

[文章编号] 1000- 4718(2006)04- 0810- 04

小鼠胎肝间质干细胞体外向肌样细胞分化的研究*

姜 铨[#], 张 洹[△]

(暨南大学医学院血液病研究所, 广东 广州 510632)

[摘要] 目的: 了解小鼠胎肝间质干细胞在体外向肌样细胞分化的潜能。方法: 无菌条件下从正常 C57BL/ 6J 胎鼠肝脏中分离出间质干细胞, 体外培养传 3 代后用 5- 氮胞苷和二性霉素 B 诱导分化, 观察胎肝间质干细胞诱导前后形态变化; 用 RT- PCR 检测细胞诱导前后, 成肌调控基因 Myf5 和成肌素 myogenin 的表达情况; 诱导后 7 d 和 14 d 行免疫细胞化学染色鉴定诱导后细胞结蛋白和 α - 肌动蛋白的表达。结果: RT- PCR 显示诱导后 6 h 至 72 h 成肌调控基因 Myf5 和 myogenin 序贯表达, 而诱导前的细胞则没有检测到表达; 免疫细胞化学染色提示第 7 d 细胞结蛋白和 α - 肌动蛋白表达阳性, 第 14 d 阳性率明显升高。结论: 胎肝中分离出的间质干细胞在体外可以定向诱导分化为肌样细胞。

[关键词] 胎儿肝脏; 间质干细胞; 骨骼肌细胞; 细胞分化

[中图分类号] R329. 21 [文献标识码] A

Differentiation of mesenchymal cells derived from mouse fetal liver into skeletal muscle- like cells *in vitro*

JIANG Hua, ZHANG Yuan

(Institute of Hematology, Medical College of Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[ABSTRACT] AIM: To study whether mesenchymal stem cells (MSCs) from fetal liver can differentiate into skeletal muscle- like cells. METHODS: MSCs were isolated from C57BL/ 6J mouse fetal liver and were induced by 5- azacytidine and amphotericin B. Myf5 and myogenin were tested by RT- PCR. Desmin and β - actin was examined by immunocytochemistry. RESULTS: RT- PCR showed that the treated cells expressed Myf5 and myogenin orderly from 6 hours to 72 hours, while the untreated cells did not. Immunocytochemistry confirmed that these cells were positive for desmin and β - actin and the positive rate was higher in 7 days than that in 14 days. CONCLUSION: MSCs derived from fetal liver can be induced into skeletal muscle- like cells *in vitro*.

[KEY WORDS] Fetal liver; Mesenchymal stem cells; Skeletal muscle cells; Cell differentiation

成体干细胞向肌细胞的分化使得很多肌肉退行性遗传性疾病的治疗多了一种更佳的选择, 同时胚胎干细胞的应用也正在发生积极的变化。间质干细胞属于成体干细胞, 已有研究发现它可以向骨、软骨、肌腱、脂肪组织、肌肉以及造血细胞、神经细胞、肺上皮细胞、肾细胞、胰岛 β - 细胞等^[1- 4]分化。胚胎肝脏比骨髓发育早, 胎肝细胞可能具有比骨髓细胞更强的增殖分化能力和更低的免疫原性和免疫活性^[5]。

在妊娠 11. 5- 15 d, 小鼠胚胎肝脏造血处于旺盛时期, 含有大量的造血干细胞, 同时还含有大量支持造血的间质干细胞等^[6]。近年来一些研究报道骨髓

间质干细胞、脐血间质干细胞在体内外可以分化成肌样细胞^[7, 8]。目前对胚胎肝间质干细胞向肌样细胞的分化尚未见报道。本研究探索了小鼠胚胎肝间质干细胞在 5- 氮胞苷和二性霉素 B 诱导下向肌样细胞分化的潜能, 为进一步研究胎肝间质干细胞向肌肉组织分化和临床应用胎肝间质干细胞治疗如进行性肌营养不良等肌源性疾病打下基础。

