论著

文章编号:1000-5404(2010)06-0516-04

细胞间接触诱导骨髓间充质干细胞向平滑肌细胞分化的实验研究

刘晓芳,王延洲,徐惠成,梁志清 (400038 重庆,第三军医大学西南医院妇产科)

[摘要] **目的** 通过两种细胞的共培养探讨细胞间接触对间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)分化的影响。**方法** 分别采用密度梯度离心法和胶原酶消化法分离培养了骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)和膀胱平滑肌细胞(bladder smooth muscle cells, BSMCs)。并对其进行了鉴定。在此基础上以单独培养的BMSCs和BSMCs分别作为阴性和阳性对照组,将获得的BMSCs和BSMCs在体外通过接触与非接触共培养作为实验组,对诱导后的BMSCs是否向平滑肌(smooth muscle cells, SMCs)分化通过免疫荧光和Western blot进行鉴定。**结果** 对BMSCs进行流式细胞术检测结果显示CD90、CD44表达阳性率分别为99.78%,60.27%,CD45表达阴性,阳性率为0.21%。在BMSCs与BMSCs共同培养的实验中,Western blot结果显示:BMSCs本身表达少量calponin蛋白,接触组calponin的表达随培养时间的延长逐渐增多,非接触组无明显变化;免疫荧光显示:接触组在共培养第8天部分细胞抗calponin阳性,非接触组与诱导前无明显变化。**结论** 初步认为BMSCs与BMSCs接触共同培养能诱导BMSCs向平滑肌分化。

[关键词] 细胞间接触;微环境;骨髓间充质干细胞;平滑肌细胞

[中图法分类号] R322.62;R329.21;R329.24 **[文献标志码]** A

Cell-cell contact induces mesenchymal stem cells differentiation to smooth muscle cells

Liu Xiaofang, Wang Yanzhou, Xu Huicheng, Liang Zhiqing (Department of Obstetrics and Gynaecology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To establish a co-culture system between mesenchymal stem cells (MSCs) and smooth muscle cells (SMCs) *in vitro*, and study the influence of SMCs on the differentiation of bone marrow MSCs (BMSCs) into SMCs in the co-culture system. **Methods** Density gradient centrifugation was used to separate and culture BMSCs, and collagenase digestion was employed to separate and culture bladder smooth muscle cells(BSMCs). Then the 2 types of cells were identified respectively. Then the cells were divided into 4 groups, BMSCs culture group (positive control), BSMCs cells culture group (negative control), BMSCs and BSMCs co-culture groups with contact or non-contact. The expression of α-smooth muscle actin (α-SMA) and calponin were detected by immunofluorescence staining. Western blot analysis was employed to determine protein expression of calponin. **Results** In contact co-culture group, the positive rate of CD90 abd CD44 were 99.78% and 60.27% respectively in BMSCs, while only 0.21% for CD45. Western blotting showed that BMSCs expressed little calponin, but those contacting with BSMCs had an increasingly stronger expression of calponin with the elapse of contact culture time, while there was no significant change in its expression in BMSCs with contact. Immunofluorescence staining indicated that part of BMSCs were calponin positive at the 8th day after culture, but no positive cell was observed in non-contact culture group and BMSCs culture group. **Conclusion** The contact between BSMCs and BMSCs can promote the differentiation of BMSCs into SMCs.

[Key words] cell-cell contact; microenvironment; mesenchymal stem cells; smooth muscle cells

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30772309). Corresponding author: Liang Zhiqing, Tel: 86-23-68754409, E-mail: zhi.lzliang@gmail.com, Xu Huicheng, Tel: 86-23-68765403, E-mail: xhuicheng@yahoo.com.cn

尿失禁是女性的常见病,据报道此病的患病率在10%~50%[1,2],其中又以压力性尿失禁为主,已成为重要的妇女健康问题,影响生活质量,现有的研究表明其主要的病因与尿道周围的横纹肌和平滑肌的病变或凋亡相关,近年来干细胞移植成为肌肉组织损伤修复的重要手段[3],亦为尿失禁的治疗提供了一种新的途径[4,5]。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal

[基金项目] 国家自然科学基金(30772309)

