

# 条件培养基对神经干细胞增殖与分化作用的影响

杨 昆<sup>1</sup>,申才良<sup>1</sup>,宋旆文<sup>1</sup>,刘晓颖<sup>2</sup>,徐 鹏<sup>1</sup>,张 峰<sup>1</sup>

**摘要** 目的 观察大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)条件培养基对体外培养神经干细胞(NSCs)增殖与分化作用的影响。方法 用BMSCs条件培养基分别在增殖与分化条件下培养NSCs,观察NSCs形态变化。用MTT法及NSCs球数目和直径的统计分析了解NSCs增殖情况,同时行免疫荧光及Western blot法鉴定其分化情况。结果 原代培养获得大量未分化且悬浮生长的NSCs球,并能分化为神经元细胞、星形胶质细胞及少突胶质细胞。BMSCs条件培养基组能够促进NSCs球的吸附贴壁,但与对照组相比光密度(OD)值差异无统计学意义,NSCs球数目和直径差异亦无统计学意义。另外,BMSCs条件培养基组少突胶质细胞特异性蛋白MBP表达量高于对照组( $P < 0.05$ ),星形胶质细胞特异性蛋白GFAP表达量低于对照组( $P < 0.05$ ),而神经元特异性蛋白MAP-2表达量未见明显异常。结论 大鼠BMSCs条件培养基促进NSCs向少突胶质细胞方向分化,但不抑制其增殖作用。

**关键词** 骨髓间充质干细胞;条件培养基;神经干细胞;增殖;分化

中图分类号 R 363

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)06-0735-05

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)是一类分布于神经系统,具有自我更新并拥有多向分化潜能的干细胞,其主要分化为星形胶质细胞、神经元细胞及少突胶质细胞,替代受损的神经组织从而起到治疗脊髓损伤的作用<sup>[1-2]</sup>。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)属于成体干细胞的一种,不仅具有成骨、成脂等多向分化潜能,还能分泌多种神经营养因子<sup>[3]</sup>,近年来利用BMSCs与NSCs共培养技术治疗脊髓损伤已成为研究热点。有报道<sup>[4]</sup>指出,BMSCs与NSCs共移植治疗神经损伤疗效优于单纯移植NSCs,说明BMSCs为NSCs的生长与分化提供了一个更加合适的微环境。然而,是BMSCs本身还是其分泌的营养因子发挥了

作用仍值得探讨。该研究利用富含营养因子的BMSCs条件培养基体外培养NSCs,去除BMSCs本身的影响,能够充分了解BMSCs条件培养基对NSCs增殖与分化的影响,为BMSCs条件培养基的应用提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 新生24 h内SD大鼠1只,雌雄不限;4~5周龄SD大鼠1只,100~120 g,购自安徽医科大学实验动物中心。

1.1.2 实验试剂及仪器 DMEM/F12培养基(美国Gibco公司);DMEM低糖、南美胎牛血清(美国HyClone公司);B-27(美国Invitrogen公司);表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)(美国PeproTech公司);小鼠抗大鼠巢蛋白(Nestin)抗体、兔抗大鼠胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)抗体、小鼠抗大鼠微管相关蛋白-2(microtubule-associated protein-2, MAP-2)(美国Santa Cruz公司);小鼠抗大鼠髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)(英国Abcam公司);FITC标记的山羊抗小鼠IgG、TRITC标记的山羊抗兔IgG、TritonX-100(北京中杉金桥生物技术有限公司);CD29-PE、CD90-PE、CD34-FITC、CD44-FITC(美国BioLegend公司);多聚赖氨酸(美国Sigma公司);MTT试剂盒、胰酶、免疫荧光稀释液、多聚甲醛、Hoechst 33342、青链霉素( $\times 100$ )(上海碧云天生物技术有限公司);山羊血清(中国武汉博士德公司);ECL显示试剂盒(美国Pierce公司);CO<sub>2</sub>恒温培养箱(美国SHEL LAB);倒置显微镜CKX41(日本Olympus公司);流式细胞仪(美国BD FACSVerser<sup>TM</sup>);荧光显微镜DMI6000型(德国Leica公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 大鼠BMSCs体外分离、培养、鉴定 采用本课题组前期的实验方法<sup>[5]</sup>从大鼠骨髓中分离并培养出BMSCs,取生长良好的第3代BMSCs,胰酶消化后制成单细胞悬液,计数,参照之前的方法,行细胞表面标记CD90、CD34、CD29的流式细胞仪检测。

