文章编号:1000-5404(2008)15-1441-03

论著

Long-Evans 大鼠骨髓间充质干细胞分离培养及生物学特性研究

刘东宁[1,2],阴正勤[1],吴 楠[1],王艳华[1] ([1]第三军医大学西南医院全军眼科中心,重庆 400038;[2]沈阳市第四人民医院眼科,沈阳 110031)

摘 要:目的 对 Long-Evans 大鼠骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)进行分离培养,并检测其生物学特性。**方法** 采用 0.85% NH_4Cl 分离培养 Long-Evans 大鼠股骨来源 BMSCs,检测生长曲线和生长周期,并进行细胞表面抗原和成骨能力鉴定。**结果** BMSCs 体外培养生长状况良好,具有活跃的增殖能力。第 5 代细胞生长速度较第 3 代略减慢。细胞周期显示 93.79% 细胞处于 $G_0 \sim G_1$ 期。表面抗原检测绝大多数细胞阳性表达 CD29 和 CD90,几乎不表达 CD45。在体外能够向成骨细胞分化。**结论** Long-Evans 大鼠股骨来源骨髓间充质干细胞经 0.85% NH_4Cl 分离培养后,纯度高,具有良好生物学特性。

关键词:骨髓间充质干细胞 细胞培养 生物学特性
中图法分类号:R329-33;R329.25;R331.22 **文献标识码:**A

Isolation, cultivation and identification of Long-Evans rat bone mesenchymal stem cells

LIU Dong-ning[1,2], YIN Zheng-qin[1], WU Nan[1], WANG Yan-hua[1] ([1]Department of Ophthalmology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]The Fourth People's Hospital of Shenyang, Shenyang 110031, China)

Abstract: Objective To isolate and cultivate Long-Evans rat bone mesenchymal stem cells (BMSCs) and identify their biological characteristics. Methods BMSCs were obtained from femurs of Long-Evan rats and dealt with 0.85% NH_4Cl. The cell growth curve and cell cycle were measured and surface antigens were detected by flow cytometry. Osteoblast differentiation was studied by Alizarin red staining. Results BMSCs had active proliferative ability. The growth velocity of passage 5 cells was slower than that of passage 3 cells. The cell cycle analysis showed that 93.79% of BMSCs was at G_0/G_1 phase. BMSCs were positive for CD29 and CD44, but negative for CD45. Alizarin red staining of BMSCs after osteoblast induction was positive. Conclusion Highly purified BMSCs obtained from Long-Evan rats by 0.85% NH4Cl show stable biological properties.

Key words: bone mesenchymal stem cells; cell culture; biological characteristics

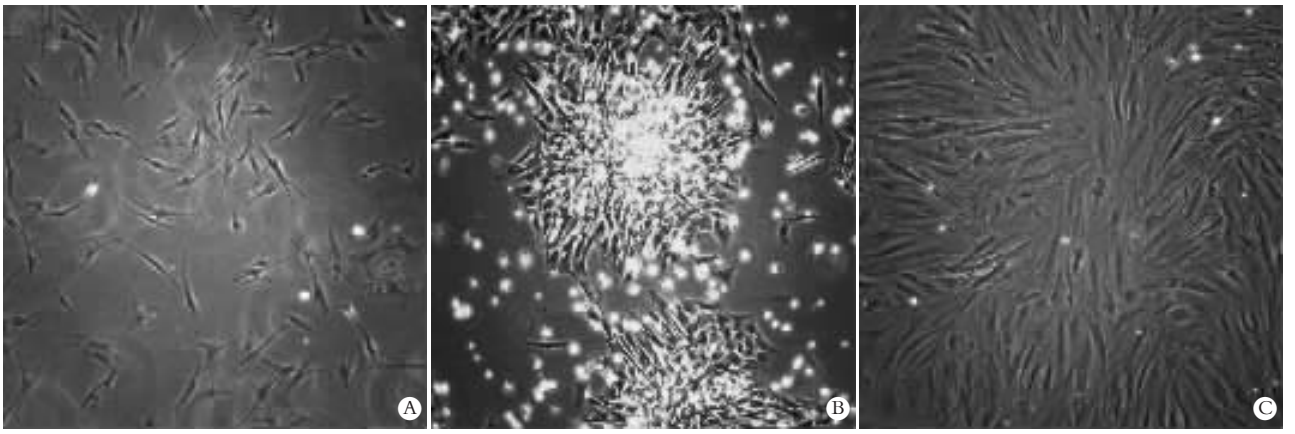
骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)是一群存在于骨髓中的非造血细胞,在适宜条件下能分化形成多种组织细胞,如骨细胞、脂肪细胞和神经细胞等[1,2]。Long-Evans 大鼠为正常有色素大鼠,因其富含色素与人类相似,是眼科基础研究中常用的动物模型,目前对其 BMSCs 分离、培养和鉴定的报道很少。本部分研究通过改良 BMSCs 分离培养方法,对 Long-Evans 大鼠股骨 BMSCs 进行分离、培养和纯化,并对其进行生物学特性检测,扩展 BMSCs 在眼科基础研究中的应用范围。

