

# 支架荷载的骨髓间充质干细胞的分化实验研究

贺斌, 王明刚, 赵李平, 钟晓红, 徐飞

**摘要** 目的 探讨大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)在改性聚乳酸-I型胶原复合支架上向表皮干细胞分化的可行性。方法 体外诱导改性聚乳酸-I型胶原复合支架荷载的大鼠骨髓间充质干细胞向表皮干细胞分化,免疫组织化学法检测表皮干细胞标志物CK19和整合素 $\beta_1$ 的表达。结果 诱导液作用2周后,免疫组织化学法检测到改性聚乳酸-I型胶原复合支架荷载的大鼠BMSCs中大量阳性双表达CK19和整合素 $\beta_1$ 。结论 改性聚乳酸-I型胶原复合支架荷载的大鼠BMSCs仍具有向表皮干细胞分化的潜能,此支架具备作为组织工程皮肤支架材料的条件。

**关键词** 改性聚乳酸; I型胶原; 支架; 干细胞

**中图分类号** R 622.1; R 318.1

**文献标识码** A **文章编号** 1000-1492(2012)04-0400-05

组织工程的研究包括种子细胞和支架材料,支架材料不仅仅是对种子细胞的支撑,而是对整个细胞外基质的仿生,是组织工程形成的关键所在。因此支架材料的选择是组织工程皮肤发展的重要因素。聚乳酸作为生物材料被广泛应用于组织工程的各个组织、器官,但其表面疏水性、性脆、降解速率较慢等缺点制约了其发展,因此对聚乳酸进行必要的改性已成为目前研究的热点。实验利用I型胶原对改性的聚乳酸表面进行包被,研究其对大鼠骨髓间充质干细胞向表皮干细胞分化的影响,为组织工程皮肤寻找一种合适的支架材料。重建含有皮肤附属器,具备完整皮肤结构和功能的全层皮肤,实现创面的完美修复。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 4~6周龄清洁级SD大鼠,体重135~186g,由安徽医科大学附属省立医院动物中

心提供。实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准。

**1.1.2 主要仪器与试剂** ECO-170型CO<sub>2</sub>培养箱购于德国New Brunswick Scientific公司;CKX41型倒置相差显微镜购于日本Olympus公司;FACS-Canto型流式细胞仪购于美国BD公司;SW-CJ-2FD型双人单面净化工作台购于苏州净化设备有限公司;L-DMEM培养基购于Hyclone公司;胎牛血清购于Gibco公司;FITC-CD29/PE-CD45大鼠荧光抗体购于BioLegend公司;PE-CD31大鼠荧光抗体购于美国BD公司;FITC-CD44大鼠荧光抗体购于美国Antigenix公司;表皮细胞生长因子(EGF)购于美国Pepro Tech公司;兔抗大鼠CK19和整合素 $\beta_1$ 抗体购于武汉博士德生物工程有限公司;DouSPTM免疫组化双染试剂盒购于福州迈新生物技术开发有限公司;聚乳酸购于济南岱罡生物科技有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 大鼠BMSCs的分离、培养** 大鼠腹腔麻醉后引颈处死,医用酒精浸泡10min;无菌条件下取出两侧股骨和胫骨,剪去骨两端露出骨髓,用10ml L-DMEM液冲出骨髓。充打均匀后移入离心管,置水平离心机中,1500r/min离心20min,弃去上清液,再用细胞培养液重悬沉淀的细胞;以 $2 \times 10^6$ /ml的细胞密度接种于25cm<sup>2</sup>的一次性培养瓶中,置37℃、5%CO<sub>2</sub>的孵箱中培养。24h后首次换液,以后每3d换液,待细胞融合于瓶底后消化传代。留取第3代备用。观察细胞生长特性并记录不同时期细胞图片。

