

脑脊液中细胞源性囊泡对间充质干细胞向神经前体细胞分化的影响

王茜茜, 唐兴江

西南医科大学附属医院神经内科, 四川省泸州市 646000

摘要:目的 探讨脑脊液微囊泡在间充质干细胞(MSCs)向神经干细胞分化中的作用。方法 从人脑脊液中分离微囊泡,从小鼠骨髓中分离原代 MSCs。将 MSCs 传代后在神经分化诱导培养基和脑脊液微囊泡作用下神经分化诱导。细胞形态学观察细胞突起数目和长度,western blot 检测细胞神经特异性蛋白表达水平变化。结果 单纯神经诱导液组单位面积内细胞突起长度为 (2.2 ± 0.4) mm,突起数量为 (94 ± 12) 个;神经诱导液加脑脊液微囊泡诱导的细胞中细胞突起更长 (5.7 ± 1.2) mm,数目也更多 (178.2 ± 32) 个,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。微囊泡组细胞中 NSE、Nestin 和 MAP-2 表达水平高于单纯神经诱导液组细胞,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 脑脊液微囊泡可有效促进 MSCs 向神经干细胞分化,有望为干细胞移植治疗神经功能缺损提供了一个新的思路。

关键词:间充质干细胞;神经分化;细胞衍生的微粒;脑脊液

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.2018.03.017

Role of cell-derived microparticles in cerebrospinal fluid in differentiation of mesenchymal stem cells into neural stem cells

WANG Xi-Xi, TANG Xing-Jian. Department of Neurology, The Affiliated Hospital, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China

Corresponding author: TANG Xing-Jian, E-mail: 3161946txj@163.com

Abstract: Objective To investigate the role of cell-derived microparticles (MPs) in the differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) into neural stem cells. **Methods** MPs were isolated from human cerebrospinal fluid and primary MSCs were isolated from mouse bone marrow. After subculture, neural differentiation of MSCs was induced in a specialized medium with the presence of MPs. The number and length of cell processes were observed, and Western blot was used to measure the change in the expression of neuron-specific proteins. **Results** Compared with the neural induction medium group, the neural induction medium + MPs group had significantly longer cell processes (5.7 ± 1.2 mm vs 2.2 ± 0.4 mm, $P < 0.01$) and a significantly higher number of cell processes (178.2 ± 32 vs 94 ± 12 , $P < 0.01$). The neural induction medium + MPs group had significantly higher expression of NSE, Nestin, and MAP-2 than the neural induction medium group ($P < 0.01$). **Conclusions** MPs in cerebrospinal fluid can effectively promote the differentiation of MSCs into neural stem cells, which may provide new thoughts for stem cell transplantation in the treatment of neurological defects.

Key words: mesenchymal stem cell; neural differentiation; cell-derived microparticle; cerebrospinal fluid

细胞源性微囊泡是细胞在激活、损伤或凋亡时经出芽方式释放的一类直径介于 100 ~ 1000 nm 的膜性囊泡^[1-3]。细胞源性微囊泡携带母体细胞特征性生物信息分子(如脂质、蛋白质、DNA、mRNA

和 miRNA),并可作为细胞间运输载体将这些生物分子传递给受体细胞,在许多生理病理学过程中充当生物信息传递载体的作用^[3]。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)来源的微囊泡可用

基金项目:泸州医学院科研课题(ly2015016)

收稿日期:2017-12-21;修回日期:2018-04-18

作者简介:王茜茜(1988-),女,住院医师。

通信作者:唐兴江(1964-),男,硕士,主任医师,主要从事脑血管病研究工作。E-mail:3161946txj@163.com。

于组织损伤的修复,如软骨组织,甚至是神经损伤的修复^[4-6]。研究证实,脑脊液中存在大量的微囊泡^[6-7],本研究探究脑脊液微囊泡对间充质干细胞体外诱导分化为神经前体细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 材料和设备

DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)、磷酸盐缓冲液(PBS)、双抗(青霉素+链霉素)和胰蛋白酶(Hyclone,美国);GAPDH 一抗;CD34、CD45、CD29、CD90、NSE、Nestin 和 MAP-2 一抗(Sigma,美国);细胞培养耗材(NEST)。

1.2 脑脊液微囊泡的分离与纯化

本研究选取2016年1月1日至2016年12月31日就诊于西南医科大学附属医院神经科患者20例。本研究符合伦理要求,患者及家属均知情同意。收集每名患者5 mL 脑脊液;并转移至离心管中,4℃条件下,1550 g 离心 20 min,离心 2 次,取上清,加入上清体积 3 倍的无菌 PBS 稀释上清液;4℃条件下 50000 g 离心 60 min,以 150 μ L 无菌 PBS 重悬沉淀,即获得脑脊液微囊泡。

1.3 动态光散射(DLS)实验

将收集的囊泡用 PBS 垂悬至合适的浓度,用 Nano-ZS ZEN 3600 型动态光散射仪分析微粒水合粒径。

1.4 微囊泡形态表征

取 10 μ L 微囊泡 PBS 垂悬液滴于碳支持膜铜网上,室温孵育 5 min,滤纸吸干铜网;将铜网置于 1% 磷钨酸复染液中染色,3 min 后滤纸吸干液体,自然晾干铜网;将铜网置于 Hitachi HT7700 型透射电镜上观察、拍照,测量微囊泡粒径大小。

1.5 骨髓间充质干细胞分离

将 BALB/C 纯系小鼠安乐死,并以 75% 乙醇浸泡 5 min 后转移至超净台。分离双侧股骨及胫骨,在含生理盐水的玻璃平皿中去除股骨周围肌肉组织,剪去包括骺板在内的两侧骺端,用 10 mL 注射器(配 4.5 号针头)抽取适量含 10% FBS 的完全培养基冲洗骨髓腔,将骨髓冲入培养瓶。依次用 7 号针头和 4.5 号针头反复吹打骨髓细胞悬液,制成单细胞悬液。细胞悬液在 1000 rpm 离心 5 min 后收集细胞或进行密度梯度离心。将单细胞悬液于 1:2 比例加到含 1.082 比重 Percoll 细胞分离液的离心管中,4℃条件下,经 500 g 密度梯度离心 25 min,小心收集离心液界面上乳白色云雾状的单

核细胞层,加入等量无血清培养基充分洗涤(500 g 离心 5 min)2 次,去上清,用 10% FBS 的培养基悬浮细胞(用 0.83% 氯化胺破碎红细胞,培养液重悬细胞)。数细胞数量,达到 106×10^7 /ml 以上后即进行原代培养,按 5×10^6 /ml 浓度接种于培养瓶中,每瓶含 5 mL L-DMEM 完全培养液。在体积分数为 5% 的 CO₂ 和 37℃ 条件下连续培养,3 d 后换液去除非贴壁细胞,以后每 3~4 d 半量换液 1 次,10~12 d 细胞达 90% 融合度时传代。0.25% 胰酶消化细胞,按 2×10^5 /ml ~ 5×10^5 /ml 密度再次接种传代于新的培养瓶中。当细胞生长接近融合层时,即得到骨髓 MSCs。本实验使用的 MSCs 均为 3~5 代的 MSCs。

1.6 骨髓间充质干细胞的鉴定

取第 3 代生长状态良好的 MSCs,0.25% 胰酶消化细胞,4℃离心(1000 rpm, 5 min),PBS(含 1% BSA)清洗 3 次,将细胞分为数管,各管依次加入单克隆抗体 CD29、CD90、CD34 和 CD45,同时每管设立同型阴性对照。避光孵育 30 min,再用 PBS 清洗 3 次,最后用 300 μ L PBS 重悬细胞,流式细胞仪检测分析上述分子的表达。

