

兔结膜基质诱导人骨髓间质干细胞分化的初步研究

黄丹平, 郑健梁, 高前应, 葛 坚, 刘金陵
(中山大学中山眼科中心, 广东 广州 510060)

摘 要:【目的】观察人骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)在保存人羊膜及兔眼表结膜基质上分化的情况。【方法】24只新西兰兔随机分为2组。实验组:培养有人MSCs的羊膜移植组,将人MSCs接种在保存人羊膜上培养4d,用5-溴脱氧尿嘧啶(BrdU)标记后移植到兔眼表结膜缺损区;对照组,单纯羊膜移植组。分别于移植后1,2,3,4,6和8周,摘取各组实验眼行组织学和免疫组织化学检查,组织学检查移植到兔结膜基质的MSCs的存活、形态变化以及移植局部的反应等情况;免疫组织化学检测移植到结膜基质的带有BrdU标记的细胞角蛋白3/12(CK3/CK12)和角蛋白13(CK13)的表达。【结果】MSCs接种到羊膜后能在羊膜上生长,与羊膜共培养4d后,MSCs贴附羊膜生长迅速,组织学特征无明显改变。用羊膜负载MSCs移植到兔结膜缺损区,术后免疫组织化学检测结膜上皮层CK13表达阳性,CK3/CK12表达阴性,在重建的结膜上皮层可检测到BrdU核阳性细胞,未见异常增殖细胞。【结论】人羊膜可作为MSCs的载体,采用人羊膜负载MSCs行兔结膜移植,MSCs能在兔结膜上皮层存活并增殖。

关键词:骨髓间充质干细胞;羊膜;结膜上皮细胞;诱导分化

中图分类号:R77

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2006)01-0024-05

Preliminary Study on Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells Induced by Conjunctival Stroma of Rabbits

HUANG Dan-ping, ZHENG Jian-liang, GAO Qian-ying, GE Jian, LIU Jin-ling
(Zhongshan Ophthalmic Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract:【Objective】To investigate the differentiation of human mesenchymal stem cells (MSCs) induced by human amniotic membrane and conjunctival stroma of rabbits.【Methods】Twenty-four New Zealand albino rabbits were equally and randomly divided into 2 groups: the experimental group was the human MSCs combined with amniotic membrane transplantation group and the control group was the amniotic membrane transplantation group. The MSCs were cultured on preserved human amniotic membrane for 4 days and labeled with 5-Bromo-2-deoxyuridine (BrdU), then they were transplanted on the scleral area of New Zealand albino rabbits. The eyeballs were taken off after 1, 2, 3, 4, 6, and 8 weeks. The growth and differentiation of human MSCs were observed by histopathological and immunohistochemical examination.【Results】The MSCs grew well on amniotic membrane. The histological characters of MSCs did not changed. When the MSCs cultured on amniotic membrane were transplanted on the scleral area of rabbits, Immunohistochemical examination revealed that the conjunctival epithelial were positive in cytokeratin 13 staining and negative in CK3/CK12 staining. The BrdU positive cells in reconstructive conjunctival epithelial were found. There were no abnormal proliferative cells.【Conclusions】The MSCs may be cultured on human amniotic membrane in vitro. When they were cultured on amniotic membrane and transplanted onto the scleral area of rabbits they could survive, proliferate without abnormal proliferation.

Key words: mesenchymal stem cells; amniotic membrane; conjunctival epithelial cells; differentiation

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(1):24-28]

收稿日期:2005-04-10

基金项目:国家重点基础研究发展(973)基金资助项目(G1999054301);国家高技术研究发展计划(863计划)基金资助项目(2003AA205005);广东省自然科学基金资助项目(031734)

