

## 体外诱导犬骨髓间充质干细胞向上皮样细胞分化的初步研究

韩桂林, 丁芳宝\*, 梅 举, 黄盛东, 龚德军, 刘晓红, 刘艳玲

(第二军医大学长海医院胸心外科, 上海 200433)

**[摘要]** **目的:**探讨体外诱导犬骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)向上皮样细胞分化的可行性和基本条件。**方法:**抽取成年健康杂种犬的骨髓,用密度梯度离心及贴壁培养法分离纯化 BMSCs,培养扩增后,取第 2 代 BMSCs 在以下不同培养液中诱导培养:K-SFM+EGF+BPE、DMEM+EGF、K-SFM+BPE、DMEM+FBS,观察细胞形态的变化,绘制细胞的生长曲线,诱导培养后第 7、14 天,用免疫细胞化学染色和流式细胞仪鉴定上皮细胞特异性标志物细胞角蛋白(cytokeratin, CK)和上皮膜抗原(epithelial membrane antigen, EMA)的表达。**结果:**K-SFM+EGF+BPE 组诱导培养第 7 天,少量细胞形态变为圆形或椭圆形,有突起,第 14 天圆形或椭圆形细胞明显增多;诱导培养过程中 DMEM+EGF、K-SFM+BPE、DMEM+FBS 组细胞形态无明显变化。CK 免疫细胞化学染色结果提示:K-SFM+EGF+BPE 组诱导培养第 7 天,少量细胞呈阳性表达,第 14 天,阳性细胞明显增多;DMEM+EGF、K-SFM+BPE、DMEM+FBS 组细胞均呈阴性表达。流式细胞仪检测发现 K-SFM+EGF+BPE 组诱导培养第 14 天,部分细胞 CK 和 EMA 呈阳性表达(>7%),DMEM+EGF、K-SFM+BPE、DMEM+FBS 组细胞均为阴性。**结论:**本实验提示 K-SFM+EGF+BPE 联合培养液能够在体外诱导犬 BMSCs 向上皮样细胞分化。

**[关键词]** 骨髓;间质干细胞;上皮样细胞;细胞分化**[中图分类号]** R 318.14**[文献标识码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2006)08-0858-05**Differentiation of canine bone marrow mesenchymal stem cells into epithelium-like cells: an *in vitro* study**

HAN Gui-lin, DING Fang-bao\*, MEI Jü, HUANG Sheng-dong, GONG De-jun, LIU Xiao-hong, LIU Yan-ling (Department of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the feasibility of inducing canine bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) to differentiate into epithelium-like cells *in vitro* and the basic inducing conditions. **Methods:** BMSCs were obtained from healthy adult canine bone marrow aspirates and were purified by density gradient centrifugation and anchoring culture. BMSCs of second passage were cultured with 4 different media: K-SFM+EGF+BPE, DMEM+EGF, K-SFM+BPE, and DMEM+FBS. The changes in cell morphology were observed daily under phase-contrast microscopy and cell growth curves of every group were drawn by the continual cell counting. The cells were identified by immunocytochemistry staining and flow cytometer through detecting cytokeratin (CK) and epithelial membrane antigen (EMA) on the 7<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> day of induction. **Results:** A few BMSCs in K-SFM+EGF+BPE group became round or oval with processes on the 7<sup>th</sup> day of induction; more BMSCs became round or oval and their phenotypic markers were CK<sup>+</sup> and EMA<sup>+</sup> on the 14<sup>th</sup> day. FACS analysis showed that CK or EMA positive cells were rare in K-SFM+EGF+BPE group on the 7<sup>th</sup> day after induction (<1%), and the number of positive cells were increased (>7%) on the 14<sup>th</sup> day. Cell morphology had no obvious change in DMEM+EGF, K-SFM+BPE, and DMEM+FBS groups during the whole culture process. Moreover, cells in DMEM+EGF, K-SFM+BPE, and DMEM+FBS group were negative for CK and EMA. **Conclusion:** Our experiment indicates that the combination of K-SFM, EGF and BPE can induce canine BMSCs to differentiate into epithelium-like cells *in vitro*.

