文章编号:1000-5404(2005)01-0059-04

论著

# 人骨髓间充质干细胞体外增殖及成骨分化的增龄变化

朱 灏,许建中,周 强,王序全,秦 辉,赵 敏 (第三军医大学西南医院骨科,重庆 400038)

**提 要: 目的** 观测年龄对人骨髓间充质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSCs)体外增殖、成骨分化的影响。**方法** 使用密度梯度离心法分离不同年龄人骨髓 MSCs 进行培养,保留贴壁细胞传代,观察细胞生长情况,检测其增殖活性、细胞周期、碱性磷酸酶活性。**结果** 低龄 hMSCs 较高龄 hMSCs 体外生长快、增殖期比例大、MTT 及碱性磷酸酶活性高。**结论** hMSCs 的增殖和成骨分化的能力和活性随着年龄的增加而降低,建立其参数可满足组织工程种子细胞在临床应用中不同患者的要求。

**关键词**: 骨髓间充质干细胞;年龄;细胞培养;增殖;成骨分化
**中图法分类号**: R322.71; R329.21; R329.28 **文献标识码**: A

# Effects of age on proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells *in vitro*

ZHU Hao, XU Jian-zhong, ZHOU Qiang, WANG Xu-quan, QIN Hui, ZHAO Min (Department of Orthopedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract: Objective** To determine whether the donor age influences proliferation and differentiation capability of human mesenchymal stem cells (hMSCs). **Methods** HMSCs cultures were obtained by using density centrifuge method from 39 donors aged from 7 to 79 years old. The adhesive cells were preserved to passage culture, then the proliferation and osteogenic differentiation capability were investigated. **Results** The total culture time increased with the age of donors. Cell cultures from younger donors showed higher activity of MTT and expression of alkaline phosphatease (ALP) than older donors. **Conclusion** The proliferation and osteogenic differentiation capability of hMSCs decreases with the age of donors. Our study has highlighted the significant effect of both donor age and *in vitro* expansion on hMSCs quality. These findings have significant implications for the proposed clinical application of hMSCs.

**Key words**: mesenchymal stem cell; aging; cell culture; proliferation; osteogenic differentiation

组织工程骨修复骨缺损在动物身上进行了大量的实验研究,为临床上组织工程骨修复人骨缺损提供了工作基础。随着临床上组织工程应用的推广,种子细胞的来源成为人们重点研究的问题。不同年龄的 hMSCs 体外增殖、分化特点有很大差异[1,2],所培养的自体 hMSCs 的增殖、成骨能力是否能满足临床修复不同类型骨缺损的需要,怎样把握培养不同年龄阶段的 hMSCs 的生物学特点以获取具有生长能力、足够的种子细胞,确定不同年龄阶段人骨髓间充质干细胞体外增殖、成骨分化的各种参数,目前尚缺少对这方面工作的系统研究。

**基金项目**:国家"863"计划(2003AA205002),重庆市科技攻关基金资助重点项目(2003-13-6),第三军医大学科研基金资助项目(XG200327)
Supported by the National "863" Key Research Project of China (2003-AA205002), the Sci & Tech Research Foundation for the Key Programs of Chongqing (2003-13-6), and the Sci & Tech Research Foundation of Third Military Medical University (XG200327)
**作者简介**:朱 灏(1973-),男,重庆市城口县人,硕士,医师,主要从事骨组织工程方面的研究。电话:(023)68754000-73076
**通讯作者**:许建中,电话:(023)68754164
**收稿日期**:2003-10-09;**修回日期**:2004-09-14

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器与试剂

DMEM/F12 培养基、优等胎牛血清(Hyclone,美国)、Percoll 分离液、β-甘油磷酸钠、VitC、地塞米松、胰蛋白酶、EDTA、D-Hanks 液、MTT(Sigma,美国)、二甲基亚砜、0.1% Triton、碱性磷酸酶试剂盒、流式细胞仪、相差显微镜、Model 550 酶联免疫检测仪。

### 1.2 方法

1.2.1 供体年龄分组 骨髓样本 39 例来自年龄 7~79 岁志愿者,所有病例均排除先天性疾病、内分泌疾病、近期服用糖皮质激素者、自身免疫病者,其中 20 岁以下 9 例、20~39 岁 10 例、

