·论著·

成年大鼠骨髓基质细胞体外诱导分化为 NSE 阳性细胞

贾延劼,杨于嘉,宋元宗

(中南大学湘雅医院儿科教研室,湖南 长沙 410008)

[摘 要] **目的** 研究成年大鼠骨髓基质细胞(MSCs)在体外分化为 NSE 阳性细胞的方法。**方法** 采用β-巯基乙醇预诱导 MSCs 24h,再诱导 5 h。神经细胞特异性烯醇化酶(NSE)免疫细胞化学染色鉴定、计数诱导前后的细胞。**结果** 诱导后 MSCs 形态改变,胞体呈锥形,突起交织成网。免疫细胞化学染色 NSE 表达率达到(63.7±4.5)%。**结论** β-巯基乙醇可以诱导成年大鼠 MSCs 在体外分化成为 NSE 阳性细胞。

[关 键 词] 骨髓基质细胞;神经细胞特异性烯醇化酶;β-巯基乙醇;大鼠
[中图分类号] Q241 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8890(2001)01-0025-03

Differentiation of Adult Rat Bone Marrow Stromal Cells Into NSE-positive Cells

JIA Yan-Jie, YANG Yu-Jia, SONG Yuan-Zong

Department of Pediatrics, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, *China*

Abstract: Objective To study the protocol that induces adult rat bone marrow stromal cells (MSCs) to express neuron-specific enolase (NSE) in vitro. **Methods** MSCs were preinduced with β-mercaptoethanol for 24 h, and then induced for 5 h. The positive percentages of NSE protein expression were measured by immunocytochemistry SABC staining. **Results** After the induction, MSCs displayed neuronal morphologies, such as pyramidal cell bodies and processes which formed extensive networks. The positive percentage of NSE protein expression was (63.7±4.5)%. **Conclusions** β-mercaptoethanol may induce adult rat MSCs to NSE-positive cells in vitro.

Key words: Bone marrow stromal cells; Neuron-specific enolase; β-mercaptoethanol; Rat

神经细胞移植是治疗神经系统退行性变的有效方法之一。但是神经细胞属于终末细胞,难以进行有丝分裂,因此很难获得足够的神经细胞移植物,限制了这项技术的临床应用。2000 年 8 月,Woodbury 等[1],Sanchez-Ramos 等[2]均采用骨髓基质细胞(marrow stromal cells,MSCs)在体外诱导成为神经细胞。我们在此基础上,体外诱导成年 SD 大鼠 MSCs 分化为 NSE(神经细胞特异性烯醇化酶)阳性细胞,获得初步成功,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM 培养基购自 Gibco BRL 公司,胎牛血清购自 TBD 生物技术发展中心,β-巯基乙醇(纯度>99.0%)、HEPES、L-谷氨酰胺、胰蛋白酶(1∶300)、HistoChoice MB 购自 AMRESCO 公司,兔抗大鼠 NSE 抗体、抗兔 SABC 免疫组化试剂、DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

[收稿日期] 2000-12-30; [修回日期] 2001-02-05
[作者简介] 贾延劼(1971-),男,博士,主治医师,湘雅医院儿科博士后研究人员。

1.2 大鼠 MSCs 培养

参考 Azizi 等[3]方法略改进。成年 SD 大鼠,雌雄不限。无菌条件下取双侧胫骨,D-Hank's 液清洗,5 ml DMEM 完全培养基(添加 20 %胎牛血清,10 mM HEPES,2 mM L-谷氨酰胺,100 U/ml 青霉素,100 mg/ml 链霉素)仔细冲洗骨髓腔,将冲洗下的细胞稀释后,直接接种于 24 孔塑料培养板,37 ℃,8 % CO_2培养。24 h 后换液,去除未贴壁细胞。以后每隔 72 h 换液。待贴壁细胞完全融合后,0.25 % 胰蛋白酶消化传代,按 1 ×10^5/ml 接种,每隔 72 h 换液,共传 3～4 代后进行诱导实验。

