

# 人骨髓间充质干细胞向光感受器样细胞诱导分化的研究

徐国兴,侯泽江,徐巍,郭健,谢茂松,白月

基金项目:中国国家自然科学基金重点资助项目(No. 60827002);  
中国福建省重点科学研究基金资助项目(No. 2008Y0040)  
作者单位:(350005)中国福建省福州市,福建医科大学附属第一医院眼科中心 福建省眼科研究所  
作者简介:徐国兴,教授,博士研究生导师,研究方向:玻璃体视网膜病。

通讯作者:徐国兴. zjfmuxgx@pub5.fz.fj.cn

收稿日期:2010-12-09 修回日期:2010-12-14

## Induction of human bone marrow mesenchymal stem cells differentiation into retinal photoreceptor cells *in vitro*

Guo-Xing Xu, Ze-Jiang Hou, Wei Xu, Jian Guo, Mao-Song Xie, Yue Bai

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (No. 60827002); Key Science Foundation of Fujian Province, China (No. 2008Y0040)

Ophthalmic Institute of Fujian Province, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China

**Correspondence to:** Guo-Xing Xu. Ophthalmic Institute of Fujian Province, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China. zjfmuxgx@pub5.fz.fj.cn

Received:2010-12-09 Accepted:2010-12-14

### Abstract

• **AIM:** To explore the microenvironment in which human bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) differentiated into photoreceptor cells under nutrilitis induction medium *in vitro*.

• **METHODS:** High-purity BMSCs could be obtained using lymphocyte separation medium by density gradient centrifugation. In the first stage the third passage cells were induced to neural precursor cells with medium including FGF, EGF and BDNF. The expression of the Nestin and MAP-2 were detected by immunocytochemistry. PEDF and taurine instead of FGF, EGF and BDNF in medium cultured the induced BMSCs furthermore 2 or 3 weeks when the positive expression rate of Nestin reached the highest level. Rhodopsin was researched during this second stage by immunocytochemistry and RT-PCR.

• **RESULTS:** Nestin could be detected from the third day after inducing differentiation, and reached its peak on the 12<sup>th</sup> day (90.9 ± 2.6)%. MAP-2 also could be detected since the sixth day after inducing. Rhodopsin was detected during the farther inducing, and the positive rate was (20.7 ± 3.8)% and (89.8 ± 3.7)% in the second and third week respectively.

• **CONCLUSION:** BMSCs can differentiate into photoreceptor cells which express Rhodopsin under the condition by stages induction with FGF, EGF, BDNF, PEDF and taurine.

• **KEYWORDS:** bone marrow mesenchymal stem cells; differentiation; photoreceptor cells

Xu GX, Hou ZJ, Xu W, *et al.* Induction of human bone marrow mesenchymal stem cells differentiation into retinal photoreceptor cells *in vitro*. *Gujy Yanke Zazhi( Int J Ophthalmol)* 2011;11(1):14-18

### 摘要

目的:探索骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)定向分化成光感受器样细胞所需的微环境。

方法:采用淋巴细胞分离液梯度离心法分离纯化人 BMSCs, 培养第3代的细胞以碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、表皮生长因子(EGF)及脑源性神经营养因子(BDNF)3种因子首先进行向神经前体细胞诱导分化,应用免疫细胞化学检测巢蛋白及微管相关蛋白-2,当巢蛋白阳性表达率达到最高时更换诱导因子,加入色素上皮衍生因子(PEDF)及牛磺酸(taurine)继续诱导2~3wk,用免疫细胞化学及RT-PCR法检测视紫红质的表达情况。

结果:诱导第3d开始能检测到巢蛋白表达,第12d阳性表达率达到最高,达(90.9 ± 2.6)%。微管相关蛋白-2在诱导后第6d检测到阳性表达。部分细胞形态呈神经元细胞样。第12d诱导因子更换为PEDF及taurine继续诱导2~3wk,检测到有视紫红质表达,第2wk阳性率为(20.7 ± 3.8)%,第3wk阳性率为(89.8 ± 3.7)%。

