

## 纤维连接蛋白对人神经干细胞诱导分化为少突胶质前体细胞的影响

汪兆艳, 王倩, 刘卫鹏, 杨辉, 栾佐, 屈素清

<https://doi.org/10.12307/2025.693>

投稿日期: 2024-06-21

采用日期: 2024-08-21

修回日期: 2024-10-09

在线日期: 2024-10-23

中图分类号:

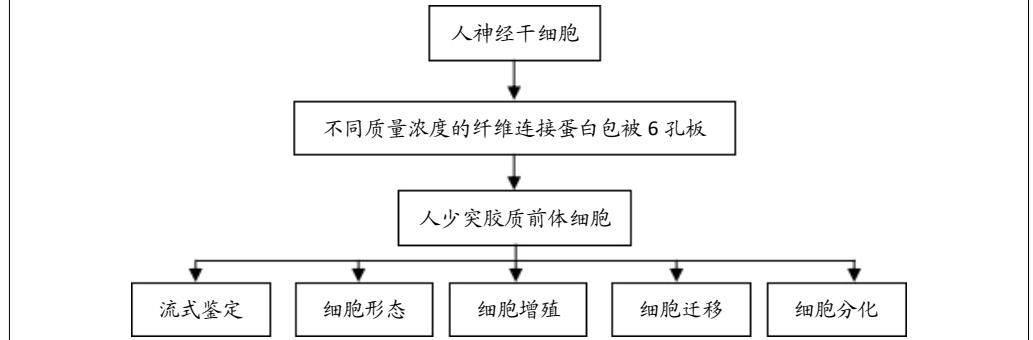
R459.9; R318; R322.8

文章编号:

2095-4344(2025)31-06661-06

文献标识码: A

文章快速阅读: 纤维连接蛋白对人神经干细胞来源少突胶质前体细胞生物学特性的影响



文题释义:

**少突胶质前体细胞:** 是组成中枢神经系统最重要的细胞之一, 不仅可以分化为成熟的少突胶质细胞包绕神经元轴突形成髓鞘, 发挥轴突保护作用, 还可以与神经元建立突触连接, 调控神经活动, 目前主要用于治疗脑白质损伤引起的脱髓鞘疾病研究。

**神经干细胞:** 是指存在于中枢神经系统中能自我更新并分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的多潜能细胞, 神经干细胞在神经发育和神经损伤修复中发挥重要作用。通过神经干细胞移植可以重建神经环路和功能, 是修复和替代受损脑组织的有效方法。

摘要

**背景:** 少突胶质前体细胞是治疗脑白质损伤性疾病的种子细胞, 建立高效稳定扩增的体外诱导分化方法是实现临床转化研究的重要前提。

**目的:** 探讨纤维连接蛋白对人神经干细胞来源少突胶质前体细胞增殖、迁移和分化等生物学特性的影响。

**方法:** 将悬浮培养的人神经干细胞用Accutase消化成单细胞, 通过流式细胞术检测特异性标志物Nestin、Sox2、Vimentin、CD133、Musashi的表达。然后将人神经干细胞单细胞重悬于少突胶质前体细胞培养基, 接种于不同质量浓度纤维连接蛋白(0, 1, 2.5, 5, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )包被的6孔板中, 培养7 d后Accutase消化进行传代, 锥虫蓝染色计数细胞, 选择扩增能力最强的纤维连接蛋白包被与未用纤维连接蛋白包被的少突胶质前体细胞进行下一步实验, Transwell小室检测细胞迁移能力, 流式细胞术检测Olig2、Sox10、PDGFR- $\alpha$ 的表达。将少突胶质前体细胞向少突胶质细胞诱导分化3周, 免疫荧光染色检测分化细胞Galc的表达。

**结果与结论:** ①人神经干细胞呈悬浮球状生长, 流式细胞术检测结果显示, 人神经干细胞高表达Nestin、Sox2、Vimentin、CD133和Musashi; ②由人神经干细胞诱导的少突胶质前体细胞的胞体为圆形或椭圆形, 折光性强, 有双极或三级突起结构; 与0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 纤维连接蛋白包被组比较, 2.5, 5, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 纤维连接蛋白包被组少突胶质前体细胞的扩增能力显著增强( $P < 0.05$ ); 当纤维连接蛋白质量浓度为10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 少突胶质前体细胞扩增能力最强; ③流式细胞术检测结果显示0, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 纤维连接蛋白包被组均高表达少突胶质前体细胞标志物Olig2、Sox10和PDGFR- $\alpha$ , 两组无统计学差异( $P > 0.05$ ); ④Transwell小室检测结果显示, 与0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 纤维连接蛋白包被组比较, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 纤维连接蛋白包被组少突胶质前体细胞的迁移能力增加( $P < 0.01$ ); ⑤少突胶质前体细胞向少突胶质细胞分化3周, 细胞呈多分支、网格状或膜片样复杂形态, 免疫荧光染色结果显示两组少突胶质细胞Galc阳性率无统计学差异( $P > 0.05$ )。结果表明, 纤维连接蛋白质量浓度为10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对少突胶质前体细胞的增殖和迁移作用最强, 但不影响少突胶质前体细胞特异性标志物Olig2、Sox10和PDGFR- $\alpha$ 的表达及其向少突胶质细胞的分化。

**关键词:** 纤维连接蛋白; 神经干细胞; 少突胶质前体细胞; 少突胶质细胞; 细胞增殖; 细胞分化; 工程化干细胞; 工程化细胞

## Effect of fibronectin on differentiation of human neural stem cells into oligodendrocyte precursor cells

Wang Zhaoyan, Wang Qian, Liu Weipeng, Yang Hui, Luan Zuo, Qu Suqing

Department of Pediatrics, Sixth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100048, China

Wang Zhaoyan, MS, Associate chief technician, Department of Pediatrics, Sixth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100048, China

**Corresponding author:** Qu Suqing, MS, Chief physician, Department of Pediatrics, Sixth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100048, China

Abstract

**BACKGROUND:** Oligodendrocyte precursor cells are seed cells for the treatment of white matter damage diseases. Establishing an efficient and stable *in vitro* differentiation method is an important prerequisite for clinical translational research.

