

# 骨髓间充质干细胞向肌成纤维细胞转化及一贯煎的影响

闫晓风, 叶目亭杰, 刘会洋, 王晓玲\*

(上海中医药大学基础医学院生物教研室, 上海 201203)

**[摘要]** 目的: 观察体外诱导骨髓间充质干细胞向肌成纤维细胞分化及一贯煎的影响。方法: 骨髓间充质干细胞分离、培养和鉴定, 取第 3 代细胞加入转化生长因子( $TGF-\beta_1$   $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 诱导定向分化。骨髓间充质干细胞随机分为正常组、 $TGF-\beta_1$  诱导组,  $TGF-\beta_1$  诱导加一贯煎组, 2 周后通过免疫荧光、实时定量 PCR 法检测骨髓间充质干细胞分化情况及一贯煎的影响。结果: 骨髓间充质干细胞鉴定结果显示 CD44 强阳性表达, CD29 弱阳性表达。 $TGF-\beta_1$  诱导后, 免疫荧光及实时定量 PCR 均显示  $TGF-\beta_1$  诱导组细胞  $\alpha$ -SMA 阳性表达, 一贯煎组细胞  $\alpha$ -SMA 表达显著降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论: 经体外诱导骨髓间充质干细胞可以向肌成纤维细胞分化, 一贯煎可阻止骨髓间充质干细胞向肌成纤维细胞分化。

**[关键词]** 骨髓间充质干细胞; 转化生长因子- $\beta_1$ ; 肌成纤维细胞; 一贯煎

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)22-0123-04

## Differentiation of Mesenchymal Stem Cells into Myofibroblasts and the Impact of Yiguanjian

YAN Xiao-feng, YE Ting-jie, LIU Hui-yang, WANG Xiao-ling\*

(Department of Biology, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into myofibroblast *in vitro* and the impact of Yiguanjian. **Method:** Bone marrow mesenchymal stem cells were separated, cultured and identified, transforming growth factor  $\beta_1$  ( $TGF-\beta_1$   $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) was added to the third-generation cells to induce differentiation. Bone marrow mesenchymal stem cells were divided into normal group,  $TGF-\beta_1$  induced group,  $TGF-\beta_1$  induced plus Yiguanjian group. 2 weeks later, bone marrow mesenchymal stem cells were harvested and detected using immunofluorescence and real-time quantitative PCR. **Result:** The result of bone marrow mesenchymal stem cells' identification showed the strong expression of CD44 and the weak expression of CD29. After  $TGF-\beta_1$  induced, the results of immunofluorescence and real-time quantitative PCR showed that the group of  $TGF-\beta_1$  induced the expression of smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), the expression of  $\alpha$ -SMA in the group of  $TGF-\beta_1$  induced plus Yiguanjian was significantly reduced, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Bone marrow mesenchymal stem cells can differentiate into myofibroblasts using  $TGF-\beta_1$  induction, Yiguanjian can prevent the bone marrow mesenchymal stem cells' differentiation to myofibroblast.

**[Key words]** bone marrow mesenchymal stem cells; transforming growth factor  $\beta_1$ ; myofibroblasts; Yiguanjian

间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 是一种中胚层来源的具有多向分化能力的干细胞,

**[收稿日期]** 20110531(013)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(30772758);“重大新药创制”科技重大专项项目(2009zx09311-003);上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金项目(szy08013)

**[第一作者]** 闫晓风, 医学硕士, 讲师, 从事中西医结合基础教学与研究, Tel:021-51322585, E-mail: dgfenger@126.com

**[通讯作者]** \* 王晓玲, 博士, 教授, 从事肝纤维化的分子细胞生物学研究, Tel:021-51322585, E-mail: wxlzxz@sohu.com

它分布于全身各结缔组织,尤以骨髓中含量最多,可以向多种中胚层和神经外胚层来源的组织分化,如骨、软骨、脂肪、纤维组织和骨髓支持基质等多种间质组织。近年来,骨髓间充质干细胞(bone-marrow mesenchymal stem cells, bMSCs)的研究引入到肝纤维化机制的研究中。目前主要存在 2 种不同的观点,一种观点认为,骨髓干细胞可以向肝细胞转化,减轻肝纤维化对肝脏的损伤。另一种观点则认为:肝纤维化的组织重构中存在肌成纤维细胞的肝外来源,骨髓在肝纤维化进程中起着促进作用。本实验通过体外培养及细胞因子刺激探讨骨髓间充质干细胞向肌成纤维细胞转化及古方一贯煎对这一进程的影响。

