

· 基础研究 ·

兔骨髓间充质干细胞的体外培养及相关检测的实验研究

王萧枫¹, 童培建², 金红婷², 吴银生¹

(1. 浙江省温州市中西医结合医院, 浙江 温州 325000; 2. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053)

摘要 目的:建立体外培养扩增、检测鉴定兔骨髓间充质干细胞的方法, 观察其生物学特性。**方法:**采用密度梯度离心法和贴壁分离法相结合, 体外培养扩增兔骨髓间充质干细胞, 观察细胞生长速度和形态变化; 选择第 3 代细胞分别以特定培养液诱导, 观察其向成骨细胞、成脂细胞、成软骨细胞的分化能力, 采用流式细胞学方法分别检测 CD29、CD44、CD34、CD45 的表达情况。**结果:**培养的细胞长梭形, 呈成纤维细胞样生长, 具有塑料贴附性、传代细胞生长迅速, 在诱导下均能分化为成熟的成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞。流式结果表明, CD29 阳性细胞比率 92.5%, CD44 阳性细胞比率 86%; CD34 阳性比率 0.77%, CD45 阳性细胞比率 0.32%。**结论:**应用密度梯度分离法和贴壁筛选法相结合能从兔骨髓中分离培养出高纯度的兔 MSCs, 生长旺盛、增殖能力强, 在条件诱导下具有向成骨细胞、脂肪细胞和软骨细胞分化的潜能。

关键词 间充质干细胞 体外培养 诱导分化 流式细胞术

Approaches To Isolate, Culture and Identify The Rabbit Marrow Mesenchymal Stem Cells WANG Xiao-feng*, TONG Pei-jian, JIN Hong-ting, et al. * Hospital of the Integration of Traditional Chinese and Western Medicine of Wenzhou City, Wenzhou 325000, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective: To explore the approaches to isolate, culture and identify the bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) of rabbits in vitro. **Methods:** Rabbit MSCs were extracted through the density gradient centrifugation and separation of the combination adherent, cell growth rate and morphological changes was observed using the inverted microscope, select the P3 cells induced using special media supplemented, observe the feasibility of differentiation into bone cells, fat cells, cartilage cells. Expression of CD29, CD44, CD34, CD45 was detected using flow cytometry. **Results:** The cultured cells showing long fusiform and fibroblast-like growth, plastic attachment and rapid growth of passage cell, they can differentiate into mature bone cells, cartilage cells and fat cells under induction. Flow cytometry results showed that for the P3 cells, about 92.5% of the cells expressed CD29, about 86% of the cells expressed CD44, 0.77% of the cells expressed CD34, 0.32% of the cells expressed CD45. **Conclusion:** The density gradient separation and screening adherence combination isolated from rabbit bone marrow in vitro with high purity MSCs, vigorous growth, proliferation ability, under the conditions with the induction of osteoblasts, adipose cells and cartilage cells potential.

Key words Mesenchymal stem cells; Cell culture techniques

股骨头坏死是骨科的常见疑难病, 治疗方法很多, 但远期效果都不理想。近来研究发现, 骨髓间充质干细胞 (Mesenchymal Stem Cells, MSCs) 和骨细胞的数量减少或活性降低是导致股骨头坏死的重要原因^[1], 有学者行干细胞移植或灌注骨髓治疗股骨头坏死, 表明干细胞对治疗早期股骨头坏死是安全有效的。虽然 MSCs 在骨髓中的含量很低, 但作为一种具有多向分化潜能的干细胞, 愈来愈成为干细胞研究的热点^[2-3]。本研究旨在探索兔 MSCs 体外分离培养、纯化、增殖的最佳条件及探讨其生物学特性, 建立一种

基金项目: 获浙江省卫生厅 (2009A197) 浙江省中医药管理局 (2009YA021)、温州市科技局 (Y20090039) 等相关项目资助

简单有效、经济实用的体外分离培养 MSCs 方法, 并进行相关检测鉴定。

1 材料与方法

1.1 MSCs 的体外分离和原代培养 取 8 周龄新西兰白兔 (浙江中医药大学实验动物中心提供), 全身麻醉后固定于手术台上, 常规备皮、消毒, 无菌下用 16 号骨穿刺针在两侧股骨大转子部骨皮质穿刺直达髓腔, 以 5 mL 注射器 (内含肝素 1 500 U) 抽出骨髓 5 mL 注入离心管中, 等量 DMEM (低糖) 培养液 (内含肝素 3 000 U · mL⁻¹) 混匀。反复吹打抽吸成单细胞悬液, 缓慢注入等体积的淋巴细胞分离液中, 1 200 r 离心 5 min 后, 吸去上清, 按 1:1 加入淋巴细胞分离液

