

体外诱导人骨髓间充质干细胞向多巴胺神经元分化的研究 Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Differentiated into Dopaminergic Neurons *in vitro*

柴立辉¹, 吴素霞², 鄢文海³, 马远方^{1,*}

CHAI Li-Hui¹, WU Su-Xia², YAN Wen-Hai³ and MA Yuan-Fang^{1,*}

1 河南大学细胞与分子免疫学实验室 河南大学免疫学研究所, 开封 475004

2 河南大学神经生物学研究所, 开封 475004

3 郑州大学干细胞研究中心, 郑州 450052

1 Laboratory for Cell and Molecular Immunology of Henan University. Institute for Immunology of Henan University, Kaifeng 475004, China

2 Institute for Neurobiology of Henan University, Kaifeng 475004, China

3 Institution for Stem Cell of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

摘 要 通过体外诱导人骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)向多巴胺(dopamine, DA)神经元分化, 探讨人 BMSCs 来源的 DA 神经元的功能特征及其分化机制, 为临床上细胞移植替代治疗诸如帕金森氏病(parkinson's disease, PD)等神经精神性疾病提供一种理想的细胞来源。通过密度梯度离心获取人骨髓中的单个核细胞, 贴壁培养纯化 BMSCs。50 μ mol/L 脑源性神经营养因子(brain derived neurotroph factor, BDNF), 10 μ mol/L forskolin(FSK)和 10 μ mol/L DA 联合对 BMSCs 进行诱导。电子显微镜观察诱导 2 周后细胞是否具有神经元的超微结构特点, 免疫细胞化学染色和 RT-PCR 检测 DA 神经元分化过程中的标志物酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)的表达以及转录因子 Nurr1、Ptx3 和 Lmx1b 的表达, 高效液相色谱(high performance liquid chromatogram, HPLC)检测诱导 2 周后的细胞多巴胺的释放水平。结果表明, 诱导 2 周后, 电镜下细胞胞浆中有大量密集的呈扁平囊状的粗面内质网及其间的一些游离核糖体以及神经微丝的形成。RT-PCR 结果显示 NSE(neuron specific enolase), Nurr1、Ptx3、Lmx1b 和 TH 的 mRNA 均有表达, 免疫细胞化学染色结果表明诱导 2 周后 TH 阳性细胞(24.80 \pm 3.36)%的表达较诱导 3d 后(3.77 \pm 1.77)%明显提高($P < 0.01$); HPLC 检测到诱导 2 周后的细胞 DA 释放水平(1.22 \pm 0.36) μ g/mL ($n = 6$)高于未经诱导的细胞(0.75 \pm 0.22) μ g/mL ($n = 6$)($t = -2.79$, $P = 0.038$)。由此得出, BDNF、FSK 和 DA 可以在体外诱导人 BMSCs 向 DA 神经元分化, 并具有 DA 神经元的功能特征, 是临床用于治疗神经精神性疾病的理想细胞来源。

关键词 骨髓间充质干细胞, 分化, 多巴胺神经元, 脑源性神经营养因子, 高效液相色谱

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)02-0252-05

Abstract Midbrain dopamine (DA) neurons play an essential role in modulating motor control. Defects in central DA neurons affect a wide range of neurological disorders including Parkinson's disease (PD). The greatest motivation in the field has been the potential use of DA neurons for cell transplantation therapy in Parkinsonian patients. Recent studies indicated that BMSCs could differentiate into DA neurons *in vitro* as neural stem cells (NSC) and embryonic stem cells (ESC) could. However, there are no direct evidences about functional DA neurons derived from BMSCs. According to the protocols which had been applicated in inducing neuronal stem cells and embryonic stem cells differentiate into DA neurons *in vitro*, the present study provides a protocol by using 50 μ mol/L brain derived neurotroph factor (BDNF), 10 μ mol/L forskolin (FSK) and 10 μ mol/L dopamine

Received: September 28, 2006; Accepted: December 5, 2006.

This work was supported by the grant from the key Science and Technologies Program of Henan Province (No. 0224630174).

