论著

文章编号:1000-5404(2006)06-0584-03

大鼠骨髓间充质干细胞向表皮细胞分化的初步研究

邹丽琴,苏踊跃,孙荣距,陈 建,梁光萍,罗向东 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 体外分离培养骨髓间充质干细胞,并探索表皮细胞生长因子诱导 MSCs 分化的潜能及条件。**方法** 采用直接贴壁法,分离培养大鼠股骨和胫骨骨髓间充质干细胞,应用免疫细胞化学法检测细胞 CD44、CD106、CD29、CD90、CD34 等,对分离的细胞进行鉴定。以 10~40 ng/ml 的表皮生长因子处理第 3 代 MSCs,观察细胞角蛋白的表达。用 Western blot 方法摸索 integrin β1 的表达与 MSCs 分化状态的关系。**结果** 原代培养的骨髓间充质细胞 CD44、CD106、CD29、CD90 免疫细胞化学染色为阳性,CD34 为阴性,符合骨髓间充质干细胞特征。MSCs 经不同浓度的 EGF 体外诱导 7 d 后,免疫细胞化学结果显示,EGF 浓度为 30 ng/ml 和 40 ng/ml 时,细胞角蛋白出现阳性表达;体外诱导 14 d,呈角蛋白染色阳性的细胞比例进一步增加,同时 integrin β1 表达量下降。**结论** 体外培养的 MSCs 在 EGF 诱导下,具有分化为表皮细胞的倾向,同时 integrin β1 可能在 MSCs 分化中具有一定的作用。

关键词: 骨髓间充质干细胞;表皮细胞;表皮生长因子;分化

中图法分类号: R322.991;R329.21;R329.24 **文献标识码:** A

Differentiation of mesenchymal stem cells into epidermal cells

ZOU Li-qin, SU Yong-yue, SUN Rong-ju, CHEN Jian, LIANG Guang-ping, LUO Xiang-dong (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To culture and identify mesenchymal stem cells (MSCs) *in vitro* and explore the potential and condition of MSCs differentiation into epidermal cells. **Methods** The MSCs were isolated from the femoral bone and tibia of Wistar rats. Identification of MSCs was by detecting CD44, CD106, CD29, CD90 and CD34 of cultured cells by ICH. The epidermal growth factor of 10, 20, 30 and 40 ng/ml was respectively added into the mixture of 50% DMEM-F12 and 50% FAD to induce MSCs differentiate into epidermal cells. The expression of integrin β1 was detected by Western blotting, and the relationship between integrin β1 expression and MSCs differentiation was analyzed. **Results** CD44, CD106, CD29 and CD90 were positive, CD34 was negative in the cultured cells, indicating the cultured cells were MSCs. After 7-day induction by 30 ng/ml and 40 ng/ml EGF, few cells were positive of cytokeratin. Fourteen days later, the quantity of positive cytokeratin cells increased, but the expression of integrin β1 decreased. **Conclusion** MSCs cultured *in vitro* have the potential to differentiate into epidermal cells, and during this process the integrin β1 might play a role in the MSCs differentiation.

Key words: mesenchymal stem cells; epidermal cells; epidermal growth factor; differentiation

骨髓间充质干细胞是存在于骨髓基质内的非造血细胞来源的细胞亚群,它们可以在体外经诱导后最终分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肌腱细胞、肌管、神经细胞与支持造血干细胞的基质[1]。由于间充质干细胞取材相对简单,具有多向分化潜能,其作为组织工程的潜能种子细胞一直是近来科研的热点之一。

创面处理是大面积烧伤救治处理的基础问题和核心问题,自体皮源的不足是大面积烧伤治疗的瓶颈,实验表明,野生型 ES 细胞[2]能在体外培养条件下分化成上皮细胞,表皮干细胞[3]在特定条件下如皮肤缺损可进行表皮再生,因此利用胚胎干细胞、表皮干细胞等生物工程的种子细胞,构建可用于创面移植的组织工程皮肤,具有深远的意义。而利用某些化学物质或生物因子诱导间充质干细胞向表皮细胞分化的研究刚刚起步[4]。

