文章编号:1000-5404(2008)21-2029-05

论著

小鼠胚胎间充质干细胞系 C3H/10T1/2 的多向分化潜能研究

王明科,邹仲敏,粟永萍,罗成基,王军平,冉新泽,王 涛,闫国和 (第三军医大学军事预防医学院防原医学教研室,全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

摘 要:目的 建立小鼠胚胎间充质干细胞系 C3H/10T1/2 细胞成肌、成脂、成内皮、成神经元分化的细胞实验模型。**方法** 用化学诱导剂 5-氮杂胞苷诱导 C3H/10T1/2 细胞成肌、成脂,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)联合诱导 C3H/10T1/2 细胞成内皮, bFGF、β-巯基乙醇(β-mercaptoethanol,β-ME)、DMSO 诱导 C3H/10T1/2 细胞成神经元细胞分化。诱导期间应用细胞形态学观察、油红"O"染色、免疫细胞化学染色检测内皮细胞表面标志 CD31 和神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase,NSE)对分化细胞进行鉴定。**结果** 5-氮杂胞苷诱导 C3H/10T1/2 10 d 后细胞变长,17 d 后可见明显肌管形成,15 d 少量细胞出现脂滴,25 d 油红"O"染色见细胞质大量红色脂滴;VEGF 和 bFGF 诱导 5 d 后细胞呈现"鹅卵石"样形态,8 d 后阳性表达 CD31;bFGF、β-巯基乙醇和 DMSO 联合诱导 3 d 后细胞胞体收缩,突起变长,15 d NSE 染色阳性。**结论** C3H/10T1/2 细胞具有多向分化的潜能,可用作研究间充质干细胞生物学特性的模型。

关键词: C3H/10T1/2;成肌分化;成脂分化;成内皮分化;成神经元分化
中图法分类号: R-33; R329.21; R329.24 **文献标识码**: A

Multilineage differentiation of murine embryonic mesenchymal stem cell line C3H/10T1/2

WANG Ming-ke, ZOU Zhong-min, SU Yong-ping, LUO Cheng-ji, WANG Jun-ping, RAN Xin-ze, WANG Tao, YAN Guo-he (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish experimental cell models of myogenic cells, adipocytes, endothelial cells and neurocytes differentiated from murine embryonic mesenchymal stem cell line C3H/10T1/2. Methods Myogenic and adipogenic differentiation of C3H/10T1/2 cells were induced by 5-azacytidine, angiogenic differentiation by vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF), and neurogenic differentiation by bFGF, β-mercaptoethanol (β-ME) and DMSO. The differentiated cells were identified by observing cell morphology, Oil Red O staining and immunohistochemical staining to detect endothelial cell surface marker CD31 and neuron-specific enolase (NSE). Results C3H/10T1/2 cells were morphologically elongated at the 10th day, and myotube-like cells appeared at the 17th day after 5-azacytidine induction. Meanwhile, adipose globelets were observed in a small proportion of cells at the 17th day, and Oil Red O staining confirmed adipose accumulation in the cytoplasm at the 25th day after 5-azacytidine induction. Cobble stone-like structure was observed since 5th day after inducement of VEGF and bFGF, and at the 8th day the induced cells exhibited typical CD31 positive staining. After treated with bFGF, β-ME in combination with DMSO, cytoplasm retracted towards the nucleus and the cell processes prolonged at the 3th day. Immunohistochemical staining showed that differentiated cells expressed NSE at the 15th day. Conclusion C3H/10T1/2 cells have the potential of multilineage differentiation and can be used as an alternative source of mesenchymal stem cells. Growth factor-induced endothelial differentiation of C3H/10T1/2 cells was established .

