

骨髓源性 EPCs 对脊髓源性 NSCs 增殖分化的影响

张 硕¹ 杜怡斌² 杜公文² 张 辉² 余 涛² 方家刘² 高维陆² 尹宗生¹

摘要 目的 观察骨髓源性内皮祖细胞(EPCs)对脊髓源性神经干细胞(NSCs)增殖分化的影响。方法 通过密度梯度离心法获取骨髓血单个核细胞,以 EBM-2 进行诱导培养 EPCs 并进行免疫细胞化学染色鉴定,成熟的方法获取及鉴定 SD 大鼠的脊髓 NSCs, 1×10^5 /ml 第 3 代 NSCs 置于 Transwell 小室下层与 1×10^5 /ml 上层原代 EPCs 进行体外 1:1 共培养,以单纯第 3 代的 NSCs 培养为对照,培养 7 d,双盲法分别计数各组在相差显微镜下神经球形成的数目,并用目镜测微尺测量神经球的平均直径,通过 5% 血清诱导培养 NSCs 7 d 后行 β -微管蛋白-III 免疫荧光染色, Hoechst 细胞核染色后在显微镜下计算神经元/细胞总数得出百分率。结果 骨髓源性 EPCs 与脊髓源性 NSCs 共培养组神经球平均数目为 (22.27 ± 3.85) 个,平均直径为 (61.70 ± 7.21) μm ,诱导培养后分化为神经元的平均百分率为 $(46.10 \pm 3.70)\%$,与对照组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 骨髓源性 EPCs 能促进脊髓源性 NSCs 增殖及其向神经元分化。

关键词 NSCs; EPCs; 增殖; 分化; 微环境; 脊髓损伤
中图分类号 R 681.54

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)01-0020-05

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)移植一直是脊髓损伤的主导研究手段,通过促进移植到损伤脊髓中的 NSCs 有效分化为神经元,促进神经生发,从而达到重建神经通路,促进脊髓神经修复的作用。但大量实验研究^[1]显示移植到脊髓中的 NSCs 最终绝大部分分化成为星形胶质细胞形成瘢痕,神经生发的比例很低。脊髓本身存在一定数量的 NSCs(内源性 NSCs),NSCs 或其他类型干细胞甚至神经组织的移植,其作用都是改善了脊髓损伤后局部的微环境,通过对脊髓 NSCs 的诱导作用,从而促进神经功能修复^[2]。研究^[3]表明影响 NSCs 增殖分

化的外在因素包括细胞因子和微环境,是多种细胞因子相互促进影响的结果,脊髓损伤后出血、水肿、缺氧及炎症造成内环境的破坏不利于 NSCs 神经生发,有效改善脊髓微环境是研究修复脊髓损伤的关键。NSCs 所处的微环境中,血管内皮细胞起着重要的营养支持作用,神经生发往往出现于血管生发之后,血管生发为神经生发提供了良好的平台,两者相辅相成,所共处的环境被称为神经血管微环境^[4]。内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)主要来源于骨髓内,并以不同分化阶段存在于外周血,研究^[5]表明 EPCs 及血管内皮细胞能分泌多种细胞因子促进神经的生发,其中主要有血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factors, IGF)等。该研究采用 EPCs 与 NSCs 共培养的方法,观察 EPCs 对 NSCs 增殖及向神经元分化的影响,为 EPCs 移植修复受损神经和治疗脊髓损伤提供相关的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料 骨髓源性 EPCs 的供体实验动物:SD 大鼠,雄性,90~120 g, SPF 级;脊髓源性 NSCs 的供体实验动物:新生 SD 大鼠, SPF 级, 5~7 d;均由安徽省实验动物中心提供。EBM-2 培养基(CC-3156)由 EBM-2 与 EGM-2 SingleQuots 组成,后者含血清 10 ml、氢化可的松 0.2 ml、成纤维生长因子(fibroblast growth factor, FGF) 2 ml、VEGF 0.5 ml、IGF 0.5 ml、抗坏血酸 0.5 ml、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF) 0.5 ml、GA-1000 0.5 ml、肝素 0.5 ml,购自美国 Clonetics 公司;大鼠骨髓淋巴细胞分离液试剂盒,购自天津 TBM 公司;鼠纤维连接蛋白(rat fibronectin, FN)购自美国 Gene Operation 公司;DiI-Ac-LDL 购自美国 Invitrogen 公司;CD133 抗体购自美国 Biorbyt 公司;DMEM/F12(1:1)培养基、B27、左旋谷氨酸均购自美国 Gibco 公司;碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)购自美国 Peprotech 公司;Flk-1 抗体、FITC-

