

# 骨髓间充质干细胞神经营养因子的表达及 对脊髓神经元的保护作用\*

吴永超<sup>1</sup> 郑启新<sup>1</sup> 胡东<sup>2</sup> 郝杰<sup>1</sup> 王运涛<sup>1</sup> 刘晓帆<sup>1</sup>

**摘要** 目的:研究骨髓间充质干细胞(BMSC)表达脑源性神经营养因子(BDNF)和神经生长因子(NGF),以及 BMSC 条件培养液对脊髓神经元的保护作用,探讨 BMSC 治疗脊髓损伤的机制,为 BMSC 的临床应用提供依据和指导。方法:取大鼠骨髓培养 BMSC,用 CD44、CD45 和 CD71 免疫细胞化学染色进行鉴定。提取 BMSC mRNA,RT-PCR 检测 BDNF 和 NGF 表达,ELISA 检测 BMSC 培养液中 BDNF 和 NGF 的含量。原代取材培养大鼠脊髓神经元,10d 后用不同比例的 BMSC 条件培养液培养 24h,热休克诱导神经元凋亡,流式细胞仪检测凋亡细胞比率。结果:BMSC 贴壁生长,免疫细胞化学染色 CD44(+),CD45(-)和 CD71(+). BMSC 表达 BDNF 和 NGF mRNA, BMSC 培养液中含有 BDNF 和 NGF,随培养时间的延长培养液中 BDNF 和 NGF 的含量增加。BMSC 条件培养液可以减少热休克诱导的脊髓神经元凋亡的比率,并且 BMSC 条件培养液含量高者有更好的保护作用。结论:BMSC 表达神经营养因子 BDNF 和 NGF,对损伤脊髓神经元有保护作用。

**关键词** 骨髓间充质干细胞; 脑源性神经营养因子; 神经生长因子; 脊髓; 神经元; 凋亡

中图分类号:R49, R651.2 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2006)-10-0867-04

**The expression of BDNF and NGF of bone marrow mesenchymal stem cells and protective effect for spinal cord neurons/WU Yongchao,ZHENG Qixin,HU Dong,et al//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006,21(10):867—870**

**Abstract Objective:**To study the possibility of expression of BDNF (brain derived neurotrophic factor)and NGF (nerve growth factor) in bone marrow mesenchymal stem cells (BMSC) in vitro and the protective effect of BMSC conditioned medium to spinal cord neuron.**Method:** BMSC was cultured, the passage 3 cells were chosen to make immunocytochemical stain for CD44,CD71 and CD45. After total mRNA was extracted,the expression of BDNF and NGF were detected in BMSC.NGF and BDNF were assayed in BMSC secretory with ELISA kit. The spinal cord neurons were collected and cultured. After 10d the culture media of neuron were changed to BMSC conditioned medium for 24h. The neurons were induced to apoptosis by heat shock. The percentage of apoptosis neurons were detected with FCM. **Result:**BMSCs were positive of CD44 and CD71 and expressed BDNF and NGF mRNA. NGF and BDNF were found in BMSC secretory and their concentrations were increased with time. BMSC conditioned medium could decrease the rate of apoptosis of spinal cord neurons induced by heat shock.**Conclusion:**BMSC can express BDNF and NGF,and BMSC conditioned medium have protective effect to spinal cord neuron.

**Author's address** Orthopaedic Department,Union Hospital,Tongji Medical College,Huazhong University of Science and Technology,Wuhan,430022

**Key words** bone marrow mesenchymal stem cells; brain-derived neurotrophic factor; nerve growth factor; spinal cord; neuron; apoptosis

以往研究表明,骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)移植治疗脊髓损伤的动物实验有很好的效果<sup>[1]</sup>,有研究者将急性脊髓损伤患者的自体骨髓细胞移植到脊髓损伤的部位,取得了不错的效果<sup>[2]</sup>,但是其治疗机制尚不清楚。我们设想 BMSC 可能通过分泌神经营养因子保护脊髓中受损的神经组织来起治疗作用。本实验培养 BMSC, 反转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BD-

NF)和神经生长因子(nerve growth factor, NGF)的 mRNA 的表达,ELISA 测定 BMSC 培养液中 BDNF 和 NGF 含量,观测 BMSC 条件培养液对热休克诱导的脊髓神经元的保护作用。

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30500511)