**[KEY WORDS]** bone marrow; mesenchymal stem cells; epithelium-like cells; cell differentiation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(8): 858-862]

近年来,食管组织工程的研究取得长足进展,其中种子细胞的筛选是其重要的研究方向。种子细胞主要来源于自体、同种异体以及异种组织细胞,自体食管上皮细胞为首选,但存在数量上的局限性及长期传代培养后细胞功能老化等问题,因此,其在食管组织工程中的应用受到限制。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)具有自我更新、多系分化及体内组织的功能重建等优

秀的生物学特性,且取材方便,易于体外扩增,不存在组织配型和免疫排斥反应等问题,是较为理想的组织工程食管种子细胞。研究表明 BMSCs 能分化为中胚层的骨、软骨、腱、脂肪、骨骼肌、平滑肌、心

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30271293)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30271293)。**[作者简介]** 韩桂林,硕士生。E-mail: guilinhan@gmail.com

\* Corresponding author. E-mail: yizi999@hotmail.com

肌、造血支持基质、血管内皮细胞以及外胚层的星形胶质细胞、神经元、表皮细胞和内胚层的肺泡上皮细胞、胃肠道的上皮细胞、肝卵圆形细胞等<sup>[1~3]</sup>。本实验旨在探讨体外诱导犬 BMSCs 向上皮样细胞分化的可行性及其诱导条件,为其在食管组织工程中的应用提供初步的理论依据。

## 1 材料和方法

1.1 实验动物和试剂 成年健康杂种犬,雌雄不限,体质量 15~20 kg,由第二军医大学实验动物中心提供。Ficoll-Paque 淋巴细胞分离液(上海生化试剂厂),磷酸盐缓冲液(PBS),0.1 mol/L Tris 缓冲液(TBS),0.05%胰蛋白酶/0.02%EDTA(Sigma),青霉素钠(上海先锋药业),硫酸链霉素(上海四药),FBS、低糖 DMEM、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、牛垂体提取物(bovine pituitary extract, BPE)、无血清分化细胞培养基(K-SFM)(Gibco),鼠抗人细胞角蛋白单克隆抗体(Boster),鼠抗人上皮膜抗原单克隆抗体、鼠抗人 CD44、CD71 抗体、DAB 显色试剂盒(福州迈新公司),异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗鼠 IgG(上海鼎国)。

1.2 培养液配制 基础培养液:含 10%FBS、100 U/ml 青霉素和 100 mg/L 链霉素的低糖 DMEM。诱导培养液:由 EGF、BPE 和 K-SFM 按比例配制成的培养液,EGF 浓度为 20 ng/ml, BPE 浓度为 75  $\mu$ g/ml,加入青霉素(100 U/ml)和链霉素(100 mg/L)。

1.3 犬 BMSCs 的分离纯化及培养扩增<sup>[4]</sup> 无菌条件下,髂后上棘骨穿法采集成年健康杂种犬骨髓液约 10 ml(肝素 200 U/ml 抗凝)。采用密度梯度离心法分离提纯骨髓有核细胞:室温下 2 000 r/min 离心骨髓液 5 min,弃上清及脂肪组织, PBS 洗涤沉淀物 2 次,用无血清 DMEM 制成细胞悬液,贴壁缓慢加入预先装有等体积 1.077 g/ml 的 Ficoll-Paque 淋巴细胞分离液的离心管中,1 200 r/min 离心 30 min。小心吸取界面云雾状有核细胞层细胞,用无血清 DMEM 洗涤 2 次,收集细胞,重悬于基础培养液中,血细胞计数板计数,以  $1 \times 10^6$  /cm<sup>2</sup> 接种于 25 cm<sup>2</sup> 塑料培养瓶中,37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下静置培养,48 h 后首次换液,弃去未贴壁细胞,此后每隔 3~4 d 换液,进一步除去未贴壁细胞。倒置相差显微镜(Olympus IX-70)下观察细胞形态变化及增殖情况,待细胞融合至 90%时,用 0.05%胰蛋白酶/0.02%EDTA 室温消化,按 1:3 比例传代培养,留取第 2 代备用。

