

全反式维甲酸对大鼠骨髓间质细胞的诱导分化作用

庄菁¹, 谢富康², 谢金卫¹, 罗超权¹

(中山医科大学 1. 生物化学教研室, 2. 组织胚胎学教研室, 广东 广州 510089)

摘要:【目的】探讨全反式维甲酸对大鼠骨髓间质细胞(BMSCs)的诱导分化作用。【方法】从大鼠骨髓中分离培养间质细胞并传至第6代, 诱导前24 h加 $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 碱性成纤维生长因子(bFGF)入培养液中以促分裂, 再以反式维甲酸作诱导剂, 然后观察细胞形态的变化, 并采用免疫组织化学法, 对诱导后第4天的细胞行巢蛋白(nestin)、神经丝蛋白(NF)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)表达的检测。对第8天的细胞行脂肪细胞特异性苏丹II染色。【结果】诱导后第4天的部分细胞不仅在形态上表现为神经元样, 而且呈nestin、NF及NSE阳性; 诱导后第8天的部分细胞呈苏丹II染色阳性。【结论】骨髓间质细胞具有多向分化潜能, 在反式维甲酸作用下, 可被诱导成神经元样细胞及脂肪细胞。

关键词: 骨髓; 间质细胞; 全反式维甲酸; 细胞分化; 大鼠

中图分类号: Q831 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)01-0024-03

The Inducing Differentiation by Using Retinoic Acid on the Bone Marrow Stromal Cells ZHUANG Jing¹, XIE Fu-kang², XIE Jin-wei¹, LUO Chao-quan¹. (1. Department of Biochemistry, 2. Department of Histology and Embryology Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

Abstract 【Objective】To study the induction effects of all-trans-retinoic acid (ATRA) to the bone marrow stromal cells (BMSCs) of rat. 【Methods】The BMSCs from rat were isolated and cultured for 6 passages which were pretreated with $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ basic fibroblast growth factor(bFGF) for 24 h before induction. Then the media was replaced with induction media containing ATRA. The morphological changes of the cells were observed. At 4 d of induction, the cells were stained immunocytochemically with anti-nestin, neurofilament (NF) and neuron-specific enolase (NSE) antibodies. At 8 d of induction, the adipocyte-like cells were stained with Sudan II. 【Results】At 4 d of induction, part of the bone marrow stromal cells became neuron like cells and showed nestin, NF and NSE positive. At 8 d of induction, part of cells were Sudan II positive. 【Conclusion】The bone marrow stromal cells can differentiate into neuron like cells and adipocytes by the induction of ATRA.

Key words: bone marrow; stromal cell; ATRA; cell differentiation; rats

干细胞具有自我更新、增殖及多向分化潜能。近年研究表明骨髓间质细胞像干细胞那样, 可以分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肌肉细胞及神经细胞^[1~3]。在 β -巯基乙醇的诱导作用下, 骨髓间质细胞分化为神经元^[6], 这一研究结果给神经修复与再生带来新的希望。由于骨髓间质细胞取材容易, 增殖快, 从患者本身取材, 培养扩增, 定向诱导分化成特定的细胞, 再植入患者体内, 避免了异体的排斥反应, 在临床应用上具有广阔的前景。本研究从大鼠骨髓中分离培养间质细胞, 采用全反式维甲酸(all-trans-retinoic-acid, ATRA)作诱导剂, 观察骨髓间质细胞体外的分化趋势, 以期为进一步应用骨髓间质细胞奠定基础。

