

奶山羊骨髓间质干细胞的分离培养及生物学特性研究

王 芳¹, 朱海鲸¹, 李 伟², 华进联¹

(1 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西省干细胞工程技术研究中心, 农业部动物生殖发育与胚胎工程重点开放性实验室, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100; 2 江苏省北科生物科技有限公司, 江苏 泰州 225300)

【摘 要】 **【目的】** 分离、培养奶山羊骨髓间质干细胞(MSCs), 探讨其生物学特性, 为心血管、神经退化, 尤其是不育症患者的细胞移植治疗及相关细胞发育分化研究奠定基础。**【方法】** 采用贴壁培养法进行 MSCs 的分离和培养, 通过形态学观察、生长曲线测定、免疫细胞化学染色和 RT-PCR 技术等进行检测; 并采用免疫细胞化学法对自发分化的细胞及定向诱导分化的神经样细胞、心肌样细胞、生殖样细胞进行检测, 计算生殖样细胞的阳性率。**【结果】** 分离得到的 MSCs 为成纤维样细胞, 其增殖能力强, 无致瘤性, 已连续传代至 22 代; 其表达胚胎干细胞(ESCs)的表面标记 Oct4、Nanog、C-myc 和 TERT; MSCs 形成类胚体自发分化的细胞表达 3 胚层特异标志基因 AFP、 β -III Tubulin 和心肌 α -actin; MSCs 经 β -巯基乙醇诱导, 定向分化为表达 Nestin 和 β -III Tubulin 的早期神经样细胞, 经 5-氮胞苷(5-Aza)诱导, 可定向分化为表达 CT3 及心肌 α -actin 的心肌样细胞, 并出现肌管样结构, 经维甲酸(RA)诱导, 分化的细胞表达生殖细胞减数分裂前期的蛋白 Vasa、Scp3 和 CD49f($\alpha 6$ 整合素)等生殖细胞标记, 其阳性率分别达到 35.7%, 24.0% 和 14.0%。**【结论】** 自奶山羊骨髓分离得到 MSCs, 其具备间质干细胞的基本特性, 并具有向神经细胞、心肌细胞、生殖细胞分化的潜能。

【关键词】 奶山羊; 骨髓; 间质干细胞; 神经细胞; 心肌细胞; 生殖细胞

【中图分类号】 S827.3⁺6

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)10-0019-08

Isolation and characterization of dairy goat bone marrow-derived mesenchymal stem cells

WANG Fang¹, ZHU Hai-jing¹, LI Wei², HUA Jin-lian¹

(1 College of Veterinary Medicine, Shaanxi Centre of Stem Cells Engineering & Technology, Key Lab for Reproductive Physiology & Embryo Biotechnology of Agriculture Ministry of China, Shaanxi Key Lab for Agriculture Molecular Biotechnology Centre, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 North Branch Bio-Technology Co., Ltd of Jiangsu Province, Taizhou, Jiangsu 225300, China)

Abstract: **【Objective】** The dairy goat bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) were isolated to investigate the characteristics to establish a model for cell differentiation and to provide new resources of cell therapy for neural and myocardial degenerative diseases, infertility and sterility. **【Method】** The cells were isolated and derived from dairy goat bone marrow by adherent culture, identified by morphology, growth curves, immunocytochemistry and RT-PCR. The positive rates of spontaneous differentiation cells were evaluated by immunocytochemical method. **【Result】** The isolated MSCs were fibroblast-like phenotype without tumorigenicity and continuously passaged to 22; The markers of embryonic stem cells

* [收稿日期] 2010-03-15

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30972097); 中国博士后基金项目(20080431253); 奶山羊良种繁育及产业化技术体系建设项目(nyhyzx07-037); 江苏科技基础设施建设计划“科技公共服务平台”项目(BM2008146)

[作者简介] 王 芳(1983—), 女, 河北邢台人, 在读硕士, 主要从事动物细胞工程学研究。E-mail: wangfang19832005@126.com

[通信作者] 华进联(1971—), 男, 陕西商州人, 副教授, 主要从事动物干细胞和胚胎工程研究。E-mail: jlhua2003@126.com

(ESCs) such as Oct4, Nanog, C-myc and TERT were identified. The spontaneously differentiated cells derived from embryoid bodies expressed markers of three embryonic germ layers. MSCs were induced to differentiate into early neural-like cells by β -mercaptoethanol induction and these cells were positive for Nestin and β -III Tubulin. Myocardial cells were obtained from MSCs induction by 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza) and appeared myotube-like cells, which were positive for CT3 and cardiac α -actin. Through RA-induction, the differentiated cells expressed the specific markers of pre-meiotic germ cells including Vasa, Scp3, CD49f and the positive rates were 35.7%, 24.0% and 14.0% respectively. 【Conclusion】 These results demonstrated that typical mesenchymal stem cells were isolated from dairy goat bone marrow, possessed the characteristics of pluripotent stem cells, and had the potential of differentiation into neural, myocardial cells and even germ cells.