**1.2.2 大鼠BMSCs的鉴定** 取培养的第3代细胞制成4份含有 $2 \times 10^4$ 个细胞的悬液200 $\mu$ l,按说明书步骤分别滴加带有流式荧光标记的FITC-CD29抗体、PE-CD31抗体、FITE-CD44抗体、PE-CD45抗体,室温避光孵育0.5h后上机检测细胞表面抗原分子CD29、CD31、CD44、CD45的表达率,并记录细胞流式图。

**1.2.3 改性聚乳酸-I型胶原复合支架的制备** 将孔隙率0.9,孔径100~150 $\mu$ l,黏度1.02,分子量10万的聚乳酸支架,切割成4mm $\times$ 4mm $\times$ 2mm片状,以三蒸水超声波振荡清洗30min,自然干燥。经

2011-11-23 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:11040606M161);安徽高校省级科研基金(编号:KJ2011Z205, KJ2008B297);安徽省卫生厅课题(编号:09A028)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院烧伤整形外科,合肥 230001

作者简介:贺斌,男,硕士研究生;

王明刚,男,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: mg-wang1105@sina.com

37℃ 环氧乙烷熏蒸消毒后浸入质量份数为 0.01 的 NaOH 溶液中 2 h 取出后用 PBS 缓冲液清洗 5 min, 再浸入 50% 的乙醇溶液中 2 h、取出用 PBS 缓冲液清洗 5 min 后浸入适量的 1:10 多聚赖氨酸溶液中 24 h 后取出自然干燥备用。将上述改性的聚乳酸浸入浓度为  $2.5 \times 10^{-3}$  的 I 型胶原的醋酸水溶液 (醋酸水溶液浓度为 0.3%) 中, 在  $-53^{\circ}\text{C}$  下真空干燥 12 h, 取出后紫外线消毒 1 h, 在无菌 PBS 液中洗 30 min 换 3 次液后再浸泡在 DMEM 培养液中 3 h, 自然干燥, 紫外线照射 30 min 后密封备用。

**1.2.4 诱导分化及鉴定** 无菌条件下拆开密封备用的支架, 浸泡于细胞培养液中 2 h; 用含胰酶和 EDTA 的消化液常规消化铺满瓶底的第三代大鼠 BMSCs, 收集细胞悬液至离心管, 1 500 r/min 离心 10 min 弃去上清, 用含有 EGF 的诱导液重悬细胞; 取出浸泡好的支架, PBS 冲洗后置于六孔板中, 将上述细胞悬液滴加于支架上, 使悬液没过支架。置 37℃、含 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中孵育; 2 周后, 小心取出 6 孔板中的支架, PBS 冲洗 3 次, 每块支架上滴加 1 ml 含 EDTA 的胰酶溶液, 1 min 后终止消化, 尽量冲出支架内细胞, 1 500 r/min 离心 10 min, 500  $\mu\text{l}$  营养液重悬, 滴加在预先准备好的无菌防脱盖玻片上; 培养箱中静置 6 h 后取出, PBS 冲洗盖玻片 3 次, 丙酮固定 10 min, 按免疫组化双染试剂盒说明书步骤操作, 检测 CK19 及整合素  $\beta_1$  表达情况。光学显微镜拍照记录。

## 2 结果

**2.1 BMSCs 的分离、培养** 原代 BMSCs 首次贴壁后可表现为梭型、星型、多角形、角质型等, 细胞体积不均一。前 3 d 细胞生长基本处于静止期, 3 d 后镜下可见几处成团的细胞克隆簇, 团簇边缘为均匀的向外的放射状细胞, 团簇的细胞密度不断增大, 同时向外扩张, 直至与另一细胞团融合, 约 13 d 左右可铺满瓶底, 此时传第一代。传代后细胞均匀铺于瓶底, 无原代细胞的团簇形成, 生长较原代快, 约 7~10 d 可铺满瓶底, 细胞大小均一, 多呈梭型, 镜下立体感增强, 见图 1。