1 材料与方法

1.1 BMSCs 的分离培养

1 月龄 Long-Evans 大鼠 6 只(雌雄不限,美国 Taconic 公司),体质量 100~150 g。麻醉后处死,无菌条件下快速取出股骨,去除附着肌肉组织,剪断股骨两端,用 D-Hanks 液缓慢冲洗骨髓腔,充分混匀,离心,弃上清及脂肪层,0.85% NH_4Cl 溶液悬浮细胞,4 ℃放置 10 min,离心弃上清,D-hanks 液洗涤 1 次,用含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液(Gibco 公司)重悬细胞,以 1×10^6 ml^{-1} 的细胞数接种于 25 cm^2 塑料培养瓶内,放于 37 ℃、5% CO_2 培养箱内培养。48 h 后首次换液,此后每 3 天换液 1 次,达到 90% 融合时,0.25% 胰酶消化,以 1∶1 进行细胞传代。

基金项目:全军医学科研"十一五"计划科技攻关项目(06G072)
Supported by the Research Project of the "Eleventh Five-Year Plan" of PLA (06G072)
作者简介:刘东宁,女,辽宁省沈阳市人,博士,主治医师,主要从事眼底病方面的研究。电话:(023)68754403
通信作者:阴正勤,E-mail:yinzq@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2007-09-22 修回日期:2008-01-10



A：原代培养3 d少数细胞贴壁；B：原代培养5 d形成集落；C：P3代细胞呈均一成纤维样

图1 BMSCs形态观察 （倒置相差显微镜×100）

1.2 BMSCs生长曲线测定

取第3代（P3）和第5代（P5）BMSCs，0.25%胰酶消化，离心。细胞重悬，调整细胞数为2×10^3 ml^{-1}分别均匀加入到2块24孔培养板内传代。每日相同时间在显微镜下计数细胞，每板计数3孔，取平均值，绘制生长曲线。

1.3 BMSCs细胞周期测定

收集1×10^6个P5代BMSCs，经70%预冷乙醇固定、RNase处理及碘化丙啶避光染色后，流式细胞仪检测细胞周期。

1.4 BMSCs细胞表面抗原检测

将90%融合P5代BMSCs消化后制成细胞数为1×10^6 ml^{-1}的单细胞悬液，分别加入10 μl CD29-FITC、CD45-PE-Cy5和CD90-PE（BD公司）的抗体以及同型阴性对照IgG1反应，室温孵育30 min。PBS洗涤2次，流式细胞仪双标记检测1×10^5个细胞。

1.5 BMSCs成骨诱导及鉴定

将80%～90%融合的P5代细胞改换成骨细胞分化培养液（Stem Cell公司）。以含10% FBS的DMEM/F12培养液做对照。每3～4天换液1次。诱导后21 d，PBS洗2次，4%多聚甲醛（PFA）固定10 min，PBS洗3次，加入0.1%茜素红-Tris-HCl（pH 8.3）37 ℃，30 min，PBS冲洗后，树胶封片。

2 结果

2.1 BMSCs形态观察

原代细胞接种24 h后，仅少部分细胞贴壁。48～72 h后，贴壁细胞数增加，呈逗点状或短棒状（图1A）。4～6 d后形成不同大小、分散的细胞集落，细胞多呈梭形，数量明显增多（图1B）。7～10 d后，细胞集落放射状向外扩展，并逐渐融合成单层。传代后，细胞分布均匀，形态也趋一致（图1C）。

2.2 BMSCs生长曲线

P3和P5细胞在第1～2个24 h细胞数目逐渐上升，为生长缓滞期；第3～5个24 h中，细胞数目明显增加，为对数生长期；第6、第7个24 h中，细胞数目轻微增加，为平台期，此时细胞基本长满培养板孔。P5代细胞生长速度较P3略减慢（图2）。

