

• 基础实验研究论著 •

严重颅脑损伤脑组织匀浆诱导人脐血 MSCs 成神经分化的实验研究

吕 品¹, 单桂秋¹, 张雅妮¹, 邓 均^{2△}, 郑峻松²(1. 广州军区广州总医院输血科, 广东广州 510010; 2. 第三军医大学
医学检验系临床检验学教研室, 重庆 400038)

摘要:目的 探讨严重颅脑损伤时的脑组织匀浆对人脐血间充质干细胞(MSCs)成神经分化的诱导能力。方法 制作小鼠严重颅脑损伤模型,取伤后 24 h 和正常小鼠脑组织匀浆,对体外培养的第 2 代 MSCs 进行诱导。诱导 3 d 后以荧光免疫细胞组化技术检测细胞内 NF 和 NeuN 的表达。结果 成功培养出人脐血 MSCs,成神经诱导后,严重损伤性脑组织匀浆诱导组 NF 和 NeuN 阳性率分别为(47.31±8.14)%和(58.91±8.12)%,高于正常脑组织匀浆诱导组阳性率($P<0.05$)。结论 脑组织匀浆可诱导人脐血 MSCs 向神经元样细胞分化,表达神经细胞特异标志分子 NF 和 NeuN,严重损伤性脑组织匀浆的诱导效果高于正常脑组织匀浆。

关键词:间质干细胞; 胎血; 颅脑损伤; 神经分化

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.18.003

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)18-2183-02

Study on severe brain injury induced by brain homogenates human umbilical
cord blood MSCs into neuronal differentiationLv Pin¹, Shan Guiqiu¹, Zhang Yani¹, Deng Jun^{2△}, Zheng Junsong²(1. Department of Blood Transfusion, General Hospital of Guangzhou Military Command
of PLA, Guangzhou, Guangdong 510010, China; 2. Department of Clinical Laboratory Science,
College of Medical Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore serious head injury when the brain homogenates of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells(MSCs) into the induction of neuronal differentiation. **Methods** Production in mice of severe traumatic brain injury model, take the injury after 24 h and normal mice brain tissue homogenates, induced by the 2nd generation of MSCs cultured in vitro. After induction of 3 days, immune cell staining was performed to detect intracellular expression of NF and NES. **Results** Human umbilical cord blood MSCs were successfully cultured. After neural induction, immunocytochemical analysis showed that positive rates of NF and NeuN of severe traumatic brain homogenates induced group were(47.31±8.14)% and (58.91±8.12)%, significantly higher than those of normal brain tissue homogenate induced group($P<0.05$). **Conclusion** Brain homogenates could induce differentiation of human umbilical cord blood MSCs to neuron-like cells, with expression of NF and NeuN. Induction effects of severe traumatic brain homogenates might be significantly higher than normal brain tissue homogenates.

Key words: mesenchymal stem cells; fetal blood; craniocerebral trauma; neuronal differentiation

颅脑外伤(TBI)是常见外伤之一,及时进行颅脑外科手术可有效控制病情和挽救患者生命,但患者脑功能的恢复十分困难,原因在于受损神经细胞极难再生^[1-4]。人脐血间充质干细胞(MSCs)具有多向分化能力,且取材方便、免疫排斥反应小,在中枢神经系统损伤后的功能恢复治疗中具有很好的应用前景。本研究通过建立小鼠严重颅脑撞击伤模型,以损伤后的脑组织匀浆模拟 TBI 损伤微环境,探讨其诱导人脐血 MSCs 向神经细胞分化的能力,以期严重颅脑外伤(STBI)的临床治疗提供新的方法和思路。

1 材料与方 法

1.1 脐血 MSCs 分离纯化 随机选择于广州军区广州总医院进行足月剖宫产的健康孕妇,孕妇及家属均签署《知情同意书》。无菌条件下取脐血 50~80 mL,以人淋巴细胞分离液分离单个核细胞, PBS 洗涤调整细胞密度至 1×10^6 /mL,接种于 MEM/F12(含 20%胎牛血清)培养基中, 5%CO₂、37℃培养箱培养,待细胞达 80%~90%融合时传代培养。

1.2 动物模型构建和诱导液制备 小鼠严重颅脑撞击伤模型的制作参照文献[5]。模型构建 24 h 后短颈处死小鼠,取损伤脑组织置于冰上,称湿重,按 100 g/L 加入培养基并制备脑组织匀浆,2 500 r/min 离心 5 min 后取上清液,经 0.22 μm 微孔