**2.2 流式细胞仪检测** 将上机细胞数达  $10^5$  个以上的流式细胞仪分析结果汇总, 计算平均值。研究发现细胞表面抗原分子 CD29 的平均表达率为 94.8%, CD31 的平均表达率为 1.7%, CD44 的平均表达率为 93.2%, CD45 的平均表达率为 1.3%。每项指标选取一张流式直方图附载, 见图 2。

**2.3 复合支架的微观结构** 改性后的聚乳酸三维支架色泽纯白, 透光度、亲水性增加, 免疫原性降低, 与 I 型胶原复合后, 可增加其细胞黏附性, 扫描电镜观察, 见图 3, 其含有多角度斜面可增加细胞黏附数量, 对细胞的生长、增殖、分化和迁徙起着重要的作用。

**2.4 免疫组化检测** CK19 广泛存在于胞质, 而整合素  $\beta_1$  大量表达在细胞膜表面。实验观察几乎所有细胞胞质呈红色, 说明几乎所有细胞均表达角蛋白 CK19, 而胞膜显紫黑色表达整合素  $\beta_1$  的细胞约占总细胞数的 93.6%, 即大量细胞角蛋白 CK19 和整合素  $\beta_1$  均呈双表达阳性结果, 见图 4。

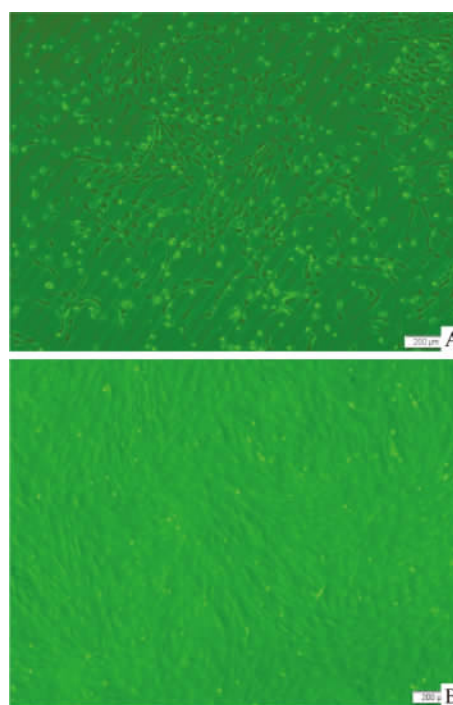


图 1 体外培养的大鼠骨髓间充质干细胞形态学观察  $\times 100$   
A: 原代体外培养第 7 天大鼠骨髓间充质干细胞; B: 体外培养第 7 天的第三代大鼠骨髓间充质干细胞

## 3 讨论

BMSCs 是全能干细胞, 具备分化为多种胚层来源的组织细胞的功能, 但不具有分化成为完整个体的潜能, 所以很好的规避了伦理学的限制, 又因其取材方便, 体外培养扩增技术成熟, 已成为目前组织工程皮肤研究方面首选的种子细胞<sup>[1]</sup>。通过多表型细胞标志物, 结合形态结构及功能特性的排除法可以完成其鉴定。BMSCs 不表达造血细胞标志 CD45 和内皮细胞标志 CD31, 但表达干细胞标志物 CD29 和 CD44<sup>[2-3]</sup>。CD29、CD44 的大量表达和 CD45、