2014-09-25 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81171173);安徽省自然科学基金(编号:11040606Q25)

作者单位:¹安徽医科大学第四附属医院骨科,合肥 230022

²安徽医科大学第一附属医院骨科,合肥 230022

作者简介:张 硕,男,硕士研究生;

尹宗生,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: yinzongsheng1961@sina.com

UEA-1、大鼠 Nestin 抗体、 β -Tubulin (3H3091) 抗体均购自美国 Santa Cruz 公司; 24 孔板 Transwell (孔径 0.3 μ m) 购自美国 Corning 公司; 二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 骨髓源性 EPCs 分离培养 参考文献^[6-7]方法, SD 大鼠(90~120 g) 颈椎脱臼法处死, 消毒后无菌条件下取出双下肢股骨及胫骨, 剪去两端干骺端, 暴露骨髓腔, 一次性注射器抽取 F 液冲洗收集骨髓血, 1 800 r/min 离心 20 min 弃上清液, 沉淀用全血组织稀释液悬起, 取等体积 C 液 5 ml 加入 15 ml 离心管, 再缓慢将细胞悬液加于 C 液之上, 两个体积比为 1:1, 注意保持两者之间的界面清晰, 勿使其彼此混合, 水平离心机离心, 1 500 r/min 离心 25 min, 离心管从上到下依次为稀释液层, 薄薄云雾状单个核细胞层, 透明分离液层, 红细胞层。以毛细管吸出单个核细胞层, 以细胞洗涤液离心洗涤细胞 2 次, 弃上清液, 细胞沉淀以 EBM-2 完全培养基重悬, 并计数, 调整细胞浓度, 以 5×10^5 /ml 细胞浓度接种到预先用 FN(10 μ g/ml) 包被过的 24 孔板中, 每孔 1 ml, 轻轻晃动培养板使细胞分散均匀, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的恒温培养箱培养。2 d 后首次换液去除为贴壁细胞, 以后隔 3 d 换液, 约 9 d 左右, 细胞融合度达到约 90%, 即可传代。

1.2.2 骨髓源性 EPCs 鉴定 参考文献^[6-7]方法, EPCs 免疫荧光化学染色: 取培养 8 d 的 EPCs, 孔内培养液吸弃, PBS 冲洗, 4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 冲洗, 0.5% Triton X-100 破膜 10 min, PBS 冲洗后 10% 山羊血清封闭置于 CO₂ 培养箱孵育 1 h, 吸弃多余血清, 滴加小鼠抗 CD133(1:100) 及兔抗 VEGFR-2(1:100) 一抗, 室温过夜, PBS 冲洗, 加入对应二抗(1:100), 避光孵育 1 h, PBS 冲洗, 添加 10 μ g/ml Hoechst33342 核染色 5 min, PBS 冲洗, 抗荧光淬灭液封片, 倒置荧光显微镜观察和拍照。Dil-Ac-LDL 与 FITC-UEA-1 检测: 取培养 8 d 的 EPCs, 吸弃孔内液体, PBS 冲洗后, 每孔加入 400 μ l Dil-Ac-LDL(10 mg/L), CO₂ 培养箱避光 4 h 后取出, PBS 冲洗后 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 冲洗; 每孔加入 400 μ l FITC-UEA-1(10 mg/L), 孵育 1 h, PBS 冲洗, 抗荧光淬灭液封片, 倒置荧光显微镜观察和拍照。

