

· 基础研究 ·

人尿源干细胞的分离培养及体外成神经细胞分化研究

姜之歆, 王从容*

(上海交通大学附属第六人民医院内分泌代谢科, 上海市糖尿病研究所, 上海市糖尿病重点实验室, 上海市糖尿病临床医学中心, 上海 200030)

【摘要】 目的 从正常成人尿液中分离提取间充质干细胞(MSC)来源的人尿源干细胞(hUSC), 并研究比较其在不同诱导液中的体外成神经分化能力。**方法** 提取正常成人来源 hUSC, 经体外培养、扩增, 流式细胞术鉴定, 用 4 种不同配方的成神经诱导液分别诱导 hUSC 向神经细胞分化, 在诱导至第 14 天时, 光镜下观察细胞形态改变, 并用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法鉴定 *Nestin*、*S100*、 β -*tublin* 和 *NF-200* 基因表达。采用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行分析。组间比较采用 *t* 检验和方差分析。**结果** 从正常成人提取的 hUSC 成功表达 MSC 表面标志物(CD27⁺、CD44⁺、CD73⁺、CD90⁺、CD31⁻、CD34⁻、CD45⁻、HLA-DR⁻)。hUSC 在 B、C、D 成神经诱导液中诱导培养 14 d 后, 细胞胞体回缩饱满、折光度变强, 呈现神经元样突起。相比 A 成神经诱导液, B、C 和 D 成神经诱导液中细胞 *Nestin*、*S100* 表达水平增高, B 和 D 成神经诱导液中细胞 β -*tublin*、*NF-200* 表达水平降低。其中 C 成神经诱导液中细胞 *Nestin* 表达水平高于 B 和 D 成神经诱导液中的细胞, B 成神经诱导液中细胞 *S100* 表达水平高于 C 和 D 成神经诱导液中细胞, 差异均具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** hUSC 具备 MSC 特性; B、C、D 成神经诱导液均有助于 hUSC 向神经类细胞方向分化, 提示在优化诱导条件下, hUSC 能向神经干细胞(NSC)及胶质细胞亚群分化。

【关键词】 干细胞; 神经胶质细胞; 分化

【中图分类号】 R34

【文献标志码】 A

【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2019.04.060

Isolation, culture and neural differentiation of human urine-derived stem cells

JIANG Zhi-Xin, WANG Cong-Rong*

(Department of Endocrinology and Metabolism, the Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai Diabetes Institute, Shanghai Key Laboratory of Diabetes Mellitus, Shanghai Clinical Center for Diabetes, Shanghai 200030, China)

【Abstract】 Objective To isolate human urinary stem cells (hUSC) with mesenchymal stem cells (MSC) characteristics from urine samples of healthy individuals, and determine the neurogenic differentiation capabilities of the cells in different neurogenic induction medium. **Methods** hUSC were isolated from the urine sample of normal individuals, and then cultured, passaged and identified with flow cytometry. Then, after 14 days' induction with 4 kinds of neurogenic induction medium, cell morphology was observed under a light microscope, and the mRNA levels of *Nestin*, *S100*, β -*tublin* and *NF-200* were detected by RT-PCR. SPSS statistics 13.0 was used to perform the statistical analysis. Student's *t* test and Chi-square test were employed for comparison among groups. **Results** The obtained cells derived from the urine samples of healthy adults could successfully express surface markers of MSC (CD27⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD31⁻, CD34⁻, CD45⁻, HLA-DR⁻). After 14 days' induction with neural induction medium B, C and D, the hUSC showed spherical cell bodies with enhanced refraction and neuron-like processes. RT-PCR indicated compared with the medium A, the mRNA levels of *Nestin* and *S100* were increased medium B, C, D induction, and those of β -*tublin* and *NF-200* were decreased after medium B and D induction. What's more, medium C induced the highest *Nestin* level than medium B and D, while medium B induction obtained the highest level of *S100* than medium C and D ($P<0.05$). **Conclusion** hUSC possess the characteristics of MSC. Medium B, C and D contribute to the differentiation of hUSC into neuron cells. Our results suggest that hUSC can be differentiated into neural stem cells and glial subpopulations under optimized induction conditions.

