论著

文章编号:1000-5404(2009)12-1140-04

三维立体培养SD大鼠骨髓间充质干细胞的研究

李芙蓉,张 莹,王代红,程 悦,张耀全,王沂芹,侯卫平,卫 静,袁发焕 (第三军医大学新桥医院肾内科,全军肾脏病中心,重庆市肾病研究所,重庆 400037)

摘 要:目的 建立三维立体培养SD大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)的方法。**方法** 分离SD大鼠胫骨、股骨,冲洗骨髓腔,通过密度梯度离心并结合贴壁法培养BMSCs,流式细胞仪检测其生长周期,电子显微镜观察其内部结构,免疫细胞化学法进行细胞表面抗原标志物鉴定。后将其接种到细胞外基质(extracellular matrix,ECM)胶中,加入DMEM-F12细胞培养液进行三维立体培养。**结果** 培养的细胞呈梭形,成纤维细胞样,单核,增殖能力强。流式细胞术显示93.10%细胞处于$G_0 \sim G_1$期。透射电镜结果显示细胞核质比例较大,核仁大而明显,细胞表面有较多微绒毛,细胞质细胞器丰富,表现出未分化细胞的特征。免疫组织化学结果显示细胞表达波形蛋白(vimentin)、纤维连接蛋白(fibronectin),不表达角蛋白(keratin)。BMSCs在ECM胶中生长良好。**结论** 分离、培养的细胞为骨髓BMSCs,在三维培养体系中生长良好。

关键词: 骨髓间充质干细胞;Ⅰ型胶原;基质胶;细胞外基质胶
中图法分类号: R-331;R329.2;R331.22 **文献标识码:** A

Research of three-dimensional cultivation of SD rat bone marrow mesenchymal stem cells

LI Fu-rong, ZHANG Ying, WANG Dai-hong, CHENG Yue, ZHANG Yao-quan, WANG Yi-qing, HOU Wei-ping, WEI Jing, YUAN Fa-huan (Department of Nephrology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To establish a three-dimensional culture method for the culture of SD rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) *in vitro*. **Methods** BMSCs were obtained from femurs and tibiae of SD rats and cultured by the way of density gradient centrifugation combined with attachment culture method. The cell cycles were detected by flow cytometry and cell internal structure by electronic microscopy. BMSCs membrane antigen phenotypes were identified with an immunocytochemical method. BMSCs were suspended in the extracellular matrix (ECM) gel and cultured at the interface of air and medium. **Results** The cells showed shuttle shape with single nuclear and strong proliferative ability *in vitro*. The cell cycle analysis showed that 93.10% of BMSCs were at G_0/G_1 phase. Transmission electron microscopy revealed that the ratio of nucleus/cytoplasm of the cells was larger. Immunochemistry staining revealed significant expressions of vimentin and fibronectin. BMSCs grew well in ECM gel. **Conclusion** Highly purified BMSCs obtained from SD rats can grow well in ECM gel and are of highly proliferative ability and stability.

Key words: bone mesenchymal stem cell; type Ⅰ collagen; matrigel; extracellular matrix gel

骨髓中至少包含2种干细胞成分:骨髓造血干细胞(bone marrow hematopoietic stem cells, BHSCs)和来源于中胚层的未分化的间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)。在适宜的条件下,BMSCs具有向各胚层细胞分化的潜能,可分化为骨、软骨、肺细胞、血细胞、血管内皮细胞、肝细胞、胆管、肠

基金项目: 国家自然科学基金(30771001)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30771001)
作者简介: 李芙蓉,女,山东省莱芜市人,博士研究生,医师,主要从事肾脏纤维化的防治及临床诊治方面的研究。E-mail: lfr199839@163.com
通信作者: 袁发焕,电话:(023)68774321,E-mail:yuanfh@mail.tmmu.com.cn
收稿日期: 2009-02-23;**修回日期:** 2009-03-14

和皮肤上皮细胞等,还可跨胚层向神经外胚层进行分化[1-7]。

细胞的生物学功能与所处的微环境有密切的关系。目前,BMSCs 的体外培养一般采用二维空间培养,这与细胞在体内的生存环境相差较大。因此,本实验在体外模拟体内环境,将 BMSCs 种植于由Ⅰ型胶原(type Ⅰ collagen)和微量生长因子基质胶(growth factor reduced Matrigel)组成的细胞外基质中。使细胞所处的环境尽可能接近体内,进一步研究 BMSCs 的生物学性能提供实验基础。