40~60岁11例、60岁以上9例。

1.2.2 hMSCs的原代培养 取髂嵴骨髓8 ml，缓慢加入到含有等量体积Percoll分离液的离心管中，以2 500 r/min离心20 min。吸取中间云雾状有核细胞，D-Hanks液洗涤，1 500 r/min离心5 min，弃上清液，加入基础培养基（含15%优等胎牛血清，100 U/ml青霉素及100 U/ml链霉素），反复吹打制成单细胞悬液，以$3\times10^5/cm^2$接种100 ml培养瓶，置37 ℃，5% $CO_2$，饱和湿度孵箱内孵育，48 h半量换液，4 d后全量换液，弃去大量的悬浮细胞，以后每2~3 d根据培养基颜色换液。

1.2.3 hMSCs的传代培养 待原代细胞长满单层后，用0.25%的胰蛋白酶消化，D-Hanks液洗涤，1 500 r/min离心5 min，弃上清液，加入基础培养基（含10%优等胎牛血清），反复吹打制成单细胞悬液，以$1\times10^4/cm^2$接种100 ml培养瓶，每2~3 d根据培养基颜色换液。

1.2.4 hMSCs的成骨诱导培养 取第2代hMSCs以$1\times10^4$/ml接种于100 ml培养瓶，加入6 ml含有β-甘油磷酸钠、VitC、地塞米松的成骨诱导培养基，每2~3 d根据培养基颜色换液。

1.2.5 活体细胞相差显微镜观察 倒置相差显微镜逐日观察原代及传代细胞生长情况和形态特征。

1.2.6 hMSCs的培养参数 记录从骨髓收获的单个核细胞数，原代及传代细胞的培养时间、收获细胞数。

1.2.7 hMSCs生长周期的测定 待传代生长的第2代细胞达80%融合时消化制成细胞悬液，滴入4 ℃预冷的70%乙醇中固定30 min，弃去固定液，用预冷的PBS漂洗离心，37 ℃以200 μl浓度为1 mg/ml的RNAseA处理30 min，离心，加入10 mg/ml的碘化丙啶0.5 ml，4 ℃避光染色30 min，流式细胞仪488 nm检测。

1.2.8 hMSCs生长与增殖的测定 取第2代细胞以$5\times10^3$/孔密度接种于96孔培养板，加入基础培养基，置入37 ℃，5% $CO_2$，饱和湿度孵箱内孵育。于第1~8天每天用MTT法分析骨髓基质细胞的存活和增殖能力，选择490 mm波长，在酶联免疫检测仪上测定各孔的光吸收值，绘制细胞生长曲线。并根据公式计算倍增时间（Td）：$Td = t\frac{Ig2}{Ig\,N_t - Ig\,N_0}$，其中t代表培养时间，$N_0$和$N_t$分别代表接种后和培养t小时后的细胞数[3]。

1.2.9 ALP活性的测定 取第2代hMSCs以$1\times10^5$/ml接种于6孔培养板，加入成骨诱导培养基，每2~3 d根据培养基颜色换液。分别于2、4、6、8、10、12、14 d消化细胞，取$1\times10^5$/ml细胞1 ml加入等量0.1% Triton于4 ℃冰箱中隔夜放置。反复吹打后，按碱性磷酸酶试剂盒操作步骤进行，用分光光度计测出其吸光度，然后换算成金氏单位。

### 1.3 统计学处理

计量资料用$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS10.0统计软件进行方差分析。

## 2 结果

### 2.1 倒置显微镜观察

原代细胞贴壁较慢，24 h后逐渐贴壁，早期培养瓶中有大量悬浮细胞且以造血细胞居多，随着培养、换液进行，造血细胞基本消失，贴壁细胞逐渐形成集落。20岁以下年龄组供体形成集落明显且个数较多，细胞呈长梭形较集中（图1）。60岁以上年龄组供体形成集落小且明显较慢，个数少，细胞较大，呈散在分布（图2）。传代细胞1 h后开始有细胞贴壁，集落形成少且稀疏，基本呈散在分布，细胞透亮形态较原代大、细长而且伸展较多。传代细胞多呈梭形，20岁以下者形态规则稍小，生长快，60岁以上者形态较大向四周伸展较多，生长较慢（图3）。细胞成骨诱导后形态较不规则，呈三角、多角形改变，较普通培养基所培养细胞生长缓慢，7 d后出现较多圆形致密细胞结节，结节中心逐渐变暗，透光性差，12~14 d后形成钙盐结节（图4）。

### 2.2 培养参数

高龄组每毫升骨髓中所含单个核细胞数低于低龄组，且其原代和传代时间长、每瓶收获细胞数少于低龄组，见表1。从不同年龄阶段供体获取的第2代hMSCs细胞数均在$10^7$数量级以上，完全能够满足自体骨缺损的修复。