结论:采用分阶段诱导法,应用因子bFGF, EGF, BDNF及PEDF, taurine能在体外诱导BMSCs表达光感受器细胞标志物视紫红质。

关键词:骨髓间充质干细胞;分化;光感受器细胞

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2011.01.006

http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1419.R.20101216.1834.000.html

徐国兴,侯泽江,徐巍,等.人骨髓间充质干细胞向光感受器样细胞诱导分化的研究.国际眼科杂志2011;11(1):14-18

### 0 引言

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是来源于中胚层的多能成体干细胞,大量的实验证实,体外不同的微环境对BMSCs具有不同的诱导分化效果。BMSCs不仅能向中胚层的细胞分化,而且能跨胚层分化,如向内胚层的肝细胞样细胞以及外胚层的神经干细胞样细胞等分化<sup>[1]</sup>。视网膜变性和营养不良是导致遗传性盲的主要原因,以视网膜光感受器细胞层凋亡为特征,至今仍无有效的治疗方法来阻止或逆转这类疾病的退行性改变。在发生视网膜光感受器变性的动物进行视网

膜移植后,可记录到视觉诱发反应,提示尽管光感受器细胞部分或全部丢失,但内核层及联系视网膜与脑的轴突部位的功能可能仍然存在<sup>[2]</sup>。因此,光感受器替代治疗作为一种以细胞为基础的治疗形式可能恢复一定的视力。所以寻找非视网膜来源的、可替代视网膜光感受器细胞功能的细胞作为理想移植供体是目前需要攻克的难题。本研究探讨人骨髓间充质干细胞定向分化成视网膜光感受器样细胞所需的微环境,现将研究结果报告如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** DMEM-LG 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清(Hyclone, USA); bFGF, EGF, BDNF, PEDF (Peprotech, USA); 牛磺酸(taurine, Sigma, USA); 淋巴细胞分离液(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司); 免疫细胞化学试剂: 鼠抗人巢蛋白单克隆抗体、鼠抗人微管相关蛋白(MAP) 2a. b. c 单克隆抗体、鼠抗人视紫红质单克隆抗体(NeoMarkers, USA); 流式细胞术试剂: 鼠抗人单抗 CD34-FITC + 鼠抗人 CD90-PE、鼠抗人单抗 CD34-FITC + 鼠抗人 CD44-PE (Beckman-Coulter, USA); RT-PCR 试剂盒 (Fermentas, America)。

## 1.2 方法

**1.2.1 骨髓的采集和分离及培养** 骨髓取自健康成年捐赠者,实验符合国务院 2005 年《医疗机构管理条例》第 33 条原则<sup>[3]</sup>。抽取骨髓约 5mL,将骨髓用 PBS 等量稀释后以 1000r/min 离心 5min,吸去上清液,洗涤 2 次,将下层血浆用等量 DMEM-LG 培养基重悬后缓慢贴壁加于装有等量淋巴细胞分离液(相对密度为 1.077kg/L)的离心管液面上,以 2500r/min 离心 25min 后,轻轻吸取白色雾状单核细胞层,置于离心管中再次用 PBS 洗涤 2 遍,用含 100mL/L FBS 的 DMEM-LG 培养基吹打分散后调整细胞密度为  $1 \times 10^9$ /L 接种于 25cm<sup>2</sup> 塑料培养瓶中,置于 37℃ 50mL/L CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。72h 后予以首次换液,以后每 3d 换液 1 次,待贴壁细胞密度达到 70% ~ 80% 时使用胰蛋白酶消化,离心后进行传代培养。