* Corresponding author. Tel: + 86-378-3880398, E-mail: mayf@henu.edu.cn

河南省重点科技攻关基金资助项目 (No. 0224630174)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

(DA) to induce BMSCs differentiate into DA neurons. After 2 weeks of differentiation, the cells expressed the character of neurons in ultrastructure. RT-PCR discovered mRNA of NSE(neuron specific enolase), *Nurr1*, *Ptx3*, *Lmx1b* and Tyrosine hydroxylase (TH) were positive. Immunocytochemistry staining indicated the ratio of TH-positive neural cells was significantly increased after induced 2 weeks(24.80 ± 3.36)% compared to that of induction of 3 days(3.77 ± 1.77)%. And the DA release was also different between differentiated and undifferentiated cells detected by high performance liquid chromatography(HPLC). That is to say BDNF and FSK and DA can induce BMSCs differentiate into DA neurons in vitro, and the transdifferentiated cells express mature neurons characters. BMSCs might be a suitable and available source for the in vitro derivation of DA neurons and cell transplantation therapy in some central neural system diseases such as PD.

Key words bone marrow mesenchymal stem cells, differentiation, DA neurons, brain derived neurotroph factor, high performance liquid chromatogram

多巴胺(dopamine, DA)神经元是脑内重要的儿茶酚胺类运动神经元,其细胞的损伤和功能的退化和许多神经精神性疾病有关,如帕金森氏病(parkinson's disease, PD)、精神分裂症和 Tourette's 病等,而这些疾病目前临床上尚缺乏有效的治疗方法。干细胞的发现以及干细胞体外诱导分化为神经细胞的成功使得进行细胞移植替代治疗该类疾病成为可能^[1]。BMSCs 是存在于骨髓中的非造血干细胞,在体外一定条件下可向神经细胞进行分化^[2,3],甚至表达 DA 神经元的标志^[4],且具有来源丰富、取材简便、容易分离纯化和扩增,又可以进行自体移植等特点。所以,研究人 BMSCs 定向分化为 DA 神经元及分化后细胞的功能特征对细胞移植替代治疗包括 PD 在内的神经精神性疾病具有重要的临床意义。

1 材料和方法

1.1 人 BMSCs 的分离培养

髂前上嵴穿刺取正常成人骨髓(19~64岁,男性9例,女性6例,取自郑州大学第一附属医院)5~10mL,肝素抗凝。用 PBS 1:1 稀释,小心叠加于等量淋巴细胞分离液(TBD, LTS1077)上层。900×g 室温离心 25min,小心吸取单个核细胞层, PBS 洗 2 遍(500×g 室温离心 10min)。细胞重悬于含 10% 胎牛血清(Gibco) 100u/mL 青霉素、100u/mL 链霉素的 DMEM-1I(Sigma, D5523)培养基中。以 $5 \times 10^6 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/mL 的密度接种于 T25 培养瓶中(4mL/瓶),置于 37℃ 5% CO₂ 完全湿度条件下进行培养。3d 后进行首次全量换液去除未贴壁细胞,以后每隔 5 天换液 1 次,待细胞达到覆盖 80%~90% 培养底面后用 0.25% 胰蛋白酶(Trypsin 1:250, Biosharp 0458)和 0.02% EDTA(Sigma, ED25G) 1:1 混合的消化液按 1:3 进行消化传代。

1.2 BMSCs 的诱导分化

将传至第 4 代的 BMSCs 先用含有 10ng/mL bFGF 和 10ng/mL EGF 的 DMEM-L 培养基培养 1 周后,更换含有 50μmol/L BDNF(Sigma, B3795) 10μmol/L FSK(Sigma, F3917)和 10μmol/L DA(Sigma, H8502)的 DMEM-L 诱导培养基继续培养^[5],以后每隔 3 天半量换液 1 次,观察记录细胞变化,持续培养 2 周。

1.3 电子显微镜观察分化后细胞的超微结构

消化收集诱导 2 周后的细胞, PBS 洗 2 遍, 1000r/min 4℃ 离心 10min 形成细胞团块,弃去上清,加入预冷的 2.5% 戊二醛置 4℃ 固定 4h 后小心游离细胞团块,用 4℃ 预冷的 PBS 漂洗 3 次,每次 10min;再用 1% 四氧化锇 4℃ 固定 30min, PBS 漂洗 3 次;系列丙酮脱水,包埋,切片,染色,透射电子显微镜观察细胞的超微结构。

