

· 论著 ·

人骨髓间质干细胞向表皮细胞分化的研究

王素一 韩春茂 赖平平 岑航辉



【摘要】 目的 探讨人骨髓间质干细胞(MSC)在体外培养条件下能否定向诱导分化为表皮细胞。方法 抽取无造血系统恶性疾病的成人骨髓标本,采用 Percoll 细胞分离液(1.073 g/ml)分离 MSC,在体外传代培养至第 3 代,分为对照组和实验组。两组分别用普通 L-DMEM 培养基和含表皮生长因子、胰岛素、维甲酸、氯化钙的 L-DMEM 培养基诱导 7 d。在倒置相差显微镜下每天观察两组细胞的形态;采用免疫组织化学法检测 P63 和广谱细胞角蛋白(PCK)的表达情况。结果 实验组细胞由长梭形逐渐转变为扁圆形或形态不规则,部分细胞 P63 和 PCK 呈阳性表达;对照组细胞持续呈长梭形,P63 和 PCK 未见表达。结论 人骨髓 MSC 在体外可诱导分化为表皮细胞。

【关键词】 间质干细胞; 细胞分化; 表皮细胞

Study on differentiation of human mesenchymal stem cells into epidermal cells WANG Su-yi, HAN Chun-mao, LAI Ping-ping, CEN Hang-hui. Health Supervision Department, Disease Prevention Control Center, Xiaoshan District of Hangzhou, Hangzhou 310009, P. R. China
Corresponding author: HAN Chun-mao, 310009, Email: hancm@mail.hz.zj.cn, Tel: 0571-87783662

【Abstract】 Objective To investigate the possibility of differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSC) into epidermic cells in vitro. **Methods** hMSCs were segregated from normal adult human bone marrow by Percoll solution (1.073 g/ml), and were cultured, purified, and amplified to 3th passage in vitro. Then the hMSCs were randomly divided into control group (with treatment of normal L-DMEM medium) and experimental group (with treatment of L-DMEM medium containing epidermal growth factor, insulin, tretinoin, calcium chloride). After 7 days of culture, the morphologic changes of hMSCs in the 2 groups were observed with inverted phase contrast microscope. The expressions of P63 and PCK of hMSCs were assessed with immunohistochemical methods. **Results** The shape of hMSCs in experimental group became irregular or oblong in shape, while that in control group were still in spindle shape. Immunohistochemical results showed that hMSCs were P63 and PCK positive in the experimental group, while those in control group were negative. **Conclusion** Human mesenchymal stem cells can differentiate into epidermic cell in vitro.

【Key words】 Mesenchymal stem cells; Cell differentiation; Epidermal cells

骨髓干细胞包括造血干细胞、间质干细胞(MSC)和内皮祖细胞^[1]。MSC 也称骨髓基质细胞,是一种多能的前体细胞,约占骨髓中单个核细胞的万分之 0.1 至万分之 1.0。从骨髓中分离出的 MSC 能在体外大量扩增,在适宜的条件下还能分化成多系细胞,如心肌细胞、血管内皮细胞和汗腺细胞等^[2-4]。动物体内实验初步证明, MSC 可以向表皮细胞分化^[5-7],但体外实验鲜有报道。本文旨在探讨人骨髓 MSC 能否在体外诱导分化为表皮细胞,为临床对大面积皮肤缺损患者进行细胞移植治疗或组织工程皮肤的构建提供参考。

1 对象与方法

1.1 人骨髓 MSC 的分离培养

征得患者知情同意,抽取浙江大学医学院附属第一医院和第二医院无造血系统恶性疾病的 7 例成人骨髓标本,其中男 5 例、女 2 例,年龄(33±6)岁。参照文献[8]分离骨髓标本后,采用 L-DMEM 培养基清洗骨髓,加入盛有 7 ml Percoll 细胞分离液(1.073 g/ml,美国 Pharmacia 公司)的离心管内,于离心半径 17.4 cm,3 000 r/min 离心 30 min(条件下同),清洗后接种于含体积分数 10% 胎牛血清(FCS,美国 Gibco 公司)的 L-DMEM 培养基,置入 37℃、体积分数 5% CO₂ 的培养箱内培养。24 h 后换液,此后每隔 2~3 d 换液 1 次。待贴壁细胞达到 80%~90% 融合时,采用 2.5 g/L 胰蛋白酶、0.2 g/L 乙二胺四乙酸(EDTA,美国 Gibco 公司)在室温下消化、离心、传代,选取第 3 代细胞进行以下实验。

作者单位:311201 杭州市萧山区疾病预防控制中心(王素一);
浙江大学医学院附属第二医院烧伤科(韩春茂、赖平平、岑航辉)
通讯作者:韩春茂,310009, Email: hancm@mail.hz.zj.cn, 电话:
0571-87783662