1.2.3 脊髓源性 NSCs 分离、培养及鉴定 参考文献^[8]方法, 5~7 d 新生 SD 大鼠, 颈椎脱臼法处死,

消毒后在超净台内剪开背部皮肤, 无菌条件下取出胸腰段脊髓, 剪碎至 0.5 mm³ 大小, 反复吹打后 200 目细胞筛滤去组织杂质, 收集悬液离心, 1 000 r/min 离心 5 min, 沉淀用 NSCs 培养基(含 10 ng/ml bFGF、20 ng/ml EGF、2% B27 和 0.6 mg/ml 谷氨酰胺的 DMEM/F12 液) 重悬, 接种于培养瓶, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养 2~3 d 半量换液, 约 7~9 d 以机械吹打法传代。取状态良好的第 3 代细胞球行 Nestin 鉴定。

1.2.4 骨髓源性 EPCs 对脊髓源性 NSCs 增殖及分化的影响 参考文献^[9]方法, 对照组: 收集纯化后培养的第 3 代 NSCs 细胞球, 缓慢吹打成单细胞悬液, 去除原培养液, 以 1×10^5 /ml 接种于含有涂有多聚赖氨酸的无菌盖玻片 24 孔培养板, 更换培养液为 DMEM/F12 + 无血清 EBM-2(1:1), 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养, 每 3 d 半量换液, 培养 7 d 观察 NSCs 生长情况。EPCs 和 NSCs 共培养组: 同对照组的基础上在孔内放置 24 孔板 Transwell, 取载有贴壁原代生长良好 EPCs(细胞融合度达到约 90%) 盖玻片, EPCs 置于 Transwell 膜上, NSCs 位于 Transwell 膜下。记细胞数为 1×10^5 /ml, 两者比例为 1:1, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养, 每日观察细胞形态变化, 培养 7 d, 100 个随机视野下, 双盲法分别计数各组在相差显微镜下克隆球形成的数目, 并随机选取 20 个视野并用目镜测微尺测量每个视野所有神经球的平均直径(每个神经球的直径 = 横径/2 + 垂直径/2), 取均值, 进行统计学分析。观察后, 两组均用 5% 血清诱导培养 NSCs 7 d, 行 β -微管蛋白-III 免疫荧光染色, Hoechst 核染色, 随机取 20 个视野, 在显微镜下计算神经元/细胞总数得出百分率, 并进行统计学分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较使用 *t* 检验。

2 结果

2.1 EPCs 分离、培养及鉴定结果 新分离出的骨髓单个核细胞呈圆形, 体积较小, 见图 1A; 48 h 待细胞贴壁紧密后首次换液, 移除悬浮细胞, 首次换液后细胞生长加快, 可见纺锤形、三角形、圆形等不同形态的细胞, 见图 1B; 第 7 天可见 EPCs 的形态特征, 以梭形细胞为主, 见图 1C; 第 9~10 天, 细胞迅速增殖, 融合度达到 80%~90%, 可见细胞集落及线状结构形成, 见图 1D; 第 12~14 天, 大部分细胞

呈多角形,微血管样生长,见图 1E、F。EPCs 免疫荧光化学染色结果:骨髓源性单个核细胞体外培养 8 d 时,行免疫荧光化学检测细胞表面抗原 CD133 及 VEGFR-2 表达情况,Hoechst 核染色,见图 2A; CD133 染色的细胞表面呈红色荧光,见图 2B; VEGFR-2 染色的细胞呈绿色,见图 2C;大部分细胞呈双阳性,表明该细胞为 EPCs。Dil-Ac-LDL 与 FITC-UEA-1 检测:倒置荧光显微镜下观察并拍照,Dil-Ac-LDL 细胞摄取呈红色,见图 2D; FITC-UEA-1 呈绿色,见图 2E。