## 1 材料

**1.1 动物** ICR 小鼠,雄性,4~6 周,体重 20 g 左右,购自中国科学院上海实验动物中心。许可证号 SCXK(沪)2007-0005。

**1.2 药物** 一贯煎(每剂组成:北沙参 10 g,当归 10 g,麦门冬 10 g,生地黄 18 g,枸杞 12 g,川楝子 4.5 g)制成粗粉末,水煎,浓缩液水浴干燥成流浸膏,真空干燥后冷藏保存。用时 DMEM 配制成  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $0.22 \mu\text{m}$  滤器过滤。

**1.3 试剂** MSCs 的培养基为低糖 DMEM 培养基(Gibco 公司),添加含 20% 胎牛血清(Gibco 公司)、消化液为 0.25% 胰蛋白酶(上海钰森生物有限公司);细胞免疫荧光染色所用抗体为大鼠抗小鼠 CD44、美国仓鼠抗小鼠 CD29 单克隆抗体(SAN-TA CRUZ BIOTECHNOLOGY INC),重组人转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )(Peprotech 公司),小鼠平滑肌肌动蛋白(smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)单克隆抗体(Sigma 公司),Alexa Flour 633 goat anti-mouse 红色荧光二抗(Invitrogen 公司);染核用 DAPI 染液(碧云天生物技术研究所)。逆转录试剂盒(Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit), Ferments Life Sciences(购于友谊中联生物有限公司);荧光定量 PCR 检测试剂盒, SYBR Green Ex Taq™ (perfect Real Time), TaKaRa BiotechnoBiotechnology (Dalian) Co. Ltd, (购自上海皓嘉科技发展有限公司)。

**1.4 仪器** 超净工作台,奥林巴斯荧光显微成像系统。定量 PCR 仪, Rotor-Gene RG-3000, Corbett Research, 基因公司产品;PCR 分析软件, Rotor-Gene Analysis Software V6.0 (built 14); 逆转录仪, My

Cycler™ thermal cycler, BioRad; 酶标仪: Molecular Devices, Spectra Max M5。

## 2 方法

**2.1 bMSCs 的分离培养** 4~6 周龄 ICR 雄性小鼠,断颈处死,75% 乙醇浸泡 5 min,严格无菌条件下取出股骨及胫骨,无菌 PBS 冲洗 2-3 次,分别剪去股骨及胫骨的骨骺端,用装有 DMEM 培养基的注射器冲洗骨髓腔,200 目滤膜过滤,  $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 离心 5 min,弃上清,以完全培养基(含 20% 胎牛血清)重悬细胞,接种于培养瓶中,采用直接贴壁法,在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养,48 h 后更换培养液,弃掉未贴壁的细胞,以后每 2~3 d 换液 1 次。贴壁细胞接近 90% 汇合时进行 1:2 消化传代,取第 3 代 bMSCs 鉴定,待诱导。

**2.2 bMSCs 鉴定免疫细胞化学染色** 将第 3 代 bMSCs 接种于 96 孔板中,生长 3 d 后,DPBS 冲洗 5 min  $\times$  2 次,4% 多聚甲醛固定 10 min,DPBS 冲洗 5 min  $\times$  3 次,抗体封闭液  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  封闭 20 min,加 CD44 (1:200)、CD29 (1:50) 单克隆抗体,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  过夜;DPBS 冲洗 5 min  $\times$  3 次,以 DPBS 代替抗体作空白对照,镜下观察,拍照。

**2.3 细胞生长曲线测定** 取传代生长良好的第 3 代 bMSCs  $1 \times 10^5/\text{mL}$  接种 96 孔板,每孔 200  $\mu\text{L}$ ,分 8 组,每组 9 孔。培养 8 d,其间逐日计数一组细胞,取均值,将 8 d 的数据绘制成图,即为细胞生长曲线。

