

具有间充质干细胞特征的 CD105⁺ 细胞在胎儿 多种组织器官的分布

郭虹 刘杰文 杨少光 曹德骏 刘津华 廖联明 赵春华*

(中国医学科学院、中国协和医科大学血液学研究所, 组织工程中心, 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020)

摘要 CD105 是骨髓间充质干细胞的特征性表型之一。为了研究机体各组织器官也存留有间充质干细胞, 首先检测胎儿各组织 CD105⁺ 细胞的分布, 进而分离胎儿各组织 CD105⁺ 细胞。将 CD105⁺ 细胞向脂肪和成骨细胞诱导分化。结果表明胎儿心、肝、肺、血管、肌肉、皮肤等组织含有 CD105⁺ 间充质干细胞。在间充质干细胞分化为脂肪细胞时, CD105 表达明显下降。地塞米松可以促进脂肪细胞形成并提高了培养液中甘油三酯的含量。而向成骨细胞分化时, 诱导的成骨细胞浆内外有电子密度高的钙盐沉积。以上结果提示, 分布于多种组织的间充质干细胞异常分化可能与疾病的发生有关。

关键词 胎儿; 间充质干细胞; CD105; 脂肪细胞; 成骨细胞

目前骨髓间充质干细胞是成体干细胞的研究热点。间充质干细胞不仅能分化为脂肪细胞、成骨细胞、软骨细胞, 还可以分化为骨骼肌、心肌和神经细胞, 显示了间充质干细胞的巨大分化潜能^[1-5]。最初研究表明, 间充质干细胞的特征性表型是 SH2、SH3、SH4 单克隆抗体识别的表面抗原^[6]。其中 SH2 通过免疫共沉淀的方法鉴定出抗原本质就是 CD105(Endoglin)^[7]。CD105 是同源二聚体糖蛋白, 主要表达在血管内皮细胞、单核巨噬细胞、滋养层细胞和成纤维细胞^[8-10]。除了骨髓存在间充质干细胞外, 具有间充质干细胞特征的 CD105⁺ 细胞是否分布于机体各组织器官, 地塞米松是否可以影响间充质干细胞向脂肪细胞分化, 这是本文研究的主要目的。

1 材料与方 法

1.1 材料

引产胎儿由天津医科大学二附属提供; CD105 抗体磁珠购自德国 MACS 公司; 单克隆抗体 CD105、CD106 购自晶美生物有限公司; CD31、CD34 购自 Santa Cruz; CD29、CD44、CD45 和 HLA-DR 购自天津学研所生物科技有限公司; 胎牛血清购自 Gibco; 免疫组化试剂盒 PicTure™ 购自 Zymed; DAB 溶液购自北京中山生物技术有限公司。

1.2 胎儿各组织的免疫组化检测

将 4~6 个月引产胎儿各组织器官冰冻切片冷丙酮 4 °C 固定 6 min 后, 3% H₂O₂ 温育 5 min, 以阻断封闭内源性的过氧化物酶, 0.1 mol/L PBS 冲洗 2 次, 每次 3 min。滴加 1:50 稀释的 CD105 抗体, 室温温育 60 min, 0.1 mol/L PBS 冲洗 2 次, 每次 3 min。滴加通用 IgG 抗体-HRP 标记物, 室温温育 40 min, 0.1 mol/L PBS 冲洗 2 次, 每次 3 min。DAB 溶液显色。细胞的免疫组化染色方法相同。

1.3 分离人胎儿各组织 CD105 阳性细胞及免疫表型鉴定

取胎儿主动脉血管、心、肝、肺、骨骼肌和皮肤, 去掉周围结缔组织, 用 D-Hank 液冲洗后, 剪成小块, 经 0.2% 胶原酶 37 °C 消化 45 min 后, 用 0.1% 胰蛋白酶消化 45 min。经过细胞筛过滤后离心, 接种在培养瓶中培养。待细胞融合约 80% 后, 消化细胞传代。将收获的细胞, 流式细胞仪检测免疫表型 CD105、CD34、CD106、CD31、CD44、CD11a、CD11b 和 CD45(方法见文献[11])。胎儿骨髓间充质干细胞的方法见文献[12]。另外,

收稿日期: 2003-05-13 接受日期: 2004-03-25

国家高技术研究发展计划资助项目(863计划)(No. 2002AA205061) 和 China Medical Board of New York, Inc (Grant #01-748) 资助项目

