

骨髓间充质干细胞移植至血管性痴呆大鼠模型的初步研究^{*}

井 沅^{1**}, 肖 雁^{1***}, 官志忠^{1,2}

(1. 贵阳医学院 分子生物学重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵阳医学院 病理学教研室, 贵州 贵阳 550004)

[摘 要] 目的: 建立体外分离、培养大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs), 体外诱导 BMSCs 向神经元样细胞方向分化、鉴定并移植至血管性痴呆大鼠模型的方法。方法: 体外分离培养 SD 大鼠 BMSCs, 采用贴壁筛选法分离纯化 BMSCs, 显微镜下观察不同时期 BMSCs 的细胞形态, 流式细胞术检测细胞表面标志物表达鉴定 BMSCs, 用含 10 $\mu\text{g/L}$ bFGF 的 L-DMEM 及含 200 $\mu\text{mol/L}$ BHA、2% DMSO 的无血清 L-DMEM 诱导 BMSCs 向神经元样细胞分化; 免疫细胞化学检测分化细胞的巢蛋白(Nestin)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)的表达, 以确定其分化特性; 用尿嘧啶脱氧核苷(BrdU)标记分化好的细胞, 移植到改良 Pulsinelli's 四血管复制的血管性痴呆(VaD)模型大鼠侧脑室内, 免疫组织化学检测 BrdU 表达以反映移植 BMSCs 在大鼠脑内的生长情况, Morris 水迷宫检测大鼠学习记忆能力。结果: 大鼠 BMSCs 可通过贴壁筛选法成功分离并在体外大量扩增, 流式细胞仪检测显示 BMSCs 第 5 代表面标志可达 90% 以上, 细胞表型 CD90、CD29、CD44 表达阳性, CD45 表达阴性; bFGF/BHA 诱导 BMSCs 分化后有 Nestin 和 NSE 表达, 分化细胞具有神经细胞的形态; 与对照组相比, 模型组大鼠逃避潜伏期明显延长, 第 1 次穿越平台时间延长, 穿越平台次数减少, 差异有统计学意义($P < 0.05$); BrdU 成功标记诱导后的 BMSCs, 并可在移植大鼠脑内检测到 BrdU 标记阳性细胞。结论: 体外成功分离、培养大鼠 BMSCs, 生长稳定、可多次传代, bFGF/BHA 可诱导 BMSCs 分化为神经元细胞, BMSCs 成功移植到 VaD 大鼠, BMSCs 有望为神经疾病细胞移植治疗提供丰富、易得的细胞来源。

[关键词] 骨髓间充质干细胞; 血管性痴呆; 神经元; 分化; 诱导; 移植

[中图分类号] R749.13; R34-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2014)02-0148-06

A Preliminary Study on Impact of Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation on Vascular Dementia Rat Model

JING Hang¹, XIAO Yan¹, GUAN Zhizhong^{1,2}

(1. Key Laboratory of Molecular Biology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China;

2. Department of Pathology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the method of isolation and culture of rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) *in vitro*, and to induce them to differentiate into neuron like cell, identify them and transplant them into vascular dementia rats. **Methods:** BMSCs of SD rats were isolated and purified by adherent screening method. Morphology of BMSCs at different stages was observed under microscope. Cell membrane markers were detected by flow cytometry to identify BMSCs. BMSCs were induced to differentiate into neuron like cell by using L-DMEM including 10 $\mu\text{g/L}$ bFGF and DMEM including 200 $\mu\text{mol/L}$ BHA and 2 % DMSO. Immunocytochemical staining of neural markers such as NSE and Nestin was performed to determine the phenotype characteristics of the differentiated cells. Af-

^{*} [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81160149); 贵州省科技厅社会攻关计划项目 [黔科合 SY(2010)3076]