1.4 犬 BMSCs 的体外诱导培养 取第 2 代犬

BMSCs,按  $5 \times 10^4$  /ml 的密度接种于 24 孔培养板中,分为 4 组,每组各 6 孔,24 h 后吸去基础培养液,分别在以下 4 组培养液中培养:K-SFM+EGF+BPE、DMEM+EGF、K-SFM+BPE、DMEM+FBS,每 3 d 换液 1 次。

1.5 犬 BMSCs 的生长增殖特点及细胞表型鉴定

1.5.1 形态学观察 细胞培养过种中每日在倒置相差显微镜下观察细胞形态变化。

1.5.2 生长曲线 取第 2 代犬 BMSCs,按  $1 \times 10^4$  /孔的密度接种于 96 孔培养板中,分为 4 组,每组 24 孔,分别加入上述 4 种不同的培养液,之后每日取 3 孔细胞,胰酶消化后进行细胞计数,剩余细胞每 3 d 换液 1 次,根据细胞计数结果求平均值以绘制细胞生长曲线。

1.5.3 细胞表型鉴定 取第 2 代犬 BMSCs,采用 EnVision 二步法染色进行免疫细胞化学染色,严格按照 Maxim 生物技术有限公司提供的免疫细胞化学染色试剂盒说明书操作,一抗为鼠抗人 CD44、CD71 抗体,工作浓度 1:50,二抗为羊抗鼠二抗,工作浓度 1:50,二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染,盐酸分化。

1.6 诱导培养后细胞成分的鉴定

1.6.1 免疫细胞化学染色 取诱导培养后第 7、14 天的各组细胞,方法同 1.5.3,一抗为鼠抗细胞角蛋白(cytokeratin, CK)单克隆抗体,工作浓度 1:50,二抗为羊抗鼠二抗,工作浓度 1:50。

1.6.2 流式细胞仪检测 取诱导培养后第 7、14 天的各组细胞,0.05%胰蛋白酶/0.02%EDTA 室温消化, PBS 洗涤 3 次,重悬细胞至 100  $\mu$ l,各组分别加入上皮细胞特异性标志物 CK(工作浓度 1:10)和上皮膜抗原(epithelial membrane antigen, EMA,工作浓度 1:50),4℃ 孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次,加入异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗鼠 IgG(工作浓度 1:10),4℃ 避光孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次后,重悬细胞至 400  $\mu$ l,密度为  $1 \times 10^6$  /ml,流式细胞仪(Becton Dickinson)检测。空白对照:不加一抗和对应 FITC 标记的二抗。

## 2 结果

2.1 倒置相差显微镜观察

2.1.1 原代培养犬 BMSCs 的形态特征 骨髓有核细胞悬液接种后 24 h 出现贴壁细胞,形态均一,呈短棒状,48 h 后首次换液,除去悬浮细胞,大部分细胞已贴壁,呈相对静止状态;72 h 贴壁细胞明显增殖,呈集落样生长,可见大小不等的细胞集落,每个

