

人外周血血清培养人脐带间充质干细胞定向诱导为神经干细胞

韩霞¹, 赵瑞东¹, 杨俊丽²

<https://doi.org/10.12307/2024.194>

投稿日期: 2023-04-18

采用日期: 2023-08-24

修回日期: 2023-09-04

在线日期: 2023-09-20

中图分类号:

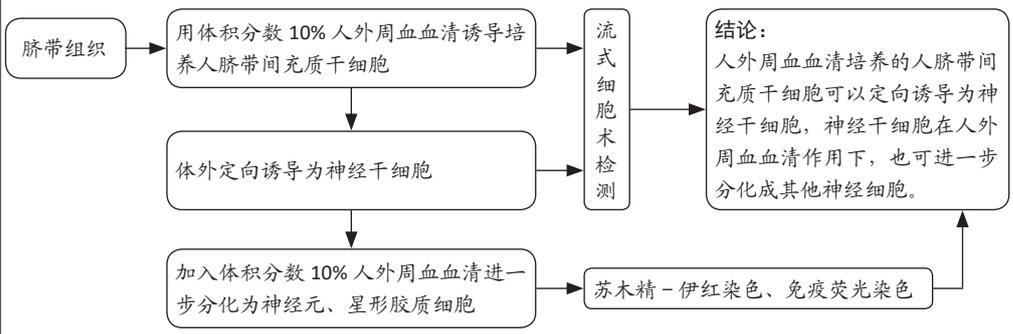
R459.9; R-331; R-392.12

文章编号:

2095-4344(2024)25-04000-05

文献标识码: A

文章快速阅读: 人外周血血清培养人脐带间充质干细胞定向诱导为神经干细胞的可行性



文题释义:

外周血血清: 从外周血中提取血清, 其含有多种自体营养成分和生长因子, 这些因子在促进细胞增殖、组织形成等方面起着极为重要的作用。

神经干细胞: 分布于神经系统, 具有自我更新与复制潜能, 并能分化成神经元、少突胶质细胞和星形胶质细胞等, 其抗原性低、容易通过血脑屏障, 是治疗神经系统疾病理想的干细胞。因其伦理问题和来源困难, 无法广泛应用于临床研究和临床治疗。

摘要

背景: 细胞培养基种类甚多, 成分不尽相同, 对细胞生长影响较大。国内外有多项研究采用无血清、含胎牛血清的培养基进行体外扩增培养, 但应用含人外周血血清的培养基将人脐带间充质干细胞定向诱导为神经干细胞以及人外周血血清促进神经干细胞分化为其他神经细胞, 目前相关研究较少。

目的: 观察人外周血血清培养的人脐带间充质干细胞定向诱导为神经干细胞的可行性。

方法: ①采用含体积分数10%人外周血血清的DMEM/F12培养基培养人脐带间充质干细胞, 传代培养至第3代时应用流式细胞仪分析其表面标志物, 并通过茜素红染色对其成骨分化能力进行检测; ②取第3代人脐带间充质干细胞, 加入培养体系为含0.5%N2、1.5%B27、20 ng/mL碱性成纤维细胞生长因子和20 ng/mL表皮生长因子的DMEM/F12培养基定向诱导为神经干细胞, 对其表面标志物进行鉴定; ③取生长状态良好的人脐带间充质干细胞源性神经干细胞, 制备成单细胞悬液, 均匀接种于96孔板中, 加入含体积分数10%人外周血血清的DMEM/F12培养基继续培养8 d后, 进行苏木精-伊红染色、微管相关蛋白2和胶质纤维酸性蛋白免疫荧光染色, 检测神经干细胞向其他神经细胞分化情况。

结果与结论: ①经人外周血血清培养的人脐带间充质干细胞呈漩涡状生长且多层分布, 排列有方向性; 人脐带间充质干细胞表面高度表达CD44、CD105、CD29、CD73, 茜素红染色阳性; ②人外周血血清培养的人脐带间充质干细胞可以定向诱导分化为神经干细胞, 神经干细胞表面高度表达CD44、CD105、CD29、CD73、Nestin、NF-L、GALC; ③神经干细胞诱导分化第8天时, 经苏木精-伊红染色后发现其伸出的突起长度较长, 分支也较多且邻近细胞之间的突起互连接, 呈典型的神经细胞形态, 且微管相关蛋白2和胶质纤维酸性蛋白免疫荧光染色均呈阳性。结果表明, 人外周血血清培养人脐带间充质干细胞可以定向诱导为神经干细胞, 在人外周血血清的作用下神经干细胞随着培养时间的延长, 可分化为其他神经细胞。

关键词: 人外周血血清; 人脐带间充质干细胞; 神经干细胞; 神经细胞; 分化

Targeted induction of human umbilical cord mesenchymal stem cells cultured with human peripheral blood serum into neural stem cells

