

与损伤神经细胞共育后小胶质细胞促进骨髓间充质干细胞神经保护功能

罗晓光* 葛春林 任艳 周进 吴哲 闫荣 王秋爽 张朝东

(中国医科大学附属第一医院神经内科, 沈阳 110001)

摘要 采用原代细胞培养法培养骨髓间充质干细胞(BMMSCs), 以鼠小胶质细胞瘤细胞(BV2)和鼠嗜铬细胞瘤细胞(PC12)细胞株分别代替小胶质细胞和神经细胞进行传代培养, 应用转移筛网进行BV2与正常或损伤PC12的共育后, 考察BV2对BMMSCs的神经保护作用的影响。结果发现小胶质细胞(BV2)与损伤PC12共育后, 能促进BMMSCs的神经保护作用, 后者的上清液能降低受损PC12的凋亡率($35.9 \pm 13.5\%$), 同对照组($95.1 \pm 26.6\%$)相比差异有统计学意义($P < 0.05$), 且BMMSCs上清液中bFGF升高达到(34.0 ± 10.0) pg/ml, 同对照组(20.3 ± 7.1) pg/ml相比二者差异有统计学意义($P < 0.05$)。

关键词 小胶质细胞; 骨髓间充质干细胞; 神经营养; 共育

一直以来, 人们普遍接受干细胞主要通过两种途径修复损伤神经组织: (1)向具有生物学功能的特异性神经元分化, 替代损伤或死亡的神经细胞^[1]。(2)在微环境诱导下分泌各种神经营养因子以支持受损神经细胞的恢复^[2]。而微环境包括损伤或未损伤的神经细胞、基质细胞、胶质细胞以及它们分泌的各种递质。以小胶质细胞为代表的免疫系统由于其在神经系统疾病中的活跃作用而成为损伤神经组织中干细胞所处微环境的重要组成部分, 其对于干细胞的神经营养、支持功能有何种影响等问题尚无明确答案。本研究以小胶质细胞为切入点, 重点考察接受不同损伤神经环境刺激的小胶质细胞对于干细胞神经营养、支持功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

胎牛血清和马血清(Gibco); DMEM培养液, 1640培养液(Hyclone); 转移筛网(BD Falcon); 培养瓶(Costar); CO₂培养箱(NAPCO), 超净工作台(苏州); 倒置相差显微镜(Olympus, IX70); 光学显微镜(Olympus, BX60); 荧光显微镜(Olympus, BH-2); 流式细胞仪(BD Falcon); 激光共聚焦扫描显微镜(Leica, TGS SPII); 双染凋亡试剂盒(上海宝赛公司); ELISA检测试剂盒(上海森雄公司)

1.2 方法

1.2.1 骨髓间充质细胞(bone marrow mesenchymal

stem cells, BMMSCs)的培养^[3]及鉴定 SD大鼠(鼠龄2~3周, 购于中国医科大学动物部)经10%水合氯醛(3.5 μl/g)麻醉后无菌条件下取出股骨和胫骨, 以无菌PBS液冲洗干净。除去股骨近端和胫骨远端, 暴露骨髓腔, 除去另一端骨髓, 用12号针头在骨端生长面开一个小孔, 用注射器将BMMSCs培养液(含20%胎牛血清的DMEM)注入后收集冲洗出来的骨髓。反复吹打骨髓组织使成为细胞悬液后, 种植于培养瓶内, 置于37℃、5%二氧化碳温箱内温育, 接种后48h以含10%胎牛血清DMEM换液, 以后每隔2~3天换液一次。当细胞生长至70%~80%铺满培养瓶时, 以0.25%胰蛋白酶消化后传代。至第2~3代时, 以CD44进行BMMSCs表面抗原的免疫荧光染色鉴定。

1.2.2 PC12及BV2培养及传代

大鼠嗜铬细胞瘤(PC12)及小鼠小胶质细胞瘤(BV2)在本实验中分别作为神经细胞和小胶质细胞的替代细胞(购于中国医学科学院基础医学研究所), 分别种于PC12培养基(含10%马血清及5%胎牛血清1640, 均购于Hyclone)及BV2培养基(含10%胎牛血清DMEM, Hyclone)中, 至细胞生长良好时开始实验。

1.2.3 细胞共育实验过程

(1)BMMSCs及BV2的准备: 将BMMSCs以 1×10^5 个/孔种植于24孔培养板中。将BV2以 1×10^4 个/孔种植于转移筛网上

收稿日期: 2006-12-04 接受日期: 2007-04-20

辽宁省教育厅高等学校科学研究项目资助(No.05L522)

