

• 论著 •

成人骨髓间充质干细胞体外多向分化潜能特性的研究

常颖 齐欣 卜丽莎 徐忠信

【摘要】 目的 研究体外不同诱导条件下成人骨髓间充质干细胞向成骨细胞、脂肪细胞、神经细胞分化的能力。**方法** 用细胞化学方法对诱导后的骨髓细胞进行脂肪细胞特异油红 O 染色; Von Kossa 及改良的钙钴法进行成骨细胞鉴定; 免疫组化方法检测诱导后的骨髓细胞神经元特异性烯醇化酶(NSE)、神经丝蛋白-M(NF-M)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)表达。**结果** 在不同的诱导条件下, 诱导后的细胞油红 O 染色胞浆内可见橙红色脂滴; Von Kossa 染色可见细胞间布满黑色颗粒, 提示有矿化基质沉积; 改良钙钴法碱性磷酸酶染色胞浆呈深棕色或深黑色。免疫组化染色显示向神经细胞方向诱导后细胞 NSE(+), NF-M(+), GFAP(-)。**结论** 成人骨髓间充质干细胞在体外具有多向分化的潜能。

【关键词】 骨髓间充质干细胞; 成骨细胞; 脂肪细胞; 神经细胞

Study on multipotential differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in vitro CHANG Ying*, QI Xin, BU Li-sha, XU Zhong-xin. * Department of Neurology Sino-Japanese Friendship Hospital, Jilin University, Jilin 130031, Jilin, China

【Abstract】 Objective To study the capability of human bone marrow mesenchymal stem cells(MSCs) to differentiate into adipocyte, osteoblasts, and neurocytes under different experimental conditions in vitro. **Methods** The induced human bone marrow MSCs were examined by cytochemistry staining and immunohistochemistry staining. **Results** Induced human bone marrow MSCs formed alkaline phosphatase-positive aggregates and Von Kossa stain-positive nodules under the condition of osteogenic differentiation. Under the condition of adipogenic differentiation, the isolated human bone marrow MSCs formed oil red-O-positive cells. Immunohistochemistry results showed that differentiated human bone marrow MSCs expressed neuron-specific enolase(NSE) and neurofilament(NF-M). **Conclusion** Human bone marrow MSCs have the capability of multipotential differentiation in vitro.

【Key words】 bone marrow mesenchymal stem cell; osteoblast; adipocyte; neurocyte

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是来源于中胚层的具有多向分化潜能的干细胞, 主要存在于全身结缔组织和器官间质中, 以骨髓组织中含量最多, 胎儿脐血中亦可分离得到^[1]。在一定的诱导条件下, MSCs 具有向成骨细胞、成软骨细胞、成肌细胞、肌腱细胞、脂肪细胞等中胚层细胞分化的能力; 同时可以向外胚层的神经细胞及内胚层的肝卵圆性细胞分化^[2,3]。本实验中通过研究成人骨髓 MSCs(hMSCs)在体外不同诱导条件下向成骨细胞、脂肪细胞、神经细胞分化的能力, 进一步证实其多向分化潜能的性质, 为更广泛应用于组织工程领域提供可靠的实验数据。

1 资料与方法

1.1 主要器材与试剂: 低糖 Dulbecco 改良 Eagle

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(20030536-5)

作者单位: 130031 吉林大学中日联谊医院神经内科(常颖, 徐忠信); 130021 吉林大学第一医院骨科(齐欣); 130021 吉林大学第一医院神经内科(卜丽莎)

作者简介: 常颖(1971-), 女(汉族), 吉林省长春市人, 博士研究生, 主治医师, 主要从事脱髓鞘疾病及重症肌无力的研究, 发表相关论文 10 篇。

培养基(DMEM)、高糖-DMEM(H-DMEM)均购自 Gibco BRL 公司; 胎牛血清(FCS)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、HEPES 缓冲液购自 Hyclone 公司; 胰蛋白酶、Ficoll 分离液(密度 1.077 g/L)、地塞米松、 β -甘油磷酸钠、维生素 C、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(3-isobutyl-1-methyl-xanthine, IBMX)、消炎痛(indomethacin)、 β -巯基乙醇购自 Sigma 公司; 牛胰岛素购自 Calbiochem 公司; 鼠抗人神经元特异性烯醇化酶(NSE)、神经丝蛋白-M(NF-M, 160 kU)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)为福州迈新生物技术开发公司产品。

