

体外培养大鼠骨髓间质干细胞的超微结构

李善宗¹, 张成¹, 吴金浪², 肖庆忠³, 陈国俊¹, 李树浓³

(中山大学 1. 附属第一医院神经科, 2. 中山医学院电镜室, 3. 病理生理学教研室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】研究体外培养大鼠骨髓间质干细胞的超微结构。【方法】采用常规技术对SD鼠骨髓间质干细胞进行体外培养传代、鉴定、诱导分化和透射电镜分析。【结果】流式细胞仪检测, 细胞表达CD29和CD44, 不表达CD11b和CD45; 经5-氮杂胞苷和两性霉素B诱导分化后结蛋白和肌球蛋白染色阳性。透射电镜观察有巨噬样、内皮样和成纤维样三类基本细胞, 巨噬样细胞表面有胞质突起, 胞浆含电子密度高的结晶样包涵体; 内皮样细胞靠胞膜边有吞饮小泡, 胞浆中有电子密度高的内皮特殊小体; 成纤维样细胞呈梭形, 较幼稚, 细胞器简单, 有丰富的糖原和核糖体; 经诱导分化的肌样细胞胞浆靠胞膜缘可见无细胞器的条状肌丝区带; 细胞间存在胞膜局部紧密连接和胞质突起接合。【结论】传代贴壁生长的为骨髓间质干细胞; 超微结构分析显示早期幼稚细胞发育的特征, 但各有特点; 在不同培养条件诱导下, 细胞具备向肌肉和脂肪组织分化的潜能。本研究为进一步了解和掌握骨髓间质干细胞的生物学特性和临床应用打下基础。

关键词: 骨髓; 间质干细胞/超微结构; 大鼠

中图分类号: R329.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2003)01-0011-05

Ultrastructure of Rat Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Cultured *in vitro*

LI Shan-zong¹, ZHANG Cheng¹, WU Jin-lang², XIAO Qing-zhong³, CHEN Guo-jun¹, LI Shu-nong³

(1. Department of Neurology, The First Affiliated Hospital, 2. Department of Electron Microscope,

3. Department of Pathophysiology, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To study the ultrastructure of rat marrow-derived mesenchymal stem cells (MSC) cultured *in vitro*. 【Methods】 The MSC of SD rat were cultured, passaged, induced and differentiated *in vitro* using routine culture technique, and evaluated by FACScan flow cytometer and analyzed by Hitachi H-600 transmission electron microscope (TEM). 【Results】 FACScan showed that the cells expressed antigens of CD29 and CD44 but not CD11b and CD45. The cells showed positive stain with desmin and myoglobin after induction with 5-azacytidine and amphotericin B. Three kinds of cells including macrophage-like, endothelium-like and fibroblast-like cells were observed with TEM. A lot of surface cytoplasm process and plasmal electron-dense crystalloid inclusion were found in the macrophage-like cells. The endothelium-like cells were found with pinocytosis vesicle beside the membrane and electron-dense specific granule in the plasm. The fibroblast-like cells were in the shape of fusiform and immature, and its organell was simple. There were a lot of glycogen and ribosome in the plasm. Stripform zone of myofilament without any organells in the margin of myoid cells membrane were observed after induction and differentiation. Membrane structures of partial tight junction and the joints of cytoplasm process with intercells were found. 【Conclusion】 The passaged cells are MSC. The study of ultrastructure displays that MSC have the characters of earlier immature cells, but each has its

收稿日期: 2002-07-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30270732, 30000057, 30170337); 教育部骨干教师基金资助项目(20002349); 卫生部临床学科研究基金重点资助项目(2001321); 广州市科学技术局基金资助项目(2002J1-C0182)

作者简介: 李善宗(1965-), 男, 江苏无锡人, 在职博士; 张成, 教授, 导师。

own behavior. Under different conditions, MSC have potency of differentiation into muscle and fatty tissues. The study provides us better background for further understanding of the biocharacteristics and clinical application of MSC.

