文章编号:1000-5404(2005)16-1631-03

论著

两种从骨髓中分离人间充质干细胞方法的比较研究

代 飞,吴 军,许建中,王序全,尹芝华 (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 比较Ficoll(1.073 g/ml)密度梯度离心法分离人骨髓间充质干细胞(human bone marrow derived mesenchymal stem cells, hBMMSCs)与常用的Percoll分离法之间的差异。建立一种简便、实用的hBMMSCs分离方法。**方法** 分别应用上述两种方法分离hBMMSCs,比较用两种方法从骨髓中分离的有核细胞得率及死亡率、贴壁细胞克隆数、细胞形态以及细胞表面标志。**结果** 两种方法获得的有核细胞得率无显著差异($P>0.05$);Ficoll(1.073 g/ml)密度梯度离心法获得的有核细胞死亡率显著小于Percoll分离法($P<0.01$);Ficoll(1.073 g/ml)密度梯度离心法获得的hBMMSCs原代培养5 d的贴壁细胞克隆数/37.5 cm^2显著多于Percoll分离法($P<0.05$)。Ficoll(1.073 g/ml)密度梯度离心法与Percoll分离法获得的hBMMSCs细胞形态均一,为纺锤形或三角形;Ficoll(1.073 g/ml)密度梯度离心法与Percoll分离法获得的原代hBMMSCs CD105阳性表达率[(94.0±2.0)% *vs* (95.8±1.5)%]及CD34阴性表达率[(96.0±1.2)% *vs* (97±1.0)%]无显著差异($P>0.05$)。**结论** 与Percoll分离法相比较,Ficoll(1.073 g/ml)密度梯度离心法分离hBMMSCs具有细胞死亡率较小,细胞得率较多的优点,是一种较好的hBMMSCs分离方法。

关键词: 人骨髓间充质干细胞;种子细胞;细胞培养
中图法分类号: R322.71; R329-33 **文献标识码**: A

A comparative study of two methods for isolating human mesenchymal stem cells from bone marrow

DAI Fei, WU Jun, XU Jian-zhong, WANG Xu-quan, YIN Zhi-hua (Department of Orthopaedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To compare two density gradient centrifugation using Ficoll (1.073 g/ml) and Percoll (1.073 g/ml) as solutes respectively to separate human bone marrow derived mesenchymal stem cells (hBMMSCs) from bone marrow. **Methods** hBMMSCs were isolated from bone marrow of the iliac crest of voluntary normal adults by methods mentioned above respectively. Average number of nucleated cells and death rate after density gradient centrifugation with two solutes were compared and the hBMMSCs were observed in morphology and compared in cell shape, adherent cell clones, specific cell-markers after primary culture for 5 d. **Results** Average number of nucleated cells gained from two methods had no significant difference. Death rates of nucleated cells isolated by Ficoll (1.073 g/ml) was markedly lower than that by Percoll (1.073 g/ml) ($P<0.01$). Number of adherent cell clones in 37.5 cm^2 culture flask after primary culture for 5 d in Ficoll (1.073 g/ml) method was markedly higher than that of Percoll (1.073 g/ml) method ($P<0.05$). hBMMSCs isolated by Ficoll (1.073 g/ml) or Percoll (1.073 g/ml) were both homogeneous spindle-like or triangle-like cells. Positive rates of CD105 and negative rates of CD34 in cells separated by Ficoll (1.073 g/ml) or Percoll (1.073 g/ml) were similar (CD105: 94.0±2.0% *vs* 95.8±1.5%; CD34: 96.0±1.2% *vs* 97±1.0%). **Conclusion** As compared to Percoll (1.073 g/ml) method, density gradient centrifugation of Ficoll (1.073 g/ml) has a lower cell death rate and higher number of adherent cell clones in 37.5 cm^2 culture flask after primary culture for 5 d. It is a good isolation method of human bone marrow derived mesenchymal stem cells.