**OBJECTIVE:** To investigate the effect of fibronectin on biological characteristics such as proliferation, migration, and differentiation of oligodendrocyte precursor cells derived from human neural stem cells.

中国人民解放军总医院第六医学中心儿科, 北京市 100048

第一作者: 汪兆艳, 女, 1981年生, 吉林省桦甸市人, 汉族, 2006年北华大学毕业, 硕士, 副主任技师, 主要从事干细胞转化研究。

通讯作者: 屈素清, 硕士, 主任医师, 中国人民解放军总医院第六医学中心儿科, 北京市 100048

<https://orcid.org/0000-0002-4255-5042>(汪兆艳); <https://orcid.org/0009-0001-4373-398X>(屈素清)

引用本文: 汪兆艳, 王倩, 刘卫鹏, 杨辉, 栾佐, 屈素清. 纤维连接蛋白对人神经干细胞诱导分化为少突胶质前体细胞的影响 [J].

中国组织工程研究, 2025, 29(31):6661-6666.



**METHODS:** Human neural stem cells cultured in suspension were digested into single cells using Accutase. The expression of specific markers Nestin, Sox2, Vimentin, CD133, and Musashi was detected by flow cytometry. The single cells of human neural stem cells were resuspended in oligodendrocyte precursor cell medium and seeded in six-well plates coated with different concentrations of fibronectin (0, 1, 2.5, 5, and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Accutase digestion was performed after 7 days of culture. Cells were counted by trypan staining. Fibronectin-coated group with the strongest amplification ability and the oligodendrocyte precursor cells without fibronectin-coated group were selected for further tests. The migration ability of the two groups of cells was detected by Transwell. Flow cytometry was used to detect the expression of Olig2, Sox10, and PDGFR- $\alpha$ . Oligodendrocyte precursor cells were induced to differentiate into oligodendrocytes for 3 weeks, and the expression of Galc in differentiated cells was detected by immunofluorescence staining.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) Human neural stem cells grew in suspension spheres. Flow cytometry showed that human neural stem cells highly expressed Nestin, Sox2, Vimentin, CD133, and Musashi. (2) The cell bodies of oligodendrocyte precursor cells induced by human neural stem cells were round or oval, with strong refractive nature and bipolar or tertiary protrusions. Compared with the 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  fibronectin coating group, there was a significant difference in the amplification ability of oligodendrocyte precursor cells in the 2.5, 5, and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  fibronectin coating groups ( $P < 0.05$ ). The amplification ability of oligodendrocyte precursor cells was the strongest when the fibronectin concentration was 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . (3) Flow cytometry results showed that the oligodendrocyte precursor cell markers Olig2, Sox10, and PDGFR- $\alpha$  were highly expressed in the 0 and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  fibronectin coating groups, and there was no significant difference between the two groups ( $P > 0.05$ ). (4) Transwell chamber assay results showed that compared with the 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  fibronectin-coated group, the migration ability of oligodendrocyte precursor cells in the 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  fibronectin-coated group was increased ( $P < 0.01$ ). (5) After 3 weeks of differentiation into oligodendrocytes, oligodendrocyte precursor cells showed complex morphology with multiple branches, grids or membrane sheets. Immunofluorescence staining results showed that there was no statistical difference in the Galc positive rate of oligodendrocytes between the two groups ( $P > 0.05$ ). These findings indicate that when the concentration of fibronectin coated well plate is 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , the proliferation and migration of oligodendrocyte precursor cells are the strongest, but it does not affect the expression of oligodendrocyte precursor cells-specific markers Olig2, Sox10, and PDGFR- $\alpha$  and their differentiation into oligodendrocytes.

**Key words:** fibronectin; neural stem cell; oligodendrocyte precursor cell; oligodendrocyte; cell proliferation; cell differentiation; engineered stem cell; engineered cell

**How to cite this article:** WANG ZY, WANG Q, LIU WP, YANG H, LUAN Z, QU SQ. Effect of fibronectin on differentiation of human neural stem cells into oligodendrocyte precursor cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2025;29(31):6661-6666.

