论著

文章编号:1000-5404(2005)16-1628-03

兔骨髓间充质干细胞的分离计量和生物学特点观察

周 强,李起鸿,许建中 (第三军医大学西南医院骨科,全军矫形外科中心,重庆 400038)

提 要:目的 建立骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)分离获取效果的计量方法;观察骨髓MSCs在体外传代培养条件下的主要生物学特点。**方法** ①梯度离心分离幼兔骨髓有核细胞,培养分离MSCs,以每10^6个骨髓有核细胞收获第1代MSCs的数计量MSCs的收获效率;②传代培养,倒置显微镜及组织学光镜观察细胞形态、生长特点、Ⅰ型胶原合成及碱性磷酸酶活性等方面的变化。**结果** ①以$2.5\times10^5/cm^2$的密度接种骨髓有核细胞,经9~10 d培养可收获第1代MSCs;第1代MSCs的收获总量和骨髓有核细胞的收获量呈显著的正相关($r=0.932$,$P<0.05$),每10^6个骨髓有核细胞平均可收获第1代MSCs约29.4×10^4个。②骨髓MSCs为长梭形,呈紧密排列的漩涡状生长,在传代培养中生物学特性无明显变化,均质性明显提高,各代Ⅰ型胶原免疫组化均为阳性,碱性磷酸酶染色为阴性。**结论** ①以$2.5\times10^5/cm^2$的骨髓有核细胞接种密度,收获第1代MSCs所需时间较短。②以每10^6个骨髓有核细胞可收获第1代MSCs的数量来计量骨髓MSCs的收获效率是可行的。③骨髓MSCs在体外培养条件下生物学特性稳定,经传代可收获高均质性的细胞。

关键词: 间充质干细胞;组织工程;细胞培养;种子细胞

中图法分类号: R322.71; R329-33; R329.28 **文献标识码:** A

Measurement of rabbit marrow mesenchymal stem cells isolated and observation on their biological characteristic *in vitro*

ZHOU Qiang, LI Qi-hong, XU Jian-zhong (Department of Orthopaedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 40038, China)

Abstract: Objective To establish the measurement for evaluating the efficiency of isolating and harvesting marrow mesenchymal stem cells (MSCs) and observe the main biological characteristic of MSCs *in vitro* during the passage cultivation. **Methods** ①The marrow nucleated cells in young rabbit marrow were isolated by the gradient centrifugation and cultivated to isolate and harvest MSCs. The efficiency of isolating and harvesting MSCs was measured by the number of the first passage MSCs from every 10^6 of the marrow nucleated cells. ②The changes of MSCs morphology, growth and proliferation, synthesis of collagen type Ⅰ and activity of alkaline phosphatase (ALP) were observed during the passage cultivation. **Results** ① After cultivated at $2.5\times10^5/cm^2$ marrow nucleated cells for 9 – 10 d, the first passage MSCs were harvested. The number of the first passage MSCs had a remarkable statistical positive correlation with the number of the marrow nucleated cells from one rabbit($r=0.932$, $P<0.05$). After cultivated for 9 – 10 d, the first passage MSCs of 29.4×10^4 in number were harvested from every 10^6 marrow nucleated cells on average. ②MSCs, which were long-spindle and tightly arrayed to form volution-like shape, showed no morphological changes in passage cultivation. The cells of every passage showed positive staining of collagen type Ⅰ and the negative staining of ALP, and their homogeneity was improved. **Conclusion** ① The period from cultivating to harvesting MSCs is shortened at the density of $2.5\ 10^5/cm^2$ marrow nucleated cells. ②It is feasible that the efficiency of isolating and harvesting MSCs was measured by the number of the first passage MSCs from every 10^6 marrow nucleated cells. ③The biological characteristic of MSCs is stable *in vitro* during the passage cultivation and the highly homogeneous MSCs can be harvested after the passage cultivation.

Key words: mesenchymal stem cells; tissue engineering; cell culture; seeding cells

基金项目: 国家高技术研究发展计划资助重大攻关课题("863"计划)(2003AA205020),重庆市科学技术重点攻关项目(2004-21-3),西南医院科技创新基金资助项目(2002-4)

Supported by the National "863" High-Tech Development Plan of China (2003AA205020), the Foundation for the Key Sci & Tech Research Project of Chongqing (2004-21-3) and the Research Foundation for Sci & Tech Innovation of Southwest Hospital of Third Military Medical University (2002-4)

作者简介: 周 强(1965-),男,河北省乐亭县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事组织工程及骨病方面的研究,发表论文15篇。电话:(023)68765283

