

模拟微重力促进骨髓间充质干细胞神经营养因子的表达

杨江河¹ 张 蓉² 李 华¹ 修彬华¹ 刘绍明^{1△}

(1 兰州军区乌鲁木齐总医院神经外科 新疆 乌鲁木齐 830000 ; 2 兰州军区乌鲁木齐总医院妇产科 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要 目的 探究微重力对干细胞向神经元分化的影响,为临床治疗神经退行性疾病提供新的思维和方法。方法 运用流式细胞术鉴定骨髓间充质干细胞及其微重力对凋亡的影响。运用反转录 PCR 检测微重力干预干细胞 48h 及 72h 后神经营养因子 BDNF, CNTF, NGF 的表达。运用 ELISA 检测其分泌营养因子的浓度。结果 流式细胞仪检测细胞凋亡,两组之间并无差异。CNTF 分泌在微重力干预后有明显增加($p < 0.05$)。BDNF 浓度有轻度增加。结论 模拟微重力可以促进骨髓间充质干细胞神经营养因子的表达。

关键词 微重力;骨髓间充质干细胞;神经营养因子

中图分类号 Q95-3 R741 **文献标识码** :A **文章编号** :1673-6273(2011)20-3857-03

Modeled-Microgravity Increases the Expression of Neurotrophins in MSCs

YANG Jiang-he¹, ZHANG Rong², LI Hua¹, XIU Bin-hua¹, YAN Zhi-qiang¹, LIU Shao-ming^{1△}

(1 department of neurosurgery, Urumchi Hospital of Lanzhou Military region, Urumchi 830000, China;

2 department of gynaecology and obstetrics, Urumchi Hospital of Lanzhou Military region, Urumchi 830000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of microgravity on the differentiation of MSCs into neurons. **Method:** Flow cytometry analysis on the cells of passage 2 was used to identify MSCs. RT-PCR was used to detect the neurotrophins expression in MSCs following microgravity stimulation. The neurotrophins levels in MSCs were detected by ELISA. **Results:** Compared with that in 1g group, the expression of CNTF and BDNF after MG stimulation was higher. **Conclusion:** Modeled-microgravity increased the expression of neurotrophins in MSCs.

Key words: Microgravity; MSCs; Neurotrophins

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3 R741 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)20-3857-03

前言

颅脑创伤及帕金森综合征、阿尔茨海默病等神经退行性疾病是医学研究领域中的一大难题。除了传统的使用一些有辅助治疗效果的药物外,目前备受关注的基于干细胞的细胞治疗为这类疾病提供了一种全新的治疗模式^[1-3]。骨髓间充质干细胞(BMSCs)已成为细胞移植替代治疗脑损伤的理想种子细胞之一。目前干细胞的主要诱导方法是将靶基因整合入目的干细胞中或是直接将干细胞置于特定诱导因子的环境中进行诱导,尽管这些方法可以成功实现诱导,但是较低的诱导效率和较高的诱导风险性限制其运用于临床。干细胞在模拟微重力的条件下更接近体内胚胎发育的环境,已有文献报道微重力可以促进骨髓间充质干细胞向脂肪细胞和软骨细胞等分化^[4-6]。如果微重力能够促进干细胞向神经细胞的分化,无疑将是更安全高效的方法。神经营养因子在神经细胞生长发育过程中起到至关重要的作用。已有研究表明骨髓间充质干细胞自身表达神经营养因子 BDNF、NGF 等^[7,8]。本研究探讨微重力对骨髓间充质干细胞神经营养因子表达的影响。

1 材料与方法

1.1 骨髓间充质干细胞的培养、扩增、纯化

取 2 周龄 S D 大鼠 4 只于体积分数 75 %乙醇浸泡 20 min,于超净工作台上严格无菌条件下取大鼠双下肢,剪除软组织,留取股骨和胫骨,将分离的股骨和胫骨置于灭菌 PBS 液中,浸泡 5min。用 5ml 注射器吸引无血清的培养基来反复吹出股骨中的骨髓组织,直到股骨颜色由红变白,用注射器反复吹打均匀后,移入 10 ml 离心管。1000 r / min 离心 5 min,细胞沉淀中加入含 10%FBS,1%青、链霉素的 L D ME M 培养基,充分吹打至单细胞悬液,调细胞浓度为 $2.5 \times 10^5 / \text{cm}^3$ 。接种在 25 cm 的培养瓶中。3d 后去除未贴壁的细胞,更换新培养液,以后每 2d 换液 1 次,细胞达 90%融合后,用含 0.25 %胰酶的消化液消化,接种传代,进行扩增、纯化培养。取第二代的细胞以 $1.5 \times 10^5 / \text{cm}^3$ 接种于六孔板。流式细胞仪检测表面抗原 CD44,和 CD90 阳性,CD45 阴性。