4 mL, 3 000 r 离心 30 min 后分层。可见管内液体分为 4 层, 最上层为红色的培养液层, 第 3 层为乳白色的 Percoll 分离液层, 两层交界处为高约 1.0 mm 的灰白色云雾状层, 为单个核细胞层, 底层紧俯试管壁, 为一薄层红色细胞层, 为红细胞等。

小心吸取含有 MSCs 的中层骨髓有核细胞, 移至另一离心管中, 无血清 DMEM 培养基漂洗, 500 r 离心 5 min, 以除去残余的 Percoll 分离液。用含 10% 胎牛的 DMEM 培养基重新悬浮细胞, 以 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 细胞密度接种于培养瓶中, 37 °C, 5% CO₂ 饱和湿度孵箱中培养。

1.2 MSCs 的传代、扩增培养 48 h 后弃去未贴壁细胞, PBS 清洗 2 次, 更换培养液, 以后每 3 ~ 4 d 换液 1 次。大约 10 d, 当观察到细胞接近 80% ~ 90% 融合时结束原代培养。弃上清, 以 PBS 冲洗 2 次, 用 0.25% 胰蛋白酶消化 2 min, 待细胞形态开始皱缩、间隙开始增大时, 终止消化并加入 3 ~ 5 ml PBS, 用吸管轻轻吹打, 移入离心管 1000 r 离心 3 min, 弃上清, 加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 按 1:2 比例传代培养。

1.3 绘制培养细胞生长曲线 取生长良好 1 ~ 8 代传代细胞消化离心收集, 然后制成浓度为 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的细胞悬液, 接种于 24 孔培养板。每孔 1 mL, 每日取出 3 孔, 血球计数板进行细胞计数, 计算均值。以细胞数(N)为纵坐标, 时间(T)为横坐标, 绘制生长曲线。

1.4 MSCs 活力测定 取 1 ~ 8 代传代细胞, 制成单细胞悬液, 浓度 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$, 以 0.4% 台盼蓝作为染色剂, 用细胞计数板计数活细胞和死细胞, 共 3 次, 取 3 次平均值, 计算细胞活力: 活细胞率(%) = 活细胞数/(活细胞数+死细胞数) × 100%。

1.5 MSCs 的鉴定

1.5.1 成骨定向诱导分化 选择生长良好的 P3 代细胞, $1 \sim 2 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ 单细胞悬液接种到六孔板中, 待细胞生长至培养板底 70 ~ 80% 面积时, 吸去旧培养液, 更换为每孔 2 mL 成骨细胞诱导剂(含 10% FBS, $10^{-8} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 地塞米松、50 mg · L⁻¹ 抗坏血酸磷酸盐、10 mmol · L⁻¹ 的 β-磷酸甘油及 1% 的双抗)进行成骨诱导分化。每 2 ~ 3 d 更换 1 次诱导培养基, 诱导 3 周, 直至可观察到明显钙结节后, 对钙结节进行茜素红染色。

1.5.2 成脂定向诱导分化 同上法, 待细胞生长至培养板底达到 100% 融合时, 吸去旧培养液, 更换为每孔 2 mL 成脂诱导分化完全培养基(含 10% FBS 的

DMEM、地塞米松 $1 \mu\text{L}$ 、胰岛素 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、吡啶美辛 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、IBMX $0.5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 进行成脂诱导分化。每 2 ~ 3 d 更换 1 次诱导培养基, 待诱导第 6 天后按半量换液, 诱导 3 周后, 观察脂滴已较为成熟, 对其进行油红 O 染色。

1.5.3 成软骨定向诱导分化 同上法, 将细胞密度调整到 $1 \sim 2 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 接种到六孔板中, 待细胞生长至培养瓶底呈现极度密集融合时(呈过度培养状态), 更换成软骨细胞诱导剂(含 TGF-β $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、IGF-β $110 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、转铁蛋白 $6.25 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、地塞米松 $10 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、维生素 C $0.05 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 进行成软骨诱导分化。每 2 ~ 3 d 更换 1 次诱导培养基, 诱导 3 周后进行阿利辛蓝染色。

