

条件培养基培养神经干细胞的体外实验研究

宋旆文 徐 鹏 尤 涛 董福龙 章仁杰 申才良

摘要 目的 观察骨髓间充质干细胞(BMSCs)条件培养基对神经干细胞(NSCs)分化的影响。方法 提取第3代大鼠BMSCs条件培养基,浓缩后加到NSCs培养基中,对所培养的NSCs进行形态学观察和免疫化学染色法鉴定。结果 在加入大鼠BMSCs条件培养基的实验组,24 h内见悬浮生长的NSCs球开始贴壁生长。至第3天,所有悬浮细胞球基本贴壁生长,大量细胞从中爬出,伸出突起。第7天时,伸出细胞交织成网。对贴壁分化后的NSCs进行免疫化学染色,其表达神经元和胶质细胞的特异性蛋白。而未加入条件培养基的对照组,NSCs仍呈悬浮生长,未见大量细胞贴壁生长及分化。结论 在完全去除BMSCs细胞的情况下,含有大鼠BMSCs分泌的细胞因子的条件培养基对NSCs的贴壁分化

有显著的促进作用。

关键词 间充质干细胞;神经干细胞;分化;条件培养基

中图分类号 R 363

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)05-0598-05

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)是来源于神经组织的未成熟细胞,能够在体内分化为神经元、少突胶质细胞和星形胶质细胞,替代原来受损的神经细胞,从而促进脊髓损伤后功能的恢复^[1]。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)则属于成体干细胞的一种,具有多向分化的潜能,在特定的条件下能够分化成为成骨、脂肪、神经、内皮祖细胞等。在大量细胞移植治疗脊髓损伤的实验中,BMSCs因具有的抑制炎症反应和细胞的凋亡、促进轴突和血管再生等而被广泛应用^[2]。然而,BMSCs的移植也有着许多不利的方

2014-02-24 接收

作者单位:安徽医科大学第一附属医院骨科,合肥 230022

作者简介:宋旆文,男,硕士研究生;

申才良,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:shencailiang1616@163.com

- [6] Sayed Razavi M, Shirani E. Development of a general method for designing microvascular networks using distribution of wall shear stress[J]. *J Biomech*, 2013, 46(13):2303-9.
- [7] Sun L L, Zhang L, Meng X L, et al. Effects of fluid shear stress on the expression of Omi/HtrA2 in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(1):110-4.
- [8] Vozzi F, Bianchi F, Ahluwalia A, et al. Hydrostatic pressure and shear stress affect endothelin-1 and nitric oxide release by endothe-

lial cells in bioreactors [J]. *Biotechnol J*, 2014 9(1):146-54.

- [9] Dolan J M, Meng H, Sim F J, et al. Differential gene expression by endothelial cells under positive and negative streamwise gradients of high wall shear stress[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2013, 305(8):C854-66.
- [10] Frangos J A, Eskin S G, McIntire L V, et al. Flow effects on prostacyclin production by cultured human endothelial cells [J]. *Science*, 1985 227(4693):1477-9.

Simulate the hemodynamic environment of umbilical vein to design a device

Yin Zongzhi¹, Chen Suhua², Ai Jihui², et al

(¹Dept of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022; ²Dept of Obstetrics and Gynecology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030)

Abstract Objective The hemodynamic environment of umbilical vein have the crucial role in fetal growth and development. A device can simulate the umbilical vein venous pressure and fluid shear stress experiment at the same time is needed in in vitro study of biological function of umbilical vein. **Methods** Parallel plate model was used for structural optimization to simulate the fluid shear stress of umbilical vein. An airtight storage tank was used to simulate venous pressure. **Results** Mechanics calculation found that the device could effectively simulate the fluid shear stress and venous pressure exactly as in the umbilical vein. **Conclusion** The device can be used to study the biomechanical characteristics of the umbilical vein endothelial cells *in vitro* under dynamic environment.

