

## 小鼠 MSCs 体外定向诱导分化神经及脂肪细胞的研究

赵兴<sup>1</sup>, 柏学进<sup>1</sup>, 封纪武<sup>1,2</sup>, 董雅娟<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>青岛农业大学胚胎工程中心, 山东青岛 266109; <sup>2</sup>宁夏大学农学院, 银川 750021)

**摘要:** 【目的】建立昆明小鼠骨髓间充质干细胞的分离、培养体系, 并鉴定其定向诱导分化为神经及脂肪细胞的能力。【方法】采用贴壁培养法分离培养昆明小鼠骨髓间充质干细胞 (MSCs), 通过相差倒置显微镜对其进行形态学特征观察; 通过碱性磷酸酶 (AKP) 染色、Hoechst 33258 染色、瑞士-姬姆萨复合染色检测 MSCs 的表型特征; 通过  $\beta$ -ME 诱导 MSCs 定向分化为神经样细胞, 诱导后的细胞进行 H.E 染色, 观察其形态学特性; 通过 NF-200、NSE 免疫荧光细胞化学方法对已分化的神经样细胞进行鉴定和分化率分析; 通过马血清诱导 MSCs 定向分化为脂肪细胞, 观察其体外生长过程, 并对诱导后的脂肪细胞进行油红 O 染色鉴定和分化率分析。【结果】分离得到的 MSCs 为成纤维样细胞, 可见多个核仁, AKP 染色阳性率为  $93.2\% \pm 1.5\%$ ;  $\beta$ -ME 诱导后, MSCs 分化为多种表型的神经细胞与原代培养的小鼠全脑细胞的外形相似, 诱导后的神经细胞 NF-200、NSE 免疫荧光细胞化学染色均呈阳性, NF-200 阳性率为  $85.4\% \pm 1.8\%$ , NSE 阳性率为  $82.7\% \pm 2.1\%$ ; 马血清诱导后, MSCs 可 100% 分化为脂肪细胞, 油红 O 染色为阳性。【结论】采用贴壁培养法能够成功分离和培养昆明小鼠的 MSCs, 分离得到的 MSCs 具有定向分化成多种神经细胞和脂肪细胞的能力。

**关键词:** 小鼠; 骨髓间充质干细胞; 分离培养; 诱导分化; 神经细胞; 脂肪细胞

## Differentiation of Mouse Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into Neurocytes and Adipocytes Induced *in vitro*

ZHAO Xing<sup>1</sup>, BAI Xue-jin<sup>1</sup>, FENG Ji-wu<sup>1,2</sup>, DONG Ya-juan<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Animal Embryo Engineering Center, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong; <sup>2</sup>Agricultural College of Ningxia University, Yinchuan 750021)

**Abstract:** 【Objective】 To establish a system for isolation and culture of bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) from Kun-ming mouse *in vitro* and to identify the characteristics of the cells, directional neuronal and adipocytic induction after culture expansion. 【Method】 MSCs were isolated and cultivated from the bone marrow of Kun-ming mice by investigating their adherence-dependent growth characters. The morphological characters of MSCs were observed under inverted phase contrast microscope. Shape characteristics of MSCs were studied by AKP staining, Hoechst33258 staining, white Giemsa staining. MSCs were induced into neurone-like cells by  $\beta$ -ME, and stained with H.E after induction, then their characteristics were observed under inverted phase contrast microscope. The differentiation ratio analysis of differentiated neurocytes was detected by immunocyto-fluorescence of NF-200 and NSE. MSCs were induced into adipocytes by horse serum, the process of growth *in vitro*, was observed and the differentiation ratio analysis of differentiated adipocytes was detected by Oil Red O stain. 【Result】 Separated MSCs were fibroblast-like cells, they had several nucleoluses, and the positive rates of AKP staining were  $93.2\% \pm 1.5\%$ . MSCs could differentiate into several phenotype characteristic neurocytes after induced by  $\beta$ -ME, their shape characteristics were similar with primer passage of mouse full-brain cells. Both NF-200 and NSE immunocyto-fluorescence of Neurons after induction were positive, and the positive rates of NF-200 and NSE were  $85.4\% \pm 1.8\%$  and  $82.7\% \pm 2.1\%$ , respectively. MSCs could differentiate into adipocytes in 100 percent after induced by horse serum, and Oil Red O stain was positive. 【Conclusion】 Mesenchymal stem cells of Kun-ming mouse can be successfully isolated and cultivated from mouse bone marrow by keeping its adherence-dependent growth

收稿日期: 2006-09-06; 接受日期: 2006-12-04

基金项目: 山东省自然科学基金 (基金编号: Y2005D01), 国家“863”计划项目 (2007AA100505)

作者简介: 赵兴 (1982-), 男, 山东德州人; 硕士研究生, 研究方向为胚胎工程及成体干细胞诱导分化。通讯作者董雅娟 (1964-), 女, 山东文登人, 教授, 研究方向为动物胚胎生物技术与克隆。Tel/Fax: 0532-8608948; E-mail: etcenter@126.com

characters. They have directional trans-differentiation potentiality to various neurocytes and adipocytes.

