

大鼠BMSCs条件培养基对NSCs形态、生长及分化的影响

纪志华 钟贞浩 史方富 唐崧杰 孟志斌*

(海南医学院附属医院骨科, 海口 570102)

摘要 通过对SD大鼠骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)及新生鼠神经干细胞(neural stem cells, NSCs)进行体外分离、培养及鉴定后, 观察BMSCs条件培养基对NSCs向神经细胞分化的影响。采用全贴壁培养法培养BMSCs, 并采用流式细胞术鉴定其特异性表面抗原标记。无血清技术培养NSCs, 采用免疫荧光技术鉴定其特异性抗原标记。BMSCs条件培养基(含10%胎牛血清的DMEM培养基)对NSCs诱导7 d后, 镜下观察细胞形态和生长, 并采用免疫荧光技术检测NSCs分化。BMSCs高表达CD90、CD29(>90%), 而CD45呈阴性表达。免疫荧光染色显示, NSCs标记蛋白Nestin、SOX2为阳性。NSCs经BMSCs培养液诱导分化7 d后经免疫荧光鉴定, MAP-2及GFAP呈阳性, 阳性率分别为73.80%和50.47%; NSCs经胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)诱导分化7 d后经免疫荧光鉴定, MAP-2及GFAP呈阳性, 阳性率分别为42.14%和31.90%。BMSCs条件培养基可诱导NSCs分化为神经元及星形胶质细胞, 其中BMSCs分泌的细胞因子在诱导分化中可能发挥重要作用。

关键词 骨髓间充质干细胞; 神经干细胞; 培养; 诱导; 分化; 鉴定; 免疫细胞荧光染色

The Effect of Bone Mesenchymal Stem Cells Culture Medium on the Morphology, Growth and Differentiation of Neural Stem Cells

Ji Zhihua, Zhong Zhenhao, Shi Fangfu, Tang Songjie, Meng Zhibin*

(Department of Orthopaedics, Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 570102, China)

Abstract This study was designed to observe the effect of BMSCs (bone mesenchymal stem cells) conditioned medium on the differentiation of NSCs (neural stem cells) after the isolation, culture and identification of SD rat BMSCs and NSCs. BMSCs were cultured using method of all-adherent culture and identified with specific antigen marker by flow cytometry. NSCs were cultured using serum-free method and identified with specific antigen marker by immunofluorescence. NSCs were induced with BMSCs conditioned medium (DMEM medium containing 10% fetal bovine serum) for 7 d, and then we could observe morphology of NSCs and detect NSCs differentiation using immunofluorescence technique. We found that BMSCs highly expressed CD90, CD29 (>90%), whereas CD45 expression was rarely; and immunofluorescence showed that specific marker of NSCs such as Nestin, SOX2 was positive reaction. The positive rate of expression MAP-2 and GFAP were 73.80% and 50.47% respectively after NSCs were induced with BMSCs conditioned medium for 7 d. Meanwhile, after NSCs had been induced and differentiated by fetal bovine serum (FBS) for 7 d, immunofluorescence identification indicated that both MAP-2 and GFAP were positive

收稿日期: 2015-03-19 接受日期: 2015-07-06

*通讯作者。Tel: 18289890991, E-mail: zhongzhenhao2011@163.com

Received: March 19, 2015 Accepted: July 6, 2015

*Corresponding author. Tel: +86-18289890991, E-mail: zhongzhenhao2011@163.com

网络出版时间: 2015-08-21 10:43:33 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150821.1043.002.html>

as well, with the rates 42.14% and 31.90%, respectively. BMSCs conditioned medium can induce NSCs to differentiate into neurons and astrocytes, in which cytokines secreted by BMSCs maybe play the vital role.