材 料 和 方 法

1 动物和试剂

孕 13. 5 d 的 C57BL/ 6J 小鼠(广州医学院实验动物中心)。DMEM/ HEPES/ F12(Sigma 公司), 胎牛血

[收稿日期] 2004- 09- 09 [修回日期] 2004- 12- 02

* [基金项目] 国务院侨办重点学科建设基金资助项目(2005)

[△]通讯作者 Tel: 020- 85220262; E- mail: tzyuan@ jnu. edu. cn

[#] 现工作单位: 邵阳医学院附属太和医院血液科

清(FBS, 杭州四季青公司), 5- 氮胞苷(5- azacytidine, Sigma 公司), 二性霉素 B(amphotericin B, Sigma 公司), 纤连蛋白(fibronectin, R&D 公司), 碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, Pepro Tech 公司), 结蛋白(desmin, DAKO 公司), α - 肌动蛋白(α - actin, Neomarker 公司), SABC 试剂盒、DAB 显色试剂盒(武汉博士德公司), Trizol reagent (Gibco 公司), RT- PCR 试剂盒(上海申能博彩公司), 引物合成(上海生工生物工程技术有限公司)。

2 胎肝间质干细胞的获取和培养

参照 Campagnoli 等^[9]胎肝间质干细胞贴壁筛选法, 无菌条件下取出胎龄 13.5 d 的 C57BL/6J 胎鼠, PBS 洗 2 次后, 取出胎肝, 置于 8 mL 4 °C 含 2% FBS 的 Hanks 平衡盐溶液中, 用眼科剪将肝组织剪成 1 mm × 1 mm × 1 mm 左右小块, 加入完全培养基(含 10⁵ U/L 青霉素, 100 mg/L 链霉素, 10% FBS 的 DMEM/HEPES/F12 培养液)反复吹打, 过 4 号针头制成单细胞悬液。按细胞密度 1 × 10⁶ cells/cm² 接种在 T- 25 塑料培养瓶中, 完全培养基, 37 °C、饱和湿度的 5% CO₂ 孵箱培养。24 h 后首次更换培养液, 弃去未贴壁细胞, 2- 3 d 半量换液 1 次, 接近融合的胎肝间质干细胞用 0.25% 胰酶 37 °C 消化 1- 5 min, 加入新鲜的完全培养基终止消化, 吸管吹打成单细胞悬液, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 沉淀按 1: 2 比例传代培养。

3 定向诱导胎肝间质干细胞向肌样细胞分化

将 10 mg/L 纤连蛋白置于事先放有消毒盖玻片的 6 孔培养板, 室温下孵育过夜, 然后用 PBS (pH 7.4) 清洗 2- 3 次。将传至第 3 代的细胞按 5 × 10⁵ cells/cm² 密度接种于经纤连蛋白包被的 6 孔培养板内制备细胞爬片。每孔加 3 mL 完全培养基, 达到 60% - 70% 融合时, 加入含 10 μmol/L 5- 氮胞苷, 1 mg/L 二性霉素 B 的完全培养基诱导 24 h, PBS 洗涤 2 次, 然后换新的完全培养基, 培养 7- 14 d。对照组仅用完全培养基培养, 不加任何诱导剂。倒置相差显微镜下观察胎肝间质干细胞诱导后的形态变化。

4 免疫细胞化学鉴定

分别于诱导后 7 d、14 d 进行免疫细胞化学鉴定。PBS 洗涤细胞爬片 2 次, 4% 多聚甲醛固定 10 min, PBS 洗涤。0.1% Triton、3% H₂O₂ 孵育 10 min 阻断内源性过氧化物酶。正常山羊血清工作液室温孵育 10 min, 去血清分别加 I 抗, 置于湿盒中 4 °C 过夜, PBS 洗 3 次, 加生物素标记的 II 抗室温孵育 30 min, PBS 洗 3 次, 再与辣根过氧化物酶标记链酶卵白素工作液室温孵育 30 min, PBS 洗 3 次, DAB 显色 10- 20 min。染色完成后, 苏木素复染细胞核, 用中

