文章编号:1000-5404(2009)21-2041-05

论著

人关节软骨来源 CD105$^+$/CD166$^+$ 间充质干细胞的分选及其多向分化特性的鉴定

常红星,杨 柳,李 忠,陈光兴,刘 军,文亚名,戴 刚 (第三军医大学西南医院关节外科中心,重庆 400038)

摘 要:目的 建立免疫磁珠技术高效分选人关节软骨 CD166$^+$/CD105$^+$ 间充质干细胞(MSCs)的方法,并鉴定其多向分化特性。**方法** 酶消化法获取5例手术切除的膝关节软骨组织细胞,并行原代(P^0 代)和传代(P^2、P^4、P^6 代)培养;流式细胞仪检测其中 CD166$^+$/CD105$^+$ 细胞百分比。比较免疫磁珠连续法与间断法分选 P^4 代培养细胞中 CD166$^+$/CD105$^+$ 细胞的所需时间、分选细胞活度及其百分比和收获率。对连续法分选 CD166$^+$/CD105$^+$ 细胞进行成骨、成软骨、成脂肪诱导,Gomori 钙钴法碱性磷酸酶(ALP)、Ⅱ型胶原免疫组化、油红O染色检测其分化特性。**结果** 人关节软骨组织分离细胞和原代培养细胞中的 CD105$^+$/CD166$^+$ 细胞百分比较低[(1.13±0.68)%、(5.16±3.59)%],传代培养细胞中的 CD105$^+$/CD166$^+$ 细胞百分比随传代次数增加而明显增高[P^2、P^4、P^6 代培养细胞中 CD166$^+$/CD105$^+$ 细胞百分比分别为(12.68±2.59)%、(17.81±3.80)%、(19.36±3.93)%]($P<0.05$),传代培养至 P^4 代,其 CD105$^+$/CD166$^+$ 细胞百分比与 P^6 代[(19.36±3.937)%]比较差异不显著($P>0.05$)。免疫磁珠连续法分选 P^4 代培养细胞中 CD105$^+$/CD166$^+$ 细胞的百分比高于间断分选法[(93.8±3.95)% *vs* (90.1±2.43)%, $P<0.05$],且分选时间显著缩短[(6.8±0.40)h *vs* (120.0±10.21) h, $P<0.01$),而细胞收获率[(62.0±7.5)% *vs* (68.5±7.0)%]和细胞活度[(93.8±1.48)% *vs* (94.6±1.14)%]差异不显著($P>0.05$)。连续法分选 CD166$^+$/CD105$^+$ 细胞成骨诱导后 ALP 染色阳性;成软骨诱导前Ⅱ型胶原弱阳性,诱导后Ⅱ型胶原阳性;成脂肪诱导后,细胞内可见脂肪滴,油红O染色阳性。**结论** 人关节软骨 P^4、P^6 代培养细胞中的 MSCs 比例较高。免疫磁珠连续法能够高效分选人关节软骨 MSCs,所分选的 MSCs 具有成骨、成软骨及成脂肪分化功能。

关键词: 人关节软骨;CD166$^+$/CD105$^+$;间充质干细胞;免疫磁珠;细胞分选
中图法分类号: R322.72; R329-33; R329.21 **文献标识码:** A

Immunomagnetic sorting and differentiation of mesenchymal stem cells in human articular cartilage

CHANG Hong-xing, YANG Liu, LI Zhong, CHEN Guang-xing, LIU Jun, WEN Ya-ming, DAI Gang (Centre for Joint Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish a simple and feasible method of immunomagnetic separation of CD166$^+$/CD105$^+$ mesenchymal stem cells (MSCs) from human articular cartilage. **Methods** The CD166$^+$/CD105$^+$ MSCs in chondrocytes were isolated and cultured from 5 tissue samples of human knee articular cartilage with primary osteoarthritis (OA). The percentage of double positive cells were analyzed by flow cytometry just after digested, and in passages 0, 2, 4 and 6. Two techniques including the Alsalameh two stage method and our continuous process were carried out. The 2 techniques of immunomagnetic separation of CD166$^+$/CD105$^+$ MSCs from the passage 4 chondrocytes were evaluate by separation time, cell activity, CD166$^+$/CD105$^+$ MSCs ratio and its cell harvesting ratio. The potential of CD105$^+$/CD166$^+$ cells to differentiate to adipogenic, osteogenic, and chondrogenic lineages was analyzed after immunomagnetic selection by histochemistry and immunohistochemistry. **Results** The CD105$^+$/CD166$^+$ MSCs ratios in the chondrocytes just after digested, passage 0, 2 and 4 were (1.13±0.68)%, (5.16±3.59)%, (12.68±2.59)% and (17.81±3.80)% respectively ($P<0.05$); No significant difference was seen between that of the passage 4 and passage 6 [(17.81±3.80)% *vs* (19.36±3.93)%, $P>0.05$]. The separation time and CD166$^+$/CD105$^+$ MSCs ratio of the Alsalameh two stage method and the our continuous process were (6.8±0.40) h and (120.0±10.21) h,

