文章编号:1000-5404(2008)21-2041-03

论著

不同浓度羊自体血清对骨髓间充质干细胞增殖能力影响的研究

张 颖,杨 柳,段小军,王富友 (第三军医大学西南医院关节外科中心,重庆 400038)

摘 要:目的 观察不同浓度羊自体血清对骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, bMSCs)增殖活力的影响,并筛选出最佳血清培养浓度。**方法** 以12月龄青山羊为实验动物,首先制备自体血清,分离获取bMSCs;然后选DMEM/F12为基础培养基,采用不同体积分数(分别为5%、10%、15%)自体血清及10%体积分数胎牛血清培养基分别对bMSCs进行培养;通过显微镜下细胞形态学观察、活细胞计数及MTT等方法对细胞进行检测,并对检测数据做统计学分析。**结果** 不同浓度自体血清培养培养条件下bMSCs形态正常。与10%胎牛血清组进行比较,5%自体血清组bMSCs增殖较慢($P<0.01$),10%、15%自体血清组增殖较好,但组间无统计学差异($P>0.05$)。**结论** 羊自体血清培养bMSCs是可行的,10%浓度自体血清是最佳培养浓度。

关键词: 骨髓间充质干细胞;自体血清;MTT法
中图法分类号: R329.28; R331.1; R331.2 **文献标识码:** A

Effect of goat autologous serum at different concentrations on proliferation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells

ZHANG Ying, YANG Liu, DUAN Xiao-jun, WANG Fu-you (Centre for Joint Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of goat autologous serum at different concentrations on the proliferation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (bMSCs) for optimal serum dose. **Methods** Autologous serum was prepared from 6 goats at 12 months old, and their bMSCs were isolated from bone marrow. Then the obtain bMSCs were cultured in DMEM/F12 medium with supplement of 5%, 10%, or 15% of corresponding autologous serum, and 10% fetal bovine serum served as control. The morphology of bMSCs, cells counting and MTT assay were observed or carried out. **Results** Morphology of the bMSCs in the different groups were similar. The proliferation of 5% autologous serum group was slower compared with that of 10% fetal bovine serum group ($P<0.05$). Both the 10% and 15% autologous serum groups had the similar proliferation as that of 10% fetal bovine serum group. **Conclusion** Cultivation of bMSCs with autologous serum is feasible. The optimized concentration of autologous serum is 10%.

Key words: mesenchymal stem cells; autologous serum; MTT

目前,组织工程实验室培养骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, bMSCs)多采用培养基加异种血清的方法[1],例如胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、新生牛血清(new-born calf serum, NBCS)等。这些方法以其获取量大、方便、实用广等优势而被采用,然而在组织工程产品安全性的前提要求下,异种血清存在潜在的抗原性、致病性[2,3],其安全尚不能保证,对组织工程产品来说存在一定的风险。相比较而言,自体血清(autologous serum, AS)无潜在致病性,无抗原性,更能够保证组织工程产品的安全。山羊是组织工程中最常用到的实验动物之一,其MSCs也是临床前实验研究中所涉及的重点。本实验拟就不同浓度自体血清对山羊bMSCs增殖影响进行初步研究,探求一种对羊bMSCs培养相对最为合适的自体血清浓度。

基金项目: 全军医学科研"十一五"计划科技攻关项目(06G079);重庆市重点科技攻关项目(2007AC5047);第三军医大学西南医院临床创新基金(2006A012)
Supported by the Key Program of "Eleventh Five-year Plan" for Medical Sci & Tech Research of PLA (06G079), the Key Tackling Project of Sci & Tech Research of Chongqing (2007AC5047), and the Clinical Innovation Fund of Southwest Hospital (2006A012)

作者简介: 张 颖,男,河南省睢县人,博士研究生,讲师,主要从事软骨组织工程方面的研究。电话:(023)68766555, E-mail: henry111111@gmail.com
通信作者: 杨 柳,电话:(023)68765280, E-mail: jointsurgery@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2008-06-20;**修回日期:** 2008-07-18