Keywords BMSCs; NSCs; culture; induction; differentiation; identification; immunofluorescence

数十年来,有关神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的分化机制已取得了很大进步。一些研究发现,NSCs的分化受细胞微环境信号的影响^[1-2],但是NSCs分化的具体分子机制尚不完全清楚,尤其是NSCs特定分化为神经元。基于此,NSCs临床应用的进一步研究仍存在较大挑战。因此,建立一种理想的实验方法能够使NSCs向神经样细胞分化的体外微环境显得很有必要。

骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)是一种多潜能干细胞,可用于组织的再生修复,如骨、软骨、脂肪和肌肉等^[3-4],并且BMSCs可分泌一些细胞因子促进造血干细胞的成熟及分化^[5]。此外, BMSCs可分泌脑源性神经营养因子^[6]。研究报道,在体内外BMSCs可被诱导为神经样细胞^[7],并且BMSCs可诱导NSCs分化为神经细胞^[8]。那么, BMSCs的条件培养基(含10%胎牛血清的DMEM培养液)是否也能引起NSCs向神经细胞分化呢?我们发现, BMSCs的条件培养基不仅可使NSCs的生长状态发生变化,即悬浮生长变为贴壁生长并伸展突起,而且NSCs可分化为神经元及星型胶质细胞。另有报道,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)可诱导NSCs向神经细胞分化^[9]。所以, BMSCs的条件培养基诱导NSCs分化及机制有待我们进一步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性SD大鼠(60~100 g)和胎鼠(10~15 g)由海南医学院实验动物中心提供,实验过程中处置动物符合海南医学院动物伦理学标准。主要试剂: DMEM培养液、胎牛血清及DMEM/F12培养液购自Gibco公司;重组表皮生长因子(recombinant epidermal growth factor, EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、L-谷氨酰胺、B-27、兔抗巢蛋白(Nestin)单抗、兔抗SOX2单抗、兔抗Map-2单抗、兔抗胶质纤维酸性蛋白(GFAP)单抗及FITC/TRITC标记山羊抗兔IgG均购自Bioworld公司;免疫荧光染色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司; FITC-CD90、PE-CD29和APC-CD45购自eBioscience公司。

1.2 方法

主要观察指标: (1)BMSCs及NSCs的生长特性及鉴定; (2)NSCs诱导后形态观察; (3)NSCs分化为神经元(MAP-2)及星型胶质细胞(GFAP)的免疫细胞化学鉴定。

1.2.1 BMSCs的分离和培养 将80 g左右SD大鼠处死, 75%乙醇浸泡5 min, 无菌条件下取其股骨和胫骨, 剪去骨垢端, 用5 mL注射器抽取DMEM培养基反复冲洗骨髓腔, 将冲洗液收集于15 mL离心管, 500 ×g离心5 min。弃上清, 加入含10%胎牛血清的DMEM培养液, 充分吹打至单细胞悬液, 调整细胞浓度为 1×10^6 /mL, 接种至25 cm²培养瓶中, 置于37 °C、5% CO₂培养箱中培养。48 h后全量换液, 此后3~4 d换液。当细胞生长至80%~90%融合时, 用0.25 g/L的胰蛋白酶消化, 再以 1×10^5 /mL的密度接种。待细胞传至第三代时, 收集细胞经流式细胞术鉴定。收集第四代细胞培养液, 待用。

1.2.2 流式细胞术鉴定BMSCs 收集第三代BMSCs, PBS洗涤1次, 调整细胞浓度为 5×10^6 /mL, 取50 μL/管细胞悬液, 共3管, 分别加入FITC-CD90、PE-CD29、APC-CD45。室温下避光孵育30 min, PBS洗涤2次, 用于流式细胞术检测。

1.2.3 NSCs的分离和培养 取新生1~2 d的SD大鼠的大脑至无菌的PBS中, 严格无菌条件下去除脑膜, 分离大脑皮质并剪碎成小块状, 用巴斯德吸管机械吹打15~20次, 收集细胞悬液, 400目过滤网过滤, 取过滤后的单细胞悬液, 500 ×g离心5 min, 然后用NSCs培养液(DMEM/F12培养基、2% B27、20 ng/mL bFGF、20 ng/mL EGF、2 mmol/L谷氨酰胺)重悬。调整细胞浓度为 1×10^4 /mL, 接种至25 cm²培养瓶中, 置于37 °C、5% CO₂培养箱中培养。每4 d换液。待细胞增殖至形成的神经球大小为100 μm左右时, 收集神经球, 500 ×g离心5 min, 然后用新鲜的培养液重悬并吹打至单细胞悬液, 重新接种。待细胞生长至7 d, 接种至24孔培养板培养24 h, 进行免疫细胞化学鉴定(一抗为Nestin单抗、SOX2单抗)。