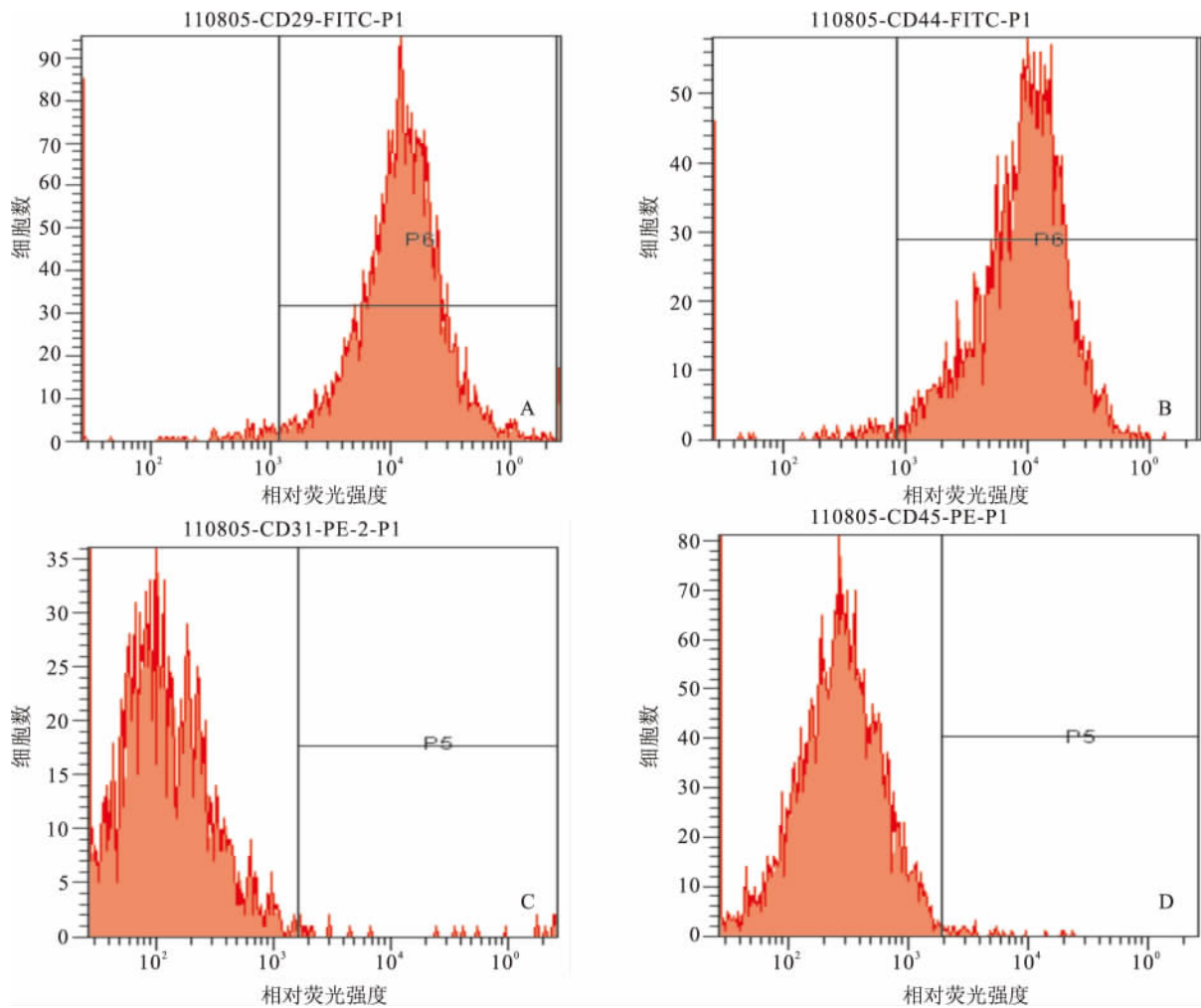


图2 大鼠第三代骨髓间充质细胞表面 CD 抗原分子流式表达图  
 A: FITC 标记的 CD29; B: FITC 标记的 CD44; C: PE 标记的 CD31; D: PE 标记的 CD45