1.2 微重力下的细胞培养和分化

把收集到的 MSC 接种六孔板玻片,用含 10%胎牛血清的 DME M。然后将种有 MSC 的玻片植入生物反应器 (clinorotation 20-RWV) 中模拟微重力培养 48h 和 72h。该生物反应器以 30 r / min 的转速转动,致使里面的细胞感受来自不同方向重力从而矢量和为零来模拟微重力(MG)。同时,也将细胞于正常重力 (1g) 下在培养板中诱导,作为对照。

作者简介 杨江河(1967—),男,硕士,副主任医师,主要从事神经外科常见疾病的临床治疗与基础研究,电话:0991-4991779。E-mail: yangdanting@163.com;

△通讯作者 刘绍明 Email: weiminzyq@sohu.com;

(收稿日期 2011-06-07 接受日期 2011-06-30)

1.3 细胞凋亡检测

Annexin V-FITC 检测正常重力和微重力 72h 干预下干细胞凋亡情况,用 4℃ 预冷磷酸盐缓冲液洗细胞 2 次,用 250ml 缓冲液重新悬浮细胞,调节浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。取 100 μl 细胞悬液于 5ml 流式管中,加 5 μl Annexin V FITC 和 10 μl 浓度为 20 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 的碘化丙啶(PI),流式细胞仪做细胞凋亡率分析。

1.4 RNA 提取与反转录

PCR 对 1g 和 MG 培养的干细胞利用 R Neasy 试剂盒提取总 RNA,并用凝胶电泳检测 RNA 的含量。取 1 μg 总 RNA,用随机引物和反转录试剂盒合成 cDNA。PCR 聚合酶为 Taq DNA 聚合酶。95℃ 变性 15S, 60℃ 退火 45S, 60℃ 延伸 60S, 共循环 30 次。PCR 引物如下 BDNF: 正向 TGCTGGATGAG-GAC 反向 GTTCCAGTGCCTTTTGTC; 可扩增 417bp, NGF: 正向 CTGCCCTTCTACACTCT 反向 ACCATGCAGTCCTTA-TA A TTTAAAA 可扩增 78bp, CNTF: 正向 CTCCTGGA-GATCCAGAGA 反向 GCTTCCTAAC AAACCTGGGA 可扩增 100bp β -actin: 正向 CTTCCAGCCATCTTCTTGG 反向 CCA CATCACACTTCATGATCG 可扩增 396bp。扩增后产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,再用 Image Quant 分析软件 (Version 5.0)

进行分析。每个基因的检测值与对照基因 (肌动蛋白) 的比值即为其相对表达值。

1.5 ELISA 检测神经营养因子浓度

ELISA 法检测骨髓间充质干细胞分泌 BDNF, CNTF, NGF 的含量。收集正常重力下和微重力处理 48h、72h 的细胞培养液采用 ELISA kits (Santa Cruz, CA) 严格按说明书进行操作。Bio-Rad 680 型酶标仪检测含量。

1.6 统计分析

数据分析应用 Microsoft Excel2003 软件处理。两组之间比较用 student's t-test 检验。

2 实验结果

2.1 rMSCs 的生长情况及鉴定

原代分离的 rMSCs 培养 3d 后换液弃去未贴壁细胞。此后细胞增殖加快,贴壁细胞呈团簇集落样生长,呈成纤维样细胞形态。7~10d 细胞集落扩大逐渐铺满瓶底达到融合状态。传代培养的细胞形态与前代基本相同,但增殖速度明显增快。流式细胞术鉴定 CD44 阳性 94.37%, CD90 阳性 95.82%, CD45 阴性(图 1)。