Key words umbilical vein; hemodynamic; fluid shear stress; venous pressure

面,如移植后在宿主体内无法长期存活、分化的不确定性和局限性以及其他潜在风险^[3]。BMSCs 可以分泌各种细胞因子,直接利用含 BMSCs 所分泌的各种细胞因子的条件培养基对于许多疾病的治疗取得了积极的疗效^[4-5]。因此,利用 BMSCs 条件培养基在体外实验中研究其对于 NSCs 分化的影响,从而探讨在完全去除 BMSCs 细胞的情况下,BMSCs 分泌的细胞因子对 NSCs 的作用,也为脊髓损伤的细胞治疗提供了新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 4~6 周 SD 大鼠 1 只,清洁级,100~120 g;24 h 内新生 SD 大鼠幼鼠,均由安徽医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 试剂 DMEM-LG、DMEM-HG 购自美国 HyClone 公司;DMEM/F12 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司;B-27 添加剂购自美国 Invitrogen 公司;表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)购自美国 PeproTech 公司;PE 标记的抗大鼠 CD29、CD90 及 FITC 标记的抗大鼠 CD34、CD44 抗体购自美国 BioLegend 公司;小鼠抗大鼠巢蛋白(nestin)单克隆抗体、兔抗大鼠胶质纤维酸性蛋白(glia fibrillary acidic protein, GFAP)、小鼠抗微管相关蛋白 2(microtubule-associated protein-2, MAP-2)抗体、FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 购自美国 Santa Cruz 公司;TRITC 标记山羊抗兔 IgG、Triton X-100 购自北京中杉金桥生物技术有限公司;多聚赖氨酸、地塞米松、 β -甘油酸钠、抗坏血酸购自美国 Sigma 公司;即用型正常山羊血清购自武汉博士德公司;青链霉素溶液(100 \times)、Hoechst 33342、胰酶细胞消化液、免疫染色一抗稀释液、免疫荧光染色二抗稀释液、免疫染色固定液、抗荧光淬灭封片液(强)购自中国碧云天公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 BMSCs 的体外分离、培养、鉴定、成骨分化 采用全骨髓贴壁法从大鼠骨髓中分离和培养 BMSCs,完全培养基由 10% 胎牛血清的 DMEM + 100 U/ml 青/链霉素构成,将细胞培养于含 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养,每 2~3 d 更换培养液一次。待细胞融合达到 80% 后,按 1:2 传代培养。

取生长良好的第 3 代大鼠 BMSCs,用 0.25% 胰酶预热消化后,制成均匀的单细胞悬液,计数,并调

整细胞密度约为 10⁶ 个/管,加入 PBS 100 μ l。在室温、避光条件下加入 FITC 标记抗大鼠 CD34 的单克隆抗体,藻红蛋白(PE)标记抗鼠 CD90、CD29 的单克隆抗体,温育 30 min 后采用流式细胞仪进行检测。

取第 3 代大鼠 BMSCs 制成单细胞悬液,按 1.5 \times 10⁴/cm² 接种至 6 孔板;待细胞长至完全融合时,实验组每孔加入 2.5 ml 成骨诱导液(高糖 DMEM 培养液、10% 胎牛血清、100 U/ml 青/链霉素、100 nmol/L 地塞米松、5 mmol/L β -甘油酸钠、50 μ g/ml 抗坏血酸),对照组继续用原培养液培养,每隔 3 d 换液一次,第 21 天终止诱导,吸去培养液,PBS 冲洗 2 次;95% 乙醇固定 30 min,蒸馏水冲洗 3 次,茜素红染液 37 $^{\circ}$ C 染色 30 min,蒸馏水冲洗 3 次,显微镜下观察。

1.2.2 大鼠 BMSCs 条件培养基的获得 将第 3 代 BMSCs 接种于 T75 培养瓶中,待细胞生长达到 90% 融合,弃去原培养基,用 PBS 冲洗 3 次后,加入无血清的 DMEM/F12 培养直至 48 h。之后,将收集的条件培养基用 10 ku 浓缩离心管,在 13 $^{\circ}$ C、4 000 r/min 离心 15 min 进行浓缩。浓缩后的条件培养基通过 0.22 μ m 无菌滤器进行过滤,冻存于 -80 $^{\circ}$ C,直至使用时取出。

1.2.3 大鼠 NSCs 的体外分离培养 取新生 24 h 内的 SD 大鼠幼鼠,颈椎脱臼法处死,经 75% 乙醇浸泡 5 min。在无菌条件下断头,分离出全脑,剥除脑膜及血块,切碎脑组织,移入 15 ml 离心管中,加入 1 ml 胰酶细胞消化液置于 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中消化 10~15 min,加入 10% 胎牛血清培养基终止消化,经筛网过滤制成单细胞悬液,以 600 r/min 离心 5 min 后弃上清液,加入 2 ml 无血清培养基(DMEM/F12、2% B-27、EGF 20 ng/ml、bFGF 20 ng/ml、100 \times 青链霉素溶液)再次离心,弃上清液,加入无血清培养基重悬,计数,以 10⁵ 个/ml 接种于培养瓶中,置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养,每 2~3 d 半量换液 1 次,5~7 d 传代。

