

· 基础研究 ·

细胞共培养体系在观察骨髓间充质干细胞对损伤脊髓神经元生长存活影响中的应用

刘 然^{1,2} 范东艳³ 金 鹏⁴ 范洪学¹ 王 革^{4,5}

摘要

目的:建立细胞共培养体系,观察骨髓间充质干细胞(BMSCs)对正常及损伤的脊髓神经元的影响。

方法:选取新生 7d 的大鼠,无菌条件下分离骨髓间充质干细胞。选取新生 24h 的大鼠,无菌条件下分离脊髓背根神经节神经元,并制备机械损伤的模型细胞。用 Transwell 可渗透培养皿构建共培养体系,通过细胞形态学,免疫细胞化学方法进行细胞纯度鉴定,观察不同条件作用下神经元特异性烯醇化酶(NSE)阳性细胞的存活。

结果:共培养组神经元细胞 NSE 阳性率较相应对照组高。在 BMSCs 与神经元共培养到第 6 天,计数神经元的存活率,单纯神经元细胞培养组仅有 40% 的神经元存活,而共培养组神经元的存活率达到 65%。单纯损伤神经元细胞培养组仅有 26% 的神经元存活,共培养组神经元的存活达到 51%,细胞凋亡的数量较对照组明显低。

结论:BMSCs 可促进正常的脊髓神经元存活,对损伤的脊髓神经元有保护作用,并能诱导神经前体细胞分化为脊髓神经元。

关键词: 骨髓间充质干细胞;脊髓损伤;神经元

中图分类号:R651.2, R329.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2011)-02-0116-04

Effect of bone mesenchymal stem cells on survival of spinal cord neurons after injury using co-culture system/ LIU Ran, FAN Dongyan, JIN Peng, et al//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2011, 26(2): 116—119

Abstract

Objective: To explore the effect of bone mesenchymal stem cells (BMSCs) on spinal cord neurons survival and growth using co-culture system.

Method: The BMSCs were obtained from P7 rats and spinal cord neurons were obtained from post-born 24h of rats and afterward the neurons were injured by two edge sword stroke. Experiment set up a co-culture system using Transwell permeable supports. Identification and purification of cells were performed by cell morphology and immunocytochemistry assay, and the survival of neuron-specific enolase(NSE) positive cells were observed.

Result: In the group of co-cultured with BMSCs and normal spinal cord neurons, the positive rate of NSE was higher than neurons cultured alone. Only 40% of neurons were seen in cultured alone group, but 65% of neurons were observed in co-cultured group on the 6th d after cultured. In the group of co-cultured with BMSCs and injured spinal cord neurons, Only 26% of neurons were counted in cultured alone group, and 51% of neurons appeared in co-cultured group. Apoptosis of neurons decreased significantly in co-cultured compared with injured neurons cultured alone.

Conclusion: BMSCs could promote the survival of normal neurons, and protect against neural injury and induce neural differentiation.

Author's address Teaching and Research Section of Toxicology, College of Public Health, Jilin University, Changchun, 130021

Key word bone mesenchymal stem cells; spinal cord injury; neuron

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2011.02.006

1 吉林大学公共卫生学院,长春,130021; 2 长春市中心血站; 3 西藏大学医学院; 4 吉林大学第一医院; 5 通讯作者
作者简介:刘然,男,主治医师,博士研究生; 收稿日期:2010-09-30

神经元能否存活是脊髓损伤修复的关键因素。近年来,随着干细胞研究的蓬勃发展,细胞移植治疗为临床治疗脊髓损伤提供了新的途径。在众多的可选择细胞类型中,骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)由于具有取材容易、移植反应弱、可在宿主体内长期存活等特点成为细胞移植治疗的理想种子细胞。BMSCs是存在于骨髓基质内的非造血细胞来源的细胞亚群,可以在体外扩增培养,具有多向分化潜能,不仅可分化为3个胚层来源的组织细胞,如软骨细胞、脂肪细胞、肝细胞、神经元、神经胶质细胞等,同时还可以分泌神经营养因子促进神经元的修复。然而,BMSCs对脊髓损伤修复的机制并不清楚。鉴于BMSCs不仅能分泌多种神经营养因子,还能分化为神经元,我们在体外制备了脊髓神经元的损伤模型,通过观察BMSCs对正常及损伤的脊髓神经元生长存活的作用,进一步探索BMSCs保护及促进脊髓神经元修复的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

