

mdx小鼠与C57小鼠骨髓基质细胞体外分化能力的比较***

冷雁, 张为西, 周琛, 郑振扬, 张成

Bone marrow stromal cells differentiation potentials *in vitro* from mdx mice versus C57 mice

Leng Yan, Zhang Wei-xi, Zhou Chen, Zheng Zhen-yang, Zhang Cheng

Abstract

BACKGROUND: Duchenne's muscular dystrophy (DMD) is a fatal recessive X-linked form of muscular dystrophy characterized by progressive muscular degeneration with no certain treatment. However, the proliferation and multipotent differentiation potential of bone marrow stromal cells (BMSCs) from DMD model mice (mdx mice) and the effectiveness of BMSCs self-transplantation are needed to be further studied.

OBJECTIVE: To investigate the proliferation and multipotent differentiation potential of BMSCs from mdx mice during *in vitro* culture.

METHODS: Both C57 and mdx mice were killed to obtain the BMSCs for culturing *in vitro*. After Giemsa's staining, the colony forming unit-fibroblast (CFU-f) of BMSCs assay was performed. With specific inductive mediums, we succeeded to induce the BMSCs to differentiate into osteogenesis, adipogenesis, myogenesis respectively. Their morphological characteristics were observed with microscope. Von kossa staining, oil red O staining and immunofluorescence for desmin were utilized to identify the differentiated BMSCs respectively and quantify their differentiation efficiency. After the BMSCs were induced for 1 week, the cellular total RNA of differentiated BMSCs was extracted, and then reverse transcription was performed. Real-time polymerase chain reaction (PCR) was used to quantify the gene expression of differentiated BMSCs.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with C57 mice, both number and volume of CFU-f of BMSCs from mdx mice were smaller. Compared to C57 mice, the efficiency of osteogenesis and myogenesis of BMSCs from mdx mice was significantly lower ($P < 0.01$). However, the efficiency of adipogenesis of BMSCs from both groups had no statistic difference ($P > 0.05$). Real-time PCR showed that both of osteogenic and myogenic gene expression of BMSCs from mdx mice decreased respectively compared to C57 mice. However, adipogenic gene expression from two groups had no difference. The results indicated that proliferation and multipotent differentiation potentials of BMSCs from mdx mice declined compared with C57 mice. The defection of Dystrophin gene may contribute to it. Therefore, the autoplasmic BMSCs transplantation of mdx mice will be interfered.

Leng Y, Zhang WX, Zhou C, Zheng ZY, Zhang C. Bone marrow stromal cells differentiation potentials *in vitro* from mdx mice versus C57 mice. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(36): 6651-6656.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 肌营养不良症是一种渐进性致死性 X 连锁隐性遗传性肌肉疾病, 目前无特效治疗。肌营养不良症模型鼠(mdx 小鼠)的骨髓基质细胞增殖及定向分化能力是否正常, 自身骨髓移植是否合适还有待研究。

目的: 观察 mdx 小鼠骨髓基质细胞体外培养时的增殖及多向分化能力。

方法: 取 mdx 小鼠与 C57 小鼠胫股骨骨髓基质细胞体外培养, 经吉姆萨染色后观察其形成成纤维细胞集落形成单位的能力; 通过不同诱导液使骨髓基质细胞定向分化为成骨、成脂、成肌细胞, 观察其形态学特性; 并分别用 Von kossa 染色、油红 O 染色、免疫荧光检测 desmin 阳性细胞对已分化细胞进行鉴定和分化率比较; 培养 1 周时, 提取分化细胞总 RNA, 反转录后, 用 real-time PCR 检测各分化细胞相关基因表达。

结果与结论: mdx 小鼠骨髓基质细胞形成的成纤维细胞集落形成单位数目和体积均小于 C57 小鼠。其成骨、成肌分化的效率均明显低于 C57 小鼠($P < 0.01$), 两种小鼠的骨髓基质细胞成脂分化效率差异无显著性($P > 0.05$)。real-time PCR 检测结果显示, 与 C57 小鼠相比, mdx 小鼠的骨髓基质细胞成骨、成肌基因表达均有不同程度下降, 而成脂基因表达无明显差异。结果提示, mdx 小鼠的骨髓基质细胞体外培养时的增殖及定向分化能力较 C57 小鼠下降, 与 Dystrophin 基因缺失有关, mdx 小鼠自体骨髓移植将会受限。

关键词: 小鼠; 骨髓基质细胞; 诱导; 分化; 肌营养不良症

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.36.001

冷雁, 张为西, 周琛, 郑振扬, 张成.mdx 小鼠与 C57 小鼠骨髓基质细胞体外分化能力的比较[J].中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(36):6651-6656. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

肌营养不良症 (Duchenne's muscular dystrophy, DMD) 是一种渐进的致死性 X 连锁隐性遗传性肌肉疾病。发病率为活产男婴的 1/3 500, 儿童时期发病, 最终多在青少年或 20 多岁时死于心肺衰竭, 目前无特效治疗, 干细

