

基础研究

成人骨髓基质干细胞的体外培养
及初步诱导分化研究胡学昱¹, 罗卓荆¹, 田 爽²

(1 第四军医大学西京医院全军骨科研究所; 2 妇产科 710032 陕西省西安市)

【摘要】目的:探讨体外培养人骨髓基质干细胞(BMSC)的方法和初步诱导 BMSC 向神经细胞方向分化的方法。**方法:**采用正常成人献髓者骨髓,分离扩增 BMSC,原代培养后将传 1~4 代细胞按 $1 \times 10^4/\text{ml}$ 种于 24 孔板,绘制生长曲线、贴壁率,观察细胞生长及不同浓度的碱性成纤维生长因子(bFGF)对 BMSC 的作用。以全反式维甲酸(RA)和 bFGF 为诱导剂,观察诱导前后 BMSC 的变化。**结果:**原代 BMSC 生长状态良好,传至第 5 代仍保持干细胞特性,bFGF 可明显促进 BMSC 增殖,且呈剂量依赖关系。RA 和 bFGF 诱导 12h, BMSC 逐渐向神经样细胞转化,胞体收缩成锥形、三角形或不规则形,细胞伸出细长突起,免疫细胞化学鉴定呈 Nestin 阴性, NSE 阳性, GFAP 阳性,且 NSE 阳性细胞数较 GFAP 阳性为少。**结论:**BMSC 可在体外稳定扩增,且能保持干细胞特性, RA 和 bFGF 可诱导其分化为神经细胞。

【关键词】骨髓基质干细胞;神经细胞;诱导分化

中图分类号:Q813.1, R329.2 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2005)-10-0594-04

A study on the culturing of human bone marrow stromal cells in vitro and its primary induction/HU Xueyu, LUO Zhuojing, TIAN Shuang//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2005, 15(10):594-597

【Abstract】 Objective: To investigate the biological activity of human BMSC and its culturing method and explore the possibility of BMSC's differentiation into neurons in vitro. **Method:** BMSC were harvested from normal human marrow, then separated and proliferated. After primary culture, the subcultured cells were implanted into hole plate by the number of $1 \times 10^4/\text{ml}$. The growth curve and maximum attached rate were described. The proliferating rate of BMSC were measured by basic fibroblast growth factor(bFGF) as inducer at different concentrations. BMSC were then cultivated in a medium containing all-transretinoic acid(RA) and bFGF. Microscopic observation, immunohistochemical staining of Nestin, NSE and GFAP were performed. **Result:** The biological activity of primary cells sustained well, the subcultured cells still kept the feature of BMSC evidently and showed the dose-effect relationship. NSE and GFAP positive cells were found after 14 days induction. **Conclusion:** BMSC can be cultivated automatically and proliferate stably ex vivo which indicates BMSC could be induced into neurons and glial cells in vitro.

【Key words】 Bone marrow stromal cells; Neurons cells; Differentiation

【Author's address】 Department of Orthopaedics, Xijing Hospital, the Fourth Military University, Xi'an, 710032, China

神经细胞移植治疗人类中枢神经系统疾病有着巨大的潜力。神经干细胞的发现为神经细胞移植提供了可能的细胞来源,但神经干细胞取材困难,细胞来源及伦理等因素限制了其临床应用^[1]。

骨髓基质干细胞(bone marrow stromal cell, BMSC)具有多向分化潜能和强大的增殖能力,遗传背景稳定,体内植入反应弱,易于分离纯化,是一种较理想的组织工程种子细胞。体外培养 BMSC 在培养基中加入适当的诱导剂,可使其向神经细胞方向分化,这已在不同种属的动物实验中得到了验证^[2,3]。本研究对成人 BMSC 进行体外培养,并进行了向神经细胞的初步诱导分化实验,旨在为神经组织工程在人体应用做准备。

基金项目: 国家 863 高技术研究发展计划基金资助项目 (编号: 2002AA216101)

第一作者简介: 男(1980-),硕士研究生,研究方向:脊柱外科,脊髓损伤的修复研究

通讯作者: 罗卓荆,男(1964-),主任医师,教授,博士生导师

电话: (029)82554006 E-mail: Tshxy@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 骨髓及试剂来源