Key words: Mice; MSCs; Separation and culture; Induction and differentiation; Neurocytes; Adipocytes

## 0 引言

【研究意义】长期以来神经系统损伤后神经细胞的再生一直困扰着人们<sup>[1]</sup>,MSCs 具有来源丰富、自体移植无免疫排斥、异体移植免疫原性低<sup>[2,3]</sup>、可在体内及体外定向诱导分化形成跨胚层的多种组织细胞、不涉及伦理问题等优点<sup>[4,5]</sup>,可以作为遗传性或退行性神经疾病治疗的理想细胞来源<sup>[6,7]</sup>。【前人研究进展】1976年, Friedenstein 等<sup>[8]</sup>首次报道,骨髓标本中小部分贴附细胞在培养过程中能够分化形成类似骨或软骨的集落。后来的研究表明, Friedenstein 分离得到的细胞是多能的,在体外不同分化条件的诱导下,可以形成成骨细胞、成肌细胞、软骨细胞、脂肪细胞或神经细胞;因此,骨髓基质中的这种多能性细胞,由于能够分化成为多种中胚层和外胚层来源的间质细胞,而被称为间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)。骨髓中的 MSCs 除参与构成支持造血的微环境外,还具有强大的自我复制能力<sup>[9,10]</sup>和多向分化潜能<sup>[10,11]</sup>。不同的体外诱导条件可以决定其分化方向,可能是这些诱导条件启动了决定分化方向的转录因子<sup>[12,13]</sup>。将 MSCs 通过静脉或局部注射移植到体内不同组织时,即可在相应的组织内分化形成该类组织细胞<sup>[6]</sup>;而将单个 MSCs 注入小鼠早期囊胚腔,胚胎移植后获得了嵌合体小鼠,并且供体 MSCs 分化形成了嵌合体小鼠的绝大多数类型组织细胞<sup>[11]</sup>。【本研究切入点】目前,人们对 MSCs 神经定向诱导分化的机制了解甚少,对诱导后神经细胞表型及功能的研究也很少见。【拟解决的关键问题】本研究对小鼠骨髓 MSCs 向神经细胞的体外定向诱导分化作初步探讨,为小鼠 MSCs 在神经科学领域的应用研究提供技术支撑;确定小鼠 MSCs 向脂肪细胞表型转化的方法,并了解其诱导前后的生物学特性变化,建立 MSCs 向脂肪细胞定向诱导分化模型,以探讨小鼠的 MSCs 定向诱导分化能力,为今后在组织工程和创伤愈合研究方面奠定实验基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

1.1.1 试验时间和地点 本试验于 2005 年 7 月~2006 年 7 月在青岛农业大学动物胚胎中心完成。

1.1.2 试验动物 雄性昆明白小鼠(购自山东大学动物管理中心)。

1.1.3 试剂 胎牛血清(Hyclone),马血清(Hyclone),L-DMEM(Gibco),H-DMEM(Gibco),L-谷氨酰胺(Sigma),胰蛋白酶(Sigma),氯化钠(Sigma),青霉素(Sigma),硫酸链霉素(Sigma),EDTA(Sigma),肝素(Sigma), $\beta$ -巯基乙醇(Sigma),I/T/S 混合液(Sigma),PBS-干粉(Sigma),氢化可的松(Sigma),瑞-姬氏染色液(南京建成生物工程研究所),碱性磷酸酶染色试剂盒(南京建成生物工程研究所),苏木素-伊红(H.E)染液(上海试剂三厂),Hoechst 33258 染色液(碧云天),油红 O(Sigma),异丙醇(Sigma)。

兔抗小鼠神经烯醇化酶(NSE)抗体,小鼠抗小鼠神经丝蛋白(NF-200)抗体,鼠即用型 SABC-Cy3 检测试剂盒,兔即用型 SABC-FITC 检测试剂盒均购自武汉博士德公司。

### 1.2 方法

1.2.1 小鼠骨髓 MSCs 分离及培养 将雄性昆明白小鼠(4~6 周龄,体重 18~20 g)颈部脱臼处死后置于 75%酒精浸泡约 5 min,将小鼠转入超净台的无菌托盘中,无菌条件下分离出股骨和胫骨,用不含钙镁离子的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)冲洗 3 次。剪开两端骨骨头,露出骨髓腔。用肝素湿化处理的注射器吸取 L-DMEM(low-dulbecco's modified eagle medium),带有 4 号针头的 5 ml 注射器冲出骨髓,置于消毒的大培养皿中,将骨髓液依次经 7 号和 4 号针头轻轻吹打,制成单细胞悬液,悬液过双层 200 目不锈钢滤网,然后用马血清完全培养基[L-DMEM+25%马血清+1%L-谷氨酰胺+ $1\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氢化可的松+ $1\times\text{I/T/S}$ (insulin-transferrin-selenium)]调整细胞密度以  $1\times 10^6\cdot\text{cm}^{-2}$  的密度接种于 35 mm 培养皿中。24 h 后全量更换培养基,去掉非贴壁细胞,然后加入牛血清完全培养基(L-DMEM+10%胎牛血清+1%L-谷氨酰胺+ $1\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢化可的松+ $1\times\text{I/T/S}$ )连续 2 次全量更换培养基,以后每 3~4 d 半量换液 1 次。细胞生长融合后,用消化液(0.25%胰蛋白酶+ $0.1\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 EDTA,消化前预热消化液,PBS 冲洗细胞 3 次,以去除死细胞)消化,在倒置显微镜下观察,大约 1 min,当细胞突起回缩,细胞之间间隙增大,

细胞接近圆形时,轻轻吹打平皿底壁,制成细胞悬液。 $80 \times g$  离心 7 min,弃上清液后 1 : 3 传代。置于 5%CO<sub>2</sub> 饱和湿度, 37 °C 培养箱中继续培养, 进行传代扩增纯化。