Key words: C3H/10T1/2 cells; myogenic cells; adipocytes; endothelial cells; neurocytes

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2005CB522605);全军医学科研"十一五"计划国际合作项目(06H029,06H030)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China (973 Program, 2005CB522605) and the Research Projects of the "Eleventh Five-year Plan" for Medical Science Development of PLA (06H029, 06H030)

作者简介:王明科,男,湖南省衡阳市人,博士研究生,主要从事干细胞基础理论方面的研究。E-mail:prophe@mail.tmmu.com.cn
通信作者:邹仲敏,电话:(023)68752280,E-mail:zmzou@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2008-06-11;**修回日期**:2008-07-24

干细胞由于其独特的优点已被广泛应用于基础和临床研究,但干细胞朝某一特定途径分化以形成特定细胞及发生恶性转化的机制至今仍不清楚。C3H/10T1/2 细胞(简称10T1/2 细胞)是 Reznikoff 等[1-3]从 C3H 小鼠胚胎分离而建立的间充质干细胞株,有较强的细胞接触抑制现象,在研究中胚层发育和分化中可发挥重要作用。本实验拟以 C3H/10T1/2 细胞为间充质干细胞模型,探讨其在化学诱导剂和生长因子诱导下成肌、成脂、成内皮及成神经情况,为研究间充质干细胞分化分子机制提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠间充质干细胞株 C3H/10T1/2 购自 ATCC 公司。DMEM 高糖培养基购自 HyClone 公司;小牛血清、马血清购自兰州民海生物工程有限公司;青、链霉素购自华北制药股份有限公司;VEGF 和 bFGF 购自 Peprotech 公司;兔抗小鼠 CD31 多克隆抗体、荧光素(FITC)标记的羊抗兔二抗购自北京博奥森生物技术有限公司;兔抗小鼠 NSE 多克隆抗体购自武汉博士德公司;Triton X-100 购自 Amersco 公司;牛血清白蛋白(BSA)、DAPI 购自 Roche 公司;5-氮杂胞苷、油红购自 Sigma 公司;β-巯基乙醇和 DMSO 购自上海生工生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 C3H/10T1/2 细胞的培养 参考美国菌种保藏中心(ATCC)说明,常规方法复苏 C3H/10T1/2 细胞,采用含 100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素、10% 小牛血清的 DMEM 高糖培养基,在 5% CO_2、100% 湿度、37 ℃孵箱培养,每 3 天换 1 次液。实验取第 5 ~ 15 代细胞。

1.2.2 成肌、成脂分化 取生长状态良好的细胞,按 1×10^5/孔接种于 24 孔板,完全贴壁后去除完全培养基,加入含 5% 马血清、5% 小牛血清(FCS)、10 μmol/L 5-氮杂胞苷、100 U/L 青、链霉素的诱导培养基,24 h 后去除诱导培养基,PBS 洗涤 2 次改用完全培养基继续培养。诱导期间每天形态学观察是否有肌管及脂滴形成,诱导 25 d 后油红"O"染色。以 C3H/10T1/2 细胞正常培养组为对照组。

1.2.3 成内皮分化 取生长状态良好的细胞,按 2×10^4/孔接种于 24 孔培养板第 1 列,倍比稀释后种植后 1 列。以 10 μg/L VEGF、5 μg/L bFGF、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素、10% FCS 的 DMEM 培养液诱导细胞,每 3 天换液 1 次。诱导期间每天进行形态学观察,每 2 天固定 2 孔,连续观察 14 d。以 C3H/10T1/2 细胞正常培养组为对照组。

1.2.4 成神经元分化 取生长状态良好的细胞,按 1×10^5/孔接种于 24 孔板,完全贴壁后去除完全培养基,以 10 μg/L bFGF、10% FCS DMEM 培养液预诱导 24 h,然后用无血清、含 5 mmol/L β-巯基乙醇的 DMEM 培养液诱导 24 h 后改用 2% DMSO、10% FCS DMEM 培养液维持 14 d。诱导期间每天进行形态学观察,诱导 15 d 后免疫细胞化学染色神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase,NSE)。以 C3H/10T1/2 细胞正常培养组为对照组。

