

· 基础研究 ·

人羊膜组织细胞神经生物学特性形态学研究*

潘琳¹ 舒峻¹ 蔡哲^{1,2} 张岚¹ 郭艳茹¹ 徐波³ 向青³
耿同超⁴ 牟亮⁵ 孔祥英⁵ 左萍萍⁵

摘要 目的:利用神经干细胞特异性标志蛋白,鉴定人羊膜组织中神经细胞的存在,从组织和细胞形态学角度探讨羊膜组织细胞的神经生物学特性。**方法:**利用 TH、AchT、NeuN、MAP2、CNPase、MBP 和 GFAP 单克隆抗体,通过免疫组织化学、免疫细胞化学和免疫荧光细胞化学技术方法,检测羊膜组织细胞中的多巴胺能神经元、胆碱能神经元、神经元、少突胶质细胞和胶质细胞。**结果:**羊膜组织细胞中存在 TH、AchT、NeuN、MAP2、CNPase、MBP 和 GFAP 等神经细胞特异性标记蛋白表达阳性细胞。**结论:**实验结果提示羊膜组织细胞内可能存在多巴胺能神经元、胆碱能神经元少突胶质细胞和星形胶质细胞等。这对细胞移植治疗帕金森氏病、老年痴呆和多发性硬化等神经系统疑难疾病将具有一定的临床意义。

关键词 人羊膜细胞;神经细胞;神经元;神经系统退行性疾病;神经干细胞

中图分类号:R338,R741 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2006)-01-0046-04

The morphologic study of the characteristics of neurobiology of the amniotic membrane/PAN Lin, SHU Jun, CAI Zhe, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006,21(1):46—49

Abstract Objective: To investigate the characteristics of neurobiology of the amniotic cells by utilizing the specific protein markers of the nerve stem cell and identifying the neurocytes in human amniotic membrane.**Method:** The human amniotic cells respectively stained with mouse anti-Tyrosine hydroxylase (THase) monoclonal antibody, anti-myelin basic protein (MBP) monoclonal antibody, anti-neuroal nuclei (NeuN) monoclonal antibody, anti-2'3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) monoclonal antibody, anti-microtubule-associated protein 2 (MAP2) monoclonal antibody, anti-choline acetyltransferase (ChAT) monoclonal antibody, anti-gial fibrillary acidic protein (GFAP) monoclonal antibody were detected the dopaminergic neuron, cholinergic neuron, oligodendrocyte, astrocyte and so on with the technique processes of immunohistochemistry, immunocytochemistry, immunofluorescence.**Result:** The specific protein markers of neurocyte such as TH, AchT, NeuN, MAP2, CNPase, MBP and GFAP were expressed in human amniotic cells.**Conclusion:** The dopaminergic neuron, cholinergic neuron, oligodendrocyte, astrocyte may be presented in human amniotic membrane, which has clinical implications for the treatment of the nervous system degenerative diseases Parkinson's disease, Alzheimer's disease and multiple sclerosis.

Author's address Institute of Clinical Medical Sciences, China-Japan Friendship Hospital, Beijing, 100029

Key words human amniotic cells; neurocyte; neuron; nervous system degenerative diseases; nerve stem cell

许多神经系统退行性疾病都伴有神经细胞的死亡,如老年痴呆症是胆碱能神经元的大量死亡;帕金森病是由于多巴胺能神经元缺失。由于神经系统病损后难以通过自身修复来恢复结构和功能,长期以来人们一直在探索通过细胞移植来修复病损的神经组织。1992 年 Reynolds^[1]首次成功地从成年小鼠纹状体中分离出神经干细胞(neural stem cell, NSC),促进再生医学领域主要治疗方法细胞移植的临床应用研究的进展,使神经干细胞移植对治疗目前常规方法难以见效的神经系统疾患提供了广阔的思路和诱人的前景。神经干细胞能够分泌大量的营养物质,能够促进机体损伤神经功能的修复;可以代替人体内已经死亡的神经细胞,修复损伤的神经功能。但是目前广泛使用的胚源人神经干细胞的伦理学、成瘤

性和来源受限等问题限制了神经干细胞移植的临床应用和推广。而羊膜组织的羊膜上皮细胞抗原性低^[2],系产后废弃物组织细胞来源充分,无伦理学问题。近年来研究表明羊膜组织细胞具有神经细胞的

* 基金项目:北京市自然科学基金重点项目(5041002);国家自然科学基金项目(30471773)

