

肿瘤坏死因子- α 对外周血单个核细胞重编程获得的神经干细胞增殖、分化的影响

唐玺和 梁有明 黄锐 秦国文 蓝胜勇 范益民

030001 太原,山西医科大学第一附属医院神经外科(唐玺和、范益民); 530021 南宁,广西壮族自治区人民医院神经外科(唐玺和、梁有明、黄锐、秦国文、蓝胜勇)

通信作者: 范益民, Email: fanyimin2012@126.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2018.08.009

【摘要】 目的 观察肿瘤坏死因子(TNF)- α 对人外周血细胞重编程获得的神经干细胞(iNSCs)在体外增殖、分化的影响。方法 将人外周血单个核细胞重编程获得神经干细胞,使用免疫组化技术,观察TNF- α 对其增殖以及向神经元及少突胶质细胞方向分化的作用。结果 低剂量TNF- α 可以促进iNSCs的增殖,并促进其向神经元及少突胶质细胞方向分化。高剂量TNF- α 可以导致其凋亡。结论 不同剂量的TNF- α 对人iNSCs作用不同,这对于人iNSCs的应用有重要意义。

【关键词】 肿瘤坏死因子- α ; 神经干细胞; 体细胞重编程; 增殖; 分化

Effects of tumor necrosis factor- α on proliferation and differentiation of human induced neural stem cells reprogrammed from peripheral blood mononuclear cells Tang Xihe, Liang Youming, Huang Rui, Qin Guowen, Lan Shengyong, Fan Yimin

Neurosurgery Department, the First Clinical Medical College of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China(Tang XH, Fan YM); Neurosurgery Department, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China(Tang XH, Liang YM, Huang R, Qin GW, Lan SY)

Corresponding author: Fan Yimin, Email: fanyimin2012@126.com

【Abstract】 Objective To explore the effects of tumor necrosis factor (TNF)- α on proliferation and differentiation of human induced neural stem cells (iNSCs) reprogrammed from peripheral blood mononuclear cells. **Methods** The human peripheral blood mononuclear cells were reprogrammed to obtain iNSCs. Immunohistochemical technique was used to observe the proliferation of TNF- α and the direction of differentiation to neurons and oligodendrocytes. **Results** A low dose of TNF- α can promote iNSCs proliferation and differentiate to a oligodendrocyte fate. High dose of TNF- α can induced apoptosis of iNSCs. **Conclusions** Different dose of TNF- α has different effect on human iNSCs, which is important for human iNSCs application.

【Key words】 Tumor necrosis factor- α ; Neural stem cells; Cell reprogramming; Proliferation; Differentiation

神经干细胞移植为神经损伤及神经退行性疾病,如帕金森病、多发性硬化、脊髓损伤等带来新的希望,但是异体神经干细胞的来源及伦理问题限制了其临床应用。随着体细胞重编程技术的出现,自体细胞重编程获得的多能干细胞(iPSCs)可以很好地解决干细胞移植中细胞来源问题及免疫排斥等难题,但是iPSCs定向分化效率较低,且存在致瘤性限制了其应用^[1]。近年来,将成体细胞直接重编程为神经干细胞而不经iPSCs阶段极大降低了移植细胞的致瘤性^[2-3]。其应用前景广阔,但是干细胞移

植后在体内炎症因子如TNF- α 、IL-6等多种因素作用下存活率较低,影响了干细胞治疗的效率。

TNF- α 是一种炎症因子,在中枢神经系统中主要由胶质细胞释放,生理情况下其参与神经突触形成^[4]。有研究发现,在卒中、多发性硬化、阿茨海默病等患者的中枢神经系统中,TNF- α 的表达量明显升高^[5]。此前的研究认为,TNF- α 可以促进室管膜下分离的神经干细胞增殖、分化^[6],可以诱导骨髓间充质干细胞凋亡^[7],而TNF- α 对人iNSCs作用效果尚未报道,本研究将TNF- α 对人iNSCs作用效果

进行研究,以作为iNSCs移植的前期研究基础。

一、材料与方法

1. 试剂: 质粒Orip/EBNA1携带6种外源基因(OCT4、SOX2、NANOG、LIN28、C-Myc和KLF4)、重组干细胞因子、重组白介素3、重组胰岛素样生长因子、LIF、CHIR99021、SB431542购自PeproTech(美国),重组人促红细胞生成素、人全转铁蛋白购自Human, CD34+购自R&D Systems(美国), Cell Nucleofection Kit购自Lonza(瑞士), B27、N2添加剂、DMEM/F12、Neurobasal培养基购自Gibco(美国)公司。TNF- α 购自Peprotech(美国),一抗Nestin购自BD(美国),Tuj-1、Oligo2、Ki-67购自Millipore(美国),Hoechst33258购自Sigma(美国)。成人外周血细胞来源于一男性志愿者外周静脉血。