1.2 hMSCs 的分离与扩增: 骨髓组织取自行脊柱融合术的患者, 全部患者签署知情同意书。行方髂嵴骨髓穿刺, 每次采集 20 ml。根据梯度离心原理, 采用 Ficoll (Sigma 公司)分离骨髓中的有核细胞, 通过对 hMSCs 在培养皿的附壁特性进行筛选。细胞扩增进入第 2 代时, 质量分数为 0.25%的胰蛋白酶/1 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA, Sigma 公司)消化后混悬于 DMEM 培养液中待用。

1.3 hMSCs 向成骨细胞的转化: ①将第 2 代的

hMSCs 按 $3 \times 10^3/\text{cm}^2$ 接种于 24 孔培养板,培养板中放置有预先经赖氨酸处理的盖玻片。培养第 2 d, 12 个孔作为实验组更换含成骨添加剂(100 nmol/L 地塞米松、10 mmol/L 甘油磷酸钠、50 $\mu\text{mol/L}$ 维生素 C)的新鲜培养基,以后每周换 2 次培养基,于第 21 d 行 Von Kossa 染色及碱性磷酸酶染色。其余 12 孔作为对照组,更换不加成骨添加剂的新鲜培养液。② Von Kossa 染色:吸干培养液后用丙酮固定 30 s,双蒸水漂洗 2 次,自然晒干后行 Von Kossa 染色,观察诱导后细胞的钙化结节形成情况。③ 碱性磷酸酶染色:培养第 21 d,取出爬满细胞的盖玻片,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3 次,体积分数为 95% 的乙醇固定 30 min,行改良的钙钴法染色。

1.4 hMSCs 向脂肪细胞的转化:①将第 2 代的 hMSCs 按 $3 \times 10^3/\text{cm}^2$ 接种于 24 孔培养板中,培养板中放置有预先经赖氨酸处理的盖玻片。待细胞有 80%~90% 融合后,加入含 1 $\mu\text{mol/L}$ 的地塞米松、0.5 mmol/L 的 IBMX、10 mg/L 的牛胰岛素、100 mmol/L 的消炎痛、10% FCS 的 H-DMEM 诱导 3 d,再用含 10 mg/L 的牛胰岛素、10% FCS 的 H-DMEM 处理 1 d,循环 3 次后,用含 10 mg/L 的牛胰岛素、体积分数为 10% 的 FCS 的 H-DMEM 处理 7 d,每隔 3~4 d 换液 1 次。对照组加入含 10 mg/L 的牛胰岛素、10% FCS 的 H-DMEM,每隔 3~4 d 换液 1 次。②油红 O 染色:诱导后的细胞用 PBS 洗涤 3 次,体积分数为 10% 的多聚甲醛固定 10 min,行油红 O 染色。

1.5 hMSCs 向神经细胞的转化:①将第 2 代的 hMSCs 按 $3 \times 10^3/\text{cm}^2$ 接种于 24 孔培养板中,培养板中放置有预先经赖氨酸处理的盖玻片。待细胞有 80%~90% 融合后,弃去培养液,细胞用含 20% FCS、10 $\mu\text{g/L}$ bFGF 的 DMEM 预诱导 24 h,更换培养液,PBS 洗涤 3 次,再加入含 5 mmol/L β -巯基乙醇的无血清 DMEM 诱导 6 h。对照组不加任何诱导剂。每组包括 18 个细胞爬片。②尼氏染色:将诱导 6 h 的细胞爬片用体积分数为 95% 的乙醇固定 20 min,蒸馏水稍洗后,用甲苯胺蓝水溶液行尼氏染色。③免疫组化鉴定:取诱导后的细胞爬片,行免疫组化染色鉴定。对照组用未诱导的 hMSCs 爬片直接进行 NF-M、NSE、GFAP 免疫组化染色。

1.6 检测方法:诱导后的细胞经免疫组化染色后在光镜下随机取 10 个非重叠视野($\times 100$),计算 NSE、NF-M 阳性细胞占细胞总数的比例,结果用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 hMSCs 向成骨细胞的转化:未加成骨添加剂的第 2 代细胞在第 21 d 时 Von Kossa 染色未见黑色的矿物质沉积;加入成骨添加剂的细胞培养 21 d, Von Kossa 染色可见细胞间布满黑色颗粒,颗粒大小不均一,提示有矿化基质沉积,培养板上有大量卷发状的细胞团(图 1)。

改良钙钴法碱性磷酸酶染色实验组细胞浆呈深棕色或深黑色,其中充满致密的黑色沉淀,有的融合成大片状,细胞间隙难以区分(图 2);对照组细胞仍呈成纤维细胞样外观,没有大片的黑色沉淀。