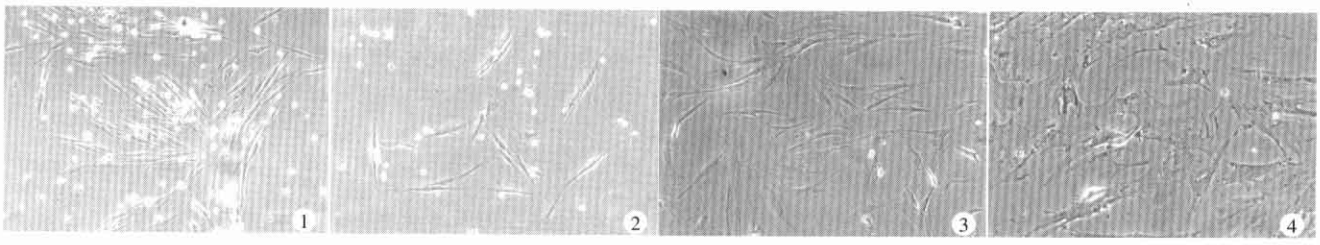



**图1 14岁原代hMSCs第4天** （倒置显微镜×40）

**Fig 1 hMSCs of the 14-year-old donor at 4 d after primary culture** （IM×40）

**图2 74岁原代hMSCs第4天** （倒置显微镜×40）

**Fig 2 hMSCs of the 74-year-old donor at 4 d after primary culture** （IM×40）

**图3 hMSCs传1代细胞** （倒置显微镜×40）

**Fig 3 Non-induced hMSCs after first passage** （IM×40）

**图4 hMSCs诱导后第8天** （倒置显微镜×40）

**Fig 4 hMSC at 8 d after induction** （IM×40）

表 1　不同年龄段 hMSCs 培养参数

Tab 1　Donor ages and cell culture parameters of hMSCs

| Age (Year) | Number of mononuclear cell of bone marrow ($\times 10^6$) | Passage | Culture time (d) | Number of cell obtained from one bottle ($\times 10^5$) |
|---|---|---|---|---|
| | | Primaray | 7 ~ 11 | 5.5 ~ 7.0 |
| | | 1st | 3 ~ 4 | 5.0 ~ 6.5 |
| < 20 | 7.4 ~ 8.4 | 2nd | 3 ~ 4 | 5.0 ~ 6.5 |
| | | 5th | 4 ~ 5 | 3.5 ~ 4.5 |
| | | 10th | 5 ~ 8 | 2.5 ~ 3.2 |
| | | Primaray | 8 ~ 13 | 5.0 ~ 6.5 |
| | | 1st | 3 ~ 5 | 4.8 ~ 6.2 |
| 20 | 7.0 ~ 8.2 | 2nd | 3 ~ 5 | 4.8 ~ 6.0 |
| | | 5th | 4 ~ 6 | 3.0 ~ 4.2 |
| | | 10th | 5 ~ 9 | 2.2 ~ 3.0 |
| | | Primaray | 10 ~ 15 | 4.7 ~ 6.2 |
| | | 1st | 3 ~ 6 | 4.5 ~ 6.0 |
| 40 | 6.3 ~ 7.2 | 2nd | 3 ~ 6 | 4.5 ~ 6.0 |
| | | 5th | 5 ~ 7 | 2.8 ~ 3.6 |
| | | 10th | 6 ~ 10 | 2.0 ~ 3.0 |
| | | Primaray | 10 ~ 17 | 4.2 ~ 5.5 |
| | | 1st | 4 ~ 6 | 4.0 ~ 5.2 |
| > 60 | 6.0 ~ 6.8 | 2nd | 4 ~ 6 | 3.8 ~ 5.0 |
| | | 5th | 5 ~ 9 | 2.5 ~ 3.5 |
| | | 10th | 7 ~ 12 | 1.8 ~ 2.5 |

## 2.3　hMSCs 的生长周期

4 个年龄组的 DNA 倍体均正常(diploid:100%)。各周期细胞所占比例见表 2,20 岁以下组增殖期(S + $G_2$ + M)细胞高于其它组,与 20 ~ 39 岁组之间的差异无显著性意义($F = 39.801$, $P > 0.05$),与 40 ~ 60 岁组之间的差异有显著性意义($F = 173.61$, $P < 0.05$),与 60 岁以上组之间的差异有非常显著性意义($F = 238.35$, $P < 0.01$),呈现随年龄增加而增殖期细胞减少的趋势。

