技术方法

文章编号:1000-5404(2007)10-0988-02

两种方法分离小型猪骨髓间充质干细胞的比较

郭书权,吴雪晖,许建中,罗 飞 (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 通过比较Ficoll和Percoll分离小型猪骨髓间充质干细胞(marrow mesenchymal stem cells, MSCs),获得较好分离小型猪骨髓MSCs的方法。**方法** Ficoll及Percoll分离小型猪骨髓MSCs后,台盼蓝染色及MTT法绘制生长曲线观察细胞活力,流式测定CD29、CD44、CD34、CD45行MSCs鉴定并了解其纯度。**结果** 两种方法分离后检测显示:Percoll组的细胞活力,细胞的纯度明显较Ficoll组高($P<0.05$)。**结论** Percoll是较好分离小型猪骨髓MSCs的方法。

组织工程骨主要由种子细胞和支架构建,其中种子细胞是组织工程研究中最基本,也是首要的环节。骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是目前最常用的种子细胞[1]。目前关于分离小型猪骨髓MSCs的报道较少。Ficoll和Percoll液是最常用的密度分离介质,通过观察Ficoll和Percoll分离小型猪骨髓间充质干细胞后对细胞活力、细胞的生物性、纯度以及成骨分化能力的影响,以得到较好分离小型猪骨髓间充质干细胞的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

小型香猪,10~12月龄,体质量为25~34 kg(第三军医大学实验动物中心提供);Percoll液(Sigma,USA),Ficoll(天津生物制造);胎牛血清(FBS)、DMEM/F_{12}(Hyclone,USA);CD29、CD34、CD44、CD45单抗及荧光标记二抗(联科生物)。

1.2 方法

1.2.1 MSCs分离 速眠新和氯胺酮联合应用麻醉下,抽骨髓10 ml,用PBS稀释骨髓液,400×g离心10 min,去上清和脂肪层,等量稀释分成两份分别加入Ficoll组(密度为1.077 g/ml的Ficoll液)和Percoll组(密度为1.073 g/ml的Percoll液)进行分离。Ficoll与骨髓悬液的比例为2∶1,Percoll与骨髓悬液的比例为1∶1,900×g离心30 min,吸取中间乳白色云雾状有核细胞层,用DMEM/F_{12}漂洗2次,加入15% FBS的DMEM/F_{12}培养液,制成单细胞悬液,以1×10^6/cm^2接种培养瓶,置37 ℃、5% CO_2、饱和湿度孵箱内孵育。

1.2.2 细胞活力检测 取1滴细胞悬液加1滴4%台盼蓝染液混匀,加盖片,显微镜高倍镜检活细胞数目。镜下观察贴壁情况。细胞活力按以下公式计算:细胞活力=活细胞数/细胞总数。

1.2.3 细胞生长曲线 分别取两组0、1、3代细胞,制成1×10^3的细胞悬液,接种96孔培养板,每孔细胞悬液200 μl,置37 ℃、5% CO_2、饱和湿度孵箱内孵育,各组每24小时分别取出4孔,每孔加入MTT(2 mg/ml)20 μl,37 ℃孵育,4 h后吸弃孔内培养液,每孔加入150 μl分析纯的二甲基亚砜,振荡10 min,用分光光度计在492 nm波长处测定每孔的吸光度值D(492),以D(492)值为纵坐标,时间为横坐标绘制生长曲线。

1.2.4 细胞鉴定及纯度确定 分别消化、离心,收集传代培养的MSCs,PBS洗涤3次,调节细胞浓度至1×10^6个/ml,取100 μl细胞悬液加入1.5 ml EP管,每个测定管中加入2 μl相应的抗CD29、$CD34^-$、CD44、CD45单抗以及100 μl 2%的BSA,室温孵育30 min,PBS洗3次,400×g离心5 min,弃上清,然后加入相应的带FITC、PE的标记二抗以及100 μl 2%的BSA,暗区4 ℃下孵育30 min,PBS洗3次,400×g离心5 min,弃上清,加入1%的多聚甲醛固定,置空白管以及小鼠IgG、FITC、PE、作阴性对照,即日上机检测。通过表面标志的含量来确定细胞的纯度。

1.3 统计学方法

数据用$\bar{x}\pm s$表示,应用SPSS 12.0统计软件进行t检验。

2 结果

2.1 MSCs镜下及活力检测

镜下细胞形态无明显差异,Ficoll组为(90.5±1.5)%,Percoll组细胞活力为(96.3±0.8)%,Percoll组明显强于Ficoll组($P<0.01$)。台盼蓝染色检测细胞分离过程中损伤情况,结果说明Percoll液对细胞的损伤较小。贴壁后4 d观察Percoll组细胞贴壁数较Ficoll组高且克隆增殖快($P<0.05$)。

2.2 生长曲线

两组方法在0、1、3代的细胞生长曲线基本现同,随传代细胞增值的潜伏期逐渐缩短,细胞倍增时间也逐渐缩短;各代间Percoll组较Ficoll组细胞增值的潜伏期短,倍增时间缩短。说明Percoll组分离的细胞细胞活力较Ficoll组强。