[通信作者] 梁志清,电话:(023)68754409,E-mail: zhi.lzliang@gmail.com
徐惠成,电话:(023)68765403,E-mail: xhuicheng@yahoo.com.cn

stem cells,BMSCs)由于其多向分化潜能,以及低免疫原性,使之成为理想的种子细胞[6]。但是目前的研究的中,体外诱导它分化产生的平滑肌细胞在数量和功能上均难以达到改善治疗压力性尿失禁的目的。体内实验表明移植的 BMSCs 能在组织微环境中分化成与其周围细胞生物学特性相似的细胞,推测干细胞能够对环境中的调节信号做出适应性改变[7],而其分子机制尚不清楚,因此本研究模仿体内细胞生存的微环境,将其向平滑肌诱导,促进 BMSCs 向平滑肌细胞(smooth muscle cells, SMCs)分化效率,为 BMSCs 作为种子细胞用于组织工程研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级雌性 SD 大鼠, 1 月龄,体质量约 120 g,由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂

高糖 DMEM 培养基(HG-DMEM,Gibco 公司), 低糖 DMEM 培养基(LG-DMEM Gibco 公司)胎牛血清(FBS,Gibco 公司), PBS 缓冲液(中杉金桥公司),胰酶(Gibco 公司),Ⅱ型胶原酶(Sigma 公司),双抗(Gibco 公司), 悬挂式细胞培养小室(transwell,millipore 公司),抗平滑肌 α-肌动蛋白单克隆抗体(α-SMA ,中杉金桥公司),抗 calponin 单克隆抗体(abcam 公司),FITC 山羊抗小鼠 IgG(碧云天公司), DAPI(碧云天公司), 辣根过氧化物酶偶联的山羊抗小鼠二抗(北京中杉公司), GAPDH (康成公司)。

1.3 细胞培养

1.3.1 大鼠骨髓 BMSCs 的分离与培养 按照 Sun 等[8]的方法分离并培养 BMSCs。无菌条件下采集大鼠双侧股骨、胫骨,用 LG-DMEM 培养液冲洗骨髓腔,200 目不锈钢滤网过滤骨髓液,用密度为 1.073 g/ml Percoll 液离心,4 ℃ 2 000 r/min 离心 20 min,收集白膜层单个核细胞,PBS 洗涤 2 次,1 200 r/min 离心 10 min 去上清,加入 LG-DMEM 培养液中,含 10% 胎牛血清和 100 U/ml 青霉素,100 U/ml 链霉素,以 5×10^5 个/ml 接种于培养瓶,置 37 ℃的 5% CO_2 培养箱中培养。24 h 后更换培养基,以后每 3 天换液 1 次。待细胞接近 80% ~90% 融合时传代

1.3.2 膀胱平滑肌细胞(bladder smooth mucle cells, BMSCs)培养 无菌条件切取雌性大鼠膀胱,用眼科剪逐步分离除去膀胱内外侧黏膜和浆膜层,将平滑肌剪成 1 mm × 1 mm × 1 mm 组织块,37 ℃下用 0.25% Ⅱ型胶原酶消化 1 h,100 目筛网过滤除去组织块,细胞悬液 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清。吸管反复吹打,使成单细胞悬液,加入 HG-DMEM 培养液中,含 10% 胎牛血清和 100 U/ml 青霉素,100 U/ml 链霉素,以 5×10^5/ml 接种于培养瓶,置 37 ℃的 5% CO_2 培养箱中培养。24 h 后更换培养基,以后每 3 天换液 1 次。待细胞接近 80% ~90% 融合时传代。

1.4 建立 BMSCs 和 BSMCs 共培养体系

1.4.1 接触共培养组 将悬挂式细胞培养小室 transwell 底层的多孔膜(1 μm)向上倒置于大培养皿中,将原代 BSMCs 以 2×10^5 均匀种植于膜外面,在 37 ℃的 5% CO_2 培养箱中培养 6 h,待细胞贴壁后,翻转 transwell,PBS 洗去未贴壁细胞,将 transwell 放回含 BSMCs 培养液的 6 孔板中,在 CO_2 培养箱中培养,每 3 ~4 天换液 1 次,直至细胞长至单层汇合。将 BMSCs 2×10^5 均匀种植于膜内面,小室内加入 BMSCs 培养液,开始计时。在 CO_2 培养箱中培养,每 48 小时换液 1 次。

