

# 骨髓间充质干细胞体外趋化神经前体细胞的机制

薛群<sup>1,2</sup> 苗宗宁<sup>1</sup> 华军<sup>3</sup> 曲静<sup>1</sup> 王明元<sup>1,4</sup> 金钧<sup>5</sup> 施勤<sup>1</sup>陈永井<sup>1</sup> 方振羊<sup>1,4</sup> 惠国桢<sup>5</sup> 张学光<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>苏州大学生物技术研究所、江苏省干细胞研究重点实验室, 苏州 215006; <sup>2</sup>苏州大学附属第一医院神经内科, 苏州 215006; <sup>3</sup>苏州大学附属儿童医院急救科, 苏州 215003; <sup>4</sup>苏州市红十字中心血站, 苏州 215006; <sup>5</sup>苏州大学附属第一医院神经外科, 苏州 215006)

**摘要** 骨髓间充质干细胞(BMSC)和神经前体细胞(NPC)移植于脑组织损伤动物的实验证明这两类细胞移植后均能在体内迁徙,与周围细胞整合,促进神经功能修复。BMSC促进神经功能修复的机制之一被认为与其分泌一些细胞因子和趋化因子有关,但具体机制不十分明确。为从基质细胞衍生因子-1 $\alpha$ (SDF-1 $\alpha$ )及其唯一的受体CXCR4这对分子相互作用的机制上探讨BMSC移植的可能治疗作用,实验采用ELISA法检测了体外培养的BMSC上清液中SDF-1 $\alpha$ 的含量,体外微孔隔离室迁移实验发现NPC能在BMSC分泌的培养上清液中SDF-1 $\alpha$ 的作用下发生定向迁移,特异性抗CXCR4单抗能有效阻断NPC的定向迁移效应,证实了BMSC分泌的SDF-1 $\alpha$ 促进表达CXCR4的NPC向病灶处迁移可能是促进神经功能修复的机制之一,从而为干细胞移植治疗神经功能缺损提供了一个新的思路。

**关键词** 骨髓间充质干细胞;神经前体细胞;SDF-1 $\alpha$ ;CXCR4;趋化

间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)具有自我更新和多向分化能力的特点。其主要来源骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)可诱导分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞和肌母细胞<sup>[1,2]</sup>,并在一定的条件下可分化为神经细胞<sup>[3-5]</sup>,在体内迁移<sup>[6]</sup>,而且可进行自体移植,避免免疫排斥,被认为是治疗多种疾病的良好细胞来源。有文献报道<sup>[7]</sup>,BMSC移植入脑缺血性病大鼠体内可使神经功能的缺损得到改善,并能表达神经细胞表型,但其作用机制尚未明了,有推测可能并非是由于新植入的细胞分化成神经细胞产生功能所致,而是由于植入的BMSC分泌了一些生物因子,改善了脑的可塑性,或吸引存在于脑组织中的少量神经前体细胞(neural progenitor cell, NPC)到达损伤部位所致,这些均值得进一步探讨。

为了进一步分析BMSC与NPC相互之间存在某种关联机制,本实验首先分析了体外培养的NPCs表达化学趋化因子受体CXCR4,并证实其在炎症因子TNF- $\alpha$ 作用下可上调表达,继而采用ELISA法检测到体外培养的BMSC可分泌CXCR4唯一配体——基质细胞衍生因子1- $\alpha$ (stromal cell derived factor1 $\alpha$ , SDF-1 $\alpha$ ),在此基础上证实表达CXCR4的NPC能

在BMSC分泌的SDF-1 $\alpha$ 作用下定向迁移。从体外实验揭示BMSC可通过分泌SDF-1 $\alpha$ 介导表达CXCR4的神经前体细胞定向迁移,这为进一步研究BMSC单独或联合移植治疗神经功能缺损提供新的思路。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