1.7 骨髓间充质干细胞体外神经诱导分化

将生长状态良好的 MSCs 接种在 24 孔板中,当细胞融合度达到 70%~80%,将细胞分为对照组(普通培养基)和实验组。实验组中加入神经细胞诱导培养基(有 0.5 μ mol/L 全反式维甲酸和 20 μ g/mL 的培养基),作用 24 h 后吸出原培养基,PBS 洗涤 3 次。其中实验组又分为两组:神经液诱导组(神经细胞诱导培养基)和微囊泡组(含有终浓度为 40 μ g/mL 微囊泡的神经细胞诱导培养基),将细胞置于体积分数为 5% 的 CO₂ 和 37℃ 条件下连续培养。光学显微镜下拍照,并以 Image J 软件统计细胞突起数目及长度。

1.8 神经元细胞的鉴定

免疫荧光法和 western blot 法检测神经诱导所得细胞神经元特异性标志物巢蛋白(nestin)、神经元特异性烯醇化酶(neuron specific enolase, NSE)和微管相关蛋白-2(microtubule-associated protein, MAP-2)的表达。

1.9 流式细胞术

向细胞重悬液中加入 CD34、CD45、CD29 和 CD90 单克隆抗体(1:100),室温孵育 30 min;离心去除多余抗体后以 PBS 重悬细胞;加入与一抗种

属对应的荧光标记二抗 (1:200), 37 °C 孵育 30 min, PBS 洗涤 5 min × 2 次; 以 400 μL PBS 重悬细胞, 流式细胞仪检测。

1.10 统计学分析

所有实验均至少重复三次, 所得实验数据采用 GraphPad Prism 6.0 软件进行统计分析并制图; 图中数据采用平均值 ± 标准误 (Mean ± SEM) 来表示。两组之间采用 *t* 检验; 三组及三组以上采用单因素方差分析 (One-way-ANOVA); 差异显著性的检验水平为 *P* < 0.05。

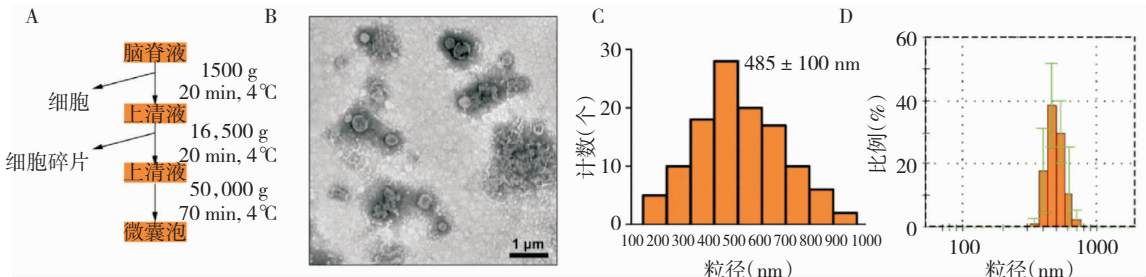


图 1 脑脊液微囊泡的分离与鉴定

注: A: 脑脊液微囊泡分离过程; B: 脑脊液微囊泡电镜图; C: 脑脊液微囊泡电镜下粒径分布; D: DLS 测量脑脊液微囊泡水合粒径。

2.2 骨髓间充质干细胞培养和鉴定

分离小鼠骨髓间充质干细胞, 导致显微镜下观察, 可见接种 24 h 后, 骨髓中体积较大的单个核细胞贴壁生长, 换液以去掉不贴壁的非单核细胞。培养 36 h ~ 48 h 后贴壁的单核细胞数目开始增多, 但形态仍保留圆形。传代后, 细胞迅速贴壁, 细胞形态逐渐变为梭形或扁平型细胞 (图 2A 为培养至

2 结果

2.1 脑脊液微囊泡的分离和鉴定

差速离心法收集脑脊液微囊泡, 重悬于 PBS。透射电镜下, 分离所得的沉淀呈双层膜结构 (图 1A), 大小范围为 100 ~ 1000 nm, 其中 450 ~ 550 nm 的双层膜结构最多 (图 1B)。流式细胞分析 (图 1C) 和动态光散射结果 (图 1D) 表明, 离心分离的沉淀粒径分布范围位于 100 ~ 1000 nm, 符合微囊泡的粒径分布, 表明本研究分离所得的沉淀为脑脊液微囊泡。

