DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.09.031
第23卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 9
1068 2001年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)09-1068-03

大鼠真皮多能间充质干细胞的分离培养

史春梦,程天民 (第三军医大学预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨发育成熟高等动物真皮组织中是否存在多能间充质干细胞,对其进行分离培养并初步研究其基本生物学性状。方法 以新生大鼠为研究对象,依据间充质干细胞的黏附特性采用酶消化法对其分离,通过传代培养进行筛选;流式细胞技术检测细胞周期,MTT法检测细胞对生长因子的反应性,免疫组织化学法检测细胞表面分子的表达。结果 早期贴壁的大鼠真皮细胞经过连续传代培养至第3代,细胞形态较为均一,超过88%的细胞处于G_0/G_1期,细胞表面波形蛋白表达阳性,但Ⅷ因子和角蛋白表达阴性;体外培养细胞增殖旺盛,对bFGF有良好反应性,但对EGF和KGF反应不明显;地塞米松诱导分化实验证实该细胞可向成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞分化,具有多向分化潜能。结论 本实验证实发育成熟大鼠真皮组织中存在多能干细胞,成功地分离得到真皮来源的间充质干细胞并通过其基本生物学特性进行了鉴定。上述结果提示真皮有可能是间充质干细胞的又一重要来源途径。这为深入研究真皮间充质干细胞在组织修复与再生中的意义与应用提供了基础。

关键词:间充质干细胞;真皮;大鼠
中图法分类号:R322.991;R329.2 文献标识码:A

Isolation and culture of multipotent mesenchymal stem cells from neonatal rat dermis

SHI Chun-meng, CHENG Tian-min (The Institute of Combined Injury of PLA, Faculty of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To isolate multipotent mesenchymal stem cells (MSCs) from adult rat dermis and study their basic phenotypical and functional properties. **Methods** Dermis of neonatal rat were digested with 0.25% trypsin and cultured for 6 h *in vitro*, the adherent cells were harvested and subcultured. After the third subculture, the cells were used for experiments. Cell cycle was analyzed by measuring DNA content with FACScan flow cytometer and cell proliferation activity was tested by MTT method. Phenotypical analysis of MSCs was made with immunohistochemical ABC technique and differentiated cells were identified by specific staining. **Results** The adherent cells in 6 h cultured neonatal rat dermis showed high activity of proliferation in *ex vivo* culture and more than 88% of cells were in the G_0/G_1 phases, expression of vimentin on cell surface was positive, Factor Ⅷ and cytokeratin were negative; bFGF can promote cell proliferation, but EGF and KGF failed. Dexamethasone treatment induced cell differentiation into osteocytes, chondrocytes and adipocytes. BMP-2 treatment induced cells to form calcium nodules. **Conclusion** Mesenchymal stem cells exist in rat dermis and can be isolated by their adherent ability. Dermis may be another important source of mesenchymal stem cells.

Key words: mesenchymal stem cell; dermis; rat

干细胞是具有高度增殖和自我更新能力,并可分化为多种不同靶细胞的细胞。在个体发育的过程中,干细胞经历了从全能干细胞(胚胎干细胞)到多能干细胞再到定向干细胞,最终分化为不同的成熟组织细胞的演变过程。近来,各个阶段干细胞的研究均取得了重要的进展。间充质干细胞来源于发育早期的中胚层和外胚层,具有广泛的分化潜能,可向多种中胚层和外胚层来源的组织细胞分化;更令人惊讶的是近来发现这类细胞广泛存在于成熟个体的多种组织中,目前已经在骨髓、肌肉、大脑、骨膜等多种组织中均证实有间充质干细胞的存在。这些发现使人类开始重新认识高等动物成熟体细胞的发育潜能,而这无论在基础研究还是应用研究中均具有重要的价值[1]。

皮肤是机体自我更新速度最快的组织之一,在受到创伤后,局部组织细胞反应强烈,修复细胞如血管内皮细胞和成纤维细胞等大量产生并发挥效应是组织修复的重要环节。长期以来,修复细胞的来源除局部成熟细胞的激活增殖以外,人们一直推测在机体成熟组织中可能存在着更早层次的作为修复细胞来源的前体细胞参与组织再生和修复。但由于受到理论和实验技术的局限这方面的研究进展缓慢,尚未见明确的研究报道。本实验基于近来干细胞研究的进展,以新生大鼠的皮肤为研究对象,成功体外分离得到真皮来源的间充质干细胞并对其部分生物学性状进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物为出生1 d的Wistar大鼠,购自本校实验动物中心。培养基和添加成分:IMDM和胎牛血清购Hyclone自公司;地塞米松购自Sigma公司;BMP-2购自军事医学科学院;EGF由解放军304医院付小兵教授赠送;KGF和bFGF购自晶美生物公司;Ⅷ因子、vimentin和Pancytokeratin免疫组化检测试剂盒购自博士德生物公司。