性树脂封片。然后在普通光学显微镜下观察, 随机取 10 个视野, 计数细胞总数和阳性细胞数并计算阳性率。空白对照用 0.01 mol/L 的 PBS 代替 I 抗。实验对照将未加诱导剂的细胞爬片直接用 4% 多聚甲醛固定后进行免疫细胞化学染色。

5 RT- PCR 鉴定肌肉细胞特异基因的表达

引物设计: Myf5 上游: 5' - CAG CCC CAC CTC CAA CTG CTA - 3', 下游: 5' - GGA GAG AGG GAA GCT GTG T - 3' (225 bp); myogenin 上游: 5' - AGG AGA GAA AGA TGG AGT CCA GAG - 3', 下游: 5' - TAA CAA AAG AAG TCA CCC CAA GAG - 3' (430 bp); β - actin(内对照) 上游: 5' - AGC TTG CTG TAT TCC CCT CCA TCG TG - 3', 下游: 5' - AAT TCG GAT GGC TAC GTA CAT GGC TG - 3' (324 bp)。分别收集未诱导、诱导后 6 h、9 h、12 h、24 h、48 h、72 h 的胎肝间质干细胞用 Trizol 试剂提取总 RNA, 普通琼脂糖凝胶(0.8%)和紫外分光光度计检测 RNA 质量。再以 RNA 为模板合成 cDNA, 逆转录的条件为 37 °C 60 min, 95 °C 灭活 5 min。然后以 cDNA 为模板扩增 Myf5、myogenin 以及 β - actin, 条件为 94 °C 2 min, 接循环反应: 94 °C 40 s、54 °C 40 s、72 °C 40 s, 共 34 个循环, 72 °C 延伸 10 min 结束反应, 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙啶显色, 观察结果并摄像。

结 果

1 胎肝间质干细胞诱导前后的形态变化

采用该完全培养基培养的胎肝细胞, 24 h 内可见较多细胞贴壁, 倒置显微镜下, 贴壁细胞成圆形。72 h 后, 大多数有胞质突起, 部分成梭形, 原代培养 1 周后细胞 80% 融合, 可见上皮样细胞和梭形细胞(图 1A)。第 3 代细胞培养后以梭形细胞为主, 细胞成平行排列生长(图 1B)。诱导 1 周左右出现细胞体积及核增大, 部分细胞变为长杆状, 2 周左右细胞呈管状样形态并可见 2- 3 个细胞之间的融合, 有少量类肌管样结构出现。未处理组细胞定期传代, 细胞形态没有明显变化。

2 免疫组化鉴定

为明确胎肝间质干细胞诱导分化后的抗原表达特点, 采用肌肉组织特异性标记结蛋白、 α - 肌动蛋白对未诱导处理的胎肝间质干细胞和诱导处理 7 d 和 14 d 后的细胞分别进行鉴定(图 2A、B)。诱导后细胞有结蛋白、 α - 肌动蛋白的表达, 诱导后 7 d 其阳性率分别为(10.6 ± 2.7)%、(8.6 ± 2.1)%, 诱导后 14 d 阳性表达率分别为(83.1 ± 8.4)%、(77.6 ± 7.9)%。经统计学分析显示, 上述 2 种抗原在 7 d 与 14 d 的阳性表达率均有明显差异($P < 0.05$)。未诱导细胞组及空白对照组显色均阴性。

3 RT-PCR 检测基因表达的变化

胎肝间质干细胞经 5- 氮胞苷和二性霉素 B 处理后各时点的总 RNA 分别经 Myf5、myogenin 基因特异引物 RT-PCR 扩增(图 3), 电泳显示诱导 6 h, 胎

肝间质干细胞开始表达 Myf5, 9 h 达高峰; 诱导 24 h 胎肝间质干细胞开始表达 myogenin, 48 h 达最高。未经 5- 氮胞苷和二性霉素 B 处理的细胞总 RNA 经 RT-PCR 扩增后基因无特异目的条带。

