

缺氧后小鼠脑匀浆提取液对儿童 MSCs 分化为神经细胞的影响

康颖¹, 罗向阳², 黄云燕¹, 李栋方², 何展文², 岑丹阳²

(1. 广东药学院临床医学院 儿科教研室, 广东 广州 510310; 2. 中山大学附属第二医院 儿科, 广东 广州 510120)

[摘要] 目的: 观察缺氧后不同时段小鼠脑匀浆提取液对儿童骨髓间充质干细胞(MSCs)分化为神经样细胞的影响, 为筛选 MSCs 的最佳移植时间提供依据。方法: 制作缺氧小鼠模型; 并制取缺氧不同时间段脑匀浆提取液; 诱导儿童 MSCs; 比较 MSCs 分化为神经样细胞的阳性率。结果: 缺氧后 1、4、7、10、13 d 小鼠脑匀浆提取液均可将 MSCs 诱导成神经样细胞, 经免疫学鉴定 NES 染色强阳性; 但各组阳性率不同, 以缺氧 10 d 后阳性率(21.02 ± 3.38)% 最高, 与其他各组比较有统计学差异($P < 0.05$)。结论: 缺氧后小鼠脑匀浆提取液可诱导儿童 MSCs 分化为神经样细胞, 缺氧后 10 d 的分化率最高。

[关键词] 缺氧; 脑匀浆诱导液; 骨髓间充质干细胞; 神经样细胞

[中图分类号] R748 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2009)06-0664-04

Homogeneous extract of hypoxia mice brain induce child's MSCs to neuron-like cells

KANG Ying¹, LUO Xiang-yang², HUANG Yun-yan¹, LI Dong-fang²,
HE Zhan-wen², CEN Dan-yang²

(1. Department of Pediatrics, School of Clinical Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510310 China;
2. Department of Pediatrics, the 2nd Affiliated Hospital, Zhongshan University, Guangzhou 510120, China)

[Abstract] **Aim:** To investigate the effects of homogeneous extract of hypoxia mice brain induce the marrow mesenchyma stem cells (MSCs) of child to neuron-like cells, to select the best time when MSCs are transplanted in vitro. **Methods:** Established animal model of anoxic mouse and refined the extract of brain organization, induced MSCs to neuron-like cells and identified the neuron-like cells immuno-chemically and compared the different positive rate. **Results:** MSCs can be induced to neuron-like cells which show positive when staining by NSE, and the highest positive rate is A10 (21.02 ± 3.38)%, which occurred 10 days later after hypoxia. **Conclusion:** MSCs can be induced to neuron-like cells by extract of hypoxia mice brain, and the 10th day later after hypoxia is the best time.

[Key words] hypoxia; brain extract-plasma; MSCs; neuron-like cells

缺氧是儿童常见的病理状态, 可造成神经细胞不可逆损害, 由于神经细胞的不可再生性, 有必要寻

找一种切实有效的修复受损脑组织的治疗方法。骨髓间充质干细胞(MSCs)具有自我更新、高度增殖以

[收稿日期] 2009-10-14

[基金项目] 广东省自然科学基金(07001590)

[作者简介] 康颖(1978-), 女, 讲师, 研究方向: 小儿神经病学方面的研究

通讯作者: 罗向阳, 副教授, E-mail: luoxxy33@hotmail.com

及在特定条件下进行多向分化的特性,包括向神经元样细胞分化的潜能^[1-2]。目前国内外研究认为,外源性 MSCs 不仅可在正常小鼠的脑内转变为神经元,表达神经特异核蛋白(NeuN)^[3];还可以在脑组织缺血缺氧性损伤的情况下,在体内诱导分化为有一定功能的神经元细胞^[4-5]。但缺氧后的脑组织提取液能否在体外诱导 MSCs 为神经元样细胞,在脑缺血性损伤后何时进行移植,现在研究尚少。本实验拟研究小鼠缺氧损伤后不同时间段脑匀浆提取液在体外诱导儿童 MSCs,观察 MSCs 能否分化成神经元样细胞,以及比较各时间段提取液的诱导阳性率,筛选最佳时间点。