基金项目: 国家自然科学基金(30672200)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30672200)
作者简介: 常红星,男,河南省新乡市人,博士研究生,主治医师,主要从事关节外科与组织工程方面的研究,现在北京军区总医院骨科。E-mail:erythros@sohu.com
通信作者: 戴 刚,E-mail:daigang60@sohu.com
收稿日期: 2009-05-26;**修回日期:** 2009-07-01

and (93.8 ± 3.95)% and (90.1 ± 2.43)% respectively ($P < 0.05$, 0.01). The cell activity and $CD166^+/CD105^+$ MSC harvesting ratio were (93.8 ± 1.48)%, (94.6 ± 1.14)% and (62.0 ± 7.5)%, (68.5 ± 7.0)% respectively ($P > 0.05$). Purified cartilage derived $CD105^+/CD166^+$ cells did not express the markers of differentiated chondrocytes. However, they expressed type Ⅱ collagen after differentiation. Differentiation to adipocytes occurred in $CD105^+/CD166^+$ cells culture, as indicated by characteristic cell morphology and oil red O staining of lipid vacuoles. Osteogenesis was observed in isolated $CD105^+/CD166^+$ cells cultured in the presence of osteogenic supplements. **Conclusion** The $CD105^+/CD166^+$ MSCs in the chondrocytes cultured from human knee articular cartilage samples covers most after chondrocytes at passage 4 and 6. Our continuous process of immunomagnetic separation of $CD105^+/CD166^+$ MSCs in the chondrocytes culture is an effective, convenient and feasible method. And the cultured $CD105^+/CD166^+$ cells maintain the potential to differentiate to adipogenic, osteogenic, and chondrogenic lineages.

Key words: human articular cartilage; mesenchymal stem cells; $CD166^+/CD105^+$ cells; immunomagnetic beads; cell separation

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)在维持组织损伤与修复的动态平衡中起着至关重要的作用[1]。新近研究发现,正常人及原发性骨关节炎(osteoarthritis,OA)患者关节软骨内均存在 MSCs[2,3]。建立适宜的分选方法并于最佳时机高效获取较为纯净和一定数量的关节软骨 MSCs,对进行其生物学特性研究具有重要意义。依据 MSCs 表面特异性标志物原理的免疫磁珠分选技术可获取较为纯净的目标细胞[4],而目前常用的免疫磁珠技术间断分选法,即细胞 + 抗体 + 二抗-磁珠二次法[3,5],尚需明确高效分选目标细胞的时机及使用二抗后对分选细胞纯度和活性的影响。据此,本研究通过观测人关节软骨组织消化分离细胞及其原代和传代培养细胞中 $CD105^+/CD166^+$ 细胞百分比的变化,明确高效分选其 MSCs 的时机;通过分析比较免疫磁珠连续法与间断法分选其中 $CD166^+/CD105^+$ 细胞的效能,建立免疫磁珠技术高效分选人关节软骨来源 $CD105^+/CD166^+$ MSCs 的适宜方法;通过对连续法分选 $CD105^+/CD166^+$ 细胞的成骨、成软骨及成脂肪诱导检测其多向分化特性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本获取 第三军医大学西南医院关节外科中心施行原发性 OA 人工全膝关节置换术中切除、Markin 病理分级 1~2 级的全层关节软骨标本 5 例,患者年龄 50~65(61.0 ± 6.3)岁,其中男性 3 例,女性 2 例。标本获取得到医院伦理委员会批准,并经患者本人知情同意。

1.1.2 主要试剂及物品 透明质酸酶、胰蛋白酶(Sigma 公司)、Ⅱ型胶原酶(Gibco 公司);小鼠抗人 CD105、CD166 抗体(Ancell 公司),Dynabeads(Pan Mouse IgG)磁珠(Invitrogen 公司)、Anti-FITC-Multisoit 磁珠试剂盒、CD105MicroBeads(Militenyi 公司),CD105-PE 抗体、CD166-FITC 抗体(Serotec 公司);rhTGF-β3(Santa 公司)、大鼠抗人Ⅱ型胶原多克隆抗体、生物素化抗大鼠 IGg(北京中山金桥公司)、胰岛素、转铁蛋白(美国 Sigma 公司)、地塞米松、β-甘油磷酸钠、抗坏血酸、丙酮酸钠、ITS、IBMX(美国 Sigma 公司)、油红 O(北京天根公司)。

