

# 体外诱导成年大鼠骨髓间充质干细胞分化为 5-羟色胺敏感性神经元

舒 畅 李廷玉\* 黄巧茵<sup>1</sup> 刘妙贞<sup>1</sup> 曾丽玲<sup>1</sup> 朱 虎<sup>1</sup> 苟毓林<sup>1</sup> 钟耀华<sup>1</sup> 陈小章<sup>1</sup>

(重庆医科大学附属儿童医院, 重庆 400014; <sup>1</sup>香港中文大学生理系上皮细胞研究中心, 香港)

**摘要** 体外诱导成年大鼠骨髓间充质干细胞分化为具有神经元表型和部分功能的细胞。在对 Woodbury 化学诱导法作改良的基础上, 加用全反式视黄酸对骨髓间充质干细胞作预诱导。诱导 3 h 后, 细胞开始表现神经元的形态特征, 细胞折光性增强, 形成收缩的双极或多极胞体和细长突起。细胞可以维持神经元样存活 72 h 以上。诱导 5 h 后, 对免疫染色的细胞用 DAPI 进行复染, (92.4±6.9)% 的细胞表达神经元特异性烯醇化酶。诱导 24 h 后, (93.9±5.2)% 的细胞表达成熟神经元的标志物神经丝 M+H。在给予 5-羟色胺刺激时可以产生与神经元相似的胞内钙离子峰, 且免疫组化证实 5-羟色胺 1A 受体在干细胞上表达微弱, 但在分化后的神经元中表达较强。实验不仅从形态、细胞标志物而且从功能上证实诱导后的细胞为 5-羟色胺敏感性神经元。

**关键词** 分化; 5-羟色胺; 钙离子; 骨髓间充质干细胞; 神经元

已有众多文章报道骨髓间充质干细胞(MSCs)可以在体内或体外分化为神经元, 为中枢神经系统外伤及退行性疾病的治疗提供了光明的前景<sup>[1-6]</sup>。从概念上讲, 判断 MSCs 是否真正分化为神经元必须证实分化后的细胞具有神经元的表型和功能反应。但在研究 MSCs 体外向神经元分化的文章中, 多数文章只是从形态及标记物方面提供证据, 并无功能方面的证明。因此我们对 Woodbury 化学诱导法<sup>[6]</sup>作了改良后, 将大鼠骨髓间充质干细胞(rMSCs)向神经元诱导, 并在形态、表面标记物之外采用胞内钙代谢法对诱导后的神经元样细胞作功能检测, 以证实其确实分化为有功能反应的神经元。

## 1 材料与方法

### 1.1 rMSCs 的原代培养

由 8~10 周 SD 大鼠股骨分离 MSCs<sup>[6]</sup>。将分离出的 rMSCs 按  $3 \times 10^6$  个/瓶的浓度接种在 25 cm<sup>2</sup> 的塑料培养瓶中, 培养液为 DMEM/F12/10%FBS/1%青、链霉素。置于 37 °C, 5%CO<sub>2</sub> 湿化培养箱中培养。24 h 后倾去上清液及未贴壁细胞, 加入新鲜培养液培养。以后每 3~4 天换液。当细胞长至 80% 汇合时 2.5% 胰蛋白酶消化离心, 按 1:2 或 1:3 的浓度传代。将细胞接种在塑料培养瓶中可传代至 28 代以上。

### 1.2 单克隆 rMSCs

将 6~10 代的 rMSCs 用 Hanks 平衡盐溶液(HBSS)清洗后, 2.5% 胰蛋白酶消化离心。用新鲜培养液将细胞再悬, 稀释至 10 个/ml 浓度后, 按 4 ml/皿种在 60 mm×10 mm 的塑料培养皿中。置于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 湿化培养箱中培养。次日换液, 于显微镜下(Olympus IX70)找到单个生长的细胞并标记。每 3 天换液直至克隆形成。用克隆环挑取克隆<sup>[7]</sup>。