*通讯作者。Tel: 024-83282201, E-mail: chunlinge@yahoo.com.cn

(transwell, 孔径 8 μm , 购自 BD Falcon), 并置于 24 孔板中。(2) 制备受损 PC12 及 PC12 上清液: 30 $\mu\text{g/ml}$ β -淀粉样蛋白₁₋₄₀($\text{A}\beta_{1-40}$, 购自 Sigma) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育一周后使之纤维化以增强 $\text{A}\beta_{1-40}$ 的毒性^[4], 以 10 $\mu\text{g/ml}$ 纤维化的 $\text{A}\beta_{1-40}$ 温育 PC12 细胞过夜以损伤 PC12。除去含 $\text{A}\beta_{1-40}$ 的培养上清液, 换以新鲜的无任何添加剂的 1640 培养液, 将损伤 PC12 轻轻吹打并以 2×10^5 个/孔培养于 24 孔板内; 同时以同样细胞浓度和新鲜无添加剂的 1640 培养液培养正常 PC12。24 h 后分别收集损伤及正常 PC12 的上清液。(3) BV2 与 PC12 细胞或 PC12 上清液共育: 将转移筛网连同其上的 BV2 转移至育有 PC12 或仅有 PC12 上清液的 24 孔板中, 使 BV2 与损伤或正常的 PC12 细胞共育; 或者使转移筛网上的 BV2 仅与 PC12 上清液共育。其中转移筛网为半透膜, 共育细胞之间通过水与中、小分子蛋白或多肽类进行相互交流, 共育细胞不能混杂生长。(4) BV2 与 BMMSCs 共育及分组: 24 h 后, 将与 PC12 细胞或其上清液共育后的 BV2 及转移筛网转移至育有 BMMSCs 的 24 孔板上(BV2 仍在转移筛网内与 BMMSCs 隔着转移筛网共育), 开始与 BMMSCs 的共育。并进行如下分组: A) BMMSCs 同未接受任何处理的 BV2 共育(BV2 对照组); B) BMMSCs 与接受正常 PC12 细胞共育的 BV2 共育(正常 PC12 共育组); C) BMMSCs 与接受损伤 PC12 细胞共育的 BV2 共育(损伤 PC12 共育组); D) BMMSCs 同接受正常 PC12 上清液刺激的 BV2 共育(正常 PC12 上清液共育组); E) BMMSCs 同接受损伤 PC12 上清液刺激的 BV2 共育(损伤 PC12 上清液共育组); F) BMMSCs 单独培养(BMMSCs 对照组)。(5) BMMSCs 上清液的收集: 上述细胞共育 24 h 后, 弃去转移筛网及 BV2 及培养液, 更换以新鲜的无任何添加剂的清 1640 培养液(以避免血清添加剂中生长因子的作用)培养各组 BMMSCs, 24 h 后收集培养上清液, 进行下一步实验或 ELISA 检测。(6) BMMSCs 上清液温育受损 PC12: 以收集的 BMMSCs 上清液温育受纤维化 $\text{A}\beta_{1-40}$ (10 $\mu\text{g/ml}$) 损伤的 PC12, 24 h 后以流式细胞仪进行 PC12 凋亡检测。(7) 以 ELISA 方法检测 BMMSCs 上清液的 bFGF、NGF、BDNF 含量: 按照 ELISA 试剂盒说明(上海森雄公司), 检测 BMMSCs 上清液中脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)、神经生长因子(nerve growing factor, NGF)、碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)的含量。简而言之: 在抗体包被的 96 孔板中分别加入倍

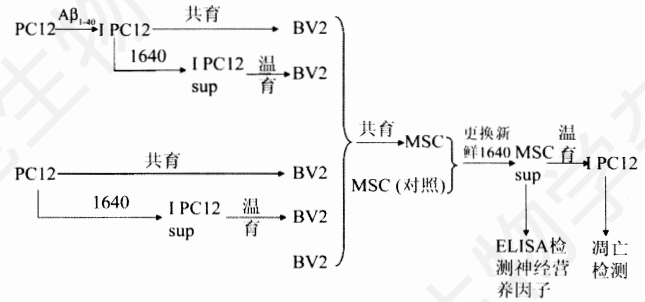


图 1 实验全过程示意图

I PC12: 损伤 PC12; sup: 上清液。

比稀释的标准蛋白和 BMMSCs 上清液待测样品, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜, 以附随试剂盒带的洗涤液 1: 20 稀释后进行洗涤, 3 遍, 每遍 5 min, 加入一抗, 37 $^{\circ}\text{C}$, 2 h, 洗涤 3 遍, 每遍 5 min, 加入 HRP 一二抗, 室温, 2 h, 洗涤液 1: 20 稀释后洗涤 3 遍, 每遍 5 min, DAB 显色 15 min 后, 以试剂盒附带的终止液终止, 以 96 孔酶标计数仪检测光密度值。

