

### 【基础研究】

通信作者:冯晓明(1979-),男,湖北黄石人,博士,研究员,博士研究生导师,研究方向:肿瘤免疫学;E-mail:xfeng1979@hotmail.com

percentage of Sca-1<sup>+</sup> cells in the medium containing 0.05, 0.10, 0.20 and 0.40 nmol · L<sup>-1</sup> RA all increased significantly compared with that in control medium ( $P < 0.05$ ), and all significantly decreased compared with that in the SB431542 group ( $P < 0.05$ ). The percentage of CD105<sup>+</sup> cells and Sca-1<sup>+</sup> cells in the medium containing 0.20 nmol · L<sup>-1</sup> RA all increased significantly compared with those in the medium containing 0.10, 0.20 and 0.40 nmol · L<sup>-1</sup> RA ( $P < 0.05$ ); After four days of iPS differentiation, the percentages of Sca-1<sup>+</sup> cells and CD105<sup>+</sup> cells in the SB431542 group increased significantly compared with those in control group ( $P < 0.05$ ). The percentage of CD105<sup>+</sup> cells in the medium containing 0.05, 0.10, 0.20 and 0.40 nmol · L<sup>-1</sup> RA all increased significantly compared with that in the control group and SB431542 group ( $P < 0.05$ ). The percentage of Sca-1<sup>+</sup> cells in the medium containing 0.05, 0.10, 0.20 or 0.40 nmol · L<sup>-1</sup> RA all increased significantly compared with that in the control group ( $P < 0.05$ ), and all significantly decreased compared with that in the SB431542 group ( $P < 0.05$ ); the percentage of Sca-1<sup>+</sup> cells in the medium containing 0.20 nmol · L<sup>-1</sup> RA increased significantly compared with that in the medium containing 0.10, 0.20 and 0.40 nmol · L<sup>-1</sup> RA ( $P < 0.05$ ). The percentage of CD105<sup>+</sup> cells in the medium containing 0.20 nmol · L<sup>-1</sup> RA increased significantly compared with that in the medium containing 0.05, 0.10 nmol · L<sup>-1</sup> RA ( $P < 0.05$ ), which had no significant difference compared with that in the medium containing 0.40 nmol · L<sup>-1</sup> RA ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** RA can promote the differentiation of ES and iPS into MSC-like cells with simple methods and short period, which provides a practical means for the study of differentiation from pluripotent stem cell into MSC-like cells.

**Key words:** mesenchymal stem cells; embryonic stem cells; induced pluripotent stem cells; retinoic acid

间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)是中胚层来源的具有高度自我更新和多向分化潜能的多能干细胞,有向损伤组织定向迁移,促进损伤修复、免疫抑制、抗炎及神经营养等功能<sup>[1-3]</sup>,是细胞替代治疗和组织工程的首选种子细胞,但其获得资源有限。多能干细胞包括胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES)和诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS),能进一步分化为多种类型细胞,为临床治疗提供无限的细胞和组织来源,成为再生医学研究的热点。本研究探讨应用 SB431542 和全反式维甲酸(retinoic acid, RA)将多能干细胞分化为 MSC 的技术方法,为今后细胞治疗提供基础。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞株** 小鼠 ES 细胞株 ES-J1 来源于南开大学生命科学学院,小鼠 iPS 购于上海斯丹赛研究所。

**1.2 主要试剂和仪器** 藻红蛋白(phycoerythrin, PE)标记的小鼠抗 CD105 抗体购自美国 Bioscience 公司,别藻青蛋白偶联物(allophycocyanin/cy7, APC/cy7)标记的小鼠抗干细胞抗原 1(stem cell antigen-1, Sca-1)抗体购自美国 Biolegend 公司,体积分数 0.1% 明胶购自加拿大 Stemcell 公司,非必需氨基酸、达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)、β-巯基乙醇、RA、胎牛血清购自美国 GIBCO 公司,ESGRO-2i 培养基及消化细胞用 accutase 酶购自美国 Millipore 公司,SB431542 购自上海 Selleckchem 公司,细胞表面 LSR II 型流式细胞分析仪购自美国 Becton 公司。

