

人骨髓间充质干细胞体外扩增和向神经细胞定向诱导分化的研究*

侯玲玲¹ 曹华¹ 白慈贤¹ 魏国荣¹ 张涌² 裴雪涛^{1**}

1. 军事医学科学院输血研究所, 干细胞研究中心, 北京 100850; 2. 西北农林科技大学
胚胎工程实验室, 杨凌 712100

摘要 骨髓间充质干细胞(MSC)是一类存在于骨髓中的具有多向分化潜能的干细胞, 在体外不仅可以分化为间充质类细胞, 而且可以分化为非间充质类细胞. 研究了人骨髓间充质干细胞的体外分离、扩增和向神经细胞的定向诱导分化条件. 从骨髓中分离 MSC, 用 MesenCult 培养基进行纯化和扩增培养. 每扩增一代, 细胞数量增加约 2~3 倍, 在体外扩增 12 代后扩增约 4.6×10^4 倍; 诱导不同扩增代数的 MSC 向神经细胞分化, 诱导后的细胞平均有 80% 以上呈现典型的神经元样表型. 免疫组化法检测发现, 神经元样细胞强表达神经丝蛋白和神经元特异性烯醇化酶, 组织化学法检测观察到神经元特有结构尼氏体, 表明 MSC 在体外具有向神经细胞分化的潜能.

关键词 骨髓 间充质干细胞 神经细胞

骨髓间充质干细胞(MSC)是目前倍受关注的一类具有多向分化潜能的组织干细胞. 体外培养的骨髓贴壁细胞是一个异质细胞群, MSC 是这一群体中的一类细胞成分. MSC 表达多种表面标志^[1], 如 SH2, SH3, CD29, CD90, CD106 和 CD166 等; 但不表达造血干细胞系的表面标志, 如脂多糖受体 CD14, CD34 以及白细胞表面抗原 CD45 等. 这群细胞特性稳定, 连续传代培养和冷冻保存后仍具有多向分化潜能. 实验表明^[2,3], 在体外特定的诱导条件下, MSC 可以分化为骨、软骨、脂肪、肌腱和韧带等多种细胞. 在动物体内也已发现了骨髓细胞来源的神经细胞^[4,5]、肝脏卵圆细胞^[6]和肌肉细胞^[7]等, 这可能也与 MSC 有关. 最近报道, 成年大鼠和成人的骨髓基质细胞体外培养传代后可定向诱导为神经细胞^[8]. 这表明 MSC 是组织工程中进行细胞治疗的一种理想的种子细胞, 有很大的应用前景. 但人体内骨髓中的 MSC 含量极其稀少, 仅占单个核细胞的百万分之一到十万分之一^[9]. 而组织工程需要大量的种子细胞, 为此, 我们研究了 MSC 的

体外分离、纯化、扩增以及定向分化为神经细胞的条件, 为 MSC 的临床应用提供理论依据、技术方法和丰富的种子细胞.

1 材料与方法

1.1 MSC 的体外分离、纯化和扩增培养

骨髓 MSC 的分离、纯化和扩增参照 Jaiswal 等人的方法^[10]. 无菌条件下采集非血液系统疾病的人骨髓, 用含 15% 胎牛血清(Hyclone)的 α -MEM 培养液适当稀释, 离心去脂肪层, 加入 5 mL 含 15% 胎牛血清的 α -MEM 培养液, 制成细胞悬液, 用比重 1.073 的 Percoll 分离液分离(400 g, 20 min), 取界面层, 用 PBS 离心洗涤. 以 $2.0 \times 10^5/\text{cm}^2$ (T-25 培养瓶)的密度接种于 MesenCult 培养液 (Stem Cell Co.)中, 置于 37℃, 5% CO₂, 饱和湿度的孵箱内培养 3 d 后更换培养基, 弃掉未贴壁细胞. 以后每 3 d 换液一次. 细胞长到 80% 融合时用 1:1 的 0.1% 的胰蛋白酶和 0.01% EDTA 混合液消化传代(在显微镜下控制消化时间), 以 $8.0 \times 10^3/\text{cm}^2$ 的密度接种于传代培养瓶(T-25)中进行扩增培养.

