

大鼠骨髓间充质干细胞分化的神经细胞在体外对 C6 胶质瘤细胞的趋向性

钟俊¹ 刘卫平^{1*} 龙乾发¹ 刘阳² 王孝安¹ 韩蕊³

1 第四军医大学西京医院神经外科, 陕西 西安 710032

2 绵阳市第三人民医院神经外科, 四川 绵阳 621000

3 武警陕西总队医院眼科, 陕西 西安 710054

摘要:目的 研究大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)诱导分化后的神经细胞在体外对 C6 胶质瘤细胞的趋向性。方法 首先采用梯度离心分离 BMSCs, 在条件培养基中添加合适诱导因子诱导 BMSCs 分化为神经细胞, 分化后的细胞进行免疫荧光细胞化学分析与 C6 胶质瘤细胞采用 Transwell 培养板共培养, 最后对迁移的细胞做统计学分析。结果 BMSC 成功诱导分化为神经细胞 Nestin (24.3 ± 5.2) %、NSE (33.6 ± 3.8) % 和 NeuN (41.9 ± 4.7) %, 共培养实验显示实验组迁移细胞明显多于对照组迁移细胞 ($p < 0.05$)。结论 大鼠骨髓间充质干细胞分化后的神经细胞在体外对 C6 胶质瘤细胞具有明显趋向性。

关键词:骨髓间充质干细胞; 神经细胞; C6 胶质瘤细胞

The rat bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into neural cells and it's tropism towards C6 glioma cells in vitro

ZHONG Jun¹, LIU Wei-Ping^{1*}, LONG Qian-Fa¹, LIU Yang², WANG Xiao-An¹, Han Rui³ 1 Department of Neurosurgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China. 2. Department of Neurosurgery, Third Hospital of Mianyang, Mianyang 621000, China. 3. Department of Ophthalmology, Shanxi People's Armed Police Corps Hospital, Xi'an 710054, China

Abstract: Objective To study the tropism of rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) differentiated into neural cells towards C6 glioma cells in vitro. **Methods** Firstly BMSCs were induced to differentiated into neural cells through adding the appropriate inducing factors into condition medium (such as 2% B27, 20ng/ml bFGF, 20ng/ml EGF and so on), and then the neurally differentiated BMSCs and C6 glioma cells were co-cultured with transwell system. The number of migrated cells was counted by statistical software. **Results** Rat BMSCs successfully differentiated into neural cells (Nestin (24.3 ± 5.2) %, NSE (33.6 ± 3.8) % and NeuN (41.9 ± 4.7) %), and transwell co-culture test manifested the number of migrated cells in experimental group was more significant than the which in control group. **Conclusions** Neurally differentiated rat BMSCs have obviously tropism towards C6 glioma cells in vitro.

Key words: bone marrow mesenchymal stem cells; neural cells; C6 glioma cells

骨髓间充质干细胞 (Bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 作为来源于中胚层的具有多向分化潜能的成体干细胞, 容易分离纯化及进行自体移植, 还能避开干细胞研究的常规伦理争议, 近来成

为干细胞研究的又一趋势^[1]。BMSCs 作为细胞载体对胶质瘤的相关研究也正不断取得进展^[2,3], 考虑到 BMSCs 的多向分化潜能, 甚至在适当条件下可向神经细胞分化的趋向^[4-6]。本试验旨在通过

基金项目:四川省卫生厅科学研究项目:创伤性脑损伤后 bFGF 干预骨髓间充质干细胞治疗作用的对比试验研究 2010-100301;陕西省科技厅科学技术研究发展计划项目:神经干细胞基因转染对脑胶质瘤的治疗 2008K09-09。

收稿日期:2011-01-15; **修回日期:**2011-04-25

作者简介:钟俊(1984-), 男, 住院医师, 第四军医大学在读硕士, 主要从事干细胞在神经外科中作用研究。

通讯作者:刘卫平(1963-), 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 主要从事颅底神经外科和干细胞的研究。

体外实验探讨大鼠 BMSCs 分化为神经细胞后,探索其向 C6 胶质瘤细胞的迁移能力,以进一步明确其作为基因治疗载体的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料

8 只 4~6 周 SD 大鼠(第四军医大学实验动物中心提供),Transwell 培养板(Corning 公司),基质胶(matrigel, Collaborative Research 公司),胎牛血清(FBS, Gibco 公司),Percoll 分离液(Pharmacia 公司),DMEM/F12(北京默飞世尔公司),碱性成纤维母细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF, Sigma 公司),表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF, Pepro Tech 公司),脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF, Sigma 公司),全反式维甲酸(all transretinoic acid, ATRA, Sigma 公司),山羊抗大鼠 CD34 和 CD105(北京中杉公司),小鼠抗 NSE 和 NeuN(Sigma 公司),兔抗 Nestin(北京中杉公司),驴抗兔 FITC 和驴抗小鼠 A594(Bios 公司),BX60 荧光显微镜和倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司)等。