* 通讯作者。E-mail: chunhuaz@public.tpt.tj.cn

用 MACS 磁珠按其操作说明分选 CD105 阳性的细胞。

1.4 CD105 阳性细胞向脂肪和成骨细胞诱导分化

将分选后的 CD105⁺ 细胞以 2×10^4 个细胞接种在 3.5 cm^2 的培养皿, 1×10^5 个细胞接种在 25 cm^2 的培养瓶中, 24 h 后, 一组改为脂肪诱导培养液 (10%FCS, 10^{-6} mol/L 地塞米松, $100 \mu\text{g/ml}$ 1-甲基-3-异丁基-黄嘌呤, $50 \mu\text{g/ml}$ 抗坏血酸, 100 u/ml 青霉素和 $100 \mu\text{g/ml}$ 链霉素)。同样, 另一组转换为成骨细胞诱导培养液 (10%FCS, 10^{-7} mol/L 地塞米松, $50 \mu\text{g/ml}$ 抗坏血酸, 10^{-2} mol/L β -磷酸甘油) 分别向脂肪和成骨细胞诱导, 细胞每 3 天换 1 次液。

1.5 成脂肪细胞的检测

倒置显微镜下观察脂肪滴的形成。采用油红 O 染色检测脂肪滴: 细胞以中性甲醛固定 10 min 后, 蒸馏水冲洗, 油红 O 染色 5 min, 明矾苏木素复染。此外, 透射电镜检测诱导后的细胞 (方法见文献 [11])。

1.6 成骨细胞的检测

用 Von Kossa 染色检测钙盐沉淀: 中性甲醛溶液固定 1 h, 去离子水洗净后, 加入 2% 硝酸银溶液, 37°C 避光反应 10 min, 去离子冲洗后曝光 15 min, 光镜下观察钙化基质沉淀。透射电镜检测诱导后的细胞 (方法见文献 [11])。

1.7 培养液中的脂类含量的测定

在不同时间收集脂肪分化培养液, 用氧化酶法在 TBA-40FR 全自动生化分析仪 (Toshiba) 检测甘油三酯和总胆固醇的含量。

2 结果

2.1 CD105⁺ 细胞在胎儿各组织器官的分布

如图 1 所示, CD105 主要表达在胎儿的心脏、肺、肝、肾、脾、胸腺、皮肤和骨骼肌等组织的血管和间质细胞。而各器官的上皮细胞、骨骼肌和心肌细胞均为阴性。因而, 我们可以通过磁珠分选 CD105⁺ 细胞的方法, 把从胎儿各组织分离到贴壁的细胞如上皮细胞 (CD105 表达为阴性) 分选掉。

2.2 分离的胎儿各组织细胞的免疫表型分析

经传代培养的肝脏、肺、皮肤、骨骼肌、肝和血管细胞来源的贴壁成纤维样的细胞, 用 FACS 分析各细胞免疫表型, 结果显示, 所有组织来源的成纤维样的细胞其免疫表型与骨髓的间充质干细胞的免疫表型相似: CD105、CD106、CD44、CD29 为阳性, 其中 CD105 的表达在 70% 以上, 黏附分

子 CD106 的表达为 20%~60%, CD44 和 CD29 的表达约 99%。而 CD45、CD11a、CD11b、HLADR 为阴性, 表达比例也与骨髓间充质干细胞的表达一致。CD34 基本为阴性, 表达不超过 3%, CD31 的表达在 0%~5% 之间, 而且两者表达基本一致。

2.3 分离的 CD105⁺ 细胞形态及向脂肪细胞和成骨细胞分化

从各组织分离的 CD105⁺ 细胞, 瑞氏-吉姆萨染色可见: 形态与骨髓间充质干细胞相似, 呈成纤维样 (图 2A)。细胞增殖较快, 倍增时间约在 30 h 左右。磁珠分选的心脏、肺脏、真皮、骨骼肌、肝脏、血管和骨髓来源的成纤维样的 CD105⁺ 细胞在脂肪诱导的环境下, 形成油红 O 染色阳性的脂肪滴 (图 2B)。同时, 在成骨诱导环境下, 形成 Von Kossa 染色阳性的钙化基质沉淀 (图 2C)。分化的脂肪细胞 CD105 的表达明显降低 (图 3)。