1.2.2 小鼠原代脑细胞的分离培养 取新生 24 h 内的小鼠 6 只, 断头取脑, 去除脑膜, 将分离得到的小鼠脑移入离心管内, 用 PBS 洗 2 次,  $100 \times g$  离心 2 min, 加入 1 ml 培养液 [90% H-DMEM (high-dulbecco's modified eagle medium) +5% 胎牛血清+5% 马血清+1% L-谷氨酰胺+1 × I/T/S], 用抛光的玻璃滴管反复吹打制成细胞悬液, 将悬液移到另一离心管内, 计数, 按  $1 \times 10^5 \cdot \text{cm}^{-2}$  接种于 1.8 cm × 1.8 cm 的盖玻片上, 置于 5%CO<sub>2</sub> 饱和湿度, 37 °C 培养箱中培养, 24 h 后半量换液, 以后每 3 天半量换液 1 次。大约 2 周后出现比较典型的神经细胞, 用作免疫荧光细胞化学染色的阳性对照。

1.2.3 瑞士-姬姆萨 (RS-GMS) 复合染色 制备细胞爬片, PBS 冲洗 3 次后加试剂 染液 3~5 滴, 使其迅速铺满爬片, 大约 1 min 后滴加试剂 缓冲液 5~10 滴, 轻轻摇动玻片, 使染液充分混合均匀, 5~10 min 后 PBS 冲去染液, 待干, 于倒置显微镜下观察。

1.2.4 碱性磷酸酶 (AKP) 染色 将细胞爬片置固定液中固定 10 min, 然后用清洗液洗数次, 将上述细胞爬片依次放入硝酸钴液中 5 min, 用清洗液洗净, 然后移于稀硫化铵液中 1 min, 用清洗液洗净, 最后用碱性藏红水溶液染色 16 s, 用蒸馏水洗净, 待干, 于倒置显微镜下观察结果。随机数取 10 个非重叠视野 ( $\times 100$ ), 计算碱性磷酸酶 (AKP) 染色阳性细胞占总细胞数的比例, 并用 SPASS11.0 统计软件进行数据分析, 结果用均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。

1.2.5 小鼠骨髓 MSCs 体外定向诱导分化神经细胞定向诱导小鼠骨髓 MSCs 向神经元分化, 取第 3 代的小鼠骨髓 MSCs 按  $1.0 \times 10^4 \cdot \text{cm}^{-2}$  密度做爬片, 共做 10 个细胞爬片, 细胞生长 70%~80% 融合时直接做诱导。

方法: 细胞用含  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\beta$ -ME ( $\beta$ -Mercaptoethanol), 1% L-谷氨酰胺的 L-DMEM (10% FBS) 培养液预诱导 24 h, 更换培养液, PBS 洗涤 3 次, 再加入含  $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\beta$ -ME, 2% DMSO, 1% L-谷氨酰胺的 L-DMEM 培养液 (无血清) 诱导 6 h。部分爬片用于免疫细胞荧光检测, 其余爬片诱导 6 h 后, 更换神经培养液继续培养, 2 周后再做免疫细胞荧光检测。

对照组不加任何诱导剂, 共做 5 个爬片。

1.2.6 小鼠骨髓 MSCs 体外定向诱导分化脂肪细胞定向诱导小鼠骨髓 MSCs 向脂肪分化, 取第 3 代的小鼠骨髓 MSCs 按  $1.0 \times 10^4 \cdot \text{cm}^{-2}$  密度接种于 35 mm 培养皿, 共接种 6 个皿, 细胞生长 70%~80% 融合时直接做诱导。

诱导液成分: H-DMEM+5% 马血清+5% 牛血清+1% L-谷氨酰胺+1 × I/T/S, 每 3~4 d 半量换液, 在倒置显微镜下逐日观察结果。正常培养的第 3 代小鼠骨髓 MSCs 作为对照。

1.2.7 诱导后神经细胞的苏木素-伊红 (H.E) 染色 PBS 冲洗诱导后的爬片 3 次, 苏木精染色 3 min, 1% 盐酸酒精分化 2 s, 自来水冲洗返蓝 10 min, 蒸馏水洗 3 min, 伊红染色 2 min, 蒸馏水洗净多余染液, 凉干, 于倒置显微镜下观察。

1.2.8 诱导后脂肪细胞的油红 O (Oil Red O) 染色 PBS 冲洗诱导后的脂肪细胞 3 次, 10% 甲醛固定 10 min, 饱和油红 O 染色液孵育 1 h, 60% 异丙醇洗去多余染液, 蒸馏水清洗 2 min, Mayer 氏苏木素染核 2 min, 蒸馏水洗净多余染液, 凉干, 甘油明胶封固, 于倒置显微镜下观察, 拍照。

1.2.9 诱导后神经细胞的免疫荧光细胞化学 (immunocyto-fluorescence) 鉴定 诱导后细胞用 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 冲洗 2 min, 3 次。滴加 PBS 1:10 稀释的封闭用正常山羊血清室温孵育 20 min, 倾去后直接滴加适当比例稀释的一抗: 兔抗小鼠神经元烯醇化酶 (NSE, 1:100 稀释)、小鼠抗小鼠神经丝蛋白单抗 (NF-200, 1:100 稀释), 室温孵育 2 h。PBS 冲洗, 2 min, 3 次。滴加 PBS 1:100 稀释的生物素化二抗, 室温孵育 30 min。PBS 冲洗, 2 min × 3 次。滴加 PBS 1:100 稀释的 SABC-Cy3 或 SABC-FITC, 室温孵育 30 min 洗涤。加入 Hoechst33258 染色液染色 5 min, PBS 冲洗, 5 min, 4 次。加抗荧光淬灭封片剂封片, 放于荧光显微镜下分别观察 Cy3、FITC 和 Hoechst33258 的荧光, 诱导的细胞免疫荧光细胞化学染色后荧光镜下随机数取 10 个非重叠视野 ( $\times 100$ ), 计算 NSE 和 NF-200 阳性细胞占总细胞数的比例, 并用 SPASS11.0 统计软件进行数据分析, 结果用均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。