^{**} 贵阳医学院 2011 级硕士研究生

^{***} 通信作者 E-mail: xiaoyanhanan@hotmail.com

网络出版时间: 2014-04-25 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20140425.2006.032.html>

ter the cell was well differentiated and authenticated, Pyrimidine nucleoside (BrdU) was used to label well differentiated cells, which then were transplanted into lateral ventricle of vascular dementia (VaD) model rats established with improved Pulsinelli's four vessels. The expressions of BrdU and growth conditions of transplanted cells in rats were observed with immunohistochemistry staining. Abilities of learning and memory of rats were tested by using Morris water maze. **Results:** BMSCs was successfully isolated and amplified. 99% of the fifth generation of BMSCs expressed surface markers. CD90, CD28 and CD44 were positive, and CD45 was negative. The differentiated BMSCs induced by bFGF/BHA expressed NSE and Nestin and exhibited neuronal morphological characteristics. Compared with the control group, the rat escape latency period and the period for crossing the platform at the first time in model group significantly prolonged, the number of crossing the platform reduced ($P < 0.05$). BrdU positive cells were detectable in rat brain. **Conclusions:** BMSCs are successfully isolated and cultured *in vitro* and grow stably and can passage time and again. BMSCs can be induced to differentiate into neuron-like cells by bFGF/BHA. BMSCs may provide cellular source for the treatment of neurologic diseases.

[**Key words**] bone marrow mesenchymal stem cells; vascular dementia; neurons; differentiation; induction; transplantation

血管性痴呆 (vascular dementia, VaD) 是老年期痴呆的主要类型, 由一系列脑血管因素 (脑组织梗死、低灌注或出血等) 导致脑组织损害引起, 以认知功能障碍为特征^[1]。目前对 VaD 尚无有效的治疗方法, 干细胞移植为 VaD 治疗提供了新的思路和方法。骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 是存在于骨髓中的一类非造血干细胞, 具有强大的增殖和多向分化潜能, 并能在体内外分化为神经元样细胞, 用其治疗神经系统疾病的研究有着重要的意义^[2-3]。为研究 BMSCs 能否改善 VaD 大鼠学习记忆及其机制, 本研究采用 BMSCs 移植 VaD 大鼠, 探讨 BMSCs 移植对血管性痴呆大鼠模型的初步影响, 为 BMSCs 的临床应用提供理论依据和技术方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂

1.1.1 动物 成年健康 (Sprague-Dawley, SD) 大鼠 60 只 (购自重庆第三军医大), 体重 200 ~ 250 g, 雌雄各半, 随机分为模型组 (模型对照组与干细胞治疗组) 和对照组。对照组 14 只, 模型组每组 23 只。

1.1.2 试剂 胎牛血清、低糖 DMEM 培养基、0.25% 胰蛋白酶液购于 HyClone 公司。CD90、CD29、CD44、CD45 流式抗体购自 BD 公司。巢蛋白 (Nestin)、神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 抗体购

于武汉博士德公司。尿嘧啶脱氧核苷 (BrdU) 免组试剂盒购自上海基因科技有限公司。BHA、bFGF 购于美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 BMSCs 原代分离培养 取 6 周左右健康 SD 大鼠, 10% 水合氯醛 (0.3 mL/100 g) 腹腔注射麻醉, 无菌条件取两侧股骨及胫骨, PBS 清洗 3 次, 用添加青-链霉素的 L-DMEM 培养基冲洗骨髓腔, 反复吹打, 将冲出的骨髓制成单细胞悬液, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入 15% FBS 的培养液, 吹打均匀接种于 25 cm² 培养瓶中, 置 37℃、5% CO₂ 湿度培养箱中培养。

1.2.2 BMSCs 鉴定 取第 5 代已纯化的 BMSCs, 0.25% 胰蛋白酶消化, 4℃ 离心, 1 000 r/min 10 min, 用 PBS 清洗细胞 3 次, 各管分别加入流式单克隆抗体 CD90、CD29、CD44、CD45, 每管样品设立独立同型隐形对照, 于流式细胞仪进行鉴定分析。