2001-04-18 收稿, 2001-06-05 收修改稿

* 北京市“二四八”创新工程基金资助(批准号: 9550213800)

** 联系人, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

1.2 流式细胞仪检测

取扩增一代的 MSC, 用胰蛋白酶消化、PBS 洗涤后制成含有 1.5×10^6 个 MSC 的单细胞悬液, 等分为 3 份, 加入 Eppendorf 管中. 1 号管为阴性对照, 加入 $5 \mu\text{L}$ IgG₁-FITC 和 $5 \mu\text{L}$ IgG₁-PE 单克隆抗体; 2 号管加入 $5 \mu\text{L}$ CD11a-FITC 和 $5 \mu\text{L}$ CD29-PE 单克隆抗体; 3 号管加入 $5 \mu\text{L}$ CD11a-FITC 和 $5 \mu\text{L}$ CD29-PE 单克隆抗体(所有抗体为 BD PharMingen 产品). 室温孵育 20 min, 流式细胞仪检测.

1.3 体外诱导 MSC 向神经细胞分化

分别取体外扩增 2, 6, 10 代后的 MSC, 以 $8.0 \times 10^3/\text{cm}^2$ 浓度接种于放置有消毒盖玻片的六孔板内, 制备细胞爬片, 每孔加 2 mL MesenCult 培养液, 达到 60% ~ 70% 融合时, 换成含 20% 胎牛血清(Hyclone)和 $3 \mu\text{mol/L}$ β -巯基乙醇的 DMEM 培养液预诱导 24 h, PBS(pH7.4)洗涤, 而后换成含 2% 二甲亚砜(DMSO)和 $200 \mu\text{mol/L}$ 丁化羟基苯甲醚(BHA)的 DMEM 培养液进行诱导. 30 min 后开始在显微镜下观察, 以后每隔 30 min 观察一次, 直到细胞形态无明显变化.

同时分别用含 1, 3, 5, 7, 10 $\mu\text{mol/L}$ β -巯基乙醇的 DMEM 培养液代替含 2% DMSO 和 $200 \mu\text{mol/L}$ BHA 的 DMEM 培养液诱导 MSC.

1.4 免疫组织化学和组织化学鉴定

分别取诱导 2, 4, 6, 12 h 后的细胞爬片, 参照 HistostainTM-SP(链酶卵白素-过氧化物酶)试剂盒(北京中山生物技术公司)操作方法进行免疫组织化学实验. 第一抗体为神经丝蛋白(NF)和神经元特异性烯醇化酶(NSE)单克隆抗体(北京中山生物技术公司), 第二抗为羊抗鼠 IgG. 阴性对照用 0.01 mol/L 的 PBS 代替 NSE 和 NF 单克隆抗体, 实验对照用未诱

导的 MSC 细胞爬片直接进行免疫组织化学染色.

取诱导后 4, 6, 8 h 的细胞爬片, 用甲苯胺蓝染色, 观察尼氏体.

2 结果

2.1 MSC 的分离、纯化、扩增

经分离的骨髓 MSC, 在含 5 mL MesenCult 培养液中培养 3 d 后全量换液, 去除未贴壁细胞, 此时贴壁生长的 MSC 数量较少, 散在存在, 呈大而扁平的梭形. 随着 MSC 的迅速增殖, 11 d 后出现较大的克隆, 20 d 左右细胞生长达 80% ~ 90% 融合, 每个克隆约数百至数千个细胞, 此时的 MSC 呈较均一的长梭形(图 1). 每瓶单层融合的 MSC 用胰蛋白酶消化后平均获得 $(5.5 \pm 0.17) \times 10^5$ 个 MSC, 将这些细胞再传代培养, 一周左右达融合, 可继续传代扩增. 经扩增 12 代后获得 2.3×10^9 个细胞, 扩增约 4.6×10^4 倍.