1.2.4 诱导分化 收集第3代神经球细胞, 500 ×g离

心5 min, 用第4代BMSCs的培养液重悬并吹打至单细胞悬液, 调整细胞浓度接种。每4 d换液, 并观察细胞生长状况。待细胞诱导7 d后进行免疫细胞化学染色(一抗为MAP-2单抗、GFAP单抗)。对照组为NSCs正常培养组、10%胎牛血清培养NSCs组。

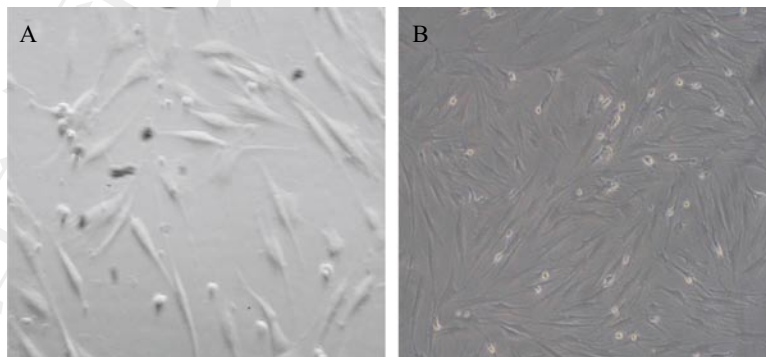
1.2.5 免疫细胞化学染色 将原代培养及诱导后的神经球细胞接种于含盖玻片的24孔培养板中, 24 h取出盖玻片, 4%多聚甲醛固定15~20 min, PBS洗涤后1% Triton X-100溶液处理10 min, PBS洗涤后5%正常山羊血清37 °C孵育60 min, 滴加一抗4 °C过夜, PBS洗涤后滴加二抗(FITC/TRITC标记山羊抗兔IgG), 37 °C孵育60 min, PBS洗涤后DAPI复染5 min, PBS洗涤后用抗荧光猝灭封片剂封片, 然后显微镜下观察染色结果并拍照。

1.2.6 统计学处理 免疫细胞化学染色诱导组和对照组各12例, 结果以每个样本随机选择4个视野, 每视野的阳性细胞数占该视野所有细胞的百分比表示。采用SPSS 15.0统计学分析处理软件处理数据, 各组结果统计数据均以 $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ 表示。两组样本采用配对双尾 t 检验, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSCs的生长特性

BMSCs一般在培养24~48 h左右悬浮细胞开始贴壁生长, 48 h全量换液后除去未贴壁细胞, 贴壁细胞形态较均一, 成纺锤状(图1A), 至7 d时细胞大量增殖, 可见细胞突触发生连接, 细胞排列成旋涡状、网状(图1B)。10~14 d细胞融合成片, 胰蛋白酶消化, 传代的细胞可完全贴壁, 形态与原代细胞相似。



A: 原代BMSCs培养3 d呈纺锤状(200×); B: BMSCs培养至7 d可见细胞突触发生连接, 细胞排列成旋涡状、网状(100×)。

A: primary BMSCs were spindle-shaped on the 3rd day (200×); B: BMSCs were arranged spirally and had synaptic connections on the 7th day (100×).