收稿日期: 2005-01-30;**修回日期:** 2005-06-24

骨髓来源的间充质干细胞（mesenchymal stem cells，MSCs）是体内的一种多能干细胞，具有多向分化潜能，在适宜的条件下能分化再生骨、软骨、肌肉、韧带、肌腱、脂肪、骨髓基质等多种组织，且增殖能力强大，易于从骨髓中分离和体外扩增纯化，便于自体移植，近年来被认为有希望成为制备多种组织工程组织的种子细胞来源[1~3]。对 MSCs 的收获进行科学的计量，以便于预计所需供体骨髓量，这对于组织工程研究及应用具有实际意义，但目前尚鲜有文献报道。因此，本实验着重探讨 MSCs 的分离收获计量，同时对其体外传代培养的主要生物学特性进行观察。

1　材料与方法

1.1　骨髓有核细胞的分离

3 周龄健康日本大耳白兔 6 只（第三军医大学实验动物中心），体质量 300 ~ 350 g，雌雄不限。分 6 次进行，全身肝素化后处死动物。取双侧股骨、胫骨和肱骨去除软组织，切除包括骺板在内的两侧骺端。用 20 ml 注射器 16 号针头，以 30 ml 含 10% FBS（fetal bovine serum，FBS，美国，Hyclone）的 DMEM/F12（美国，Hyclone）培养液冲洗骨髓入 9 cm 的平皿，用注射器适当抽吸吹打使骨髓组织均匀分散。将骨髓混悬液等分、缓慢加入 3 支预先加有 15 ml 1.073 g/ml 密度梯度离心液（Pharmacia，Piscataway，NJ）的 50 ml 塑料离心管（NUNCLON 公司，德国）中。以 800 × g 离心 20 min，小心收集界面上的乳白色云雾状细胞层以 DMEM/Ham's F12 培养液漂洗，1 500 r/min 离心 5 min，弃上清，重复 1 次。加入含 10% FBS 的基础培养液（DMEM/Ham's-F12 + 584 mg/L L-谷氨酰胺 + 50 μg/L 维生素 C + 100 U/ml 青霉素 + 100 μg/ml 链霉素），吹打混匀后，进行细胞计数，计算收获有核细胞总量。

1.2　骨髓 MSCs 的原代培养

细胞悬液经适当稀释后，以 2.5 × 10^5/cm^2 的密度、含 10% FBS 的基础培养液接种于 175 cm^2 的培养瓶（NUNCLON 公司，德国）和放有盖玻片的 6 孔板（BD 公司，美国），置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱内。接种 48 h 后首次全量换液，以后隔 2 d 全量换液。当细胞生长至 80% ~ 90% 融合时，为收获培养瓶中细胞并传代的时机；培养板中的细胞 - 玻片以 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液固定，供相应指标检测。

1.3　骨髓 MSCs 的传代培养

弃去培养液，D-Hanks 液漂洗，以 0.25% 胰蛋白酶（美国，Sigma）/0.02% EDTA-Na_2 消化，离心收集细胞并以 DMEM/Hams F12 培养液漂洗，加入适量含 10% FBS 的基础培养液，吹打混匀后，行细胞计数，计算收获第 1 代骨髓 MSCs 细胞总量。以 3 × 10^4/cm^2 的密度、含 10% FBS 的基础培养液传代接种于 25 cm^2 的培养瓶（NUNCLON 公司，德国）和放有 1/4 盖玻片的 24 孔板（BD 公司，美国），置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱内。接种 48 h 后首次换液，以后隔天换液。培养瓶中的细胞如此传代培养至第 4 代，固定并收集培养板中各代细胞 - 玻片标本备检测。

1.4　指标观测

1.4.1　第 1 代 MSCs 的收获计量　　计算每只幼兔收获的骨髓有核细胞数，以 2.5 × 10^5/cm^2 的骨髓有核细胞接种密度，计算每 10^6 个骨髓有核细胞经原代培养收获第 1 代 MSCs 的数量，以计量 MSCs 的收获效率。

每 10^6 个有核细胞收获第 1 代 MSCs 数 = 收获第 1 代 MSCs 的总量 × 10^6 个细胞骨髓有核细胞总数。

1.4.2　倒置显微镜动态观察

1.4.3　HE 染色　　0.01 mol/L PBS（中国，武汉博士德公司）漂洗细胞盖玻片，常规 HE 染色，光镜观察。

1.4.4　碱性磷酸酶染色　　蒸馏水漂洗细胞盖玻片，采用钙钴法染色，中性红对比染色，中性树胶封片，光镜观察，阳性细胞为棕褐色。

1.4.5　Ⅰ型胶原免疫组化　　参照文献[4]的方法，0.01 mol/L PBS 漂洗细胞盖玻片 3 min，分别以鼠抗兔Ⅰ型胶原单克隆抗体（美国，Oncogene 公司）为一抗，按免疫组化试剂盒（中国，北京中山公司）说明进行操作，以过氧化物酶（DAB）显色试剂盒（中国，武汉博士德公司）显色，光镜观察，如被染色为棕黄色，则为免疫组化阳性。