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目(G1999054205)
作者简介:史春梦(1974-),男,天津市人,博士研究生,助教,主要从事成体干细胞在组织修复与再生中的基础与应用方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68752278
收稿日期:2001-06-01;修回日期:2001-08-23

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2　间充质干细胞的分离

取出生 1 d 的大鼠, 引颈处死, 酒精消毒, 剪取背部全层皮肤置于 0.25% 的胰酶中, 4 ℃消化过夜, Hanks 液轻洗 3 次, 剥去表皮, 无菌刀片去除皮下组织, 分离真皮组织层(组织切片证实), 用滴管吹打成单细胞悬液, 过滤除去大块组织和碎片, 接种于塑料培养瓶, 培养条件为 IMDM+10% 胎牛血清, 37 ℃, 5% CO_2。培养 6 h 后, 轻轻弃去悬浮细胞, 将贴壁细胞继续培养, 待长满瓶地大部分后, 胰酶消化, 常规传代。取传至第 3 代的细胞进行研究。

1.3　间充质干细胞的生物学特性

取第 3 代贴壁细胞, 以 5×10^4/孔接种于培养瓶中, 按上述方法继续培养, 分别于第 2、4、6、8、10、12、14 天胎盘蓝染色计数活细胞数, 绘制生长曲线; 流式细胞仪检测细胞周期含量; 取第 3 代贴壁细胞, 以 2×10^5/孔的密度接种于 96 孔板, 分别加入不同浓度的 EGF、KGF 和 bFGF, 按上述方法继续培养 2 d, MTT 法检测培养细胞对不同生长因子的反应性。取第 3 代贴壁细胞, 使其在盖玻片上生长, 1 d 后取出, 弃去培养液, PBS 轻洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定。免疫组织化学 ABC 法检测 Ⅷ因子、vimentin 和 Pancytokeratin 的表达, 一抗为小鼠抗大鼠的单克隆抗体, 工作浓度为 1∶100, 操作步骤按照说明书进行, DAB 显色后, 光镜观察结果。

1.4　间充质干细胞的体外诱导分化

将第 3 代的贴壁细胞在盖玻片上培养, 加入不同浓度的地塞米松进行多向分化诱导, BMP-2 进行定向成骨分化诱导, 于不同时相点光镜观察细胞的形态学改变。4 周后, 取出盖玻片, 固定, 染色, 观察细胞分化情况。组织染色方法参照文献[3] 进行, 钙盐染色采用 McGee-Russell 核固红法, 碱性磷酸酶染色采用 Gomori 改良钙钴法, 脂肪染色采用油红法, 软骨染色采用阿尔辛蓝丽春红组合法。

2　结果

2.1　皮肤间充质干细胞的分离和培养

原代细胞经过 6 h 的体外培养后有少量细胞贴壁。弃去悬浮细胞后继续培养, 发现细胞呈克隆生长, 培养 3 d 后, 倒置显微镜下可见多个细胞克隆, 继续培养后细胞逐渐融合在一起, 见图 1。早期贴壁的细胞形态异质性较大, 以梭形和多角形为主, 细胞体积较大。传代培养至第 3 代以后, 细胞形态比较均一, 主要为梭形。流式细胞仪检测细胞周期结果为: G_0/G_1 细胞为 88.13%, 见图 2。免疫组织化学法发现, 体外分离培养的细胞 Ⅷ因子和 cytoKeratin 表达为阴性, vimentin 表达呈阳性。生长曲线测定的结果显示, 所分离的细胞具有很强的增殖活性, 见图 3, 进一步观察到经过 15 代连续培养后的细胞其增殖能力未见明显改变。应用 MTT 法检测还发现, 细胞对 bFGF 具有良好的反应性, 而对 EGF 和 KGF 的反应不明显, 见表 1。

表 1　皮肤间充质干细胞对不同生长因子的反应性

Tab 1　Effects of growth factors on dermis MSCs

Growth factor (2 d)	D_λ
EGF	0.235±0.019
bFGF	0.322±0.021
KGF	0.232±0.018
Control	0.231±0.016