1.2.4 NSCs 的鉴定 取第 2 代培养 7 d 的 NSCs 球,接种于经 0.1 mg/ml 多聚赖氨酸包被处理后的盖玻片的 6 孔板中,37 $^{\circ}$ C 培养箱过夜,次日吸去培养基,用 0.01 mol/L 的 PBS 洗 3 次,每次 5 min,免疫荧光染色固定液常温下固定 20 min,吸去多余残液后用 0.01 mol/L 的 PBS 洗 3 次,每次 5 min,后在含 0.1% Triton X-100 的 PBS 液中孵育 20 min,PBS 液漂洗 3 次,每次 5 min,加入正常山羊血清工作液

后置于 37 °C 培养箱内孵育 1 h ,加入一抗 nestin 抗体(1 : 50) ,4 °C 条件下孵育过夜 ,次日 ,常温下放置 2 h 后 PBS 液漂洗 3 次 ,每次 5 min 后加入 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体(1 : 100) 37 °C 细胞培养箱内避光孵育 1 h ,PBS 漂洗 3 次 ,每次 5 min 晾干后 ,抗荧光淬灭封片液封片 ,荧光显微镜观察及照相。

1.2.5 NSCs 的分化及分化后鉴定 取第 2 代培养 7 d 的 NSCs ,经离心后 ,吸弃旧的无血清培养基 ,更换培养基为去除 EGF、bFGF 的含 10% FBS 的 DMEM/F12 中培养。重悬后 ,接种于放有经 0.1 mg/ml 多聚赖氨酸包被过夜的盖玻片的 6 孔板中 ,置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中继续培养 ,每 2 ~ 3 d 减半量换液。

NSCs 贴壁培养 7 d 后 ,形态上已出现了明显的分化 ,各盖玻片已大部铺满 ,选取神经胶质细胞和神经元的特异性标志物 GFAP、MAP-2 行免疫荧光染色。用 0.01 mol/L 的 PBS 洗 3 次 ,每次 5 min ,免疫荧光染色固定液常温下固定 20 min ,吸去多余残液后用 0.01 mol/L 的 PBS 洗 3 次 ,每次 5 min 后在含 0.1% Triton X-100 的 PBS 液中孵育 20 min ,PBS 液漂洗 3 次 ,每次 5 min 加入正常山羊血清工作液后置于 37 °C 培养箱内孵育 1 h ,将一抗 MAP-2、GFAP 抗体按 1 : 50 混合稀释后加入各培养孔内 ,4 °C 冰箱内孵育过夜 ,次日 ,常温下放置 2 h ,PBS 液漂洗 3 次 ,每次 5 min 后加入 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体(1 : 100) 及 TRITC 标记山羊抗兔 IgG(1 : 100) 37 °C 细胞培养箱内避光孵育 2 h ,PBS 漂洗 3 次 ,每次 5 min 晾干后 ,抗荧光淬灭封片液封片 ,荧光显微镜观察及照相。

1.2.6 大鼠 NSCs 和 BMSCs 条件培养基共培养 将 1 × 10⁶ 细胞数的 NSCs 接种于 6 孔板中 ,对照组直接加入 NSCs 培养基 + 25% DMEM/F12 ,共培养组加入 NSCs 培养基 + 25% BMSCs 浓缩的条件培养

基。每日观察细胞形态变化及细胞贴壁情况 ,第 3 天换液一次。第 7 天终止培养 ,进行免疫化学染色。

2 结果

2.1 BMSCs 的形态观察及鉴定 原代 BMSCs 刚接种时 ,可见大量细胞呈悬浮状态 ,24 h 首次换液 ,悬浮细胞明显减少 ,镜下已可见部分贴壁细胞 ,多为圆形 ,大小不一 ,不能清晰辨认细胞核。4 ~ 5 d 可见部分贴壁细胞呈多角形、梭形 ,数量逐渐增多。至第 3 代以后 ,细胞形态基本均匀一致 ,呈较典型的放射状生长 ,见图 1。流式细胞仪对第 3 代大鼠 BMSCs 细胞免疫表型检测结果显示 ,CD29、CD90 阳性率分别为 0.972 和 0.983 ;CD34 阳性率为 0.321 ,见图 2。同时对第 3 代细胞进行成骨诱导 ,至诱导 3 周时 ,镜下可见明显的钙结节形成 ,茜素红染色呈红色结节 ,见图 3。