Key words: goat; bone marrow; mesenchymal stem cells (MSCs); neural cells; myocardial cells; germ cells

骨髓间质干细胞 (Mesenchymal stem cells, MSCs) 是来源于骨髓的一类多能性成体干细胞,也是至今研究最为广泛的成体干细胞之一。体内、外试验证明, MSCs 能分化成 3 个胚层的诸多细胞类型,如肌肉细胞、心肌细胞、神经元、神经胶质细胞、内皮细胞、肝细胞等^[1-5]。有学者认为, MSCs 在分化潜能上几乎可以与胚胎干细胞 (ESCs) 相媲美^[4]。另外,与胚胎干细胞相比, MSCs 具有取材方便,体外易培养,增殖快和免疫原性低等优点。MSCs 独特的生物学特性使其可以作为细胞发育分化、基因表达调控和组织器官构建的理想模型和种子细胞。目前,有关人类和小鼠骨髓源 MSCs 的分离培养及定向分化研究已经有较多的文献报道^[4-7]。但有关奶山羊多能性干细胞的研究鲜有报道。山羊是重要的经济动物,具有生产肉、绒、奶等经济价值。我国的奶山羊数量居世界首位,奶山羊养殖业是我国的优势畜牧产业之一。利用干细胞作为种子细胞开展奶山羊的遗传育种以及转基因克隆的研究,可能是加速优质高产奶山羊扩繁的捷径之一。本试验对关中奶山羊的骨髓源 MSCs 进行了分离培养,并对其基本的生物学特性进行了研究,以为奶山羊细胞发育分化、育种及动物疾病模型等研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 3 月龄左右雄性关中奶山羊羔羊,购自陕西杨凌附近农村。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清 (FBS), Hyclone 公司产品; α -MEM, Gibco 公司产品; L-谷氨酰胺、胰蛋白酶、青霉素、硫酸链霉素、EDTA、鼠抗人 α -actin、

β -巯基乙醇 (β -ME), 均为 Sigma 公司产品; 兔抗鼠 Nanog、兔抗鼠 Oct4、鼠抗人 CD49f ($\alpha 6$ 整合素)、兔抗鼠 AFP, 均为 Chemicon 公司产品; 鼠抗人 β -III Tubulin、鼠抗人 CT3, 均为 DSHB 公司产品; 兔抗鼠 Vasa, 为 Abcam 公司产品; SP 超敏试剂盒, 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; RT-PCR Kit, 为 Fermentas 公司产品。

1.2 奶山羊骨髓源 MSCs 的分离及培养

无菌采集 3 月龄左右雄性关中奶山羊羔羊股骨,剔除肌肉、筋膜、骨膜、软骨等,用吸有培养液的一次性注射器冲出骨髓,置于离心管中,加入等体积的无血清培养液,在 1 500 r/min 离心 10 min,将细胞团用含体积分数 10% FBS 的 α -MEM 制成细胞悬液,以 $2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 接种入培养皿,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 、饱和湿度的培养箱内培养。

1.3 奶山羊骨髓源 MSCs 的形态及生长特性

1.3.1 细胞形态学观察 每日在倒置显微镜下观察细胞形态和贴壁情况。

1.3.2 细胞生长曲线的测定 分别取生长状况良好的 P10、P13、P19 细胞悬液,以 $1.0 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 接种于 24 孔培养板中,每孔 0.5 mL,每天各取 3 孔消化贴壁细胞并计数,每孔计数 3 次,连续 8 d,计算平均值。以培养时间为横坐标,细胞数为纵坐标,绘制细胞传代后生长曲线。根据 Patterson 公式计算细胞群体倍增时间:

$$TD = t \times \lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)。$$

式中: TD 为细胞群体倍增时间, t 为培养时间 (h), N_0 为接种后的细胞数, N_t 为培养 t h 后的细胞数。

1.4 奶山羊骨髓源 MSCs 多能性标志基因的检测

1.4.1 免疫细胞化学法 接种第 6 代奶山羊骨髓源 MSCs 于 48 孔培养板中,待其生长至 50% 融合

时,弃去上清,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;加入体积分数 4%多聚甲醛,固定 15 min,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;加入体积分数 3% H₂O₂,室温静止 10 min,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;5% BSA 室温封闭 30 min,弃去液体,分别滴加兔抗鼠 Nanog(1 : 200 倍稀释)、兔抗鼠 Oct4 (1 : 500 倍稀释)、兔抗鼠 TERT(1 : 200 倍稀释)、兔抗鼠 C-myc(1 : 500 倍稀释)抗体,4 ℃过夜,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min(用 PBS 代替一抗作阴性对照);加入生物素标记的二抗,室温下孵育 1 h,加入链霉菌抗生物素蛋白过氧化酶,室温孵育 30 min,DAB 显色 30 min,显微镜下观察并照相。

1.4.2 RNA 的抽提和 RT-PCR (1) 引物的设计和合成。根据猪的 *Oct4*、*C-myc* 基因,人的 *TERT*、*β-actin* 基因的 cDNA 序列和绵羊 *Nanog* 的同源序列(登录号分别为: NM_001113060, AB292846, NM_198255.2, NM_001101.3, AY786437.2),采用 Primer premier 5.0 软件设计相应引物,引物序列及