DMEM、DMEM/F12培养基,谷氨酰胺和N2添加剂(Gibco BRL);胎牛血清(FBS)(Hyclone,美国);重组人碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)(Peprotech Inc,美国);淋巴细胞分离液(Ficoll,比重1.077 g/ml,上海试剂二厂);兔抗人神经元特异性烯醇化酶(neuron specific enolase, NSE)单克隆抗体(Boster,中国);兔抗人神经微丝(neurofilament, NF-M)单克隆抗体(Antibody Diagnostic,美国);兔抗人胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acid protein, GFAP)单克隆抗体(Boster,中国);兔抗人巢蛋白(nestin)单克隆抗体(Boster,中国),鼠抗人微管相关蛋白(microtubule

收稿日期:2004-09-13 接受日期:2004-11-11

\*通讯作者。Tel: 0512-65125022, Fax: 0512-65104908, E-mail: smbxuegz@public1.sz.js.cn

associated protein-2, MAP-2)单克隆抗体(Boster,中国);鼠抗人少突胶质细胞标志O4(Oligodendrocyte marker O4, O4)单克隆抗体(R&D,英国);ABC试剂盒为博士得公司产品。鼠抗人单克隆抗体CD19和CD11b、CD44(Exalpha Biological Inc., MA)、CD29、CD106及CD105(SH2)(Ansell, 美国)、CD34(Caltag Laboratories, 美国)、HLA-DR(eBioscience, 美国)、CD45(Immunotech, 法国),鼠抗人AC133-1单克隆抗体(MACS, 美国),CXCR4阻断型mAb, CXCR4-PE mAb、SDF-1 $\alpha$ 及其ELISA试剂盒(R&D, 英国)。倒置像差显微镜(Olympas CK40, 日本),CO<sub>2</sub>培养箱(Jouan, 法国),流式细胞仪(Beckmancoult, 美国),自动酶标检测仪(BioRad 550, 美国),Transwell板(Costar, 美国)。

## 1.2 方法

**1.2.1 神经前体细胞的分离培养** 收集孕8~12周流产的胚胎。按医院规定和家属同意,常规方法分离脑组织,将皮层及侧脑室旁的脑组织分别剪碎,并用移液管轻轻吹打后过200目滤网,获得单细胞悬液。将所得神经前体细胞加入神经前体细胞培养基(DMEM/F12 1:1, B27 1:50, 20 ng/ml bFGF, 100 u/ml 青霉素, 100 u/ml 链霉素),置于5% CO<sub>2</sub>, 37 °C饱和湿度CO<sub>2</sub>培养箱培养3~5天后换液,传代采用机械分离的方法。培养细胞用20% DMSO, DMEM/F12常规冻存置于液氮。

**1.2.2 神经前体细胞的鉴定** 将NPC种于经多聚鸟氨酸、层黏连蛋白处理的培养皿,24~72 h后用4%多聚甲醛固定0.5 h,按常规方法进行免疫荧光或免疫组化染色分析。主要步骤如下:培养细胞经PBS洗1遍后,4%多聚甲醛固定0.5 h, PBS洗涤3次,3%过氧化氢处理10 min, PBS洗涤3次,0.3% Triton X-100处理0.5 h, PBS漂洗3次,10%牛血清室温封闭20 min,分别加入兔抗人NSE、GFAP、NF-M、巢蛋白一抗或鼠抗人MAP-2、Gal-C、O4一抗室温温育2 h或4 °C过夜,然后PBS洗3次,加入羊抗兔或羊抗鼠二抗温育0.5 h。ABC法染色按说明书进行。3,3-二氨基联苯胺显色,常规在显微镜下观察,或加入FITC荧光二抗,在荧光显微镜下观察。

**1.2.3 骨髓基质细胞的分离培养** 收集志愿者成人骨髓,采用淋巴细胞分离,获得单个核细胞,经PBS洗涤后用含20% FBS的DMEM培养基置于5% CO<sub>2</sub>, 37 °C饱和湿度CO<sub>2</sub>培养箱培养24~48 h,去