不同组织细胞来源的脂肪滴和钙化基质沉淀形成的时间不同 (表 1)。在向脂肪细胞诱导时, 骨骼肌和真皮组织来源的 CD105⁺ 细胞更易向脂肪细胞分化, 第 3 天就出现脂肪滴, 其他组织来源的细胞如: 心脏、肝脏需要的时间较长, 约 15 天左右, 而血管、肺和骨髓的诱导时间类似约 5~9 天左右, 而且产生含脂滴的细胞数目与骨髓、真皮和骨骼肌相比较少。在向成骨诱导时, 骨骼肌、主动脉弓和骨髓在 1~2 周形成钙化基质沉淀, 而肝脏、心脏、肺脏和真皮组织需要 3 周或 3 周以上。从以上结果可知, 从不同组织分离到的 CD105⁺ 的成纤维样的细胞是间充质干细胞。

2.4 诱导的脂肪细胞和成骨细胞超微结构

骨髓、血管、骨骼肌和肺脏来源的间充质干细胞诱导的脂肪细胞和成骨细胞电镜结果显示: 诱导的脂肪的细胞, 致密染色质增多, 有含油滴的脂肪泡 (图 4A)。诱导的成骨细胞, 细胞外可见钙基质沉淀和胶原纤维, 在细胞内可以看到成骨细胞特

表 1 不同组织和器官的 CD105⁺ 向脂肪和成骨细胞分化所需的时间 (天)

| 组织类型 | 成脂肪 | 成骨 |
|------|-------|-------|
| 骨髓 | 5~7 | 7~9 |
| 心脏 | 17~19 | 28~29 |
| 肺 | 8~10 | 19~22 |
| 真皮 | 3 | 22~24 |
| 肝 | 10~15 | 12 |
| 血管 | 6 | 10~12 |
| 骨骼肌 | 5~8 | 8~9 |

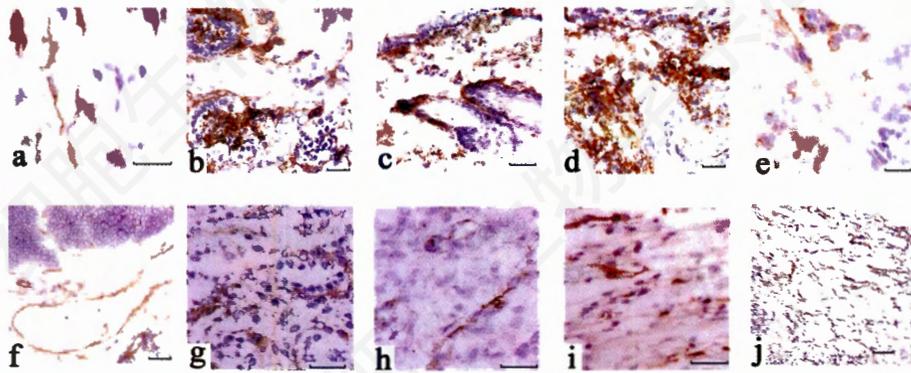


图1 CD105⁺细胞在胎儿多种组织的分布

(a)心脏; (b)肾脏; (c)皮肤; (d)脾脏; (e)胰腺; (f)胸腺; (g)肺脏; (h)肝脏; (i)骨骼肌; (j)主动脉弓。CD105 主要表达在不同组织的血管和间质细胞。Bar: (d), (f), (h), (j) 为 50 μm, 其他为 30 μm。