胞移植是很有前景的治疗方法^[1-3]。该种疾病常累及四肢骨骼肌、膈肌和心肌, 肌细胞变性坏死, 逐渐出现钙沉积或被结缔组织和脂肪组织所取代^[4]。致病基因为 dystrophin 基因, 其编码产物为肌细胞膜结构蛋白 dystrophin, 发病机制主要为 dystrophin 基因部分区域的缺失、重复或点突变, 引起膜结构蛋白 dystrophin 蛋白的缺乏或结构异常^[5]。DMD 模型鼠 (X-linked

Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Leng Yan★, Studying for master's degree, Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China
Lengyan19840117@sina.com

Correspondence to: Zhang Wei-xi, Doctor, Professor, Master's supervisor, Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China
weixizhang@qq.com.

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30971026*, 30870852*

Received:2010-06-23
Accepted:2010-07-27

中山大学附属第一医院神经内科, 广东省广州市 510080

冷雁★, 女, 1984 年生, 湖南省永州市人, 汉族, 中山大学附属第一医院在读硕士, 主要从事骨髓干细胞与神经肌肉疾病的研究。
Lengyan198401
17@sina.com

通讯作者: 张为西, 博士, 教授, 硕士生导师, 中山大学附属第一医院神经内科, 广东省广州市 510080
weixizhang@qq.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225
(2010)36-06651-06

收稿日期: 2010-06-23
修回日期: 2010-07-27
(20100623009/W·Q)

muscular dystrophy, mdx 小鼠)是由于 X 连锁隐性自然突变引起肌肉组织的急性坏死与再生, 存在肌肉的坏死和再生; 其分子基础是其 Dystrophin 基因 23 号外显子单个碱基替代引起点突变, 导致 dystrophin 蛋白表达缺失, 与 DMD 患者基因座位具有同源性^[6]。

骨髓基质细胞是由骨髓组织干细胞或前体细胞组成的成分及功能复杂的细胞群体, 具有高度增殖和多向分化潜能^[7]; 已有研究证明在体外不同诱导条件下骨髓基质细胞可分化为成骨细胞、脂肪细胞、肌肉细胞、软骨细胞及神经细胞等^[8-9]。C57 小鼠骨髓基质细胞的体外培养、扩增、分化及增殖能力的鉴定已有较多研究^[10-11], 实验通过与 C57 小鼠比较, 旨在探讨 mdx 小鼠骨髓基质细胞体外培养时的增殖及多向分化能力, 为 DMD 患者能否进行自身骨髓移植提供实验性依据。

1 材料和方法

设计: 以骨髓基质细胞为对象的对照观察。

时间及地点: 于 2009-06/2010-06 在中山大学附属第一医院神经科实验室完成。

材料: 取 3~12 月雄性 C57BL/6J 小鼠及 mdx 小鼠各 18 只, 体质量为 18~26 g。C57 小鼠购于中山大学中山医学院实验动物中心; 原代纯合子 mdx 配种鼠 (C57BL/10ScSn-DMDmdx), 购于美国 Maine 州 Jackson 实验室, 实验所用 mdx 鼠为原代配种所生的纯合子 mdx 鼠, 种鼠和实验用鼠均饲养于中山大学中山医学院实验动物中心 II 级动物室, 室温, 12 h 日光, 12 h 夜间循环, 标准啮齿类动物饮食。实验过程中对动物处置符合 2006 年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》^[12]。

试剂:

试剂	来源
DMEM 培养基, 胎牛血清, 马血清	美国 Hyclone 公司
RNAiso Plus(total RNA 提取试剂), real time-PCR 试剂盒	日本, TaKaRa 公司
抗坏血酸, 地塞米松, β -甘油磷酸钠, 5-氮胞苷, 胰岛素, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), DEPC	美国 Sigma 公司
兔抗鼠多克隆抗体 desmin	美国 Thermo 公司
山羊抗兔-FITC IgG 二抗	Santa-Cruz 公司
引物	由 TaKaRa 公司合成

实验方法:

小鼠骨髓基质细胞的体外分离及培养: mdx 小鼠与 C57 小鼠颈椎脱臼处死后, 用体积分数为 75% 的乙醇浸泡 2 min, 无菌取股骨, 去除结缔组织及肌肉组织, PBS 冲洗 3 遍, 用剪刀剪断骨的两端, 用 5 mL 注射器从一端骨髓开口处, 推入无血清 DMEM 培养基, 冲出骨髓, 置于另一无菌培养皿中, 用注射器来回吸吹, 制成单细胞悬液, 1 200 g 离心 3 min 后倒掉上面液体, 用含体积分数 10% 胎牛血清以及 100 U/mL 双抗(青霉素+链霉素)的低糖 DMEM 培养基重悬细胞, 细胞计数时用 2% 醋酸破坏红细胞, 调整细胞浓度至 $1 \times 10^{12} \text{ L}^{-1}$, 然后以不同细胞浓度接种于六孔板(普通培养浓度为 $2 \times 10^6 / \text{cm}^2$, 成骨诱导浓度为 $1 \times 10^7 / \text{cm}^2$, 成脂诱导浓度为 $4 \times 10^7 / \text{cm}^2$, 成肌诱导浓度为 $5 \times 10^6 / \text{cm}^2$), 放在体积分数 5% CO₂、37 °C 饱和湿度的 CO₂ 培养箱内静置培养, 24 h 后, 用 PBS 轻轻冲去悬浮细胞, 分别加普通培养液和诱导培养液^[13]。

