

· 论 著 ·

犬骨髓多能成体祖细胞体外培养、鉴定及诱导分化为平滑肌样细胞的实验研究

温 昱¹, 李 彬², 党瑞山¹, 张传森^{1*}, 张 喜¹, 刘艳春¹, 李 瑞¹
(1. 第二军医大学基础部人体解剖学教研室, 生物医学工程研究所, 上海 200433; 2. 第二军医大学长征医院骨科, 上海 200003)

[摘要] **目的:**探讨犬骨髓多能成体祖细胞(MAPC)的体外培养条件、生物学特性及其向平滑肌样细胞分化的可能性。**方法:**观察体外培养犬骨髓多能成体祖细胞的形态、生长情况,检测其表面标志,利用流式细胞技术检测 MAPC 的生长周期及特异表面标志表达率;并以分化培养基诱导培养,采用 RT-PCR 方法检测骨髓多能成体祖细胞 OCT-4 及分化细胞 SM-MHC (smooth muscle cells-myosin heavy chain)表达;检测分化细胞有无平滑肌细胞表面标志的表达。**结果:**光镜下观察犬骨髓多能成体祖细胞体积偏大,长多角型,数个细长伪足,细胞核大,胞质丰富,细胞增殖能力旺盛;表达表面标志 CD13 和 SSEA-1,不表达 CD44、CD45、CD133 和 MHC II;RT-PCR 结果显示表达 OCT-4。诱导分化后,分化细胞表达平滑肌细胞表面标志—— α -SMA、calponin、SM-MHC;RT-PCR 结果显示表达 SM-MHC。**结论:**体外成功培养犬骨髓多能成体祖细胞,具有与文献报道类似的生物学特征;MAPC 在一定诱导条件下具有向平滑肌样细胞分化的潜能。

[关键词] 骨髓;多能成体祖细胞;细胞培养;细胞分化;平滑肌样细胞

[中图分类号] R 329.21 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)06-0593-05

Culture and identification of canine bone marrow-derived multipotent adult progenitor cells and their differentiation into smooth muscle-like cells

WEN Yu¹, LI Bin², DANG Rui-shan¹, ZHANG Chuan-sen^{1*}, ZHANG Xi¹, LIU Yan-chun¹, LI Rui¹ (1. Department of Anatomy, College of Basic Medical Sciences, Institute of Biomedical Engineering, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Orthopedics, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the culture condition and biological characteristics of canine multipotent adult progenitor cells(MAPC) and their potential to differentiate into smooth muscle-like cells *in vitro*. **Methods:** The morphology and growth of *in vitro* cultured MAPC were observed and the surface marker of MAPC was detected. The cell cycle and phenotype of MAPC were determined by FACS. RT-PCR was used to examine the expression of OCT-4 in MAPC and smooth muscle cells-myosin heavy chain (SM-MHC) in the differentiated cells. The surface markers of smooth muscle cells were detected in the differentiated cells. **Results:** Under microscope, MAPCs were polygon and had large nuclei, multi-parapodiums and affluent cytoplasm. The cells also showed strong proliferation ability and were positive of CD13, SSEA-1 and negative of CD44, CD45, CD133, and MHC II. RT-PCR showed expression of OCT-4. The cells differentiated from MAPC expressed the surface markers of smooth muscle cells, including α -SMA, calponin and SM-MHC. RT-PCR demonstrated the expression of SM-MHC. **Conclusion:** We have successfully cultured canine MAPC *in vitro*, which has similar biological characteristics as reported previously. MAPC has the potential to differentiate into smooth muscle-like cells under certain physiological condition *in vitro*.