1.2.3 BMSCs 的诱导鉴定和标记 选择第 3 代 BMSCs, 加入含 10 μg/L bFGF 的 L-DMEM (10% FBS) 预诱导 24 h^[4], 更换培养液, PBS 洗 3 次, 再加入含 200 μmol/L BHA, 2% DMSO 的无血清 DMEM 诱导 5 h, 用 95% 乙醇固定 40 min, PBS 洗 5 次 × 3 min, 加入 3% H₂O₂ 室温避光孵育 15 min, PBS 洗 3 次 × 3 min, 各孔加入 100 μL NSE、Nestin—抗^[5, 6], 4℃ 孵育过夜, 对固定的细胞进行免疫组织化学染色鉴定分析, 具体步骤按照免疫组化试

剂盒进行。诱导后的 BMSCs 于移植前 24 h 在其培养液中加入 BrdU,使其浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$,继续培养 48 h,离心收集标记后的 BMSCs,备用。

1.2.4 VaD 模型制备 SD 大鼠适应性喂养 1 周,进行 VaD 模型的制备。术前 12 h 禁食,4 h 禁水。大鼠称重后用 10 % 水合氯醛(0.3 mL/100 g)腹腔注射,无菌条件下行背侧颈正中切口,暴露双侧第一颈椎横突翼小孔,用直径 0.5 mm 电凝针插入双侧翼小孔凝闭双侧椎动脉,逐层整理好皮下组织,局部伤口缝合前,涂以适量青霉素粉以防止感染,间断缝合皮肤。24 h 后行颈前正中切口,暴露双侧颈动脉后穿线待用,拉起穿线用微动脉夹夹闭双侧颈总动脉 5 min,共夹闭 3 次,每次间隔 1 h。对照组只分离椎动脉和颈总动脉,不进行椎动脉凝闭和夹闭^[7]。

1.2.5 诱导后 BMSCs 移植 大鼠干细胞移植前禁食 12 h,禁水 6 h,10% 水合氯醛按 0.3 mL/100 g 进行腹腔麻醉,侧脑室(前凶后 1.8 mm,矢状缝旁 2.0 mm,硬膜下 3.8 mm)注射诱导后的 BMSCs,移植细胞数量约为 1×10^6 个,以 1 $\mu\text{L/min}$ 的速度匀速推注^[8]。对照组、模型对照组移植步骤同前,移植等量培养基。干细胞移植后,对照组死亡 7 只,存活 7 只,干细胞治疗组死亡 10 只,存活 13 只,模型对照组死亡 17 只,存活 6 只。

1.2.6 学习记忆能力测定 移植细胞后约 1 月用 Morris 水迷宫检测大鼠的学习记忆能力,进行 Morris 水迷宫定向航行实验和空间探索实验,探索造模成功与否和干细胞移植后是否有所改善。具体方法参考本课题组前期研究结果^[9]。

1.2.7 BrdU 免疫组织化学染色 水迷宫测试结束后,将大鼠脱颈处死,取大鼠脑组织,电子天平称重后立刻装入有 4% 多聚甲醛溶液的瓶子中,进行石蜡包埋、切片及 BrdU 免疫组织化学染色。

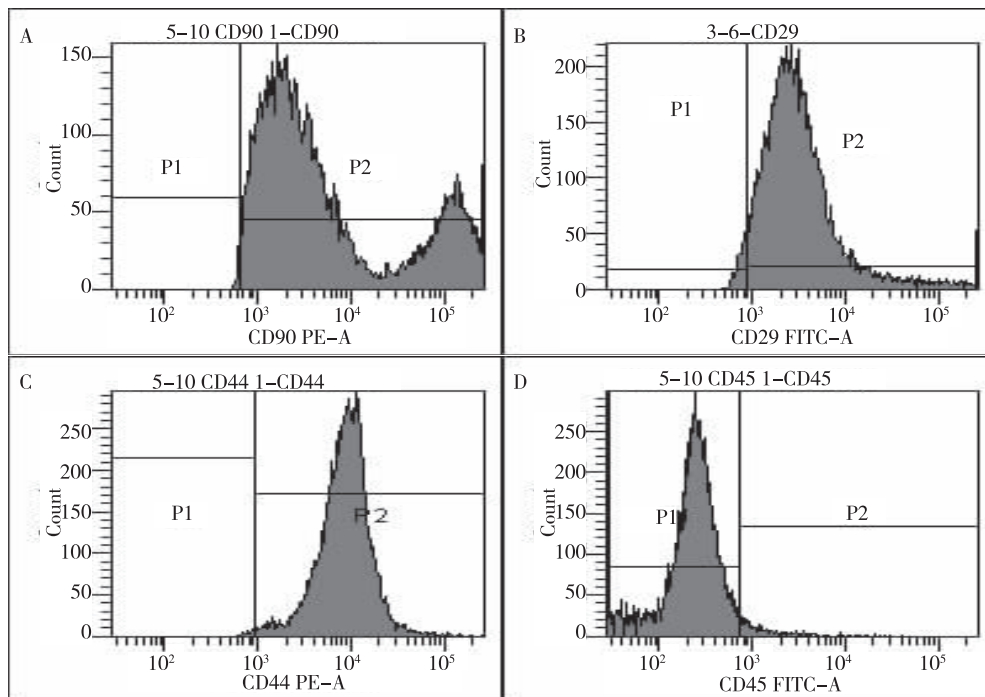
1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计分析软件,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析或非参数检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSCs 表面标志物的表达、诱导及鉴定