小鼠骨髓基质细胞的成纤维细胞群落生成单位 (CFU-f): 第 1 次换液后, 在含体积分数 10% 胎牛血清、100 U/mL 双抗的低糖 DMEM 普通培养基中培养, 每 3 d 换液 1 次, 用枪头吸取培养基上层液体, PBS 轻轻冲洗 1 次, 再加入新鲜培养液, 分别于 7, 14, 21 d 时用吉姆萨染色后, 显微镜下观察 CFU-f 的大小, 并直接计数。

小鼠骨髓基质细胞的体外诱导分化:

成骨诱导: 24 h 后的第 1 次换液加成骨诱导培养液(含 50 mg/L 抗坏血酸、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松、0.5 mmol/L β -甘油磷酸钠、体积分数为 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养液), 隔天换液。2 周后行茜素红(ARS)染色: 用无磷酸钙的 PBS 冲洗细胞 3 次后, 40 g/L 多聚甲醛室温固定 30 min, PBS 冲洗 3 次后, 用 ARS 溶液染色 15 min, PBS 冲洗 3 次后, 镜下观察钙结节染成橘红色。3 周后, 行 vonkossa 染色: 用无钙镁离子的 PBS 冲洗细胞后, 40 g/L 多聚甲醛室温固定 30 min 后, 用 50 g/L 硝酸银溶液在暗室中染色 30 min, 清水轻轻冲洗后, 在紫外光下照射 30 min, 记录其颜色改变, 对于细胞钙沉积, Vonkossa 染色成黑褐色, 无钙沉积则不显色。

成脂诱导: 脂肪细胞诱导培养液用低糖 DMEM 加体积分数为 10% 胎牛血清, 1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松, 200 $\mu\text{mol/L}$ 吡啶美辛, 10 mg/L 胰岛素, 0.5 mmol/L IBMX; 诱导 3 d 后, 改用维持培养液(高糖 DMEM, 体积分数为 10% 胎

牛血清加 10 mg/L 胰岛素), 每 3 d 换液 1 次。显微镜下观察出现典型的脂肪细胞时, 行油红 O 染色: 用 PBS 冲洗后, 40 g/L 多聚甲醛室温固定 30 min 后, PBS 冲洗 3 次, 用新鲜配制的 5 g/L Oil Red O 工作液(异丙醇和双蒸水的比例为 6:4)室温中染色 1 h, 双蒸水冲洗两三次后, 脂肪细胞呈红色, 其他细胞则不着色, 显微镜下观察并拍照记录。

成肌诱导: 诱导成肌细胞时, 用含 10 μ mol/L 5-氮胞苷、5%马血清、体积分数 10%胎牛血清的低糖 DMEM 培养液中诱导培养 24 h 后, 用含体积分数 2%马血清的低糖 DMEM 培养基继续培养, 隔天换液。3 周后, 显微镜下观察出现典型多核细胞或肌管样细胞后, 免疫荧光检测 desmin: 细胞固定, 山羊血清封闭后, 滴加兔抗鼠多克隆抗体 desmin(1:300 稀释)湿盒孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次, 5 min/次, 滴加山羊抗兔-FITC IgG 二抗(1:100 稀释)湿盒孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次, 5 min/次, 荧光显微镜下观察并记录。

Real-time PCR 检测诱导分化后骨髓基质细胞相关基因表达:

real-time PCR 引物:

基因	基因库	正链引物(5'to 3')	反链引物(5'	产物 (bp)
β -actin	NM_007393	CTG GCA CCA GGT ACG ACC	190 CAC CTT C TAC AGA GGC ATA CA A	
ALP	BC065175	AAC CCA GAC CCA GCA AGA	213 ACA AGC ATT AGA AGC CTT CC TG	
Runx2	NM_009820	CCA CCA CTC TCA GCG TCA	250 ACT ACC ACA ACA CCA TCA TT CG	
Colla1	U03419	CAC CCT CAA CGG GCT GAT	250 GAG CCT GAG GTA CCA GTT CT TC	
OC	U11542	TTC TGC TCA TTT GTA GGC	250 CTC TGC TGA GGT CTT CAA GC CC	
C/EBP α	M62362	GAT AAA GCC CTA GAG ATC	255 AAA CAA CGC CAG CGA CCC AAC GA	
PPAR γ 2	BC021798	TTT TCC GAA ACA AAT GGT	343 GAA CCA TCC GAT TTG TCC GAT GTT	
myf5	NM_008656.5	CTA TTA CAG GAC AAG CAA	192 CCT GCC GGG TCC AAG CTG ACA GAC A	
desmin	NM_010043.1	CGA CGC TGT TAG TTG GCG	84 GAA CCA GGA AAG CGG TCA TT GT	