表 1 奶山羊骨髓源 MSCs 多能性基因的引物序列
Table 1 Primer sequences of the pluripotency genes of MSC

引物名称 Gene	上游引物(5'→3') Forward primer	下游引物(5'→3') Reverse primer	退火温度/℃ Annealing temperature	产物长度/bp Size
Oct4	GAAGCTGGACAAGGAGAAGCT	CATGCTCTCCAGGTTGCCTC	58	379
Nanog	ATGCCTGAAGAAAGTTACGC	AGGCTGTATGTTGAGAGGGT	52	819
TERT	GTGTGCTGCAGCTCCCATTTTC	GCTGCGTCTGGGCTGTCC	58	264
C-myc	ACGCTGACCAAGGTAT	CTGAGGTGTTTCATACTGA	54	210
β-actin	ACGGCATCGTCACCAACT	AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG	58	583

1.5 奶山羊骨髓源 MSCs 的成瘤性检测

收集第 3,6 代奶山羊骨髓源 MSCs 制成单细胞悬液,调整细胞密度至 3.0×10⁷ mL⁻¹,以 1 mL 注射器吸取 0.2 mL 细胞悬液接种于裸鼠背部皮下,饲养 30 d,观察有无肿瘤形成。

1.6 奶山羊骨髓源 MSCs 分化能力的检测

1.6.1 自发分化 将 5~10 代奶山羊骨髓源 MSCs 按(3.2~4)×10⁴ mL⁻¹悬滴接种至 10.0 cm 悬浮培养皿皿盖上(皿底加 1 mL PBS,防止水分蒸发),盖上皿盖,于 37 ℃、体积分数 5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养,观察类胚体(EBs)的形成。约 2~3 d 后,将形成的 EBs 接种至无饲养层的 48 孔培养板上,7 d 后免疫细胞化学检测 3 胚层特异标志蛋白 β-Ⅲ Tubulin(外胚层,鼠抗人 β-Ⅲ Tubulin,1 : 1 000 倍稀释)、α-actin(中胚层,鼠抗人 α-actin,1 : 500 倍稀释)和 AFP(内胚层,兔抗鼠 AFP,1 : 200 倍稀释)的表达情况。

1.6.2 向神经细胞的定向分化 将生长良好的第

反应条件见表 1。引物均由上海生工生物工程服务有限公司合成。

(2) RT-PCR。收集第 6 代奶山羊骨髓源 MSCs,采用 Trizol 试剂盒抽提总 RNA,调整 RNA 质量浓度至 500 μg/μL,按照 Fermentas 公司反转录试剂盒说明书反转录得到 cDNA,RT-PCR 检测 *Oct4*、*Nanog*、*TERT*、*C-myc* 基因的表达情况,以 *β-actin* 基因为内参基因。PCR 反应体系为 15 μL: 2.5 mmol/L dNTP Mixture 1.2 μL,10×buffer 1.5 μL,MgCl₂ 1.6 μL,r Taq 酶 0.1 μL,上、下游引物(10 pmol/L)各 0.3 μL,模板 DNA (1 000 ng/μL)0.5 μL,加双蒸水至 15 μL。PCR 反应程序为:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 30 s,52~58 ℃(具体温度因引物而异)退火 30 s(退火时间因基因而异,其中 Nanog 引物退火 45 s),72 ℃延伸 30 s(其中 Nanog 引物延伸 45 s),共 35 个循环;72 ℃延伸 10 min,4 ℃保存。

12 代奶山羊骨髓源 MSCs 接种到 48 孔培养板中,待细胞铺满皿底的 60% 时,诱导组细胞用 2 mmol/L β-ME 的 α-MEM 诱导培养液预诱导 24 h,之后用含有 5 mmol/L β-ME 的基础培养液正式诱导 5 h,进行免疫细胞化学检测;对照组细胞在常规 α-MEM 完全培养液中培养。试验所用的神经细胞抗体为兔抗鼠 Nestin(1 : 1 000 倍稀释)和鼠抗人 β-Ⅲ Tubulin(1 : 1 000 倍稀释)。

1.6.3 向心肌细胞的定向分化 采用 1.6.1 方法形成 EBs,接种至无饲养层的 48 孔培养板中,每孔接种 1 个 EBs,用含有 10 μmol/L 5-氮胞苷(5-Aza)的 α-MEM 诱导液培养 48 h,转至 α-MEM 完全培养液中培养,取贴壁 9 d 的细胞,采用 1.4.1 方法进行鼠抗人 CT3(1 : 1 000 倍稀释)和鼠抗人 α-actin(1 : 500 倍稀释)免疫细胞化学染色,检测心肌细胞特异标志蛋白的表达。

1.6.4 向生殖细胞的定向分化 采用 1.6.1 方法形成 EBs,接种至无饲养层的 48 孔培养板中,每孔

接种 1 个 EBs,用含有 1×10^{-5} mol/L RA 的 α -MEM 诱导液培养,取贴壁培养 10 d 的细胞进行生殖细胞特异标志基因的检测,并计算阳性率。免疫细胞化学染色的抗体分别为兔抗鼠 Vasa(1 : 1 000 倍稀释)、兔抗鼠 Scp3(1 : 300 倍稀释)、鼠抗人 CD49f(1 : 500 倍稀释)。