流式细胞仪检测结果显示,第 5 代大鼠 BMSCs 均一表达 CD90、CD29 和 CD44,阳性率分别为 99.4 %、96.8 %、99.6 %,而 CD45 呈阴性,阳性率仅为 3.7%。说明该细胞群为未分化的骨髓间充质干细胞,分离培养的第 5 代 BMSCs 其纯度在 95 % 以上,见图 1。BMSCs 加入 bFGF 预诱导 24 h,梭形的 BMSCs 胞体发生收缩,体积变小,细



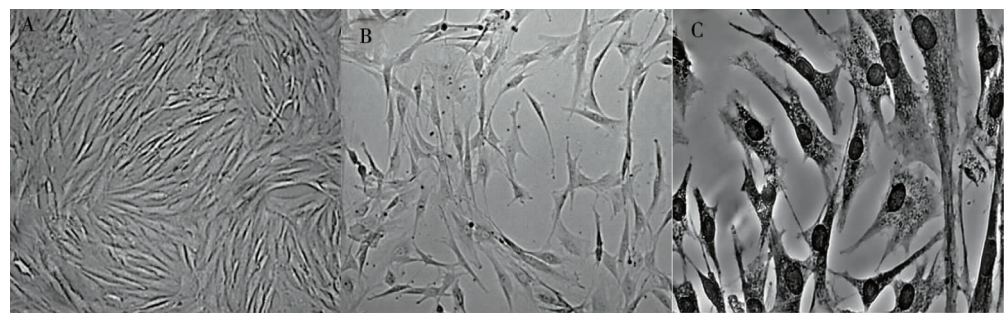
A:CD90; B:CD29; C:CD44; D:CD45

图 1 BMSCs 表面标志物的表达

Fig. 1 The expression of surface makers on BMSCs

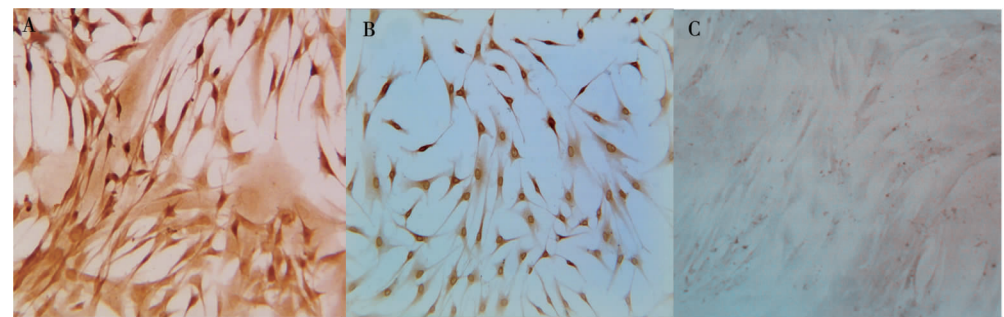
胞边缘不规整,胞体类似于锥形或球形,少部分细胞形态发生改变,细胞变长,有少量突起长出,观察到细胞折光性降低。转入含 DMSO 的 BHA 诱导液 5 h 后,胞体形态立体感、遮光性增强,细胞长出长的突起,呈双极、多极型神经元样细胞形态,有的还有多级分支,类似于树突结构。对照组 BMSCs

