牛血清但含有B27,且在其诱导后期继续应用B27总共诱导了10 d,其诱导后的细胞生长旺盛,但呈神经细胞样形态变化的细胞较少,免疫荧光染色中NF-M和GFAP的阳性表达率也较低。孙丽等^[37]采用丹参联合生长因子诱导HUMSCs向神经元样细胞分化后的GFAP阳性表达率为(25.6±2.6)%,与此实验结果类似,但其未检测NF-M;郜元军等^[38]比较了胶质细胞神经营养因子联合胎肠培养基,维甲酸、ZnSO₄联合胎肠培养基诱导大鼠基质干细胞分化为肠神经细胞的效率,2种诱导法NF-M的阳性表达率分别为(75.6±8.4)%和(48.5±7.5)%,而GFAP均为阴性表达。郜元军实验中NF-M的阳性率高于此次实验研究,考虑与两者的实验对象、所用的诱导方法及试剂不同有关。此次实验过程中传统诱导方法在第10天左右细胞形态最佳,此后出现大量细胞凋亡现象;而改良诱导方法在第14天左右细胞形态最佳,仅出现少量细胞凋亡现象,所以传统诱导法的周期设定为10 d,而改良诱导方法为14 d,两者没能达到统一的诱导时间。

实验结果验证了HUMSCs可分化为神经元样细胞,作者通过对前期的诱导方法进行改良,明显提高了HUMSCs向神经元样细胞诱导分化的效率,为后续实验研究提供了有力的保障。但是研究也存在不足之处有待改进,目前常用神经标志物有神经特异性烯醇化酶、NF-M、GFAP、β微管蛋白III、微管相关蛋白等。该研究为系列探索性实验研究,前期实验检测了神经干细胞特异性标志蛋白nestin,此次研究仅选用了神经标志物NF-M和GFAP作为检测指标,说服力仍显不足,后续研究中课题组还将进一步检测微管相关蛋白、β微管蛋白III等神经标志物以验证实验结果。

致谢: 感谢新疆医科大学第一附属医院干细胞室及分子生物学实验室提供技术支持与帮助。

作者贡献: 实验设计为王武、齐保军及武忠炎,实验实施为王武、齐保军,资料收集和实验评估为王武、齐保军、崔泳。王武、齐保军成文,崔泳审核,王武、齐保军和崔泳对文章负责。

经费支持: 该文章接受了“新疆维吾尔自治区自然科学基金项目

(2016D01C239)”的资助。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: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 该研究的实施符合新疆医科大学第五附属医院的相关伦理要求(医院伦理批件号: LLI 审见[2015]285 号)。

知情同意问题: 足月健康新生儿脐带组织取自新疆医科大学第五附属医院妇产科, 产妇及家属均知情同意。

写作指南: 该研究遵守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: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经通过新疆医科大学第一附属医院统计教研室生物统计学专家审核。