2 结果与分析

2.1 奶山羊骨髓源 MSCs 的形态及生长特性

在原代培养 12~24 h 后,可见成纤维样细胞开

始贴壁,一般 7~10 d 汇合;在传代培养后,细胞主要表现为梭形、纺锤形,少数为多角形,多为单核细胞(图 1A,B)。细胞一般 3~5 d 传代 1 次,最高传至 22 代。从生长曲线(图 1C)可以看出,第 10,13,19 代细胞分别在第 2,3,4 天进入快速增长期,此后第 10 代细胞仍然保持旺盛的增殖趋势,而第 13 和 19 代细胞增殖明显变慢。根据计数结果,上述 P10、P13 和 P19 代细胞在对数生长期的群体倍增时间依次为 30.4,37.5 和 42.0 h。

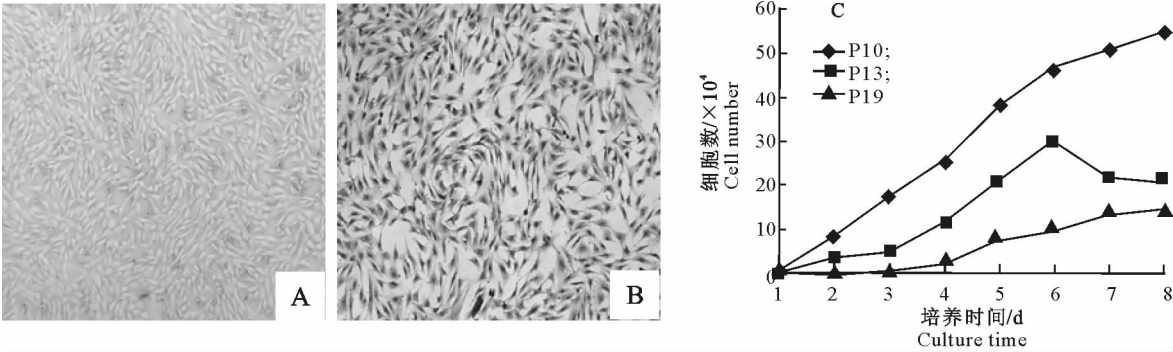


图 1 奶山羊骨髓源 MSCs 的形态和生长曲线

A. 第 3 代 MSCs(50 $\times$);B. 第 9 代 MSCs 的 HE 染色(50 $\times$);C. MSCs 的生长曲线

Fig.1 Morphology and growth curves of MSCs

A. The third passage MSCs(50 $\times$);B. HE staining of the 9th passage MSCs(50 $\times$);C. The growth curves of MSCs

2.2 奶山羊骨髓源 MSCs 多能性标志基因表达的检测

色结果(图 2)显示,分离得到的 MSCs 呈 Oct4、Nanog、TERT、C-myc 阳性。

2.2.1 免疫细胞化学检测结果 免疫细胞化学染

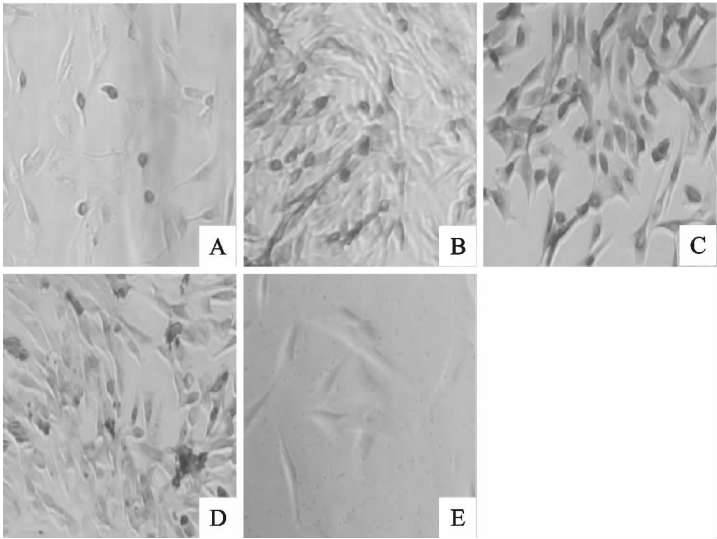


图 2 奶山羊骨髓源 MSCs 的免疫细胞化学检测结果(200 $\times$)

A. Oct4 染色;B. Nanog 染色;C. C-myc 染色;D. TERT 染色;E. 阴性对照

Fig.2 Analysis of immunocytochemistry of dairy goat bone marrow-derived mesenchymal stem cells(200 $\times$)