2015-03-11 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81472088)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学第一附属医院脊柱外科,合肥 230022

<sup>2</sup>安徽医科大学生命科学院生物学系,合肥 230032

作者简介:杨 昆,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

**1.2.2 大鼠 BMSCs 条件培养基的制备** 取第 3 代生长良好的 BMSCs,待细胞长至约 90 % 密度时,弃去原培养基,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;加入 DMEM/F12 培养基继续培养 48 h 后,收集浓缩上清液,按前期实验比例配制成 NSCs 增殖与分化条件培养基。

**1.2.3 大鼠 NSCs 的分离、培养、鉴定** 取新生 24 h SD 大鼠幼鼠,处死后置于 75% 酒精浸泡 5 min;在无菌条件下分离出大脑半球,剪碎,加入 0.25% 胰酶消化 10 min,轻轻吹打混匀后经筛网过滤成单细胞悬液;加入增殖培养基(DMEM/F12 + 2% B27 + 20 ng/ml bFGF + 20 ng/ml EGF + 链霉素 0.1 mg/ml + 青霉素 100 U/ml),600 r/min 离心 5 min 2 次,弃上清液;吹打混匀后以  $3 \times 10^5$  /ml 接种于培养瓶中,置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,每 3 d 半定量换液 1 次,培养 7 d 后传代。

取第 2 代培养 7 d 的细胞球,600 r/min 离心 5 min,弃上清液,接种于经 0.1 mg/ml 多聚赖氨酸包被盖玻片的 6 孔板中,置于 37 ℃ 培养箱 6 h,使悬浮干细胞贴壁。用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;4% 多聚甲醛固定后,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。在含 0.3% TritonX-100 中孵育 10 min,PBS 洗 3 次后,加入正常山羊血清封闭液,置于 37 ℃ 细胞培养箱内孵育 1 h 后,加入 1:50 稀释 Nestin 一抗,4 ℃ 条件下孵育过夜。次日常温下放置 2 h,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,加入 1:100 稀释 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG,37 ℃ 细胞培养箱内避光孵育 1 h。最后行 Hoechst 溶液核染后封片,荧光显微镜下观察、拍照。

**1.2.4 大鼠 NSCs 分化及分化后鉴定** 取第 2 代培养 7 d 的 NSCs 球,600 r/min 离心 5 min,弃上清液;加入分化培养基(DMEM/F12 + 2% B27 + 链霉素 0.1 mg/ml + 青霉素 100 U/ml + 10% FBS),吹打混匀后,接种于经 0.1% 多聚赖氨酸包被盖玻片的 6 孔板中;置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 1 周,每 3 d 半定量换液 1 次。1 周后,参照上述免疫荧光方法,行神经元特异性蛋白 MAP-2、星形胶质细胞特异性蛋白 GFAP、少突胶质细胞特异性蛋白 MBP 的免疫荧光染色。

**1.2.5 大鼠 BMSCs 条件培养基在增殖情况下对大鼠 NSCs 增殖的影响** 取第 2 代培养 7 d 生长良好的 NSCs,600 r/min 离心 5 min,吹打均匀。实验组换用 BMSCs 条件培养基在增殖条件下放入 96 孔板中培养,每孔细胞数约  $2 \times 10^4$  个,对照组放入 96 孔

板中继续增殖培养基培养。分别在培养 1、3、5 d 时,每次每组取 6 孔行 MTT 检测,利用细胞生长曲线的绘制,了解大鼠 BMSCs 条件培养基在增殖条件下对 NSCs 的影响。MTT 检测:每孔加入  $5 \times 10^{-3}$  g/ml 的 MTT 溶液 20  $\mu$ l,置于 37 ℃ 温箱 4 h 后取出,弃上清液;每孔加入 DMSO 150  $\mu$ l,振荡 10 min 混匀后,用酶标仪测定光密度(optical density,OD)值;每个样品取 6 孔,算出平均值后绘制曲线。