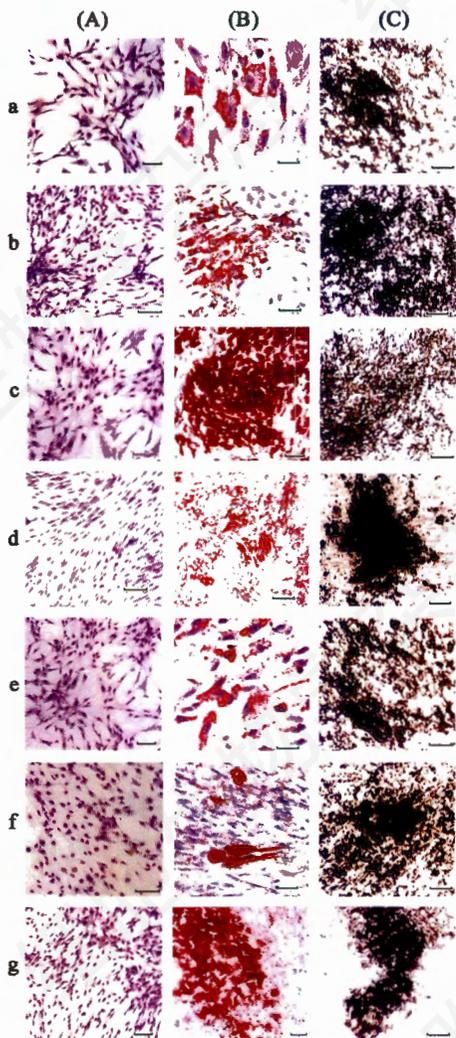


图2 分离的胎儿多种组织 CD105⁺细胞的形态及脂肪和成骨细胞分化

(a)心脏; (b)肺脏; (c)肝脏; (d)真皮; (e)骨骼肌; (f)主动脉弓; (g)骨髓。(A) 以上组织来源的 CD105⁺细胞形态相似。(B)油红 O 染色阳性的脂肪细胞。(C) Von Kossa 染色阳性的钙盐沉积。Bar: (A), (B - c) 为 100 μm; (B - a, -b, -d, -e, -f, -g) 和 (C) 为 50 μm。

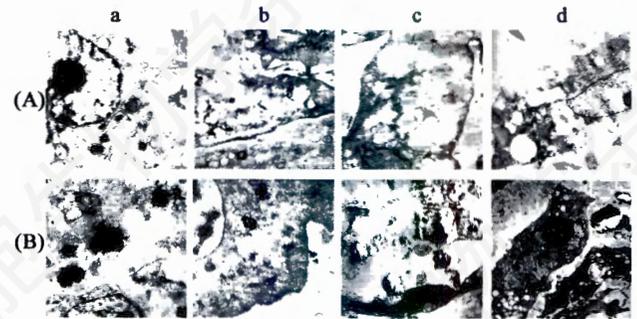


图4 诱导的脂肪细胞和成骨细胞的超微结构

(a)肺脏; (b)骨骼肌; (c)主动脉弓; (d)骨髓来源的间充质干细胞。(A) 诱导的脂肪细胞, 胞浆内可见有包膜的脂滴, 线粒体嵴深染为脂肪细胞的特征。(B) 诱导的成骨细胞, 细胞外可见钙盐沉积和胶原纤维, 有的细胞内有骨针样结构的钙盐产生。(A - a) 10 000×; (A - b) 8000×; (A - c) 9000×; (A - d) 5000×; (B - a) 5000×; (B - b) 9000×; (B - c) 3000×; (B - d) 4000×。

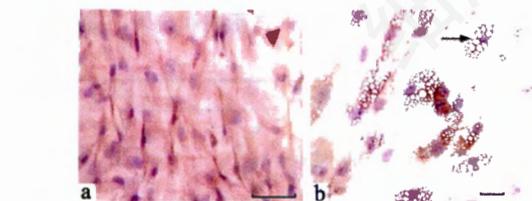


图3 免疫组化检测脂肪形成过程中 CD105 的表达

(a)诱导前 CD105 表达阳性; (b)当含有脂滴的脂肪细胞形成后, 脂肪细胞 CD105 的表达明显降低甚至丢失(箭头所示)。Bar: (a) 50 μm; (b) 30 μm。

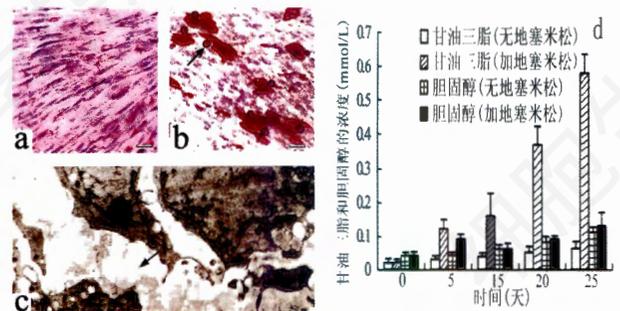


图5 地塞米松促进脂肪的分化和甘油三酯的产生

(a)诱导培养液中无地塞米松时, 没有含脂滴的脂肪细胞产生; (b)当加入地塞米松时, 不但有脂肪细胞产生, 而且诱导的脂肪细胞内的脂滴可以溢出细胞外(箭头所示); (c)诱导的脂肪细胞, 电镜下可见细胞外有胞膜的脂滴(箭头所示); (d)检测培养液中的甘油三酯和总胆固醇的含量, 甘油三酯的含量在有地塞米松时逐渐增加(15天, $P < 0.05$; 20天, $P < 0.01$), 而不加地塞米松时, 甘油三酯的含量变化不明显。胆固醇的含量在同样诱导过程中未见变化。Bar: (a), (b) 为 50 μm。 (c) 4000×。