2.2 hMSCs 向脂肪细胞的分化:培养 7 d 后,体积分数为 10% 的中性甲醛固定、油红 O 染色、苏木精复染核后,镜下观察可见脂滴为橙红色,胞核为蓝色,脂肪细胞中含大小不等的脂肪滴,细胞核被脂滴挤于细胞一侧(图 3)。

2.3 hMSCs 向神经细胞的分化:尼氏染色见诱导 6 h 的神经细胞胞质中有深蓝色块状或颗粒状尼氏体(图 4A)。免疫组化染色显示:未诱导的 hMSCs (对照组)不表达 NSE 和 NF-M,细胞不着色。诱导 6 h 的 hMSCs 呈 NSE(+),NF-M(+),GFAP(-);阳性细胞呈棕褐色,表现为弥漫性胞浆着色(图 4B~D)。诱导 6 h NSE、NF-M 阳性细胞数分别为 $(80.1 \pm 2.2)\%$ 和 $(82.7 \pm 1.8)\%$ 。

3 讨论

自 20 世纪 70 年代 Friedenstein 等首次报道骨髓标本中有小部分贴附细胞在培养过程中能分化形成类似骨、软骨的集落后,人们对骨髓中这一小部分贴壁细胞产生了浓厚兴趣。随后的大量文献报道了从不同种属如鼠、兔、犬、人的骨髓中分离得到这种贴壁细胞^[4,5]。因为在体外不同诱导分化条件下其可分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞及神经细胞,具有多向分化的潜能,因此命名为骨髓 MSCs 或骨髓基质干细胞(bone marrow stromal cells, MSCs)。虽然 1994 年 Bethel 等^[6]研究发现 hMSCs 在胎儿骨髓中的含量较成人骨髓中含量多;苏瑞军和傅文玉等^[7,8]研究也证明了胚胎骨髓 MSCs 较成人骨髓幼稚,具有更强的自分泌因子以维持自身生长及分泌的能力,但是仍存在着有关伦理和免疫排斥等问题。因此,成体 MSCs 较其他干细胞具有更为明显的优势;所以本实验选用成人骨髓。

虽然人们对 MSCs 进行了大量的研究工作,但对这种细胞本身的认识还远远不足,至今还未能筛选到 MSCs 特有的标记分子,尚无直接方法鉴定得

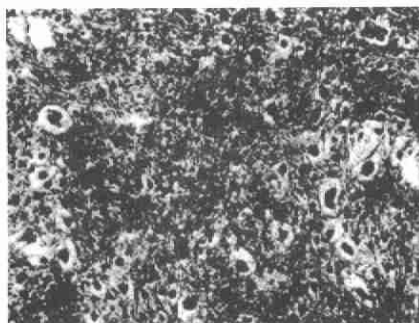


图 1 向成骨细胞诱导第 21 d Von Kossa 染色($\times 150$)

Figure 1 Cells stained by the Von Kossa technique after osteogenic induction for 21 days

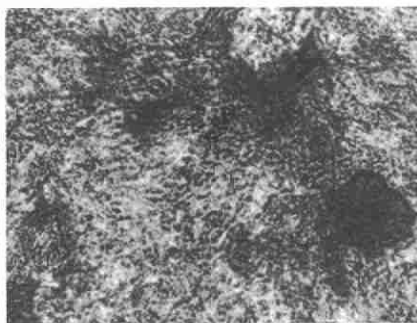


图 2 向成骨细胞诱导实验组第 21 d 碱性磷酸酶染色($\times 150$)

Figure 2 Osteogenic induction of MSCs for 21 days to show varying degrees of positive stain for alkaline phosphatase

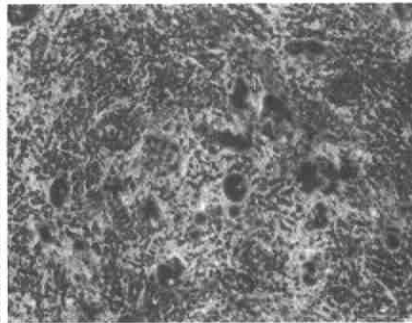
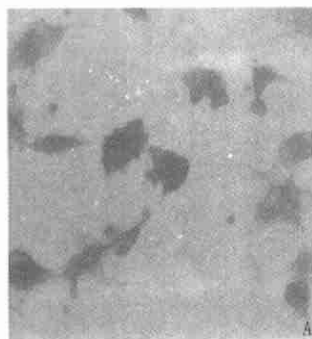
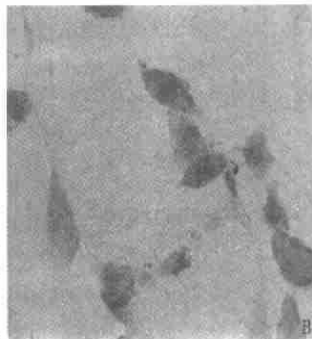