**1.3 ES 和 iPS 常规培养** 小鼠 ES 和 iPS 培养于 ESGRO-2i 培养基。接种前用体积分数 0.1% 的明

胶铺板,20 min 后吸掉明胶,接入适量的细胞,置于 37 ℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,每天换液。细胞呈克隆生长,传代时用 accutase 酶消化 1 ~ 2 min,加入适量 1640 培养基将细胞吹打为单细胞悬液,将细胞悬液吸入离心管离心,离心后吸走上层的 1640 培养基,用 ESGRO-2i 培养基重悬细胞,按 1 : 10 的比例将细胞接种于体积分数 0.1% 明胶铺板的培养器皿中,使细胞处于良好状态。

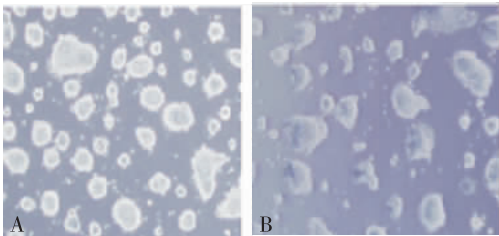
**1.4 ES 和 iPS 的分化** 首先配制含体积分数 10% 胎牛血清、0.1 mmol · L<sup>-1</sup> β-巯基乙醇、2.0 mmol · L<sup>-1</sup> L-谷氨酰胺、0.1 mmol · L<sup>-1</sup> 非必需氨基酸的 DMEM 完全培养基。根据不同的分化条件分为 3 组:对照组、RA 组及 SB431542 组。对照组为 DMEM 完全培养基;SB431542 组为 DMEM 完全培养基中含 10 μmol · L<sup>-1</sup> SB431542;RA 组中 DMEM 完全培养基中分别含 0.05、0.10、0.20、0.40 nmol · L<sup>-1</sup> RA。将 ES 和 iPS 用 accutase 酶消化为单细胞悬液,离心后用配制的分化培养基重悬细胞,以传代比例 1 : 10 ~ 1 : 6 加入体积分数 0.1% 明胶处理过的培养皿,每天换液,持续 4 d。

**1.5 流式细胞术分析** 分化 4 d 后将细胞用胰蛋白酶消化,加入流式分析管中,1 400 r · min<sup>-1</sup> 离心 3 min,弃上清,加入磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)2 mL 洗细胞 1 次,加入适量 1 × PBS 重悬,计数,每组取约 1 × 10<sup>5</sup> 细胞至另一流式分析管,液体体积约 100 μL,每管加入 PE-CD105 和 APC/cy7-Sca-1 各 1 μL,混匀后 4 ℃ 避光孵育 40 min。2 mL 1 × PBS 洗涤细胞 1 次,离心弃上清,加入 500 μL 的 PBS 重悬细胞,流式细胞仪检测细胞表面标志物 CD105 和 Sca-1 的表达。实验重复 3 次。

**1.6 统计学处理** 应用 Graphpad prism 5 软件进行统计分析,计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,采用非配对  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

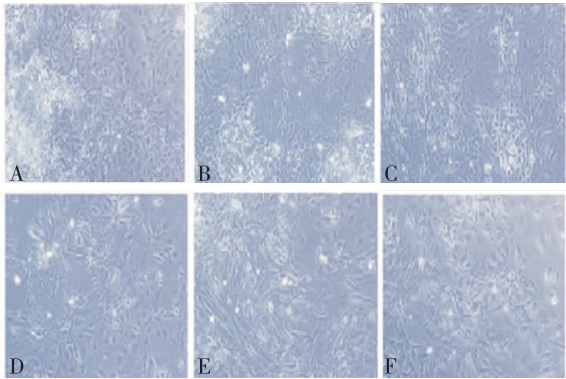
**2.1 显微镜下多能干细胞的形态** 小鼠 ES 和 iPS 在培养基中生长较好,3 ~ 4 d 后细胞长成较大的克隆 (图 1)。



A; ES; B; iPS。  
图 1 培养 3 d 后 ES 和 iPS 的形态 (×10)

Fig.1 Morphology of ES and iPS after three days of culture (×10)

