

bFGF-Chitosan Accelerates Its Differentiation into Nerve Cells by Recruiting Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

Manli Li, Xiaoguang Li*

Beijing Key Laboratory for Biomaterials and Neural Regeneration, School of Biological Science and Medical Engineering, Beihang University, Beijing
Email: *lxgchina@sina.com

Received: Dec. 28th, 2018; accepted: Jan. 11th, 2019; published: Jan. 18th, 2019

Abstract

Objective: To investigate the induction of MSC into nerve cells and its process by bFGF-chitosan. **Methods:** Adult rat bone marrow mesenchymal stem cells were cultured with bFGF-chitosan and soluble bFGF respectively, and their differentiation behavior was analyzed by means of nestin, Tuj-1 and MAP2. Calcium imaging technique was used to identify its nerve cell function. **Results:** At 19 days of induction, a large number of neurospheres could be found in the bFGF-chitosan group, and a small amount of neurospheres could be observed in the single soluble bFGF and conditional culture group. Continued culture was able to observe a large number of Tuj-1 positive cells in the bFGF-chitosan group and concentrate near bFGF-chitosan. MAP2 positive cells can be observed at 40 days of culture and calcium transient phenomena can be observed. **Conclusion:** bFGF-chitosan can induce MSC as a functional nerve cell by inducing it as a neurosphere structure.

Keywords

Bone Mesenchymal Stem Cells, Neurosphere, Neuron, bFGF-Chitosan, Calcium Imaging

bFGF-Chitosan通过招募骨髓间充质干细胞加速其向神经细胞分化进程

李曼丽, 李晓光*

北京航空航天大学生物医学工程学院生物材料与神经再生北京重点实验室, 北京
Email: *lxgchina@sina.com

*通讯作者。

摘要

目的: 探讨bFGF-chitosan将MSC诱导为神经细胞及其过程。**方法:** 成年大鼠骨髓间充质干细胞分别与bFGF-chitosan和单纯可溶性bFGF共培养, 利用nestin, Tuj-1, MAP2等指标分析其分化行为。并利用钙成像技术鉴定其具有神经细胞功能。**结果:** 在诱导19天时bFGF-chitosan组中能够发现大量神经球样结构, 在单纯可溶性bFGF和条件培养基组中能够观察到少量神经球样结构。继续培养能够在bFGF-chitosan组中观察到大量Tuj-1阳性细胞存在并聚集在bFGF-chitosan附近。培养40天时能够观察到MAP2阳性细胞, 并能够观察到钙瞬变现象。**结论:** bFGF-chitosan能够通过将MSC诱导为神经球样结构诱导为具有功能的神经细胞。

关键词

骨髓间充质干细胞, 神经球, 神经元, bFGF-Chitosan, 钙成像

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

神经元丢失, 失能的不可逆一直以来是导致神经系统损伤或是神经退行性疾病不能治愈的最关键原因。近年来, 人们尝试使用细胞移植的方法, 替代丢失或是失能的神经元。这种替代细胞一般来自胚胎干细胞, 诱导多能干细胞或是神经干细胞。但上述细胞的来源及其免疫, 伦理等问题一直没有得到解决[1][2]。

MSC 作为中胚层起源的细胞, 具有多向分化潜能。能够分化为骨, 脂肪和软骨细胞[3][4][5][6]。能够在 β -巯基乙醇(β -mercaptoethanol, BME)的诱导条件下分化为 NSE, NF 阳性细胞[7][8]。其来源广泛, 可以取自自体。这就解决了免疫, 伦理等问题[9][10]。

bFGF 为成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)家族中的一员, 在促进神经发育, 伤口愈合, 血管生成等方面发挥着重要作用。先前有报道称, 外源添加 bFGF 能够将人源 MSC 诱导分化为神经细胞, 并具有电生理特性。但其添加 bFGF 的方式为通过外源直接添加 bFGF, 这种给药方式显然不适用于临床。并且, 诱导分化比例较低。这也是导致这种技术不能应用于临床的主要原因[11]。