1.5　统计学分析

实验所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 Microsoft Excel 数据统计处理程序进行第 1 代 MSCs 收获总量与骨髓有核细胞收获量间的相关分析。

2　结果

2.1　骨髓有核细胞的分离

骨髓与培养液混匀后，经梯度离心，最上层可见一些纤维蛋白凝块，在梯度离心液与培养液的界面上有一层乳白色云雾状物，即骨髓有核细胞，镜下为圆形的小细胞。每只幼兔收获的骨髓有核细胞数及其均值详见表 1。

表 1　每只幼兔骨髓有核细胞及第 1 代 MSCs 收获量（× 10^4）

Tab 1　The number of the nucleated marrow cells and MSCs of the first passage harvested from each young rabbit（× 10^4）

Animal number	Nucleated marrow cells	MSCs	MSCs/10^6 nucleated cells
1	32 000	9 143	28.6
2	48 000	12 617	26.3
3	28 000	8 192	29.3
4	45 000	12 960	28.8
5	35 000	10 720	30.6
6	34 000	11 113	32.7
$\bar{x} \pm s$	37 000 ± 7 797	10 791 ± 1 877	29.4 ± 2.14

2.2　第 1 代骨 MSCs 的培养和收获

以 2.5 × 10^5/cm^2 的密度接种骨髓有核细胞，附壁生长的主要为骨髓 MSCs。经 9 ~ 10 d 的培养 MSCs 即可达到 80% ~ 90% 的融合，此时收获细胞。每只幼兔第 1 代 MSCs 的收获总量和每 10^6 个骨髓有核细胞经培养收获第 1 代 MSCs 的量及其均值详见表 1。第 1 代 MSCs 的收获总量和骨髓有核细胞的收获量呈显著的正相关（$r = 0.932$，$P < 0.05$）。

2.3　生物学特点的观察

2.3.1　倒置显微镜观察　　骨髓有核细胞接种 48 h 后开始出现细胞附壁铺伸，呈小的短梭形或三角形，培养液中有大量密集的悬浮细胞。72 h 附壁铺伸细胞数量增多，呈分散独立的多细胞聚集性分布。第 4、5 天开始形成典型的骨髓 MSCs 簇状增生灶，且数量逐渐增多，细胞形态发生了根本的变化，呈长梭形、漩涡状紧密排列；另外，还有一种附壁细胞，外形类似马蹄

印,散在分布,增殖速度很慢。第6天后MSCs迅速增殖,不仅细胞簇状增生灶数量迅速增加,而且不断增大。第9~10天细胞生长即可达80%~90%的融合,呈紧密排列的漩涡状生长,细胞为大的长梭形。此时马蹄形细胞消失,非附壁细胞经反复换液绝大部分已被去。传代细胞接种4 h后开始附壁铺伸,12 h活细胞基本完成附壁,第2、3天迅速增殖,第4天即可达到80%~90%的融合。第1~4代细胞间的附壁和生长速度无明显区别,细胞形态呈比原代更均匀一致的长梭形,无马蹄形细胞及悬浮细胞生长。

2.3.2 细胞学染色光镜观察 细胞的形态与倒置显微镜下所见基本相同。原代至第4代细胞,HE染色细胞着色良好,胞质透亮、着色均匀,细胞核轮廓清楚、有1或2个核仁;碱性磷酸酶染色均呈阴性(图1)。

2.3.3 Ⅰ型胶原的免疫组化 MSCs各代Ⅰ型胶原免疫着色均为阳性,着色强弱无明显区别(图2)。

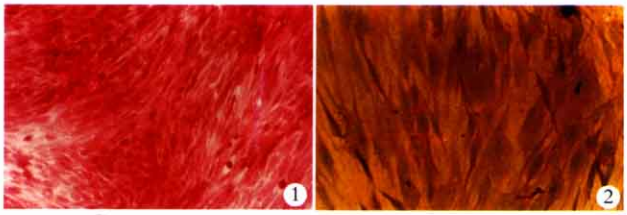


图1 第4代MSCs碱性磷酸酶染色均呈阴性 (ALP×100)
Fig 1 MSCs of the 4th passage appeared negative (ALP×100)
图2 第4代MSCs Ⅰ型胶原免疫组化为阳性 (S-P×200)
Fig 2 Positive immunohistochemical staining of collagen type Ⅰ in MSCs of the 4th passage (S-P×200)