滤膜过滤后-70℃保存备用。正常脑组织取自健康小鼠,脑组织匀浆制作方法同上。

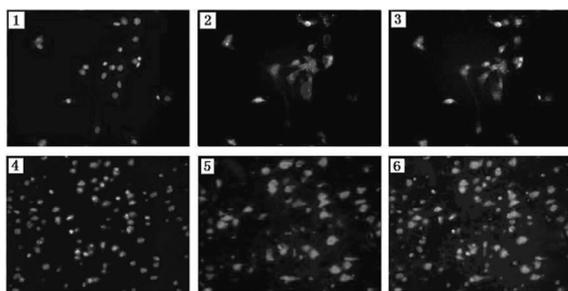
1.3 实验分组及荧光免疫细胞化学观察 实验分正常脑组织匀浆诱导组和 STBI 脑组织匀浆诱导组。诱导 3 d 后留取切片标本,常规荧光免疫细胞化学试验检测细胞胞浆内 NF 和核内 NeuN 的表达,计算 NF 和 NeuN 阳性率。

1.4 统计学处理 采用 SPSS12.0 软件进行统计分析,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组采用独立样本 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义, $P<0.01$ 为非常显著差异。

2 结 果

2.1 人脐血 MSCs 培养 成功培养人脐血 MSCs,接种 24 h 后,可见细胞贴壁生长,有短小突起伸出,2 d 后细胞突起延长且呈纺锤形,并逐渐有集落形成,8 d 后达 80%~90%融合,进行传代。传代后细胞生长加快且分布均一,呈典型 MSCs 漩涡或平行排列式生长。

2.2 荧光免疫细胞化学试验结果 正常脑组织匀浆诱导组诱导人脐血 MSCs 表达率为 NF(28.27±6.47)%和 NeuN(36.52±7.71)%,低于 STBI 诱导组的表达率(47.31±8.14)%和(58.91±8.12)%, $P<0.05$ 。STBI 诱导组荧光免疫细胞化学染色结果见图 1。



1~3: NF 表达检测, 1 为 DAPI 染色的细胞核, 2 为 NF 表达, 3 为 1~2 合并图; 4~6: NeuN 表达检测, 其中 4 为 DAPI 染色的细胞核, 5 为 NeuN 表达, 6 为 4~5 的合并图。

图 1 STBI 脑组织匀浆诱导人脐血 MSCs 3 d 后 NF 及 NeuN 的表达 (×1 000)

3 讨 论

干细胞移植对 TBI 患者脑功能的恢复性治疗十分重要^[6-7]。人脐血 MSCs 具有自我增殖、更新能力和多向分化潜能, 在不同诱导条件下, 可分化为成骨细胞、心肌细胞、肝细胞、神经细胞等, 并具有取材方便、易于体外培养、异体移植不易引起排斥反应等优点, 所以得到广泛的研究运用^[8-9]。已有很多研究探讨了 MSCs 的诱导分化条件, 如细胞因子、化学分子等等, 已证实二甲亚砜 (DMSO)、2-巯基乙醇、3-叔丁基-4 羟基茴香醚 (BHA)、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 等均可诱导 MSCs 成神经分化^[10]; 但 MSCs 是在患者损伤脑组织特定微环境中进行分化的, 所以研究模拟微环境的诱导可行性更有意义。

以脑组织匀浆作为 MSCs 成神经分化的诱导剂可提供与体内微环境类似的生长条件, 有报道 MSCs 在脑组织匀浆诱导下可转化为神经样细胞, 并证实脑组织细胞分泌的生长因子 (如神经生长因子、胶质源性神经营养因子等) 在转化过程中起到促进作用。本研究采用前期构建的 STBI 小鼠模型^[5], 制作了 TBI 脑组织匀浆诱导液, 对人脐血 MSCs 进行诱导, 3 d 后进行荧光免疫细胞化学试验检测, 证实正常脑组织匀浆和 STBI 脑组织匀浆均可诱导人脐血 MSCs 表达 NF 和 NeuN, 且 STBI 脑组织匀浆诱导组 NF 和 NeuN 阳性率高于正常脑组织匀浆诱导组 ($P < 0.05$)。由此可见, 脑组织匀浆可诱导人脐 MSCs 向神经元样细胞分化, 表达神经细胞特异标志分子 NF 和 Ne-

uN, 且 STBI 脑组织匀浆的诱导效果好于正常脑组织匀浆。

本研究初步证实了模拟 STBI 微环境的诱导剂可诱导人脐血 MSCs 表达神经细胞的标志分子, 具有诱导人脐血 MSCs 成神经分化能力, 但分化生成的细胞是否具有神经细胞功能, 以及具体的分化调控机制还需进一步深入探讨。