1 华中科技大学同济医学院附属协和医院骨科,武汉,430022

2 华中科技大学同济医学院附属协和医院湖北省干细胞中心

作者简介:吴永超,男,博士,主治医师,讲师

收稿日期:2006-06-12

## 1 材料与方法

### 1.1 BMSC的取材和培养

BMSC的培养、鉴定等检测方法参照作者已经发表文章<sup>[1]</sup>, 简述如下: 取1月龄成年SD大鼠, 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 无菌条件下取双侧股骨、胫骨, 剪去两侧骨端。用10ml DMEM-LG完全培养基(含15%胎牛血清, 2mM谷氨酰胺, 100U/ml青霉素, 100mg/ml链霉素)冲洗骨髓腔, 吹打分散细胞。用等体积PBS稀释骨髓, 放置在Ficoll液上离心, 取中间单个核细胞层。调整细胞密度为 $1 \times 10^6$ 个/ml, 接种培养瓶, 置培养箱培养。定时换液、消化和传代。

### 1.2 BMSCs的免疫组织化学染色鉴定

取出接种第三代(P<sub>3</sub>)细胞的盖玻片, 用0.4%多聚甲醛固定。TritonX-100处理、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和羊血清封闭后, 分别加入CD44、CD71和CD45抗体, 置湿盒内室温1h后4℃过夜, 二抗反应30min, 显色步骤按博士德SABC试剂盒说明书进行。

### 1.3 BMSC中BDNF和NGF的RT-PCR检测

用Trizol提取第3代细胞mRNA, 具体方法参照试剂说明。

BDNF的引物序列是:

sense: 5'-TCCCTGGCTGACACTTTTGAG-3'

antisense: 5'-ATTGGGTAGTTCGGCATTGCG-3'

NGF的引物序列是:

sense: 5'-CTGGACTAACTTCAGCATTTC-3'

antisense: 5'-TGTTGTTAATGTTACCTCGC-3'

产物长度分别是466bp和395bp。

RT-PCR用QIAGEN OneStep RT-PCR Kit, 具体方法参照试剂说明, 逆转录步骤是50℃, 30min; 然后95℃, 15min。BDNF的PCR的步骤是: 94℃ 60s; 62℃ 90s, 共30个循环, 最后延伸7min。NGF的PCR步骤是: 95℃ 30s; 58℃ 60s; 72℃ 120s, 共30个循环, 最后延伸3min。

### 1.4 BDNF和NGF的ELISA检测

取第3代BMSC传代培养, 分别培养2d、4d、7d, 收集培养液, 离心收集上清。检测采用BDNF和NGF的ELISA试剂盒(Promega Emax Immunoassay Systems), 按说明逐步操作, 依照标准品浓度建立标准曲线, 在标准曲线范围内确定检测样本BDNF和NGF浓度。

### 1.5 新生大鼠脊髓神经元培养

取出生1d的新生SD大鼠, 无菌操作下分离出脊髓, 剥除脊膜及血管组织并剪碎, 置于0.125%胰蛋白酶溶液中37℃消化20min, 去除消化液, 加入含2%B27和10%FCS的DMEM/F12的培养液, 用火焰抛光的巴式管吹打, 过200目筛网制成细胞悬液, 以

$5 \times 10^5$ /ml的密度接种于涂有0.1mg/ml多聚赖氨酸的6孔培养板, 部分培养板中预置涂有0.1mg/ml多聚赖氨酸的盖玻片, 置37℃、5%二氧化碳和饱和湿度的培养箱中培养。24h后更换为含2%B27的DMEM/F12无血清培养液, 以后隔天半量换液。培养10d后取细胞爬片行NF免疫细胞化学染色计算神经元纯度。

### 1.6 BMSC条件培养液的制备

取第3代BMSC传代, 24h后弃去培养液, PBS洗涤3次, 换用含2%B27的DMEM/F12无血清培养液, 培养48h后取培养液, 10000g 4℃离心10min, 收集上清即为完全BMSC条件培养液, 分别加入等体积和3倍体积的DMEM/F12无血清培养液, 制成1/2和1/4 BMSC条件培养液