1.2 方法

1.2.1 BMSCs 的分离及培养 严格无菌条件下取大鼠股骨骨髓并用 1.077 g/ml 的 Percoll 分离液^[5]分离,以 2500 rpm/min 的速度离心 20 min, PBS 洗 2 遍以后以 1×10^6 /ml 的密度接种于 40ml 的塑料培养瓶中,置于 37℃、5% CO₂ 孵箱静止培养 3 天后换液,细胞铺满培养瓶底 80% 以上时用胰酶消化传代,随机分为实验组和对照组。定期置于倒置相差显微镜下观察与照相。

1.2.2 免疫细胞化学鉴定 取生长状态良好的 BMSCs,采用免疫细胞化学方法对其表面抗体 CD105 和 CD34 做荧光染色,而后对同类 BMSCs 进行诱导分化。实验组细胞用含 2% B27、20 ng/ml bFGF、20 ng/ml EGF 和 DMEM/F12 培养一周后用 10 ng/ml BDNF 诱导 3~4 天,最后用 1 μmol/L ATRA 刺激 3~4 天完成分化,对照组用 DMEM/F12 和 10% FBS 培养。

1.2.3 免疫荧光细胞化学分析 分化后细胞用 4% 多聚甲醛固定,1% H₂O₂ 孵育 10 min 去除内源性过氧化物酶,而后加一抗,即兔抗 Nestin (1:

200)、小鼠抗 NeuN (1:2000) 和小鼠抗 NSE (1:500),室温孵育 16 h-18 h,孵育液含 0.3% TritonX-100, 0.05% NaN₃, 5% 胎牛血清(FBS)。二抗加于种属对应的驴抗兔 FITC (1:500) 和驴抗小鼠 A594 (1:500),避光放置 3~4 h,最后封片,荧光显微镜下观察、照相。

1.2.4 Transwell 迁移试验 对照组和实验组细胞与 C6 胶质瘤细胞共培养,用 50 mg/L Matrigel 1:8 稀释液包被 Transwell 小室底部膜的上室面,4℃ 风干。吸出培养板中残余液体,每孔加入 50 μl 的无血清培养液,37℃,30 min。消化实验组和对照组细胞及 C6 胶质瘤细胞,终止消化后离心弃去培养液,用 PBS 洗 2 次,用无血清培养基重悬,调整细胞密度至 5×10^4 ,取实验组和对照组细胞悬液 100 μl 各自加入 Transwell 小室,24 孔板下室都加入 500 μl 含 10% FBS 的 C6 胶质瘤细胞,共培养 48 h。谨慎用棉签擦去基质胶和上室内的细胞,用手术刀将小室内的膜切下固定在载玻片上,0.1 mol/L PBS 洗 3 次后 4% 多聚甲醛固定 10 min,苏木素染 5 min,自来水冲洗后 1% 盐酸乙醇分化 30 sec,而后自来水浸泡 15 min,最后脱水透明,观察、照相,分别在 20 倍光镜视野下计数实验组和对照组通过的细胞数。

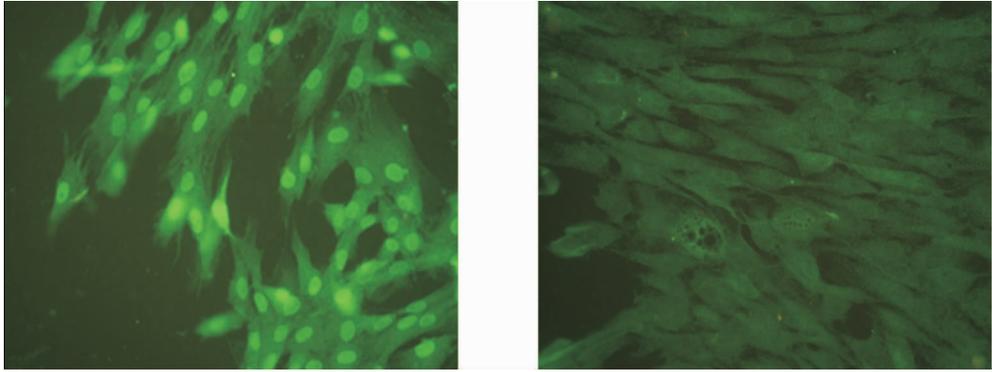
1.3 统计学方法

所有数据均采用 SPSS13.0 软件处理。实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,统计方法采用重复测量数据两样本 *t* 检验及相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSCs 的形态学观察及表面抗体鉴定