除不贴壁细胞后继续培养。细胞可用常规方法冻存,每3天换液,5~8天传代一次。

**1.2.4 免疫荧光标记和流式细胞仪检测** 培养细胞(2代以后)用0.25%胰蛋白酶和1 mmol/L EDTA消化和洗涤后,细胞置含1%小牛血清的PBS分别加入下列鼠抗人单克隆抗体:CD11b-FITC、CD34-FITC、CD45-PE、CD19-FITC、CD29-FITC、CD44-PE、CD105-FITC、CD106-FITC和HLA-DR-PE,置4 °C温育0.5 h,直标单抗可直接用流式细胞仪分析,而间标单抗再加兔抗鼠FITC二抗,置4 °C温育0.5 h,进行流式细胞仪分析。

**1.2.5 ELISA检测SDF-1 $\alpha$ 在BMSC培养上清液的含量** 按试剂盒要求操作,每个样品做3个复孔,另设空白对照。

**1.2.6 免疫荧光标记及流式细胞检测TNF- $\alpha$ 对NPC表达CXCR4的影响** 将皮层和侧脑室下来源的NPC分别与不同浓度TNF- $\alpha$ (20 ng/ml, 40 ng/ml)温育10天,CXCR4-PE单抗标记后,直接用流式细胞仪分析CXCR4的表达。

**1.2.7 微孔隔离室穿越实验(Boyden Chamber Assay)** 微孔隔离室(Transwell)板下室分别置600  $\mu$ l BMSC培养上清液、含4 ng/ml SDF-1 $\alpha$ 的DMEM及含20%FBS的DMEM空白对照,上室加入100  $\mu$ l ( $5 \times 10^5$ ) NPC,置5% CO<sub>2</sub>, 37 °C饱和湿度CO<sub>2</sub>培养箱培养4 h,然后收集下室细胞,用流式细胞仪计数。

**1.2.8 阻断试验** 将CXCR4阻断型抗体20  $\mu$ g/ml和IgG同型对照分别与 $5 \times 10^5$  NPC相互作用20 min后,加入上室; BMSC培养上清液、含4 ng/ml SDF-1 $\alpha$ 的DMEM及DMEM空白对照置于transwell板下室,5% CO<sub>2</sub>, 37 °C饱和湿度CO<sub>2</sub>培养箱温育4 h,然后收集下室细胞,采用流式细胞仪计数。

## 2 结果

### 2.1 悬浮培养的皮层和侧脑室下来源的神经球中含有多向分化能力的神经前体细胞

悬浮培养的皮层和侧脑室下来源的单个神经细胞悬浮液,经约7~10天长出许多悬浮的神经球,免疫荧光鉴定提示NPC表达巢蛋白(图1)。免疫荧光标记和流式细胞仪分析提示,NPC表达干细胞标志CD133-1(图2),而不表达CD34和CD45。神经球种于经多聚鸟氨酸、层黏连蛋白处理的培养皿后迅速贴壁,部分细胞由神经球爬出,呈放射状生长,免疫组化提示NPC表达巢蛋白,并能分化成表达

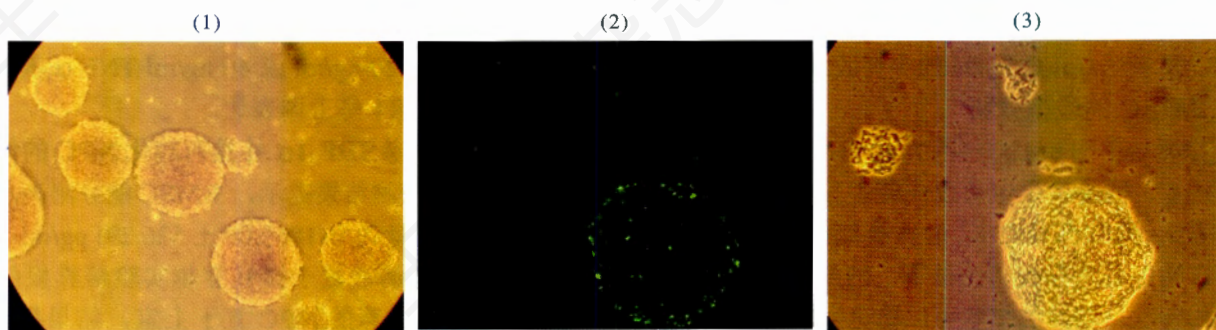


图1 NPC的体外培养及免疫荧光鉴定

1: 悬浮培养的皮层和侧脑室下来源的单个神经细胞悬浮液, 经约7~10天长出许多悬浮的神经球, 每个球可由上百个细胞组成, 倒置显微镜, 100×; 2: 免疫荧光染色显示NPC表达巢蛋白, 荧光显微镜, 100×; 3: 与(2)同一视野光镜, 100×。