Mdx 和 C57 小鼠骨髓基质细胞诱导 1 周时分别提取细胞总 RNA: 吸出六孔板里培养液, 用 PBS 清洗 1

次。每 10 cm^2 生长的细胞中加 1 mL RNAisoTM Plus, 用移液枪吹打细胞使其脱落并充分裂解细胞。将内含细胞的裂解液转移至离心管中, 用移液枪反复吹吸直至裂解液中无明显沉淀, 室温静置 5 min; 加 1/5 RNAisoTM Plus 体积量氯仿, 振荡至液体变乳白色, 室温静置 5 min, 12 000 g 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min; 将上清液转移至另一离心管中, 加入等体积异丙醇, 振荡 30 s, 室温静置 10 min, 12 000 g 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min; 向沉淀中加入 1 mL 体积分数为 75%乙醇清洗沉淀, 12 000 g 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min, 弃上清保留沉淀, 溶解于 20 μ L DEPC 处理水中。反转录后, real-time PCR 检测成骨(ALP、Runx2、Colla1、OC)、成脂(C/EBP α 、PPAR γ 2)及成肌(desmin、myf5)相关基因表达(使用时根据试剂盒说明书操作)

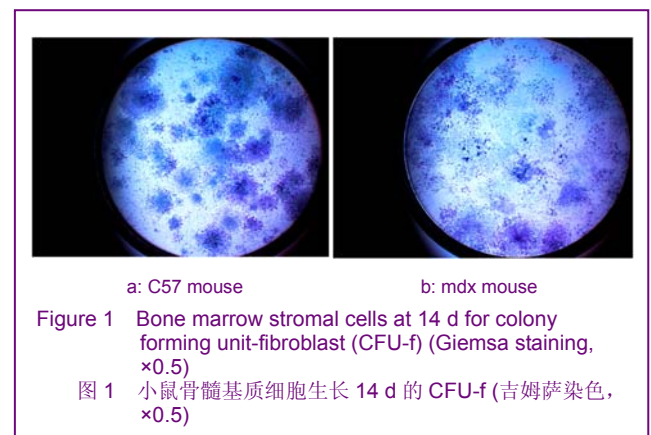
主要观察指标: 吉姆萨染色后观察 CFU-f 数目及大小; 分别用 Vonkossa 染色、油红 O 染色、免疫荧光检测 desmin 阳性细胞观察骨髓基质细胞定向分化为成骨、成脂、成肌细胞的特性; 各分化细胞相关基因表达。

设计、实施、评估者: 实验设计为第一、第二作者, 实施为第一作者, 评估为第三、四、五作者, 均经过系统培训, 未使用盲法评估。

统计学分析: 诱导的细胞在显微镜下随机数取 5 个非重叠视野($\times 100$), 计算染色或免疫荧光阳性细胞占总细胞数的比例。实验重复 3 次, 由第一作者用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析, 采用两组独立样本 t 检验, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

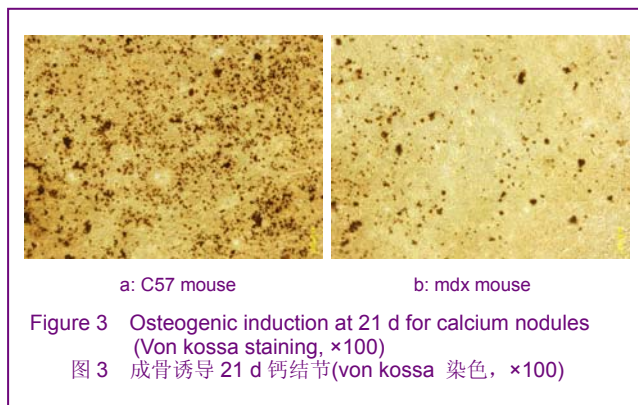
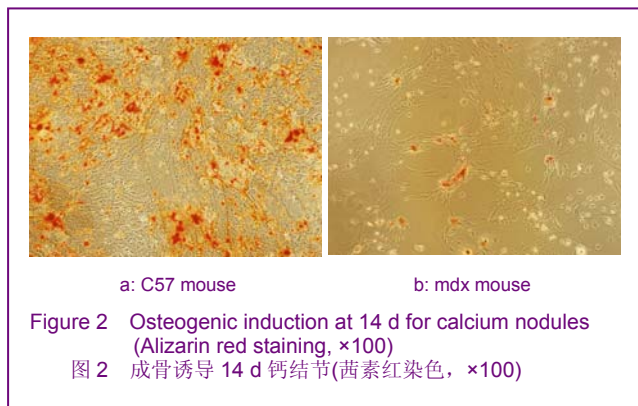
2.1 mdx 小鼠和 C57 小鼠骨髓基质细胞 CFU-f 比较 普通 DMEM 培养液培养 7, 14, 21d 后, 分别用吉姆萨染色, 结果发现 mdx 小鼠骨髓基质细胞 CFU-f 数目、面积均小于 C57 小鼠, 见图 1。