1.2 定向诱导人骨髓 MSC 向表皮细胞分化

将细胞分为对照组、实验组。对照组采用普通 L-DMEM 培养基培养,实验组采用含表皮生长因子(EGF)0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、胰岛素 0.01 g/ml 、维甲酸(美国 Sigma 公司)0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、氯化钙 0.015 g/L 的 L-DMEM 培养基培养。诱导 7 d 后进行检测。

1.3 观察细胞的形态变化

应用倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司)每日观察细胞的生长情况和形态变化。

1.4 免疫组织化学法检测人骨髓 MSC 中 P63 和广谱细胞角蛋白(PCK)的表达

磷酸盐缓冲液(PBS)清洗细胞,以体积分数 95% 乙醇固定 10 min,再采用 Tris 缓冲盐溶液(TBS)洗涤 3 次,每次 3 min,滴加 30 g/L 过氧化物酶阻断剂室温孵育 10 min,TBS 洗涤 3 次,每次 3 min,滴加正常非免疫动物血清室温孵育 10 min,再分别滴加鼠抗人 P63 抗体、鼠抗人 PCK 抗体(均为 1:200,福州迈新生物技术有限公司),室温孵育 1 h,TBS 洗涤,滴加生物素标记的羊抗鼠二抗室温孵育 10 min,TBS 洗涤,滴加链霉菌抗生物素、过氧化物酶溶液室温孵育 10 min,TBS 洗涤。二氨基联苯胺显色、苏木素复染,水性封片剂封片。

2 结果

2.1 人骨髓 MSC 的分离培养和扩增

骨髓经 Percoll 细胞分离液分离后可以看到明

显的 4 层,自上而下分别为 L-DMEM 培养液、单个核细胞层、Percoll 细胞分离液和红细胞层。单个核细胞接种 24 h 后换液,有少量 MSC 贴壁,呈比较均匀的成纤维细胞状(图 1a),未贴壁的细胞通过换液被除去。培养 3 d 的细胞增殖缓慢,后逐渐加快,培养 7~15 d 达 80%~90% 融合,细胞融合后排列呈旋涡状(图 1b)。传代细胞以 3×10^5 个/ml 的浓度接种 4~5 d 可达到 80%~90% 融合,传代后细胞形态趋于均一。

2.2 人骨髓 MSC 的形态观察

镜下观察到,随着培养时间的延长,实验组细胞由长梭形逐渐转变为扁圆形或形态不规则(图 1c),很少呈旋涡状排列,增殖能力明显减弱。对照组细胞形态未见明显改变,持续呈长梭形。

2.3 免疫组织化学法检测人骨髓 MSC 的 P63 和 PCK 的表达

实验组部分细胞 P63 和 PCK 呈棕黄色阳性表达(图 2a,b),对照组未见阳性细胞(图 2c)。

3 讨论

皮肤缺损患者由于切取自体皮时具有损伤性,特别是大面积皮肤缺损患者的创面覆盖与修复一直是临床医师倍感棘手的问题。随着组织工程皮肤研究的兴起和不断拓展,干细胞技术为解决这一难题带来了新的希望。MSC 具有很强的自我更新能力和多向分化潜能,且取材方便、免疫排斥反应小、增



图 1 诱导前后人骨髓间质干细胞的形态变化 倒置相差显微镜 $\times 200$ 。a. 接种 24 h 后可见少量细胞贴壁,呈成纤维细胞状;b. 融合的细胞为长梭形并呈旋涡状排列;c. 诱导 7 d 实验组细胞呈扁圆形或形态不规则



图 2 两组骨髓间质干细胞免疫组织化学观察结果 二氨基联苯胺/苏木素 $\times 400$ 。a. 实验组 P63 阳性细胞核呈棕黄色,胞质为蓝色;b. 实验组广谱细胞角蛋白阳性细胞胞质呈棕黄色,胞核为蓝色;c. 对照组细胞胞质、胞核均呈蓝色

殖能力强以及有利于外源性基因的导入和表达等,是临床细胞移植治疗和构建组织工程皮肤较为理想的种子细胞。已有关于 MSC 在体内可分化为表皮细胞的报道^[6,7]。本研究结果表明,人骨髓 MSC 在体外也可向表皮细胞分化。

对第 3 代人骨髓 MSC 采用流式细胞仪进行鉴定的结果显示,CD14/CD45、CD34/CD45、人白细胞抗原 DR (HLA-DR) 表达均呈阴性,极晚(激活)抗原 1 (VLA-1) 弱阳性,CD44/CD105 呈阳性。细胞周期检测结果显示,第 3 代 MSC G0/G1 期细胞约为 85.7%、S + G2 + M 期细胞占 14.3%,符合人骨髓 MSC 的特点,同时还成功地在体外诱导其分化为脂肪细胞和成骨细胞^[9]。