1 材料和方法

1.1 骨髓间质细胞的分离及培养

Wistar 大鼠(雌雄不限, 120 g左右)经麻醉后处死, 在无菌条件下取出股骨, 除去骨周围的肌肉组织, 剪开骨两端, 用注射器吸取1.5 mL minimum essential medium alpha medium [α -MEM (GIBCO) 培养液+体积分数20%胎牛血清(FBS, 杭州四季青)+ $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 谷氨酰胺(Sigma)], 从骨的一端缓慢地冲洗骨髓腔, 所得的细胞悬液按 1×10^6 的数密度进行培养, 次日换液。换液前用 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的PBS轻轻冲洗培养细胞的表面, 以除去未贴壁细胞, 以后改为每隔两天换液。当细胞铺满培养瓶底后, 用 $1.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶(Sigma)消化, 以一传三的方式传代。传至第6代后, 培养基改用: DMEM (GIBCO)+体积分数20%胎牛血清(杭州四季青)+ $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 谷氨酰胺。

1.2 反式维甲酸诱导大鼠骨髓间质细胞

大鼠骨髓间质细胞培养至第6代, 其中3瓶25

收稿日期: 2001-09-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39970237); CMB-SUMS Scholar基金资助项目(98677); “211工程”重点学科基金资助项目(98142)

作者简介: 庄菁(1967-), 女, 江西兴国人, 博士生, 讲师, 谢富康, 教授, 导师, 课题联系人; 罗超权, 教授, 导师。

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

cm^2 的细胞作为诱导组,诱导前在培养基中加入 $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 碱性成纤维生长因子以促分裂,24 h 后用全反式维甲酸(Sigma)进行诱导,诱导液为 DMEM (GIBCO)培养液+体积分数 20%胎牛血清(杭州四季青)+ $2 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 谷氨酰胺+ $7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ A-TRA,24 h 后其中一瓶细胞移植入体内进行观察。结果拟将在另一文中发表,另两瓶细胞继续用诱导液培养,每隔 3 d 更换一次液。对照组的细胞则一直采用 DMEM (GIBCO)+体积分数 20%胎牛血清(杭州四季青)+ $2 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 谷氨酰胺进行培养,直至细胞传代到 15 代。

1.3 大鼠骨髓间质细胞分化后的检测

用 4 g/L 的多聚甲醛(polyformaldehyde)分别将诱导后不同时间(4 d、8 d)的细胞固定 15 min。对第 4 天的细胞采用间接免疫组化法检测巢蛋白、神经丝蛋白(NF)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)的表达,阳性对照采用脊髓的冰凍切片,阴性对照采用成纤维细胞。对第 8 天的细胞行苏丹 II 组织化学染色。

2 结果

2.1 骨髓间质细胞的生长情况

在原代培养过程中,约 24 h 细胞出现贴壁生长,贴壁细胞呈梭型(图 1),开始时细胞增殖缓慢,第 3 天细胞急剧增多,呈集落生长,然后增殖趋于平缓,10 d 左右细胞铺满瓶底。当细胞传代后,细胞形态仍保持梭形,细胞增殖旺盛,显微镜下观察细胞呈旋涡状排列(图 2),每隔 3 d 传代一次。

2.2 反式维甲酸诱导大鼠骨髓间质细胞

诱导前培养基中加入 $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ bFGF,细胞形态保持不变,并能促进细胞的增殖。24 h 后,改用诱导液培养,48 h 后部分细胞形态改变,表现出神经元样细胞的形态,图 3 为诱导后第 4 天的神经元样细胞,细胞胞体变圆或呈三角形,突起明显,有双极和多极,有些细胞间突起互相连接,形成神经网络样,此时细胞无明显增殖现象。诱导后第 8 天,部分细胞分化成脂肪样细胞(图 4),胞浆中出现大量的脂滴。诱导后细胞的分化呈区域异质性,即在同一培养瓶的细胞中,某一区域的细胞朝神经元样细胞分化,而另一区域细胞朝脂肪样细胞分化,呈非均一化性分化。分化后细胞的存活时间约 20 d 左右,然后细胞突起脱壁、漂浮,细胞逐渐死亡。对照组的细胞则仍然分裂旺盛,形态呈梭形,传代至