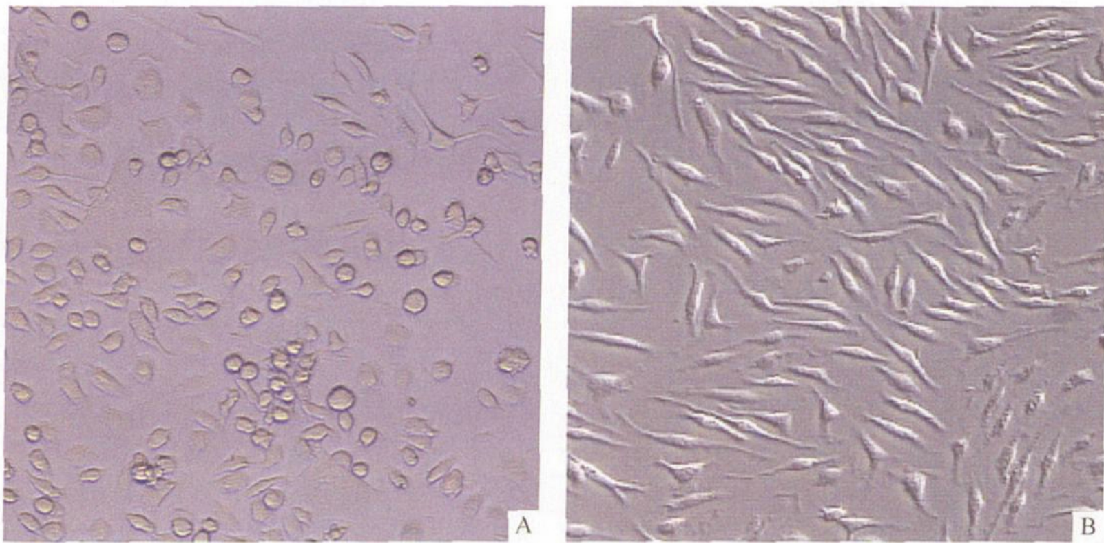


Fig 1 Primary plastic-adherent cells derived from fetal liver (A) and mesenchymal stem cells from fetal liver after passage (B).
图 1 胎肝原代贴壁细胞 (A) 和传代后的间质干细胞 (B)

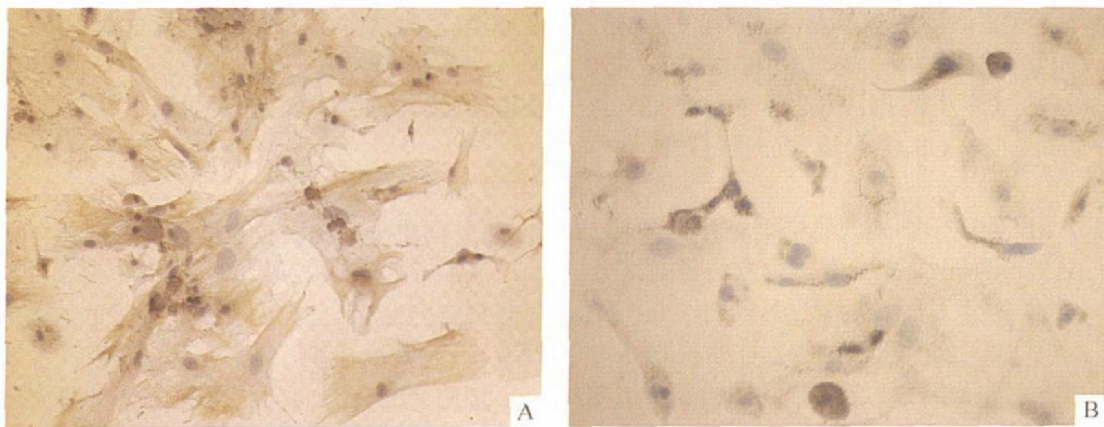


Fig 2 Identification of skeletal muscle-like cells by immunocytochemistry (Positive DAB staining, $\times 200$). A: desmin; B: α -actin.
图 2 免疫细胞化学染色鉴定肌样细胞 (A: I 抗为结蛋白, B: I 抗为 α - 肌动蛋白)

