

人羊膜组织细胞的神经干细胞特性形态学研究*

蔡哲¹ 舒峻¹ 潘琳¹ 张岚¹ 徐波² 郭艳如¹

黄小杰¹ 向青² 耿同超³ 胡景伟⁴ 周忠蜀⁴ 徐杨⁴ 高艳⁴ 崔晓惠⁴

摘要 目的:利用形态学研究方法,探讨神经干细胞特异性标志蛋白的表达和增殖分化特性,鉴定人类羊膜组织中神经干/前体细胞的存在。**方法:**利用免疫组织化学法,检测人类羊膜组织和培养人类羊膜细胞中 nestin、musashi-1、vimentin 和 PSA-NCAM 等神经干细胞特异性标志蛋白的表达,利用 BrdU 掺入实验鉴定羊膜组织来源神经干/前体细胞的增殖分化能力。**结果:**免疫组织化学检测证实人羊膜组织表达 nestin、musashi-1、CD133 和 vimentin 等神经干细胞特异性标志蛋白,主要分布于羊膜组织的间质层。培养羊膜细胞的免疫荧光化学染色显示 nestin、musashi-1、vimentin 和 PSA-NCAM 阳性细胞的存在。BrdU 掺入的组织形态学实验显示培养羊膜细胞中存在 BrdU 标记阳性细胞,其中具有 BrdU 与 nestin、musashi-1、vimentin 双标阳性细胞,显示羊膜细胞中存在具有增殖活性神经干细胞标记蛋白表达阳性细胞;而 BrdU 与 β -tubulin III、TH 和 GFAP 双标阳性细胞的存在,表明神经元和胶质细胞是由培养羊膜细胞增殖分化的。**结论:**羊膜组织中存在神经干细胞特异性标记蛋白 Nestin、Musashi-1、CD133、PSA-NCAM 和 Vimentin 表达阳性细胞, BrdU 掺入的组织形态学结果不仅证实羊膜细胞中 Nestin、Musashi-1、Vimentin 阳性细胞具有增殖活性,而且其中存在已分化的神经元和胶质细胞,提示羊膜组织细胞内存在神经干/前体细胞。

关键词 羊膜细胞;神经干细胞;巢蛋白

中图分类号:R77 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2008)-12-1077-05

The morphologic study of phenotypes expression of neural stem cell from human amniotic cells/CAI Zhe, SHU Jun, PAN Lin, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23(12): 1077—1081

Abstract Objective: Amniotic membrane which formed at the early stage of embryonic development, consists of epithelial cells and mesenchymal cells and possesses the potency to differentiate into multi-germinal layer cells. Here we investigate the expression of specific protein markers of the neural stem cells (NSCs), the proliferation and differentiation of the amniotic cells by utilizing the morphology methods, identifying the neural stem/precursor cells in human amniotic membrane. **Method:** The expression of specific protein markers of neural stem cells were detected by immunocytochemistry in human amniotic membrane and cultured amniotic cells respectively. The proliferation of neural stem/precursor cells derived from human amniotic cells were tested by BrdU incorporation. **Result:** Pluripotent neural stem cell specific makers were detected in the human amnion membrane, especially in mesenchymal layer. In addition, several neural stem cell specific markers including Nestin, Musashi-1, Vimentin and PSA-NCAM positive cells were identified in the cultured amniotic cells by immunofluorescence staining. BrdU incorporation test showed that BrdU positive cells existed in cultured human amniotic cells, and double staining of Nestin+/BrdU+, Musashi-1+/BrdU+, Vimentin+/BrdU+ and PSA-NCAM+/BrdU+ suggested that proliferative cells expressing specific protein markers of the neural stem cells presented in cultured amniotic cells. **Conclusion:** Positive cells of neural stem cells specific protein markers including Nestin, Musashi-1, CD133, PSA-NCAM and Vimentin existed in human amnion membrane. BrdU incorporation test showed the existence of both the proliferative cells expressing Nestin, Musashi-1 and Vimentin, and differentiated neuron and glia cells, which indicated neural stem / precursor cell presented in human amniotic membrane.

