

骨髓间充质干细胞体外诱导向内皮和上皮细胞的分化☆

朱希山, 台卫平, 施 薇, 安广宇

Epithelial and endothelial differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro*

Zhu Xi-shan, Tai Wei-ping, Shi Wei, An Guang-yu

Abstract

BACKGROUND: Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) have multiple differentiation potential *in vitro*, but the *in vitro* differentiation of BMSCs to the lung tissue is still controversial.

OBJECTIVE: To verify the ability of mouse BMSCs differentiating to endothelial cells and epithelial cells *in vitro*.

METHODS: Mouse BMSCs were isolated and induced by endothelial-induced fluid to differentiate into endothelial cells. In addition, isolated mouse BMSCs were induced in these epithelial induction media for 3 weeks: a simple epithelial induction medium; epithelial induction medium plus 10 $\mu\text{g/L}$ transforming growth factor $\beta 1$. Non-induced mouse BMSCs were used as negative controls and the alveolar epithelium as a positive control.

RESULTS AND CONCLUSION: After cultured in the epithelial induction medium for 3 weeks, some cells changed from the spindle cells into a typical pebble-like epithelial cell. 60% induced cells expressed epithelial cell marker pan-CK, and RT-PCR showed that differentiated epithelial cells expressed cell-specific signs CK18. There was no CK18 expression in non-induced mouse BMSCs. Mouse BMSCs in the epithelial induction medium for 24 hours, typical vascular network structure appeared. vWF immunofluorescence staining showed that about 70% of cells were positive, and RT-PCR showed that differentiated cells expressed CD31, vWF, and CD34. It is indicated that BMSCs has *in vitro* cross-mesodermal multilineage differentiation ability.

Zhu XS, Tai WP, Shi W, An GY. Epithelial and endothelial differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro*. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(40): 7433-7436.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

Department of Internal Oncology, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University (the 9th Hospital of Peking University), Beijing 100038, China

Zhu Xi-shan☆, Doctor, Department of Internal Oncology, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University (the 9th Hospital of Peking University), Beijing 100038, China
zhuxishan@tsinghua.org.cn

Received: 2011-05-11
Accepted: 2011-06-16

摘要

背景: 骨髓来源的间充质干细胞在体外具有多系分化潜能, 但其在体外向肺组织细胞的分化能力尚存在争议。

目的: 体外诱导验证小鼠骨髓间充质干细胞向内皮细胞和上皮细胞分化的能力。

方法: 分离小鼠骨髓来源的间充质干细胞, 以内皮诱导液向内皮细胞分化。另外将小鼠骨髓间充质干细胞分别在以下诱导培养基中进行上皮诱导 3 周: 单纯上皮诱导培养基, 上皮诱导培养基加 10 $\mu\text{g/L}$ 转化生长因子 $\beta 1$, 并以未经诱导的小鼠骨髓间充质干细胞作为阴性对照, 肺泡上皮作为阳性对照。

结果与结论: 小鼠骨髓间充质干细胞在上皮诱导培养基中诱导培养 3 周后, 部分细胞由梭形变为典型的卵石样上皮细胞形态, 诱导后约 60% 细胞表达广谱上皮细胞标志 pan-CK, RT-PCR 结果显示分化后的细胞表达上皮细胞特异标志 CK18, 未经诱导的间充质干细胞未表达。小鼠骨髓间充质干细胞在内皮诱导 24 h 后即出现了典型的血管网状结构, vWF 免疫荧光染色显示约 70% 的细胞呈阳性, RT-PCR 显示分化后的细胞表达内皮细胞特异性标志 CD31、vWF 和 CD34。提示骨髓来源的间充质干细胞体外诱导培养具有跨胚层多系分化能力。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 小鼠; 内皮细胞; 上皮细胞; 细胞培养; 诱导

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.40.006

朱希山, 台卫平, 施薇, 安广宇. 骨髓间充质干细胞体外诱导向内皮和上皮细胞的分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(40):7433-7436. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

已经有很多证据表明骨髓来源的间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)在体外具有多系分化潜能^[1-3], 但其在体内的分化能力尚存在争议, 其中就包括向肺组织细胞的分化^[4-6]。间充质干细胞在受损肺内的分化趋向主要有两类观点, 一类认为它在植入受损肺组织后可以分化为肺泡上皮细胞和支气管上皮细胞^[7-8], 进而参予肺组织的损伤修复; 另外, 普遍认为肺组织纤维化的爆发很大程度上是因为调动了骨髓间充质细胞在肺内分化为成纤维细胞和肌成纤维细胞。