烧伤创面外用表皮生长因子(epidermal growth

作者简介:邹丽琴(1979-),女,江西省抚州市人,硕士研究生,主要从事细胞增殖分化方面的研究。电话:(023)68754149-8082

通讯作者:罗向东,E-mail:luoxd@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2005-11-07;修回日期:2006-02-21

factor，EGF）是最早发现的生长因子之一，它能促进细胞增长，加快修复表皮的速度，是多种细胞分裂增殖的刺激源。EGF 可明显缩短创面愈合天数。本研究拟利用 EGF 诱导刺激体外分离的 MSCs，并加入表皮干细胞培养液 FAD，探讨骨髓间充质干细胞（mesenchymal stem cells，MSCs）向表皮细胞分化的可行性及条件，为皮肤组织工程提供种子细胞。

1　材料与方法

1.1　大鼠骨髓间充质干细胞的体外分离培养

用 2 ml 1% 戊巴比妥钠腹腔注射 Wistar 大鼠（由第三军医大学实验动物中心提供），麻醉致死，分离股骨、胫骨，取骨髓液，采用直接贴壁法，置含 10% 胎牛血清（Hyclone）的 DMEM-F12 培养基中培养，4 h 后全量换液。每 2～3 d 换液 1 次，5～7 d 后达到约 80% 融合，0.25% 胰酶-0.02% EDTA（Sigma，USA）消化 2～3 min，1 500 r/min，离心 5 min，按 1∶3 传代培养，留取第 3 代备用。

1.2　MSCs 的免疫细胞化学鉴定

取生长状态良好的第 3 代贴壁细胞，60% 左右融合度，以 4% 多聚甲醛 4 ℃ 固定过夜，免疫细胞化学染色按照即用型 SABC 免疫组化试剂盒（武汉博士德，SA1022）说明操作。一抗应用：CD44、CD106（武汉博士德，兔多克隆抗体）。二抗应用试剂盒提供的抗体，稀释比例均为 1∶100。

免疫荧光染色将固定细胞于 5% BSA 封闭 1 h，滴加一抗，4 ℃ 过夜。一抗应用：CD29、CD90、CD34（Santa Cruz，山羊多克隆抗体 IgG），稀释比例为 1∶（50～200）。二抗应用 FICT 标记兔抗山羊 IgG（北京中杉，ZF－0314），稀释比例均为 1∶100。其中 CD29、CD34 中二抗应用 0.005% 伊文思蓝液稀释，复染；CD90 中二抗应用 PBS 稀释。

1.3　MSCs 向表皮细胞诱导分化

细胞传代后，含 10% 胎牛血清的 DMEM-F12 培养液与表皮干细胞培养液 FAD 1∶1 混合，加入浓度分别为 0、10、20、30、40 ng/ml 的表皮生长因子，每 3 d 换液 1 次，分别诱导 7 d 或 14 d 后，用免疫细胞化学法检测广谱角蛋白（DAKO 公司）的表达，Western blot 方法检测诱导前后细胞 integrin β1 的表达。

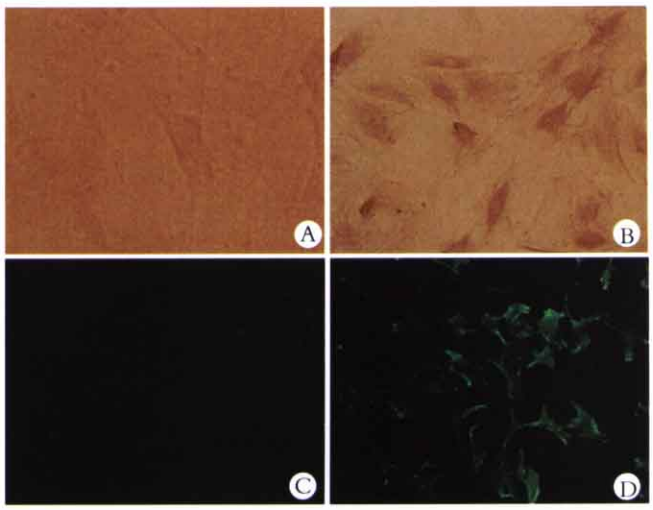
2　结果

2.1　MSCs 的分离培养和鉴定

骨髓液接种于培养瓶后，5～7 d 能达到接近融合状态，此时贴壁细胞中混有血细胞、巨噬细胞等杂细胞，经 3～4 次传代后基本纯化，细胞形态较为均一，呈长梭形或纺锤形。分离培养细胞的免疫细胞化学和免疫荧光鉴定结果显示，MSCs 中 CD44、CD106、CD29、CD90 呈阳性，细胞核周围出现棕红色染色或荧光（图 1），CD34 为阴性。