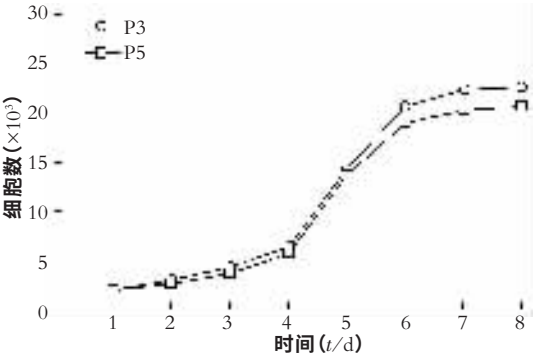


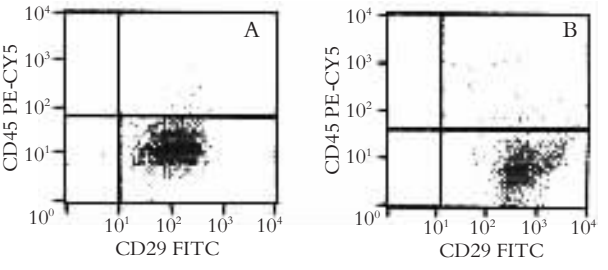
图2 P3和P5代细胞生长曲线

2.3 BMSCs细胞周期

P5代细胞周期检测结果：$G_0\sim G_1$期为93.79%，$G_2\sim M$期平均值为3.45%，S期为2.76%。提示BMSCs大多数处于静止期。

2.4 BMSCs细胞CD29、CD45和CD90表达

P5代细胞$CD29^+/CD45^-$细胞约94.86%；$CD90^+/CD45^-$细胞约98.12%（图3）。



A：CD29/CD45表达；B：CD90/CD45表达

图3 P5代细胞CD29、CD45和CD90表达

2.5 BMSCs细胞成骨诱导后观察

成骨细胞诱导后，梭形细胞比例减少，细胞排列密集。0.1%茜素红-Tris-HCl染色可见深红色结节（图4）。对照组无明显改变。

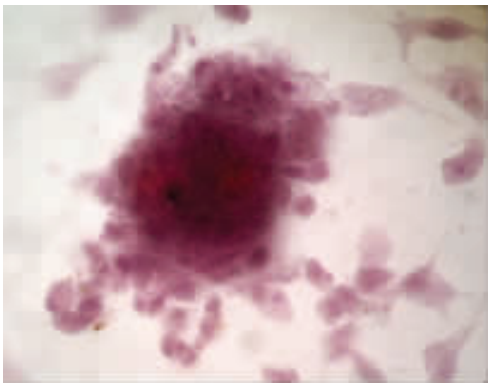


图 4　BMSCs 细胞成骨诱导后茜素红-Tris-HCl 染色结果　（×400）

3　讨论

成体动物骨髓中 BMSCs 含量极低，仅 0.001% ~ 0.01%[3]。因此，采用快速、简单和有效的分离培养方法，尽可能获取较高纯度的 BMSCs，对其应用和推广有着重要意义。目前对骨髓中 BMSCs 分离培养没有一致的方案：常用方法包括全骨髓贴壁培养法[4]、密度梯度离心法[5]、流式细胞仪分选法[6]和免疫磁珠分离法[7]。全骨髓贴壁法是根据骨髓 BMSCs 贴壁生长而造血系细胞悬浮生长的特性对二者进行分离，经济实用、操作简便，但所得细胞成分复杂，影响 BMSCs 的纯度。流式细胞仪分选法或免疫磁珠分离法对细胞活性影响较大，而且实验条件要求高，费用昂贵，操作复杂，应用范围较小。密度梯度离心法是目前较为普遍的分离培养方法，利用 Percoll 等分离液将大部分造血细胞和单个核细胞分离出来，再经过体外贴壁培养换液去除悬浮生长的造血细胞，操作时间较长，且容易丢失细胞。本研究采用 0.85% NH_4Cl 溶液分离培养 Long-Evans 大鼠股骨来源 BMSCs，其原理为 0.85% NH_4Cl 溶液可降低环境渗透压，选择性破坏红细胞[8]，经 0.85% NH_4Cl 溶液短时快速裂解红细胞，所余细胞成分即主要为白细胞和有核骨髓细胞，通过定期更换培养液，剔除不贴壁生长的白细胞和造血干细胞，所余贴壁生长细胞即主要为 BMSCs。此方法克服了密度梯度离心法操作流程长、步骤繁琐、试剂耗费大的缺点，且减少污染机会和细胞丢失，具有经济、实用、便捷、操作时间短的优点，为未来 BMSCs 的临床应用提供了一种更为经济实用的方法。采用本方法分离获得的 BMSCs，经体外培养能大量增殖，并形成细胞形态较为均一的细胞增殖集落，与既往研究结果相似[9]。细胞传 3 代后纯度高达 94% 以上，与密度梯度离心法相近[10]。