近年来研究发现干细胞分化趋向的差异性受到细胞移植时间的影响, 仅在损伤的急性炎症期进行移植的细胞才能分化为上皮细胞^[9]。对肺放射损伤模型的研究发现, 肺在放损后经历了一系列典型的病理修复过程, 其包括3个主要阶段: 急性炎症期, 慢性炎症期和纤维化期^[8, 10-11]。实验旨在研究不同时期移植的间充质干细胞的命运是否同相应病理阶段紧密联系, 并且探讨其可能机制。

作者的前期研究已经证实间充质干细胞具有向3个胚层细胞分化的潜能, 包括神经、内皮、骨、软骨、骨骼肌、脂肪和上皮等细胞^[12-14]。本实验中, 作者将BMSCs在体内外进行多系分化的培养, 结果提示其在体内外都具有多系分

首都医科大学附属北京世纪坛医院(北京大学第九医院)肿瘤内科, 北京市 100038

朱希山☆, 男, 1978年生, 山东省潍坊市人, 汉族, 2009年北京协和医学院(清华大学医学部)毕业, 博士, 主要从事肿瘤干细胞的基础研究和临床应用。
zhuxishan@tsinghua.org.cn

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2011)40-07433-04

收稿日期: 2011-05-11
修回日期: 2011-06-16
(20110511004/W·W)

化潜能, 损伤组织的微环境直接调控了其体内分化的方向, 这就为干细胞移植治疗肺损伤性疾病的时间窗的选择提供了重要的实验依据。

1 材料和方法

设计: 单一样本观察。

时间及地点: 实验于2009-10/2011-03在首都医科大学附属北京世纪坛医院(北京大学第九临床医学院)肿瘤实验室完成。

材料: C57BL/6小鼠购于中国医学科学院动物所; EGFP(C57BL/6-TgN)小鼠购于南京模式动物研究中心(引自美国Jackson实验室)。所有动物实验均按照中国医学科学院动物管理条例执行, 在无菌条件下饲养。

试剂:

试剂	来源
M199、体积分数 2%胎牛血清、50 µg/L 血管内皮生长因子	Gibcd
10 µg/L 碱性成纤维细胞生长因子、10 µg/L 胰岛素样生长因子、20 µg/L 肝细胞生长因子	Sigma
100 mg/L 青霉素、100 U/mL 硫酸链霉素	BD

实验方法:

骨髓的取材: ①用颈椎脱臼断颈法处死小鼠。在无菌条件下取股骨和胫骨, 除去骨表面附着的肌肉组织, 用D-Hank液浸泡(添加青霉素100 U/mL, 链霉素100 mg/L)。②用器械去除股骨近端和胫骨远端, 暴露骨髓腔。然后除去股骨、胫骨另一端的骨髓, 并用1 mL注射器在骨髓的生长面上开一个小孔。③用注射器吸1 mL含血清的基础培养液, 将针头从上述小孔插入骨髓腔中, 注入培养液, 从骨的另一端收集冲洗出来的骨髓。④将收获的全部骨髓用注射器反复抽吸, 以打散组织成为细胞悬液。⑤收集细胞悬液, 离心(1 200 r/min, 10 min)。用细胞培养液重悬沉淀的细胞。⑥取少量细胞悬液与等量4%乙酸混合以溶解红细胞。然后计数有核细胞。

细胞接种及培养: ①用含血清的基础培养液调节细胞浓度, 每 6×10^7 个骨髓有核细胞接种到一个T75的塑料培养瓶中。在37 °C、体积分数5%CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中培养。②原代接种后24 h, 除去未贴壁的造血细胞, 用D-Hank液洗1遍, 半量换液。以后每隔一两天换液1次。③5~7 d后, 当形成一些较大的细胞克隆时, 用D-Hank液将培养的细胞洗2遍。加入2.5 g/L胰酶(含0.01% EDTA)消化液, 室温消化2 min。用牛血清终止胰蛋白酶的作用。④用吸管轻轻吹打培养瓶的细胞贴附面, 使细胞从培养瓶壁上脱离下来, 制成细胞悬液。⑤将细胞悬液接种到新的培养瓶中, 于37 °C、体积分数5%CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。待传代的细胞生长