将整个实验过程概括如图 1 所示。

1.2.4 统计学分析 采用 SAS 6.12 软件包, 资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析及 Dunnett's 检验, 统计检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 细胞的培养和鉴定

BMMSCs 生长良好, 第二天为圆形, 传 4~5 代后为梭形及类成纤维样, 成簇状密集生长。以 CD44 免疫荧光鉴定, 95% 以上细胞呈阳性表达。PC12 及 BV2 传代培养, 生长良好。其中 PC12 呈半贴壁状态生长, 传代 7~8 次后, 转为贴壁生长。BV2 起始即为贴壁细胞。

2.2 流式细胞仪检测 PC12 凋亡

碘化丙啶(PI)和膜联蛋白(annexin) V 双染检测将细胞分为 4 个细胞亚群, 包括机械性损伤细胞(左上象限, 膜联蛋白 V⁻/PI⁺)、正常活细胞(左下象限, 膜联蛋白 V⁻/PI⁻)、早期凋亡细胞(右下象限, 膜联蛋白 V⁺/PI⁻)和晚期凋亡及坏死细胞(右上象限, 膜联蛋白 V⁺/PI⁺), 其中右上象限及右下象限均被计数为凋亡细胞(图 2)。各实验组之间 PC12 凋亡率出现差别, 以 C 组凋亡细胞数最少, 与对照组(F 组)相比差异有统计学意义, 分别是(35.9 \pm 13.5)%, (95.1 \pm 26.6)%, $P<0.05$, 而 B 组(与接受受损 PC12 上清液刺激的 BV2 共育的 BMMSCs 上清液温育组)凋亡细胞数次之(69.2 \pm 18.5)%,

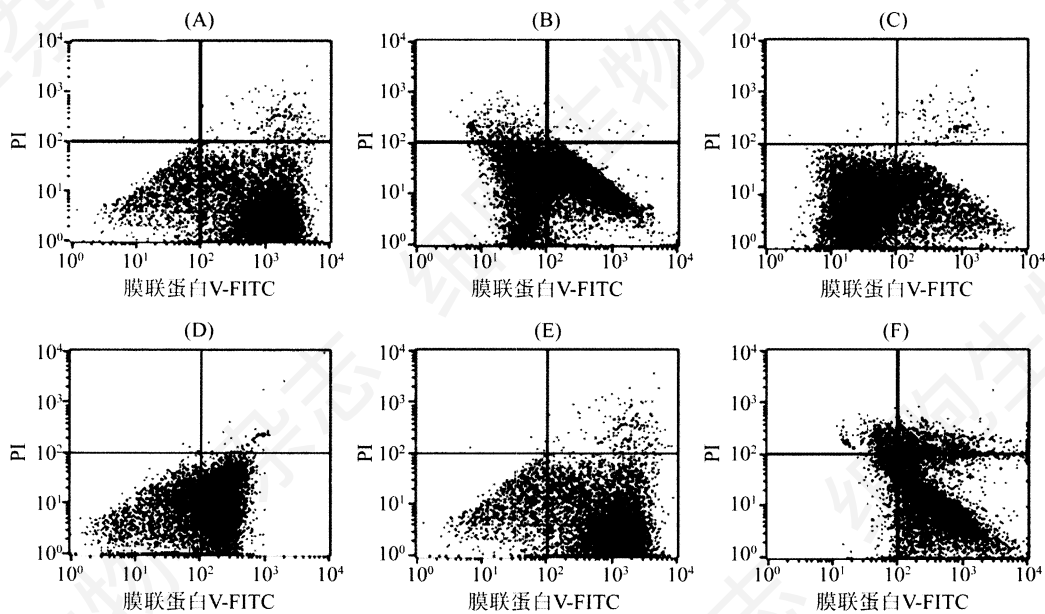


图2 膜联蛋白 V-PI 双染法流式细胞仪检测 PC12 凋亡各组代表图谱

A: BV2 对照组; B: 正常 PC12 共育组; C: 损伤 PC12 共育组; D: 正常 PC12 上清液共育组; E: 损伤 PC12 共育组; F: BMMSCs 对照组。

