

网络出版时间: 2016-1-20 10:32:26 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160120.1032.024.html>

BMP-4 对大鼠骨髓间充质干细胞与神经干细胞 共培养转归影响的实验研究

李海太¹, 申才良¹, 宋旆文¹, 刘晓颖², 杨 昆¹, 杜 宁¹, 王汉邦¹

摘要 目的 探讨骨形态发生蛋白-4 (BMP-4) 对经过骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 共同培养后的大鼠神经干细胞 (NSCs) 的存活和分化的影响。方法 建立 BMSCs 与 NSCs 共培养模型, 在共同培养体系中加入 BMP-4, 采用流式细胞仪检测 NSCs 的存活率, 同时利用细胞免疫荧光和 Western blot 法鉴定 NSCs 的分化情况, 通过比较 NSCs 的存活率和分化率, 进而分析 BMP-4 对共培养后 NSCs 的存活及分化的影响。结果 共培养体系加入 BMP-4 后, 大鼠 NSCs 的细胞存活率低于对照组 ($P < 0.05$), BMP-4 促进了 NSCs 向星形胶质细胞分化而阻碍其向少突胶质细胞分化, 而分化后的神经星形胶质细胞的特异性表达蛋白神经胶质细胞酸性纤维蛋白 (GFAP) 的表达率高于对照组 ($P < 0.05$), 少突胶质细胞特异性蛋白髓鞘碱性蛋白 (MBP) 表达率低于对照组 ($P < 0.05$)。结论 BMP-4 阻碍了 MSCs 促进 NSCs 有效分化的效应。

关键词 共培养; 骨形态发生蛋白; 骨髓间充质干细胞; 分化; 神经干细胞; 存活

中图分类号 R 363

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)02-0205-05

脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 是指表现为损伤脊髓平面以下的感觉以及运动功能完全或部分丧失为的一种中枢神经系统的严重性创伤疾病^[1]。目前针对该疾病的主要治疗方法在疾病后期通过细胞移植来进行细胞的替代的神经营养的补充^[2]。研究^[3]表明利用干细胞的多向分化潜能, 特别是某些神经干细胞 (neural stem cells, NSCs) 能够分化为特定的神经细胞, 使脊髓的功能恢复以及 SCI 修复成为可能。而骨形态发生蛋白-4 (bone morphogenetic protein-4, BMP-4) 是神经系统发育过程中必不可

少的形态蛋白^[4], 可以通过多种信号通路来完成对神经系统的生长和发育的调控^[4]。该实验采用体外分离培养出 NSCs, 分析 BMP-4 对 NSCs 存活及分化的影响, 为临床治疗 SCI 提供新的治疗思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级大鼠新生雌鼠 1 只。SD 雌性大鼠 1 只, 4~6 周龄, 100 g, 购自安徽医科大学实验动物中心。

1.1.2 主要试剂 DMEM 低糖细胞培养液 (美国 Hyclone 公司); DMEM/F12 细胞培养液 (美国 Gibco 公司); 小鼠抗大鼠神经胶质细胞酸性纤维蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP)、兔抗小鼠抗微管相关性蛋白 2 (microtubule-associated protein 2, MAP-2) 抗体、兔抗大鼠细胞髓鞘碱性蛋白 (myelin basic protein, MBP)、小鼠抗大鼠细胞巢蛋白抗体 (Nestin)、FITC 标签的山羊抗小鼠 IgG 抗体 (美国 Santa Cruz 公司); 碱性细胞成纤维生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、细胞表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 和 B-27 细胞因子 (美国 PeproTech 公司); Triton X-100、TRITC 标签山羊抗兔 IgG 抗体 (北京中杉金桥生物技术有限公司); 包被用左旋氏多聚赖氨酸 (Poly-L-Lysine) (美国 Sigma 公司); ECL 蛋白显影液试剂盒、BCA 蛋白定量检测试剂盒 (美国 Pierce 公司); Transwell 培养板 (美国 Corning 公司); Hoechst33342、免疫荧光一抗稀释液、免疫荧光二抗稀释液、青/链霉素溶液 ($\times 100$)、即用型胰蛋白酶细胞消化液、抗荧光淬灭封片液 (上海碧云天公司); BMP-4 (美国 Peprotech 公司); AnnexinV-PI 凋亡试剂盒 (美国 BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 体外分离和培养大鼠骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 本实验从大鼠股骨和胫骨骨髓中分离出 BMSCs 后采取骨髓贴壁法培养, 细胞培养基由含 100 U/ml 青链霉素及 10% 胎牛血清的 DMEM (低糖) 组成, 放置于