### 1.3 诱导 rMSCs 向神经元分化

将 13~25 代的 rMSCs 种在置于六孔板中的涂有 L 型多聚赖氨酸的盖玻片上或 75 cm<sup>2</sup> 塑料培养瓶中, 培养液为 DMEM/F12/10%FBS。24 h 后换为预诱导液[DMEM/F12/10%FBS/10<sup>-7</sup> mol/L 全反式视黄酸(ATRA)/10 ng/ml 碱性成纤维母细胞生长因子(bFGF)]<sup>[5]</sup>。在开始神经元诱导前, 倾去预诱导液, 并用 HBSS 清洗细胞后加入改良神经元诱导液[MNM, DMEM/1.6% 二甲基亚砜(DMSO)/160 μmol/L 丁基茴香醚(BHA)/20 mmol/L KCL/1.6 mmol/L 丙戊酸/8 μmol/L 毛喉素(forskolin)/0.8 μmol/L 氢化可的松/4 μg/ml 胰岛素]<sup>[8]</sup>。为了维持长时间神经元分化, 在

收稿日期: 2006-02-23 接受日期: 2006-05-23

国家自然科学基金资助项目(No. 30070382)

\* 通讯作者。Tel: 023-63623604, Fax: 023-63622874, E-mail:

tyli@vip.sina.com

24 h 后加入 ATRA 和 bFGF 以防止细胞死亡。

### 1.4 细胞内钙测定

将细胞接种在置于六孔板中的涂有 L 型多聚赖氨酸的盖玻片上, 加入 Fura-2(缓冲盐水/3  $\mu\text{mol/L}$  Fura-2-acetoxymethylester/1.6  $\mu\text{mol/L}$  pluronic F127) 后 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 45 min。用细胞内离子成像系统记录单个活细胞中 Fura-2 在 340 nm 和 380 nm 激发的荧光图像信号, MetaFlour 高阶荧光离子流影像分析软件(Universal Imaging Corp.)分析处理信号。这两个信号的比值与钙离子( $\text{Ca}^{2+}$ )的浓度成正比<sup>[9]</sup>。为了激发钙离子的流动, 给予 10 mmol/L 5-羟色胺(5-HT)刺激细胞<sup>[10]</sup>。

### 1.5 免疫细胞化学和免疫荧光染色

免疫细胞化学: 4% 多聚甲醛固定细胞。PBS 清洗后, 阻断血清室温温育 1 h, 一抗 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜(兔抗 5-HT<sub>1A</sub> 受体抗体, Santa Cruz, USA; 小鼠抗神经丝 M+H 抗体, Zymed Laboratories Inc., 均按 1:500 的比例稀释在 PBS-Triton 中; 阴性对照为 PBS)。PBS 清洗后二抗室温温育 1 h(生物素标记的抗兔 IgG, 1:250, Jackson ImmunoResearch, USA)。DAB 显色。Olympus IX70 系统观察记录。

免疫荧光染色: 100% 甲醇-20  $^{\circ}\text{C}$  固定 3~5 min。PBS 清洗后, 阻断血清室温温育 1 h, 一抗 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜(兔抗神经元特异性烯醇化酶抗体, Biodesign, USA, 按 1:400 的比例稀释在 PBS-Triton 中; 阴性对照: PBS)。PBS 清洗 3 次, FITC 标记

的羊抗兔二抗(1:100, Bacton Diokinson)室温温育 1 h 后 PBS 清洗, DAPI 复染, 1 h 内荧光显微镜(Olympus IX70)观察。

## 2 结果

### 2.1 rMSCs 的传代培养

将 rMSCs 培养于塑料培养瓶中可传代 28 代以上, 细胞的生长速度(传代时间)和形态无明显改变。rMSCs 贴壁生长呈扁平梭形, 漩涡状排列。单克隆细胞的生长速度和形态与正常细胞比较无明显差异(图 1)。

### 2.2 神经元的分化

2.2.1 形态学改变 诱导 3 h 后, 细胞开始表现神经元的形态特征, 细胞折光性增强, 形成收缩的双极或多极胞体和细长突起。细胞可以维持神经元样存活 72 h 以上, 72 h 时可观察到部分细胞开始死亡, 96 h 时, 几乎所有的细胞都已经死亡(图 2)。