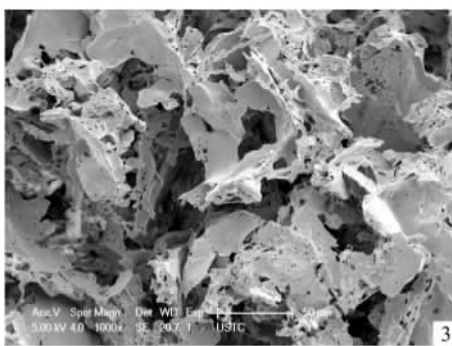


图3 改性聚乳酸-I 型胶原支架表面及内部电镜扫描图 ×1 000



图4 免疫组化双染法检测 CK19 和整合素  $\beta_1$  双表达的细胞 ×400

CD31 的低量表达可用于鉴别 BMSCs。使用流式荧光抗体直接标记细胞表面 CD 抗原分子可减少二抗标记的误差;利用细胞学研究最精确的流式细胞仪检测分析,结果为 CD29 的表达率约为 94% 左右, CD31 的表达率约为 2% 左右, CD44 的表达率约为 92% 左右, CD45 的表达率约为 1.8% 左右。与文

献<sup>[4-6]</sup>结果一致,说明培养的第三代细胞为 BMSCs,且纯度较高。钟晓红等<sup>[7]</sup>以大鼠为模型,通过对大鼠创面直接注射 BMSCs 的方法研究其可促进糖尿病创面的愈合,并提高创面愈合的质量,减少瘢痕增生。本实验在方法上予以突破,研究大鼠 BMSCs 在支架上是否仍具有向表皮干细胞分化的能力,旨在

为 BMSCs 寻找一种合适的载体,为真正的组织工程皮肤的研发打下基础。

组织工程支架材料的要求是降解无毒性、良好的生物相容性和细胞亲和性,通过表面仿生技术对高分子合成支架进行必要的改性,再用自然高分子材料加以修饰可改变其表面的微观结构,增强其组织相容性、细胞黏附性,促进细胞的增值。因此复合高分子材料无疑已成为目前研究的重点<sup>[8]</sup>。聚乳酸在体内经三羧酸循环分解为 CO<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>O 而排出体外。另因其易于加工、机械性能和降解速率可调,组织相容性良好、造价低廉,可规模化生产等优点已成为目前组织工程研究中最常用的支架材料,但其表面的疏水性限制其在组织工程皮肤领域中的发展。改性的聚乳酸表面复合 I 型胶原,既保持了 I 型胶原生物相容性好易于细胞黏附、生长、增殖的特性,又具备聚乳酸的力学性能。实验将该复合支架作为研究对象,观察其是否会使 BMSCs 丧失分化为表皮干细胞的能力。

检测表皮干细胞的标志物主要有整合素、角蛋白(keratins)、增殖细胞核抗原(PCNA)等<sup>[9]</sup>。整合素  $\beta_1$  是一种位于细胞膜表面的糖蛋白受体分子,其表达水平与表皮干细胞的增殖能力成正相关。表皮干细胞表面高表达整合素  $\beta_1$ ,而有丝分裂后细胞及终末分化细胞不表达整合素  $\beta_1$ 。角蛋白是表皮细胞的结构蛋白,在细胞内形成广泛的网状结构,能较精细的反应细胞的增殖分化状态,不同分化程度的表皮细胞表达不同的角蛋白。增殖活跃的表皮细胞强表达 CK19,而终末分化的表皮细胞不表达 CK19<sup>[10]</sup>。龙剑虹等<sup>[11]</sup>利用含有适宜浓度 EGF 的培养基对 BMSCs 进行诱导分化,通过检测 CK19 和整合素  $\beta_1$  双表达的细胞,证明 BMSCs 具有向表皮干细胞分化的能力。本实验发现大鼠 BMSCs 在改性聚乳酸-I 型胶原复合支架荷载的诱导下,大量双阳性表达 CK19 和整合素  $\beta_1$ ,说明改性聚乳酸-I 型胶原复合支架荷载的大鼠骨髓间充质干细胞仍具有