**2.2 ES 细胞向 MSC 细胞的分化** ES 分化 4 d 后,对照组和 SB431542 组的细胞分化成内皮样细胞,且有许多未分化的细胞克隆。RA 组的细胞分化成纤维状细胞,其中 0.05 nmol · L<sup>-1</sup> RA 组有部分细胞分化为内皮状,较多细胞分化为纤维状;0.10、0.20 nmol · L<sup>-1</sup> RA 组细胞较好地分化为纤维状;0.40 nmol · L<sup>-1</sup> RA 组细胞分化为纤维状细胞 (图 2)。



A:对照组;B:SB431542 组;C:0.05 nmol · L<sup>-1</sup> RA 组;D:0.10 nmol · L<sup>-1</sup> RA 组;E:0.20 nmol · L<sup>-1</sup> RA 组;F:0.40 nmol · L<sup>-1</sup> RA 组。

图 2 ES 在不同分化条件下分化 4 d 后 (×20)  
Fig.2 Morphology of ES after four days of differentiation (×20)

**2.3 ES 向 MSC 样细胞分化的鉴定** 结果见表 1。ES 分化 4 d 后,SB431542 组 Sca-1<sup>+</sup> 细胞比例显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ),CD105<sup>+</sup> 细胞比例与对照组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。0.05、0.10、0.20、0.40 nmol · L<sup>-1</sup> RA 组 ES 分化的 CD105<sup>+</sup> 细胞比例显

著高于对照组和 SB431542 组 ( $P < 0.05$ ),Sca-1<sup>+</sup> 细胞比例显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ),但与 SB431542 组比较显著降低 ( $P < 0.05$ );0.20 nmol · L<sup>-1</sup> RA 组的 CD105<sup>+</sup> 和 Sca-1<sup>+</sup> 细胞比例显著高于 0.05、0.10、0.40 nmol · L<sup>-1</sup> RA 组 ( $P < 0.05$ )。

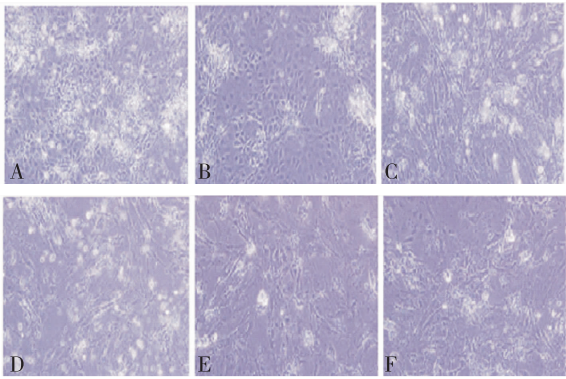
表 1 不同条件下 ES 分化细胞中 CD105<sup>+</sup> 细胞和 Sca-1<sup>+</sup> 细胞比例比较

Tab.1 Comparison of the percentages of CD105<sup>+</sup> and Sca-1<sup>+</sup> cells in the differentiated cells of ES under different conditions ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	CD105 <sup>+</sup> 细胞/%	Sca-1 <sup>+</sup> 细胞/%
对照组	3	2.7 ± 0.3	4.0 ± 0.3
SB431542 组	3	1.8 ± 0.2	18.0 ± 1.6 <sup>a</sup>
0.05 nmol · L <sup>-1</sup> RA 组	3	32.7 ± 1.8 <sup>abc</sup>	10.2 ± 0.7 <sup>abc</sup>
0.10 nmol · L <sup>-1</sup> RA 组	3	37.9 ± 1.7 <sup>abc</sup>	10.7 ± 0.8 <sup>abc</sup>
0.20 nmol · L <sup>-1</sup> RA 组	3	43.1 ± 1.2 <sup>ab</sup>	12.9 ± 1.3 <sup>ab</sup>
0.40 nmol · L <sup>-1</sup> RA 组	3	24.3 ± 1.3 <sup>abc</sup>	7.7 ± 0.7 <sup>abc</sup>

注:与对照组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 SB431542 组比较<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 0.20 nmol · L<sup>-1</sup> RA 组比较<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

**2.4 iPS 向 MSC 样细胞的分化** iPS 分化 4 d 后,对照组和 SB431542 组的细胞分化为内皮样细胞,存在部分未分化的细胞克隆。RA 组的细胞分化形成纤维状的细胞。0.05 nmol · L<sup>-1</sup> RA 组部分细胞分化为内皮状,较多的分化为纤维状细胞,0.10、0.20 nmol · L<sup>-1</sup> RA 组较多的细胞分化为纤维状,0.40 nmol · L<sup>-1</sup> RA 组分化为纤维状细胞,但有小部分细胞状态不佳 (图 3)。



