

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.06.016

血管紧张素 II 联合生长因子诱导人骨髓间充质干细胞分化为多巴胺能神经元

张 蕾¹, 金 辉², 李伟伟¹

(辽宁医学院 1. 生物化学教研室; 2. 附属第三医院检验科 锦州 121000)

【摘要】目的: 观察血管紧张素 II (Angiotensin II, Ang II) 联合应用多种生长因子体外诱导人骨髓间充质干细胞 (Human bone marrow mesenchymal stem cells, hBMSCs) 向神经元和多巴胺神经元分化的潜能。方法: 从正常人骨髓中分离单个核细胞并对 hBMSCs 进行纯化、鉴定; hBMSCs 先用碱性成纤维细胞生长因子和表皮细胞生长因子预诱导, 再用胶质细胞源性神经营养因子 (Glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) 和 Ang II 联合诱导生长良好的 hBMSCs 向神经元分化。倒置显微镜观察 hBMSCs 分化过程中细胞形态的变化; RT-PCR 方法检测诱导前后 hBMSCs 神经干细胞的标记物巢蛋白 (Nestin)、神经元特异性烯醇化酶 (Neuron-specific enolase, NSE)、神经胶质细胞的特异性标记物酸性纤维蛋白 (Glial fibrillary acidic protein, GFAP) 以及多巴胺能神经元特异性标记物酪氨酸羟化酶 (Tyrosinehydroxylase, TH) 等标志物的表达情况; 免疫荧光法检测诱导前后 hBMSCs 的 NSE、TH 和 GFAP 蛋白表达情况。结果: 流式分析获得了高纯度的 hBMSCs。在不同浓度的 Ang II 诱导 2 周后, 倒置显微镜观察 hBMSCs, 具有典型神经元细胞形态, 大多呈双极、多极和锥形; Nestin、NSE、TH 的基因 mRNA 表达量, 诱导组相较于对照组, 有显著性差异 ($P < 0.05$); 免疫荧光细胞化学检测结果表明诱导分化后表达 NSE、Nestin、TH 蛋白的细胞数明显增加 ($P < 0.05$), 但诱导前后的细胞都不表达 GFAP 基因。结论: 多种生长因子联合 Ang II 可以在体外诱导 hBMSCs 分化为多巴胺能神经元样细胞。

【关键词】人骨髓间充质干细胞; 生长因子; 血管紧张素 II; 多巴胺能神经元**【中国图书分类法分类号】**R34**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2011-12-05

Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into dopaminergic neuron-like cells induced by angiotensin II combined with growth factor

ZHANG Lei¹, JIN Hui², LI Weiwei¹

(1. Department of Biochemistry; 2. Department of Laboratory Medicine, the Third Affiliated Hospital, Liaoning Medical College)

【Abstract】Objective: To explore the potential of human bone marrow mesenchymal stem cells (hBMSCs) to differentiate into neurons and dopaminergic neuron-like cells in vitro. **Methods:** The hBMSCs were isolated and purified from normal human bone marrow mononuclear cells in vitro. After the identification and pretreatment with basic fibroblast growth factor (bFGF) and epidermal growth factor (EGF), the hBMSCs were cultured at the medium containing glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and Angiotensin II (Ang II). The cell morphology of hBMSCs during the differentiation was observed by inverted microscope. The mRNA expressions and proteins of Nestin, neuron-specific enolase (NSE), human glial fibrillary acidic protein (GFAP), tyrosinehydroxylase (TH) of hBMSCs were detected by RT-PCR and immunofluorescence method before and after the induction. **Results:** The hBMSCs with high purity of were collected. The majority of the hBMSCs were transformed into neuron-like cells displaying as bipolar, multipolar and cone in sharp at two weeks after the differentiation of hBMSCs by Ang II. The mRNAs expressions of Nestin, NSE and TH by hBMSCs after the induction were significantly more than those before the induction ($P < 0.05$). Immunofluorescence analysis showed that the number of cells expressing proteins of NSE, Nestin and TH was increased significantly after the induction ($P < 0.05$). GFAP gene was not expressed by cells before and after the induction. **Conclusion:** Ang II combined with other growth factors can induce hBMSCs to differentiate into dopaminergic neuron-like cells.