1 材料和方法

1.1 材料

(1)实验材料和动物 骨髓间质干细胞取自正常儿童骨髓(自愿供者),经贴壁培养、传代后,筛选出形态较均一的 MSCs。动物选取正常成年昆明小鼠(6~8周)。

(2)主要试剂 低糖达尔伯克改良伊格尔培养基(L-DMEM)(Gibco 公司),胎牛血清 FBS(杭州四季清公司),兔抗人神经烯醇化酶(NSE)、兔抗人胶质纤维酸性蛋白(GFAP)(博士德公司),荧光二抗 CY3(羊抗兔免疫球蛋白)(Sigma 公司),体积分数为 8%的 O₂ 及 92% N₂ 的混合气体(广州气体厂定制)。

1.2 实验方法

(1)MSCs 的分离、培养、纯化与鉴定 无菌条件下取正常儿童骨髓 2 mL,贴壁培养法培养,利用 MSCs 贴壁特性将其与骨髓中其他细胞分离。传代培养 3~5 代之后可达到 95% 以上纯化。MSCs 培养至 P5 代时送流式细胞仪室检测 CD34、CD44、CD29。检测结果 CD29、CD44 阳性,CD34 阴性,证明为均一 MSCs。

(2)缺氧动物模型的制作 将 6~8 周正常成年昆明小鼠放入密闭的透明塑料箱中,通含体积分数 8% O₂ 及 92% N₂ 的混合气体,气体流量为 2 L/min,箱体的另一端与外界相通,以保持箱内的压力与大气一致。箱内置钠石灰以吸收小鼠呼出的 CO₂,水硅胶以吸收水蒸气。通气 2.5 h 后,将小鼠放出,恢复正常通气于自然空气中。为缺氧组(A)。正常对照组(B)放入同样密闭箱中 2.5 h,通正常空气。

(3)脑匀浆诱导液的提取制备 将缺氧小鼠随机分为 5 组,每组 8 只($n=8$)。分别在缺氧后 1 d(A1),4 d(A4),7 d(A7),10 d(A10),13 d(A13)引

颈处死。体积分数为 75% 酒精浸泡数分钟消毒后,在无菌条件下取出脑组织。一侧脑组织以体积分数为 10% 福尔马林固定,以备制作病理切片用;一侧脑组织称质量,按每 150 mL 湿重加 1 mL 的 L-DMEM 培养基的比例研磨,将研磨好的脑匀浆,以 2 000 r/min,离心 10 min,吸取上清液,以 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌制备成诱导液,-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。使用时 37 $^{\circ}$ C 水浴解冻,按 20% 比例以 L-DMEM 培养基稀释,加入已生长 P5 的 MSCs 的 12 孔培养板中诱导。正常对照组(B)取 8 只小鼠以同样方法制备脑匀浆诱导液。

(4)MSCs 诱导为神经元样细胞的鉴定 将与诱导液作用 8 h 之后的细胞固定,用荧光免疫组化的方法检测神经元样细胞所特有的兔抗人神经烯醇化酶(NSE)及星形胶质细胞所特有的胶质纤维酸性蛋白(GFAP),加入荧光二抗 CY3(羊抗兔免疫球蛋白),阳性细胞在荧光显微镜下呈红色荧光。免疫组染色后显微镜下随机数取 8 个非重叠视野($\times 100$)计算阳性细胞占总细胞数的比例,结果(均数 \pm 标准差)表示。

2 结果

(1)MSCs 的特性及鉴定 细胞呈贴壁生长,开始为单一圆形,5~7 d 后为梭形或纺锤形,细胞核大,增殖迅速,10~14 d 左右融合,长满瓶底(图 1)。从骨髓中分离出单核细胞层培养,通过换液除去悬浮的造血干细胞;贴壁细胞消化后经流式细胞仪检测细胞均一性好,CD29、CD44 阳性,CD34 阴性,证明本实验方法可得到纯度较高的 MSCs。

(2)缺氧动物模型的制作 本实验将 45 只小鼠进行缺氧通气,在缺氧过程中,随时间延长,小鼠渐出烦躁、平衡失调、发抖、嗜睡等现象,无小鼠死亡;但缺氧后第 1 天死亡 2 只,第 4、第 5 天分别死亡 1 只,剩余 41 只均可存活至实验所需天数。死亡的小鼠无其他外因,考虑为缺氧后损伤所致。