图1 镜下观察BMSCs形态

Fig.1 BMSCs morphology were observed under microscope

2.2 BMSCs流式细胞术鉴定

经流式细胞术鉴定, BMSCs高表达CD90、CD29(>98%), 而CD45呈阴性(>99%), 证实分离所得的细胞为BMSCs(图2)。

2.3 NSCs的生长特性

细胞培养后3 d开始出现极少的克隆团(神经球), 大部分单细胞死亡或形成碎片。培养至7 d时, 神经球明显增多增大, 呈悬浮球形, 折光性强, 边界清晰, 未见突触生长(图3)。

2.4 NSCs的免疫细胞化学鉴定

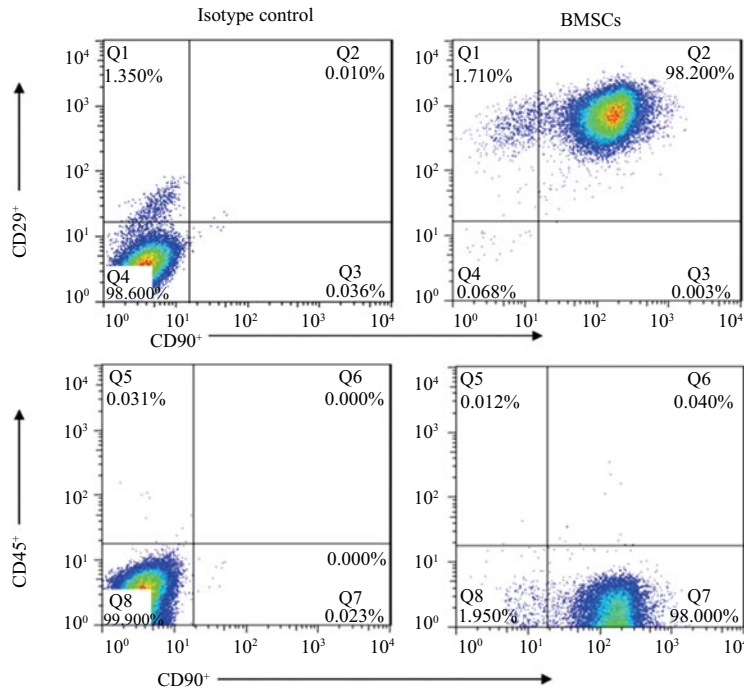
对培养的克隆球细胞爬片后, 进行免疫细胞荧光染色, 结果显示, 神经干细胞标记蛋白Nestin、SOX2呈阳性表达(图4)。

2.5 镜下观察NSCs诱导分化后的细胞形态

将3代神经球细胞经BMSCs培养液诱导分化24~48 h后, 可见悬浮的神经球开始贴壁生长, 有突起从胞体伸出。至3~4 d时大多数神经球细胞贴壁生长, 大量细胞从球中爬出伸出突触, 6~7 d细胞形态发生明显变化, 生长出胞体圆形有突起及多角形的神经元样细胞, 并向周围生长(图5)。

2.6 NSCs诱导分化的免疫细胞化学鉴定

将第3代神经球细胞经BMSCs培养液诱导分化14 d后进行免疫细胞化学染色, 结果显示, 神经元细胞中MAP-2阳性细胞占73.80%, 星型胶质细胞中GFAP阳性细胞占50.47%(图6和图7), 而NSCs对照组中MAP-2及GFAP阳性细胞分别占8.76%和4.52%, 差异有统计学意义($P < 0.001$)(图7), 表明BMSCs条件培养基可诱导NSCs向神经元和星型胶质细胞分化。

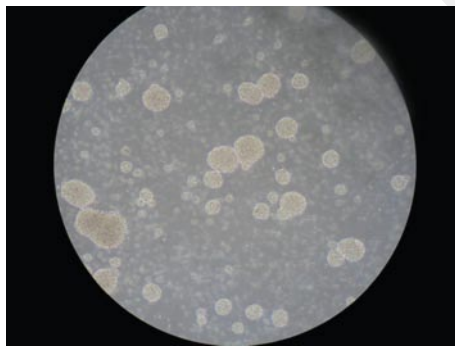


BMSCs中CD90⁺CD29⁺双阳性细胞占98.200%，即BMSCs高表达CD90和CD29；而CD90⁺CD45⁺双阳性细胞占0.040%，即CD45在BMSCs中表达呈阴性。

As the figure showed, the ratio of CD90⁺CD29⁺ expression in BMSCs cells is 98.200%, but CD90⁺CD45⁺ is 0.040%, indicating that BMSCs highly express CD90, but not CD45.