[KEY WORDS] bone marrow; multipotent adult progenitor cells; cell cultural; cell differentiation; smooth muscle-like cells

[Acad J Sec Mil Med Univ,2007,28(6):593-597]

静脉的细胞成分除表面的内皮细胞外,间质内主要有平滑肌细胞、成纤维细胞和肌纤维母细胞等。平滑肌细胞合成分泌的胶原蛋白、弹力蛋白和蛋白聚糖等细胞外基质是提供血管塑形及张力的最主要成分,在血管的自我更新中起重要作用。因此,平滑肌类细胞的种植是成功构建组织工程化静脉瓣的重要环节,有必要找到一种合适的平滑肌类细胞来源。目前用于构建组织工程静脉瓣间质的主要细胞为动脉壁肌纤维母细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞等^[1]。

由于平滑肌细胞和成纤维细胞是成熟细胞、肌纤维母细胞属于定向祖细胞,它们的寿命较短,不是理想的种子细胞。作为骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)亚群的多能成体祖细胞

[基金项目] 国家自然科学基金(30672045)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30672045)。
[作者简介] 温 昱,博士生,讲师。
* Corresponding author. E-mail:chuansen@yahoo.com

(multipotent adult progenitor cells, MAPC), 由于其具有取材方便、可自体来源、无排斥反应、易获得和活性好等优点,理论上在合适的生长因子和生长环境下可以诱导为需要的细胞^[2-5],是一种良好的种子细胞来源。但是,目前还缺乏成年犬新鲜骨髓中 MAPC 的性状和培养条件的系统报道;MAPC 能否分化为平滑肌样细胞及其诱导条件还有待明确。

1 材料和方法

1.1 实验动物 杂交犬,雌性,6个月龄,体质量 15 kg,购于上海海军医学研究所[动物使用许可证号:SRXK(军)2002-044]。

1.2 MAPC 扩增培养基 60% DMEM-LG (Gibco), 40% MCDB-201 (Sigma), 1×胰岛素-转铁蛋白-硒 (insulin-transferrin-selenium, ITS, Sigma), 10^{-9} mol/L 地塞米松 (dexamethasone, Sigma), 10^{-4} mol/L 2-磷酸抗坏血酸 (ascorbic acid 2-phosphate, Sigma), 2% 胎牛血清 (fetal calf serum, FCS, Hyclone), 10 ng/ml 重组人表皮生长因子 (recombinant human epidermal growth factor, rhEGF, R&D System), 10 ng/ml 重组人血小板衍生生长因子 BB (recombinant human platelet derived growth factor, rhPDGF-BB, R&D System), 1×10^{-6} U/L 白血病抑制因子 (leukemia inhibitor factor, LIF, Prospec), 10^{-9} mol/L 纤维连接蛋白 (fibronectin, FN, Sigma), 常规加入双抗 (Gibco)。

1.3 犬骨髓 MAPC 培养及鉴定

1.3.1 MAPC 培养 2.5% 硫喷妥钠 5 ml 腹腔注射麻醉动物,无菌条件下,用骨穿针于实验犬髂后上棘处进行多点穿刺,共抽取骨髓 10 ml 至含肝素的注射器中,然后将骨髓直接注入含扩增培养基的培养瓶中,进行全骨髓培养。5% CO₂、37℃ 孵箱中培养 1 d 后换液,弃去未贴壁细胞,以后每 2~3 d 换液 1 次。细胞长至 80%~90% 融合时, PBS 洗涤 2 次, 0.25% 胰酶 37℃ 消化 1 min 左右,吸管吹打至细胞完全脱壁为单细胞悬液, 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清;扩增培养液重悬细胞,以 $(1 \sim 2) \times 10^5$ /ml 重新接种于 25 cm² 培养瓶中。

1.3.2 MAPC 生物学特性的鉴定 ①倒置相差显微镜下观察细胞生长情况,并拍照。②绘制生长曲线:0.25% 胰酶消化细胞,条件培养液重悬细胞;以 1.6×10^5 /ml 接种至 24 孔板,每孔接种 200 μ l,共接种 21 孔,移入培养箱中。此后每天取 3 孔,锥虫蓝染色,计数活细胞数,取 3 孔平均值,连做 7 d,绘制细胞生长曲线。③流式细胞术检测:将第 2 代骨髓 MAPC 消化, PBS 多次洗涤后,分别加入荧光标记