【Key words】human bone marrow mesenchymal stem cells; growth factor; angiotensin II; dopaminergic neuron-like cells

作者介绍: 张 蕾 (1974-), 女, 副教授, 博士,
研究方向: 胚胎干细胞发育。

细胞替代治疗是中枢神经系统变性疾病的治疗策略之一,一直以来,神经干细胞、胚胎干细胞等被认为是细胞移植的首选种子细胞,但他们的来源问题以及胚胎干细胞涉及的伦理道德等方面因素严重制约了其临床大规模的应用^[1],而且移植后神经干细胞的存活数量、是否具有相应神经元的功能、向特定神经元的分化,尤其向多巴胺能神经元分化的数量很少。因此研究细胞移植的细胞来源问题、其体外定向诱导分化的因素以及提高多巴胺能神经元的数量,对细胞移植治疗帕金森病的应用尤为重要。国外已有研究证明血管紧张素 II (Angiotensin II, Ang II) 通过血管紧张素 2 型受体介导使多巴胺能神经元数目增加^[2],及机制尚不明确,由此我们想到 Ang II 是否是通过诱导神经干细胞向多巴胺能神经元分化来解释这一现象。同时有报道再用胶质细胞源性神经营养因子 (Glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) 可支持包括多巴胺能神经元在内的多种神经元细胞的存活^[3,4],还可使多巴胺能神经元的合成增加^[5]。所以本实验采用 Ang II 联合多种生长因子体外诱导人骨髓间充质干细胞 (Human bone marrow mesenchymal stem cells, hBMSCs) 向神经元样细胞分化,探讨 Ang II 对 hBMSCs 的诱导分化作用,为神经系统疾病的治疗提供进一步的实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

健康自愿者 6 例,髂骨骨髓 5 ml。Ang II (Sigma)、胰蛋白酶 (Sigma)、L-DMEM (Gibco, USA)、FGF、GDNF (Pepro Tech)、Trizol (Invitrogen)、细胞培养箱 (SANYO)。

1.2 hBMSCs 的分离、培养

抽取健康志愿者的骨髓,抗凝,用 PBS 稀释后,加入等体积的人淋巴细胞分离液,按照文献[6]进行操作,培养并纯化 hBMSCs。

1.3 hBMSCs 表面标志物鉴定

取培养至第 2 代的细胞,经胰酶消化后制成单细胞悬液,调整细胞密度为 1×10^6 个/L。PBS 洗涤后分别加入抗 CD29、CD44、CD14、CD166、CD34、CD45 单克隆抗体混匀,避光、室温反应 20 min,用 IgG1 作同型对照。PBS 洗涤后用流式细胞仪检测分析 (图 1)。

1.4 hBMSCs 向多巴胺能神经元分化的诱导方法

取生长良好的第 3 代 hBMSCs 的细胞密度调整为 3×10^5 个/L,接种于 6 孔细胞培养板中,当细胞生长至 60%~70% 融合时,将培养液弃去,PBS 洗两次。诱导组在含有体积分数为 10% 胎牛血清、DMEM 培养液中加 20 μ g/L bFGF 和 20 μ g/L EGF 预处理 48 h,PBS 洗涤 3 次,加入 20 μ g/L GDNF 和

Ang II (0~100 μ g/L 不等浓度) 培养液诱导 2 d 后换液,14 d 后收集细胞。空白对照组加入含体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液培养,不添加任何诱导分化试剂。倒置显微镜下记录细胞形态的变化。