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

Key words amnion cell; nerve cord; nidogen

神经干细胞(neural stem cell, NSC)的发现改变了“成年哺乳动物中枢神经系统的神经细胞无法更新换代”的传统观点,研究证实哺乳动物的胚胎和成熟个体体内均存在 NSC。在啮齿类动物小鼠胚胎脑内, NSC 位于纹状体、小脑、中脑、海马、皮质和室管区;成年鼠脑内 NSC 分布于纹状体、海马、皮质和室管区;成年人脑的 NSC 位于侧脑室和海马^[1]。鉴于

* 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(30471773);北京市科委重大专项(D07050701350704);国家“863”计划(2006AA02A114)

1 中日友好医院临床医学研究所免疫学研究室,北京,100029

2 中日友好医院临床医学研究所生化分子生物学研究室

3 清华大学附属玉泉医院神经内科

4 中日友好医院儿科

作者简介:蔡哲,女,副研究员,博士

收稿日期:2008-09-01

NSC 具有自我更新、无限增殖和分化潜能(分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞)的特点^[2],神经科学研究领域利用 NSC 的可扩增性和可塑性,进行 NSC 脑内移植治疗帕金森氏病等神经系统疾病^[3-5],取得良好进展,为神经系统退行性疾病的治疗带来希望。但是胚胎来源 NSC 的伦理学和自体 NSC 来源受限等问题,限制了 NSC 脑内移植的临床应用。形成于胚胎早期的羊膜组织抗原性低,系产后废弃物,无论伦理学问题,近年来的研究表明羊膜组织中存在具有分化潜能的细胞,羊膜上皮细胞表达多能干细胞特异性转录因子 Oct-4 (octamer-binding protein 4, Oct-4, 八聚体连接蛋白)和 nanog,免疫组织化学和基因分析显示,体外培养羊膜上皮细胞具有分化为 3 个胚原基层的潜能——内胚层(肝,胰腺)、中胚层(心肌细胞)和外胚层(神经细胞),提示羊膜上皮细胞具有干细胞特性^[6]。本实验选择人羊膜组织中的神经干细胞为研究目标,利用组织细胞形态学研究方法,对神经干细胞特异性标记蛋白在羊膜组织细胞中的表达进行鉴定,了解其增殖活性和分化潜能等生物学特性,为 NSC 移植治疗神经系统退行性疾病提供新的细胞来源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料:健康产妇剖宫产后废弃的羊膜组织(中日友好医院提供)。

1.1.2 试剂:小鼠抗人巢蛋白单克隆抗体 IgG (mouse anti-nestin human specific monoclonal antibody, CHEMICON);小鼠抗波形蛋白单克隆抗体 IgG (mouse anti-vimentin monoclonal antibody, CHEMICON);小鼠抗多唾液酸神经细胞黏附分子单克隆抗体 IgM (mouse anti-polysialic acid-NCAM monoclonal antibody: PSA-NCAM, CHEMICON);山羊抗 Musashi-1 多克隆抗体 IgG (goat anti-musashi-1 polyclonal antibody, R&D);小鼠抗 CD133 单克隆抗体 (mouse anti-CD133 monoclonal antibody, Abcam)。小鼠抗酪氨酸羟化酶单克隆抗体 (mouse anti-tyrosine hydroxylase monoclonal antibody, TH, CHEMICON),小鼠抗胶原纤维酸性蛋白单克隆抗体 (mouse anti-glia fibrillary acidic protein, GFAP, CHEMICON),小鼠抗神经元特异性 β -III 微管蛋白单克隆抗体 (mouse anti-neuron-specific β -III tubulin monoclonal antibody, R & D),绵羊抗 BrdU 多克隆抗体 (sheep anti-BrdU polyclonal antibody, Abcam),兔抗绵羊罗丹明标记二抗 (rabbit anti-

sheep rhodamine conjugated secondary antibody, santa cruz),山羊抗 CyTM2 标记山羊抗小鼠二抗 (CyTM2-conjugated goat anti-mouse secondary antibody, Jackson);DMEM/F12 培养基 (gibco),胎牛血清 (hyclone),胰蛋白酶 (sigma)。