集落由几个到几十个细胞组成,细胞呈梭形,少量呈宽大扁平的星形或多角形,核居中,核仁多而明显,

8~10 d时,细胞密集在集落中心,周围细胞呈漩涡状或放射状排列(图 1A)。

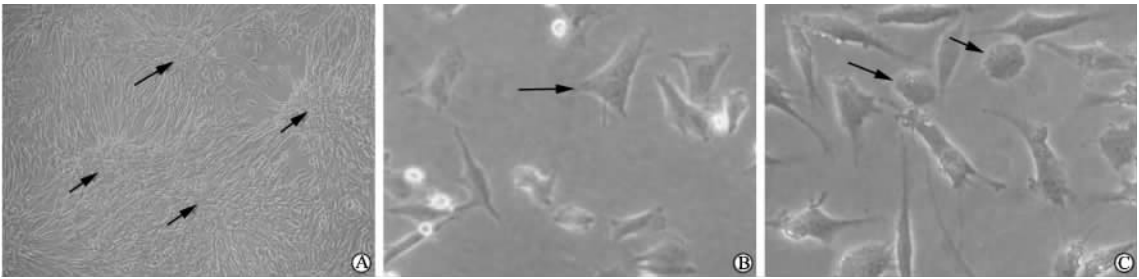


图 1 犬 BMSCs 的形态特征

Fig 1 Morphology of canine BMSCs

A: 10<sup>th</sup> day after primary plating(×100), arrow indicating the center of colony ; B: 3<sup>th</sup> day after passage plating(×400), arrow indicating the dividing cells; C: 7<sup>th</sup> day after induction(×400). Arrows indicating the differentiated cells with round or oval shape

2.1.2 传代培养犬 BMSCs 的形态特征 传代培养细胞接种后 2 h 开始贴壁,并很快铺展变大,呈不规则的多角形,有短而薄的胞质突起,细胞核呈圆形或椭圆形,有多个核仁,胞质中有黑色颗粒,增殖旺盛,可发现双核分裂象细胞(图 1B),生长速度较原代明显增快,5~7 d 即可铺满培养瓶底部。

心法获得的骨髓单个核细胞经贴壁筛选、传代培养后的免疫细胞化学染色大部分细胞 CD44、CD71 为阳性(图 3),提示所获取的细胞成分大部分为 BM-SCs。

2.1.3 诱导培养犬 BMSCs 的形态特征 诱导培养过程中 DMEM + EGF、K-SFM + BPE、DMEM + FBS 组细胞形态无明显变化,呈梭形或多角形。K-SFM+EGF+BPE 组细胞诱导初期呈长条索状,形态大小均一,无突起,诱导第 7 天少量细胞变为圆形或椭圆形,周围有短的绒毛样突起,胞质丰富(图 1C);第 14 天圆形、椭圆形细胞明显增多。

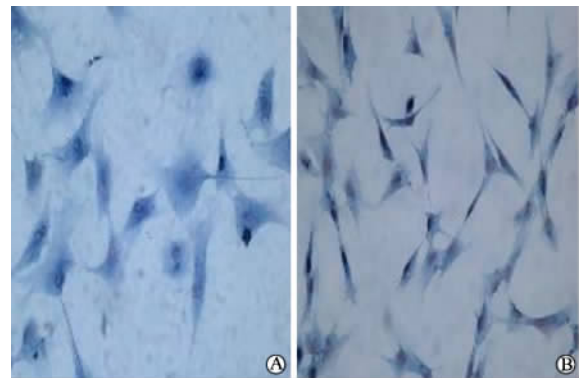


图 3 第 2 代犬 BMSCs CD44(A)和 CD71(B)免疫细胞化学染色

Fig 3 CD44(A, ×400) and CD71(B, ×200)

immunocytochemistry staining of passage 2 canine BMSCs

2.2 细胞生长曲线 诱导培养各组细胞接种初期生长速度相对缓慢,此后呈指数形式快速增殖,10 d 左右达到 80%~90% 融合,呈典型的“S”形,DMEM+FBS 组扩增速度最快,K-SFM+EGF+BPE 组次之,10 d 时可收获约 1×10<sup>6</sup> 个细胞。根据不同培养时间细胞数量绘制犬 BMSCs 生长曲线(图 2)。

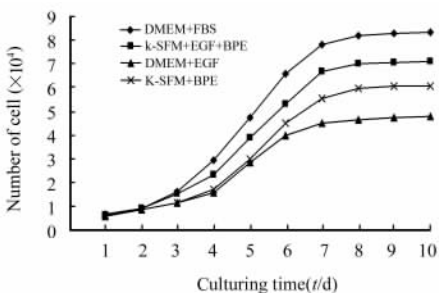


图 2 犬 BMSCs 在不同培养基中的生长曲线  
Fig 2 Growth curve of canine BMSCs treated with different media