作者简介:黄丹平(1964-),女,广东揭阳人,博士,副主任医师;葛 坚,教授,博士生导师,通讯作者。E-mail:cjiange@hotmail.com

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

眼表疾病是一组高发发病率的难治性眼病, 严重眼表疾病的治疗, 一直是眼科学者面临的非常棘手的问题。对于双眼大面积结膜缺损或损伤, 现有的治疗方法不能完全解决结膜移植的材料来源, 采用组织工程学方法构建生物结膜是解决大面积结膜缺损的一个重要途径。而构建生物结膜最重要的是获取种子细胞。随着种子细胞的进一步研究, 骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSCs) 已逐渐成为目前研究的热点。MSCs 是存在于骨髓基质系统中一种具有多向分化潜能的干细胞。最近的研究表明 MSCs 具有强大的增殖力和多向分化潜能, 不仅具有向中胚层间质细胞分化的能力, 还具有向外胚层和内胚层细胞分化的能力。已有报告将 MSCs 诱导分化为多种细胞如成骨细胞、软骨细胞、肌肉细胞、脂肪细胞以及神经细胞等, MSCs 是否具有分化为结膜上皮细胞的潜能, 国内外文献尚未见报道。为了探索 MSCs 作为结膜上皮种子细胞的可能性, 本文研究 MSCs 在人羊膜和兔眼表结膜基质微环境下的分化方向, 希望为以后构建生物结膜提供合适的细胞来源。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

胎儿骨髓: 取自孙逸仙纪念医院妇产科, 经米索前列腺醇引产的 5~7 月无病理情况胎儿的股骨和胫骨。深低温保存人羊膜: 由本中心眼库提供。实验动物: 普通级新西兰白兔, 体质量 2.0~3.0 kg, 由中山大学动物实验中心提供。试剂: 低糖 DMEM 培养基, 胎牛血清, 均为 GIBCO/BRL 产品。聚蔗糖 (Ficoll) 1.077 g/mL, 天津。单克隆抗体: AE5, 角蛋白 cytokeratin3/12 抗体; DE-K13, 角蛋白 cytokeratin10/13 抗体, 均为 American Research products, Inc. ARP 公司产品。5-溴脱氧尿嘧啶 ($5'$ -Bromo- $2'$ -deoxyuridine, BrdU) 和 BrdU 抗体: Sigma 公司。免疫组化二抗试剂盒, DAB 显色试剂盒: 武汉博士德公司。荧光标记小鼠抗人抗体: Ancell 公司和 PharMingen 公司。

1.2 MSCs 的分离和培养

骨髓用 L-DMEM 培养液 2 倍稀释后, 按常规分离方法 (1.077 g/mL Ficoll 分离液) 制备单个核细胞 (MNC)。多次洗涤后以骨髓 MNC 2×10^6 /mL 密度分别接种于 25 cm^2 的塑料培养瓶, 加入含 L-

DMEM 的完全培养基, 置 37°C 、体积分数 5% CO_2 , 饱和湿度培养箱中, 3~5 d 后全量换液, 去除未贴壁细胞, 以后每 3 天换液 1 次, 倒置相差显微镜逐日观察细胞形态、贴壁情况及生长情况, 待细胞融合达 80%~90%, 用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化, 进行传代、扩增培养。

1.3 MSCs 表面标志的检测

将不同来源的 MSCs 用 PBS 多次洗涤后, 分别加入荧光标记的抗体, 4°C 孵育 30 min, PBS 洗去未标记抗体, 10 g/L 多聚甲醛固定, 应用 FACSscan 流式细胞仪分析样本中 1×10^4 个细胞的相应标记抗原的阳性表达率, 每个样本都用 FITC 或 PE 标记, 同型 IgG 作为相应的阴性对照。

1.4 人羊膜的制备

无菌条件下取健康足月剖腹产产妇的羊膜, 将羊膜铺平, 按上皮面朝上, 基底面朝下平铺在硝酸纤维素膜上, 浸泡在 1 000 U/mL 庆大霉素生理盐水中, 30 min 后, 在超净工作台中将其移入盛有 DMEM 培养基的平皿中。存放在纯甘油加 DMEM (1:1) 保存液, -80°C 下保存备用。

1.5 MSCs 接种于羊膜表面培养

无菌条件下将羊膜剪成 4 cm 的圆形小块, 将羊膜按上皮面朝上铺于 6 孔培养板, 取传代培养 48 h 的 MSCs 细胞, 接种于铺好的羊膜表面, 加足量 L-DMEM 完全培养基每日半量换液 1~2 次。荧光倒置相差显微镜下观察 MSCs 形态。将在羊膜上培养 4 d 的 MSCs 分为两组, 一组以 1.25 g/L 蛋白酶-EDTA 消化液消化为单细胞, 离心, 弃上清后行 MSCs 表面标志测定。另一组培养 4 d 后移植到实验动物结膜缺损区, MSCs 移植前, 将 BrdU 加入到培养液中, 使终浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 。