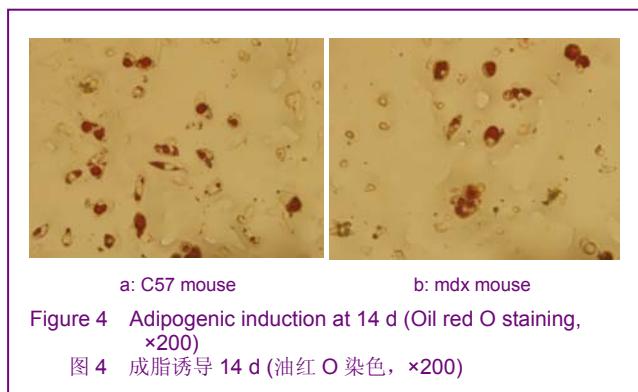
2.2 mdx 小鼠和 C57 小鼠骨髓基质细胞体外诱导分化比较

诱导为成骨细胞: 骨髓基质细胞在成骨细胞诱导培养液中诱导 2 周后, ARS 染色钙结节呈橘红色, mdx 小

鼠钙结节数目少于 C57 小鼠 ($P < 0.01$), 见图 2。诱导 3 周后, 细胞更多钙结节沉积, vonkossa 染色成黑褐色, mdx 小鼠骨髓基质细胞形成的钙结节数目少于 C57 小鼠 ($P < 0.01$), 见图 3。

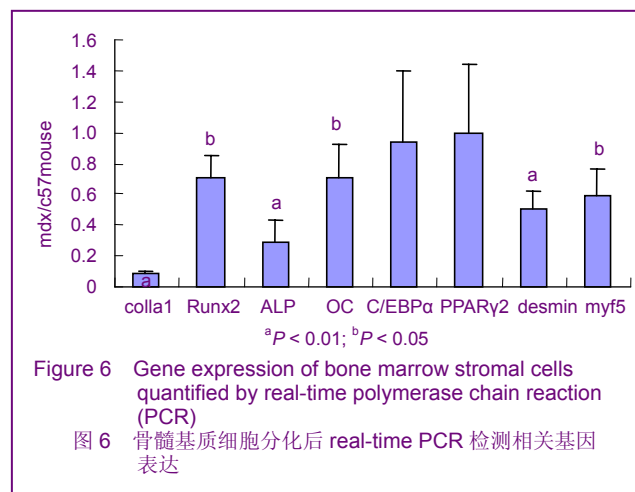
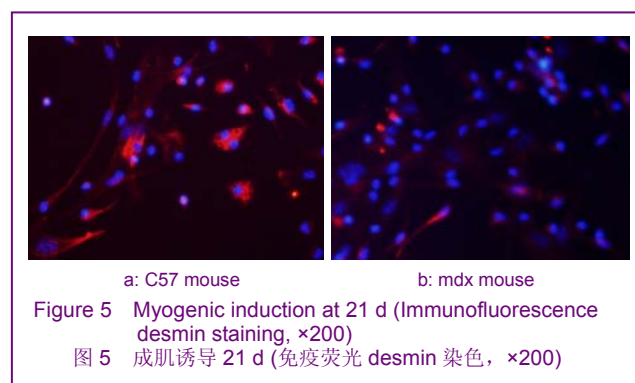


诱导为成脂肪细胞: 骨髓基质细胞在成脂肪细胞诱导培养液中诱导培养 14 d 后, 出现典型脂肪滴, 油红 O 染色呈红色, 结果发现 mdx 小鼠基质细胞成脂诱导分化的细胞数少于 C57 小鼠, 但差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 见图 4。

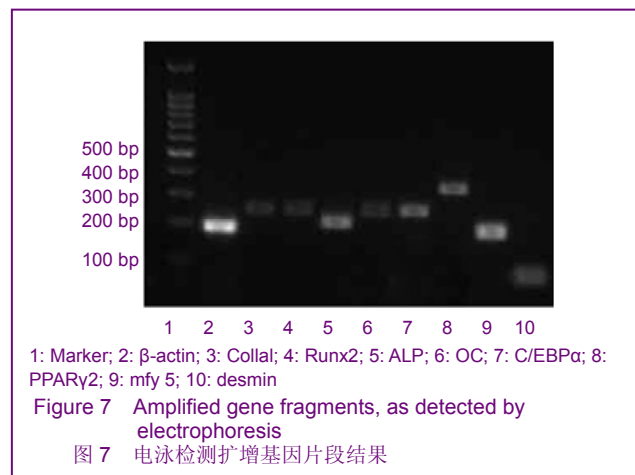


诱导为成肌肉细胞: 骨髓基质细胞在成肌诱导培养液中诱导培养 1 周后, C57 小鼠基质细胞出现长梭形细胞, 平行排列, 随着培养时间延长, 细胞体积逐渐增大, 细胞核明显增多, 多位于细胞中央, 典型的还出现长管形肌管, 而 mdx 小鼠则没有出现典型肌细胞形成。经 desmin 染色, 发现 C57 小鼠的阳性细胞数明显多于 mdx 小鼠 ($P < 0.01$), 见图 5。