Han Xia¹, Zhao Ruidong¹, Yang Junli²

¹Stem Cell Laboratory, ²Health Examination Center, The Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Han Xia, Laboratorian, Stem Cell Laboratory, The Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Corresponding author: Yang Junli, Master, Associate chief physician, Health Examination Center, The Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, Inner Mongolia Autonomous Region, China

内蒙古医科大学附属医院, ¹干细胞实验室, ²体检中心, 内蒙古自治区呼和浩特市 010050

第一作者: 韩霞, 女, 1984年生, 内蒙古自治区包头市人, 汉族, 2016年内蒙古科技大学毕业, 检验师, 主要从事干细胞及自身免疫性疾病治疗研究。

通讯作者: 杨俊丽, 硕士, 副主任医师, 内蒙古医科大学附属医院体检中心, 内蒙古自治区呼和浩特市 010050

<https://orcid.org/0009-0006-9016-1001> (韩霞)

基金资助: 内蒙古医科大学科技百万工程联合资助项目 [YKD2017KJBW(LH)005], 项目负责人: 韩霞

引用本文: 韩霞, 赵瑞东, 杨俊丽. 人外周血血清培养人脐带间充质干细胞定向诱导为神经干细胞 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(25):4000-4004.



Abstract

BACKGROUND: There are many kinds of cell media with different components, which have a great influence on cell growth. Several studies in and outside China have used serum-free media containing fetal bovine serum for *in vitro* amplification culture, but the use of media containing human peripheral blood serum to directionally induce human umbilical cord mesenchymal stem cells to neural stem cells and human peripheral blood serum to promote neural stem cells to differentiate into other nerve cells, so far there are few relevant studies.

OBJECTIVE: To observe the feasibility of inducing human umbilical cord mesenchymal stem cells cultured with human peripheral blood serum into neural stem cells.

METHODS: (1) Human umbilical cord mesenchymal stem cells were cultured in DMEM/F-12 culture medium containing 10% human peripheral blood serum by volume fraction. Flow cytometry analysis was performed at the third passage to identify surface markers and alizarin red staining was used to detect osteogenic differentiation function. (2) The third-generation human umbilical cord mesenchymal stem cells were induced into neural stem cells using DMEM/F-12 medium containing 0.5% N2, 1.5% B27, 20 ng/mL basic fibroblast growth factor, and 20 ng/mL epidermal growth factor, and their surface markers were identified. (3) Well-growing human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived neural stem cells were taken to prepare a single cell suspension. They were evenly inoculated into 96-well plates and incubated with DMEM/F-12 culture medium containing 10% human peripheral blood serum for 8 days. Then, hematoxylin-eosin staining, microtubule-associated protein 2, and glial fibrillary acidic protein immunofluorescence staining were performed to detect the differentiation of neural stem cells into other neural cells.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Human umbilical cord mesenchymal stem cells cultured with human peripheral blood serum grew in a spiral-like pattern and were distributed in multiple layers, with directional arrangement. The surface of human umbilical cord mesenchymal stem cells highly expressed CD44, CD105, CD29, and CD73. Cells stained with alizarin red showed a color reaction. (2) Human umbilical cord mesenchymal stem cells cultured with human peripheral blood serum could be induced to differentiate into neural stem cells, and the surface of neural stem cells was highly expressed with CD44, CD105, CD29, CD73, Nestin, NF-L, and GALC. (3) On day 8 of induced differentiation of neural stem cells, after staining with hematoxylin and eosin, it was found that the protruding protrusions were longer, with more branches and adjacent cells connected, presenting typical neural cell morphology. Immunofluorescence staining for microtubule-associated protein 2 and glial fibrillary acidic protein was positive. It is concluded that human umbilical cord mesenchymal stem cells cultured by human peripheral blood serum can be directly induced to differentiate into neural stem cells. Under the action of human peripheral blood serum, neural stem cells can differentiate into other neural cells as the culture time prolongs.

Key words: human peripheral blood serum; human umbilical cord mesenchymal stem cell; neural stem cell; neural cell; differentiation

Funding: Science and Technology Million Engineering Joint Funding Project of Inner Mongolia Medical University, No. YKD2017KJBW(LH)005 (to HX)

How to cite this article: HAN X, ZHAO RD, YANG JL. Targeted induction of human umbilical cord mesenchymal stem cells cultured with human peripheral blood serum into neural stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(25):4000-4004.