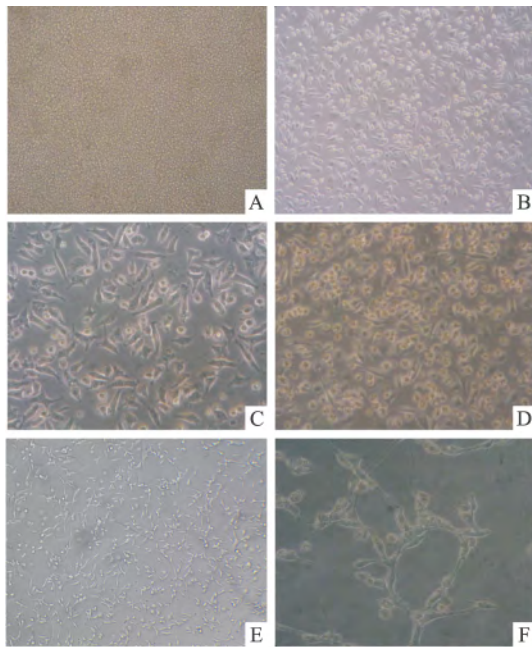


图 1 EPCs 培养过程中的形态

A: 骨髓单个核细胞 ×100; B: 原代 EPCs 3 d 时的形态 ×200; C: 原代 EPCs 7 d 时的形态 ×400; D: EPCs 的细胞集落 ×200; E: EPCs 微血管样生长 ×100; F: EPCs 构成的管状结构 ×400

2.2 NSCs 分离、培养及鉴定结果 新鲜分离的单个 NSCs 呈圆形,悬浮状,折光性较好,分散存在 2 d 后细胞逐渐聚集生长形成 5~7 个细胞的细胞团,培养 7 d 增大至典型的球形(神经球),由数百个细胞构成,悬浮生长于培养基中,见图 3A;原代培养 7~9 d 受周围杂细胞及死亡细胞释放毒性物质的影响,细胞球中央细胞折光性逐渐减弱、周边边境清晰,细胞生长速度较慢,此时机械吹打分离,进行细胞传代,传代后细胞增殖加快,形成的神经球形状规则,呈球形悬浮生长,收集生长状态良好的第 3 代神经球,Hoechst 标记细胞核,见图 3B,行抗 Nestin 抗体染色,见图 3C。

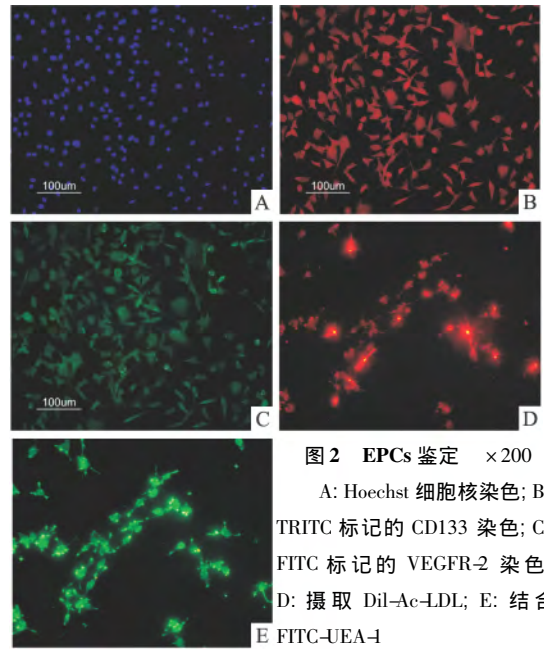


图 2 EPCs 鉴定 ×200

A: Hoechst 细胞核染色; B: TRITC 标记的 CD133 染色; C: FITC 标记的 VEGFR-2 染色; D: 摄取 Dil-Ac-LDL; E: 结合 FITC-UEA-1

