

· 实验研究 ·

脊髓性肌萎缩症患儿骨髓间质干细胞 分化为神经元样细胞的实验研究

杨晓苏¹, 罗新明¹, 肖波¹, 李新中²

(中南大学湘雅医院 1. 神经内科, 2. 药剂科, 湖南 长沙 410008)

[摘要] 目的 脊髓性肌萎缩症(SMA)是一组常染色体隐性遗传性疾病,由于SMN基因的缺失或突变,导致脊髓前角细胞变性坏死,引起肢体近端肌肉无力和肌萎缩。该病至今无有效治疗,干细胞治疗可望给患者带来福音。本研究拟探讨SMA患者骨髓间质干细胞(MSCs)能否分化为神经元样细胞,从而为SMA的干细胞治疗提供实验依据。方法 用PCR-RFLP的方法对SMA患者进行基因诊断;分离和纯化患者的(MSCs),在bFGF预诱导后,再用黄芩甙诱导MSCs分化为神经元样细胞;用神经元标志物NSE和NF鉴定诱导的神经元样细胞。上述研究均与对照者进行对比。结果 PCR-RFLP证实所选患者SMN1基因外显子7缺失,而对照者无缺失;SMA患者和对照者的MSCs形态相同,增殖速度相似;两组MSCs经黄芩甙诱导6d后,大多数细胞转变为类似于神经元的形态,有长的突起,相互之间连接呈网状。免疫荧光染色鉴定两组分化后的神经元样细胞,NSE和NF均为阳性。结论 SMN1基因缺失不影响MSCs的增殖和分化,SMA患者的MSCs能够分化为神经元样细胞。 [中国当代儿科杂志,2007,9(5):453-456]

[关键词] 脊髓性肌萎缩症;骨髓间质干细胞;黄芩甙;神经元样细胞

[中图分类号] R741 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2007)05-0453-04

An experimental research on differentiation of mesenchymal stem cells derived from children with spinal muscular atrophy into neuron-like cells

YANG Xiao-Su, LUO Xin-Ming, XIAO Bo, LI Xin-Zhong. Department of Neurology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China (Email: yanxia@public.cs.hn.cn)

Abstract: Objective Spinal muscular atrophy (SMA) is an autosomal recessive neurodegenerative disease. It is characterized by selective loss of spinal cord motor neurons leading to muscle atrophy and is the result of mutation or deletion of the survival motor neuron (SMN) gene. Currently, there are no effective therapies for this disease. Stem cell therapy is a new prospect for SMA patients. This study aimed to investigate whether mesenchymal stem cells (MSCs) can be differentiated into neuron-like cells (NLCs) in SMA patients in order to provide a basis for stem cell therapy for SMA. **Methods** SMA was definitively diagnosed using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Two children without SMN1 gene deletion were used as controls. MSCs were isolated and purified from SMA patients and controls, and induced into NLCs by bFGF and baicalin. The NLCs were identified by immunofluorescence staining with NSE and NF monoclonal antibodies. **Results** SMA patients showed the deletion of SMN1 exon 7. The morphous and proliferative speed of MSCs between SMA patients and controls were similar. After 6-day induction, MSCs of the two groups displayed similar morphology to that of neurons, with long processes forming extensive networks. NSE and NF, the neuronal markers, were detected in the differentiated NLCs of the two groups. **Conclusions** SMN1 deletion appears not to affect the proliferation and differentiation of MSCs. MSCs of SMA patients can be differentiated into NLCs.

[Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9(5):453-456]

Key words: Spinal muscular atrophy; Mesenchymal stem cells; Baicalin; Neuron-like cells

脊髓性肌萎缩症(spinal muscular atrophy, SMA)是一组常染色体隐性遗传性疾病,其中儿童型(I~III)是由致病基因运动神经元生存基因(survival of motor neuron, SMN)端粒侧拷贝SMN1缺失引起^[1],

表现为脊髓前角细胞变性所致的肌无力和肌萎缩,本病至今无有效治疗。干细胞治疗的问世,无疑给SMA患者带来了希望。本课题将研究SMA患儿的骨髓间质干细胞(MSCs)能否分化为神经元样细胞,从而为