**1.2.2 人骨髓间充质干细胞的形态学观察与细胞表面抗原的流式细胞仪检测** 倒置相差显微镜下观察原代及传代细胞形态学变化及增殖情况,并拍照记录。第 3 代人 BMSCs 90% 融合时用胰蛋白酶消化,离心,弃去上清液,用 PBS 制成  $2 \times 10^9$ /L 的细胞悬液,分装至 4 个样品管中,分别加入荧光标记的鼠抗人单抗 CD34-FITC + 鼠抗人 CD90-PE,鼠抗人单抗 CD34-FITC + 鼠抗人 CD44-PE 及其对应的同型对照各 10μL,混匀,37℃ 避光反应 20min,加入 PBS 离心洗涤,弃去上清液,每管加入 1mL PBS 重悬细胞,用流式细胞仪检测 BMSCs 表面抗原 CD34(造血干细胞表面抗原)、CD44(基质细胞表面抗原)及 CD90(干细胞表面抗原)。

**1.2.3 人骨髓间充质干细胞的诱导分化** 实验分两组:诱导组和对照组。诱导组分两阶段诱导:首先向神经前体细胞诱导分化,再进一步向视网膜光感受器细胞专向诱导分化。取第 3 代人 BMSCs 按  $5 \times 10^7$ /L 密度接种 6 孔板中,每个 6 孔板中预先放盖玻片进行爬片,24h 后将培养基更换为含 20μg/L bFGF, 20μg/L EGF 及 20μg/L BDNF 进行第一阶段诱导,在因子诱导的 2 ~ 14d 进行巢蛋白及 MAP 的检测,检测到巢蛋白表达率最高时更换诱导因子为

10μg/L PEDF 及 50μmol/L taurine 继续进行第二阶段诱导并观察细胞形态变化,继续诱导 2 ~ 3wk 后进行免疫细胞化学(ICC)检测视紫红质表达情况。对照组采用含 100mL/L FBS 的 DMEM-LG 培养基培养,不加任何因子。

**1.2.4 诱导分化的人骨髓间充质干细胞的免疫细胞化学检测** 第一阶段诱导的第 2 ~ 14d 收集细胞爬片进行巢蛋白及微管相关蛋白的免疫细胞化学检测:PBS 洗涤 1min × 3 次,40g/L 多聚甲醛固定 15min, PBS 洗涤 2min × 3 次,5mL/L Triton X-100 溶液孵育 15min, PBS 洗涤 2min × 3 次,30mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 孵育 10min, 50mL/L 正常羊血清封闭 20min, 分别加入鼠抗人巢蛋白单克隆抗体(稀释度为 1:100)及鼠抗人 MAP-2a. b. c 单克隆抗体(稀释度为 1:150), 4℃ 过夜, PBS 洗涤 5min × 3 次后,使用羊抗鼠二抗(美国 GBI 公司二步法免疫组化检测试剂),滴加试剂 1, 37℃ 孵育 20min, PBS 洗涤后滴加试剂 2, 37℃ 孵育 30min, PBS 洗涤后使用 DAB 显色 3min, 蒸馏水洗涤后苏木素复染 30s, 自来水洗涤后干燥,树脂封片,每一指标随机选择 5 个视野计数阳性个数,拍照。第二阶段诱导 2wk 和 3wk 后 ICC 检测视紫红质表达情况,步骤同上,鼠抗人视紫红质单克隆抗体使用稀释度为 1:50。

**1.2.5 向光感受器细胞方向诱导后视紫红质表达的 RT-PCR 检测** 第二阶段诱导 3wk 后,收集细胞,Trizol 裂解细胞提总 RNA,取 1μL RNA 在逆转录酶作用下合成 cDNA,然后以此 cDNA 为模板,以视紫红质序列(5'-CG AGCGGTACGTGGTGGTGT-3'; 5'-GGAGCCCCTGGTGGGTGA AGA-3',产物长度 445 bp)扩增。产物经 10g/L 琼脂糖电泳,凝胶成像系统拍照。