1.4 免疫细胞化学

将传至 3 代的 BMSCs 消化后按 $3 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$ 个细胞/孔的密度重新接种于 6 孔培养板中,培养板中预先放置包被有 0.05% 多聚赖氨酸的盖玻片,分别在诱导培养前、诱导培养后 3 天和诱导培养后 2 周取出盖玻片,采用免疫组织化学试剂盒(中杉金桥, SP-9002)进行免疫细胞化学染色: PBS 洗 3 遍以除去残留培养基, 4% 多聚甲醛室温固定 15min 后用 0.3% Triton-X 100 透化处理 10min, 3% H₂O₂ 室温作用 10min 以去除内源性过氧化物酶,正常山羊血清室温封闭 15min,分别滴加 50μL 单克隆抗体 TH(Sigma, T2928, 1:3000)和 NSE(中杉金桥, ZM-0203, 1:100),置湿盒 4℃ 孵育过夜,第 2 天参考试剂盒说明书完成剩余步骤。DAB(中杉金桥, ZLI-9018)显色,梯度酒精脱水;二甲苯透明;中性树胶封片。随机选取 10 个视野计数阳性细胞数。

1.5 RT-PCR

0.25%胰蛋白酶消化收集一定数量的细胞，RNA 抽提试剂盒(Sangon , SK1321)提取细胞总 RNA Oligo 引物(Sangon , SK2027)随机合成 cDNA。采用 NSE、Nurr1、Ptx3、Lmx1b 和 TH 的特异性引物扩

增目的片段， β -Actin 作为内参照(表 1)。反应条件为 94℃ 预变性 2min ,94℃ 变性 50s ,NSE、Nurr1、TH 在 60℃ 退火 50s , Ptx3、Lmx1b 在 55℃ 退火 50s ,然后 72℃ 延伸 1min ,共 35 个循环 ,最后 72℃ 延伸 10min ,扩增产物进行 1.8% 琼脂糖凝胶电泳。

表 1 RT-PCR 扩增所需引物及其序列
Tab. 1 Primer sequences for reverse transcription-polymerase chain reaction

Gene name	Primer sequence	Product size
NSE	Forward 5'-CATCGACAAGGCTGGCTACACG-3'	329bp
	Reverse 5'-GACAGTTGCAGGCCCTTTCTTC-3'	
Nurr1	Forward 5'-GAACTGCACCTTGGCAGAGTTG-3'	141bp
	Reverse 5'-GGTGGACAGTGTCTAATTC-3'	
Ptx3	Forward 5'-CATCCAGTGAGACCAATGAG-3'	287bp
	Reverse 5'-GTAGCCGCCAGTTCACCATTC-3'	
Lmx1b	Forward 5'-AACTGTACTGCAAAACAAGACTACC-3'	293bp
	Reverse 5'-TTCATGTCCCATCTTCATCCTC-3'	
TH	Forward 5'-AGAGCTGGACAAGTGTTCATCACC-3'	543bp
	Reverse 5'-AATGTCTCTGCCGAGAACTGCG-3'	
β -Actin	Forward 5'-GCACTCTTCCAGCCTTCCTTCC-3'	515bp
	Reverse 5'-TCACCTTCACCGTTCAGTTTTT-3'	

1.6 高效液相色谱偶联电化学检测法(HPLC-ECD)测定 DA

参照 Studer 等的方法^[6],采用钾离子刺激诱导分化 2 周后的细胞和同步培养未经诱导的 BMSCs 以促进细胞释放 DA ,使用 HPLC-ECD 测定上清中 DA 的含量。色谱柱为 C18 (5 μ m ,250 \times 4.6mm ,supelco) ,工作电极为 Au 电极 ,参比电极为 Ag/AgCl 电极 ,流动相为 20mmol/L NH₄H₂PO₄/MeOH = 9:1(V/ V ,pH = 4.5) ;进样 25 μ L ,设定流速 1.0mL/min ,ECD 电压 0.75V ,根据对不同浓度梯度标准品(DA ,H8502 sigma)的测定绘制标准曲线。

1.7 统计学方法

采用两样本 *t* 检验 ,用 SPSS11.5 软件进行数据分析 ,当 *P* < 0.05 时视差异有显著性。

2 结果

2.1 BMSCs 的增殖分化

骨髓单个核细胞中的贴壁细胞在培养初期增殖缓慢 ,呈长梭形或多角形 ,培养 2 ~ 3 周后细胞开始增殖迅速 ,呈极性排列 ,并逐渐融合形成漩涡状(图 1A)。加入诱导培养基 12h 后 ,部分细胞的形态就已经发生了明显变化 ,如胞体变圆 ,折光性增强 ,伸出长的突起^[3]等。