诱导培养第 7 天,K-SFM+EGF+BPE 组少量细胞 CK 免疫细胞化学染色阳性(图 4A),其他 3 组细胞均为阴性。诱导培养第 14 天,K-SFM+EGF+BPE 组 CK 阳性表达细胞明显增多,阳性细胞呈椭圆形或圆形,部分细胞有突起,胞质呈棕色着色(图 4B)。其余 3 组细胞胞质未着色。

2.3 免疫细胞化学染色结果 Ficoll 密度梯度离

2.4 流式细胞仪检测结果 诱导培养第 7 天,各组细胞 CK 和 EMA 流式细胞仪检测阴性(<1%)。第 14 天 K-SFM+EGF+BPE 组流式细胞仪检测为阳性,EMA 阳性表达为 7.86%,CK 阳性表达为 7.63%,其余 3 组 CK 和 EMA 流式细胞仪检测均为阴性。

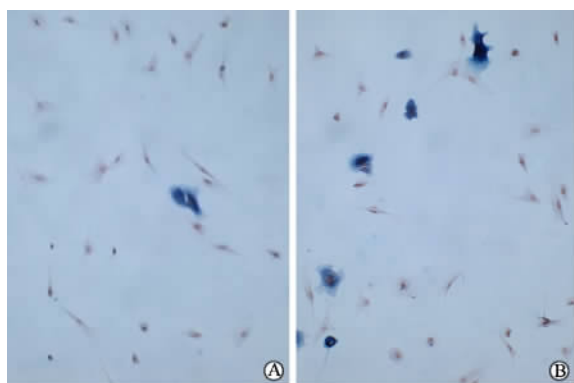


图4 犬 BMSCs 诱导培养第7天(A)和第14天(B)CK免疫细胞化学染色

Fig 4 CK immunocytochemistry staining of canine BMSCs on the 7<sup>th</sup> day(A) and 14<sup>th</sup> day(B) after induction( $\times 200$ )

### 3 讨论

研究表明 BMSCs 具有自我更新能力、多系分化潜能、体内组织的功能重建等优秀的生物学特性,是一种比较理想的组织工程种子细胞。目前, BMSCs 分化潜能的机制尚不清楚。Tremain 等<sup>[5]</sup>对 BMSCs 的基因表达进行分析,发现它不仅含有编码间质组织成分的基因,还含有编码内皮及上皮组织的基因,为其多分化潜能提供了理论依据。细胞分化是基因有序表达与关闭的结果,但这一过程并非自发产生,而是受细胞与细胞、细胞与环境,即微环境“壁龛”(niche)<sup>[6]</sup>相互作用的影响,这个动态的可逆过程能够程序性重调<sup>[7]</sup>。

实验表明与呼吸道上皮细胞间接接触共培养 BMSCs 可以分化为呼吸道上皮细胞<sup>[8]</sup>。食管上皮细胞和呼吸道上皮细胞均来源于内胚层,与 BMSCs 属于不同的胚层来源, BMSCs 成功分化为呼吸道上皮细胞提示其可以向上皮样细胞分化,具有跨胚层分化的潜能。多种细胞因子、激素和化学药物都对 BMSCs 有诱导分化作用,可能是诱导 BMSCs 获得靶组织的表型、向不同细胞谱系分化的主要原因之一。本实验尝试利用角化细胞的基础培养基 K-SFM 和 EGF、BPE 联合诱导犬 BMSCs 向上皮样细胞分化,结果提示:单纯应用 K-SFM 或 EGF、BPE 不能在体外诱导犬 BMSCs 向上皮样细胞分化,而联合应用则能使其表达上皮细胞特异性标志物 CK,但可能与诱导的时间和 EGF 的浓度有关。EGF 是一种广泛存在于各种组织体液中的低分子多肽,能促进多种细胞的增殖,包括上皮细胞、间质细胞以及神经干细胞等。EGF 与靶细胞表面的 EGF 受体结合