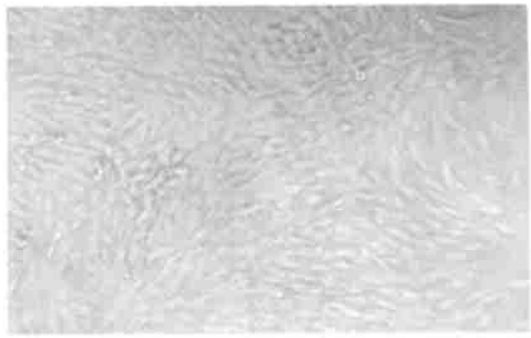


图 1　培养后融合成片的贴壁细胞　(× 100)

Fig 1　The adherent cells fused into pieces　(× 100)

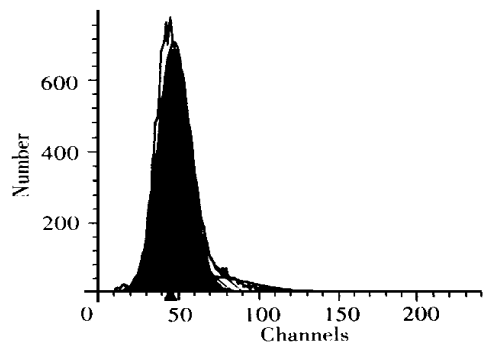


图 2　细胞周期流式细胞仪分析结果　G_0/G_1 期: 88.17%; G_2/M 期+S 期: 11.83%, 其中 G_2/G_1 期: 2.00%

Fig 2　Analysis of cell cycle by FACS　G_0/G_1 phase: 88.17%, G_2/M+S phase: 11.83%; G_2/G_1 phase: 2.00%

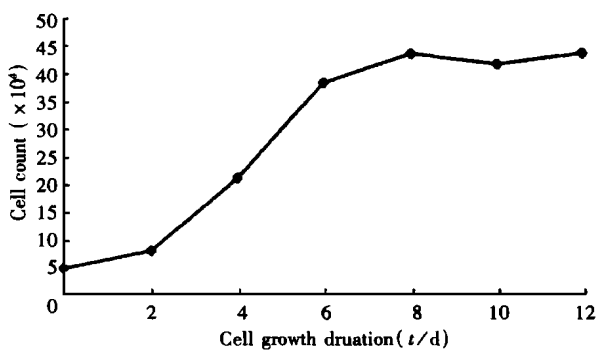


图 3　皮肤间充质干细胞的生长曲线

Fig 3　Proliferation curve of dermis MSCs

2.2　皮肤间充质干细胞的分化潜能

分化的多向性是干细胞最重要的特征之一。本实验采用一种广谱的分化诱导物—地塞米松来观察分离细胞的反应性。结果发现 1 μmol/L 地塞米松作用 4 周后, 细胞碱性磷酸酶染色、钙盐染色、软骨染色和脂肪染色均呈阳性, 提示分离细胞经诱导可向成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞分化, 见图 4; 进一步选择一种成骨特异性的诱导因子-BMP-2 作用, 发现细胞对 BMP-2 的诱导也呈现明显的反应性。0.1 μg/ml BMP-2 诱导 3 d 后, 光镜下可见细胞聚集成簇, 既继而细胞分泌黑色颗粒, 分泌物堆积成云雾状黑色小节, 最后形成多个钙结节, 组织染色证实碱性磷酸酶和钙盐均呈阳性, 见图 5。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



图 4 地塞米松诱导后细胞脂肪染色、软骨染色和钙沉积染色呈阳性 (×100)
A: 钙染色; B: 软骨染色; C: 脂肪染色

Fig 4 Confirmation of multilineage differentiation of dermis MSCs by specific staining (×100)
A: Calcified matrix stain for osteocytes; B: Alcian blue stain for chondrocytes; C: Oil red O stain for adipocytes

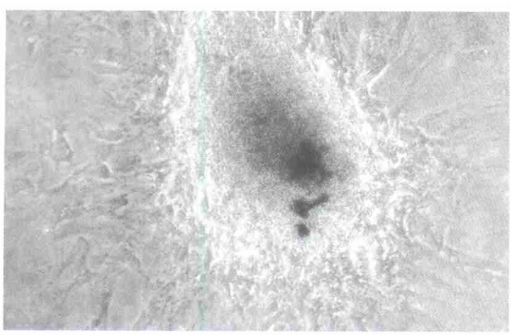


图 5 BMP-2 诱导 5 d 后细胞成簇生长, 分泌黑色颗粒, 并形成云雾状小节 (×200)

Fig 5 Dermis MSCs gathered, produced black partides and the secretion became smear after treatment with BMP-2 for 5 days (×200)