图 3 向脂肪细胞诱导第 7 d 油红 O 染色($\times 150$)

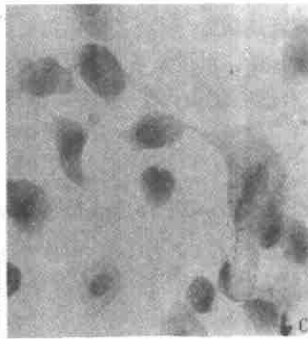
Figure 3 Cells stained by the oil-O technique after adipogenic differentiation for 7 days



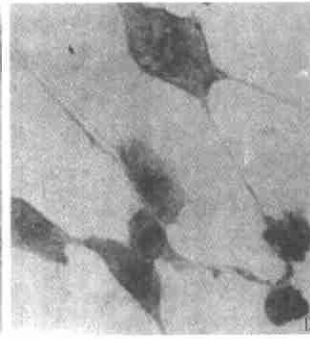
A: 尼氏染色



B: NSE 染色



C: GFAP 染色



D: NF-M 染色

图 4 向神经细胞诱导 6 h 的 MSCs($\times 200$)

Figure 4 Neuro-differentiation of MSCs for 6 hours($\times 200$)

到 MSCs。本实验中用梯度离心的方法结合 MSCs 塑料贴壁生长的特性,从成人骨髓中分离、扩增得到 MSCs,并在体外不同的诱导条件下,将 MSCs 诱导分化为成骨细胞、脂肪细胞、神经细胞,间接证明了本实验从骨髓中分离得到的细胞为骨髓 MSCs,而非造血干细胞或其他细胞。

随着对 MSCs 研究的不断深入, MSCs 在体内的分化情况又引起了人们的关注。但体内分化的实验多来自于动物 MSCs,多用小动物的 MSCs 修复动物自身组织缺损。傅文玉等^[8]曾将人胚胎骨髓中分离的 hMSCs 注入到裸鼠皮下,观察到经 1 个月的生长, hMSCs 不仅存活,而且在注射局部分化成多种组织类型,如骨、软骨、脂肪、骨骼肌、肌腱样组织及类似于无髓神经纤维的结构。本课题组也曾将 hMSCs 注入裸鼠皮下,但 hMSCs 只分化成脂肪组织及骨骼肌组织。这说明 hMSCs 的多向分化能力要弱于胚胎的骨髓 MSCs。近 1 年来,陆续有报道用 hMSCs 移植治疗大鼠脊髓损伤及缺血性脑卒中,其神经系统的功能恢复均优于对照组,这就为 hMSCs 自体移植治疗神经系统疾病提供了可靠的实验数据。相信随着研究的不断深入, hMSCs 自体移植会

真正应用于临床,为人类的健康服务,造福于人类。

参考文献:

- 1 Erices A, Conget P, Minguell J J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood [J]. Br J Haematol, 2000, 109: 235-242.
- 2 Jiang Y, Jahagirdar B N, Reinhardt R L, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow [J]. Nature, 2002, 418: 41-49.
- 3 Schwartz R E, Reyes M, Koodie L, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells [J]. J Clin Invest, 2002, 109: 1291-1302.
- 4 Owen M. Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system (A). In: Peck W A. Bone and Mineral Research (vol. 3) [M]. New York: Elsevier, 1985. 1-25.
- 5 方利君, 付小兵, 孙同柱, 等. 猪骨髓间质干细胞的分离培养及分化潜能的鉴定 [J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15: 606-608.
- 6 Bethel C A, Steinkirchner T, Zanjani E D, et al. Stromal micro-environment of human fetal hematopoiesis; in vitro morphologic studies [J]. Pathobiology, 1994, 62: 99-103.
- 7 苏瑞军, 黄绍良, 周郭华, 等. 人胚胎骨髓基质细胞的体外培养观察 [J]. 中国小儿血液, 1999, 4: 14-15.
- 8 傅文玉, 路艳蒙, 朴英杰. 人骨髓间充质干细胞的培养及多能性研究 [J]. 中华血液学杂志, 2002, 23: 202-204.

(收稿日期: 2004-07-03 修回日期: 2004-12-24)

(本文编辑: 李银平)