A:对照组;B:SB431542 组;C:0.05 nmol · L<sup>-1</sup> RA 组;D:0.10 nmol · L<sup>-1</sup> RA 组;E:0.20 nmol · L<sup>-1</sup> RA 组;F:0.40 nmol · L<sup>-1</sup> RA 组。

图 3 iPS 在不同分化条件下分化 4 d 后 (×20)  
Fig.3 Morphology of iPS after four days of differentiation (×20)

**2.5 iPS 向 MSC 样细胞分化的鉴定** 结果见表 2。iPS 分化 4 d 后,SB431542 组 CD105<sup>+</sup> 细胞和 Sca-1<sup>+</sup> 细胞比例显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。0.05、0.10、0.20、0.40 nmol · L<sup>-1</sup> RA 组 iPS 分化的 CD105<sup>+</sup> 细胞比例显著高于对照组和 SB431542 组 ( $P < 0.05$ ),Sca-1<sup>+</sup> 细胞比例显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ),但与 SB431542 组比较均显著降低 ( $P < 0.05$ );

0.20 nmol · L<sup>-1</sup> RA 组 Sca-1<sup>+</sup> 细胞比例显著高于 0.05、0.10、0.40 nmol · L<sup>-1</sup> RA 组 ( $P < 0.05$ ), 0.20 nmol · L<sup>-1</sup> RA 组 CD105<sup>+</sup> 细胞比例显著高于 0.05、0.10 nmol · L<sup>-1</sup> RA 组 ( $P < 0.05$ ), 但与 0.40 nmol · L<sup>-1</sup> RA 组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 2 不同条件下 iPS 分化细胞中 CD105<sup>+</sup> 细胞和 Sca-1<sup>+</sup> 细胞比例比较

Tab. 2 Comparison of the percentages of CD105<sup>+</sup> and Sca-1<sup>+</sup> cells in the differentiated cells of iPS under different conditions ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	CD105 <sup>+</sup> 细胞/%	Sca-1 <sup>+</sup> 细胞/%
对照组	3	1.3 ± 0.2	6.5 ± 0.4
SB431542 组	3	2.0 ± 0.4 <sup>a</sup>	16.5 ± 1.3 <sup>a</sup>
0.05 nmol · L <sup>-1</sup> RA 组	3	41.3 ± 1.5 <sup>abc</sup>	12.2 ± 0.8 <sup>abc</sup>
0.10 nmol · L <sup>-1</sup> RA 组	3	45.8 ± 1.6 <sup>abc</sup>	12.4 ± 1.0 <sup>abc</sup>
0.20 nmol · L <sup>-1</sup> RA 组	3	50.8 ± 1.9 <sup>ab</sup>	14.9 ± 1.4 <sup>ab</sup>
0.40 nmol · L <sup>-1</sup> RA 组	3	51.7 ± 2.0 <sup>ab</sup>	10.9 ± 1.2 <sup>abc</sup>

注:与对照组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 SB431542 组比较<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 0.20 nmol · L<sup>-1</sup> RA 组比较<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

SB431542 可促进人多能干细胞向 MSC 样细胞分化,Sánchez 等<sup>[4]</sup>使用 SB431542 将人类胚胎干细胞分化 28 d 后,获得具有间充质特性的 CD73<sup>+</sup> CD90<sup>+</sup> 的细胞,Chen 等<sup>[5]</sup>使用 SB431542 将人诱导多能干细胞分化为 MSC 样细胞。另外有研究表明 RA 受体在将基质细胞重编程为多能干细胞中起作用<sup>[6]</sup>,Torres 等<sup>[7]</sup>利用骨形态蛋白 4、RA 和基质细胞将鼠的胚胎干细胞分化为间质祖细胞。本研究应用 SB431542 和 RA 诱导小鼠 ES 和 iPS 向 MSC 方向进行分化,以探讨一种高效的 iPS 向 MSC 分化的方法。