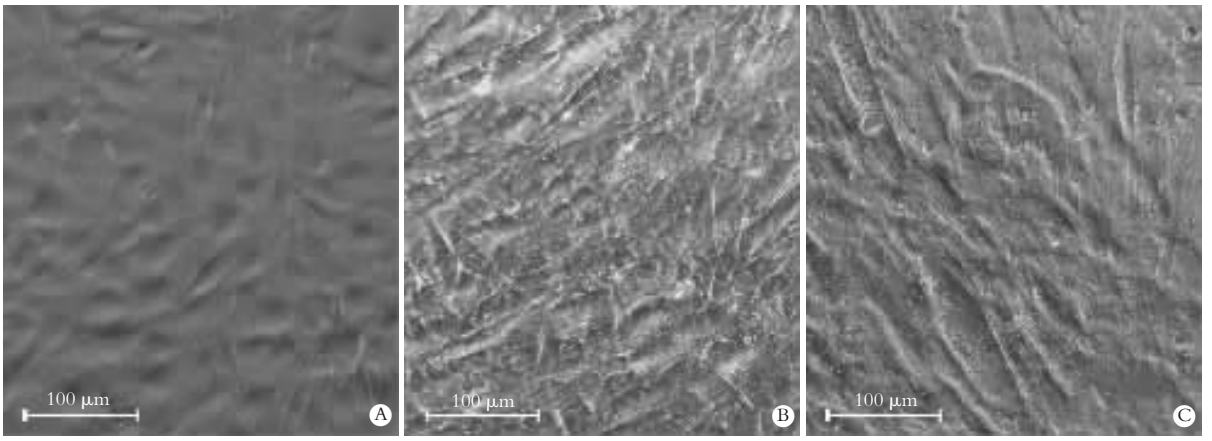
1.2.5 油红"O"染色 24 孔板诱导细胞孔弃原培养液,PBS 洗 2 次,4% 多聚甲醛室温固定 20 min。PBS 洗 2 次,加入 500 μl/孔新鲜配置的油红"O"染色工作液(0.5 g 油红融于 100 ml 98 % 的异丙醇成染色母液,临用前摇匀,与蒸馏水以3∶2 比例混合,0.45 μm 滤膜过滤后 2 h 内用),室温放置 20 min,PBS 或蒸馏水冲洗 3 次,每次 2 ~ 3 min,加入 0.45 μm 滤膜过滤后的苏木精淡染 20 s,0.6% 盐酸酒精快速冲洗 1 次,三蒸 H_2O 浸泡 10 min,镜下观察照相。

1.2.6 免疫细胞化学鉴定 取内皮、神经诱导后不同时间 24 孔板细胞弃原培养液,PBS 洗 2 次,4% 多聚甲醛室温固定 20 min。含 1% Triton X-100 的 PBS 洗 3 次,每次 2 min,之后用含 1% Triton X-100 的 PBS 室温通透化处理 10 min,4% BSA 的 PBS 洗 3 次,每次 2 min。4% BSA 的 PBS 室温封闭 30 min,加入兔抗小鼠 CD31 多克隆抗体置湿盒中,4 ℃孵育过夜。4% BSA 的 PBS 洗 3 次,每次 5 min。加入 FITC 标记的羊抗兔二抗置湿盒中,37 ℃孵育 45 min。去除二抗,4% BSA 的 PBS 洗 3 次,每次 5 min,加入含 1 μg/ml DAPI 的 70% 甘油封片。荧光显微镜下观察,494 nm 波长激发,照相保存实验结果。

2 结果

2.1 成肌结果

C3H/10T1/2 细胞以 1×10^5/孔接种于 24 孔板,10 μmol/L 5-氮杂胞苷诱导 3 d 后细胞长满,10 d 后细胞明显变长,并发生多个细胞的融合,17 d 后可见粗大肌管形成,肌管内可见特征性的多个细胞核结构(图 1)。