密度达到80%~90%时, 即再次传代^[15]。

体外内皮诱导: 24孔培养板用Matrigel包被, 细胞按 5×10^4 /孔接种小鼠BMSCs。内皮诱导液为M199、体积分数2%胎牛血清、50 µg/L血管内皮生长因子、10 µg/L 碱性成纤维细胞生长因子和100 mg/L青霉素及100 U/mL硫酸链霉素^[16]。诱导两三天。光学显微镜下记录48 h内细胞形态变化过程, 并以RT-PCR和免疫荧光方法鉴定分化结果, 未诱导的间充质干细胞作为阴性对照, 肺微血管内皮细胞作为阳性对照^[17]。

体外上皮细胞诱导: 根据文献[18]的方法从正常C57小鼠中分离肺细胞, 细胞按 5×10^8 L⁻¹浓度重悬于DF-12溶液中, 进行10 Gy放射(照射速率, 1.0 Gy/min)。于37 °C、体积分数5%CO₂培养箱中放置12 h后, 收集细胞悬液, 离心(1 500 r/min, 10 min)后取上清液, 再加入等体积的DF-12溶液。并以此作为母液, 添加10 µg/L胰岛素样生长因子, 20 µg/L肝细胞生长因子, 10 µg/L成纤维细胞生长因子和体积分数2%胎牛血清。该培养液即作为上皮诱导培养液(epithelial differentiation medium, EpDM)。同样分离放损后120 d C57小鼠(未移植细胞)的肺细胞, 标记为“120 d肺细胞”, 备做后用。

小鼠BMSCs按每孔 2×10^5 个细胞接种于6孔板中, 在单纯EpDM中, 以及EpDM加10 µg/L 转化生长因子β1中诱导3周^[19]。培养液均每三四天半量换液。以未经诱导的小鼠BMSCs作为阴性对照, 肺泡上皮作为阳性对照。

引物序列:

	Sense primers	Antisense primers
转化生长因子β1	5'-AAT ACG TCA GAC ATT CGG GAA GCA-3'	5'-GTC AAT GTA CAG CTG CCG CAC ACA-3'
β-actin	5'-GTG GGC CGC TCT AGG CAC CAA-3'	5'-CTC TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC-3'
CK18	5'-CGC ATC GTC TTG CAG ATC GAC-3'	5'-GCT GAG ACC AGT ACT TGT CCA G-3'
CD34	5'-AAA GAC CCT GAT TGC ACT GG-3'	5'-GCC CTG AGT CAA TTT CAC TT-3'
CD31	5'-CCA GCT GCT CCA CTT CTG AA-3'	5'-GCA CTG CCT TGA CTG TCT TA-3'
vWF	5'-GCG ATT CCC ACT CTT CC-3'	5'-TTG ACG AGG CAG GGG TTC-3'

主要观察指标: 小鼠BMSCs体外经诱导可分化上皮细胞和血管内皮细胞结果。

2 结果

2.1 小鼠BMSCs在体外经诱导可分化为上皮细胞结果 小鼠BMSCs在EpDM中诱导培养3周后, 部分细胞由梭形变为典型的卵石样上皮细胞形态, 见图1。免疫荧光染色显示, 诱导后约60%细胞表达广谱上皮细胞标志

pan-CK, 见图2。

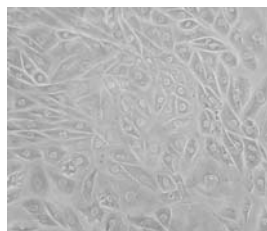


Figure 1 Morphology of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) after epithelial differentiation (×100)
图 1 上皮细胞分化后的骨髓来源的间充质干细胞的形态(×100)

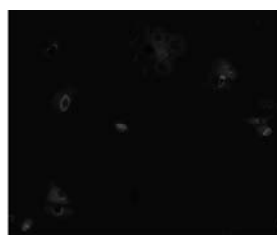
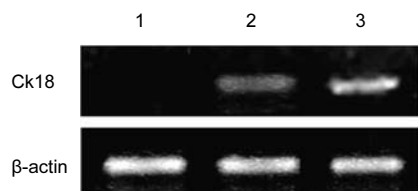


Figure 2 pan-CK staining confirmed the epithelial cell differentiation (×100)
图 2 pan-CK 染色证实上皮细胞的分化(×100)

RT-PCR结果显示分化后的细胞表达上皮细胞特异性标志CK18, 而未经诱导的间充质干细胞则并不表达, 见图3。



1: Before induction; 2: After induction; 3: Type II alveolar epithelial cells as a positive control