**2.4 TGF- $\beta_1$  诱导 bMSCs 向肌成纤维细胞转化** 将第 3 代 bMSCs 随机分为正常组、TGF- $\beta_1$  诱导组、TGF- $\beta_1$  诱导加一贯煎组,消化后第 2 天诱导组加 TGF- $\beta_1$ ,药物组加一贯煎,TGF- $\beta_1$  诱导剂量为  $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,一贯煎药物质量浓度为  $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,诱导 2 周后,收集细胞,待检测。

**2.5 免疫荧光检测鉴定诱导后的 bMSCs** 诱导 2 周后,DPBS 冲洗 5 min  $\times$  2 次,4% 多聚甲醛固定 10 min,DPBS 冲洗 5 min  $\times$  3 次,抗体封闭液  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  封闭 20 min,封闭结束后,进行抗原抗体反应,加  $\alpha$ -SMA (1:200)  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育过夜,DPBS 冲洗 5 min  $\times$  3 次,滴加 Alexa Flour633 (1:200)  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育 1 h,DPBS 冲洗 5 min  $\times$  3 次,加入 DAPI 染色液 ( $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 室温孵育 20 min,镜下观察,拍照。

**2.6 荧光定量 PCR 检测鉴定诱导后的 bMSCs** Trizol 试剂提取 bMSCs 的总 RNA,引物序列: $\alpha$ -SMA

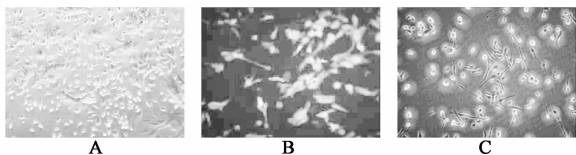
(85 bp): 上游: 5'-CGA GAG GAC GTT GTT AGC ATA GAG-3' 下游: 5'-GGG CAT CCA CGA AAC CA-3' 18 s(151 bp); 上游: 5'-GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT-3', 下游: 5'-CCA TCC AAT CGG TAG TAGCG-3'。PCR 反应条件: 95 ℃ 预变性 10 s; 95 ℃ 变性 5 s, 退火延伸并作一步, 温度 58 ℃, 20 s, 共 40 个循环。

**2.7 统计学方法** 采用 SPSS 11.0 统计软件进行统计学处理, 所有实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 小鼠骨髓间充质干细胞的形态观察及鉴定

光镜下, 接种培养 2 d 培养液中的悬浮细胞已完全除去, 换液去除未贴壁细胞, 只留下贴壁细胞, 细胞增殖迅速, 新生细胞呈圆形, 折光性很强。大约 7 d 后形成细胞集落, 无接触抑制, 大部分呈梭形、纺锤形等不规则型, 层次不清, 原代细胞培养 7 d 左右, 细胞快速增殖, 培养 11 d 左右, 细胞出现重叠、融合时进行传代。经胰酶消化后的 bMSCs 呈圆形, 胞体较大, 传代 24 h 内完全贴壁伸展, 呈成纤维细胞样形态, 传代后的 bMSCs 增殖能力不断增加。第 3 代骨髓间充质干细胞 CD44, CD29 免疫荧光染色结果显示, CD44 强阳性表达, CD29 弱阳性表达(图 1)。



A. 第 3 代 bMSCs; B. CD44 免疫荧光染色; C. CD29 免疫荧光染色

图 1 第 3 代骨髓间充质干细胞形态及鉴定 ( $\times 200$ )

**3.2 bMSCs 生长曲线** 由生长曲线可见第 3 代 bMSCs 在前 3 d 生长比较缓慢, 约第 4 天进入对数生长期, 5 d 后细胞生长速度减缓, 进入平台期。(图 2)。

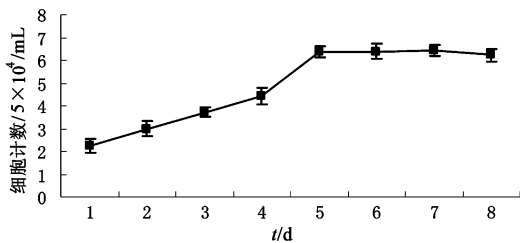


图 2 第 3 代 bMSC 细胞增殖曲线

**3.3  $\alpha$ -SMA 免疫荧光检测**  $\alpha$ -SMA 检测结果显示, 第 3 代培养 2 周后, 对照组细胞未见  $\alpha$ -SMA 表

达, 诱导组细胞  $\alpha$ -SMA 阳性, 细胞呈不规则形状, 部分形态较小, 较圆, 细胞核较大, 部分形态较大, 呈不规则梭形, 细胞形态较大, 细胞质部分伸展开来, 还有部分形态较小, 呈马蹄样。TGF- $\beta_1$  诱导加一贯煎组  $\alpha$ -SMA 表达显著减少。