### 1.7 热休克诱导脊髓神经元凋亡

参考Okura的实验<sup>[3]</sup>。取培养10d的脊髓神经元, 弃去培养液, PBS洗涤3次, 实验组换用BMSC条件培养液。24h后, 实验组换用预温到42℃的完全、1/2和1/4 BMSC条件培养液, 对照组换用预温到42℃的含2%B27的DMEM/F12无血清培养液, 然后放入42℃的培养箱中。1h后取出, 实验组换用预温到37℃的BMSC条件培养液, 对照组换用预温到37℃的含2%B27的DMEM/F12无血清培养液, 37℃培养8h。

### 1.8 凋亡的流式细胞检测

取上述细胞, 0.25%胰酶消化收集, 用Annexin V/PI凋亡检测试剂盒(Bender Medsystems)按说明标记细胞, 流式细胞仪检测10000个细胞, 计算凋亡率, 比较各组间差异。

## 2 结果

### 2.1 BMSCs原代和传代培养

大鼠骨髓单个核细胞贴壁培养24h后, 可见少量圆形或者椭圆形细胞贴壁, 3d后贴壁细胞增多, 呈梭形, 放射状分布。7—12d细胞铺满约90%的培养瓶底部, 传代后2—12h细胞贴壁, 第2代以后细胞成分较为均一。

### 2.2 BMSCs的免疫组织化学染色鉴定

本实验细胞进行CD44、CD71和CD45免疫组织化学染色, 可见>90%的细胞胞膜和胞浆CD44和CD71染色阳性, 同时CD45染色阴性, 见图1—2(见前置彩色插页8)。

### 2.3 BMSC中BDNF和NGF的mRNA表达

BMSC的mRNA提取物进行RT-PCR后可见BDNF和NGF表达, 见图3(见前置彩色插页8)。

### 2.4 BDNF 和 NGF 的 ELISA 检测

BMSC 培养液中可以检测到 BDNF 和 NGF, NGF 表达高于 BDNF, 而且随培养时间延长培养液中 BDNF 和 NGF 含量增加, 见图 4。

### 2.5 新生大鼠脊髓神经元培养

脊髓神经细胞在培养 24h 后绝大多数细胞贴壁, 2d 后贴壁细胞长出突起, 培养 10d 后神经细胞胞体大且饱满, 神经突起增粗并进一步延长。NF 免疫细胞化学染色计算神经元纯度为 91%, 见图 5(见前置彩色插页 8)。

### 2.6 凋亡的流式细胞检测

各组凋亡的流式细胞仪检测结果见表 1 和图

6, 对照组未凋亡的正常细胞比实验组少, 凋亡细胞比实验组多, 而且 BMSC 条件培养液的含量增加时凋亡细胞减少, 说明 BMSC 条件培养液对脊髓神经元有保护作用, 而且有量效相关性。

图 4 BMSC 培养液中 BDNF 和 NGF 含量

a 完全 BMSC 条件培养液组热休克诱导后脊髓神经元凋亡的流式细胞检测  
 b 1/2BMSC 条件培养液组热休克诱导后脊髓神经元凋亡的流式细胞检测  
 c 1/4 BMSC 条件培养液组热休克诱导后脊髓神经元凋亡的流式细胞检测  
 d 对照组热休克诱导后脊髓神经元凋亡的流式细胞检测

图 6 各组凋亡的流式细胞仪检测结果

表 1 热休克诱导后各组细胞凋亡、死亡比率 (%)

	Annexin V -/PI-	Annexin V +/PI-	Annexin V +/PI+
完全 BMSC 条件培养液组	83.49	14.25	2.00
1/2 BMSC 条件培养液	79.63	17.84	2.15
1/4 BMSC 条件培养液	68.17	21.98	8.32
对照组	65.61	29.80	3.97

Annexin V -/PI- 是正常细胞, Annexin V +/PI- 是早期凋亡细胞, Annexin V +/PI+ 是晚期凋亡细胞

### 3 讨论

BMSC 是目前研究神经损伤的自体细胞移植的主要细胞来源之一, 由于自体细胞移植治疗神经损伤具有安全、没有免疫排斥反应等优点, 所以这方面的研究引起了高度关注。目前主要研究的有嗅鞘细胞、雪旺细胞和 BMSC, 其中 BMSC 取材最为方便、损伤最小而且体外扩增方便迅速、基因转染率较高。