向表皮干细胞的分化的能力,证明该复合支架具备与大鼠 BMSCs 共同构建组织工程人工皮肤的初步条件。

### 参考文献

- [1] Lei Z, Yongda L, Jun M, et al. Culture and neural differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro* [J]. *Cell Biol Int* 2007, 31(9): 916-23.
- [2] Zannettino A C, Paton S, Kortessidis A, et al. Human multipotential mesenchymal/stromal stem cells are derived from a discrete sub-population of STRO-1 bright/CD34/CD45 (-) /glycophorin - Abone marrow cells [J]. *Haematologica*, 2007, 92(12): 1707-8.
- [3] Romanov Y A, Darevskaya A N, Merzlikina N V, et al. Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: isolation, characterization, and differentiation potentialities [J]. *Bull Exp Biol Med* 2005, 140(1): 138-43.
- [4] 倪玉霞, 李澎, 李贻奎, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞的分离、培养和鉴定 [J]. *广西医科大学学报* 2009, 26(1): 10-3.
- [5] Le Blanc K, Pittenger M. Mesenchymal stem cells: Progress toward promise [J]. *Cytotherapy* 2005, 7(1): 36-45.
- [6] Kassem M. Mesenchymal stem cells: Biological characteristics and potential clinical applications [J]. *Cloning Stem Cells* 2004, 6(4): 369-74.
- [7] 钟晓红, 王明刚, 赵李平, 等. 骨髓间充质干细胞在糖尿病创面中向皮肤腺上皮的分化 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(6): 1019-22.
- [8] 蔡华琼, 窦晓晨, 周健, 等. 磷酸化壳聚糖-羟基磷灰石纳米复合物的仿生合成及其细胞相容性的研究 [J]. *安徽医科大学学报* 2010, 45(1): 13-6.
- [9] Watt F M, Lo Celso C, Silva-Vargas V. Epidermal stem cells: an update [J]. *Curr Opin Genetics Development* 2006, 16(5): 518-24.
- [10] Michel M, Torok N, Godbout M J, et al. Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells *in vivo* and *in vitro*: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage [J]. *Cell Sci*, 1996, 109(5): 1017-21.
- [11] 龙剑虹, 刘芳芬, 祁敏, 等. 体外诱导骨髓间充质干细胞分化为表皮干细胞 [J]. *中南大学学报(医学版)* 2006, 31(6): 866-71.

## The differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells on scaffold

He Bin, Wang Minggang, Zhao Liping, et al

(Dept of Burns and Plastic Surgery, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

**Abstract Objective** To investigate the feasibility of Rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) differentiated into epidermal cells on modified poly L acid and type collagen I composites scaffold (PLA-I). **Methods**

# 柠檬醛诱导急性早幼粒细胞白血病细胞株 NB4 凋亡机制的研究

宋 琴, 夏海龙

**摘要** 目的 探讨柠檬醛诱导急性早幼粒细胞白血病细胞株 NB4 凋亡的机制。方法 不同浓度的柠檬醛处理 NB4 细胞 48 h 后, RT-PCR 法检测凋亡相关基因 Bcl-2 及 Bax 的 mRNA 表达变化, 流式细胞仪检测细胞 caspase-3 及核因子 kappaB (NF- $\kappa$ B) 表达的变化。结果 随着柠檬醛浓度增加, RT-PCR 结果显示受测细胞的 Bax mRNA 表达增强, Bcl-2 mRNA 表达减弱; 流式细胞仪检测结果显示受测细胞的 caspase-3 表达增加, NF- $\kappa$ B 表达下降。结论 降低 NF- $\kappa$ B、Bcl-2 表达及促进 Bax、caspase-3 表达可能是柠檬醛诱导 NB4 细胞株凋亡的机制之一。

**关键词** 急性早幼粒细胞白血病; 凋亡; 柠檬醛; NF- $\kappa$ B

**中图分类号** R 733.71, R 979.1

**文献标识码** A **文章编号** 1000-1492(2012)04-0404-04

柠檬醛是中草药山苍子挥发油(香精油)的主要成分, 广泛用于香料原料、食品添加剂和食品防腐。有研究<sup>[1-2]</sup>发现柠檬醛对细菌及真菌有较好的抑制作用, 尤其对黄曲霉有较好抑制作用, 此外国外有文献<sup>[3-5]</sup>报道柠檬醛对多种肿瘤细胞株具有抑制增殖并诱导凋亡作用, 提示柠檬醛具有良好的抗肿瘤前景。该课题组前期研究<sup>[6-7]</sup>表明柠檬醛可抑制急性早幼粒细胞白血病细胞株 NB4 增殖并诱导其凋亡。该研究旨在通过对细胞凋亡相关分子进行检测来探讨柠檬醛诱导 NB4 细胞凋亡的可能机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂 急性早幼粒细胞白血病细胞株