无形态变化。诱导后的细胞爬片进行 NSE 和 Nestin 的免疫组化染色发现神经元样细胞的胞体及部分突起 NSE 和 Nestin 染色呈阳性(DAB 染色呈棕色者为阳性细胞),而未加诱导液的对照组染色均为阴性。说明诱导分化所得的细胞为神经元样细胞,见图 2,图 3。



A :诱导对照组;B:bFGF 预诱导 24 h; C:BHA 正式诱导 5 h
图 2 BMSCs 诱导后细胞形态(×200)

Fig.2 The cell morphorlogy of BMSCs after induction



A: Nestin - 200; B :NSE - 200; C:阴性对照
图 3 BMSCs 诱导后免疫组织化学鉴定(×400)

Fig.3 Identification of BMSCs with immunohistochemistry staining after induction

2.2 学习记忆能力

对照组、模型对照组和干细胞治疗组移植30 d,模型对照组与干细胞治疗组中大鼠平均逃避潜伏期长于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),表明 VaD 模型大鼠定向航行能力降低;空间探索实验结果,与对照组比较,模型对照组和干细胞治疗组第 1

次穿越平台区所用时间延长,穿越站台次数明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$),表明 VaD 大鼠学习能力降低,说明造模成功。模型对照组与干细胞治疗组相比,干细胞治疗组逃避潜伏期明显缩短,第 1 次穿越平台时间减少,穿越平台次数增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠定向航行实验及空间探索实验结果($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Navigation test and spatial probe test results of rats in the 3 groups

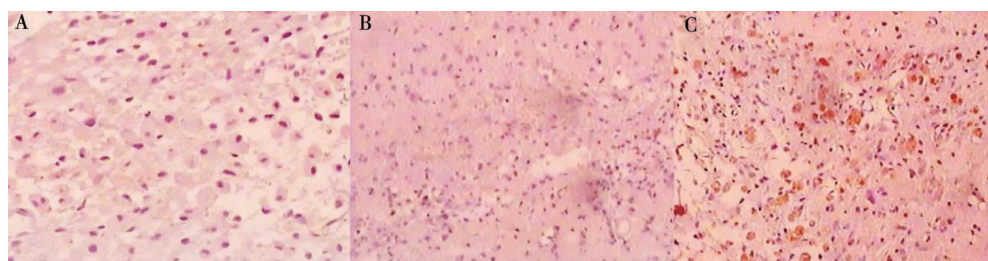
组别	n	定向航行实验(s)				空间探索实验	
		第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第一次穿越平台 时间(s)	平台穿越 次数(次)
对照组	7	17.34	12.77	9.46	8.60	15.88	3.07
模型对照组	6	26.27 ⁽¹⁾	19.06 ⁽¹⁾	15.34 ⁽¹⁾	13.58 ⁽¹⁾	19.72 ⁽¹⁾	1.88 ⁽¹⁾
干细胞治疗组	13	22.16 ⁽¹⁾⁽²⁾	16.06 ⁽¹⁾⁽²⁾	11.47 ⁽¹⁾⁽²⁾	9.88 ⁽¹⁾⁽²⁾	17.07 ⁽¹⁾⁽²⁾	2.78 ⁽¹⁾⁽²⁾

⁽¹⁾ 与对照组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾ 与模型对照组比较, $P < 0.05$

2.3 BrdU 表达

移植后 30 d,干细胞治疗组大鼠脑组织双侧半球切片中可见 BrdU 染色阳性细胞分布,细胞呈圆形或椭圆形,BrdU 阳性反应物呈棕褐色、颗粒状或弥漫性分布,位于细胞核内,提示经 BrdU

标记的 BMSCs 在移植组大鼠脑内可以存活。同时在移植周围部位也可看到较多的 BrdU 染色阳性细胞,提示细胞移植后发生了一定的迁移。对照组、模型对照组未见 BrdU 染色阳性细胞,见图 4。