## 2 结果

**2.1 人骨髓间充质干细胞形态学特征观察和鉴定** 原代细胞培养 48h 有部分细胞贴壁,少数形态呈杆状,4 ~ 6d 细胞呈杆状或梭形,形成多个不同大小的细胞集落,7 ~ 10d 呈放射状向外扩展,细胞呈梭形,并逐渐融合成漩涡状单层细胞。传代后细胞分布均匀,形态一致,长梭形,呈纤维细胞样形态(图 1)。第 3 代人 BMSCs 表面抗原检测显示 CD90 表达阳性率 CD90<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup>:96.3%, CD44 表达阳性率 CD44<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup>:94.2%,表明所获得的细胞绝大部分为 BMSCs(图 2)。

**2.2 诱导分化的人骨髓间充质干细胞形态学观察** 诱导 4d 部分 BMSCs 开始形成细胞突起,随着诱导时间的延长,部分细胞呈神经元细胞样形态(图 3)。

## 2.3 诱导后细胞的免疫细胞化学鉴定

**2.3.1 第一阶段向神经前体细胞方向诱导** 诱导 2d 时检测巢蛋白未见表达,4d 时巢蛋白阳性率为(12.6 ± 2.8)%, 8d 时巢蛋白阳性率为(26.6 ± 4.6)%, 12d 时巢蛋白阳性率(90.9 ± 2.6)%,之后检测巢蛋白阳性率减低,14d 时巢蛋白阳性率为(72.2 ± 3.1)%(图 4);诱导 6d 时 MAP-2 有阳性表达,诱导 8d 时阳性率为(36.4 ± 3.3)%,诱导 16d 时为(90.7 ± 4.6)%(图 5)。