我们的研究拟采用 bFGF-chitosan 载体将 bFGF 于生物可降解材料 chitosan 结合, 使其适用于临床研究。并研究了其分化过程。并将利用钙成像技术证实其是否具有神经元特有的钙瞬变现象。

2. 材料方法

2.1. 骨髓间充质干细胞的提取和纯化

无菌条件下取成年大鼠股骨和胫骨, 去除肌肉筋膜等剪断骨两端暴露骨髓, 利用注射器吸取含 10% FBS 的 DMEM 冲洗骨髓。将骨髓冲出后吹打数次, 使细胞分散成单细胞为 P0 代。24 小时后全换液。此后每三天换液一次, 待细胞生长至 80%~90%时, 用胰酶消化传代, 传代比例为 1 传 2, 为 P2 代。待传至 P3 待备用。

2.2. 神经谱系细胞诱导

取 P3 代细胞, 以 105 密度种植于多聚赖氨酸包被的盖玻片上, 更换培养基为 DMEM/F12 含有 B27 和 bFGF, EGF。分三组诱导分别为, bFGF-chitosan 组为在培养体系中添加 20 ng bFGF-chitosan, bFGF 组为在培养体系中一次性添加 20 ng bFGF, 条件培养基组为不添加其他诱导条件。每 2~3 天半量换液。

2.3. 免疫细胞化学

相应诱导时间点时, PBS 缓冲液清洗细胞 3 次每次 5 分钟。之后用 4%的多聚甲醛于 4°条件下固定 30 分钟。PBS 洗掉多余多聚甲醛后, 0.3% PBST 处理 5 分钟破膜。10% NGS 于 37°条件下封闭细胞 30 分钟。10% NGS 稀释抗体至工作浓度滴加至细胞上于 4°条件下孵育过夜。恢复室温后, PBS 洗掉多余一抗, 10% NGS 稀释二抗至工作浓度并滴加至细胞上于 37 度条件下孵育 60 分钟。恢复室温后, PBS 洗掉多余二抗后 DAPI 染核。于显微镜下观察并拍照。

2.4. 钙成像检测

诱导后的细胞用 HBSS 溶液洗 3 次, 洗掉培养基。去掉 HBSS 溶液后加入 2 ml fluo-4AM 溶液于 37°C 下孵育 40 分钟。HBSS 洗掉多余染料后避光条件下静置 30 min 后于激发光 488 下观察绿色钙信号变化。

3. 结果

3.1. 不同诱导条件下 MSC 向神经球发育的情况

我们将 P3 代 MSC 分别在不同的诱导条件下诱导 19 天, 观察其向神经球样结构分化的表现。图 1 中可以发现其中 bFGF-chitosan 诱导条件下神经球的数目有所增加相比 soluble bFGF 组和 CM 组。其中 bFGF 诱导条件下并没有增加神经球的数目, 而是增加了神经球最大直径。综上, bFGF-chitosan 结合了 bFGF 的诱导功能, 即能够将 MSC 诱导为神经球样结构, 同时还控制了神经球的大小, 是的更多的细胞走向分化。