A:对照组;B:模型对照组;C:干细胞治疗组

图 4 脑组织 BrdU 表达(×100)

Fig. 4 The expression of BrdU in rats of the 3 groups

3 讨论

VaD 突出的表现为记忆力减退,严重的患者表现为精神行为异常,给家庭和社会带来了沉重的负担。随着人口老龄化和脑血管疾病发病率的上升,VaD 的发病率也逐年上升。因此,为 VaD 患者提供有效的治疗是亟待解决的问题,VaD 的研究越来越受到重视^[10]。传统的 VaD 药物治疗主要是一些钙通道阻断剂,而此种药物毒副作用大,且容易复发。现在新兴的干细胞疗法,主要是通过干细胞诱导后能够一定程度代替受损的神经元细胞,从而能够在一定程度上缓解 VaD 的脑损伤。BMSCs 是一种主要存在于骨髓中的干细胞,具有强大的增殖和多向分化的潜能,能在体内、外分化为神经元细胞,是目前干细胞研究的热点和前沿^[11]。

目前,虽然国内外有关 VaD 发病机制的报道较多,但关于 BMSCs 移植治疗 VaD 大鼠以及是否能改善学习记忆机制未见报道,仅有干细胞移植治疗一些传统医学手段无法治疗疾病的研究报道,已取得了一定疗效,如在治疗脑梗死,缺血性脑血管疾病取得了相当的进展^[12]。因此,研究 BMSCs 对 VaD 的治疗机制有着广阔的前景。

因成年动物骨髓腔内以含脂肪细胞较多的黄骨髓为主,BMSCs 较少,而幼年动物骨髓腔内以具有多向分化潜能的未分化幼稚细胞为主,BMSCs 在骨髓中仅占有核细胞的 0.001%~0.01%,且数量随年龄的增加而逐渐减少,故培养 BMSCs 应以幼年动物为细胞来源。本研究选择 6 周龄、体重在

25 g 左右的雄性大鼠股骨、胫骨骨髓分离、培养 BMSCs,进行分离纯化和体外扩增,利用 BMSCs 在体外能快速贴壁生长,形成克隆的特点,采用贴壁细胞分离法分离 BMSCs,通过更换培养基方法除去不贴壁生长的白细胞及造血干细胞,以获得比例更纯的 BMSCs。此方法最初分离的细胞是混杂的细胞群,含有多种不同细胞成分,形态呈多形性,用传代法可进一步对 BMSCs 进行纯化,分离单一克隆细胞成分,传代 3~5 代后,所得 BMSCs 形态趋于一致,可获得纯度达 95% 的 BMSCs^[13]。BMSCs 表达多种表面抗原,但目前尚未发现其特异性抗原,BMSCs 的表型不均一,可表达间质细胞、内皮细胞和表皮细胞的表面标志,目前比较公认的方法主要看其是否具备对塑料底物的黏附性、自我更新能力、多向分化潜能以及流式细胞仪细胞表面标志物检测等分析方法,通过 BMSCs 不表达 CD14、CD34、CD45 而表达 CD106、CD29、CD90、CD105、CD44 等特点,对 BMSCs 进行鉴定。本研究流式细胞仪检测结果为,大鼠体外分离培养的第 5 代 BMSCs 基本不表达造血细胞的表面标志 CD45 (阳性率仅为 3.7%),但是表达 CD90 (阳性率达 99.4%)、CD44 (阳性率 99.6%)、CD29 (阳性率 96.8%)。而且分离所得的细胞在体外具有贴壁性,细胞形态呈长梭形和旋涡状,符合 BMSCs 的形态及细胞表面标志物等特性。说明分离、培养的细胞为较纯 BMSCs^[14]。BMSCs 向神经元样细胞的诱导分化方法主要有 2 种:抗氧化诱导法和神经营养因子诱导法^[15]。前者诱导分化快,但诱导后的细胞存活时间短;后者诱导分化效率高,而且诱导后