【Key words】 stem cells; neuroglia cells, differentiation

This work was supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81570808), the Program of Outstanding Talents Training in Shanghai Health and Family Planning System (2017BR045), and the National Key Research and Development Program of China (2017YFC0906903).

Corresponding author: WANG Cong-Rong, E-mail: crwang@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2018-11-01; 接受日期: 2018-12-24

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81570808); 上海市卫生计生系统优秀人才培养计划(2017BR045); 国家重点研发计划(2017YFC0906903)

通信作者: 王从容, E-mail: crwang@sjtu.edu.cn

随着组织工程相关研究与日俱增,干细胞治疗越来越被关注^[1,2]。干细胞自我更新及体外多向分化能力旺盛,可间接分泌多种细胞因子和调节免疫,常被用来作为治疗疾病的种子细胞,其中用于神经细胞移植疗法的主要有胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)、神经干细胞(neural stem cell, NSC)以及其他来源的间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)^[3-5]。ESC取材不易和伦理问题限制了其广泛应用,NSC需自体有创取材,提取与培养均十分不易。目前已有研究证实骨髓来源的MSC可在体外成功分化为神经细胞^[6,7],在细胞治疗中被广泛研究。人尿源干细胞(human urinary stem cells, hUSC)因便于取材、来源简易、安全无创等特点,临床应用前景广阔^[8-10]。Zhang等^[11]首次报道从人尿液中分离获得一种具有多向分化潜能的干细胞,并鉴定了其MSC的生物特性,表达CD29、CD44、CD73、CD90等MSC标志物,并可体外成功分化为脂肪细胞、成骨细胞、软骨细胞等。目前对hUSC分化为神经细胞的相关报道较少,且结果不一。为进一步研究hUSC分化为神经细胞(包括NSC、胶质细胞、神经细胞)的可行性,本研究对既往文献中报道的经典MSC成神经诱导液,以及hUSC成神经诱导液成分做了整合调整,对hUSC向神经类细胞定向分化潜能进行了研究,以期对hUSC在中枢神经系统疾病方面的应用提供新依据。

1 材料与方法

1.1 hUSC的培养和传代

我们收集了3例健康成人无菌新鲜中段尿液200 ml,加入5 ml青链霉素混匀,分装至4管50 ml离心管,400转/min离心10 min后弃上清,加入20 ml磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)吹打混匀,继续400转/min离心10 min,弃上清, hUSC培养基重悬后接种于0.1%明胶包被的6孔板中(2 ml/孔),在37℃、5% CO₂培养箱静置培养。hUSC培养基成分包括:含F12 Dulbecco改良型基础培养基(Dulbecco's modified eagle medium/nutrient mixture F-12, DMEM/F12)、2%胎牛血清、10 ng/ml表皮细胞生长因子(epidermal growth factor, EGF)、2 ng/ml血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)、1 ng/ml转化生长因子(transforming growth factor, TGF)、2 ng/ml重组人成纤维细胞生长因子(recombinant human fibroblast growth factor, hFGF)、0.5 mmol/L氢化可的松、24 mg/ml胰岛素、20 mg/ml转铁蛋白、549 ng/ml肾上腺素、125 ng/ml

三碘甲状腺原氨酸。原代细胞培养3 d后观察细胞生长情况,并添加培养基1 ml/孔,经7~10 d培养,待hUSC融合率80%~90%时,使用0.25%胰蛋白酶消化传代,用于后续实验。本研究经上海市第六人民医院伦理委员会审核各项通过。

1.2 hUSC表面标志物检测

选取P4 hUSC, PBS洗涤2遍,加入0.25%胰蛋白酶消化,1%牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)洗涤后重悬细胞计数,调整细胞密度至10⁶/ml。取细胞悬液200 μl加入藻红蛋白(phycoerythrin, PE)标记的单克隆抗体CD29、CD73、CD90、CD34和HLA-DR,以及异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的单克隆抗体CD44、CD31、CD45至各流式管,并以相应的荧光标记的IgG抗体为同型对照组。冰上避光孵育30 min,孵育后200转/min离心5 min,使用PBS清洗游离抗体,200转/min再次离心5 min,最终用1%BSA重悬细胞至200 μl,经Guava easyCyte (Millipore, USA)流式细胞仪检测。