15 代时细胞开始变得宽大、扁平,逐渐脱壁,漂浮死亡。

2.3 大鼠骨髓间质细胞分化后的鉴定

对诱导后第 4 天的细胞,用间接免疫组化法染色,神经元样细胞呈现巢蛋白(nestin)阳性(图 5)、神经丝蛋白(NF)阳性(图 6)及神经元特异性烯醇化酶(NSE)阳性(图 7),胞体及突起部分都被染成棕色;而未分化的胞体扁平细胞对这些抗体则呈阴性反应。阳性对照的脊髓切片对以上抗体均呈阳性反应,而成纤维细胞则呈阴性。

对诱导后第 8 天的细胞,采用苏丹 II 组织化学染色,脂肪样细胞呈阳性反应(图 8),胞浆被染成橙红色,而神经元样细胞则呈阴性。

3 讨论

骨髓中含有各级造血细胞、骨髓间质细胞及其多种细胞因子。骨髓间质细胞是造血诱导微环境的重要组成部分,它来源于中胚层发育的早期间质干细胞,通过与造血细胞密切接触、分泌细胞外基质和多种细胞因子调节造血。其结构和功能的完整性对于保持机体在生理状况和应急状态时造血的稳定性具有重要的作用^[7]。骨髓间质细胞除了提供细胞外基质、支持和调节造血干细胞的自我更新和分化外,本身还具有增殖和多向分化潜能。骨髓间质细胞在体外能被诱导分化为成骨细胞、软骨细胞、肌肉细胞及脂肪细胞。

本实验根据造血干细胞呈悬浮生长,间质细胞呈贴壁生长的特点,经多次换液及传代培养,以除去悬浮的血细胞和造血干细胞,获得高纯度的间质细胞。在此基础上,我们用全反式维甲酸来诱导骨髓间质细胞的进一步分化,目前其具体诱导机制还不清楚。本研究结果表明,全反式维甲酸可促使骨髓间质细胞朝分化方向发展,诱导 48 h 后即有部分细胞分化成神经元样细胞,而未经全反式维甲酸作用的对照组细胞依然保持原有的细胞形态。据此推测全反式维甲酸具有诱导分化的作用。对第 4 天的细胞进行免疫组化鉴定,结果显示,这些神经元样细胞呈现 nestin、NF 及 NSE 阳性,NF 及 NSE 是神经元表达的特异性蛋白质,而 nestin 是分布在神经前体细胞胞质中的中间丝蛋白,待神经前体细胞分化成神经元或神经胶质细胞后,这种中间丝蛋白将逐渐消失^[8],这说明本实验诱导后的细胞属于分化早期神经元。在诱导后第 8 天开始,部分

细胞分化成脂肪样细胞, 呈苏丹 II 染色阳性反应, 此结果说明全反式维甲酸对骨髓间质细胞的诱导作用是多方向的, 而且骨髓间质细胞朝不同细胞分化的启动时间不同。与 Woodbury 等^[6] 研究比较, 在 β -巯基乙醇的诱导作用下, 几小时内约 70% 分化成神经元样细胞, 而本实验全反式维甲酸作用 48 h 后才逐渐产生神经元样细胞, 同时诱导的神经元存活时间可达 20 d, 可以推测 β -巯基乙醇与全反式维甲酸对骨髓间质细胞诱导机制可能不同, 其本质区别有待于进一步探讨。

(本文图 1~8 见插页 1. Fig. 1~8 shown in back coloured page 1)

参考文献:

- [1] Prockop D J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues [J]. *Science*, 1997, 276(5309): 71.
- [2] Caplan A I. The mesengenic process [J]. *Clin Plastic Surg*, 1994, 21(3): 429.

- [3] Pittenger M F. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143.
- [4] Hanada K, Dennis J E. Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *J Bone Miner Res*, 1997, 12(10): 1606.
- [5] Deng W, Obrocka M, Fischer I, *et al.* *In vitro* differentiation of human marrow stromal cell into early progenitors of neural cells by conditions increase intracellular cyclic AMP [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 282(1): 148.
- [6] Woodbury D, Emily J. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons [J]. *J Neuroscience Research*, 2000, 61(4): 364.
- [7] Dorshkind K. Regulation of hematopoiesis by bone marrow stromal cells and their products [J]. *Ann Rev Immunol*, 1990, 8: 111.
- [8] Lendahl U, Zimmernan L, McKay R. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein [J]. *Cell*, 1990, 60(4): 585.