1.1.3 主要仪器 LD 分离柱、MS 分离柱、miniMACS 分选架(Militenyi 公司);CKX31 型倒置显微镜(OLYMPUS),YJ-1450 净化工作台(苏州净化设备公司),二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司),低温离心机(Beckman 公司),EPICS AL TRA Ⅱ型流式细胞仪(Beckman 公司)。

1.2 方法

1.2.1 关节软骨细胞分离与培养 按照周强等[6]系列酶消化方法分离关节软骨细胞。切剪关节软骨呈 1 mm^3 碎块,分别用 1 g/L 胰蛋白酶、1 g/L 透明质酸酶、2 g/L Ⅱ型胶原酶溶液于 37 ℃摇床中分别消化 1、3 h,细胞悬液 300 目滤网过滤洗涤;细胞计数后,按 $3 \times 10^4/cm^2$ 细胞密度接种于盛有适量 DMEM/F12(其中含 10% 胎牛血清、100 IU/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素)培养液的细胞培养瓶中,于 37 ℃、体积分数为 5% CO_2 培养箱内孵育;细胞接种 72 h 首次换液,培养细胞至 80% 融合时(第 5 天),以 0.25% 胰蛋白酶溶液消化收集培养细胞;细胞计数后,以 1∶2细胞比并按上述原代细胞培养方法,连续传代培养至第 6 代。

1.2.2 分离细胞及培养细胞中 $CD105^+/CD166^+$ 细胞百分比检测 分别取上述分离细胞及原代(P^0代)和传代(P^2、P^4、P^6代)培养细胞悬液1 ml(含 5×10^5 细胞),PBS 洗涤后 100 μl PBS 重悬,同时加入 CD105-PE 抗体与 CD166-FITC 抗体(1 μg/10^6 细胞,终浓度 1∶50),4 ℃冰箱避光孵育 30 min;PBS 洗涤 2 次,4% 多聚甲醛固定 15 min,于流式细胞仪检测其 $CD105^+/CD166^+$ 细胞百分比(%)。

1.2.3 2 种免疫磁珠方法分选人关节软骨来源 MSCs 的效能比较

1.2.3.1　间断分选法　　按照试剂盒说明书并参照 Alsalameh 等[3]方法。取 Dynabeads 液 25 μl 于 10 ml 塑料离心管中,1 ml PBS 稀释后置于 miniMACS 分选架磁场中 2 min,PBS 洗涤 2 次,移出磁场,加入 0.4 μg 小鼠抗人 CD105 抗体,混匀后置于 4 ℃冰箱低温孵育 30 min,以制备其磁珠-CD105 抗体复合物悬液;将其置于上述磁场中,2 ml PBS 洗涤后,移出磁场,加入前述 P^{4}代细胞悬液 1 ml(含 1×10^7 细胞),混匀后置于 4 ℃冰箱低温孵育 30 min,期间每 5 分钟轻微震荡 1 次,加入 PBS 2 ml,混匀后置于 miniMACS 分选架磁场中 2 min,PBS 洗涤 2 次,移出磁场,即获得磁珠-抗体-CD105$^+$细胞混合物;按照前述细胞培养方法孵育 5 d 待磁珠完全解离,0.25% 胰蛋白酶溶液消化收集与上述磁珠-抗体完全解离的 CD105$^+$细胞,计数并制备其细胞悬液。以鼠抗人 CD166 抗体并使用上述相同方法得到 CD105$^+$/CD166$^+$细胞。

1.2.3.2　连续分选法　　参照试剂盒说明书,按以下步骤分选:①取前述 P^{4}代细胞悬液 1 ml(含 1×10^7/细胞)于 1.5 ml 塑料离心管中,按(1∶50)加入 CD166-FITC 抗体,混匀后置于 4 ℃冰箱低温避光孵育 45 min;②4 ℃ 300 g 离心 5 min,弃去上清液,1 ml PBS 洗涤 2 次、80 μl PBS 重悬后,加入 10 μl 抗 FITC 磁珠溶液,混匀后置于 4 ℃冰箱低温孵育 30 min,再次上述条件下离心、洗涤后,500 μl PBS 重悬;③将 LD 分离柱置于 miniMACS 分选架磁场中,1 ml PBS 洗柱后,加入上述再次重悬的细胞悬液,流出液为 CD166$^-$细胞,1 ml PBS 洗涤分离柱 2 次;④于磁场中取出 LD 分离柱,1 ml PBS 重复冲洗并收集含 CD166$^+$细胞冲洗液;⑤前述方式离心冲洗液,重悬后加入分离试剂(20 μl/ml),4 ℃冰箱孵育 10 min;前述方式离心,弃去上清液后 50 μl PBS 重悬,加入 30 μl 终止试剂并充分混匀;⑥加入 CD105 磁珠(10 μl/10^6细胞,细胞体积 90 μl),4 ℃冰箱低温避光孵育 30 min;⑦重复② ~ ④的操作,使用 MS 分离柱,获得 CD105$^+$/CD166$^+$细胞。