**3.4  $\alpha$ -SMA 荧光定量 PCR 检测** TGF- $\beta_1$  诱导组  $\alpha$ -SMA mRNA 表达量  $1.55 \pm 0.11$  显著高于正常组  $1.00 \pm 0.11$  ( $P < 0.01$ ), 与 TGF- $\beta_1$  诱导组表达量相比, TGF- $\beta_1$  诱导加一贯煎组  $\alpha$ -SMA mRNA 表达量  $1.28 \pm 0.08$  明显降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

### 4 讨论

1867 年, 德国病理学家 Cohnheim 首次提出, 骨髓中除造血干细胞以外还存在另一类细胞——间充质干细胞, 这类细胞是一种中胚层来源的具有多向分化能力的干细胞, 可以向多种中胚层和神经外胚层来源的组织分化。20 世纪 70 年代中期, Fridenstein<sup>[1]</sup> 建立了骨髓间充质干细胞的贴壁分离法。这种分离方法具有操作简便、快速、对细胞活性影响小等特点。

目前, MSC 的分离方法主要有 4 种: 贴壁法、密度梯度离心法、流式细胞仪分离法、免疫磁珠法。流式细胞仪分离法和免疫磁珠法虽可得到纯度较高的细胞, 但分离过程对细胞的活性影响较大, 甚至使细胞的活性完全丧失<sup>[2]</sup>。percoll 或 Ficoll 密度梯度离心法分离 MSC, 虽能有效地将红细胞、白细胞和骨髓间充质干细胞分离开来, 但细胞得率不高, 接种细胞密度偏小, 不利于细胞的生长<sup>[3]</sup>。本实验采用贴壁细胞分离法对骨髓间充质干细胞进行分离, 每次换液除去悬浮生长的造血系细胞。原代骨髓细胞还混杂有巨噬细胞、淋巴细胞、内皮细胞、成纤维细胞等, 而干细胞生长过程中细胞本身与其培养的微环境有比较重要的相互影响作用, 因此直接贴壁培养法有利于维持干细胞生存环境的稳定<sup>[4]</sup>, 有助于骨髓间充质干细胞的存活和功能维持。

在诱导前如何鉴定骨髓间充质干细胞目前尚没有统一的国际标准, 但通常认为骨髓间充质干细胞的表面表达了多种特异性抗原以及多种细胞因子和生长因子的受体等如 SH-2, SH-3, CD29, CD54, CD44, CD71, CD90, CD106, CD120a, Stro-1 等, 其中 CD71 被认为是成熟间充质干细胞的标志, CD29 和 CD44 被认为是 MSCs 重要表面标志物<sup>[5]</sup>。我们的

实验采用免疫荧光法鉴定小鼠骨髓间充质干细胞,结果显示骨髓间充质干细胞 CD29,CD44 阳性表达,与文献报道基本一致。在形态学方面,体外培养的 MSCs 细胞体积小,核质比较大,形态与骨髓中的成纤维细胞较相近。

多向分化潜能被认为是骨髓间充质干细胞的最重要的生物学特征,以往的研究<sup>[6-8]</sup>发现骨髓间充质干细胞体外培养可分化成皮肤、脂肪、成骨、心肌、神经等多种组织。对骨髓间充质干细胞横向分化的研究多是通过不同方案对其进行体外诱导,常用的诱导方法是向培养体系中加入诱导因子。细胞哺乳动物转化生长因子 TGF- $\beta$  有 3 种异构体, TGF- $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ , 信号转导通过同一受体发挥作用并引起相似的生物学反应,它们具有调节细胞增殖、生长、分化和运动,以及细胞外基质的合成和沉积的功能。其中, TGF- $\beta_1$  含量最丰富,几乎每种细胞都分泌,能够诱导细胞向成纤维细胞表型转化。我们的实验选择用 TGF- $\beta_1$  对骨髓间充质干细胞进行诱导,2 周后,诱导后的细胞  $\alpha$ -SMA 阳性表达率显著增高,表明经 TGF- $\beta_1$  诱导后,骨髓间充质干细胞具备了肌成纤维细胞特征。证明在一定条件下,骨髓间充质干细胞可向肌成纤维细胞转化。ZhaodiGong<sup>[9]</sup>等在研究人骨髓间充质干细胞向血管平滑肌细胞样细胞分化时发现,骨髓间充质干细胞是否向血管平滑肌样细胞分化,是否表达  $\alpha$ -SMA 主要与 TGF- $\beta_1$  存在有关。