1.5 神经细胞的鉴定

1.5.1 间接免疫荧光染色法鉴定多巴胺能神经元 取出细胞爬片,按照文献[6]的方法进行操作,用荧光显微镜进行观察,随机计数 10 个非重叠的视野 ($\times 100$),计算神经元特异性烯醇化酶 (Neuron-specific enolase, NSE)、酸性纤维蛋白 (Glial fibrillary acidic protein, GFAP)、巢蛋白 (Nestin)、酪氨酸羟化酶 (Tyrosinehydroxylase, TH) 阳性细胞占总细胞数的比例,并用 SPASS13.0 统计软件进行数据分析,结果用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

1.5.2 RT-PCR 检测 NSE、Nestin、TH 和 GFAP 基因的表达 取诱导前后的 hBMSCs 常规提取总 RNA。应用 NSE、Nestin、TH、GFAP 特异性的引物扩增目的片断应用 NSE、TH 特异性的引物扩增目的片断,内参照为 β -actin。引物序列见表 1。cDNA 的反转录条件是:10 μ l 反应体系,于 42 $^{\circ}$ C 逆转录、30 min。PCR 反应条件是:50 μ l 反应体系,95 $^{\circ}$ C 预变性、5 min;变性 95 $^{\circ}$ C、30 s;退火 30 s;延伸 72 $^{\circ}$ C、45 s;30 个循环;最后延伸 72 $^{\circ}$ C、10 min。

表 1 引物序列

Tab.1 Sequences of the primer			
基因	序 列	产物大小 (bp)	退火温度 ($^{\circ}$ C)
β -actin	上游:5'-TGACGGGGTCACCCACAC-TGTGCCC-3'	661	59
	下游:5'-CTAGAAGCATTTGCGGTG-GACGATG-3'		
NSE	上游:5'-AGAGGACCAGAGTATTGT-3'	370	58
	下游:5'-GAAACTCAAGCACCACTG-3'		
Nestin	上游:5'-AAATGAGGATGAGGCAGAGC-3'	459	58
	下游:5'-ATGGAACCAACCCCTGGAAGC-3'		
GFAP	上游:5'-TGAAGAGCCGGAATGAG-3'	468	56
	下游:5'-CGTCCCTACCTTCTTCC-3'		
TH	上游:5'-GTCTGTTCATCCACCAGGC-3'	307	57
	下游:5'-TGAGGACGGGTGGGTGGAC-3'		

1.6 统计学分析

电泳图像用 Bandscan 图像处理系统进行分析,测出每个扩增产物条带的 DNA 吸光度值,以扩增产物 β -actin 的吸光度值作为对照,其他扩增产物和 β -actin 吸光度值的百分比 (%) 表示 NSE、TH 基因的表达水平。

所有数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 来表示,应用 SPSS 13.0 统计软件处理实验数据,组间比较采用单因素方差分析 F 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 hBMSCs 的形态观察

刚贴壁的 hBMSCs 细胞以椭圆形、圆形多见,分布不均,在贴壁的初期细胞增殖较缓慢,5~6 d 后贴壁细胞增殖迅速,呈放射状生长,出现细胞集落。第 7~8 天时,细胞呈旋涡状生长,集落迅速增多,但是集落大小不等、集落之间互相融合,培养至第 12~14 天左右细胞达 80%~90% 融合。传代后生长速度增快,形成均一的长梭形、多角形细胞,其他形态的细胞少见,7 d 左右即可达到 70%~80% 融合。

2.2 hBMSCs 的表面标志鉴定

流式细胞仪检测的结果显示,hBMSCs 表面抗原 CD44、CD29 和 CD166 阳性率达到 95% 以上,不表达或低表达 CD14、CD45 和 CD34 等(图 1)。