的细胞的生长状态明显好于前者。本实验采用了 bFGF/BHA 联合诱导法,诱导后 BMSCs 形态上向神经元方向改变很多,诱导后细胞爬片进行 NSE 和 Nestin 的免疫组化染色呈阳性,显示 BMSCs 经 bFGF/BHA 诱导后,大部分的 BMSCs 可以分化为神经元样细胞^[16],这就为后续的研究提供了重要的实验基础。

BrdU 为胸腺嘧啶脱氧核苷类似物,可以底物形式整合至 DNA 中,作为体内实验中移植细胞的标记和识别^[17]。本实验中将 BrdU 标记的 BMSCs 移植入 VaD 模型大鼠侧脑室内,结果移植组大鼠脑组织中出现了 BrdU 阳性细胞,尤其以缺血区及周围最明显,并随着 BMSCs 向损伤部位的迁移而逐渐增加,移植后 30 d 仍能检测到,而对照组和模型对照组大鼠脑组织中未检测到 BrdU 阳性细胞,证明移植的 BMSCs 成功存活于 VaD 大鼠脑组织缺血病灶及周围区。

本实验经移植治疗后,对三组大鼠进行水迷宫行为学实验,定向航行实验结果显示培养基注射组和干细胞治疗组中大鼠平均逃避潜伏期明显长于对照组,空间探索实验时模型对照组和干细胞治疗组第 1 次穿越平台所用时间延长,穿越站台次数较对照组明显减少,提示 VaD 造模成功。而干细胞治疗组与模型对照组相比,干细胞治疗组逃避潜伏期明显缩短,第 1 次穿越平台时间减少,穿越平台次数增加。说明干细胞治疗组相对于模型对照组记忆和学习能力均有所改善,推测细胞移植后对痴呆大鼠有一定的治疗作用。其治疗机制可能为 BMSCs 在移植区增殖,使得局部神经元轴突再生,神经元之间形成了新的联系,新生细胞及新的突触联系发挥代偿作用,使大鼠海马区神经功能明显恢复,从而促进大鼠学习、记忆能力的改善。

总之, BMSCs 经诱导后移植于 VaD 大鼠侧脑室,可迁移至大鼠脑缺血区及周围并逐渐分化为神经元细胞,从而减轻脑损伤,促进大鼠神经功能恢复,可作为血管性痴呆等缺血性脑病治疗中的理想种子细胞,相关深入研究正在进行中。

4 参考文献

[1] De Lucia N, Grossi D, Trojano L. The genesis of closing - in in Alzheimer disease and vascular dementia: A comparative clinical and experimental study [J]. Neuropsychology, 2014 (2):312 - 318.

[2] Monticone M, Liu Y, Pujic N, et al. Activation of nervous system development genes in bone marrow derived mesenchymal stem cells following spaceflight exposure [J]. J Cell Biochem, 2010 (2):442 - 452.

[3] Bai Y, Li P, Yin G, et al. BMP-2, VEGF and bFGF synergistically promote the osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. Biotechnol Lett, 2013 (3):301 - 308.

[4] Wautier F, Wislet-Gendebien S, Chanas G, et al. Regulation of nestin expression by thrombin and cell density in cultures of bone mesenchymal stem cells and radial glial cells [J]. BMC Neurosci, 2007(8):104.

[5] Duan P, Zhang Y, Han X, et al. Effect of neuronal induction on NSE, Tau, and Oct4 promoter methylation in bone marrow mesenchymal stem cells [J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2012 (4):251 - 258.

[6] 肖雁, 吴昌学, 周凡, 等. 脑通复方制剂对血管性痴呆模型大鼠海马神经元细胞外调节蛋白激酶表达的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2011(9):705 - 708.

[7] 杨龙秀, 刘金萍, 张泰鹏, 等. 甘露醇对骨髓间充质干细胞治疗血管性痴呆大鼠行为学的影响 [J]. 广西医科大学学报, 2011 (1):4 - 8.

[8] 肖雁, 吴昌学, 黄勇, 等. 脑通复方制剂对血管性痴呆大鼠学习记忆及胆碱酯酶活性的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2010(8):627 - 629.