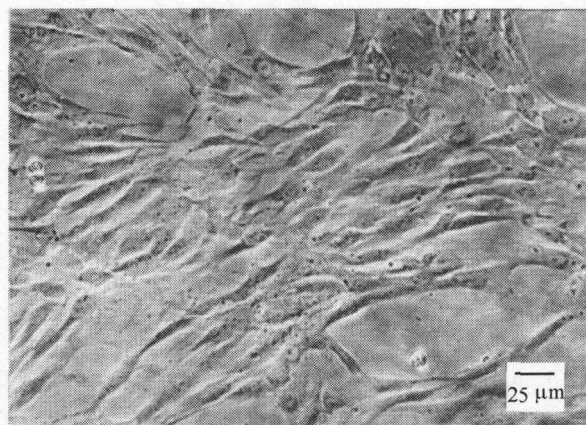


图 1 原代 MSC 形态

2.2 MSC 的表面抗原特性

图 2 示流式细胞仪检测 MSC 的表面抗原特性. 扩增一代的 MSC 不表达 CD34 (造血干细胞的特异

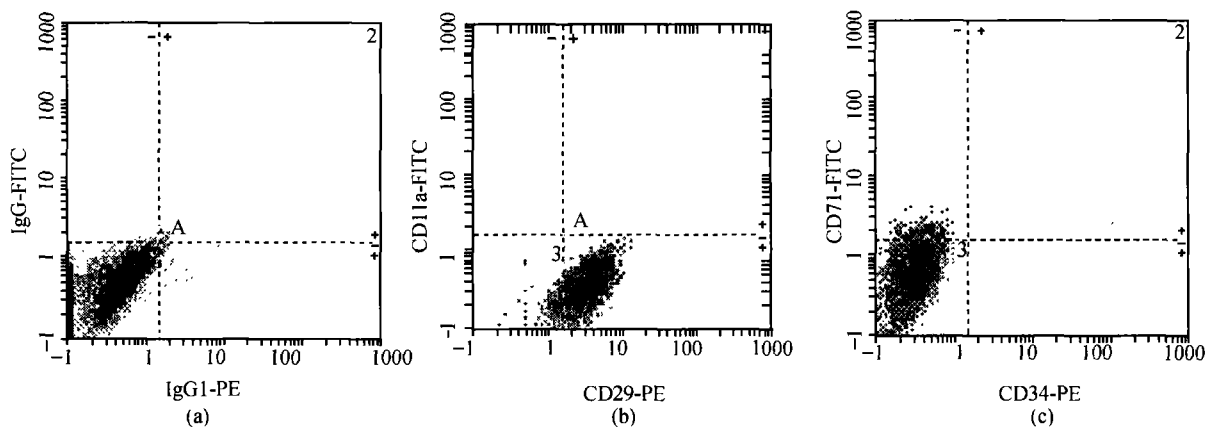


图 2 MSC 的抗原特性

(a) 阴性对照 IgG-PE 和 IgG-FITC; (b) CD29-PE 和 CD11a-FITC; (c) CD34-PE 和 CD71-FITC

性表面标志)和 CD11a(淋巴细胞表面标志); 强表达 CD29(整合素家族的成员), CD71(转铁蛋白受体)仅有微弱表达. 这表明 MSC 是骨髓中区别于造血干细胞的一群处于未分化状态的非定向干/祖细胞.

2.3 MSC 向神经细胞转化过程中的形态变化

在预诱导后 12 h 已发现原来大而扁平的 MSC 胞体发生收缩, 细胞边缘变的不规整, 有许多细

指状突起(见图 3(a)). 预诱导结束时, 一部分细胞胞体已变成近似圆形. 正式诱导后的 3 h 内细胞发生明显的形态学变化, 细胞胞体进一步收缩, 形成圆形、不规整的锥形、三角形, 有的细胞有多个突起, 而且发出分支, 终末端有类似神经元细胞的终结; 有的突起逐渐伸长, 形成圆锥状终末端, 类似于 Golgi I 型神经元的长轴突(见图 3(b)~(f)). 5 h 后细胞形态基本不再发生明显变化, 观察发现有 80% 以上的细胞呈现典型的神经元样表型.