Figure 3 Detection of CK18 expression by RT-PCR method
图 3 RT-PCR 检测 CK18 的表达

2.2 小鼠BMSCs在体外经诱导可分化为血管内皮细胞
结果 小鼠BMSCs在内皮诱导24 h后即出现了典型的血管网状结构, 见图4。

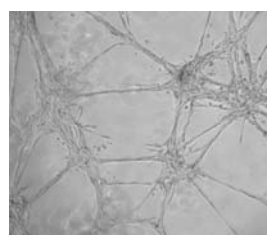


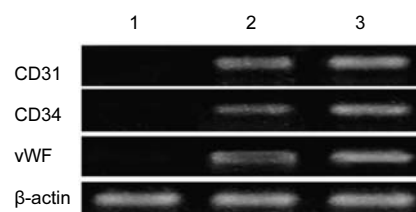
Figure 4 Morphology of bone marrow mesenchymal stem cells for endothelial cells differentiation (×100)
图 4 内皮细胞分化后的骨髓间充质干细胞的形态(×100)

vWF免疫荧光染色显示, 约70%的细胞呈阳性, 见图5。



Figure 5 vWF staining confirmed the epithelial cell differentiation (×100)
图 5 vWF 染色证实了上皮细胞的分化(×100)

RT-PCR显示分化后的细胞表达内皮细胞特异性标志CD31、vWF和CD34, 见图6。



1: Before induction; 2: After induction; 3: Lung microvascular endothelial cells served as the positive control

Figure 6 Detection of CD31, vWF and CD34 expression by RT-PCR method
图 6 RT-PCR 检测的 CD31, vWF 和 CD34 表达

3 讨论

之前针对肺损伤或是肺疾病的细胞治疗研究中, 主要侧重于干细胞的分化能力, 进而参与了组织的损伤修复过程, 但是不同实验室对干细胞的体内分化能力和分化趋向存在争议。实验旨在探讨损伤不同阶段的组织微环境对干细胞分化产生影响的可能机制。首先从小鼠骨髓中分离并培养得到间充质干细胞(小鼠BMSCs), 在体外诱导实验中证实其具有跨胚层多系分化的能力。

在体外实验中, 对培养的小鼠BMSCs进行成血管内皮和成上皮的诱导。这两种细胞类型代表了肺放射损伤中最主要的两种靶细胞, 即中胚层来源的血管内皮细胞和内胚层来源的肺泡上皮细胞, 它们是肺脏复杂而精密的结构中的重要组成细胞^[15]。小鼠BMSCs进行成内皮诱导后, 仅仅48 h就形成了一个立体的成熟血管网的形态, 并且检测到了血管内皮特异的基因表达和表面抗原, 在本实验室前期的研究也证实了这一点^[16]。小鼠BMSCs进行上皮诱导时, 细胞形态由梭形逐渐变扁变宽, 经过两到三周形成了类似卵石样紧密相连的典型上皮结构, 同样也检测到了上皮细胞特异的基因表达和表面抗原^[17-19]。为了更好地创造一个上皮分化的体外诱导

环境, 采取了肺泡上皮细胞照射后的上清液作为诱导基, 在此基础上再添加细胞因子进行诱导。该上皮诱导体系同以前报道的诱导体系(仅包含肝细胞生长因子和成纤维细胞生长因子4等细胞因子)相比, 可获得更高的分化比例^[20-21]。

在肿瘤放疗或是造血干细胞移植中(肝星状细胞移植前患者先要进行清髓或半清髓预处理), 放射引起的间质性肺炎(肺纤维化)十分常见。作者在实验中已经发现在放损早期移植的间充质干细胞可向肺功能细胞分化, 这提示早期联合输注间充质干细胞将有可能缓解该症状。

简而言之, 作者发现小鼠BMSCs具有跨胚层多系分化能力, 通过对体内分析和示踪及体外模拟刺激实验, 发现这种干细胞的分化趋向的巨大差异可能受到细胞因子等体内微环境的影响和引导。因此在细胞治疗中, 间充质干细胞移植时间窗的选择至关重要。