另外,取第 2 代培养 7 d 生长良好的 NSCs 接种至 6 孔板中,每孔接种细胞数为  $1 \times 10^6$ ,培养方法同上,观察细胞形态变化。在培养第 5 天时,实验组与对照每组取 3 孔,在显微镜下( $\times 100$ ),按照双盲法,每次每组各取 10 个视野对 NSCs 球进行计数,同时每组选取 10 个细胞球利用 Image J 图像处理软件测量其直径(直径的最大值/2 + 最小值/2)。

**1.2.6 大鼠 BMSCs 条件培养基在分化情况下对大鼠 NSCs 分化的影响** 取第 2 代培养 7 d 的 NSCs 球,600 r/min 离心 5 min,弃上清液,重悬后计数,接种于经 0.1% 多聚赖氨酸包被盖玻片的 6 孔板中,每孔细胞数约  $1 \times 10^6$ 。实验组换用大鼠 BMSCs 条件培养基在分化条件下培养,对照组在无条件培养基条件下分化。置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 1 周,每 3 d 半定量换液 1 次。1 周后,分别提取分化后细胞总蛋白并测定蛋白浓度,根据蛋白浓度选择上样量,依次行电泳、转膜、封闭;加一抗于 4 ℃ 孵育过夜,次日洗膜,加入相应蛋白二抗,室温孵育 2 h,充分洗涤后显影、定影。所使用抗体及稀释度:MAP-2(小鼠单抗,1:200 稀释),GFAP(兔多抗,1:500 稀释),MBP(小鼠单抗,1:500 稀释), $\beta$ -actin(小鼠单抗,1:1 000 稀释),二抗(山羊抗鼠,1:5 000 稀释;山羊抗兔,1:5 000 稀释)。胶片扫描后采用 Image J 软件分析各组条带的灰度值。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS 11.0 统计软件进行分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示;两组间均数比较采用独立样本 *t* 检验,组间差异采用单因素方差分析;所有实验每次至少 3 组,独立重复 3 次。

## 2 结果

**2.1 大鼠 NSCs 细胞的培养及鉴定** 原代细胞接种于培养瓶后,光镜下呈单细胞悬浮状态,边界清楚。2~3 d 后,逐渐分裂成小细胞球,悬浮生长,随着时间增加,细胞球逐渐增大,大多成球状。培养至 7 d 左右,部分细胞球中心出现颜色变暗,折光性差。遂进行传代培养,传代后细胞球形态与原代相

似(图 1A)。将第 2 代培养 7 d 的细胞球后行免疫荧光染色,结果示贴壁细胞中大多表达 Nestin 阳性细胞(图 2A)。

**2.2 大鼠 NSCs 分化培养及分化后鉴定** 第 2 代培养 7 d 的 NSCs 球接种于 0.1% 多聚赖氨酸包被的载玻片后,细胞球逐渐贴壁,6 h 后即可见部分细胞球形态已发生改变,外周有细胞迁出现象(图 1B)。迁出细胞很快发生分化,并随着培养时间延长,突触逐渐增多、增长,与周围细胞交织成网状。分化至第 7 天,光镜下示细胞球向周边放射状生长,交织更紧密,间隙更窄(图 1C、D)。免疫荧光可见 GFAP 阳性的星形胶质细胞(图 2B)、MBP 阳性的少突胶质细胞(图 2C)及 MAP-2 阳性的神经元细胞(图 2D),该结果也进一步说明培养出了具有多向分化功能的干细胞。