(3)MSCs 诱导成神经元样细胞及免疫细胞化学鉴定 将制备好的小鼠脑匀浆诱导液(A1、A4、A7、A10、A13、B 组)按 20% 比例以 L-DMEM 稀释后,加入 60%~70% 融合的 P5 代 MSCs 中,空白对照组(C 组)只加入 L-DMEM。光镜下观察,诱导 3 h 后,就可见少量细胞出现形态改变,MSCs 细胞向核收缩,胞体变圆,折光性变强;6 h 后,可见一部分细胞转变成类似神经元样细胞的形态,突起伸出。突起数目由开始的两极发展到 3~5 个多极,并在轴突末端出现一级和二级类似树突的分支,8 h 后更多

的细胞出现突起,有些细胞突起相互连接形成网状结构(图 2)。对照组细胞仍保持原有形态不变。

采用 NSE 和 GFAP 进行免疫细胞化学染色鉴定,并计算诱导阳性率。结果表明,脑组织提取液诱导 8 h 后,那些折光性强有突起的细胞表现为 NSE 染色强阳性(图 3~5)。各组 GFAP 染色无明显阳性细胞。空白对照组 C 无 NSE 和 GFAP 阳性细胞出现。

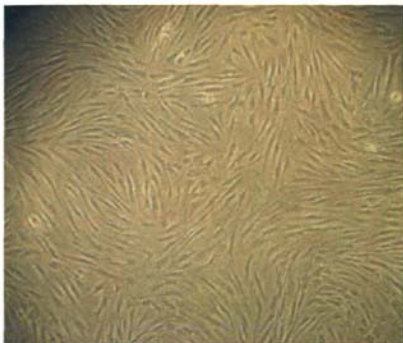


图 1 MSCs P5 代 (×100)



图 2 各组 MSCs 诱导 8 h 后,突起增多,个别细胞连成网状 (×100)



图 3 荧光显微镜下,阳性细胞可见红色荧光(A1) (×100)



图 4 A7 阳性细胞较 A1 组多 (×100)



图 5 A10 组阳性细胞明显较多 (×100)

(4) MSCs 诱导成神经元样细胞的阳性率及统计分析 脑组织提取液诱导 8 h 后,各组 NSE 及 GFAP 的强阳性表达率详见(表 1)。

表 1 A、B、C 各组间 NSE 及 GFAP 表达情况

分组	n	NSE(+)	GFAP(+)
A1	8	11.69% ± 2.10%	-
A4	8	13.66% ± 2.31%	-
A7	8	15.09% ± 2.28%	-
A10	8	21.02% ± 3.38% ¹⁾²⁾	-
A13	8	14.68% ± 4.44%	-
B	8	20.48% ± 3.16% ²⁾	-
C	8	-	-

1) A10 与 A1、A4、A7、A13 有显著统计学差异, $P < 0.05$; 2) A10 与 B 组无统计学差异, $P > 0.05$

结果经 SPSS 10.0 统计软件分析(方差分析), A10 组阳性率为 $(21.02 \pm 3.38)\%$ 与 A1 $(11.69 \pm 2.10)\%$ 、A4 $(13.66 \pm 2.31)\%$ 、A7 $(15.09 \pm 2.28)\%$ 及 A13 $(14.68 \pm 4.44)\%$ 组有显著统计学差异($P < 0.05$)。说明缺氧后第 10 天为此 5 个时间点中最佳移植时间。其中组与组间比较, A1、A4、A13 无统计学差异,与 A7 有统计学差异($P = 0.04$)。

<0.05);表明缺氧后1、4、13 d 移植无明显差异,而缺氧后7 d 优于第1、4、13 d。B组阳性率为 $(20.48 \pm 3.16)\%$,与A1、A4、A7、A13有显著统计学差异($P < 0.05$),与A10无统计学差异($P = 0.565 > 0.05$)。C组无阳性表达。