2015-11-11 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81472088); 安徽省自然科学基金 (编号: 1508085MH152)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第一附属医院脊柱外科, 合肥 230022

² 安徽医科大学生物科学学院生物学系, 合肥 230032

作者简介: 李海太, 男, 硕士研究生;

申才良, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: shencailiang1616@163.com

含 5% CO₂、37 ℃ 细胞恒温培养箱中,每隔 2~3 d 更换培养液。待细胞铺满培养瓶后,进行细胞传代。细胞传至第 3 代后,利用流式细胞术检测分析细胞表面特异性标志物(CD90、CD29、CD34),并结合细胞形态学分析,证明所培养的细胞为大鼠 BMSCs。

1.2.2 体外培养大鼠 NSCs 取 SD 大鼠新生鼠,脱臼处死。浸泡在 75% 酒精中 5 min 后断头,依次分离出全脑组织并将脑膜及残余血管剥除。用剪刀充分剪碎全脑组织,放入 1 ml 即用型胰酶细胞消化液,放置于恒温细胞培养箱中,时间为 8~10 min,加入含血清的 NSCs 培养液以终止消化,转移至筛网,过滤为细胞悬液,转至 15 ml 离心管,800 r/min 离心 5 min。弃除管内上清液,加入 2 ml 的无血清 NSCs 完全培养基并再次重复离心。加入完全培养基重悬细胞并进行细胞计数,调整密度为 10⁵ 个/ml 接种于细胞培养瓶,放于恒温细胞培养箱中,每隔 3 d 采取半量换液法更换培养基 1 次,培养 7 d 后传代。传至第 2 代后,行免疫细胞化学荧光检测 NSCs 特异性蛋白(Nestin 巢蛋白),证实所培养细胞为大鼠 NSCs。

1.2.3 BMSCs 与 NSCs 共同培养 将第 3 代后的 BMSCs 以 1 × 10⁶ /ml 的细胞密度接种于共培养板的下室,在培养板上室内接种第 2 代 NSCs,接种密度与下室细胞密度相同,保证培养液能够在培养板上、下室间相互通融,以后每隔 3 d 进行换液,共培养 7 d,建立起大鼠 NSCs 与 BMSCs 的共同培养体系。

1.2.4 BMP-4 对 NSCs 存活率影响实验 采用 AnnexinV-PI 细胞凋亡试剂盒,利用流式细胞术测定诱导凋亡后的 NSCs 的存活率,步骤如下:① 将 NSCs 分为 4 组并进行编号后分别接种于 24 孔板中,每孔约 1 ml,其中第 3 组和第 4 组为共培养的 NSCs,第 1 组和第 2 组细胞为独立培养的 NSCs,② 第 2 组(H₂O₂ 组)加入 100 μmol/ml 的 H₂O₂,第 1 组(对照组)加入等量的 PBS,第 3 组(H₂O₂ + 共培养组)加入 100 μmol/ml 的 H₂O₂,第 4 组(H₂O₂ + 共培养 + BMP-4 组)加入 100 μmol/ml 的 H₂O₂ 和 2 ng/ml BMP-4,温箱培养 4 h;③ 将细胞计数后,以 1 000 r/min 离心 4 min,弃去上清液,加入适量的 PBS 缓冲液重悬上述细胞;④ 取细胞悬液 1 ml,1 000 r/min 离心 4 min,去除上清液后加入 100 μl 的 Binding Buffer,重悬细胞,加入 5 μl 经荧光标记的 Annexin-V 试剂,充分混匀,避光条件下孵育 20 min;⑤ 加入 5 μl 的 PI 试剂后避光下孵育 5 min;⑥ 加入 400 μl 的细胞重悬液,混匀后立刻行流式细胞仪检测分析

