

兔骨髓间充质干细胞的分离培养

闫颖颖^{1,2}, 张静芳¹, 和小娥², 王新庄^{1,2*}

(1. 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 为探讨体外分离及培养扩增兔骨髓间充质干细胞(MSCs)的方法, 无菌采取兔股骨, 用含20% FBS的DMEM培养液冲骨髓腔, 采用全骨髓细胞贴壁培养法对MSCs进行纯化扩增, 倒置显微镜下观察原代及传代细胞的形态、生长情况、绘制细胞生长曲线。结果显示, MSCs为贴壁生长细胞, 形态均匀呈纤维样, 增殖能力强, 多次传代仍能保持其生物学特性。采用全骨髓贴壁培养法能够较好地纯化和扩增MSCs。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 体外培养; 兔

中图分类号: Q813.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2010)02-0102-03

Preparation and Cultivation of Rabbit Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells

YAN Ying-ying^{1,2}, ZHANG Jing-fang¹, HE Xiao-e², WANG Xin-zhuang^{1,2*}

(1. Animal Medical College, Northwest A & F University, Yangling 712100, China;

2. College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In this study, an effective method to prepare and culture rabbit bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSCs) was established. After the femurs were dissected from rabbit, the marrow was flushed out with DMEM medium under aseptic condition. The MSCs were enriched and expanded by using bone marrow adherent culture, and inverted microscope was employed to observe the proliferation and their morphous of primary and passage cells. The result shows that MSCs are adherent cells with a similar fibroblastoid spindle-shaped morphology during different passages. Bone marrow adherent culture can be used to produce a certain purity of MSCs, which is an easy way to ensure a good condition and powerful productivity for cell.

Key words: Mesenchymal stem cell; Culture *in vitro*; Rabbit

骨髓间充质干细胞(MSCs)是一群来源于骨髓组织中的非造血干细胞, 属于多能干细胞^[1], 具有向中胚层组织及神经外胚层组织分化的能力^[2,3]。因其取材方便, 易于分离培养, 体外扩增快, 且自体骨髓干细胞移植不易产生免疫排斥反应等优点在临床应用备受重视, 已经成为组织工程、细胞治疗、基因治疗等方面研究的热点。然而骨髓中MSCs的含量非常少, 每1万至10万个单核细胞中大约有1个MSC, 如何迅速、大量获取有生长活力的优质的MSCs, 是目前MSCs研究中亟待解决的问题^[4]。本试验旨在通过体外培养扩增获得纯度较高且数量

较多的MSCs, 从而为诱导MSCs向心肌细胞分化奠定基础。

1 材料和方法

1.1 供试动物

新西兰大耳白兔, 由河南实验动物中心提供。

1.2 主要试剂及仪器

DMEM培养液、胎牛血清(杭州四季青生物工程有限公司)、胰蛋白酶、倒置显微镜(LEICA DM IL)、离心机(江苏大地自动化仪器厂)。

1.3 方法

1.3.1 MSCs的分离培养

无菌采取兔股骨, 收集

收稿日期: 2009-10-14

基金项目: 国家“863”高新技术项目(2008AA101010); 河南农业大学人才引进基金; 河南省基础与前沿技术研究计划(092300410081)

作者简介: 闫颖颖(1986-), 女, 河南焦作人, 在读硕士研究生, 研究方向: 动物胚胎工程。

*通讯作者: 王新庄(1963-), 男, 陕西渭南人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事哺乳动物胚胎工程研究。

骨髓腔内的组织细胞, 0.147 mm 滤纱过滤后面, 置于 10 mL 离心管中, 1500 r/min 离心 10 min, 吸去脂肪及上清。用 DMEM 将沉淀的细胞吹起, 重新悬浮细胞。将细胞悬液用 20 g/mL 台酚兰染液染色, 计数 300 个细胞, 调整密度, 染色后蓝色的死细胞数小于 5% 方可继续试验。以 DMEM 培养液 (含 20% FBS) 调整细胞数为 $(1 \sim 2) \times 10^5$ 个/mL 接种于培养瓶中, 于 5% CO₂、37℃ 条件下培养。3 d 后换液, 去除非贴壁细胞, 以后每 3 d 换液 1 次。

1.3.2 MSCs 传代培养 细胞融合达 90% 以上时, PBS 冲洗, 0.25% 胰蛋白酶消化, 用含 20% 胎牛血清的 DMEM 终止消化。反复轻轻敲打细胞, 细胞悬液以 2500 r/min 离心 10 min, 收集细胞, 获得原代 MSCs, 以 1:3 比例传代。

