

神经节苷脂体外诱导骨髓基质干细胞分化为神经元样细胞

杨键¹, 洪毅², 董浩³, 张宪娣³, 姜树东²

[摘要] 目的 探讨神经节苷脂体外诱导骨髓基质干细胞(BMSC)向神经元样细胞分化的可能性。方法 分离培养人 BMSC, 采用含神经节苷脂的无血清培养基诱导 BMSC 的分化, 免疫细胞化学方法鉴定诱导分化后细胞表面神经细胞标志物神经元特异性烯醇化酶(NSE)和神经丝蛋白(NF)的表达。结果 神经节苷脂诱导培养 6 h 后, 细胞表现为典型神经细胞样形态, 神经元特异性标志物 NSE 和 NF 呈阳性表达。结论 神经节苷脂可在体外诱导人 BMSC 分化为神经元样细胞。

[关键词] 骨髓基质干细胞; 神经节苷脂; 诱导分化; 神经元样细胞

Study of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Differentiated into Neuron-like Cells Induced by Ganglioside in Vitro YANG Jian, HONG Yi, DONG Hao, et al. The Rehabilitation Medicine Institute of China Rehabilitation Research Center, Beijing 100068, China

Abstract: **Objective** To investigate the possibility that bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) differentiated into neuron-like cells induced by ganglioside in vitro. **Methods** BMSCs were separated, cultured and differentiated into neuron-like cells induced by ganglioside. Neuro-specific enolase (NSE) and neurofilament (NF) on the surface of differentiated and induced BMSCs were detected by immunocytochemistry. **Results** BMSCs were induced to differentiate into the cells with a typical neuronal morphology. The induced neuron-like cells expressed NSE and NF. **Conclusion** BMSCs can be differentiated into neuron-like cells by induction of ganglioside in vitro.

Key words: bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs); ganglioside; induced differentiation; neuron-like cells

[中图分类号] R338.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1006-9771(2006)12-1054-02

[本文著录格式] 杨键, 洪毅, 董浩, 等. 神经节苷脂体外诱导骨髓基质干细胞分化为神经元样细胞[J]. 中国康复理论与实践, 2006, 12(12): 1054—1055.

在骨髓中, 除造血干细胞外, 还有一类具有干细胞特性可向多种非造血组织分化的骨髓基质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)^[1], 这类细胞不但具有自我更新和增殖能力, 还可经诱导向神经细胞方向分化^[2], 因而在神经系统疾病治疗方面有良好的应用前景。神经节苷脂是存在于哺乳动物细胞特别是神经细胞膜中的一类酸性糖鞘脂, 外源性神经节苷脂可以促进神经细胞分化和神经纤维发育成熟, 增加轴突再生和神经出芽^[3]。本研究旨在观察神经节苷脂是否能在体外诱导 BMSCs 分化为神经元样细胞。

1 材料与方法

1.1 骨髓标本 在脊髓损伤患者术中行取骨植骨术的同时, 于髂后上棘预取骨部位采取骨髓。

1.2 试剂 DMEM 培养基(GIBCO 公司); 胎牛血清(fetal calf serum, FCS)(杭州四季青生物工程材料有限公司); 单唾液酸四己糖神经节苷脂钠盐注射液(阿根廷 TRB 药厂); Ficoll-Paque (Stem Cell Technologies 公司); 小鼠抗人神经元特异性烯醇化酶(neuro-specific enolase, NSE)单克隆抗体、小鼠抗人神经丝蛋白(neurofilament, NF)单克隆抗体、DAB 显色试剂盒(北京中山金桥生物技术有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 BMSCs 分离 骨髓液 1000 r/min 离心 5 min, 去除上清及脂肪层, 沉淀用培养液混匀后轻轻叠加到 Ficoll-Paque 分离液上, 200 g 离心 30 min, 收集单个核细胞层, 用培养液洗涤 2 次。

1.3.2 BMSCs 培养和传代 分离后的细胞内加入含 20% FCS 的 DMEM 完全培养液, 按 3×10^6 /ml 的细胞密度接种于 25 ml

培养瓶中, 于 37℃, 5% CO₂ 饱和湿度下培养, 3 d 后全量换液, 去除未贴壁细胞, 以后每隔 3 d 更换培养液 1 次, 待细胞达 80% 融合后用消化液(0.25% 胰酶/0.02% EDTA) 37℃ 消化, 按 1:3 比例传代培养, 倒置显微镜下观察细胞生长情况。