有的骨针结构(图 4B)。进一步说明各组织来源的间充质干细胞可以向脂肪和成骨细胞分化。

2.5 地塞米松促进脂肪的形成和增加甘油三酯的含量

在诱导脂肪形成的培养液中含有地塞米松, 会对其对间充质干细胞的分化产生影响。不加地塞米松诱导, 结果显微镜下未见含脂滴的细胞(图 5a)。而加入地塞米松组, 不但形成脂肪细胞, 还可见脂滴从细胞中溢出(图 5b)。电镜下可见溢出带有包膜的脂滴(图 5c)。同时检测培养液中的甘油三酯和总胆固醇的含量, 发现甘油三酯的含量在有地塞米松时逐渐增加, 而不加地塞米松时, 甘油三酯的含量变化不明显。另外, 胆固醇的含量在同样诱导过程中未见变化。同样, 来自骨骼肌和真皮组织的间充质干细胞同样在脂肪细胞形成过程中, 可见甘油三酯含量增高(图 5d)。

3 讨论

骨髓间充质干细胞的发现及其巨大的分化潜能及潜在的应用价值, 为成体干细胞研究与发展提供了良好的契机。我们首先检测了 CD105 在胎儿各组织器的分布, 在各脏器组织的血管和间质组织细胞分布着 CD105 阳性的细胞。用 CD105 抗体磁珠分选的各组织器官的成纤维样的细胞, 无论从其形态、增殖速度甚至表型都与骨髓的来源的间充质干细胞相似。另外, 也能向脂肪和成骨细胞分化, 以上结果说明, 从心、肝、肺、主动脉血管、真皮和骨骼肌分离的 CD105⁺ 成纤维样的细胞具有间充质干细胞的特征。诱导的脂肪细胞, CD105 表达明显降低。同时分化为成骨细胞时, CD105 丢失^[7], 提示 CD105 是间充质干细胞的重要特征。虽然, 内皮细胞也是 CD105⁺ 细胞, 我们的表型鉴定结果也的确如此。但是当我们从脐带动静脉分离到的内皮细胞却不能向脂肪细胞和成骨细胞分化, 相反在诱导条件下内皮细胞反而会受到损伤而死亡。

我们的实验证明具有间充质干细胞特征的细胞存留在胎儿的各组织器官中, 目前的研究也表明间充质干细胞也分布于胎儿和成体的不同组织器官中^[13-17]。间充质干细胞或干细胞在成体内存留的意义一直是所有干细胞工作者研究的目标。干细胞除了在组织损伤后的修复和再生作用外, 多项研究表明干细胞与克隆性的肿瘤发生有关^[18,19]。我们的研究结果说明胎儿血管、肌肉、真皮、心、肝、肺

和骨髓等都含有间充质干细胞特征的细胞存在, 并且都可以向脂肪和成骨细胞分化。在体外诱导体系中, 我们发现成体各组织器官的 CD105⁺ 细胞在向脂肪细胞分化同时, 脂肪细胞含有的脂滴逐渐增大, 最终会溢出细胞外。不仅如此, 培养液内的甘油三酯含量明显增高, 提示分布于多种组织的间充质干细胞向脂肪细胞异常分化有可能是血脂增高重要原因。而地塞米松促进间充质干细胞的脂肪形成, 为进一步研究间充质干细胞向脂肪细胞分化的调节提供了线索。另外, 胎儿各组织器官的 CD105⁺ 细胞也可向成骨细胞分化, 尤其是诱导后的细胞胞浆内产生的钙盐沉淀, 目前还未有报道。同时细胞内外钙盐沉淀有可能会影响所在组织器官的功能, 比如动脉粥样硬化斑块内就有钙盐沉积并与骨的形成有相似之处^[20]。目前, 从成体多种组织中已经分离到的间充质干细胞都可以向脂肪和成骨细胞分化^[14,15]。因而, 各组织存留的间充质干细胞在机体合适的条件下异常分化, 是否与老年人各组织器官逐步失去弹性而变硬有关还有待于进一步研究。