1.4.2 非接触共培养组 将 BSMCs 以 2×10^5 均匀种植于 6 孔板底,加 BSMCs 培养液,等细胞长至单层汇合,把 transwell 放入 6 孔板中,将 BMSCs 以 2 $\times10^5$ 均匀种植于 transwell 膜内面,小室内加入 BMSCs 培养液,开始计时。在 37 ℃的 5% CO_2 培养箱中培养,每 48 小时换液 1 次。

1.5 细胞鉴定及共培养对间充质干细胞影响的鉴定

1.5.1 流式细胞仪检测 取 1×10^6 BMSCs 细胞分别加入流式细胞抗体 CD45、CD44、CD90 ,抗体均购自 BD 公司,室温避光 30 min,PBS 冲洗后,流式细胞仪检测。

1.5.2 免疫荧光化学染色 应用免疫细胞化学方法检测平滑肌细胞、BMSCs 中平滑肌肌动蛋白(α-SMA)和 Calponin 的表达情况,并检测在共培养的第 2 天和第 8 天的 BMSCs 中 Calponin 的表达情况。方法如下:接触共培养的半透膜在固定前用棉签将下层的 BSMCs 擦净,PBS 冲洗,用 4% 多聚甲醛固定长有细胞的半透膜以及 BMSCs 和 BSMCs 爬片 30 min,PBS 漂洗 5 min × 3 次;滴加 0.25% Triton X-100 作用 10 min,PBS 漂洗 5 min × 3 次;5% BSA 室温下封闭 30 min;一抗 α-SMA、Calponin 按 1∶200 稀释后 4 ℃孵育过夜,PBS 漂洗 5 min × 3 次, FITC 山羊抗小鼠 IgG 按 1∶150 稀释后 37 ℃,孵育 60 min,PBS 漂洗 5 min × 3 次, DAPI 室温孵育 10 min 衬染细胞核,PBS 漂洗后封片,激光共聚焦显微镜下观察细胞。

1.5.3 Western 印记检测 Calponin 的表达 收集共培养 2、4、6、8 d 的细胞 ,以 BSMCs 为阳性对照组,没有诱导的 BMSCs 为阴性对照组,加入适量细胞裂解液,冰上裂解 30 min, 离心取上清液,即为各组细胞的总蛋白,Brandford 法测蛋白质浓度后,加入上样缓冲液煮沸 5 min,各实验组取含有 40 μg 总蛋白的样品进行 SDS-PAGE。电泳结束后将蛋白转移到 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 PVDF 膜 37 ℃孵育 1 h, 一抗 Calponin 按 1∶400 稀释后孵育 PVDF 膜 4 ℃过夜,PBS-T 洗膜, 5 min × 3 次,辣根过氧化物酶耦联的山羊抗小鼠二抗室温孵育 1 h,PBS-T 漂洗 PVDF 膜 3 次,5 min × 3 次,设 GAPDH 为内参照。

2 结果

2.1 细胞形态

倒置显微镜观察细胞形态发现 BMSCs 为成纤维样细胞,原代时呈集落生长(图 1A),传代后失去此种特性(图 1B),单个细胞形态呈多角型和梭型,待细胞基本长至 90% 融合时呈漩涡状生长;BMCs 为成纤维样细胞,呈长梭形(图 1C),细胞接近融合时呈漩涡状生长(图 1D)。

2.2 流式细胞仪检测

对 BMSCs 进行流式细胞术检测,测定 CD90 (FITC)、CD44 (PE)、CD45 (PE-Cy5)的表达情况,结果显示 CD90、CD44 表达阳性,阳性率分别为 99.78%,60.27%(图 2); CD45 表达阴性,阳性率为 0.21% (图 2),与文献[9]报道的 BMSCs 的表面标记