1 材料与方法

1.1 实验动物

12月龄青山羊6只,体质量20~25 kg,雌雄不限,由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 材料

特级胎牛血清、D-Hanks液(HyClone公司),Percoll分离液(美国Pharmacia公司),DMEM/F12(1∶1)培养液、胰蛋白酶、MTT、二甲基亚砜、青霉素、链霉素(Sigma公司),96孔一次性细胞培养板(美国Nuclon公司)。

1.3 方法

1.3.1 自体血清制备 山羊侧卧位,四肢固定于动物固定架上,于上颈部外侧常规消毒、铺巾,颈总静脉穿刺,用60 ml注射器抽取全血80 ml,然后注入一次性采血袋中,无菌封口,37 ℃水温箱静置1 h,4 ℃冰箱过夜,待完全凝血后离心(2 000 r/min,20 min),抽取上层血清入离心管中再次离心(2 000 r/min,20 min),收集上清,获取深棕色透明液体(38.2±0.6)ml,0.22 μm滤膜过滤后分装入无菌血袋中,待用。

1.3.2 bMSCs细胞获取 山羊侧卧位,四肢固定于动物固定架上,于髋关节部常规消毒、铺巾,髂嵴处紧贴骨膜注射0.5 ml利多卡因局部麻醉,用16号骨髓穿刺针刺入髂嵴,用已预湿肝素的注射器抽取骨髓8~10 ml,混匀,以防止骨髓凝集。

1.3.3 原代bMSCs的获取和扩增[1] 将骨髓注入离心管中,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,1 500 r/min离心5 min,弃上清,再加入DMEM/F12培养液10 ml吹打漂洗,1 000 r/min离心5 min,弃上清,沉淀加入DMEM/F12培养液吹打制细胞悬液。

1.3.4 细胞培养及实验分组 实验分为对照组A(10%胎牛血清组)和实验组B(自体血清组),根据不同浓度B又分为3组:B_1为5%自体血清组,B_2为10%自体血清组,B_3组为15%自体血清组。细胞悬液经计数后,按$(1\sim5)\times10^5/cm^2$接种于培养瓶。按实验分组加入各培养基(各培养基内分别含青霉素100 U/ml、链霉素100 U/ml及对应浓度DMEM/F12、血清)。置37 ℃,5% CO_2饱和湿度培养箱内培养,48 h后半量换液,以后每3天全量换液1次,细胞融合至80%时进行传代培养。传代时0.25%胰蛋白酶消化,按$(1\sim5)\times10^5/cm^2$接种入培养瓶中,48 h后首次全量换液,以后每隔3天换液。

传代培养:待细胞铺满瓶底面积80%~90%时,进行消化传代。吸出培养液,D-Hanks液10 ml冲洗,加入0.25%胰蛋白酶消化3~5 min,然后加入含血清培养液终止消化,离心后去上清液,细胞计数,按$(1\sim5)\times10^5/cm^2$的密度传代接种,每隔3天换液。

1.3.5 显微镜下细胞形态学观察、细胞计数及贴壁率测定

每组各用1个96孔培养板,取第2代细胞,每孔接种2×10^3个细胞,500 μl培养液,每48小时换液。每日取3孔细胞显微镜下观察形态学,用0.25%胰蛋白酶消化并计数,共测定8 d。

细胞贴壁率(%)=(第2天细胞数量/细胞接种数)×100%

1.3.6 MTT值测定及生长曲线、增殖曲线绘制 每组各用1个96孔培养板,取第2代细胞,每板种植32孔,每孔接种2×10^3个细胞,200 μl培养液,每48小时换液。每日取4孔细胞,加入20 μl MTT,4 h后尽量吸弃孔内培养液,加入150 μl二甲基亚砜,振荡10 min,以490 nm为测量波长,以空白孔为对照,用酶联免疫检测仪检测各孔吸光度值[$D(490)$]。根据细胞计数绘制生长曲线,MTT值绘制细胞增殖曲线。