1.3.3 MSCs 的鉴定 选用生长状况良好的第 3 代 MSCs, 采用 SABC 法检测细胞表面抗原。

1.3.4 MSCs 生长曲线的测定 选择生长良好的第 3 代 MSCs, 加入 4 mL 细胞消化液, 于室温下消化 2~3 min, 用含 20% FBS 的 DMEM 培养液 4 mL 终止消化, 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 另用 1 mL 细胞培养液悬浮细胞, 调整细胞浓度。取 24 孔培养板, 按照 1×10^4 个/mL 的细胞浓度, 每孔接种 1 mL, 进行培养。期间每隔 2 d 换液 1 次, 每隔 24 h 计数 1 次, 每次计数取 3 孔, 每孔计数 3 次, 求计数平均数, 绘制细胞生长曲线。计算细胞的倍增时间: $PDT = t \times [1g2 / (1gN_t - 1gN_0)]$, 其中 N_0 和 N_t 分别代表接种时和培养 t 小时后的细胞数。

1.3.5 MSCs 贴壁率的测定 取对数生长期 MSCs, 制备单细胞悬液, 调整细胞浓度为 1×10^5 个/mL 接种在直径为 2 cm 的培养皿, 常规培养, 每 2 h 取出 1 个培养皿弃去培养液, 消化贴壁细胞, 计算每个时间点的贴壁率。贴壁率 = 已贴壁细胞总数 / 接种细胞总数 $\times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 MSCs 的原代培养情况

原代培养中, 未离心的细胞悬液直接接种培养 24 h 后, 可以看到培养瓶内有大量的悬浮细胞, 主要为圆形的红细胞, 首次半量换液后, 仍然不易见到贴壁的 MSCs。经过数次换液后, 漂浮的细胞逐渐除去, 可见已有较多的贴壁细胞, 为分散、克隆集落方式增殖; 第 3~7 天, 贴壁细胞明显增多, 逐渐伸张为多角形或梭形 (图 1), 并有集落形成, 折光性好; 第 8~12 天, 相邻集落融合成片达 80% 以上, 细胞排列呈漩涡状或扫帚状, 细胞间的界限不清, 细胞呈长梭状。

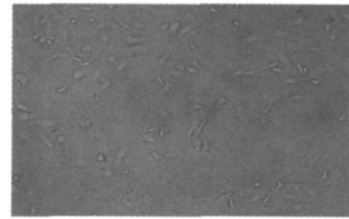


图 1 MSCs 培养第 5 天生长情况

2.2 MSCs 的传代培养与扩增

传代后的细胞很快贴壁, 生长旺盛时呈漩涡状, 平均 3 d 即可铺满瓶底。传代后, 细胞不以集落形式生长, 而是呈均匀分布的长梭形细胞平均生长, 4~5 代后可达到较高的纯度。

2.3 MSCs 的鉴定结果

MSCs 采用免疫细胞化学方法进行鉴定, 指标包括 CD34、CD44。结果表明: 胞浆未着色, 细胞核被复染成蓝色, 为 CD34 阴性 (图 2); 胞浆呈淡棕黄色, 细胞核呈蓝色, 为 CD44 阳性 (图 3)。表明这些小圆形的贴壁细胞为 MSCs。

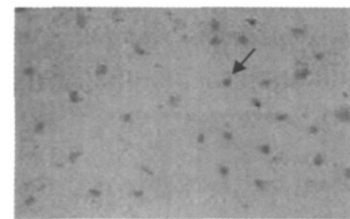


图 2 CD34 阴性 MSCs

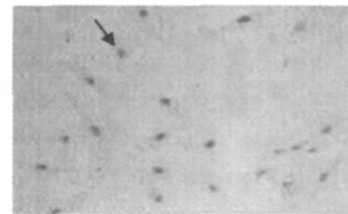


图 3 CD44 阳性 MSCs

2.4 MSCs 的生长曲线

传代培养 1~2 d 细胞处于潜伏期。第 3 天起细胞呈对数生长, 至第 6 天达到高峰, 之后为平台期。通过计算, 得出 MSCs 的倍增时间为 57 h (图 4)。