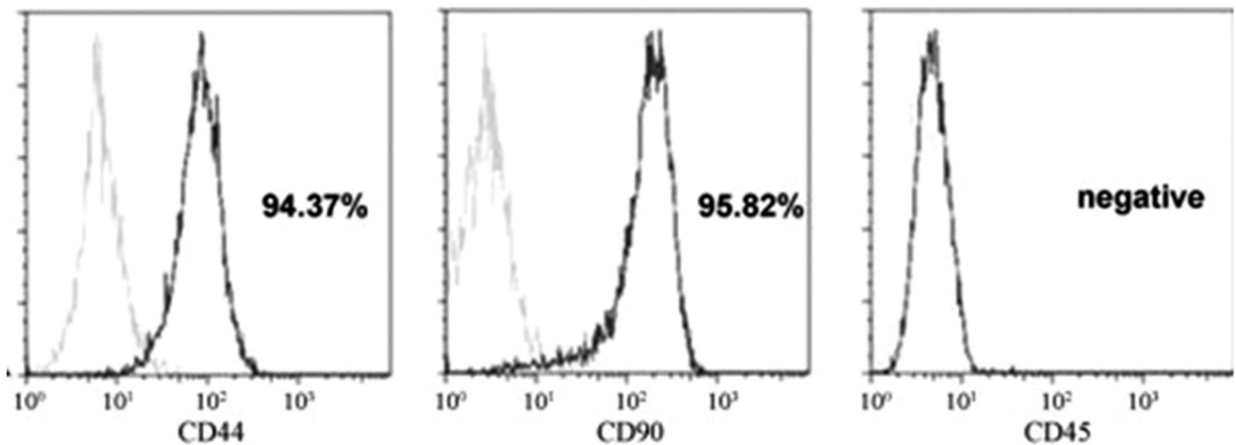


图 1 流式细胞术鉴定 rMSCs 表面标志物

Fig. 1 Flow cytometry analysis on the cells of rMSCs

2.2 微重力干预骨髓间充质干细胞凋亡检测

流式细胞仪检测正常重力(1g)和微重力(MG)干预 72h 后细胞凋亡的影响。结果显示两组无差异(图 2)。

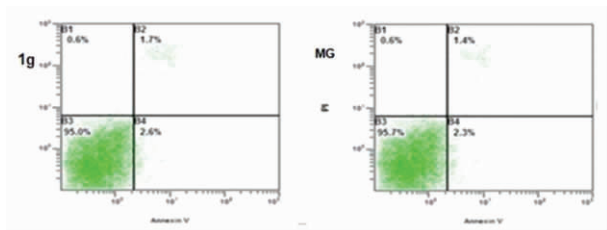


图 2 流式细胞仪检测细胞凋亡, 两组之间并无差异

Fig.2 After the stimulation of MG, no more apoptotic rMSCs were observed than in 1g group according to the Annexin V method.

2.3 RT-PCR 检测微重力对干细胞表达神经营养因子的影响

分别对正常重力和微重力干预 48h、72h 的样本进行 PCR 检测,结果显示 CNTF 和 BDNF 在微重力干预后表达增加一倍左右,并随干预时间延长而明显($p < 0.05$)。NGF 表达在微重力干

预 48h 有轻度增加但随时间的延长有所减低。CNTF 的表达量要明显比 BDNF、NGF 表达量高(图 3)。

2.4 ELISA 检测两组骨髓间充质干细胞分泌神经营养因子的变化

分别收集正常重力下、微重力 48h、微重力 72h 干细胞培养液,检测各神经因子的浓度,在同等细胞数量下,CNTF 浓度最高,并且在微重力干预后明显增加($P < 0.05$)。BDNF 在微重力干预组分泌略有增加。NGF 浓度在微重力干预 72h 后略有下降。ELISA 检测结果与 RT-PCR 结果相符(图 4)。

3 讨论

空间环境尤其是微重力环境对人类细胞影响的研究历史可以追溯到 20 世纪 60 年代,前苏联早在 Zond 5 和 Zond 7 的飞行中就将 Hela 细胞带上太空^[9]。但由于当时实验条件有限,很难得到客观清晰的实验结果。自 1983 年空间实验项目启动后,真正开始了广泛研究空间医学细胞学。近些年的研究显