表 2　不同年龄段 hMSCs 的细胞周期 (%, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2　Donor ages and cell cycles of hMSCs (%, $\bar{x} \pm s$)

| Age (Year) | $G_0 + G_1$ | S | $G_2$ + M | S + $G_2$ + M | Apoptosis |
|---|---|---|---|---|---|
| < 20 | 68.30 ± 3.82 | 21.75 ± 1.62 | 9.95 ± 1.02 | 31.70 ± 2.69 | 0.02 ± 0.00 |
| 20 | 75.99 ± 5.13 | 17.58 ± 6.87 | 6.87 ± 4.13 | 24.41 ± 9.55 | 0.045 ± 0.00 |
| 40 | 83.15 ± 9.30 | 11.10 ± 9.36 | 5.75 ± 4.03 | 16.85 ± 9.17* | 0.13 ± 0.00 |
| > 60 | 90.22 ± 4.24 | 5.64 ± 1.33 | 4.14 ± 1.03 | 9.78 ± 4.24* | 0.35 ± 0.15 |

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, *vs* age < 20 year

## 2.4　hMSCs 的生长曲线

4 个年龄组的第 2 代细胞生长曲线见图 5,在第 3 天左右 $D_{490}$ 值明显增加,大约 6 ~ 7 d 达到最高峰,年龄越小其达到峰值的时间越早,< 20 岁组高峰值明显大于其它组,与 20 ~ 39 岁组之间的差异无显著性意义($F = 28.76$, $P > 0.05$),与 40 ~ 60 岁组之间的差异有显著性意义($F = 76.45$, $P < 0.05$),与 60 岁以上组之间的差异有非常显著性意义($F = 127.78$, $P < 0.01$)。各年龄组倍增时间分别为 32.3、34.2、37.4、39.8 h,低龄组明显小于高龄组。

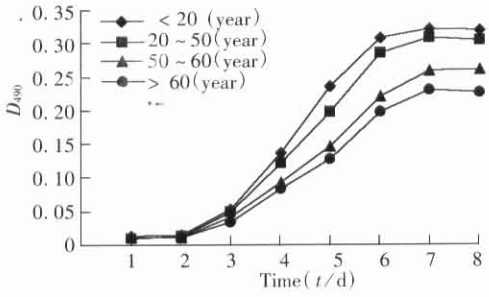



图 5　不同年龄段 hMSCs 第 2 代生长曲线(MTT)

Fig 5　Growth curves of the non-induced hMSCs (MTT) of different donor ages after second passage

## 2.5　hMSCs 的 ALP 活性曲线

本实验用地塞米松进行成骨诱导,可以显著地增加 ALP 活性[4],从图 6 可以看不同年龄段供体 hMSCs 的 ALP 活性之间存在差异,细胞诱导后 4 d ALP 活性水平显著增高($P < 0.01$),10 ~ 12 d 达到最高峰,< 20 岁组的 ALP 活性明显大于其它组,与 20 ~ 39 岁组之间的差异无显著性意义($F = 19.42$, $P > 0.05$),与 40 ~ 60 岁组之间的差异有显著性意义($F = 86.34$, $P < 0.05$),与 60 岁以上组之间的差异有非常显著性意义($F = 144.85$, $P < 0.01$)。

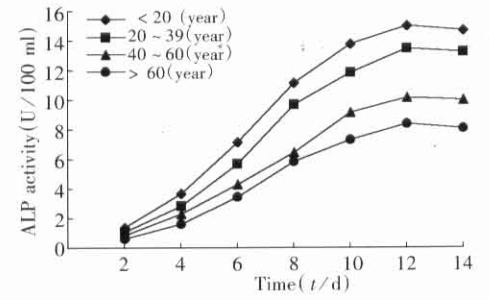



图 6　不同年龄段 hMSCs 成骨诱导后在不同时间的 ALP 活性($\times 10^{-2}$U/ml)

Fig 6　ALP activity of induced hMSCs of different donor ages at different time points ($\times 10^{-2}$U/ml)

## 3　讨论

组织工程的产品化是组织工程应用于临床的最终目标,尤其是种子细胞的来源和大规模扩增是组织工程研究中要解决的关键问题,虽然胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES)以其全能性和无限增殖能力有望成为组织工程中种子细胞的新来源[5],但其伦理问题、提纯和分化控制的技术难题等限制了 ES 的应用,hMSCs 仍是目前研究的重点。Wexler 等[6]研究发现成年人 MSCs 是最好的组织工程种子细胞来源,但随着年龄的增长和其他器官系统的功能降低一样 hMSCs 的生长

能力也在退化，不同年龄的 MSCs 体外增殖、分化特点有很大差异，尤其是来自老年患者的种子细胞易老化，从而丧失分泌基质的功能，因而难以从少量的组织经体外分离培养获得大量的组织细胞。不同年龄供体的 hMSCs 生长特性是否存在差异以及是否能满足修复自身骨缺损的需要尚缺少系统的研究，且多停留在动物实验上。