## 0 引言 Introduction

少突胶质细胞是中枢神经系统髓鞘形成细胞，为神经元轴突提供营养支持并增加动作电位传播速度，其功能障碍与脱髓鞘疾病密切相关<sup>[1]</sup>。少突胶质细胞是由少突胶质前体细胞分化形成的<sup>[2]</sup>。少突胶质前体细胞的发育和功能受到细胞外基质等多种分子的严格调控。纤维连接蛋白是存在于体液和组织中的高分子糖蛋白，是细胞外基质的重要组成部分。纤维连接蛋白通过与细胞膜上的整合素受体结合促进细胞的迁移、增殖和分化<sup>[3]</sup>。有研究通过对比纤维连接蛋白、层粘连蛋白和基质胶3种细胞外基质对大鼠脊髓来源少突胶质前体细胞存活、增殖、迁移和纯度的影响，结果发现纤维连接蛋白促进少突胶质前体细胞存活和增殖的作用最强<sup>[4]</sup>，这表明纤维连接蛋白是少突胶质前体细胞体外生长的较好底物。

课题组前期将神经干细胞成功诱导分化为少突胶质前体细胞<sup>[5]</sup>，但仍存在一些问题，例如人少突胶质前体细胞的增殖能力和诱导稳定性还有待进一步提升。该研究在神经干细胞向少突胶质前体细胞诱导分化过程中使用纤维连接蛋白包被6孔板，获得了增殖能力强、可以稳定扩增的少突胶质前体细胞，对其迁移能力、表面标志物以及分化能力进行鉴定，为少突胶质前体细胞的进一步临床转化奠定了基础。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外实验研究。

1.2 时间及地点 实验于2023年6-12月在中国人民解放军总医院第六医学中心儿科实验室完成。

1.3 材料 表皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、

白血病抑制因子、血小板源性生长因子AA、神经营养因子3购自Peprotech公司；纤维连接蛋白购自Gibco公司；层粘连蛋白购自Sigma公司；B27、N2添加剂、DMEM/F12培养基、Accutase消化酶购自Gibco公司；PDGFR- $\alpha$ -BV421、A2B5-PE流式抗体购自Miltenyi Biotec公司；Sox10-FITC流式抗体购自NOVUS Biologicals公司；Olig2、Galc免疫荧光抗体购自Miltenyi Biotec公司；Transwell迁移小室购自Corning公司；CCK-8细胞活性检测试剂盒购自北京同仁化学公司；少突胶质细胞分化培养基购自Sciencell公司；电动移液枪购自Eppendorf公司；倒置光学显微镜、荧光显微镜购自Olympus公司；CO<sub>2</sub>培养箱购自SANYO公司。

### 1.4 实验方法

1.4.1 人神经干细胞的培养 人神经干细胞来源于课题组建立的NSC-9细胞系。从液氮罐中取出冻存的第8代神经干细胞，37.5℃水浴锅中快速解冻细胞，1 mL移液枪吸取细胞悬液逐滴加入含有DMEM/F12培养基的离心管中，400 $\times$ g离心5 min，彻底吸弃上清，轻弹混匀细胞沉淀，加入神经干细胞完全培养基(DMEM/F12+1% N2+2% B27+20 ng/mL表皮生长因子+20 ng/mL碱性成纤维细胞生长因子+10 ng/mL白血病抑制因子+1%谷氨酰胺)重悬细胞，将细胞悬液转移至T75培养瓶中静止培养。培养7 d，收集神经干细胞球至50 mL离心管，400 $\times$ g离心5 min，彻底弃掉上清，每管加1 mL Accutase酶消化细胞，37℃培养箱中共孵育10 min，间隔5 min轻轻混匀细胞，用1 mL蓝枪头轻柔吹打神经球至均匀的单细胞悬液，立即加入3倍体积的DMEM/F12培养基终止消化，500 $\times$ g离心5 min，弃掉上清后用神经干细胞完全培养基重悬细胞，

连续传代至第 10 代的人神经干细胞经流式细胞术和免疫荧光染色鉴定, 然后诱导分化为少突胶质前体细胞。

#### 1.4.2 人神经干细胞诱导分化为少突胶质前体细胞

(1) 纤维连接蛋白配置: 5 mg 纤维连接蛋白粉剂加 5 mL 无菌 PBS 37 °C 孵育 45 min, 配成 1 mg/mL 储存液, 稀释纤维连接蛋白为以下几个质量浓度: 10, 5, 2.5, 1, 0 μg/mL, 6 孔板每孔加 1 mL 配好的纤维连接蛋白溶液, 晃动培养板混匀液体后放置 37 °C 培养箱中孵育 45 min, 接种细胞前彻底吸弃包被液。

(2) 人神经干细胞诱导分化为少突胶质前体细胞: 消化成单细胞的第 10 代神经干细胞, 用 DMEM/F12 培养基离心洗涤后重悬于自配的少突胶质前体细胞完全培养基 (主要成分为 DMEM/F12 基础培养基添加 N2、B27、碱性成纤维生长因子和血小板源性生长因子等细胞因子), 按照  $2 \times 10^4/\text{cm}^2$  密度接种于事先包被的 6 孔板中, 培养 7 d, 细胞生长至 80%–90% 融合度时, 每孔加 1 mL Accutase 消化液, 当细胞完全脱离孔板底部时, 每孔立即加入 2.5 mL DMEM/F12 培养基终止消化。

1.4.3 少突胶质前体细胞增殖能力检测 诱导分化第 7 天, 取出 6 孔板中的细胞, 在显微镜下观察各组细胞形态和生长密度, Accutase 消化细胞后锥虫蓝染色计数各组细胞数量, 选择增殖能力最佳的一组少突胶质前体细胞与对照组 (0 μg/mL 纤维连接蛋白) 少突胶质前体细胞连续传代至第 3 代进行后续迁移、特异性标志物鉴定和少突胶质细胞分化实验。