成人骨髓来源于正常成人献髓者, DMEM/F12、新生牛血清为 GIBCO 公司产品, MTT、碱性成纤维生长因子 (basic fibroblast growth, bFGF)、全反式维甲酸(all-transretinoic acid, RA)、脑源性神经生长因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) 来自 Sigma 公司, 胰酶、SABC 试剂盒和 DAB 显色试剂盒为武汉博士德公司产品。

1.2 BMSC 的分离和培养

采用改进的全骨髓培养法。从健康成人志愿者髂前上嵴穿刺抽取 5~6ml 骨髓, 快速置于含肝素(100U/ml)的无菌离心管中, 4℃条件下转至 1:10000 级层流细胞培养室处理。将骨髓与培养基 DMEM/F12 液 1:2 稀释混匀后, 1000r/min 离心 20min, 吸取红细胞层与上清层间的白膜层(骨髓基质干细胞所在层), 置入新离心管并加入培养基吹打均匀, 再离心(800r/min 离心 10min), 弃上清, 加入含 15% 的新生牛血清的培养基重悬。接种到 100ml 的培养瓶中, 细胞密度为 3×10^5 /ml, 置于 37℃、5%CO₂、饱和湿度孵箱内进行培养。于第 3 天给予半量换液, 以后 2~3d 全量换液。待原代细胞长满至瓶底的 85%~90%, 用 0.25% 胰酶消化液 1.2ml 将贴壁细胞消化分离(37℃、5min), 加含血清的 DMEM/F12 培养液终止消化, 800r/min 离心 10min, 去上清, 用培养液重悬后再离心以洗去残留消化液。按 1:2 或 1:3 的比例进行传代接种, 置 37℃、CO₂ 孵箱继续培养, 每 2~3d 换液。倒置相差显微镜逐日观察骨髓基质干细胞形态以及生长增殖情况。待细胞增殖并覆盖瓶底的 85%~90% 时, 用同样方法消化传代。

1.3 生长曲线的绘制和贴壁率的计算^[4]

1.3.1 生长曲线测定 取生长状态良好的传 1~4 代细胞, 消化成单细胞悬液, 调整细胞浓度以 1×10^4 个/ml 种植于 24 孔板, 每代细胞接种 12 孔(每孔 1.2ml), 置于相同条件下培养, 每 24h 取出一块培养板, 计数均值, 以培养时间为横坐标, 细胞数为纵坐标绘制生长曲线。

1.3.2 贴壁率测定 取生长状态良好的传 2~5 代细胞, 消化成单细胞悬液, 调整细胞浓度以 3×10^4 个/ml 接种于 10ml 培养瓶中, 每瓶 2.5ml, 每代接种 4 瓶, 于相同条件下培养。每 2h 取出一瓶细胞, 倒掉培养液, 胰酶消化后, 计数已贴壁细胞, 按

下面公式记算不同时间点贴壁率。

贴壁率 (接种存活率) = (贴壁存活细胞数/接种细胞数) × 100%

1.4 不同浓度 bFGF 对 BMSC 的促增殖作用

将传代培养的 BMSC 种植于 96 孔板内, 种植浓度为 1×10^4 个/cm², 加入浓度分别为 5ng/ml、10ng/ml、15ng/ml、20ng/ml、25ng/ml、30ng/ml 的 bFGF, 于固定时间点(24h)取材, 用 MTT 法对各孔细胞测 OD 值, 绘制细胞增殖曲线。

1.5 体外诱导分化

待细胞传至 3 代后, 取传代细胞加诱导培养基, 即 DMEM/F12+15% 新生牛血清、诱导剂 RA (0.5μg/ml)+bFGF (10ng/ml), 置于 37℃、5%CO₂、饱和湿度孵箱内进行培养, 每 3d 换液一次。倒置相差显微镜下逐日观察 BMSC 形态及生长增殖情况, 待细胞覆盖瓶底 85%~90% 时, 常规消化法传代。