**2.3.2 第二阶段向光感受器细胞方向诱导** 诱导 2wk 后视紫红质表达的阳性率为(20.7 ± 3.8)%,诱导 3wk 后视紫红质表达的阳性率为(89.8 ± 3.7)%(图 6)。

**2.4 第二阶段向光感受器细胞方向诱导后视紫红质表达的 RT-PCR 检测** 诱导组有视紫红质表达,对照组无视紫红质表达(图 7)。

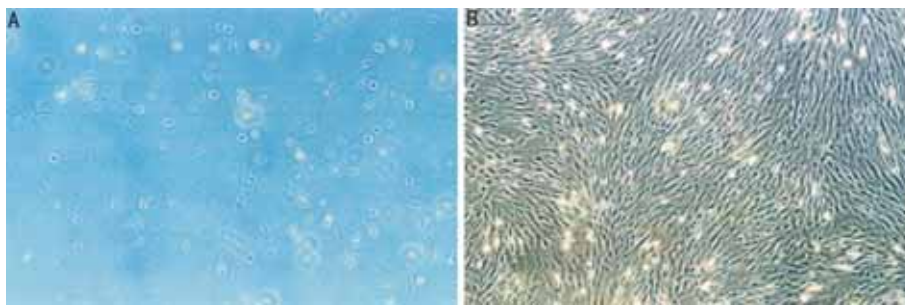


图1 原代培养 BMSCs(×400) A:第3d;B:第10d。

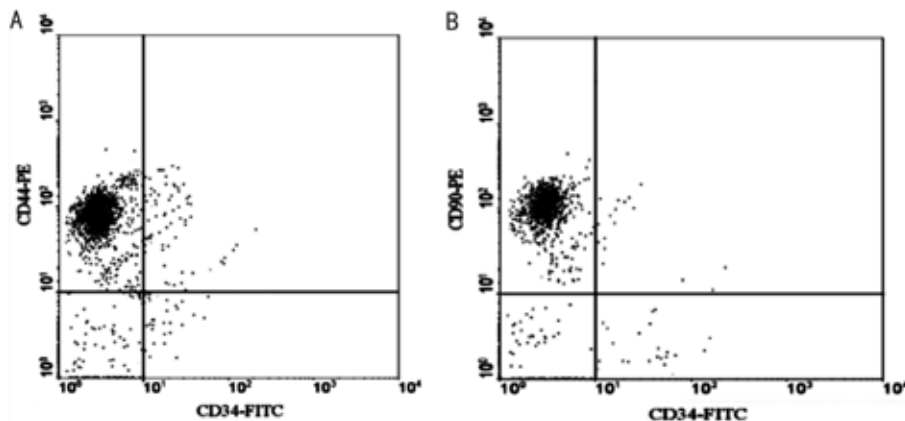


图2 流式细胞术检测 BMSCs 表面抗原及纯度 A: CD44 表达阳性率;B: CD90 表达阳性率。

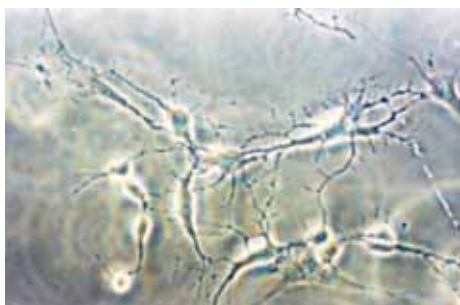


图3 诱导后部分 BMSCs 典型形态变化(×100)。

### 3 讨论

**3.1 骨髓间充质干细胞的体外诱导分化** BMSCs 是来自中胚层的具有多向分化潜能的成体干细胞,是组织工程学细胞移植技术中理想的种子来源。对于 BMSCs 向视网膜细胞方向分化目前还处于研究的初步阶段,体外诱导分化的条件仍不明确。Kicie, Tomita 和 Chiou 等对 BMSCs 进行诱导分化实验,可诱导 BMSCs 表达光感受器细胞标志物<sup>[4-6]</sup>。而 Arnhold 等<sup>[7]</sup>诱导 BMSCs 向视网膜色素上皮(RPE)细胞分化并检测到 RPE 细胞标志物细胞角蛋白表达,这些研究结果显示 BMSCs 有向视网膜细胞方向分化的可能。干细胞在体内分化与微环境密切相关,不同的发育阶段干细胞所处的微环境不同将会影响干细胞发生不同的分化,干细胞进入新的微环境后,对新的微环境的调节信号做出反应,分化成与新的生长环境相适应的细胞。因此,本实验根据目前的研究进展选择密切相关的几种因子,采取分阶段诱导的方法在体外模拟体内微环境,用不同的因子对 BMSCs 进行向视网膜光感受器细胞方向诱导分化,第一阶段向神经前体细胞方向诱导分化,第二阶段向视网膜光感受器细胞诱导分化,探索定向诱导分化的微环境。

**3.2 诱导因子的功能** 第一阶段使用生长因子和神经营养因子主要作用是促进神经元的存活和分化,调节轴突和树突的生长。有实验证实<sup>[8]</sup>,骨髓基质细胞表面存在 PDGF, FGF 和 EGF 受体等。bFGF 具有促有丝分裂功能,在神经元发生、分化和功能方面起着重要作用<sup>[9]</sup>,在体外 bFGF 能提高视网膜表达视蛋白的水平<sup>[10]</sup>,体内能挽救视网膜色素上皮变性鼠的光感受器细胞存活<sup>[11]</sup>及神经视网膜保护作用<sup>[12]</sup>。BDNF 能延缓神经元的变性和自然死亡,对神经元的存活和生长具有重要作用,有很强的刺激和促进神经细胞生长、分化的功能<sup>[13]</sup>;不仅能保护神经元的功能,而且能促进光损伤的视网膜修复<sup>[14]</sup>;BDNF 能明显促进光感受器细胞生存<sup>[15]</sup>;在发育中的 RPE 细胞中有 BDNF 表达。大量实验证实 EGF 存在于视网膜,可能与胚胎发育期和生后的光感受器细胞的诱导分化有关,它是视网膜神经元有效的分化因子<sup>[16]</sup>。第二阶段所用的为 RPE 分泌的对视觉系统发育和分化起着重要作用的因子。PEDF 有神经保护和为抗血管生成活动提供环境保护的功能,并支持光感受器细胞和神经视网膜细胞的生长<sup>[17]</sup>。Taurine 具有抗氧化和蛋白质稳定作用,在体外能促进视杆细胞的发育<sup>[18]</sup>,taurine 转运蛋白基因缺失的鼠光感受器细胞发育受阻,发生视网膜变性<sup>[19]</sup>。Taurine 对视网膜及视杆细胞外段的 ATP 依赖的钙离子的摄入具有调节作用。