Key words: bone marrow derived mesenchymal stem cells; seeding cells; cell culture

骨组织工程有3大关键因素:种子细胞、生物材料和组织工程构建技术,其中种子细胞是最重要的环节之一[1,2]。人骨髓间充质干细胞(human bone marrow derived mesenchymal stem cell, hBMMSCs)因其具有诱导成骨潜能、容易分离、数量相对较多等优点被认为是骨组织工程最佳的种子细胞。在众多分离hBMMSCs的方法中,Pittenger[3]报道的Percoll(1.073 g/ml)密

基金项目:国家自然科学青年基金资助项目(3030090),国家重点实验室开放课题(2003)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (3030090) and the Funds of Open Projects for the National Key Laboratories in China (2003)
作者简介:代 飞(1971-),男,重庆市人,博士,主治医师,主要从事移植免疫及组织工程方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)68754000-73076
通讯作者:吴 军,电话:(023)68754006,E-mail: Junwupro@public.cta.cq.cn
收稿日期:2005-01-30;**修回日期**:2005-06-24

度梯度离心法被认为是经典的方法。但该方法操作较为复杂,离心速度较大,次数较多,对细胞损伤较大。针对上述问题,本实验首次应用 Ficoll(1.073 g/ml)密度梯度离心法分离 hBMMSCs,并将其与 Percoll (1.073 g/ml)密度梯度离心法进行了详细的比较。现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

骨髓:健康成年自愿者捐献;培养基 F12-DMEM 及胎牛血清(FBS) 购自美国 Hyclone 公司;Percoll 细胞分离液购自美国 Pharmacia 公司;Ficoll(1.073 g/ml)细胞分离液购自天津 TBD 公司;FITC 标记鼠抗人 CD105 单克隆抗体、PE 标记鼠抗人 CD34 单克隆抗体、FITC 标记鼠抗人 IgG_{2b} 单克隆抗体、PE 标记鼠抗人 IgG_1 单克隆抗体均购自美国 Sigma 公司;其它常规试剂为国产分析纯或进口分装。

1.2 实验方法

1.2.1 骨髓抽取 自愿者 18 人,均为健康男性,年龄 18 ~ 33 岁,平均年龄(25 ±2.5)岁。令自愿者仰卧,常规消毒铺单,1% 利多卡因局麻后用骨穿针从髂前上嵴后 2 cm 处穿刺入髂骨骨髓腔抽取骨髓 20 ml,均分到两个含有 3 000 U 肝素的 50 ml 无菌离心管中分别用下述两种方法分离 hBMMSCs。操作在无菌条件下完成。

1.2.2 Percoll 密度梯度离心法[3] 取肝素化骨髓 10 ml,加入 20 ml PBS,离心:900 × g,20 ℃,20 min,吸尽上清;再用 20 ml PBS 重悬细胞,900 × g,20 ℃,20 min,吸尽上清;用 5 ml PBS 重悬细胞,缓慢加入到另一装有 20 ml Percoll(1.073 g/ml)的 50 ml 离心管中,离心:1 100 × g,20 ℃,30 min;收集分层界面上的有核细胞,20 ml PBS 稀释,离心:900 g,20 ℃,20 min,弃上清;最后用完全培养基(F12-DMEM + 10% FBS)重悬细胞,台盼蓝染色后计算细胞总数及死亡细胞数,细胞死亡率 = 死亡细胞数/细胞总数。将有核细胞以 2 × 10^5/cm^2 接种培养瓶(37.5 cm^2 玻璃瓶),加入完全培养基 10 ml,5% CO_2、37 ℃ 培养箱培养;24 h 首次换液,此后每 24 h 换液 1 次;细胞长满以后胰酶/EDTA 消化收集以备流式细胞仪检测。