1.5.4 表面标志物检测 细胞生长接近融合时, 取第 5 代生长良好的细胞, 消化后用 PBS 缓冲液冲洗 2 遍, 并制备成 $1 \times 10^5 \text{mL}^{-1}$ 浓度的细胞悬液, 取 100 μL 细胞悬液与抗兔单抗(CD29-FITC, CD44-FITC, CD34-ECD, CD45-PE) 和同型阴性对照抗兔 IgG1-FITC, 室温避光孵育 30 min 后送流式细胞仪检测。Cell-Quest 软件分析。

2 结 果

2.1 细胞形态学观察 原代细胞体外接种 24 h, 可见少量散在单个核的细胞贴壁, 圆球形为主, 核大, 胞核多位于胞体中央, 核浆比例大, 核浆分界清晰, 折光性好。48 ~ 96 h 后, 见贴壁的细胞数量逐渐增多, 大小形态渐趋一致, 细胞铺伸变大, 呈扁圆球形、短梭形, 出现核分裂相。每 3 d 换液 1 次, 逐渐形成多个由大小、形态较为均一的长梭形细胞组成的增殖集落, 呈旋涡状排列, 培养 10 ~ 12 d, 细胞生长即可达 80% ~ 90% 的单层融合(图 1A)。刚传代的 MSCs 呈圆形, 接种 2 ~ 4 h 后, 开始附壁铺伸, 重新成为梭形, 24 h 后见已基本完成贴壁, 48 ~ 72 h 开始快速增殖, 7 ~ 8 d 时可达 80% ~ 90% 的融合。传代细胞与原代相比, 生长较快, 细胞均一性更好, 呈长梭形, 无马蹄形细胞及悬浮细胞生长。第 1 ~ 8 代附壁和生长速度无明显区别。但随传代次数增多, 细胞形态出现多样性, 逐渐呈老化现象。

2.2 传代生长曲线 第 1 ~ 3 代传代细胞生长曲线基本相同, 传代接种后开始数量稍微减少, 为潜伏适应期, 第 3 天大量增加, 第 6 天达曲线高峰, 随后增殖细胞进入平台期。第 5、6 代细胞生长曲线高峰降低,

细胞倍增时间延长至 24 h 和 32 h。

2.3 MSCs 活力测定 第 1~8 代传代细胞存活率如图 2 所示,第 1~4 代细胞存活率大致相等为 90% 以上,5 代细胞活力开始呈明显下降趋势,第 4 代存活率降至 85%,第 8 代存活率仅为 70%。

2.4 MSCs 的鉴定

2.4.1 成骨定向诱导分化 成骨诱导 1 周,细胞变大呈多角形,胞质内细胞颗粒增多;8~10 d,胞质内充满颗粒,细胞呈集落样生长,细胞间可见钙质沉积;12~14 d,细胞结节中心的细胞逐渐融合失去细胞结构,钙结节形成明显,18~21 d,经茜素红染色呈红色结节(图 1B)。茜素红染色实验为成骨诱导中晚期鉴定细胞分化为钙化结节的定性指标。

2.4.2 成脂定向诱导分化 成脂诱导约 3 d,细胞从长梭形类成纤维细胞外观逐渐变为类圆形或椭圆形,并且出现充满小脂滴的细胞,1 周后细胞内脂滴增大明显,逐渐聚集融合形成大的脂滴。2 周后经油红 O 染色阳性表现,细胞内脂滴呈明亮橙红色(图 1C)。油红 O 染色实验被公认为细胞内脂滴聚集定性染色的金标准。

2.4.3 成软骨定向诱导分化 成软骨诱导 2~3 d,细胞开始逐渐发生聚集,至第 14 天时,在细胞聚集的部位可见高密度的细胞团,呈斑片状或结节状;随着诱导时间的延长至 21 天,聚集的细胞团数量有所增加,细胞团块逐渐增大,高度聚集生长的细胞团块呈斑片状或结节状,表面会变得光滑呈胶质,周围细胞呈放射状(图 1D)。经阿利辛蓝染色结节及周边聚集的细胞呈淡蓝色。

2.4.4 流式细胞仪检测结果 培养的第 3 代兔 MSCs 中 CD29 阳性细胞比率 92.5%,CD44 阳性细胞比率 86%;CD34 阳性比率 0.77%,CD45 阳性细胞比率 0.32%,CD34、CD45 为阴性,基本不表达,证明这些细胞是非造血干细胞。