0 引言 Introduction

人脐带间充质干细胞 (human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs) 具有自我更新和多向分化的潜能, 由于取材方便、来源丰富且伦理问题少, 因此具有更加广泛的临床应用与研究价值^[1]。实验采用人外周血血清体外培养 hUC-MSCs, 人外周血血清含有多种营养成分和细胞因子, 可避免培养过程中胎牛血清和 AB 血清所致的异种基因免疫应答的可能, 临床应用更安全, 是理想的营养基质^[2]。

神经干细胞 (neural stem cells, NSCs) 分布于神经系统, 具有自我更新与复制潜能, 并能分化成神经元、少突胶质细胞和星形胶质细胞等^[3-4]。大量研究显示, 不同来源的间充质干细胞在一定条件下可定向诱导为 NSCs^[5-8]。NSCs 具有较强的归巢、趋化向损伤的神经系统聚集特性, 受局部微环境的影响分化为神经细胞^[9-11]; NSCs 除了干细胞共有特性外, 其抗原性低、容易通过血脑屏障、移植后易进入神经系统、免疫系统对其易耐受、在体内生存时间长, 因此是治疗神经系统疾病理想的干细胞^[12-14]。结合既往报道, 该研究选用人外周血血清分离培养 hUC-MSCs, 体外定向诱导为 NSCs, 对 hUC-MSCs 源性 NSCs 的分化功能进行了检测, 为 NSCs 移植修复研究提供理论依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞学实验。

1.2 时间及地点 实验于 2022 年 3-9 月在内蒙古医科大学附属医院干细胞实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 脐带标本 脐带取自内蒙古医科大学附属医院妇产科, 经产妇及家属同意后取足月健康剖宫产新生儿脐带, 4 °C 预冷盐水保存备用。该研究的实施符合内蒙古医科大学附属医

院医学伦理委员会的相关伦理要求 (批准号 2017028)。

1.3.2 实验仪器和试剂 生物安全柜和二氧化碳培养箱购自力新仪器 (上海) 有限公司; 倒置相差显微镜和正置荧光显微镜购自宁波光学股份有限公司; 医用冷藏冷冻箱购自海尔集团公司; 电动移液器购自德国 eppendorf 股份公司; 恒温水浴箱购自上海一恒科学仪器有限公司; 细胞计数仪购自德国默克公司; 高速冷冻离心机购自中科中佳科学仪器有限公司; 流式细胞分析仪购自美国 BD 公司; DMEM/F12、0.25% Trypsin-EDTA(1X)、N2 添加剂和 B27 添加剂均购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; 表皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子、Nestin、NF-L、GALC 抗体均购自美国艾菲公司; IgG1、CD34、CD45、HLA-DR、CD44、CD105、CD29、CD73 抗体均购自美国 BD 公司; 微管相关蛋白 2 抗体、胶质纤维酸性蛋白抗体均购自艾博抗 (上海) 贸易有限公司。

1.4 方法

1.4.1 人外周血血清制备 采集作者本人外周血 50 mL, 分别移入 2 个含肝素的离心管混匀, 4 °C 冰箱冷藏过夜, 1 700×g、4 °C 离心 10 min, 然后放入 56 °C 水浴锅进行热灭活 30 min, 吸取黄色血清, 0.22 μm 针头过滤器过滤除菌并分装, -20 °C 冰箱冻存备用。

1.4.2 人外周血血清诱导培养 hUC-MSCs 脐带标本采集后置于密闭无菌容器中, 2 h 之内进行分离培养, 剪碎的脐带组织均匀涂布接种在 T75 培养瓶内, 加入适量含体积分数 10% 人外周血血清的 DMEM/F12 培养, 48 h 首次换液, 之后三四天换液 1 次, 显微镜下观察其形态变化, 培养至 10 d 时细胞融合至 80% 时开始传代, 用 0.25% Trypsin-EDTA 酶消化, 按 1 : 2 比例传至下 1 代, 标记为第 1 代。培养 3 d 后细胞铺满瓶底, 再次进行传代培养, 传到第 3 代进行细胞鉴定及定向诱导分化。

人脐带间充质干细胞的培养及鉴定:

细胞来源:	人脐带组织
原代培养方法:	组织块贴壁法
基础培养基:	DMEM/F12
添加材料:	体积分数 10% 无菌人外周血血清
原代培养时间:	原代细胞培养 48 h 首次换液, 之后三四天换液 1 次, 培养至 10 d 时开始传代
细胞传代:	细胞融合至 80%, 用 0.25% Trypsin-EDTA 酶消化, 按 1 : 2 比例传至下 1 代, 培养 3 d 后细胞铺满瓶底, 再次进行传代培养, 共传到第 3 代
细胞鉴定:	细胞形态、流式细胞鉴定、定向诱导分化
伦理学批准:	通过内蒙古医科大学附属医院伦理委员批准

1.4.3 流式细胞仪检测 hUC-MSCs 表型表达 取生长良好的第 3 代 hUC-MSCs, 制备成单细胞悬液, 第一管同型对照加入 PE-IgG1, 第二管阴性对照分别加入 PE-CD34、FITC-CD45、Per CP-HLA-DR 抗体, 第三管阳性对照分别加入 FITC-CD44、APC-CD29、PE-CD105, Per CP-CD73 抗体 4 °C 避光孵育 30 min, 400×g 离心 10 min, 弃上清, 加入 700 μL PBS 重悬细胞, 过滤后上 BD FACS Calibur 流式细胞仪检测, 采用 Cellquest 进行分析。