1.6 细胞移植实验

实验兔随机分为 2 组, 每组 12 只, 右眼为实验眼。实验组: 培养有 MSCs 的羊膜移植组; 对照组, 单纯羊膜移植组。实验兔麻醉后, 按常规洗眼, 消毒铺巾, 开睑器开睑。实验组: 剪去上部 (10:00~2:00) 的长方形球结膜后, 将负载 MSCs 的羊膜上皮面向下覆盖到结膜缺损区, 10-0 缝线紧密缝合, 将羊膜固定于巩膜浅层。对照组: 将羊膜上皮面向下, 覆盖到结膜缺损区后缝合。

1.7 动物处死方法、时间与取材

分别于术后 1、2、3、4、6、8 周处死动物, 每组 2 只, 取出眼球, 切下术区, 用 100 mL/L 中性甲醛

固定 24 h 以上,制备石蜡切片,分别作 HE 染色和 AE5、DE-K13、BrdU 抗体免疫组化染色,观察移植细胞的存活、生长、分化情况。

1.8 免疫组织化学检查:

组织切片常规脱蜡后,用 PBS 冲洗 3 次,采用 S-P 法,按免疫组织化学试剂盒的通用方法依次加入 A 溶液、B 溶液、第一抗体(包括 AE5、DE-K13 及 BrdU)、C 溶液(二抗)、D 溶液,检测 BrdU 前标本先用 2NHCL 作用 25 min,使 DNA 变性(因 Anti-BrdU 只能结合单链上的 BrdU),采用 DAB 显色,本实验采用棕色,苏木素复染,脱水后封片。

2 结果

2.1 MSCs 的培养和鉴定

骨髓 MSCs 接种于塑料培养瓶后,72 h 完全换液,去除未贴壁细胞,此时贴壁的细胞呈长梭形;5~7 d 可见由几十个或数百个细胞组成的集落,细胞形态均一。每个集落中的细胞不断增殖,呈“漩涡状”,辐射状,培养 2~3 周左右每个小集落形成约数百至上千个细胞的大集落。HE 染色后,细胞呈梭形,多角形,胞浆淡蓝色,核圆形或椭圆形,可见深蓝色的核仁,染色体疏松。经胰蛋白酶消化后的 MSCs 呈圆形,胞体较大,传代 24 h 后完全贴壁、伸展,仍呈长梭形,传代后的 MSCs 生长迅

速,细胞形态光镜下亦无明显区别。

取 P₃ 代细胞行流式细胞仪检测,结果显示, MSCs 易纯化, P₃ 代细胞均一性达 95% 以上。CD29、CD44、CD105 和 CD166 的抗原表达均为阳性(图 1);造血细胞表面标志: CD34、CD8、CD19、CD45、CD14、CD33 等表达均为阴性;与 GVHD 发生密切相关的表面标志: HLA-DR、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、CD40 和 CD40L 均为阴性。

2.2 MSCs 在人羊膜上的分化情况

MSCs 接种在 HAM 的基质面后很快贴附生长,细胞呈梭形,胞核大,细胞活力好,48 h 后融合成单层,第 4 天可见 MSCs 在 HAM 的基质面密集生长,细胞形态难以辨认。免疫组化检测羊膜上 MSCs 的表面标志,流式细胞仪结果显示,羊膜上 MSCs 的表面标志与未接种于羊膜上的 MSCs 细胞一致。

2.3 羊膜负载人 MSCs 移植到兔结膜基质后观察

两组术后改变基本一致:术后第 7 天,植片开始出现轻度水肿。第 2 周,植片水肿逐渐消退,见新生血管长入植片,羊膜植片与植床周边结膜愈合良好,未见瘢痕增生,植片与周边结膜难以分辨。第 4~8 周,植片呈半透明,无眼球粘连,眼球运动正常。

2.4 组织学检查

组织学改变基本一致,术后 2 周:羊膜植片开始溶解,基底膜上见 2~4 层上皮细胞(图 2);术后 4 周:羊膜植片大部分溶解,上皮细胞 2~3 层,连续整齐排列;术后 6~8 周:植床上见上皮细胞连续,细胞 2~3 层,细胞小而圆,大量杯状细胞分布在表层上皮细胞间。两组均未见异常增殖细胞。

