文章编号:1000-5404(2007)10-0907-04

论著

小鼠骨髓间充质干细胞的分离与纯化培养的实验研究

仝识非[1],宋治远[1],姚 青[1],万 琪[2],邹丽云[2] (第三军医大学:[1]西南医院心血管内科,重庆市介入心脏病学研究所,[2]基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探索小鼠骨髓间充质干细胞的体外纯化培养方法。**方法** 先采用直接贴壁法培养的小鼠股、胫骨髓细胞,再用免疫磁珠法分选第3代中的CD11b⁻细胞。取分选纯化细胞进行形态学观察,并检测细胞在不同诱导条件下向成骨细胞及脂肪细胞的分化能力。**结果** ①原代及传代培养的小鼠骨髓贴壁细胞多呈梭形,部分呈不规则型,其中含有较多的CD11b⁺细胞;磁珠分离后的纯化细胞呈现纺锤型、星型及不规则型等多种形态,细胞质丰富,核仁明显,细胞平行排列或漩涡状生长;②成骨诱导3周后mMSCs分化为成骨细胞,茜素红S染色有橘红色磷酸盐胞外基质沉积;③随着成脂化诱导时间的延长,细胞逐渐增大,油红O染色可见胞质内大量橙红色脂肪空泡。**结论** 单纯的贴壁及传代培养不能纯化小鼠骨髓间充质干细胞,贴壁与免疫磁珠分离相结合才是一种有效的mMSCs体外分离和纯化方法。

关键词:间充质干细胞;小鼠;免疫磁珠;骨髓
中图法分类号:R329-33;R329.24;R331.22 **文献标识码**:A

Cultivation, retrieval and purification of mouse MSCs

TONG Shi-fei[1], SONG Zhi-yuan[1], YAO Qing[1], WAN Ying[2], ZOU Li-yun[2] ([1]Department of Cardiology, Southwest Hospital, [2]Institute of Immunology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To develop new methods to cultivate, retrieve and purify mouse mesenchymal stem cells (mMSCs). **Methods** Bone marrow was collected from 2-month-old Kunming mice by flushing femurs and tibias with complete medium of DMEM-LG. Cells were plated in a Petri dish. After 24 hours, non-adherent cells were removed by two to three washes with PBS, adherent cells were further cultured in complete medium and retrieved by trypsinisation with 0.25% trypsin for 5 min at 37 ℃. The treated adherent cells were cultivated with 3 × dilution for further generations. CD11b-negative cells were retrieved from the collected adherent cells of 3rd generation by using immunomagnetic microbeads, and continued to be cultured in complete medium. After the cultured cells were retrieved, their morphology and their ability of osteoblastic differentiation and adipocytic differentiation were examined. **Results** Most of mMSCs from 1st generation were of shuttle shape, some of irregular shape. After treatment with magnetic microbeads and several generations, mMSCs were of spindle, star and irregular shape. These cells were of rich cytoplasma, clear nucleolus, and grew in parallel or vortex. The cultured adherent cells from the first and subsequent generations had plenty of CD11b-positive blooding-making cells. After 20-day osteoblastic induction, mMSCs differentiated into bone cells, which showed orange phosphate in extracellular matrix by Alizarin red S staining. mMSCs could differentiate into lipocytes. The size of cells increased along with fat-developing induction period. These cells showed many orange fatty follicles with O Red Oil dyeing. **Conclusion** Pure mMSCs can not be retrieved by either adhering method or generation cultivation method separately. The combined methods of adhering, immunomagnetic microbeads, and serial subcultivation is effective *in vitro* in retrieve mMSCs.

Key words: mesenchymal stem cells; mouse; immunomagnetic microbeads; marrow

骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一种成体干细胞,能从自体骨髓中获取,容易分离及扩增培养,其与胚胎干细胞相比优势明显,不存在免疫排斥、畸胎瘤及伦理等问题,是近年干细胞研究的热点和重点。目前,对塑料培养皿表面的高黏附特

基金项目:国家自然科学基金(30370585)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30370585)
作者简介:仝识非(1973-),男,河南省洛阳市人,博士,主治医师,主要从事心脏电生理的基础与临床方面的研究。电话:(023)68754118
通讯作者:宋治远,电话:(023)68765168
收稿日期:2006-08-28;**修回日期**:2007-01-31