Key words: bone marrow; mesenchymal stem cells/ultrastructure; rat

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2003,24(1):11~15]

骨髓间质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)具有极强的自我更新和增殖能力,在特定条件下,具有向骨、软骨、肌肉、神经等中胚层和外胚层组织细胞分化的潜能,是重要的组织工程种子细胞,因而成为医学界研究的热点。文献检索显示,近年来人们对体外培养 MSC 的生物学特性了解较多,但对其超微结构的变化研究甚少。我们对体外培养传代和经化合物诱导定向分化的 SD 鼠 MSC 进行透射电镜观察,对 MSC 的超微结构变化进行了分析,旨在进一步了解和掌握其生物学特性,为临床应用干细胞治疗如进行性肌营养不良等难治性肌萎缩疾病打下基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验动物为质量 80~100 g 的雄性 SD 大鼠,购自中山大学实验动物中心。

主要试剂有:L-DMEM/HamF₁₂ 1:1 培养基(购自 GIBCO BRL 公司的干粉剂自配),胎牛血清 FBS 和 马血清 HS (100 mL, Hyclone 公司), Penicillin-Streptomycin-Glutamine (100 ×, GIBCO BRL 公司), 2.5 g/L Trypsin (1 ×, GIBCO BRL 公司), Amphotericin B (25 mg, Sigma 公司), 5-azacytidine (100 mg, Sigma 公司), bFGF (10 μg, EC 公司), D-Hanks 液和无钙镁 PBS (pH7.4, 自配), 荧光标记小鼠抗大鼠抗体 CD11b-FITC、CD29-FITC、CD44-FITC、CD45-FITC (Ansell 公司)、电镜固定液等。

1.2 MSC 的分离、培养和传代

引颈法处死大鼠,无菌条件下取出股骨和胫骨,剔净附着组织,断开骨端,用抽吸 D-Hanks 液的注射器将骨髓细胞冲至含 100 mL/L FBS 培养基的无菌小烧杯中,尖头吸管轻轻吹打制成细胞悬液,900 r/min 离心(离心半径 $r = 4$ cm),含 150 mL/L FBS 的培养基重悬沉淀细胞。镜下将细胞密度调整为 1×10^6 /mL,接种至 25 cm² 的塑料培养瓶,37 ℃、体积分数为 5% 饱和湿度的 CO₂ 培养箱中原代培养。倒置相差显微镜每日观察,根据细

胞生长代谢情况,3~4 d 换液一次。贴壁细胞约 90% 接近融合时, PBS (pH7.4) 洗涤, 2.5 g/L Trypsin 37 ℃ 消化并以 1:3 接种传代。在第一代细胞生长融合时,可继续传代。

1.3 传代后 MSC 的鉴定

胰酶消化 P6 代细胞, PBS 洗涤, 加入荧光标记抗体, 室温避光孵育 30 min, 再用 PBS 清洗, 10 g/L 多聚甲醛固定 15 min, FACScan 流式细胞仪检测细胞表面抗原表达。

1.4 MSC 的体外定向诱导分化

取 P6 代培养 2 d 的 MSC, 分别按 1、5、10 ($\times 10^4$ /mL) 的细胞密度接种, 5 μg/L bFGF 预诱导, 24 h 后用含 7 μmol/L 5-azacytidine 和 1 mg/L Amphotericin B 的培养基诱导处理, 24 h 后更换为添加 50 mL/L HS、125 μg/L VitC 的 L-DMEM/HamF₁₂ 完全培养基继续培养。诱导分化 2 周的 MSC 做细胞爬片, 冷丙酮固定后进行 Desmin 和 Myoglobin 免疫组化染色检测。

1.5 MSC 的透射电镜观察

分别取样 P2 代、P6 代和经诱导分化后的 MSC, 经 20 g/L 多聚甲醛 + 25 g/L 戊二醛 4 ℃ 前固定 20 min, 用细胞刀将固定细胞轻轻刮下, 转入离心管 2 000 r/min 离心 20 min, 使细胞成团, 倾弃上液, 继续前固定 30 min 和 10 g/L 锇酸后固定 40 min, 梯度酒精脱水, 环氧树脂 Epon812 包埋, LKB-I 型超薄切片机切片, 醋酸双氧铀和枸橼酸铅双染色, 日立 H-600 透射电镜观察。