1.3 诱导实验

参考 Woodbury 等的方法[1]。主要步骤为:MSCs 完全融合后,进行预诱导。去除 DMEM 完全培养基,D-Hank's 液清洗 3 次,加入预诱导液(DMEM 培养基,20 %胎牛血清,1mM β-巯基乙醇),37 ℃,8 % CO_2培养 24 h。预诱导后,加入诱导液(DMEM 培养基,5 mM β-巯基乙醇),37 ℃,8 % CO_2培养 5 h,0.01 M PBS 液(pH 7.4)清洗 3 次,HistoChoice MB 固定。对照实验 1 为空白对照,即预诱导液和诱导液均去除β-巯基乙醇;对照实验 2 在诱导液中去除β-巯基乙醇;对照实验 3 在预诱导液中去除β-巯基乙醇。

1.4 生长和诱导情况观察

倒置显微镜下,观察 MSCs 生长情况,及预诱导和诱导后形态学变化。

1.5 NSE 免疫细胞化学染色记数

参考 SABC 试剂盒说明操作,DAB 显色,常规脱水,透明。光镜下观察,随机记数 200 个细胞,计算阳性细胞数目。其中兔抗大鼠 NSE 抗体稀释度为 1∶100,对照实验以0.01 M PBS 液(pH = 7.4)代替 NSE 抗体。

1.6 统计处理

采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$为显著性差异。

2 结果

2.1 生长情况观察

刚接种的细胞种类较多,包括造血干细胞及分化程度不同的其他各系细胞、MSCs 等,经过数次换液后,培养 14 d 细胞以造血干细胞和 MSCs 等贴壁生长的细胞为主,且 MSCs 融合成片。经 3～4 次传代后,形成较典型的 MSCs,其形态特点是:Ⅰ型细胞较少,梭形,生长较快;Ⅱ型细胞为主要类型,大而扁平,立体感不强,生长较慢。同时,混有少量造血干细胞(图 1)。

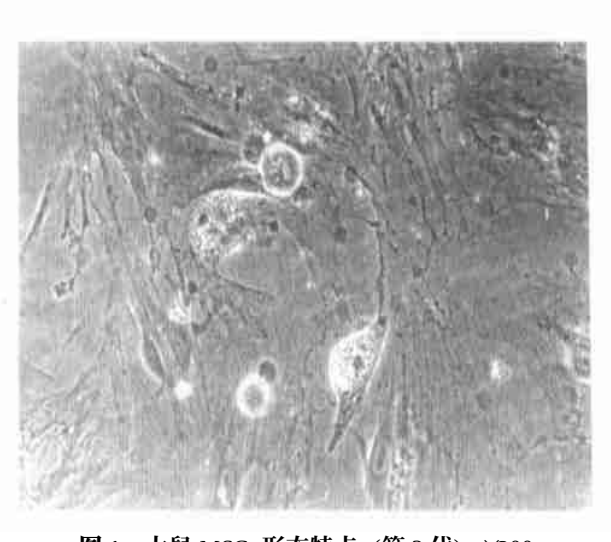

图 1 大鼠 MSCs 形态特点,(第 3 代) ×200

Figure 1 Morphological characteristics of rat MSCs, (passage 3) ×200

2.2 诱导情况观察

预诱导 24 h 后,细胞体积减小,立体感增强,部分胞体收缩成锥形或球形,伪足收缩成较细长突起,少量细胞脱落、死亡。诱导 5 h 后,绝大多数细胞成锥形,伪足收缩成细长突起,并交织成网,立体感强,部分细胞周围有光晕,类似神经细胞(图 2)。对照实验 1 形态基本没有变化;对照实验 2 仅部分细胞形态学发生变化;对照实验 3 虽然有一定量的细胞形态类似神经细胞,但是细胞脱落、死亡过多。

