

人脂肪组织来源的酪氨酸羟化酶、胆碱乙酰转移酶、谷氨酸脱羧酶的表达*

刘斌¹ 吴孟海¹ 张晋霞¹ 张强¹

摘要 目的:探讨人脂肪组织来源的基质细胞(ADSCs)分化为神经细胞的神经递质关键酶 TH、CHAT、GAD 的表达情况。**方法:**分离培养人 ADSCs,采用神经诱导培养基(NIM)进行诱导培养,倒置相差显微镜下连续观察细胞生长情况和形态变化,免疫组化法和免疫荧光技术检测神经递质多巴胺(DA)、乙酰胆碱(Ach)和 γ -氨基丁酸(GABA)合成过程中的关键酶——酪氨酸羟化酶(TH)、胆碱乙酰转移酶(CHAT)和谷氨酸脱羧酶(GAD)的表达情况。**结果:**①经 NIM 诱导后,ADSCs 可分化为神经细胞。诱导分化后,1h、5h 未见 TH、CHAT 和 GAD 阳性表达。1d、5d 出现 TH、CHAT 和 GAD 阳性表达。②免疫荧光单标结果:诱导后的细胞内有 TH、CHAT 和 GAD 表达。免疫荧光双标结果:GAD 与 TH、CHAT 与 TH 可同时表达于同一个诱导后的细胞内。**结论:**ADSCs 可分化为神经细胞,分化后的神经细胞具有合成神经递质 DA、Ach 和 GABA 的功能。

关键词 脂肪组织;基质细胞;神经细胞;酪氨酸羟化酶;胆碱乙酰转移酶;谷氨酸脱羧酶

中图分类号: R338,R49 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2007)-08-0691-02

The expression of tyrosine hydroxylase, choline acetyl transferase, glutamic acid decarboxylase of human adipose tissue-derived stromal cells into neural cells/LIU Bin, WU Menghai, ZHANG Jinxia, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(8):691—692

Abstract Objective: To investigate the expression of tyrosine hydroxylase (TH), choline acetyl transferase (CHAT), glutamic acid decarboxylase (GAD) of human adipose tissue-derived stromal cells (ADSCs) into neural cells. **Method:** ADSCs were isolated from human liposuction tissues and cultured in NIM, which was used to induce ADSCs into neural cells. Inverted phase contrast microscope was used to observe morphological changes of ADSC after induction. The expression of TH, CHAT and GAD were identified by immunocytochemistry and immunofluorescence. **Result:** ① ADSCs could differentiate into neural cells in NIM. The expression of TH, CHAT or GAD were undetectable in 1h or 5h after inducing and their expression could be detected on 1d and 5d after inducing. ② The differentiated cells could express TH, CHAT or GAD. TH and GAD or TH and CHAT could be detected in the same cells by immunofluorescence. **Conclusion:** ADSCs could differentiate into neural cells which have the function of composing DA, Ach and GABA.

Author's address Dept. of Neurology, the Affiliated Hospital of North China Coal Medical College, Tangshan, 063000

Key words adipose tissue; stromal cells; neural cells; tyrosine hydroxylase; choline acetyl transferase; glutamic acid decarboxylase

脂肪组织来源的基质细胞(adipose tissue-derived stromal cells, ADSCs)在体外合适的诱导条件下可分化为神经细胞^[1-3],但分化后的神经细胞属哪一类型,能否合成和分泌神经递质,能否向某一特定类型的神经细胞分化等尚不清楚。我们用神经诱导培养基(neural induction medium, NIM)诱导 ADSCs 向神经细胞分化,并用免疫组化法和免疫荧光技术检测诱导分化后的细胞神经递质多巴胺(dopamine, DA)、乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)和 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)合成过程中的关键酶——酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)、胆碱乙酰转移酶(choline acetyl transferase, CHAT)和谷氨酸脱羧酶(glutamic acid

decarboxylase, GAD)的表达情况,探讨诱导分化后的神经细胞是否具有合成神经递质的功能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂:高糖 DMEM 培养基(Sigma 美国), α -MEM 培养基(Gibco 美国),标准胎牛血清 FBS(天津血液病研究所),牛血清白蛋白(天津血液病研究所),兔抗人 TH 单克隆抗体(Sigma 美国),兔抗人

* 基金项目:河北省教育厅自然科学基金项目(Z2005101)

1 华北煤炭医学院附属医院神经内科,唐山, 063000

作者简介:刘斌,男,主任医师,教授,硕士生导师

收稿日期:2006-10-16

CHAT 多克隆抗体(武汉博士德生物公司), 兔抗人 GAD 多克隆抗体(武汉博士德生物公司)。

1.1.2 组织来源:脂肪组织取自一位健康 35 岁女性要求去除的腹部多余皮下脂肪, 供体无传染性疾病和内分泌疾病。

1.2 方法

1.2.1 ADSCs 的分离和培养: 无菌条件下将脂肪抽吸术获取的人体腹部皮下脂肪组织约 20ml 浸于含青、链霉素的 D-Hank's 液中, 于 1h 内送至实验室进行下一步实验。脂肪组织提取物的分离培养参照 Zuk PA¹⁴的方法进行, 常规细胞培养, 并换液传代。倒置相差显微镜下连续观察原代及传代后的细胞生长情况和形态变化, 照相记录。