2.2.2 神经元标记物的表达 诱导 5 h 后, 可以检测到分化后神经元的标记物——神经元特异性烯醇化酶(NSE)。对免疫染色的细胞用 DAPI 进行复染, (92.4 $\pm$ 6.9)% 的细胞表达 NSE(图 3 a~c)。诱导

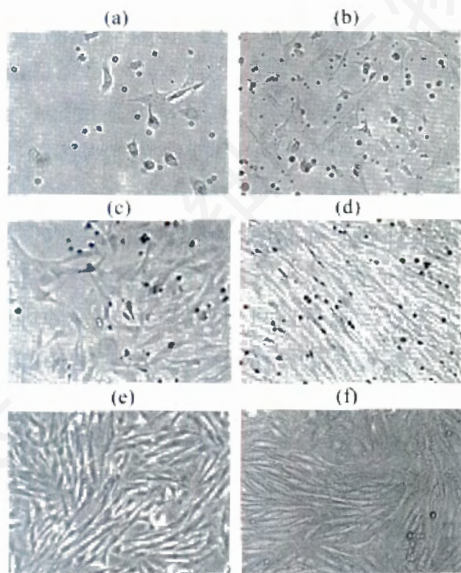


图 1 rMSCs 的生长形态

a, b, c, d: 0 代培养 3、5、8、10 天; e, f: 第 18、25 代(单克隆)细胞。

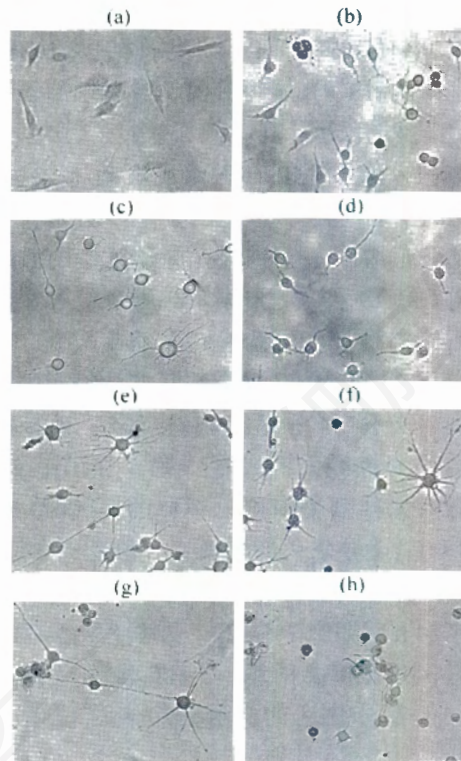


图 2 rMSCs 向神经元分化的形态变化

a 为 rMSCs, b~h 分别为换用 MNM 后 3、6、9、24、48、72、96 h 时的细胞形态。

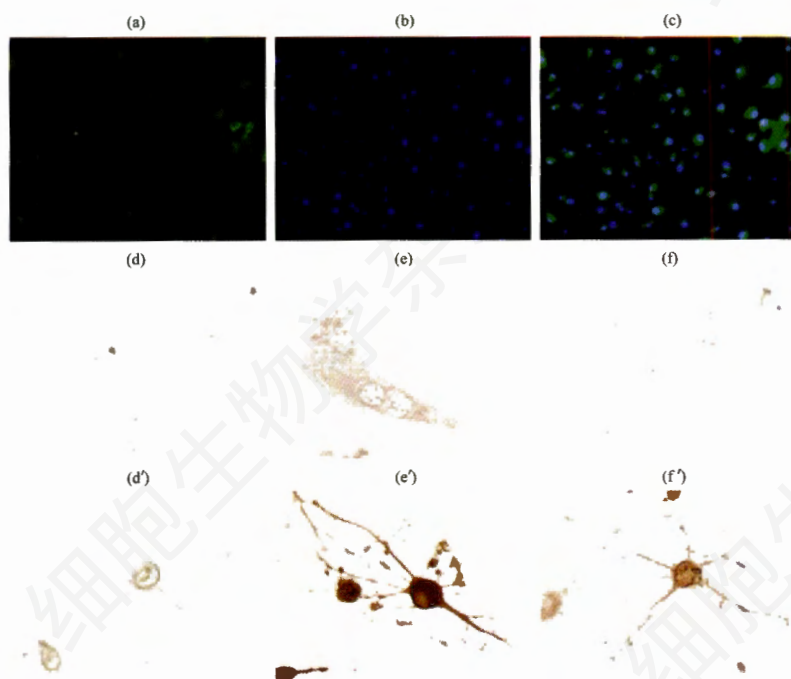


图3 细胞免疫染色检测神经元标记物的表达

神经元特异性烯醇化酶(NSE)在诱导后5 h的神经元样细胞中表达(a)。NSE免疫荧光染色(a)后用DAPI进行核复染(b),(c)为NSE(a)和DAPI复染的核(b)的Merge图片;随机计数8~10个视野300多个细胞( $n>3$ ),结果显示( $92.4\pm6.9$ )%的细胞呈NSE阳性。神经丝M+H在rMSCs中表达微弱(e),在诱导后24 h的神经元样细胞中强表达(e')。5-HT<sub>1A</sub>R在rMSCs中表达微弱(f),在诱导24 h的神经元样细胞中表达较强(f')。d, d'为PBS阴性对照。

24 h后, ( $93.9\pm5.2$ )%的细胞表达成熟神经元的标志物神经丝M+H(NF-M+H)。在传代纯化的rMSCs和单克隆来源的rMSCs中得到的诱导后细胞表达神经元标记物的百分比相似。

**2.2.3 5-HT引起的胞内Ca<sup>2+</sup>浓度改变** 由于Ca<sup>2+</sup>在神经元的活动(包括神经元的分化)中起着重要的调节作用,我们观察了在神经元分化过程中激动剂引起的胞内Ca<sup>2+</sup>改变。