1.2.3 Ficoll (1.073 g/ml)密度梯度离心法 取肝素化骨髓 10 ml,加入 10 ml PBS 稀释,缓慢加入到另一装有 20 ml Ficoll (1.073 g/ml)的 50 ml 离心管中,离心:900 × g,20 ℃,20 min;收集分层界面上的有核细胞,20 ml PBS 稀释,离心:700 × g,20 ℃,10 min,弃上清;最后用完全培养基重悬细胞,台盼蓝染色后计算细胞总数及死亡细胞数,细胞死亡率 = 死亡细胞数/细胞总数。以 2 × 10^5/cm^2 接种培养瓶(37.5 cm^2 玻璃瓶),加入完全培养基 10 ml,5% CO_2、37 ℃ 培养箱培养;24 h 首次换液,此后每 24 h 换液 1 次;细胞长满以后胰酶/EDTA 消化收集以备流式细胞仪检测。

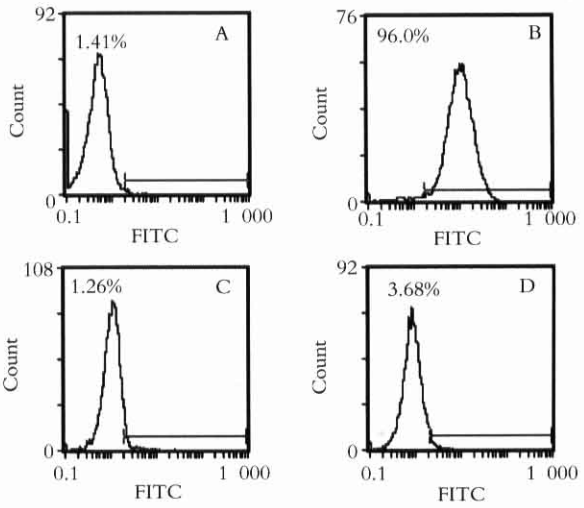
1.2.4 细胞表面标志鉴定 分别收集 4 份 5 × 10^5 上述细胞,分别标记为:对照 1、对照 2、实验 1、实验 2;对照 1 加入 1∶1 000 FITC-IgG_{2b} 80 μl,对照 2 加入 1∶1 000 PE-IgG_1 40 μl,实验 1 加入 1∶50 FITC-CD105 80 μl,实验 2 加入 1∶10 PE-CD34 50 μl,4 ℃ 分别孵育 30 min;然后用 PBS 洗去多余的抗体,FACS 进行检测。

1.3 统计学处理

所得数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 10.0 统计学软件进行独立样本 t 检验。

2 结果

自愿者捐献的骨髓除 1 例凝血以外均应用上述两种方法进行了分离。发现两种方法所获得的有核细胞数无显著差异($P > 0.05$);Ficoll (1.073 g/ml)密度梯度离心法的有核细胞死亡率显著低于 Percoll (1.073 g/ml) ($P < 0.01$);两种方法分离的细胞培养 5 d 时在 37.5 cm^2 培养瓶中的贴壁生长细胞克隆数无显著差异($P > 0.05$);用 FACS 检测细胞表面标志,发现两种方法分离的细胞 CD105 阳性表达率和 CD34 阴性表达率均无显著差异($P > 0.05$)。(图 1,表 1)两种方法分离的细胞形态均一,呈纺锤形和三角形,细胞克隆呈漩涡状排列(图 2)。



A: Control CD105; B: Experiment CD105; C: Control CD34; D: Experiment CD34

图 1 FACS 检测 hBMMSCs 细胞表面 CD105,CD34 表达情况

Fig 1 Expression of CD105 and CD34 on surface of hBMMSCs detected by FACS

表 1 Percoll(1.073 g/ml)与 Ficoll(1.073 g/ml)密度梯度离心法分离 hBMMSCs 的比较 (n = 17)

Tab 1 Comparing Ficoll (1.073 g/ml) method to Percoll (1.073 g/ml) method of isolating MSCs from human bone marrow (n = 17)

