

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.30.005

表皮生长因子诱导骨髓间充质干细胞向视网膜神经细胞分化的体外研究*

陈泽华¹ 付彩云¹ 刘俊² 黎其友² 阴正勤^{2△}

(1 解放军总医院 北京 100853; 2 第三军医大学附属西南医院 重庆 400038)

摘要 目的:研究表皮生长因子诱导骨髓间充质干细胞向视网膜神经细胞分化的可能性。**方法:**体外培养骨髓间充质干细胞,利用流式细胞仪分析其细胞表型。采用含 EGF 的培养液诱导骨髓间充质干细胞向视网膜神经细胞分化,并利用免疫荧光法进行鉴定。**结果:**从骨髓中分离培养的细胞具有成纤维细胞样形态,贴壁生长,表型相对均一,表面标志为 CD90、CD44、CD147 阳性;而 CD34、CD38、CD45、CD14、HLA-DR 阴性。体外诱导后可以得到神经干细胞标志物 nestin、神经胶质细胞标志物 GFAP 和视网膜光感受器细胞标志物 Rhodopsin 呈阳性表达的细胞。**结论:**从骨髓中分离培养得到的间充质干细胞具有向视网膜神经细胞分化的潜能。

关键词:骨髓间充质干细胞;视网膜神经细胞;体外分化

中图分类号:Q25 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)30-5818-03

Experimental Research on the Differentiation of Human Bone Mesenchymal Stem Cells into Retinal Cells in vitro*

CHEN Ze-hua¹, FU Cai-yun¹, LIU Jun², LI Qi-you², YIN Zheng-qin^{2△}

(1 General Hospital of PLA, Beijing, 100853, China;

2 South Hospital of the Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

ABSTRACT Objective: To study the differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells into retinal cells in vitro.

Methods: HMSCs were isolated from human bone marrow after Ficoll density gradient centrifugation. The adherent cells after cultivation at least 3 passages were used for study. Immunophenotype of the cells was analyzed by Flow cytometer, and cellular differentiation was identified by immunofluorescence labeling technique. **Results:** The target cells derived from human bone marrow adhered to the plate with fibroblastic-like morphology, whose surface markers were similar as mesenchymal stem cells. Major cells were positive for CD90, CD44 and CD147, while they were all negative for CD34, CD45 and HLA-DR. In the differentiation study, HMSCs were cultured in induced medium can differentiate into nestin positive cell, GFAP positive glial cells and retina-specific neurons expressing Rhodopsin with CD90 negative. **Conclusion:** HMSCs are capable of differentiating into the retinal neural cells in vitro.

Key words: Bone marrow mesenchymal stem cells; Retina; Cellular differentiation

Chinese Library Classification(CLC): Q25 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2014)30-5818-03

前言

目前,我国失明和视力低下的发病率逐年增高,且越来越倾向于年龄偏低的青少年人群,严重影响身心健康。引起低视力的原因很多,且不同年龄患者的病因也不同,临床通常认为视网膜疾病、弱视、视神经病变、青光眼及角膜疾病等均可导致视力减退,甚至失明^[1,2]。其中,视网膜神经细胞病变引起的视力减弱是目前研究的热点。神经细胞损伤后无法再生,因此大多数致盲疾病尚未制定可靠的治疗方法。随着干细胞研究的发展,使得干细胞可能为那些视网膜神经细胞病变导致疾病的治疗提供一个新突破^[3-5]。本实验拟用优化的方法从人骨髓中分离间充质干细胞、进行体外培养,并诱导其向视网膜神经细胞分化。

1 材料与方法

1.1 标本来源

正常成人骨髓,无先天性视网膜遗传疾病。均签署知情同意书。

1.2 主要试剂及仪器

小鼠抗人 Nestin 单克隆抗体(美国 BD 公司),小鼠抗人 Rhodopsin 单克隆抗体、小鼠抗人 CD90 单克隆抗体(美国 Santa-Cruz 公司),兔抗人 GFAP 多克隆抗体(Chemicon 公司),羊抗鼠抗体、羊抗兔抗体(北京中山试剂公司),流式细胞仪(Becton Dickinson)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞的分离及培养 将抽取的骨髓用 PBS 冲洗,1000 r/min× 10 min,2-3 次,用 Ficoll 密度梯度离心法分离获得单细胞。2% 台盼兰染色,计数活细胞,以 $3 \times 10^5/\text{cm}^2$ 接种于 75 cm^2 培养瓶中,置于 37℃、5% CO_2 饱和湿度的恒温培养箱内。培养

* 基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2013CB967001)

作者简介:陈泽华, E-mail: enhance741@126.com

△ 通讯作者:阴正勤, E-mail: qinzyin@yahoo.com.cn

(收稿日期:2014-06-10 接受日期:2014-06-30)