参考文献

- [1] Vincent AS, Roebuck-Spencer T, Gilliland K, et al. Automated neuro-psychological assessment metrics (v4) traumatic brain injury battery: military normative data[J]. Mil Med, 2012, 177(3): 256-269.
- [2] Hoffman JM, Bell KR, Powell JM, et al. A randomized controlled trial of exercise to improve mood after traumatic brain injury[J]. PM-R, 2010, 2(10): 911-919.
- [3] Tatsuki I, Shigeo H, Takao S, et al. Edaravone increases neural stem cell number around the area of damage following rat traumatic brain injury[J]. Neurosci Res, 2010, 68(1): 426-433.
- [4] Catale C, Germain S, Meulemans T, et al. Exploration of perceptual and motor inhibition in children with traumatic brain injury[J]. Percept Mot Skills, 2011, 112(3): 667-679.
- [5] 邓均, 艾国平, 周桃莉, 等. G-CSF 动员循环间充质干细胞及其对颅脑损伤修复的可行性分析[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(12): 1131-1134.
- [6] 阮成钧, 张化彪, 冯伟生, 等. 细胞移植对脑出血脑损伤的保护作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(38): 7551-7554.
- [7] 步兴耀, 黄志起, 张永福. 骨髓间充质干细胞移植治疗缺血性脑损伤的研究进展[J]. 实用诊断与治疗杂志, 2004, 18(2): 113-115.
- [8] Knippenberg M, Helder MN, Doulabi BZ, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells acquire bone cell-like responsiveness to fluid shear stress on osteogenic stimulation[J]. Tissue Eng, 2005, 11(11/12): 1780-1788.
- [9] Ertem M, Ileri T, Azik F, et al. Related donor hematopoietic stem cell transplantation for Fanconi anemia without radiation: a single center experience in Turkey[J]. Pediatr Transplant, 2009, 13(1): 88-95.
- [10] Jiang J, Lv Z, Gu Y, et al. Adult rat mesenchymal stem cells differentiate into neuronal-like phenotype and express a variety of neuro-regulatory molecules in vitro[J]. Neurosci Res, 2010, 66(1): 46-52.

(收稿日期: 2012-01-09)

(上接第 2182 页)

建立并分析了影响 ELISA 法和胶体金标记方法检测 OA 灵敏度的可能因素。本文则对比分析了试纸条制备过程中多种因素的影响, 最终获得了高于之前检测灵敏度的稳定制备流程, 并对其实用性进行了验证。目前多数国家规定的贝类组织 OA 安全阈值是每 100 g 贝肉 OA 含量不超过 20 μg, 本研究所建立方法的检测灵敏度基本满足该要求, 可用于进行现场快速检测和大量筛查, 在检验检疫、食品安全部门及卫生监控部门具有较为广泛的应用前景。

参考文献

- [1] 全先庆, 曹善东. 赤潮的危害、成因及防治[J]. 山东教育学院学报, 2002, 17(2): 87-88.
- [2] Hallegraeff G. Harmful algal blooms: a global overview [J]. Monogra Oceanogra Methodol, 2003, 11(1): 25-49.
- [3] Viviani R. Eutrophication, marine biotoxins, human health[J]. Sci Total Environ, 1992, 139(Suppl): 631-662.
- [4] Fernandez J, Candenias M, Souto M, et al. Okadaic acid, useful tool for studying cellular processes[J]. Curr Med Chem, 2002, 9(2): 229-262.

- [5] Wright JLC. Dealing with seafood toxins: present approaches and future options[J]. Food Res Int, 1995, 28(4): 347-358.
- [6] 孟宪梅, 卢士英, 林超, 等. 大田软海绵酸致病性及检测方法研究进展[J]. 疾病防治, 2011, 38(2): 152-156.
- [7] 方立超, 程平, 蒋丽莉, 等. 甲胎蛋白纳米金侧流免疫层析快速检测试纸的研制[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(7): 736-738.
- [8] 张茂海, 吴建业, 陆玲娜, 等. 胶体金与酶联免疫法检测乙肝表面抗原结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(14): 1625-1626.
- [9] 胡乐琴, 柳俊秀, 王权, 等. 抗大田软海绵酸单克隆抗体的制备及免疫学特性分析[J]. 免疫学杂志, 2011, 27(9): 809-811.
- [10] Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions[J]. Nat Phys Sci, 1973, 24(17): 120-122.
- [11] 刘仁沿, 梁玉波, 陈冰君, 等. 胶体金免疫层析方法快速检测腹泻性贝毒软海绵酸的初步研究[J]. 分析实验室, 2008, 27(7): 26-29.
- [12] 刘仁沿, 陈冰君, 梁玉波, 等. 腹泻性贝毒软海绵酸单克隆抗体的制备和酶联免疫检测方法的建立[J]. 卫生研究, 2008, 37(4): 443-445.

(收稿日期: 2012-04-09)