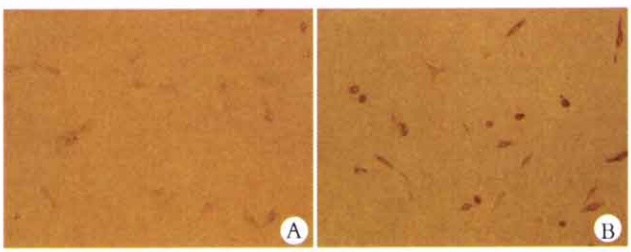
2.2　MSCs 向表皮细胞分化的鉴定

细胞经诱导 7 d 后，30、40 ng/ml EGF 的刺激浓度组出现少量细胞呈现角蛋白染色抗体阳性结果，两者差别不大，说明 30 ng/ml 为适宜刺激浓度。在此浓度下诱导 14 d 后，呈阳性结果的细胞数量有所增加（图 2）。



A：CD44 阴性对照（未加一抗，SABC ×200）；B：CD44 阳性染色（SABC ×200）；C：CD90 阴性对照（免疫荧光 ×200）；D：CD90 阳性染色（免疫荧光 ×200）

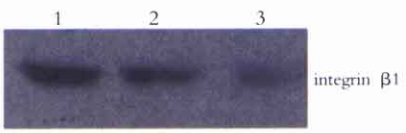
图 1　培养细胞的免疫细胞化学鉴定



A：角蛋白阴性对照（未加一抗）；B：角蛋白阳性染色。

图 2　MSCs 诱导分化的免疫细胞化学鉴定　（SABC × 100）

提取未经诱导细胞以及在 30 ng/ml EGF 刺激浓度下分别诱导 7、14 d 的细胞蛋白，通过 Westernblot 方法检测 3 种状态下 integrin β1 的表达（图 3），可见随时间的延长，细胞内 integrin β1 的表达下降。



1：无诱导；2：EGF 诱导 7 d；3：EGF 诱导 14 d

图 3　EGF 诱导对 MSCs integrin βI 表达的影响

3　讨论

骨髓间充质干细胞具有高度自我更新和多向分化潜能等优点，由于其易取材、方便导入外源基因、自体移植不存在排斥反应，因此在组织工程学方面得到了极大的关注。随着其研究的不断深入，越来越多的学者认为体外培养的 MSCs 具有异质性[5]。目前 MSCs 表面标记的研究结论极不一致，还未发现任何一种能用来分离“纯” MSCs 的独特表型标记。一般从形态、

检测其细胞表面一系列标志蛋白、验证其在体外的分化能力来间接说明。而物理性富集塑料器皿内的贴壁培养仍是分离 MSCs 的基本方法。

本实验将分离的骨髓液 4 h 贴壁后，弃去悬浮细胞后全量换液，经 3～4 次传代，贴壁细胞形态逐渐趋于一致，呈成纤维状或纺锤形。利用免疫细胞化学法和免疫荧光法显示体外培养扩增的细胞中 CD44、CD106、CD29、CD90 呈阳性，CD34 呈阴性，说明分离细胞为 MSCs，不含造血细胞或血管内皮细胞。

据文献[6]报道，将体外培养的骨髓间充质干细胞直接加入皮肤创伤部位，可发现在创伤微环境下能加速愈合，具有向表皮细胞分化的趋势。大面积烧伤伤及皮肤全层及附件时，仅靠创面自身难以实现皮肤的再生，需要足够的皮肤替代物进行修复。而 MSCs 具有可自体取材、体外培养扩增、避免排斥反应等优势，使其在皮肤的组织工程学上具有潜在的应用价值。

角蛋白是表皮细胞的结构蛋白，在细胞内形成广泛的网状结构。随分化程度的不同，表皮细胞表达不同的角蛋白。本实验利用 EGF 和培养表皮干细胞的 FAD 培养液，诱导体外培养的 MSCs 向表皮细胞分化，结果发现诱导 7、14 d 后，细胞内广谱角蛋白呈阳性，说明 EGF 具有刺激 MSCs 向表皮细胞分化的趋势，随时间延长效果增强。Western blot 结果显示 30 ng/ml EGF 诱导细胞后 integrin β1 表达量较诱导前降低，并呈时间依赖性趋势。既往研究表明，integrin β1 是表皮干细胞的标记之一，高浓度 integrin β1 抑制表皮干细胞向表皮细胞的分化，低浓度 integrin β1 促进其向表皮细胞分化[7]。而 integrin β1 的表达是否与 MSCs 的分化状态相关，尚未见文献报道。本实验显示，经 EGF 诱导的 MSCs 具有向表皮细胞分化趋势，同时 integrin β1 表达量下降，提示 integrin β1 可能在 MSCs 分化中具有一定的作用。

本实验初步探索了大鼠 MSCs 向表皮细胞分化的可能性，为寻找表皮组织工程种子细胞提供了一定的线索和思路。

参考文献：

[1] MINGUELL J J, ERICES A, CONGET P. Mesenchymal stem cells [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2001, 226(6): 507－520.