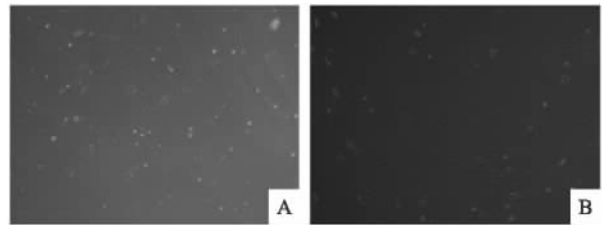


图 1 BMSCs 形态观察 ×100
A:BMSCs 原代培养第 5 天;B:第 3 代 BMSCs

2.2 NSCs 的形态观察及鉴定 原代细胞接种 2 ~ 3 d 后可见 NSCs 成球形悬浮生长 ,到第 7 天时培养瓶内生长出数十个甚至上百个细胞的集落 ,多呈球形、桑葚状 ,折光性强 ,未见到明显的贴壁和细胞突起形成 ,见图 3 ,部分 NSCs 因体积过大导致细胞球中心出现颜色暗淡、透光性较差。将培养 7 d 贴壁固定的 NSCs 球行 nestin 免疫荧光染色 ,结果显示贴壁的细胞球中大部分细胞表达 nestin 阳性 ,见图 4。

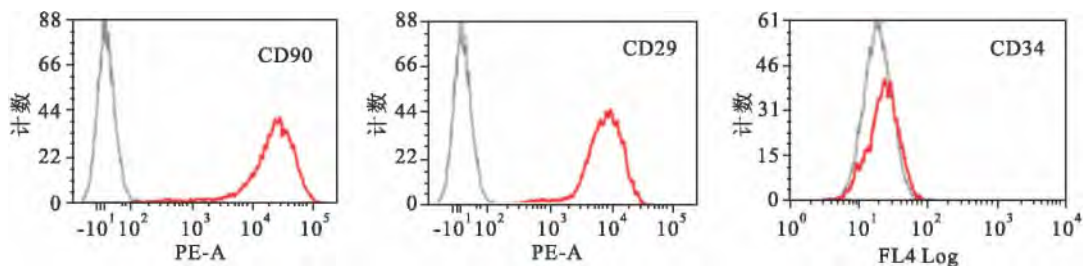


图 2 大鼠 BMSCs 表面标志物检测
灰色线条代表阴性对照组 ;红色线条代表阳性细胞

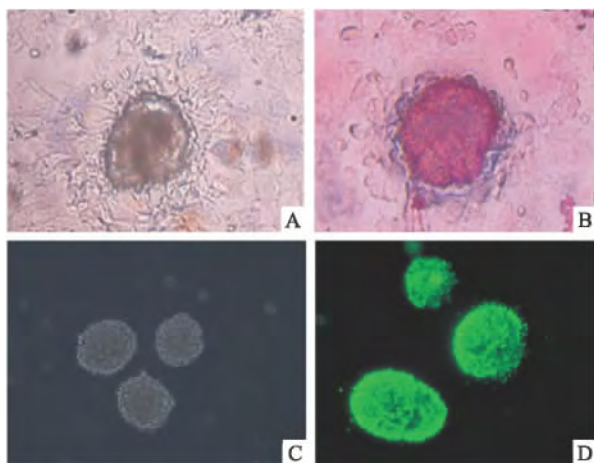


图3 BMSCs成骨、茜素红染色和NSCs形态及鉴定

A:成骨诱导3周×400;B:茜素红染色后钙结节呈红色×400;
C:NSCs培养7d×200;D:对NSCs细胞球nestin染色,阳性×200

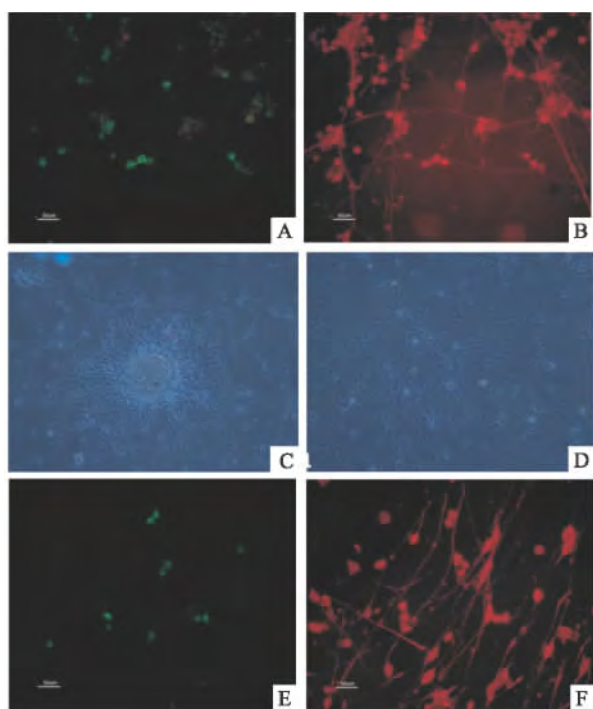


图4 NSCs分化后鉴定和加入BMSCs条件培养基后NSCs形态观察及鉴定

A:NSCs分化后MAP-2染色,阳性×400;B:NSCs分化后GFAP染色,阳性×400;C、D:NSCs加入BMSCs条件培养基后第3、7天分化细胞形态观察×200;E、F:NSCs加入BMSC条件培养基后分化细胞进行MAP-2和GFAP染色,均呈阳性×400

2.3 NSCs分化后形态观察及鉴定 在NSCs接种的有多聚赖氨酸处理过盖玻片的6孔板中,发现NSCs球逐渐贴壁,细胞逐渐从球中爬出,表现出多种形态,部分细胞分化为具有多个突起,胞体圆形、椭圆形的神经元样细胞。部分则出现粗长突起并呈

梭样排列的神经胶质样细胞,并随着培养时间的延长,突起逐渐变长、增多。免疫荧光染色结果可见MAP-2阳性的神经元细胞及GFAP阳性的星形胶质细胞,见图4。