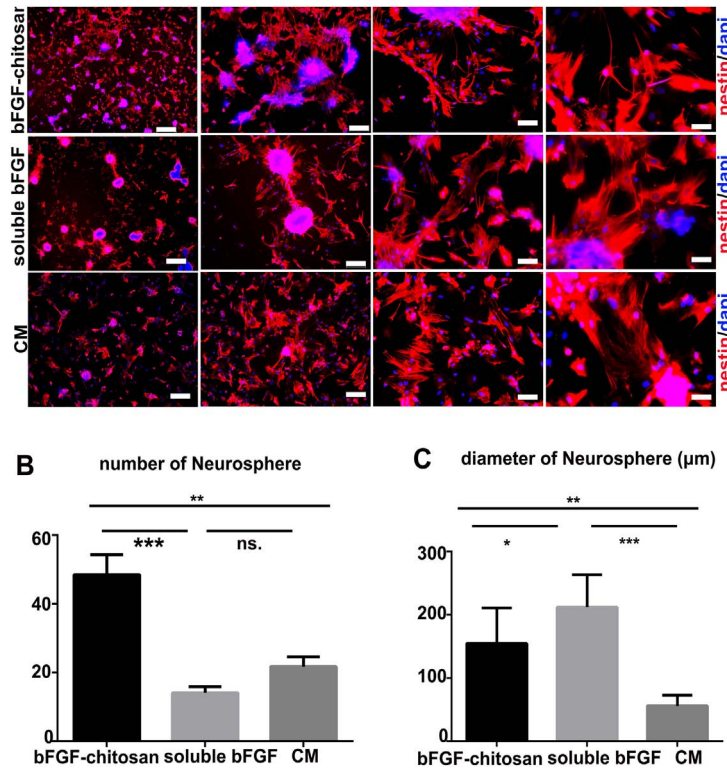
3.2. bFGF-chitosan 能够招募 Tuj-1 阳性细胞

随着诱导时间的增加, 我们检测了各培养条件下幼稚神经元标志物 Tuj-1 的表达情况。从图 2 中可以看出, soluble bFGF 处理 MSC 21 天时, 能够检测到 Tuj-1 阳性细胞的存在, 开始细胞分散存在, bFGF-chitosan 处理 MSC 时细胞同样开始分散存在, 开始失去神经球样结构但细胞还是在载体附近聚集。说明载体具有招募细胞的功能。这对细胞功能的实现是非常重要的。神经球中细胞的分散是细胞开始分化的标志, 细胞分散状态一定程度上代表了细胞分化能力。从 C 中可以看到 Soluble bFGF 和 bFGF-chitosan 处理 MSC 时细胞其细胞分化能力还是有区别的, bFGF-chitosan 中 Tuj-1 阳性细胞明显要比 soluble bFGF 组数量要多, 且差异明显。当然 Tuj-1 为幼稚神经元 marker, 随着发育的进展, 幼稚神经元趋于成熟, 其表达量将有所降低。从 D 中可以看出随着诱导时间的增加 Tuj-1 的 RNA 水平在诱导 4 w 时都开始有所降低。但从总量看, bFGF-chitosan 组要比 soluble bFGF 组要多。数据未统计。

3.3. bFGF 加速了 MSC 向神经细胞分化的进程

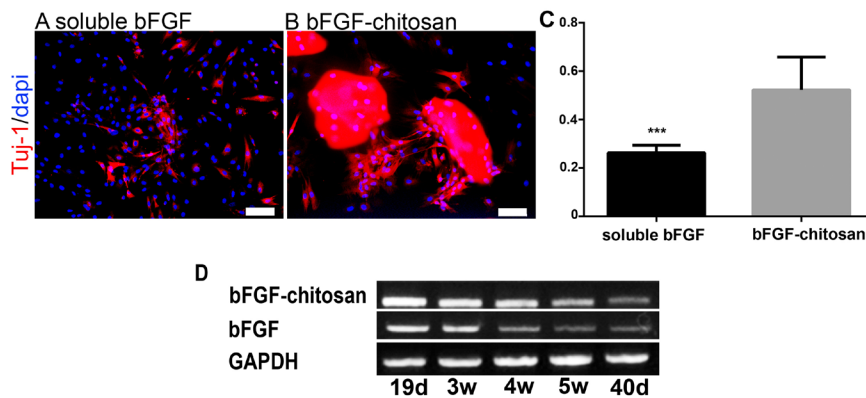
根据上述结果在培养四周后能同时检测到 nestin 和 Tuj-1 阳性的细胞存在, 这其中存在 nestin 单阳性, 即只表达 nestin 不表达 Tuj-1 的细胞, Tuj-1 单阳性即只表达 Tuj-1 的细胞, 还存在有能够同时表达 nestin 和 Tuj-1 的细胞。但比较 A, B 两图可以发现, soluble bFGF 组大部分细胞即 80%以上的细胞是表达 nestin, 而 bFGF-chitosan 组的细胞只有不到 40%的细胞表达 nestin, soluble bFGF 组有不到 20%的细胞表达幼稚神经元 marker Tuj-1, 而这个数量在 bFGF-chitosan 组中则达到了 40%以上, nestin 和 Tuj-1 双阳性细胞在

soluble bFGF 组中为 20%左右, 而 bFGF-chitosan 组中只有 10%左右。这些结果说明, MSC 在向神经细胞分化的过程中是具有异质性的, 其分化是不均衡的。bFGF-chitosan 组的分化进程要明显快于 soluble bFGF 组的(图 3)。