近年来用 BMSC 移植治疗脑和脊髓损伤的实验取得了好的效果, 但是其机制尚不清楚。Hofstetter<sup>[4]</sup>和 Chopp<sup>[5]</sup>报道 BMSC 移植到损伤脊髓后, 促进脊髓损伤大鼠后肢的运动功能的恢复, BMSC 在脊髓中存活、迁移, 引导神经微丝和 5-羟色胺染色的神经纤维长入。该作者认为 BMSC 在体内环境诱导下向神经元或者神经胶质细胞横向分化, 发挥神经传导

或者支持作用, 但是目前很多人对这种观点表示怀疑。因为一方面虽然在体外实验中 BMSC 向神经样细胞诱导的比率较高, 但是诱导过程中有较多的 BMSC 的凋亡或者死亡, BMSC 也较难诱导成为成熟的具有分泌神经递质和电生理功能的神经细胞, 另一方面体内实验的诱导率远较体外实验的低, 依靠这些少量的不成熟的细胞恢复神经功能可能较小。

我们设想 BMSC 可能通过分泌神经营养因子保护脊髓中受损的神经组织来起治疗作用。因为 BMSC 本身是一种支持细胞, 能分泌多种生长因子, 能对多种组织起支持作用。Cheng 等<sup>[6]</sup>发现 BMSC 能作为胚胎干细胞的饲养层细胞, 支持胚胎干细胞的生长保持其未分化状态。Lou 等<sup>[7]</sup>报道 BMSC 可以引导神经干细胞向神经元方向分化, 促进分化的神经元的存活, 并且认为是 BMSC 的分泌物作用的结果。张帆等<sup>[8]</sup>报道 BMSC 的分泌物促进培养的脊髓神经元的贴壁、生长和突起延长。但是以上实验都没有明确指出 BMSC 的分泌物中何种成分对于神经元起作用。

多种神经营养因子对于神经元有支持和保护作用, 其中 BDNF 和 NGF 是两种重要的神经营养因子, 我们挑选这两种进行检测。实验表明 BMSC 可以表达 BDNF 和 NGF mRNA, 在 BMSC 分泌物中存在

活性的 BDNF 和 NGF,并且 BMSC 条件培养液能够对热休克诱导的脊髓神经元有保护作用,从而证实了我们的设想。

BDNF 和 NGF 可以从多方面对神经元起保护作用,Kishino 等<sup>[9]</sup>发现 BDNF 减少损伤后脊髓运动神经元的死亡,对受损神经元的胞体萎缩有保护作用,阻止神经递质相关酶类的减少,促进轴突长出。Novikova 等<sup>[10]</sup>发现 BDNF 阻止一氧化氮的合成,阻断 NMDA 依赖的神经退变途径,减少运动神经元的死亡,减少脊髓损伤后形成的空洞的体积。

本实验证实了 BMSC 表达 BDNF 和 NGF,对脊髓神经元有保护作用。

### 参考文献

- [1] 吴永超,郑启新,谢宗平.骨髓间充质干细胞表达神经营养因子及治疗脊髓损伤的研究[J].中华实验外科杂志,2005,22(2):139—141.
- [2] Park HC,Shim YS,Ha Y,et al. Treatment of complete spinal cord injury patients by autologous bone marrow cell transplantation and administration of granulocyte-macrophage colony stimulating factor[J]. Tissue Eng,2005,11(5-6):913—922.
- [3] Okura Y,Tanaka R,Ono K,et al. Analysis of neuronal death in the central nervous system using a new apoptosis model[J]. Neurosci Res,1996,26(3):279—288.
- [4] Hofstetter CP,Schwarz EJ,Hess D,et al. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2002,99(4):2199—2204.
- [5] Chopp M,Zhang XH,Li Y,et al. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation[J]. Neuro report,2000,11(13):3001—3005.
- [6] Cheng L,Hammond H,Ye Z ,et al. Human adult marrow cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells in culture[J]. Stem Cells,2003,21(2):131—142.
- [7] Lou S,Gu P,Chen F, et al. The effect of bone marrow stromal cells on neuronal differentiation of mesencephalic neural stem cells in Sprague-Dawley rats [J]. Brain Res,2003 ,968(1):114—121.
- [8] 张帆,洪光祥,王发斌,等. 骨髓基质细胞分泌物促进体外脊髓运动神经元的存活和生长 [J]. 中华手外科杂志,2001,17(4):237—239.
- [9] Kishino A,Ishige Y,Tatsuno T ,et al. BDNF prevents and reverses adult rat motor neuron degeneration and induces axonal outgrowth[J]. Exp Neurol,1997,144(2):273—286.
- [10] Novikova L,Novikov L,Kellerth JO. Brain-derived neurotrophic factor promotes axonal regeneration and long-term survival of adult rat spinal motoneurons in vivo [J]. Neuroscience,1997,79(3):765—774.