人 ES 向中胚层的分化可能要经历上皮到间质的转变 (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) 过程<sup>[8]</sup>,Chen 等<sup>[5]</sup>使用 SB431542 将人诱导多能干细胞分化为 MSC 样细胞的过程也经历了 EMT 的过程。本研究中对照组和 SB431542 组分化 4 d 后细胞呈内皮样细胞,有较多未分化的细胞克隆存在,而 RA 组则向纤维状的细胞进行分化,有效缩短了 EMT 过程。

2006 年,国际细胞治疗协会确定 MSC 的鉴定标准为 MSC 表达 CD105、CD73 和 CD90。Sca-1 是干细胞表面标志物,在 MSC 表面高度表达,因此本研究以 CD105 和 Sca-1 作为鉴定 MSC 的表面标志物,研究结果表明,SB431542 能促进多能干细胞向 CD105<sup>+</sup> 细胞分化,且分化为内皮状细胞,RA 组的 CD105<sup>+</sup> 细胞和 Sca-1<sup>+</sup> 细胞比例与对照组比较均明显升高,其中 0.20 nmol · L<sup>-1</sup> RA 组分化较好,

CD105<sup>+</sup> 细胞和 Sca-1<sup>+</sup> 细胞比例也较高,因此 RA 在一定浓度范围内以浓度依赖的方式促进 ES 和 iPS 向 MSC 样细胞分化,使分化的细胞中 CD105<sup>+</sup> 和 Sca-1<sup>+</sup> 细胞比例均明显升高,但 RA 浓度过高会引起分化效率降低,并使分化的细胞呈老化状态,可能是 RA 对细胞的毒性作用。

SB431542 能促进多能干细胞向 CD105<sup>+</sup> 细胞分化,且分化为内皮状细胞,RA 能促进多能干细胞同时向 CD105<sup>+</sup> 和 Sca-1<sup>+</sup> 细胞分化,分化为 MSC 样细胞,因此 RA 较 SB431542 能更好促进多能干细胞向 MSC 样细胞分化。MSC 作为一种具有多系分化潜能的原始细胞,对许多器官组织损伤性疾病有良好疗效。同时,由于其抗原性较弱,具有良好的组织相容性,便于进行异体移植,因此极具临床应用前景<sup>[9]</sup>。RA 能促进多能干细胞有效向 CD105<sup>+</sup> 和 Sca-1<sup>+</sup> 细胞分化,使细胞分化为 MSC 样细胞。用 RA 促进多能干细胞向 MSC 样细胞分化,缩短了分化周期,为多能干细胞向 MSC 的定向分化提供了方法学和形态学基础,为 MSC 临床应用提供了技术支持。

### 参考文献:

[1] 胡雅敏,罗敏,谷平. 干细胞在视网膜损伤修复中的应用进展[J]. 眼科新进展,2013,33(2):190-192,196.

[2] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *Science*, 1999, 284 (5411):143-147.

[3] 秦力维,高原,郭建巍. 间充质干细胞治疗眼免疫性疾病的新进展[J]. 眼科新进展,2013,33(9):890-893.

[4] Sánchez L, Gutierrez-Aranda I, Ligeró G, et al. Enrichment of human ESC-derived multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive and anti-inflammatory properties capable to protect against experimental inflammatory bowel disease [J]. *Stem Cells*, 2011, 29(2):251-262.

[5] Chen Y S, Pelekanos R A, Ellis R L, et al. Small molecule mesengenic induction of human induced pluripotent stem cells to generate mesenchymal stem/stromal cells [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2012, 1(2):83-95.

[6] Wang W, Yang J, Liu H, et al. Rapid and efficient reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells by retinoic acid receptor  $\gamma$  and liver receptor homolog 1 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(45):18283-18288.

[7] Torres J, Prieto J, Durupt F C, et al. Efficient differentiation of embryonic stem cells into mesodermal precursors by BMP, retinoic acid and notch signaling [J]. *PLoS One*, 2012, 7(4):e36405.

[8] Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF- $\beta$  induced epithelial to mesenchymal transition [J]. *Cell Res*, 2009, 19(2):156-172.

[9] 何志旭,严虎,刘俊峰,等. 骨髓间充质干细胞移植治疗缺血再灌注脑损伤 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2013, 28(6):435-437.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:王 燕)