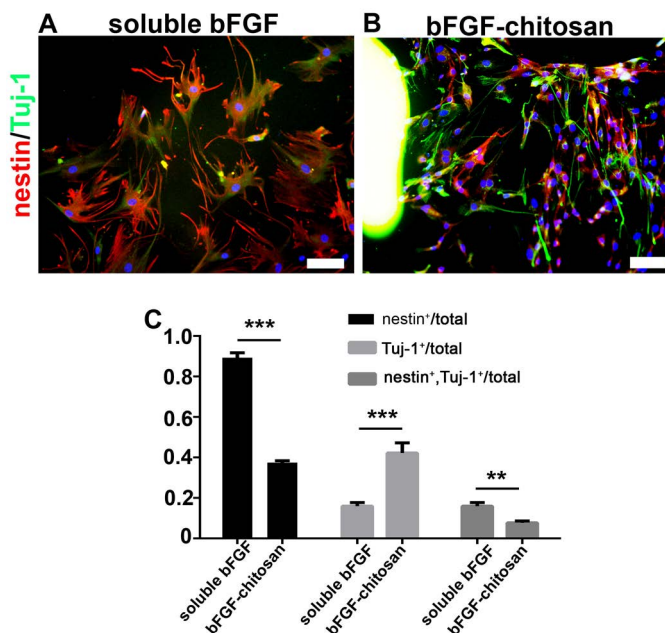
A: 不同诱导条件下 MSC 分化为神经球样结构的不同表现。B: 不同诱导条件下神经球样结构的数量统计。C: 不同诱导条件下神经球样结构的最大直径的数量统计。A 图中从左至右 scale bar 分别为 500 μm, 200 μm, 100 μm, 50 μm。

Figure 1. MSC differentiation into neurosphere-like structures at different induction conditions after 19 days
图 1. 不同诱导条件诱导 19 天 MSC 分化为神经球样结构的不同表现



A: soluble bFGF 处理 21 天时幼稚神经元 marker Tuji-1 的表达水平。B: bFGF-chitosan 处理 20 天时 Tuji-1 表达水平。Scale bar 100 μm。C: soluble bFGF 和 bFGF-chitosan 处理 MSC 时 Tuji-1 阳性细胞的数据统计。D: RT-PCR 检测 soluble bFGF 和 bFGF-chitosan 处理时 19 d, 3 w, 4 w, 5 w, 40 d 时 Tuji-1RNA 水平的表达。

Figure 2. bFGF-chitosan has the function of recruiting cells to differentiate cells
图 2. bFGF-chitosan 具有招募细胞分化细胞的功能



A: soluble bFGF 处理细胞 4 w 条件神经干细胞 marker nestin 和幼稚神经元 marker Tuj-1 的表达情况。B: bFGF-chitosan 处理细胞 4 w 条件下神经干细胞 marker nestin 和幼稚神经元 marker Tuj-1 的表达情况。bFGF-chitosan 处理条件能够加速 MSC 向神经细胞分化进程。Scale bar 100 μ m。

Figure 3. bFGF-chitosan accelerates the differentiation process
图 3. bFGF-chitosan 加速了分化进程