第三代的贴壁细胞形态)。流式细胞检测贴壁细胞表面标志物 CD34、CD45、CD29 和 CD90, 结果发现, 贴壁细胞高表达 CD29 (96.7%) 和 CD90 (99.2%), 而几乎不表达 CD34 (0.2%) 和 CD45 (0.1%) (图 2B)。以上结果显示, 所得的贴壁细胞为骨髓间充质干细胞。

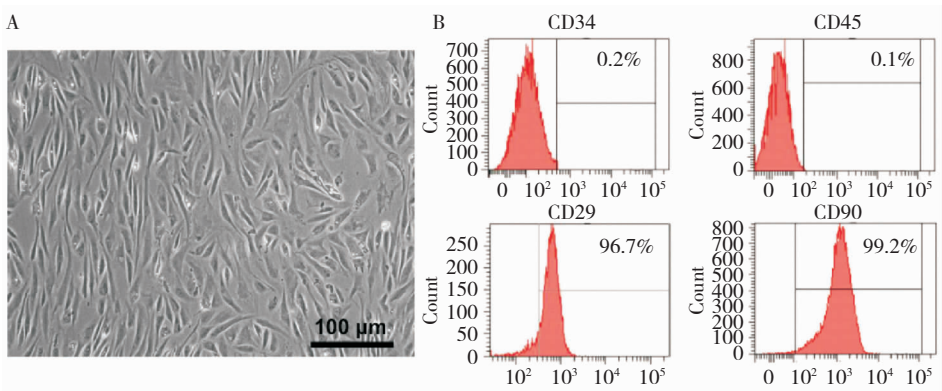


图 2 骨髓间充质干细胞的鉴定

注: A: 第三代间充质干细胞形态学观察; B: 流式细胞术检测间充质干细胞表面标志物表达。

2.3 骨髓间充质干细胞神经分化诱导

经神经分化诱导液刺激 5 d 后, MSCs 形态逐渐改变, 细胞伸出细长的突起, 呈双极或多极向四周展开; 刺激 10 d 和 15 d 时, 细胞逐渐形成次级或多极突起, 并与临近细胞相连。单位面积内 ($0.4 \text{ mm} \times 0.4 \text{ mm}$), 单纯神经诱导液组细胞突起长度为 (2.2 ± 0.4) mm, 突起数量为 (94 ± 12) 个; 而神经神经诱导液加脑脊液微囊泡诱导的细胞中细胞突起更长 (5.7 ± 1.2) mm, 数目也更多 (178.2 ± 32) 个, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 3。

未分化的间充质干细胞不表达神经元特异性标志物, 经神经诱导液诱导后, 利用 western blot 可检测到 NSE、Nestin 和 MAP-2 强阳性表达, 相对灰度值分别为 0.8 ± 0.06 、 0.71 ± 0.05 和 0.74 ± 0.03 (图 4A、图 4B)。更重要的是, 加入终浓度 $40 \mu\text{g/mL}$ 的脑脊液微囊泡后, 间充质干细胞经神经诱导后的细胞中 NSE、Nestin 和 MAP-2 表达水平进一步提高, 相对灰度值分别为 0.91 ± 0.07 、 1.12 ± 0.06 和 1.24 ± 0.04 , 明显高于神经液诱导组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$) (图 4A、图 4B)。以上结果说明, 脑脊液微囊泡可促进间充质干细胞向神经干细胞分化。

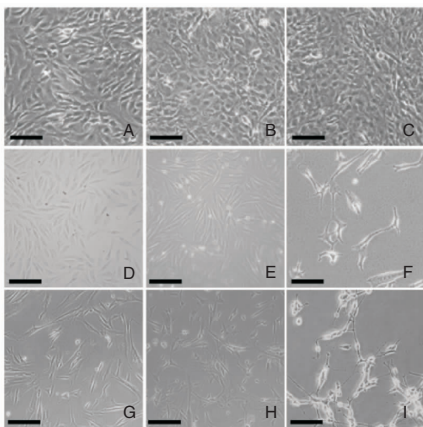


图 3 间充质干细胞神经诱导后的细胞形态

注: A、B、C: 对照组 5 d、10 d、15 d; D、E、F: 神经诱导液组 5 d、10 d、15 d; G、H、I: 微囊泡组 5 d、10 d、15 d。