1.4.4 Transwell 小室检测少突胶质前体细胞迁移能力 Transwell 小室放入 24 孔培养板中, 上、下室分别加 0.1 mL 和 0.5 mL 纤维连接蛋白 (10 μg/mL) 37 °C 放置 45 min, 对照组加等量的 PBS, 吸弃上、下室的液体, 下室加 0.5 mL 少突胶质前体细胞完全培养基, 上室加重悬于 0.1 mL 少突胶质前体细胞完全培养基的细胞  $2 \times 10^4$  个, 置于培养箱中放置 18 h。取出小室并吸弃上室内的液体, 用湿润的棉签擦拭上室底面残留的少突胶质前体细胞, 然后将小室置于 40 g/L 多聚甲醛中室温固定 10 min, PBS 洗 3 次, DAPI 染色 5 min, 荧光显微镜下观察细胞并拍照, Image J 软件分析少突胶质前体细胞迁移率。

1.4.5 流式细胞术检测少突胶质前体细胞特异性标志物 将第 3 代少突胶质前体细胞消化成单细胞, 按照流式抗体说明书进行流式检测。流式检测操作方法为: 每个流式管加细胞  $1 \times 10^6$  个, 离心弃掉上清, 每管加 0.25 mL 固定液, 4 °C 避光放置 30 min, 清洗细胞, 每管加 1 mL 破膜剂, 4 °C 避光放置 30 min 后清洗细胞 (表面抗体不用破膜), 每管加 FC 封闭液室温孵育 10 min; 按照每种抗体的操作说明分别加入同型抗体和靶标抗体。

少突胶质前体细胞流式检测指标为: Sox10、PDGFR-α、Olig2, 其中 Olig2 为间标抗体, 标记方法同免疫荧光染色法, 每管加入抗体后 4 °C 孵育 30 min, 加 1 mL Buffer 洗涤细胞, 2 000 r/min 离心 5 min 彻底弃掉上清, 每管加 0.5 mL PBS 重悬细胞后上机检测。使用 FlowJo 软件 v10(FlowJo, Ashland, OR, USA) 对数据进行分析。

#### 1.4.6 少突胶质前体细胞分化为少突胶质细胞

(1) 包被孔板: 24 孔板每孔加 0.2 mL 100 μg/mL 多聚 L-鸟氨酸氢溴酸盐, 培养箱中孵育 4 h, 彻底吸弃多聚 L-鸟氨酸氢溴酸盐, 每孔加 0.2 mL 10 μg/mL 层粘连蛋白置于培养箱中孵育过夜, 接种细胞前彻底吸弃包被液。

(2) 少突胶质前体细胞分化为少突胶质细胞: 消化成单细胞的第 3 代少突胶质前体细胞重悬于少突胶质细胞分化培养基, 调整细胞浓度为  $2 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ , 每孔加 1.0 mL 细胞悬液于包被好的 24 孔板中, 间隔 3 d 半量换液, 每次换液前显微镜下观察细胞形态变化, 连续分化 3 周, 当显微镜下观察到分化细胞呈复杂的多级或网格状, 部分细胞出现膜片状, 进行免疫荧光染色鉴定。

1.4.7 少突胶质细胞免疫荧光染色鉴定 40 g/L 多聚甲醛室温固定细胞 10 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 用含体积分数 5% 羊血清、3% 牛血清白蛋白的 PBS 封闭液室温孵育 1 h, 弃掉封闭液加入 Galc 一抗 (1 : 100), 4 °C 孵育过夜; 弃掉一抗, PBS 洗 3 次, 每次 10 min; 加入与一抗对应的 Alexa Fluor 488 标记的山羊抗小鼠 IgG (1 : 1 000) 二抗, 室温孵育 1 h; 弃掉二抗, PBS 洗 3 次, 每次 10 min; DAPI 染色 3 min, PBS 洗 3 次, 每次 10 min, 荧光显微镜下观察细胞并拍照。

1.5 主要观察指标 ①神经干细胞和少突胶质前体细胞流式鉴定结果; ②少突胶质前体细胞形态及扩增能力; ③少突胶质前体细胞迁移能力; ④少突胶质前体细胞分化为少突胶质细胞的免疫荧光染色鉴定结果。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 22.0 软件包进行数据分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。两组比较符合正态分布采用 *t* 检验, 多组比较符合方差齐性采用单因素方差分析, 再用 Dunnett *t* 检验进行多重比较,  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。文章统计学方法已经通过中国人民解放军总医院第六医学中心生物统计学专家审核。

## 2 结果 Results

2.1 神经干细胞形态及鉴定结果 神经干细胞在培养瓶内呈悬浮球状生长, 折光性好, 神经球周边有较为致密的毛刺。流式细胞术检测结果显示神经干细胞表达特异性标志物 Nestin、Musashi、Sox2、Vimentin、CD133, 见图 1。

2.2 纤维连接蛋白促进少突胶质前体细胞的增殖 接种于 6 孔板中的少突胶质前体细胞胞体呈圆形或卵圆形, 折光

性强,有双极或三级突起结构,随着纤维连接蛋白质量浓度的增加,镜下可见贴壁细胞数量增多。对照组细胞增殖较慢,细胞贴壁不牢固,视野中可见较多细胞聚集成团现象。Accutase 消化各组细胞,锥虫蓝染色计数结果显示,与对照组比较,1  $\mu\text{g/mL}$  纤维连接蛋白组细胞数量无统计学差异,2.5, 5, 10  $\mu\text{g/mL}$  纤维连接蛋白组细胞数量均有统计学差异,随着纤维连接蛋白质量浓度的增加细胞扩增能力增强,当纤维连接蛋白质量浓度为 10  $\mu\text{g/mL}$  时细胞增殖能力最强,见图 2。