2.5 免疫组织化学检查

两组 DE-K13 染色结膜上皮层呈棕黄色(图 3), AE5 染色阴性。实验组: BrdU 染色在结膜上皮层以及羊膜下可见核阳性细胞(图 4),胞核阳性细胞比例为 10%。对照组: BrdU 染色未见核阳性细胞。

3 讨论

3.1 MSCs 的分离和鉴定

MSCs 是存在于骨髓基质系统中一种具有多向分化潜能的干细胞,它可以分化形成多种中胚层组织,包括骨、软骨、肌腱、肌肉和脂肪组织及骨

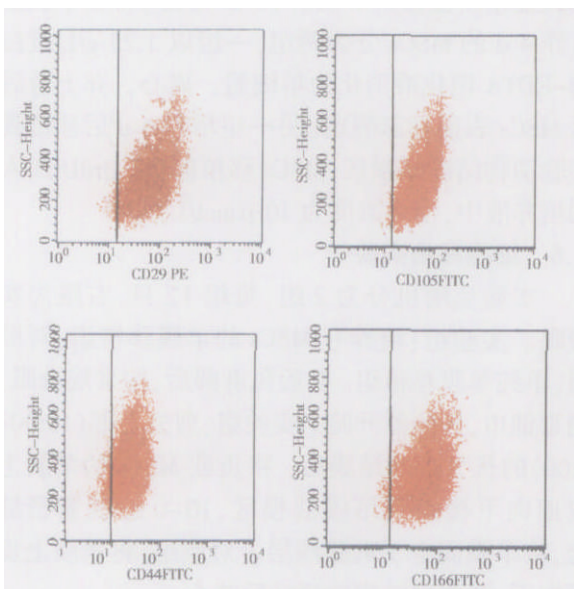


图 1 流式细胞仪检测人 MSCs CD29、CD44、CD105、CD166 阳性图

Fig.1 The human MSCs showed positive in CD29, CD44, CD105, CD166 by flow cytometry

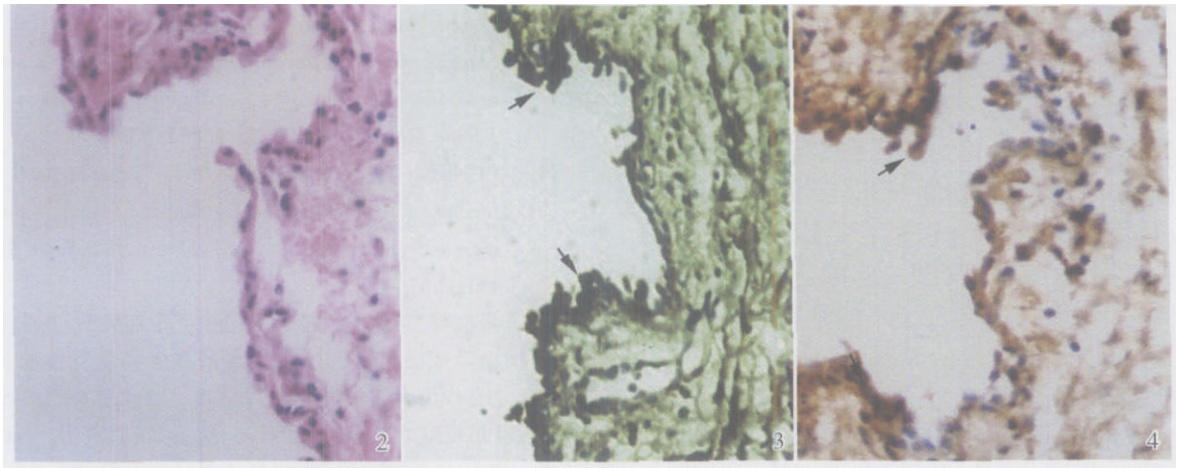


图 2 人 MSCs +羊膜结膜移植术后 2 周组织学

图 3 人 MSCs +羊膜结膜移植组结膜上皮 DE- K13 染色结果

图 4 人 MSCs +羊膜结膜移植组结膜上皮 BrdU 染色结果

Fig.2 The conjunctiva at the 14th day post transplantation of MSCs cultured on amniotic member ($\times 200$)