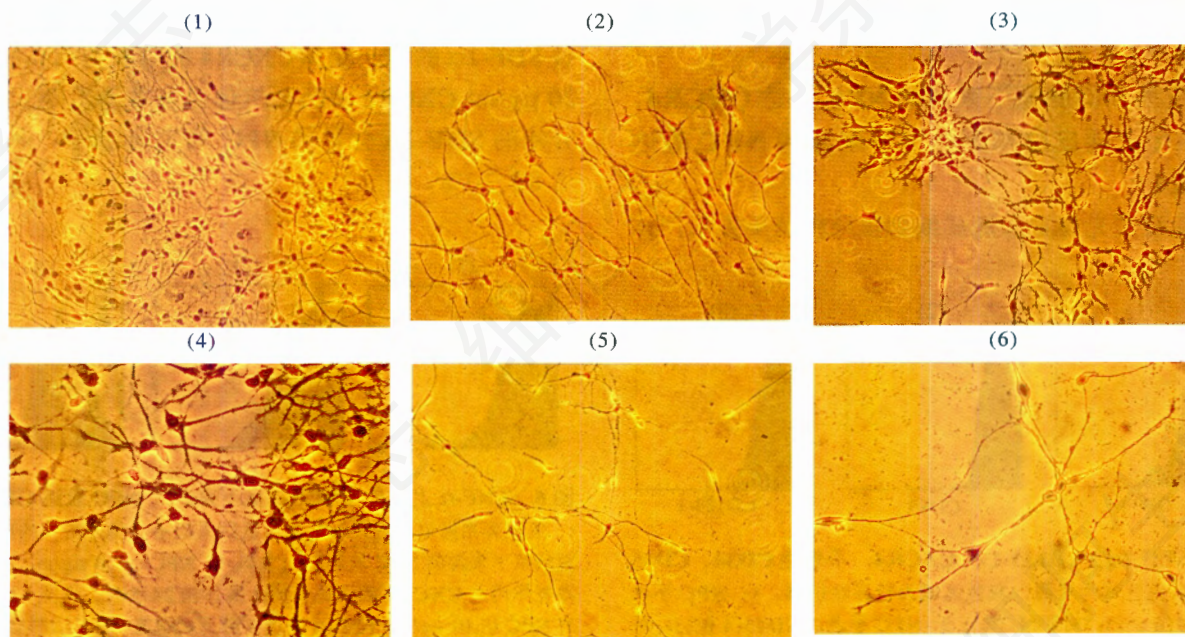


图3 NPC具有分化成神经元和胶质细胞的能力

神经球种子经多聚鸟氨酸、层黏连蛋白处理的培养皿后迅速贴壁, 部分细胞由神经球爬出, 呈放射状生长, 免疫组化提示: 1: NPC贴壁后仍有部分巢蛋白染色阳性, ABC法, 倒置显微镜, 100×; 2: NPC贴壁后, 神经细胞表达神经元标志NF-M, ABC法, 倒置显微镜, 100×; 3: NPC贴壁后, 神经细胞表达神经元标志MAP-2, ABC法, 倒置显微镜, 100×; 4: NPC贴壁后, 神经细胞表达星型胶质细胞标志GFAP, ABC法, 倒置显微镜, 200×; 5: NPC贴壁后, 神经细胞表达少突胶质细胞标志Gal-C, ABC法, 倒置显微镜, 100×; 6: NPC贴壁后, 神经细胞表达少突胶质细胞标志O4, ABC法, 倒置显微镜, 200×。