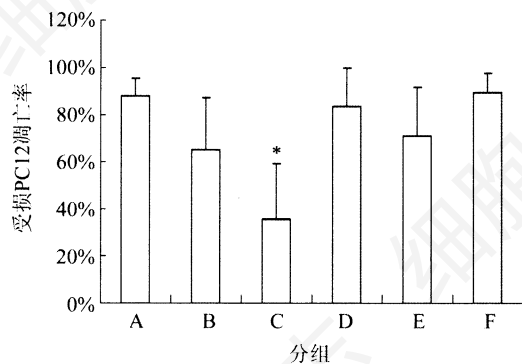


图3 BMMSCs 上清液温育后各组受损 PC12 凋亡

A: 对照 BV2 组; B: 正常 PC12 共育组; C: 损伤 PC12 共育组; D: 正常 PC12 上清液共育组; E: 损伤 PC12 共育组; F: 对照 BMMSCs 组。与对照组相比, $*P < 0.05$ 。

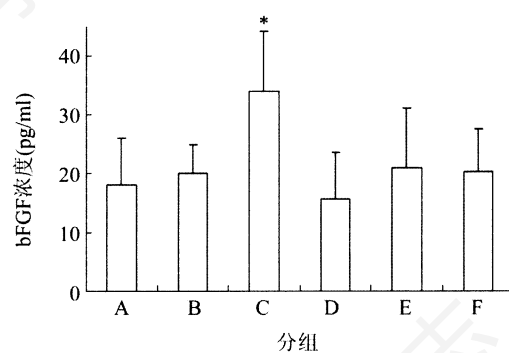


图4 ELISA 检测培养 BMMSCs 上清液中 bFGF 浓度

A: BV2 对照组; B: 正常 PC12 共育组; C: 损伤 PC12 共育组; D: 正常 PC12 上清液共育组; E: 损伤 PC12 共育组; F: BMMSCs 对照组。与对照组相比, $*P < 0.05$ 。

但与对照组相比无统计学差异($P > 0.05$)(图3)。

2.3 上清液液中神经营养因子的检测

BMMSCs 培养上清液神经营养因子 ELISA 检测: bFGF 在各组中均能检测到, 而在 C 组(同接受损伤 PC12 刺激的 BV2 共育的 BMMSCs 上清液温育组)中含量最高(34.0 ± 10.0)pg/ml, 同对照组 F 组(20.3 ± 7.1)pg/ml 相比有统计学差异($P < 0.05$)。其余各组之间 bFGF 表达无统计学差异($P > 0.05$)。BDNF、NGF 在所有各组中均未达到检测水平(图4)。

3 讨论

干细胞的引入为损伤神经系统的重建和修复带来了希望。迄今为止大量的实验已经表明干细胞移植后能够一定程度上缓解损伤神经系统的神经功能缺陷^[5,6], 然而干细胞进入中枢神经系统后控制其生物学行为的影响因素是什么、其如何受到损伤微环境的影响等问题仍如同迷雾, 阻碍了利用干细胞进行疾病治疗的进程。体内复杂的神经损伤环境由多种细胞和系统参与构成, 其中既包括来源于损伤神经细胞释放的生物活性分子和神经递质等, 也包括来源于小胶质细胞的神经营养或毒性因子, 它们均可能影响着干细胞在体内的生物学行为。在没有将这些环境因

素对干细胞的影响和它们之间的相互作用阐明之前,干细胞用于神经系统疾病的治疗将无法保证其有效性和安全性。

小胶质细胞被认为是正常中枢神经系统(central nervous system, CNS)中最有代表性的免疫细胞,具有基本的单核巨噬细胞系统的吞噬清除和抗原提呈功能,同时小胶质细胞又对环境极其敏感,受刺激后能够迅速激活并在受损神经组织中发挥着损伤和修复的双重作用^[7,8],而来自于神经元的刺激是引发其活化的重要因素^[9]。本实验中小胶质细胞(BV2)分别与受损或正常神经元(PC12)共育,或温育于受损或正常神经元的上清液中,使小胶质细胞在不同的神经损伤环境中接受刺激后考察其对健康干细胞(BMMSCs)神经营养功能的影响。