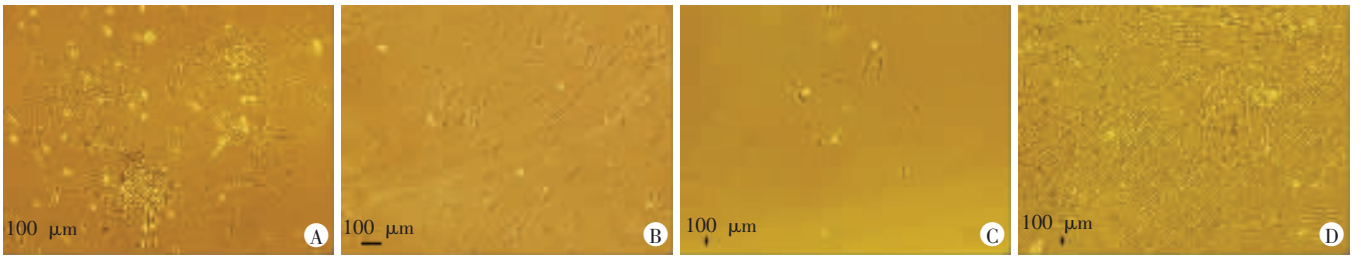
的情况一致。

2.3 免疫荧光化学染色

免疫荧光化学染色检测 SMCs 特异性的 α-SMA，Calponin 的表达，结果显示：在 BSMCs 均呈阳性表达（图 3A、C），在 BMSCS 中 SMA 为阳性，Calponin 为阴性（图 3B、D）。因 α-SMA 在两种细胞中不具备特异性，因此在共培养组中以 Calponin 为鉴定标准，检测其在诱导后的 BMSCs 中的表达情况。接触共培养的第 2 天，部分 BMSCs 中的 Calponin 表达呈弱阳性（图 3E），共培养第 8 天，部分 BMSCs 表达阳性（图 3F）。在非接触共培养组，Calponin 的表达阴性，与诱导前相同。

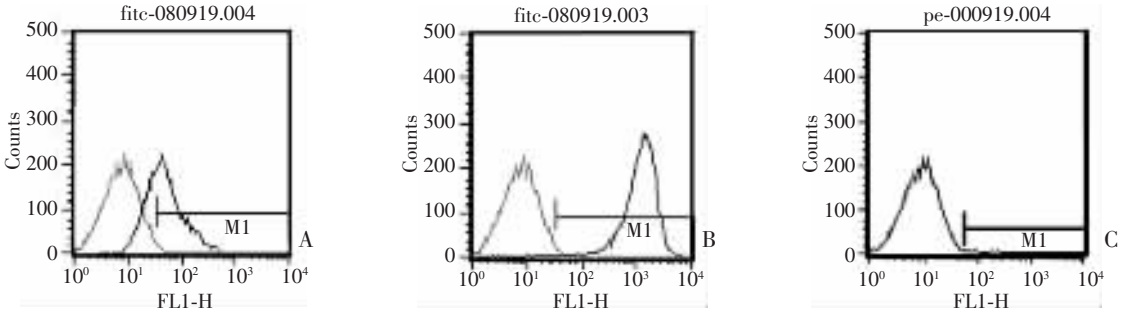
2.4 Western 印记检测

Western 印迹亦显示，BMSCs 本身表达少量的 Calponin 蛋白，随着接触组共培养时间的延长，Calponin 的表达随培养时间的延长逐渐增多，非接触组无明显变化（图 4）。