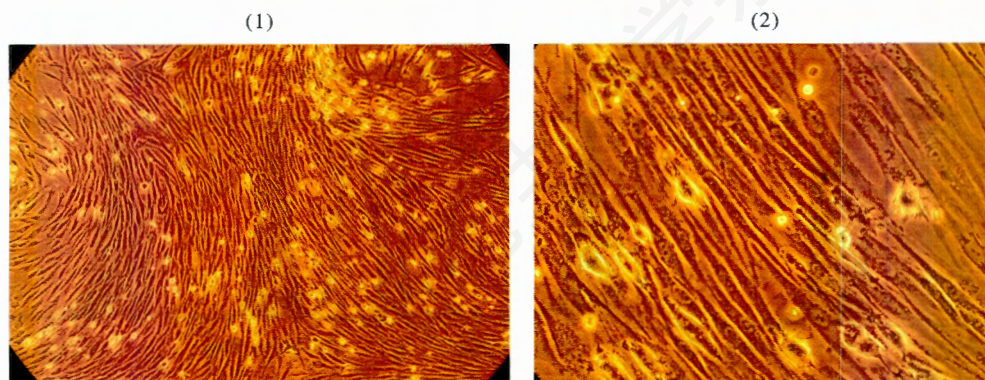


图4 BMSC的体外培养

1: 贴壁培养的BMSC经约7~10天后逐渐形成扁平单层细胞, 呈漩涡状生长, 倒置显微镜, 40×; 2: 在细胞长满培养瓶时, 胞体变得细长, 形态类似成纤维细胞, 倒置显微镜, 200×。

GFAP 的星形胶质细胞、表达 MAP-2 和 NF-M 的神经元以及表达 Gal-C 和 O4 的少突胶质细胞 (图 3)。

## 2.2 BMSC 的表型分析

贴壁培养的 BMSC 经约 7~10 天后逐渐形成扁平单层细胞, 呈漩涡状生长或成簇生长; 在细胞长满培养瓶时, 胞体变得细长, 形态类似成纤维细胞 (图 4)。在胎牛血清存在的条件下, 细胞在 5~8 天左右可传代一次。培养的细胞可以稳定生长传代, 而且体外培养 10 代以后, 细胞的增殖速度无明显减慢。免疫荧光标记和流式细胞仪检测显示: BMSC 表达 CD29、CD44 和 CD105(SH2), 但不表达 CD11b、CD34、CD45、CD19、CD106 和 HLA-DR 等表面抗原分子 (图 5)。

## 2.3 皮层和侧脑室下来源的 NPC 表达 CXCR4, TNF- $\alpha$ 上调皮层和侧脑室下来源的 NPC 表达 CXCR4

免疫荧光标记和流式细胞仪分析结果提示, 体

外培养的皮层和侧脑室下来源的 NPC 表达 CXCR4 (图 6)。NPC 在 20 ng/ml 或 40 ng/ml TNF- $\alpha$  激发作用下可使 CXCR4 呈上调表达。

## 2.4 BMSC 分泌 SDF-1 $\alpha$ 并具有趋化 NPC 的作用

SDF-1 $\alpha$  检测结果提示, BMSC 能分泌高水平 SDF-1 $\alpha$ , 分泌量约为  $(1860.00 \pm 526.29)$  pg/ml。将 BMSC 培养上清液置于微孔穿越实验培养板的下室, 体外分离培养的 NPC 置于上室, 结果提示: NPC 在 BMSC 培养上清液的作用下, 发生了定向迁移, 迁移率为  $(26.64 \pm 16.36)\%$ , 含 20% FBS 的 DMEM 空白对照的迁移率为  $(0.54 \pm 0.44)\%$ , 两者有显著差异 ( $F=10.16, P<0.05$ ), 而且这种迁移可被 SDF-1 $\alpha$  的唯一配体 CXCR4 的阻断型抗体阻断, 20  $\mu$ g/ml CXCR4 阻断型抗体可有效地阻断 BMSC 分泌的 SDF-1 $\alpha$  介导的 NPC 的定向迁移, 抑制率达 83.20%。