[收稿日期]2007-01-06;[修回日期]2007-03-11

[基金项目]国家自然科学基金资助项目(No30170330);湖南省自然科学基金资助项目(02JJY3016)。

[作者简介]杨晓苏,女,在读博士,主任医师,科副主任。主攻方向:小儿神经病学。

SMA 的干细胞治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

L-DMEM(美国 GIBCO 公司),新生牛血清(美国 Hyclone 公司),淋巴细胞分离液(天津 TDK 公司),碱性成纤维生长因子(bFGF)(英国 PeproTech 公司),CD34、CD44 单抗(华美生物公司)。小鼠抗人神经元特异性烯醇化酶(NSE)单抗、小鼠抗人神经丝蛋白(NF)单抗、SP 试剂盒和 DAB 显色试剂盒(中山生物公司),羊抗小鼠 Cy3(美国 GIBCO 公司)。Taq 酶和 dNTP(北京鼎国生物公司),限制性内切酶 Dra I(上海 Promega 公司)。

SMN 外显子 7 引物序列为:F: 5'-AGACTATCAACTTAATTTCTGATCA-3',R: 5'-CCTTCCTTCTTTTTGATT TTGTTT-3'(上海博亚公司合成)。

1.2 实验对象

选择符合 1992 年及 1994 年国际脊髓性肌萎缩症会议诊断标准^[2,3]的患者,在知情同意的前提下骨穿抽取骨髓;对照者骨髓来源于本院胸外科手术中切除的无肿瘤及血液系统疾病患者的肋骨。患者及对照者均进行 SMN 基因检测确诊。

1.3 基因诊断—PCR-RFLP 法

酚-氯仿法提取 DNA,ddH₂O 溶解后置 -20℃ 冰箱内备用。PCR 扩增体系(25 μL):gDNA 100 ng, Taq 酶 2 U,10 mM dNTPs 1 μL,10 × PCR buffer(含 Mg²⁺)2.5 μL,正反向引物各 5 pmol,加 ddH₂O 至 25 μL。经 DYAD PCR 仪扩增,反应条件:95℃ 预变性 5 min,95℃ 45 s,55℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 50 s,循环 35 次后以 72℃ 维持 10 min。

取 PCR 产物 15 μL,加入限制性内切酶 Dra I 10U 以及相应的缓冲液、ddH₂O 至 30 μL,37℃ 孵育 6 h。酶切后用 2% 琼脂糖凝胶电泳(电压 110 V,40 min),图像分析仪照相、观察结果。结果判读:PCR 扩增 SMN1 和 SMN2 的产物均为 188 bp,酶切后 SMN2 切成 164 bp 和 24 bp(后者电泳出凝胶外),而 SMN1 不能被酶切,见到 188 bp 和 164 bp 两条带者为正常,只有 164 bp 一条带提示 SMN1 缺失。

1.4 MSCs 培养及鉴定

无菌条件下,骨穿或冲洗碎骨获得骨髓,离心,弃上清及脂肪层,沉淀用 L-DMEM 充分混匀,用 Ficoll-Paque 分离液(1.077)梯度离心,收集单核细胞层,用 L-DMEM 洗涤 2 次。细胞沉淀中加入含 10%

新生牛血清的 L-DMEM,以 1×10^6 /mL 密度接种于培养瓶,放入 37℃,5% CO₂,饱和湿度的 CO₂ 孵育箱内,4 d 后更换培养液,弃去未贴壁的细胞,3~4 d 换液 1 次,12 d 后 MSCs 接近融合,用 0.25% 胰酶室温消化(镜下控制时间),按 1:3 比例传代。选择生长状态良好的第 3 代 MSCs,按 2×10^4 /孔密度接种于事先放置有消毒盖玻片的 6 孔板内制备细胞爬片,用 CD34 和 CD44 单抗做免疫细胞化学鉴定。

1.5 MSCs 的生长曲线绘制

取第 3 代患者和对照者 MSCs 分别接种 8 个 6 孔培养板(2×10^4 /孔),每隔 24 h 消化细胞并计数,共计 8 个时间点,每个时间点分别计数 6 孔,每孔计数 2 次取平均值,作 MSCs 生长曲线。

1.6 神经元样细胞的诱导及鉴定

将传至第 4~6 代的细胞按 2×10^4 /孔密度接种于事先放置有消毒盖玻片的 6 孔板内制备细胞爬片。细胞 60% 融合后,参照文献^[4]的方法进行诱导分化:用含 10 ng/mL bFGF 细胞因子的 L-DMEM(含 10% 新生牛血清)预诱导 24 h, D-Hank's 液清洗 3 次,加入含 0.4 mmol/L 黄芩甙的无血清 DMEM 培养基维持诱导 6 d。诱导后细胞用 NSE 和 NF 单抗行免疫荧光鉴定。