1.4.4 hUC-MSCs 成骨分化 hUC-MSCs 传至第 3 代时, 以 1×10^4 /孔的密度接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁后, 换成含体积分数 10% 人外周血血清、10 mmol/L β-甘油磷酸钠、20 nmol/L 地塞米松、50 μmol/L 维生素 C 的 DMEM/F12 培养基进行培养, 每隔 3 d 全量换液, 20 d 后弃掉培养液, PBS 洗 3 遍, 体积分数 95% 乙醇固定 10 min, 超纯水洗 3 次, 加入 0.1% 茜素红-Tris-HCL 染液 (pH 8.3), 37 °C 染色 30 min, 显微镜下观察。

1.4.5 hUC-MSCs 定向诱导分化为 NSCs 取第 3 代 hUC-MSCs, 调节细胞浓度为 1×10^9 L⁻¹, 置于 T75 培养瓶中, 加入 10 mL 含 0.5% N2、1.5% B27、20 ng/mL 碱性成纤维细胞生长因子和 20 ng/mL 表皮生长因子的 DMEM/F12 培养基, 培养 48 h 后进行换液, 在显微镜下观察其生长状况, 培养第 14 天进行流式细胞鉴定和诱导分化。

1.4.6 hUC-MSCs 源性 NSCs 表型 取生长良好的 hUC-MSCs 源性 NSCs, 制备成单细胞悬液, 第一管同型对照加入 PE-IgG1, 第二管阴性对照分别加入 PE-CD34、FITC-CD45、Per CP-HLA-DR 抗体, 第三管阳性对照分别加入 FITC-CD44、APC-CD29、PE-CD105, Per CP-CD73 抗体, 第四管阳性对照加入 Per CP-Nestin、PE-NF-L、FITC-GALC 抗体避光孵育 30 min, 离心弃上清, 过滤后上流式细胞仪分析。

1.4.7 NSCs 分化为其他神经细胞 取生长良好的 hUC-MSCs 源性 NSCs, 4 °C、400×g 离心 10 min, 弃上清, 用适量 PBS 400×g 离心洗涤 10 min, 弃上清, 加入 2 mL 0.25% Trypsin-EDTA 酶消化 1 min, 用自制切割器机械分离成 1×10^7 L⁻¹ 单细胞悬液, 种植于预先放置多聚赖氨酸包被的无菌盖玻片的 24 孔板中, 每孔 500 μL 细胞悬液, 加入含体积分数 10% 人外周血血清的 DMEM/F12 培养基继续培养。在细胞诱导分化培

养第 8 天时, 进行苏木精-伊红染色以及免疫荧光染色。

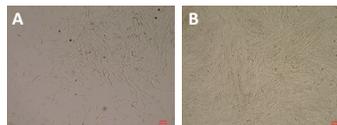
1.4.8 神经细胞苏木精-伊红染色 取出 NSCs 诱导分化的神经细胞爬片, 用体积分数 95% 乙醇固定 10 min, 依次置于体积分数 80% 乙醇、体积分数 70% 乙醇 3 s 后, 过水 1 s, 然后置于苏木精染液中 5 min, 浸入水中 30 min, 伊红染液复染 2 min, 过水 1 s 后置于无水乙醇, 瞬间取出后置于二甲苯中 5 min, 封固后正置显微镜下观察。

1.4.9 神经细胞免疫荧光染色 取出 NSCs 诱导分化的神经细胞爬片, 40 g/L 多聚甲醛固定 30 min; PBS 浸洗 3 次, 5 min/次; 0.3% TritonX-100 破膜 30 min; 滴加 100 μL 体积分数 5% 山羊血清封闭 30 min, 吸水纸把液体吸去; 分别滴加一抗微管相关蛋白 2、胶质纤维酸性蛋白 (1 : 200) 单克隆抗体, 置于湿盒, 4 °C 冰箱孵育过夜; PBS 浸洗 3 次, 5 min/次; 吸水纸吸去液体, 滴加二抗 (1 : 500) 置于湿盒中, 37 °C 温箱孵育 1 h; PBS 浸洗 3 次, 5 min/次; 吸去多余水分, 滴加 DAPI (1 : 1 000) 染核 5 min; 超纯水充分洗片 5 min; 50% 甘油封固, 荧光显微镜下观察拍照。

1.5 主要观察指标 ①体外培养过程中 hUC-MSCs 及 NSCs 的生长状态及形态学变化; ②流式细胞术检测 hUC-MSCs 及 NSCs 表型的表达; ③茜素红染色观察 hUC-MSCs 向成骨细胞分化情况; ④ NSCs 进一步诱导分化后的神经细胞进行苏木精-伊红染色及免疫荧光染色鉴定。

