

成人骨髓间质干细胞诱导分化为神经元样细胞及其与细胞分裂的关系

姚晓黎, 张 成*, 卢锡林, 陈松林, 冯善伟, 李 群

(中山大学附属第一医院 神经科, 广东 广州 510080)

摘 要:目的 探讨成人骨髓间质干细胞(hMSC)向神经元样细胞分化过程中分化与细胞分裂的关系。方法 从成人骨髓中分离骨髓间质干细胞(MSC), 培养扩增。用参芪液诱导 MSC 分化为神经元样细胞, 经免疫组化鉴定其神经元烯醇化酶(NSE)、神经丝蛋白(NF)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)的表达。诱导后进行神经元样细胞计数, 掺入 Brdu 测定, 计算标记系数。采用双标记间接免疫荧光法检测神经元样细胞特异性表面标记(NSE、NF)与细胞分裂的标记 Brdu 的关系。抑制 DNA 合成, 计算 Brdu、NSE 和 NF 阳性细胞数。结果 MSC 经参芪液诱导后, 可见神经元样细胞。免疫组化显示诱导出的神经元样细胞 NSE、NF 阳性, GFAP 阴性。MSC 诱导分化后的细胞总数增加, 诱导分化后 12 h 内细胞增殖较快。30% 以上分化的神经元样细胞在表达 NSE 和 NF 的同时可见 Brdu 标记, 而另一部分分化的神经元则无 Brdu 标记。抑制 DNA 合成, 并不会阻止神经元的分化, 仍有 70% 的分化神经元表达神经元特异性标记蛋白 NSE。结论 MSC 诱导分化的部分神经元样细胞可进行细胞分裂, 但抑制细胞分裂不影响神经元分化。

关键词:骨髓间质干细胞; 神经元; 细胞分裂; 参芪液

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)11-1679-04

Relationship between mitosis and differentiation from human mesenchymal stem cell into neuron-like cell

YAO Xiao-li, ZHANG Cheng, LU Xi-lin, CHEN Song-lin, FENG Shan-wei, LI Qun

(Department of Neurology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: **Objective** To study the relationship between mitosis and differentiation in the process of induction from human mesenchymal stem cells (hMSC) into neuron-like cells. **Methods** Mesenchymal stem cells (MSC) were separated from human marrow, cultured, and expanded in culture medium. After MSC was induced to differentiate into neuron-like cells with Shenqi Liquid, expression of neuron-specific enolase (NSE), neurofilament (NF), and glial fibrillary acidic protein (GFAP) were detected by immunocytochemistry, respectively. Total cell count before and after differentiation were calculated, the Brdu labeling index (LI: the ratio of Brdu-labeled to total cells) was measured. Using double label indirect immunofluorescence, the relationship between neuron-like cells and mitosis was illuminated. **Results** MSC exhibited neuronal phenotype after treated with inducers, Shenqi Liquid. The expressions of NSE and NF in the neuron-like cells were positive, but GFAP was not found. The number of total cells was increased, especially during the first 12 h of induction. Over 30% neuron expressed NSE and NF incorporated Brdu, while another part of neuron not incorporated Brdu. Inhibiting the DNA synthesis, hMSC still differentiated into neuron-like cells and over 70% expressed neuron specific gene products such as NSE and NF. **Conclusion** Some neuron-like cells after induction would undergo mitosis, but inhibiting the DNA synthesis does not influence the neurogenesis.

Key words: mesenchymal stem cell (MSC); neurons; mitosis; Shenqi Liquid

传统上认为, 细胞分化需从多能干细胞分化为定向祖细胞、定向前体细胞, 直至最终的系细胞。而近来研究却提出不同的说法, 认为多能干细胞、定向祖细胞、定向前体细胞三者之间没有明确的界限, 并

提出转分化和去分化等观点^[1,2]。在参芪扶正注射液(参芪液)体外诱导分化为神经元样细胞的前提下, 本研究拟初步说明骨髓间质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)与分化后的神经元样细胞的关系。

收稿日期: 2005-04-09

基金项目: 国家自然科学基金(30270732); 广东省科技计划项目(2KM05501S); 广东省科技计划项目重大专项(2003A3020106); 广东博士启动基金(5300783)