2.3 纤维连接蛋白不影响少突胶质前体细胞标志物的表达  
流式检测结果显示,10  $\mu\text{g/mL}$  纤维连接蛋白包被组与对照组获得的少突胶质前体细胞均高表达 PDGFR- $\alpha$ 、Olig2、Sox10,两组少突胶质前体细胞标志物的表达无统计学差异,说明培养过程中是否使用纤维连接蛋白包被孔板并不会影响少突胶质前体细胞特异性标志物的表达,见图 3。

2.4 纤维连接蛋白促进少突胶质前体细胞的迁移  
Transwell 小室检测少突胶质前体细胞的迁移能力,DAPI 染色结果显示,与对照组比较,10  $\mu\text{g/mL}$  纤维连接蛋白组少突胶质前体细胞迁移能力增加 ( $P < 0.01$ ),见图 4。

2.5 少突胶质前体细胞分化为少突胶质细胞及鉴定结果  
少突胶质前体细胞向少突胶质细胞分化 3 周,10  $\mu\text{g/mL}$  纤维连接蛋白组与对照组少突胶质前体细胞均可以分化为具有复杂分支或呈膜片状的细胞。免疫荧光染色结果显示 Galc 染色阳性,见图 5。

### 3 讨论 Discussion

少突胶质前体细胞是中枢神经系统形成髓鞘的少突胶质细胞的祖细胞。少突胶质前体细胞的发育受大量分子的调节,包括表征相对较少的细胞外基质蛋白。纤维连接蛋白是一种无处不在的细胞外基质成分,具有多种细胞来源,如星形胶质细胞<sup>[6]</sup>、上皮细胞、成纤维细胞和间充质细胞<sup>[7]</sup>,并参与细胞黏附、增殖和分化、上皮组织修复、免疫调节、神经再生和其他生理活动<sup>[8-9]</sup>。

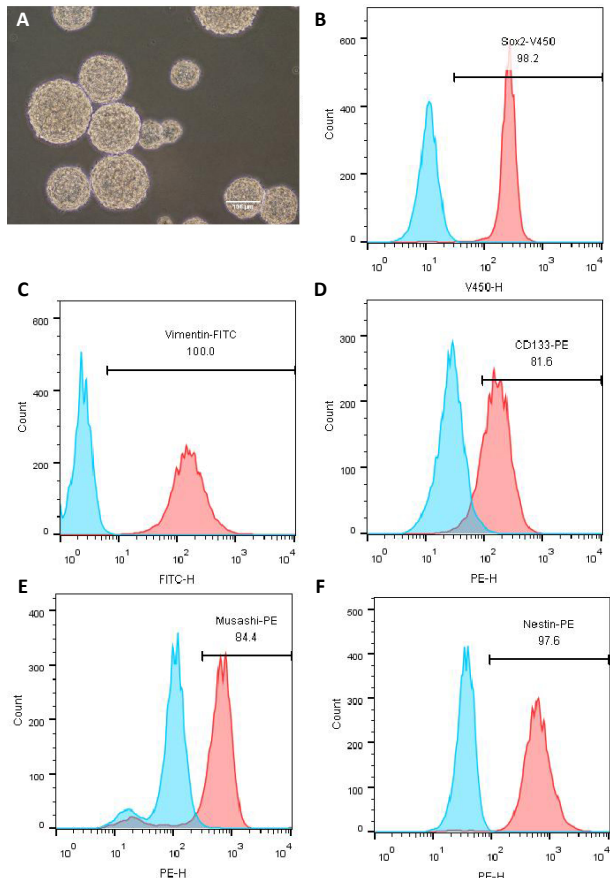
纤维连接蛋白通过与细胞表面的整合素等受体结合,调节细胞与基质之间的相互作用,促进细胞黏附和增殖<sup>[10]</sup>。体内研究结果发现,纤维连接蛋白有助于改善多发性硬化病变微环境,促进神经功能恢复,是髓鞘再生有前途的治疗靶点和药物<sup>[11]</sup>。星形胶质细胞分泌的纤维连接蛋白能够介导中枢神经系统脱髓鞘后少突胶质前体细胞的增殖<sup>[12]</sup>,纤维连接蛋白也可以促进血小板衍生生长因子 A 诱导的少突胶质前体细胞增殖<sup>[13]</sup>,体外研究显示,少突胶质细胞通过  $\alpha V \beta 3$  整合素受体附着在纤维连接蛋白上比通过  $\alpha 6 \beta 1$  整合素附着在层粘连蛋白上更能抵抗细胞凋亡<sup>[14]</sup>。有研究发现,层粘连蛋白和富含层粘连蛋白

的基质胶底物上的神经元和神经突生长速度明显优于纤维连接蛋白、多聚-D-赖氨酸和胶原底物<sup>[15]</sup>,说明细胞外基质对不同类型细胞作用不同。该研究未用纤维连接蛋白包被组和 1  $\mu\text{g/mL}$  纤维连接蛋白包被组少突胶质前体细胞增殖缓慢,而且细胞容易出现聚团现象;随着纤维连接蛋白质量浓度的增加,少突胶质前体细胞的增殖能力逐渐增加,当纤维连接蛋白质量浓度为 10  $\mu\text{g/mL}$  时促进少突胶质前体细胞增殖的作用最强,同时可以观察到少突胶质前体细胞在孔板中分布较为均匀,未出现细胞聚团现象。