2 结果 Results

2.1 人外周血血清诱导的 hUC-MSCs 体积分数 10% 人外周血血清诱导培养的 hUC-MSCs 在倒置显微镜下观察可见呈漩涡状生长且多层分布, 排列有方向性, 细胞多呈梭形或纺锤状, 见图 1。



图注: 图 A 为原代脐带间充质干细胞培养第 7 天; B 为第 3 代脐带间充质干细胞培养第 4 天。

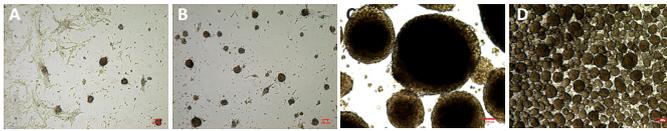
图 1 | 分离培养的人脐带间充质干细胞形态 (标尺为 100 μm)

Figure 1 | Morphology of isolated and cultured human umbilical cord mesenchymal stem cells (scale bars: 100 μm)

2.2 hUC-MSCs 定向诱导分化为 NSCs hUC-MSCs 加入神经干细胞诱导培养液培养三四天, 细胞体积开始变小, 仍呈漩涡样排列, 当诱导培养 7-10 d 时, 大部分细胞开始聚集在瓶底部, 形成小的球形细胞簇。随着培养时间延长, 球形结构逐渐离开培养瓶底形成了悬浮的细胞团, 形态规则, 致密, 折光性强, 无突起生长, 形成典型的神经球细胞团, 细胞团生长迅速, 由最初的小细胞团逐渐增大增多, 见图 2。

2.3 流式细胞仪检测 hUC-MSCs 表型 流式细胞仪分析可见, hUC-MSCs 表面高度表达 CD44、CD105、CD29、CD73, 不表达 HLA-DR、CD34、CD45, 见图 3。

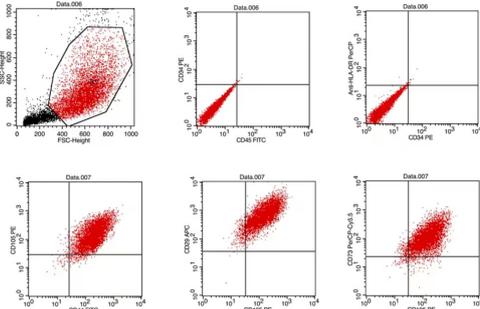
2.4 流式细胞仪检测 hUC-MSCs 源性 NSCs 表型 hUC-MSCs 源性 NSCs 高度表达 CD44、CD105、CD29、CD73、Nestin、NF-L、GALC, 不表达 HLA-DR、CD34、CD45, 见图 4。此结果



图注：图 A 为 hUC-MSCs 源性 NSCs 培养第 4 天；B 为 hUC-MSCs 源性 NSCs 培养第 7 天；C, D 为 hUC-MSCs 源性 NSCs 培养第 14 天。

图 2 | 脐带间充质干细胞 (hUC-MSCs) 定向诱导的神经干细胞 (NSCs) 形态 (标尺为 100 μm)

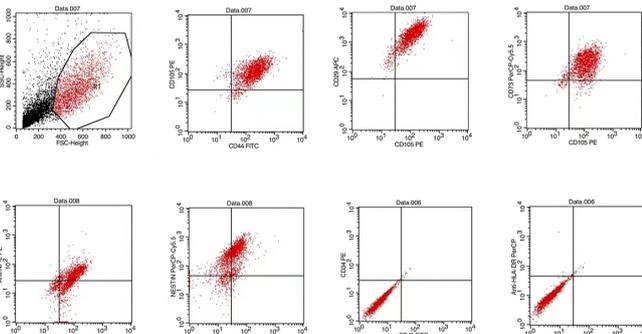
Figure 2 | Morphology of neural stem cells induced by directional induction of umbilical cord mesenchymal stem cells (scale bars: 100 μm)



图注：PE-IgG1 为 hUC-MSCs 同型对照组；hUC-MSCs 表面高度表达 CD44、CD105、CD29、CD73，而不表达 HLA-DR、CD34、CD45。

图 3 | 流式细胞仪分析人脐带间充质干细胞 (hUC-MSCs) 的表型

Figure 3 | Analysis of phenotype of human umbilical cord mesenchymal stem cells using flow cytometry



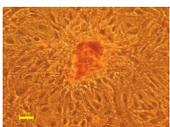
图注：PE-IgG1 为 hUC-MSCs 同型对照组；hUC-MSCs 源性 NSCs 高度表达 CD44、CD105、CD29、CD73、Nestin、NF-L、GALC，不表达 HLA-DR、CD34、CD45。

