论著

文章编号:1000-5404(2008)18-1718-04

胎儿肠壁结缔组织诱导骨髓间充质干细胞向肠上皮细胞的分化

段江洁[1],王 蓓[1],张建华[2],姜 蓉[1],汪维伟[1] (重庆医科大学:[1]基础医学院干细胞与组织工程研究室,组织胚胎学教研室;[2]临床学院妇产科,重庆 400016)

摘 要:目的 观察胎儿肠壁结缔组织能否诱导骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)分化为上皮细胞。**方法** 制备含胎儿肠黏膜和黏膜下层的组织块,酶消化去肠上皮。将DAPI标记的第3代BMSCs种植于组织块黏膜下层面,设加和不加EGF的A、B组;另设BMSCs细胞爬片的C、D对照组。体外培养至第12天,做光镜、CLSM的形态、组化和免疫组化观察。**结果** ①荧光显微镜下组织块表面有DAPI荧光标记细胞,同一切片HE染色显示这些细胞呈上皮样形态。②免疫组化染色显示A、B组组织块表面的细胞和C组的细胞都能表达CK及CK20,D组为阴性;肠组织块有EGF表达。CLSM下组织块表面可见蓝色DAPI和红色CK或者绿色EMA双荧光标记阳性细胞。③PAS反应显示在细胞与结缔组织之间有基膜样结构出现。**结论** 肠壁结缔组织能诱导BMSCs分化为上皮细胞,内源性EGF可能是其诱导因素之一。

关键词:肠;结缔组织;诱导;骨髓间充质干细胞;分化

中图法分类号:R321.5;R322.45;R329.1 **文献标识码**:A

Bone marrow-derived mesenchymal stem cells differentiate into epithelial cells induced by fetal intestinal connective tissue

DUAN Jiang-jie[1], WANG Bei[1], ZHANG Jian-hua[2], JIANG Rong[1], WANG Wei-wei[1] ([1]Department of Histology and Embryology, Faculty of Basic Medical Sciences, [2]Department of Gynecology and Obstetrics, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To observe the possibility that bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) induced by fetal intestinal connective tissue differentiate into epithelial cells. **Methods** The fetal intestinal tissue lumps composed of mucosa and submucosa were prepared with informed consent and approval of the Ethics Committee of our university, and the intestinal epithelium was removed with enzymatic digestion. The 3rd generation cells of fetal BMSCs labeled with DAPI were planted on the surface of the bowel submucosa, and divided into group A (EGF added) and group B (without EGF addition). BMSCs attached to cover glass were set as control groups C and D. After BMSCs were cultured *in vitro* for 12 d, their morphological, histochemical and immunohistochemical analysis was performed under light microscope and CLSM. **Results** The DAPI labeled cells could be seen on the surface of tissue lumps by fluorescence microscope, and in the same section stained by HE, these cells looked morphologically like epithelial cells. Immunohistochemical staining showed that the cells on the surface of tissue lumps in groups A, B and C expressed CK and CK20, but not in group D. EGF expressed in intestinal connective tissues. The double fluorescent labelling cells with blue DAPI and red CK or green EMA could be seen on the surface of tissue lumps observed by CLSM. The basal lamina-like structure appeared between the cells and connective tissues in PAS reaction. **Conclusion** The intestinal connective tissues could induce BMSCs to differentiate into epithelial cells, and the endogenous EGF may be one of factors in this process.