A:诱导第 3 天; B:诱导第 10 天;C:诱导第 17 天

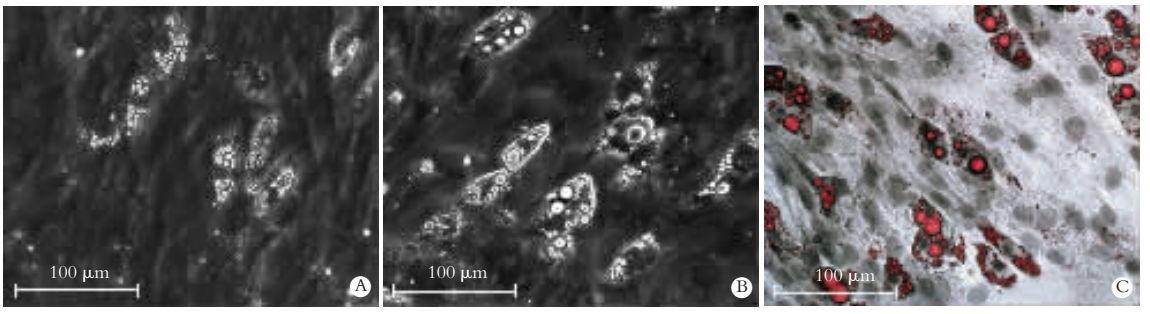
图 1 C3H/10T1/2 细胞成肌分化后细胞形态学变化 (倒置相差显微镜)

2.2　成脂结果

10 μmol/L 5-氮杂胞苷诱导 C3H/10T1/2 细胞 15 d 后少量细胞的细胞质出现折光性较强的微小脂滴，脂滴逐步融合变大。其他非成脂分化的细胞形态亦发生变化。25 d 后细胞的细胞核周围可见较大脂滴并挤压细胞核至一边，形成典型的脂肪细胞（图 2）。在成脂分化的克隆视野内，约有 20% 的细胞内有脂滴蓄积。

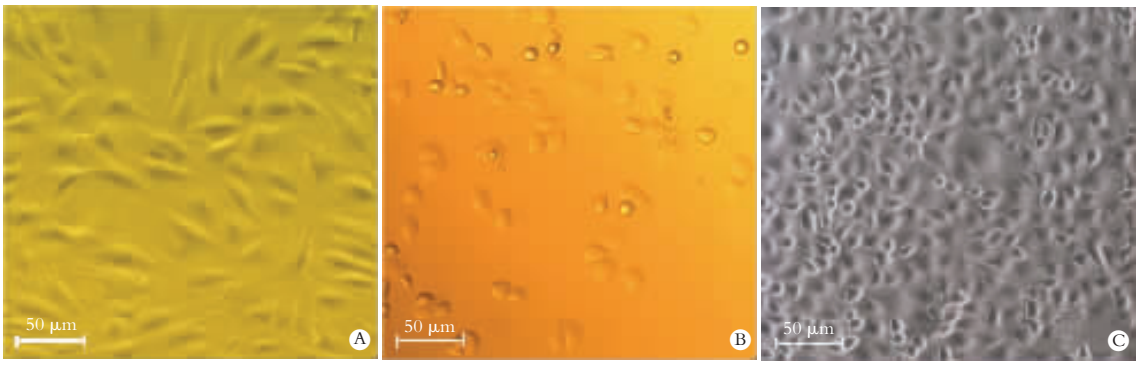
2.3　成内皮结果

VEGF（10 μg/L）+ bFGF（5 μg/L）诱导 C3H/10T1/2 细胞 5 d 后可见细胞胞体回缩，立体感增强，镜下呈内皮细胞特征性的“鹅卵石”样生长外观，而对照组成梭形和多角形外观（图 3）。诱导后第 8 天免疫荧光检测 CD31 显示细胞呈阳性反应，以细胞膜表达为主，对照组为阴性（图 4）。