细胞凋亡率。

1.2.5 细胞分化实验 将共培养后的 NSCs 接种于经 0.1% 多聚赖氨酸包被的玻片,实验组加入 2 ng/ml BMP-4,对照组加入等量的 PBS,贴壁培养 7 d 后,细胞形态上出现了明显的分化,各盖玻片大部分铺满细胞,以 GFAP(神经胶质细胞特异性标志物)、MBP(少突胶质细胞特异性表达蛋白标志物)和 MAP-2(神经元特异性标志物)行细胞免疫荧光染色检测。用 PBS 洗 3 次,每次 5 min,常温下使用免疫荧光染色固定液固定 20 min;吸去残液后用 PBS 缓冲液洗 3 次,每次 5 min;0.1% Triton X-400 中孵育 20 min;PBS 缓冲液洗 3 次,每次 5 min。用正常山羊血清封闭液于 37 ℃ 恒温细胞培养箱中封闭 1 h,将免疫荧光一抗抗体 MAP-2、MBP、GFAP 抗体均按 1:100 稀释混合均匀后分别依次加入各培养孔内,在 4 ℃ 冰箱条件下孵育过夜;第 2 天放置常温下 2 h,PBS 缓冲液洗 3 次,每次 5 min;后加入 TRITC 标签山羊抗兔 IgG(1:100)及 FITC 标签的山羊抗小鼠 IgG 抗体(1:100),于 37 ℃ 恒温细胞培养箱内避光孵育 1 h;用 PBS 缓冲液漂洗 3 次,每次 5 min。Hoechst 染色 5 min 后 PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。抗荧光淬灭封片液封片后马上用免疫荧光显微镜观察同时拍照。

1.2.6 Western blot 法检测细胞分化后 MBP、MAP-2、GFAP 蛋白的表达 BMSCs 与 NSCs 共同培育后,将 NSCs 接种在经 0.1% 多聚赖氨酸包被的大玻片上,其中实验组加入 2 ng/ml BMP-4,对照组加入等量的 PBS,贴壁培养 7 d。提取各组细胞分化后的总蛋白,用 BCA 蛋白定量检测试剂盒测定各组蛋白含量,确定电泳上样量为 20 μg,蛋白行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳,PVDF 转膜,非特异性封闭。加入一抗 MAP-2、GFAP、MBP 单克隆抗体,所使用抗体稀释浓度为 β-actin(鼠单抗,1:1 000)、GFAP(兔多抗,1:500)MAP-2(小鼠单抗,1:200)、MBP(小鼠单抗,1:1 000)。4 ℃ 冰箱内孵育过夜,加入对应的二抗;4 ℃ 孵育 1 h,用 ECL 发光剂时间为 1~5 min,通过进行曝光、显影、定影一系列操作后使用数码相机成像系统软件对实验结果进行统计分析,用目的蛋白的灰度值表示相对表达的目的蛋白水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,两组间比较使用 *t* 检验,多组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 大鼠 BMSCs 的形态学观察及鉴定 原代