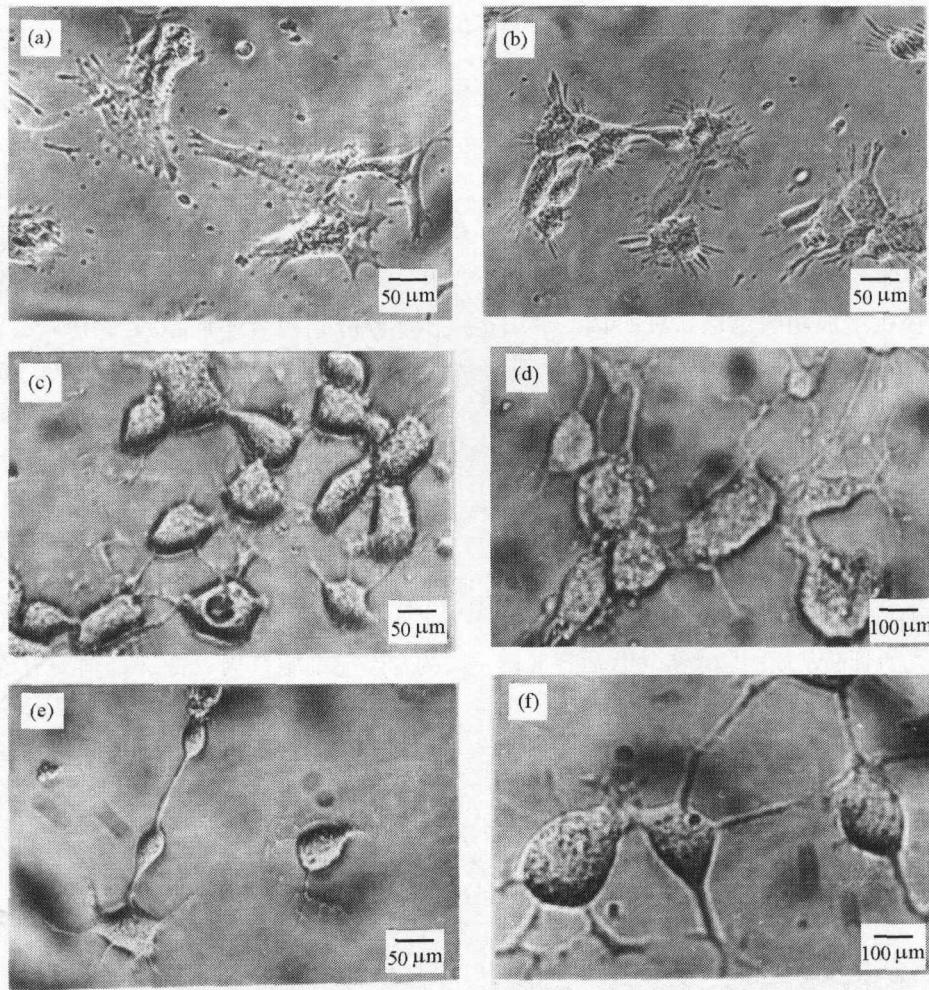


图3 MSC 向神经细胞诱导过程中形态的变化

(a) 预诱导 12 h 后的细胞; (b)~(f) 诱导后 0.5, 1.5, 2.5, 3.5, 4.5 h 的细胞形态变化

分别用含 1, 3, 5, 7, 10 $\mu\text{mol/L}$ β -巯基乙醇的 DMEM 培养液诱导 MSC, 均可观察到典型的神经元样细胞, 只是转化率较含 2% DMSO 和 200 $\mu\text{mol/L}$ BHA 的 DMEM 培养液诱导时低.

2.4 免疫组织化学和组织化学染色结果

在诱导 MSC 向神经细胞分化过程中, 取诱导 2,

4, 6, 12 h 后的细胞爬片, 检测 NSE 和 NF 的表达情况. 观察发现, 未诱导的 MSC 不表达 NSE 和 NF, 细胞不着色(见图版 I-A(a)(c)). 诱导后不同时间的细胞均有 NSE 和 NF 表达. 阳性细胞呈棕褐色. NSE 阳性细胞表现为弥漫性胞浆着色(见图版 I-A(b)); NF 在核周和突起均有表达(见图版 I-A(d)).

不同扩增代数的骨髓 MSC 向神经细胞分化后均表达 NSE 和 NF. 不同代数的 MSC 分化过程中 NSE 和 NF 阳性率(显微镜下计数 100 个细胞中 NSE 和 NF 阳性的细胞数, 分别随机计数 5 次,)经统计学分析无显著性差异($P > 0.05$).

甲苯胺蓝染色发现, 诱导 6 和 8 h 后的神经元样细胞的胞质中存在着深蓝色的块状或颗粒状的尼氏体(见图版 I-B).