[9] Zhang Y, Shen W, Hua J, et al. Pancreatic islet - like clusters from bone marrow mesenchymal stem cells of human first-trimester abortus can cure streptozocin-induced mouse diabetes [J]. Rejuvenation Res, 2010 (6):695 - 706.

[10] Kirshner HS. Vascular dementia: a review of recent evidence for prevention and treatment [J]. Curr Neurol Neurosci Rep, 2009 (6):437 - 442.

[11] Ribeiro CA, Salgado AJ, Fraga JS, et al. The secretome of bone marrow mesenchymal stem cells-conditioned media varies with time and drives a distinct effect on mature neurons and glial cells (primary cultures) [J]. J Tissue Eng Regen Med, 2011 (8):668 - 672.

[12] 张广宇, 王翠琴, 彭越, 等. 自噬在大鼠骨髓间质干细胞神经分化过程中的作用 [J]. 中国应用生理学杂志, 2013 (5):389 - 390, 394.

[13] Grassel S, Stockl S, Jenei-Lanzl Z. Isolation, culture, and osteogenic/chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. Methods Mol Biol, 2012 (1):203 - 267.

(下转第 161 页)

胞纯度有一定影响,有时可见少数少突胶质细胞混杂生长,通过多次传代后,少突胶质细胞逐渐消失,即可提高 AS 纯度。

本研究成功分离和培养了原代星形胶质细胞,经 GFAP 免疫荧光鉴定星形胶质细胞比例在 95% 以上。成功建立了原代 SD 大鼠大脑皮层星形胶质细胞体系。

4 参考文献

- [1] 刘慧,王小军,胡荣,等. 星形胶质细胞[J]. 生理科学进展, 2004(1):86.
- [2] Sidoryk-Wegrzynowicz M, Wegrzynowicz M, Lee E, et al. Role of astrocytes in brain function and disease[J]. Toxicol Pathol, 2011 (1):115 – 23.
- [3] Mc Carthy K D, Vellis J D. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue[J]. Cell Biol, 1980(85):890 – 902.
- [4] Miraz B, Hdborg H, Thomsen P, et al. The absence of reactive astrocytosis is indicative of a unique inflammatory process in Parkinson's disease[J]. Neuroscience, 2000 (95):425 – 432.
- [5] Lee JW, Lee YK, Yuk DY, et al. Neuro-inflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation [J]. J Neuroinflammation, 2008(5):37.
- [6] LIU B, NEUFELD AH. Activation of epidermal growth factor receptors in astrocytes: from development to neural injury[J]. Neurosci Res, 2007 (16):3523 – 3529.
- [7] 李红霞, 黄厚今, 徐园园, 等. 氟对体外培养大鼠大脑皮层星形胶质细胞的毒性作用[J]. 卫生研究, 2010(1): 86.
(2014-01-20 收稿, 2014-03-25 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 周 凌
- [14] Gao X, Zhang J, Zou H, et al. Identification of rat respiratory mucosa stem cells and comparison of the early neural differentiation potential with the bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. Cell Mol Neurobiol, 2014 (2): 257 – 268.
- [15] Reyes M, Verfaillie C M. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells[J]. Ann N Y Acad Sci, 2001 (6):231 – 235.
- [16] Xiong N, Yang H, Liu L, et al. bFGF promotes the differentiation and effectiveness of human bone marrow mesenchymal stem cells in a rotenone model for Parkinson's disease[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2013 (2):411 – 422.
- [17] Zhang MM, Jia GQ, Cheng JQ, et al. In vitro analysis and in vivo tracing of BrdU-labeled rat bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2012 (2):266 – 270.
(2014-01-10 收稿, 2014-03-15 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 周 凌
- [7] Martone RL, Zhou H, Atchison K, et al. Begacestat (GSI-953): a novel, selective thiophene sulfonamide inhibitor of amyloid precursor protein gamma-secretase for the treatment of Alzheimer's disease[J]. Pharmacol Exp Ther, 2009(2):598 – 608.
- [8] Bray S. Notch[J]. Curr Biol, 2000 (12):R433 – 435.
(2014-01-15 收稿, 2014-03-08 修回)
中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 赵 毅