3 讨论

3.1 骨髓MSCs的分离和第1代MSCs的收获

骨髓MSCs是骨髓细胞成份之一,仅占骨髓有核细胞的0.001%~0.01%,目前尚无收获较纯原代MSCs的方法。由于MSCs与骨髓中其它细胞成分不同,具有附壁生长的特性,故在培养过程中通过换液可以弃除骨髓其它细胞成分,而得以分离收获第1代或更高代次的MSCs,第1代和第2代细胞的均质性分别可达95%和98%[5]。由于全骨髓培养分离MSCs的成功率低,现在多采用梯度离心收获骨髓有核细胞进行培养,以提高MSCs培养分离的成功率[5,6]。有核细胞的接种密度大多为$(2\sim7)\times10^5/cm^2$,培养10~14 d可接近融合[5,6]。本实验采用$2.5\times10^5/cm^2$的密度接种,培养9~10 d细胞即生长达到80%~90%的融和,可收获第1代MSCs。说明我们分离的骨髓有核细胞中MSCs的比例较高且稳定,以较低密度的细胞接种实现了较短时间的第1代细胞收获,提高了分离收获效率。

有效地预计骨髓MSCs的收获量,无论在实验研究工作中还是在将来临床应用中对有计划地进行骨髓采集,都有很重要的参考价值。但是,由于骨髓原代MSCs不易获取,故对MSCs的收获量或效率尚无有效的评估计量方法。本实验的结果表明,收获的骨髓有核细胞数量与可收获第1代MSCs的量有很好的相关性。因此,可以用特定细胞接种密度条件下的单位骨髓有核细胞数和所需培养时间为参照评估第1代MSCs的收获效率。这样只需要明确一定量骨髓可收获骨髓有核细胞的数量,即可预计出收获第1代MSCs的数量和时间,反之,以所需细胞量即可推算出所需骨髓量,在相关的研究工作中具有实际的可行性和参考价值。本实验结果表明,每10^6个3周龄幼兔骨髓有核细胞、以$2.5\times10^5/cm^2$密度接种、经9~10 d培养平均可收获第1代MSCs约29.4×10^4个。

3.2 体外培养的生物学特点

骨髓MSCs体外培养的生长特点和生物学特性已有较多相关文献报道。本实验观察结果表明,分离培养的骨髓MSCs在生长特性和形态特征上与以往文献[2]报道的基本一致。随传代次数的增加,细胞增殖速度无明显下降,细胞形态的均质性经传代后明显提高。Ⅰ型胶原是MSCs体外培养合成分泌细胞外基质的主要胶原成分,是其重要表型之一[5]。各代MSCs均有基本一致的Ⅰ型胶原免疫阳性着色,表明传代培养未使其分泌细胞外基质的功能活性明显下降。成骨细胞是MSCs容易分化的方向,而碱性磷酸酶是分化为成骨细胞的标志性表型之一[1,7]。在各代培养中碱性磷酸酶染色均为阴性,可基本表明在本实验培养条件下MSCs未发生向成骨细胞方向的分化。这些结果说明,在本实验的传代培养过程中MSCs能够保持其生物学特性的稳定。因此,传代培养可作为目前收获较高纯度和具有良好功能活性的骨髓MSCs的有效手段。

参考文献:

[1] Li W J, Tuli R, Huang X, *et al*. Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three-dimensional nanofibrous scaffold [J]. Biomaterials, 2005, 26(25): 5158-5166.

[2] Carlo Stella C, Gianni M A. Biology and clinical applications of marrow mesenchymal stem cells[J]. Pathol Biol(Paris), 2005, 53(3): 162-164.

[3] 周 强, 李起鸿, 杨 柳. 骨髓间充质干细胞及在软骨组织工程中的研究进展[J]. 临床骨科杂志, 2001, 4(4): 319-323.

[4] Kumagai J, Sarkar K, Uhthoff H K, *et al*. Immunohistochemical distribution of type Ⅰ, Ⅱ and Ⅲ collagens in the rabbit supraspinatus tendon insertion[J]. J Anat, 1994, 185(Pt 2): 279-284.

[5] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, *et al*. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411): 143-147.

[6] Stute N, Holtz K, Bubenheim M, *et al*. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use[J]. Exp Hematol, 2004, 32(12): 1212-1225.

[7] Takahashi Y, Yamamoto M, Tabata Y. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and β-tricalcium phosphate[J]. Biomaterials, 2005, 26(17): 3587-3596.

(编辑 王 红)