经 Percoll 分离液处理的细胞接种在 40ml 塑料培养瓶中 24~48 h 后出现贴壁细胞,梭形多见,部分呈巢状生长。部分没有贴壁的悬浮细胞可能是血细胞,换液两次后悬浮细胞基本清除。贴壁细胞 7~10 天便可达 70%~80% 融合,2 周后出现致密的贴壁层,传至第 2 代细胞后形成均一的长梭形、多角形细胞,其他形态的细胞极罕见。第 2 代细胞爬片后免疫组化检测,转化生长因子 β 受体(CD105)强表达,造血干细胞表面标记性抗原 CD34 几乎不表达。(如图 1)



A: CD105 × 400

B: CD34 × 400

图1 BMSCs 表面抗原的表达情况 A: CD105 几乎表达于所有 BMSCs 的胞核中; B: CD34 在胞核中未见有表达

2.2 BMSCs 诱导分化和分化后细胞的免疫荧光细胞化学结果

实验组细胞在 NSC 培养基中培养 3 天后扁平细胞的胞体向内收缩,呈圆形或椭圆形,并向周围长出较长的突起,一周左右细胞立体感增强,并出现少量悬浮细胞。经 BDNF 诱导 3~4 天后可见简单双极或大的多极细胞,极少数表现为锥形,突触

明显增多。ATRA 刺激 3~4 天后细胞折光性明显,胞体伸展出很长的突触,部分表现出典型的神经元样细胞形态。对照组细胞无明显变化。免疫荧光细胞化学分析发现分化后细胞表达明显的 Nestin (24.3 ± 5.2)%、NSE (33.6 ± 3.8)% 和 NeuN (41.9 ± 4.7)% 阳性。(如图 2、3)

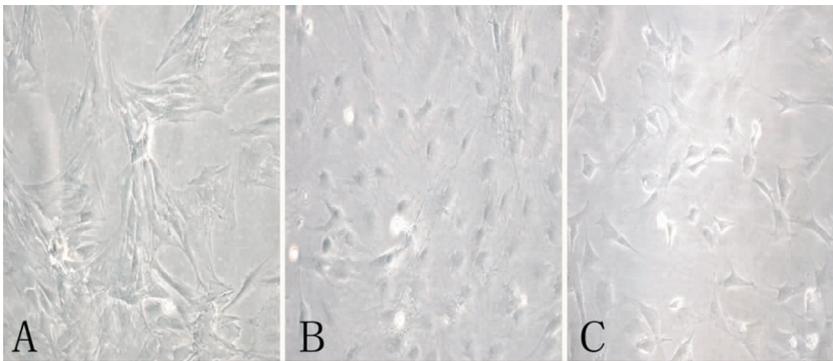
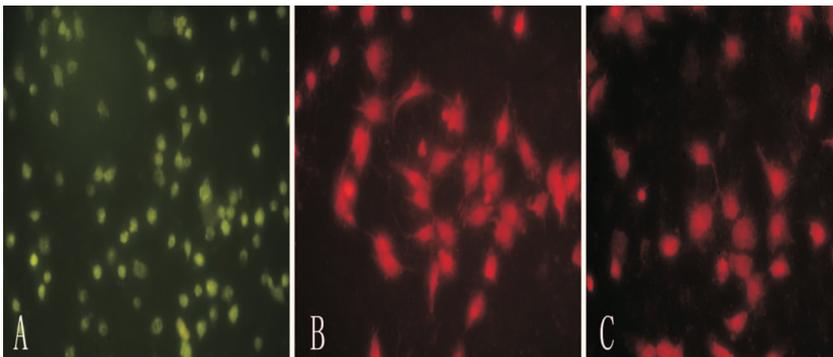