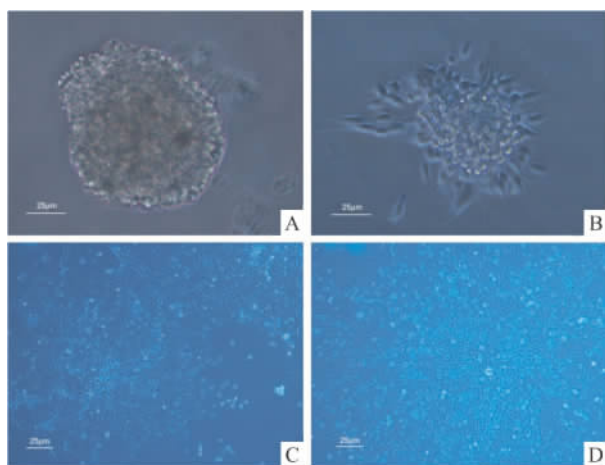


图 1 NSCs 原代培养及分化

A:原代培养 NSCs 5 d×400;B:NSCs 分化 6 h×400;C:NSCs 分化 3 d×200;D:NSCs 分化 7 d×200

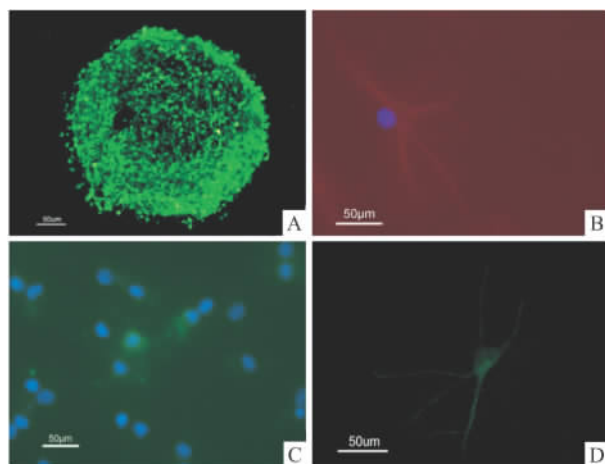


图 2 NSCs 分化及分化后鉴定

A:NSCs 特异性 Nestin 染色,阳性×200;B:NSCs 分化 7 d GFAP 染色,阳性×400;C:NSCs 分化 7 d MBP 染色,阳性×400;D:NSCs 分化 7 d MAP-2 染色阳性×400

**2.3 大鼠 BMSCs 条件培养基在增殖情况下对大鼠 NSCs 增殖的影响** 接种 NSCs 悬液于 96 孔板后,分别在培养 1、3、5 d 时,每次每组取 6 孔行 MTT 检测,绘制细胞生长曲线。见图 3。大鼠 BM-SCs 条件培养基在增殖情况下对大鼠 NSCs 增殖无明显抑制作用,差异无统计学意义(实验组与对照组相比第 1 天: $t = 0.297, P = 0.781$ ;第 3 天: $t = 0.561, P = 0.605$ ;第 5 天: $t = 2.283, P = 0.085$ )。实验组细胞 24 h 后贴壁并逐渐有突起伸出,而对照组细胞一直呈悬浮状态生长。见图 4。另外,实验组与对照组培养 5 d 后行 NSCs 球数目及直径统计,利用 Image J 软件进行图像处理,结果显示镜下(×100)实验组细胞球数量及直径均略大于对照组,但两组间差异均无统计学意义,见表 1。

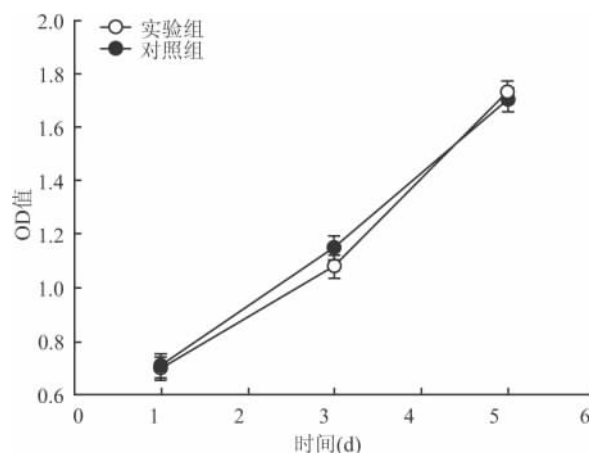


图 3 BMSCs 条件培养基对 NSCs 增殖的影响

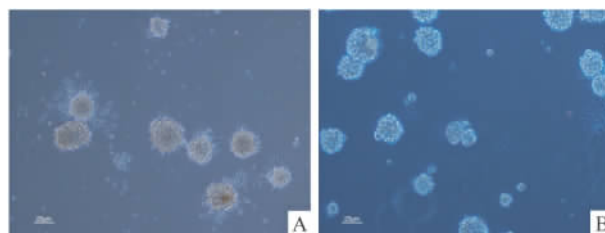


图 4 培养第 1 天 BMSCs 条件培养基在增殖情况下对 NSCs 的影响×100

A:实验组;B:对照组

表 1 NSCs 球增殖情况( $\bar{x} \pm s$ )