本课题组前期体内实验研究发现,骨髓移植小鼠四氯化碳造模后,骨髓细胞可向肌成纤维细胞和库普弗细胞转化,结合我们的体外实验结果,可以推测微环境的改变可促进骨髓间充质干细胞向肌成纤维细胞转化,其中 TGF- $\beta_1$  的存在是一个重要促进因子,而大量研究表明,肝纤维化发展过程中,确实存在 TGF- $\beta_1$  表达量的增高。

古典方剂一贯煎(北沙参、麦冬、当归、生地黄、枸杞、川楝子的配伍比例为 1:1:1:1.8:1.2:0.45)是临床治疗慢性肝病肝阴不足证的常用方剂<sup>[10-11]</sup>。现代研究报道可显著降低四氯化碳大鼠肝纤维化肝组织羟脯氨酸含量,减少肝组织  $\alpha$ -SMA 的表达,显示了良好的抗肝纤维化作用<sup>[12]</sup>。本实验结果显示一贯煎可在一定程度上抑制骨髓间充质干细胞向肌成纤维细胞分化,提示一贯煎抗肝纤维化的作用机

制可能与抑制骨髓来源的细胞向肌成纤维细胞转化有关。

### [参考文献]

- [1] Friedenstein A J, Gorskaja J F, Kulagina N N. Fibroblast pre cursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs[J]. Exp Hematol, 1976,4:267.
- [2] Deryugina E I, Muller-sieburg C E. Stromal cells in long-term cultures: keys to the elucidation of hematopoietic development[J]. Crit Rev Immunol, 1993, 13(2):115.
- [3] 宫晓洁,孙莉,黎靖宇,等. 小鼠骨髓间充质干细胞的分离培养及形态学观察[J]. 解剖学研究, 2008,30(1):54.
- [4] 焦嫦亮,张阳德,谢祁阳,等. 小鼠骨髓间充质干细胞的分离及其诱导定向脂肪细胞分化[J]. 中国康复理论与实践, 2006, 12(8):682.
- [5] Minguell J J, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells[J]. Exp Biol Med, 2001,226(6):507.
- [6] Rodriguez J P, Astudillo P, Pino A M. Involvement of adipogenic potential of human bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in osteoporosis[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2008,3(3):208.
- [7] Slater B J, Kwan M D, Gupta D M, et al. Mesenchymal cells for skeletal tissue engineering[J]. Expert Opin Biol Ther, 2008,8(7):885.
- [8] Yagi K, Kojima M, Oyagi S, et al. Application of mesenchymal stem cells to liver regenerative medicine[J]. Yakugaku Zasshi, 2008,128(11):3.
- [9] Zhaodi Gong, Geoffrey Calkins, Ee-chun Cheng, et al. Influence of culture medium on smooth muscle cell differentiation from human bone marrow derived mesenchymal stem cells[J]. Tissue Engineering, 2009, 15(2):319.
- [10] 闫祝辰. 一贯煎和易善复合用治疗化疗药物性肝损伤的临床研究[J]. 实用肝脏杂志, 2006,9(5):306.
- [11] 魏运红. 一贯煎化痰治疗血吸虫肝硬化腹水 55 例[J]. 中国中医药杂志, 2006,4(4):106.
- [12] 慕永平,刘平,都广礼,等. 祛瘀和养阴不同功效中医经典方剂抑制 CCL4 诱导大鼠肝硬化的作用机制[J]. 自然科学进展, 2006,16(9):1101.

[责任编辑 聂淑琴]