1.6 免疫细胞化学法鉴定

以 Nestin 抗原表达鉴定神经干细胞, 神经元特异性烯醇化酶 (neuron specific enolase, NSE)、胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 抗原表达分别鉴定分化形成的神经元及星形胶质细胞, 免疫细胞化学检测采用 SABC 改良方法进行。步骤为: 细胞经 4% 多聚甲醛固定, 0.01M PBS 液冲洗, 山羊血清封闭后, 滴加一抗 4℃过夜处理, 其中兔抗人 Nestin (1:2000)、兔抗人 NSE (1:250)、小鼠抗人 GFAP (1:250); 生物素化二抗 (羊抗小鼠 IgG/羊抗兔 IgG) 37℃孵育 20min; 链酶亲和素-生物素-过氧化酶复合物 (1:200) 37℃孵育 20min; DAB 显色 5~15min。苏木素轻度复染。风干后封片, 光学显微镜下观察。

2 结果

2.1 原代生长特点

原代细胞接种于培养瓶后即刻, 所有细胞呈圆球形、悬浮状有核细胞, 混有少量红细胞。接种后 24h, 可见少数呈椭圆形, 有单个小突起的细胞贴壁, 2~3d 后换液, 培养瓶中仍可见少量未清除干净的造血细胞, 以后贴壁细胞逐渐增多, 显示出集落生长趋势。第 5 天, 有数十个细胞集落形成, 细胞以梭形为主, 有少量多角形和大圆形细胞散在分布。接种后 10~11d, 瓶底细胞基本融合。细胞传代后 12h 开始贴壁, 呈长梭形, 集落式生长。传

代后细胞生长潜伏期缩短, 细胞增长迅速, 6~7d 细胞即融合。细胞生长均匀, 排列规则(多呈漩涡式群集生长)。至 P5 代, 细胞形态基本一致(图 1a、b, 后插页 III)。传至 11 代, 细胞增长速度开始下降, 需 10~11d 才达到融合, 并且开始呈现衰老状态, 表现为细胞折光性减弱, 胞体内颗粒增多。

2.2 BMSC 的生长曲线

人 BMSC 原代细胞增殖较慢, 传代约需 10~12d(图 2)。2~5 代细胞生长曲线基本相同: 1~3d 细胞增殖缓慢, 为潜伏期, 3d 后细胞大量增殖, 7d 后细胞数达顶点, 之后细胞数轻度下降。

2.3 BMSC 的贴壁率

贴壁率可反映细胞的生存能力及活性。1~5 代细胞的贴壁率未见明显差异。传代接种后 12h 就有细胞贴壁, 24h 有 60%~70% 的细胞贴壁, 48h 有约 90% 的细胞贴壁。

2.4 不同浓度 bFGF 的促增殖作用

bFGF 促进 BMSC 的增殖呈剂量依赖性。在

10~30ng/ml 范围内促增殖效果较好。10~20ng/ml 随剂量增高曲线呈上升趋势, 浓度在 20ng/ml 水平促增殖作用最好(图 3)。

2.5 诱导分化及免疫细胞化学染色

RA+bFGF 诱导 3h 后, 某些 BMSC 出现明显的形态变化, 表现为胞体收缩变圆, 伸出树枝状突起, 突起与突起间互相连接, 立体感增强。12h 左右 BMSC 逐渐向神经样细胞转化, 其胞体收缩成锥形、三角形或不规则形, 折光性强, 细胞伸出较多的细长突起, 有的还有 1~2 级分支(图 4, 后插页 III)。随着时间的延长, 神经样细胞数目增多, 突起变长, 多个神经样细胞突起可相互延伸形成网状。诱导后 14d, 诱导的细胞仍可继续存活。免疫细胞化学鉴定这些神经元样细胞呈 Nestin 阴性, NSE 阳性, GFAP 阳性。而且随诱导时间的延长, NSE、GFAP 阳性细胞比例逐渐增多, 但 NSE 阳性细胞数较 GFAP 阳性细胞数为少(图 5, 后插页 III)。