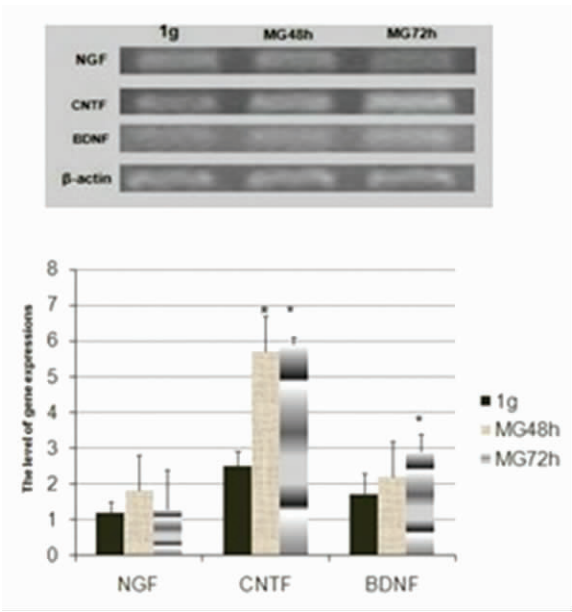


图 3 RT-PCR 检测神经营养因子的表达情况

Fig. 3 RT-PCR analysis of neurotrophins expression in MSCs

Note : *P<0.05, compared with 1g group.

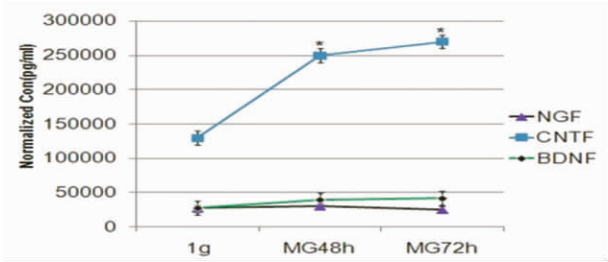


图 4 ELISA 检测神经营养因子分泌情况

Fig. 4 Detection of neurotrophic factor secretion by ELISA

Note : *P<0.05, compared with 1g group

示 :宇航员和飞行试验动物在飞行过程中或飞行后,他们的很多器官都发生了生理变化,这其中包括脑脊液流动改变^[10],体液电解质丧失^[11],肌肉萎缩^[12],免疫系统功能下降^[13],太空运动病等。同样,微重力会改变细胞的一些性质,包括细胞骨架,凋亡速率和细胞对环境的反应。LOUIS YUGE 曾对 hMSCs 进行微重力处理后发现其增殖能力增强^[14]。然而 Z. Q. Dai 对大鼠 MSCs 处理后发现其增值能力被抑制^[15]。这可能和采用不同的干细胞种系和不同的模拟微重力方法有关。已有研究表明骨髓间充质干细胞在微重力作用下有利于向脂肪细胞分化而抑制向成骨细胞分化,然而微重力对干细胞向神经方向分化的影响未见报道。

本实验运用生物回转器 (clinorotation 20-RWV) 模拟微重力,发现微重力干预后骨髓间充质干细胞表达和分泌神经营养因子量增多,预示微重力作用有助于干细胞向神经细胞分化。本研究为干细胞治疗颅脑创伤及帕金森综合征、阿尔茨海默病等提供新的思维和方法。

神经营养因子是诱导神经细胞生长发育和发挥功能的一类蛋白家族。通过神经营养因子来治疗神经系统损伤疾病无疑是很有前景的方法。然而由于给药途径和可能的副作用限制了其在临床的应用。此后有研究通过细胞共培养的方式,以旁分泌或细胞间接触形式促进内源神经细胞再生。即将干细胞移植

入体内特定组织来诱导神经细胞。体内培养的优点就是给细胞提供了三维的环境,这对其分化很重要。MSCs 已经显示可以产生营养因子比如 BDNF 来促进形成突出^[16]或促进内源性 NSCs 的形成^[17]。我们的研究显示在微重力处理的骨髓间充质干细胞能够显著增加其表达和分泌神经营养因子的能力,并且未引起干细胞的凋亡。以上表明此方法的安全高效性。微重力干预所产生的这种结果不仅有助于干细胞自身向神经细胞分化,也有助于通过旁分泌来刺激内源性神经细胞的再生。