1　材料与方法

1.1　材料

1 月龄 SD 大鼠,体质量 90 ~ 100 g,雄性,30 只,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。Percoll 分离液(Amershan-Pharmacia 公司),DMEM-F12 培养基(DF,Gibco 公司),皂素(saponin)、0.25% 胰蛋白酶(Sigma 公司),胎牛血清(FBS,hyclone 公司),Ⅰ型胶原、微量生长因子基质胶(BD 公司),小鼠抗大鼠波形蛋白(vimentin)、纤维连接蛋白(fibronectin)、角蛋白(keratin)单克隆抗体(BD 公司),免疫细胞化学试剂盒(武汉博士德生物试剂公司)。

1.2　方法

1.2.1　SD 大鼠 BMSCs 原代及传代培养　　将 SD 大鼠断颈处死,碘伏消毒其皮毛,取两侧股骨和胫骨浸泡于碘伏 10 min,无菌条件下用冷 PBS 将碘伏冲洗干净,去除骨表面附着肌肉及肌腱,剪掉骨端,暴露骨髓腔,用冷无血清培养液冲出骨髓,收集于离心管中,反复吹打成单细胞悬液,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,重悬细胞。将重悬的细胞缓慢加入已置于离心管底部的 1.073 g/ml Percoll 液,2 100 r/min 离心 21 min,收集界面的白膜层细胞。用无血清培养液洗涤 2 次,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,用含 10 % FBS 的 DF 培养基重悬细胞,吹打为单细胞悬液,接种于 25 cm^2 培养瓶内,置于 37 ℃、5% 的 CO_2 的培养箱内孵育。24 h 后换液去除未贴壁细胞,继续培养,每 2 ~ 3 天换液 1 次。当 BMSCs 长到 80% 融合时用胰酶消化传代。

1.2.2　细胞免疫组织化学染色法鉴定细胞表面标志　　取第 3 代 BMSCs,胰酶消化后接种于 24 孔板培养,待细胞生长 24 h 时,取出盖玻片,PBS 冲洗,4 ℃ 多聚甲醛固定 20 min,PBS 冲洗,加双氧水置室温 30 min,PBS 冲洗,0.1% 皂素作用 30 min 以增加细胞膜的通透性,山羊血清封闭 30 min,滴加小鼠抗大鼠滴波形蛋白、纤维连接蛋白、角蛋白一抗(1∶100),4 ℃ 过夜,PBS 洗 3 次,每次 2 min,加山羊抗小鼠生物素化二抗,37 ℃ 孵育 30 min,PBS 冲洗,加 SABC,37 ℃ 孵育 20 min,PBS 冲洗后,DAB 染色,苏木精复染,封片,照像。

1.2.3　细胞透射电镜的鉴定　　选对数生长期的第 3 代细胞,胰酶消化细胞后,PBS 洗涤 2 次,弃上清,沿管壁加入 2.5% 戊二醛,置 4 ℃ 冰箱固定 2 h,包埋、切片、摄片。

1.2.4　细胞周期的鉴定　　选对数生长期的第 3 代细胞,消化制成单个细胞悬液,PBS 液洗涤细胞 2 次,冷 75% 乙醇固定,RNA 酶Ⅰ处理,PI 避光染色,用流式细胞仪计数分析结果。

1.2.5　构建三维立体空间培养体系　　消化并收获细胞,参照 Qiao 等[8]构建 5 组三维立体空间培养体系。

A 组:将Ⅰ型胶原与微量生长因子基质胶按 1∶1的比例,配好细胞外基质胶,用 NaOH 及 0.1 mol/L PBS 调节细胞外基质胶的 pH 值及渗透压,然后将细胞接种于配制好的细胞外基质胶中,置于 37℃、5% CO_2 的培养箱内孵育,分别于 5、10、20、30 min 后从孵箱中取出,观察细胞外基质胶的凝固情况,待细胞外基质胶凝固后加入新的培养液,置于 37 ℃、5% CO_2 的培养箱内继续培养。

B 组:将Ⅰ型胶原与微量生长因子基质胶按 2∶1的比例,配好细胞外基质胶,培养过程同 A 组。

C 组:将Ⅰ型胶原与微量生长因子基质胶按 3∶1的比例,配好细胞外基质胶,培养过程同 A 组。

D 组:将Ⅰ型胶原与微量生长因子基质胶按 4∶1的比例,配好细胞外基质胶,培养过程同 A 组。

E 组:将Ⅰ型胶原与微量生长因子基质胶按 5∶1的比例,配好细胞外基质胶,培养过程同 A 组。

1.2.6　三维立体空间培养体系中细胞免疫荧光化学染色　　取 D 组培养 48 h 的细胞,PBS 冲洗 3 次,每次 10 min,2% 多聚甲醛 4 ℃ 固定 30 min,PBS 冲洗后,0.1% 皂素 37 ℃ 作用 30 min,山羊血清封闭 30 min,滴加小鼠抗大鼠波形蛋白、纤维连接蛋白、角蛋白一抗(1∶100),4 ℃过夜,滴加 CY_3 标记的二抗,37 ℃作用 1 h,PBS 冲洗 3 次,每次 10 min,DAPI 染细胞核 30 min,PBS 冲洗 3 次,每次 10 min,2% 多聚甲醛再次固定,激光扫描共聚焦显微镜成像。