作者简介: 姚晓黎(1971—), 女, 讲师, 博士, 主要从事神经变性疾病及干细胞分化的研究。Tel: (020) 33064439

* 通讯作者 张 成 E-mail: yeyaoxiaoli@sohu.com

系,是直接转化还是通过细胞分裂、神经元样细胞的特异性标记的表达与细胞分裂的关系如何、在分裂前表达还是分裂后表达、抑制细胞分裂是否抑制神经元样细胞的特异性标记的表达等问题。

1 材料

1.1 成人肋骨:来源于非血液系统疾病的胸外科手术中摘取的肋骨。

1.2 主要试剂:胎牛血清(FCS, Hyclone公司)、DMEM(Gibco公司)、Ficoll-paque分离液(Pharmacia公司)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF, Pepro Tech公司)、小鼠抗人神经元烯醇化酶(NSE, Maxim公司)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP, Maxim公司)、小鼠抗人神经微丝蛋白单抗(NFH, NeoMarkers公司)、超敏SP(鼠)试剂盒(MBI公司)、DAB显色试剂盒(DAKO公司)、溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU, Sigma公司)、SABC-Cy3免疫荧光检测试剂盒和SABC-FITC免疫荧光检测试剂盒(Boster公司)、参芪液(250 mL,含党参和黄芪生药各10 g,购自广东丽珠集团利民制药厂)。

2 方法

2.1 MSC的分离培养与鉴定按文献方法^[3]进行。

2.2 体外诱导MSC定向分化为神经元样细胞^[4]:传至第5代的MSC按 4×10^5 /L密度接种于有盖玻片的六孔板内制备细胞爬片。细胞用含bFGF(10 ng/mL)的DMEM(20%FCS)预诱导24 h,更换培养液,PBS洗涤3次,再加入稀释200倍参芪液的无血清DMEM诱导5 h。对照组不加任何诱导剂。每组包括18个细胞爬片。

2.3 神经元样细胞的鉴定:按DAB显色试剂盒方法染色。参芪液诱导的细胞免疫组化染色后光镜下随机选取10个非重叠视野($\times 100$),计算NSE和NFH阳性细胞占总细胞数的比例,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2.4 BrdU掺入法检测标记指数:BrdU特异掺入S期细胞,通常测定其标记指数(labeled index, LI),即S期细胞占细胞周期的百分数,进行BrdU阳性比例的测定。配置BrdU 10 mmol/L,备用。取适量BrdU掺入培养细胞中,终浓度为10 μ mol/L。按照下述方法进行免疫荧光检测。随机选取10个非重叠视野($\times 100$),计算BrdU阳性细胞占总细胞数的比例,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2.5 双标记间接免疫荧光方法检测神经元样细胞特异性表面标记:细胞用4%多聚甲醛固定30

min;5%正常羊血清封闭10 min;分别加入小鼠抗人神经元烯醇化酶(NSE)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)单克隆抗体(即用型)、小鼠抗人神经微丝蛋白单抗(NFH,1:100稀释),室温孵育1 h或4 $^{\circ}$ C过夜;加入羊抗小鼠-CY3或FITC,黑暗中反应1 h;荧光显微镜下观察,摄影。双标法在上述基础,加入2 mol/L盐酸固定1 h;加入BrdU单抗,室温孵育1 h或4 $^{\circ}$ C过夜;加入羊抗小鼠-FITC或CY3,黑暗中反应1 h,以上步骤均需PBS洗涤5 min $\times$ 3次;共聚焦显微镜(ZEISS LSM 510 META,德国)观察,摄影。

2.6 抑制细胞DNA合成:在培养细胞中加入终质量浓度为10 μ g/mL阿糖胞苷进行神经诱导分化24 h,按上述方法进行双标记间接免疫荧光方法。随机选取10个非重叠视野($\times 100$),计算BrdU阳性细胞占总细胞数的比例,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 MSC的分离、纯化、扩增与体外向神经元样细胞的诱导分化:经骨髓单核细胞分离纯化的MSC,形态呈梭形。随着MSC的迅速增殖,约10 d可见细胞的排列有一定的方向性,呈旋涡状。20 d细胞接近融合,经胰酶消化后,可获得 $5 \times 10^5 \sim 6 \times 10^5$ 个MSC。体外扩增15代,细胞数可达 $3 \times 10^{12} \sim 4 \times 10^{12}$ 个,扩增约 1×10^6 倍。经参芪液诱导后,MSC形态发生变化,呈典型的核周体形态,突起伸出(轴突),并在轴突末端出现一级和二级分支,类似树突。