1.2 实验方法

1.2.1 人羊膜细胞分离培养:取产后废弃的新鲜胎盘,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 10%胎牛血清 DMEM/F12 终止消化,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 1×10^6 /ml,接种含 10%胎牛血清 DMEM/F12 的 75cm² 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 羊膜组织和培养羊膜细胞形态学实验。

1.2.2.1 酶免疫组织化学染色:将羊膜组织、羊膜组织石蜡切片用 4%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-Nestin 1:50; mouse anti-CD133 1:50; mouse anti-Vimentin; mouse anti-Musashi-1; 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) 显色液 3—5min, 封片后光学显微镜观察。

1.2.2.2 培养羊膜细胞的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 96 孔培养板内,待细胞贴壁完全后,4%多聚甲醛固定 30min 后添加一级抗体 (mouse anti-Nestin 1:50; mouse anti-PSA-NCAM 1:50; mouse anti-Vimentin; mouse anti-Musashi-1) 置 4℃过夜, PBS 漂洗 3 次, 加荧光标记的二级抗体 (FITC 标记山羊抗小鼠 IgG 1:100; 罗丹明标记山羊抗小鼠 IgG 1:100), 置 37℃孵育 1h, PBS 洗 3 次后荧光倒置显微镜观察。

1.2.3 BrdU 掺入实验。

1.2.3.1 培养羊膜细胞增殖能力鉴定:采用 BrdU 掺入实验检测培养羊膜细胞的增殖能力,分离羊膜上皮及间质细胞,计数并以含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基重悬细胞,接种至 75cm² 培养瓶,培养基预先加入 BrdU (终浓度为 10 μ mol/L), 37℃恒温培养箱 5%CO₂ 培养 3d, 收集培养 3d 后的人羊膜上皮(间质)细胞, D-hank's 液漂洗 2 遍, 计数并调整细胞浓度, 按每孔 5000—10000 个细胞接种至 96 孔培养

板,待细胞完全贴壁后以 PBS 漂洗 3 次,吸弃培养液并以 PBS 洗 3 次。加入 1N HCl,4℃酸化 10min,加入 2N HCl,25℃作用 20min,PBS 洗 3 次,每次 5min,0.1M 硼酸 25℃中和 15min,PBS 洗 3 次,0.3%过氧化氢氧化 15min,PBS 洗 3 次。加绵羊抗 BrdU 多克隆抗体,4℃过夜,PBS 漂洗 3 次,加兔抗绵羊罗丹明标记二抗,避光 37℃孵育 1h,PBS 漂洗后荧光倒置显微镜下观察。

1.2.3.2 培养羊膜细胞分化能力鉴定:采用 BrdU-神经细胞标记蛋白免疫荧光双标实验,鉴定培养羊膜细胞的分化能力。每孔 5000—10000 个 BrdU 标记培养人羊膜细胞接种至 96 孔培养板,待细胞完全贴壁后,加入 1:100 稀释的绵羊抗 BrdU 多克隆抗体,将加入了抗 BrdU 一抗的细胞分为 3 组,每组分别加入 1:200 稀释的小鼠抗 TH 单克隆抗体,小鼠抗 GFAP 单克隆抗体,小鼠抗神经元特异性 β -III tubullin 单克隆抗体,4℃过夜,PBS 洗 3 次,每次 5min,在加有抗 BrdU 一抗的 96 孔培养板每孔中加入 1:100 稀释的兔抗绵羊罗丹明标记二抗,每孔加入 CyTM2 标记山羊抗小鼠二抗,避光,37℃孵育 1h,PBS 漂洗后荧光倒置显微镜下观察结果。利用 Image-Pro Plus 5.1 软件,将检测标本采集的不同激发光的图像(绿色荧光和红色荧光)进行叠加,显示不同荧光标记的抗体在同一细胞中的表达。