2.3 Real-time PCR 检测 mdx 小鼠和 C57 小鼠骨髓基质细胞分化后各相关因子表达 Real-time PCR 读数 CT 值是指达到阈值时的扩增循环数, 它与起始模板数的对数值成负相关。将目的基因、管家基因分别作标准曲线, 然后从各自的标准曲线上求出初始模板量, 经管家基因均一化处理后, 求出目的基因的相对含量。用 mdx 小鼠的相对量除 C57 小鼠的相对量得出比值, 多次测量结果的平均值小于 1, 显示 mdx 小鼠的成骨、成肌基因表达较 C57 小鼠有不同程度下降, 成脂基因表达无明显下降, 见图 6。



2.4 PCR 产物检测 经过电泳鉴定, 证明扩增基因片段是正确的, 而且引物具有较高的特异性, 见图 7。



3 讨论

实验选择的诱导液是较经典的方案^[14], 成骨分化方面抗坏血酸不仅可以促进细胞贴壁, 还可以促进体外培养细胞合成胶原, 形成钙质, 也能调节 ATP 和碱性磷酸酶活性, 影响其合成; β -甘油磷酸钠可提供磷酸离子作为磷酸酶底物, 促进结节钙化; 地塞米松可促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化, 促进基质合成, 促进钙化^[15-16]。成脂分化时胰岛素可通过与骨髓间充质干细胞胰岛素样生长因子 1 受体结合, 促进骨髓间充质干细胞增殖分化, IBMX 通过抑制 cAMP 降解来调控转录因子家族成员 C/EBP 的表达, 以促进脂肪细胞产生^[17]。成肌诱导与 5-氮杂胞苷的去甲基化作用、抑制细胞增殖作用以及马血清中细胞因子的诱导分化作用有关^[18]。本实验中的成骨、成脂、成肌诱导均获得成功, 再次验证此诱导方案的有效性。

在 Real-time PCR 检测的基因片段中, ALP, Colla1, OC, Runx2 等基因都是成骨分化的重要指征, Runx2 蛋白在成骨细胞的分化和骨形成方面起重要的作用, 能直接刺激骨髓间充质细胞向成骨细胞分化过程中骨钙素、I 型胶原、骨桥蛋白和胶原酶 3 等基因的转录^[19]。过氧化物酶体增殖物激活受体- γ 2 (PPAR- γ 2) 基因是目前公认的脂肪细胞分化基因, 可作为脂肪类细胞的标志。另一个转录因子 C/EBP(C 反应增强蛋白) 成脂信号会合到与 PPAR γ , 从而启动分化程序^[20]。Desmin 蛋白为细胞骨架丝蛋白的一种, 通常作为肌源性细胞的标志, 另一成肌基因 Myf5 在肌肉前体细胞分化为成肌细胞过程中起作用^[21]。作者选择以上的相关基因, 在判定分化后细胞的特性方面, 不但具有代表性, 还有很好的特异性。

根据该实验结果, mdx 小鼠及 C57 小鼠骨髓基质细胞在体外培养时都能进行扩增和定向分化, 但也存在差异, 同时期的 mdx 小鼠骨髓基质细胞形成 CFU-f 数目及面积均少于 C57 小鼠, 这一现象说明 mdx 小鼠骨髓基质细胞增殖能力稍有下降; 而定向分化结果无论是形态学观察还是相关基因检测, 均显示 mdx 小鼠骨髓基质细胞诱导分化为成骨细胞、成肌细胞的能力较 C57 小鼠下降, 而诱导分化为成脂细胞的能力两组无明显差异, 这与以前的研究发现相一致^[22-23]。

骨架蛋白 dystrophin 是保持肌细胞完整性的重要结构, 主要定位于肌细胞膜内表面和神经肌肉接头处, 可与细胞膜上多种糖蛋白-肌萎缩蛋白相关蛋白 (dystrophin associated proteins, DAPs) 结合形成复合体, 后者构成了维系肌细胞膜稳定的骨架系统的最主要成分, 并介导着跨膜信号转导, Dystrophin 基因在维持肌管生理过程中起重要作用, 它的缺失将破坏肌管内钙

稳定, 提高钙蛋白酶水解作用, 导致肌管形成障碍^[24-25]。另外, Dystrophin 与 Agrin、nNOS、电压门控 Na⁺及 Sar-coglycans 有关联, 具有信号传导功能, mdx 小鼠 dystrophin 基因缺失使骨髓基质细胞功能异常, 出现成骨能力下降的现象^[26-27]。mdx 小鼠骨髓基质细胞成脂能力无明显下降, 在骨骼肌里甚至存在脂肪增生现象, 可能是保持总体平衡的一种病理性代偿作用, 有人曾提出, 骨髓腔内的脂肪细胞和成骨细胞均来源于骨髓间充质干细胞, 二者具有相同的细胞表型, 在一定条件下可以互相转换, 并且存在彼消此长的关系^[28-29]。并有研究证明骨髓干细胞成骨诱导时, 含成骨因子的诱导液不加 FBS, 则向脂肪细胞方向分化增多, 成脂基因 PPAR 表达增强^[30]。具体原因还需要深入研究验证。