3 讨论

成熟机体组织中存在多能干细胞是近来干细胞研究领域取得的重要进展之一。上皮是机体内增殖更新最快的组织, 已经证实多种上皮组织中均存在有多能细胞, 这些细胞对深入研究组织再生修复的机制以及应用这些细胞进行相关疾病或损伤的细胞治疗与基因治疗具有重要的价值。皮肤组织更新速度快, 再生能力强, 我们推测除存在表皮干细胞外, 在成年机体的真皮组织中可能还含有较丰富的间充质干细胞。以往有研究发现在鸟类的多种结缔组织包括真皮中存在多能间充质干细胞[4], 但对高等动物的真皮组织中是否存在多能干细胞尚未明确。由于目前对间充质干细胞的研究尚未发现特异性的表面标志分子, 因此很难应用 FACS 或 MACS 对其进行分选。有报道, 间充质干细胞具有较强的粘附能力, 可依据这一特性进行分离[5]。本实验即基于这一原理从真皮组织中分离间充质干细胞。为尽可能获取较高纯度和生长稳定的细胞, 本实验主要分离培养 6 h 以内的贴壁细胞, 并取传代至第 3 代的细胞为研究对象。发现原代细胞中大部分为梭形和多角形, 体积较大, 并呈克隆性生长。但经传至第 3 代后细胞形态比较一致, 主要为梭形细胞。体外培养证实分离的细胞有较强的增殖能力, 连续传代培养 15 代后, 细胞的增殖活性未见明显改变。分离的细胞表面标志 VIII 因子和 cytoKeratin 为阴性, 可排除为内皮细胞和角质细胞的可能; vimentin 呈阳性, 提示该细胞为间质来源。此外细胞对 bFGF 具有良好的反应性, 而对 EGF 和 KGF 则未见明显反应性的结果也间接证实了分离细胞的间质来源。通过地塞米松与 BMP-2 的诱导实验, 证实分离的细胞具有向成骨、成软骨和成脂等多向分化能力并对诱导物有明显的反应性。因此, 通过这些实验, 我们证实分离的细胞具有高度的增殖能力和多向分化潜能、表达有间质标志并对 bFGF 有良好的反应性, 具有干细胞的主要特性。此外, 由于处于静止状态也是干细胞的一个重要特性, 通过流式细胞仪发现分选的细胞绝大多数 (88%以上)处于 G_0/G_1 期, 也支持分选细胞为间充质干细胞。进一步体内诱导实验的结果还显示分离到的真皮间充质干细胞可向成纤维细胞、血管内皮细胞和肌细胞分化, 且其分化诱导潜能更强于其他组织来源的间充质干细胞(待发表)。

通过本研究, 我们证实在发育成熟大鼠的皮肤组织中存在多能干细胞, 而且应用消化—贴壁—传代的程序成功地分离得到这些间充质干细胞, 从而提示真皮可望成为间充质干细胞的又一重要来源途径。另据 8 月 17 日纽约(路透社—健康专栏)报道在今年 9 月出版的最新一期《Nature-Cell Biology》杂志上即将刊登有关加拿大科学家从大鼠皮肤内层-真皮中分离出可分化为神经细胞, 脂肪细胞, 肌细胞等多种细胞的多能干细胞的研究论文, 这一报道也支持了我们的研究结果。因此我们相信, 在此基础上对这类细胞在组织修复与再生中的变化特点及调控机制进行深入研究, 将为组织修复与再生的理论及寻找新的促愈途径提供线索; 而深入研究这类细胞体外的生长规律, 优化体外扩增和定向诱导其向特定细胞分化的培养体系, 还将为组织工程及相关组织器官损伤的细胞治疗甚至基因治疗提供良好的种子细胞。

参考文献:

[1] Shi C M, Cheng T M, Su Y P. Exploring the developmental potential of adult somatic cells[J]. Chin Sci Bull, 2001, 46(1): 4—5.
[2] Vogel G. Capturing the promise of youth[J]. Science, 1999, 286(5 448): 2 238—2 239.
[3] 龚志锦, 詹容洲 编著. 病理组织制片和染色技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1994. 135—312.
[4] Prockop D J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues [J]. Science, 1997, 276(5 309): 71—74.
[5] Young H E, Ceballos E M, Smith J C, *et al*. Pluripotent mesenchymal stem cells reside within avian connective tissue matrices[J]. *In Vitro* Cell Dev Biol Anim, 1993, 29A(9): 723—736.

(编辑 王 红)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net