1 中日友好医院临床医学研究所免疫学研究室,北京市朝阳区和平街北口,100029

2 通讯作者:蔡哲(中日友好医院临床医学研究所免疫学研究室,北京市朝阳区和平街北口,100029)

3 中日友好医院临床医学研究所生化-分子生物学研究室

4 清华大学附属玉泉医院神经内科

5 中国医学科学院基础医学研究所药理学研究室

作者简介:潘琳,女,副主任医师

收稿日期:2005-12-05

神经生物学特点和功能,上述优势使羊膜组织细胞有望成为再生医学领域的可靠细胞来源,为此,我们在完成羊膜组织细胞内神经前体细胞鉴定基础上^[3],利用形态学方法对羊膜组织细胞进行观察,从组织形态学角度探讨羊膜组织细胞的神经生物学特性,以促进细胞移植治疗神经系统退行性疾病和外伤性神经损伤临床应用研究进展。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本:健康产妇正常分娩的产后废弃羊膜组织。

1.1.2 试剂:一级抗体为小鼠抗胶质纤维酸性蛋白(mouse anti-glial fibrillary acidic protein monoclonal antibody, anti-GFAP mAb, CHEMICON), 小鼠抗酪氨酸羟化酶(mouse anti-Tyrosine hydroxylase monoclonal antibody, anti-TH mAb, CHEMICON), 小鼠抗髓鞘碱性蛋白(mouse anti-myelin basic protein monoclonal antibody, anti-MBP mAb, Sant Cruz), 小鼠抗环核苷酸磷酸二酯酶(mouse anti-2'3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase monoclonal antibody, anti-CNPase, CHEMICON), 小鼠抗微管相关蛋白(mouse anti-microtubule-associated protein 2 monoclonal antibody, anti-MAP2, CHEMICON), 小鼠抗神经元核单克隆抗体(mouse anti-neuroal nuclei monoclonal antibody, anti-NeuN, CHEMICON), 小鼠抗乙酰胆碱转移酶(mouse anti-choline acetyltransferase monoclonal antibody, anti-ChAT, CHEMICON)。二级抗体为罗丹明标记山羊抗小鼠 IgG (Rhodamine (TRITC)-conjugated affinipure goat anti-mouse IgG (H+L), 中杉金桥), FITC 标记山羊抗小鼠 IgG (Fluorescein-conjugated affinipure goat anti-mouse IgG (H+L), 中杉金桥), 辣根酶标记羊抗小鼠 IgG (Peroxidase-conjugated affinipure rabbit anti-goat IgG (H+L), 中杉金桥)。DMEM/F12 培养基(Gibco), 胎牛血清(Hyclone)胰蛋白酶(Sigma)。

1.1.3 主要实验仪器:Olympus 荧光正置显微镜(BX-51, 日本)和 Olympus 倒置显微镜(LX-71, 日本)。离心涂片机(L-TPC, 中国)

1.2 方法

1.2.1 人羊膜组织细胞分离和培养:取产后弃置的新鲜胎盘,机械分离羊膜组织,以生理盐水漂洗去掉血凝块,在灭菌的 PBS(含青霉素 1000U/ml,链霉素 1000U/ml,庆大霉素 100U/ml)浸泡 1.5h,在无菌条件下剥离羊膜上皮并将其剪成糜状,0.25%胰蛋白

酶 37℃消化 1h,含 5%胎牛血清 DMEM/F12 终止消化,轻柔吹打混匀后 200 目细胞筛过滤,台盼兰染色计数活细胞,调整细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$,接种至 75cm^2 培养瓶,置于 37℃恒温、5%CO₂、饱和湿度培养箱静置培养,每 3d 更换培养液,每 7—10d 传代 1 次。

1.2.2 人羊膜组织的酶免疫组织化学染色:将羊膜组织、羊膜组织石蜡切片用 10%多聚甲醛固定,PBS 漂洗 3 次,3% H₂O₂ 作用 15min,细流水冲洗 1min,PBS 漂洗 3 次,加一抗(mouse anti-TH mAb 1:50; mouse anti-CNPase mAb 1:50; mouse anti-MBP mAb 1:50; mouse anti-NeuN mAb 1:50; mouse anti-MAP2 mAb 1:50; mouse anti-ChAT mAb 1:50; mouse anti-GFAP mAb 1:50; 阴性对照为 PBS)置 4℃过夜,PBS 洗 3 次,加过氧化物酶标的羊抗鼠抗体,置 37℃反应 1h,PBS 洗 3 次,加 DAB(棕褐色)或 AEC(红色)显色液 3—5min,封片观察。