结果显示一种普遍存在的神经递质——5-HT<sup>[10]</sup>引起的胞内Ca<sup>2+</sup>浓度改变。在诱导rMSCs分化24 h后的细胞中与其在神经元中引起的波峰相似。分化24 h后细胞的形态、功能和标志物的表达均与神经元的表型一致。在诱导2天、3天后的神经元样细胞中可见相似的反应(图4)。

**2.2.4 5-HT<sub>1A</sub>受体表达的改变** 细胞对5-HT敏感性由5-HT受体表达介导。因此我们用免疫组化检测了诱导24 h后细胞中5-HT<sub>1A</sub>受体亚型(5-HT<sub>1A</sub>R)表达。如图3中d和d'所示,5-HT<sub>1A</sub>R在干细胞上表达微弱,但在分化后的神经元中表达较强。

### 3 讨论

研究结果证实在特定的培养条件下,rMSCs可以被诱导分化为具有神经元表型和功能的细胞。在

诱导rMSCs向神经元分化时,我们对Woodbury的化学诱导法作了改良,将其神经元诱导液的浓度降低至原浓度的4/5,使诱导分化后的神经元的存活时间延长<sup>[6]</sup>。ATRA是一种对神经元发育至关重要的因子<sup>[5]</sup>,我们发现加入ATRA作预诱导可以将神经元的诱导率由原来的80%左右<sup>[6]</sup>提高至92%~94%。因此,ATRA可以用于诱导rMSCs产生大量神经元以治疗神经退行性和外伤性疾病,从而避免采用成年神经祖细胞治疗神经系统疾病中遇到的细胞来源少、取材困难等缺点。在传代16代的rMSCs和来自单个细胞克隆的rMSCs中得到的诱导率是相似的,显示可以通过传代纯化细胞。

迄今为止,众多关于MSCs分化为神经元的报道均是基于形态改变和神经元标志物如NF和NSE等的表达<sup>[1,11,12]</sup>而缺乏神经元功能性的指标。我们的研究在通过形态和标志物证实神经元分化的基础上进一步提供了功能方面的证据。5-HT和钙离子在神经元增殖、迁移和分化中起着重要调节作用<sup>[13-15]</sup>,因此我们比较了rMSCs和诱导后的神经元样细胞中5-HT引起的胞内钙离子变化。结果显示干细胞中5-HT引起的钙离子流小而在分化后的神经元中形成明显的钙离子峰。该钙离子峰与5-HT在脑组织来源