A：诱导第 15 天；B：诱导第 25 天，C3H/10T1/2 细胞分化后较多成脂细胞克隆；C：诱导第 25 天油红“O”染色

图 2　C3H/10T1/2 细胞成脂分化结果　（倒置相差显微镜）



A：正常对照组；B：诱导第 5 天；C：诱导第 12 天

图 3　C3H/10T1/2 细胞成内皮分化后细胞形态学变化　（倒置相差显微镜）

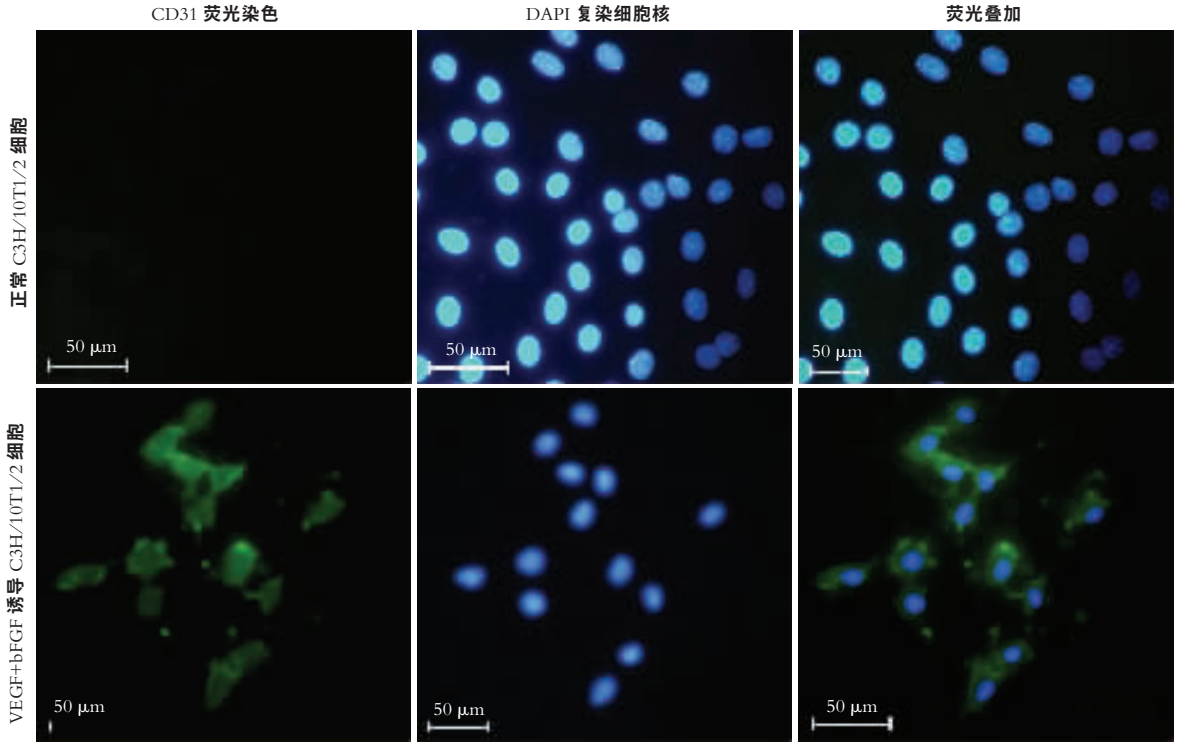
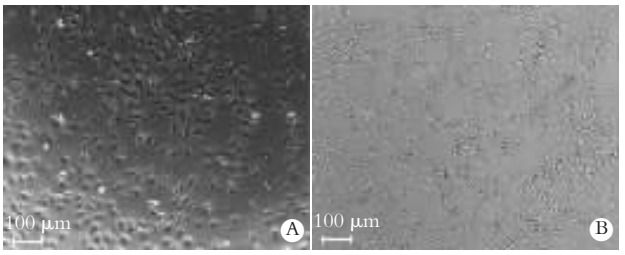