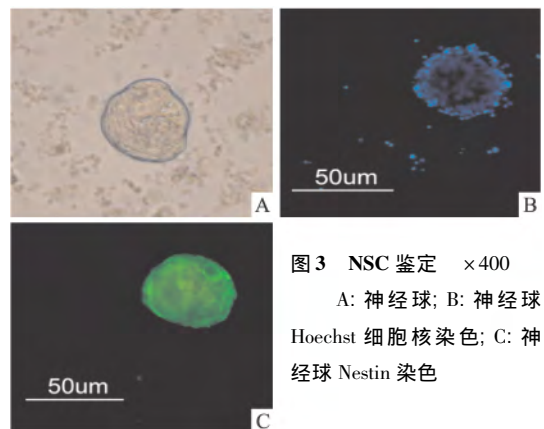


图 3 NSC 鉴定 ×400

A: 神经球; B: 神经球 Hoechst 细胞核染色; C: 神经球 Nestin 染色

2.3 两组 NSCs 增殖及分化结果 倒置显微镜下观察两组 NSCs 神经球数及球直径的变化,NSCs 接种后呈单细胞悬浮生长,2 d 后,两组 NSCs 逐渐聚集形成神经球,但神经球数量及直径无明显区别,4~5 d 后,共培养组神经球数比对照组明显多,而且球直径明显增大,于培养 7 d 后 100 倍视野下观察,共培养组神经球数比对照组继续增多,球直径继续增大,每组 100 个随机视野下双盲法分别计数各组在相差显微镜下神经球形成的数目,共培养组为 (22.27 ± 3.85) 个,对照组为 (13.77 ± 2.97) 个,两组比较差异有统计学意义 ($t = 17.463, P < 0.01$);并随机选取 20 个视野并用目镜测微尺测量每个视野所有神经球的平均直径,共培养组为 $(61.70 \pm 7.21) \mu\text{m}$,对照组为 $(41.60 \pm 4.10) \mu\text{m}$,两组比较差异有统计学意义 ($t = 10.846, P < 0.01$)。两组观察后 5% 血清诱导培养 NSCs 7 d 后,Hoechst 核染色,

行 β -微管蛋白-III 免疫荧光染色 随机取个 20 视野, 在显微镜下计算神经元/细胞总数得出百分率, 共培养组为 $(46.10 \pm 3.70)\%$, 对照组为 $(16.95 \pm 3.66)\%$, 两组比较差异有统计学意义 ($t = 25.046$ $P < 0.01$)。见图 4。

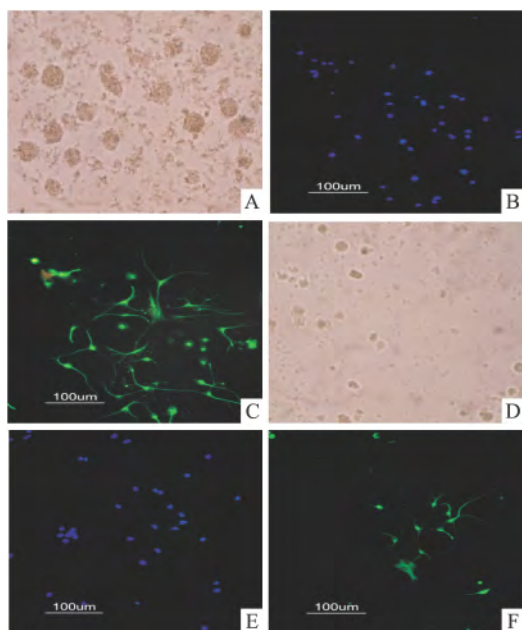


图 4 NSC 增殖及分化 $\times 200$

1: 共培养组; 2: 对照组; A: NSCs 7 d 形成的神经球; B: NSCs 分化 Hoechst 细胞核染色; C: 神经元 β -tubulin-III 染色

3 讨论

脊髓损伤后引起一次机械性组织损伤和二次化学性变性, 其中二次变性中关键的是血管的丢失, 血流减少引起组织的缺氧、水肿及炎症细胞的渗透, 造成内环境的严重破坏, 微环境的破坏不利于脊髓内源性神经生发和轴突再生^[3, 40]。调节 NSCs 分化的分子机制尚不太清楚, 目前研究^[11-13]表明, 除了 NSCs 固有性状外, 其外在的微环境包括生长因子、细胞因子及细胞间接触等在 NSCs 增殖分化过程中都扮演了重要角色。NSCs 所处的微环境主要由 5 种细胞构成: NSCs、传递放大细胞、神经母细胞、室管膜细胞和血管内皮细胞, 室管膜细胞被认为是一种潜在的内源性 NSCs, 血管内皮细胞则起着重要的营养支持作用^[4]。