1.3 成神经分化检测

取P4代hUSC,以5×10⁴/ml浓度接种于6孔板,待其融合度达90%~100%时,按预处理、分化诱导两个阶段进行实验。(1)预处理阶段,使用低糖DMEM、10%胎牛血清、100 ng/ml hFGF预诱导24 h,之后各孔分别更换成对应的诱导液。(2)分化阶段采用不同成分的成神经诱导液诱导14 d。A成神经诱导液是使用经典诱导方案^[12]:DF-12培养基,添加50 ng/ml hFGF、50 ng/ml EGF、10 ng/ml脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, bDNF)。B成神经诱导液参照既往文献报道的hUSC成神经诱导液成分^[13]:DF-12培养基,添加50 ng/ml hFGF、50 ng/ml EGF、2% B27神经细胞培养添加剂、1%非必需氨基酸(non-essential amino acids, NEAA)、1% L-谷氨酸、1%胰岛素-转铁蛋白-硒(insulin-transferrin-selenium, ITS)溶液。C成神经诱导液在经典诱导方案(A)基础上添加了其他促成神经分化成分,包括0.1%的二甲基亚砜、0.1 mmol/L丁基羟基茴香醚。D成神经诱导液除将DF-12培养基更换为低糖DMEM培养基,其他成分和C成神经诱导液相同。对照组不进行成神经诱导分化。诱导液隔天换液,诱导至第14天时,荧光倒置显微镜下观察各诱导液中细胞形态变化。

1.4 逆转录-聚合酶链反应检测

我们检测了神经干细胞特异性标志物Nestin,成熟神经细胞特异性标志物β3-tubulin与NF-200,胶质细胞前体特异性标志物S100的表达情况。Trizol

法常规提取细胞总 RNA,cDNA 提取参照 Superscript III Fast-Strand Synthesis System(Invitrogen) 试剂盒说明。逆转录-聚合酶链反应参照 Powerup Sybr Green Master Mix (Thermo Fischer Scientific) 反应体系,终 CT 值上机由 LightCycler 480 system 测得。引物定量标准依据内参 GAPDH。引物序列由 Primer-BLAST 在线设计获得,由上海生物工程有限公司合成,正反引物如下(表 1)。

表 1 Nestin、S100、β3-tublin、NF-200、GAPDH 基因引物序列

Table 1 Primer sequence of Nestin, S100, β3-tublin, NF-200 and GAPDH gene		
Gene	Amplified direction	Primer sequence
Nestin	Forward	5'-GCGTTGGAACAGAGGTTGGA-3'
	Reverse	5'-CTGTTTCTCCTGCTCCAGGG-3'
S100	Forward	5'-GCAGCCACATTGCAACCTT-3'
	Reverse	5'-GCGTGGAACACGTTGATGAG-3'
β3-tublin	Forward	5'-CAACCAGATCGGGGCCAAGT-3'
	Reverse	5'-TGAAGAGATGTCCAAAGGCCCC-3'
NF-200	Forward	5'-GCTGAGCTGAGGAACACCAA-3'
	Reverse	5'-AGGAATTGGGCCAAAGCCAA-3'
GAPDH	Forward	5'-GGTGTGAACCATGAGAAGTATGA-3'
	Reverse	5'-GAGTCCTTCCACGATACCAAAG-3'

1.5 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行分析, Graphpad 7.0 软件进行作图。计量资料用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验和方差分析。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 hUSC 原代培养鉴定