2.3 细胞表面标志物检测

细胞对不同时期细胞的细胞表面标志$CD34^-$、$CD45^-$、

基金项目:国家高技术研究发展计划(863)重大专项(2003AA205020);重庆市科技攻关项目(2003136)
Supported by the National "863" High-Tech Development Plan of China (2003AA5020) and the Key Sci &Tech Research Project of Chongqing (2003136)

作者简介:郭书权(1974-),男,四川省营山县人,博士研究生,主治医师,主要从事骨组织工程及脊柱外科方面的研究,电话:13983895664,E-mail:gsq05@yahoo.com.cn
通讯作者:许建中,电话:(023)68754164

收稿日期:2006-08-30;修回日期:2006-12-25

$CD29^+$、$CD44^+$检测显示两种方法获得的细胞表面标志CD29、CD44阳性表达，CD34、CD45阴性表达，符合间充质干细胞的表型。原代培养时细胞表面标志检测显示比例低，随传代培养细胞标志物检测逐渐增高，到第3代时基本稳定，显示第3代时细胞纯度较高，传代细胞检测结果显示Percoll组较Ficoll组细胞纯度高($P<0.05$)。

3 讨论

1976年Friedenstein等[2]首次从骨髓里分离出贴壁生长的纤维样细胞，后来证实该细胞是MSCs。MSCs在临床得到了广泛的应用[3]。但如何从骨髓分离纯化MSCs是一直研究的难点，由于其缺少特异的表面标志，流式荧光细胞分选法以及磁珠分离法均不能获得更为理想的细胞[4,5]。目前密度离心法仍是分离人骨髓MSCs的重要标准，Ficoll及Percoll分离液是最常用密度分离介质，因密度不同而导致分离结果不同。长期培养观察研究显示，Ficoll分离后混有较多的成纤维细胞。Guo等[6]认为Percoll液较Ficoll液更适合分离人骨髓间充质干细胞，并推测特别的密度能够有利于从骨髓分离出MSCs。

我们用Ficoll和Percoll两种介质分离小型猪骨髓间充质干细胞并观察了细胞活力、生物性能，检测了细胞表面标志物以及成骨分化能力，结果显示分离过程中Percoll较Ficoll对细胞的损伤小；两组生长曲线相似，但生长潜伏期以及倍增时间在早期Percoll较Ficoll明显短，后期不明显；CD29、CD44、$CD34^-$、$CD45^-$是MSCs的主要表面标志物，两组均有表达，且发现其纯度随传代而提高，Percoll组在传第3代时各标志物纯度已相当高，与Ficoll组比较差异显著($P<0.05$)。本实验显示Percoll分离液能够从小型猪骨髓分离出较高质量的MSCs。

关键词：小型猪；骨髓间充质干细胞；分离；纯化
中图法分类号：R329-33 **文献标识码**：B

参考文献：

[1] Caplan A I. Mesenchymal stem cells: Cell-based reconstructive therapy in orthopedics[J]. Tissue Eng, 2005, 11(7-8): 1198-1211.
[2] Friedenstein A J, Gorskaja U F, Kulagina N N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs[J]. Exp Hematol, 1976, 4(5): 267-274.
[3] Deans R J, Moseley A B. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses[J]. Exp Hematol, 2000, 28(8): 875-884.
[4] Oyekunle A A, Koehl U, Schieder H, *et al*. $CD34^+$-selected stem cell boost for delayed or insufficient engraftment after allogeneic stem cell transplantation[J]. Cytotherapy, 2006, 8(4): 375-380.
[5] Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, *et al*. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies [J]. Exp Hematol, 2002, 30(7): 783-791.
[6] Guo Z, Yang J, Liu X, *et al*. Biological features of mesenchymal stem cells from human bone marrow[J]. Chin Med J (Engl), 2001, 114(9): 950-953.

（编辑 栾 嘉）

文章编号：1000-5404(2007)10-0989-01

个案与短篇

高血压合并心房颤动患者188例临床分析

高大中，王春彬 （重庆医科大学附属第二医院心血管内科，重庆 400010）

心房颤动（房颤）是最常见的心律失常，也是导致卒中和死亡的主要危险因素。目前，高血压不但是房颤的主要危险因素，也是房颤患者发生脑卒中的危险因素[1]，近年来逐渐受到人们的关注。本研究通过对188例高血压合并房颤资料的临床分析，进行高血压合并房颤的诊疗探讨。

1 对象与方法

1.1 研究对象

收集本院1997年1月至2004年9月高血压合并房颤的住院患者188例，其中男性113例，女性75例，年龄25-85岁（65.2±13.6）岁。

1.2 房颤的分类

采用3P分类法，阵发性房颤发作小于7 d（大于24 h），持续性房颤发作大于7 d，永久性房颤为转复失败或不宜转复。房颤均有心电图或动态心电图证实。高血压诊断标准符合1999年WHO的规定。

1.3 资料获取方法

住院期间患者的一般情况、病情及治疗状况主要通过查阅住院记录获得。出院后患者的预后、服药情况，通过门诊病历和电话询问患者及家属获得。

研究自患者入院日期开始，至2004年12月，平均随访时间为3.6年。

作者简介：高大中（1954-），男，重庆市人，硕士，副教授，主要从事心血管疾病临床方面的研究。电话：(023)67033880，E-mail：zhaxican@sina.com

收稿日期：2006-11-06；修回日期：2007-01-20

（下转991页）