| 项目                  | 实验组              | 对照组              | $t$ 值 | $P$ 值 |
|---------------------|------------------|------------------|-------|-------|
| 数目(个)               | $14.26 \pm 2.16$ | $13.58 \pm 2.57$ | 1.115 | 0.270 |
| 直径( $\mu\text{m}$ ) | $50.04 \pm 1.82$ | $49.42 \pm 2.62$ | 1.918 | 0.057 |

**2.4 大鼠 BMSCs 条件培养基在分化情况下对大鼠 NSCs 分化的影响** 第 2 代培养 7 d 的 NSCs 球放入 6 孔板中分化 1 周后,提取蛋白行 Western blot 法检测,结果提示实验组少突胶质细胞特异性蛋白

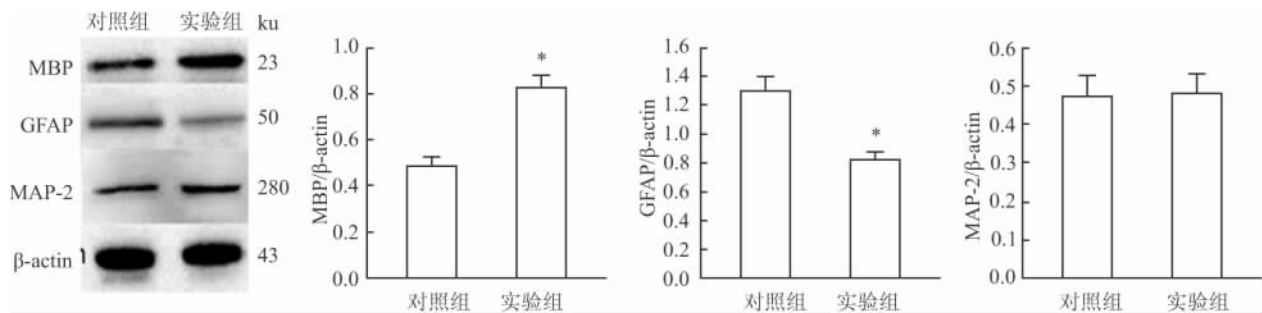


图5 Western blot 法检测 NSCs 分化后 MBP、GFAP、MAP-2 蛋白的表达情况  
与对照组比较: \*  $P < 0.05$

MBP 表达量高于对照组 ( $t = 7.906, P < 0.05$ ), 而星形胶质细胞特异性蛋白 GFAP 表达低于对照组 ( $t = 5.652, P < 0.05$ ), 两组神经元表面特异性蛋白 MAP-2 的表达的差异无统计学意义 ( $t = 1.502, P = 0.272$ ), 见图 5。

### 3 讨论

该实验通过 MTT 法对细胞增殖及 Western blot 法对特异性蛋白的检测及差异性分析, 结果表明 BMSCs 条件培养基对 NSCs 的增殖无明显抑制作用; 但能够促进 NSCs 向少突胶质细胞分化, 抑制其向星形胶质细胞分化, 并对向神经元分化无明显影响。