性虽然是成功分离及纯化多种哺乳动物 MSCs 的关键,有不少学者[1,2]也曾应用直接贴壁法纯化培养小鼠 MSCs(mMSCs)。但有资料表明其中混杂有较多的造血干细胞,且这些细胞不会随着细胞的传代而消失[3]。因此,本实验采用贴壁法及重复免疫磁珠法分离纯化 mMSCs,并观察 mMSCs 的体外多向诱导分化能力,为以 mMSCs 为基础的组织工程、细胞治疗和基因治疗研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

6~8 周龄 SPF 级昆明小鼠 20 只,体质量 30~50 g(雌雄不拘),由本校实验动物中心提供。DMEM 培养基(GIBCO)、CD11b-FITC(ebioscience)、CD11b MicroBeads(MiltenyiBiotec)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠全骨髓细胞的贴壁分离与原代培养 小鼠断颈处死,无菌条件下取股骨和胫骨,清除表面肌肉组织。刺穿股骨、胫骨两端,用 DMDM 培养液(含 10% FCS)冲洗骨髓,200 目筛网过滤后离心 5 min(1 000 r/min),培养液重悬细胞,调整细胞浓度 1×10^6/ml。常规培养 24 h 后全量换液去除非贴壁细胞。当细胞生长至约 80% 融合时,用 0.25% 胰酶和 0.01% EDTA 消化,按 1∶3比例常规传代培养。

1.2.2 小鼠骨髓间充质干细胞的纯化 酶解法消化收集第 3 代贴壁骨髓细胞(3×10^6细胞/300 μl)。加入 Fc 受体阻断剂和结合有小鼠 CD11b 单克隆抗体的磁珠各 100 μl,充分混匀后 4 ℃孵育 30 min。把孵育完毕的细胞悬液加到分离柱中,自然流尽,收集流出细胞,并按上述方案再次孵育收集细胞。更换分离柱,把孵育好的细胞悬液加到分离柱中,收集自然流出的细胞。用培养液重悬,一部分继续常规贴壁培养,另一部分流式细胞仪检测。

1.2.3 流式细胞仪检测 取第 3 代骨髓贴壁细胞及免疫磁珠新鲜分离的细胞(1×10^6),重悬于 DMEM 培养液中,加入 FITC 标记的抗小鼠 CD11b(CD11b-FITC),4 ℃孵育 30 min,PBS 洗涤后立即送流式细胞仪分析结果。同型抗体检测作为阴性对照。

1.2.4 小鼠骨髓间充质干细胞的多向分化

1.2.4.1 mMSCs 的成骨化诱导 将免疫磁珠法分选细胞继续扩增培养(1 000 个/cm^2)。生长至 80% ~90% 时用0.25% 胰酶/0.01% EDTA 消化,用 α-MEM 培养液重悬细胞,调整细胞浓度(1000 个/cm^2),按下列条件进行细胞成骨化诱导。完全培养基(α-MEM + 10% FCS + 100 U/ml 青霉素 + 100 mg/L 链霉素 + 2 mmol/L 谷氨酰胺)、10^{-5} mmol/L 地塞米松、0.3 mmol/L 维生素 C、10 mmol/L β-磷酸甘油钠,培养 3 周。去除培养液,PBS 冲洗后 4% 多聚甲醇固定细胞,用茜素红 S 室温染色 30 min。显微镜下观察细胞外基质的钙沉积。

1.2.4.2 mMSCs 的成脂化诱导 将免疫磁珠法分选细胞继续扩增培养(1 000 个/cm^2)。生长至 80% ~90% 时用 0.25% 胰酶/0.01% EDTA 消化,用 F12 培养液重悬细胞,调整细胞浓度(1 000 个/cm^2),按下列条件进行细胞成脂化诱导。完全培养基(F12 + 2% FCS + 100 U/ml 青霉素 + 100 mg/L 链霉素 + 2 mmol/L 谷氨酰胺)、10^{-5} mmol/L 地塞米松、1 mg/L 胰岛素,培养 3 周。去除培养液,PBS 冲洗后 10% 甲醛固定细胞,然后油红 O 室温染色 60 min。显微镜下观察脂肪空泡。