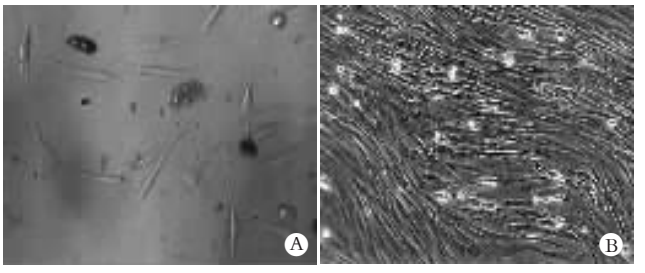
1.4 统计学方法

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件,对MTT结果进行完全随机设计资料的方差分析。

2 结果

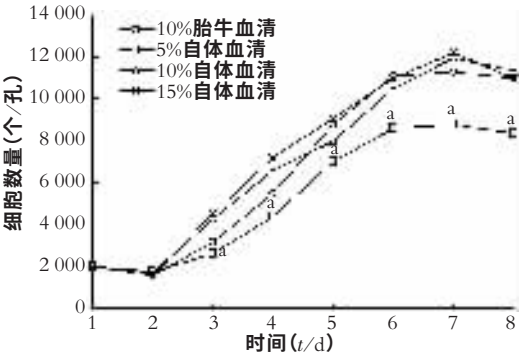
2.1 显微镜下细胞生长变化及生长曲线

原代羊bMSCs分布较为散在,12~24 h可见细胞贴壁,细胞呈梭形,形态多样,折光性好,约14 d铺满瓶底80%面积,见图1。传代细胞4~8 h可见细胞贴壁,细胞呈长梭形,形态较为单一,4~6 d铺满瓶底80%面积。所有培养瓶中bMSCs均传代10代以上,增殖能力良好。24 h细胞贴附率A、B_1、B_2、B_3组均值分别为93.2%、92.3%、93.3%、93.6%,细胞生长曲线见图2。



A:原代bMSCs;B:传代bMSCs

图1 倒置显微镜下观察羊bMSCs (×100)

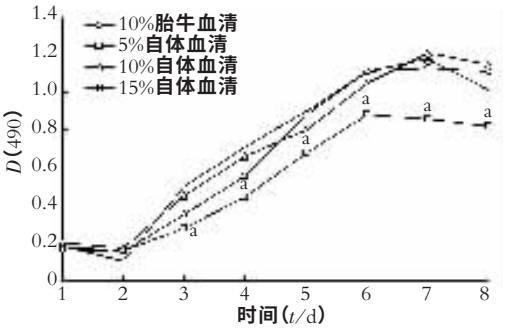


a:$P<0.01$,5%自体血清组与其余各组比较

图2 羊bMSCs生长曲线

2.2 MTT实验结果

根据每日不同$D(490)$均值为数据,绘制细胞增殖曲线,见图3。结果显示:5%自体血清(B_1)组与其余各组组间比较差异有统计学意义($P<0.01$),其余各组间两两比较无统计学差异($P>0.05$)。



a: $P<0.01$, 5% 自体血清组与其余各组比较

图 3　MTT 值变化曲线

3　讨论

组织工程学的发展带动了对 bMSCs 的研究,目前 bMSCs 是组织工程研究中最多的种子细胞之一,它的特点在于获取容易,细胞培养体外扩增快速,并且拥有强大的分化潜力。如今实验室所用的分离 bMSCs 与培养方法,主要是采用 Friedenstein 等[1]于 20 个世纪 70 年代创立的经典方法,其中细胞培养基是细胞生存、增殖和分化的基础,而血清又是细胞培养基中不可或缺的成分,它内含多种氨基酸,是细胞的生长、分化营养成分的主要来源。在血清的选择上,自体血清以其无抗原性、高安全性而被视为最理想的培养基血清来源之一[3,4]。