MTT 法是经典的评估细胞增殖的方法, 通过测定实验组与对照组分别在第 1、3、5 天的 OD 值, 描绘出细胞增殖曲线并通过统计学分析得出实验组与对照组差异无统计学意义, 从而说明 BMSCs 条件培养基对 NSCs 增殖无明显抑制作用。而通过形态学发现, 24 h 后实验组开始贴壁并有突起伸出, 但对照组仍呈悬浮状态, 说明 BMSCs 条件培养基中可能含有某种成分能干预 NSCs 球的稳定, 使干细胞能迁移出来<sup>[8]</sup>。培养 5 d 后, 测量两组细胞球数目及直径大小, 分析得出二者差异仍无统计学意义, 更进一步说明 BMSCs 条件培养基对 NSCs 的增殖无明显抑制作用。因此, 可以推测 BMSCs 条件培养基与 NSCs 共移植治疗脊髓损伤时, 可能会促进 NSCs 球的解聚使干细胞迁移出来到达神经损伤处更好的发挥作用而不影响 NSCs 的增殖<sup>[8]</sup>。

NSCs 移植治疗脊髓损伤时, NSCs 的分化方向也同样起到了重要作用, 并参与决定了细胞移植治疗的效果<sup>[9]</sup>。已有文献<sup>[1-2]</sup>报道, NSCs 主要分化为神经元细胞、少突胶质细胞和星形胶质细胞, 而其中对脊髓损伤治疗起主要作用的是神经元细胞和少突

胶质细胞<sup>[9]</sup>。神经元细胞能有效地修复损伤的脊髓组织, 重新建立神经间的连接, 而少突胶质细胞是中枢神经系统髓鞘形成细胞, 在 NSCs 自然分化中所含比例最少<sup>[8]</sup>, 其主要作用是形成髓鞘包裹轴突促进电传导, 对神经损伤的修复亦有重要作用<sup>[9]</sup>。相反, 星形胶质细胞虽然是中枢神经系统中含量最多的一种细胞, 但由于其一方面抑制其他细胞分化, 另一方面导致脊髓损伤处瘢痕组织的增生<sup>[10]</sup>, 从而使得其他细胞如少突胶质细胞不能充分发挥作用。该实验通过对分化后蛋白行 Western blot 法检测, 结果表明 BMSCs 条件培养基在分化条件下能够促进 NSCs 向少突胶质细胞分化, 减少星形胶质细胞分化, 而对神经元分化无明显作用, 与 Li et al<sup>[11]</sup> 研究结果较一致。

该实验收集的培养基中完全去除 BMSCs, 排除了 BMSCs 本身的干扰, 从而更加直接的研究 BMSCs 条件培养基的对 NSCs 的影响, 但作用机制仍不清楚。Rivera et al<sup>[12]</sup> 指出 NSCs 可能先分化为神经元细胞和 A2B5 阳性祖细胞, A2B5 阳性祖细胞再分化为少突胶质细胞及星形胶质细胞, BMSCs 条件培养基中可能存在一种或多种细胞因子能够促进 A2B5 阳性祖细胞内少突胶质细胞化生长基因 Olig 的表达而降低抑制其生长的 Id2 基因的表达<sup>[13]</sup>, 从而导致少突胶质前体细胞含量增加, 这也可能是实验组与对照组神经元标志蛋白 MAP-2 表达量差异无统计学意义的原因。另外, 研究<sup>[14]</sup>进一步表明 BMSCs 条件培养基还能继续促进少突胶质前体细胞内少突胶质细胞成熟转录因子 GTX/Nkx6.2 的表达而使得少突胶质细胞含量增加, 且实验显示现睫状生长因子有类似作用, 但具体机制仍不清楚。

综上所述, BMSCs 条件培养基为 NSCs 的增殖与分化提供了一个合适的微环境, 而此种微环境不但能够促进 NSCs 向少突胶质细胞分化与成熟<sup>[13]</sup>,

而且能够促进 NSCs 球的解离迁移<sup>[6]</sup>,这可能也是 NSCs 和 BMSCs 条件培养基共培养体系治疗脊髓损伤的原因之一。本实验虽然证明了 BMSCs 条件培养基发挥上述作用,但具体何种因子及其发挥作用的机制仍不清楚,需后期实验进行研究。另外,本实验结果表明 BMSCs 条件培养基在体外对 NSCs 的增殖与分化产生了上述作用,但脊髓损伤后内环境错综复杂,共培养体系在体内能否产生上述积极作用,还需下一步动物实验证明。