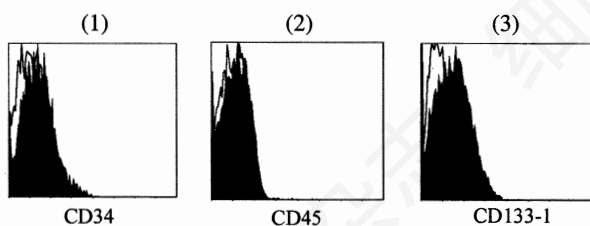


图 2 NPC 表达 CD133-1 和 CXCR4, 不表达 CD34、CD45 叠加图白色区域为对照, 灰色区域为特异性抗体。1: NPC 不表达 CD34(6.8%), 对照(4.3%); 2: NPC 不表达 CD45(4.0%), 对照(4.3%); 3: NPC 表达 CD133-1(37.7%), 对照(1.4%)。

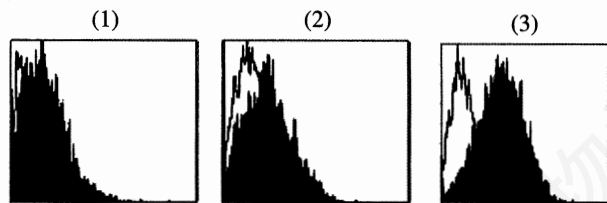


图 6 TNF- $\alpha$  上调皮层和侧脑室下来源的 NPC 表达 CXCR4

1: 免疫荧光标记和流式细胞仪分析结果提示, 体外培养的皮层和侧脑室下来源的 NPC 表达 CXCR4; 2: NPC 在 20 ng/ml TNF- $\alpha$  激发作用下 CXCR4 的表达有所上升, 由 24.5% 上调至 42.7%; 3: NPC 在 40 ng/ml TNF- $\alpha$  激发作用下 CXCR4 的表达明显上升, 由 24.5% 上调至 66.8%。

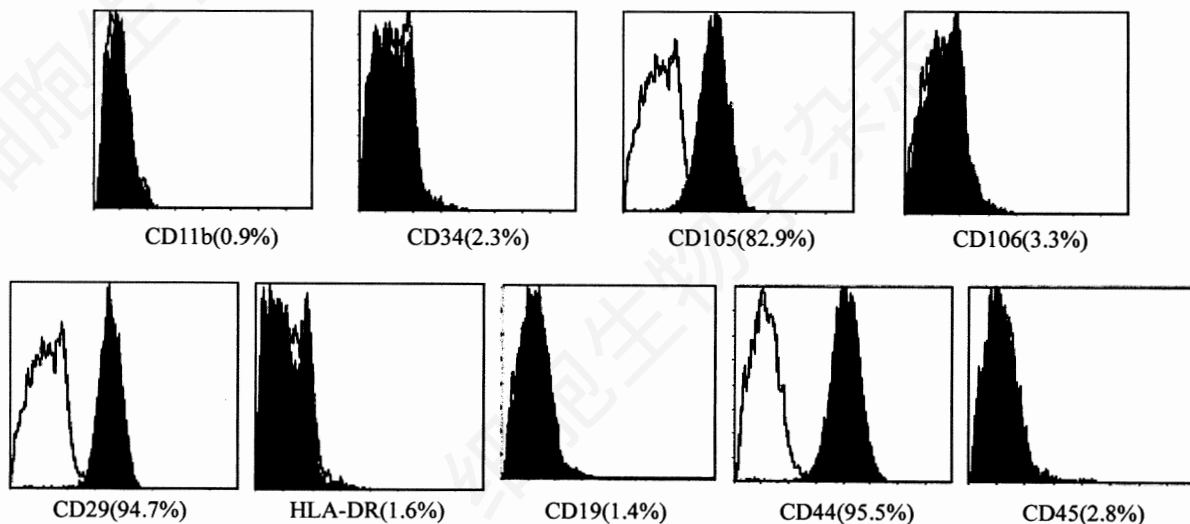


图 5 BMSC 表面抗原 FACS 检测结果(叠加图)