2.4 加入BMSCs条件培养基后NSCs形态的观察及鉴定 实验组在加入条件培养基24h内,就可见部分NSCs开始贴壁分化。培养第3天可见多种形态细胞从贴壁的NSCs球中爬出,伸出突起,至第7天时,细胞间胶质成网,见图4。而对照组细胞一直呈悬浮球状生长。将实验组贴壁细胞行免疫荧光染色,GFAP及MAP-2阳性,证明贴壁细胞为NSCs分化的神经元和神经胶质细胞,见图4。

3 讨论

本研究结果显示,利用MSCs的条件培养基,在含有bFGF和EGF两种因子的情况下,仍可以促进悬浮生长的NSCs球贴壁分化为神经元和胶质细胞,表明BMSCs所分泌的各种因子能够促进NSCs的贴壁分化。

在脊髓损伤后,机体会自发的激活内源性的NSCs^[6]或者通过外源性NSCs的植入使得局部的NSCs增多,这对于损伤后功能的恢复有着重要意义。因此,增加局部NSCs的存活率和促进NSCs向具有功能的神经元和胶质细胞分化尤为重要。既往的实验利用BMSCs和NSCs的协同作用,将两者联合移植治疗脊髓损伤已取得了一定的成效。但随着实验的不断进行,研究人员发现MSCs所获得的很多积极效应并非依赖于细胞本身作用,而是通过分泌各种细胞因子和神经营养因子,如脑源性神经营养因子、神经营养因子、睫状神经生长因子及其金属蛋白酶组织抑制剂-1和中性粒细胞趋化因子-3等,这些营养因子不仅可以保护NSCs移植的凋亡,同时对NSCs的增殖和分化也有着重要作用^[7-8]。

本研究中,实验组加入条件培养基后,悬浮的NSCs球即开始贴壁分化,大量细胞从中爬出,伸出突起,最终交织成网。对贴壁细胞进行免疫化学检测,GFAP及MAP-2呈阳性,表明NSCs贴壁分化为神经元和胶质细胞。而对照组细胞仍悬浮生长,且呈球状生长,鲜有贴壁。这一结果与其他许多MSCs和NSCs共培养实验中所观察到的NSCs的改变基本相符。如Wang et al^[9]将BMSCs和NSCs混合后直接共同培养,发现种植后12h,BMSCs表面贴壁的NSCs球即开始呈放射状向外迁移。杨早等^[10]利用Transwell培养板构建的NSCs和MSCs非接触