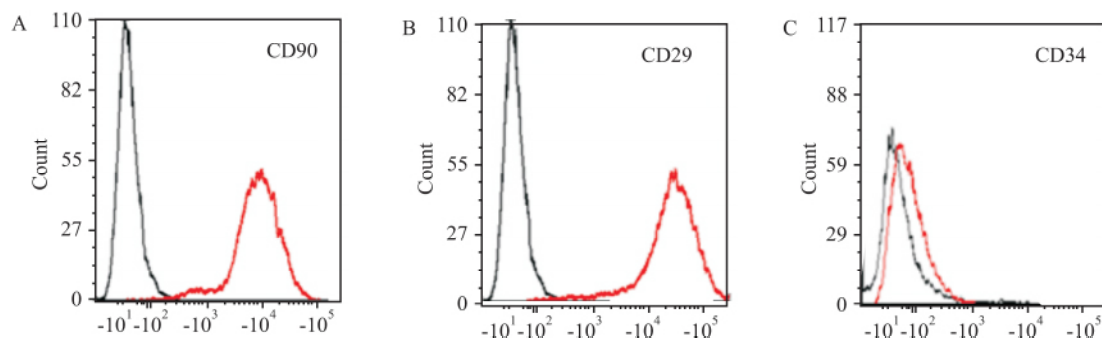


图1 流式细胞术检测大鼠 BMSCs 特异性表面标志物

A: CD90; B: CD29; C: CD34; 红色条带代表表达阳性细胞; 灰色条带代表未表达对照组

BMSCs 在接种起始, 细胞大部分呈悬浮状态, 24 h 后首次换液, 可见悬浮细胞明显减少, 镜下已可见部分贴壁细胞。细胞大小不均一, 形态各不相同。培养约 4~5 d 后见细胞数量逐渐增多, 贴壁细胞呈菱形、梭形等形态。第 3 代以后, 细胞形态大体均匀一致。取第 3 代的 BMSCs 进行流式细胞术检测细胞特异性表面标志物 CD90、CD29、CD34。见图 1。与对照组比较, CD90、CD29 的荧光值明显向右偏移, 而 CD34 的荧光值与对照组基本重叠, 结合细胞形态学分析确定该细胞为 BMSCs。

2.2 大鼠 NSCs 鉴定 体外分离的原代 NSCs 培养 2~3 d 后可见细胞聚集成球形悬浮生长, 培养至第 7 天时培养瓶内可见大量细胞的集落, 折光性较强。见图 2。取贴壁后的神经干细胞球, 行 NSCs 特异性蛋白 Nestin 荧光染色检测, 结果见细胞球中细胞表达 Nestin, 见图 3A。

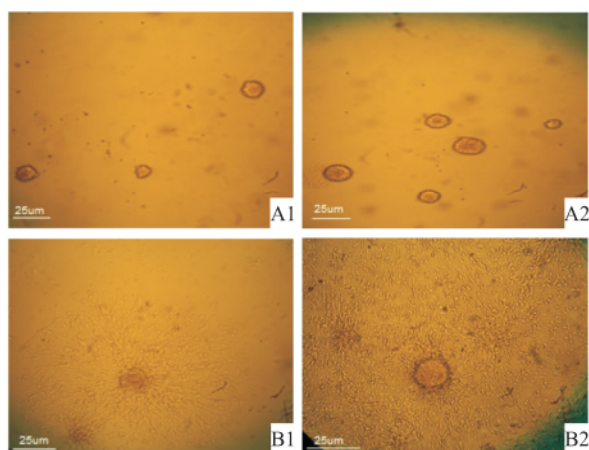


图2 神经干细胞的原代培养及分化 ×100

A: NSCs 原代培养; B: 分化的 NSCs; 1: 3 d; 2: 7 d

2.3 BMP-4 对 NSCs 分化的影响 BMSCs 与 NSCs 共培养后, 接种于经 0.1% 多聚赖氨酸包被的玻片,

实验组加入 2 ng/ml BMP-4, 对照组加入等量的 PBS。贴壁培养 3 d 后, 细胞形态发生明显, 7 d 后细胞形态上已出现了明显的分化, 光镜下示细胞球向周边放射状生长, 交织更紧密, 间隙更窄。见图 2。细胞免疫荧光可见 GFAP 阳性的星形胶质细胞, MAP-2 表达阳性的神经元细胞以及 MBP 表达阳性的少突胶质细胞。见图 3。

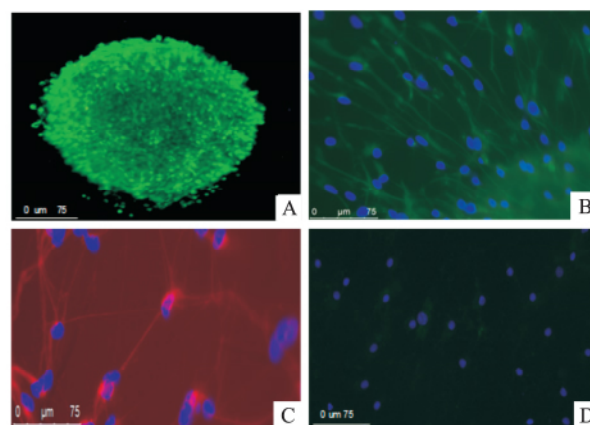


图3 NSCs 免疫荧光染色阳性结果 ×400

A: Nestin; B: GFAP; C: MAP-2; D: MBP

2.4 BMP-4 对 NSCs 存活率的影响 流式细胞术检测分析显示共培养后的 NSCs 存活率明显提高, 但在共培养体系中加入 BMP-4 后细胞存活率出现一定程度的下降, 经方差分析显示, 差异有统计学意义 ($F = 29.373$, $P < 0.05$)。见图 4。