2 结 果

2.1 MSC 的体外培养、鉴定和肌样细胞的诱导分化

骨髓单核细胞悬液接种后 3~4 h 开始贴壁, 24 h 后 90% 以上贴壁, 且摇晃瓶身细胞不易脱落。原代培养 72 h 后可见球形和梭形细胞贴壁生长, 5~7 d 后出现形态均一的细胞增殖集落, 10 d 后 90% 以上细胞趋于融合。经胰酶消化, “纺锤样”梭形细胞首先脱落, 传代后 6~8 h 内又基本贴壁, 24

h后开始增殖,细胞集落增多,呈“漩涡状”或“辐射状”生长,3~5 d可传代,MSC趋于纯化。P6代的细胞经流式细胞仪检测,细胞均一性达95%以上,CD11b和CD45表达阴性,CD29和CD44表达阳性,说明传代贴壁生长的纯化细胞为MSC。诱导分化后的MSC经Desmin和Myoglobin免疫组化染色检测呈阳性反应,提示有肌样细胞特性,见图1。

2.2 MSC的超微结构

透射电镜下可见巨噬样细胞(macrophage-like)、内皮样细胞(endothelium-like)和成纤维样细胞(fibroblast-like)3类基本细胞。其中:①巨噬样细胞的胞体巨大;胞核不规则,异染色质丰富,呈小凝块状,部分边聚;胞浆较多线粒体(mitochondria, Mi)、溶酶体(lysosome, Ly)、吞噬小体(phagosome, P)和电子密度高的均质性结晶样包涵体(crystalloid inclusion, CI),其它细胞未发现有此类似结晶物,细胞表面有胞质突起(cytoplasm process, CP)(图2A, B)。②内皮样细胞核呈椭圆形,核膜较规则,异染色质呈小凝块状;靠胞膜边有吞饮小泡(pinocytosis vesicle, PV),胞浆中有电子密度高的内皮特殊小体(specific granule, SG),可见较多粗面和滑面内质网(rough and smooth-surfaced endoplasmic reticulum, RER & SER)(图2C)。③成纤维样细胞呈梭形,细胞较幼稚;核大,常染色质丰富;细胞器较简单,有丰富的糖原和核糖体(ribosome, Ri),可见较多粗面内质网(RER)(图2D, E)。④经诱导分化后的肌样细胞有丰富的糖原和核糖体,可见粗面内质网(RER)、线粒体(MI)等细胞器,细胞浆靠胞膜边缘可见无细胞器的条状肌丝(myofilament, Mf)区带(图2F)。⑤在光镜下见到的细胞集落中,电镜显示细胞间存在胞膜局部紧密连接(tight junction, TJ),部分连接处胞膜融合消失;还可见成纤维样细胞胞质突起(CP)向外延伸,并与另一相邻细胞发出的类似突起接合,突起内未见细胞器(图2G, H)。

3 讨论

除了胚胎干细胞,机体还存在如骨髓间质干细胞的具有一定自我更新和分化能力的多能干细胞。早在130年前,德国病理学家Cohnheim在研究伤口修复时首先提出了骨髓中还存在非造血干细胞的概念^[1,2]。直到20世纪70年代中期,Frieden-

stein在对少部分贴壁细胞进行培养过程中,发现其能够分化成类似骨和软骨的集落^[1];及至80年代,Piersma和Owen等又在骨髓基质中成功分离出能分化为成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞、甚至成肌细胞等多种中胚层来源组织的多潜能细胞,即MSC^[2]。MSC表型不一,具有间质细胞、上皮细胞和内皮细胞的特点^[3]。在实验中观察到,体外培养未纯化的骨髓贴壁细胞在相差显微镜下存在两种形态:一种呈宽大扁平近似圆形,胞质近中央处有明显的圆形细胞核,增殖速度较慢,生长时细胞间紧密相靠,互相衔接,有连接成片的能力,贴壁较牢,传代时胰酶短时间内消化不易脱落;另一种呈梭形或不规则三角形,一经传代其增殖速度较快,生长时细胞排列呈漩涡状或辐射状,符合传统意义上MSC的特点,胰酶消化时较易脱落,故可采用“差速消化贴壁法”分离纯化MSC^[4]。从培养传代数看,P5~6代后趋于纯化,细胞呈“集落”或“克隆”生长,形成“漩涡状”或“辐射状”排列分布,细胞形态以“纺锤样”梭形为主。