1.3.3 神经节苷脂诱导 BMSCs 分化 传代后 BMSCs 移至加有盖玻片的平皿内培养, 待细胞达 90% 融合状态时, 去除培养液, 实验组平皿内加入诱导液(含 50 μg/ml 神经节苷脂的无血清 DMEM 培养液); 对照 I 组平皿内加无血清 DMEM 培养液; 对照 II 组仍用 20% FCS 的 DMEM 完全培养液培养, 诱导后 2 h、4 h、6 h 在倒置显微镜下观察细胞形态变化。

1.3.4 免疫细胞化学染色鉴定 诱导后 6 h 的细胞用 40% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 洗涤, 分别加入抗 NSE 单抗和抗 NF 单抗, 参考相应试剂盒说明书进行操作, DAB 显色, 中性树胶封片, 光镜检查, 随机取 10 个非重叠视野, 计算阳性细胞数与总细胞数比例, 结果以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。

2 结果

2.1 BMSCs 分离培养 刚接种时的细胞内含有多种细胞成分, 第 3 天全量换液去除未贴壁的细胞后, 可见少量 BMSCs 贴壁生长; 培养 1 周时, 细胞缓慢生长并形成圆形、梭形和扁平 3 种形态的细胞; 培养至第 2 周, 细胞生长速度加快, 形态逐渐变为梭形, 随着细胞的迅速增殖, 3 周后细胞生长达 80%~90% 融合, 此时细胞呈长梭形, 形态较均一(见封三图 2.1)。

2.2 神经节苷脂诱导过程中的形态变化 实验组 BMSCs 内加入含神经节苷脂的诱导液 2 h 后, 少数细胞胞质向核收缩, 呈核周体形态; 诱导 4 h 后, 细胞形态发生明显改变, 胞体进一步收缩形成突起, 胞体立体感增强, 周围出现光晕, 可见到很多双极和多极细胞; 6 h 后, 大多数细胞形成锥形、三角形等不规则形状, 突起增多变长, 细胞间突起相互连接, 交错成网, 呈现典型的神经细胞样形态(见封三图 2.2)。对照 I 组在 6 h 后也有少数细胞发生核周体形态改变, 但大多数细胞仍保持原来的长梭形; 对照 II 组细胞形态未发生任何改变。

作者单位: 1. 中国康复研究中心康复医学研究所, 北京市 100068; 2. 首都医科大学康复医学院临床康复研究室, 北京市 100068; 3. 中国康复研究中心科教处, 北京市 100068。作者简介: 杨键(1955-), 男, 北京市人, 副主任技师, 主要研究方向: 神经损伤修复和再生。

2.3 神经元样细胞鉴定 为进一步确定神经节苷脂诱导 BMSCs 分化为神经元样细胞,采用神经元标志物 NSE 和 NF 进行鉴定。结果显示,在实验组神经节苷脂诱导 6 h 后,多数细胞呈 NSE 和 NF 染色阳性(棕色,见封三图 2.3、图 2.4)。对照 I 组也有少数细胞 NSE 和 NF 染色呈阳性,对照 II 组未见到 NSE 和 NF 染色阳性细胞。实验组与对照 I 组 NSE 阳性细胞比例分别为(61.52±8.80)%和(8.24±1.02)%,NF 阳性细胞比例分别为(57.86±9.23)%和(6.75±0.91)%,两组间差异均有显著性意义($P < 0.05$)。

3 讨论

BMSCs 是存在于骨髓中的一类具有多向分化潜能的细胞,可分化为骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肌肉细胞等^[4]。1999 年, Kopen 将 BMSCs 移植到小鼠脑室,首次证明其可在体内转化为神经元样细胞^[5]。近年来, BMSCs 被引入神经损伤修复的研究中^[6]。实验证实, BMSCs 移植到动物脑或脊髓损伤部位后,可与神经组织整合并向神经元方向分化,使神经功能部分恢复^[7,8]。这些研究显示了 BMSCs 在神经损伤修复方面的潜在价值。目前, BMSCs 移植治疗脊髓损伤的临床实验已在进行,并观察到一定的疗效^[9,10]。但动物实验显示, BMSCs 移植到损伤神经组织后,只有很少部分分化为神经元样细胞^[11,12];体外诱导实验也发现,损伤脊髓组织液虽可诱导 BMSCs 分化为神经元样细胞,但分化率不高^[13,14]。以上结果说明,单独应用 BMSCs 移植修复神经损伤似乎还达不到理想的效果,如能人为改变损伤局部微环境或加入某些促进细胞分化的药物,则有可能促进 BMSCs 移植对神经损伤的修复作用。因此,寻找能诱导或促进 BMSCs 分化的药物具有重要意义。近年来的研究发现,巯基乙醇、二甲基亚枫、硫代甘油等均能在体外诱导 BMSCs 分化为神经元样细胞^[15],但它们都不能作为药物在临床应用。