2.2 诱导分化后神经元样细胞的超微结构

透射电镜下观察发现诱导分化后的神经元样细

胞胞核体积较大 ,常染色质丰富 ,异染色质少 ;具有电镜下尼氏体(Nissl body)的特殊结构 :大量密集的呈扁平囊状的粗面内质网及其间的一些多聚核糖体和单个核糖体 ,并观察到有神经微丝的形成(图 2)。

2.3 DA 神经元的鉴定

2.3.1 免疫细胞化学 :免疫细胞化学结果显示 ,BMSCs 在诱导 3d 和 2 周后均出现 NSE 和 TH 表达阳性细胞(图 1B) ,TH 阳性率在诱导 3d 和诱导 2 周后分别为(3.77 \pm 1.77)% 和(24.80 \pm 3.36)% ,诱导不同时间以后 TH 阳性细胞的表达有统计学差异(*P* < 0.01)。

2.3.2 RT-PCR :电泳结果显示 BMSCs 诱导 2 周后 ,有成熟神经元的标志 NSE 及 DA 神经元的标志 TH 的表达 ,以及转录因子 Ptx3 ,Lmx1b ,Nurr1 等的表达(图 3)。

2.3.3 HPLC-ECD 测定诱导分化后 DA 的水平 :HPLC-ECD 测定 K⁺ 刺激细胞后 DA 的释放水平 ,采用配对数据的 *t* 检验对结果进行分析 ,结果显示诱导后细胞分泌 DA 的浓度为[(1.22 \pm 0.36) μ g/mL (*n* = 6)] ,未经诱导的细胞其 DA 浓度为[(0.75 \pm 0.22) μ g/mL (*n* = 6)] (图 4)。诱导后细胞分泌 DA 的水平高于未经诱导的细胞 ,其差异有统计学意义

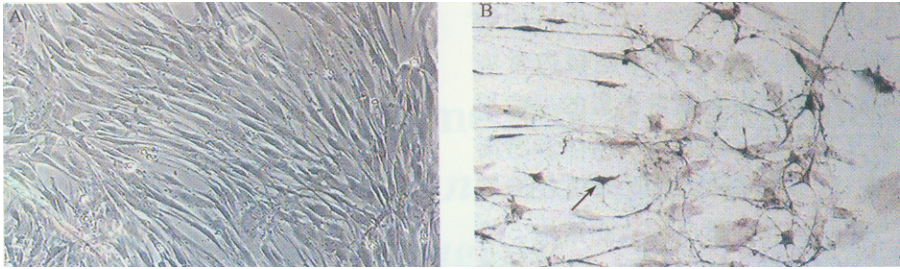


图 1 BMSCs 的形态及免疫细胞化学染色

Fig. 1 BMSCs morphology and immunocytochemical staining

A human BMSCs are fibroblast-like cells ,had covered about 90% of culture flat after 10 days(40 ×); B :immunocytochemical staining to show TH-positive immunoreactivity in inducing culture from BMSCs that had been induced for 2 weeks as described in tex(DAB , 40 ×).

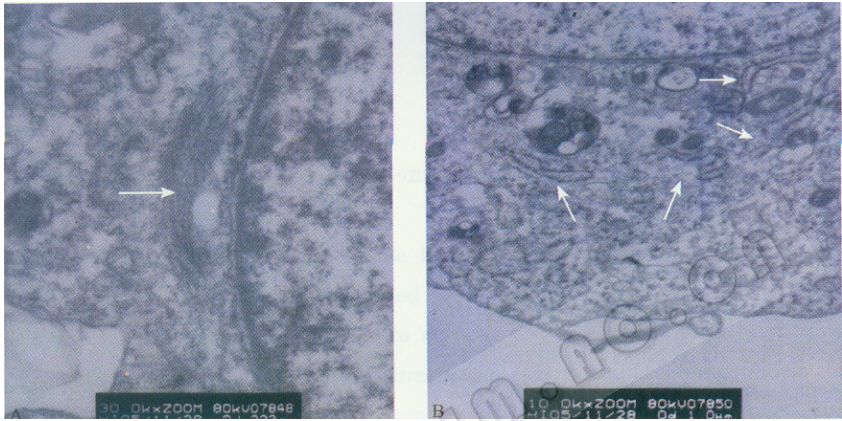


图 2 神经元样细胞的超微结构

Fig. 2 Ultrastructural and functional characterization of BMSCs-derived DA neurons

A :neurofilament(NF) arrow)has emerged in cytoplasm of neuron-like cells from BMSCs that had been induced for 2 weeks(30000 ×); B :Nissl body has formed in cytoplasm of neuron-like cells , Nissl body is composed of many rough endoplasmic reticula(RER) and free ribosomes(Ri) in electron microscop(10000 ×).