3 讨论

传统医学方法无法治愈许多疾病, 如中枢神经系统退行性疾病 (帕金森病和脱髓鞘病变) 及中枢神经系统创伤 (如脑损伤和脊髓损伤)。近几十年来, 包括胚胎干细胞和间充质干细胞在内的干细胞

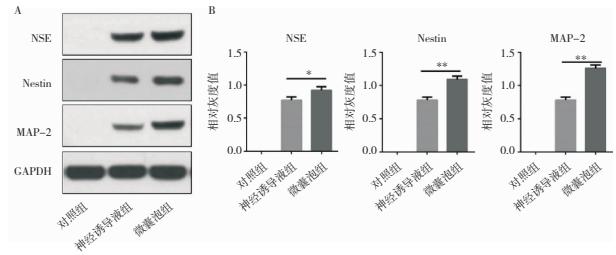


图 4 间充质干细胞神经诱导后表达 NSE、Nestin 和 MAP-2 水平

注: A: western blot 检测间充质干细胞神经诱导后 NSE、Nestin 和 MAP-2 的表达水平; B: western blot 相对灰度值。* 为神经诱导液组和微囊泡组 NSE 表达水平比较, $P < 0.01$; ** 为神经诱导液组和微囊泡组 Nestin 和 MAP-2 表达水平比较, $P < 0.01$ 。

的实验研究取得了令人兴奋成果^[9, 10]。目前已有研究发现, 神经干细胞移植至脊髓损伤区域后可分化为神经元细胞、星形胶质细胞及少突胶质细胞, 连接脊髓断端并重建神经传导通路, 改善损伤平面以下的运动和感觉功能^[11, 12]。目前, 具有神经干细胞分化功能的骨髓间充质干细胞成为神经干细胞研究的重要细胞来源。神经前体细胞, 即神经干细胞, 是指在一定条件下可以分化为神经元、星形胶质细胞及少突胶质细胞等的原始多能干细胞^[13]。骨髓间充质干细胞和神经前体细胞移植于脑组织损伤动物的实验证明这两类细胞移植后均能在体内迁徙, 与周围细胞整合, 促进神经功能修复。

有学者对大鼠皮质进行分离体外培养时, 首次发现神经元可以分泌微囊泡。神经元和神经胶质细胞可以借助微囊泡来实现物质的转移和信号的传导^[14]。形成以神经元为协调中心的精密且高效的信号传导系统。在氧化应激条件下, 胶质细胞来源的微囊泡可以通过抑制神经元与胶质细胞的黏附并释放突触蛋白 I 促进轴突生长和神经元存活^[15]。此外星形胶质细胞释放的微囊泡可能会影响神经元的存活, 胶质细胞可以清除其他神经胶质细胞释放的多余微囊泡, 选择性激活炎症反应, 并且会影响到突触活性^[16]。综上所述, 微囊泡在中枢神经系统内对神经元和神经胶质细胞之间的信息交流发挥了重要作用。

骨髓间充质干细胞促进神经修复的作用与其分泌一些细胞因子和趋化因子有关, 但具体机制不是十分明确。很长时间以来, 人们较为熟悉的细胞间信息传递方式主要包括各种生长因子、细胞因子

和小分子生物活性物质的分泌和释放。另外,细胞之间也可通过黏附反应或建立通道性微管等传递生物信息。最新研究表明,微囊泡可能是细胞之间传递关键生物信息的重要途径^[17-19]。然而,脑脊液中的微囊泡对间充质干细胞向神经干细胞分化的作用至今仍然不清楚。