1.2.3 培养人羊膜细胞标本处理:①在倒置显微镜下观察细胞及生长情况,制作细胞爬片进行免疫荧光细胞化学染色,将培养扩增的羊膜细胞按一定浓度接种于以多聚赖氨酸包被的盖玻片上,待细胞贴壁完全后,10%多聚甲醛固定 30min 供染色使用,PBS 漂洗 3 次,3% H₂O₂ 作用 15min,细流水冲洗 1min,PBS 漂洗 3 次,加一抗(mouse anti-TH 1:50; mouse anti-GFAP 1:50; 阴性对照为 PBS)置 4℃过夜,PBS 洗 3 次,加荧光标记的二抗(1:100),置 37℃反应 1h,PBS 洗 3 次,封片后荧光显微镜观察。②收集对数生长期的培养人羊膜组织细胞,D-hanks 或 PBS 漂洗 2 次,以 D-hanks 或 PBS 悬浮细胞,计数 1×10^5 cells/ml,滴加 50—100μl 于载玻片上,利用离心涂片机,800—1000 转/min,将细胞固定贴附于载玻片上。10%多聚甲醛固定 30min 供染色使用,PBS 漂洗 3 次,3% H₂O₂ 作用 15min,细流水冲洗 1min,PBS 漂洗 3 次,加一抗(mouse anti-NeuN 1:50; mouse anti-MAP2; mouse anti-CNPase 1:50; mouse anti-MBP 1:50, 阴性对照为 PBS)。加过氧化物酶标的羊抗鼠抗体,置 37℃反应 1h,PBS 洗 3 次,PBS 漂洗 3 次,加 DAB 显色液 3—5min,封片观察。

2 结果

2.1 人羊膜组织免疫组织化学染色的组织形态学结果

人类羊膜组织的免疫组织化学染色显示,羊膜组织中存在神经细胞特异性蛋白表达阳性细胞。TH 是多巴胺合成的关键酶,也是多巴胺能神经元的标

志酶, 图 1A (见后置彩色插页 1) 显示羊膜组织内分布棕黄色染色颗粒的 TH 阳性细胞, 提示多巴胺能神经元的存在。AchT 是合成乙酰胆碱的限速酶, 在胆碱能神经元胞体内合成, 是作为研究胆碱能神经元的标志物, 胆碱能神经元与哺乳动物学习记忆相关, 我们的实验结果可见羊膜组织内 AchT 染色阳性胆碱能神经元的存在 (图 1B, 见后置彩色插页 1); 还显示了 NeuN 和 MAP2 染色阳性的神经元 (图 1C、D, 见后置彩色插页 1)。少突胶质细胞特异性标志蛋白 CNPase (图 1E, 见后置彩色插页 1) 和 MBP (myelin basic protein, MBP) (图 1F, 见后置彩色插页 1) 也有阳性表达, 提示人羊膜组织内少突胶质细胞的存在; 此外, 还可见 GFAP (anti-glial fibrillary acidic protein) (图 1G, 见后置彩色插页 1) 阳性表达的胶质细胞。

2.2 倒置显微镜观察原代培养人羊膜组织细胞的细胞形态学结果

原代培养人羊膜组织细胞接种 3—5 天后逐渐贴壁生长, 倒置显微镜观察细胞呈多形性, 有多角形、长梭形等, 10 天后融合成片, 其中可见神经细胞样细胞 (图 2, 见后置彩色插页 1), 图 2B 为图 2A 蓝色方框的局部扩大图像, 其中蓝色箭头所示星形胶质细胞样细胞; 黄色箭头所示为神经元样细胞。

2.3 培养人类羊膜细胞的免疫细胞化学染色的细胞形态学结果

免疫荧光化学和免疫细胞化学形态学实验结果显示, 培养羊膜组织细胞具有神经细胞特异性标志蛋白表达阳性细胞。多巴胺能神经元 (图 3A TH, 见后置彩色插页 1)、神经元 (图 3B NeuN 和图 3C MAP2, 见后置彩色插页 1)、少突胶质细胞 (图 3D CNPase 和图 3E MBP, 见后置彩色插页 1) 和胶质细胞 (图 3F GFAP, 见后置彩色插页 1)。