[2] BAGUTTI C, WOBUS A M, FASSLER R, *et al*. Differentiation of embryonal stem cells into keratinocytes: comparison of wild-type and beta 1 integrin-deficient cells[J]. Dev Biol, 1996, 179(1): 184－196.

[3] LIMAT A, MAURI D, HUNZIKER T. Successful treatment of chronic leg ulcers with epidermal equivalents generated from cultured autologous outer root sheath cells[J]. J Invest Dermatol, 1996, 107(1): 128－135.

[4] 方利君，付小兵，王玉新，等. 体外诱导骨髓间充质干细胞分化为上皮细胞的研究[J]. 中华实验外科杂志，2004，21(2)：171－172.

[5] COLTER D C, CLASS R, DIGIROLAMO C M, *et al*. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(7): 3213－3218.

[6] JIANG Y, VAESSEN B, LENVIK T, *et al*. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain[J]. Exp Hematol, 2002, 30(8): 896－904.

[7] BODEAU A L, BERRIER A L, MASTRANGELO A M, *et al*. A functional comparison of mutations in integrin beta cytoplasmic domains: effects on the regulation of tyrosine phosphorylation, cell spreading, cell attachment and beta1 integrin conformation[J]. J Cell Sci, 2001, 114(Pt 15): 2795－2807.

（编辑 陈聪连）

（上接 583 页）

组除 2 例出现高氯性酸中毒外，其余患者在随访过程中生化检查均未发现异常，这可能与患者自身代偿调节有关。我们注意到本组 2 例出现高氯性酸中毒的患者均是发生在开展手术的初期，使用肠管的长度在 60 cm，年龄分别为 69 岁，71 岁。我们认为出现高氯性酸中毒除了使用肠管长度过长外，可能还与老年人自身调节能力降低有关，因此我们认为肠管长度不应超过 50 cm，特别对于老年患者，在术中应多次精确测量。

Studer 等认为可控回肠代膀胱术仅适用于男性。近年来通过对女性控尿机制的深入研究[3]，认为女性尿道中下段 1/3 有平滑肌和横纹肌，称为横纹括约肌。保证排尿可控机制不受损害的关键是，保护好支配尿道的神经及尿道周围组织[4]，而切除膀胱颈不会损伤可控机制。本组 4 例中，1 例保留膀胱颈，3 例切除膀胱颈，术后控尿均满意。

由于患者排尿接近于正常生理状况，生活质量明显提高，容易被患者接受，因此，我们认为该手术是一种比较理想的尿流改道方式。由于缺乏术后尿流动力学检查，不能评估回肠膀胱内压力的变化及对上尿路的影响，这些患者有待继续观察。

关键词：Studer；膀胱癌；回肠代膀胱术

中图法分类号：R737.14 文献标识码：B

参考文献：

[1] STUDER U E, ACKERMANN D, GASANOVA G A, *et al*. Three years' experience with an ileal low pressure bladder substitute[J]. Br J Urol, 1989, 63(1): 43－52.

[2] CAMEA M, RICHARD F, BOTTO H. Bladder replacement by ileocystoplasty[M]// KING L R, STONE A R, WEBSTER G D. Bladder reconstruction and continent urinary diversion. Chicago: Year Book Medical Publishers, 1987: 336－359.

[3] KOCK N G, NILSON A E, NILSON L O, *et al*. Urinary diversion *via* a continent ileal reservoir: clinical results in 12 patients[J]. J Urol, 1982, 128(3): 469－475.

[4] MILLS R D, STUDER U E. Metabolic consequences of continent urinary diversion[J]. J Urol, 1999, 161(4): 1057－1066.

[5] COLLESELLI K, STENZL A, EDER R, *et al*. The female urethral sphincter: a morphological and topographical study[J]. J Urol, 1998, 160(1): 49－54.

[6] 杨远洁，殷 民，杨曼世，等. 女性去带盖结肠前膀胱术(附四例报告)[J]. 中华泌尿外科杂志，2003，24(7)：448－450.

（编辑 龙 亮）