1.7 统计学分析

测定数值用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组细胞在不同时间点的细胞计数差异的比较采用重复测量资料的方差分析,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。图表用 Excel 2003 绘制。统计学分析用 SPSS10.0 统计软件包处理。

2 结果

2.1 临床诊断及 SMN 基因检测

收集 SMA 患者 3 例(男 2 例、女 1 例),年龄分别为 10 岁、11 岁、13 岁,起病年龄分别为 2 岁、2.5 岁、6 岁。患者均有近端肌无力和肌萎缩,肌电图示神经源性损害,可见巨大电位,临床符合 SMA III 型。PCR-RFLP 结果示:SMN 外显子 7 扩增产物均为 188 bp, Dra I 酶切后,仅见 164 bp 条带,说明 SMN1 缺失,确诊为患者纳入;对照者 2 例,年龄分别为 10 岁、12 岁,无神经系统症状和体征。PCR-RFLP 结果示:Dra I 酶切后见 188 bp 和 164 bp 两条带,无 SMN1 缺失,作为对照者纳入(图 1)。

2.2 MSCs 形态及鉴定

骨髓中单核细胞接种于塑料培养瓶后,第 3 天逐渐出现贴壁细胞,呈长梭形,为单个或几个细胞的

克隆,即为原代 MSCs。培养 11 ~ 13 d 后,细胞接近融合,细胞排列有一定的方向性,呈“漩涡样”生长,经过换液及传代,细胞趋于纯化(图 2)。SMA 患者和对照者的 MSCs 形态相同。

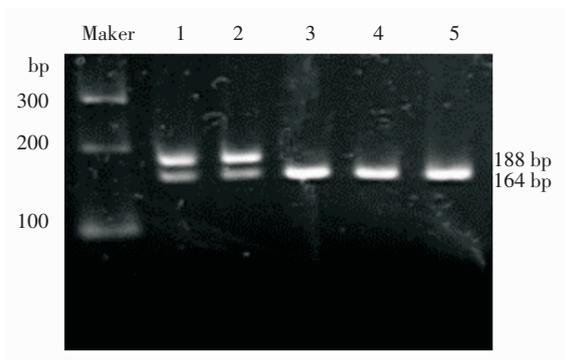


图 1 SMN exon7 酶切电泳图。1、2 道为对照者,3、4、5 道为患者

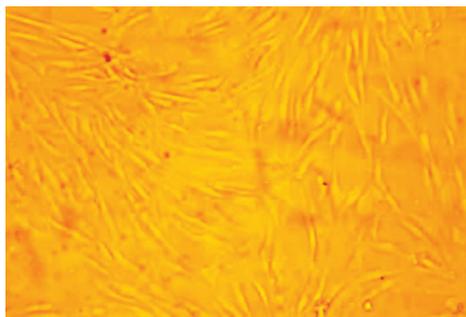


图 2 第 3 代的 MSCs × 100

2.3 MSCs 生长曲线

SMA 患者和对照者 MSCs 增殖趋势及速度相似(图 3),两曲线差异无统计学意义($F = 1.509, P > 0.05$)。

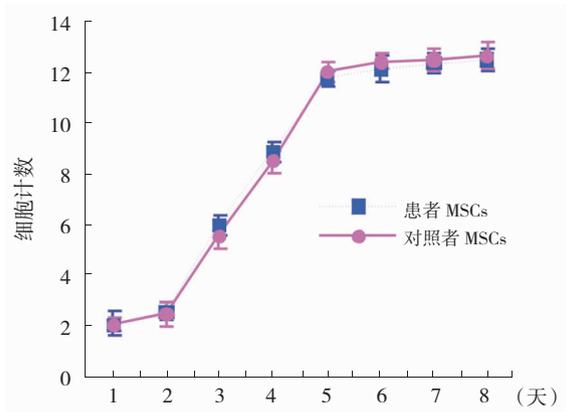


图 3 患者和对照者 MSCs 生长曲线

2.4 MSCs 向神经元样细胞的转化及鉴定

黄芩甙诱导 6 d 后,大多数细胞转变为类似于

神经元的形态,有长的突起,相互之间连接呈网状,细胞周围有光晕,部分细胞脱落、死亡。SMA 患者和对照者 MSCs 在分化过程中细胞形态及其变化相似(图 4)。

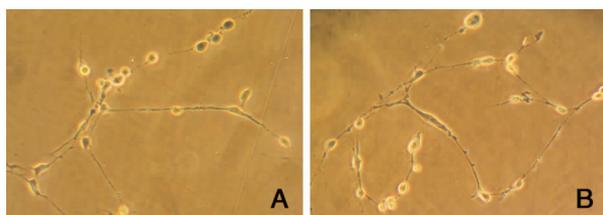


图 4 MSCs 诱导后神经元样细胞形态(×100) A: SMA 患者 MSCs 诱导后,胞体收缩,形成突起并交织成网; B: 对照者 MSCs 诱导后,胞体收缩,形成突起并交织成网