Fig.3 DE- K13 dyed conjunctival epithelial of experimental group ($\times 200$)

Arrow: K13 positive cell

Fig.4 BrdU dyed conjunctival epithelial of experimental group ($\times 200$)

Arrow:BrdU positive cell

髓基质结缔组织, 还可向来自外胚层的神经细胞分化。Liechty 等^[1]利用人的 MSCs 移植绵羊, 证实异基因移植的 MSCs 不仅具有多向分化的能力, 而且具有特殊的免疫特点, 能够在异基因环境中存活, 所以 MSCs 的研究受到广泛的关注。

我们采用密度梯度离心法分离 MSCs, 取含 MSCs 的低密度层进行 MSCs 的分离, 将大部分造血细胞和单个核细胞分离开来, 再经过多次换液和传代, 去除悬浮生长的造血细胞, 获得高纯度的 MSCs, 流式细胞仪结果显示, MSCs P3 代细胞均一性达 95% 以上。对 MSCs 的鉴定至今未找到特异性抗原标记^[2-5], 主要依靠细胞形态和表面标志物鉴定。我们培养的 MSCs 形态均一, 为梭形, 成纤维细胞样, 反复传代后细胞形态不变, 增殖速度不减, 细胞表面物流式细胞仪结果显示, 所培养的细胞 CD29、CD44、CD105 和 CD166 的抗原表达均为阳性, 而造血细胞表面标志 CD34、CD8、CD19、CD45、CD14、CD33 等表达均为阴性, 与 GVHD 发生密切相关的表面标志: HLA- DR、B7- 1 (CD80)、B7- 2 (CD86)、CD40 和 CD40L 均为阴性, 说明所培养的细胞不是骨髓中的另一大类细胞—造血干细胞, Prockop 等^[6]认为, 骨髓来源的贴壁粘附细胞就是 MSCs。表明本实验培养的细胞为 MSCs。

3.2 人羊膜和兔结膜基质对 MSCs 的诱导作用

将 MSCs 接种到保存人羊膜上培养 4 d 后, MSCs 能在羊膜上贴附生长, 羊膜可作为 MSCs 的载体, 流式细胞仪检测 MSCs 表面标志未发生改变, 说明保存羊膜对 MSCs 无明显诱导分化作用。

本实验采用的免疫组化试剂 CK13 主要是识别结膜上皮细胞, AE5 主要是识别角膜上皮细胞, 而 BrdU 是一种胸腺嘧啶核苷类似物, 处于 DNA 合成期的细胞可摄取它作为合成 DNA 的原料。当它被整合在 DNA 链以后, 可作为半抗原与 BrdU 抗体结合, 从而被免疫细胞化学法检测出来。利用 BrdU 标记技术可以识别外源性 MSCs 细胞, 观察其在兔结膜基质的存活和增殖情况, 本实验结果显示: 结膜上皮层 CK13 阳性, AE5 阴性, 实验组在重建的结膜上皮层上检测到细胞核抗 BrdU 阳性细胞, 说明人 MSCs 能在兔结膜上皮层存活和增殖, 参与了结膜上皮的重建。已有研究表明人 MSCs 植入到大鼠的纹状体内, 可存活并分化为星形胶质样细胞, 且这些细胞与脑内神经干细胞有相似的迁移方式^[7-10]。将培养的 MSCs 植入体内, 它可在多种造血以外的组织如肺、骨、软骨、皮肤等处定位和分化, 并表现出相应组织细胞的表型^[11]。本文的研究结果与上述实验的结果一致, 充分说明了骨髓间质干细胞在分化的过程中, 其所处的体内微环境起重要的作用^[11-13]。

3.3 人 MSCs 作为结膜上皮种子细胞的可能性

人 MSCs 能在兔结膜基质存活并增殖, 同时在重建的结膜上皮层可检测到 MSCs 来源的细胞, 推测有部分 MSCs 分化为结膜上皮细胞, 我们可以通过模拟结膜微环境诱导 MSCs 分化为结膜上皮细胞, 从而实现将 MSCs 作为结膜上皮细胞种子细胞这一目标, 这些有待于进一步的研究。MSCs 不同于其它干细胞的优点在于不但具有惊人的分化可塑性, 可以跨越胚层的界限, 而且来源丰富, 取材方便, 容易分离和纯化, 在体外可迅速扩增, 可通过自体移植克服伦理和免疫排斥问题, 所以 MSCs 具有更重要的应用前景。