总之, 胎儿心、肝、肺、血管、肌肉、皮肤等组织含有间充质干细胞特征的 CD105⁺ 细胞, 在分化为脂肪细胞时 CD105 表达明显下降, 进一步说明 CD105 是间充质干细胞的重要表型。在间充质干细胞向脂肪分化时, 地塞米松可以促进脂肪细胞形成并提高分化培养液中甘油三酯的含量增高, 提示分布于多种组织的间充质干细胞异常分化可能与脂类等代谢疾病有关。而向成骨细胞分化时, 细胞内外的钙盐可能会影响所在组织器官的功能。间充质干细胞是否与病理过程的发生有关, 有待于进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] Mackay AM *et al. Tissue Eng*, 1998, 4: 415
- [2] Pittenger MF *et al. Science*, 1999, 284: 143
- [3] Wakitani S *et al. Muscle Nerve*, 1995, 18: 1417
- [4] Woodbury D *et al. J Neurosci Res*, 2000, 61: 364
- [5] Wang JS *et al. J Thorac Cardiovasc Surg*, 2000, 120: 999
- [6] Haynesworth SE *et al. Bone*, 1992, 13: 81
- [7] Barry FP *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 265: 134
- [8] Cheifetz S *et al. J Biol Chem*, 1992, 267: 19027
- [9] Gougos A *et al. Int Immunol*, 1992, 4: 83
- [10] St-Jacques S *et al. Endocrinology*, 1994, 134: 2645
- [11] Guo H *et al. Exp Hematol*, 2003, 31: 650
- [12] 呼莹等. *中国实验血液学杂志*, 2001, 9: 289
- [13] Campagnoli C *et al. Blood*, 2001, 98: 2396
- [14] Zuk PA *et al. Mol Biol Cell*, 2002, 13: 4279

- [15] De Bari C *et al. Arthritis Rheum*, 2001, **44**:1928
[16] Erices A *et al. Br J Haematol*, 2000, **109**: 235
[17] Hu Y *et al. J Lab Clin Med*, 2003, **141**: 342
[18] Janes SM *et al. J Pathol*, 2002, **197**: 479
[19] Brittan M *et al. J Pathol*, 2002, **197**: 492
[20] Bostrom K. *Am J Cardiol*, 2001, **88**: 20E

The Distribution of CD105⁺ Cells with Characteristics of Mesenchymal Stem Cells in Diverse Fetal Tissues and Organs

Hong Guo, Jie-Wen Liu, Shao-Guang Yang, De-Jun Cao, Jin-Hua Liu, Lian-Ming Liao, Chun-Hua Zhao*

(State Key Laboratory of Experimental Haematology, Institute of Haematology and Blood Diseases Hospital, and Tissue Engineering Center, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

Abstract To investigate whether there are CD105⁺ mesenchymal stem cells (MSCs) in fetal diverse tissues and organs besides MSCs derived from bone marrow, we assessed the distribution of CD105 in fetal diverse tissues and organs, and isolated CD105⁺ cells from various tissues. CD105⁺ cells were induced to differentiate into adipocytes and osteoblasts. The results showed that CD105⁺ cells distributed in vascular and mesenchymal cells of heart, liver, spleen, lung, kidney, thymus gland, pancreas, blood vessel, skeletal muscles and derma. The sorted CD105⁺ cells could differentiate into adipocytes and osteoblasts. During differentiation of MSCs into adipocytes, CD105 expression decreased, strongly supporting that CD105 was a marker of MSCs. Dexamethasone could enhance adipogenesis and the production of triglycerides in the medium of differentiation into adipocytes. During osteogenesis, some needle-shaped crystal calcium deposition similar to bone spicules was also observed both inside and outside of the cytoplasm. These results demonstrated that CD105⁺ MSCs distributed in various fetal tissues. The increase of content of triglycerides in the medium of differentiation into adipocytes and calcium deposition inside the cytoplasm indicated CD105⁺ MSCs reside in diverse tissues may be related with some pathologic progress.

Key words fetus; mesenchymal stem cells; CD105; adipocyte; osteoblast

Received: May 13, 2003 Accepted: March 25, 2004

This work was supported by from the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2002AA205061) and China Medical Board of New York, Inc (Grant #01-748)

*Corresponding author. E-mail: chunhuaz@public.tpt.tj.cn