3 讨论

随着组织工程的兴起和发展, 细胞替代治疗将成为攻克一些疑难病症的新途径. 目前, 正在尝试通过组织工程技术将组织干细胞体外扩增和定向诱导为所需细胞, 然后植入患者体内, 用以修复损伤、替代退行性组织以及改善遗传性缺陷组织的功能. 造血干细胞的移植已得到广泛开展, 通过输注造血干细胞来对恶性血液病患者进行造血重建已取得成功, 这为组织干细胞的研究提供了成功的范例. MSC 因其具有高度的自我更新能力和多向分化潜能以及取材方便、体内植入后不良反应较弱等优点将成为理想的种子细胞. 据报道, MSC 可以为骨、软骨、肺、脑组织等的修复和重建提供细胞来源^[11]. Azizi 等^[5]将经体外培养的人 MSC 植入大鼠的脑内, 发现人 MSC 在大鼠脑内能够沿着神经干细胞的迁移路线进行迁移, 具有类似于星形胶质细胞的特性. Woodbury 等^[8]在体外将成年大鼠和成人的骨髓基质细胞培养传代后定向诱导为神经细胞. 然而, 骨髓中的 MSC 数量较少, 难以满足组织工程的需要, 因此体外纯化和扩增 MSC 就显得尤为重要. 在我们的实验中, 对 MSC 的分离和培养是基于 Jaiswal 等^[10]的方法并进行了一定的改进, 同时采用 MesenCult 培养基对 MSC 进行进一步的纯化和扩增培养. MesenCult 培养基选用经过筛选的适于 MSC 增殖的胎牛血清, 通过传代培养后 MSC 的纯度可高达 95% 以上. 实验结果表明, MSC 不表达 CD34 和 CD11a, 而是表达 CD29, 是骨髓中区别于造血干细胞的一群处于未分化状态的非定向干/祖细胞; MSC 扩增迅速, 5.0×10^5 个原代成人骨髓 MSC 在体外扩增 12 代后获得 2.3×10^9 个细胞, 扩增约 4.6×10^4 倍; 特性稳定, 传代后的 MSC 形态无明显变化. MSC 的这些特性是使其成为组织工程中进行细胞治疗的理想的种子细胞, 有很大的临床应用前景.

在体内, 组织干细胞的发生及功能获得与组织中基因编码的转录因子和细胞外信号有关^[12]. 但在

体外组织干细胞的定向分化机理尚不十分清楚. 本研究分别取扩增 2, 6, 10 代的 MSC, 用含 20% 胎牛血清和 $3 \mu\text{mol/L}$ β -巯基乙醇的 DMEM 培养液预诱导, 用含 2% DMSO 和 $200 \mu\text{mol/L}$ BHA 的 DMEM 培养液诱导其向神经细胞分化. 不同代数的 MSC 诱导分化后均表达 NSE 和 NF, 而且不同代数 NSE 和 NF 的阳性率无显著差异($P > 0.05$). 这在 Woodbury 等^[8]工作的基础上进一步证明了不同代数的 MSC 均具有向神经细胞分化的潜能, 而且分化潜能无明显差异. 诱导培养基中的 β -巯基乙醇和 BHA 均为强的抗氧化剂, BHA 的抗氧化作用更强^[8]. β -巯基乙醇和 BHA 对 MSC 的定向诱导作用与其能将细胞从氧化状态中释放出来有关, 但其作用机理不十分清楚. 有实验表明, 在培养神经细胞的无血清培养基中加入适当浓度的 β -巯基乙醇 ($10 \sim 50 \mu\text{mol/L}$) 可以使神经细胞的存活率增加几倍到几百倍, 这也与 β -巯基乙醇的抗氧化作用有关^[13]. 本实验分别用含不同浓度 β -巯基乙醇的 DMEM 培养液代替含 2% DMSO 和 $200 \mu\text{mol/L}$ BHA 的 DMEM 培养液诱导 MSC 向神经细胞分化, 得到了类似的结果.