Key words: intestine; connective tissue; induction; bone marrow mesenchymal stem cells; differentiation

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是当前干细胞研究的热点之一。BMSCs在体内可分化为不同类型的细胞,有助于损伤的修复[1,2]。其诱导分化机制尚不十分清楚,不同组织的微环境含不同的因子,可能是促使BMSCs向不同类型细胞分化的重要因素[3-5]。肠壁结缔组织内含有丰富的生长因子,可能在肠道干细胞分化过程中起决

基金项目:重庆医科大学创新基金(CX200307)
Supported by the Innovative Funds of Chongqing Medical University (CX200307)

作者简介:段江洁,女,重庆市人,硕士研究生,主要从事干细胞分化方面的研究。E-mail: cluanjiangjie@163.com

通信作者:汪维伟,E-mail: wwwpzn@163.com

收稿日期:2007-10-10;**修回日期**:2008-01-10

定性作用[6]。但在某些溃疡性疾病中,因为黏膜的严重破坏,肠道干细胞不能参与修复损伤的黏膜。因此 Oyama 等[7]用异体干细胞移植治疗恶性血液病伴有 Crohn's 病后,认为干细胞移植治疗炎性肠病很可能是未来发展的趋势。本实验旨在探讨胎儿肠壁结缔组织能否诱导 BMSCs 分化为上皮细胞,为进一步研究 MSCs 移植治疗炎性肠病的可能性提供理论和实验依据。

1　材料与方法

1.1　实验标本与主要试剂

6 例 4 ~ 5 个月引产胎儿由重庆医科大学临床学院产科提供,经学校伦理委员会讨论通过,并与家属签署知情同意书。DMEM-F12 培养基和 D-Hanks 液,HyClone 公司;4,6-乙酰基-2-苯基吲哚(DAPI)和 EGF,Sigma 公司;小鼠抗人 CD29-FITC、CD34-PE、CD71-FITC、HLA-DR-PE,协和干细胞有限公司;鼠抗人 CK(角蛋白)、CK20、EMA(上皮细胞表面抗原)抗体,中山生物有限公司;罗丹明标记羊抗鼠 IgG,北京中杉金桥公司;FITC 标记山羊抗小鼠 IgG,武汉博士德公司。

1.2　方法

1.2.1　BMSCs 的分离、扩增、鉴定　　无菌取胎儿长骨骨髓细胞,加入 Ficoll, 2 000 × *g* 离心 30 min,收集单个核细胞,接种于 25 ml 玻璃培养瓶中,加入含 10% FBS 的 DMEM-F12 培养液,置 37 ℃,5% 的 CO_2 孵箱培养(后同),3 d 后换液,去非贴壁细胞,细胞生长达 80% ~ 90% 融合时,常规传代培养。取第 3 代(P3)细胞做流式细胞分析,检测 CD29、CD34、CD71、HLA-DR 的表达。

1.2.2　BMSCs 的标记　　P3 细胞生长至 80% ~ 90% 融合时,加入 DAPI(终浓度 50 μg/ml)[8],置 37 ℃、5% CO_2 孵箱孵育 12 h后,洗去 DAPI,制成 $5 \times 10^6\ ml^{-1}$ 的细胞悬液备用。标记后 1、2、3、4 周观察荧光强度变化,每孔计数 500 个细胞,按标记率 = DAPI 阳性细胞数/细胞总数 × 100%,计算标记率。

1.2.3　BMSCs 的诱导分化　　无菌剪开胎儿腹壁,沿十二指肠乳头以下截取长约 15 cm 的肠段。解剖显微镜下去除肌层和外膜,0.25% 胰蛋白酶与 0.02% EDTA 等量混合液消化,去除肠上皮,制成结缔组织块。将肠壁结缔组织块分为 A、B 组,每组 4 块,滴加 DAPI 标记的 P3 细胞(3×10^4)在组织块的黏膜下层面,加入 10% FBS、DMEM-F12 培养液;同时设 P3 细胞爬片的 C、D 对照组;只在 A、C 组加入终浓度为 10 ng/ml[9] 的 EGF,置孵育箱培养。培养后第 12 天收集组织块及细胞爬片,A、B 组中 2 个组织块制成恒冷箱切片,甘油封片;1 个用于激光共聚焦扫描显微镜(CLSM)观察,1 个常规固定、脱水、包埋成石蜡组织块。C、D 组的细胞爬片经固定、洗涤备用。