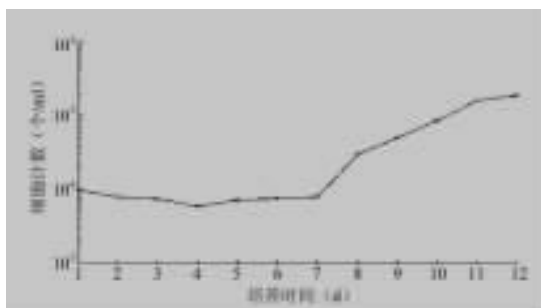


图 2 人骨髓基质干细胞原代生长曲线

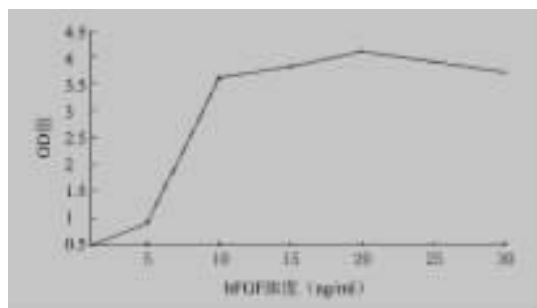


图 3 不同浓度的 bFGF 的促增殖作用曲线

3 讨论

BMSC 是一种多能干细胞, 具有自我复制能力, 不仅可分化为造血细胞, 在特定条件下还可分化为非造血组织细胞, 如成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞等。实验证明, 体外条件下通过化学和生物诱导剂的作用, 可以使 BMSC 转化为神经元和神经胶质样细胞。BMSC 来源广、取材便捷, 对培养条件要求不高, 容易存活, 且能迅速扩增, 弥补了神经干细胞取材困难的缺点。此外, 自体的 BMSC 不但可以克服移植治疗难以对付的免疫排斥反应, 而且可以避免因胚胎取材涉及的伦理道德问题。因此, BMSC 作为神经细胞的另一来源, 用于中枢神经系统疾病和损伤修复的细胞移植治疗, 具有广阔的前景^[9]。

为进一步研究 BMSC 向神经元或神经胶质细胞分化的可能性及分化机制, 必须建立一套切实

可行的 BMSC 培养扩增方法, 以保证实验所需要的大量的优质实验细胞。目前用于 BMSC 分离的常用方法主要有全骨髓法和密度梯度离心法两种。本实验将两种方法结合用于原代细胞培养, 主要利用的是离心原理和骨髓基质干细胞的贴壁特性。经过原代和多次传代后, 细胞生长稳定, 增殖速度快, 贴壁率高, 保持了干细胞的形态特点, 证明了本实验方法可以稳定获取和扩增 BMSC, 而且实验成本低, 在组织工程的种子细胞培养中有较大的应用价值。

本实验利用碱性成纤维生长因子 (bFGF) 作为 BMSC 的促增殖剂, 发现在体外 bFGF 可以稳定地促进 BMSC 增殖, 并且呈剂量依赖性。bFGF 的作用广泛而复杂, 能维持由表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 激发的神经干细胞的存活及增殖, 有诱导神经干细胞向神经元分

化的作用,并可维持神经元和神经胶质细胞的存活,诱导神经元合成神经特异性基因(SCG-100)产物和乙酰胆碱转移酶,并能促进交感神经和副交感神经的轴突生长,具有丝裂原样作用^[6,7]。本实验证明,bFGF 促进 BMSC 的增殖呈剂量依赖性,在 10~30ng/ml 促增殖效果较好。10~20ng/ml 时随剂量增高曲线呈上升趋势。浓度在 20ng/ml 时促增殖作用最好。这为进一步研究 bFGF 在 BMSC 增殖和诱导分化中的作用提供了实验依据。