3.4 人 MSCs 在异体环境存活和分化的机制

本实验采用人 MSCs 移植到兔结膜基质, 属于异种移植, 存在免疫排斥反应, 人 MSCs 在移植后短期内能存活, 说明人 MSCs 能在异基因环境存活, 与 Azizi^[7]和 Liechty 等^[1]的研究结果一致, 其长期的转归有待于进一步的观察研究。人 MSCs 能在异基因环境存活、增殖和分化, 推测其原因有: 第一, 异基因环境可刺激 MSCs 的生存和分化; 第二, 由于人 MSCs 表达人类白细胞抗原, 不表达人白细胞抗原, 因而避免了免疫反应的发生; 第三, MSCs 能改变淋巴细胞对异体靶细胞和组织的反应。研究表明^[14]: 体外培养的 MSCs 可抑制淋巴细胞的增殖, 体内应用 MSCs 可延长异体皮肤植片的存活时间, MSCs 对于淋巴细胞具有免疫调节功能, 这种特性对于 MSCs 应用于组织工程中具有重要的意义。本实验 MSCs 在移植后 8 周内能存活和增殖, 其长期的转归有待于进一步的观察研究。

(衷心感谢中山大学孙逸仙纪念医院儿科黄绍良教授、周敦华博士为本实验提供人骨髓间质干细胞, 以及在骨髓间质干细胞培养和鉴定上给予的大力支持)

参考文献:

- [1] LIECHTY K W, MACKENZIE T C, SHAABAN A F, et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep [J]. *Nature Med*, 2000,6(11): 1282- 1286.
- [2] MAJUNDAR M K, THIEDE M A, MOSCA J D, et al. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells[J]. *J Cell Physiol*,1998,176(1):57- 66.
- [3] BRUDER S P, RICALTON N S, BOYNTON R E, et al.

Mesenchymal stem cells surface antigen SB - 10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation [J]. *J Bone Miner Res*,1998, 13(4):655- 663.

- [4] CONGET P A, MOMGIE J J. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells[J]. *J Cell Physiol*, 1999, 181(1):67- 73.
- [5] 朱美玲, 陈汝光, 刘 华, 等. 人中期胚胎、新生儿脐血及成人骨髓间质干细胞基本生物学特性的比较 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2004,25(6):504- 507.
- [6] PROCKOP D J, AZIZI S A, COLTER D, et al. Potential use of stem cells from bone marrow to repair the extracellular matrix and the central nervous system [J]. *Biochemical Soc Trans*, 2000, 28(4):341- 345.
- [7] AZIZI S A, STOKES D G, AUGELLI C D, et al. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats-similarities to astrocyte grafts [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(7):3908- 3913.
- [8] 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.
- [9] 姚晓黎, 张 成, 刘卫彬, 等. 成人骨髓间质干细胞分化为神经元样细胞及与凋亡的关系 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2004, 25(6):516- 520.
- [10] BERTANI N, MALATESTA P, VOLPI G, et al. Neurogenic potential of human mesenchymal stem cells revisited: analysis by immunostaining, time-lapse video and microarray [J]. *J Cell Sci*, 2005, 118(17):3925- 3936.
- [11] 周进明, 邹钟敏, 郭朝华, 等. 培养小鼠骨髓间充干细胞及其移植后在体内的定位分布[J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2002, 22(3):167- 169.
- [12] BJONSON C R, RIETZE R L, REYNOLDS B A, et al. Turning brain into blood: hematopoietic fate adopted by adult stem cells in vivo[J]. *Science*, 1999, 283(5401): 534- 537.
- [13] SPEES J L, OLSON S D, YLOSTALO J, et al. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma [J]. *Equine Vet* 2003, 35(1): 99- 102.
- [14] Bartholomew A, Sturgeon C, Satskas M, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo[J]. *Exp Hematol*, 2002,30(1):42- 48.

(编辑 刘清海)