1.2.4　BMSCs 的形态观察　　荧光显微镜下观察恒冷箱切片 DAPI 标记的 BMSCs,并拍照;同一切片洗去甘油再 HE 染色、封片后,普通光学显微镜下观察拍照。

1.2.5　免疫组织化学染色　　A、B 组的石蜡切片和 C、D 组细胞爬片,均按照试剂盒提供的实验步骤,行 SABC 法免疫组化染色,DAB 显色,显示 CK 及 CK20 的表达,用 PAS 替代特异性抗体作为阴性对照。取未培养的胎儿肠壁组织块制作石蜡切片,按上述免疫组化方法染色显示结缔组织中 EGF 的表达。抗 CK 抗体与罗丹明标记的山羊抗鼠 IgG 配用,抗 EMA 抗体与 FITC 标记的山羊抗鼠 IgG 配用,按试剂盒步骤做组织块免疫荧光染色,用于 CLSM 下观察。

1.2.6　PAS 染色　　A、B 组的石蜡切片常规脱蜡至水,过碘酸雪夫反应染色[10],常规脱水透明,树胶封固。

2　结果

2.1　BMSCs 的分离、鉴定和 DAPI 标记

细胞原代培养 3 ~ 12 d 数量迅速增多,呈旋涡状生长(图 1)。流式细胞仪检测示,所培养的细胞表达 CD29 及 CD71,均一性达 98.68% 以上,不表达 CD34 及 HLA-DR。

荧光倒置显微镜下,DAPI 标记 1 d 的 BMSCs,胞核发明亮蓝色荧光,标记率达 100%;随着时间延长,荧光亮度进行性减弱,标记率下降,但 2 周时,仍有 50% 的标记率(图 2),4 周时仅 5% 的标记率。



图 1　BMSCs 原代培养 10 d　(×200)

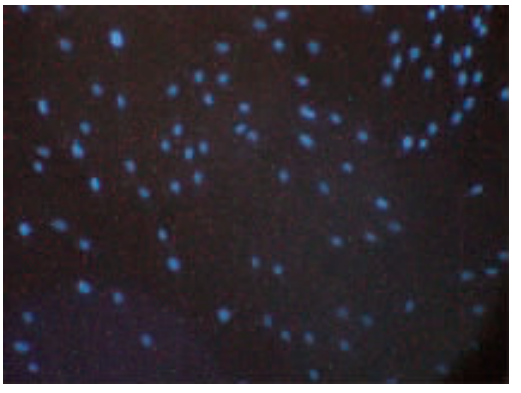


图 2　DAPI 标记 BMSCs 后 2 周　(×200)

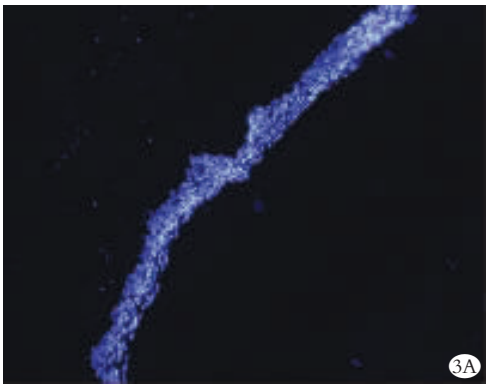
2.2　形态观察结果

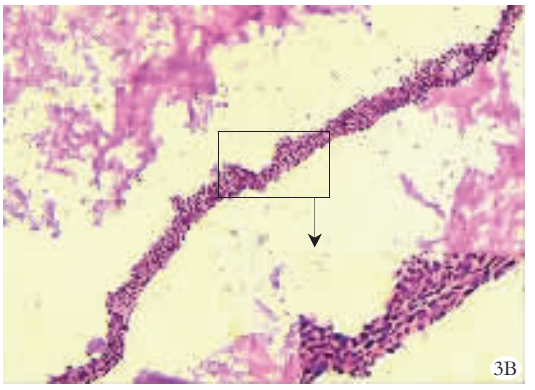
A、B 组培养第 12 天,组织块表面有 DAPI 标记细胞。HE 染色后,这些细胞核体积较大、核明显的细胞,其分布与 DAPI 标记细胞分布一致(图 3、4)。