动物:Wistar大鼠(吉林大学医学院动物中心)。细胞培养试剂:DMEM/F12和胎牛血清(Gibco公司);胰蛋白酶(Gibco公司);多聚赖氨酸、B27、bFGF、MTT、DMSO和Hoechst(Sigma公司);细胞凋亡检测试剂盒(碧云天公司);兔抗鼠神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)、Alexa Flour555标记的山羊抗兔IgG(Molecular Probes公司);嵌套微孔底膜培养皿(Transwell Permeable Supports)(Gibco公司)。倒置相差显微镜和激光扫描共聚焦显微镜(Olympus公司)。

1.2 BMSCs分离、纯化、鉴定

选取新生7d大鼠,无菌条件下取出双侧股骨、胫骨、肱骨,两端剪开,用装有L-DMEM的无菌注射器冲洗骨髓入30ml离心管;1000转/min离心5min;将细胞团轻柔打散并以 1×10^6 个/ml细胞接种于完全培养液内,完全培养液为L-DMEM培养基+15%胎牛血清+100U/ml青霉素和100U/ml链霉素;将细胞培养于37℃ 5%CO₂饱和湿度培养箱内。

培养72h更换培养液,以后每3d换液1次。细

胞长到80%融合时用0.25%的胰酶消化传代,以 1×10^6 个/ml的密度接种于传代培养瓶中进行扩增培养。采用及时、反复传代对细胞进行纯化。

将第3代的BMSCs种植于PLL包被的盖玻片上,4%多聚甲醛室温固定30min;PBS洗3次,5min/次;加入5%封闭血清-0.3%Trito 100-PBS,37℃封闭30min;加一抗:鼠抗CD44(1:400)、CD105(1:50);阴性对照加入PBS,置湿盒内,4℃过夜;PBS洗3次,5min/次;Alexa Flour555标记的山羊抗鼠IgG(1:400)37℃孵育1h;PBS洗3次,5min/次;Hoechst复染细胞核,50%甘油封片,荧光显微镜下观察。

1.3 脊髓背根神经节神经元分离

采用禹晓东等^[1]的方法进行分离。取新生24h Wistar大鼠,无菌条件下剥离背部皮肤及软骨,暴露椎体外侧隐窝中圆形脊神经节,逐个摘除,置于预冷PBS内,剥除神经节表面筋膜,置于另一个盛有预冷PBS的平皿中,眼科剪将神经节剪至0.5mm³大小的碎块,并用预冷PBS冲洗3次,将组织块移入盛有0.25%胰蛋白酶的离心管中,37℃培养箱中消化20min,用含10%FBS的DMEM/F12培养基终止消化,吸管轻柔吹打数次,滤掉组织块,离心(1000转/min 10min),弃上清,以10%FBS的DMEM/F12培养基再次重悬,200目滤网过滤,计数细胞存活率为90%,调整细胞浓度为 1×10^6 /ml。

1.4 共培养体系建立

用嵌套微孔底膜培养皿构建共培养体系。取脊髓神经元接种在Transwell孔底部,第3代BMSCs接种在Transwell膜上。共培养体系为含2% B27(v/v)、bfgf(20ng/ml)的DMEM/F12培养液^[2]。

1.5 实验分组

BMSCs对正常脊髓神经元生长存活的影响,取共培养6d的细胞作为实验细胞,分为I组(对照组)、II组(共培养组)。BMSCs对损伤脊髓神经元生长存活的影响,将预先准备的一个划有纵、横平行细线的模板置于盛有已培养了的脊髓神经元的培养皿的下面。直视下用锋利的无菌双面刀片严格沿着模板的线条均匀用力地做成纵与横线的损伤径路^[3]。取损伤后培养6d的细胞作为实验细胞分为III组(对照组)、IV组(共培养组)。