目前认为,CD29、CD44、CD105、CD166是MSC的重要标记物^[5],但不表达LFA1- α (CD11a)、Mac1(CD11b)、CD34、泛白细胞标志抗原CD45等^[3]。本研究体外纯化传代培养的细胞经流式细胞仪检测,细胞均一性表达CD29和CD44,但不表达CD11b和CD45,说明传代贴壁生长的纯化细胞为MSC。对P2代细胞的超微结构研究发现,MSC在透射电镜下可见巨噬样、内皮样和成纤维样三种基本细胞。这些细胞均相对幼稚,胞核较大,形状多样,染色质分布不均,电子密度较低;胞浆中高尔基体、线粒体、粗面/滑面内质网等细胞器不甚发达,纤维丝状物较少,总体表现为早期幼稚细胞发育的特点,但各自又有特点,而P6代以成纤维样细胞为主。巨噬样细胞表面有许多胞质突起(CP),细胞内均存在一种电子密度高的均质性结晶样包涵体(CI),其它细胞未发现类似结晶物。根据文献报道,这种CI结构很可能是由铁粒或含铁血黄素浓集并与载铁蛋白或其他转运蛋白成分混杂而形成的一种结晶体,依其镜下形状和排列,CI可见4种类型,但它们之间并无本质区别,差别仅与标本制作或切片方向有关^[6]。内皮样细胞胞浆中有电子密度高的特殊小体(SG),其形成机理不明;紧靠胞膜边有吞饮小泡(PV),与细胞代谢有关,有别于巨噬样细胞中含碎片物的吞噬小体。成纤维样细胞呈梭形,细胞器简单,细胞相对较幼稚,但含丰

