论著

文章编号:1000-5404(2005)16-1640-04

模拟微重力环境促进人间充质干细胞体外高效增殖

罗 飞,许建中,王序全,何清义,谢 肇,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 观察人骨髓间充质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSCs)在模拟微重力环境中的体外增殖情况。**方法** 在旋转细胞培养系统(rotary cell culture system, RCCS)模拟的微重力环境中,用Cytodex-3微载体技术培养hMSCs,通过相差显微镜、细胞计数、MTT法、CCK-8(cell counting Kit-8)观察检测hMSCs的增殖状况。**结果** 试验组hMSCs较平皿培养组延长指数生长期提高2倍,细胞增殖速度提高近2倍,培养密度增加15.8倍。**结论** 模拟微重力环境能促进hMSCs的体外增殖速度,利于体外规模化扩增组织工程的种子细胞。

关键词:间充质干细胞;生物反应器;微重力;微载体

中图法分类号:R329-33;R329.28 **文献标识码**:A

High-performance proliferation of hMSCs in the mimic microgravity environment

LUO Fei, XU Jian-zhong, WANG Xu-quan, HE Qing-yi, XIE Zhao, YIN Zhi-hua (Department of Orthopedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the proliferation of human bone marrow MSCs cultured under the mimic microgravity condition *in vitro*. **Methods** The hMSCs were cultured in the mimic microgravity environment founded by rotary cell culture system and Cytodex-3 microcarrier. The proliferation of hMSCs were observed by phase contrast microscope and detected by cell counting, MTT assay and CCK-8 assay. **Results** The exponential growth period of hMSCs extended to double, the speed of proliferation increased to nearly two times, and the density of hMSCs in the medium increased by 15.8 times as compared with the plate-culture method. **Conclusion** The mimic microgravity condition and microcarrier benefit the proliferation of hMSCs *in vitro*, and also fit to produce a large quantity of seeding cells for tissue engineering.

Key words: mesenchymal stem cells; bioreactor; microgravity; microcarrier

如何在体外获得大量优质的种子细胞一直是组织工程研究的主要内容之一。人间充质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSCs)具有很强的自我更新和多向分化潜能,且取材方便、易于在体外分离、扩增,已成为骨组织工程最常用的种子细胞之一。常规的平皿培养法由于操作繁杂,需经多次消化传代,培养时长,容易污染,需要占用较大的培养空间,故难以扩大培养规模。近年发展起来的微载体培养法在细胞的规模化扩增方面显示出一定优势,另一方面,美国航空航天局(NASA)发明的旋转细胞培养系统(rotary cell culture system, RCCS)可以在地面模拟出微重力环境,这两方面技术的结合为贴壁生长的hMSCs进行模拟微重力三维培养提供了可能。本研究尝试用RCCS和Cytodex-3微载体构建的微重力环境中进行hMSCs的体外培养,探讨其在组织工程种子细胞体外规模化扩增中的应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

人骨髓间充质干细胞由青年自愿捐献者穿刺抽取髂骨骨髓进行分离、培养获得。RCCS(美国Synthecon公司),Cytodex-3微载体(美国Sigma公司),Percoll分离液(美国Pharmacia公司),DMEM/F12培养液(美国Hyclone公司),优等胎牛血清(Fetal Bovine Serum,FBS,美国Hyclone公司)。MTT(美国Sigma公司),二甲基亚砜(美国Sigma公司)、CCK-8试剂(Cell Counting Kit-8,日本,同仁化学研究所),原代细胞培养液:DMEM/F12培养基+15% FBS+青、链霉素各100 U/ml,pH

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)(2003-AA205020),重庆市科学技术攻关项目(2003-13-6),西南医院临床研究课题(SW2004007)

Supported by the National "863" High-Tech Development Plan of China (2003AA205020), the Sci & Tech Research Project of Chongqing (2003-13-6) and the Clinical Research Projects Sponsored by Southwest Hospital of Third Military Medical University (SW2004007)

作者简介:罗 飞(1976-),男,四川省内江市人,博士研究生,医师,主要从事骨组织工程相关方面的研究。电话:(023)66930632,E-mail:luofly1009@hotmail.com