NSE 是一种胞浆蛋白, 主要表达于神经元细胞, 某些神经元内分泌细胞及神经内分泌肿瘤细胞也有表达. NF 是一种由 NF-L, NF-M, NF-H3 种多肽组成的巨分子复合物, 在中枢和外周神经系统的神经元细胞核周、特别是轴突有表达. 免疫组织化学鉴定结果显示, 诱导后的细胞 NSE 和 NF 均呈阳性表达, 这表明诱导分化后的神经元样细胞已经具备神经元的抗原特性. 组织化学实验结果显示, 诱导后的细胞具有神经元的特有结构尼氏体. 尼氏体的形成与细胞的逐渐成熟有关, 尼氏体是由许多规则平行排列并互相沟通的粗面内质网以及其间的游离核糖体组成, 不成熟的细胞细胞器相对较少. 这表明 MSC 具有向非间充质系细胞, 特别是神经细胞分化的能力.

MSC 向不同方向分化需要不同的环境条件. 这表明, 细胞的系特异性和定向分化性是受周围环境因素影响和决定的, 某些干/祖细胞不仅可以分化为同一胚层来源的细胞, 而且可以分化为不同胚层来源的细胞. 但目前 MSC 体内体外的定向分化机理均不十分清楚. 对这些分化机理的深入研究和阐明, 将最终使我们更广泛地应用组织工程进行细胞替代治疗和器官移植.

参 考 文 献

- 1 Deans R J, et al. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Experimental Hematology*, 2000, 28: 875
- 2 Pittenger M F, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284: 143
- 3 Prockop D J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 1997, 276: 71
- 4 Eglitis M A, et al. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 4080
- 5 Azizi S A, et al. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats—similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 3908
- 6 Petersen B E, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*, 1999, 284: 1168
- 7 Ferrari G, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*, 1998, 279: 1528
- 8 Woodbury D, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 2000, 61: 364
- 9 Bruder S P, et al. Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1998, 355(suppl): 247
- 10 Jaiswal N, et al. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells *in vitro*. *Journal of Cellular Biochemistry*, 1997, 64: 295
- 11 Pereira R F, et al. Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 1142
- 12 Morrison S J, et al. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*, 1997, 88: 287
- 13 Ishii K, et al. Effects of 2-mercaptoethanol on survival and differentiation of fetal mouse brain neurons cultured *in vitro*. *Neuroscience Letters*, 1993, 163: 159

第四届两岸三地地质科学学术交流会 将于2002年5月在南京大学召开

两岸三地地质科学学术交流会(原称世界华人地质科学讨论会(WCCOGS)),是由中国地质学会(GSC)和海外华人地质协会(OCESTA)等组织发起举办的国际性会议,已在中国北京、美国斯坦福和中国香港成功地举行了三次,促进了全球华人地球科学家的交流和地球科学本身的发展,产生了良好的影响,受到普遍的关注。经有关组织部门同意和批准,决定两岸三地地质科学学术交流会由南京大学主办,于2002年5月下旬在南京召开。

本次会议的主要议题包括:(1)地球科学发展与人类社会进步;(2)矿产资源开发和环境保护;(3)地球科学研究的技术和方法;(4)地球科学教育改革和人才培养;(5)其他地学相关问题。并拟组织部分专题:如“花岗岩成因与成矿”,“流体地质作用”、“盆地构造与油气”、“水资源与水环境”、“东亚环境变迁与演化”等。此外,会后安排地质旅行和参观,初选地点为南京汤山猿人洞、宁芜地区火山作用与矿产和黄山花岗岩。

南京是中国六朝古都,是中国近代地学的重要发祥地,南京大学是中国重要的地学研究和教育中心。2002年又恰逢南京大学百年校庆,因此由南京大学承办这次大会将具有广泛的影响和深远的意义。本届大会已得到发起单位国家自然科学基金委员会等单位的大力支持,并已有许多海内外积极报名,届时必将名流云集,群贤纷至,使这次大会成为全球华人地学工作者团结交流、联谊进步的盛会。南京大学热诚欢迎海内外嘉宾与会。