1.6 免疫荧光染色

用 Hank's 溶液洗涤细胞 2 次, 加入 4% 的多聚甲醛溶液, 固定 30min。用 PBS 洗涤 3×5min, 加入 0.1% Triton X-100 处理 15min, 5% 山羊血清封闭 1h, 加入一抗(NSE, 1:100), 室温孵育 1h, 用 PBS 洗涤 3×15min, 加入 Alexa Fluor 555 标记的山羊抗小鼠 IgG 的二抗(1:400), 室温避光放置 1h, PBS 洗涤 3×15min, 轻轻摇动。弃掉洗涤液, 最后样品均再用 1mg/ml 的 Hoechst 33342 复染细胞核, 室温温育 5min。甘油封片后, 用 Fluvium 1000 激光扫描共聚焦显微镜观察。阴性对照实验中, 用 PBS 代替第一抗体来排除非特异性的二抗结合。共聚焦显微镜观察 PMT(电压值)为 650, C.A(针孔值)为 100, 采用单通道扫描, 检测波长分别为 405nm 和 563nm。阳性计数: ×400 荧光显微镜下, 随机选取 6 个区域用目镜网格测同尺计算阳性细胞率(%), 即阳性细胞数/网格范围内的细胞总数, 取平均值。

1.7 统计学分析

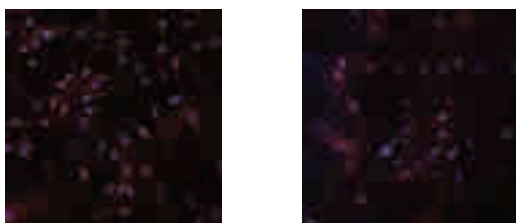
所有资料均采用 SPSS 13.0 软件包进行统计学分析。计量资料用均数±标准差表示。

2 结果

2.1 形态学观察

原代培养 BMSCs 接种后, 倒置显微镜下 24h 可见单个散在的贴壁细胞, 多呈椭圆形、少有胞浆突起, 48h 部分区域形成细胞团簇; 72h 细胞以长梭形为主, 进入快速增殖期, 大约 7d 左右融合成片。经特异性染色鉴定, 本实验分离、提取的 BMSCs 表达 CD44, CD105 干细胞标记。见图 1。

图 1 BMSCs 表型鉴定 (×400)



图中红色为表达的特异性荧光产物, 蓝色为标记的细胞核。

2.2 神经元细胞免疫化学染色

脊髓神经元细胞倒置显微镜下观察培养 24h 后, 可见大部分细胞已贴壁且呈现均匀分布, 胞体呈

圆形或椭圆形, 可见细胞突起。随培养时间延长, 神经元细胞突起增多形成网络。培养的第 3 天时镜下可见, 各共培养组神经元密度较相应对照组高, 与对照组比较, 突起更长、胞体更大、折光性更好、网络结构更致密。各组细胞染色大部分为 NSE 阳性, 染色细胞浆呈红色荧光。各共培养组神经元细胞 NSE 阳性率较相应对照组高。见图 2。

图 2 正常与损伤脊髓神经元和 BMSCs 共培养后神经元生长状态 (×400)



2.3 BMSCs 对背根神经结神经元存活的影响

在 BMSCs 与正常神经元共培养到第 6 天时, 计数神经元的存活率。结果显示, 单纯神经元细胞培养组仅有 40% 的神经元存活。共培养组神经元的存活率达到 65%。在 BMSCs 与损伤神经元共培养到第 6 天时, 计数神经元的存活率。结果显示, 单纯损伤神经元细胞培养组仅有 26% 的神经元存活, 共培养组神经元的存活达到 51%, 细胞凋亡的数量较对照组明显低($P < 0.05$)。

3 讨论

分层渗透培养(Transwell)是指分层渗透培养中两种细胞在同一个培养皿中共培养, 但由一层多孔膜相隔, 使得两种细胞间只存在弥散因子的移动交换, 而没有直接接触。适合于研究细胞微环境对细胞存活、分化的影响。Li 等采用 BMSCs 与心肌细胞共培养体系, 观察心肌细胞对 BMSCs 的影响, 发现心肌微环境可以促进 BMSCs 分化成心肌细胞^[4]。此外, BMSCs 可能分泌某些因子, 提高共培养细胞的存活率。Cheng 等发现 BMSCs 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^[5]。

