

脐血间充质干细胞向神经细胞诱导分化的研究进展

陈俊, 杨自金

(徐州医科大学附属连云港医院儿内科, 江苏 连云港 222002)

摘要:脐血间充质干细胞是从胎儿脐带血中分离出的一种成体干细胞, 具有分化为神经细胞的潜能, 可用于多种神经系统疾病的治疗。如何有效诱导脐血间充质干细胞向神经细胞分化一直是干细胞领域的研究热点, 具有很高的研究价值, 该文将对脐血间充质干细胞向神经细胞定向分化的诱导方法作一综述。

关键词:脐血; 间充质干细胞; 神经细胞; 诱导分化

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2018.11.004

Research advance in differentiation of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neural cells

CHEN Jun, YANG Zijin

(Department of Pediatrics, Lianyungang Hospital Affiliated to Xuzhou Medical University,
Lianyungang, Jiangsu 222002, China)

Abstract: Human umbilical cord blood mesenchymal stem cells are a kind of adult stem cell isolated from human umbilical cord blood, with the potential to differentiate into nerve cells, can be used for the treatment of a variety of neurological diseases. How to effectively induce human umbilical cord blood mesenchymal stem cells differentiation into nerve cells has always been a research hotspot in the field of stem cells, which has a high research value. This article reviews the methods of inducing differentiation of umbilical cord blood mesenchymal stem cells into nerve cells.

Key words: Umbilical cord blood; Mesenchymal stem cells; Nerve cells; Inducing differentiation

人脐血间充质干细胞(MSC)是存在于人脐带血中的一种成体干细胞, 具有旺盛的自我更新能力以及向多胚层分化的潜能^[1]。在适宜的条件下, 脐血 MSC 能分化为神经元细胞和神经胶质细胞, 并且能够分泌多种细胞活性因子, 通过免疫调节、抑制炎症、减少凋亡、细胞替代等机制实现对神经系统功能的修复^[2-3]。脐血 MSC 还具有免疫原性低、来源广泛、伦理争议少等优点^[4], 因此成为修复中枢神经系统受损的一种有前途且极具吸引力的种子细胞。

1 脐血 MSC 向神经细胞诱导分化

1.1 化学试剂诱导 抗氧化剂作为最常见的化学诱导剂广泛应用于干细胞研究中, 早年研究使用的有 β -巯基乙醇(β ME)、二甲基亚砷(DMSO)、丁基羟基茴香醚(BHA)等。近年研究发现抗坏血酸(AsA)、维 A 酸(RA)、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBM-X)及腺苷酸环化酶激活剂毛喉素(Forskolin)也具有诱导分化作用。其中 RA 属于维生素 A 的衍生

物, Jin 等^[5]在使用不同浓度的全反式维甲酸(ATRA)对脐血 MSC 进行诱导时发现: ATRA 既能够诱导脐血 MSC 向神经细胞分化, 同时也能驱使细胞凋亡, 这两种不同机制具有剂量依赖性, 当剂量为 0.5 μ mol 时细胞分化效果最佳且凋亡最少。另外, IBM-X 和 Forskolin 能够提高细胞内环磷酸腺苷(cAMP)的水平从而激活 cAMP 依赖蛋白激酶(PKA), 最终效应也是增加细胞分化和诱发细胞凋亡。对此, Shahbazi 等^[6]首次尝试使用 IBMX 和 Forskolin 作为诱导剂对脐血 MSC 进行诱导, 并成功诱导出神经细胞。在诱导 8 h 后通过免疫化学法检测到神经元表面特异标志物巢蛋白(nestin)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、微管相关蛋白 2(MAP2)以及星形胶质细胞活化标志物胶质纤维酸性蛋白(GFAP)均阳性表达。

由于化学试剂存在细胞毒性作用, 如 RA 长时间以来被公认为是一种致畸剂^[7], 且在大剂量时能够促进细胞凋亡, 因此这些化学试剂的诱导机制以及安全诱导剂量还需深入研究。

1.2 细胞因子诱导 目前可作为诱导剂的已知细

通信作者: 杨自金, 男, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向为脑瘫与干细胞, E-mail: yangzijin2008@163.com