### 参考文献

- [1] Tarasenko Y I, Gao J, Nie L, et al. Human fetal neural stem cells grafted into contusion-injured rat spinal cords improve behavior [J]. *J Neurosci Res*, 2007, 85(1): 47-57.
- [2] Dobkin B H. Recommendations for publishing case studies of cell transplantation for spinal cord injury [J]. *Neurorehabil Neural Repair*, 2010, 24(8): 687-91.
- [3] Neuhoff S, Moers J, Rieks M, et al. Proliferation, differentiation, and cytokine secretion of human umbilical cord blood-derived mononuclear cells *in vitro* [J]. *Exp Hematol*, 2007, 35(7): 1119-31.
- [4] Bai L, Caplan A, Lennon D, et al. Human mesenchymal stem cells signals regulate neural stem cell fate [J]. *Neurochem Res*, 2007, 32(2): 353-62.
- [5] 宋旆文, 徐 鹏, 申才良, 等. 条件培养基培养神经干细胞的体外实验研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(5): 598-602.
- [6] 陈 玉, 吴秦浩, 李舍予, 等. 人骨髓间充质干细胞对小鼠神经干细胞增殖与分化培养的影响 [J]. *四川大学学报*, 2009, 46(1): 211-6.
- [7] Sabelström H, Stenudd M, Frisén J. Neural stem cells in the adult spinal cord [J]. *Exp Neurol*, 2014, 260: 44-9.
- [8] Vescovi A L, Parati E A, Gritti A, et al. Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human neural stem cell lines by epigenetic stimulation [J]. *Exp Neurol*, 1999, 156(1): 71-83.
- [9] Bruce C C, Zhao C, Franklin R J. Remyelination-An effective means of neuroprotection [J]. *Horm Behav*, 2010, 57(1): 56-62.
- [10] 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.
- [11] Li Q M, Fu Y M, Shan Z Y, et al. MSCs guide neurite directional extension and promote oligodendrogenesis in NSCs [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 384(3): 372-7.
- [12] Rivera F J, Couillard-Despres S, Pedre X, et al. Mesenchymal stem cells instruct oligodendrogenic fate decision on adult neural stem cells [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(10): 2209-19.
- [13] Steffenhagen C, Dechant F X, Oberbauer E, et al. Mesenchymal stem cells prime proliferating adult neural progenitors toward an oligodendrocyte fate [J]. *Stem Cells Dev*, 2012, 21(11): 1838-51.
- [14] Rivera F J, Kandasamy M, Couillard-Despres S, et al. Oligodendrogenesis of adult neural progenitors: differential effects of ciliary neurotrophic factor and mesenchymal stem cell derived factors [J]. *J Neurochem*, 2008, 107(3): 832-43.
- [15] Jadasz J J, Kremer D, Cöttele P, et al. Mesenchymal stem cell conditioning promotes rat oligodendroglial cell maturation [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e71814.

## Effects of conditioned medium on the proliferation and differentiation of neural stem cells

Yang Kun, Shen Cailiang, Song Peiwen, et al

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

**Abstract Objective** To observe the effects of conditioned medium from rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) on the proliferation and differentiation of neural stem cells (NSCs) *in vitro*. **Methods** The NSCs were cultured with conditioned medium from BMSCs (BMSC-CM) under the condition of proliferation and differentiation respectively and shape variation of NSCs was observed. Then the proliferation of NSCs was analyzed by MTT, counting and diameter measurement of neurospheres; at the same time immunofluorescence and Western blot were used to identify their differentiation. **Results** A mass of neurospheres were obtained and cultured in suspension, those NSCs could differentiate into neurons, astrocytes and oligodendrocytes. The group of BMSC-CM promoted adhesion of neurospheres, but there was no obvious difference in OD value, the number and diameter of neurospheres compared with the control group. In addition, BMSC-CM could promote the expression of MBP ( $P < 0.05$ ), reduce the expression of GFAP ( $P < 0.05$ ) but had no effect on the expression of MAP-2. **Conclusion** BMSC-CM can promote NSCs toward an oligodendrocyte fate but does not inhibit the proliferation of the NSCs.

**Key words** bone marrow mesenchymal stem cells; conditioned medium; neural stem cells; proliferation; differentiation