神经节苷脂是细胞膜的组成成分,在中枢神经系统中含量丰富,内源性神经节苷脂参与细胞膜与胞浆的生理过程,对保持细胞膜的正常结构和生理功能发挥重要作用。外源性神经节苷脂可以通过血脑屏障,促进神经元出芽、轴索再生和突触形成^[16],调节、增强神经营养因子的作用^[17],对抗神经损伤后的细胞凋亡^[18],促进神经干细胞的增殖^[19]。20 世纪 80 年代神经节苷脂就已应用于临床,治疗结果显示,神经节苷脂可以减轻脑脊髓损伤后的继发性损伤,促进神经功能恢复^[20]。研究显示,神经节苷脂具有的这些作用是通过其参与神经元内外信息传递、介导细胞之间和细胞与基质之间相互作用而完成的^[21,22]。那么,神经节苷脂能否对 BMSCs 的生长分化产生影响?据此,本实验设计了神经节苷脂在体外对 BMSCs 的诱导分化研究,以探讨其定向诱导神经元样细胞分化的可能性。实验结果表明,在加入含神经节苷脂的无血清培养基后 2 h,部分 BMSCs 即开始发生核周体形态改变,4 h 后出现类似神经元的轴突和树突,6 h 后很多细胞突起相互联结形成网络,呈典型神经细胞样结构;进一步行免疫细胞化学染色发现,超过半数的诱导后细胞神经元标志物 NSE 和 NF 表达阳性,表明 BMSCs 在神经节苷脂诱导后不仅形态学上发生改变,分子水平亦发生质的变化,分化形成了神经元样细胞。本实验对照组使用了不含神经节苷脂的无血清培养基,结果也有少量 BMSCs 发生神经细胞样改变并呈 NSE 和 NF 阳性,虽然所占比例很小,但这种现象值得关注。因为通常 BMSCs 培养时使用含血清培养基, BMSCs 体外定向诱导神经元样细胞分化时一般采用无血清

培养基加诱导剂的方法^[23,24], BMSCs 从含血清培养到无血清培养体系,实际上其生长环境已发生改变,这种变化是否给予了 BMSCs 前期诱导或刺激使其处于应激状态,而加入诱导剂只是加速细胞向神经元样细胞的分化?这些问题目前还不清楚,有待进一步研究。总之,本实验显示神经节苷脂在体外无血清培养体系中可以诱导 BMSCs 分化为神经元样细胞,这将有助于研究 BMSCs 定向分化为神经细胞的分子机制,为 BMSCs 移植与药物联合应用治疗神经损伤性疾病提供理论基础。

[参考文献]