**3.3 诱导后巢蛋白、微管相关蛋白和视紫红质的表达和检测的意义** 巢蛋白是神经干细胞的重要标志,出现在神经干细胞分化的早期,随着神经细胞的逐渐成熟,其表达会下降。成熟神经元细胞表达 MAP-2。本实验中 BMSCs 实验组与对照组诱导 2d 时检测巢蛋白均为阴性,诱导 3d 后检测到巢蛋白阳性表达,随着诱导时间的延长,巢蛋白表达的阳性率也在增加。阳性率达到较高后,检测到 MAP-2

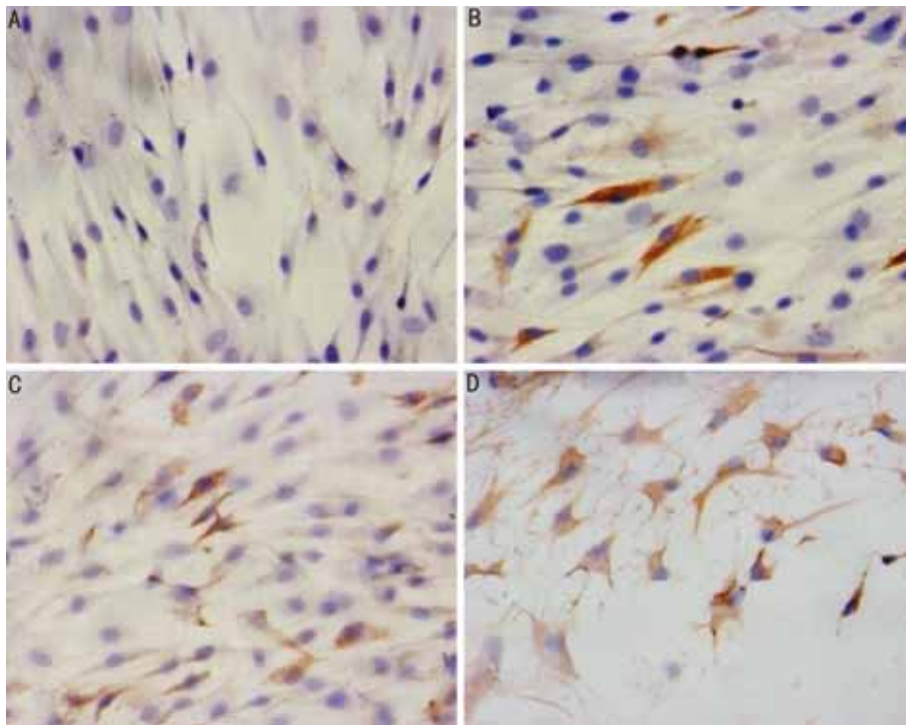


图4 人 BMSCs 向神经前体细胞诱导过程中巢蛋白的表达 (ICC ×100) A:2d;B:4d;C:8d;D:12d。

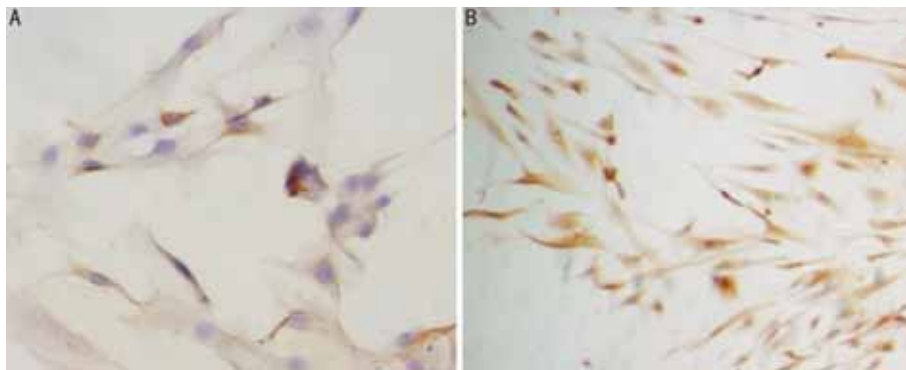


图5 人 BMSCs 向神经前体细胞诱导过程中微管相关蛋白-2 的表达 (ICC ×100) A:8d;B:16d。

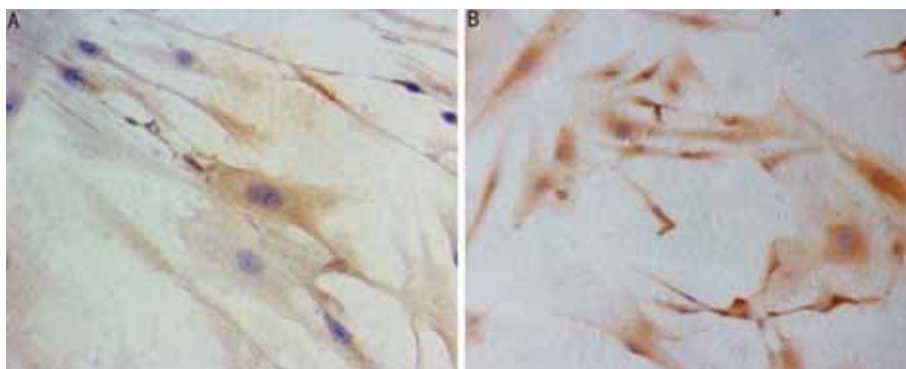


图6 人 BMSCs 向光感受器细胞诱导过程中视紫红质的表达 (ICC ×100) A:2wk;B:3wk。