图2 BMSCs流式细胞术鉴定其特异性抗原标记阳性率

Fig.2 The identification of BMSCs with specific antigen marker by flow cytometry



NSCs培养7 d后呈悬浮球形生长，折光性强，边界清晰(100×)。
NSCs grew up for 7 days as suspension spheres with strong refraction and clear boundaries (100×).

图3 NSCs的生长特性

Fig.3 Growth characteristics of NSCs

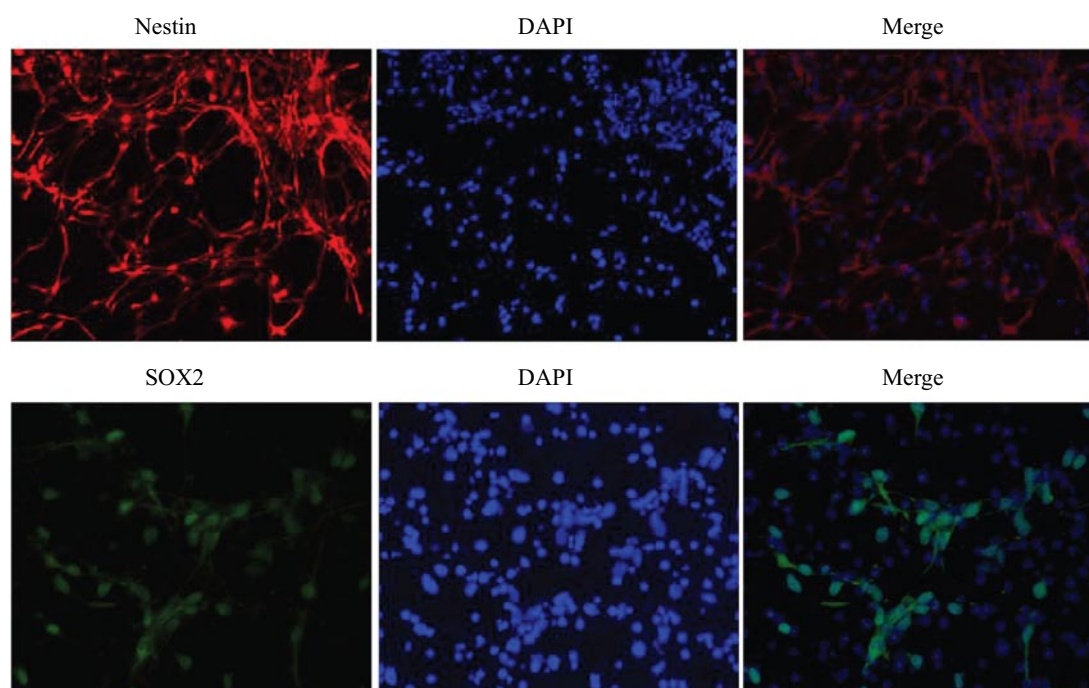
3 讨论

本研究着手于BMSCs及NSCs的体外培养体系的建立，并探讨体外BMSCs条件培养基对NSCs生长形态及分化的影响。结果显示，骨髓全贴壁培养法可获得高纯度的BMSCs，细胞生长形态较均一，呈纺锤状，梭形，大量细胞呈旋涡状。NSCs呈悬浮球形，

折光性强，在BMSCs条件培养液中，NSCs逐渐贴壁生长，大量细胞从球中爬出并长出突起，经免疫荧光技术检测，NSCs被诱导分化为神经元及星型胶质细胞，提示NSCs在BMSCs条件培养液的诱导下，可分化为神经样细胞。

骨髓中获取BMSCs有多种方法^[10-11]，本研究采用全骨髓贴壁法培养以获得BMSCs。在培养初期，BMSCs可很快贴壁，但早期贴壁不牢，延长初次换液时间可改善这种情况。细胞生长至3~4 d后，大量增殖且速度较快。具有克隆能力的BMSCs经传代培养后快速增殖，说明本培养方法适用于BMSCs的体外培养及扩增。