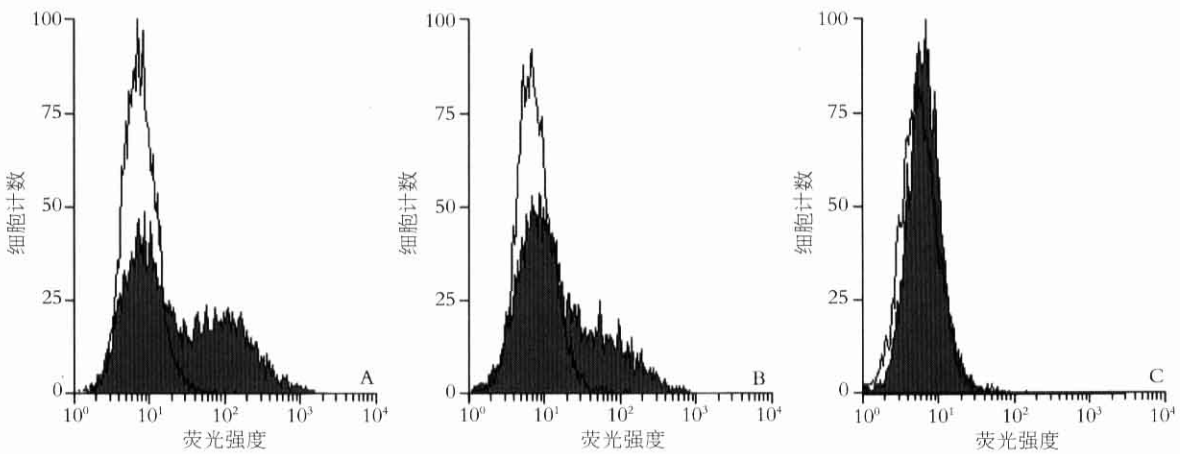
2 结果

2.1 骨髓细胞的原代及传代培养

接种后 4 h 已有细胞贴壁,24 h 后换液可除去大量圆形漂浮细胞,贴壁细胞大部分呈圆形、短条形及多角形。3~4 d 后可见部分贴壁细胞呈克隆样生长。传代细胞培养 48 h 后,细胞大小趋于均匀,以梭形细胞为主,部分呈不规则型。

2.2 mMSCs 的纯化培养

流式细胞仪检测发现直接贴壁法培养的第 3 代细胞中 $CD11b^+$ 细胞约占 40%,单次磁珠分离后所得细胞数平均为 $(5.2\pm1.2)\times10^6$/ml,经流式细胞仪鉴定 $CD11b^-$ 细胞纯度为 75% ~85%;重复磁珠分离后所得细胞数平均为 $(3.8\pm0.9)\times10^6$/ml,经流式细胞仪鉴定 $CD11b^-$ 细胞纯度超过 95%(图 1)。



A:磁珠分离前的骨髓;B:第一次磁珠分离后;C:第二次磁珠分离后

图 1 骨髓贴壁细胞免疫磁珠分选前后流式细胞仪检测结果

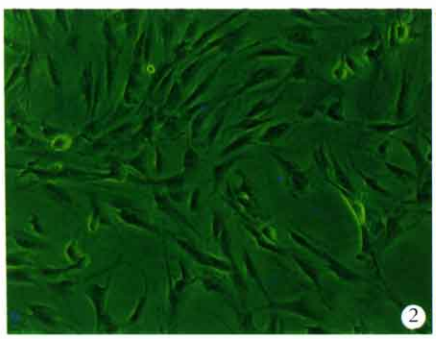
磁珠分离后的小鼠骨髓间充质干细胞于接种 1 h 开始贴壁，贴壁培养初期细胞有不规则细胞质凸起。培养 48 h 后，细胞大小及折光性趋于均匀一致，分离细胞存活率超过 90%。随着培养时间延长及多次传代，细胞呈现纺锤型、星型及不规则型等多种形态，细胞质丰富，核仁明显，细胞平行排列或漩涡状生长（图 2）。纯化后的细胞培养至第 10 代仍能呈现较强的增殖能力。

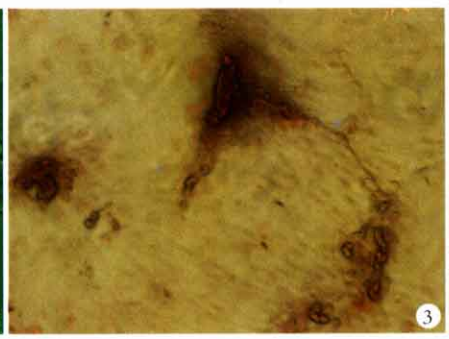
2.3　mMSCs 的成骨化诱导

成骨诱导 20 d 后 mMSCs 可分化为成骨细胞，茜素红 S 染色有橘红色磷酸盐胞外基质沉积（图 3）。

2.4　mMSCs 的成脂化诱导

骨髓间充质干细胞在成脂化诱导 3 周后，约 50% 细胞可分化为脂肪细胞，随着成脂诱导时间的延长，细胞形态逐渐增大，油红 O 染色可见大量橙红色脂肪空泡（图 4）。