细胞迁移是正常细胞的基本功能之一,是许多生理和病理过程的核心,纤维连接蛋白介导的细胞迁移对损伤修复、癌症转移<sup>[16-18]</sup>、胚胎发生、炎症、再生、组织修复等过程至关重要<sup>[7]</sup>。细胞迁移被认为是由于响应细胞外信号而启动的<sup>[19]</sup>。细胞外基质是多种信号因子的仓库,细胞通过配体与受体的结合启动了信号通路<sup>[20]</sup>。研究表明,细胞外基质可以调节啮齿动物和人类神经干细胞的迁移<sup>[21-23]</sup>。纤维连接蛋白可以促进移植到创伤性损伤小鼠脑内原代神经干细胞的存活和迁移<sup>[24]</sup>。MOORE 等<sup>[25]</sup>研究发现,在壳聚糖和固定化肝素组成的 StemTrix 支架上涂有纤维连接蛋白可以促进大鼠和人神经干细胞、少突胶质前体细胞的增殖。利用 Transwell 小室检测少突胶质前体细胞的迁移能力,结果显示,与未用纤维连接蛋白包被 Transwell 小室的少突胶质前体细胞比较,10  $\mu\text{g/mL}$  纤维连接蛋白包被 Transwell 小室可以显著提升少突胶质前体细胞的迁移能力。

有研究发现,纤维连接蛋白负向调节大鼠少突胶质细胞分化,而层粘连蛋白可以促进少突胶质细胞分化成熟<sup>[26]</sup>。另有研究结果显示,在纤维连接蛋白包被的培养皿上少突胶质细胞分支减少,没有形成髓鞘膜片样结构,阻碍了髓鞘的再生,而多聚 L-鸟氨酸氢溴酸盐能够逆转纤维连接蛋白的作用,促进少突胶质细胞进一步分化<sup>[27-29]</sup>。该研究在少突胶质前体细胞向少突胶质细胞分化过程中联合使用多聚 L-鸟氨酸氢溴酸盐和层粘连蛋白包被孔板,研究结果显示,在人神经干细胞诱导分化为少突胶质前体细胞的过程中无论是否使用纤维连接蛋白包被孔板,少突胶质前体细胞均可以分化为少突胶质细胞,Galc 免疫荧光染色统计分析结果显示二者无显著性差异,说明利用纤维连接蛋白包被孔板不会影响少突胶质前体细胞向少突胶质细胞的分化。

总之,与未用纤维连接蛋白包被的孔板相比,纤维连接蛋白作为底物包被 6 孔板可以促进人神经干细胞来源少突胶质前体细胞的增殖、迁移,但不影响少突胶质前体细胞的分化,为少突胶质前体细胞的临床转化研究奠定了基础。



图注：图 A 显示悬浮培养的人神经干细胞为球形，折光性强，细胞球周边有毛刺（标尺为 100 μm）；B-F 为流式细胞术鉴定神经干细胞特异性标记蛋白表达；G 为神经干细胞特异性标记蛋白统计分析结果。

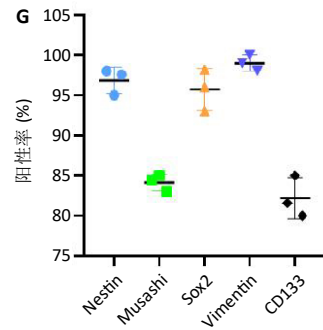
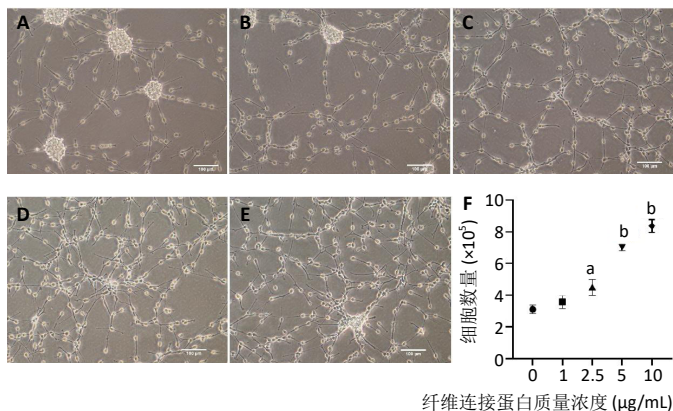
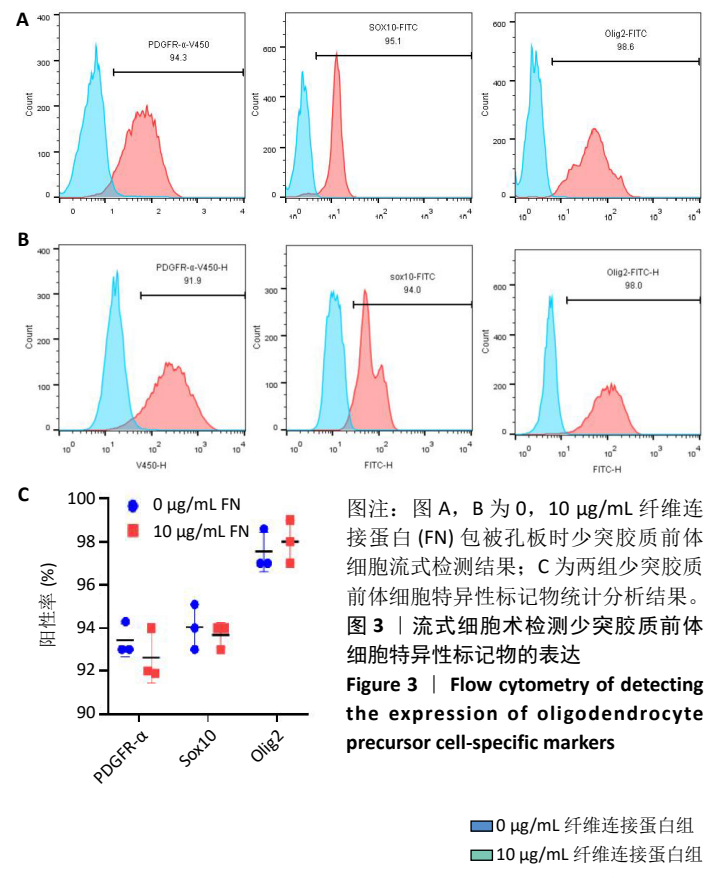