BMSC 定向诱导分化为目的细胞是目前神经科学领域的研究热点。而 BMSC 转化为神经细胞的条件极为复杂。Brazelton^[8]和 Mezey 等^[9]将 BMSC 分别注入致死量照射的成年小鼠体内和缺血大鼠的脑内观察到,外源性 BMSC 可在脑内转变为神经元,表达神经特异核蛋白(neuron-specific nuclear protein, NeuN)、 β -微管(β -tubulin)、NF 等神经元标志蛋白,从而改善神经功能的缺陷。Woodbury 等^[3]首次在体外诱导 BMSC 分化为神经元,应用 2-巯基乙醇(betamercaptoethanol, BME)启动分化,继而应用 BME、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)和丁羟基茴香醚(butylated hydroxy anisole, BHA)等一些具有还原性的物质成功诱导了 BMSC 转变为神经元。Sanchez 等^[2]将 BMSC 诱导为神经元样细胞的诱导因子为 EGF 或 BDNF 与 RA 的组合。Deng 等^[10]联合应用异丁甲基黄嘌呤(isobutylmethylxanthine, IBMX)和二丁基环磷酸腺苷(dibutyl cyclic AMP, dbcAMP)提高细胞内 cAMP 的含量,亦将 BMSC 转变为神经元样细胞。

目前,关于人类 BMSC 向神经细胞诱导分化的实验研究报道较少,如果在这方面获得一些研究资料,将为人类 BMSC 诱导分化为神经细胞并在临床应用提供实验依据。本实验进行的人 BMSC 初步诱导实验,以 RA 和 bFGF 为诱导剂,促使 BMSC 向神经细胞方向分化,使 BMSC 表达了成熟神经元细胞的 NSE 以及星形胶质细胞特异性的 GFAP 抗原,而神经干细胞特异性的抗原 Nestin 为阴性。实验结果表明,BMSC 经诱导可分化为神经细胞,且随着诱导时间的延长,神经细胞数量不断增加。诱导分化后的神经细胞中,神经元细胞数量较胶质细胞数少。神经干细胞特异性抗原 Nestin 表达为阴性,考虑可能是由于 BMSC 分化为神经干细胞仅为某一短暂阶段,本实验过程

未能采集到所致。这些资料为 BMSC 在将来的临床治疗应用提供了实验依据。

BMSC 定向诱导分化为神经细胞的研究尚处于起始阶段,虽然已有较多相关动物实验的成功报道,但要将其成果应用于临床,还有诸多问题需要进一步研究解决:①如何使 BMSC 定向分化,如何提高分化率是尚待解决的难题;②在体外由 BMSC 定向诱导分化而来的神经干细胞以及由神经干细胞进一步分化成的神经元或胶质细胞是否具有特定的功能;③体外诱导的神经细胞如何顺利进入神经组织和定向迁移,在体内它们能否与宿主自体的神经细胞相容并存,能否长期存活和增殖;④体外诱导的神经细胞能否与宿主自体神经细胞整合发挥神经修复作用。以上种种都是需要进一步证实和解决的问题。

4 参考文献

1. Woerly S. Restorative surgery of the central nervous system by means of tissue engineering using neurogel implants [J]. *Neurosurg Rev*, 2000, 23(2): 59-79.
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. Woodbury D, Emily JS, Darwin JP, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cell differentiate into neurons [J]. *Neurosci Res*, 2000, 61(4): 364-370.
4. 司徒镇强, 吴军正主编. 细胞培养 [M]. 西安: 世界图书出版西安公司, 2003. 175-179.
5. Horwitz EM. Stem cell plasticity: a new image of the bone marrow stem cell [J]. *Curr Opin Pediatr*, 2003, 15(1): 32-37.
6. Eriksson C, Bjorklund A, Wictorin K. Neuronal differentiation following transplantation of expanded mouse neurosphere cultures derived from different embryonic forebrain regions [J]. *Exp Neurol*, 2003, 184(2): 615-635.
7. Nibu K, Li G, Kaga K, et al. bFGF induces differentiation and death of olfactory neuroblastoma cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 279(1): 172-180.
8. Brazelton TR, Rossi FMV, Keshet GI, et al. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice [J]. *Science*, 2000, 290: 1775-1779.
9. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, et al. Turning blood into brain cells: bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow [J]. *Science*, 2000, 290: 1779-1782.
10. Deng W, Obrocka M, Fishcher I, et al. In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 282(1): 148-152.

(收稿日期: 2005-03-02 修回日期: 2005-04-11)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 卢庆霞)