EPCs 能够分泌多种细胞因子如 BDNF、VEGF、IGF 等均被证明能够促进神经生发^[11-13]。EPCs 是一种异质性的细胞群体, 主要来源于骨髓复杂的前

体细胞, 并以不同的分化阶段存在于外周循环中, 骨髓中 EPCs 的含量远超过外周血, 骨髓源性的 EPCs 能以血管发生的方式参与出生后的生理与病理性的血管形成, 作为内皮细胞的前体细胞, 能够选择性地归巢受损或者缺血部位, 参与局部的血管发生, 从而形成血管, 促进内皮的修复。

脊髓损伤后骨髓源性 EPCs 的移植能够促进局部新生血管的形成以及反应性星形胶质细胞聚集, 减少炎症细胞渗透^[10]。在体外分离获得脊髓损伤后出现的反应性星形胶质细胞, 发现其具备 NSCs 的特点, 并能够分化为神经元, 脊髓损伤后反应性星形胶质细胞大量增加^[14], 能够广泛表达 VEGF 受体-3^[15], 而 VEGF 又有明确的促神经生发作用^[12], EPCs 主要表达的细胞因子就是 VEGF, 这就充分利用反应性星形胶质细胞的 NSCs 特性将解决内源性 NSCs 的数量问题。

由于骨髓源性 EPCs 与骨髓源性 NSCs 两种细胞的增殖周期及生长特性不同, 本实验采用 Transwell 经典共培养系统, 两者比例为 1:1, 接种细胞浓度为 1×10^5 /ml, 并设立对照组。7 d 后, 高倍镜下共培养组神经球数量比对照组明显多, 而且直径更大; EPCs 共培养 NSCs 分化的结果提示: 共培养组 β -tubulin-III 阳性率为 46.10%, 对照组 β -tubulin-III 阳性率为 16.95%。与对照 NSCs 组相比, 共培养组 EPCs 明显促进 NSCs 的增殖及其向神经元分化。这可能与 EPCs 作为内皮细胞的前体细胞能够分泌 VEGF、BDNF、IGF、PEDF 型胶原等多种细胞生长因子, 通过 Transwell 小室中细胞不能通过聚碳酸酯膜作用于 NSCs, 这种调控相对于加细胞因子更具有安全性和持久性, 为 NSCs 提供合适的微环境, 促进 NSCs 的增殖及其向神经元分化。但两者之间主要作用机制有待进一步验证。

参考文献

- [1] Pluchino S, Cusimano M, Bacigaluppi M, et al. Remodelling the injured CNS through the establishment of atypical ectopic perivascular neural stem cell niches [J]. Arch Ital Biol, 2010, 148(2): 173-83.
- [2] Jin K, Xie L, Mao X, et al. Effect of human neural precursor cell transplantation on endogenous neurogenesis after focal cerebral ischemia in the rat [J]. Brain Res, 2011, 1374: 56-62.
- [3] Burdick J A, Vunjak-Novakovic G. Engineered microenvironments for controlled stem cell differentiation [J]. Tissue Eng Part A, 2009, 15(2): 205-19.