2 结果

2.1 神经干细胞特异性标记蛋白在人羊膜组织细胞中的表达

神经干/前体细胞是一类未成熟细胞,选择性表达分化抗原标记蛋白,如 nestin、musashi-1、CD133、和 vimentin,免疫组织化学染色显示,在人羊膜组织的间质层散在分布有 nestin、musashi-1、CD133、和 vimentin 阳性细胞(见图 1,见前置彩色插页),其中 musashi-1 阳性细胞数量较少,CD133 阳性细胞呈细胞集团样分布。

人羊膜组织的免疫组织化学染色,DAB 显色,阳性细胞为棕褐色。图 A 为羊膜间质层散在分布的 nestin 阳性细胞;图 B 箭头所指为羊膜间质层中分布的 musashi-1 阳性细胞,数量较少,散在分布于羊膜组织间质层;图 C 显示羊膜组织间质层中的 CD133 阳性细胞团;图 D 为羊膜间质层中散在分布的 vimentin 阳性细胞。

2.2 培养人羊膜细胞表达神经干/前体细胞特异性标记蛋白

上述组织形态学结果证实人羊膜组织内存在神

经干细胞特异性标志蛋白表达阳性细胞,采用培养细胞的免疫荧光化学染色,进一步显示人羊膜组织细胞内存在 nestin、musashi-1、vimentin 和 PSA-NCAM 阳性细胞(见图 2,见前置彩色插页),确认人类羊膜组织细胞中存在有神经干/前体细胞。

培养人羊膜细胞的免疫荧光细胞化学染色,绿色荧光 FITC 标记者阳性细胞。其中有 nestin(A)、musashi-1(B)、vimentin(C)和 PSA-NCAM(D)图中存在绿色荧光标记的神经干细胞特异性蛋白阳性的培养人羊膜细胞。

2.3 人羊膜细胞中神经干/前体细胞具有增殖分化能力

见图 3(见前置彩色插页)。BrdU 是胸腺嘧啶的同源替代物,可以在细胞周期的 S 期掺入到增殖细胞的 DNA 内,如果体外培养人羊膜细胞能够增殖,就会将 BrdU 整合入细胞的 DNA。经免疫组织化学染色可观察 BrdU 在细胞内掺入状况,Cooper-Kuhn 等^[7]证明 BrdU 阳性细胞主要是增殖细胞,是形态学角度反映细胞增殖的理想指标。实验表明,人羊膜细胞在含有 BrdU 的培养基中孵育 72h 后,免疫荧光化学染色显示培养羊膜细胞呈明显阳性反应(见图 3A),表明培养人羊膜细胞中具有增殖活性细胞的存在。其中神经干具有多分化潜能,能够分化出神经元和胶质细胞,TH 是多巴胺合成的关键酶,也是多巴胺能神经元的标志酶, β -tubullin III 是神经元分化的早期标记物,GFAP 是神经胶质细胞的标记蛋白,因此 TH、 β -tubullin III 和 GFAP 可分别作为多巴胺能神经元、神经元和星形胶质细胞的特异性抗原标志物,为证实羊膜组织来源神经干细胞的增殖潜能,对培养羊膜细胞进行 BrdU 与 TH、 β -tubullin III 和 GFAP 双标免疫荧光化学染色,发现培养人羊膜细胞中有增殖分化的 TH、 β -tubullin III 和 GFAP 与 BrdU 双标阳性细胞(图 3B,C,D)。

培养人羊膜细胞的 BrdU 掺入免疫荧光化学染色。红色荧光为罗丹明标记,绿色荧光为 FITC 标记,图 D 和图 H 为阴性对照。图中红色荧光标记为 BrdU 阳性细胞,显示培养人羊膜细胞增殖呈阳性反应,图 3-A,B,C 显示 BrdU 与 nestin、musashi-1 和 vimentin 双标染色阳性细胞,其中 musashi-1 为 RNA 连接蛋白,主要表达于细胞核周围,图 3-B 的细胞核显色为黄绿色。图 3-E,F,G 为 BrdU 与 tujb, TH 和 GFAP 双标染色,绿色荧光分别是 β -tubellin III, TH 和 GFAP,图中双标染色箭头所指为增殖分化的 Tujb 阳性神经元(E),多巴胺能神经元(F)和胶质细胞(G)。