正常人尿液经离心、重悬、接种至 6 孔板后 7~10 d 开始出现克隆微团,贴壁生长(图 1A)。细胞紧密排列,形态均一,呈短梭形或米粒样,14 d 左右克隆融

合率达 90%~100%,此时对其进行传代,即得到 P1 代 hUSC(图 1B)。细胞增殖迅速,经多次传代,细胞形态未见明显改变(图 1C)。

2.2 hUSC 的 MSC 特性

P4 代 hUSC 表面标志物流式细胞术鉴定结果显示,hUSC 高表达 CD29(99.64%)、CD44(97.22%)、CD73(99.44%)、CD90(71.14%),不表达 CD31(2.66%)、CD34(0.62%)、CD45(2.22%)、HLA-DR(0.60%),提示其 MSC 来源具备多向分化潜能(图 2)。

2.3 hUSC 细胞诱导分化为神经细胞检测

诱导至第 14 天时,A 成神经诱导液中细胞形态紧密,未发现明显改变(图 3A),Nestin、S100、β3-tublin、NF-200 基因不表达(图 4)。B 成神经诱导液中细胞胞体回缩饱满、折光度变强,呈现神经细胞样突起(图 3B),C 成神经诱导液中细胞形态饱满,折光度变强(图 3C),D 成神经诱导液中细胞形态亦出现类似神经细胞样改变(图 3D)。相比 A 成神经诱导液,B、C 和 D 成神经诱导液中细胞 Nestin、S100 基因表达水平增高,B 和 D 成神经诱导液中细胞 β3-tublin、NF-200 基因表达水平降低。其中 C 成神经诱导液中细胞 Nestin 基因表达水平高于 B 和 D 成神经诱导液中细胞,B 成神经诱导液中细胞 S100 基因表达水平高于 C 和 D 成神经诱导液中细胞,差异均具有统计学意义(*P*<0.05;图 4)。

3 讨 论

hUSC 的来源方式简易,可对同一供体进行多次取材,是理想的自体种子细胞来源。既往研究中对 hUSC 体外诱导多能干细胞后进行成神经分化研究较多,或是通过转导内源性基因建立 hUSC 来源的 NSC 模型,进而再向神经细胞分化^[12-14]。然而,直接

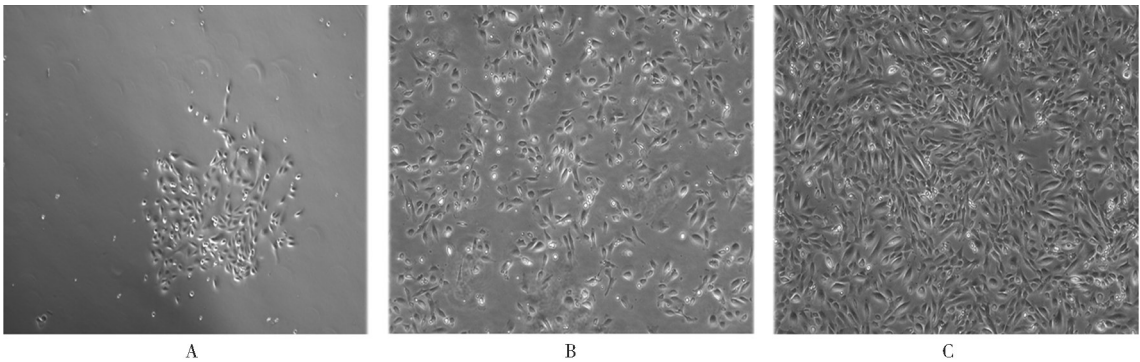


图 1 hUSC 原代培养

Figure 1 Primary isolation and culture of hUSC (×50)

A: formation of hUSC clones at 7 d; B: hUSC at passage 1; C: hUSC at passage 5; hUSC: human urinary stem cells.