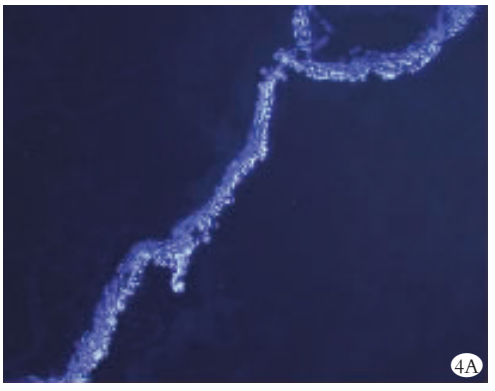
2.3　免疫组织化学结果

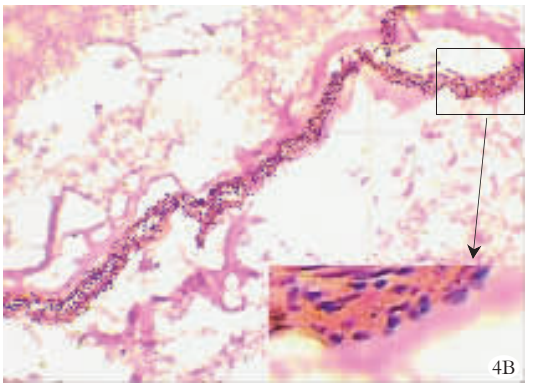
A、B 组均见部分沿组织块表面生长、呈低柱状、体积较大的细胞,胞质中有 CK 及 CK20 阳性产物(图 5,6);C 组部分细胞有表达,D 组为阴性。未经培养的肠壁结缔组织的部分细胞有棕色的 EGF 阳性产物(图 7)。