的抗体, 4℃ 孵育 30 min, PBS 洗去未标记的抗体, 1% 多聚甲醛固定,应用 FACSscan 流式细胞仪分析样本中 1×10^4 个细胞的相应标记抗原的阳性表达率,每个样本用 FITC 标记,同型二抗作为相应的阴性对照。④免疫荧光检测细胞表面标志: CD13 (Gibco)、CD44 (Santa Cruz)、CD45 (Santa Cruz)、CD133 (Santa Cruz)、MHC-II (Santa Cruz)。

1.4 分化细胞培养及鉴定 配制分化培养基:在上述 MAPC 扩增培养基中减去 EGF、LIF 和 PDGF-BB,加入 10 μ g/L 碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF, Gibco), 10 μ g/L 胰岛素样生长因子-1 (insulin like growth factor-1, IGF-1, Sigma) 和 10 μ g/L 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF, Sigma)。观察分化细胞形态,并拍照。分化细胞表面标志鉴定:一抗为 α -SMA (Santa Cruz)、Calponin (Santa Cruz)、SM-MHC (Santa Cruz)。

1.5 RT-PCR 检测 检测 MAPC 的 OCT-4 基因和分化细胞的 SM-MHC 基因的表达。OCT-4 mRNA 引物 sense primer: 5'-GCG AAC AAG TAT TGA GAA CCG-3', anti-sense primer: 5'-GGG ACT GAG GAG TAG AGC GTA G-3', 退火温度: 56.5℃。SM-MHC mRNA 引物 sense primer: 5'-CTG CGG CAA GTA GGA-3', anti-sense primer: 5'-ATC TGC GTT GGT CGT-3', 退火温度为 49℃。选择 GAPDH 作为内参,其 mRNA 引物 sense primer: 5'-CAA GGC TGT GGG CAA GGT-3', anti-sense primer: 5'-CGA AGG TGG AAG AGT GGG T-3', 退火温度为 55.3℃。

2 结果

2.1 细胞原代培养 原代培养的细胞大部分在 24 h 以内贴壁,初时细胞较小,多角形。24 h 后首次换液,以后,每 3 d 换液。一般 10 d 内贴壁的非骨髓 MAPC 相继死亡,剩下的细胞体积变大,以生长良好的细胞为中心,呈克隆样生长,形态为长多角形,达 80%~90% 融合约需 10~14 d 时间 (图 1)。

2.2 细胞传代培养 本文在培养时,未用 FN 包被促进贴壁,而是将 FN 加入到培养基中,发现细胞仍可贴壁。0.25% 胰酶 37℃ 消化 2~3 min,效果较好。传代后的细胞,生长潜伏期不到 1 d,倍增时间大约为 2 d;以 $(1 \sim 2) \times 10^5$ cells/ml 重新接种于 25 cm² 培养瓶中, 6~7 d 达 60% 融合;经过 2~3 代后,约可获得 $(1 \sim 2) \times 10^6$ 个细胞,基本可达到移植和细胞诱导分化要求的数量 (图 2)。

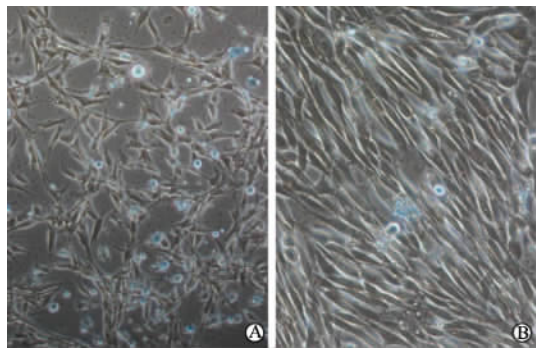


图 1 倒置显微镜下原代培养细胞形态

Fig 1 Morphology of primarily cultured MAPC(×100)

A:5 days;B:10 days

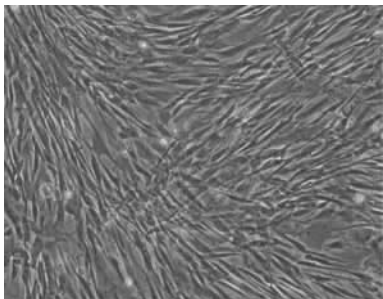


图 2 倒置显微镜下第 3 代细胞培养 5 d 时的形态

Fig 2 Morphology of passage 3 MAPC

after 5 days culture(×100)