图 1 | 悬浮培养的人神经干细胞形态及流式鉴定结果  
Figure 1 | Morphology and flow cytometry identification of human neural stem cells cultured in suspension



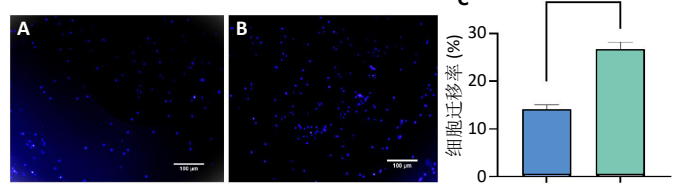
图注：图 A-E 依次为纤维连接蛋白质量浓度为 0, 1, 2.5, 5, 10 μg/mL 包被时少突胶质前体细胞形态，当质量浓度为 0, 1 μg/mL 时少突胶质前体细胞容易出现聚集现象，标尺为 100 μm；F 为不同质量浓度纤维连接蛋白组少突胶质前体细胞增殖能力比较。与 0 μg/mL 纤维连接蛋白组比，<sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01。

图 2 | 各组少突胶质前体细胞形态和增殖能力  
Figure 2 | Morphology and proliferation ability of oligodendrocyte precursor cells in each group



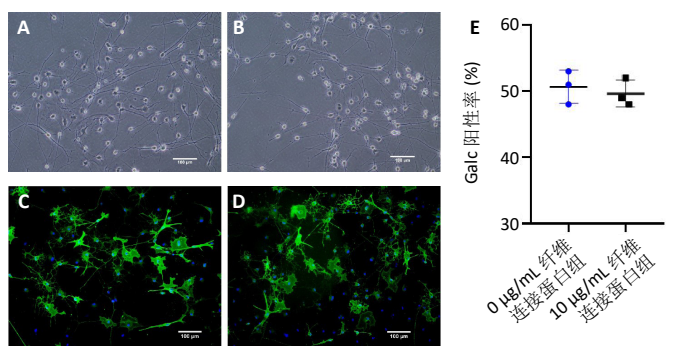
图注：图 A, B 为 0, 10 μg/mL 纤维连接蛋白 (FN) 包被孔板时少突胶质前体细胞流式检测结果；C 为两组少突胶质前体细胞特异性标记物统计分析结果。

图 3 | 流式细胞术检测少突胶质前体细胞特异性标记物的表达  
Figure 3 | Flow cytometry of detecting the expression of oligodendrocyte precursor cell-specific markers



图注：图 A, B 为 0, 10 μg/mL 纤维连接蛋白组细胞迁移图片（标尺为 100 μm）；C 为两组细胞迁移率统计分析。<sup>a</sup>P < 0.01。

图 4 | 两组少突胶质前体细胞的迁移能力比较  
Figure 4 | Comparison of the migration ability of oligodendrocyte precursor cells between the two groups



图注：图 A, B 为 0, 10 μg/mL 纤维连接蛋白组少突胶质细胞明场细胞形态（标尺为 100 μm）；C, D 为 0, 10 μg/mL 纤维连接蛋白组少突胶质细胞 Galc 免疫荧光染色图片（标尺为 100 μm）；E 为两组少突胶质细胞 Galc 免疫荧光染色阳性率。

图 5 | 少突胶质前体细胞分化为少突胶质细胞的明场细胞形态及 Galc 免疫荧光染色  
Figure 5 | Brightfield cell morphology of oligodendrocyte precursor cell differentiation into oligodendrocytes and Galc immunofluorescence staining results