A. Oct4 staining;B. Nanog staining;C. C-myc staining;D. TERT staining;E. Negative control

2.2.2 RT-PCR 结果 RT-PCR 检测结果(图 3)表明,本试验分离得到的 MSCs 表达 *Oct4*、*Nanog*、*TERT*、*C-myc* 基因,目的条带与设计的基因大小一致。

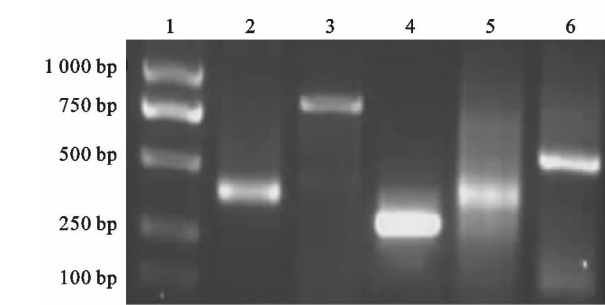


图 3 奶山羊骨髓源 MSCs 的 RT-PCR 检测结果
1. DNA Marker DL2000;2. *Oct4* 基因;3. *Nanog* 基因;
4. *C-myc* 基因;5. *TERT* 基因;6. *β-actin* 基因
Fig. 3 Analysis of RT-PCR of dairy goat bone marrow-derived mesenchymal stem cells
1. DNA Marker DL2000;2. *Oct4*;3. *Nanog*;4. *C-myc*;
5. *TERT*;6. *β-actin*

2.4 奶山羊骨髓源 MSCs 分化能力的检测

2.4.1 自发分化能力 分离得到的 MSCs 悬滴培养 2 d 即可聚集形成 EBs (图 5A),形态呈圆球形,折光性良好。将形成的 EBs 于 48 孔培养板贴壁培养,1~2 d 时细胞从 EBs 周边迁出,并呈放射性生

2.3 奶山羊骨髓源 MSCs 的成瘤性检测

MSCs 细胞于裸鼠皮下注射,30 d 后在四肢、皮下及内脏均未发现成瘤现象,初步表明该细胞无成瘤能力(图 4A-B)。

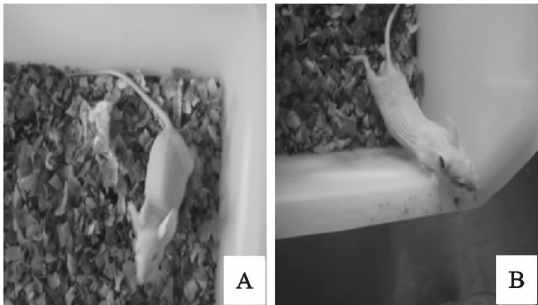


图 4 奶山羊骨髓源 MSCs 的成瘤性检测结果
A. 注射第 3 代细胞的裸鼠;B. 注射第 6 代细胞的裸鼠
Fig. 4 Analysis of tumorigenicity of dairy goat bone marrow-derived mesenchymal stem cells
A. The nude mice after injecting the 3rd passage cells;
B. The nude mice after injecting the 6th passage cells

长(图 5B)。培养 7 d 后进行免疫细胞化学检测,结果表明,EBs 迁出的部分细胞表达 β -III Tubulin(外胚层)、心肌 α -actin(中胚层)和 AFP(内胚层)3 胚层特异标志蛋白(图 5C-F)。

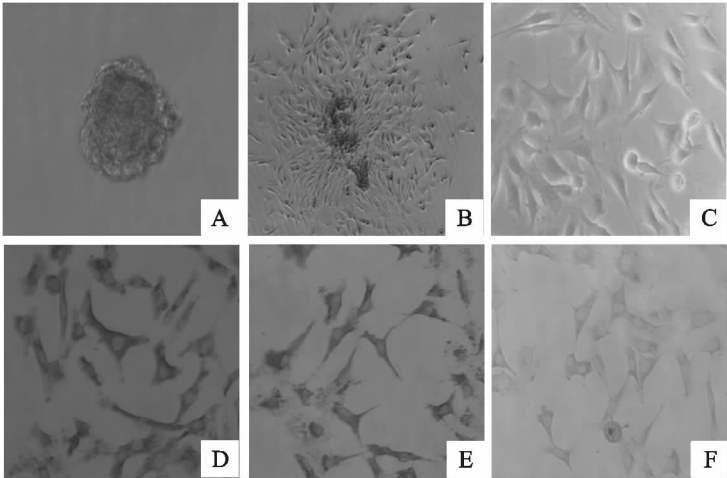


图 5 奶山羊骨髓源 MSCs 向 3 胚层自发分化的免疫细胞化学染色结果
A. 类胚体(200×);B. EBs 周边迁移出细胞(50×);C. 阴性对照(200×);
D. AFP 染色(200×);E. β -III Tubulin 染色(200×);F. α -actin 染色(200×)
Fig. 5 Immunocytochemistry analysis of MSCs spontaneously differentiated into three germ layers
A. The embryonic body(200×);B. The proliferation of the growth of EBs(50×);C. Negative control(200×);
D. AFP staining(200×);E. β -III Tubulin staining(200×);F. α -actin staining(200×)

2.4.2 定向分化 (1)向神经细胞的定向分化。在预诱导 24 h 后 MSCs 变长,出现多个触角,三角形细胞居多;正式诱导 5 h 后进行免疫细胞化学染色,