2. 方法: (1)iNSCs的诱导及培养: iNSCs体外诱导过程完全参照Tang等^[2]实验方法操作,所获得的神经干细胞在神经干细胞培养基中培养,扩增,传至5代。培养基为Neurobasal培养基中添加N2(10 ng/ml), B27(10 ng/ml), LIF(10 ng/ml), CHIR99021(3 mmol/ml), SB431542(2 mmol/L),隔日换液,每5天传代一次。(2)TNF- α 作用于iNSCs: 将传代至第5代的 1×10^4 iNSCs接种在PDL/Laminin包被的24孔板上,分为3组,4 ng/ml TNF- α 组,20 ng/ml TNF- α 组,单纯培养基组。培养第3天后,细胞固定,进行免疫组化染色,每组12个孔。用于分化的iNSCs首先接种在24孔板上的Coverslip上,将含有4 ng/ml TNF- α 的神经元分化培养基(Neurobasal+N2+B27)及少突胶质细胞分化培养基(神经元培养基中加SAG10 ng/ml,反维甲酸100 ng/ml)分别培养7 d,同时设立对照组,7 d后,固定并进行免疫组化染色。(3)免疫组化染色: 将备染色的细胞用Wash Buffer室温洗3次,每次5 min。使用4%PFA室温固定10 min。吸去PFA,用PBS洗一遍,然后加入0.3%Triton液,每次5 min,共3次。细胞用Blocking Buffer室温孵育2 h。细胞换一抗混合液: Antibody Buffer中加入一抗抗体,加完后放在4℃冰箱孵育过夜。弃一抗混合液,用Wash Buffer室温洗3次,每次5 min。细胞换二抗混合液: Antibody Buffer中分别加入对应的二抗。室温避光孵育2 h。弃二抗混合液,用Wash Buffer室温避光洗3遍,每次5 min。弃液体,用核染液室温避光洗10 min。弃液体,用Wash Buffer室温避光洗5 min。用眼科直镊小心夹起载有细胞的圆玻璃片,在载玻片上涂上防止猝灭剂,封片,室温避光晾干。使用

共聚焦显微镜拍照。将免疫荧光染色后的细胞利用激光共聚焦显微镜进行采图,每张玻片采集12个视野,计算每张图片中阳性细胞数量所占比例,将9次独立实验的计数结果纳入统计学分析。

3. 统计学方法: 采用SPSS 19.0软件进行统计学分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,实验组和对照组组间比较采用两独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

1. 将人外周血单个核细胞重编程为神经干细胞: 见图1(见本期封三)。在志愿者签字同意后,采集其外周血5 ml并分离其中单个核细胞(图1A),按照之前论文所述的方法,在转染后20 d左右可见获得了细胞克隆(图1B),之后,将该克隆挑出后继续扩增,传代,在传至第5代时,利用免疫组化方法进行染色,90%以上的细胞表达神经干细胞标志蛋白Nestin、Sox1(图1C)。

2. 不同剂量的TNF- α 对iNSCs的作用效果: 见图2(见本期封三)。Hoechst33258染色提示高浓度TNF- α 可以明显导致细胞死亡,低浓度组与对照组比较细胞死亡数量差别不明显(图2A)。而Ki-67阳性率在低浓度组中阳性率较对照组增高,而高浓度TNF- α 细胞中Ki-67阳性率明显下降(图2B)。

3. 低剂量TNF- α 可以促进iNSCs向神经元及少突胶质细胞方向分化: 见图3(见本期封三)。免疫组化染色提示,神经元标志Tuj-1阳性率(图3A)及早期少突胶质细胞标志Olig2阳性率(图3B)较对照组明显升高($P < 0.01$)。

讨论 体细胞重编程技术可以将体细胞重编程为多能干细胞,这一技术为自体干细胞移植带来新的思路。人成纤维细胞是目前最常用的起始细胞^[8-9],但是获取人体成纤维细胞是一种有创的操作,相比成纤维细胞获取的方式,采集外周静脉血单个核细胞是一种几乎无创的,而且外周静脉血单个核细胞此前已经被重编程获得了iPSCs^[10]。在本研究中将外周血单个核细胞重编程为诱导神经干细胞,不经过多能干细胞过程,可以明显降低其致瘤性。因此,这是一种安全、无创的方法。

TNF- α 是一种可以引起肿瘤出血性坏死的血清蛋白。它有多种生物学功能,中枢神经系统中,TNF- α 通过TNFR1与TNFR2两种受体参与免疫应答,有研究人员使用小鼠室管膜下分离的神经干细胞研究TNF- α 的作用机理,发现TNF- α 通过TNFR1受体促进神经干细胞分化,但是大剂量的

TNF- α 可以促进神经干细胞凋亡^[6]。干细胞移植后体内的存活状态受到移植后内环境的影响,有研究报道移植后神经干细胞存活率并不高,主要受到移植后环境中炎性因子的影响,其中 TNF- α 是机体释放的最常见的炎性因子。因此在体外研究 TNF- α 对 iNSCs 的作用机制是很有必要的。我们在体外的实验结果证实,低剂量的 TNF- α 可以促进 iNSCs 增殖,高剂量 TNF- α 可以促进 iNSCs 凋亡,这说明在移植后减少炎性因子释放,有利于促进 iNSCs 生存。