2.5 Western blot 法检测 MBP、MAP-2、GFAP 的表达 将接种的 NSCs 培养 7 d 后, 提取蛋白后行 Western blot 法检测, 结果显示, 实验组中 GFAP 的表达量高于对照组 ($t = 9.638$, $P < 0.05$), 而 MBP 的表达量低于对照组 ($t = 4.902$, $P < 0.05$), MAP-2 的表达差异无统计学意义 ($t = 0.71$, $P > 0.05$)。见图 5。

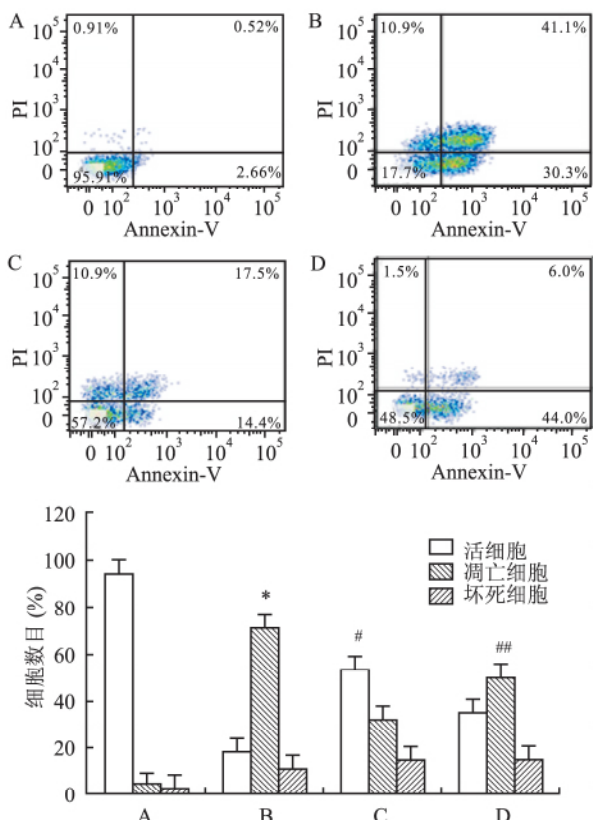
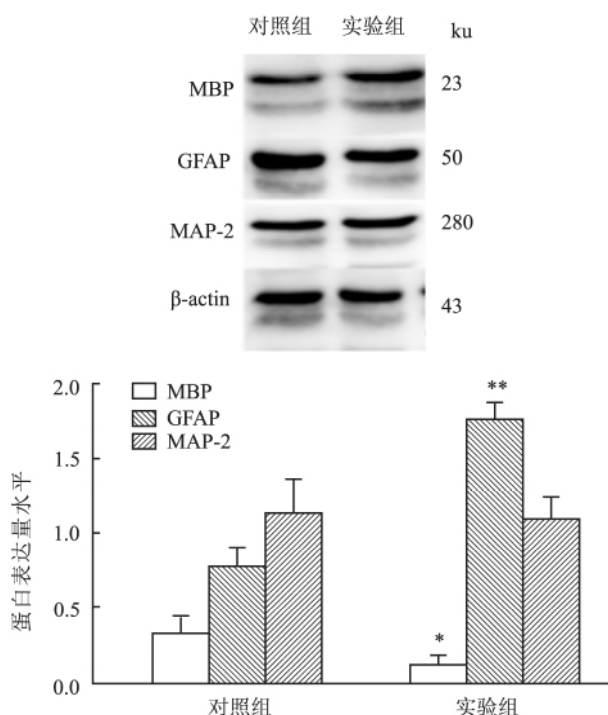