2011-10-27 接收

基金项目: 安徽省教育厅高校省级自然科学研究重点项目(编号: KJ2011A 172)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院血液内科, 合肥 230022

作者简介: 宋 琴, 女, 硕士研究生;

夏海龙, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: xhl1999cn@163.com

NB4 由瑞金医院上海血液学研究所陈赛娟院士惠赠; 柠檬醛购自 Sigma 公司, 纯度  $\geq 95.0\%$ ; RPMI 1640 培养基购自 Hyclon 公司; caspase-3、NF- $\kappa$ B 抗体购自美国 Santa Cruz 公司; TRIzol Reagent 试剂购自 Invitrogen 公司; 逆转录试剂盒、PCR 试剂盒购自 Fermentas 公司产品。引物由上海生工有限公司合成。

**1.2 细胞培养** 白血病细胞株 NB4 于 5% CO<sub>2</sub>、37℃、饱和湿度条件下, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液培养, 待处于对数生长期, 台盼蓝拒染法检测活力  $>95\%$ , 维持细胞浓度在  $(1 \sim 5) \times 10^5 / \text{ml}$  备用。

**1.3 RT-PCR 法检测 Bcl-2 及 Bax 的表达** 不同浓度柠檬醛(0、5、10、20 mg/L)作用 NB4 细胞 48 h, 同时设置乙醇对照组, 以 TRIzol 法提取各组细胞总 RNA, 取 1  $\mu\text{g}$  逆转录成 cDNA, 进行 RCR 反应。反应条件: 95℃ 5 s; 94℃ 30 s; 56℃ 40 s; 72℃ 50 s。35 个循环; 72℃ 5 min。以 GAPDH 作为内参。GAPDH 上游引物: 5'-CAAGTTCATCCATGACAACCTTTG-3', 下游引物: 5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3', 产物长度 496 bp; Bcl-2 上游引物: 5'-TGG-GAAGTTTCAAATCAGC-3', 下游引物: 5'-GCATTCT-TGGACGAGGG-3', 产物长度 298 bp; Bax 上游引物: 5'-GCAAACCTGGTCTCAAGG-3', 下游引物 5'-ACTCCCGCCACAAAGA-3', 产物长度 187 bp。然后各取 PCR 产物 5  $\mu\text{l}$ , 加 6  $\times$  Loading Buffer 1  $\mu\text{l}$ , 经 2% 琼脂糖凝胶(含 EB 0.5 mg/L 电泳, 电压为 90 V, 时间 40 min, 用紫外透射分析仪观察并拍照。通过 Tanon 凝胶图像分析系统分析各条带灰度值, 计算 Bcl-2、Bax 相对于 GAPDH 的相对表达量。实验重复 3 次。

### 1.4 流式细胞仪检测 caspase-3 及 NF- $\kappa$ B 的表达

Differentiation of rat BMSCs on PLA-I into epidermal stem cells *in vitro* by EGF induced cell culture solution. Two-sigend of immunohistochemistry identified CK19 and intergrin  $\beta_1$  markers epidermal stem cells. **Results** After two weeks of EGF induced cell culture solution, expression of CK19 and intergrin  $\beta_1$  was highly at rat BMSCs on PLA-I. **Conclusion** Rat BMSCs still have the potential to differentiate into epidermal cells on PLA-I, which can be used as a vehicle for tissue engineering skin.

**Key words** modified poly-L-acid; type collagen I; stem cells