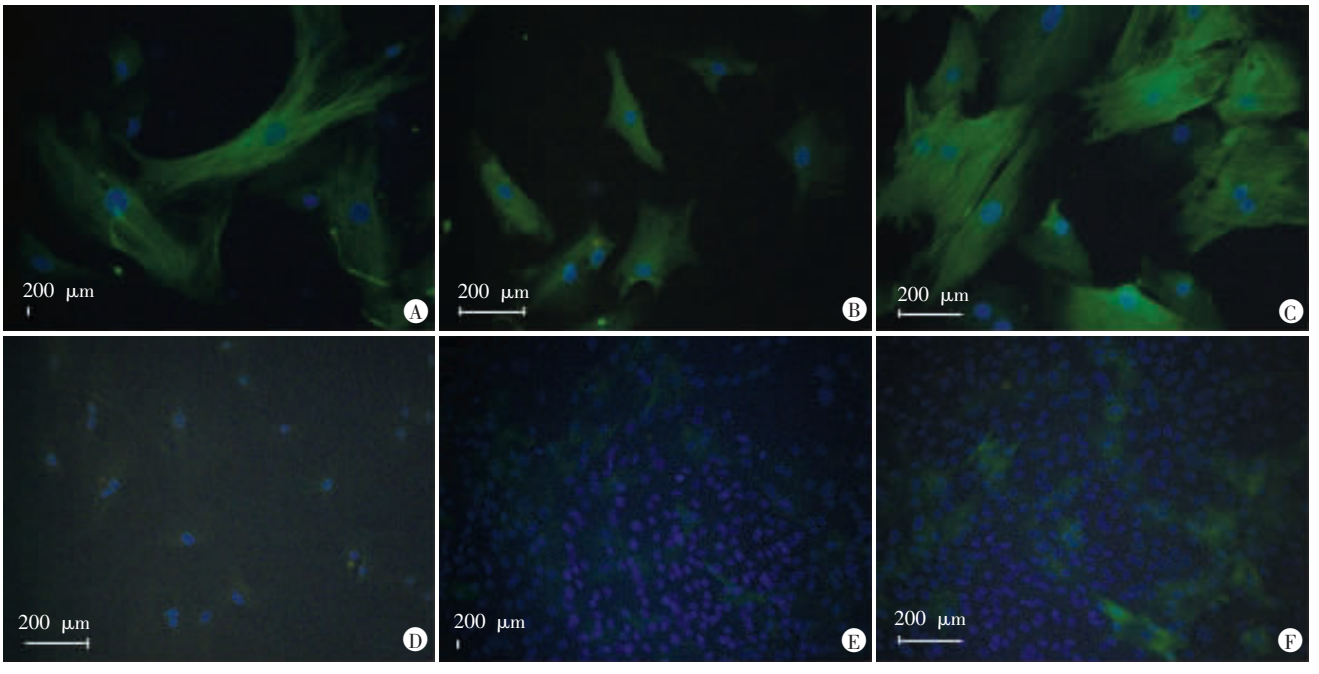
A：原代 BMSCs；B：传代后 BMSCs；C：原代 BSMCs 培养 24 h；D：原代 BSMCs 培养 9 d

图 1 BMSCs 和膀胱平滑肌细胞形态观察（倒置相差显微镜）



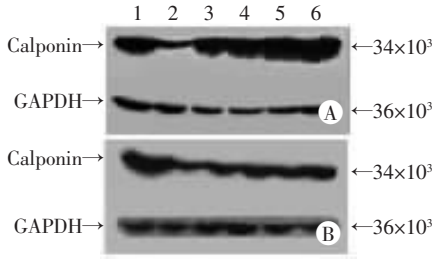
A：CD44 60.27%；B：CD90 99.78%；C：CD45 0.21%

图 2 流式细胞仪鉴定 BMSCs 表面标记



A：BSMCs α-SMA 标记；B：BMSCs 的 α-SMA 标记；C：BSMCs calponin 标记；D：BMSCs 的 calponin 标记；E：共培养 2 d 的 BMSCs 的 calponin 标记；F：共培养 8 d BMSCs 的 calponin 标记

图 3 免疫荧光检测平滑肌细胞和 BMSCs 的 α-SMA 和 calponin 表达（FITC）



1：BSMCs；2：BMSCs；3－6：两种细胞共培养2、4、6、8 d A：接触组；B：非接触组

图4 Western blot检测BMSCs的Calponin表达

3 讨论

女性压力性尿失禁与尿道壁内平滑肌和横纹肌减少有关[2]，是导致女性压力性尿失禁发病率随年龄增长而升高的主要原因，MSCs由于其多向分化潜能成治疗女性压力性尿失禁的一种新途径[10]，但是决定BMSCs分化的机制还不清楚。现在的研究认为BMSCs具体向哪个方向分化是由周围微环境所调控的[7,11]，即干细胞本身状态和所处的微环境决定了干细胞是处于静息状态、还是进行分化、成熟，并向何种类型的细胞进行分化，微环境是决定BMSCs分化的关键因素[12]。微环境包含多个方面，可溶性细胞因子，细胞与细胞间接触，细胞与细胞周围基质的作用等[13]，但是它们之间是共同作用还是单独作用就可影响BMSCs分化，是如何影响BMSCs分化尚属未知。

本实验通过改进实验方法设计了接触组和非接触组，初步探讨了微环境中的可溶性细胞因子和细胞间接触在BMSCs分化中的机制：研究中，首先建立两种细胞非接触共培养的模型，下层BSMCs分泌的可溶性细胞因子可通过悬挂式细胞培养小室的半透膜作用于BMSCs，但是随着共培养时间的延长，BMSCs的形态和平滑肌特异的calponin的表达并未出现改变，说明只有可溶性细胞因子单独作用，并不能激活BMSCs向SMCs分化的转录基因，引起细胞的分化。