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 4.0”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] Pop DM, SorîȚău O, Şuşman S, et al. Potential of placental-derived human mesenchymal stem cells for osteogenesis and neurogenesis. *Rom J Morphol Embryol*. 2015;56(3):989-996.
- [2] Nitkin CR, Bonfield TL. Concise Review: Mesenchymal Stem Cell Therapy for Pediatric Disease: Perspectives on Success and Potential Improvements. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(2):539-565.
- [3] Nekanti U, Mohanty L, Venugopal P, et al. Optimization and scale-up of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells for clinical applications. *Stem Cell Res*. 2010;5(3):244-254.
- [4] Gao F, Chiu SM, Motan DA, et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death Dis*. 2016;7:e2062.
- [5] Du WJ, Chi Y, Yang ZX, et al. Heterogeneity of proangiogenic features in mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, umbilical cord, and placenta. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7(1):163.
- [6] Antunes MA, Laffey JG, Pelosi P, et al. Mesenchymal stem cell trials for pulmonary diseases. *J Cell Biochem*. 2014;115(6):1023-1032.
- [7] Latifpour M, Shakiba Y, Amidi F, et al. Differentiation of human umbilical cord matrix-derived mesenchymal stem cells into germ-like cells. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2014;6(4):218-227.
- [8] Tao R, Sun TJ, Han YQ, et al. Epimorphin-induced differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into sweat gland cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014;18(9):1404-1410.
- [9] Li W, Ye B, Cai XY, et al. Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into prostate-like epithelial cells in vivo. *PLoS One*. 2014;9(7):e102657.
- [10] Bai J, Hu Y, Wang YR, et al. Comparison of human amniotic fluid-derived and umbilical cord Wharton's Jelly-derived mesenchymal stromal cells: Characterization and myocardial differentiation capacity. *J Geriatr Cardiol*. 2012;9(2):166-171.
- [11] Hu Y, Liang J, Cui H, et al. Wharton's jelly mesenchymal stem cells differentiate into retinal progenitor cells. *Neural Regen Res*. 2013; 8(19):1783-1792.
- [12] Hang H, Yu Y, Wu N, et al. Induction of highly functional hepatocytes from human umbilical cord mesenchymal stem cells by HNF4 α transduction. *PLoS One*. 2014;9(8):e104133.
- [13] Qu H, Liu X, Ni Y, et al. Laminin 411 acts as a potent inducer of umbilical cord mesenchymal stem cell differentiation into insulin-producing cells. *J Transl Med*. 2014;12:135.
- [14] Doan CC, Le TL, Hoang NS, et al. Differentiation of umbilical cord lining membrane-derived mesenchymal stem cells into endothelial-like cells. *Iran Biomed J*. 2014;18(2):67-75.
- [15] Paldino E, Cenciarelli C, Giampaolo A, et al. Induction of dopaminergic neurons from human Wharton's jelly mesenchymal stem cell by forskolin. *J Cell Physiol*. 2014;229(2):232-244.
- [16] Alves da Silva ML, Costa-Pinto AR, Martins A, et al. Conditioned medium as a strategy for human stem cells chondrogenic differentiation. *J Tissue Eng Regen Med*. 2015;9(6):714-723.
- [17] Ali H, Al-Yatama MK, Abu-Farha M, et al. Multi-lineage differentiation of human umbilical cord Wharton's Jelly Mesenchymal Stromal Cells mediates changes in the expression profile of stemness markers. *PLoS One*. 2015;10(4):e0122465.
- [18] Bárçia RN, Santos JM, Filipe M, et al. What Makes Umbilical Cord Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells Superior Immunomodulators When Compared to Bone Marrow Derived Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells Int*. 2015;2015:583984.
- [19] Hu SL, Luo HS, Li JT, et al. Functional recovery in acute traumatic spinal cord injury after transplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Crit Care Med*. 2010;38(11):2181-2189.
- [20] Pang KM, Sung MA, Alrash-dan MS, et al. Tans-plantation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord versus human umbilical cord blood for peripheral nerve regeneration. *Neural Regen Res*. 2010;5(11):838-845.
- [21] Cheng H, Liu X, Hua R, et al. Clinical observation of umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in treatment for sequelae of thoracolumbar spinal cord injury. *J Transl Med*. 2014;12:253.
- [22] Chen J, Venkat P, Zacharek A, et al. Neurorestorative therapy for stroke. *Front Hum Neurosci*. 2014;8:382.
- [23] 张飞, 王一雄, 武忠炎, 等. 人脐带间充质干细胞生物特性比较: 胰酶冷消化和组织块体外培养[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(41):6614-6619.
- [24] McElreavey KD, Irvine AI, Ennis KT, et al. Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. *Biochem Soc Trans*. 1991;19(1):29S.
- [25] 王武, 张飞, 李贵才, 等. 以 EdU 体外标记人脐带间充质干细胞: 5, 10 μ mol/L 是其最适浓度[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(32):5167-5171.
- [26] Ianus A, Holz GG, Theise ND, et al. In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest*. 2003;111(6):843-850.
- [27] Ra JC, Shin IS, Kim SH, et al. Safety of intravenous infusion of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in animals and humans. *Stem Cells Dev*. 2011;20(8):1297-1308.
- [28] Nazarov I, Lee JW, Soupene E, et al. Multipotent stromal stem cells from human placenta demonstrate high therapeutic potential. *Stem Cells Transl Med*. 2012;1(5):359-372.
- [29] Rohban R, Pieber TR. Mesenchymal Stem and Progenitor Cells in Regeneration: Tissue Specificity and Regenerative Potential. *Stem Cells Int*. 2017;2017:5173732.
- [30] Guan LX, Guan H, Li HB, et al. Therapeutic efficacy of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in patients with type 2 diabetes. *Exp Ther Med*. 2015;9(5):1623-1630.
- [31] Zhao XF, Xu Y, Zhu ZY, et al. Clinical observation of umbilical cord mesenchymal stem cell treatment of severe systolic heart failure. *Genet Mol Res*. 2015;14(2):3010-3017.
- [32] D'souza N, Rossignoli F, Golinelli G, et al. Mesenchymal stem/stromal cells as a delivery platform in cell and gene therapies. *BMC Med*. 2015;13:186.
- [33] Hendijani F, Sadeghi-Aliabadi H, Haghjooy Javanmard S. Comparison of human mesenchymal stem cells isolated by explant culture method from entire umbilical cord and Wharton's jelly matrix. *Cell Tissue Bank*. 2014;15(4):555-565.
- [34] Zhou X, Gu J, Gu Y, et al. Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells Improve Learning and Memory Function in Hypoxic-Ischemic Brain-Damaged Rats via an IL-8-Mediated Secretion Mechanism Rather than Differentiation Pattern Induction. *Cell Physiol Biochem*. 2015;35(6):2383-2401.
- [35] Álvarez D, Levine M, Rojas M. Regenerative medicine in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: current position. *Stem Cells Cloning*. 2015;8:61-65.
- [36] Rismanchi N, Floyd CL, Berman RF, et al. Cell death and long-term maintenance of neuron-like state after differentiation of rat bone marrow stromal cells: a comparison of protocols. *Brain Res*. 2003;991(1-2):46-55.
- [37] 孙丽, 于丽, 张华芳, 等. 人脐带间充质干细胞的富集及向神经细胞的诱导分化[J]. 神经解剖杂志, 2011, 27(2):185-190.
- [38] 郜元军, 钱伟, 汪涉海, 等. 大鼠骨髓基质干细胞诱导分化为肠神经细胞的体外研究[J]. 中华消化杂志, 2006, 26(10):661-665.