2.3 MAPC 生长曲线 由生长曲线(图 3)可以看出,接种第 2 天细胞数量即已经开始增加,说明潜伏期不到 24 h,对数生长期为 4~6 d,至第 6 天数量达到 1.46×10^6 cells/ml,之后进入平台期。

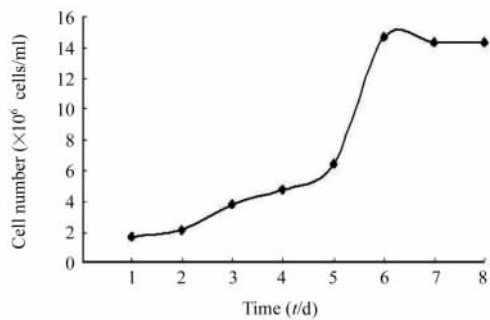


图 3 MAPC 生长曲线

Fig 3 Growth curve of MAPC

2.4 流式细胞仪检测阳性细胞百分比 由流式细胞术检测结果(图 4)看出,处于 S 期的细胞数量比较少,仅占 1.13%,CD13 和 SSEA-1 阳性细胞分别为 8.27%和 7.03%(图 5),说明得到的细胞大部分是 MAPC,同时混有部分 CD44⁺、CD45⁺、CD133⁺、MHC II⁺骨髓单个核细胞。

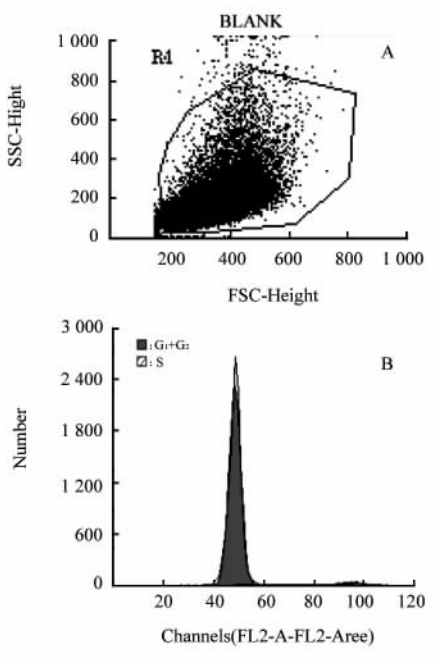


图 4 分析选取的细胞范围(A)及细胞周期(B)

Fig 4 The selected cell rgeion(A)and cell cycle(B)of MAPC

2.5 免疫荧光检测细胞表面标志 培养细胞免疫荧光染色结果显示:CD13⁺(图 6A)、SSEA-1⁺(图 6B)、CD44⁺、CD45⁺、CD133⁺、MHC II⁺。

2.6 诱导培养平滑肌样细胞形态、表面标志

2.6.1 诱导培养细胞形态观察 生长良好的 15 代细胞换分化培养基后,细胞形态变为长梭形,诱导培养 3 d 细胞呈集落样生长,围绕集落呈放射状;传代后为长多角形,5 d 即可长成单层(图 7)。

2.6.2 细胞表面标志检测 免疫荧光染色结果显示:分化细胞表达 α -SMA、Calponin 和 SM-MHC(图 8)。

2.6.3 RT-PCR 检测结果 结果显示:MAPC 表达多能性干细胞标志物 OCT-4,不表达 SM-MHC;而分化细胞表达 SM-MHC,失去 OCT-4 的表达(图 9)。

3 讨 论

本实验参照 Verfaillie 实验室^[6]的报道对骨髓 MAPC 的分离方法、培养条件和免疫指标鉴定进行了探索。首先,关于 MAPC 的分离方法,目前多采用流式细胞仪分选、淋巴分离液密度梯度离心、微小磁珠分离等方法^[7-8],但存在提纯后细胞量少、容易污染、影响细胞的生物学特性和活力及难以存活等缺点;加之所需设备昂贵、难以普及,未能用于大量干细胞的制备^[9]。为此我们采用了全骨髓直接接种、条件培养基诱导培养的方法,操作简便、得到的