图 4　CD31 免疫荧光染色　（倒置荧光显微镜）

2.4 成神经元结果

成神经诱导 3 d 后可见细胞胞体收缩,细胞质突起明显变长(图 5)。诱导第 15 天免疫荧光检测 NSE 可见细胞质呈较强荧光(图 6)。



A:神经诱导后第 1 天; B: 神经诱导后第 3 天

图 5 C3H/10T1/2 细胞成神经分化后细胞形态学变化
(倒置相差显微镜)

3 讨论

1976 年 Friedenstein 等[4]首先发现骨髓中存在非造血间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs),继之大量研究证实皮肤真皮、脂肪、肌肉、骨膜等多种组织中存在 MSCs。MSCs 不仅可以分化为骨、软骨、肌肉、脂肪等中胚层细胞,还可跨越胚层界限,分化为外胚层的神经细胞及内胚层的肝卵圆性细胞,是理想的治疗遗传性疾病和退行性疾病的细胞来源[5,6]。MSCs 对造血恢复、创面愈合、骨和软骨组织置换、心肌和骨骼肌修复、血管修复以及一些神经系统疾病的治疗前景良好,同时也避免了应用胚胎干细胞而带来的伦理道德等问题,是目前组织工程和再生医学研究的热点[7,8]。

5-氮杂胞苷为 DNA 甲基化抑制剂,作用于细胞产生低甲基化,是一种非特异性诱导剂。Taylor 等[9]报道 5-氮杂胞苷诱导 C3H/10T1/2 细胞 第 15 ~ 16 天出现明显肌管样结构,28 d 细胞出现大量脂滴,与本研究结果基本一致。促血管生成因子 VEGF 和 bFGF 可通过激活下游一系列受体激酶引起靶细胞增殖、迁移和分化[10]。Oswald 等[11]用 50 μg/L VEGF 诱导人 MSCs 7 d 后细胞阳性表达内皮细胞特异性标志 CD31、八因子,并具有三维成血管特性。本研究联合应用 10 μg/L VEGF 和 5 μg/L bFGF 诱导 C3H/10T1/2 细胞,8 d 后检测 CD31 细胞质阳性表达。另外,我们免疫荧光染色还观察到阳性表达内皮细胞特异性标志八因子、透射电镜观察到 W-P 小体且诱导后细胞具有吞噬 ac-LDL 的功能并在体外三维培养中能形成血管样结构,成内皮细胞百分率约 60%,说明 C3H/10T1/2 细胞分化成了内皮细胞并具有内皮细胞的功能。据报道,β-ME、2% DMSO 可诱导大鼠和人 MSCs 向神经元转化,且 bFGF 可促进大鼠 MSCs 向神经元转化[12,13]。本研究对 C3H/10T1/2 细胞用10 μg/L bFGF 预诱导 1 d,再以无血清 5 mmol/L β-ME 诱导 1 d,最后以 2% DMSO 维持诱导,第3天出现类似神经元样细胞即胞