2　结果

2.1　细胞形态学观察

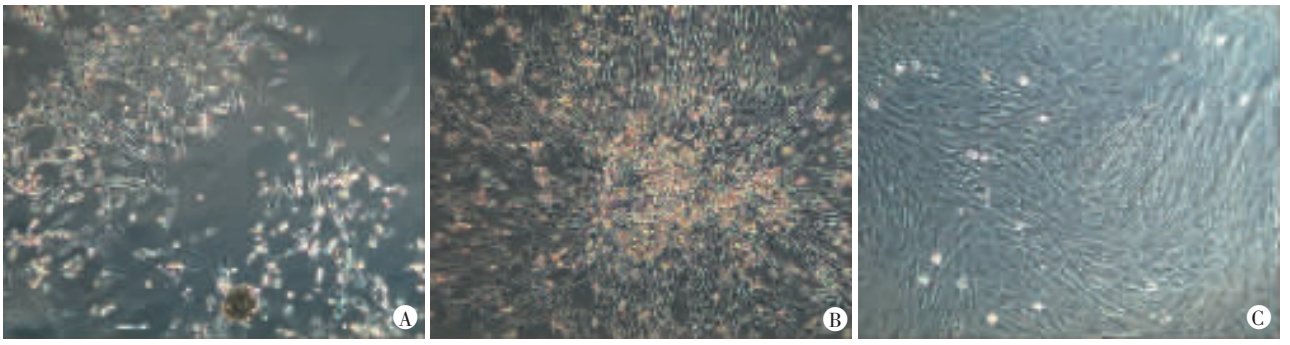
原代细胞接种 24 h 后,可见少数细胞贴壁,部分细胞有伪足伸展;培养 72 h 后贴壁细胞数增加,呈梭形和多角形;4 d 后细胞迅速增殖,呈放射状的细胞集落,胞核大,核仁清晰。第 8 ~ 12 天后集落迅速增多,呈漩涡状,向周围不断扩大,并逐渐互相融合成单层,细胞界限不清。细胞传代培养时易被胰酶消化,形态均匀,呈长梭形,排列规则(图 1)。

2.2　免疫组织化学染色法鉴定表面标志

细胞均不表达 keratin,但细胞明显表达 vimentin、fibronectin(图 2)。

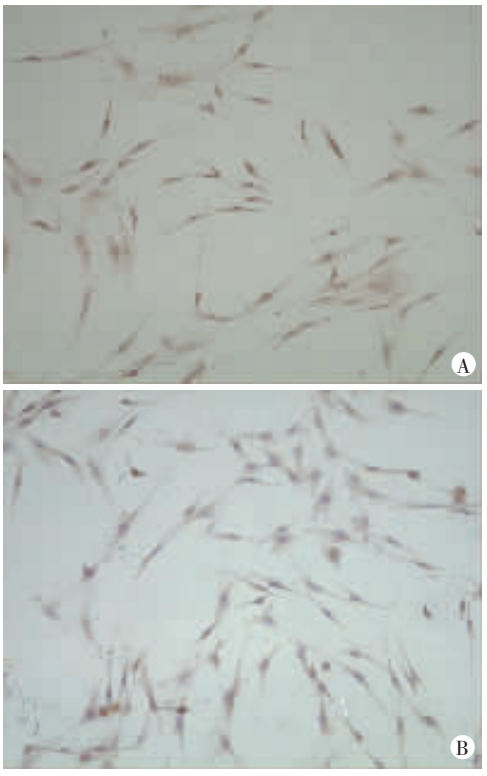
2.3　细胞透射电镜的结果

透射电镜示细胞核质较大,核大呈不规则形,含有 2 ~ 3 个核仁,胞质内有核糖体和线粒体,其他细胞器较少,表现出未分化细胞的特征(图 3)。



A:原代培养3 d细胞贴壁;B:原代培养7 d形成集落;C: 原代培养10 d融合成单层

图1 原代培养大鼠BMSCs的形态学观察 (倒置相差显微镜×100)



A:波形蛋白(+);B:纤维连接蛋白(+)