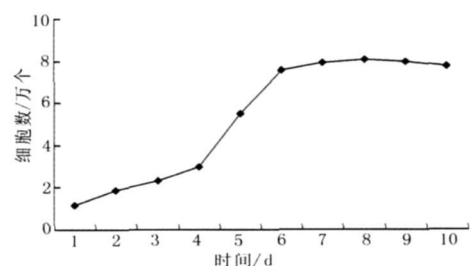


图 4 MSCs 生长曲线

2.5 MSCs 的贴壁率

MSCs 各时间位点细胞贴壁率见表 1。随着培养时间的延长, MSCs 贴壁率逐渐上升, 10h 达 96%, 贴壁基本完成。

表 1 MSCs 贴壁率

项目	时相点/h				
	2	4	6	8	10
贴壁率/%	35	67	81	90	96

3 讨论

MSCs 在骨髓中的密度很低, 而且随着年龄的增长逐渐减少。为了获得较纯的 MSCs, 人们进行了许多探索, 目前实验室分离 MSCs 的方法主要有 4 种, 分别是全骨髓贴壁筛选法、密度梯度离心法、单克隆抗体磁珠分离法和流式细胞仪分选法。单克隆抗体磁珠分离法是根据对 MSCs 表面抗原认识的深入, 利用免疫方法对其进行分离纯化, 可以获得较高的 MSCs 纯度, 但是在试验操作过程中对细胞活性的影响较大, 细胞增殖缓慢, 甚至完全失去活性。加之耗费较大和对技术水平要求较高, 在某种程度上限制了其广泛应用^[5]。Van 等^[9]用流式细胞仪分离 MSCs, 但是分选出来的 MSCs 活性很低, 在培养过程中发现分选的细胞大多数不贴壁, 并在 24 h 内死亡, 可能是分选过程中机械剪切力和高能激光造成了 MSCs 的损伤, 并影响了其生化特性。目前, 国外文献^[6,7]中较为常用的是 Percoll 或 Ficoll 分离液梯度离心, 分离收获有核细胞层进行培养, 该法可以将红细胞、白细胞和单个核细胞分层, 操作相对简便, 对细胞的活性影响较小。这样得到的细胞虽然较纯, 但增殖能力较差, 而且收获细胞数量少, 经常难以满足试验需要, 有学者认为此类方法可获得均质的 MSCs, 但是, MSCs 实际上是不均质的^[7,8], 还有其他密度的 MSCs 被排斥在外了。全骨髓贴壁筛选法可以将各种密度的 MSCs 都分离得到, 并且增殖力和多能分化性强, 短时间内即可获得大量试验用细胞。

虽然采用全骨髓贴壁筛选法所获得的原代 MSCs 的纯度不如梯度离心法高, 但是由于骨髓中其他细胞可分泌一些滋养 MSCs 生长的细胞因子, 使得 MSCs 的增殖旺盛, 活力比较强, 这样通过多次传代后, 亦可以使 MSCs 达到较高的纯度^[9]。传代后细胞 10h 贴壁率可达到 96%, 接种以后的细胞成活率也比较高, 这与杨晋等^[10]的研究结果相符。本试验中采用含 20%FBS DMEM 培养液培养, 原代细胞在第 8—12 天即大量增殖, 融合成片达 80% 以上, 这与甘凤英等^[11]的试验结果一致, 而屠洪等^[12]用含 10%FBS 的 DMEM 培养, 原代培养大量增殖

需要 14~21 d, 这可能与培养基中 FBS 浓度不同有关系。

综上所述, 本研究根据 MSCs 与血系细胞贴壁性能的差异, 并利用血系细胞所分泌的细胞因子, 通过多次传代使 MSCs 成为形态均一、排列有序的成纤维样细胞, 是一种比较理想的分离、纯化和扩增 MSCs 的方法, 这为将 MSCs 作为种子细胞, 进一步定向诱导分化为心肌细胞奠定了基础。

参考文献:

[1] Delorme B, Chateauvieux S, Charbord P. The concept of mesenchymal stem cells[J]. Regen Med, 2006, 1(4): 497-509.

[2] Kang X Q, Zang W J, Song T S, et al. Rat bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into hepatocytes *in vitro*[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(22): 3479-3484.

[3] Haynesworth S E, Baber M A, Caplan A I. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells *in vitro*; effects of dexamethasone and IL-1 α [J]. Cell Physiol, 1996, 166(3): 585-592.

[4] 周敦华, 黄绍良, 吴燕峰, 等. 人骨髓间充质干细胞体外扩增及生物学特性的研究[J]. 中华儿科杂志, 2003, 41(8): 607-610.

[5] Hung S C, Chen N J, Hsien S L, et al. Isolation and characterization of aze-sieved stem cells from human bone marrow[J]. Stem Cells, 2002, 20(3): 249-258.

[6] Van Vlasselaer P, Falla N, Snoeck H. Characterization and purification of osteogenic cells from murine bone marrow by two-color cell sorting using anti-sca-1 monoclonal antibody and wheat germ agglutinin[J]. Blood, 1994, 84(3): 753-763.

[7] Hanada K, Dennis J E, Caplan A I. Stimulatory effects of basic fiber blast growth factor and bone morphogenetic pmtn-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow derived mesenchymal stem cells[J]. J Bone Miner Res, 1997, 12(10): 1606-1614.

[8] Bruder S P, Jaiswal N, Ricahon N S. Mesenchymal stem cells in OS-teobiology and applied bone regeneration[J]. Clin Orthop, 1998, 355(S-1): 247-256.

[9] 刘晓丹, 郭子宽, 李秀森, 等. 人骨髓间充质干细胞分离与培养方法的建立[J]. 军事医学科学院院刊, 2000, 24(4): 43-45.

[10] 杨晋, 李映红, 张永锋, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞的分离培养及鉴定[J]. 深圳中西医结合杂志, 2009, 18(6): 337-339.

[11] 甘凤英, 肖丽霞, 陈彬娟, 等. 骨髓间充质干细胞分离培养和生物学鉴定[J]. 赣南医学院学报, 2007, 27(6): 837-839.

[12] 屠洪, 曾晶晶. 兔骨髓间充质干细胞体外培养及生物学特性研究[J]. 深圳中西医结合杂志, 2008, 17(6): 341-345.