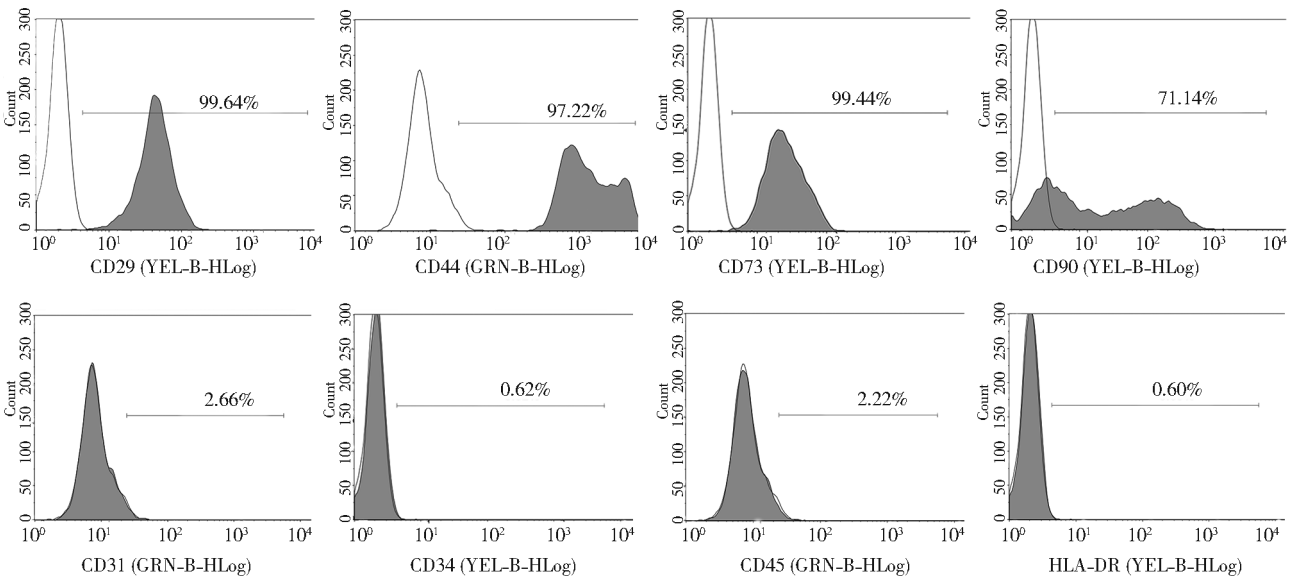


图2 原代 hUSC 表面标志物流式细胞术鉴定

Figure 2 Identification of the primary hUSC by flow cytometry

hUSC: human urinary stem cells. hUSC was identified by flow cytometry using the surface markers CD29, CD44, CD73, CD90, CD31, CD34, CD45 and HLA-DR. White solid peaks represent the isotype controls and the grey solid peak represents the marker indicated.

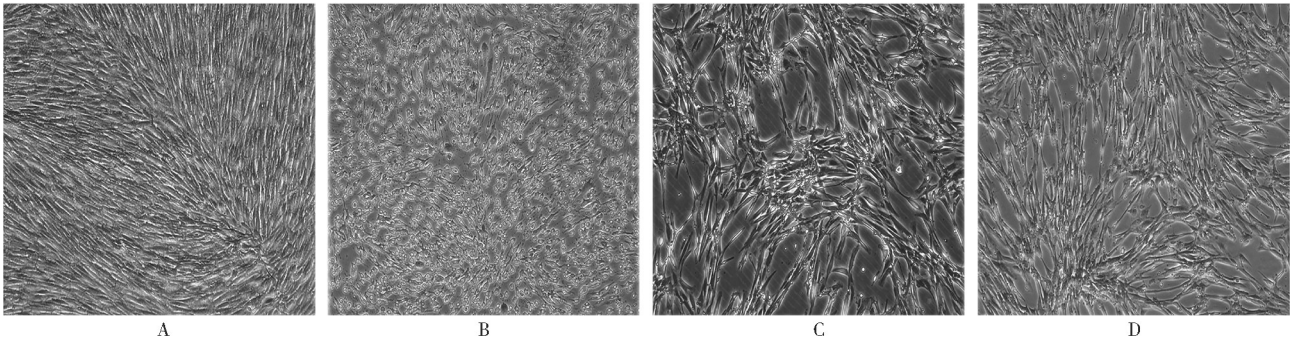


图3 hUSC 分别在4种成神经诱导液中诱导至第14天时的形态变化

Figure 3 Morphological changes of hUSC after induction for 14 d in four kinds of neurogenic induction medium ($\times 50$)

A: medium A; B: medium B; C: medium C; D: medium D; hUSC: human urinary stem cells.