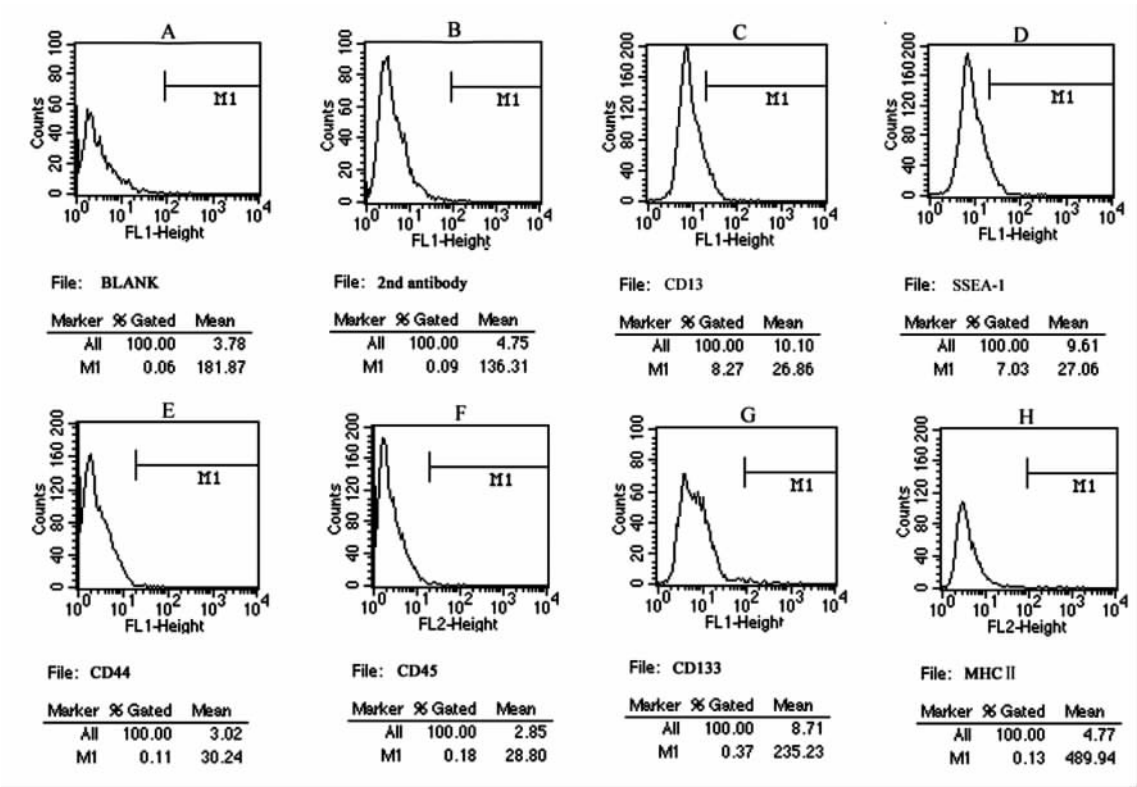


图 5 流式细胞技术分析结果

Fig 5 FACS analysis of MAPC

A:Blank;B:Negative control;C:CD13;D:SSEA-1;E:CD44;F: CD45;G:CD133;H:MHC II

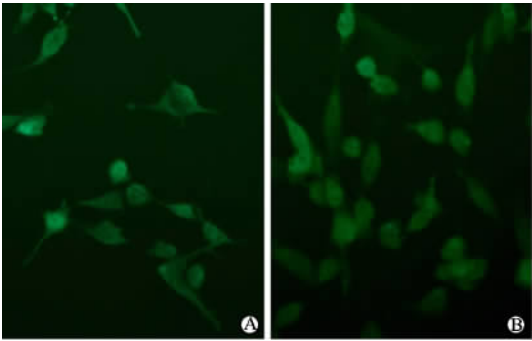


图 6 MAPC 免疫荧光检测结果

Fig 6 Immunofluorescence results of CD13 and SSEA-1 expression in MAPC (×200)