结果 Nestin 呈弱阳性, β -III Tubulin 呈强阳性(图 6A—C)。

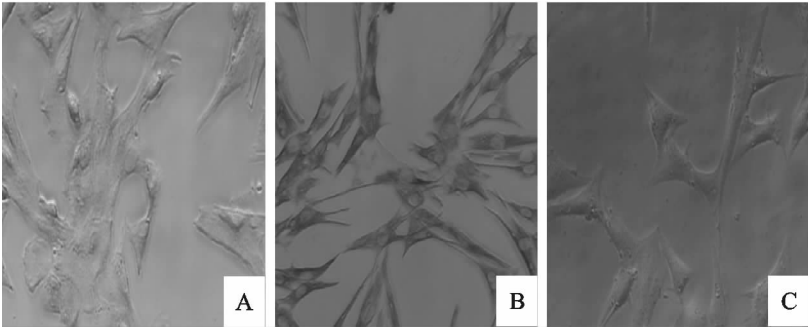


图 6 奶山羊骨髓源 MSCs 向神经细胞诱导分化的免疫细胞化学染色结果(200 $\times$)
A. Nestin 染色;B. β -III Tubulin 染色;C. 阴性对照

Fig. 6 Immunocytochemistry staining of MSCs differentiated toward neurocytes (200 $\times$)
A. Nestin staining;B. β -III Tubulin staining;C. Negative control

(2)向心肌细胞的定向分化。MSCs 在悬滴培养 2 d 可形成 EBs,在 48 孔培养板贴壁诱导后 EBs 周围可生长出长梭形细胞,进一步培养 EBs 周围可

出现杆状、索形、类似早期心肌样细胞,并出现了肌管样结构(图 7A)。免疫细胞化学染色结果表明,诱导后的细胞呈 CT3、 α -actin 阳性(图 7B—D)。

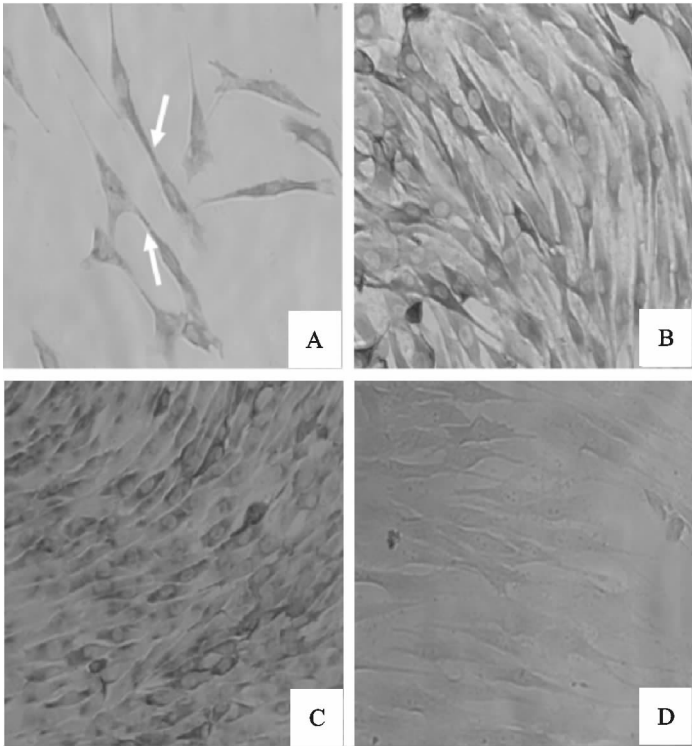


图 7 奶山羊骨髓源 MSCs 向心肌细胞诱导分化的免疫细胞化学染色结果(200 $\times$)
A. 肌管样细胞(箭头所示);B. CT3 染色;C. α -actin 染色;D. 阴性对照

Fig. 7 Immunocytochemistry staining of MSCs differentiated toward cardiocytes (200 $\times$)
A. The myotube-like cells (arrows);B. CT3 staining;C. α -actin staining;D. Negative control

(3)向生殖细胞的定向分化。免疫细胞化学检测结果显示, MSCs 诱导细胞表达 Vasa、Scp3、

CD49f 等生殖细胞标记(图 8A—D),其阳性率分别达到 35.7%,24.0%和 14.0%。

3 讨 论

MSCs 是存在于骨髓中的一种分泌多种细胞因子的较原始的骨髓基质细胞,具有自我更新和多向分化潜能,在体外适宜的环境下,可增殖并能诱导分化形成包括肌肉、骨骼、肌腱、神经、心肌等在内的多种细胞类型。与 ESCs 细胞相比, MSCs 具有取材方便、不受伦理限制等优势,另外,骨髓源 MSCs 具有自体或异体的免疫调节特性,使其在免疫抑制方面具有重要的理论意义和使用价值,因此 MSCs 可能成为组织工程和细胞移植治疗的优良种子细胞。