3 讨论

80年代末,Davis等^[8]观察到羊膜基质的非细胞性提取物,对在体成年大鼠海马区的胆碱能神经元具有营养作用。继而发现在胚胎周围和中枢神经系统发育早期人类羊膜基底膜出现包含启动和引导神经突生长的信号,提示羊膜组织对胚胎早期神经系统发育具有调节作用^[9]。Uchida等^[10]证实了体外培养HAEC能够合成释放脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、NT-3和神经生长因子(nerve growth factor, NGF),提示羊膜组织通过分泌释放神经营养因子进入羊水,在胚胎神经发育的早期阶段具有重要调节作用。此外,在HAEC条件培养基中除检测到较高浓度的BDNF、NT-3和睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF),可能还有其他未知神经营养因子的存在^[11]。Marvin等^[12]从分子水平证实了羊膜组织表达神经营养因子基因,如 ephrin-A2, ephrin受体-A2-B、-B3、-B4和-B5, neuropilin-2, p75等神经生长因子受体和 semaphorin-F, 这些基因在胚胎发育成熟的不同阶段具有重要作用。因此神经发育生物学研究认为,神经发生的早期羊膜组织直接与神经上皮联系,向羊水中释放神经递质及神经营养因子,在神经系统发育过程中起着重要作用。近年的研究认为羊膜组织的主要作用之一是向羊水提供神经营养因子,确认了其在早期神经系统发育中的神经营养和调控作用^[13-14]。有学者从神经发育生物学的蛋白质水平推测人类羊膜细胞中可能存在有早期发育的神经前体细胞或神经元样细胞。Koyano等^[15]发现培养羊膜上皮细胞可以合成释放睾酮A(activin A)和头蛋白(noggin),而 activin A 可以诱导初级应答头蛋白信息核糖核酸 mRNA 的表达,实验结果显示羊膜上皮细胞中存在睾酮信号途径。而 noggin 在发育中的重要功能是使部分细胞发育为脑和神经组织,在没有背侧中胚层的条件下,可直接诱导神经组织,在发育的一定阶段,可能是内源性神经诱导信号。碱性螺旋-环-螺旋转录因子(basic helix-loop-helix, bHLH)参与神经干细胞分化的调节,促进前体细胞的形成和增殖,诱导细胞分化方向,刺激神经细胞突起和功能性突触的形成^[16-17]。bHLH 蛋白家族作为原神经基因,主要功能是调节干细胞向终末细胞分化,高表达会促进干细胞的分化,相反低表达则抑制干细胞分化,使干细胞处于持续增殖状态,在果蝇的神经干细胞以及脊椎动物的脊髓、脑皮质的发育过程中具有重要作用。Knöfler等^[17]发现胚胎发育的不同阶段,羊膜上皮细胞中有 bHLH 转录调控因子 Hand