## 周士枋教授给本刊编辑部的一封信

编辑部同志:

最近我接到很多送审稿件,从总体看,来稿质量较过去有较大程度提高,尤其是研究生的论文。一般临床稿件也都注意了对照组的设置、观察指标的可比性,以及结果分析的合理性。但从中也发现一些问题。特提醒如下:

**1 对照组设置不能“随意”而应随机化:**随机化是指临床观察和试验中的受试者,有同等机会被分配到实验组或对照组中,而不受研究者、观察者或受试者主观意愿的影响,可以使各组各影响因素(包括已知和未知的因素)分布趋于平衡。随机化包括分组随机和试验顺序随机,当与“盲”法合用,有助于避免因处理分配的可预测性,以致在受试者的选择和分组时所导致的可能偏倚。所以随机不等同于随意,随机有一定规律可循而随意则仅凭主观愿望(含研究者和受试者双方)所决定。应以书面形式确定随机原则,受试者应严格按照规定顺序入组,不得随意变动,否则会破坏随机效果。样本数量应依从一定的规律,通常是两组或三组间样本数相等或呈比例关系,且其基本条件均衡。目前有不少论文其各组间数量不符合上述规律,所以不是严格意义上的随机。

在决定随机化的同时必须注意基本条件应大致相似,这里包括性别、年龄、疾病诊断、病程、病情等,特别对某些治疗中的特殊要求,如偏瘫的治疗,年龄应大体相近,由于老年人存在与年轻人不同的心态,同时老年人又可能伴有其他病变,这些均可影响功能的恢复。为此如将年轻人由于血管畸形所致偏瘫归于同组中,必然导致疗效上的差别。

**2 有关“双盲”的问题:**为了使疗效观察更具客观性,临床上多要求采用“双盲法”。“双盲法”是指临床治疗中应用某种治疗方法(通常指药物治疗)试验中的受试者、研究者、参与疗效和安全性评价的医务人员、监察人员及统计分析人员都不知道治疗分配程序,其目的是为了控制临床试验过程中和结果解释时产生的偏倚。这时用于不同治疗药物的形状和剂量在外观上应该相似,所以可以做到“双盲”。但对康复治疗来说,不同治疗方法是显而易见的,要求做到“双盲”是很难的,但应该使疗效评估时的医务人员处于“盲”的状态,即评估者不清楚某一病例是接受何种治疗方法,这种方法临床上亦被接受,并称之为“单盲”。为了使不同治疗方法所得的效果更具客观性,需大力提倡在康复医学中推行“单盲法”。

**3 治疗方法的可比性:**不同临床治疗方法可起到不同的治疗效果。例如一组在相似脊髓损伤患者未做任何外科介入与曾做外科手术合理矫治、减压、固定手术两组间康复治疗效果肯定不相同,在分组时即应注意。即使是同一种治疗方法,但具体的训练方法不同也可影响康复治疗效果。例如肌肉的等长收缩练习,大肌群与小肌群的等长收缩对人体的影响即不同;当与动力性肌收缩对人体影响相比较时,宜选择机体反应大小相近的两组观察。如常用的耐力训练法和等长收缩练习相比,一个是运动 10 分钟以上,一个是等长收缩练习仅数分钟,机体反应差别即可很大,如不注意这点而得出某一治疗效果优于其他治疗效果,或在某些治疗后副反应低于其他方法的结论则是不适合的。为了使这些条件具有可比性,这就需要做一些预试验。

**4 量表的应用:**所有量表必须经过效度与信度的检验,然后才可应用。如应用他人已发表的量表,也应查一下其原始的依据。通用量表或已反复使用过的量表另当别论。我这里强调的是如果是自己提出的量表则必须具有效度和信度的检验结果。

以上问题在审稿中较为常见,在这里提出的目的是供读者在做科研课题设计时参考。

(南京医科大学第一附属医院 周士枋)