性共培养体系也是观察到了对 NSCs 促贴壁分化这一现象,这些共培养实验均表明 MSCs 具有促进 NSCs 分化为神经元和胶质细胞的作用,但都没有完全去除 BMSCs 本身。非接触共培养虽然去除了 BMSCs 和 NSCs 的直接接触,但仍无法避免 NSCs 分泌的各种因子通过共同培养基与 BMSCs 形成间接接触,从而影响 BMSCs 细胞因子的分泌。本实验利用含有 BMSCs 分泌的各种细胞因子的条件培养基,浓缩后添加到 NSCs 的培养基中,在完全去除 BMSCs 细胞本身,彻底避免了两细胞间直接和间接相互作用的情况下,观察到了 NSCs 的贴壁分化,这也进一步肯定了 MSCs 旁分泌的细胞因子对于 NSCs 分化的促进作用。

本次实验结果肯定了富含 BMSCs 所分泌的细胞因子的条件培养基对 NSCs 贴壁分化的积极作用而不依赖于 BMSCs 细胞本身。同时也为 BMSCs 条件培养基与 NSCs 共同移植提供了依据,避免了 BMSCs 移植后的不确定性及潜在风险,为脊髓损伤细胞移植带来了新的思路。

参考文献

[1] Piltti K M, Salazar D L, Uchida N, et al. Safety of human neural stem cell transplantation in chronic spinal cord injury [J]. *Stem Cells Transl Med* 2013 2(12):961-74.
 [2] Karaoz E, Kabatas S, Duruksu G, et al. Reduction of lesion in

injured rat spinal cord and partial functional recovery of motility after bone marrow derived mesenchymal stem cell transplantation [J]. *Turk Neurosurg*, 2012 22(2):207-17.
 [3] Wong R S. Mesenchymal stem cells: angels or demons [J]. *J Biomed Biotechnol* 2011 2011: 459510.
 [4] Du Z, Wei C, Cheng K, et al. Mesenchymal stem cells conditioned medium reduces liver injury and enhances regeneration in reduced-size rat liver transplantation [J]. *J Surg Res* 2013, 183(2):907-15.
 [5] Nakahara M, Okumura N, Kay E P, et al. Corneal endothelial expansion promoted by human bone marrow mesenchymal stem cell-derived conditioned medium [J]. *PLoS One* 2013 8(7):e69009.
 [6] Ke Y, Chi L, Xu R, et al. Early response of endogenous adult neural progenitor cells to acute spinal cord injury in mice [J]. *Stem Cells* 2006 24(4):1011-9.
 [7] Quertainmont R, Cantinieaux D, Botman O, et al. Mesenchymal stem cell graft improves recovery after spinal cord injury in adult rats through neurotrophic and pro-angiogenic actions [J]. *PLoS One* 2012 7(6):e39500.
 [8] Tejima E, Guo S, Murata Y, et al. Neuroprotective effects of overexpressing tissue inhibitor of metalloproteinase TIMP-1 [J]. *J Neurotrauma* 2009 26(11):1935-41.
 [9] Wang Y, Tu W, Lou Y, et al. Mesenchymal stem cells regulate the proliferation and differentiation of neural stem cells through notch signaling [J]. *Cell Biol Int* 2009 33(11):1173-9.
 [10] 杨早, 杨琴, 贾延劫, 等. 相互间非接触性共培养对神经干细胞和骨髓基质细胞的影响 [J]. *南方医科大学学报* 2010, 30(4):823-6.

Effects of conditioned medium on neural stem cells *in vitro*

Song Peiwen, Xu Peng, You Tao, et al

(Dept of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230022)

Abstract Objective To observe the effect of the conditioned medium from bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) on the differentiation of neural stem cells (NSCs). **Methods** The morphology and immunocytochemistry profile of NSCs were investigated via culturing with the concentrated conditioned medium derived from the passage 3 BMSCs. **Results** In the conditioned medium of BMSC treated group, the growth of NSCs was converted from floating to adherence gradually within 24h. Till the 3rd day, most floating cells were adhered to the plastic and extended long processes which formed a network with the migrating cells on the 7th day. By immunocytochemistry examination, the cells differentiated from the adhering NSCs expressed the phenotypes of neurons and astrocytes. Nevertheless, the NSCs without BMSC-CM was keeping floating growth in control group and observed adhering to plastic rarely. **Conclusion** Without the BMSCs themselves, the deliver factors secreted by BMSCs in the form of concentrated conditioned medium promote the differentiation of NSCs.

Key words mesenchymal stem cell; neural stem cell; differentiation; conditioned medium