实验中体外培养的脊髓神经元的形式特征与文献报道一致。当 BMSCs 与脊髓神经元共培养后, 神经元的生长明显增快、胞体增大、伸出伪足神经元的

数目更多、网络结构更致密、神经元活性增加。据此推断,BMSCs可能通过分泌一种或几种因子去结合其在神经元的膜受体或者胞内受体来达到促进神经元生长的作用。

神经营养因子是神经元存活和发挥功能的基础,在体内脊髓神经元的存活不仅需要从血液中摄取营养物质,而且需要多种神经营养因子的支持,这些因子可来自神经细胞本身,也可来自外周细胞。当神经元受损处于凋亡前状态,若给予积极的干预措施,有望逆转或减缓神经元的变性坏死。文献报道,BMSCs的培养上清液中含有BDNF、NGF、GDNF等营养因子,在某些特定的环境这些因子释放量还会增加^[6-8]。本实验研究了BMSCs对损伤脊髓神经元存活的影响,发现BMSCs对损伤的脊髓神经元具有保护作用,神经元的存活率达到51%,与对照组相比差异有显著性意义。推测这可能是由于BMSCs不仅对脊髓神经元具有营养、支持、保护的作用,而且还可能促进了神经前体细胞向神经元分化。实验中分离提取的神经元取材于椎体外侧隐窝中的脊神经节,这个区域除了含有大量的脊髓神经元外还有许多神经前体细胞,这些前体细胞具有分化潜能,在BMSCs的作用下,分化成脊髓神经元,Bonner等最近的研究结果证实了这个推测^[9]。

目前对BMSCs的研究仍是神经科学的热点,移植治疗脊髓损伤的动物实验取得了良好的进展^[10-11],但其修复机制尚不清楚。我们的研究表明BMSCs不仅可明显促进脊髓神经元的生长,而且还保护、修复受损的脊髓神经元,从而为BMSCs移植治疗脊髓损伤提供了一定的实验依据。

参考文献

- [1] 禹晓东,罗卓荆,张琳.嗅鞘细胞对培养脊髓神经元生长状态的影响[J].中华神经外科疾病研究杂志,2006,5(1):40—44.
- [2] 李鹤飞,王春芳.骨髓基质细胞对共培养条件下的脊髓源性神经干细胞分化为胆碱能神经元的诱导[J].解剖学杂志,2006,29(6):744—746.
- [3] 阙海萍,陈秉耀,刘少君.体外培养大鼠胚胎脊髓神经元前后的凋亡变化[J].解放军医学杂志,2006,31:54—56.
- [4] Li XH, Yu XY, Lin QX, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into functional cardiac phenotypes by cardiac microenvironment [J]. J Mol Cell Cardiol, 2006, 54(8): 3254—3266.
- [5] 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.
- [6] Garcia R, Aguiar J, Alberti E, et al. Bone marrow stromal cells produce nerve growth factor and glial cell line-derived neurotrophic factors [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 316(3):753—754.
- [7] 丁永忠,李强,张建生.鼠骨髓间充质干细胞对体外培养乳鼠脊髓神经元影响的研究[J].兰州大学学报(医学版),2006,32(1):54—57.
- [8] 范东艳,王萃,杜波.小胶质细胞活化刺激骨髓间充质干细胞释放胶质细胞源性神经营养因子保护多巴胺能神经元的实验[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(6):979—984.
- [9] Bonner JF, Blesch A, Neuhuber B, et al. Promoting directional axon growth from neural progenitors grafted into the injured spinal cord[J]. J Neurosci Res, 2010, 88(6):1182—1192.
- [10] Ide C, Nakai Y, Nakano N, et al. Bone marrow stromal cell transplantation for treatment of sub-acute spinal cord injury in the rat[J]. Brain Res, 2010, 1332:32—47.
- [11] 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.