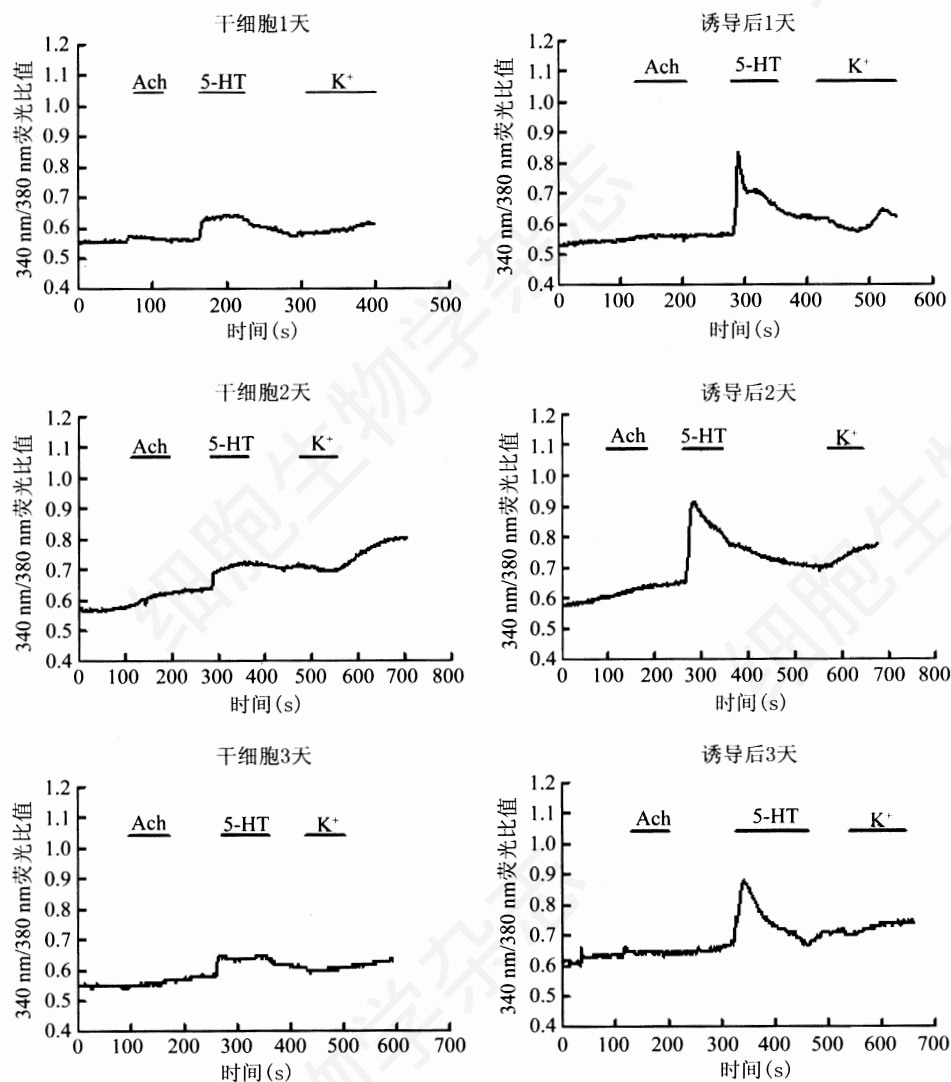


图4 神经元分化的功能性检测

胞内钙离子对 5-HT 的敏感性在诱导 24、48、72 h 后的神经元样细胞中较对照的 rMSCs 中明显增高。ACh: 乙酰胆碱。

神经元中引起的钙离子峰相似<sup>[14,16]</sup>。诱导前后细胞对 5-HT 敏感性的改变与免疫组化中细胞中 5-HT<sub>1A</sub>R 表达水平的改变相对应。因此 5-HT 敏感性胞内钙离子峰可以作为神经元分化的一个功能指标。