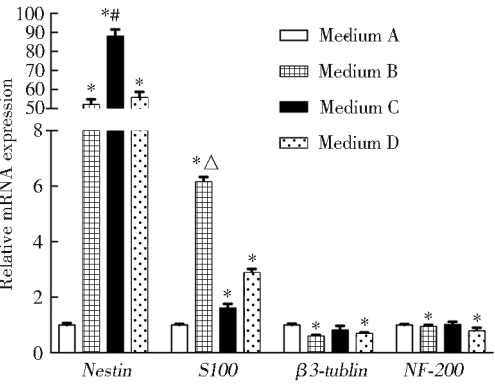


图4 hUSC 经4种成神经诱导液诱导至第14天时 *Nestin*、*S100*、*̢3-tublin*、*NF-200* 的相对表达水平

Figure 4 Relative expression levels of *Nestin*, *S100*, *̢3-tublin* and *NF-200* gene in hUSC after 14 d induction in 4 different neurogenic induction medium

Compared with medium A, * $P < 0.05$; compared with medium B and D, # $P < 0.05$; compared with medium C and D, $\Delta P < 0.05$. hUSC: human urinary stem cells.

对 hUSC 进行体外成神经分化的研究较少,且结果不尽一致。Guan 等^[15]的研究结果表明 hUSC 体外成神经分化时 NSC 特异性标志物 *Nestin*、*Sox2* 表达水平增高,而终末成熟神经细胞标志物如 *̢3-tublin* 表达水平未增高,提示 hUSC 可向神经前体细胞分化。Bharadwaj 等^[16]的研究表明 hUSC 体外成神经诱导可成功表达 NSC 特异性标志物 *Nestin* 及成熟神经细胞标志物 *NF-200*,但胶质细胞特异性标志物 *S100* 表达水平未增高,提示特定培养条件下 hUSC 可向神经细胞定向分化。

本研究结果表明,我们成功从健康成人尿液中提取出 hUSC,并鉴定了其 MSC 来源。在体外成神经分化研究中,A 成神经诱导液诱导过程中未见任何细胞形态改变及神经细胞相关基因表达,可能由于 MSC 来源不同,该诱导液最多报道用于人脐带 MSC 的成神经分化^[13,17],可能并不适合用于 hUSC。

成神经诱导液 14 d 后,B、C、D 诱导液中细胞胞体均出现回缩、折光度增加,呈现类似神经样细胞的改变,提示开始向神经细胞转变。逆转录-聚合酶链反应结果显示 hUSC 经过 B、C、D 成神经诱导液诱导 14 d 后,NSC 特异性标志物 *Nestin* 表达水平均显著上调,其中 C 成神经诱导液中细胞 *Nestin* 表达水平最高($P<0.05$),提示 C 成神经诱导液最有利于 hUSC 向 NSC 分化。B、C、D 成神经诱导液中胶质细胞前体标志物 *SI00* 表达量亦均显著上调,其中 B 成神经诱导液中细胞 *SI00* 表达水平最高($P<0.05$),提示 B 成神经诱导液最有利于 hUSC 向胶质前体细胞分化。而成熟神经元细胞特异性标志物 $\beta 3$ -*tublin* 与 *NF-200* 基因在 4 种成神经诱导液中表达水平未增高, $\beta 3$ -*tublin* 在 B、D 成神经诱导液中反而有所降低。以上结果初步表明 B、C、D 成神经诱导液均有助于诱导 hUSC 向神经类细胞分化,分化的细胞表达 NSC 特异性标志物 *Nestin*,以及胶质细胞亚群的前体标志物 *SI00*,但未能形成成熟的神经细胞。

本研究 hUSC 成功分化为神经前体细胞,后续实验将从神经前体细胞向成熟神经细胞或成熟神经胶质细胞入手,通过细胞超微结构、神经电生理特性、分子生物学功能等角度进一步验证,hUSC 极有可能成为干细胞治疗神经系统疾病的重要“种子细胞”。