后,能刺激受体自身磷酸化及细胞内其他蛋白质的酪氨酸磷酸化,进而激活蛋白激酶 C 和磷脂酶 C,通过第二信使 cAMP、Ca<sup>2+</sup> 激活 cAMP 依赖的蛋白酶,使细胞核内组蛋白对 DNA 的阻遏作用解除,使促有丝分裂信号向胞内传递,从而引起 DNA 合成、细胞的增殖<sup>[9]</sup>。研究表明,在一定浓度范围内,EGF 对 BMSCs 具有促增殖作用,当浓度过高时,可能激发了不同的信号转导途径,促进细胞的分化而抑制细胞的增殖。本实验中,含 EGF、BPE 的 K-SFM 明显促进细胞的分化,而促增殖作用却不明显。BMSCs 的诱导分化是一个复杂的过程,是多种因素参与的综合结果,单一因素不能成功诱导其分化。含 BPE 的 K-SFM 是培养角化细胞的基础培养基,含有上皮细胞生长增殖所必需的多种因子,如可以促进上皮细胞增殖的转化生长因子  $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )、胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor, IGF) 等,在与 EGF 共同作用下可能诱导 BMSCs 向上皮组织分化。

BMSCs 取自自体骨髓,采集方便,接受治疗的患者痛苦小,并且由于来源于自体,由它诱导的食管上皮细胞在进行移植时不存在组织配型、免疫排斥和医学伦理等问题<sup>[10]</sup>,因此,其应用前景十分广阔。本实验进一步验证 BMSCs 具有多向分化的潜能,探索了 BMSCs 向上皮细胞分化的基本诱导条件,结果提示犬 BMSCs 体外定向诱导分化为上皮样细胞的方法是可行的,但 BMSCs 在分化为上皮样细胞后能否长久保持上皮样细胞的表型,体外培养一段时间后是否会重新恢复到 BMSCs 的表型,以及 BMSCs 分化为上皮样细胞的过程中,发生了哪些基因的变化,机制有哪些,涉及哪些信号通路的参与,有待进一步研究。相信随着研究的深入,利用 BMSCs 诱导分化来的上皮样细胞作为构建组织工程食管的种子细胞将是一种合理的选择。

### [参考文献]

- [1] Kawada H, Fujita J, Kinjo K, et al. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction[J]. *Blood*, 2004, 104: 3581-3587.
- [2] Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, et al. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow[J]. *J Clin Invest*, 2002, 109:337-346.
- [3] Herzog EL, Chai L, Krause DS, et al. Plasticity of marrow-derived stem cells[J]. *Blood*, 2003, 102:3483-3493.
- [4] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 北京:世界图书出版公司, 1996:79-82.
- [5] Tremain N, Korkko J, Ibberson D, et al. MicroSAGE analysis of 2,353 expressed genes in a single cell-derived colony of un-

- differentiated human mesenchymal stem cells reveals mRNAs of multiple cell lineages[J]. *Stem Cells*, 2001, 19:408-418.
- [6] Jiang XX, Zhang Y, Liu B, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte derived dendritic cells[J]. *Blood*, 2005, 105:4120-4126.
- [7] Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D, et al. Nuclear reprogramming and adult stem cell potential [J]. *Histol Histopathol*, 2005, 20:977-986.
- [8] Le Visage C, Dunham B, Flint P, et al. Coculture of mesenchymal stem cells and respiratory epithelial cells to engineer a human composite respiratory mucosa[J]. *Tissue Eng*, 2004, 10 (9-10):1426-1435.
- [9] Harris RC. Potential physiology roles for epidermal growth factor in kidney[J]. *Ann J Kidney Dis*, 1991, 17:627-630.
- [10] Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells[J]. *Lancet*, 2004, 363: 1439-1441.
- [收稿日期] 2006-01-19 [修回日期] 2006-06-12  
[本文编辑] 曹 静