I mRNA 的特异性表达。上述研究结果从神经发育生物学角度为羊膜组织中存在神经干细胞的假说提供了实验依据。

有关神经干细胞生物学研究表明,NSC 可以表达特异性分化抗原,其中巢蛋白(nestin)又称神经上皮干细胞蛋白,是中枢神经系统主要的中间丝蛋白,表达于发育中的中枢神经系统和骨骼肌,其功能与维持神经前体细胞形态结构有关,在神经干细胞研究中的重要意义^[18-19]。Musashi-1 是一种 RNA 连接蛋白,作为中枢神经系统神经前体细胞增殖的主要标记,在哺乳动物胚胎和成体神经干细胞中表达丰富^[20-21]。其主要功能是调控外胚层前体细胞的不对称分裂,在哺乳动物 Musashi-1 通过其翻译抑制靶 mRNA 的 mNumb 增强 Notch 信号,有助于神经干细胞的自我复制^[22],Musashi-1 对中枢神经系统前体细胞(包括神经干细胞)而言,是一种进化稳定标志蛋白,Musashi-1 表达于神经干细胞神经元前体细胞、星形胶质前体细胞和星形细胞^[23],如果未分化的细胞表达 Nestin 和 musashi1 蛋白,表明这些细胞是神经元分化的原始细胞。波形蛋白(vimentin)是中间丝蛋白的一种,在神经系统发育中的表达有一定的时间性,主要表达于尚未发生终末分化的、保留分化潜能的神经祖细胞/前体细胞。研究证实 vimentin 阳性细胞存在于胚胎及成年哺乳动物的脑室系统和嗅球、海马、纹状体等部位^[1]。PSA-NCAM 是细胞表面的一种糖蛋白,参与中枢神经发育和可塑性的许多过程^[24],介导细胞的黏附识别,是神经干细胞/神经前体细胞可塑性的重要调节因子,其表达水平对神经干细胞迁移、轴突生长和功能活动诱导的可塑性非常重要^[25]。CD133 不仅作为造血干细胞标记蛋白,也表达于中枢神经系统的 NSC,是鉴定 NSC 的主要标记物^[26]。为此,我们利用 NSC 表达特异性标记蛋白的特点,采用免疫组织化学染色技术,确认了人羊膜组织细胞表达 nestin、musashi-1、CD133、和 vimentin 等 NSC 特异性标志蛋白,它们主要分布于羊膜组织的间质层(图 1)。培养羊膜细胞的免疫荧光化学染色结果显示了其中 nestin、musashi-1、vimentin 和 PSA-NCAM 阳性细胞的存在(图 2)。证实羊膜组织细胞中存在神经干细胞特异性标记蛋白表达阳性细胞,提示羊膜组织细胞内具有神经干/前体细胞的存在。

NSC 的主要生物学特点是增殖活性,以及分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞分化潜能。羊膜上皮细胞中存在具有分化潜能的细胞,实验表明鼠羊膜上皮在特定条件下,可分化为毛囊上皮和

皮肤上皮细胞^[27]。Wei 等^[28]的实验发现, 尼克酰胺刺激下的体外培养羊膜上皮细胞可以诱导胰岛素 mRNA 的表达, 糖尿病模型鼠的羊膜上皮细胞体内移植不仅可以调控血糖至正常水平, 还可以分化为 β 细胞, 提示羊膜上皮细胞移植具有治疗糖尿病的潜能。Takashima 等^[29]利用 RT-PCR 检测, 证实人羊膜上皮细胞表达白蛋白、 $\alpha(1)$ -antitrypsin 和肝细胞相关基因, 体外培养羊膜上皮细胞可以产生白蛋白、glycogen storage, 小鼠体内移植实验也表明羊膜上皮细胞可以分泌白蛋白, 提示羊膜上皮细胞具有分化肝细胞的潜能。此外, 人类羊膜上皮细胞还表达心肌细胞特异性转录因子 GATA4, 心肌特异性基因如 (myosin light chain, MLC-2a, MLC-2v; cTnI, cTnT; α -subunits of the cardiac-specific L-type calcium channel, α_1c ; transient outward potassium channel, Kv4.3), 经碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 或活化素 (activin A) 刺激后心肌细胞特异性转录因子 Nkx2.5 和心肌特异性标记物 atrial natriuretic peptide, 在活化素治疗的特定条件下, 可以检测到心肌特异性基因 α -myosin heavy chain, 人羊膜上皮细胞的大鼠心肌缺血模型实验显示, 人羊膜上皮细胞至少可以在体内存活 2 个月, 并可以分化为心肌样细胞^[30]。