胞因子包括表皮生长因子(EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)、神经生长因子(NGF)、胰岛素样生长因子(IGF)等。其中,EGF和bFGF是两种广谱的神经营养因子,常作为预诱导剂提高诱导效率^[8]。BDNF则广泛存在于中枢神经系统中,通过与特异性受体TrkB结合激活细胞外调节蛋白激酶信号通路从而发挥生物学效应^[9],其诱导效果已被广泛认可。新发现具有诱导作用的IGF是一类多功能细胞增殖调控因子,Hussain、Waheed等^[10]使用IGF-1诱导脐血MSC,成功诱导出nestin标记阳性的神经样细胞。

近年研究发现,多种细胞因子联合诱导或细胞因子联合化学试剂诱导的方法能够有效提高诱导效率,可以弥补单个细胞因子诱导效率较低的缺点,因此成为目前的研究热点。Salehinejad等^[11]使用细胞因子EGF、bFGF以及化学试剂RA、DMSO进行联合诱导,诱导后的脐血MSC向神经元、少突胶质细胞和星形胶质细胞分化,通过检测对比神经细胞标志物nestin和GFAP的表达水平发现联合诱导组的诱导效率明显高于单独诱导组。Rafieemehr等^[12]则在上述研究的基础上进一步提出了两步诱导法:先将RA、EGF、bFGF作为预诱导剂诱导2 d,弃去预诱导剂后加入NGF、IBMX、AsA正式诱导6 d,诱导后细胞通过反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测到神经细胞标志物MAP2、髓鞘碱性蛋白(MBP)和GFAP均高表达,成功诱导出神经细胞并且诱导效率明显提高,并认为RA相比其他诱导剂在促进细胞分化的过程中起到了更为关键的作用。

细胞因子与化学试剂相比,诱导后的细胞具有存活率高、毒副作用小,诱导效率较低的缺点,但可以通过联合诱导的方案解决,因此应用前景更加广泛。

1.3 移植、共培养诱导 通过将脐血MSC移植入宿主神经组织,或与神经组织细胞体外共培养,观察移植或共培养后脐血MSC的发育、分化及作用情况。目前主要的细胞移植方法有:(1)侧脑室注射移植法:经立体定位仪定位后,通过侧脑室穿刺将细胞注射入侧脑室,使其随脑脊液到达病变部位;(2)直接移植法:通过手术或其他技术手段将细胞直接移植于病变部位;(3)椎管内植入法:将细胞通过腰椎穿刺术注射入蛛网膜下腔,使其随脑脊液到达病变部位;(4)静脉注射移植法:将细胞通过静脉输入,使其通过血脑屏障到达病变部位。Cui等^[13]将脐血MSC直接移植到脊髓损伤大鼠的神经受损部位,移植4周后行免疫组织化学法检测,发现移植

到受损部位的细胞阳性表达神经元特异标志物NSE和胶质细胞标志物GFAP,同时大鼠脊髓损伤模型的后肢运动功能评分也较损伤前提高,说明脐血MSC移植后能够分化为神经细胞并对损伤神经组织进行修复。Miao等^[14]通过腰椎穿刺鞘内注射脐血MSC的方法,对接受注射的100名神经系统损伤患者进行治疗随访,结果表明此方法对于脊髓损伤、脑瘫、脑梗死、脑外伤综合征等多种神经系统疾病的恢复均具有一定的疗效,其作用机制可能与上述实验相同,即脐血MSC移植到体内后能够在神经受损部位聚集并进行修复有关。类似于移植诱导法,共培养诱导法是在体外利用神经组织细胞提供的生长环境来培养并促进细胞的分化。Zeng等^[15]使用嗅鞘细胞条件培养液对脐血MSC进行共培养诱导,经共培养后的细胞神经元特异性标志物NSE阳性表达,并成功检测到神经电生理活动。上述研究表明,神经组织细胞在生长过程中提供的微环境对脐血MSC分化为神经细胞具有诱导促进作用,其原理可能与微环境中存在能够诱导脐血MSC分化的神经营养因子有关,这为细胞移植治疗神经系统疾病的开展提供了理论和实验依据。