用免疫荧光染色鉴定神经元特异性标志物 NSE、NF,结果显示,SMA 患者和对照者分化后的神经元样细胞 NSE、NF 均为阳性(图 5)。

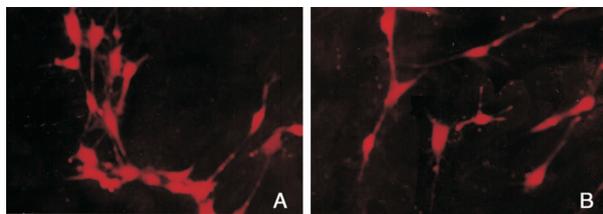


图 5 SMA 患者 MSCs 诱导后神经元样细胞表面特征性抗原鉴定(Cy3 染色 × 100) A: 诱导后 NSE 阳性细胞; B: 诱导后 NF 阳性细胞

3 讨论

儿童型脊髓性肌萎缩症主要是由于 SMN1 缺失引起。不同研究中心检测了 SMA 患者 SMN1 缺失情况,国外研究显示缺失率为 91% ~ 100%,平均为 94%,国内为 90%^[5-8]。其中我们的研究^[8]显示 I, II 型 SMA 患者 SMN1 外显子 7 缺失率为 100%, III 型缺失率低于 I, II 型,为 76%。因此,对于 I, II 型 SMA 患者,可用 SMN1 基因缺失检测代替肌电图和肌活检等有创检查而作为确诊手段。而对 III 型 SMA 患者来说,由于 SMN1 缺失的检出率相对较低些,当未检出 SMN1 外显子 7 缺失时,应结合临床考虑。本实验所选用的患者,除了有典型的脊髓性肌萎缩症临床特征外,也检出 SMN1 外显子 7 缺失,所以患者的 SMA 的诊断是可以成立的。

骨髓间质干细胞是成体干细胞,具有多向分化的潜能,大量的实验证明 MSCs 在体内外一定的诱导条件下,可分化为成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细

胞、成肌细胞、心肌细胞、胶质细胞和神经元样细胞等多种细胞系细胞。由 MSCs 诱导分化而来的神经元样细胞不但能表达神经元的表面标志 NSE 和 NF 等,还能高水平表达运动神经元生存蛋白(SMN 蛋白)^[9]。SMN 蛋白在各组织中均有表达,但表达水平不尽相同^[9,10],其中在运动神经系统中高水平表达,而在成纤维细胞、淋巴细胞和骨髓间质细胞中低水平表达。神经元样细胞能高水平表达 SMN 蛋白,则进一步说明了它具有神经元的特征。

SMN 蛋白是 SMA 致病基因—SMN 基因的产物。SMN 蛋白的缺乏引起了患者脊髓前角运动神经元的变性,但其具体的生物化学机制尚不完全清楚。现有的研究表明,SMN 蛋白是稳定的多蛋白复合体—SMN 蛋白复合体的组成成分,此复合体可见于细胞质和核 gems 小体内。SMN 复合体中除了 SMN 蛋白外,至少包括六种其他的蛋白:Gemins2 ~ 7。SMN 复合体介导了 Sm 核心域的形成,促进剪接体 snRNPs 的装配。SMN 复合体通过和 snRNAs 的特殊序列结合,识别靶 RNA 的正确序列并确保 snRNPs 装配的特异性^[11]。SMN 复合体和很多蛋白相互作用,包括 P53^[12], Bcl-2^[13] 和 ZRP1^[14] 等,可能参与了细胞的凋亡调节。但 SMN 蛋白能否影响 MSCs 分化为神经元样细胞尚未见报道。本研究发现,SMN1 缺失及其产物 SMN 蛋白缺乏的 SMA 患者,其 MSCs 和对照者的 MSCs 在形态上无明显区别,其增殖速度和分化能力也无明显差异,说明 SMN 蛋白对 MSCs 的生长和向神经元样细胞的分化上无明显影响,由此推测 SMN 蛋白对神经元细胞的生发可能无明显影响,只是缺少 SMN 蛋白使发育成熟的神经元细胞难以维持长期生存。在基因敲除小鼠的实验中发现^[15],在胚胎早期可见神经细胞的生发,但随后有大量的神经细胞凋亡就支持这一观点。另外,SMN 蛋白在神经元细胞和骨髓间质细胞^[9,10] 中表达水平的差异,亦提示 MSCs 的生长和增殖对 SMN 蛋白的依赖性可能不如神经细胞。