3.2 神经元样细胞的形态及其细胞分裂现象:使用相差显微镜和荧光显微镜来记录在神经元诱导分化后24 h内的改变。在加入诱导剂前和加入后24 h分别进行细胞计数(包括未分化和已分化的MSC细胞),MSC形态发生变化,细胞变圆,伸出突起,呈神经元的外形。随着诱导分化时间的延长,总的细胞数在增加,在分化后24 h,细胞数提高超过65%。在诱导前,BrdU阳性细胞比例约45%,2 h后略有下降约为33%,12 h后约为28%,24 h后急剧下降约为5%。

3.3 神经元特异性基因产物表达与细胞分裂:为了解在诱导后24 h的细胞分裂,用神经元特异性标记蛋白NSE和NF的抗体来标记MSC诱导后的细胞,同时检测BrdU。结果显示BrdU在未分化MSC的表达,用FITC为荧光染料,荧光显微镜下可见细胞核呈绿色。MSC在诱导后24 h内掺入BrdU,用连有CY3的NSE抗体标记神经元样细胞,间接免疫荧光双标法显示MSC分化成神经元样细胞,有

树突和轴突,并且 NSE 阳性,即神经元样细胞呈现红色荧光。在分裂中期,可见 Brdu 掺入。部分细胞 NSE 阳性同时可见 Brdu 标记,即神经元样细胞呈现红色荧光伴有绿色细胞核,也可见部分 NSE 阳性细胞无 Brdu 标记。图 1 表示 NSE 阳性和 Brdu 标记细胞之间的定量关系。可见分化和未分化细胞 Brdu 标记比例基本一致;而分化后的细胞 NSE 阳性比例约 52%,明显高于未分化细胞;分化后的细胞 NSE 阳性同时有 Brdu 标记的细胞比例约 32%,也明显高于未分化细胞;同时约有 20% NSE 阳性的神经元样细胞无 Brdu 标记,即没有进行细胞分裂。此结果意味着神经元特异性标记蛋白 NSE 的表达,可发生在细胞分裂之前、之后或伴随细胞分裂发生。为了进一步验证上述结果,在 MSC 诱导后 8 h 内快速掺入 Brdu 2 h,之后进行固定等免疫荧光等检测步骤。用连有 CY3 的 NF 抗体标记神经元样细胞,间接免疫荧光双标法显示 MSC 分化成神经元样细胞,有树突和轴突,由于 NF 阳性,即神经元样细胞呈现红色荧光。在分裂中期,合并 Brdu 掺入,即神经元样细胞呈现红色荧光伴有绿色细胞核。结果与采用 NSE 标记相似。

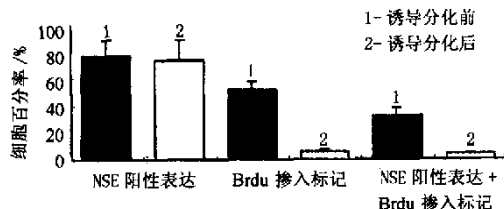


图 1 MSC 分化前后 NSE 阳性表达和 Brdu 掺入结果

Fig. 1 Results of NSE positive expression and Brdu incorporation in MSC before and after differentiation

3.4 抑制细胞 DNA 合成后与神经元样细胞分化的关系:为进一步说明神经元样细胞分化与细胞分裂的关系,使用阿糖胞苷 (DNA 合成抑制剂) 来检测分化过程。结果用 CY3 作为荧光染料,间接免疫荧光双标法显示神经元样细胞呈现红色荧光,而细胞核没有出现绿色荧光,说明没有 Brdu 标记,因为阿糖胞苷抑制了细胞分裂。图 2 可见加入阿糖胞苷后,细胞分裂受抑制,细胞数明显减少。图 3 表明在加入阿糖胞苷后,Brdu 标记细胞比例几乎为零,因为阿糖胞苷强烈抑制 DNA 合成,从而抑制了 Brdu 的摄取。而 NSE 阳性细胞比例没有明显改变。