- [1] Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues[J]. Science, 1997, 276(5309): 71-74.
- [2] Sanchez Ramos J, Song S, Cardoso Pelaez F, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro[J]. Exp Neurol, 2000, 164(2): 247-256.
- [3] Commission J W, Toffano G. The effect of GM-1 ganglioside on cerebrolipid, noradrenergic, adult neurons and on fetal monoaminergic neurons transplanted into the transected spinal cord of the adult rats[J]. Brain Res, 1986, 380: 205-215.
- [4] Bianco P, Gehron RP. Marrow stromal stem cells[J]. J Clin Invest, 2000, 105(12): 1663-1668.
- [5] Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection in neonatal mouse brains[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(19): 10711-10716.
- [6] 姜红, 高旭光. 骨髓间充质干细胞在神经系统疾病中的应用[J]. 中国康复理论与实践, 2004, 10(3): 169-171.
- [7] Ankeny DP, McTigue DM, Jakeman LB. Bone marrow transplants provide tissue protection and directional guidance for axons after contusive spinal cord injury in rats[J]. Exp Neurol, 2004, 190: 17-31.
- [8] Zurita M, Vaquero J. Functional recovery in chronic paraplegia after bone marrow stromal cells transplantation[J]. Neuro Report, 2004, 15(7): 1105-1108.
- [9] 周青, 张世忠, 徐如祥, 等. 神经干细胞移植及术后处理: 附 70 例报告[J]. 第一军医大学学报, 2004, 24(10): 1207-1209.
- [10] 步星耀, 张永福. 骨髓间充质干细胞移植治疗脊髓损伤[J]. 实用诊断与治疗杂志, 2004, 18(4): 259-261.
- [11] 赵宗茂, 张庆俊, 韩忠朝, 等. 骨髓间质干细胞移植对大鼠脊髓损伤神经功能恢复的影响[J]. 中华神经外科杂志, 2003, 19(1): 58.
- [12] Lee JB, Kuroda S, Shichinohe H, et al. A pre-clinical assessment model of rat autogenous bone marrow stromal cell transplantation into the central nervous system[J]. Brain Res Protoc, 2004, 14: 37-44.
- [13] 唐云安, 王瑞淑, 张成, 等. 大鼠脊髓匀浆上清液对骨髓间质干细胞的诱导分化作用[J]. 中风与神经疾病杂志, 2003, 20(3): 536.
- [14] 梅斯凡, 秦书俭, 范广宇, 等. 损伤脊髓组织液对大鼠骨髓基质细胞向神经细胞诱导分化的研究[J]. 中国临床解剖学杂志, 2005, 23(3): 264-267.
- [15] Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons[J]. J Neurosci Res, 2000, 61: 364-370.
- [16] Schengrund CL, Mummert CM. Exogenous gangliosides. How do they cross the blood-brain barrier and how do they inhibit cell proliferation[J]. Ann NY Acad Sci, 1998, 845: 278-284.
- [17] Levi Montalcini R. The nerve growth factor thirty-five years later[J]. Science, 1987, 237: 1154-1162.
- [18] 卓豫, 廖维宏, 吴宝明, 等. GM-1 对脊髓损伤后神经细胞凋亡的影响[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2003, 13(9): 536-538.
- [19] Man Y, Li H W, Yang B, et al. Effects of different dose of ganglioside on proliferation and differentiation of nerve stem cells[J]. Chin J Clin Rehabil, 2004, 8(22): 4634-4635.
- [20] Walker JB, Harris M. GM-1 ganglioside administration combined with physical therapy restores ambulation in human with chronic spinal cord injury[J]. Neurosci Lett, 1993, 161: 174-176.
- [21] Hakonori SI. Bifunctional role of glycosphingolipids: modulators for transmembrane signaling and mediators for cellular interactions[J]. J Biol Chem, 1990, 265(31): 18713-18716.
- [22] 唐向东. 神经节苷脂的结构、合成和功能[J]. 生命的化学, 1995, 15(2): 32-34.
- [23] 项鹏, 夏文杰, 张丽蓉, 等. 碱性成纤维生长因子等诱导间质干细胞分化为神经元样细胞的研究[J]. 中华神经科杂志, 2002, 35(3): 165-167.
- [24] 杨立业, 刘相名, 惠国桢, 等. 丹参诱导鼠间充质干细胞向神经元分化[J]. 中华神经外科疾病杂志, 2003, 2(1): 29-32.

(收稿日期: 2006-06-22)



图1.4 TNF-α 干预4天后呈现形态学细胞形态改变 (400 ×)



图2.1 培养3周的hMSCs (100 ×)



图2.2 人hMSCs诱导TNF-α形态学变化 (100 ×)



图2.3 诱导分化6天后AR染色阳性细胞 (100 ×)



图2.4 诱导分化6天后AR染色阳性细胞 (100 ×)

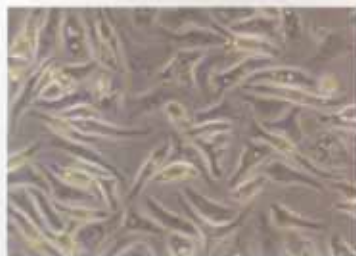


图2.1 hMSCs大多呈长纺锤状，贴壁生长，胞体饱满 (200 ×)