通讯作者:许建中,电话:(023)68754164,E-mail:xjzslw@hotmail.com

收稿日期:2005-01-31;**修回日期**:2005-06-24

7.3。传代细胞培养液：DMEM/F12 培养基 + 10% FBS + 青、链霉素各 100 U/ml，pH 7.3。

1.2　方法

1.2.1　hMSCs 的获取和扩增　　青年健康志愿者，于髂嵴局麻后作骨髓穿刺，用已经肝素预湿的 20 ml 注射器抽取骨髓 6 ml，再抽吸等量的 DMEM/F12 培养液，混匀后缓慢沿管壁加入到含有等体积密度为 1.073 g/ml 的 Percoll 分离液离心管中，以 2 000 r/min 离心 20 min，吸取中间乳白色云雾状有核细胞层，加入 D-Hanks 液 10 ml 吹打漂洗，1 000 r/min 离心 5 min，弃上清，沉淀加入原代培养液吹打制悬，经细胞计数后，按 $5 \times 10^5/cm^2$ 接种培养瓶，置 37 ℃，5% CO_2、饱和湿度培养箱内培养，48 h 后全量换液，以后隔日换液。待细胞融合 80% 后进行传代培养。0.25 % 胰蛋白酶消化传代，按 $1 \times 10^4/cm^2$ 接种，换用传代细胞培养液培养，用 P2 代的细胞进行下列试验。

1.2.2　RCCS 使用前的准备　　使用 RCCS 中 50 ml 容积的高截面纵横比容器（high aspect ratio vessel，HARV）进行培养。细胞接种前，将容器所有部件在温和中性洗涤液中浸泡 1 h，双蒸水漂洗并浸泡过夜，重新组装，100% 乙醇浸泡 24 h，双蒸水浸泡 24 h。高压蒸汽灭菌，无血清培养基浸泡过夜后备用。

1.2.3　Cytodex-3 微载体的预处理　　将 0.25 g Cytodex-3 干粉用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液（PBS）浸泡过夜，再用 0.1 mol/L 的 PBS 洗涤 2 次，高压灭菌 30 min，无血清 DMEM/F12 培养基洗涤 2 次，浸泡于 DMEM/F12 培养基中，置于 4 ℃冰箱中备用。

1.2.4　细胞培养方法　　将按上述步骤准备好的 1.0×10^7 个 hMSCs 和 0.5 g Cytodex-3 加入到 HARV 中，补充传代细胞培养液充满整个容器，排净气泡，调整旋转速度到微载体的运动轨迹既不与周围碰撞也不在中心聚集，将整个反应器放入 37 ℃，5% CO_2、饱和湿度培养箱内培养。对照组采用平皿培养法，分别用 24 孔细胞培养板（美国 NUCLON，培养面积 1.91 cm^2/孔）进行培养，每孔接种 20 000 个 hMSCs，500 μl 培养液；96 孔细胞培养板（美国 NUCLON，培养面积 0.31 cm^2/孔）进行培养，每孔接种 4 000 个细胞，100 μl 培养液。每日调整 RCCS 旋转速度，保持微载体的运动轨迹既不与周围碰撞也不在中心聚集，试验组和对照组均 48 h 全量更换培养液。

1.2.5　细胞形态观察、计数、粘附率观察　　每 24 小时在 RCCS 选转状态下抽取 0.5 ml 样品，其中 100 μl 用于细胞计数，60 μl 用于 MTT 检测，60 μl 用于 CCK-8 检测，其余用于形态学观察。在 100 μl 样品中加入等量的 0.1% 结晶紫溶液（含 0.1 mol/L 柠檬酸），置于 37 ℃中孵育 30 min，应用血球计数板进行细胞核酸计数。平皿培养法直接在相差显微镜观察各组细胞形态，在 24 孔板中取 3 孔细胞经 0.25 % 胰蛋白酶消化后作细胞计数。根据培养第 24 小时细胞记数结果计算各组细胞的贴附率：细胞贴附率 =（贴壁细胞数/接种细胞数）× 100%。

1.2.6　MTT 检测　　试验组取样按 20 μl/孔加入到 96 孔板 3 个孔中，对照组取 96 孔板中 3 个孔进行试验，以上各孔分别加入 5 g/L 的 MTT 溶液 10 μl，放入培养箱继续培养 4 h，取出培养板，小心吸弃孔内培养上清液，每孔加入二甲基亚砜 150 μl，振荡 10 min 使沉淀充分溶解后，选择 570 nm 波长为测量波长，630 nm 为参比波长，在酶标仪上测定各孔的光吸收值（OD），以不加细胞的空白孔 OD 值作调零值。每天测量的结果，以时间为横轴，光吸收值为纵轴绘制曲线。

1.2.7　CCK-8 检测　　试验组取样按 20 μl/孔加入到 96 孔板 3 个孔中，对照组取 96 孔板中 3 个孔进行试验，培养后第 1 ~ 8 天，每天在检测孔各加 CCK-8 试剂 10 μl，继续培养 3 h 后直接测定各观测孔 OD 值，测定波长为 450 nm，参比波长为 655 nm，以不加细胞组为空白对照。每天测量的结果，以时间为横轴，光吸收值为纵轴绘制曲线。