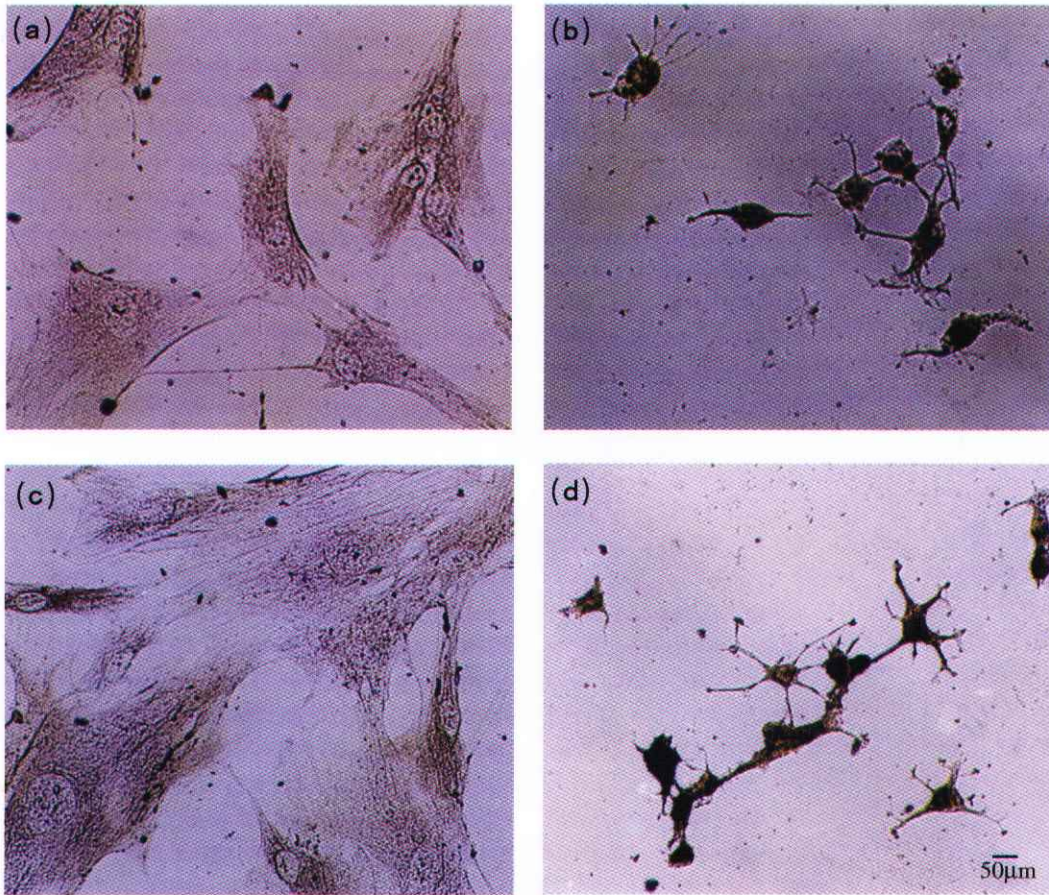
联系人:华仁民:南京大学地球科学系,电话:025-3592763, Email: earthzr@nju.edu.cn

胡文瑄:南京大学地球科学系,电话:025-6207135, Email: huwx@nju.edu.cn

陈从喜:中国地质学会,北京百万庄26号,010-68326451, Email: gsc@cags.cn.net

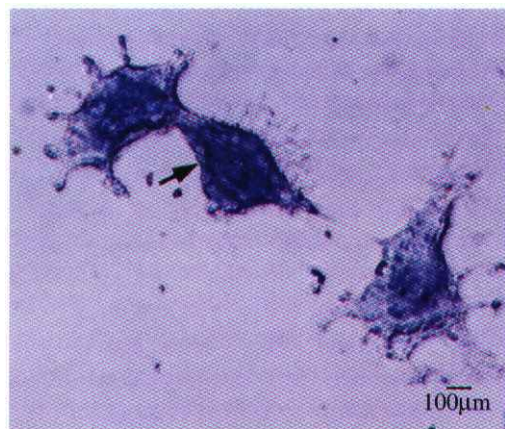
段振豪(Zhenhao Duan): OCESTA, E-mail: duanzhenhao@yahoo.com

(供稿:胡文瑄)



A MSC 向神经细胞分化过程中 NSE 和 NF 的表达

(a) 未诱导的 MSC NSE 染色 (b) 诱导的 MSC NSE 染色 (c) 未诱导的 MSC NF 染色 (d) 诱导的 NF 染色



B 诱导 8 h 的神经元样细胞尼氏体染色