基为含 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养液, 24-48 h 后换液。以后每 3-4 天换液一次, 当细胞达 80-90% 融合时, 用 0.25% 胰酶-0.02% EDTA 消化以 1:2 比例进行传代。实验选取第 5 代以上的细胞。

1.3.2 细胞表型分析 细胞经 0.25% 胰酶-0.02% EDTA 消化后, 用 PBS 洗 2 次, 以每管 4×10^5 个细胞分装到流式管。使用标记有鼠单克隆藻红蛋白 (PE) 的 CD44, CD90, CD38 抗体和 FITC 标记的 CD34, CD14, CD45, CD147, HLA-DR (Becton Dickinson) 抗体, 使用鼠 IgG1k-PE, IgG1k-FITC, IgG2ak-PE, IgG2bk-PE (Becton Dickinson), IgG2ak-FITC (Chemicon) 等抗体作为对照。4℃ 孵育 30 min, 洗涤, 固定。用流式细胞仪 (Becton Dickinson) 的 CellQuest 软件采集数据并分析细胞表面不同抗原的相对含量。

1.3.3 骨髓间充质细胞的体外诱导分化 将体外扩增的人骨髓间充质细胞分为观察组和对照组, 分别接种于六孔板内, 并置于含 1% 胎牛血清的 α MEM 培养液中。每 3 天换液一次, 观察组加入 EGF 诱导, 对照组使用人骨髓间充质细胞继续培养。均在 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的恒温培养箱内培养 14 天。

1.3.4 免疫荧光染色鉴定 将细胞爬片用 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 每次 5 min; 4% 多聚甲醛固定 15 min; PBS 缓冲液洗涤 3

次, 每次 3 分钟; 10% BSA 37℃ 封闭半小时; 分别加入一抗, 37℃ 孵育 30 min; 0.1% Tween20-PBS 缓冲液洗涤 3 次, 每次 5 min; 分别加入 FITC 和 TRITC 标记的二抗, 室温孵育 1 h; 0.1% Tween20-PBS 缓冲液洗涤 3 次, 每次 5 min; 二蒸水洗涤后封片, 荧光显微镜下观察。

2 结果

2.1 细胞形态学观察

接种后细胞悬浮于培养液中, 形态不一, 种类较多。1 天后有少量成纤维样细胞贴壁, 此后贴壁细胞渐渐增多, 折光性强, 1 周后成纤维样细胞汇聚到 80~90%, 呈栅栏状或漩涡状排列。细胞经传代逐渐纯化, 在体外至少可传 15~16 代, 且增殖能力、细胞形态、大小与颗粒度保持不变。

2.2 细胞表面标记物检测

培养细胞表面标志的表达与间充质干细胞表面标志均不表达造血系统的标志 CD34、CD38、CD45、CD14 和 HLA-DR, 而表达多种粘附分子 CD44、CD90 和 CD147。说明体外培养的骨髓间充质细胞表面标志的表达物与间充质干细胞表面标志物的表达基本一致。