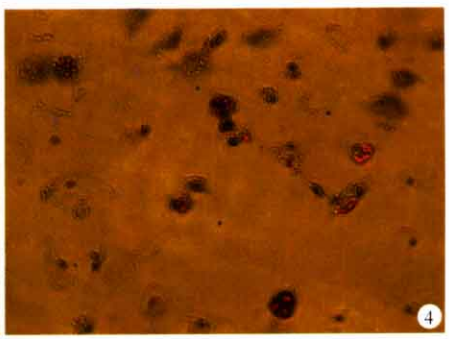


图 2　**免疫磁珠分选后纯化培养 P_5 mMSCs**　（倒置相差显微镜 ×200）

图 3　**成骨诱导后的 mMSCs**　（茜素红 S 染色 ×100）

图 4　**成脂化诱导后的 mMSCs**　（油红 O 染色 ×200）

3　讨论

人们对 MSCs 关注不仅在于其具有多向分化潜能，还表现在 MSCs 对外源基因所具有的高转染效率及对外源基因高效稳定的表达。但 MSCs 作为一种有效的机体受损细胞的补充来源与优良的目的基因载入平台，如何纯化培养是其功能发挥的前提和基础。从 Friedenstein 等首次从骨髓中分离得到了骨髓间充质干细胞以来，人们相继从人、大鼠、兔、猪等多种哺乳动物骨髓中成功地分离了 MSCs。由于 MSCs 表面缺乏特异性细胞标志物，因此对 MSCs 尚无相对统一的鉴定标准。所谓 MSCs 的“金标准”最早是由 Pittenger 等[4]提出的，即 MSCs 在适当的外界刺激下能定向分化为成骨、软骨及脂肪细胞。虽然以 MSCs 的分化能力作为其鉴定标准不失为一种好的方法，但这无助于 MSCs 的初期分离和纯化。

近年来，国内外有许多关于 mMSCs 的实验研究，但大多也是采取直接贴壁法及/或密度梯度离心法，而没有对其进行进一步的纯化[1,2]。有不少学者发现贴壁的小鼠骨髓细胞中含有间充质及造血两种成分的干细胞[3,5]，后者 CD11b 表达阳性，且这些造血干细胞并不会随着细胞的培养及传代而消失，是 mMSCs 纯化培养的主要障碍。为了克服这一难题，有学者应用 5-氟尿嘧啶消除骨髓中的造血干细胞或者将特定基因导入骨髓基质干细胞，利用 mMSCs 易于分化的特性及对外来基因的高转染效率纯化培养 mMSCs，但效果不太理想。也有研究采用 CD11b 抗体纯化 mMSCs，但其纯度仍有待提高，且需要较长时间的传代培养才能消除混杂的造血干细胞[6-8]。

在本研究中，初始贴壁的细胞异质性很大，经过 2 次的传代培养后多数变为梭型样细胞，流式细胞仪检测显示 $CD11b^+$ 细胞约占 40%。连续两次过柱分选后 mMSCs 呈纺锤型、星型及不规则型等多种形态，细胞纯度大于 95%，纯化后的细胞培养至第 10 代仍能呈现较强的增殖能力。本实验采用的微型磁珠对细胞损伤小，有利于分离细胞的后续培养，并可直接进行流式细胞仪检测，mMSCs 的纯化培养时间也明显缩短。虽然 MSCs 表面缺乏特异性细胞标志物，但自我更新和多向分化是所有干细胞必须具备的两个最重要特征。为了说明本实验中 mMSCs 的多向分化特性，我们应用成骨及成脂诱导液对纯化细胞进行诱导。结果表明纯化细胞能分化为成骨细胞，成脂诱导后细胞内有脂滴形成。这与 Tropel 等[7]的研究结果相吻合。纯化细胞所具有的这种多向分化能力在一定程度上也反证它的干细胞特性[9]。

本研究结果表明，单纯的贴壁及传代培养不能纯化小鼠骨髓间充质干细胞，贴壁培养与免疫磁珠分离相结合才是一种有效的 mMSCs 体外纯化方法。本实验结果将为以 mMSCs 为基础的实验研究提供可靠的细胞平台。

参考文献：

[1] Jin H K, Carter J E, Huntley G W, *et al*. Intracerebral transplantation of mesenchymal stem cells into acid sphingomyelinase-deficient mice delays the onset of neurological abnormalities and extends their life span [J]. J Clin Invest, 2002, 109(9): 1183-1191.