	Ficoll(1.073 g/ml)	Percoll (1.073 g/ml)
Number of nucleated cells in 10 ml marrow	(6.5 ±2.8) × 10^7 *	(6.0 ±3.2) × 10^7
Death rate of nucleated cells (%)	0.98 ±0.35 *	5.21 ±2.16
Number of adherent cell clones cultured for 5 d (cells/37.5 cm^2 culture flask)	31.0 ±15.0	28.0 ±13.0
Positive rate of CD105 (%)	94.0 ±2.0	95.8 ±1.5
Negative rate CD34 (%)	96.0 ±1.2	97.0 ±1.0

*: $P < 0.01$, *vs* Percoll (1.073 g/ml) method



图 2　分离、培养 5 d 时的细胞形态　（光镜 ×100）

Fig 2　MSCs isolated and cultured for 5 d　（Light microscope ×100）

3　讨论

Friedenstein 等[4]首先从骨髓中分离、培养了一种贴壁生长的纤维样细胞，在体外培养具有有限的自我更新的能力并能分化为骨、软骨等组织。这种细胞被命名为克隆形成单位成纤维细胞（colony forming unit-fibroblast，CFU-F）；后来 Pittenger 等[3]采用 Percoll（1.073 g/ml）密度梯度离心法，进一步从骨髓中分离出了一类细胞，这类细胞同源性更强，具有更强的自我更新能力和多向分化潜能，被认为是比 CFU-F 更纯的 MSCs。从人骨髓中分离 MSCs 有几种方法：全骨髓培养、Ficoll（1.077g/ml）密度梯度离心法、Percoll（1.073 g/ml）密度梯度离心法，应用 MSCs 贴壁生长特性使其与造血谱系细胞分离。研究表明：全骨髓培养效果最差，由于造血谱系细胞的影响很难得到比较纯的 MSCs[5,6]；Ficoll（1.077g/ml）分离的 MSCs 纯度不如 Percoll[7]。也有人利用针对 MSCs 表面抗原（如 STRO-1、CD11b、Hop-26 等）的单克隆抗体包被免疫磁珠或通过流式细胞仪分选 MSCs[8,9]。然而到目前为止，还没有一种方法被视为分选是 MSCs 的标准方法。

本研究分别采用了 Percoll 和比重为 1.073 g/ml 的 Ficoll 密度梯度离心法分离 MSCs，并观察了两种方法分离的 MSCs 体外扩增情况。发现用两种方法分离的 MSCs 在细胞形态、细胞表面标志、生长速度和生命周期等方面无明显的差别。与 Percoll 密度梯度离心法比较，Ficoll（1.073 g/ml）密度梯度离心法不仅降低了离心对细胞的损害；而且简化了操作步骤，缩短了分离时间，减少了污染机会。因此，Ficoll（1.073 g/ml）密度梯度离心法是一种行之有效的 MSCs 分离方法。

参考文献：

[1] Edelman E R. Vascular tissue engineering: designer arteries[J]. Circ Res, 1999, 85(12): 1115 - 1117.

[2] Langer R, Vacanti J P. Tissue engineering[J]. Science, 1993, 260(5110): 920 - 926.

[3] 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.

[4] Friedenstein A J, Piatetzky Shapiro II, Petrakova K V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells[J]. J Embryol Exp Morphol, 1966, 16(3): 381 - 390.

[5] Kitano Y, Radu A, Shaaban A, *et al*. Selection, enrichment, and culture expansion of murine mesenchymal progenitor cells by retroviral transduction of cycling adherent bone marrow cells[J]. Exp Hematol, 2000, 28 (12): 1460 - 1469.

[6] Van Vlasselaer P, Falla N, Snoeck H, *et al*. 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] 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)：282 - 284.

[8] Encina N R, Billotte W G, Hofmann M C. Immunomagnetic isolation of osteoprogenitors from human bone marrow stroma[J]. Lab Invest, 1999, 79(4): 449 - 457.

[9] Oreffo R O, Virdi A S, Triffitt J T. Retroviral marking of human bone marrow fibroblasts: *in vitro* expansion and localization in calvarial sites after subcutaneous transplantation *in vivo*[J]. J Cell Physiol, 2001, 186(2): 201 - 209.

（编辑　王　红）

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