1.4 基因转染诱导 基因转染是将某些细胞因子质粒转染到脐血MSC中后,通过不断分泌这种具有诱导分化作用的细胞因子,以实现自我诱导。由于BDNF具有促进受损神经元再生的作用,并且能够诱导脐血MSC分化为神经细胞。Hei等^[16]利用腺病毒载体将BDNF转染入脐血MSC,然后将转染后的脐血MSC移植到坐骨神经损伤大鼠模型中,4周后通过酶联免疫吸附实验(ELISA)和荧光实时定量反转录-聚合酶链反应(RT-qPCR)检测发现,转染组BDNF蛋白以及mRNA的表达水平均明显升高。另外通过轴突计数、轴突密度测定和坐骨神经功能检测发现,转染组神经损伤部位的再生程度明显高于其他实验组,这些结果表明经BDNF转染后的脐血MSC能够不断分泌BDNF,以提高损伤局部BDNF浓度并且成功自我诱导分化为神经细胞,最终达到修复神经损伤的目的。

脐血MSC的生存寿命有限,对生存环境要求较高,阻碍了其在临床上的应用,端粒反转录酶(TERT)是端粒酶活性调节的关键因子,能够促进缺血缺氧状态下细胞的增殖和存活^[17],新生儿缺氧缺血性脑病(HIE)是围产期窒息引起脑组织缺血缺氧导致的脑损伤性疾病,如果使用TERT和BDNF基因共修饰脐血MSC,就能在提高脐血MSC生存率的同时对受损神经进行修复,可能成为治疗HIE的

一种新方法^[18]。

虽然基因转染法能够在不使用诱导剂的情况下实现细胞的自诱导,但也存在转染效率低、转染后细胞生长状态差甚至死亡的可能,限制了其临床应用。

1.5 中药诱导 中药注射液如丹参、香丹、黄芩苷等能够诱导脐血 MSC 向神经细胞分化。Nan 等^[19]近来发现川芎嗪也具备诱导脐带 MSC 分化为神经细胞的能力,这些研究引发了广泛地关注及后续研究。有研究者通过设置不同类型的诱导组合对脐血 MSC 进行诱导^[20],结果发现丹参素 + 生长因子诱导组(丹参素 + EGF + bFGF)的诱导效果要优于单纯细胞因子诱导组(EGF + bFGF)、单纯化学试剂诱导组(β ME + DMSO + BHA)以及化学试剂 + 细胞因子诱导组(RA + EGF/BDNF + bFGF),展示了中药联合细胞因子诱导的高效性及今后临床应用的可行性。

中药诱导剂价格便宜,毒副作用较小,在治疗方法上可选择口服或静脉注射,也可用于脐血 MSC 移植后的体内诱导分化,临床应用方便。但中药诱导剂的有效成分暂不十分明确,且存在纯度不均一的问题。此外,为了更好、更安全地应用于临床治疗,其诱导分化的具体作用机制以及用量问题尚需进一步研究。

2 应用与展望

脐血 MSC 相比早前研究使用的神经干细胞,具有取材方便、低免疫原性、无伦理争议等优点,是细胞移植治疗中枢神经系统疾病的新型种子细胞。众多动物实验及临床前期研究表明,脐血 MSC 作为新型种子细胞移植治疗神经系统疾病的优势明显,可用于下列多种疾病的治疗:(1)脊髓损伤性疾病,脊髓损伤后主要导致机体运动功能障碍,严重影响患者今后生存质量,目前药物治疗更多只是延缓损伤进展,修复作用有限,而脐血 MSC 通过移植入脊髓受损部位后能够促进神经元轴突的再生与存活^[21],并联合细胞替代作用实现对神经功能的恢复,另有研究表明在脊髓损伤急性期移植脐血 MSC 对神经功能的恢复更加有利^[22];(2)神经退行性疾病,包括帕金森和阿尔茨海默病等,主要是由神经元丢失、氧化应激和神经炎症反应所致^[23-24],目前可用于治疗的药物少且疗效有限,而脐血 MSC 具有细胞替代以及减少氧化应激的作用^[25],能够有效解决这些问题,成为治疗神经退行性疾病的新方法;(3)小儿脑性瘫痪,它是一种严重阻碍患儿智能和运动发育的疾病,给家庭带来了沉重的经济负担,