NSCs是一种多能干细胞，具有自我复制、增殖能力，还具有向神经元、星型胶质细胞和少突胶质细胞分化的特征。因此，NSCs培养的关键是促进其增殖同时抑制其分化。我们采用出生24 h的SD大鼠作为NSCs的供体，24 h NSCs的数量接近胎鼠，杂细胞少，利于培养和分离纯化。我们采用无血清技术克隆团培养NSCs可获得高纯度NSCs。

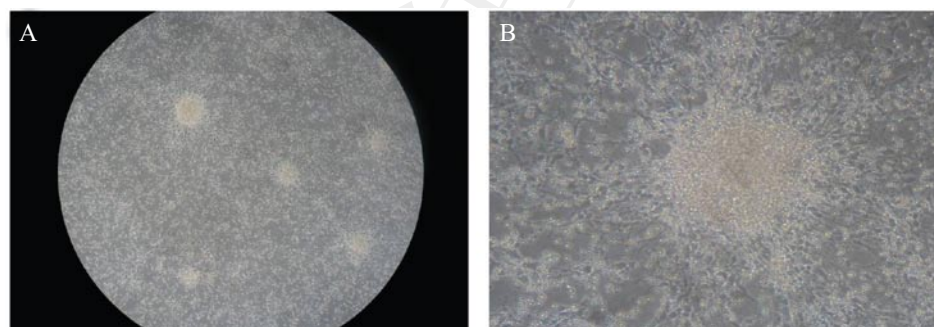


Nestin(200×)、SOX2(400×)阳性表达。

As the figure showed, both Nestin (200×) and SOX2 (400×) were positively expression.

图4 NSCs免疫荧光鉴定

Fig.4 The identification of NSCs by immunofluorescence



NSCs诱导分化4 d后, 镜下细胞的形态(A: 100×; B: 400×)。

The growth of cells were induced by NSCs for 4 d (A: 100×; B: 400×).

图5 NSCs诱导分化后的生长特性

Fig.5 Growth characteristics of induced NSCs

我们检测到神经干细胞中Nestin呈阳性反应, 此结果和Mothe等^[12]及Shahram等^[13]的结果一致。Nestin是NSCs的主要标志^[14-15]。Sauerzweig等^[16]发现, 在无血清培养条件下, BMSCs可表达典型的NSCs标记。另外, 我们的结果也显示, NSCs的另一标记SOX2也呈阳性表达。

随着NSCs培养技术越来越成熟, NSCs的临床应用也愈广泛, NSCs的分化及其机制受到广泛的重视。研究证明, 通过BMSCs和NSCs共培养, BMSCs可诱导NSCs向神经元及胶质细胞分化^[8,17]。共培

养12 h后即可发现有神经元和胶质细胞从神经球中迁移出, 这表明了BMSCs提供的微环境有利于神经细胞的迁移。BMSCs分泌的许多因子还可调节神经和造血系统的发育^[18], 而BMSCs促进造血干细胞的生长及成熟依赖于细胞外基质、细胞表面黏附分子及BMSCs分泌的细胞因子^[19]。我们得知在BMSCs培养的过程中其释放一些细胞因子到培养液中, 那么BMSCs条件培养液是否影响NSCs的生长状态及分化值得进一步研究。因此, 我们采用NSCs和BMSCs条件培养液共培养的方式进行间接