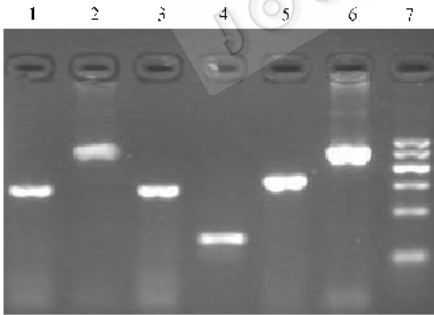


图 3 RT-PCR 扩增产物的电泳结果

Fig. 3 RT-PCR Analysis of markers of DA neurons

Expressing of neuronal marker NSE and the key factors during development of DA neurons in BMSCs-derived neurons after induced 2 weeks. 1 :Lmx1b(293bp); 2 :TH(543bp); 3 :Pt3(287bp); 4 :Nurr1 (141bp); 5 :NSE(329bp); 6 :β-actin(515bp); 7 :100bp ~ 600bp DNA marker .

3 讨论

许多文献已经证实了在体外一定条件下胚胎干细胞(embryonic stem cells , ESC)和神经干细胞(neural stem cells , NSC)可以向 DA 神经元分化 ,并表达 DA 神经元的标志和功能特征^[7-9] ,也有研究表明

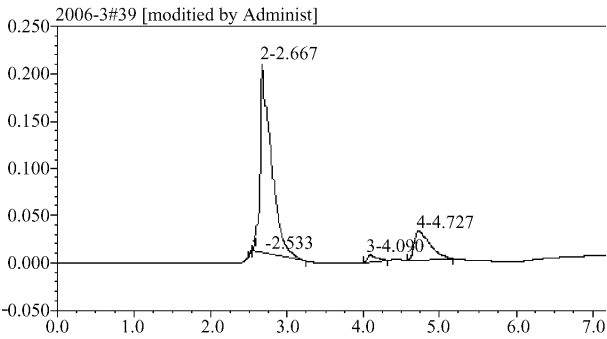


图 4 HPLC-ECD 结果图

Fig. 4 HPLC-ECD chromatogram

Representative HPLC couple ECD chromatogram showing high levels of DA in the medium of BMSCs-derived neurons after 30 min of KCl-evoked. Elution time of 4.7 min for DA .

人 BMSCs 来源的神经细胞同样表达 DA 神经元的标志 TH^[4] ,但目前尚缺乏对人 BMSCs 来源的 DA 神经元功能特征的研究。本研究采用 Riaz 等^[5]的方法在体外使用 BDNF ,FSK 和 DA 联合诱导人 BMSCs 2 周 ,成功诱导接近 1/4 的细胞表现为 TH 染色阳性细胞 ,并通过 HPLC-ECD 检测到 DA 的释放 ;同时本研究还首次使用透射电镜对人 BMSCs 来源的神经

细胞的超微结构进行了观察,结果显示分化后的细胞已经具有成熟神经元的超微结构:细胞核内常染色质丰富,异染色质少,胞浆中有大量密集的呈扁平囊状的粗面内质网及其间的一些多聚核糖体和游离核糖体,细胞质中充满细胞器。这说明分化后细胞已经具有了合成神经元特异性蛋白的功能结构。提示人 BMSCs 来源的神经细胞已经具有 DA 神经元的功能特征,这为临床上细胞移植替代治疗 PD 等神经精神性疾病提供了一种理想的细胞来源。

在中脑 DA 神经元分化发育过程中有两个级联信号通路,一个是 Lmx1b-Ptx3,另一个是 Nurr1。Lmx1b-Ptx3 对 DA 神经元的表型发育起关键作用,Ptx3 在小鼠胚胎 11.5d 时即特异性的表达于中脑 DA 神经元,主要功能是增加 TH 基因启动子的活性^[10]。在 PD 患者,Ptx3 阳性神经元数目减少,同样在 6-OH DA 大鼠 PD 模型中 Ptx3 阳性细胞缺失^[11]。Nurr1 对于中脑 DA 神经元前体细胞最终分化为成熟 DA 神经元有决定性作用,是神经前体细胞中内源性 TH 表达的转录增强子的激动剂,它能结合到 TH 基因转录增强子的一个反应元件上,从而激活 TH 基因的表达,在中脑神经元形成 DA 能神经递质的过程中起重要作用^[12]。本研究中 RT-PCR 结果显示这些因子的表达说明 BMSCs 的确已经向 DA 神经元分化。