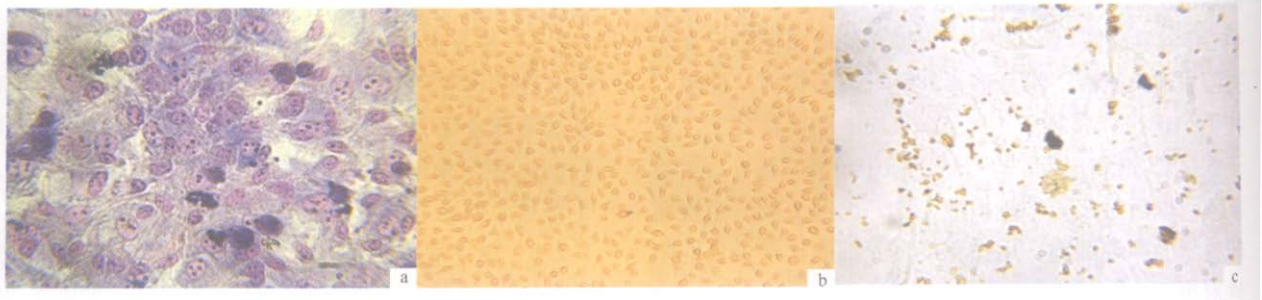
## 2 结果与分析

### 2.1 小鼠骨髓 MSCs 分离及培养

刚接种时骨髓细胞悬液中的细胞呈圆形, 大小不一, 不能辨认细胞核, 1~3 d 可见形态相对均一、折

光性较强的纺锤形细胞,以及少量的成纤维细胞样的细胞,可见一些微克隆,以后细胞逐渐增多,大约5~7 d 细胞进入对数生长期呈现很多集落样细胞,细胞生长较快;10~12 d 细胞生长进入平台期,细胞数量扩增减慢,并开始出现融合,而且细胞逐渐出现多种形态,成纤维细胞样的细胞开始增加,可见少量大而扁平的细胞(图 1-a)。一经传代小圆形细胞均不见,细胞主要为梭形、多角形,呈现很多集落样细胞并融合

成片(图 1-b),但是细胞间存在接触抑制,传代培养的细胞呈集落生长并融合成片。第3、4代的细胞纯度高达98%以上,细胞呈高度统一的成纤维表型(图 1-b),碱性磷酸酶染色有极高的阳性率(表 1)。培养17 d 后发生融合,呈水纹状分布或平行生长,以后细胞生长融合时间逐渐缩短;经75 d 细胞可传至第8代,细胞表型一致,呈成纤维样,无异常表型,可继续传代。



a. 完全融合的原代 MSCs 瑞士-姬姆萨复合染色 ( $\times 400$ ); b. 接近融合的第4代 MSCs ( $\times 100$ ); c. 第3代 MSCs 的弱阳性 AKP 染色,胞浆中有棕黄色颗粒 ( $\times 100$ )  
a. The RS-GMS staining of full-fusion primary MSCs ( $\times 400$ ); b. Reach to fusion of 4th passage MSCs ( $\times 100$ ); c. The weakly positive AKP staining of 3rd passage MSCs ( $\times 100$ )

图 1 小鼠 MSCs 的分离培养及鉴定

Fig. 1 The cultivation and identification of mMSCs

## 2.2 小鼠原代脑细胞的分离培养

接种前几天,组织及细胞团块较多,有圆形细胞贴壁,随着换液的进行,组织及细胞团块逐渐除去,贴壁细胞开始分裂增殖,贴壁细胞开始长出突起;随培养时间的增加,细胞突起逐渐变长,并呈神经细胞样表型,培养14 d 以后出现多种形态的神经细胞,作为诱导后免疫荧光细胞化学实验的阳性对照,可见强阳性结果(图 2-a, d)。

## 2.3 瑞士-姬姆萨 (RS-GMS) 复合染色

原代和3代细胞做瑞士-姬姆萨复合染色,原代细胞形态多样,绝大多数细胞为成纤维细胞样,有少量

小圆形细胞和大而扁平的细胞,3代细胞全为成纤维细胞样细胞。原代及3代细胞的细胞核着色较深,大多数细胞有2~4个核仁,细胞呈克隆样分布(图 1-a, b, 图 2-c, g)。