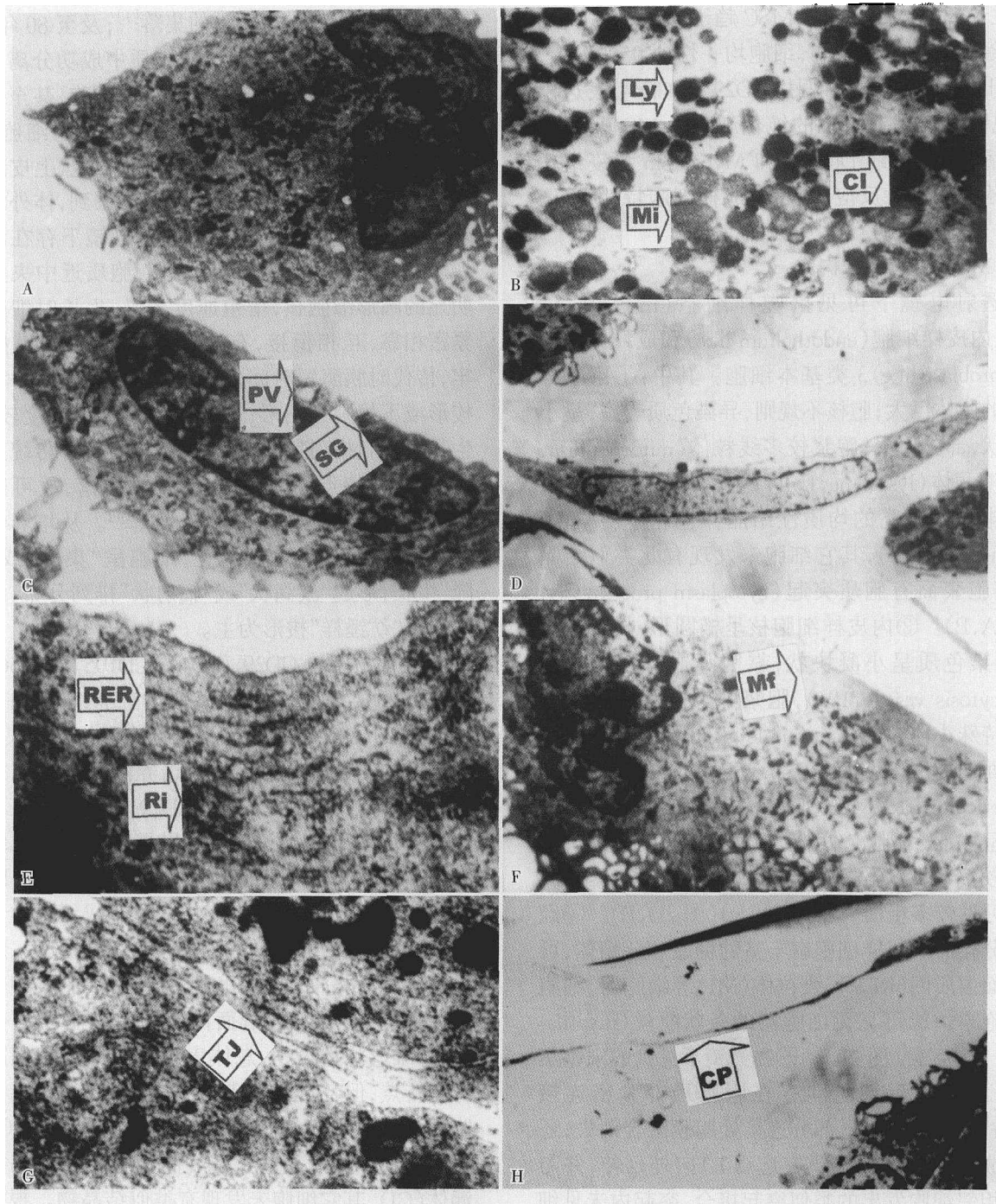


图2 体外培养大鼠骨髓间质干细胞的超微结构

Fig.2 The ultrastructure of rat marrow-derived mesenchymal stem cells(MSC) cultured *in vitro*

A: The body of macrophage-like cell is very large, its nucleus is irregular, and there are a lot of cytoplasm process in cell surface ($\times 6\ 000$); B: There are a lot of mitochondria and lysosome and electron-dense crystalloid inclusion in the plasm of macrophage-like cells ($\times 17\ 000$); C: Pinocytosis vesicle beside the membrane and electron-dense specific granule in the plasm of endothelium-like cells ($\times 6\ 000$); D: Fusiform and immature fibroblast-like cell with simple organell ($\times 4\ 000$); E: There are a lot of rough-surfaced endoplasmicreticulum and ribosome in the plasm of fibroblast-like cell ($\times 2\ 0000$); F: There are stripform zone of myofilament without any organells at the edge of myoid cell membrane after induction and differentiation ($\times 10\ 000$); G: The membrane structures of partial tight junction intercells ($\times 25\ 000$); H: The cytoplasm process of fibroblast-like cell is extended and connected with the resemblance cytoplasm process of its adjacent cell ($\times 4\ 000$)

富的糖原和核糖体。随着体外传代纯化,细胞表型趋于一致,呈“梭形纤维样”,并形成许多细胞集落(克隆);超微结构显示细胞间存在胞膜局部紧密连接(TJ),部分连接处胞膜融合消失;还可见成纤维样细胞胞质突起(CP)向外延伸,并与另一相邻细胞发出的类似突起接合。细胞生物学研究认为,细胞间连接是细胞的一种重要通讯结构,连接结构的存在有利于细胞间的信息传递,是产生细胞调控、影响细胞生长发育和相应组织结构形成的重要基础。

对体外培养诱导分化的 Desmin 和 Myoglobin 染色阳性的肌样细胞超微结构研究发现,细胞呈“成纤维样”,胞浆靠胞膜边缘可见无细胞器的条状肌丝(Mf)区带,部分细胞两侧胞膜缘均有分布,说明这是发育较幼稚的成肌样细胞结构。另外,在对用高糖和含高浓度血清(200~250 mL/L)培养基培养的 MSC 超微结构研究发现,成纤维样细胞容易脂化,胞浆脂滴丰富,细胞核与其它细胞结构发育尚正常,未见细胞变性坏死改变。提示在培养条件改变后,MSC 有向肌肉和脂肪组织分化的潜能,至于 MSC 中是否成纤维样细胞更有向多种细胞组

织类型分化发育的能力,值得进一步研究。

(本文图 1 见插页 1. Fig. 1 shown in back coloured page 1)

参考文献:

- [1] Friedenstein A J, Chailakhyan R K, Gerasimov U V. Bone marrow osteogenic stem cells: *in vitro* cultivation and transplantation in diffusion chambers[J]. *Cell Tissue Kinet*, 1987, 20(3): 263.
- [2] Prockop D J. Marrow stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues[J]. *Science*, 1997, 276(5309): 71.
- [3] Pittenger M F, Mackay A M, Jaiswal S C, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143.
- [4] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版西安公司, 2000. 78.
- [5] 项 鹏, 夏文杰, 王连荣, 等. 丹参注射液诱导间质干细胞分化为神经元样细胞[J]. *中山医科大学学报*, 2001, 22(5): 321.
- [6] Yamazaki K. Isolated cilia and crystalloid inclusions in murine bone marrow stromal cells[J]. *Blood Cells*, 1988, 13(3): 407.

(编辑 刘清海)

(上接第 10 页 from page 10)

- [6] Meyer-Franke A, Kaplan M R, Pfrieger F W, *et al.* Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture[J]. *Neuron*, 1995, 15(4): 805.
- [7] Shen S L, Wiemelt A P, Mc Morris F A, *et al.* Retinal ganglion cells lose trophic responsiveness after axotomy [J]. *Neuron*, 1999, 23(2): 285.
- [8] Cai D, Shen Y, De Bellard M, *et al.* Related Articles Prior exposure to neurotrophins blocks inhibition of axonal regeneration by MAG and myelin via a camp-dependent mechanism[J]. *Neuron*, 1999, 22(1): 89.
- [9] Cai D, Qiu J, Cao Z, *et al.* Neuronal cyclic AMP controls the developmental loss in ability of axons to regenerate[J]. *J Neurosci*, 2001, 21(13): 4731.
- [10] Finkbeiner S, Tavazoie S F, Maloratsky A, *et al.* CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses[J]. *Neuron*, 1997, 19(5): 1031.
- [11] Vossler M R, Yao H, York R D, *et al.* Camp activates mapkinase and Elk-1 through a B-Raf and Rap1-dependent pathway[J]. *Cell*, 1997, 89(1): 73.

(编辑 张恩健)

霍乱毒素对视神经扎断后视网膜节细胞轴突再生的作用 (正文见第7页)

The Effectc of Cholera Toxin on the Axonal Regeneration of the Retinal Ganglion Cells After Optic Nerve Microcrushed (Text in page 7)