图 4 | 流式细胞仪分析人脐带间充质干细胞 (hUC-MSCs) 来源的神经干细胞 (NSCs) 表型

Figure 4 | Flow cytometry analysis of neural stem cells phenotype derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells

与国内外研究文献记载的 NSCs 特异性表面标记物相符^[15-17]。因此，通过上述形态学观察和表面标志物的表达可证实人外周血清培养的 hUC-MSCs 成功诱导为 NSCs。

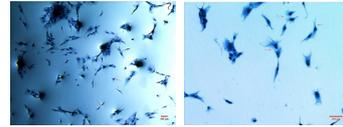
2.5 成骨细胞茜素红染色 hUC-MSCs 成骨诱导分化后，茜素红染色镜下可观察到茜素红与钙发生显色反应，产生一种深红色的带色化合物，即茜素红染色阳性，见图 5。



图注：成骨细胞表面沉积的钙结节被染成了深红色。

图 5 | 人脐带间充质干细胞成骨诱导分化 (茜素红染色，标尺为 20 μm)
Figure 5 | Osteogenic induction and differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells (alizarin red staining; scale bars: 20 μm)

2.6 神经细胞苏木精-伊红染色结果 用含体积分数 10% 人外周血清的 DMEM/F12 培养基继续培养 NSCs，随着培养时间的延长，神经球开始贴壁，并向周围伸出长突起，呈单极或多极神经细胞样改变，部分突起出现分支。诱导分化第 8 天时，经苏木精-伊红染色后的神经细胞在显微镜下可更直观地发现其伸出的突起长度较长，分支也较多且邻近细胞之间的突起互相连接，呈典型的神经细胞形态，见图 6。

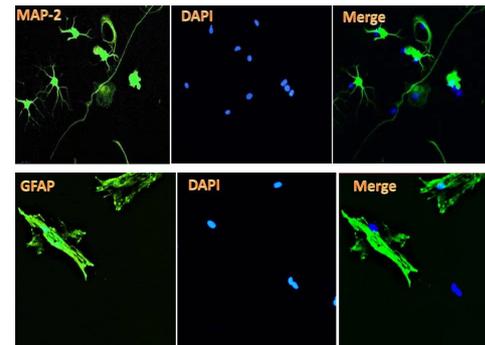


图注：红色箭头所示细胞伸出较长的突起，并可见邻近细胞间相互连接成网状，呈现出典型神经细胞样改变。

图 6 | 人脐带间充质干细胞源性神经干细胞分化为神经细胞 (苏木精-伊红染色，标尺为 100 μm)

Figure 6 | Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells derived neural stem cells into other neural cells (hematoxylin-eosin staining; scale bars: 100 μm)

2.7 神经细胞免疫荧光染色结果 免疫荧光检测结果显示微管相关蛋白 2 染色阳性；胶质纤维酸性蛋白染色呈阳性，阳性细胞呈多角形，突起较多，且多由贴壁分化的神经球向四周放射状发出，这充分说明神经干细胞随着培养时间的延长可分化成神经元和星形胶质细胞，见图 7。



图注：微管相关蛋白 2(MAP-2) 阳性细胞 (+)，即神经元；胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 阳性 (+) 细胞，即星形胶质细胞。

图 7 | 免疫荧光染色鉴定体外诱导人脐带间充质干细胞源性神经干细胞向神经元和星形胶质细胞分化 (×100)

Figure 7 | Immunofluorescence staining identification of *in vitro* induced differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells derived neural stem cells into neurons and astrocytes (×100)

3 讨论 Discussion

研究显示，hUC-MSCs 具有高度增殖、低免疫原性、多向分化潜能等特点，在特定条件下可分化为神经细胞、肝细胞、成骨细胞等^[18-19]，参与细胞及组织的修复，在自身免疫性疾病、肝纤维化、神经系统等医学领域中具有广泛的应用前景^[20-21]。而脐带组织以其来源广泛、取材方便、无伦理学问题等特点而更加受到研究者的青睐^[22-23]。hUC-MSCs 培养过程中通常使用胎牛血清，而胎牛血清含有牛类蛋白可能会引起局部免疫反应及炎症反应^[24-25]。为此，通过查阅文献及预实验筛选，该实验采用人外周血清来代替胎牛血清，并成功分离培养出脐带间充质干细胞，细胞形态呈漩涡状生长且多层分布，排列有方向性，细胞多呈梭形或纺锤状；对其表面标志物与分化功能进行检测，结果显示表面标志物 CD44、CD105、CD29、CD73 均为高表达，不表达 HLA-DR、