BMSC 表达 CD29、CD44 和 CD105(SH2), 但不表达 CD11b、CD34、CD45、CD19、CD106、HLA-DR 等表面抗原分子。白色区域为对照, 灰色区域为特异性抗体。

### 3 讨论

近 10 年来, 人们致力于采用神经移植来探讨中枢神经系统的发育、再生和可塑性, 同时也显示其在神经系统疾病损伤组织的修复和功能重建中的巨大潜能。尽管由流产胎儿组织中获取移植种子细胞进行的移植, 可使患者的临床症状获得明显改善, 但是, 破坏胎儿组织来获取种子细胞的做法会导致伦理与法律问题, 并且由于免疫排斥及胎儿组织代谢依赖于脂质而非糖类等原因, 仅 5%~10% 细胞存活下来, 所以人们试图采用如 MSC、星型胶质细胞、成纤维母细胞等作为新的神经移植的组织来源。而良好的可用于神经移植的细胞应有以下特点: 易于获取, 快速扩增, 免疫源性低, 能长期存活并与宿主细胞整合等。骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cell, BMSC)/ 基质细胞(bone marrow stromal cell, BMSC)是其中最有可能的来源。BMSC 移植入脑缺血性病变大鼠体内可使神经功能的缺损得到改善, 其作用机制可能是多方面的。有文献提示<sup>[7]</sup>: BMSC 能穿越血脑屏障并转化成为胶质细胞, 能向损伤区迁徙, 显著改善神经功能, 并能表达神经细胞表型。另有文献报道<sup>[8]</sup>其治疗机制之一就是能分泌一些细胞因子和趋化因子, 趋化内源性 NPC, 进行修复, 但具体机制尚不清楚。

Corti 等<sup>[9]</sup>的研究提示骨髓可能是一个干细胞库。Ratajczak 等<sup>[10]</sup>在外周血和骨髓中检测到神经细胞、肌细胞、肝细胞前体细胞标志 mRNA, 并认为这些细胞是在趋化因子的作用下归巢于骨髓, 使骨髓成为干细胞库。SDF-1 在促进骨髓 CD117<sup>+</sup> 干细胞归巢于缺血型损伤的心肌的报道, 提示 SDF-1 在干细胞归巢中可能起着重要的作用<sup>[11]</sup>。同时有报道脑膜细胞分泌的 SDF-1 能趋化外颗粒层神经干细胞的研究<sup>[12]</sup>, 这些研究结果促使我们推测 BMSC 是否具有类似的作用?

本实验首先对 BMSC 进行分离培养, 并用免疫荧光标记和流式细胞仪检测了培养细胞的细胞表面分子, 证实培养细胞具有与文献报道基本一致的细胞表面标志<sup>[1-4]</sup>。另外还进行了 BMSC 向神经细胞诱

导的研究, 证实能在 BHA 和 DMSO 等的作用下诱导表达 NF-M、MAP-2 及 GFAP 等神经元和胶质细胞标志, 而且还能向脂肪细胞诱导的研究(此处未列出), 证实所得细胞为具有多向分化能力的 BMSC。进而采用 ELISA 法检测到 BMSC 培养上清液含高水平的 SDF-1 $\alpha$ 。

本实验同时进行了 NPC 的分离培养, 用免疫荧光标记和免疫组化的方法鉴定所得细胞表达 NPC 标志巢蛋白, 并具有分化成神经元、少突胶质细胞和星形胶质细胞的多向分化能力的神经前体细胞。NPC 表达干细胞标志 CD133-1 和趋化因子 SDF-1 $\alpha$  唯一受体 CXCR4。

在此基础上采用了体外微孔隔离室迁移实验, 结果证明 NPC 能在 BMSC 培养上清液的作用下发生定向迁移, 进一步为了证明是 BMSC 培养上清液中 SDF-1 $\alpha$  起的作用, 运用 CXCR4 的阻断型抗体阻断 NPC 上的 CXCR4, 结果使 NPC 迁移率明显下降, 20  $\mu\text{g/ml}$  CXCR4 阻断型抗体阻断 NPC 上的 CXCR4 受体后, 可抑制 83.20% 的 NPC 的迁移, 证明 NPC 上的 CXCR4 为功能性受体, 在 NPC 的迁移中起了重要的作用。