图2 大鼠BMSCs免疫组织化学观察 (SABC×100)

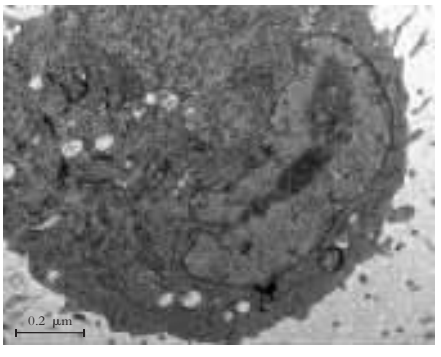


图3 大鼠BMSCs透射电镜观察

2.4 细胞周期的结果

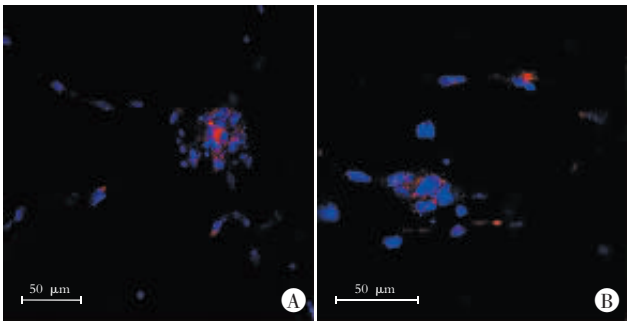
细胞周期发现所培养的BMSCs中6.7%左右处于活跃的复制期(S+G_2+M期),其余绝大部分细胞停滞在G_0/G_1期,高比例的G_0/G_1期说明细胞大部分细胞处于静止期,只有少数的细胞处于活跃的增殖期。

2.5 三维立体空间培养体系培养细胞

A、B、C、D、E 5组接种了细胞的细胞外基质胶放入细胞孵箱10、20、30 min后都能凝固,接种于细胞外基质胶中的细胞1 h后镜下观察未伸展,呈球形。24 h后镜下观察接种于细胞外基质胶中的细胞都已伸展呈长梭形,细胞外基质胶不同的层面可以看到细胞不同的形态。与二维培养体系相比,BMSCs的立体感更强。D组中Ⅰ型胶原与微量生长因子基质胶的比例所配制的细胞外基质胶,倒置显微镜下观察不同层面的细胞生长较其他3组生长状态好,细胞量多。

2.6 三维立体空间培养体系中细胞的免疫荧光化学染色

激光共聚焦下可见基质胶不同层面的细胞明显表达vimentin、fibronectin(图4),细胞质被染成红色,核成蓝色。基质胶中细胞生长状态良好,成簇或单个生长,呈梭形。



A:波形蛋白(+); B:纤维粘连蛋白(+)

图4 大鼠骨髓间充质干细胞的激光共聚焦显微镜观察

3 讨论

本研究采用密度梯度离心与贴壁法相结合,用密度为1.073 g/ml的Percoll分离液,对BMSCs进行密度梯度离心(2 100 r/min, 离心21 min),使不同密度的细胞按照相应密度梯度分布, 小心吸取界面白膜层细胞,PBS离心2遍即可加培养基和胎牛血清培养。通过贴壁筛选结合消化控制法, 每次传代严格掌握消化酶的量和消化时间, 保证BMSCs在短时间内与培

养瓶底分开，淋巴细胞、成纤维细胞等则因贴壁牢固仍贴附于瓶底，从而使 BMSCs 得到进一步纯化。所培养的细胞生长特点和表型都符合间充质细胞，细胞为贴壁细胞，呈梭形成纤维细胞样[9]。细胞透射电镜和细胞周期都显示了 BMSCs 具有高度的分化潜能，符合干细胞特征。细胞免疫组化结果显示不表达上皮细胞标志物蛋白 keratin，从而排除了上皮细胞；细胞明显表达间充质细胞标志物 vimentin 和 fibronectin，表明是间充质来源。