4 讨论

本实验结果显示 MSC 和神经元样细胞的细胞

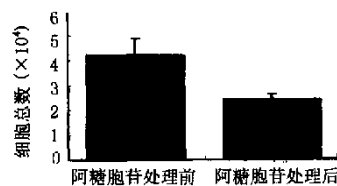


图 2 阿糖胞苷处理前后 MSC 细胞总数的变化

Fig. 2 Change of total number of MSC pre- and post-treatment by arabinosylcytosine

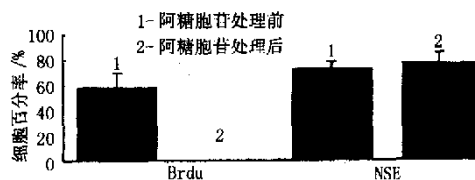


图 3 阿糖胞苷处理前后 MSC 细胞中 NSE 阳性表达和 Brdu 掺入细胞比例变化

Fig. 3 Change of NSE positive expression and Brdu incorporation in MSC pre- and post-treatment by arabinosylcytosine

分裂都很活跃。从 MSC 分化为神经元样细胞过程,在 24 h 提高细胞数 60%。而掺入 Brdu 后,LI 在分化早期较高,随着分化时间的延长,LI 从 40% 下降至 5% 左右。表明在诱导分化后的 12 h 内,细胞的增殖能力比较强,随着分化时间的延长,增殖能力有所降低,可能与神经元样细胞日趋成熟有关。意味着细胞分裂与细胞分化可以同时发生,神经元特异性标志的表达并不会阻止细胞分裂,这与 Black 等^[5,6]研究交感神经元分裂与分化的结果一致。

分化后的神经元样细胞不仅形态相似,而且表达神经元特异性基因:如 NSE、NF,同时还联合表达细胞分裂 S 期标志 Brdu。提示神经元多基因的表达和神经元形成的同时也伴随细胞分裂。推测 MSC 定向分化为神经元样细胞不是严格意义上细胞分裂后的现象。而且这个分化过程也不是按照简单的干细胞模式:不对称分裂分化,使其中一个子代细胞不可逆分化为功能专一的终末细胞而形成具有自我更新的有功能的细胞,如向神经分化的前体细胞^[7]。

以阿糖胞苷来证实神经元分化不需要细胞分裂。阿糖胞苷不仅可以抑制 Brdu 的表达,而且还阻止细胞增殖和细胞数的增加,但是并不阻断神经元特异性基因的表达。因此,神经元的形成和基因的表达并不一定需要细胞分裂。

本实验结果显示 MSC 定向诱导分化为神经元样细胞,并表达神经元特异性基因 NSE、NF,可以

在细胞分裂存在时发生,也可以不需要细胞分裂。这可以初步说明干细胞、多能干祖细胞和定向分化前体细胞之间的关系。在没有细胞分裂的前提下,神经元分化的发生意味着至少有一部分神经元直接来自有功能的前体细胞,而不是干细胞,因为干细胞需要经过细胞分裂才能分化。这个结论与以往的观点不同^[8]。他们认为干细胞需要经过细胞分裂分化成多能干祖细胞,才可以进行神经元分化。而且,研究表明神经元诱导剂至少直接作用于部分“已经准备好”的 MSC 引起神经元的分化。这与上述的结果一致。未分化 MSC 表达所有胚层的基因,包括内胚层、中胚层、外胚层和生殖层。在这个模式中,分化即是优先数量调节在分化潜能的 MSC 已表达的基因。肾的间质干细胞可以表达神经微丝蛋白的轻链(NF-L),一种神经外胚层的标记,说明多分化和多潜能的间质干细胞不只局限在骨髓^[9]。

本实验结果表明 MSC 定向诱导分化为神经元样细胞,不需要通过干细胞分裂的途径,这与 Shen 等^[10]研究一致,在胰腺细胞转分化为肝细胞的过程,只需要环境中的地塞米松,而不需要细胞分裂和体细胞的突变。尽管这样,本研究中部分神经元样细胞在分化前后联合表达细胞分裂 S 期标志 Brdu,与既往的干细胞分化途径一致。通过本实验可以暂时得出结论, MSC 分化可以通过细胞分裂或非细胞分裂途径, MSC 有干细胞和前体细胞的功能,即 MSC 具有多分化潜能。近年越来越多的研究表明,骨髓造血干细胞可逆地、持续地改变表型,影响细胞周期相关染色体的改变,最终允许分化转录因子进入。这个过程与本研究一致。多分化潜能的 MSC 具有干细