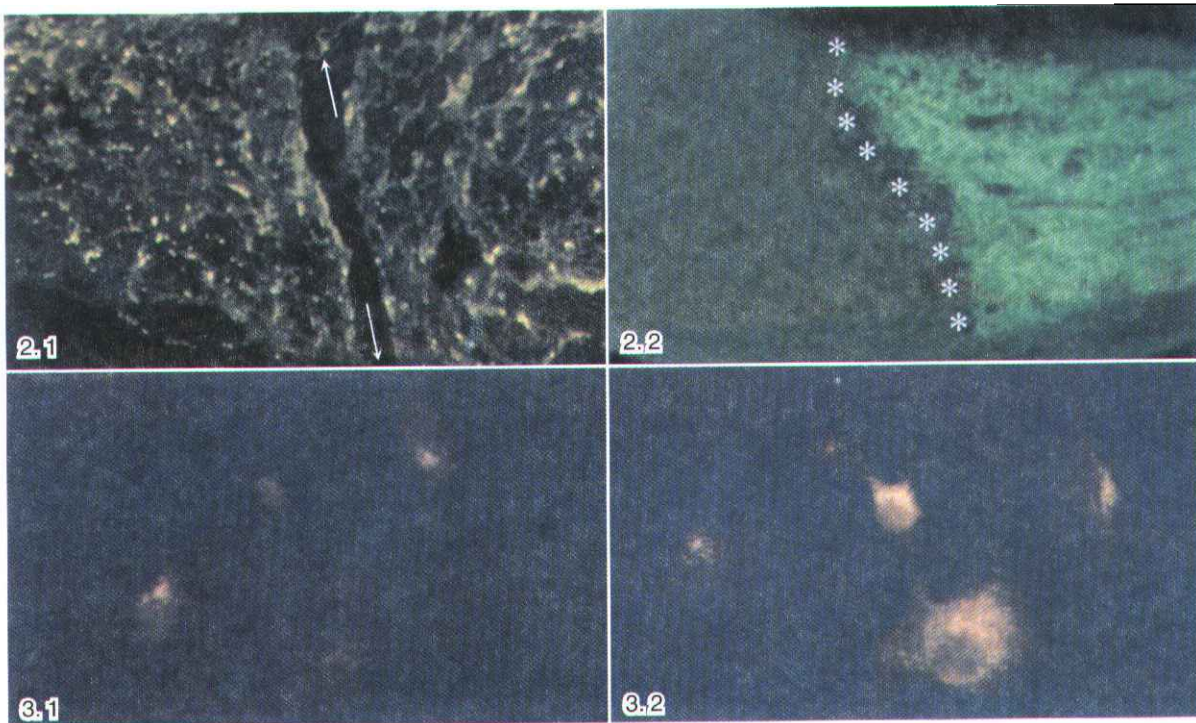


图2 ON切片、逆、顺行标记观察扎断点

图3 两实验组再生的RGCs(FG标记)

Fig.2 Retrogradely and anterogradely labeled RGC axons detected past the crush in longitudinal sections of optic nerve

2. 1: Retrogradely labeled RGC axons with FG, show that no xon extend past a microcrushed lesion. Just connected with sheath (arrowhead); 2. 2: Anterogradely labeled RGC axons with CTB, shows the crush site (asterisks), no axons extend past the crush site. Scale bar 100µm

Fig.3 Regeneratig RGCs in experment groups (labeled with FG)

3. 1: Only small regenerating RGCs in MC + CTx group; 3. 2: Show that small and big regenerating RGCs exited in MC + CTx + SN group. Scale bar: 50µm

体外培养大鼠骨髓间质干细胞的超微结构 (正文见第11页)

Ultrastructure of Rat Marrow – Derived Mesenchymal Stem Cells Cultured *in vitro* (Text in page 11)

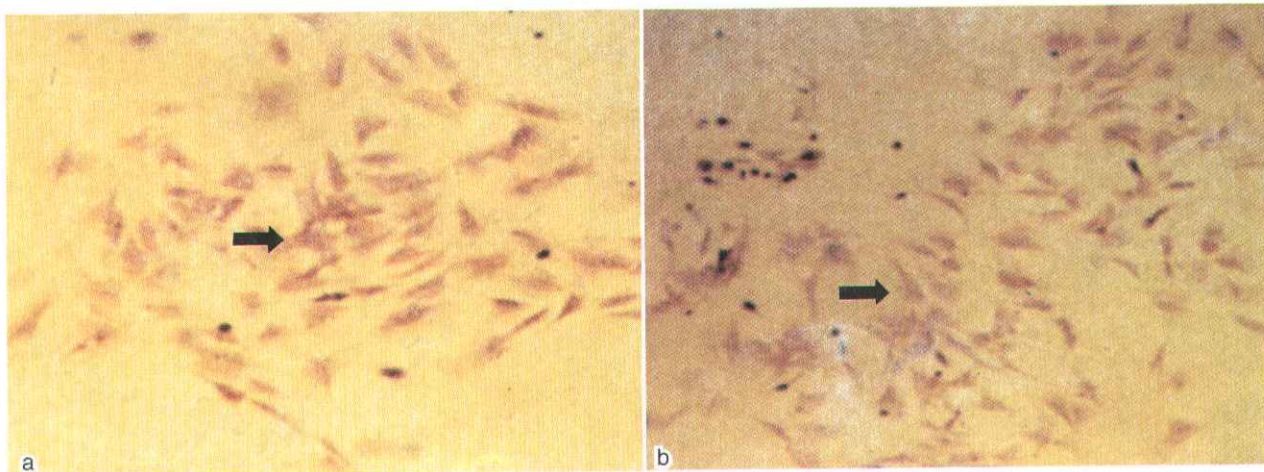


图1 体外培养诱导分化后大鼠骨髓间质干细胞的免疫组化染色

Fig.1 The results of immunohistochemistry of rat marrow – derived mesenchymal stem cells(MSC) cultured, induced and differentiated *in vitro*

a: Stained with Desmin(×100); b: Stained with Myoglobin(×100)