实验结果发现,与损伤PC12直接共育的BV2显著提高了BMMSCs的神经营养功能,表现为以该BMMSCs培养上清液温育受损PC12后,PC12的凋亡同对照组相比显著减少,并在所有组中最低。而与健康PC12共育的BV2一定程度上也提高了BMMSCs的神经营养功能,同对照组相比降低了受损PC12的凋亡率,但无统计学意义。提示神经元的损伤是小胶质细胞对BMMSCs神经营养功能施加良性影响的重要条件。此外,我们也看到温育于受损PC12上清液的BV2,其对BMMSCs的影响同对照组相比没有明显差异($P>0.05$),其PC12凋亡率几乎等同于对照组及未接受任何处理的BV2组,提示小胶质细胞与受损神经元的直接接触和与神经元之间蛋白递质的双向交流对于小胶质细胞活化和发挥生物学功能至关重要,而来源于受损神经元上清液的单方面的刺激不足以达到小胶质细胞的活化阈。Sudo等^[9]在神经细胞的混合培养中也发现与神经元有接触或靠近神经元的小胶质细胞,其激活程度远大于远离神经元的小胶

质细胞,从而提出介导小胶质细胞的激活需要神经元-小胶质细胞的接触联系,本实验结果与这一结论相符。

为进一步探讨在该微环境中起作用的神经营养因子,我们又检测了BMMSCs条件培养液中bFGF、NGF、BDNF等神经营养因子的浓度,结果发现能够检测到bFGF在各组的表达,且仅C组BMMSCs分泌的bFGF的升高同对照组相比差异有统计学意义,同该组降低的PC12凋亡率相一致,提示小胶质细胞对干细胞神经营养功能的影响中bFGF扮演有益角色。bFGF早已被证明具有显著的神经营养功能,可提高体内神经元的存活力,在神经修复与再生中起重要作用。本实验结果表明:小胶质细胞与受损神经元之间的直接接触和二者之间的双向交流对于小胶质细胞促进BMMSCs的神经营养功能至关重要,接受小胶质细胞作用后的BMMSCs能显著降低受损PC12的凋亡率,并生成bFGF,提示损伤神经组织中的小胶质细胞对损伤神经组织中BMMSCs的神经修复功能产生良性影响。至于究竟是何种蛋白质在小胶质细胞与受损神经组织的微环境中对BMMSCs的生物学行为起主导作用、在体内损伤神经组织复杂的微环境内小胶质细胞又充当何种角色尚需进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Panchision D *et al.* *Curr Opin Cell Biol*, 1998, **10**: 727
- [2] Kurozumi K *et al.* *Mol Ther*, 2005, **11**: 96
- [3] Tondreau T *et al.* *Cytotherapy*, 2004, **6**: 372
- [4] Pike CJ *et al.* *J Neurosci*, 1993, **13**: 1676
- [5] Hellmann MA *et al.* *Neurosci Lett*, 2006, **395**: 124
- [6] Chu K *et al.* *Neurosci Res*, 2004, **50**: 459
- [7] Neumann J *et al.* *FASEB J*, 2006, **20**: 714
- [8] Gibbons HM *et al.* *Brain Res*, 2006, **1084**: 1
- [9] Sudo S *et al.* *Exp Neurol*, 1998, **154**: 499

Microglia Improved Neurotrophicity of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells after being Stimulated with Injured Neurons

Xiao-Guang Luo*, Chun-Lin Ge, Yan Ren, Jin Zhou, Zhe Wu, Rong Yan, Qiu-Shuang Wang, Chao-Dong Zhang
(Department of Neurology, First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract Bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) were primarily cultured, BV2 and PC12 were sub-cultured to substitute for microglia and neurons respectively. Co-culture was performed with transwells. Stimulated with injured PC12, BV2 was able to promote the neurotrophicity of BMMSCs, whose supernatant reduced PC12 apoptosis significantly when compared with control [(35.9±13.5)%, (95.1±26.6)% respectively, $P<0.05$], and was of the highest basic fibroblast growth factor (bFGF) concentration among groups which was significantly different from that of control [(34.0±10.0) pg/ml, (20.3±7.1) pg/ml respectively, $P<0.05$]. We demonstrated that when stimulated with injured neurons, microglia improved the neurotrophicity of BMMSCs

Key words microglia; bone marrow mesenchymal stem cells; neurotrophicity; co-culture

Received: December 4, 2006 Accepted: April 20, 2007

This work was supported by the Program of Liaoning's Higher Education Committee (No.05L522)

*Corresponding author. Tel: 86-24-83282201, E-mail: chunlinge@yahoo.com.cn