

兔骨髓间充质干细胞的分离培养及其生物学性状的研究

杨自权¹, 卫小春¹, 郝一勇², 焦强¹, 丁娟¹, 李鹏翠¹, 陈崇伟¹

(1. 山西医科大学第二医院骨科, 山西 太原 030001; 2. 太原钢铁总公司医院骨科)

摘要 目的:分离培养兔骨髓间充质干细胞,对其生物学性状进行观察。方法:用密度梯度离心法与贴壁培养法相结合,分离兔骨髓间充质干细胞,进行体外培养扩增,绘制其生长曲线,用倒置显微镜、细胞爬片、扫描电镜、透射电镜观察细胞的生物学性状。结果:密度梯度离心后,活细胞比例在 95% 以上,贴壁培养的细胞呈纺锤形,细胞增殖力强,平均倍增时间为 32 h,细胞的增殖能力随传代次数的增加而有所下降。结论:密度梯度离心与贴壁培养相结合可以提高细胞分离效率。体外培养的兔骨髓间充质干细胞生长稳定,增殖力强,可以作为组织工程的种子细胞。

关键词 骨髓; 间充质干细胞; 细胞培养; 生物学性状

Study of the isolation culture and biological characteristics of rabbit bone marrow derived mesenchymal stem cells in vitro Yang Zi-quan, Wei Xiaochun, Hao Yi-yong, JIAO Qiang, DING Juan, LI Peng-cui, CHEN Chun-wei. Department of Orthopaedics, The Second Hospital of Shanxi Medical University (Shanxi Taiyuan, 030001, China)

Abstract Objective: To establish a method to isolate and culture rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) and investigate their biological characteristics. **Methods:** Bone marrow aspirate of New Zealand white rabbit was density gradient centrifuged and cultured in plastic culture bottles. The cells were examined by invert microscope, scanning and transmission electron microscope. The growth curve was drawn. **Results:** 95% cells were alive after density gradient centrifugation. BMSCs had a similar spindle-like morphology. The average time for cell doubling was 32 hours. The proliferation ability declined with time of the culture. **Conclusion:** The combination of density gradient centrifugation and adhere culture is an effective method to isolate BMSCs from bone marrow aspirate. BMSCs cultured in vitro show stable growth, rapid proliferation, and can be used in tissue engineering.

Key words Bone marrow; Mesenchymal stem cells; Cell culture; Biological characteristics

间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 是一类存在于多种组织中的干细胞,具有多向分化潜能,可分化为骨、软骨、脂肪、肌肉等多种中胚层来源的组织,可作为修复这些组织的细胞来源。存在于骨髓中的间充质干细胞 (bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs) 由于有采集方便,对机体损伤小的特点,易于临床应用,因而成为目前研究的热点之一。本实验采用密度梯度离心与贴壁培养相结合的方法,对存在于骨髓中的间充质干细胞进行分离培养和体外扩增,并对其生物学特性作初步研究,为利用 BMSCs 修复组织损伤提供实验研究的

基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物 新西兰大耳白兔 20 只,雌雄不限,体质量 2.0~3.5 kg,平均月龄 6 个月,由山西省实验动物中心提供。

1.2 主要仪器及试剂 CO₂ 培养箱 (Heraeus 公司)、超净工作台 (苏州空气净化器材厂)、倒置显微镜 (重庆光学仪器厂)、DMEM 培养基 (Gibco 公司)、胎牛血清 FBS (天津 TBD 公司)、胰蛋白酶 (Sigma 公司)、Percoll 细胞分离液 (Pharmacia 公司)。

1.3 取材 氯胺酮肌注法麻醉动物,16 号骨髓穿刺针自大转子处穿入股骨骨髓腔,接 5 ml 注射器 (内含 3 000 U/ml 的肝素钠 0.2 ml),抽取骨髓约 3~4 ml。

1.4 细胞培养

1.4.1 原代培养 取等体积 DMEM 培养液与骨髓充分混匀,加比重为 1.077 的 Percoll 细胞分离液,1 500 r/min 离心 15 min,吸取单个核细胞层的细胞, Hank's 液洗涤 2 次,制成单细胞悬液,胎盘兰拒染法测定细胞活力。