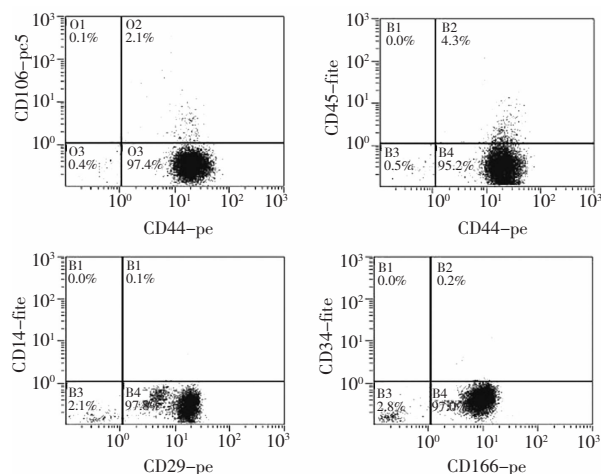


图 1 hBMSCs 表面标志的测定结果

Fig.1 Detecting results of hBMSCs surface marker

2.3 诱导分化后细胞生长情况和形态变化

诱导 48 h 后不同浓度组均可见长梭形的两极逐渐地变细,少量的细胞胞体开始变圆,细胞生长速度减缓(图 2A),诱导 2 周后 20 $\mu\text{g/L}$ GDNF+40 $\mu\text{g/L}$ Ang II 组细胞形态已经发生明显变化,胞体回缩变圆,呈立体感,突起越来越细,但未见增长,少部分细胞出现几个突起(图 2B);20 $\mu\text{g/L}$ GDNF+80 $\mu\text{g/L}$ Ang II 组可见细胞胞体折光性较强,进一步地回缩,突起明显增多(图 2C);20 $\mu\text{g/L}$ GDNF+100 $\mu\text{g/L}$ Ang II 组可见较多的形态类似神经元样的细胞出现,多数细胞具有 1~3 个细长突起或有多个短突起,突起间相互连接呈网状(图 2D)。

2.4 RT-PCR 检测诱导前后 hBMSCs 的神经细胞特异性标志物的表达

空白对照组细胞不表达 Nestin、NSE 及 TH 基因。20 $\mu\text{g/L}$ GDNF+40 $\mu\text{g/L}$ Ang II 组细胞弱表达 Nestin、NSE 基因,分别只有 2% 和 3%,不表达 TH 基因;其余 Ang II 浓度组表达 Nestin、NSE 及 TH 基因均较空白对照组增加 ($P < 0.05$),且 20 $\mu\text{g/L}$ GDNF+100 $\mu\text{g/L}$ Ang II 组上述 3 基因表达量较 20 $\mu\text{g/L}$ GDNF+40 $\mu\text{g/L}$ Ang II 组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。诱导前后的 hBMSCs 均不表达 GFAP(图 3)。

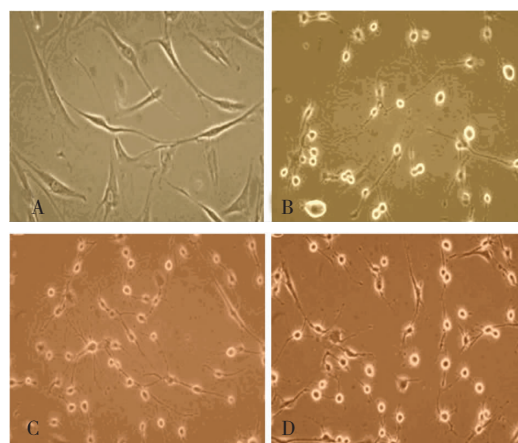


图 2 Ang II 诱导后 hBMSCs 的形态学特征

Fig.2 Morphological characteristics of hBMSCs before and after Ang II induction

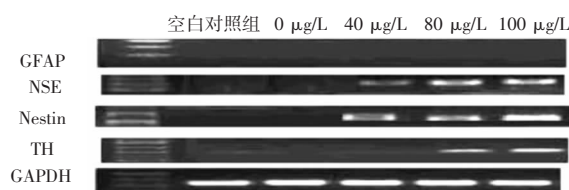


图 3 诱导前后 Nestin、NSE 和 TH 基因 RT-PCR 表达变化

Fig.3 Changes in RT-PCR expression of NSE, Nestin and TH gene before and after the induction