图4 NSCs 流式细胞仪分析结果及存活率比较

A: 对照组; B: H₂O₂ 组; C: H₂O₂ + 共培养组; D: H₂O₂ + 共培养 + BMP4 组; 与 H₂O₂ 组比较: * $P < 0.05$; 与 H₂O₂ + 共培养组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

图5 NSCs 分化后相关蛋白表达量比较
与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

SCI 常见于工农业生产中发生的意外事故,全世界大约 2 500 万人罹患该损伤^[5]。特定的 NSCs 移植治疗 SCI 是目前最有潜力的治疗方法,但是由于 SCI 后微环境并不有利于 NSCs 的定植、存活及分化^[6],仍需要进一步探究 NSCs 新的移植方法。研究^[7]表明在 SCI 早期 BMPs 迅速增高,持续约 3 d,后逐渐减低,增高的 BMPs 有阻碍 MSCs 促进神经前体细胞分化成少突胶质细胞的作用。本实验通过流式细胞仪检测 NSCs 的存活率及 Western blot 法检测 NSCs 分化后特异性蛋白检测及差异性分析,结果表明 BMP-4 抑制共培养后的 NSCs 的细胞存活率,而且促进 NSCs 向星形胶质细胞方向分化抑制其向少突胶质细胞分化。

NSCs 移植治疗 SCI 的成功前提首先是移植后的 NSCs 能够存活,但 SCI 初期的微环境并不利于 NSCs 的存活和定植^[6]。本研究利用特定浓度的双氧水制作细胞凋亡模型,探究不同环境下 NSCs 的存活率,显示单独培养的 NSCs 经双氧水诱导后存活率大幅度下降,这与 Hu et al^[8]的实验研究结果相似,同时经过共培养后的 NSCs 的存活率有明显的提升,这可能与 MSCs 分泌的细胞因子有保护 NSCs 的作用有关^[9]。而在相同共培养体系中加入 BMP-4 后发现 NSCs 的存活率出现一定程度的下降,表明 BMP-4 有抑制 MSCs 保护 NSCs 的作用。BMP-4 是转化生长因子超家族(TGF)的一员,生物学活性比较广泛,作用于神经发育的不同阶段,有调节细胞存活及分化的作用^[10]。研究^[9]表明 MSCs 能够分泌多种细胞因子,作用于 NSCs,促进其存活及分化。推断 BMP-4 可能通过拮抗 MSCs 分泌某种细胞因子重新从而抑制 NSCs 的存活,如细胞信号转导 Olig2 信号通路、Notch 相关信号通路等。但具体作用机制仍需进一步研究中去探索。

在治疗 SCI 的过程中 NSCs 的分化方向也起到非常重要的作用,研究^[11]显示 NSCs 可定向分化为少突胶质细胞、星形胶质细胞和神经元细胞,而对 SCI 的治疗起主要作用的是神经元细胞和少突胶质细胞。本实验通过采用 Western blot 法检测 NSCs 不同分化过程中的特异性蛋白的表达率,结果表明 BMP-4 作用于共培养体系后 MBP 表达量减低而 GFAP 表达量升高, Sandner et al^[12]发现 BMPs 有阻碍 MSCs 促进神经前体细胞分化成少突胶质细胞的作用。存在于成体中枢神经系统的大多数区域,受

体表量低,但在神经系统出现损伤后表 BMP 受体达升高^[13],增高的 BMP 受体有阻碍 MSCs 促进神经前体细胞分化成少突胶质细胞的作用^[12],本研究结果与之一致,具体作用机制将进一步研究。

综上所述,体内脊髓早期损伤因子 BMPs 是阻碍 NSCs 有效分化的重要因素之一,SCI 早期 BMPs 的增高将影响 MSCs 促进 NSCs 有效分化,本研究显示 BMP-4 阻碍了 MSCs 促进 NSCs 有效分化,这将导致 MSCs 与 NSCs 早期共同移植后的 NSCs 并不能有效的分化为神经元细胞或少突胶质细胞,不能达到 NSCs 移植的理想的预期治疗效果。虽然 BMSCs 的培养基具有促进 NSCs 向少突胶质细胞方向分化的作用^[14],但本实验在体外环境下研究显示 BMP-4 对 MSCs 与 NSCs 共培养体系有重要的影响作用,这也间接提示 MSCs 与 NSCs 早期共同移植不利于两者协同效应的发挥,这将为 SCI 的治疗方法带来突破性的进展。