综上所述, 我们的研究在通过形态和标志物证实神经元分化的基础上进一步提供了功能上的证据: rMSCs 在诱导分化为神经元后其细胞内钙离子对 5-HT 反应明显增强, 因此 5-HT 敏感性的钙离子峰可作为神经元分化的功能性指标。此外, 我们还证实了 ATRA 可以促进 rMSCs 向神经元分化, 在加用了 ATRA 后, 细胞分化率高达 92%~94%, 这一分化率较已有文献中报道的均高, 为体外研究神经元的分化提供了良好的模型。

## 参考文献 (References)

- [1] Brazelton TR *et al.* *Science*, 2000, **290**: 1775
- [2] Crain BJ *et al.* *J Neurol Sci*, 2005, **233**: 121
- [3] Deng W *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **282**: 148
- [4] Kabos P *et al.* *Exp Neurol*, 2002, **178**: 288
- [5] Kim BJ *et al.* *Neuroreport*, 2002, **13**: 1185
- [6] Woodbury D *et al.* *J Neurosci Res*, 2000, **61**: 364
- [7] McFarland DC. *Methods Cell Sci*, 2000, **22**: 63
- [8] Black IB *et al.* *Blood Cells Mol Dis*, 2001, **27**: 632
- [9] Redmond L *et al.* *Neuron*, 2002, **34**: 999
- [10] Dierkes PW *et al.* *J Neurobiol*, 2005, **62**: 106
- [11] Tosh D *et al.* *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, **3**: 187
- [12] Hofstetter CP *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 2199
- [13] Berridge MJ. *Neuron*, 1998, **21**: 13
- [14] Beck A *et al.* *Cell Calcium*, 2002, **31**: 137
- [15] Vitalis T *et al.* *Dev Neurosci*, 2003, **25**: 245
- [16] Vanden Berghe P *et al.* *Neurogastroenterol Motil*, 2001, **13**: 493

## Induction of Adult Rat Bone Marrow Stem Cells into 5-Hydroxytryptamine-sensitive Neurons *in Vitro*

Chang Shu, Ting-Yu Li\*, Connie-Hau-Yan Wong<sup>1</sup>, Miu-Ching Lau<sup>1</sup>, Lai-Ling Tsang<sup>1</sup>, Hu Zhu<sup>1</sup>,

Yu-Lin Gou<sup>1</sup>, Yiu-Wa Chung<sup>1</sup>, Hsiao-Chang Chan<sup>1</sup>

( Children's Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400014, China; <sup>1</sup>Epithelial Cell Biology Research Center, Department of Physiology, Faculty of Medicine, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, China )

**Abstract** We successfully induced adult rat bone marrow stromal cells ( rMSCs) into phenotypic and functional neurons. To induce neuronal differentiation, rMSCs of passage 13–25 were grown in pre-induction media containing  $10^{-7}$  mol/l all-trans-retinoic acid and 10 ng/ml basic fibroblast growth factor. After the pre-induction media were removed, the cells were transferred to serum free modified neuronal induction media. Within 3 h after induction, responsive cells assumed neuronal morphological characteristics. Neuron-specific enolase could be detected in 5 h and a  $(92.4 \pm 6.9)\%$  of neuron-specific enolase positive cells was determined. Neurofilament H was also detected, with a  $(93.9 \pm 5.2)\%$  of Neurofilament H positive cells observed after 24 h. Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  response to a ubiquitous neurotransmitter, 5-hydroxytryptamine, was monitored since both 5-hydroxytryptamine and  $\text{Ca}^{2+}$  are well known for their regulatory roles in neuronal proliferation, migration and differentiation. The results showed that the sensitivity of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  changes to 5-hydroxytryptamine increased with time with distinct  $\text{Ca}^{2+}$  spike similar to that in neurons observed 24 h after induction. Expression of 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptor was weakly detected in stem cells, but with strong intensity observed in differentiated neurons. The present study has demonstrated, with well defined culture conditions, that adult rMSCs can be induced to phenotypic and functional neurons *in vitro*.

**Key words** differentiation; 5-hydroxytryptamine;  $\text{Ca}^{2+}$ ; bone marrow stromal cells; neuron

Received: February 23, 2006 Accepted: May 23, 2006

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30070382)

\*Corresponding author. Tel: 86-23-63623604, Fax: 86-23-63622874, E-mail: tyli@vip.sina.com