(编辑 张敏瑞)

(上接第 16 页 from page 16)

经酰胺 (ceramide) 诱导的小鼠胚胎成纤维细胞凋亡^[5]。体外培养的大鼠肝细胞, 肿瘤坏死因子 α 可导致其发生凋亡, 而预先用 NO 处理, 诱导 HSP₇₀ 表达, 则可对抗 TNF α 诱导的大鼠肝细胞凋亡^[6]。Doxorubicin 是一种抗癌药, 它可引起大鼠心肌细胞发生凋亡, 如果在用 doxorubicin 前将心肌细胞放在 42 °C 进行热休克处理 30 min, 可以明显减少细胞凋亡数^[7]。以上这些结果都来自于非神经细胞。

在本实验中, 我们应用了复极化诱导的小脑颗粒神经元凋亡模型, 这一模型在研究神经元凋亡信号转导机制及抗凋亡药物筛选中被广泛应用^[8]。将体外培养 8 d 的小脑颗粒神经元放入 44 °C, 体积分数为 5% CO₂ 的开放式培养箱中进行热休克处理一段时间后再换成复极化条件培养基, 可明显减少细胞凋亡数, 并且随着热处理时间延长, 这种保护作用增强, 热预处理 90 min 保护作用最好。Western blotting 检测 HSP₇₀ 表达量发现, 热预处理 90 min 组 HSP₇₀ 的表达量最高。这提示热刺激预处理对复极化诱导的小脑颗粒神经元凋亡的保护作用可能与 HSP₇₀ 有关。接下来我们将用 HSP₇₀ 的反义寡核苷酸抑制 HSP₇₀ 表达观察是否削弱或取

消这一保护作用, 进一步证实 HSP₇₀ 的保护作用。

参考文献:

- [1] Cason D A, Ribeiro J M. Apoptosis and disease [J]. *Lancet*, 1993, 341(8855): 1251.
- [2] Loo D T, Copani A, Pike C J, *et al.* Apoptosis is induced by beta-amyloid in culture central nervous system neurons [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(17): 7951.
- [3] Yan G M, Irwin R P, Li S Z, *et al.* Diphenylhydantoin induces apoptotic cell death of cultured rat cerebellar granule neurons [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1995, 274(2): 983.
- [4] Mosser D D, Marti L H. Induced thermotolerance to apoptosis in a human T lymphocyte cell line [J]. *J Cell Physiol*, 1992, 151(3): 561.
- [5] Buzzard K A, Giaccia A J, Killender M, *et al.* Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(27): 17147.
- [6] Kim Y M, de Vera M E, Watkins S C, *et al.* Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(2): 1402.
- [7] Ito H, Shimajo T, Fujisaki H, *et al.* Thermal preconditioning protects rat cardiac muscle cell from doxorubicin-induced apoptosis [J]. *Life Sci*, 1999, 64(9): 755.
- [8] 颜光美. 中枢神经元凋亡模型的建立及其信号转导 [J]. *中山医科大学学报*, 1998, 19(1): 1.

(编辑 黄小延)

全反式维甲酸对大鼠骨髓间质细胞的诱导分化作用 (正文见第 24 页)

The Inducing Differentiation by Using Retinoic Acid on the Bone Marrow Stromal Cells (Text in page 24)