不少学者认为,MSC 的分化与微环境的“壁龛”密切相关。因此笔者模拟体内皮肤微环境配制了特殊的诱导液,除保持人骨髓 MSC 的增殖能力外,还可促进它向表皮细胞分化。在含体积分数 10% FCS 的 L-DMEM 培养基中加入 EGF、胰岛素、氯化钙等物质,其中 EGF 能促进细胞的生长和分化^[10];外源性钙离子在蛋白转录和转录后水平的调节中发挥着重要作用^[11],因此添加氯化钙可以提高外源性钙离子浓度。

本研究结果显示,诱导后部分人骨髓 MSC 由长梭形逐渐转变为扁圆形或形态不规则,近似于表皮细胞。免疫组织化学法检测结果显示,诱导后的人骨髓 MSC 表达 P63 和 PCK。Pellegrini 等^[12]认为 P63 是表皮干细胞的特异性标志物,而 PCK 则是公认的表皮细胞的重要标志物。因此在表皮细胞标志物方面,笔者选用了 P63 和 PCK,以便从不同角度检测细胞的分化情况。本研究的诱导剂不仅启动了人骨髓 MSC 向表皮祖细胞分化,还可以向终末的表皮细胞分化。

由于本研究未进行定量分析,因此不清楚具体的诱导分化时效,同时还需行体内动物实验来验证

分化后的细胞能否形成表皮,这些均有待进一步研究。总之,人骨髓 MSC 体外可诱导分化成不同阶段的表皮细胞,表皮祖细胞具有较强的增殖能力,可进一步分化为皮肤附属器细胞,有利于创面的愈合和功能的恢复,对今后组织工程和干细胞治疗有潜在的应用价值。

参考文献

- [1] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284 (5411):143 - 147.
- [2] 朱淑霞,宋治远,罗向东,等. 体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞的研究. *第三军医大学学报*, 2005, 27 (15):1555 - 1557.
- [3] 方利君,付小兵,孙同柱,等. 骨髓间充质干细胞分化为血管内皮细胞的实验研究. *中华烧伤杂志*, 2003, 19(1):22 - 24.
- [4] 李海红,付小兵,欧阳云淑,等. 人骨髓间充质干细胞表型转化为汗腺细胞的体外研究. *中华创伤杂志*, 2006, 22(2):81 - 86.
- [5] Krause DS, Theise ND, Collector MI, et al. Multiorgan, multilineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*, 2001, 105(3):369 - 377.
- [6] 方利君,付小兵,孙同柱,等. 在体诱导骨髓间充质干细胞分化为表皮细胞的初步观察. *中华创伤杂志*, 2003, 19(4):212 - 214.
- [7] 邹丽琴,苏踊跃,孙荣距,等. 大鼠骨髓间充质干细胞向表皮细胞分化的初步研究. *第三军医大学学报*, 2006, 28(6):584 - 586.
- [8] 赖平平,韩春茂,岑航辉,等. 骨髓间充质干细胞的分离培养和生物学性状. *浙江医学*, 2004, 26(5):328 - 330.
- [9] 岑航辉,韩春茂,赖平平,等. 成人骨髓间充质干细胞的体外诱导培养及向脂肪细胞的定向分化. *浙江大学学报(医学版)*, 2003, 32(2):137 - 140.
- [10] DiRenzo J, Signoretti S, Nakamura N, et al. Growth factor requirements and basal phenotype of an immortalized mammary epithelial cell line. *Cancer Res*, 2002, 62(1):89 - 98.
- [11] Elias P, Ahn SK, Denda M, et al. Modulations in epidermal calcium regulate the expression of differentiation-specific markers. *J Invest Dermatol*, 2002, 119(5):1128 - 1136.
- [12] Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, et al. P63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(6):3156 - 3161.

(收稿日期:2006-02-23)

(本文编辑:莫愚)

· 消息 ·

2007 年第五届全国烧伤救治专题研讨会征文通知

经中华医学会烧伤外科学分会和中华烧伤杂志编辑委员会常务委员在南昌审稿会上商议,拟定于 2007 年 6 月中旬,在重庆市召开“第五届全国烧伤救治专题研讨会”,重点探讨严重烧伤后脏器损害的发病机制及临床处理措施。文稿被收入会议的论文汇编后,当年可在“中国重要会议论文全文数据库”中检索并阅读。征文要求:(1)未曾公开发表或近一年来发表但未在本系列研讨会上交流过的论文全文 1 份及 300 字以内的中文摘要 2 份。(2)撰写顺序:文题、姓名、作者单位、邮政编码、摘要、正文。(3)稿件用 A4 纸打印,加盖单位公章并附寄 Word 格式软盘。截稿日期:2007 年 3 月 31 日。来稿请寄:重庆市沙坪坝区西南医院中华烧伤杂志编辑部收,邮编 400038。请在信封左下角注明:会议投稿。欢迎用电子邮件形式投稿,Email: cmashz@mail.tmmu.com.cn,电话:023-68754670-602,传真:023-65460398。联系人:付佑梅。