1.3　统计学处理

实验统计数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 SPSS 12.0 统计软件进行双因素方差分析。

2　结果

2.1　细胞形态倒置相差显微镜观察

接种 24 h 后，大部分细胞贴附于微载体表面，培养液中存留少量散在分布的类球形、折光性弱的细胞，微载体表面的细胞多数呈半球形，少数已铺展为不规则扁平形，少数为长梭形，随着时间推移，微载体表面的细胞数量逐渐增加，形态也更加趋向于长梭形，第 9 天细胞数量达到峰值，此时的细胞在微载体上的分布仍不均匀，多数微载体几乎长满细胞（图 1）。以后细胞数目及形态无显著变化。对照组细胞刚传代后为圆形，折光性好，接种后 2 ~ 4 h 细胞迅速贴壁、铺展，8 ~ 10 h 后活细胞基本完成贴壁，重新恢复为梭形，第 6 天几乎完全铺满容器底，以后部分细胞逐渐变扁，呈多角形外观，折光性减弱，胞内颗粒增加。

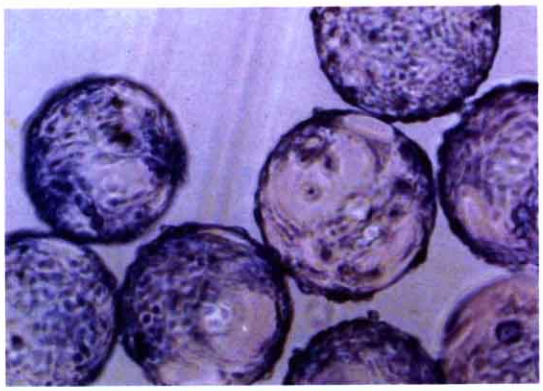
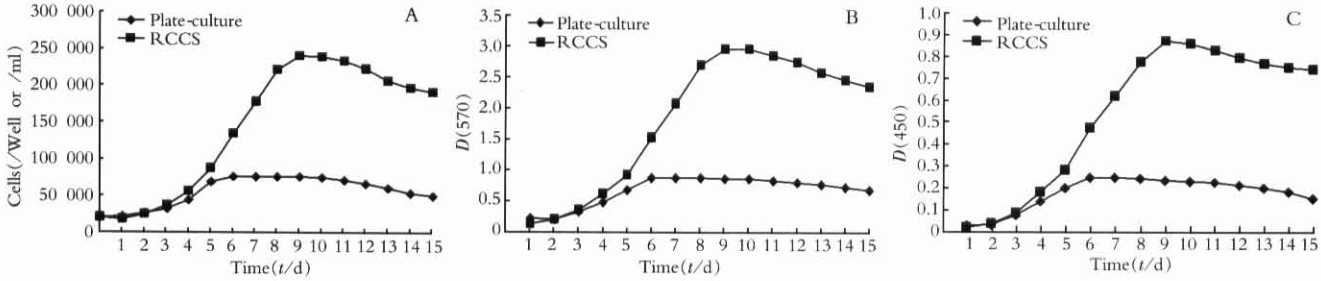


图 1　Cytodex-3 上的生长第 9 天的 hMSCs　（Invert phase contrast microscope × 100）

Fig 1　hMSCs on the Cytodex-3 microcarriers at day 9　（Invert phase contrast microscope × 100）

2.2　细胞计数

根据各次细胞计数结果计算对数生长期平均倍增时间。24 h 贴壁细胞率平皿培养法为（108.0 ± 2.2）%，微重力培养法为（86.9 ± 3.7）%。绘制细胞增殖曲线见图 2A，试验组和对照组间差异非常显著（$P < 0.01$）。由生长曲线可以看出，平皿培养法中 hMSCs 对数生长期约为第 2 ~ 5 天，第 6 天细胞数量达峰值（7.55 ± 0.07）× 10^4 个，微重力培养中 hMSCs 对数生长期约为第 2 ~ 8 天，第 9 天细胞数量峰值在，（2.39 ± 0.01）× 10^5 个。