CLSM 下,组织块表面可见蓝色 DAPI 和红色 CK 双荧光的细胞,以及蓝色 DAPI 和绿色 EMA 双荧光的细胞(图 8,9)。





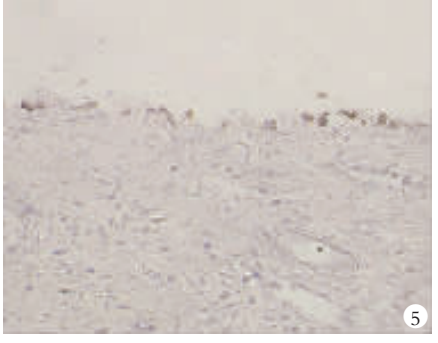


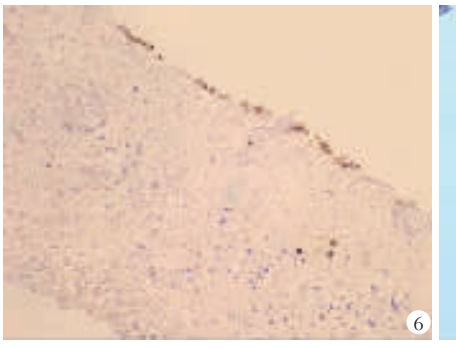


A:黏膜下层表面的淡蓝色荧光为 DAPI 阳性细胞; B:与 A 图相同部位的 HE 染色 ↑示上皮样细胞

图 3 A 组培养 12 d BMSCs 形态学观察 （×200）

图 4 B 组培养 12 d BMSCs 形态学观察 （×200）





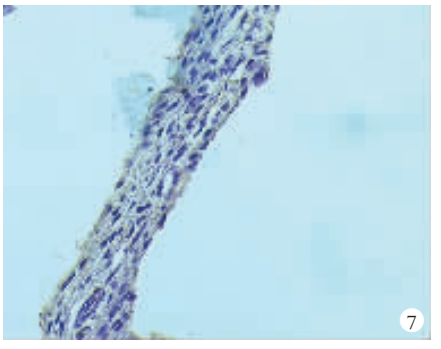


图 5 A 组培养 12 d,黏膜下层表面的 CK 阳性细胞 （SABC×200）

图 6 A 组培养 12 d,黏膜下层表面的 CK20 阳性细胞 （SABC×200）

图 7 未培养肠壁结缔组织 EGF 阳性 （SABC×200）

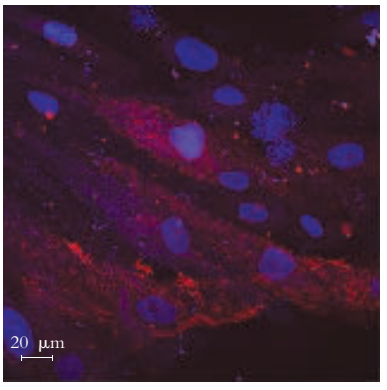


图 8 培养 12 d,CLSM 下组织块表面蓝色 DAPI 和红色 CK 荧光双阳性的 BMSCs

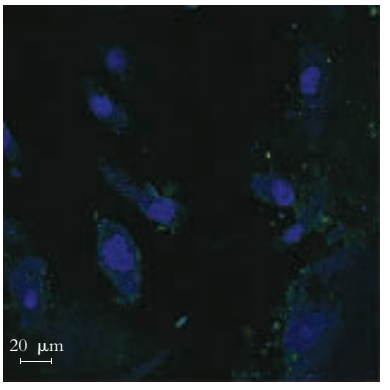
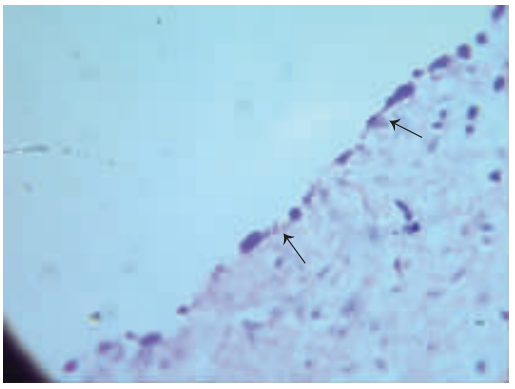


图 9 培养 12 d,CLSM 下组织块表面蓝色 DAPI 和绿色 EMA 荧光双阳性的 BMSCs

2.4　PAS 染色结果

部分沿组织块表面生长的细胞与结缔组织之间有紫红色细线状结构(图 10)。



↑示细胞与结缔组织间的细线状 PAS 阳性结构

图 10　B 组培养 12 d PAS 染色观察　(×200)

3　讨论

将 DAPI 标记的 P3-BMSCs 种植到肠结缔组织块表面培养 12 d 时,镜下可见组织块表面有 DAPI 标记的细胞。同一切片 HE 染色后,可见这些细胞胞体较大,细胞质较丰富,具有上皮细胞的形态特点。培养中经多次换液,仍未被洗脱的标记细胞应该是已经较为紧密的与结缔组织结合了。

CK 是上皮细胞的共同标志之一,CK20 则可表达于肠黏膜上皮细胞。本实验免疫组化染色结果显示:在组织块表面生长的标记细胞,有 CK 及 CK20 的表达。这提示 BMSCs 可以在肠壁结缔组织上生长,并分化为具有上皮细胞和具有肠上皮表型的细胞。PAS 染色观察到,标记细胞与组织块之间有紫红色细线状结构,提示有以糖蛋白为主要成分的基膜类结构产生,这也支持种植在结缔组织上的 BMSCs 可能已分化为上皮细胞了。