本研究首次发现,脑脊液微囊泡可有效促进骨髓间充质干细胞向神经干细胞分化,使骨髓来源的神经前体细胞治疗中枢神经系统疾病成为可能,从而为干细胞移植治疗神经功能缺损提供了一个新的思路。此外,本研究有助于全面理解脑脊液的功能。然而,微囊泡通过何种途径促进间充质干细胞向神经干细胞分化仍然是本领域待解决的难题,同时也是我们进一步研究的方向。

参 考 文 献

- [1] Mause SF, Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange [J]. *Circ Res*, 2010, 107(9): 1047-1057.
- [2] Kanada M, Bachmann MH, Hardy JW, et al. Differential fates of biomolecules delivered to target cells via extracellular vesicles [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(12): E1433-E1442.
- [3] Phinney DG, Giuseppe MD, Njah J, et al. Mesenchymal stem cells use extracellular vesicles to outsource mitophagy and shuttle micromas [J]. *Nat Commun*, 2015, 6(8472): 8472.
- [4] 侯威宇,程艳伟,向川. 间充质干细胞源性微囊泡和诱导性多潜能干细胞促进关节软骨修复的进展[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(41): 6706-6710.
- [5] 单伟,王长辉,秦书俭,等. 人脐带间充质干细胞修复大鼠坐骨神经损伤的实验研究[J]. *中国医科大学学报*, 2011, 40(8): 696-698.
- [6] 龚之涛,江荣才. 外泌体在急性中枢神经系统损伤中的研究进展[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2016, 43(6): 602-604.
- [7] Mrvar-Brecko A, Sustar V, Jansa V, et al. Isolated microvesicles from peripheral blood and body fluids as observed by scanning electron microscope [J]. *Blood cells Mol Dis*, 2010, 44(4): 307-312.
- [8] Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications [J]. *Blood Rev*, 2007, 21(3): 157-171.
- [9] 刘静,韩冬梅,王志东,等. 脐带间充质干细胞治疗脊髓损伤临床分析[J]. *中华损伤与修复杂志(电子版)*, 2011, 6(4): 41-44.
- [10] 魏俊吉,曾立芬,樊晓彤,等. 骨髓间充质干细胞治疗大鼠缺血性脑卒中的实验研究[J]. *中华医学杂志*, 2007, 87(3): 184-189.
- [11] 薛群,苗宗宁,华军,等. 骨髓间充质干细胞体外趋化神经前体细胞的机制[J]. *中国细胞生物学学报*, 2005, 27(2): 215-220.
- [12] 钟毅,蔡金华,贺小娅,等. 骨髓间充质干细胞成神经分化中的 FTH1 基因表达[J]. *第三军医大学学报*, 2016, 38(19): 2121-2127.
- [13] 刁新峰,程立敏,薛咏,等. 立体定向脑内移植神经干细胞改善颅脑损伤大鼠的神经运动功能[J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(10): 1446-1451.
- [14] Faure J, Lachenal G, Court M, et al. Exosomes are released by cultured cortical neurones [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2006, 31(4): 642-648.
- [15] Wang S, Cesca F, Loers G, et al. Synapsin I is an oligomannose-carrying glycoprotein, acts as an oligomannose-binding lectin, and promotes neurite outgrowth and neuronal survival when released via glia-derived exosomes [J]. *J Neurosci*, 2011, 31(20): 7275.
- [16] Turola E, Furlan R, Bianco F, et al. Microglial Microvesicle Secretion and Intercellular Signaling [J]. *Front Physiol*, 2012, 3: 149.
- [17] Scherlinger M, Sisirak V, Richez C, et al. New Insights on Platelets and Platelet-Derived Microparticles in Systemic Lupus Erythematosus [J]. *Cur Rheumatol Reports*, 2017, 19(8): 48.
- [18] Finkielstein A. Isolation and Characterization of Neutrophil-Derived Microparticles for Functional Studies [J]. *J Vis Exp*, 2018, 133.
- [19] Cosenza S, Ruiz M, Toupet K, et al. Mesenchymal stem cells derived exosomes and microparticles protect cartilage and bone from degradation in osteoarthritis [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 16214.