细胞的发育和正常机能的进行依赖于细胞微环境中分子间的相互作用，主要调节细胞发育和机能的分子包括生长因子、分化因子、黏附分子和 ECM 成分。ECM 在细胞粘附、伸展、分化、迁移和增殖等方面起了重要的作用，其中Ⅰ型胶原是 ECM 的主要组成成分，存在于大多数组织和器官中，尤其是真皮、腱和骨中含量最丰富。Ⅰ型胶原长 300 nm，由 2 个 α_1 和 1 个 α_2 构成的异质三联体。作为三维培养体系的成分，Ⅰ型胶原能较好的模拟肾脏内细胞生长的状态，使细胞在三维培养体系中能更好的伸展和增强细胞特异形态和功能的表达。微量生长因子基质胶是由 EHS（Engelbreth-Holm-Swarm）肿瘤中提取出来的可溶性的基底膜，在室温下可重新形成基底膜。微量生长因子基质胶主要的成分是层粘连蛋白、Ⅳ型胶原、内功素和硫酸类肝素蛋白多糖。在三维培养体系中，微量生长因子基质胶能模拟体内基底膜，使细胞的生长环境更好的接近在体内生长的微环境。在肾脏中，Ⅰ型胶原、层粘连蛋白、Ⅳ型胶原、内功素和硫酸类肝素蛋白多糖等是 ECM 的重要组成成分，所以我们用Ⅰ型胶原/微量生长因子基质胶所组成的细胞外基质胶作为 BMSCs 生长的三维培养体系。

在本实验中我们发现，由Ⅰ型胶原和基质胶按4∶1的比例所配制的细胞外基质胶较其他比例所配制的培养体系更适合 BMSCs 的生长。在本实验中我们还发现，在 37 ℃的恒温下，5 min 时细胞外基质胶未完全凝固，10 min 时细胞外基质胶已经凝固，所以在以后的实验中，采用的都是细胞外基质胶在 37°C 的恒温下凝固 10 min。在细胞外基质胶的配制中有 3 点需要特别注意：①NaOH 的 pH 值，pH 值的配制一定要非常准确，否则三维培养胶凝固不好，容易使种植于其中的细胞脱落。②细胞外基质胶的渗透压，因为Ⅰ型胶原和微量生长因子基质胶都没有渗透压，所以在配制细胞外基质胶时要计算好整个培养胶的渗透压，否则会造成种植于其中的细胞死亡。③三维培养胶的凝固时间，在细胞接种后置于 37 ℃凝固时间最好不要超过 30 mim，时间过长容易使 BMSCs 死亡。

组织工程中一个重要的因素是种子细胞的载体。本实验选择Ⅰ型胶原/微量生长因子基质胶为载体，它的结构特性接近肾脏内细胞外基质结构，能够为 BMSCs 提供黏附及生长的空间。我们分别在激光共聚焦、倒置显微镜下观察到 BMSCs 在Ⅰ型胶原/微量生长因子基质胶材料的表面和孔隙内黏附和生长，且生长形态良好。

近年来随着对间充质干细胞在肾脏再生及肾脏纤维化防治研究的深入，国内外许多学者发现细胞替代治疗在肾脏受损后组织修复再生和肾功能保护方面的作用[9]。BMSCs 来源广泛、易于体外分离培养和扩增的特点，因此是防治肾脏疾病较为理想的种子细胞。本实验成功三维培养了大鼠的 BMSCs，为进一步研究其参与肾脏再生修复的机制提供技术平台。

参考文献：

[1] Deb A, Wang S, Skelding K A, *et al*. Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: a study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients[J]. Circulation, 2003, 107(9): 1247 - 1249.

[2] Gussoni E, Bennett R R, Muskiewicz K R, *et al*. Long-term persistence of donor nuclei in a Duchenne muscular dystrophy patient receiving bone marrow transplantation[J]. J Clin Invest, 2002, 110(6): 807 - 814.

[3] Mezey E, Key S, Vogelsang G, *et al*. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(3): 1364 - 1369.

[4] Tran S D, Pillemer S R, Dutra A, *et al*. Differentiation of human bone marrow-derived cells into buccal epithelial cells *in vivo*: a molecular analytical study[J]. Lancet, 2003, 361(9363): 1084 - 1088.

[5] Weimann J M, Charlton C A, Brazelton T R, *et al*. Contribution of transplanted bone marrow cells to Purkinje neurons in human adult brains[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(4): 2088 - 2093.

[6] Snykers S, Vanhaecke T, Rogiers V. Isolation of rat bone marrow stem cells[J]. Methods Mol Biol, 2006, 320: 265 - 272.

[7] Jackson L, Jones D R, Scotting P, *et al*. Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications[J]. J Postgrad Med, 2007, 53(2): 121 - 127.

[8] Qiao J, Sakurai H, Nigam S K. Branching morphogenesis independent of mesenchymal-epithelial contact in the developing kidney[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(13): 7330 - 7335.

[9] 杨书强，张振香，法宪恩，等. VEGF 诱导人骨髓间充质干细胞分化为内皮细胞的可行性[J]. 郑州大学学报：医学版，2008，43(3)：503 - 506.

[10] Zerbini G, Piemonti L, Maestroni A, *et al*. Stem cells and the kidney: a new therapeutic tool? [J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17(4 Suppl 2): S123 - S126.

（编辑　邓强庭）