## 2.4 碱性磷酸酶 (AKP) 染色

3代细胞制作细胞爬片后做碱性磷酸酶 (AKP) 染色,可见细胞呈弱阳性,有极高的阳性率(表 1),说明分离得到的 MSCs 是一群比较原始的细胞(图 1-c)。

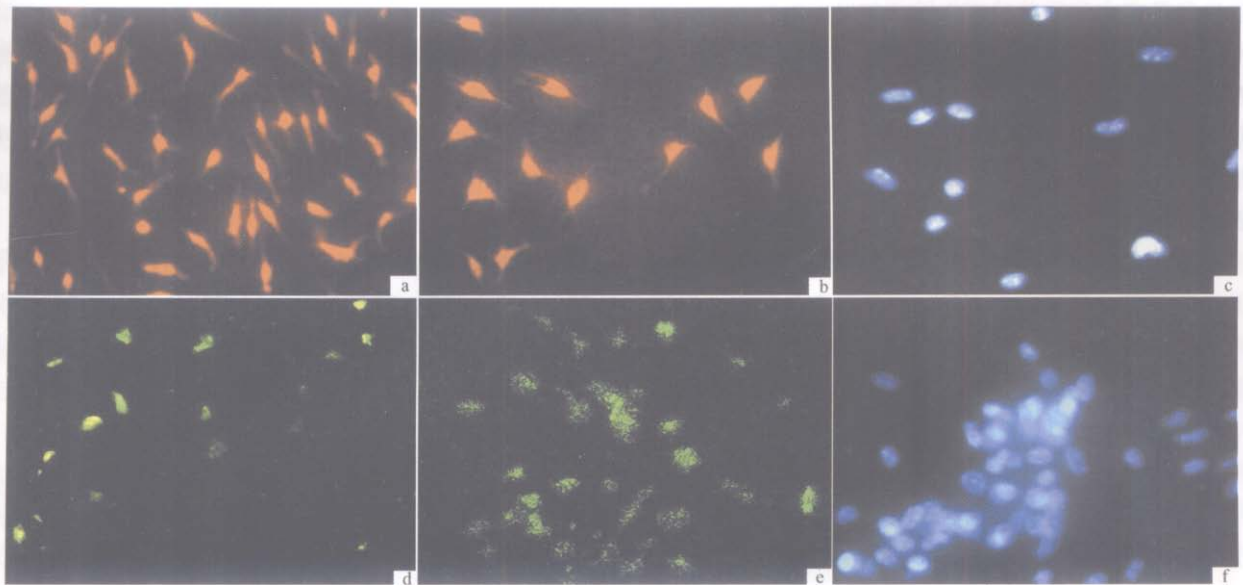
## 2.5 小鼠骨髓 MSCs 体外定向诱导分化神经细胞

小鼠 MSCs 在含  $\beta$ -ME 的 DMEM (20%FBS) 预

表 1 MSCs AKP 染色及诱导后神经细胞 NSE、NF-200 免疫荧光细胞化学染色阳性率

Table 1 AKP staining of MSCs and the immunocyto-fluorescence positive rates of NF-200 and NSE of neurocytes after induced

试验	N(代数)	检测细胞总数(个)	AKP(%)	NSE(%)	NF-200(%)	
Experiment	N(passage)	No. of cells by detected				
未诱导	Non-induced	3	576	93.2 $\pm$ 1.5	-	-
$\beta$ -ME 诱导 6h	6h after induced by $\beta$ -ME	3	493	-	82.7 $\pm$ 2.1	85.4 $\pm$ 1.8
诱导后培养 2 周	Culture 2 weeks after induced	3	477	-	84.6 $\pm$ 2.4	86.9 $\pm$ 1.5



a. 阳性对照，小鼠全脑细胞原代培养 14 d 后用 Cy3 标记的抗 NF-200 的抗体进行染色；b. 试验组，MSCs 神经诱导后用 Cy3 标记的抗 NF-200 的抗体进行染色；c. 阴性对照，第 3 代 MSCs 用 Cy3 标记的抗 NF-200 的抗体和 Hoechst 33258 染色，免疫荧光细胞化学染色阴性，只显示 Hoechst 33258 的蓝色荧光；d. 阳性对照，小鼠全脑细胞原代培养 14 d 后用 FITC 标记的抗 NSE 的抗体染色；e. 试验组，MSCs 神经诱导后用 FITC 标记的抗 NSE 的抗体染色；f. 阴性对照，第 3 代 MSCs 的免疫荧光细胞化学染色和 Hoechst 33258 染色，免疫荧光细胞化学染色阴性，只显示 Hoechst 33258 的蓝色荧光；颜色：Cy3，红色；FITC，黄绿色；Hoechst 33258，蓝色

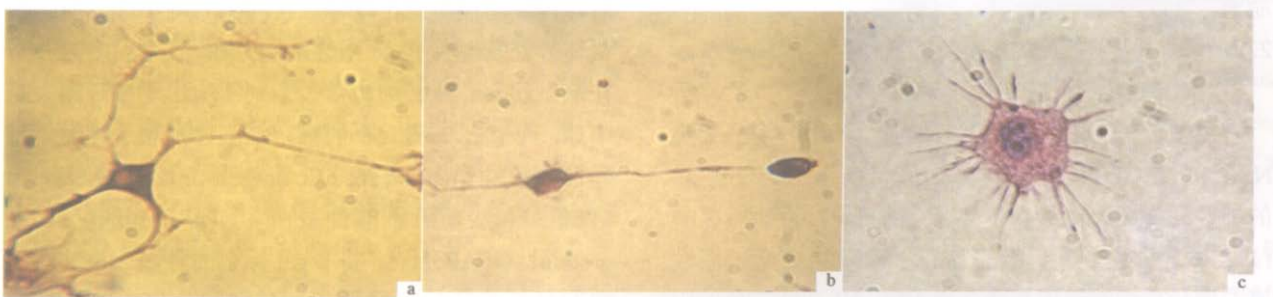
a. Positive control, muse full-brain cells after culture for 2 weeks were stained with antibodies against NF-200-Cy3; b. Sample, MSCs after neuron inducing were stained with antibodies against NF-200-Cy3; c. Negative control, 3rd passage MSCs were stained with antibodies against NF-200-Cy3 and Hoechst 33258, immunocyte-fluorescence staining was negative, only show blue-fluorescences of Hoechst 33258; d. Positive control, muse full-brain cells after culture for 2 weeks were stained with antibodies against NSE-FITC; e. Sample, MSCs after neuron inducing were stained with antibodies against NSE-FITC; f. Negative control, 3rd passage MSCs were stained with antibodies against NSE-FITC and Hoechst 33258, immunocyte-fluorescence staining was negative, only show blue-fluorescences of Hoechst 33258; Color staining: Cy3, red; FITC, flavovirens; Hoechst33258, blue