将上述方法分离的细胞以 1×10^6 /ml 浓度置入培养瓶中,加 DMEM 培养液(内含 10% FBS、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 μ g/ml、两性霉素 B 25 μ g/ml),置于 5% CO₂、饱和湿度,37 培养箱中培养。4 d 后首次换液,首次换液时将培养液离心,收集其中的悬浮细胞置入原瓶内继续培养。以后每周换液 2 次,不再收集培养液中的悬浮细胞,直至细胞长成单层。

1.4.2 传代培养 原代培养待细胞间融合后用 0.25% 胰酶消化 3~5 min,见细胞间隙增大、细胞回缩时用 FBS 终止反应,DMEM 液吹打制成细胞悬液,按 1:3 传代培养。第 1 次传代后的细胞称为 P1 代细胞,以后传代的细胞依次称为 P2、P3代细胞。

1.5 生物学性状的观察

1.5.1 活细胞观察 用倒置显微镜每日观察细胞的生长情况并拍照。

1.5.2 玻片染色观察 在部分培养瓶中加入小盖玻片,一定间隔时取出,进行 HE 染色及 Wright-Giemsa 染色,观察细胞形态。

1.5.3 集落形成效率的测定 (colony forming efficiency, CFE) 调整细胞浓度为 1×10^6 /ml,接种于 50 ml 培养瓶中,原代培养 6 d、10 d 时计数所形成的集落数目。CFE = 形成集落数/接种细胞数

1.5.4 生长曲线的测定 原代培养生长曲线:原代细胞以 1×10^4 /ml 接种于 24 孔板中(每孔加悬液 1 ml),从接种第 2 天起每日消化 6 孔,计数平均贴壁细胞数、绘制生长曲线。 传代培养生长曲线:细胞以 1×10^4 /ml 密度接种 24 孔板,同上法绘制 P1、P3、P5 代细胞生长曲线。 倍增时间测定:按公式 $DT = (t_1 - t_0) \lg 2 / (\lg N_{t_1} - \lg N_0)$ 计算细胞生长倍增时间 (t_1 :终止时间, t_0 :起始时间, N_1 :终止时细胞数, N_0 :起始细胞数)。 贴壁率曲线:传代细胞以 1×10^4 /ml 密度接种 6 孔板,置培养箱内培养,每 2 h 用胰酶消化 1 孔,计数贴壁细胞数,计算贴壁率(贴壁细胞数/接种细胞数 $\times 100\%$),绘制贴壁率曲线。

1.5.5 超微结构观察 14 d 时取出培养瓶,吸去培养液,0.25% 胰酶消化,制成细胞悬液,移入尖底离

心管,2 000 r/min 离心 10 min,去上清,加入 2.5% 戊二醛前固定,二甲砷酸钠缓冲液冲洗,1% 锇酸后固定,丙酮逐级脱水,环氧树脂包埋,超薄切片,醋酸铀与枸缘酸铅双重染色后,透射电镜观察。

10 d 时取出生长有细胞的玻片,PBS 洗 2 次后立即投入 2.5% 戊二醛中前固定,二甲砷酸钠缓冲液冲洗,1% 锇酸后固定,逐级脱水,临界点干燥,喷金、JSM 扫描电镜观察。

2 结果

2.1 活细胞观察 细胞分离液分离后所得的细胞大多为圆形单个核细胞,其中也混有少量红细胞,经胎盘兰拒染法测定,活细胞的比例在 95% 以上。

原代细胞接种 24 h 后,即有少量圆形细胞贴壁,但大多数细胞仍呈悬浮状态。接种 72 h,贴壁细胞明显增多,部分细胞已伸出伪足变成纺锤形,细胞核较大,呈圆形或椭圆形,胞浆中颗粒较多。2~3 次换液后,悬浮细胞已基本被去除。接种 4 d 已经有部分细胞开始分裂,并形成由数个同源细胞组成的细胞集落,以后集落数目逐渐增多,集落体积也逐渐扩大,大者甚至有数百个细胞组成。14~21 d 集落间相互融合,细胞形成单层。但继续培养后细胞可形成多层,并不发生明显的接触抑制现象。