3 分析与讨论

MSCs 是目前公认具有实用价值的骨组织工程种子细胞,利用它进行组织工程学研究有如下优势:①取材方便且对机体无害,简单的骨髓穿刺即可获得。②自体来源,在进行移植时不存在组织配型及免疫排斥问题。③理论上由 MSCs 能分化为所有的间质组织类型。目前已经应用于临床试验进行骨和软骨损伤的修复。例如,美国 FDA 已经批准的有关 MSCs8 项临床试验中,4 项涉及骨和软骨组织的修复^[4-5]。

骨髓中有多种细胞成分,MSCs 含量极低,与造血干细胞等其他细胞相比,通常 $1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$ 个有核细胞中仅有 1 个 MSCs^[6],并随年龄的增加,细胞数量逐渐减少。因此如何简便有效地从骨髓中获取高纯度的 MSCs 显得尤为重要,亦是骨组织工程技术应用和推广的前提。

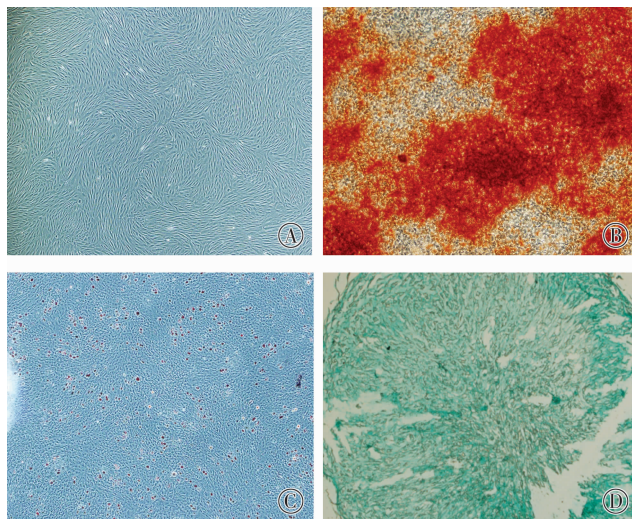


图 1 MSCs 体外培养细胞形态学变化光镜片

①培养第 10 天 MSCs 原代细胞生长情况 $\times 40$;②MSCs 成骨诱导分化后茜素红染色 $\times 100$;③MSCs 成脂诱导分化后油红 O 染色 $\times 40$;④MSCs 成软骨诱导分化后阿利辛蓝染色 $\times 200$

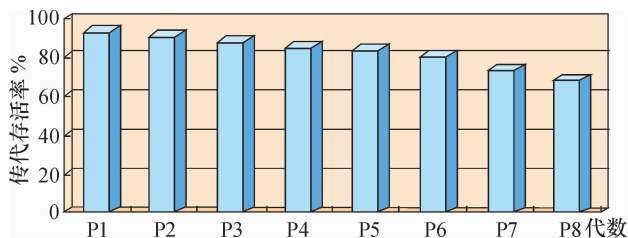


图 2 第 1~8 代传代细胞存活率

常用的骨髓间充质干细胞分离方法包括:贴壁培养分离法、密度梯度离心法、流式细胞离心法、免疫磁性分离法等^[7]。密度梯度离心法:主要根据骨髓中细胞成分的比重不同,清除红细胞,分离提取骨髓单个核细胞进行贴壁培养。Pittenger 等^[8]发现,通过密度梯度离心法分离培养的 MSCs 在第 1 代纯度可达 95%,第 2 代达 98%。因此该法被广泛采用。贴壁筛选法:是根据 MSCs 贴壁生长而造血系细胞悬浮生长的特性,通过定期换液除去不贴壁细胞,收集贴壁生长的 MSCs,其纯度可达 95%。此法简单、易行,所得细胞多能分化能力和增殖能力好,也被广泛采用。细胞表面分子标志分选法:一般采用流式细胞仪、免疫磁珠或免疫沉积法来进行分选,分选效率和纯度均较