图 2 小鼠 MSCs 神经诱导后的免疫荧光细胞化学染色 ( × 400 )

Fig. 2 The immunocyte-fluorescence staining after neuron inducing of mouse MSCs ( × 400 )

诱导液中处理 24 h 后，部分细胞形态发生改变，细胞开始有少量突起长出，细胞变长，细胞质变得致密，加入诱导液，1 h 后细胞形态变化更加明显，大多数细胞原来宽大扁平的小鼠 MSCs 的胞质向核收缩，呈典型的核周体形态，细胞突起开始变长，6 h 后大多数细

胞均转变为类似于神经细胞的形态，突起伸出轴突，并在轴突末端出现一级和二级分支，类似树突。倒置显微镜下可见简单的双极细胞，也有复杂的多极细胞拉网，有生长锥形成，还有胶质样细胞，与培养的小鼠原代脑细胞形态学上很类似（图 3），对照组细胞



a, b. MSCs 诱导后出现的神经元样细胞；c. MSCs 诱导后出现的神经胶质样细；用苏木素-伊红染色

a, b. Neuron-like cells after inducing of MSCs; c. Neuroglia-like cells after inducing of MSCs; Staining with H.E

图 3 小鼠骨髓 MSCs 神经诱导后出现的各种神经细胞 ( × 400 )

Fig. 3 Various neurocytes after neuronal inducing of mouse MSCs ( × 400 )

仍然保持宽大扁平的状态。随着神经元分化成熟, 神经元不再增殖, 数量不再增加。24 h 后少数分化细胞开始脱落, 即停止诱导分化, 更换神经培养液可继续培养 4 周, 其间细胞形态无明显改变, 也不增殖, 4 周后细胞开始死亡脱落。

## 2.6 小鼠骨髓 MSCs 体外定向诱导分化脂肪细胞

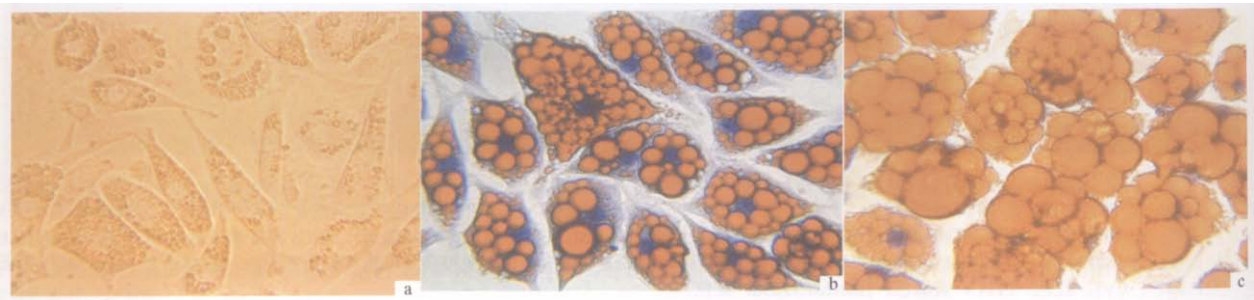
小鼠骨髓 MSCs 在含 5% 马血清的诱导液中培养 7 d 后, 细胞体积增大, 由长梭形逐渐变为圆形、椭圆形, 细胞形态扁平; 诱导第 14 d 后光镜下可见脂滴沉着的细胞, 小脂滴多集中于细胞边缘 (图 4-a), 随后

小脂滴逐渐融合增大成为较大的脂滴, 细胞体积逐渐增大, 细胞立体感增强 (图 4-b); 诱导 4 周后细胞被 3~50 个大脂滴充满, 并有部分临近脂肪细胞的脂滴融合成较大的脂肪球悬浮于培养液中, 细胞边界模糊, 细胞体积变为原来的 3~5 倍 (图 4-c)。

## 2.7 诱导后神经细胞的苏木素-伊红 (H.E) 染色

诱导后细胞经苏木素-伊红染色后, 细胞形态更加明显, 易于辨别, 可见多种神经细胞样形态的细胞 (图 3)。

## 2.8 诱导后脂肪细胞的油红 O (Oil Red O) 染色



a. MSCs 诱导第 14 d 形成的脂肪细胞; b. MSCs 诱导第 21 d 形成的脂肪细胞; c. MSCs 诱导第 29 d 得到的脂肪细胞; b, c. 经油红 O 染色  
a. Adipocytes at 14th day after adipocytic inducing of mouse MSCs; b. Adipocytes at 21st day after adipocytic inducing of mouse MSCs; c. Adipocytes at 29th day after adipocytic inducing of mouse MSCs; b and c staining with Oil Red O

图 4 小鼠骨髓 MSCs 体外诱导分化形成的脂肪细胞及其油红 O 染色 ( $\times 400$ )

Fig. 4 Adipocytes after adipocytic inducing of mouse MSCs *in vitro* and they stain with Oil Red O ( $\times 400$ )

取诱导第 17、21、25、29 和 33 d 的脂肪细胞做油红 O 染色, 结果显示 MSCs 全部分化为脂肪细胞。油红 O 染色示胞核呈蓝色, 被胞浆内大量的大颗粒脂滴挤向一侧 (图 4-b, c), 脂滴呈橙红色, 用 60% 异丙醇清洗时细小的红色液滴被溶解, 明确为脂肪滴 (图 4-b, c); 对照组光镜下观察和油红 O 染色未见脂滴。