传代后细胞生长速度明显加快,细胞大多于传代后 12 h 内贴壁,24 h 后迅速生长,7~10 d 后长满瓶底。各代细胞形态基本一致,都为长梭形。(图 1)

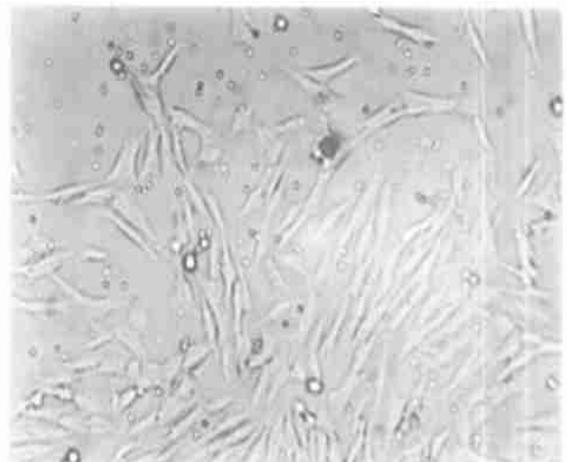


图 1 传代后细胞形态基本一致,都为长梭形(倒置显微镜 $\times 40$)
Fig 1 Form of the cells after passage culture were similar, with long fusiform shape (invert microscope $\times 40$)

2.2 细胞爬片染色观察 细胞形态以纺锤形、长梭形为主,细胞核较大,圆形或卵圆形,胞浆内可见细小颗粒。

2.3 CFE 观察 原代培养 6 d 后 CFE 平均为 4.8/1

$\times 10^6$, 10 d 时为 $15.2/1 \times 10^6$ 。

2.4 生长曲线的绘制 原代培养时潜伏期较长,一般为 6~8 d, 10 d 进入对数生长期, 细胞增殖明显加快, 呈对数样增殖, 培养 14 d 左右进入生长平台期, 细胞增殖速度趋于平缓。传代培养细胞生长明显加快, 生长潜伏期平均只有 1~2 d, 3~4 d 即可进入对

数生长阶段, 7~8 d 进入平台期。对不同代次细胞生长曲线分析可以看出, 随着传代次数的增加, 细胞的增殖能力有所下降。(图 2, 3)。传代细胞平均倍增时间为 32 h。

2.5 贴壁率曲线 传代细胞大多在传代后的 12 h 内贴壁, 各代细胞间贴壁率无明显差别。(图 4)

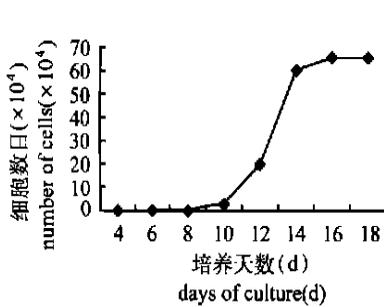


图 2 原代培养生长曲线

Fig 2 Curve of cell growth at primary culture

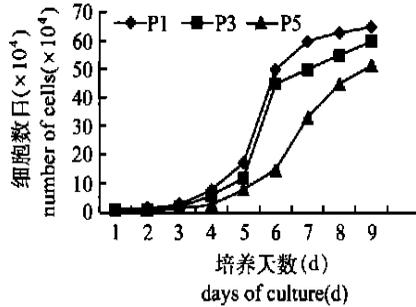


图 3 传代细胞生长曲线

Fig 3 Curve of cell growth at passage culture

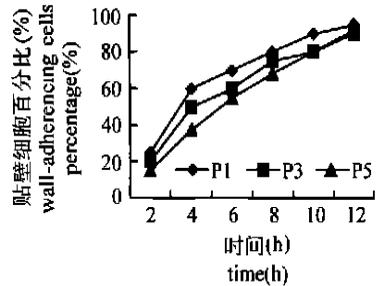


图 4 传代细胞贴壁率曲线

Fig 4 Percentage curve of wall-adhering cells at passage culture

2.6 超微结构的观察

2.6.1 扫描电镜观察 细胞形态纺锤形, 有多个触角状突起, 可见细胞分裂相。(图 5)