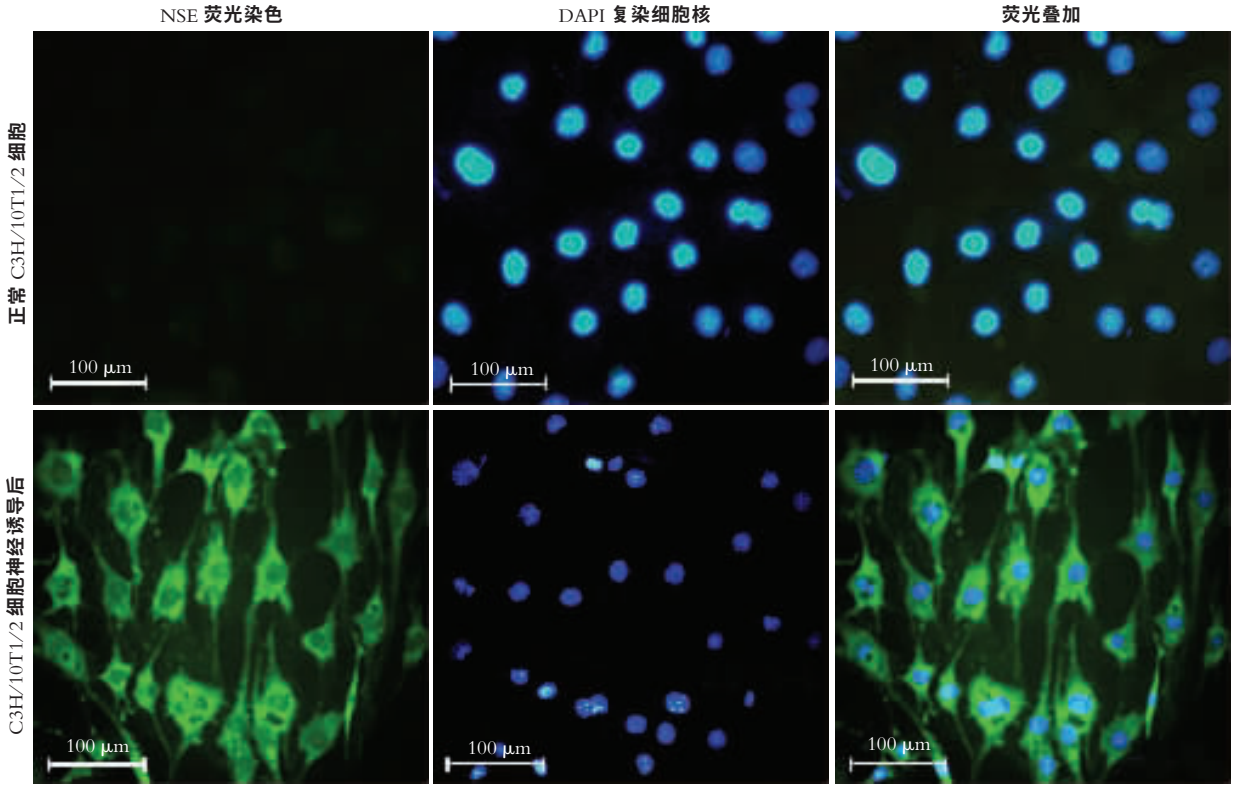


图 6 诱导第 15 天 NSE 免疫荧光染色 (倒置荧光显微镜)

体收缩，细胞质伸出类似轴突样突起，诱导 15 d NSE 染色仍为阳性，说明诱导后的神经元样细胞在其培养条件下可存活较长时间，但其神经细胞的功能有待进一步研究。

C3H/10T1/2 细胞为小鼠胚胎时期间充质来源干细胞，可分化为骨[14]、软骨[2]、脂肪[15]、肌[16]、神经元细胞[17]，剪切力作用下可分化为内皮细胞[18]，尚未观察到自发恶性转化，但射线和化学诱导剂可使其恶性转化。相对于原代 MSCs，C3H/10T1/2 细胞具有细胞类型单一、生长快速稳定的特点。本实验对 C3H/10T1/2 细胞用不同条件进行诱导分化，初步鉴定 C3H/10T1/2 可向成肌、成脂、成内皮、成神经元分化，证实了 C3H/10T1/2 细胞可作为较好的研究 MSCs 生物学特性的模型应用于创伤愈合的基础研究。由于本实验组前期已建立的基因捕获 C3H/10T1/2 细胞阳性克隆库[19]，也为下一步利用基因捕获技术研究 MSCs 分化分子机制等生物学特性奠定了基础。

参考文献：

[1] Reznikoff C A, Brankow D W, Heidelberger C. Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division[J]. Cancer Res, 1973, 33(12): 3231-3238.