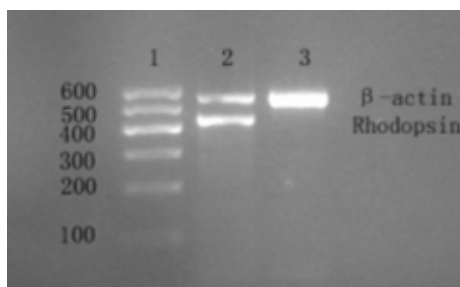


图7 RT-PCR 检测实验组及对照组视紫红质表达情况 1: marker (100 ~ 600bp); 2: 第二阶段诱导 3wk 后; 3: 对照组。

表达,意味着部分细胞进一步向成熟神经元细胞分化。MAP-2 抗体包括 a, b 和 c, 其中 MAP-2b 较早表达, 因此检测到部分 BMSCs 较早出现 MAP-2 阳性表达可能属于 MAP-2b。对照组始终未表达巢蛋白及 MAP-2。因此在诱导分化的细胞还处于神经前体细胞状态时改用 PEDF 及 Taurine 等诱导, 提供一个局部的微环境, 使其可能向光感受器细胞分化。在第二阶段诱导 2wk 后检测被诱导的 BMSCs 表达视紫红质的情况, 结果显示部分细胞表达视紫红质, 随着诱导时间的延长, 其表达率显著增加。对照

组不表达视紫红质。本研究通过在体外模拟体内微环境进行分阶段诱导的方法,可以诱导 BMSCs 表达光感受器细胞标志物视紫红质,且阳性表达率较高,证明 BMSCs 具有向光感受器样细胞分化的可能性。而诱导 BMSCs 分化的光感受器样细胞是否具有体内光感受器细胞的功能,仍需进一步研究。