在接触共培养组，不仅膜下层的BSMCs分泌的细胞因子可穿过小孔，两种细胞还可通过半透膜上的小孔形成细胞间连接BMSCs处于一个近似于立体的环境中，尽可能的模仿了细胞体内的生长环境，但是由于半透膜孔径的限制，细胞也不会穿过膜进入另一侧，随着共培养时间的延长，BMSCs表达SMCs特异的Calponin有了明显的增加，说明细胞间接触在BMSCs向SMCs分化的过程中是非常重要的。该实验初步发现除了分泌在细胞外的可溶性细胞因子外，一些转录激活所必须的因子及信号还必须通过细胞间缝隙连接进行传递[14,15]。

本研究初步证明了细胞与细胞间的接触在BMSCs分化中的重要作用，那么具体是什么因子导致了细胞定向分化转录水平的激活，通过何种信号途径，都是研究BMSCs分化机制的重要方面，在研究机制的基础之上，通过改进实验方法，诱导的BMSCs不仅有形态学的改变，还有结构和功能的改变，这些还有待进一步的研究。综上所述，BMSCs在体外平滑肌样环境中能分化为SMCs，BMSCs与平滑肌细胞间的直接接触是诱导分化的重要因素，利用这种方法可进一步深入研究BMSCs的分化潜能，提高分化效率，为BMSCs移植治疗压力性尿失禁提供理论支持。

参考文献：

[1] Dubeau C E. The aging lower urinary tract[J]. J Urol, 2006, 175(3 Pt 2): S11－S15.
[2] Fatton B. Urinary incontinence and menopause: epidemiological data [J]. Pelvi Perineologie, 2007, 2(2): 149－155.
[3] Smaldone M C, Chancellor M B. Muscle derived stem cell therapy for stress urinary incontinence[J]. World J Urol, 2008, 26(4): 327－332.
[4] Chung S Y, Krivorov N P, Rausei V, *et al*. Bladder reconstitution with bone marrow derived stem cells seeded on small intestinal submucosa improves morphological and molecular composition[J]. J Urol, 2005, 174(1): 353－359.
[5] Furuta A, Jankowski R J, Honda M, *et al*. State of the art of where we are at using stem cells for stress urinary incontinence[J]. Neurourol Urodyn, 2007, 26(7): 966－971.
[6] Bajada S, Mazakova I, Richardson J B, *et al*. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2008, 2(4): 169－183.
[7] Huang N F, Li S. Mesenchymal stem cells for vascular regeneration [J]. Regen Med, 2008, 3(6): 877－892.
[8] Sun S, Guo Z, Xiao X, *et al*. Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable method[J]. Stem Cells, 2003, 21(5): 527－535.
[9] Carrancio S, Lopez-Holgado N, Sanchez-Guijo F M, *et al*. Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification[J]. Exp Hematol, 2008, 36(8): 1014－1021.
[10] Kanematsu A, Yamamoto S, Iwai-Kanai E, *et al*. Induction of smooth muscle cell-like phenotype in marrow-derived cells among regenerating urinary bladder smooth muscle cells[J]. Am J Pathol, 2005, 166(2): 565－573.
[11] Gang E J, Jeong J A, Hong S H, *et al*. Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood[J]. Stem Cells, 2004, 22(4): 617－624.
[12] Hackney J A, Charbord P, Brunk B P, *et al*. A molecular profile of a hematopoietic stem cell niche[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(20): 13061－13066.
[13] Edelberg J M, Ballard V L. Stem cell review series: regulating highly potent stem cells in aging: environmental influences on plasticity[J]. Aging Cell, 2008, 7(4): 599－604.
[14] Giepmans B N. Gap junctions and connexin-interacting proteins[J]. Cardiovasc Res, 2004, 62(2): 233－245.
[15] Vinken M, Vanhaecke T, Papeleu P, *et al*. Connexins and their channels in cell growth and cell death[J]. Cell Signal, 2006, 18(5): 592－600.

（**收稿**：2009-09-15；**修回**：2009-12-12）
（编辑 邓强庭）