A:CD13;B:SSEA-1

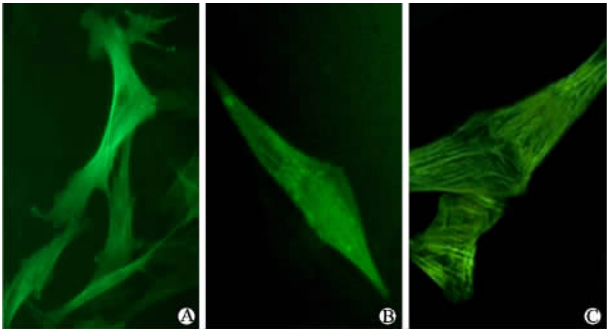


图 8 分化细胞表面标志鉴定结果

Fig 8 Expression of α -SMA,Calponin and SM-MHC in MAPC by immunohistochemistry(×400)

A; α -SMA;B:Calponin;C:SM-MHC

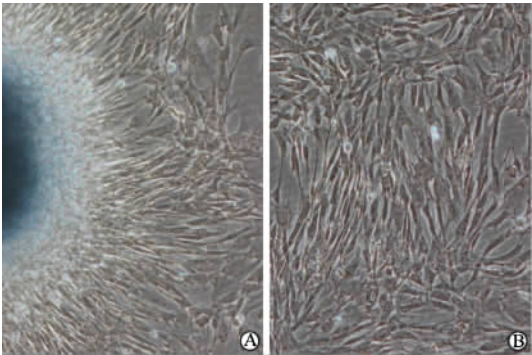


图 7 诱导培养细胞形态观察

Fig 7 Morphology of induced MAPC(×100)

A: Primary culture;B: Passage 4

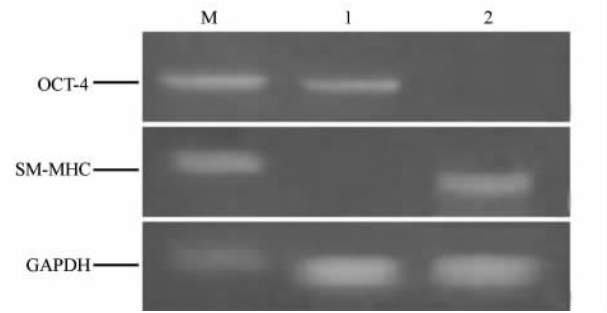


图 9 RT-PCR 扩增产物凝胶电泳分析

Fig 9 Analysis of RT-PCR product by agarose gel electrophoresis

M;Marker; 1;MAPC at passage 15; 2;Induced MAPC

细胞量大、细胞成活率高,传代后细胞形态渐趋同一。其次,我们对培养方法进行了改进,未用纤维连接蛋白包被培养瓶^[10],而是将其加入到培养基中,发现培养的成年杂交犬 MAPC 能够贴壁和生长,原代时呈小多角形,与文献^[2-6]报道不同;传代后为大多角形,与文献^[2-6]报道一致。细胞生长曲线显示培养的细胞潜伏期短,24 h 后已经开始增殖,倍增时间为 2 d,增殖力非常强,至第 6 天达到高峰,然后进入平台期,与先前报道相似^[11-12]。最初几代,细胞增殖能力仍然旺盛,平均 5 d 就可以传 1 代;但是,随传代次数的增加,细胞形态发生改变,体积变大,变长,有分化现象,增殖能力下降,我们共传了 20 代,与 Verfaillie 实验室报道可传代 100 次以上有差异^[6],原因可能是本文在原代培养后未能进行进一步筛选,一直培养的是混合性未纯化细胞,随培养时间的延长细胞易于发生分化,寿命缩短。所以在以后的实验中,应进一步优化培养条件,并尽量纯化细胞。免疫组化结果显示培养的细胞 CD13⁺、SSEA-1⁺、CD44⁻、CD45⁻、CD133⁻、MHC II⁻符合 MAPC 特点,由流式细胞检测结果看出,处于 S 期的细胞数量比较少,仅占 1.13%,CD13 和 SSEA-1 阳性细胞分别为 8.27%和 7.03%,符合干细胞特点,说明得到的细胞大部分是 MAPC。RT-PCR 结果显示第 15 代 MAPC 仍表达多能干细胞特异标志物 OCT-4,从侧面反映出多次传代后 MAPC 仍保持了干细胞的特性。