3 讨论

3.1 羊膜上皮细胞神经生物学功能

有关羊膜上皮细胞神经生物学功能的研究表明, 羊膜细胞中能够合成并产生多巴胺, 分子水平研究证实了羊膜上皮细胞有酪氨酸羟化酶的 mRNA 和蛋白质的表达, 在培养羊膜上皮细胞中约 10% 的细胞酪氨酸羟化酶免疫组织化学染色阳性; 酪氨酸羟化酶阳性细胞体内移植治疗大鼠帕金森氏病模型的实验表明, 不仅可以缓解了帕金森氏病的临床症状, 而且脑内移植细胞的可以存活和并具有多巴胺产生功能^[4]。继而发现培养的羊膜上皮细胞中有神经元和神经干细胞表面标记 Nestin、MAP2 的阳性细

胞, 同时表达 Nestin mRNA, 纯化后的神经元干细胞脑缺血模型的脑内细胞移植实验发现, 移植细胞可以迁移到缺血部位, 并选择性进入脑缺血坏死区, 与坏死区功能相关部位的神经元或细胞成活, 与坏死区部位功能无关的神经元或细胞随时间延长消失^[5]。Kakishita 等^[6]研究发现人淹没上皮细胞能够增强多巴胺神经元成活, 治疗大鼠帕金森氏病。此外, 羊膜上皮细胞还可以合成释放 BDNF、NT-3 和 NGF 等生物活性因子, 提示羊膜上皮细胞的重要功能之一可能是为羊水提供神经营养因子, 胚胎早期神经元发育具有重要作用^[7]。国内刘斌等^[8]“羊膜细胞移植对帕金森病鼠纹状体中多巴胺神经元的促再生作用”的报道, 他们发现在接受移植的大鼠脑内的植入靶点周围出现了原位的酪氨酸羟化酶阳性纤维, 同时模型鼠的旋转行为明显减少。目前已知羊膜细胞可以分泌神经生长因子、上皮生长因子和胰岛素样生长因子, 但在上述实验中, 是活羊膜细胞诱导了宿主脑内神经干细胞的增殖和分化, 还是羊膜细胞中的干细胞本身分化为神经细胞, 尚不清楚。此外, 羊膜上皮细胞中还发现有 ChAT mRNA 和蛋白质表达细胞, 培养上清中含有 Ach 蛋白, 提示 Ach 合成释放细胞的存在, 可以用来治疗溶酶体储积病^[9]。

综上所述, 由于羊膜上皮细胞中不仅有合成释放多巴胺的前体细胞或神经干细胞存在, 羊膜上皮细胞还可以分泌神经营养因子等生物活性物质, 具有神经营养功能, 提示羊膜上皮细胞可以作为多巴胺能神经元、胆碱能神经元等神经元损伤神经系统疾病的治疗手段之一。我们认为这是干细胞研究领域里一个值得深入探索的课题。

3.2 羊膜组织细胞治疗神经系统退行性疾病的可行性

进入 21 世纪, 人类更加注重生存质量, 而帕金森氏病作为神经系统的常见病多发病, 至今没有有效的治疗措施, 目前国内外有关神经干细胞基础和临床应用研究取得了可喜成绩, 研究结果表明, 已从胎鼠、成年鼠、胎儿和成人脑的皮层、室管膜下层、纹状体、海马、中脑、前脑等脑区和脊髓分离得到了神经干细胞。应用流式细胞技术可以从成年小鼠的脑室分离到纯度达 80% 的神经干细胞^[10-12]。证实了神经干细胞可以分化为中枢神经系统内的神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞三种细胞^[13-14]。通过移植神经干细胞替代因疾病或损伤死亡的神经细胞, 达到修复损伤组织的目的, 利用干细胞治疗帕金森氏病等神经系统疑难疾病, 成为神经科学家瞩目的课题。近年来国内外陆续发表了有关神经干细胞移植

治疗帕金森氏病研究报道^[15-17],为目前尚无有效治疗措施的帕金森氏病等神经系统疑难疾病的治疗带来了新的希望。但是,神经干细胞来源,如胚胎干细胞的伦理学、组织排异问题;如何获得足够数量的干细胞等,始终是困扰临床应用的中心问题。