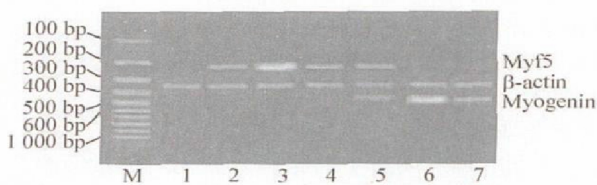


Fig 3 RT-PCR detection of gene expression related to skeletal muscle in different times. M: marker 1: 0 h; 2: 6 h; 3: 9 h; 4: 12 h; 5: 24 h; 6: 48 h; 7: 72 h.

图 3 RT-PCR 检测诱导前后不同时点成肌相关基因的表达

讨 论

1995 年, Wakitani 等^[7]首次证实 5- 氮胞苷可诱导骨髓间质干细胞分化为肌性细胞。随后亦有其它

的干细胞向肌性细胞分化的研究^[15]。而胎肝间质干细胞是否也能向肌性细胞分化尚无报道。本研究中, 胎龄 13.5 d 的小鼠处于造血的旺盛时期, 胚胎肝含有大量支持造血的间质干细胞, 利用间质干细胞在体外原代培养的粘附特性可以获取间质干细胞^[10-12]。本实验证明了体外培养的胎肝间质干细胞经过 5- 氮胞苷和二性霉素 B 程序化诱导可以分化为肌样细胞。

因为至今还未筛选到间质干细胞特有的标志分子, 目前尚无直接方法可鉴定间质干细胞, 大多是通过密度梯度分离或差速贴壁分离得到细胞后在培养过程中出现分化表型而确认。贴壁筛选法最初是应用在骨髓间质干细胞分离上的, 随后发现在胎肝间质干细胞的分离中也同样是非常有效的^[9]。该方法

利用间质干细胞较强的贴壁能力和生存能力,在细胞培养中逐渐淘汰贴壁能力差和生存能力差的非间质干细胞。本实验中,在 10% FBS 的 DMEM/HEPES/F12 培养体系中进行胎肝间质干细胞的培养时,发现原代培养的胎肝细胞形态很不均一,传代后非间质干细胞会随着培养时间的延长而逐渐破碎消失,而间质干细胞则不断地增殖,传 3 代后即可得到较均一的胎肝间质干细胞。

本实验诱导条件之一是 5- 氮胞苷。5- 氮胞苷是一种 DNA 甲基化抑制剂,在肿瘤治疗中可抑制细胞的增殖,诱导细胞分化。研究发现,它可与 DNA 共价结合形成复合物从而导致 DNA 甲基在细胞分裂周期中进行性丢失,发挥去甲基化作用;而甲基化对于基因印记维持是必需的,5- 氮胞苷作用后产生去甲基化作用可使基因印记丢失,使某些相关等位基因得以表达^[13]。由于间质干细胞具有向肌细胞分化潜能,Konieczny 等^[14]认为骨髓间质干细胞的成肌调控基因甲基化时处于转录失活状态,5- 氮胞苷为甲基转移酶抑制剂,在其作用下成肌调控基因发生去甲基化而被激活,使细胞向成肌细胞方向分化。Myf5、myogenin 均属于成肌调节因子家族,Myf5 为初级成肌调节因子,负责调控成肌的定向分化,myogenin 为次级成肌调节因子,调控成肌的终末分化。本实验发现,Myf5 基因的表达早于 myogenin 基因的表达,与该理论是相吻合的。