在以往自体血清对人 bMSCs 增殖影响的研究中,Matsuo、Isogai 等[5-8]经过对人 bMSCs 以及马 bMSCs 大量实验发现,自体血清培养的 bMSCs 不仅与胎牛血清组的细胞形态相似,而且连生长方式、分化潜能、表面标志这些指标都相差无几,得出近乎一致的结果;Di-Nicola 等[9]更是发现,自体血清培养的 bMSCs 正常表达 CD90 和 CD105 这种 bMSCs 特异性的表面标志,并不表达 HLA Ⅱ类抗原,这表明自体血清培养出来的 bMSCs 相比较含胎牛血清培养基培养出的 bMSCs 具有低免疫原性,原因可能是自体血清内异种抗原较含胎牛血清培养基要少。在 bMSCs 接种密度研究中,Colter 等[10,11]普遍采用低密度接种[$(10\sim20)/cm^2$],这种培养方式更适合 bMSCs 的增殖,但是这种低密度的种植对血清及培养基的量要求较多,实际实施还尚存一些问题。

本实验通过对 bMSCs 的一系列实验,利用其自体血清成功培养 bMSCs,并对其培养基最适浓度进行了一系列研究,以公认最佳胎牛血清浓度 10% 为对照组[3],最终发现 10%、15% 浓度的自体血清培养基与 10% 胎牛血清培养基对 bMSCs 的增殖能力无统计学差异,细胞增殖能力良好,各组之间形态学无明显差异,各个体样本间 bMSCs 形态、增殖能力无明显差异,而且从细胞计数和 MTT 值所绘制的曲线相似,并最终将 10% 自体血清定为培养羊 bMSCs 最佳浓度,为 bMSCs 的培养进一步提供了前期动物实验研究数据。本实验我们还发现了 5% 自体血清组增殖速度与其余组间存在明显差异,5% 自体血清组 bMSCs 在对数生长期并没有达到 1 个生长的高峰,对其观察延长到 11 d,仍未出现高峰,究其原因是细胞营养不足,或是抑制其增殖,值得进一步研究。

回顾本研究,实验过程中没有涉及到对 bMSCs 分化以后的研究,尤其是向成骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞等方向分化,这也是我们所需要思考和值得进一步研究的问题。在组织工程飞速发展的今天,生物安全性是组织工程化产品是临床应用的基础,自体血清以其自身的高度安全性及适用性,必将逐渐在日后的发展中成为主流方向。

参考文献:

[1] Friedenstein A J, Chailakhyan R K, Gerasimov U V. Bone marrow osteogenic stem cells: *in vitro* cultivation and transplantation in diffusion chambers[J]. Cell Tissue Kinet, 1987, 20(3): 263-272.

[2] 奚廷斐,陈　亮,赵　鹏,等. 组织工程医疗产品监督管理与标准研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2003, 17(6): 480-487.

[3] Yilmaz M, Ovali E, Akdogan E, *et al*. Autologous serum is more effective than fetal bovine serum on proliferation of bone marrow derived human mesenchymal stem cells[J]. Saudi Med J, 2008, 29(2): 306-309.

[4] 汪　萍,呼　莹,姜学英,等. 造血干细胞联合骨髓间充质干细胞移植实验效果观察[J]. 郑州大学学报:医学版,2006,41(5):873-875.

[5] Matsuo A,Yamazaki Y,Takase C, *et al*. Osteogenic potential of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal stem cells cultured with autologous serum[J]. J Craniofac Surg, 2008, 19(3): 693-700.

[6] Isogai N, Nakagawa Y, Suzuki K, *et al*. Cytokine-rich autologous serum system for cartilaginous tissue engineering[J]. Ann Plast Surg, 2008, 60(6): 703-709.

[7] Sun X, Gan Y, Tang T, *et al*. *In vitro* proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells cultured in autologous plasma derived from bone marrow[J]. Tissue Eng Part A, 2008, 14(3): 391-400.

[8] Arnhold S J, Goletz I, Klein H, *et al*. Isolation and characterization of bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells[J]. Am J Vet Res, 2007, 68(10): 1095-1105.

[9] Di-Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, *et al*. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli[J]. Blood, 2002, 99(10): 3838-3843.

[10] Colter D C, Class R, DiGirolamo C M, *et al*. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(7): 3213-3218.

[11] Colter D C, Sekiya I, Prockop D J. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(14): 7841-7845.

(编辑　张　维)