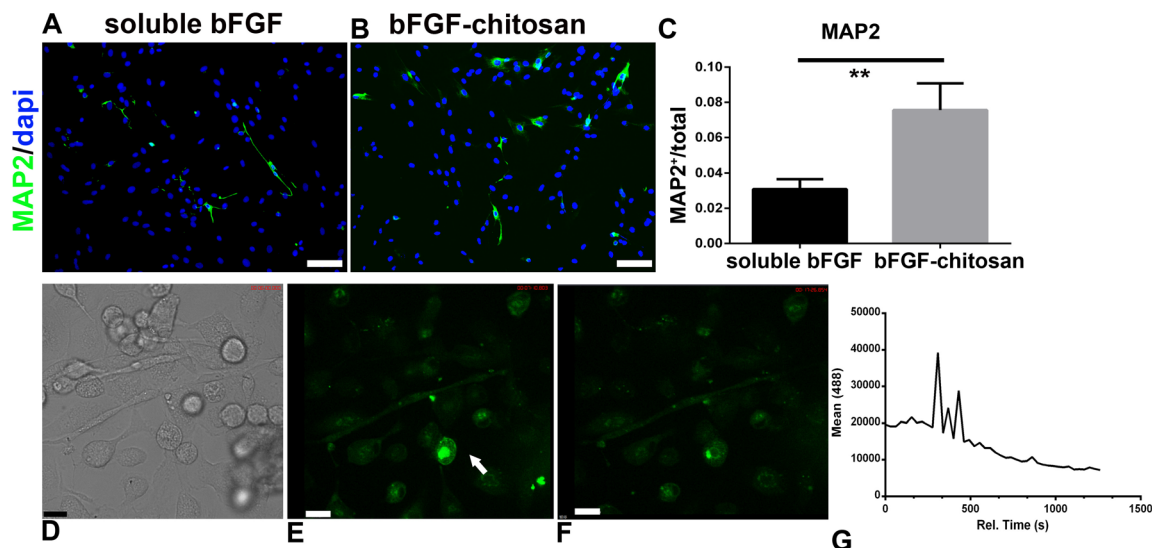
3.4. bFGF-chitosan 能够将 MSC 诱导分化为成熟神经元

接下来我们又研究了 MSC 在不同诱导条件下分化为成熟神经元 marker MAP2 的情况。图 4 中我们发现, bFGF 和 bFGF-chitosan 组都能够诱导成熟神经元 marker MAP2 表达, 但从数量上看, bFGF-chitosan 组要比 bFGF 组要多, 且差异显著。我们又检测了各组中 MAP2 阳性细胞的钙信号的变化。bFGF-chitosan 中在相差显微镜下可以看到部分细胞具有神经元形态, 具有较长突起。钙信号在较短时间内有较大变化, 出现了钙瞬变这种神经细胞特有的钙信号变化特征。说明 bFGF-chitosan 诱导的 MAP2 为功能性神经元。Soluble bFGF 组中没有观察到钙瞬变现象。这表明, bFGF 对于 MSC 分化为神经元为必须, 但 bFGF-chitosan 能够诱导 MSC 为功能性神经元。

4. 讨论

神经元丢失, 失能的不可逆一直以来是导致神经系统损伤或是神经退行性疾病不能治愈的最关键原因。近年来, 人们尝试使用细胞移植的方法, 替代丢失或是失能的神经元。这种替代细胞一般来自胚胎干细胞, 诱导多能干细胞或是神经干细胞。但上述细胞的来源及其免疫, 伦理等问题一直没有得到解决。MSC 作为中胚层起源的细胞, 具有多向分化潜能。能够分化为骨, 脂肪和软骨细胞。先前有报道称 MSC 能够在 bFGF 的诱导条件下分化为神经细胞。其来源广泛, 可以取自自体。这就解决了免疫, 伦理等问题。但先前的报道中通过外源直接添加 bFGF, 这种给药方式不适用于临床。并且, 诱导分化比例较低。我们的研究采用 bFGF-chitosan 载体将 bFGF 于生物可降解材料 chitosan 结合, 使其适用于临床研究。并研究了其分化过程, 发现 bFGF-chitosan 能够将 MSC 诱导为神经球样细胞, 进而分化为神经元, 并且通过钙成像技术, 观察到了钙瞬变这种神经细胞特有的现象。我们的研究解决了外源 bFGF 给药不便的难题, 并阐明了 MSC 分化为神经细胞的过程。为 MSC 应用临床治疗神经系统损伤和神经退行性疾病提供