经过一系列的研究,体外诱导 MSCs 分化为神经元样细胞已经有了多种比较成熟的方法,包括脱甲基制剂、抗氧化剂、生长因子、视黄酸和增加细胞内 cAMP 的复合体等。本实验采用的中药黄芩甙单体是一种较弱的抗氧化剂,其特点是诱导过程温和而高效,而且诱导的细胞基本不表达 GFAP 和 S-100 等胶质细胞标志物,说明黄芩甙诱导具有定向性,主要朝神经细胞方向分化^[3],而且黄芩甙诱导后细胞存活率高^[3]。本实验采用黄芩甙诱导后,细胞存活时间(>6 d)明显长于我们以前用抗氧化剂二甲基

亚砷和丁化羟基苯甲醚诱导的神经元样细胞(<2 d),支持上述观点。本实验结果证实,SMA 患者的骨髓间质干细胞能够诱导分化为神经元样细胞,这为 SMA 的治疗提供了一个可喜的信息。

[参 考 文 献]

- [1] Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Bulet P, Villet L, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene[J]. Cell, 1995, 80(1):155-165.
- [2] Theodore L, Kay E. International SMA consortium meeting report [J]. Neuromusc Disord, 1992, 2(5/6):423-428.
- [3] Klaus Z, Kay E. 59th ENMC International Workshop: spinal muscular atrophies: recent progress and revised diagnostic criteria[J]. Neuromusc Disord, 1999, 9(4):272-278.
- [4] 贾延劫,杨于嘉,周燕,宋元宗,刘丽旭,宋建辉,等.黄芩甙诱导大鼠骨髓基质细胞向神经细胞化的研究[J].中华医学杂志,2002,82(19):1337-1341.
- [5] Simard LR, Rochette C, Semionov A, Movgan K, Vanasse M. SMN-t and NAIP mutations in Canadian families with spinal muscular atrophy (SMA): genotype/phenotype correlations with disease severity[J]. Am J Med Genet, 1997, 72(1):51-58.
- [6] Velasco E, Valero C, Moreno F, Valero A, Hernandez-ethico C. Molecular analysis of the SMN and NAIP genes in Spanish spinal muscular atrophy (SMA) families and correlation between number of copies of cBCD541 and SMA phenotype[J]. Hum Mol Genet, 1996, 5(2):257-263.
- [7] Wirth B. An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA) [J]. Hum Mut, 2000, 15(3):228-237.
- [8] 杨晓苏,邓益东,肖波.运动神经元存活基因缺失与微突变检测及临床意义[J].中国当代儿科杂志,2005,7(6):489-492.
- [9] 杨晓苏,吴海香,肖波.人骨髓间质干细胞分化为神经元样细胞及 SMN 蛋白表达的研究[J].中华医学杂志,2005,85(16):1121-1128.
- [10] Coovert DD, Le TT, McAndrew PE, Strasswimmer J, Crawford TO, Mendell JR, et al. The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy [J]. Hum Mol Genet, 1997, 6(8):1205-1214.
- [11] Gubitza AK, Feng W, Dreyfuss G. The SMN complex [J]. Exp Cell Res, 2004, 296(1):51-56.
- [12] Young PJ, Day PM, Zhou J, Androphy EJ, Monrrie GE, Lorson CL. A direct interaction between the survival motor neuron protein and p53 and its relationship to spinal muscular atrophy [J]. J Biol Chem, 2002, 277(4):2852-2859.
- [13] Sato K, Eguchi Y, Kodama TS, Tsujimoto Y. Regions essential for the interaction between Bcl-2 and SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product [J]. Cell Death Differ, 2000, 7(4):374-383.
- [14] Gangwani L, Flavell RA, Davis RJ. ZPR1 is essential for survival and is required for localization of the survival motor neurons (SMN) protein to cajal bodies [J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(7):2744-2756.
- [15] Lefebvre S, Bulet P, Liu Q, Bertrand S, Clermont O, Munnich A, et al. Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy [J]. Nat Genet, 1997, 16(3):265-269.

(本文编辑:吉耕中)