2.6.2 透射电镜观察 细胞核形态不规则, 染色质

丰富, 核仁明显, 胞浆伸出许多突起, 胞浆内有多量的粗面内质网, 线粒体丰富, 高尔基氏复合体发达, 说明细胞合成代谢旺盛。(图 6)



图 5 细胞形态纺锤形, 有多个触角状突起, 可见细胞分裂相 (扫描电镜 $\times 3\ 200$)

Fig 5 Cells form were long fusiform shape, had some feeler-like processes, cell division phase (scanning electron microscope $\times 3\ 200$)

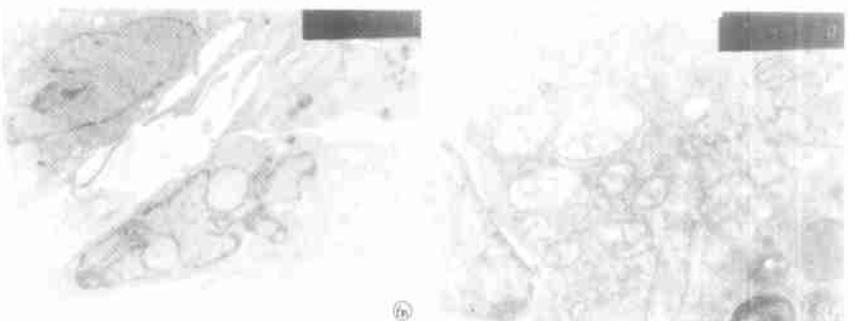


图 6a) 细胞核形态不规则, 染色质丰富, 核仁明显, 胞浆伸出许多突起, 胞浆内有多量的粗面内质网, 线粒体丰富, 高尔基复合体发达 (6a: 透射电镜 $\times 8\ 000$; 6b: 透射电镜 $\times 15\ 000$)

Fig 6a) Irregular or abnormal form of nucleus, with rich chromatin and apparent nucleoli, many cell process stretched out, plenty of rough endoplasmic reticulum mitochondria and Golgi complex became in cells plasm (6a: Transmission electron microscope $\times 8\ 000$; 6b: Transmission electron microscope $\times 15\ 000$)

3 讨论

间充质干细胞 (MSCs) 具有干细胞特性, 分裂增殖能力强, 在一定条件下可分化为多种中胚层来源的组织, 如骨组织、软骨组织、脂肪组织、肌和韧带组织等^[1], 利用 MSCs 修复骨骼肌肉等组织的损伤是目前研究的热点, 已有多个研究组报道利用间充质干细胞可修复骨^[2]、软骨^[3]等组织的损伤。

目前的研究发现, 间充质干细胞在体内分布较

广, 骨膜、软骨膜、骨小梁、骨髓和脂肪等^[4, 5]组织中都有 MSCs 的存在, 但其在体内的含量却较少, 即使在细胞分布较多的骨髓组织中, 也只占有核细胞的 $1/10\ 000 \sim 1/100\ 000$, 而且 BMSCs 的数目随着年龄的增加而减小, 80 岁老人的骨髓中, BMSCs 只占 $1/2\ 000\ 000$ ^[6], 24 个月龄小鼠骨髓中 MSCs 比 4 个月龄小鼠的减少 41%^[7]。因此, 对 BMSCs 的分离纯化和体外扩增非常重要。目前, 对 BMSCs 的分离方法

主要有贴壁培养分离法、密度梯度分离法、流式细胞分离法、免疫磁性分离法等^[8-11],但由于BMSCs缺乏特异性的细胞表面标志,目前的分离方法仍无法获得高纯度的MSCs。本研究将密度梯度分离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密度梯度离心,剔除骨髓中的大多数其他细胞成分,继续进行贴壁培养,利用MSCs具有的贴壁生长特性,进一步剔除不贴壁的有核细胞,使细胞得以纯化。国外许多学者的研究中,在换液时要弃去所有的未贴壁细胞,而本研究发现有些MSCs贴壁较晚,将首次换液的培养液离心收集其中的悬浮细胞,重新置入培养瓶中继续培养,仍有MSCs贴壁生长,收集这些细胞可增加贴壁MSCs的数量,大大缩短细胞培养的时间。