Long-Evans 大鼠股骨来源 BMSCs 生长曲线检测结果显示，P5 代细胞生长速度仍较快，仅较 P3 代细胞略减慢，说明细胞生长状态良好。细胞周期检测结果显示，超过 90% 的细胞处于静止期，只有少数细胞处于活跃期，与既往研究结果相符合[11]。目前研究尚未发现 BMSCs 的特异性标记，BMSCs 形态学特征和表面标记的特异性方面仍存有争议[12]。本实验选 P5 代细胞行流式细胞仪检测表面抗原 CD29、CD45 和 CD90。CD29 是黏附分子受体标记物，CD45 是淋巴造血干细胞标记物，CD90 是干细胞标记物。结果显示绝大多数 P5 代细胞表达 CD29 和 CD90 细胞，几乎不表达 CD45。说明我们获得的细胞主要是 BMSCs，纯度较高，但仍混杂有少量的造血系细胞。此外，成骨诱导分化实验显示 BMSCs 可以分化为成骨细胞，反向证明获取的 BMSCs 具有多向分化潜能，不是骨髓内其他成熟细胞。综上所述，Long-Evans 大鼠股骨来源骨髓间充质干细胞经 0.85% NH_4Cl 分离培养后，纯度高，具有良好生物学特性，扩展了 BMSCs 在眼科基础研究中的应用范围。

参考文献：

[1] Herzog E L, Chai L, Krause D S. Plasticity of marrow-derived stem cells[J]. Blood, 2003, 102(10): 3483 - 3493.

[2] Kramer B C, Woodbury D, Black I B. Adult rat bone marrow stromal cells express genes associated with dopamine neurons[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 343(4): 1045 - 1052.

[3] 刘　杰，吴雪晖，罗　飞，等. 自体骨髓间充质干细胞构建组织工程骨修复长骨缺损的临床观察[J]. 第三军医大学学报，2008，30(9)：851 - 854.

[4] Izuta Y, Ochi M, Adachi N, *et al*. Meniscal repair using bone marrow-derived mesenchymal stem cells: experimental study using green fluorescent protein transgenic rats[J]. Knee, 2005, 12(3): 217 - 223.

[5] Lisignoli G, Remiddi G, Cattini L, *et al*. An elevated number of differentiated osteoblast colonies can be obtained from rat bone marrow stromal cells using a gradient isolation procedure[J]. Connect Tissue Res, 2001, 42(1): 49 - 58.

[6] Jones E A, English A, Kinsey S E, *et al*. Optimization of a flow cytometry-based protocol for detection and phenotypic characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from human bone marrow[J]. Cytometry B Clin Cytom, 2006, 70(6): 391 - 399.

[7] Ito A, Hibino E, Honda H, *et al*. A new methodology of mesenchymal stem cell expansion using magnetic nanoparticles[J]. Biochem Eng J, 2004, 20(2 - 3): 119 - 125.

[8] Izadpanah R, Joswig T, Tsien F, *et al*. Characterization of multipotent mesenchymal stem cells from the bone marrow of rhesus macaques[J]. Stem Cells Dev, 2005, 14(4): 440 - 451.

[9] 李　鹏，邢　杰，闫玉文. 嗜酸性粒细胞的提纯[J]. 武警医学院学报，2005，14(1)：62 - 65，71.

[10] 郑辉哲，林　群，雷立华，等. Lewis 大鼠骨髓间充质干细胞分离培养和鉴定[J]. 福建医科大学学报，2005，39(4)：360 - 363.

[11] Conget P A, Minguell J J. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells[J]. J Cell Physiol, 1999, 181(1): 67 - 73.

[12] 段　萍，许烜慧，许　燕，等. 骨髓间充质干细胞向神经细胞分化过程中 Tau 蛋白表达量的变化[J]. 郑州大学学报：医学版，2008，43(1)：89 - 92.

（编辑　陈聪连）