## 2.9 诱导后神经细胞的免疫荧光细胞化学 (immunocytofluorescence) 鉴定

免疫荧光细胞化学鉴定结果显示, 诱导后的细胞 NSE 和 NF-200 均呈强阳性表达。这表明诱导分化后的神经元样细胞已经具备神经元的抗原特性 (图 3-b, f)。诱导分化 6 h 后细胞 NSE、NF-200 染色的阳性率与诱导后细胞继续培养 2 周 NSE、NF-200 染色的阳性率无明显差异 (表 1), 但诱导后继续培养 2 周细胞 NSE、NF-200 染色的阳性率略有上升。

## 3 讨论

MSCs 除来源于骨髓外, 也可从脐血和外周血中获得, 并且不同来源的 MSCs 分化潜能相似<sup>[14,15]</sup>。MSCs 在脑内具有迁移及分化的能力, 将 MSCs 注入新生鼠侧脑室后可分化为神经元和胶质细胞<sup>[16]</sup>。将 5-溴脱氧尿核苷 (bromodeoxyuridine, Brdu) 标记的骨髓 MSCs 经尾静脉移植入大鼠中动脉缺血的大鼠后, 神经功能得到了改善。在同侧大脑半球皮质、纹状体等处发现有 Brdu 阳性细胞分布, 且绝大多数分布在缺血灶中心及其周边带, 个别细胞出现在对侧大脑半球, 约 1%、2% 和 5% 的标记细胞分别表达神经元特异性核蛋白 (neuron specific nuclear protein, NeuN)、MAP-2 和胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP)<sup>[17]</sup>。将  $\beta$ -gal 标记的骨髓 MSCs 注入细胞早期囊胚后, 发现  $\beta$ -gal<sup>+</sup> 细胞分化成的神经元 (Neu-N<sup>+</sup>) 和星形胶质细胞 (GFAP<sup>+</sup>) 遍及整个嵌合体小鼠的脑部, 包括皮质、沟回、海马、神经床和小脑<sup>[11]</sup>。Woodbury 等对 15~20 代的 MSC 和分化的神经元的基因表达作了比较, 采用 RT-PCR 法检测出

未分化的 MSCs 不仅携带有中胚层的基因, 且还有内外胚层及胚胎组织的基因, 说明了 MSCs 的多分化潜能<sup>[18]</sup>。MSCs 除具有多向分化潜能外, 还可以延缓肿瘤细胞的扩增, 在体内和体外当 MSCs 和大鼠结肠肉瘤细胞数量相同时, 则可完全抑制肿瘤细胞的生长<sup>[19]</sup>。

本研究采用贴壁筛选法分离 MSCs, 由于 MSCs 具有较强的黏附特性, 可经过不断传代得以扩增和纯化; 其方法简单易行, 不需要特殊仪器和试剂, 对细胞损伤较小, 细胞传至 8 代以上而未出现异常表型, 而且可以在短时间内扩增得到大量高纯度的 MSCs (细胞经 75 d 培养即可扩增 5 000 倍以上); 所以贴壁培养法是一种理想的 MSCs 分离方法, 可以满足临床治疗对大量细胞的要求。

本研究应用 DMSO 和抗氧化剂  $\beta$ -ME 诱导 MSCs 后, 形成的神经元样细胞表达神经细胞特有的标记 NSE 和 NF-200, 说明分化后的神经元样细胞已具备神经元的抗原特性, 证实了 MSCs 具有向神经细胞体外定向分化的能力。诱导后的细胞经继续培养, NSE 和 NF-200 的阳性率有微小增加, 可能是由于未分化的细胞在后续培养中死亡或未分化细胞在已分化细胞影响下继续分化引起的。本研究中的 MSCs 经  $\beta$ -ME 诱导后, 产生了多种类型的神经细胞, 其原因很可是  $\beta$ -ME 激活了 MSCs 细胞内的某些细胞信号转到通路, 诱导 MSCs 中神经发生早期基因的表达, 进而 MSCs 转化为神经上皮细胞, 然后神经上皮细胞再分化为各种神经细胞。也可能是 MSCs 不是完全均质的<sup>[10]</sup>, 对  $\beta$ -ME 诱导刺激的反应不同, 从而分化为不同类型的神经细胞。Peister 认为骨髓间充质干细胞是骨髓源性的成纤维细胞样细胞, 并且在一定条件下可以分化为中胚层的脂肪细胞、成骨细胞和成软骨细胞<sup>[20]</sup>。本试验中第 3 代的 MSCs 用含 5% 的马血清的诱导培养液培养, 使骨髓间充质干细胞中出现大量脂质聚集, 并且进一步聚集形成折光度强的脂滴, 从而使骨髓间充质干细胞分化为脂肪细胞。这不同于 Lee<sup>[15]</sup>, Trope<sup>[21]</sup>, Janderova<sup>[22]</sup>等人用地塞米松和兔血清的诱导方法, 可能与马血清中具有较高的脂质和糖皮质激素含量有关, 其中糖皮质激素可能起了主要作用。

#### 4 结论

本研究结果显示了 MSCs 体外向神经细胞、脂肪细胞分化的潜能, 但还有许多问题有待于研究, 诱导 MSCs 分化的具体分子机制, 分化的神经元样细胞是否具有正常的功能, 在体内受损组织如何启动 MSCs