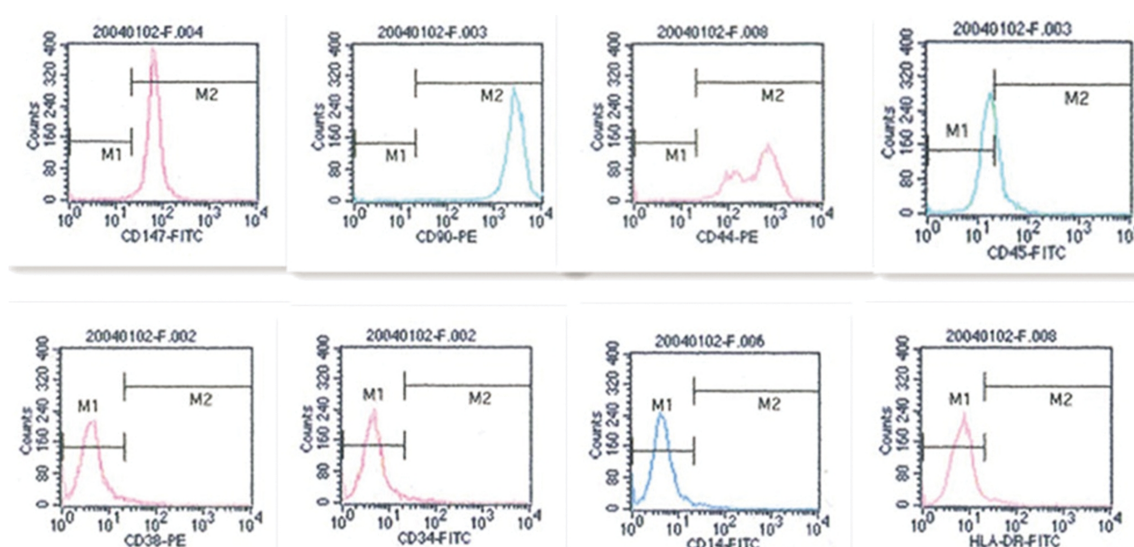


图 1 细胞表面标记物检测结果

Fig.1 Detective results of targets in cells

2.3 体外诱导分化

2.3.1 光镜下观察 骨髓来源的细胞在诱导液中培养后, 细胞形态发生变化, 细胞胞体向细胞核收缩, 渐渐地大多数细胞均转变为类似神经元的形态, 形成不规则的锥形、三角形, 有的细胞有多个突起, 而且发出分支, 终末端有类似神经元细胞的终结; 有的突起逐渐伸长, 形成圆锥状终末端, 而对照组细胞形态无改变。

2.3.2 免疫荧光染色结果 在 1% 胎牛血清的 α MEM 培养液不加 EGF 组中, 诱导 2 周后可以得到神经干细胞标志物 nestin 和神经胶质细胞标志物 GFAP 表达阳性的细胞; 在 1% 胎牛血清的 α MEM 培养液加 EGF 组中, 不仅可以得到以上两种细胞, 还可以诱导得到光感受器细胞 Rhodopsin 表达阳性的细胞, 同时, 骨髓间充质细胞的标志物 CD90 转为阴性。而对照组均无阳性细胞出现。说明诱导细胞可以分化, 且表达神经细胞

甚至视网膜光感受器细胞的表面标志物。

3 讨论

近年来, 干细胞研究已经为神经元损伤性疾病开拓了新的思路, 且自体移植可以避免移植细胞与宿主间的免疫排斥^[14]。细胞移植替代治疗正在成为有效治疗神经系统损伤和退行性病变的新途径^[6]。既往研究表明, 胚胎干细胞和神经干细胞在眼内移植后可以整合到宿主视网膜并分化为形态类似视网膜细胞的神经细胞^[7-9]。动物实验证实, 在成年小鼠眼内存在视网膜干细胞^[10]。然而, 无论是胚胎干细胞、神经干细胞, 还是视网膜干细胞的标本都非常困难, 而且受到社会伦理道德的制约, 限制了其在临床治疗中的应用。

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)起源于中胚层的具有自我更新和多向分化潜能的一种多能干细胞, 该干细

胞分布广泛,主要存在于骨髓,也可以见于肌肉、脂肪、胎盘、脐带、骨、软骨及韧带等^[11-13]。间充质干细胞在体外培养条件下能够自我复制、大量增殖,具有多向分化的潜能,甚至可以跨越胚层限制而分化为外胚层来源的神经元细胞,从而保证移植细胞的数量充足^[15]。

间充质干细胞的表面标志具有非单一性的特性,它可以表达间质细胞、内皮细胞及表皮细胞等的表面标志。目前一般认为CD29、CD44、CD90、CD147、CD166是MSC的重要标记物^[16]。国内外研究证实,体外培养或体内移植的MSCs可定向分化为表达神经元表面标志的细胞^[17]。有学者通过流式细胞仪研究细胞表面抗原发现,MSCs不表达造血细胞的表面抗原,如造血前体细胞的表面标志CD34、CD38,白细胞的标志抗原CD45,抗原呈递细胞的标志抗原HLA-DR和单核细胞/巨噬细胞表面抗原CD14,而整合素家族成员CD29、粘附分子CD44、CD166、CD90均为阳性^[18]。本实验中,我们对体外培养的骨髓来源的间充质细胞应用流式细胞仪进行鉴定后发现,细胞表达CD44、CD147、CD90,而不表达CD34、CD45、CD38、HLA-DR、CD14,证明它们的表面标志与文献报道的骨髓来源间充质干细胞的表面标志基本一致,基本上可以肯定我们从成人骨髓中获得的细胞是间充质干细胞。

国外相关实验将PKH-67标记的富含干细胞的骨髓来源细胞注射到经机械损伤视网膜的玻璃体腔内,两周后这些细胞整合到损伤视网膜区域,并分化表达成熟视网膜细胞标记物,延长一年仍能检测到BMSC来源的神经细胞^[19,20]。本研究利用骨髓分离得到的间充质干细胞,经体外诱导后,分化细胞不再表达间充质干细胞的表面标志物,而表达神经细胞及光感受器细胞的表面标志物,说明这些间充质干细胞具有分化为视网膜神经细胞的能力,如果将其注射到玻璃体或视网膜下腔,可能有助于修复损伤的视网膜细胞。

综上所述,从人骨髓中分离、培养得到的间充质干细胞具有向视网膜神经细胞分化的潜能,本实验为细胞移植治疗视网膜疾病的可能性奠定了实验基础。

参考文献(References)