CD34、CD45，成骨诱导分化后经茜素红染色可见钙结节，其生长特性和生物学特性与文献相符^[26]，这充分说明人外周血清的多种自体营养成分和自身生长因子，既可成功诱导分化，又可避免培养过程中胎牛血清和 AB 血清所致的异种基因免疫应答的可能，是理想的营养基质。NSCs 除了干细胞共有生物学特性外，其抗原性低、容易通过血脑屏障，所以移植后易进入神经系统，免疫系统对其易耐受，在体内生存时间长，因此是治疗神经系统疾病理想的干细胞^[27-28]。由于伦理问题和来源困难，NSCs 无法广泛应用于临床研究和临床治疗，研究人员针对这一困扰不断研究，证实了脐带间充质干细胞可定向诱导分化为 NSCs，表达 Nestin、神经特异性抗原标志 NF-L、星形胶质细胞表面标记物胶质纤维酸性蛋白及少突胶质细胞表面标记物 GALC^[29-30]。该实验基于以上文献报道，采用了培养体系为含 0.5%N2、1.5%B27、20 ng/mL 碱性成纤维细胞生长因子和 20 ng/mL 表皮生长因子的 DMEM/F12 培养基进行诱导培养，结果显示诱导后的细胞形态均呈神经球样改变，流式细胞分析显示神经干细胞高表达 Nestin、NF-L、GALC，从细胞形态学以及特异性表面标记物可证实人外周血清培养的脐带间充质干细胞成功诱导神经干细胞。在体积分数 10% 人外周血清作用下，NSCs 随着培养时间延长，可进一步分化为神经细胞，对分化出来的神经细胞进行苏木精-伊红染色，显微镜下可更加直观地看到神经细胞之间形成的神经连接及网络。免疫荧光以微管相关蛋白 2 染色阳性代表神经元，胶质纤维酸性蛋白染色阳性则代表星形胶质细胞，实验发现微管相关蛋白 2 标记的细胞突起呈单极和多极分化，细胞之间形成良好的突触连接，为典型神经元样，胶质纤维酸性蛋白标记的细胞呈扁平多极，说明人外周血清可使神经干细胞分化为成熟的神经元和星形胶质细胞^[31-36]。

综上所述，人外周血清培养的 hUC-MSCs 在体外可以定向诱导为 NSCs，而 NSCs 在人外周血清的作用下可进一步分化为神经元及星形胶质细胞，具有神经细胞的特异性，且无伦理和取材不便等问题，为大规模体外诱导培养 NSCs 摸索出优化的实验方案。

作者贡献：韩霞负责实验实施、论文撰写、实验数据分析处理以及细胞培养；赵瑞东负责指标检测；杨俊丽负责数据和文章的校对及实验设计。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》；文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次文字和图表查重；文章经小同行外审专家双盲审稿，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] 戴如飞, 叶英, 曾因明, 等. 不同来源血清体外培养骨髓间充质干细胞的研究 [J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2009,30(5):390-393,398.
- [2] 董震, 张洪涛, 范月超, 等. 自体血清培养人骨髓间充质干细胞及其向神经细胞分化 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007,11(42):8520-8523.