来自于血管壁的平滑肌细胞数量比较少,在体外培养过程中生长缓慢,且传代 5~8 代后迅速发生衰老。到目前为止,还没有一种理想的平滑肌细胞来源。本文对骨髓 MAPC 能否诱导分化为平滑肌样细胞进行了初步探讨。结果发现,换用诱导培养基后,细胞形态发生变化,变为长梭形,并呈集落样生长,分析原因可能为诱导培养基促进 MAPC 向平滑肌样细胞分化并优势生长,呈集落样;不能分化为平滑肌样细胞的其他细胞则受到抑制,逐渐死亡。免疫组化检测结果显示:分化细胞表达 α -SMA、Calponin 和 SM-MHC,RT-PCR 检测分化细胞表达 SM-MHC,提示骨髓 MAPC 有被诱导分化为平滑肌样细胞的可能性^[1],即具有分化为血管中层细胞的潜能。由此得出结论 MAPC 可以作为心血管组织工程的种子细胞^[13-14]。

[参 考 文 献]

[1] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284:143-147.

[2] Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, et al. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain[J]. Exp Hematol, 2002, 30:896-904.

[3] Jiang Y, Jahagirdar B N, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. Nature, 2002, 418:41-49.

[4] 慕 宁,高 毅,唐力军. 双阴性选择法纯化培养人骨髓多能成体祖细胞[J]. 第一军医大学学报, 2005,25:535-537.

[5] 陈黎红,程 桦,闵 军,等. 小鼠骨髓多能成体祖细胞的分离、培养及体外诱导分化为胰岛素分泌细胞的研究[J]. 中国病理生理杂志,2005,21:1797-1801.

[6] Tolar J, O'Shaughnessy M J, Panoskaltsis-Mortari A, et al. Host factors that impact the biodistribution and persistence of multipotent adult progenitor cells[J]. Blood, 2006, 107:4182-4188.

[7] Grove J E, Bruscia E, Krause D S. Plasticity of bone marrow-derived stem cells[J]. Stem Cells, 2004, 22:487-500.

[8] Jin Y, Fuller L, Ciano G, et al. Antigen presentation and immune regulatory capacity of immature and mature-enriched antigen presenting (dendritic) cells derived from human bone marrow[J]. Hum Immunol, 2004,65:93-103.

[9] Lakshminpathy U, Hammer L, Verfaillie C. Method-a nonviral gene transfer method for transfecting multipotent adult progenitor cells (MAPC)[J]. Gene Ther Regul, 2004,2:301-312.

[10] Reyes M, Li S, Foraker J, et al. Donor origin of multipotent adult progenitor cells in radiation chimeras[J]. Blood, 2005, 106:3646-3649.

[11] Muguruma Y, Reyes M, Nakamura Y, et al. *In vivo* and *in vitro* differentiation of myocytes from human bone marrow-derived multipotent progenitor cells[J]. Exp Hematol, 2003,31: 1323-1330.

[12] 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.

[13] Shimizu K, Sugiyama S, Aikawa M, et al. Host bone-marrow cells are a source of donor intimal smooth-muscle-like cells in murine aortic transplant arteriopathy[J]. Nat Med, 2001,7: 738-741.

[14] Prosper F, Stroncek D, Verfaillie C M. Phenotypic and functional characterization of long-term culture-initiating cells present in peripheral blood progenitor collections of normal donors treated with granulocyte colony-stimulating factor[J]. Blood, 1996, 88:2033-2042.

[收稿日期] 2007-01-02

[修回日期] 2007-04-16

[本文编辑] 尹 茶