综上所述, 本研究证明了 mdx 小鼠骨髓基质细胞体外培养的增殖能力及定向分化能力较 C57 小鼠下降, 其下降与 Dystrophin 基因缺失及骨髓微环境改变有关, 但其具体机制还有待进一步探索。

4 参考文献

- [1] Dezawa M, Ishikawa H, Itokazu Y, et al. Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science*. 2005;309(5732):314-317.
- [2] Yang XF, Xu YF, Zhang YB, et al. Functional improvement of patients with progressive muscular dystrophy by bone marrow and umbilical cord blood mesenchymal stem cell transplantations. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2009;89(36):2552-2556.
- [3] Feng SW, Zhang C, Lu XL, et al. Mesenchymal stem cells transplanted in mdx mice differentiate into myocytes and express dystrophin/utrophin. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2009;29(5):974-978.
- [4] Quattrocchi M, Cassano M, Crippa S, et al. Cell therapy strategies and improvements for muscular dystrophy. *Cell Death and Differentiation*. 2009;10:1038-1026.
- [5] Cheeseman EA, Kilpatrick SJ, Stevenson AC, et al. The sex ratio of mutation rates of sex-linked recessive genes in man with particular reference to Duchenne type muscular dystrophy. *Ann Hum Genet*. 1958;22(3):235-243.
- [6] Sicinski R, Yan G, Ryder-Cook AS, et al. The molecular basis of muscular dystrophy in mdx mice: a point mutation. *Science*. 1989;244:1578-1580.
- [7] Pittenger MF, Mackay AM, Stephen CB, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cell. *Science*. 1999;284:143-147.
- [8] See EY, Toh SL, Goh JC. Multilineage potential of bone-marrow-derived mesenchymal stem cell sheets: implications for tissue engineering. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(4):1421-1431.
- [9] Zhang WX, Chen SL, Yao XL, et al. *Zhongshan Daxue Xuebao*. 2008;29(5):633-636.
张为西, 陈松林, 姚晓黎, 等. 小鼠骨髓间质干细胞的体外培养与多向分化潜能的鉴定[J]. *中山大学学报*, 2008,29(5):633-636.
- [10] Zhang WX, Ou GM, Mark H, et al. Age-Related Changes in the Osteogenic Differentiation Potential of Mouse Bone Marrow Stromal Cells. *J Bone Miner Res*. 2008;23(7):1118-1128.
- [11] Esposito MT, Noto RD, Mirabelli P, et al. Culture Conditions Allow Selection of Different Mesenchymal Progenitors from Adult Mouse Bone Marrow. *Tissue Eng*. 2009;15:1089-1091.
- [12] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.
中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [13] Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, et al. Bone marrow stromal cell, biology, and potential application. *Stem Cell*. 2001;19(3):180-192.
- [14] Esposito MT, Di Noto R, Mirabelli P, et al. Culture conditions allow selection of different mesenchymal progenitors from adult mouse bone marrow. *Tissue Eng*. 2009;10:1089-1094.
- [15] Lieb E, Milz S, Vogel T, et al. Effects of transforming growth factor beta1 on bone-like tissue formation in three-dimensional cell culture. I. Culture conditions and tissue formation. *Tissue Eng*. 2004;10(9-10):1399-1413.

[16] Fromiguet O, Hamidouche Z, Chateauvieux S, et al. Distinct osteoblastic differentiation potential of murine fetal liver and bone marrow stroma-derived mesenchymal stem cells. J Cell Biochem. 2008; 104:620-627.

[17] Xu DH, Zhou CH, Liu YY, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang. 2009; 13 (1):125-128.
徐道华, 周晨慧, 刘钰瑜, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞分化成脂肪细胞的定向诱导[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13 (1): 125-128.

[18] Zhang W, Yang N, Shi XM. Regulation of MSC osteogenic differentiation by glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ). J Biol Chem. 2008;283:4723-4729.

[19] Radin S, Reilly G, Bhargava G, et al. Osteogenic effects of bioactive glass on bone marrow stromal cells. J Biomed Cell Res A. 2005;73:21-29.

[20] Liu CH, Zeng YH, Tang HL, et al. Disi Junyi Daxue Xuebao. 2008, 29 (20):1825-1828.
刘广辉, 曾艳辉, 唐海林, 等. PPAR γ 基因转染对兔骨髓间充质干细胞向脂肪细胞早期分化的影响[J]. 第四军医大学学报, 2008, 29 (20): 1825-1828.

[21] Zeng Y, Zhang C, Li CM, et al. Disi Junyi Daxue Xuebao. 2006; 27(18):1637-1640.
曾纛, 张成, 李才明, 等. 早期肌肉特异性mRNA在骨髓干细胞的表达[J]. 第四军医大学学报, 2006, 27(18):1637-1640.