结缔组织中含有多种生长因子,能调节细胞的增殖和分化[11,12]。体外实验证明,BMSCs 在 EGF 等生长因子的作用下,可以向皮肤组织细胞、肝细胞、血管内皮细胞等分化[13-15]。本实验观察到,单独培养细胞爬片的 BMSCs 不表达 CK 及 CK20,加入 EGF 后部分细胞可表达角蛋白,提示在 EGF 诱导下,BMSCs 能向上皮细胞分化。当把 BMSCs 与肠壁结缔组织一起培养时,加与不加 EGF 实验组的 DAPI 阳性细胞数,以及表达 CK 及 CK20 的细胞数的差异均不明显。同时免疫组化也观察到肠壁结缔组织细胞有 EGF 表达。这提示肠壁结缔组织中内源性的 EGF 可能是诱导 BMSCs 分化的因素之一。

本实验加入外源性 EGF 仅参照文献设立了 1 个剂量,故外源性 EGF 与结缔组织内源性 EGF 的协同效应不明显,可能与使用的 EGF 浓度有关。关于 EGF 与 BMSCs 之间的作用机制,肠壁结缔组织还有哪些影响细胞分化的因子,均有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Semont A, Francois S, Mouiseddine M, *et al*. Mesenchymal stem cells increase self-renewal of small intestinal epithelium and accelerate structural recovery after radiation injury[J]. Adv Exp Med Biol, 2006, 585: 19-30.

[2] Freyman T, Polin G, Osman H, *et al*. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction[J]. Eur Heart J, 2006, 27(9): 1114-1122.

[3] Tarnawski A S. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing[J]. Dig Dis Sci, 2005, 50 (Suppl 1): S24-S33.

[4] Bendall S C, Stewart M H, Menendez P, *et al*. IGF and FGF cooperatively establish the regulatory stem cell niche of pluripotent human cells *in vitro*[J]. Nature, 2007, 448(7157): 1015-1021.

[5] Paunescu V, Deak E, Herman D, *et al*. *In vitro* differentiation of human mesenchymal stem cells to epithelial lineage[J]. J Cell Mol Med, 2007, 11(3): 502-508.

[6] Oyama Y, Craig R M, Traynor A E, *et al*. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory Crohn's disease[J]. Gastroenterology, 2005, 128(3): 552-563.

[7] 牛丽丽, 郑　敏, 曹　丰, 等. 同种异体骨髓间充质干细胞在大鼠心脏的迁移及分化[J]. 中华医学杂志, 2004, 84(1): 38-42.

[8] 黄秉仁, 蔡良婉, 向绪传. 人表皮生长因子的基础和应用研究[J]. 中国医学科学院学报, 2001, 23(2): 176-180.

[9] 蔡文琴. 现代实用细胞与分子生物学实验技术[M]. 北京: 人民军医出版社,2003: 78.

[10] Fleming J M, Desury G, Polanco T A, *et al*. Insulin growth factor-I and epidermal growth factor receptors recruit distinct upstream signaling molecules to enhance AKT activation in mammary epithelial cells[J]. Endocrinology, 2006, 147 (12): 6027-6035.

[11] Wu M, Yang L, Liu S, *et al*. Differentiation potential of human embryonic mesenchymal stem cells for skin-related tissue[J]. Br J Dermatol, 2006,155(2): 282-291.

[12] Ruster B, Gottig S, Ludwig R J, *et al*. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells[J]. Blood, 2006, 108(12): 3938-3944.

[13] Honczarenko M, Le Y, Swierkowski M, *et al*. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors[J]. Stem Cells, 2006, 24(4): 1030-1041.

[14] Segers V F, Van-Riet I, Andries L J, *et al*. Mesenchymal stem cell adhesion to cardiac microvascular endothelium: activators and mechanisms[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006, 290(4): H1370-H1377.

(编辑　王　红)