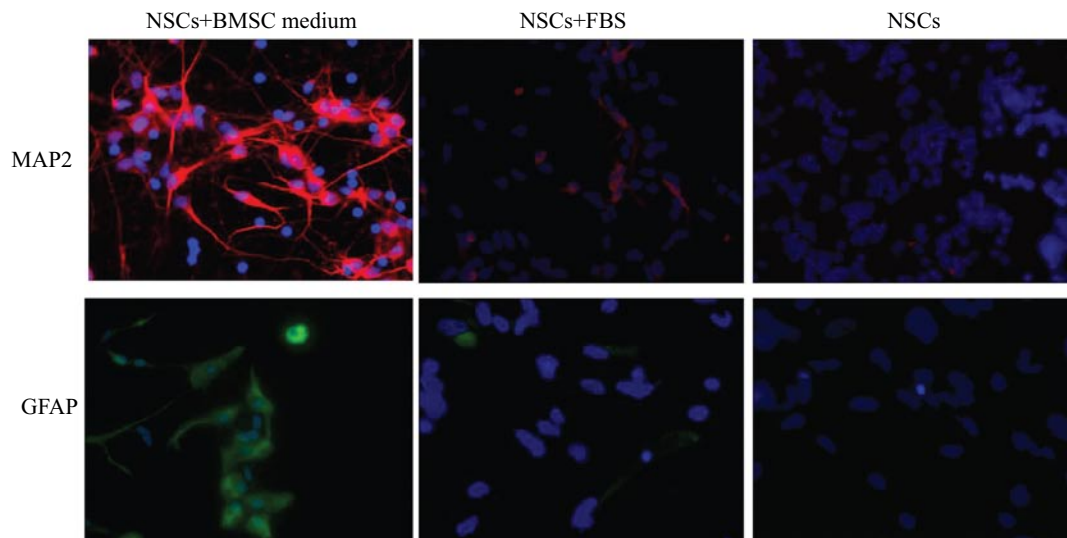
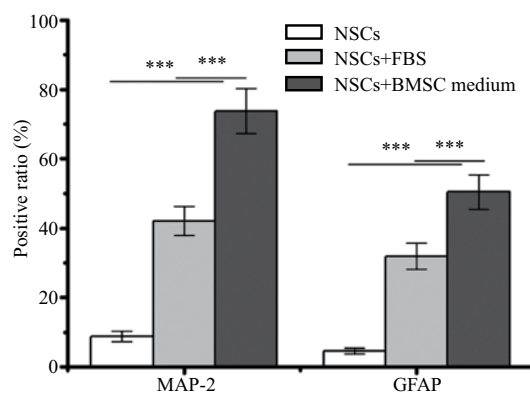


图6 NSCs诱导分化的免疫荧光鉴定(400×)

Fig.6 The identification of induced NEPs by immunofluorescence (400×)



NSCs经BMSC条件培养基诱导后MAP-2和GFAP阳性表达较单独FBS诱导组及对照组增多,*** $P<0.001$ 。

Compared with single FBS induction group and the control group, MAP-2 and GFAP had more positive expression than NSCs induced by BMSC conditioned medium, *** $P<0.001$.

图7 NSCs诱导分化后MAP-2和GFAP阳性表达率统计图

Fig.7 The positively expression ratio of MAP-2 and GFAP in induced NSCs

研究,发现NSCs贴壁生长,并且伸展生长出有突起的细胞。经免疫荧光技术鉴定,神经元和星形胶质细胞的比例增高。另外,我们单独用FBS诱导NSCs,也可使NSCs分化为神经细胞,但比例较BMSCs细胞培养液低。由此,我们认为,BMSCs分泌的某种细胞因子可能在NSCs分化过程中发挥重要作用。研究发现,BMSCs可分泌一些具有神经保护和修复作用的细胞因子,如转化生长因子- β (transfected growth factor- β , TGF- β)、碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)和脑源性神经营养因

子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)。TGF- β 可促进细胞外基质蛋白的分泌,并促进诱导后的细胞成熟。BDNF是一类神经生长因子,对神经元的分化及突起的生长、存活及功能起支持和促进的作用^[20]。因此,这些细胞因子在NSCs诱导分化中有一定的影响。

NSCs移植在临床治疗中已得到广泛应用,NSCs在体内生长及分化机制将有待更深入的研究。本文从BMSCs可直接诱导NSCs分化为神经样细胞的基础上,进一步研究BMSCs对NSCs分化的间接影响,即BMSCs条件培养液对NSCs生长及分化的影响,一定程度上揭示了NSCs分化的分子机制,即诱导分化效应可能是通过BMSCs分泌的细胞因子发挥作用的。