关于微重力对干细胞特性改变的机制目前尚不明确。大量的研究,发现微重力可导致几乎目前研究的包括贴壁和悬浮生长的所有细胞的细胞骨架改变甚至崩解。人们首先选择鉴定多种与细胞骨架相关的基因蛋白表达,在微重力情况下核心因子小 G 蛋白 Rho 家族表达水平没有明显改变,骨架连接蛋白 plectin 表达稍有上调^[18]。其次,部分学者试图通过研究细胞外基质(extracellular matrix, ECM)各蛋白的改变来解释^[19]。目前基于微重力对干细胞形态功能改变的机制还有待进一步研究。

参考文献(References)

[1] Traska KA, Rameshwar P. Current advances in the treatment of Parkinson's disease with stem cells [J]. Curr Neurovasc Res,2007,4 (21): 99-109

[2] KojY, Park CH, Kohh C, et al. Human embryonic stem cell -derived neural precursors as a continuous stable. and on-demand source for human dopamine neurons[J]. J Neurochem,2007,103(4): 1417-1429

[3] Zhan SC, Li XJ, Johnson MA ,et al. Human embryonic stem cells for brain repair?[J]. Philos Trans Rsoc Lond B Biol Sci,2008,363(1489): 87-99

[4] Meyers VE, Zayzafoon M, Douglas JT, et al. RhoA and cytoskeletal disruption mediate reduced osteoblastogenesis and enhanced adipogenesis of human mesenchymal stem cells in modeled microgravity[J]. J Bone Miner Res, 2005, 20(10):1858-1866

[5] Buravkova LB, Romanov YA. Cultured stemcells are sensitive to gravity changes[J]. Acta Astronautica, 2008, 63: 603-608

[6] Yuge L, Kajume T, Tahara H, et al. Microgravity potentiates stem cell proliferation while sustaining the capability of differentiation[J]. Stem cells and development 2006, 15(6): 921-929

[7] Auffray I, Chevalier S, Froger J, et al. Nerve growth factor is involved in the supportive effect by bonemarrow-derived stromal cells of the factor-dependent human cell line UT-7 [J]. Blood 88 (5), 1996 1608-1618

[8] Chen XG, Li Y, Wang L, et al. Ischemic rat brain extracts induce human marrow stromal cell growth factor production [J]. Neuropathology,2002, 22 (4): 275-279

[9] Zhukov VNN, Volkov MN, Maisky IN, et al. Experiments with micro organisms and human cell cultures In the Zond 5 and Zond 7 flights [J]. J Life Sci Space Res, 1971.9(1): 99-103

[10] Stevens SA, Lakin WD, Penar PI. Modeling steady-state intracranial pressures in supine head-down tilt and microgravity conditions [J]. Aviat Space Environ Med,2005,76(4): 329-338

[11] Reddi LN,Xiao M,Steinberg SL. Discontinuous p61'e fluid distilbution under microgravity KC 135 flight investigations [J]. Soil Sci Soc Am J,2005,69(3): 593-598

(下转第 3877 页)