A: cell counting; B: MTT; C: CCK-8

图2 RCCS中的hMSCs增殖曲线

Fig 2 Growth curves of the hMSCs culturing by two methods

2.3 MTT检测

根据每日检测结果绘制细胞增殖曲线如图2B。组间差异非常显著($P<0.01$)。

2.4 CCK-8检测

根据每日检测结果绘制细胞增殖曲线如图2C。各组间差异非常显著($P<0.01$)。

3 讨论

采用常规的平皿接种传代培养方法分离扩增hMSCs,增殖速度慢,操作繁琐,影响因素多,不便于规模化培养,微载体培养法在细胞的大规模扩增方面取得了一定的成功。Ven Wezel于1967年最先使用微载体技术进行细胞培养,经过30余年的发展,该技术目前已渐趋完善和成熟,并广泛应用于体外细胞培养[1]。微载体技术培养细胞最显著的优点是其具有极高的比表面积,例如:1 g Cytodex-3微载体的总表面积约为4 600 cm^2,可置于100 ml生物反应器中培养细胞,而100 ml的普通培养瓶的培养面积仅35 cm^2左右,所以利用微载体技术培养效率高,能在较小的空间内培养出大量的细胞。此外,微载体技术还有以下显著优点:①兼有单层培养和悬浮培养的优点,且是均相的三维培养,细胞所处的环境均一;② 延长细胞的对数生长期,加快细胞生长速度;③ 环境条件(温度、pH值、CO_2等)容易调节和监控;④培养操作便于系统化、自动化,减少污染的危险;⑤ 连续培养时,加入新的微载体后细胞便能自行迁移其上,免去了酶消化传代对细胞的损害。

微载体培养法的装置主要是搅拌式生物反应器,但搅拌式生物反应器在培养过程中剪切力较大,不利于细胞的生长。RCCS源自美国航空航天局,是一种绕水平轴旋转、充满液体,通过气液两相膜进行气体交换的圆柱形旋转壁式生物反应器(rotating wall vessel bioreactor, RWVB),其培养室旋转带动容器内培养液和培养物一起做旋转运动。通过调整旋转速度可实现RCCS中的培养液和培养物与容器壁同步旋转,当微载体上的细胞增殖聚集后,增加旋转速度以抵消增加的沉降率。此时,培养物在水平轴上建立了近似均质液体的悬浮轨道,重力向量持续随机分布,使培养物维持在连续的自由落体状态,作用于细胞的表观重力降到大约10^{-2} g[2,3],在地面上模拟了类似太空的微重力环境。

在RCCS模拟的微重力环境中,细胞克服重力影响易于聚集,能获得比在普通重力环境中更高的细胞培养密度[2]。本研究中,当细胞数量达到峰值时,RCCS中的细胞密度为2.39×10^6/ml,而平皿培养法中的细胞密度为1.51×10^5/ml,二者相差15.8倍,说明同样多的培养基在RCCS中能支持更多的细胞,培养基的利用效率更高。培养密度的增加可节约生产成本、减少操作强度,便于规模化生产。模拟微重力环境也可以使细胞克服重力影响更容易贴附在微载体表面[4]。细胞在模拟微重力环境中有一定程度的三维空间自由,有利于细胞-细胞、细胞-基质之间按组织学特性相互接触,有利于细胞的增殖和分化[6],其原因可能是微重力直接影响基因表达或者间接促进细胞的自分泌/旁分泌作用[5]。本研究结果显示,试验组hMSCs的指数生长期从平皿培养法的2~5 d,延长到2~8 d,表明细胞生长的最佳时期延长,更有利于细胞增殖。微重力组和平皿培养组细胞数量达到峰值时的平均每天增殖倍数分别为:1.32倍和0.629倍,在两种方法各到自达最大细胞数量期间,前者的细胞的增殖效率较后者高近1倍。

除了能模拟微重力环境外,RCCS还有这些优点:①液体与固体微粒的同步移动使其受到的剪切力很小,作用于单个微粒(细胞/微载体)的流体剪切力小于0.05 Pa[2,3];②培养液通过旋转逐渐混合,使内部环境均匀、物质传递能力强;③共轴氧合器提供了充分

氧合,高效物质交换能力为高密度细胞培养提供良好的培养环境。另一方面,RCCS 也存在一些不足,其提供的模拟微重力环境在旋转培养过程中还存在碰撞、剪切力等因素的影响;由于设计原理的限制,RCCS 的旋转半径不可能很大,影响了其培养规模;RCCS 的价格昂贵,使用较繁琐。新一代的循环灌注式 RCCS 虽然部分解决这些问题,但仍值得深入研究。

总之,微重力环境及微载体技术的应用较以往的平皿培养法使 hMSCs 的指数生长期提高 2 倍,细胞增殖速度提高近 2 倍,培养密度增加 15.8 倍,实现了种子细胞的快速扩增,便于规模化生产。微重力环境及微载体技术对 hMSCs 的分化潜能、生物安全性、组织构建和成熟等因素的影响值得继续开展深入研究。

参考文献:

[1] Malda J, van Blitterswijk C A, Grojec M, *et al*. Expansion of bovine chondrocytes on microcarriers enhances redifferentiation[J]. Tissue Eng, 2003, 9(5): 939-948.