目前治疗主要是依靠康复训练来改善症状,耗费人力物力财力,而脐血 MSC 移植疗法则具有花费低、效果显著的优点^[26],是目前脑瘫治疗的研究热点;(4)脑卒中,包括出血性脑卒中和缺血性脑卒中,以后者为主,已成为我国第一位死亡原因,且致残率极高,目前药物治疗大多仅起到预防保护作用,而脐血 MSC 在移植后能够向脑受损部位迁移,通过促进血管再生改善缺血损伤部位的血流量^[27],以减少梗死面积,并通过细胞替代修复受损神经,修复效果可靠。除上述疾病外,脐血 MSC 还可用于缺血缺氧性脑损伤、脊髓侧索硬化症、脑白质营养不良等神经系统疾病的治疗,应用前景广泛。

虽然脐血 MSC 的应用具有很多优点,但仍存在以下问题:(1)体外培养问题,临床应用需要大量细胞,如何保证细胞在体外培养条件下稳定高效扩增,并避免在高速扩增过程中细胞出现转化;(2)长期传代培养问题,脐血 MSC 的多向分化潜能随着培养时间的延长以及所传代数的增多而降低^[28],另外长期传代培养会增加细胞恶性转换的概率,应注意实时监测;(3)诱导分化问题,如何合理选择诱导剂,如何安全高效诱导脐血 MSC 向神经细胞分化,目前尚未有统一的意见和方法;(4)临床应用安全性问题,虽有研究表明 MSC 体内移植后的致瘤潜能很低^[29],但仍需谨慎,且在体内移植之前需要对细胞进行严格测验,如细胞活力以及内毒素检测,否则可能会出现严重不良后果。

综上所述,虽然脐血 MSC 已被证明是一种非常具有应用前景的种子细胞,但是在大量临床应用之前,需要更深入的研究。相信随着对脐血 MSC 研究的不断深入,这些问题终会得到解决,届时,脐血 MSC 将会产生巨大的社会效益和经济效益。

参考文献

- [1] TARAN R, MAMIDI MK, SINGH G, et al. In vitro, and in vivo, neurogenic potential of mesenchymal stem cells isolated from different sources[J]. Journal of Biosciences, 2014, 39(1):157-169.
- [2] SANBERG PR, EVE DJ, BORLONGAN CV. Umbilical cord blood cells in the repair of central nervous system diseases[M]. New York: Perinatal Stem Cells, 2014:269-287.
- [3] YAO Z, GUAN YM, HUANG HL, et al. Human umbilical cord blood mesenchymal stem cell transplantation suppresses inflammatory responses and neuronal apoptosis during early stage of focal cerebral ischemia in rabbits[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2014, 35(5):585-591.
- [4] WANG L, LU M. Regulation and direction of umbilical cord blood mesenchymal stem cells to adopt neuronal fate[J]. International Journal of Neuroscience, 2013, 124(3):149-159.