高,但是由于 MSCs 表面缺乏特异性标志,且其费用昂贵及操作复杂,故此类法较少采用。

本实验采用密度梯度离心法和贴壁分离法相结合,先利用骨髓血中各种成分的密度不同,加入细胞分离液进行梯度离心,采集液面交界处的单个核细胞层的细胞,骨髓间充质干细胞多位于此层中,利用比重差别将绝大部分红细胞、粒细胞、脂肪细胞和血小板除去。MSCs 等基质细胞不易贴附在玻璃器皿上,因而选用塑料培养皿。根据 MSCs 与血细胞贴壁性能差异,随换液弃除悬浮生长的血细胞,将其进一步纯化。原代培养的贴壁细胞主要是 MSCs,也可能混有单核细胞、淋巴细胞,在每次传代消化中,MSCs 会迅速从培养瓶上脱落,而淋巴细胞、单核细胞由于贴附性强仍附于培养瓶壁,几次传代后,MSCs 可得到进一步纯化。不仅步骤相对简便,且能有效避免细胞活性损伤,得到的细胞纯度高,形态均一、增殖迅速、生长性状稳定。

根据 MSCs 的生长曲线可知,对于体外培养的 MSCs 生长经历三个阶段,即生长潜伏期、对数生长期以及生长平台期。对不同代次的细胞生长曲线和生长活力分析可以看出,随着传代次数的增加,细胞增殖能力有所下降,这可能与传代过程中细胞发生了自发性的细胞凋亡有关,但 MSCs 在培养 8 代以内仍能保持其细胞生物学特性。随着进一步的传代,细胞可能会逐渐失去其高分化特性和特异性表型。本实验显示传代细胞较原代增殖迅速,数次传代后即可达所需数量。

2006 年,国际间质组织干细胞委员会提出了 MSCs 的三条最低标准^[9]:塑料贴附性、特定的细胞表面抗原表达和多向分化潜能。由此可见,我们本次实验分离培养所获得的细胞完全符合以下条件:①细胞在形态上均为典型的梭形成纤维细胞样形态,呈漩涡状、塑料贴壁生长,增殖迅速,原代培养约 8~10 d 后达到单层融合;②实验中流式细胞仪检测表明所培养的 MSCs 细胞膜抗原 CD29、CD44 有阳性表达,而这些抗原造血干细胞表面没有的,但作为造血干细胞及白细胞抗原的标志抗原 CD34、CD45 在所培养的细胞表面却呈阴性表达,说明培养的细胞不是骨髓中另一大类细胞造血干细胞,而是 MSCs。③加入成骨、成软骨、成脂诱导分化培养基后,均能分化为成熟的成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞,分别通过茜素红染色、

油红 O 染色、及阿利辛蓝染色进行鉴定为阳性。因此证明了我们分离培养所获得的细胞属于间充质干细胞。

总之,本实验用密度梯度分离法和贴壁筛选法相结合可从兔骨髓中分离培养出高纯度的兔 MSCs,生长旺盛、增殖能力强,可较长时间稳定地培养增殖、在条件诱导下具有向成骨细胞、脂肪细胞和软骨细胞分化的潜能,建立了一整套有关 MSCs 物理学、形态学、表型和功能属性鉴定的方法。由于 MSCs 来源丰富、取材容易,创伤小,是理想的组织工程种子细胞,具有广阔的应用前景。

4 参考文献

- [1] Lee JS, Lee JS, Roh HL, et al. Alterations in the differentiation ability of mesenchymal stem cells in patients with non-traumatic osteonecrosis of the femoral head: Comparative analysis according to the risk factor[J]. J Orthop Res, 2006, 24(4): 604-609.
- [2] Ji WF, Tong PJ, Zheng WB, et al. Experimental study on treatment of femoral head necrosis with arterial perfusion of marrow stem cells[J]. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi, 2004, 24(11): 999-1002.
- [3] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[Z]. Nature, 2002, 418: 41.
- [4] Brooke G, Cook M, Blair C, et al. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells[J]. Sem Cell Dev Biol, 2007, 18(9): 846-858.
- [5] 王恒湘, 郭子宽. 间充质干细胞在组织再生应用中的诸多问题[J]. 组织工程与重建外科杂志, 2008, 4(5): 241-245.
- [6] 张文, 田杰, 江德勤, 等. 骨髓 BMSC 体外分化为心肌样细胞相关调控基因的时序表达[J]. 中华心血管病杂志, 2004, 32(11): 1004-1008.
- [7] Encina NR, Billotte WG, Hoffman MC. Immunomagnetic isolation of osteo progenitors from human bone marrow stroma[J]. Lab Invest, 1999, 79(4): 49-457.
- [8] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411): 143-147.
- [9] Dominici M, Le BK, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement[J]. Cytotherapy, 2006, 8(4): 315-317.