另外我们还发现, NPC 在 TNF- $\alpha$  作用下上调表达了 CXCR4, 由此推断, 组织损伤后, 局部组织内产生 TNF- $\alpha$ , 继而通过上调 CXCR4 使 NPC 迁移能力增强。从而从机制上探讨了 BMSC 移植入脑缺血性病变受体后使神经功能的缺损得到改善的治疗作用, 为进一步临床应用提供了理论依据。

### 参考文献 (References)

- [1] Pittenger MF *et al. Science*, 1999, **284**: 143
- [2] Jiang Y *et al. Nature*, 2002, **418**: 41
- [3] Brazelton TR *et al. Science*, 2000, **290**: 1775
- [4] Woodbury D *et al. J Neurosci Res*, 2000, **61**: 364
- [5] Sanchez-Ramos J *et al. Exp Neurol*, 2000, **164**: 247
- [6] Kopen GC *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 10711
- [7] Zhao LR *et al. Exp Neurol*, 2002, **174**: 11
- [8] Chen J *et al. Stroke*, 2001, **32**: 1005
- [9] Corti S *et al. Exp Neurol*, 2002, **177**: 443
- [10] Ratajczak MZ *et al. Leukemia*, 2004, **18**: 29
- [11] Askari AT *et al. Lancet*, 2003, **362**: 697
- [12] Reiss K *et al. Neuroscience*, 2002, **115**: 295

## The Mechanism of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Chemoattract Neural Progenitor Cells *in Vitro*

Qun Xue<sup>1,2</sup>, Zhong-Nin Miao<sup>1</sup>, Jun Hua<sup>3</sup>, Jing Qu<sup>1</sup>, Ming-Yuan Wang<sup>1,4</sup>, Jun Jin<sup>5</sup>, Qing Shi<sup>1</sup>, Yong-Jing Cheng<sup>1</sup>,  
Zheng-Yang Fang<sup>1,4</sup>, Guo-Zhen Hui<sup>5</sup>, Xue-Guang Zhang<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>The Stem Cell Research Laboratory of Jiangsu Province, Institute of Biology Technical, Soochow University, Suzhou 215006,

China; <sup>2</sup> Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China;

<sup>3</sup> Department of Emergency, the Pediatric Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215003, China;

<sup>4</sup>The Blood Station of Soochow Red Cross Center, Suzhou 215006, China;

<sup>5</sup>Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China )

**Abstract** Brain trauma examination indicated that both bone marrow mesenchymal stem cells (BMSC) and neural progenitor cells (NPC) could migrate after transplantation, *in vivo*, and integrated into the cells around of them, so as to accelerate the recovery of neurological impairment. Although the mechanism of it is not clear, it was speculated that some chemokines or cytokines secreted by BMSC might contribute to it. This study discussed the possible mechanism dealing with the molecular SDF-1 $\alpha$ /CXCR4. BMSC were confirmed by ELISA to secrete high level of SDF-1 $\alpha$  [about (1860.00 $\pm$ 526.29) pg/ml]. Suggested by Boyden Chamber Assay, BMSC were able to chemoattract the CXCR4 positive NPC migration *in vitro*, which could be neutralized by the monoclonal antibody CXCR4. It is speculated that TNF- $\alpha$  may up-regulate the expression of CXCR4 on the NPC, thus enhance the migration ability of NPC. This provided a novel idea to neurological impairment therapy by stem cells transplantation.

**Key words** bone marrow mesenchymal stem cells; neural progenitor cells; stromal cell derived factor-1 $\alpha$ ; CXCR4; chemoattract

Received: September 13, 2004

Accepted: November 11, 2004

\*Corresponding author. Tel: 86-512-65125022, Fax: 86-512-65104908, E-mail: smbxuegz@public1.sz.js.cn