了理论和现实依据。



A: MSC 在 soluble bFGF 诱导 40 天时 MAP2 表达情况。B: MSC 在 bFGF-chitosan 诱导 40 天时 MAP2 表达情况。C: 各组诱导条件下 MAP2 阳性细胞统计结果。D~G: 钙成像技术检测神经元功能。D: 相差显微镜下细胞形态。E~F: 不同时间下细胞钙信号强度。G: 不同时间下该信号强度的统计。Scale bar: A~B, 100 μ m, D~F: 16 微米。D, E: 图中白色箭头所示为钙信号有明显变化的细胞。

Figure 4. Differentiation of MSC into functional mature neurons under different induction conditions

图 4. MSC 在不同诱导条件下分化为功能性成熟神经元的情况

发现 bFGF-chitosan 能够将 MSC 诱导为神经球样细胞, 进而分化为神经元, 并且通过钙成像技术, 观察到了钙瞬变这种神经细胞特有的现象。我们的研究解决了外源 bFGF 给药不便的难题, 并阐明了 MSC 分化为神经细胞的过程。为 MSC 应用用临床治疗神经系统损伤和神经退行性疾病提供了理论和现实依据。

神经球样细胞是神经干细胞在体外存在的一种非粘附性聚集体方式, 具有分化为神经元, 星形胶质细胞, 少突胶质细胞等神经细胞的能力[12] [13]。不同的培养方法, 诱导方式都能够将其诱导分化。Nestin 和 sox2 通常作为神经干细胞的 marker 被用来检测其是否为神经干细胞。神经球样结构直径的增加从一定程度上增加了聚集细胞的数量, 必然会导致处于球状结构中间的细胞由于接触不到营养物质导致死亡, 这一点由图 A 中神经球样结构内部细胞染色结构可以看出, 中间细胞大多数是 nestin 阴性的结果, 这些细胞由于接触不到营养物质导致不能分化为 nestin 阳性细胞, 随着时间的发展可能会导致细胞死亡。另外, 神经球样结构数目的增多可能会从物理空间上使得更多的分化细胞之间能够建立连接, 这也为后来形成突触样结构建立了基础。Andreas Hermann 等人于 2016 年总结了几种不同的方法来培养 MSC 向神经内皮细胞分化。其中方法 4 采用了低氧结合 20 ng EGF 和 bFGF 的培养 10~20 天的方法(5% CO₂, 92% N₂, and 3% O₂ (protocol 4))将 MSC 分化为神经球样结构并能检测到 Tuj-1, GFAP 阳性细胞但是并不能检测到 MAP2 阳性的细胞[14]。

我们在条件培养基组, 可溶性 bFGF 组和 bFGF-chitosan 组中都检测到了神经干细胞标志物 nestin 阳性的细胞, 说明在正常培养状态下, MSC 能够自发的分化为神经干细胞。bFGF 能够诱导形态特征更明显的神经球的产生。其直径有了明显的增加, 随着诱导时间的增加, 这些神经球样结构在可溶性 bFGF 诱导组同样也能够检测到极少量幼稚神经元的标志物 Tuj-1 阳性细胞和少量成熟神经元特征物 MAP2 阳性细胞, 而在 bFGF-chitosan 诱导下, 检测到了大量 Tuj-1 阳性和 MAP2 阳性细胞并且应用钙成像技术检测到了神经元特异性的钙瞬变现象。这说明 bFGF-chitosan 能够将骨髓间充质干细胞诱导为具有功能的神