1.2.2 ADSCs 的诱导和分化:将第四代的 ADSCs 采用胰酶消化, 传第五代细胞至已预先放入无菌盖玻片的 24 孔培养板中, 制备细胞爬片, 至细胞长成 80% 融合时, 去除培养液, 加入 NIM 诱导。对照组只加改良 Eagle's 培养液(α -MEM)。于诱导培养后 1h、5h、1d 和 5d 在相差显微镜下观察细胞生长情况和形态变化, 照相记录。

1.2.3 神经递质合成过程中关键酶的检测: 于诱导培养后 1h、5h、1d 和 5d, 用免疫组化法和免疫荧光法测定诱导分化后的神经细胞神经递质 DA、Ach 和 GABA 合成过程中的关键酶 TH、CHAT 和 GAD 的表达情况。

免疫组化法步骤: 取出培养孔中的盖玻片, PBS 冲洗 2 次, 每次数秒。4% 多聚甲醛固定细胞 30min 后, 倒掉固定液。PBS 冲洗 3 遍, 每次 3min。0.1% Triton-X-100 穿透 5min。PBS 冲洗 3 遍, 每次 3min。3% H₂O₂ 孵育 10min, 以消除内源性的过氧化物酶活性。PBS 冲洗 3 遍, 每次 3min。滴加封闭血清, 室温孵育 15min, 倾去, 勿洗。滴加适当比例稀释的一抗, 4℃ 过夜。PBS 冲洗 3 遍, 每次 3min。滴加生物素标记的二抗, 室温孵育 15min。PBS 冲洗 3 遍, 每次 3min。滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液, 室温孵育 15min。PBS 冲洗 3 遍, 每次 3min。DAB 显色 10min, 自来水终止反应, 并用自来水充分冲洗。苏木素复染 3min 后, 盐酸酒精分化数秒。梯度酒精(70%、80%、90%、100%) 脱水, 二甲苯透明, 中性树脂胶封片。显微镜下观察拍照。以上一抗分别为 1:1000 TH、1:150CHAT 和 1:200GAD。阴性对照采用 0.01MPBS 代替一抗。结果判定: 细胞胞浆中出现棕黄色颗粒为阳性, 胞浆未着色为阴性。

免疫荧光单标法步骤: 取出培养孔中的盖玻片, PBS 冲洗 2 次, 每次数秒。4% 多聚甲醛固定细胞

30min 后, 倒掉固定液。PBS 冲洗 3 遍, 每次 3min。0.1% Triton-X-100 穿透 5min。PBS 冲洗 3 遍, 每次 3min。3% H₂O₂ 孵育 10min, 以消除内源性的过氧化物酶活性。PBS 冲洗 3 遍, 每次 3min。滴加封闭血清, 室温孵育 15min, 倾去, 勿洗。滴加适当比例稀释的一抗, 4℃ 过夜。PBS 冲洗 3 遍, 每次 3min。滴加 PBS 适当比例稀释的间接荧光抗体, 湿盒内 37℃ 孵育 60min。PBS 冲洗 3 遍, 每次 3min。双蒸水洗 1min。50% 甘油缓冲液封片。荧光显微镜下观察并拍照。一抗为 TH、CHAT 和 GAD。荧光抗体为 FITC 标记山羊抗兔 IgG 和 TRITC 标记山羊抗小鼠 IgG, 荧光抗体均按 1:50 比例稀释, 荧光抗体稀释液为 0.1M PBS。

免疫荧光双标方法的步骤同免疫荧光单标方法。不同点为: 一抗为 TH 和 CHAT 的混合液, TH 和 GAD 的混合液。荧光抗体为 FITC 标记山羊抗兔 IgG 和 TRITC 标记山羊抗小鼠 IgG 的混合液, 混合后两者的终浓度均为 1:50, 荧光抗体稀释液为 0.1M PBS。

2 结果

2.1 原代和传代细胞生长情况和形态变化

原代细胞在刚接种时呈圆形, 悬浮状态, 4h 后少量细胞贴壁, 呈成纤维细胞形态, 大量细胞仍呈圆形, 24h 后大量细胞贴壁, 呈宽大扁平的成纤维细胞形态, 细胞核浆分界清楚, 多为单核, 核位于细胞中心。随着培养时间的延长, 大部分细胞呈集落生长, 并迅速增殖。集落大小不一, 含数十个至数百个细胞不等, 集落中的细胞呈梭形, 集落之间互相靠近, 1 周后达到 80% 融合, 呈漩涡状排列。

传代细胞初始呈圆形, 悬浮状态, 并很快贴壁, 贴壁细胞呈梭形、三角形或四边形, 3—4h 后所有成活细胞完全贴壁, 均匀分布, 与原代细胞相比, 细胞形态更为单一, 呈梭形, 且增殖速度明显加快, 出现多个漩涡状生长区, 4—5d 即长满瓶底。

2.2 诱导后细胞生长情况和形态变化

加入诱导培养基 1—3h 内, 细胞形态即发生显著变化。细胞体积缩小, 胞质以胞核为中心收缩并向两侧延长, 细胞体逐渐形成球形并形成突起, 立体感增强, 折光性增加。随着时间进展, 有神经细胞形态特点的细胞数逐渐增多, 形成双极或多极细胞, 细胞突起互相交织成网, 至第 5d 时 ADSCs 转化达到高峰, 细胞形态不再发生明显变化, 大部分细胞呈典型的神经元样形态。对照组细胞形态未见明显变化。

(下转 701 页)