3 讨论

(1) MSCs 诱导成为神经元样细胞 本实验所用缺氧脑组织提取液及可诱导 MSCs 向神经元样细胞分化,考虑其分化机制可能与神经营养因子启动 MSCs 外胚层神经组织特有基因有关。脑缺氧时防御和应激反应可触发和启动一系列内源性神经保护,其作用机制涉及腺苷、神经营养因子(NTF)、 γ -氨基丁酸、组织基质金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)等多个环节^[1-2]。脑缺血、缺氧等损伤后,许多 NTF 及其受体的表达上调,对受损神经组织发挥营养、支持、保护和再生等多种效应;并且也促进外源性 MSCs 向神经细胞分化。但内源性神经保护作用随时间推移在达到高峰后会逐渐减弱。目前 MSCs 的跨胚层分化的机制研究刚刚起步,一般认为可能与 MSCs 的再程序化有关,至于激活哪些转录因子或基因使它跨胚层分化为某些特定的细胞至今仍不清楚^[6]。本实验经诱导后的 MSCs 均未有 GFAP 的明显阳性表达,说明在体外诱导实验中 MSCs 基本不能被诱导成为星形胶质样细胞。考虑为在脑匀浆提取液冻融的过程中,可能损失一些有活性的因子,导致 MSCs 不能向星形胶质样细胞分化。这与其他 MSCs 体内分化实验可分别表达 NSE 及 GFAP 有一定差异。

(2) 筛选 MSCs 移植的最佳时间点 脑缺氧后脑内既存在对神经细胞的损伤因素,又存在有利于神经细胞修复的保护因素;对于外源性的 MSCs 来说,能否在二者共同作用的最佳时间点移植入体内至关重要。Hofstetter 等^[7]发现脑缺血损伤后立即或一周后移植,后者 MSCs 的神经性分化效率较前者为高。在脑细胞坏死急性期存在产生大量氧自由基,导致脂质过氧化反应等一系列细胞损伤;溶酶体酶的释放、吞噬细胞的趋化聚集等,不仅对自身的神经组织造成损伤,也不利于外源性 MSCs 存活。随时间的推移,急性损伤因素逐渐趋于平缓并逐渐减弱。并且在脑损伤炎症反应中,除血源性吞噬细胞外,还有来自中枢神经系统(CNS)的胶质细胞参与吞噬清除轴突和髓鞘碎片,这样脑损伤后胶质的大

量增生是产生胶质瘢痕的主要原因之一。而胶质瘢痕形成会阻碍神经突起发育,影响神经再生与重建。

本实验筛选出缺氧10 d后脑匀浆提取液诱导阳性率最高,说明 MSCs 诱导成为神经元样细胞阳性率逐渐增加,在第10天达到顶点,继而下降。与 Hofstetter 等^[7]实验结果一致。说明在脑缺氧性损伤后10 d,有利于 MSCs 分化的因素与有害因素之比达到一个最高点,此时 MSCs 的诱导分化阳性率最高。10 d 之后,阳性率有所下降,考虑跟促进 MSCs 分化的神经营养因子减少等因素相关。第10天的阳性率与正常脑匀浆诱导阳性率相同,说明此前的不利于 MSC 分化的因素占主导,并随时间推移下降;而在第10天才达到与正常脑匀浆相同的效果。

本实验为进一步的体内移植实验的最佳时间点筛选提供了重要线索。但体内实验所涉及的因素更多更复杂,在脑匀浆提取液冻融的过程中,也有可能损失一些有活性的因子,所以体内实验有待更深入的研究。

[参考文献]

- [1] 苏镇培,卢林.脑缺血时的脑保护[J].现代实用医学,2002,14(12):635-637.
- [2] 罗向阳,黄绍良.细胞因子与癫痫[J].中国病理生理杂志,2002,18(6):734-736.
- [3] KOPEN G C, PROCKOP D J, PHINNEY D G. Marrow stromal cell migrate through forebrain and cerebellum and they differentiate into astrocyte after injection into neonatal mouse brains [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996 (19):10711-10716.
- [4] LI Y, CHOPP M, CHEN J, et al. Intrastriatal transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice [J]. Cereb Blood Flow, 2000, 20(9):1311-1319.
- [5] 孟明,张化彪.骨髓间充质干细胞对神经损伤修复的保护机制[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(42):8573-8577.
- [6] 王延华,王惠君,John W McDonald.干细胞理论与技术[M].北京:科学出版社,2005:59-62.
- [7] WOODBURY D, KATHLEEN R, BLACK I, et al. Adult bone marrow stromal stem cells express germLine, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis [J]. Neurosci Res, 2002, 69(6):908-917.

[责任编辑:陈咏梅]