【参考文献】

- [1] Sarmah D, Kaur H, Saraf J, *et al.* Mitochondrial dysfunction in stroke: implications of stem cell therapy[J]. *Transl Stroke Res*, 2019, 10(2): 121-136. DOI: 10.1007/s12975-018-0642-y.
- [2] Sonntag KC, Song B, Lee N, *et al.* Pluripotent stem cell-based therapy for Parkinson's disease: current status and future prospects[J]. *Prog Neurobiol*, 2018, 168: 1-20. DOI: 10.1016/j.pneurobio. 2018.04.005.
- [3] Li JY, Christophersen NS, Hall V, *et al.* Critical issues of clinical human embryonic stem cell therapy for brain repair[J]. *Trends Neurosci*, 2008, 31(3): 146-153. DOI: 10.1016/j.tins.2007.12.001.
- [4] Murry CE, Keller G. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development[J]. *Cell*, 2008, 132(4): 661-680. DOI: 10.1016/j.cell. 2008.02.008.
- [5] Zhang B, Yan W, Zhu Y, *et al.* Nanomaterials in neural-stem-cell-mediated regenerative medicine: imaging and treatment of neurological diseases[J]. *Adv Mater*, 2018, 30(17): e1705694.

DOI: 10.1002/adma.201705694.

- [6] Scuteri A, Miloso M, Foudah D, *et al.* Mesenchymal stem cells neuronal differentiation ability: a real perspective for nervous system repair? [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2011, 6(2): 82-92.
- [7] Sammali E, Alia C, Vegliante G, *et al.* Intravenous infusion of human bone marrow mesenchymal stromal cells promotes functional recovery and neuroplasticity after ischemic stroke in mice[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 6962. DOI: 10.1038/s41598-017-07274-w.
- [8] Qin D, Long T, Deng J, *et al.* Urine-derived stem cells for potential use in bladder repair[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2014, 5(3): 69. DOI: 10.1186/sct458.
- [9] Pavathuparambil Abdul Manaph N, Al-Hawwas M, Bobrovskaya L, *et al.* Urine-derived cells for human cell therapy[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 189. DOI: 10.1186/s13287-018-0932-z.
- [10] Ji X, Wang M, Chen F, *et al.* Urine-derived stem cells: the present and the future[J]. *Stem Cells Int*, 2017, 2017: 4378947. DOI: 10.1155/2017/4378947.
- [11] Zhang Y, McNeill E, Tian H, *et al.* Urine derived cells are a potential source for urological tissue reconstruction[J]. *J Urol*, 2008, 180(5): 2226-2233. DOI: 10.1016/j.juro.2008.07.023.
- [12] Bae KS, Park JB, Kim HS, *et al.* Neuron-like differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. *Yonsei Med J*, 2011, 52(3): 401-412. DOI: 10.3349/ymj.2011.52.3.401.
- [13] Yi H, Xie B, Liu B, *et al.* Derivation and identification of motor neurons from human urine-derived induced pluripotent stem cells[J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 3628578. DOI: 10.1155/2018/3628578.
- [14] Wang L, Wang W, 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.
- [15] Guan JJ, Niu X, Gong FX, *et al.* Biological characteristics of human-urine-derived stem cells: potential for cell-based therapy in neurology[J]. *Tissue Eng Part A*, 2014, 20(13-14): 1794-1806. DOI: 10.1089/ten.TEA.2013.0584.
- [16] Bharadwaj S, Liu G, Shi Y, *et al.* Multipotential differentiation of human urine-derived stem cells: potential for therapeutic applications in urology[J]. *Stem Cells*, 2013, 31(9): 1840-1856. DOI: 10.1002/stem.1424.
- [17] 邢衢, 马珊珊, 王欣欣, 等. 人脐带间充质干细胞神经分化微环境的优化[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2016, 51(4): 469-474. DOI: 10.13705/j.issn.1671-6825.2016.04.009.

Xing Q, Ma SS, Wang XX, *et al.* Optimization and evaluation of micro-environment about hUC-MSC neural differentiation [J]. *J Zhengzhou Univ (Med Sci)*, 2016, 51(4): 469-474. DOI: 10.13705/j.issn.1671-6825.2016.04.009.

(编辑:王彩霞)