[2] Kotton D N, Ma B Y, Cardoso W V, *et al*. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium[J]. Development, 2001, 128(24): 5181-5188.

[3] Phinney D G, Kopen G, Isaacson R L, *et al*. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation[J]. J Cell Biochem, 1999, 72(4): 570-585.

[4] 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.

[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] Kopen G C, Prockop D J, Phinney D G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(19): 10711-10716.

[7] Tropel P, Noel D, Platet N, *et al*. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow[J]. Exp Cell Res, 2004, 295(2): 395-406.

[8] Anjos-Afonso F, Siapati E K, Bonnet D. *In vivo* contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions[J]. J Cell Sci, 2004, 117(Pt 23): 5655-5664.

[9] 邹丽琴，苏踊跃，孙荣距，等. 大鼠骨髓间充质干细胞向表皮细胞分化的初步研究[J]. 第三军医大学学报，2006，28(6)：584-586.

（编辑 龙 亮）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2007)10-0910-01

盐酸坦索罗辛加阿托品治疗尿路结石引起肾绞痛的疗效

莫党生，轩若亮 （重庆市中山医院急诊科，重庆 430013）

输尿管结石大都伴发严重腰腹疼痛，急需尽快缓解疼痛症状。从2002年10月至2004年10月，我院急症科针对收治的86例输尿管结石病例，分别采用了杜冷丁加阿托品和盐酸坦索罗辛加阿托品的解痉止痛治疗。本研究分析评估2种方法在治疗效果上的差异性。报告如下。

1 材料与方法

盐酸坦索罗辛由沈阳山之内制药厂生产；86例患者均有典型腹痛症状和体征，并经腹部B超和尿血检查证实诊断。输尿管结石直径0.3～0.8 cm。病例中，男性71例；女性15例；年龄35～63岁。伴发高血压的有17例。所有病例被随机分为两组，其中，杜冷丁加阿托品组40例（高血压患者6例）；盐酸坦索罗辛加阿托品组46例（高血压患者11例）。杜冷丁加阿托品组分别给杜冷丁50 mg+阿托品0.5 mg；盐酸坦索罗辛+阿托品组给药为立即给患者口服盐酸坦索罗辛0.4 mg并肌注阿托品0.5 mg。

2 结果

2.1 疗效判定标准

采用参考视觉脸谱评分法[1]观察脸部表情及询问主观感觉等综合评定（时间限制在60 min）疼痛完全消失、缓解、止痛无效。治疗前和用药后60 min测量血压。

2.2 分析结果

两治疗组年龄、性别、诱因、结石大小等各项指标差异无统计学意义（$P>0.05$）。通过对组用药60 min疗效、一级症状差异的χ^2检验显示2组差异不显著（$P>0.05$，表1）。杜冷丁+阿托品治疗组治疗6例高血压后有3例血压升高（50%）。盐酸坦索罗辛+阿托品治疗组治疗11例高血压后仅1例血压升高（9.1%）。

表1 治疗组疗效观察

组别	疼痛消失	缓解	无效	合计	有效率(%)
杜冷丁+阿托品	23	11	6	40	0.85
坦索罗辛+阿托品	22	16	8	46	0.82

$\chi^2=0.90$，$P=0.764$ 双侧

3 讨论

杜冷丁加阿托品是急诊医生对付输尿管结石所致腹痛的常规手段之一，并被证实是行之有效的。联合使用杜冷丁和阿托品是从中枢镇痛和松弛输尿管平滑肌2个途径起作用的联合用药的好处是减少用药剂量、减轻药物的副作用。但是，杜冷丁等鸦片受体兴奋剂，除能够致成瘾外，还往往导致因为迷走神经张力升高，出现频繁呕吐等副反应。并且涉及麻醉品管理等问题；而阿托品有升高血压加快心率的副作用，对罹患有心血管疾病的患者有较高的危险性。

（下转914页）

作者简介：莫党生（1963－），男，重庆市人，副主任医师，主要从事急诊学方面的研究，发表论文8篇。电话：(023)63515442，E-mail：cqwk66@sina.com

收稿日期：2006-05-19；修回日期：2006-12-25