#### 参考文献

- 1 Woodbury D, Reynolds K, Black IB. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *J Neurosci Res* 2002;69(6):908-917
- 2 Woch G, Aramant RB, Seiler MJ, et al. Retinal transplants restore visually evoked responses in rats with photoreceptor degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(7):1669-1676
- 3 中华人民共和国国务院令 第 149 号. 医疗机构管理条例 1994-09-01
- 4 Kicic A, Shen WY, Wilson AS, et al. Differentiation of marrow stromal cells into photoreceptors in the rat eye. *J Neurosci* 2003;23(21):7742-7749
- 5 Tomita M, Mori T, Maruyama K, et al. A comparison of neural differentiation and retinal transplantation with bone marrow-derived cells and retinal progenitor cells. *Stem Cells* 2006;24(10):2270-2278
- 6 Chiou SH, Kao CL, Peng CH, et al. A novel *in vitro* retinal differentiation model by co-culturing adult human bone marrow stem cells with retinal pigmented epithelium cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;326(3):578-585
- 7 Arnhold S, Heiduschka P, Klein H, et al. Adenovirally transduced bone marrow stromal cells differentiate into pigment epithelial cells and induce rescue effects in RCS rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47(9):4121-4129
- 8 Satomura K, Derubeis AR, Fedarko NS. Receptor tyrosine kinase expression in human bone marrow stromal cells. *J Cell Physiol* 1998;177(3):426-438
- 9 Gospodarowicz D, Neufeld G, Schweigerer L. Molecular and biological

characterization of fibroblast growth factor, an angiogenic factor which also controls the proliferation and differentiation of mesoderm and neuroectoderm derived cells. *Cell Differ* 1986;19(1):1-17

- 10 Hicks D, Courtois Y. Fibroblast growth factor stimulates photoreceptor differentiation *in vitro*. *J Neurosci* 1992;12(6):2022-2033
- 11 Lau D, McGee LH, Zhou S, et al. Retinal degeneration is slowed in transgenic rats by AAV-mediated delivery of FGF-2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(11):3622-3633
- 12 Joly S, Pernet V, Chemtob S, et al. Neuroprotection in the juvenile rat model of light-induced retinopathy: evidence suggesting a role for FGF-2 and CNTF. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(5):2311-2320
- 13 Sanchez AL, Matthews BJ, Meynard MM, et al. BDNF increases synapse density in dendrites of developing tectal neurons *in vivo*. *Development* 2006;133(13):2477-2486
- 14 Ikeda K, Tanihara H, Tatsuno T, et al. Brain-derived neurotrophic factor shows a protective effect and improves recovery of the ERG b-wave response in light-damage. *J Neurochem* 2003;87(2):290-296
- 15 Lawrence JM, Keegan DJ, Muir EM, et al. Transplantation of Schwann cell line clones secreting GDNF or BDNF into the retinas of dystrophic Royal College of Surgeons rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(1):267-274
- 16 Angieux B, Schorderet DF, Arsenijevic Y. Epidermal growth factor is a neuronal differentiation factor for Retinal stem cells *in vitro*. *Stem Cells* 2006;24(3):696-706
- 17 Barnstable CJ, Tombran-Tink J. Neuroprotective and antiangiogenic actions of PEDF in the eye: molecular targets and therapeutic potential. *Prog Retin Eye Res* 2004;23(5):561-577
- 18 Altshuler D, Lo Turco JJ, Rush J, et al. Taurine promotes the differentiation of a vertebrate retinal cell type *in vitro*. *Development* 1993;119(4):1317-1328
- 19 Heller-Stilb B, van Roeyen C, Rascher K, et al. Disruption of the taurine transporter gene (*taut*) leads to retinal degeneration in mice. *FASEB J* 2002;16(2):231-233