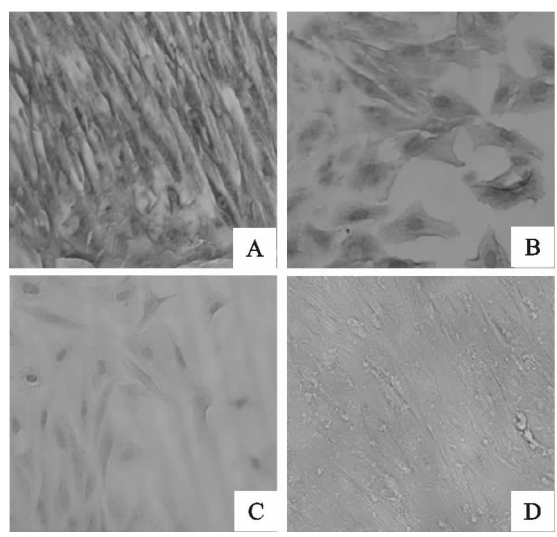


图 8 奶山羊骨髓源 MSCs 向生殖细胞诱导分化的免疫细胞化学染色结果(200×)

A. Vasa 染色;B. Scp3 染色;C. CD49f 染色;D. 阴性对照
Fig. 8 Immunocytochemistry staining of MSCs differentiated toward germ cells (200×)
A. Vasa staining;B. Scp3 staining;C. CD49f staining;D. Negative control

目前,有关 MSCs 的研究报道绝大多数集中在模式动物小鼠和人类上,而在家畜,尤其是奶山羊干细胞上的研究报道很少。本试验比较系统地研究了奶山羊骨髓源 MSCs 的生物学特性,发现其具有较强的增殖能力,且具有类似已报道的小鼠胚胎干细胞的生物学特性,如表达 *Oct4*、*Nanog*、*C-myc* 基因等。更重要的是,本研究初步证实,奶山羊骨髓源 MSCs 具有向各种重要功能细胞,如神经细胞、心肌细胞、生殖细胞分化的潜能,表明其可用于神经细胞、心肌细胞、生殖细胞发育分化和组织器官修复的研究。

成年动物的心肌和神经细胞再生能力很差,易患各种系统性疾病,因此,用干细胞分化的神经细胞

和心肌细胞,作为神经系统和心脏等退化性疾病的 治疗及其发育分化研究具有重要的意义。多数研究 采用 5-Aza、 β -巯基乙醇等诱导 ESCs 细胞等向心肌 细胞和神经细胞分化^[8-9]。本试验分别采用 5-Aza 和 β -巯基乙醇诱导奶山羊 MSCs 向心肌细胞和神经 细胞诱导分化,结果发现 MSCs 经 5-Aza 诱导能分 化形成心肌样细胞,具有肌管样结构,并表达 CT3、 心肌 α -actin 等心肌细胞特异性功能蛋白;经 β -巯基 乙醇诱导后形成了神经样细胞,表明分离得到的奶 山羊 MSCs 具有向神经和心肌细胞分化的潜能。

传统观点认为,只有胚胎干细胞能够分化成多种组织细胞,但最近的研究显示,成体干细胞也有多 向分化能力,并能打破胚层界限,横向发展为多种成 熟细胞^[1],胚胎干细胞和一些成体干细胞还可以分 化为生殖细胞^[10-12]。本研究采用 RA 对骨髓源 MSCs 形成的 EBs 进行诱导,结果显示,在 RA 诱导 后, MSCs 开始表达 Vasa、Scp3 和 CD49f 等生殖细 胞特异性标记基因,表明其可能具有向生殖细胞分 化的潜能,这些研究结果与人类干细胞的研究结果^[10]基本一致。RA 可以促进小鼠 ESCs 分化及原 始生殖细胞(PGC)的增殖、存活与自我更新,并且可 以促使精母细胞分化到减数分裂前期^[11]。Vasa、 Scp3、CD49f 是生殖细胞的特异性标记基因。Shi- nohara 等^[13]发现,小鼠精原干细胞表达 β 1 和 α 6 整 合素表面标记,并用抗体鉴定了精原细胞。Castril- lon 等^[14]研究证实,人类 Vasa 是生殖细胞高度特 异性的标记,只在生殖细胞中特异性表达,而体细胞 不表达。Scp3 是雄性生殖细胞中联会复合体的重 要组成部分,同时对精母细胞中染色体联会、减数分 裂和精子的发生也起着重要的作用^[15]。本试验经 诱导的细胞表达 Vasa、Scp3、CD49f,即表达减数分 裂前生殖细胞分化特异基因,说明 MSCs 经诱导可 能分化为生殖细胞,这与 Nayernia 等^[16]、Drusenhei- mer 等^[17]、Lue 等^[18]的试验结论一致。至于 MSCs 经诱导后的细胞能否真正进入减数分裂后期,完 成减数分裂、产生成熟的单倍体精子,还需要进一步 研究。如果 MSCs 能成功诱导为成熟的精子,将有可能为不育患畜和珍稀濒危动物的繁育提供一种新的 治疗途径,在临床上具有广泛的应用前景。

[参考文献]

[1] Reyes M, Lund T, Lenvik T, et al. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells [J]. Blood, 2001, 98(9): 2615-2625.