[2] Tscheudschilsuren G, Bosserhoff A K, Schlegel J, *et al*. Regulation of mesenchymal stem cell and chondrocyte differentiation by MIA[J]. Exp Cell Res, 2006, 312(1): 63-72.

[3] Pinney D F, Emerson C P, Jr. 10T1/2 cells: an in vitro model for molecular genetic analysis of mesodermal determination and differentiation[J]. Environ Health Perspect, 1989, 80: 221-227.

[4] Friedenstein A J. Precursor cells of mechonocytes[J]. Int Rev Cytol, 1976, 47: 327-359.

[5] Jiang Y, Jahagirdar B N, Reinhardt R L, *et al*. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. Nature, 2002, 418(6893): 41-49.

[6] Qihao Z, Xigu C, Guanghui C, *et al*. Spheroid formation and differentiation into hepatocyte-like cells of rat mesenchymal stem cell induced by co-culture with liver cells[J]. DNA Cell Biol, 2007, 26(7): 497-503.

[7] 王明科，罗成基，邹仲敏. 干细胞与组织工程[J]. 重庆医学，2006，35(21)：1990-1992.

[8] Ringe J, Kaps C, Burmester G R, *et al*. Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs[J]. Naturwissenschaften, 2002, 89(8): 338-351.

[9] Taylor S M, Jones P A. Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine[J]. Cell, 1979, 17(4): 771-779.

[10] Cross M J, Claesson-Welsh L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition[J]. Trends Pharmacol Sci, 2001, 22(4): 201-207.

[11] Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, *et al*. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells *in vitro*[J]. Stem Cells, 2004, 22(3): 377-384.

[12] 江和碧，卓本慧，代　英，等. bFGF 促进大鼠骨髓间充质干细胞向神经元转化及机制[J]. 第三军医大学学报，2005，27(2)：98-101.

[13] Woodbury D, Schwarz E J, Prockop D J, *et al*. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons[J]. J Neurosci Res, 2000, 61(4): 364-370.

[14] Vernet D, Nolazco G, Cantini L, *et al*. Evidence that osteogenic progenitor cells in the human tunica albuginea may originate from stem cells: implications for peyronie disease[J]. Biol Reprod, 2005, 73(6): 1199-1210.

[15] Bowers R R, Kim J W, Otto T C, *et al*. Stable stem cell commitment to the adipocyte lineage by inhibition of DNA methylation: role of the BMP-4 gene[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(35): 13022-13027.

[16] Lien S C, Usami S, Chien S, *et al*. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway is involved in transforming growth factor-beta1-induced phenotypic modulation of 10T1/2 cells to smooth muscle cells[J]. Cell Signal, 2006, 18(8): 1270-1278.

[17] 邓　均，艾国平，王军平，等. C3H/10T1/2 细胞向神经元诱导分化的方法研究[J]. 中国修复重建外科杂志，2007，21(6)：638-641.

[18] Wang H, Riha G M, Yan S, *et al*. Shear stress induces endothelial differentiation from a murine embryonic mesenchymal progenitor cell line[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(9): 1817-1823.

[19] 王明科，邹仲敏，罗成基，等. 多用途基因捕获 C3H/10T1/2 细胞阳性克隆库的构建及鉴定[J]. 第四军医大学学报，2008，29(6)：508-512.

（编辑　吴培红）

血压计量单位恢复 mmHg 表示法

根据国家质量技术监督局和卫生部联合发出的质技监局量函[1998]《关于血压计量单位使用规定的补充通知》的精神，血压计量单位恢复使用毫米汞柱(mmHg)，但首次使用时应注明 mmHg 与千帕[斯卡](kPa)的换算系数(1 mmHg = 0.133 kPa)。

本刊编辑部