**作者贡献:** 汪兆艳负责实验实施、论文撰写, 刘卫鹏负责实验数据分析处理, 汪兆艳、王倩负责细胞培养、指标检测, 屈素清、栾佐负责数据和文章的校对, 汪兆艳、杨辉负责实验设计。

**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。

**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。

**版权转让:** 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

**出版规范:** 该文章撰写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。

## 4 参考文献 References

- [1] TANG X, WANG Z, WANG M, et al. Nanoarchitectonics of cellulose nanocrystal conjugated with a tetrasaccharide-glycotope for targeting oligodendrocyte precursor cells. *Carbohydr Polym.* 2023;317:121086.
- [2] FANG M, CHEN L, TANG T, et al. The committed oligodendrocyte precursor cell, a newly-defined intermediate progenitor cell type in oligodendroglial lineage. *Glia.* 2023;71(11):2499-2510.
- [3] LEE KK, DE REPENTIGNY Y, SAULNIER R, et al. Dominant-negative beta1 integrin mice have region-specific myelin defects accompanied by alterations in MAPK activity. *Glia.* 2006;53(8):836-844.
- [4] HU J, DENG L, WANG X, et al. Effects of extracellular matrix molecules on the growth properties of oligodendrocyte progenitor cells in vitro. *J Neurosci Res.* 2009;87(13):2854-2862.
- [5] MONACO MC, MARIC D, BANDEIAN A, et al. Progenitor-derived oligodendrocyte culture system from human fetal brain. *J Vis Exp.* 2012;(70):4274.
- [6] RIESKE P, AUGELLI BJ, STAWSKI R, et al. A population of human brain cells expressing phenotypic markers of more than one lineage can be induced in vitro to differentiate into mesenchymal cells. *Exp Cell Res.* 2009;315(3):462-473.
- [7] DALTON CJ, LEMMON CA. Fibronectin: Molecular Structure, Fibrillar Structure and Mechanochemical Signaling. *Cells.* 2021;10(9):2443.
- [8] MORIYA K, SAKAI K, YAN MH, et al. Fibronectin is essential for survival but is dispensable for proliferation of hepatocytes in acute liver injury in mice. *Hepatology.* 2012;56(1):311-321.
- [9] BONADIO JD, BASHIRI G, HALLIGAN P, et al. Delivery technologies for therapeutic targeting of fibronectin in autoimmunity and fibrosis applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2024;209:115303.
- [10] AHN S, SHARMA U, KASUBA KC, et al. Engineered Biomimetic Fibrillar Fibronectin Matrices Regulate Cell Adhesion Initiation, Migration, and Proliferation via  $\alpha 5 \beta 1$  Integrin and Syndecan-4 Crosstalk. *Adv Sci (Weinh).* 2023;10(24):e2300812.
- [11] VAN SCHAİK PEM, ZUHORN IS, BARON W. Targeting Fibronectin to Overcome Remyelination Failure in Multiple Sclerosis: The Need for Brain- and Lesion-Targeted Drug Delivery. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(15):8418.
- [12] STOFFELS JM, HOEKSTRA D, FRANKLIN RJ, et al. The E111A domain from astrocyte-derived fibronectin mediates proliferation of oligodendrocyte progenitor cells following CNS demyelination. *Glia.* 2015;63(2): 242-256.
- [13] BARON W, COLOGNATO H, FFRENCH-CONSTANT C. Integrin-growth factor interactions as regulators of oligodendroglial development and function. *Glia.* 2005;49(4):467-479.
- [14] CHUDAKOVA DA, ZEIDAN YH, WHEELER BW, et al. Integrin-associated Lyn kinase promotes cell survival by suppressing acid sphingomyelinase activity. *J Biol Chem.* 2008;283(43):28806-28816.
- [15] MA W, TAVAKOLI T, DERBY E, et al. Cell-extracellular matrix interactions regulate neural differentiation of human embryonic stem cells. *BMC Dev Biol.* 2008;8:90.
- [16] LONGSTRETH JH, WANG K. The role of fibronectin in mediating cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2024;326(4):C1212-C1225.
- [17] GUERRERO-BARBERÀ G, BURDAY N, COSTELL M. Shaping Oncogenic Microenvironments: Contribution of Fibronectin. *Front Cell Dev Biol.* 2024;12:1363004.
- [18] MARTINUCCI B, CUCIELO MS, MINATEL BC, et al. Fibronectin Modulates the Expression of miRNAs in Prostate Cancer Cell Lines. *Front Vet Sci.* 2022;9:879997.
- [19] WEBB DJ, PARSONS JT, HORWITZ AF. Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells-- over and over and over again. *Nat Cell Biol.* 2002;4(4):E97-100.
- [20] BANDZEREWICZ A, GADOMSKA-GAJADHUR A. Into the Tissues: Extracellular Matrix and Its Artificial Substitutes: Cell Signalling Mechanisms. *Cells.* 2022;11(5):914.
- [21] STEPP MA, ZHU L, SHEPPARD D, et al. Localized distribution of alpha 9 integrin in the cornea and changes in expression during corneal epithelial cell differentiation. *J Histochem Cytochem.* 1995;43(4): 353-362.
- [22] ANLAR B, ATILLA P, CAKAR AN, et al. Expression of adhesion and extracellular matrix molecules in the developing human brain. *J Child Neurol.* 2002;17(9):707-713.
- [23] FLANAGAN LA, REBAZA LM, DERZIC S, et al. Regulation of human neural precursor cells by laminin and integrins. *J Neurosci Res.* 2006; 83(5):845-856.
- [24] TATE MC, SHEAR DA, HOFFMAN SW, et al. Fibronectin promotes survival and migration of primary neural stem cells transplanted into the traumatically injured mouse brain. *Cell Transplant.* 2002;11(3): 283-295.
- [25] MOORE L, SKOP NB, ROTHBARD DE, et al. Tethered growth factors on biocompatible scaffolds improve stemness of cultured rat and human neural stem cells and growth of oligodendrocyte progenitors. *Methods.* 2018;133:54-64.
- [26] LAFRENAYE AD, FUSS B. Focal adhesion kinase can play unique and opposing roles in regulating the morphology of differentiating oligodendrocytes. *J Neurochem.* 2010;115(1):269-282.
- [27] XIONG YJ, SOOMRO SH, HUANG ZH, et al. Poly-L-ornithine blocks the inhibitory effects of fibronectin on oligodendrocyte differentiation and promotes myelin repair. *Neural Regen Res.* 2023;18(4):832-839.
- [28] TO WS, MIDWOOD KS. Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2011;4:21.
- [29] EYERMANN C, CZAPLINSKI K, COLOGNATO H. Dystroglycan promotes filopodial formation and process branching in differentiating oligodendroglia. *J Neurochem.* 2012;120(6):928-947.

(责任编辑: ZM, MZH, ZN, QY)