- [5] JIN W, XU YP, YANG AH, et al. In vitro induction and differentiation of umbilical cord mesenchymal stem cells into neuron-like cells by all-trans retinoic acid[J]. International Journal of Ophthalmology, 2015, 8(2): 250-256.
- [6] SHAHBAZI A, SAFA M, ALIKARAMI F, et al. Rapid induction of neural differentiation in human umbilical cord matrix mesenchymal stem cells by cAMP-elevating agents[J]. International Journal of Molecular & Cellular Medicine, 2016, 5(3): 167-177.
- [7] SARAEE F, SAGHA M, MOHSENI KH, et al. Biological parameters influencing the human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells' response to retinoic acid[J]. Biofactors, 2014, 40(6): 624-635.
- [8] RAFIEEMEHR H, KHEIRANDISH M, SOLEIMANI M. Improving the neuronal differentiation efficiency of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells cultivated under appropriate conditions[J]. Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 2015, 18(11): 1100-1106.
- [9] PACZKOWSKA E, LUCZKOWSKA K, PIECYK K, et al. The influence of BDNF on human umbilical cord blood stem/progenitor cells: implications for stem cell-based therapy of neurodegenerative disorders[J]. Acta Neurobiologiae Experimentalis, 2015, 75(2): 172-191.
- [10] HUSSAIN EK, WAHEED IN. The effects of insulin like growth factor -1 (IGF-1) on the plasticity of umbilical cord blood derived mesenchymal stem cells colonies to in vitro neurogenic differentiation[J]. Journal of Biology, Agriculture and Healthcare, 2015, 5(4): 138-144.
- [11] SALEHINEJAD P, ALITHEEN NB, ALI AM, et al. Neural differentiation of human umbilical cord matrix-derived mesenchymal cells under special culture conditions[J]. Cytotechnology, 2015, 67(3): 449-460.
- [12] RAFIEEMEHR H, KHEIRANDISH M, SOLEIMANI M. A new two step induction protocol for neural differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells[J]. Iranian Journal of Blood & Cancer, 2015, 7(2): 111-116.
- [13] CUI B, EN LI, YANG BO, et al. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of spinal cord injury[J]. Experimental & Therapeutic Medicine, 2014, 7(5): 1233-1236.
- [14] MIAO X, WU X, SHI W. Umbilical cord mesenchymal stem cells in neurological disorders: A clinical study[J]. Indian Journal of Biochemistry & Biophysics, 2015, 52(2): 140-146.
- [15] ZENG Y, RONG M, LIU Y, et al. Electrophysiological characterization of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells induced by olfactory ensheathing cell-conditioned medium[J]. Neurochemical Research, 2013, 38(12): 2483-2489.
- [16] HEI WH, ALMANSOORI AA, SUNG MA, et al. Adenovirus vector-mediated ex vivo gene transfer of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) to human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells (UCB-MSCs) promotes crush-injured rat sciatic nerve regeneration[J]. Neuroscience Letters, 2017, 643(5): 111-120.
- [17] NI N, LIU Q, REN H, et al. Ginsenoside Rb1 protects rat neural progenitor cells against oxidative injury[J]. Molecules, 2014, 19(3): 3012-3024.
- [18] ZHAO F, YI Q, LIU H, et al. Umbilical cord blood mesenchymal stem cells co-modified by TERT and BDNF: A novel neuroprotective therapy for neonatal hypoxic-ischemic brain damage[J]. International Journal of Developmental Neuroscience, 2014, 38(9): 147-154.
- [19] NAN C, GUO LI, ZHAO Z, et al. Tetramethylpyrazine induces differentiation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells into neuron-like cells in vitro[J]. International Journal of Oncology, 2016, 48(6): 2287-2294.
- [20] 陈瑶, 张馨月, 陆玉霞, 等. 脐血间充质干细胞分化为神经样细胞的诱导因素的比较及优化[J]. 临床检验杂志, 2016, 34(9): 669-673.
- [21] LIU J, CHEN J, LIU B, et al. A cellular spinal cord scaffold seeded with mesenchymal stem cells promotes long-distance axon regeneration and functional recovery in spinal cord injured rats[J]. Journal of the Neurological Sciences, 2013, 325(1/2): 127-136.
- [22] NING G, TANG L, WU Q, et al. Human umbilical cord blood stem cells for spinal cord injury: early transplantation results in better local angiogenesis[J]. Regenerative Medicine, 2013, 8(3): 271-281.
- [23] YUKI D, SUGIURA Y, ZAIMA N, et al. DHA-PC and PSD-95 decrease after loss of synaptophysin and before neuronal loss in patients with Alzheimer's disease[J]. Scientific Rep, 2014, 4(4): 1-9.
- [24] CHEN X, GUO C, KONG J. Oxidative stress in neurodegenerative diseases[J]. Molecular Neurobiology, 2016, 36(6): 376-385.
- [25] CUI YB, MA SS, ZHANG CY, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation improves cognitive function in Alzheimer's disease mice by decreasing oxidative stress and promoting hippocampal neurogenesis[J]. Behavioural Brain Research, 2017, 320(3): 291-301.
- [26] 付晓君, 王晓东, 代广辉, 等. 两疗程脐带间充质干细胞治疗脑瘫患儿两年随访及疗效分析[J]. 武警后勤学院学报(医学版), 2016, 25(2): 108-113.
- [27] PARK HW, MOON HE, KIM HS, et al. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells improve functional recovery through thrombospondin1, pantraxin3, and vascular endothelial growth factor in the ischemic rat brain[J]. Journal of Neuroscience Research, 2015, 93(12): 1814-1825.
- [28] CHEN G, YUE A, RUAN Z, et al. Monitoring the biology stability of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells during long-term culture in serum-free medium[J]. Cell and Tissue Banking, 2014, 15(4): 513-521.
- [29] PARK SJ, KIM HJ, KIM W, et al. Tumorigenicity evaluation of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells[J]. Toxicological Research, 2016, 32(3): 251-258.

(收稿日期: 2017-05-06, 修回日期: 2017-05-20)