图2 BMSCs 诱导分化后形态的改变(×100) A: BMSCs 分化前的形态; B: BMSCs 诱导分化一周后; C: BMSCs 诱导分化完成时。



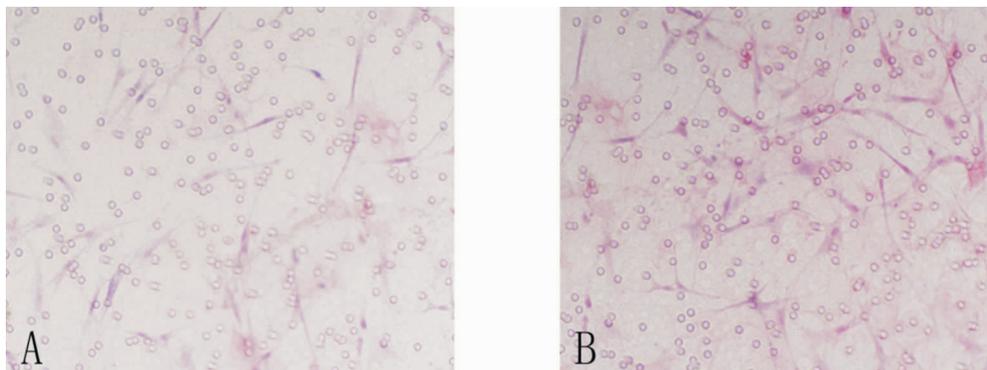
A: Nestin × 100 B: NSE × 200 C: NeuN × 200

图3 BMSCs 诱导分化后表达 Nestin (A)、NSE (B) 和 NeuN (C) 阳性

2.3 BMSCs 及分化后的细胞与 C6 胶质瘤细胞共培养结果

BMSCs 及分化后的细胞与 C6 胶质瘤细胞在 Transwell 共培养体系中培养 48 小时后, 除去基质

胶和上、下室内的细胞, 留下小室内膜, 发现膜上存在大量的迁移细胞。膜上的迁移细胞经 HE 染色发现实验组细胞通过数明显多于对照组。(如图 4 和表 1)



A 为对照组, 可见部分细胞穿过 Transwell 小孔; B 为实验组, 可见更多的细胞穿过 Transwell 小孔。(×200)

图 4 对照组和实验组细胞穿过 Transwell 小孔的情况

表 1 对照组和实验组细胞穿过 Transwell 小孔的数量 (n=10, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| A | 39.0 ± 3.2 | 33.0 ± 4.0 | 35.0 ± 2.8 | 43.0 ± 2.5 | 29.0 ± 2.5 | 48.0 ± 3.0 | 47.0 ± 3.3 | 23.0 ± 2.9 | 29.0 ± 5.1 | 31.0 ± 4.2 |
| B | 49.0 ± 2.9 | 39.0 ± 3.8 | 49.0 ± 3.6 | 47.0 ± 4.5 | 65.0 ± 4.3 | 57.0 ± 2.9 | 42.0 ± 3.9 | 51.0 ± 4.9 | 43.0 ± 4.0 | 39.0 ± 2.4 |

A 对照组, B 实验组, P < 0.05 (B vs A).

3 讨论

胶质瘤作为人类颅内最常见的肿瘤, 在目前辅以先进的外科手术方法和放疗化疗手段, 由于其超常的增殖和转移趋势, 在大部分病人中的预后仍不可观。因此研究者们正在不断引入新的治疗手段如细胞移植治疗和基因治疗等, 早期 Aboody 和 Suzuki 等^[7,8] 人发现神经干细胞 (neural stem cells, NSC) 不但可作为基因载体对胶质瘤趋向性, 而且其本身对胶质瘤的发展也有抑制作用, 鉴于 NSC 研究的伦理学障碍, Nakamura 和 Hamada 等学者发现 BMSCs 作为 NSC 的替代研究不失为一个更好的选择, BMSCs 不但方便取材和体外扩增, 而且还能避开伦理学争议和自身的免疫反应, 研究中发现 BMSCs 同样对胶质瘤有明显趋向性并有部分抑制胶质瘤生长的功能^[9,10]。最近还发现 BMSCs 作为基因载体转染血小板衍生生长因子 (platelet derived growth factor, PDGF-BB) 能明显促进向胶质瘤迁移, 甚至还发现转染白介素-18 后对胶质瘤有明显抑制作用^[2,11,12]。

由于 BMSCs 在适当条件下可分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、神经细胞等^[13], 甚至还有研究表明它还有自分化功能^[1], 因此在颅内复杂的环境