2.5 免疫荧光检测诱导前后 hBMSCs 神经细胞特异性标志物的表达

经免疫荧光检测,空白对照组 hBMSCs 不表达 NSE、Nestin、TH,而 Ang II 诱导 2 周后,20 $\mu\text{g/L}$ GDNF+40 $\mu\text{g/L}$ Ang II 组、20 $\mu\text{g/L}$ GDNF+80 $\mu\text{g/L}$ Ang II 组和 20 $\mu\text{g/L}$ GDNF+100 $\mu\text{g/L}$ Ang II 组其 NSE、TH、Nestin 蛋白表达含量均有显著性差异(表 2)。免疫荧光各组均不表达 GFAP 蛋白。

3 讨论

国外研究表明肾素-血管紧张素系统可能对脑组织的发育和分化起到重要的作用。Rodriguez-Pallares 等^[2]在中脑前体细胞培养分化期中加入 Ang II 后多巴胺神经元显著增加到 4 倍,并推测,肾素-血管紧张素系统将会在帕金森病的细胞移植治疗中起到一定的作用。表皮生长因子可以促进神经干细胞的分裂,促进神经元轴突的延长以及维持神经元细胞的存活^[7]。而碱性成纤维细胞生长因子具有丝裂原样的作用,可以诱导神经干细胞向神经元细胞分化,能够维持由表皮生长因子激发的神经干细胞的存活以及增殖,并可维持神经元细胞、神经胶质细胞的存活^[8]。GDNF 属于转化生长因子- β 超家族成员之一,可支持包括多巴胺能神经元在内的多

表 2 诱导前后各组 NSE、nestin、TH 蛋白阳性表达率 ($\bar{x} \pm s, \%$)Tab.2 Positive expression rate of NSE, Nestin and TH protein before and after the induction ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	例数 (n)	神经元细胞标志物		
		TH	NSE	Nestin
空白对照组	10	0	0	0
20 $\mu\text{g/L}$ GDNF+0 $\mu\text{g/L}$ Ang II 组	10	0	$2.1 \pm 0.2^*$	$2.2 \pm 0.4^*$
20 $\mu\text{g/L}$ GDNF+40 $\mu\text{g/L}$ Ang II 组	10	$18.5 \pm 1.7^*$	$22.3 \pm 2.9^*$	$30.4 \pm 3.5^*$
20 $\mu\text{g/L}$ GDNF+80 $\mu\text{g/L}$ Ang II 组	10	$36.2 \pm 3.6^{\Delta}$	$44.0 \pm 4.0^{\Delta}$	$60.9 \pm 5.9^{\Delta}$
20 $\mu\text{g/ml}$ GDNF+100 $\mu\text{g/L}$ Ang II 组	10	$48.5 \pm 5.6^{\#}$	$55.0 \pm 4.3^{\#}$	$78.2 \pm 6.7^{\#}$

注:*,与空白对照组比较, $P < 0.05$; Δ ,与 20 $\mu\text{g/L}$ GDNF+40 $\mu\text{g/L}$ Ang II 组比较, $P < 0.05$; #,与 20 $\mu\text{g/L}$ GDNF+80 $\mu\text{g/L}$ Ang II 组比较, $P < 0.05$

种神经元存活^[9,10]。

另外,有研究发现 Ang II 还具有促进细胞生长的作用^[11],其促进细胞生长的机制与 c-myc、血小板衍生生长因子转化生长因子等作用有关。

由此,想到集促进细胞向多巴胺能神经元分化与维持神经元存活的神经营养因子于一体,并有报道二者作用具有相关性,所以本实验应用多种生长因子联合 Ang II 诱导 hBMSCs 向多巴胺能神经元分化,结果表明诱导后的细胞从 mRNA 和蛋白水平不同程度的表达神经元特异性标志物 NSE 及多巴胺等神经元特异标志物 TH,细胞形态具有典型的神经元形态,免疫荧光显示诱导后的多巴胺能样神经元较好的表达多巴胺能神经元的标志蛋白,表明 hBMSCs 可以作为细胞移植替代治疗的理想细胞来源。AT1R 和 AT2R 均属于 G 蛋白耦联受体^[12,13]。