本实验看出不同年龄供体每毫升骨髓所含单个核细胞数随着年龄的增大而减少，传代时间以及每代收获细胞数不同，低龄组细胞体形较小、集落形成多、形态规则、细胞密度大，各组倍增时间差别明显，显示出低龄组增殖能力强于高龄组。年龄越小传代时间越短所收获的细胞数越多，按支架接种细胞数 $10^6 \sim 10^7$ 数量级[7]的要求各年龄组在传 2 代左右均能满足，但高龄组增殖周期（至 2 代）18 ~ 29 d 明显高于低龄组 13 ~ 19 d，这就要求临床应用时应充分考虑不同年龄供体骨髓的抽取量以及种子细胞的扩增时间与病情的需要。

20 岁以下组细胞周期中增殖期 $S + G_2 + M$ 的百分比例为 32.12 与 60 岁以上组 9.78 的差异具有显著性意义（$P < 0.01$），其凋亡率 0.02 与 60 岁以上组 0.35 的差异也具有显著性意义（$P < 0.01$）但对各组细胞的应用均无明显影响。随年龄增大，细胞增殖期百分比例减少，静止期比例增加，反映出了细胞增殖的年龄区别。

活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性 MTT 还原为紫色结晶，二甲基亚砜能溶解此结晶物，用酶联免疫检测仪在 490 nm 波长出测定其吸收值，可间接反映活细胞数量与功能。MTT 生长曲线可以看出低龄组与高龄组的差异明显，各组均在 3 d 左右出现倍增，6 d 左右达到增殖高峰，20 岁以下组曲线坡度陡直、高峰值高表明其增殖能力旺盛，60 岁以上组曲线较平缓、高峰值明显较 20 岁以下组低，表明其增殖能力较弱。从该图可以看出随供体年龄的增加细胞的增殖能力相应减弱。

ALP 是成熟成骨细胞的标志性酶之一，其活性可以反映出细胞的成骨分化能力。本实验中 20 岁以下组的 ALP 活性明显高于其它组（$P < 0.01$），说明低龄组 hMSCs 的成骨能力大于高龄组，随着年龄的增大 hMSCs 的成骨分化能力相应降低。

从以上结果看出，总的来说 hMSCs 的增殖、成骨分化能力随着年龄的增加而减弱，但各年龄组细胞扩增数量能满足 hMSCs 种子细胞的临床应用。通过对不同年龄供体的 hMSCs 生长、增殖、成骨分化进行比较研究，确立其参数，充分考虑年龄对 hMSCs 增殖、成骨分化的影响，为种子细胞的临床应用提供了依据。

**参考文献：**


[1] Mueller S M, Glowacki J. Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges [J]. J Cell Biochem, 2001, 82(4): 583 - 590.

[2] Voegele T J, Voegele-Kadletz M, Esposito V, *et al*. The effect of different isolation techniques on human osteoblast-like cell growth[J]. Anticancer Res, 2000, 20(5B): 3575 - 3581.

[3] 司徒镇强，吴军正. 细胞培养[M]. 西安：世界图书出版公司，1996. 136 - 137.

[4] Ter Brugge P J, Jansen J A. *In vitro* osteogenic differentiation of rat bone marrow cells subcultured with and without dexamethasone[J]. Tissue Eng, 2002, 8(2): 321 - 331.

[5] Buttery L D, Bourne S, Xynos J D. *et al*. Differentiation of osteoblasts and *in vitro* bone formation from murine embryonic stem cells[J]. Tissue Eng, 2001, 7(1): 89 - 99.

[6] Wexler S A, Donaldson C, Denning Kendall P, *et al*. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not[J]. Br J Haematol, 2003, 121(2): 368 - 374.

[7] Hasegawa Y, Ohgushi H, Ishimura M, *et al*. Marrow cell culture on poly-L-lactic acid fabrics[J]. Clin Orthop, 1999, (358): 235 - 243.


（编辑 汪勤俭）

## 参考文献中英文作者名的著录方法

医学期刊的论文中，引用英文文献的比例很高，但有不少作者将英、美人的姓名搞错，以至用光盘核对时出现错姓、错名或姓名全错。英、美人姓名的习惯写法是：名-名-姓，"名"可以有 1 个、2 个或 3 个，但"姓"只有 1 个。因此，从书籍或期刊中的姓名转录到文献时，要将次序调整为姓-名-名。姓是不可以简写的；"名"可以缩写，用第一个字母大写，不用缩写点。数据库在著录作者姓名时，已经调整为姓-名-名，可照录。

例如：John Quincy Public 写为 Public J Q

本刊编辑部