参考文献 (References)

- 1 Sommer L, Rao M. Neural stem cells and regulation of cell number. *Prog Neurobiol* 2002; 66(1): 1-18.
- 2 Morrison SJ. Neuronal potential and lineage determination by neural stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13(6): 666-72.
- 3 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411): 143-7.
- 4 Ferrari G, Cusella-De AG, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, *et al.* Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279(5356): 1528-30.
- 5 Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000; 28(8): 875-84.
- 6 Dormady SP, Bashayan O, Dougherty R, Zhang XM, Basch RS. Immortalized multipotential mesenchymal cells and the

- hematopoietic microenvironment. *J Hematother Stem Cell Res* 2001; 10(1): 125-40.
- 7 Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000; 61(4): 364-70.
- 8 Lou SJ, Gu P, Chen F, He C, Wang MW, Lu CL. The effect of bone marrow stromal cells on neuronal differentiation of mesencephalic neural stem cells in Sprague-Dawley rats. *Brain Res* 2003; 968(1): 114-21.
- 9 徐富翠, 邹礼乐, 梅欣明, 郭勇. 神经干细胞培养及其影响因素. *中国组织工程研究*(*Xu Fucui, Zou Lile, Mei Xinming, Guo Yong. Culture of neural stem cells and the influencing factors. Chinese Journal of Tissue Engineering Research*) 2013; 17(10): 1835-40.
- 10 Tropel P, Noel D, Platet N, Legrand P, Benabid AL, Berger F. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res* 2004; 295(2): 395-406.
- 11 Tondreau T, Lagneaux L, Dejeneffe M, Delforge A, Massy M, Mortier C, *et al.* Isolation of BM mesenchymal stem cells by plastic adhesion or negative selection: Phenotype, proliferation kinetics and differentiation potential. *Cytotherapy* 2004; 6(4): 372-9.
- 12 Mothe AJ, Zahir T, Santaguida C, Cook D, Tator CH. Neural stem/progenitor cells from the adult human spinal cord are multipotent and self-renewing and differentiate after transplantation. *PLoS One* 2011; 6(11): e27079.
- 13 Darabi S, Tiraihi T, Ruintan A, Abbaszadeh HA, Delshad A, Taheri T. Polarized neural stem cells derived from adult bone marrow stromal cells develop a rosette-like structure. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2013; 49(8): 638-52.
- 14 Bazan E, Alonso FJ, Redondo C, Lopez-Toledano MA, Alfaro JM, Reimers D, *et al.* *In vitro* and *in vivo* characterization of neural stem cells. *Histol Histopathol* 2004; 19(4): 1261-75.
- 15 Binello E, Qadeer ZA, Kothari HP, Emdad L, Germano IM. Stemness of the CT-2A immunocompetent mouse brain tumor model: Characterization *in vitro*. *J Cancer* 2012; 3: 166-74.
- 16 Sauerzweig S, Munsch T, Lessmann V, Reymann KG, Braun H. A population of serum deprivation-induced bone marrow stem cells (SD-BMSC) expresses marker typical for embryonic and neural stem cells. *Exp Cell Res* 2009; 315(1): 50-66.
- 17 Azedi F, Kazemnejad S, Zarnani AH, Behzadi G, Vasei M, Khanmohammadi M, *et al.* Differentiation potential of menstrual blood-versus bone marrow-stem cells into glial-like cells. *Cell Biol Int* 2014; 38(5): 615-24.
- 18 Mehler MF, Kessler JA. Hematolymphopoietic and inflammatory cytokines in neural development. *Trends Neurosci* 1997; 20(8): 357-65.
- 19 Seshi B, Kumar S, Sellers D. Human bone marrow stromal cell: Coexpression of markers specific for multiple mesenchymal cell lineages. *Blood Cells Mol Dis* 2000; 26(3): 234-46.
- 20 Heldt SA, Stanek L, Chhatwal JP, Ressler KJ. Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Mol Psychiatry* 2007; 12(7): 656-70.