胞和前体细胞的功能,可使神经元的分化通过分裂和非分裂途径。因此,干细胞、祖细胞和前体细胞的功能是可逆的,很难严格区分^[11]。

References:

- [1] Clarke D L, Johansson C B, Wübertz J, et al. Generalized potential of adult neural stem cells [J]. *Science*, 2000, 288 (5471): 1660-1663.
- [2] Krause D S, Theise N D, Collector M I, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell [J]. *Cell*, 2001, 105(3): 369-377.
- [3] Yao X L, Zhang C, Lu X L, et al. Experimental research of human mesenchymal stem cells induced by Shenqi Fuzheng Injection in cerebral infarction [J]. *Chin J Integr Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 2005, 25(7): 629-632.
- [4] Yao X L, Zhang C, Liu W B, et al. Inducing differentiation of Shenqi Injection on human marrow mesenchymal stem cells [J]. *Chin J Nerv Ment Dis* (中国神经精神疾病杂志), 2004, 30(3): 211-212.
- [5] DiCicco-Bloom E, Townes-Anderson E, Black I B. Neuroblast mitosis in dissociated culture; regulation and relationship to differentiation [J]. *J Cell Biol*, 1990, 110(6): 2073-2086.
- [6] Wolf E, Black I B, DiCicco-Bloom E. Mitotic sympathetic neuroblasts initiate axonal pathfinding *in vivo* [J]. *J Neurobiol*, 1999, 40(3): 366-374.
- [7] Anderson D J. Stem cells and pattern formation in the nervous system; the possible versus the actual [J]. *Neuron*, 2001, 30(1): 19-35.
- [8] Blau H M, Brazelton T R, Weimann J M. The evolving concept of a stem cell; entity or function? [J]. *Cell*, 2001, 105: 829-841.
- [9] Shen C N, Slack J M, Tosh D. Molecular basis of transdifferentiation of pancreas to liver [J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2 (12): 879-887.
- [10] Sainio K, Nonclercq D, Saarma M, et al. Neuronal characteristics in embryonic renal stroma [J]. *Int J Dev Biol*, 1994, 38(1): 77-84.
- [11] Guillermo M E, Woodbury D, Black I B. Marrow stromal cells, mitosis, and neuronal differentiation; stem cell and precursor functions [J]. *Stem Cells*, 2003, 21(3): 437-448.

欢迎订阅 2006 年《中成药》杂志

《中成药》杂志是国家食品药品监督管理局信息中心中成药信息站出版的国家级期刊,月刊,国内外公开发行业。

本杂志创刊于 1978 年 8 月。本刊历来被权威的北京大学图书馆确认为全国中文核心期刊,2004 年再次被确认,见《中文核心期刊要目总览》(北京大学出版社 2004 年版)。本刊多年来一直被确认为中国自然科学核心期刊,中国科学引文数据库核心期刊,《中文科技资料目录——医药卫生》收录源期刊,《中国生物学文摘》数据库收录期刊,并获得首届中国学术期刊《CAJ—CD 规范》优秀期刊奖。

本刊主要报道中成药制剂工艺,药理作用,质量标准,成分分析,饮片炮制,临床应用,综述,古方研究,制药设备,企业管理,植物提取物等方面的研究论文。科研论文附英文摘要,并欢迎英文稿件。本刊为从事中成药及植物药科研、生产、教育、临床及经营、管理人员的必读刊物。

本刊为月刊,每期(册)定价为人民币 15.00 元,全年 180 元。国内邮发代号:4-249;国外代号:M-1093。欢迎到当地邮局订阅,也可直接向本刊编辑部订阅。

编辑部地址:上海市汉口路 239 号 131 室

电话:(021) 63213275 63213363

电子邮箱:med@stn.sh.cn

邮编:200002

传真:(021) 63213363

网址:http://www.cherb.com.cn