- [3] VIEIRA MS, SANTOS AK, VASCONCELLOS R, et al. Neural stem cell differentiation into mature neurons: Mechanisms of regulation and biotechnological applications. *Biotechnol Adv.* 2018;36(7):1946-1970.
- [4] POUSS L, DESHPANDE SS, NATH S, et al. Fibrinogen induces neural stem cell differentiation into astrocytes in the subventricular zone via BMP signaling. *Nat Commun.* 2020;11(1):630.
- [5] 刘吉星, 侯博儒, 杨文栋, 等. 神经干细胞体外培养鉴定及诱导分化的表型特征 [J]. 中国组织工程研究, 2015,19(19):3054-3060.
- [6] 田鑫. 人胎盘间充质干细胞的分离鉴定及诱导其向神经干细胞的分化 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2019.
- [7] 杜佳蕾, 张曦元, 万娜, 等. 体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞向神经干细胞分化的研究进展 [J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2017,5(27):32-33.
- [8] CHEN S, ZHANG W, WANG JM, et al. Differentiation of isolated human umbilical cord mesenchymal stem cells into neural stem cells. *Int J Ophthalmol.* 2016;9(1):41-47.
- [9] ASSINCK P, DUNCAN GJ, HILTON BJ, et al. Cell transplantation therapy for spinal cord injury. *Nat Neurosci.* 2017;20(5):637-647.
- [10] LU P, WANG Y, GRAHAM L, et al. Long-distance growth and connectivity of neural stem cells after severe spinal cord injury. *Cell.* 2012;150(6):1264-1273.
- [11] HUANG L, FU C, XIONG F, et al. Stem Cell Therapy for Spinal Cord Injury. *Cell Transplant.* 2021;30:963689721989266.
- [12] GONG Z, XIA K, XU A, et al. Stem Cell Transplantation: A Promising Therapy for Spinal Cord Injury. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2020;15(4):321-331.
- [13] SUZUKI H, SAKAI T. Current Concepts of Stem Cell Therapy for Chronic Spinal Cord Injury. *Int J Mol Sci.* 2021;22(14):7435.
- [14] 陈晓丽, 李少川, 陈久智, 等. 神经干细胞治疗脊髓损伤的研究近况 [J]. 中国医药生物技术, 2017,12(5):424-428.
- [15] 季丽莉, 傅雷, 王振宇. 神经干细胞的生物学特性和体外培养鉴定 [J]. 解剖科学进展, 2007,13(2):180-182.
- [16] 刘莎, 刘俊涛, 郑彦茹, 等. 人脐带间充质干细胞的生物学特性及向神经样细胞分化的研究 [J]. 中国医药科学, 2018,8(5):37-39,176.
- [17] 王光辉, 张敏娜, 钟鸣, 等. 一种神经干细胞制剂及其制备方法: CN201810496205.1[P].CN109939128A[2023-08-13].
- [18] 易笑, 刘凡, 陈枫, 等. 人脐带和胎盘不同层次间充质干细胞的生物学特性分析 [J]. 生物工程学报, 2022,38(3):1183-1189.
- [19] 徐曼. 人脐带不同组织来源间充质干细胞的分离培养及其免疫调控能力和支持造血的实验研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2011.
- [20] JU Y, YI L, LI C, et al. Comparison of biological characteristics of human adipose- and umbilical cord- derived mesenchymal stem cells and their effects on delaying the progression of osteoarthritis in a rat model. *Acta Histochem.* 2022;124(6):151911.
- [21] YIN F, WANG WY, JIANG WH. Human umbilical cord mesenchymal stem cells ameliorate liver fibrosis in vitro and in vivo: From biological characteristics to therapeutic mechanisms. *World J Stem Cells.* 2019;11(8):548-564.
- [22] 韩振霞, 时庆, 汪大琨, 等. 骨髓源与脐带源间充质干细胞的基本生物学特征比较 [J]. 中国实验血液学杂志, 2013,21(5):1248-1255.
- [23] 吕璐璐, 宋永平, 魏旭东, 等. 人脐带和骨髓源间充质干细胞生物学特征的对比研究 [J]. 中国实验血液学杂志, 2008,16(1):140-146.
- [24] TUSCHONG L, SOENEN SL, BLAESE RM, et al. Immune response to fetal calf serum by two adenosine deaminase-deficient patients after T cell gene therapy. *Hum Gene Ther.* 2002;13(13):1605-1610.
- [25] 刘立强, 李森恺, 范金财, 等. 自体血清与胎牛血清培养口腔黏膜角质细胞及上皮组织的实验研究 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2006,20(4):467-470.
- [26] MUSHAHARY D, SPITTLER A, KASPER C, et al. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry A.* 2018;93(1):19-31.
- [27] DE GIOIA R, BIELLA F, CITTERIO G, et al. Neural Stem Cell Transplantation for Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci.* 2020;21(9):3103.
- [28] CURTIS E, MARTIN JR, GABEL B, et al. A First-in-Human, Phase I Study of Neural Stem Cell Transplantation for Chronic Spinal Cord Injury. *Cell Stem Cell.* 2018;22(6):941-950.e6.
- [29] 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. *Int J Mol Cell Med.* 2016;5(3):167-177.
- [30] XIAO L, WANG M, ZOU K, et al. Effects of ginsenoside Rg1 on proliferation and directed differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into neural stem cells. *Neuroreport.* 2022;33(10):413-421.
- [31] 孟凡刚, 吴承远, 刘猛. 神经干细胞的生物学特性及应用潜能研究进展 [J]. 中华实验外科杂志, 2003,20(8):767-768.
- [32] 欧亚, 王小冬, 蔡亚楠, 等. ADSC 源性神经干细胞向神经元和星形胶质细胞不同方向分化时的超微结构变化研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2011,27(7):1414-1418.
- [33] 管倩, 栾佐, 叶豆, 等. 人少突胶质前体细胞代过程中形态学的变化 [J]. 中国组织工程研究, 2021,25(7):1045-1049.
- [34] 卞菁, 郑娇, 朱明健, 等. 诱导多功能干细胞分化为脊髓神经元的代表性标志物的鉴定 [J]. 南通大学学报 (医学版), 2013,33(1):51-56.
- [35] AGHOLME L, LINDSTRÖM T, KÄGEDAL K, et al. An in vitro model for neuroscience: differentiation of SH-SY5Y cells into cells with morphological and biochemical characteristics of mature neurons. *J Alzheimers Dis.* 2010;20(4):1069-1082.
- [36] 黎海燕, 罗杰峰, 沈岳飞. 控制和影响神经干细胞增殖分化为神经元细胞的途径及因素 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007,11(3):559-562.

(责任编辑: ZM, MZH, ZN, QY)