- [2] Dennis J E, Charbord P. Origin and differentiation of human and murine stroma [J]. Stem Cells, 2002, 20(3): 205-214.
- [3] Barry F P, Murphy J M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36(4): 568-584.
- [4] Jiang Y, Jahagirdar B N, Reinhardt R L, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow [J]. Nature, 2002, 418: 41-49.
- [5] 洪建琴, 王成友, 范子冰, 等. 小鼠骨髓间充质干细胞的体外培养及鉴定 [J]. 深圳中西医结合杂志, 2009, 19(4): 201-203.
Hong J Q, Wang C Y, Fan Z B, et al. Culture and identify of bone marrow mesenchymal stem cells of mice [J]. Shenzhen Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2009, 19(4): 201-203. (in Chinese)
- [6] Shinohara T, Kato M, Takehashi M, et al. Rats produced by interspecies spermatogonial transplantation in mice and *in vitro* microinsemination [J]. PNAS, 2006, 103(37): 13624-13628.
- [7] Colter D C, Class R, DiGirolamo C M, et al. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow [J]. PNAS, 2000, 97: 3213-3218.
- [8] Wu K H, Yang S G, Zhou B, et al. Human umbilical cord derived stem cells for the injured heart [J]. Medical Hypotheses, 2007, 68(1): 94-97.
- [9] 徐路尧, 包普花, 张焕相, 等. 不同方法诱导大鼠骨髓间充质干细胞向神经样细胞的分化 [J]. 苏州大学学报: 医学版, 2009, 29(2): 197-200.
Xu L Y, Bao P H, Zhang H X, et al. Differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells into cells with a neural phenotype by two specific treatments [J]. Suzhou University Journal: Medical Science Edition, 2009, 29(2): 197-200. (in Chinese)
- [10] 林丽敏, 吴小英, 谢庆东, 等. 体内诱导人脐带间充质干细胞向男性生殖细胞分化的实验研究 [J]. 中国输血杂志, 2009, 22(3): 184-188.
Lin L M, Wu X Y, Xie Q D, et al. Differentiation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells into male germ cells [J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2009, 22(3): 184-188. (in Chinese)
- [11] Geijsen N, Horoschak M, Kim K, et al. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells [J]. Nature, 2004, 427: 148-154.
- [12] Lacham-Kaplan O, Chy H, Trounson A. Testicular cell conditioned medium supports differentiation of embryonic stem cells into ovarian structures containing oocytes [J]. Stem Cells, 2006, 24: 266-273.
- [13] Shinohara T, Avarbock M R, Brinster R L. Beta1 and alpha6 integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells [J]. PNAS, 1999, 96(10): 5504-5509.
- [14] Castrillon D H, Quade B J, Wang T Y, et al. The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage [J]. PNAS, 2000, 97(17): 9585-9590.
- [15] 侯越, 吴应积, 罗奋华, 等. 绒山羊 Scp3 基因的克隆及睾丸中第一轮减数分裂的发生 [J]. 动物学研究, 2009, 30(3): 341-344.
Hou Y, Wu Y J, Luo F H, et al. Cloning of cashmere goat Scp3 gene and determining the first round meiosis in the testes [J]. Zoological Research, 2009, 30(3): 341-344. (in Chinese)
- [16] Nayernia K, Lee J H, Drusenheimer N, et al. Derivation of male germ cells from bone marrow stem cells [J]. Lab Invest, 2006, 86(7): 654-663.
- [17] Drusenheimer N, Wulf G, Nolte J, et al. Putative human male germ cells from bone marrow stem cells [J]. Soc Reprod Fert Suppl, 2007, 63: 69-76.
- [18] Lue Y, Erkkila K, Liu P Y, et al. Fate of bone marrow stem cells transplanted into the testis: potential implication for men with testicular failure [J]. Am J Pathol, 2007, 170(3): 899-908.

(上接第 18 页)

- [16] Tort J, Brindley P J, Knox D, et al. Proteinases and associated genes of parasitic helminthes [J]. Adv Parasitol, 1999, 43: 161-266.
- [17] White A C J. *Neurocysticercosis* a major cause of neurological disease world wide [J]. Clin Infect Dis, 1997, 24(2): 101-113.
- [18] Katunuma N, Murata E, Kakegawa H, et al. Structure based development of novel specific inhibitors for cathepsin L and cathepsin S *in vitro* and *in vivo* [J]. FEBS Lett, 1999, 458(1): 6-10.
- [19] Katunuma N, Tsuge H, Nukatsuka M, et al. Structure-based design of specific cathepsin inhibitors and their application to protection of bone metastases of cancer cells [J]. Arch Biochem Biophys, 2002, 397(2): 305-311.
- [20] Kongkerd N, Uparanukraw P, Morakote N, et al. Identification and characterization of a cathepsin L-like cysteine protease from *Gnathostoma spinigerum* [J]. Mol Biochem Parasitol, 2008, 160(2): 129-137.
- [21] [美]布劳沃. 基因克隆和 DNA 分析 [M]. 魏群, 译. 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2003.
[American] Brown T A. Gene cloning and DNA analysis [M]. Translated by Wei Q. 4th ed. Beijing: Higher Education Press, 2003. (in Chinese)