研究表明,AT1R 通过 Gq 激活磷脂酶 C,从而促进 1,4,5-三磷酸肌醇(IP3)、二脂酰甘油产生,或者通过酪氨酸蛋白激酶途径激活丝裂原、活化蛋白激酶等机制,完成 Ang II 收缩血管、促进细胞增殖等功能。Ang II 促进干细胞向多巴胺能神经元分化具体机制需进一步研究。

综上所述,多种生长因子联合 Ang II 可诱导 hBMSCs 向多巴胺能神经元分化,但还不能达到临床移植治疗的要求,如何选择更好的诱导因子组合以及更好的诱导分化方法来提高多巴胺能神经元的数量;分化后的细胞是否还同时具有其他神经元样细胞的功能特征;分化后的 hBMSCs 细胞是否能够和受者自身的细胞相互联系以及发挥神经元细胞的功能,以及移植到体内细胞是否具有安全性还需要进一步探讨。

参 考 文 献

[1] Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, et al. Induction of midbrain

dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity[J]. Neuron, 2000, 28(1):31-40.

[2] Rodriguez-Pallares J, Quiroz C R, Parga J A, et al. Angiotensin II increases differentiation of dopaminergic neurons from mesencephalic precursors via angiotensin type 2 receptors[J]. Eur Neurosci, 2004, 20(6):1489-1498.

[3] Duan X, Kang E, Liu C Y, et al. Development of neural stem cell in the adult brain[J]. Curr Opin Neurobiol, 2008, 18(1):108-115.

[4] Roussa E, Kriegstein K. GDNF promotes neuronal differentiation and dopaminergic development of mouse mesencephalic neurospheres[J]. Neurosci Lett, 2004, 361(1-3):52-55.

[5] Kobory N, Waymire J C, Haycock J W, et al. Enhancement of tyrosine hydroxylase phosphorylation and activity by glial cell line-derived neurotrophic factor[J]. Biol Chem, 2004, 279(3):2182-2191.

[6] 李伟伟, 张 蕾, 田 力, 等. 卵泡抑制诱导骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞[J]. 神经解剖学杂志, 2009, 25(6):616-620.

Li W W, Zhang L, Tian L, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells into neuron-like cells induced by follistatin[J]. Chinese Journal of Neuroanatomy, 2009, 25(6):616-620.

[7] Sieber-Blum M, Zhang J M. Growth factor action in neural crest cell diversification[J]. J Anal, 1997, 191(Pt4):493-499.

[8] Pincus D W, Keyoung H M, Harrison-Restellic, et al. Fibroblast growth factor-2 brain derived neurotrophic factor-associated maturation of new neurons generated from adult human subependymal cells[J]. Ann Neurol, 1998, 43(5):576-585.

[9] Duan X, Kang E, Liu C Y, et al. Development of neural stem cell in the adult brain[J]. Curr Opin Neurobiol, 2008, 18(1):108-115.

[10] Clark P A, Treisman D M, Ebben J, et al. Developmental signaling pathways in brain tumor-derived stem-like cells[J]. Dev Dyn, 2007, 236(12):3297-3308.

[11] Roussa E, Kriegstein K. GDNF promotes neuronal differentiation and dopaminergic development of mouse mesencephalic neurospheres[J]. Neurosci Lett, 2004, 361(1-3):52-55.

[12] Gattullo D, Pagliaro P, Marsh N A, et al. New insights into nitric oxide and coronary circulation[J]. Life Sci, 1999, 65:2167-2174.

[13] Luther J M, Wang Z F, Makhanova N, et al. Endogenous aldosterone contributes to acute angiotensin II-stimulated plasminogen activator inhibitor-1 and preproendothelin-1 expression in heart but not aorta[J]. Endocrinology, 2009, 150(5):2229-2236.

(责任编辑:唐秋姗)