参考文献

- [1] Kwon B K, Fisher C G, Dvorak M F, et al. Strategies to promote neural repair and regeneration after spinal cord injury [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2005, 30(17 Suppl): S3-13.
- [2] Miljkovic-Lolic M, Silbergleit R, Fiskum G, et al. Neuroprotective effects of hyperbaric oxygen treatment in experimental focal cerebral ischemia are associated with reduced brain leukocyte myeloperoxidase activity [J]. *Brain Res*, 2003, 971(1): 90-4.
- [3] Reeves A, Keirstead H S. Stem cell based strategies for spinal cord injury repair [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 760: 16-24.
- [4] Bond A M, Bhalala O G, Kessler J A. The dynamic role of bone morphogenetic proteins in neural stem cell fate and maturation [J]. *Dev Neurobiol*, 2012, 72(7): 1068-84.
- [5] Thuret S, Moon L D, Gage F H. Therapeutic interventions after spinal cord injury [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2006, 7(8): 628-43.
- [6] Guadagno J, Xu X, Karajgikar M, et al. Microglia-derived TNF alpha induces apoptosis in neural precursor cells via transcriptional activation of the Bcl-2 family member Puma [J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4: e538.
- [7] He B L, Ba Y C, Wang X Y, et al. BDNF expression with functional improvement in transected spinal cord treated with neural stem cells in adult rats [J]. *Neuropeptides*, 2013, 47(1): 1-7.
- [8] Hu Z X, Geng J M, Liang D M, et al. Hepatocyte growth factor protects human embryonic stem cell derived-neural progenitors from hydrogen peroxide-induced apoptosis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 645(1-3): 23-31.
- [9] Jain A, McKeon R J, Brady-Kalnay S M, et al. Sustained delivery of activated Rho GTPases and BDNF promotes axon growth in CSPG-rich regions following spinal cord injury [J]. *PLoS One*, 2011, 6(1): e16135.
- [10] ten Dijke P. Bone morphogenetic protein signal transduction in bone [J]. *Curr Med Res Opin*, 2006, 22 Suppl 1: S7-11.
- [11] Sabelström H, Stenudd M, Frisen J. Neural stem cells in the adult spinal cord [J]. *Exp Neurol*, 2014, 260: 44-9.
- [12] Sandner B, Rivera F J, Caioni M, et al. Bone morphogenetic proteins prevent bone marrow stromal cell-mediated oligodendroglial differentiation of transplanted adult neural progenitor cells in the injured spinal cord [J]. *Stem Cell Res*, 2013, 11(2): 758-71.
- [13] Lamb T M, Knecht A K, Smith W C, et al. Neural induction by the secreted polypeptide noggin [J]. *Science*, 1993, 262(5134): 713-8.
- [14] 杨 昆,申才良,宋旖文,等.条件培养基对神经干细胞增殖与分化作用的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(6): 735-9.

Effect of BMP-4 on neural stem cells co-cultured with rat bone marrow mesenchymal stem cells

Li Haitai, Shen Cailiang, Song Peiwen, et al

(Dept of Spine Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To explore the effect of bone morphogenetic protein (BMP-4) on survival and differentiation of neural stem cells (NSCs) co-cultured with bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs). **Methods** Firstly, the modeling of MSCs co-cultured with NSCs was set up, then BMP-4 was put into this co-culture system. After that, the survival rate of NSCs was detected by the flow cytometry (FCM) and expression of NSCs was detected by immunocytochemistry and Western blot. By comparing the rates of cell survival and differentiation, the effect of BMP-4 on survival and differentiation of NSCs was analyzed. **Results** After addition of BMP-4, the survival rate of neural stem cells was lower than the control group ($P < 0.05$), the expression of MBP was lower than the control group ($P < 0.05$), and the expression rate of GFAP was higher than the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** BMP-4 hinders the differentiation effect of MSCs, promotion on NSCs.

Key words co-culture; bone morphogenetic protein; bone marrow mesenchymal stem cells; differentiation; neural stem cells; survival