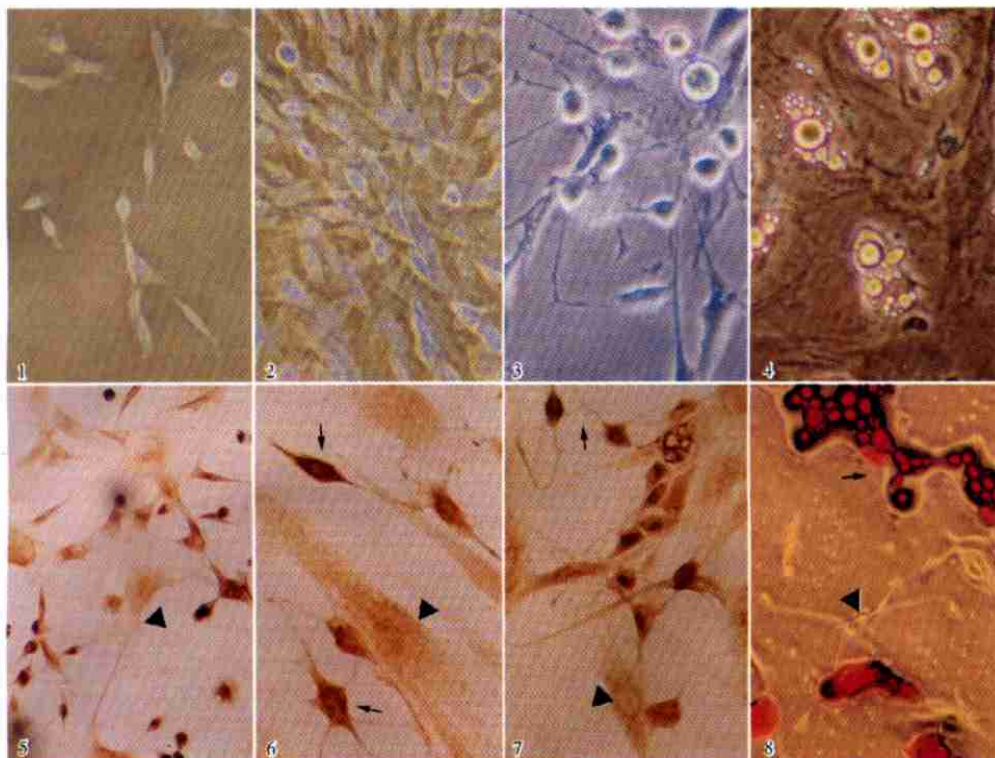


图 1 原代培养的骨髓间质细胞

图 2 传代后的骨髓间质细胞

图 3 骨髓间质细胞分化的神经元样细胞

图 4 骨髓间质细胞分化的脂肪样细胞

图 5 分化后的神经元样细胞呈 nestin 阳性反应

图 6 分化后的神经元样细胞呈 NF 阳性反应

图 7 分化后的神经元样细胞呈 NSE 阳性反应

图 8 分化后的脂肪样细胞

Fig. 1 The bone marrow stromal cells in primary culture ×100

Fig. 2 The bone marrow stromal cells in passenge culture

The bone marrow stromal cells arranged in spite shape. ×100

Fig. 3 The neuron like cells after induction

On the 4th day of induction some cells were displaying neuronal morphologies. ×200

Fig. 4 The adipocyte like cells after induction

On the 8th day of induction, the bone marrow stromal cells differentiated into adipocyte like cells. ×200

Fig. 5 Expression of nestin by the differentiated neuron like cells

Cells displaying neuronal morphologies (↑ arrows) stained dark brown for nestin expression within the cell body and extending into the processes. Flat, undifferentiated BMSCs(▲) are unstained. ×100

Fig. 6 Expression of NF by the differentiated neuron like cells

Cells displaying neuronal morphologies (↑ arrows) stained dark brown for neurofilament expression within the cell body and extending into the processes. Flat, undifferentiated BMSCs(▲) are unstained. ×200

Fig. 7 Expression of NSE by the differentiated neuron like cells

Cells displaying neuronal morphologies (↑ arrows) stain dark brown for nestin expression within the cell body. Flat, undifferentiated BMSCs(▲) are unstained. ×200

Fig. 8 The differentiated adipocyte like cells

The cytoplasm of the differentiated adipocyte like cells (↑ arrows) was stained red-orange. The neuron like cells(▲) are unstained. ×100