[22] Ohnishi S, Ito H, Suzukib Y, et al. Intra-bone marrow-bone marrow transplantation slows disease progression and prolongs survival in G93A mutant SOD1 transgenic mice, an animal model mouse for amyotrophic lateral sclerosis. Brain Res. 2009; 1296: 216-224.

[23] Li Y, Zhang C, Xiong F, et al. Comparative study of mesenchymal stem cells from C57BL/10 and mdx mice. BMC Cell Biology. 2008; 9(24):147-158.

[24] Brusse V, Tardif F, Tremblay JP. Muscle fibers of mdx mice are more vulnerable to exercise than those of normal mice. Neuromuscul Disord. 1997; 7 (8): 487-492.

[25] Alderton JM, Steinhardt RA. Calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. J Biol Chem. 2000; 275: 9452-9460.

[26] Rafael JA, Townsend ER, Squire SE, et al. dystrophin and utrophin influence fiber type composition and post-synaptic membrane structure. Hum Mol Genet. 2000; 9: 1357-1367.

[27] Suchyna TM, Sachs F. Mechanosensitive channel properties and membrane mechanics in mouse dystrophic myotubes. J Physiol. 2007;581(Pt 1):369-387.

[28] Banfi A, Muraglia A, Dozin B, et al. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. Exp Hematol. 2000;28(6):707-715.

[29] Ahdjoudj S, Lasmoles F, Oyajobi BO, et al. Reciprocal control of osteoblast/chondroblast and osteoblast/adipocyte differentiation of multipotential clonal human marrow stromal F/STRO-1(+) cells. J Cell Biochem. 2001;81(1):23-38.

[30] Ichikawa J. Serum-free medium with osteogenic supplements induces adipogenesis in rat bone marrow stromal cells. Cell Biol Int. 2010;34(6):615-620.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 课题由 2 项国家自然科学基金资助: GILZ 对骨髓间质干细胞分化的调控及其机制的研究(30870852); GILZ 转导的 MSC 移植治疗 DMD 模型的研究(30971026)。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的创新点: DMD 模型鼠(mdx 小鼠)骨髓基质细胞体外培养时的增殖及多向分化能力是否改变, 是否能在体外培养扩增后作为自身骨髓移植的种子细胞, 国内外的研究不多, 尚没有明确的定论, 是值得深入探究的问题。本实验自 2009 年初开始, 在体外行小鼠骨髓基质细胞的扩增及定向分化试验, 通过与 C57 小鼠比较, 验证 mdx 小鼠自身的骨髓基质细胞是否适合作为移植的种子细胞。目前已熟练掌握小鼠骨髓基质细胞原代培养技术, 培养及纯化了 C57 小鼠和 mdx 小鼠的骨髓基质干细胞, 为下一步实验打下基础。

课题评估的“金标准”: 实验结果中分化细胞阳性率应用了金标准计算, 而 real-time PCR 结果得出的是目的基因相对量, 无金标准。

设计或课题的偏倚与不足: 本实验观察到 mdx 小鼠骨髓基质细胞体外培养时的增殖及定向分化能力下降的现象, 但造成这种现象的机制还需要更多的实验进行验证。

提供临床借鉴的价值: 课题拟证实 GILZ 通过抑制 MSC 向脂肪细胞分化而促进其向成肌细胞的分化并探讨 GILZ 抑制 MSC 向脂肪细胞分化的分子机制, 为将来开发治疗肥胖及相关性疾病、DMD 及肌肉相关疾病的药物提供新的特异性靶点。

CRTER 杂志干细胞栏目组稿重点: 关注 2011~2013 年国家自然科学基金干细胞项目①

14-3-3 β 在胶质瘤干细胞中的作用及机制研究	癌细胞增殖过程中的作用机制研究	BMP9-MAPK信号途径调控间充质干细胞成骨分化
2型糖尿病患者骨髓干细胞成骨能力研究	Bmi-1信号系统调控喉癌实体瘤干细胞自我更新机制研究	BMP和FGF信号诱导(大鼠)神经干细胞休眠的机制研究
5-杂氮-2'-脱氧胞苷对乳腺肿瘤干细胞自我更新的抑制及机制	Bmi-1与DNMT1基因调节膀胱移行细胞癌T24侧群细胞肿瘤干细胞特性的研究	BMSCs+PLGA三维支架在活体应力环境下成骨分化的MAPK信号转导机制
Ang-1和VEGF165基因共修饰骨髓间充质干细胞移植对吸入性损伤的修复作用及其机制研究	Bmi-1在肝脏再生、肝干细胞自我更新和肝脏肿瘤发生中的作用研究	Cajal-Retzius细胞促进移植干细胞在脑片上有序分化的实验研究
BDNF-TrkB通路在乳腺癌间质转化促进乳腺	BMP-4活化的脂肪源干细胞治疗重型再生障碍性贫血的实验研究	