二性霉素 B 亦可促进间质干细胞向肌细胞的分化。bFGF 在体内参与组织修复,刺激内皮细胞,间质干细胞等多种细胞的生长,与其它细胞生长因子不同,它缺少引导分泌的系列,不能外分泌。通常认为细胞死亡、物理化学损伤、辐射、或感染引起的细胞膜损伤或溶解而被释放到细胞外。因此在诱导后的培养基中加入 bFGF 可以给培养的间充质干细胞发出组织发生损伤、需要修复的信号,促使干细胞进行分化,这可能也有助于激活干细胞的分化潜能。

在本实验中,胎肝间质干细胞经 5- 氮胞苷和二性霉素 B 诱导后第 7 d、14 d 的细胞进行免疫组织化学染色,检测结蛋白、 α - 肌动蛋白等肌细胞特异性蛋白的表达。结果实验组中培养后第 7 d、14 d 的细胞进行免疫组织化学染色呈阳性,且第 14 d 的阳性率明显升高,而对照组中各种时间段的细胞行免疫组织化学染色呈阴性。这些都说明胎肝间质干细胞在体外经 5- 氮胞苷和二性霉素 B 定向诱导后一定时间内可以肌样分化。

胎肝间质干细胞可以分化为肌样细胞,为成体干细胞分化的研究提供了一种新的种子细胞,同时为杜氏肌营养不良等目前无法根治的遗传性肌病的细胞治疗提供了一些思路。我们的实验结果仅仅证

明了它们可以分化为肌样细胞,但是否具有肌细胞的功能,尚待进一步研究。下一步我们将把该类细胞植入肌损伤模型的动物体内,观察功能的恢复情况。

[参 考 文 献]

- [1] Jiang YH, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. *Nature*, 2002, 418(6893): 41- 49.
- [2] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143- 147.
- [3] 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(9): 1797- 1801.
- [4] 原清涛,邓宇斌,刘晓刚,等. 隐丹参酮诱导猴骨髓间质干细胞分化为神经元样细胞[J]. *中国病理生理杂志*, 2005, 21(5): 993- 996.
- [5] Blair A, Thomas DB. The proliferative status of haematopoietic progenitor cells in the developing murine liver and adult bone marrow[J]. *J Anat*, 1998, 193(Pt3): 443- 447.
- [6] Massimo S, Prolo O, Elena B, et al. Long- term cultures of human fetal liver cells: a three dimensional experimental model for monitoring liver tissue development[J]. *J Hepatol*, 1998, 28(3): 480- 490.
- [7] Wakitani S, Saito T, Caplan AL, et al. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5- azacytidine[J]. *Muscle Nerve*, 1995, 18(12): 1417- 1426.
- [8] Eun JG, Ju AJ, Seung HH, et al. Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood[J]. *Stem Cells*, 2004, 22(4): 617- 624.
- [9] Campagnoli C, Roberts IAG, Kumar S, et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first- trimester fetal blood, liver and bone marrow[J]. *Blood*, 2001, 98(8): 2396- 2402.
- [10] Chagraoui J, Lepage NA, Anjo A, et al. Fetal liver stroma consists of cells in epithelial to mesenchymal transition[J]. *Blood*, 2003, 101(8): 2973- 2982.
- [11] James ED, Pierre C. Origin and differentiation of human and murine stroma[J]. *Stem Cells*, 2002, 20(3): 205- 214.
- [12] Tocci A, Rezzoug F, Wahbi K, et al. Fetal liver generate slow CD4 hematopoietic cells in murine stromal cultures[J]. *Blood*, 1995, 85(6): 1463- 1471.
- [13] Robertson KD, Jones PA. DNA methylation: past, present and future directions[J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21(2): 461- 467.
- [14] Konieczny SF, Emerson CP. Induction of stable mesodermal stem cell lineages from 10T1/2 cells: Evidence for regulatory genes controlling determination[J]. *Cell*, 1984, 38(3): 791- 800.
- [15] 李中,张成,陈国俊,等. 骨髓间质干细胞移植治疗假肥大型肌营养不良症模型鼠后运动功能的改善[J]. *中国病理生理杂志*, 2004, 20(9): 1547- 1552.