[2] Unsworth B R, Lelkes P I. Growing tissues in microgravity[J]. Nat Med, 1998, 4(8): 901-907.

[3] Liu T Q, Li X Q, Sun X Y, *et al*. Analysis on forces and movement of cultivated particles in a rotating wall vessel bioreactor[J]. Biochemical Engineering Journal, 2004, 18(2): 97-104.

[4] Khaoustov V I, Risin D, Pellis N R, *et al*. Microarray analysis of genes differentially expressed in HepG2 cells cultured in simulated microgravity: preliminary report[J]. *In Vitro* Cell Dev Biol Anim, 2001, 37(2): 84-88.

[5] Licato L L, Grimm E A. Multiple interleukin-2 signaling pathways differentially regulated by microgravity[J]. Immunopharmacology, 1999, 44(3): 273-279.

[6] Chiu B, Wan J Z, Abley D, *et al*. Induction of vascular endothelial phenotype and cellular proliferation from human cord blood stem cells cultured in simulated microgravity[J]. Acta Astronaut, 2005, 56(9-12): 918-922.

(编辑 王 红)

文章编号:1000-5404(2005)16-1643-01

个案与短篇

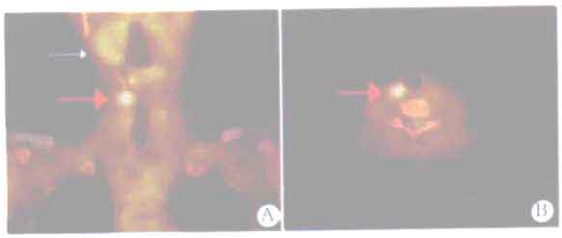
^{18}F-FDG PET/CT 探测早期甲状腺癌 1 例

Thyroid carcinoma at early stage detected by ^{18}F-FDG PET/CT imaging: a case report

李前伟[1],黎 川[2],厉红民[1],黄定德[1],黎海涛[2],陈 霖[2]

(第三军医大学西南医院:[1]核医学中心,[2]放射科,重庆 400038)

患者,女,48 岁,健康体检 ^{18}F-FDG PET/CT 检查发现甲状腺右叶上份局限性异常高代谢灶。显像仪器为 SIEMENS biograph 2- PET/CT,患者禁食 12 h,静脉注射 ^{18}F-FDG 274 MBq,120 min 后行常规 PET/CT 显像,范围从眼眶下部至大腿近端,PET 采集数据经 CT 衰减校正,OSEM 迭代重建。PET/CT 融合图像显示:右甲状腺上份见一类圆形异常高代谢浓聚灶(图 1 红箭头示),大小约 1.2 cm × 1.3 cm × 1.1 cm,平均 SUV 为 3.18,提示为恶性病变;右颌下淋巴结椭圆形轻度核素浓聚,平均 SUV 为 2.10,考虑炎性改变(图 1A 白箭头示)。次日彩超示甲状腺右叶多发性实质结节,包膜不完整。于 2004 年 10 月 13 日入院。查体右叶甲状腺未扪及明显包块,无明显压痛,颈部未扪及明显肿大淋巴结,余无异常发现。MRI 示颈 4/5、5/6,胸 11/12 椎间盘变性、膨出;脑电图见左侧椎动脉痉挛;其余检查均无异常。术中见甲状腺右叶上极约 1.0 cm × 1.0 cm 实性包块,质硬,包膜欠完整,无粘连,包块上缘见一约 1.0 cm × 1.0 cm 淋巴结;完整切除包块及淋巴结,包块冰冻切片病理报告为甲状腺癌,遂行甲状腺癌根治术。病理诊断:甲状腺微灶癌(乳头状腺癌Ⅰ级);淋巴结为慢性炎症。患者于 2004 年 10 月 19 日痊愈出院。



A:冠状断层;B:横断层;红箭头:一类圆形异常高代谢浓聚灶;白箭头:炎性改变

图 1 甲状腺微灶癌 ^{18}F-FDG PET/CT 融合图像

作者简介:李前伟(1963-),男,贵州省安顺市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事肿瘤分子核医学显像与治疗方面的研究。电话:(023)68754422

收稿日期:2005-03-01;修回日期:2005-05-05

(下转 1647 页)