本研究发现,与其他细胞体外培养类似,BMSCs体外培养同样经历了生长潜伏期、对数生长期和生长平台期三个阶段。同时本研究也发现,体外培养的MSCs增殖能力很强,平均倍增时间仅为32h。对不同代次细胞的生长曲线分析可以看出,随着传代次数的增加,细胞的增殖能力有所下降,这可能与传代过程中MSCs发生了自发性的细胞凋亡有关^[12]。虽有研究显示,BMSCs的分化能力并不随传代次数的增加而下降,体外传代30次以上仍具有多向分化的潜能^[12],但我们认为,由于其增殖能力随传代次数的增加而下降,应选用前几代的细胞进行实验。

德国学者Cohnheim早在100多年前就提出骨髓中可能存在着一类细胞,可在组织损伤后起修复作用,但这一理论一直未被证实。1976年,Friedenstein^[13]在全骨髓培养时发现了骨髓间充质细胞,并证实其可分化成骨和软骨。以后的研究证实骨髓间充质细胞可分化成骨、软骨、脂肪、肌和韧带等多种组织^[14,15]。作为组织工程学的种子细胞,MSCs还具有以下优点:细胞的增殖能力强,可通过体外培养的方法对种子细胞进行扩增,从而获得足够量的细胞以供移植,可进行自体细胞移植,从而避免了免疫排斥和疾病传播等问题,具有多向分化潜能,可对多种组织进行修复等,因而有着良好的应用前

景。本实验通过密度梯度离心和贴壁培养相结合,成功地建立了一种对骨髓间充质干细胞的分离培养方法,并对其生物学特性进行了初步的研究,这些研究可为进一步以BMSCs作为种子细胞的组织工程学研究提供实验基础。

参考文献

- 1 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284: 143.
- 2 Goshima J, Goldber VM, Caplan AI. The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vivo in calcium phosphate ceramic blocks. *Clin Orthop*, 1991, 262: 298-311.
- 3 Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, et al. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg (Am)*, 1994, 76: 579-592.
- 4 Nakahara H, Dennis JE, Brude SP, et al. In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells. *Exp Cell Res*, 1991, 195(2): 492-503.
- 5 Nuttall ME, Patton AJ, Olivera DL, et al. Human trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype implications for osteopenci disorders. *J Bone Miner Res*, 1998, 13(3): 371-382.
- 6 Service RF. Tissue engineering build new bone. *Science*, 2000, 289: 1498.
- 7 Bergman RJ, Gazit D, Kahn AJ, et al. Age-related changes in osteogenic stem cells in mice. *J Bone Miner Res*, 1996, 11(5): 568.
- 8 Majumdar MK, Banks V, Peluso DP, et al. Isolation, characterization, and chondrogenic potential utero marrow-derived multipotential stromal cells. *J Cell Physiol*, 2000, 185(1): 98-106.
- 9 Fortier LA, Nixon AJ, Williams J, et al. Isolation and chondrocytic differentiation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res*, 1998, 59(9): 1182-1187.
- 10 Zohar R, Sodek J, McCulloch CA. Characterization of stromal progenitor cells enriched by flow cytometry. *J Blood*, 1997, 90(9): 3471-3481.
- 11 Encina NR, Billotte WG, Hofmann MC. Immunomagnetic isolation of osteo progenitors from human bone marrow stroma. *Lab Invest*, 1999, 79(4): 449-457.
- 12 Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol*, 1999, 181(1): 67-73.
- 13 Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes. *J Int Rev Cytol*, 1976, 47: 327.
- 14 Owen ME, Cave J, Joyner CJ. Clonal analysis in vitro of osteogenic differentiation of marrow CFU-F. *J Cell Science*, 1987, 87: 731.
- 15 Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, et al. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop*, 1980, 151: 294-307.

(收稿日期:2003-08-01 本文编辑:王宏)