下 BMSCs 作为载体治疗肿瘤时, 有理由推论 BMSCs 在与众多神经营养因子和神经细胞共存时其有向神经细胞分化的可能。目前分化后的 BMSCs 对肿瘤趋向性的效率还未有相关报道, 因此该实验就分化后的 BMSCs 对肿瘤的趋向性作了初步研究。通过 BMSCs 的分离纯化培养并对表面抗原 CD105 和 CD34 进行鉴定, 结果证实 BMSCs 基本达到目前的纯化标准^[14], 而后依据目前较为经典的分化方案^[5,6], 通过 2% B27、20 ng/mlbFGF、20 ng/mlEGF 和 DMEM/F12 培养和 10 ng/mlBDNF、1 μmol/L ATRA 诱导将 BMSCs 分化为神经细胞, 然后采取 Transwell 共培养策略对分化后的神经细胞和 C6 胶质瘤细胞共培养^[15], 结果显示分化后的神经细胞同样对胶质瘤有趋向性, 从实验结果分析来看其趋向性比对照组—未分化的 BMSCs 更强, 这也可能因为分化后产生有大量的神经干细胞, 验证了 Aboody 等^[7] 对 NSC 的研究。分析其机制, 可能是经过诱导后部分骨髓基质干细胞已经分化, 某些趋化或生长因子的分泌得到了加强, 与文献报道^[16] 对干细胞进行预先诱导能够提高其趋化作用及分泌生长因子抑制肿瘤细胞增殖^[17] 类似, 这说明分化细胞对胶质瘤的趋

向性及抑制效应更强,同时这也需要我们下一步实验中深入探讨是否存在特定的趋化或免疫因子介入其中,参与趋化和抑制肿瘤细胞增殖。BMSCs 分化后的神经细胞对 C6 胶质瘤同样具有明显的趋向性,这一结论为 BMSCs 作为基因或药物载体治疗颅内肿瘤提供了有效支持,同时分化后细胞的趋向性研究也为载体选择提供了新的思路。

BMSCs 分化后的神经细胞对胶质瘤趋向性研究为临床基因治疗奠定了一定的理论基础,但是考虑到体内和体外的研究差别,动物实验和临床研究的距离,基础研究还有待更进一步的深入。

参 考 文 献

- [1] Minguell JJ, Conget P, Erices A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Braz J Med Biol Res*, 2000, 33 (8) : 881-887.
- [2] Cheng P, Gao ZQ, Liu YH, et al. Platelet-derived growth factor BB promotes the migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells towards C6 glioma and up-regulates the expression of intracellular adhesion molecule-1. *Neurosci Letters*, 2009, 451 (1) :52-56.
- [3] Christian S, Tobias B, Nima E, et al. Vascular endothelial growth factor A contributes to glioma-induced migration of human marrow stromal cells (hMSC). *Exp Neurol*, 2006, 199 (2) : 301-310.
- [4] Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol*, 2000, 164 (2) :247-256.
- [5] Lou SJ, 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. *Brain Research*, 2003, 968 (1) :114-121.
- [6] Munoz EG, Woodbury D, Black IB, et al. Marrow stromal cells, mitosis, and neuronal differentiation: stem cell and precursor functions. *Stem Cells*, 2003, 21 (4) :437-448.
- [7] Aboody KS, Brown A, Rainov NG, et al. Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97 (23) :12846-12851.
- [8] Suzuki T, Izumoto S, Wada K, et al. Inhibition of glioma cell proliferation by neural stem cell factor. *Neuro-Oncology*, 2005, 74 (3) :233-239.
- [9] Nakamura K, Ito Y, Kawano Y, et al. Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Therapy*, 2004, 11 (14) :1155-1164.
- [10] Hamada H, Kobune M, Nakamura K, et al. Mesenchymal stem cells (MSC) as therapeutic cytoreagents for gene therapy. *Cancer Sci*, 2005, 96 (3) :149-156.
- [11] Xu G, Jiang XD, Xu Y, et al. Adenoviral-mediated interleukin-18 expression in mesenchymal stem cells effectively suppresses the growth of glioma in rats. *Cell Biology International*, 2009, 33 (4) : 466-474.
- [12] 范存刚,周景儒,张庆俊. 间充质干细胞在脑胶质瘤实验性靶向治疗中的应用, *国际神经病学神经外科学杂志*, 2010, 37 (1) :22-25.
- [13] Zhou Qiong, Tang Yong-hong, Zhao Shu-he, et al. Nerve growth factor induces human bone marrow stromal cells to differentiate into neuron-like cells in vitro. *Journal of International Neurology and Neurosurgery*, 2007, 34 (5) :397-401.
- [14] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284 (5411) :143-147.
- [15] Li S, Gao Y, Tokuyama T, et al. Genetically engineered neural stem cells migrate and suppress glioma cell growth at distant intracranial sites. *Cancer Letters*, 2007, 251 (2) : 220-227.
- [16] Ponte AL, Marais E, Gallay N, et al. The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells*, 2007, 25 (7) : 1737-1745.
- [17] Khakoo AY, Pati S, Anderson SA, et al. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *J Exp Med*, 2006, 15; 2003 (5) : 1235-1247.