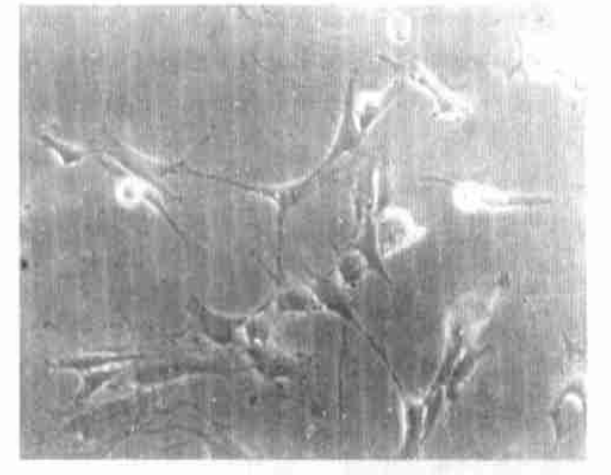

图 2 大鼠 MSCs 诱导分化后形态特点,类似神经细胞,胞体呈锥形,突起交织成网。 ×200

Figure 2 Morphological characteristics of rat MSCs - differentiated cells. It displayed neuronal morphologies, such as pyramidal cell bodies and processes which formed extensive networks. ×200

2.3　NSE 免疫细胞化学染色记数

对照实验 1 MSCs 基本不表达 NSE,仅个别细胞为弱阳性(< 5 %)。对照实验 2 NSE 表达率较低,为(16.5 ±6.5) %,而且部分细胞表达弱阳性。对照实验 3 大部分细胞表达 NSE 阳性或强阳性,其表达率为(46.3 ±7.6) %,较对照实验 2 相比,差异有显著性(P < 0.01),但是很多细胞脱落、死亡。预诱导 24 h + 诱导 5 h 后,MSCs 表达率最高,为(63.7 ±4.5) %,与对照实验 2,3 相比,差异有显著性(均 P < 0.01)。其中聚集成团的分化细胞 NSE 表达为强阳性;未分化的细胞仍保持原来的扁平形态,NSE 表达为阴性或弱阳性(图 3,4 见插页 Ⅰ)。

3　讨论

MSCs 是一种多能干细胞,可以分化成为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞等。如果将大鼠 MSCs 移植到新生或成年大鼠脑内,可以分化成为星形胶质细胞[3,4]。而且 MSCs 获得方法简单,易于增殖,采用合适的体外培养方法,培养 6 周 MSCs 细胞增殖 10^9 倍,一次骨髓穿刺获得的人 MSCs 很快可达 10^{13} 个[5]。因此,MSCs 成为神经细胞移植和基因治疗的理想细胞[6]。

MSCs 在体外分化成为神经细胞目前采用的方法有两种,抗氧化剂[1]和生长因子[2]诱导。但是前者快速、分化率较高。我们实验证明,MSCs 基本不表达 NSE。采用抗氧化剂β-巯基乙醇预诱导 24 h + 诱导 5 h 后,63.7 ±4.5 %细胞表达 NSE。虽然仅依据 NSE 表达断定为神经细胞尚不完全,但是至少提示 MSCs 在朝神经细胞方向分化,说明该方法是可行的。而且整个分化诱导过程是连续的、逐步的,省略预诱导期或诱导期,都可能影响分化率。

β-巯基乙醇诱导作用尚不清楚,但是部分抗氧化剂有此作用,如二甲基亚砜、叔丁对甲氧酚(butylated hydroxyanisole)等[1]。研究证实,活性氧在细胞增殖分化过程中起到第二信使的作用[7],β-巯基乙醇作为一种抗氧化剂,是否通过改变 MSCs 细胞内的氧化还原状态使其分化为 NSE 阳性细胞有待进一步研究。

[参　考　文　献]

[1] Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons [J]. J Neurosci Res, 2000, 61 (4): 364 - 370.

[2] Sanchez - Ramos J, Song S, Cardozo - Pelaez F, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro [J]. Exp Neurol, 2000, 164 (2): 247 - 256.

[3] Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, et al. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats - similarities to astrocyte grafts [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95 (7): 3908 - 3913.

[4] Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain andcerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96 (19): 10711 - 10716.

[5] Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, et al. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic - adherent cells from human bone marrow [J]. Proc Natl Acad Sci. USA, 2000, 97 (7): 3213 - 3218.

[6] Li Y, Chopp M, Chen J, et al. Intrastriatal transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20 (9): 1311 - 1319.

[7] Schreck R, Riebar P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF - κB transcription factor and HIV - 1 [J]. EMBO J, 1991, 10 (8): 2247 - 2258.

(本文编辑:曹励之)