而羊膜组织来源细胞可以规避上述问题。羊膜组织中有神经细胞或神经干细胞的存在,利用诱导增殖的羊膜细胞具有开展细胞移植治疗可能性^[18],如并能够分离纯化出目的性神经细胞或神经干细胞,将为细胞移植治疗神经系统退行性疾病提供可靠细胞来源。为此,我们回顾了有关羊膜上皮细胞研究的文献,开展了羊膜上皮细胞组织形态学和细胞生物学实验研究,确认羊膜组织中不仅存在神经前体细胞^[4],还发现了培养羊膜组织细胞内有神经细胞样细胞存在(见图2),进一步利用神经细胞特异性标记蛋白的组织形态学实验方法,不仅证实羊膜组织细胞内存在神经元和胶质细胞,还存在具有临床应用价值的多巴胺能神经元、胆碱能神经元和少突胶质细胞的存在。为再生医学领域细胞移植治疗帕金森氏病、老年痴呆和多发性硬化等神经系统疑难疾病,提供良好的细胞来源,但还需从细胞水平对其进行神经生物和神经电生理方面的研究,确认其所分泌的神经递质的生物活性和电生理功能。

参考文献

- [1] Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cell of the adult mammalian central nervous system[J]. Science, 1992,225:1707—1710.
- [2] Sakuragawa N, Tohyama J, Yamamoto H. Immunostaining of human amniotic epithelial cells: possible use as a transgene carrier in gene therapy for inborn errors of metabolism [J]. Cell Transplant, 1995,4(3):343—346.
- [3] 蔡哲,潘林,舒峻,等.人类羊膜细胞表达神经干细胞特异性蛋白[J].中国康复理论与实践,2005,11(12):965—967.
- [4] Kakishita K, Elwan MA, Nakao N, et al. Human amniotic epithelial cells produce dopamine and survive after implantation into the striatum of a rat model of Parkinson's disease: a potential source of donor for transplantation therapy[J]. Exp Neurol, 2000,165:27—34.
- [5] Okawa H, Okuda O, Arai H, et al. Amniotic epithelial cells transform into neuron-like cells in the ischemic brain[J]. Neuroreport, 2001,12:4003—4007.
- [6] Kakishita K, Nakao N, Sakuragawa N, et al. Implantation of human amniotic epithelial cells prevents the degeneration of nigral dopamine neurons in rats with 6-hydroxydopamine lesions [J]. Brain Res, 2003,980(1):48—56.
- [7] Uchida S, Inanaga Y, Kobayashi M, et al. Neurotrophic function of conditioned medium from human amniotic epithelial cells[J]. J Neurosci Res, 2000,62:585—590.
- [8] 刘斌,田新良,杨飞.羊膜细胞对帕金森氏病鼠纹状体中多巴胺神经元的再生作用[J].中国老年学杂志,2001,21:358—360.
- [9] Sakuragawa N, Misawa H, Ohsugi K, et al. Evidence for active acetylcholine metabolism in human amniotic epithelial cells: applicable to intracerebral allografting for neurologic disease [J]. Neurosci Lett, 1997,232:53—56.
- [10] Gage FH. Mammalian neural stem cell[J]. Science, 2000, 287: 1433—1438.
- [11] Rietze RL, Valcanis H, Brooker GF, et al. Purification of pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain [J]. Nature, 2001,412:736—739.
- [12] Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, et al. Generalized potential of adult neural stem cell [J]. Science, 2000,288:1660—1663.
- [13] Wagner J, Akerud P, Castro DS, et al. Induction of a mid-brain dopaminergic phenotype in Nurr1-overexpressing neural stem cell by type1 astrocytes[J]. Nature Biotech, 1999,17:653—659.
- [14] Honggjun S, Charles F, Stevens, Fred HG. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells [M]. London: Macmillan Magazines Ltd, 2002, 39—44.
- [15] Benjamin ER, Pavel Itsykson, Tikva T, et al. Neural progenitors from human embryonic stem cells [J]. Nature Biotechnology, 2001,19:1134—1140.
- [16] Freed CR, Greene PE, Boberze RE, et al. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease [J]. N Eng J Med, 2001,344:710—719.
- [17] Rosemary A, Fricker G, Stephen B Dunnett. Rewiring the Parkinsonian brain [J]. Nature Medicine, 2002, 8:105—106.
- [18] Terada S, Matsuura K, Enosawa S, et al. Inducing proliferation of human amniotic epithelial (HAE) cells for cell therapy [J]. Cell Transplant, 2000,9:701—704.