许多细胞因子和化学诱导剂可以在体外诱导干细胞分化为 DA 神经元^[5,7,9],但其作用机制目前并不十分清楚。实验表明 EGF 和 bFGF 可以促进 BMSCs 向神经细胞分化并促进神经干细胞的扩增^[3],bFGF 还可以调节中脑 DA 神经元的发育和分化^[13]。BDNF 属于神经营养因子家族,通过和相应的受体结合启动胞内的某些信号转导通路从而促进 DA 神经元的分化和存活。FSK 可以提高胞内 cAMP 水平从而促进 BMSCs 向神经元分化^[14],并对 DA 神经元有保护作用^[15]。本研究通过用含 EGF 和 bFGF 的培养基先对人 BMSCs 进行诱导扩增 1 周,促进其向神经细胞分化,再使用 BDNF、FSK 和 DA 联合诱导 2 周来诱导其向 DA 神经元进行定向分化,成功获得了 TH 染色阳性细胞并检测到其功能特征。

虽然本研究在体外获得了人 BMSCs 来源的功能性 DA 神经元,但是还有必要寻求更好的方法来提高 DA 神经元的产生,而随后的动物试验对人 BMSCs 来源的 DA 神经元移植后的功能以及安全性进行研究也是非常重要的。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Perrier AL, Studer L. Making and repairing the mammalian brain: *in vitro* production of dopaminergic neurons. *Semin Cell Dev Biol*, 2003, **14**: 181–189.
- [2] Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, et al. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*, 2000, **290**: 1775–1779.
- [3] Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *Journal of Neuroscience Res*, 2000, **61**: 364–370.
- [4] Long X, Olszewski M, Huang W, et al. Neural cell differentiation *in vitro* from adult human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 2005, **14**(1): 65–69.
- [5] Riaz SS, Jauniaux E, Sterna GM, et al. The controlled conversion of human neural progenitor cells derived from foetal ventral mesencephalon into dopaminergic neurons *in vitro*. *Developmental Brain Research*, 2002, **136**: 27–34.
- [6] Studer L, Psylla M, Buehler B, et al. Non-invasive dopamine determination by reversed phase HPLC in the medium of free-floating roller tube cultures of rat fetal ventral mesencephalon: A tool to assess dopaminergic tissue prior to grafting. *Brain Res Bull*, 1996, **41**(3): 143–150.
- [7] Yan J, Studer L, McKay RDG. Ascorbic acid increases the yield of dopaminergic neurons derived from basic fibroblast growth factor expanded mesencephalic precursors. *Journal of Neurochemistry*, 2001, **76**: 307–311.
- [8] Zeng X, Cai J, Chen J, et al. Dopaminergic differentiation of human embryonic stem cells. *Stem cell*, 2004, **22**: 925–940.
- [9] Park S, Lee KS, Lee YJ, et al. Generation of dopaminergic neurons *in vitro* from human embryonic stem cells treated with neurotrophic factors. *Neurosci Lett*, 2004, **359**: 99–103.
- [10] Smidt MP, Asbreuk CH, Cox JJ, et al. A second independent pathway for development of mesencephalic dopaminergic neurons requires Lmx1b. *Nat Neurosci*, 2003, **3**: 337–341.
- [11] Smidt MP, van Schaick HS, Lancot C, et al. A homeodomain gene Ptx3 has highly restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 13305–13310.
- [12] Sakurada K, Ohshima-Sakurada M, Palmer TD, et al. Nurr1, an orphan nuclear receptor, is a transcriptional activator of endogenous tyrosine hydroxylase in neural progenitor cells derived from the adult brain. *Development*, 1999, **126**(18): 4017–4026.
- [13] Bouvier MM, Mytilineou C. Basic fibroblast growth factor increase division and delays differentiation of dopamine precursors *in vitro*. *Neurosci*, 1995, **15**: 7141–7149.
- [14] Deng W, Obrocka M, Fischer I, et al. In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **282**(1): 148–152.
- [15] Hulley P, Hartikka J, Lubbert H. Cyclic AMP promotes the survival of dopaminergic neurons *in vitro* and protects them from the toxic effects of MPP⁺. *Neural Transm Suppl*, 1995, **46**: 217–228.