再生及分化能力, MSCs 在体外培养和定向诱导分化是否会产生遗传突变等等。了解 MSCs 向神经、脂肪分化的机制有助于揭示骨髓 MSCs 与组织特异性干细胞之间的联系, 为进一步研究骨髓 MSCs 参与创面愈合机理奠定基础。存在于骨髓中的 MSCs 是成纤维细胞、内皮细胞、成骨细胞、脂肪细胞等多种骨髓基质细胞的前体细胞, 在造血调控中可能都具有一定的作用, 与 ES 细胞类似, 同种异基因型的 MSCs 可以用于矫正退行性或先天性疾病。在同源异型基因个体间进行 MSCs 移植治疗白血病和心脏病已经获得成功<sup>[23-25]</sup>。与 ES 细胞相比, MSCs 可以从自体骨髓中筛选出来, 无伦理问题, 未分化的 MSCs 注入动物体内后并不产生畸胎瘤, 所以未分化的或经遗传修饰的 MSCs 最有可能用于退行性或遗传性疾病的治疗。本研究结果为相关临床研究提供试验依据, MSCs 具有广阔的应用前景。

#### References

- [1] Brazelton T R, Rossi F M V, Keshet G I, Blau H M. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*, 2000, 290: 1775-1779.
- [2] Plumas J, Chaperot L, Richard M J, Molens J P, Bensa J C, Favrot M C. Mesenchymal stem cells induce apoptosis of activated T cells. *Leukemia Advance Online Publication*, 28 July 2005, doi: 10. 1038/sj.leu. 2403871.
- [3] Zhao R C H, Liao L M, Han Q. Mechanisms of and perspectives on the mesenchymal stem cell in immunotherapy. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 2004, 143: 284-291.
- [4] Krause D S. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Gene Therapy*, 2002, 9: 754-758.
- [5] Erica L H, Li Chai, Krause D S. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*, 2003, 102: 3483-3493.
- [6] Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D, Strazzer S, Comi G P. Somatic stem cell research for neural repair: current evidence and emerging perspectives. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2004, 8: 329-337.
- [7] Mazey E, Chandross K J, Harta G, Maki R A, McKercher S R. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science*, 2000, 290(5497): 1779-1782.
- [8] Friedenstein A J, Gorskaja J F, Kulagina N N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experiment Hematology*, 1976, 4: 267-274.
- [9] Pittenger M F, Mackay A M, Stephen C B, Rama K J, Robin D,

- Joseph D M, Moorman M A, Simonetti D W, Craig S, Marshak D R. Multilineage potential of adults human mesenchymal stem cell. *Science*, 1999, 284: 143-147.
- [10] Jiang Y H, Jahagirdar B N, Reinhardt R L, Schwartz R E, Keene C D, Ortiz-Gonzalez X R, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J B, Aldrich S, Lisberg A, Low W C, Largaespada D A, Verfaillie C M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 2002, 418: 41-49.
- [11] Prockop D J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 1997, 276(5309): 71-74.
- [12] Justesen J, Stenderup K, Kassem M S. Mesenchymal stem cell: potential use in cell and gene therapy of bone loss caused by aging and osteoporosis. *Ugeskr Laeger*, 2001, 163: 5491-5495.
- [13] Gao Jizong, Dennis J E, Muzic R F, Lundberg M, Caplan A I. The dynamic *in vivo* distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs*, 2001, 169: 12-20.
- [14] Minguell J J, Conget P, Erices A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2000, 33(8): 881-887.
- [15] Lee O K, Kuo T K, Chen W M, Lee K D, Hsieh S L, Chen T H. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Hematopoiesis*, 2004, 103: 1669-1675.
- [16] Kopen G C, Prockop D J, Phinney D G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96: 10711.
- [17] Chen J L, Li Y, Wang L, Zhang Z G, Lu D Y, Lu M, Chopp M. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral is chemia in rats. *Stroke*, 2001, 32: 1005-1011.
- [18] Woodbury D, Reynolds K, Black I B. Adult bone marrow stromal stem cells: Express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *Journal of Neuroscience Research*, 2002, 96: 908-917.
- [19] Ohlsson L B, Varas L, Kjellman C, Edvardsen K, Lindvall M. Mesenchymal progenitor cell-mediated inhibition of tumor growth *in vivo* and *in vitro* in gelatin matrix. *Experimental and Molecular Pathology*, 2003, (75): 248-225.
- [20] Peister A Mellad J A, Larson B L, Hall B M, Gibson L F, Prockop D J. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood*, 2004, 103: 1662-1668.
- [21] Tropel P, Noel D, Platet N, Legrand P, Benabid A L, Berger F. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Experimental Cell Research*, 2004, 295: 395-406.
- [22] Janderova L, McNeil M, Murrell A N, Mynatt R L, Smith S R. Human mesenchymal stem cells as an *in vitro* model for human Adipogenesis. *Obesity Research*, 2003, 11: 65-74.
- [23] Ponticello M S, Schinagl R M, Kadiyala S, Barry F P. Gelatin-based resorbable sponge as a carrier matrix for human mesenchymal stem cells in cartilage regeneration therapy. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2000, 52: 246-255.
- [24] Koç O N, Gerson S L, Cooper B W, Dyhouse S M, Haynesworth S E, Caplan A I, Lazarus H M. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, 2000, 18: 307-316.
- [25] Amado L C, Saliaris A P, Schuleri K H, John M St, Xie J S, Cattaneo S, Durand D J, Fitton T, Kuang J Q, Stewart G, Lehrke S, Baumgartner W W, Martin B J, Heldman A W, Hare J M. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102: 11474-11479.

(责任编辑 高 雨)