- [1] Zhao Y, Xin J, Sun C, et al. Saffrole oxide induced neuronal differentiation of rat bone-marrow mesenchymal stem cells by elevating Hsp70 [J]. *Gene*, 2012, 509(1): 85-92
- [2] Yu K, GE J, Summers JB, et al. TSP-1 secreted by bone marrow stromal cells contributes to retinal ganglion cell neurite outgrowth and survival[J]. *PLoS One*, 2008, 3(6): e2470
- [3] Yan K, Zhang R, Sun C, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells maintain the resting phenotype of microglia and inhibit microglial activation[J]. *PLoS One*, 2013, 31, 8(12): e84116
- [4] 李恬, 谢振华, 郭玲, 等. 两种 GSK-3 β 抑制剂对间充质干细胞神经分化的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2012, 12(34): 6601-6606
Li Tian, Xie Zhen-hua, Guo Ling, et al. The Effect of Two Gsk-3 Inhibitors on the Neurogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2012, 12(34): 6601-6606
- [5] Chen J, Liu R, Yang Y, et al. The simulated microgravity enhances the differentiation of mesenchymal stem cells into neurons [J]. *Neuro sci Lett*, 2011, 505(2): 171-175
- [6] Johnson TV, DeKorver NW, Levasseur VA, et al. Identification of retinal ganglion cell neuroprotection conferred by platelet-derived growth factor through analysis of the mesenchymal stem cell secretome[J]. *Brain*, 2014, 137(Pt2): 503-519
- [7] Ng TK, Fortino VR, Pelaez D, et al. Progress of mesenchymal stem cell therapy for neural and retinal diseases [J]. *World J Stem Cells*, 2014, 26, 6(2): 111-119
- [8] Aizman I, Tirumalashetty BJ, McGrogan M, et al. Comparison of the neuropoietic activity of gene-modified versus parental mesenchymal stromal cells and the identification of soluble and extracellular matrix-related neuropoietic mediators [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2014, 26, 5(1): 29
- [9] Lim HS, Joe YA. A ROCK Inhibitor Blocks the Inhibitory Effect of Chondroitin Sulfate Proteoglycan on Morphological Changes of Mesenchymal Stromal/Stem Cells into Neuron-Like Cell[J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2013, 21(6): 447-453
- [10] Wang S, Kan Q, Sun Y, et al. Caveolin-1 regulates neural differentiation of rat bone mesenchymal stem cells into neurons by modulating Notch signaling[J]. *Int J Dev Neuro sci*, 2012, 12(12): 459
- [11] Wu R, Tang Y, Zang W, et al. MicroRNA-128 regulates the differentiation of rat bone mesenchymal stem cells into neuron-like cells by Wnt signaling[J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 387(1-2): 151-158
- [12] Liu Y, Zhang Y, Lin L, et al. Effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on the axonal outgrowth through activation of PI3K/AKT signaling in primary cortical neurons followed oxygen-glucose deprivation injury[J]. *PLoS One*, 2013, 12, 8(11): e78514
- [13] Liu Y, Yi XC, Guo G, et al. Basic fibroblast growth factor increases the transplantation-mediated therapeutic effect of bone mesenchymal stem cells following traumatic brain injury[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9 (1): 333-339
- [14] Hu Y, Tan HB, Wang XM, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells protect against retinal ganglion cell loss in aged rats with glaucoma [J]. *Clin Interv Aging*, 2013, 8: 1467-1470
- [15] Mead B, Logan A, Berry M, et al. Intravitreally transplanted dental pulp stem cells promote neuroprotection and axon regeneration of retinal ganglion cells after optic nerve injury [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 15, 54(12): 7544-7556
- [16] Sugitani S, Tsuruma K, Ohno Y, et al. The potential neuroprotective effect of human adipose stem cells conditioned medium against light-induced retinal damage[J]. *Exp Eye Res*, 2013, 116: 254-264
- [17] Jeong SG, Ohn T, Kim SH, et al. Valproic acid promotes neuronal differentiation by induction of neuroprogenitors in human bone-marrow mesenchymal stromal cells [J]. *Neurosci Lett*, 2013, 25, 554: 22-27
- [18] Wang K, Long Q, Jia C, et al. Over-expression of Mash1 improves the GABAergic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in vitro[J]. *Brain Res Bull*, 2013, 99: 84-94
- [19] Feng N, Han Q, Li J, et al. Generation of highly purified neural stem cells from human adipose-derived mesenchymal stem cells by Sox1 activation[J]. *Stem Cells Dev*, 2014, 1, 23(5): 515-529
- [20] Tan Y, Uchida K, Nakajima H, et al. Blockade of interleukin 6 signaling improves the survival rate of transplanted bone marrow stromal cells and increases locomotor function in mice with spinal cord injury[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2013, 72(10): 980-993