近年来, Sakuragawa 研究小组在对羊膜上皮细胞神经生物学功能进行了系统研究基础上^[31], 进一步发现位于 AECs 下的 AMC 中 93.1% 表达 Musashi-1 蛋白, Nestin 阳性细胞为 87.7%, RT-PCR 证实 AMC 表达 Musashi 和 Nestin mRNA, 在培养过程中标记 BrdU 发现有 66%—88% BrdU 阳性细胞, 同时存在有分化的 β -tubullin 和 NF-M 阳性细胞存在, 提示羊膜间充质细胞的增殖活性和多分化潜能, 证实人类羊膜间充质细胞中存在神经胶质前体细胞的表型。本研究表明, 羊膜组织细胞中存在神经干细胞特异性标记蛋白 nestin、musashi-1、CD133、PSA-NCAM 和 vimentin 表达阳性细胞, BrdU 掺入实验显示, 培养人羊膜细胞能够将 BrdU 掺入到自身 DNA 中, 同时还表达神经干细胞特异性标记蛋白 nestin、musashi-1 和 vimentin, 证实了其中存在具有增殖能力的神经干/前体细胞。而培养羊膜细胞中 BrdU 与 TH、 β -tubullin III 和 GFAP 双标阳性神经元和胶质细胞的存在 (图 3-F, G, H), 显示培养人羊膜细胞中存在具有分化潜能细胞。上述结果提示羊膜组织中存在具有增殖活性和分化潜能, 能够分化出神经干/前体细胞。

参考文献

- [1] Gage FH. Mammalian neural stem cells [J]. Science, 2000, 287(5457): 1433—1438.
- [2] Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, et al. Generalized potential of adult neural stem cells [J]. Science, 2000, 288(5471): 1660—1663.
- [3] Correia AS, Anisimov SV, Li JY, et al. Stem cell-based therapy for Parkinson's disease [J]. Ann Med, 2005, 37(7): 487—498.
- [4] Roberts TJ, Price J, Williams SC, et al. Preservation of striatal tissue and behavioral function after neural stem cell transplantation in a rat model of Huntington's disease [J]. Neuroscience, 2006, 139(4): 1187—1199.
- [5] Wang Q, Matsumoto Y, Shindo T, et al. Neural stem cells transplantation in cortex in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. J Med Invest, 2006, 53(1-2): 61—69.
- [6] Miki T, Lehmann T, Cai H, et al. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells [J]. Stem Cells, 2005, 23(10): 1549—1559.
- [7] Cooper-Kuhn CM, Kuhn HG. Is it all DNA repair? Methodological considerations for detecting neurogenesis in the adult brain [J]. Brain Res Dev Brain Res, 2002, 134(1-2): 13—21.
- [8] Davis GE, Blaker SN, Engvall E, et al. Human amnion membrane serves as a substratum for growing axons in vitro and in vivo [J]. Science, 1987, 236(4805): 1106—1109.
- [9] Davis GE, Engvall E, Varon S, et al. Human amnion membrane as a substratum for cultured peripheral and central nervous system neurons [J]. Brain Res, 1987, 430(1): 1—10.
- [10] Uchida S, Inanaga Y, Kobayashi M, et al. Neurotrophic function of conditioned medium from human amniotic epithelial cells [J]. J Neurosci Res, 2000, 62(4): 585—590.
- [11] Uchida S, Suzuki Y, Araie M, et al. Factors secreted by human amniotic epithelial cells promote the survival of rat retinal ganglion cells [J]. Neurosci Lett, 2003, 341(1): 1—4.
- [12] Marvin KW, Keelan JA, Eykholt RL, et al. Expression of angiogenic and neurotrophic factors in the human amnion and chorion [J]. Am J Obstet Gynecol, 2002, 187(3): 728—734.
- [13] Uchida S, Inanaga Y, Kobayashi M, et al. Neurotrophic function of conditioned medium from human amniotic epithelial cells [J]. J Neurosci Res, 2000, 62(4): 585—590.
- [14] Uchida S, Suzuki Y, Araie M, et al. Factors secreted by human amniotic epithelial cells promote the survival of rat retinal ganglion cells [J]. Neurosci Lett, 2003, 341(1): 1—4.
- [15] Koyano S, Fukui A, Uchida S, et al. Synthesis and release of activin and noggin by cultured human amniotic epithelial cells [J]. Dev Growth Differ, 2002, 44(2): 103—112.
- [16] Nieto M, Schuurmans C, Britz O, et al. Neural bHLH genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors [J]. Neuron, 2001, 29(2): 401—413.
- [17] Lee SK, Pfaff SL. Synchronization of neurogenesis and motor neuron specification by direct coupling of bHLH and homeodomain transcription factors [J]. Neuron, 2003, 38(5): 731—745.