- Wang JP. Gastrointestinal Surgery [M]. Beijing: People's Medical Publishing company,2000: 360-415
- [2] Singh SS, Pyragius MD, Shah PJ, et al. Management of a Large Bronchopleural fistula Using a Tracheobronchial Stent[J]. Heart Lung Circ, 2007, 16(1): 57-59
- [3] Mao AW, Liu SY, Fang SM, et al. Gastrobronchial fistula: Treatment with a covered tracheobronchial stent and an integrated Y-shaped metallic stent [J]. European Journal of Radiology Extra, 2010, 73(2): e61-e64
- [4] Hofstetter W, Swisher SG, Correa AM, et al. Treatment outcomes of resected esophageal cancer[J]. Ann Surg, 2002, 236(3):376-385
- [5] Blewett CJ, Miller JD, Young JE, et al. Anastomotic leaks after esophagectomy for esophageal cancer: a comparison of thoracic and cervical anastomoses[J]. Ann Thorac Cardiovasc Surg, 2001,7(2): 75-78
- [6] Gelbmann CM, Ratiu NL, Rath HC, et al. Use of self-expandable plastic stents for the treatment of esophageal perforations and symptomatic anastomotic leaks[J]. Endoscopy, 2004, 36(8): 695-699
- [7] Langer FB, Wenzl E, Prager G, et al. Management of postoperative esophageal leaks with the Polyflex self-expanding covered plastic stent[J]. Ann Thorac Surg 2005, 79(2): 398-403, discussion 404
- [8] 尹国文, 陈世晔, 冯纯伟, 等. 新 " 三管法 " 介入治疗胸内食管胃吻合口瘘[J]. 介入放射学杂志, 2008, 17(11): 812-814
Yin GW, Chen SX, Feng CW, et al. The new "three laws" within the interventional treatment of thoracic esophageal anastomotic leakage [J]. Journal of interventional radiology, 2008, 17(11): 812-814
- [9] Yang RM, Han XW, Wu G, et al. Implantation of a self-expandable metallic inverted Y-stent to treat tracheobronchial stenosis in the carinal region: initial clinical experience. Clin Radiol 2007, 62(12): 1223-1231
- [10] Han XW, Wu G, Li YD, et al. Overcoming the delivery limitation: results of an approach to implanting an integrated self-expanding y-shaped metallic stent in the carina [J]. J Vasc Interv Radiol, 2008, 19(5): 742-749
- [11] Mao AW, Liu SY, Fang SM, et al. Gastrobronchial fistula: Treatment with a covered tracheobronchial stent and an integrated Y-shaped metal +lic stent[J]. European Journal of Radiology Extra, 2010, 73(2): e61-e64
- [12] Blackmon SH, Santora R, Schwarz P, et al. Utility of Removable Esophageal Covered Self-Expanding Metal Stents for Leak and Fistula Management[J]. The Annals of Thoracic Surgery, 2010, 89(3): 931-937
- [13] Odell JA, and DeVault KA. Extended Stent Usage for Persistent Esophageal Leak: Should There Be Limits? [J] The Annals of Thoracic Surgery, 2010, 90(5): 1707-1708
- [14] Schuchert MJ, Luketich JD, Landreneau RJ, et al. Management of Esophageal [J] Cancer Current Problems in Surgery, 2010, 47 (11) : 845-946
- [15] Singh SS, Pyragius MD, Shah PJ, et al. Management of a Large Bronchopleural Fistula Using a Tracheobronchial Stent [J]. Heart, Lung and Circulation, 2007, 16(1): 57-59

(上接第 3859 页)

- [12] Blottner D, Salanova M, Piittmann B, et al. Human skeletal muscle structure and function preserved by vibration muscle exercise following 55 days of bed rest[J]. Eur J Appl Physiol, 2006, 97(3): 261-271
- [13] Sonnenfeld G. Use of animal models for space flight physiology studies, with special focus on the immune system [J]. Gravit Space Biol Bull, 2005, 18(2): 3113-3118
- [14] Louis Y, Teruyuki K, Hidetoish T. Microgravity Potentiates Stem Cell Proliferation While Sustaining the Capability of Differentiation [J]. Stem Cells and Development, 2006, 15: 921-929
- [15] Dai ZQ, Wang R, Ling SK, et al. Simulated microgravity inhibits the proliferation and steogenesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Cell Prolif. 2007, 40: 671-684
- [16] Rodrigues HRC, Silva CMM, Goes AM, et al. Local injection of BDNF producing mesenchymal stem cells increases neuronal survival and synaptic stability following ventral root avulsion [J]. Neurobiol. Dis., 2009, 33, 290-300
- [17] Yoo SW, Kim SS, Lee SY, et al. Mesenchymal stem cells promote proliferation of endogenous neural stem cells and survival of newborn cells in a rat stroke model[J]. Exp. Mol. Med., 2008, 40, 387-397
- [18] Ferreira R, Vitorino R, Neuparth MJ, et al. Cellular patterns of the atrophic response in murine soleus and gastrocnemius muscles submitted to simulated weightlessness [J]. European journal of applied physiology, 2007, 101(3): 331-340
- [19] Grigoryan EN, Mitashov VI, Anton HJ. Urodelean amphibians in studies on microgravity: effects upon organ and tissue regeneration[J]. Adv Space Res 2002, 30(4): 757-764