4 参考文献

- [1] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284: 143-147.
- [2] Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997;276:71-74.
- [3] Bianco P, Gehron Robey P. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest*. 2000;105:1663-1668.
- [4] Engelmann MG, Franz WM. Stem cell therapy after myocardial infarction: ready for clinical application? *Curr Opin Mol Ther*. 2006; 8: 396-414.
- [5] Hashimoto N, Jin H, Liu T, et al. Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*. 2004;113:243-252.
- [6] Epperly MW, Guo H, Gretton JE, et al. Bone marrow origin of myofibroblasts in irradiation pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;29:213-224.
- [7] Stefanidakis M, Koivunen E. Cell-surface association between matrix metalloproteinases and integrins: role of the complexes in leukocyte migration and cancer progression. *Blood*. 2006;108: 1441-1450.
- [8] Paupert J, Mansat-De Mas V, Demur C. Cell-surface MMP-9 regulates the invasive capacity of leukemia blast cells with monocytic features. *Cell Cycle*. 2008;7(8):1047-1053.
- [9] Redondo-Muñoz J, José Terol M, García-Marco JA. Matrix metalloproteinase-9 is up-regulated by CCL21/CCR7 interaction via extracellular signal-regulated kinase-1/2 signaling and is involved in CCL21-driven B-cell chronic lymphocytic leukemia cell invasion and migration. *Blood*. 2008;111(1):383-386.
- [10] Redondo-Muñoz J, Escobar-Díaz E, Samaniego R. MMP-9 in B-cell chronic lymphocytic leukemia is up-regulated by alpha4beta1 integrin or CXCR4 engagement via distinct signaling pathways, localizes to podosomes, and is involved in cell invasion and migration. *Blood*. 2006;108(9):3143-3151.
- [11] Shishodia S, Sethi G, Konopleva M, et al. A synthetic triterpenoid, CDDO-Me, inhibits IκappaB kinase and enhances apoptosis induced by TNF and chemotherapeutic agents through down-regulation of expression of nuclear factor kappaB-regulated gene products in human leukemic cells. *Clin Cancer Res*. 2006 Mar 15;12(6):1828-38.

- [12] Janowska-Wieczorek A, Majka M, Marquez-Curtis L, et al. Bcr-abl-positive cells secrete angiogenic factors including matrix metalloproteinases and stimulate angiogenesis in vivo in Matrigel implants. *Leukemia*. 2002;16(6):1160-1106.
- [13] Kaneta Y, Kagami Y, Tsunoda T, et al. Genome-wide analysis of gene-expression profiles in chronic myeloid leukemia cells using a cDNA microarray. *Int J Oncol*. 2003;23(3):681-691.
- [14] Bruchova H, Borovanova T, Klamova H, et al. Gene expression profiling in chronic myeloid leukemia patients treated with hydroxyurea. *Leuk Lymphoma*. 2002;43(6):1289-1295.
- [15] Ries C, Lohrer F, Zang C, et al. Matrix metalloproteinase production by bone marrow mononuclear cells from normal individuals and patients with acute and chronic myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes. *Clin Cancer Res*. 1999;5(5): 1115-1124.
- [16] Kim JG, Sohn SK, Kim DH, et al. Clinical implications of angiogenic factors in patients with acute or chronic leukemia: hepatocyte growth factor levels have prognostic impact, especially in patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2005;46(6):885-891.
- [17] Sang-Oh Yoon, Sejeong Shin, Ho-Jae Lee. Isoginkgetin inhibits tumor cell invasion by regulating phosphatidylinositol 3 kinase/Akt dependent matrix metalloproteinase-9 expression. *Mol Cancer Ther*. 2006;5(11):344-349.
- [18] Anand P, Sundaram C, Jhurani S, et al. Curcumin and cancer: an "old-age" disease with an "age-old" solution. *Cancer Lett*. 2008; 267(1):133-164.
- [19] Zhang B, Liu R, Shi D, et al. Mesenchymal stem cells induce mature dendritic cells into a novel Jagged-2-dependent regulatory dendritic cell production. *Blood*. 2009;113(1):46-57.
- [20] Reyes M, Lund T, Lenvik T, et al. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*. 2001;98:2615-2625.
- [21] Guo H, Fang B, Zhao RC. Hemangioblastic characteristics of fetal bone marrow-derived Flk1(+)CD31(-)CD34(-) cells. *Exp Hematol*. 2003;31:650-613.
- [22] 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.

来自本文课题的更多信息——

作者贡献: 实验设计、实施为第一作者, 评估为第二作者, 资料收集为第三作者, 由第一作者成文, 第四作者审核, 第一作者对文章负责。

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。

伦理批准: 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》^[22]。

本文创新性: 发现小鼠骨髓间充质干细胞具有跨胚层多系分化能力, 通过对体内分析和示踪及体外模拟刺激实验, 发现这种干细胞的分化趋向的巨大差异可能受到细胞因子等体内微环境的影响和引导。因此在细胞治疗中, 间充质干细胞移植时间窗的选择至关重要。