经细胞。其诱导过程遵循了干细胞, 幼稚神经元, 成熟神经元的发育规律。为细胞移植治疗神经退行性疾病和神经损伤提供了理论基础。

基金项目

国家自然科学基金资助项目(31730030, 31650001, 31670988, 31320103903, 31771053)。

参考文献

- [1] Yang, Z.Y., Zhang, A.F., Duan, H.M., Zhang, S., Hao, P., Ye, K.Q., Sun, Y.E. and Li, X.G. (2015) NT3-Chitosan Elicits Robust Endogenous Neurogenesis to Enable Functional Recovery after Spinal Cord Injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **112**, 13354-13359. <https://doi.org/10.1073/pnas.1510194112>
- [2] Duan, H.M., Ge, W.H., Zhang, A.F., Xi, Y., Chen, Z.H., Luo, D.D., Cheng, Y., Fan, K.S., Horvath, S., Sofroniew, M.V., Cheng, L.M., Yang, Z.Y., Sun, Y.E. and Li, X.G. (2015) Transcriptome Analyses Reveal Molecular Mechanisms Underlying Functional Recovery after Spinal Cord Injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **112**, 13360-13365. <https://doi.org/10.1073/pnas.1510176112>
- [3] Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., *et al.* (1999) Multilineage Potential of Adult human Mesenchymal Stem Cells. *Science*, **284**, 143-147. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>
- [4] Ding, Z., Liu, X., Ren, X., *et al.* (2016) Galectin-1-Induced Skeletal Muscle Cell Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Seeded on an Acellular Dermalmatrix Improves Injured Anal Sphincter. *Discovery Medicine*, **21**, 331-340.
- [5] Özdal-Kurt, F., Tuğlu, I., Vatansver, H.S., *et al.* (2016) The Effect of Different implant Biomaterials on the Behavior of Canine Bone Marrow Stromal Cells during Their Differentiation into Osteoblasts. *Biotechnic & Histochemistry*, **91**, 412-422. <https://doi.org/10.1080/10520295.2016.1183819>
- [6] Zhang, L.Y., Xue, H.G. and Chen, J.Y. (2016) Genistein Induces Adipogenic Differentiation in Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Suppresses their Osteogenic Potential by Upregulating PPAR γ . *Experimental and Therapeutic Medicine*, **11**, 1853-1858. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3120>
- [7] Kokai, L.E., Rubin, J.P. and Marra, K.G. (2005) The Potential of Adipose-Derived Adultstem Cells as a Source of Neuronal Progenitor Cells. *Plastic and Reconstructive Surgery*, **116**, 1453-1460. <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000182570.62814.e3>
- [8] Zhou, S., Eid, K. and Glowacki, J. (2004) Cooperation between TGF-Beta and Wnt pathways during Chondrocyte and Adipocyte Differentiation of Human Marrow Stromal Cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, **19**, 463-470. <https://doi.org/10.1359/JBMR.0301239>
- [9] Oliveira, J.M., Rodrigues, M.T., Silva, S.S., *et al.* (2006) Novel Hydroxyapatite/Chitosan Bilayered Scaffold for Osteochondral Tissue-Engineering Applications: Scaffold Design and Its Performance When Seeded with Goat Bone-marrow Stromal Cells. *Biomaterials*, **27**, 6123-6137. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.07.034>
- [10] Traktuev, D.O., Parfenova, E.V., Tkachuk, V.A., *et al.* (2006) Adipose Stromalcells-Plastic Type of Cells with High Therapeutic Potential. *Tsitologiya*, **48**, 83-94.
- [11] Woodbury, D., Schwarz, E.J., Prockop, D.J., *et al.* (2000) Adult Rat and Humanbone Marrow Stromal Cells Differentiate into Neurons. *Journal of Neuroscience Research*, **61**, 364-370. [https://doi.org/10.1002/1097-4547\(20000815\)61:4<364::AID-JNR2>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1097-4547(20000815)61:4<364::AID-JNR2>3.0.CO;2-C)
- [12] Reynolds, B.A. and Weiss, S. (1992) Generation of Neurons and Astrocytes from Isolated Cells of the Adult Mammalian Central Nervous System. *Science*, **255**, 1707-1710. <https://doi.org/10.1126/science.1553558>
- [13] Reynolds, B.A. and Weiss, S. (1996) Clonal and Population Analyses Demonstrate That an EGF-Responsive Mammalian Embryonic CNS Precursor Is a Stem Cell. *Developmental Biology*, **175**, 1-13. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0090>
- [14] Hermann, A., Liebau, S., Gastl, R., Fickert, S. and Schwarz, J. (2006) Comparative Analysis of Neuroectodermal Differentiation Capacity of Human Bone Marrow Stromal Cells Using Various Conversion Protocols. *Journal of Neuroscience Research*, **83**, 1502-1514. <https://doi.org/10.1002/jnr.20840>

知网检索的两种方式：

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2161-8976，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：hjbm@hanspub.org