少突胶质细胞在中枢神经系统炎症及损伤修复过程中具有重要作用,其主要作用为髓鞘的修复。脱髓鞘疾病如多发性硬化,婴儿脑室周围软化性疾病发病后,机体新生少突胶质细胞修复非常有限,临床治疗效果不佳,有研究人员试图将诱导多能干细胞 iPSCs 分化为少突胶质细胞移植治疗多发性硬化,但是将 iPSCs 分化为少突胶质前体细胞周期长,效率低^[11]。也有研究认为在 iPSCs 中转入外源因子 SOX10, Olig2 可以将其加速分化为少突胶质前体细胞^[12],但是,这种转入慢病毒载体的方法影响了其实际应用的安全性。将 iNSCs 移植后如何促使其分化为有功能的少突胶质细胞值得进一步研究。我们的研究结果认为在低浓度 TNF- α 作用下,可以促进 iNSCs 在体外分化为少突胶质前体细胞,但是,这种少突胶质前体细胞能否在体内形成有功能的少突胶质细胞还需要进一步研究。

利益冲突 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

作者贡献声明 构思与设计、研究准备为唐玺和、黄锐,实验操作、数据采集、论文撰写为唐玺和,绘制图表为梁有明、黄锐、秦国文,论文修订为蓝胜勇、范益民

参 考 文 献

- [1] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. *Cell*, 2007, 131(5): 861-872. DOI: 10.1016/j.cell.2007.11.019.
- [2] Tang X, Wang S, Bai Y, et al. Conversion of adult human peripheral blood mononuclear cells into induced neural stem cell by using episomal vectors[J]. *Stem Cell Res*, 2016, 16(2): 236-242. DOI: 10.1016/j.scr.2016.01.016.
- [3] Wang L, Wang L, Huang W, et al. Generation of integration-free neural progenitor cells from cells in human urine[J]. *Nat Methods*, 2013, 10(1): 84-89. DOI: 10.1038/nmeth.2283.
- [4] Morini R, Ghirardini E, Butti E, et al. Subventricular zone neural progenitors reverse TNF-alpha effects in cortical neurons[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6: 166. DOI: 10.1186/s13287-015-0158-2.
- [5] Santello M, Volterra A. TNF α in synaptic function: switching gears[J]. *Trends Neurosci*, 2012, 35(10): 638-647. DOI: 10.1016/j.tins.2012.06.001.
- [6] Bernardino L, Agasse F, Silva B, et al. Tumor necrosis factor-alpha modulates survival, proliferation, and neuronal differentiation in neonatal subventricular zone cell cultures[J]. *Stem Cells*, 2008, 26(9): 2361-2371. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0914.
- [7] Yang R, Ouyang Y, Li W, et al. Autophagy Plays a Protective Role in Tumor Necrosis Factor- α -Induced Apoptosis of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells[J]. *Stem Cells Dev*, 2016, 25(10): 788-797. DOI: 10.1089/scd.2015.0387.
- [8] Lu J, Liu H, Huang CT, et al. Generation of integration-free and region-specific neural progenitors from primate fibroblasts[J]. *Cell Rep*, 2013, 3(5): 1580-1591. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.04.004.
- [9] Kumar A, Declercq J, Eggermont K, et al. Zic3 induces conversion of human fibroblasts to stable neural progenitor-like cells[J]. *J Mol Cell Biol*, 2012, 4(4): 252-255. DOI: 10.1093/jmcb/mjs015.
- [10] Simara P, Tesarova L, Rehakova D, et al. Reprogramming of Adult Peripheral Blood Cells into Human Induced Pluripotent Stem Cells as a Safe and Accessible Source of Endothelial Cells[J]. *Stem Cells Dev*, 2018, 27(1): 10-22. DOI: 10.1089/scd.2017.0132.
- [11] Douvaras P, Wang J, Zimmer M, et al. Efficient generation of myelinating oligodendrocytes from primary progressive multiple sclerosis patients by induced pluripotent stem cells[J]. *Stem Cell Reports*, 2014, 3(2): 250-259. DOI: 10.1016/j.stemcr.2014.06.012.
- [12] 李鹏燕, 李默, 唐玺和, 等. Sox10 和 Olig2 加速人源性诱导多能干细胞向少突胶质前体细胞分化[J]. *中国科学: 生命科学*, 2016, 46(11): 1259-1266. DOI: 10.1360/N052016-00289.
Li PY, Li M, Tang XH, et al. Accelerated generation of oligodendrocyte progenitor cells from human induced pluripotent stem cells by forced expression of Sox10 and Olig2 [J]. *Science China Life Sciences*, 2016, 46(11): 1259-1266.

(收稿日期: 2018-01-03)

(本文编辑: 赵静姝)