- [4] Goldberg J S , Hirschi K K . Diverse roles of the vasculature within the neural stem cell niche [J]. *Reg Med* ,2009 ,4(6) : 879 –97.
- [5] Di Stefano R , Barsotti M C , Armani C , et al . Human peripheral blood endothelial progenitor cells synthesize and express functionally active tissue factor [J]. *Thromb Res* ,2009 ,123(6) : 925 –30.
- [6] Asahara T , Murohara T , Sullivan A , et al . Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis [J]. *Science* ,1997 ,275(5302) : 964 –7.
- [7] Amini A R , Laurencin C T , Nukavarapu S P . Differential analysis of peripheral blood- and bone marrow-derived endothelial progenitor cells for enhanced vascularization in bone tissue engineering [J]. *J Orthop Res* ,2012 ,30(9) : 1507 –15.
- [8] Yin Z S , Zhang H , Wang W , et al . Wnt-3a protein promote neuronal differentiation of neural stem cells derived from adult mouse spinal cord [J]. *Neurol Res* ,2007 ,29(8) : 847 –54.
- [9] Teng H , Zheng Z G , Wang L , et al . Coupling of angiogenesis and neurogenesis in cultured endothelial cells and neural progenitor cells after stroke [J]. *J Cereb Blood Flow Metab* ,2008 ,28(4) : 764 –71.
- [10] Kamei N , Kwon S M , Kawamoto A , et al . Contribution of bone marrow-derived endothelial progenitor cells to neovascularization and astrogliosis following spinal cord injury [J]. *J Neurosci Res* ,2012 ,90(12) : 2281 –92.
- [11] Horne M K , Nisbet D R , Forsythe J S , et al . Three-dimensional nanofibrous scaffolds incorporating immobilized BDNF promote proliferation and differentiation of cortical neural stem cells [J]. *Stem Cells Dev* ,2010 ,19(6) : 843 –52.
- [12] Sun Y , Jin K , Childs J T , et al . Vascular endothelial growth factor-B (VEGFB) stimulates neurogenesis: evidence from knockout mice and growth factor administration [J]. *Dev Biol* ,2006 ,289(2) : 329 –35.
- [13] Lunn J S , Pacut C , Backus C , et al . The pleiotropic effects of insulin-like growth factor-I on human spinal cord neural progenitor cells [J]. *Stem Cells Dev* ,2010 ,19(12) : 1983 –93.
- [14] Buffo A , Rite I , Tripathi P , et al . Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* ,2008 ,105(9) : 3581 –6.
- [15] Shin Y J , Choi J S , Choi J Y , et al . Induction of vascular endothelial growth factor receptor-3 mRNA in glial cells following focal cerebral ischemia in rats [J]. *J Neuroimmunol* ,2010 ,229(1–2) : 81 –90.

The effects of bone marrow-derived endothelial progenitor cells on the proliferation and differentiation of spinal cord-derived neural stem cells

Zhang Shuo¹ , Du Yibin² , Du Gongwen² , et al

¹Dept of Orthopaedics , The Fourth Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230022;

²Dept of Orthopaedics , The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the effects of bone marrow-derived endothelial progenitor cells(EPCs) on the proliferation and differentiation of spinal cord-derived neural stem cells(NSCs) . **Methods** Bone marrow mononuclear cells were isolated by density gradient centrifugation methods and EPCs were cultured by EBM-2 basal medium , identified by fluorescent immunocytochemistry. Spinal cord-derived NSCs were isolated , cultured and identified by the mature methods. 1×10^5 /ml tertiary NSCs were plated on the base of culture wells , the upper transwell compartment was seeded with 1×10^5 /ml primary EPCs , EPCs and NSCs (1 : 1) were co-cultured *in vitro* , set the untreated tertiary NSCs as a control group. 7 days after co-culture , the number and diameter of neurospheres were calculated and measured with the double blind method. After that , NSCs were maintained for 7 days in DMEM/F12 + 5 % serum medium , and immunochemically stained with neuronal specific marker β -tubulin-III , ratio of positive cells to total cells was calculated. **Results** The average number of neurospheres in co-culture group was (22.27 ± 3.85) and the average diameter was $(61.70 \pm 7.21) \mu\text{m}$. The percentage of neurons immunostaining was $(46.10 \pm 3.70) \%$, differences are statistical significance compared with the control group ($P < 0.01$) . **Conclusion** Bone marrow-derived EPCs promote the proliferation of spinal cord-derived NSCs and induce the differentiation of spinal cord-derived neural stem cells into neurons.

Key words neural stem cells; endothelial progenitor cells; proliferation; differentiation; niche; spinal cord injury