检测指标:①分选所需时间:分别记录 2 种分选方法获取 CD105$^+$/CD166$^+$细胞所需操作时间;②分选后细胞活度:常规台盼蓝溶液染色法计算 2 种分选方法所获其细胞总数及台盼蓝拒染率(重复 3 次);③CD105$^+$/CD166$^+$细胞百分比:将 2 种分选方法所得 CD105$^+$/CD166$^+$细胞按照前述细胞培养方法孵育 3 d,0.25% 胰蛋白酶溶液消化并收集细胞,以前述 CD105$^+$/CD166$^+$细胞百分比流式细胞仪方法检测;④CD105$^+$/CD166$^+$细胞收获率(%)=(分选后细胞总数×双阳性细胞百分比)/(分离前细胞总数×分离前双阳性细胞百分比)×100%。

1.2.4　CD105$^+$/CD166$^+$细胞分化特性检测　　将免疫磁珠连续法分选 CD105$^+$/CD166$^+$细胞以 5×10^4/孔接种于含盖玻片培养板中,分别以成骨诱导培养液(普通培养液中加入 50 μmol/L 抗坏血酸、10 μmol/L β-甘油磷酸钠、0.1 μmol/L 地塞米松)、成软骨诱导培养液(加入 1 mmol/L 丙酮酸钠、1×10^{-7} mol/L 地塞米松、1% ITS、10 ng/ml rhTGF-β3)、成脂诱导培养液(加入 1 μmol/L 地塞米松、0.5 mmol/L IBMX,10 μg/ml 胰岛素)培养 14 d,分别进行 Gomori 钙钴法碱性磷酸酶(ALP)、Ⅱ型胶原免疫组化、油红 O 染色,镜下观察摄片。

1.3　统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件处理数据,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,计数资料以百分比表示,组间比较采用 t 检验。

2　结果

2.1　不同培养阶段人关节软骨组织细胞中 CD105$^+$/CD166$^+$细胞的百分比

以相近细胞活度及等量细胞数,分别加入 CD105-PE 抗体与 CD166-FITC 抗体,通过流式细胞仪检测人关节软骨分离细胞及原代、传代培养细胞中 CD105$^+$/CD166$^+$细胞的百分比,见表 1。

表 1　不同培养阶段关节软骨细胞中 CD105$^+$/CD166$^+$细胞百分比(%,$n=5$)

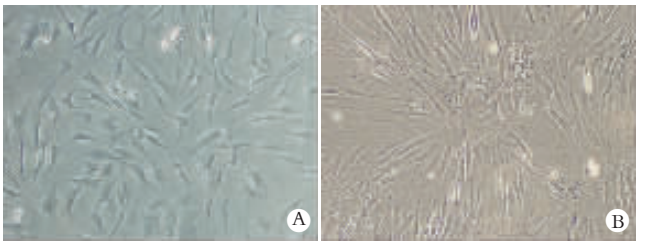
组别	细胞数量	细胞活度	CD105$^+$/CD166$^+$细胞比
组织分离细胞	5×10^5	90.8±3.27	1.13±0.68[a]
原代培养细胞	5×10^5	93.0±3.39	5.16±3.59[a]
P^{2}代培养细胞	5×10^5	94.2±1.64	12.68±2.59[a]
P^{4}代培养细胞	5×10^5	95.6±2.30	17.81±3.80[a]
P^{6}代培养细胞	5×10^5	93.8±2.28	19.36±3.93[a]

a:$P<0.05$,组间两两比较

结果显示,人关节软骨组织分离细胞和原代培养细胞中的 CD105$^+$/CD166$^+$细胞百分比较低,传代培养细胞中的 CD105$^+$/CD166$^+$细胞百分比随传代次数增加而明显增高($P<0.05$),传代培养 P^{4}代与 P^{6}代比较,其 CD105$^+$/CD166$^+$细胞百分比相近($P>0.05$)。

2.2　两种免疫磁珠方法分选人关节软骨来源 CD105$^+$/CD166$^+$细胞的效能比较

以相近细胞活度及等量细胞数的人关节软骨 P^{4}代培养细胞(图 1A),分别采用免疫磁性间断法、连续法分选其中的 CD105$^+$/CD166$^+$细胞(图 1B),其效能比较结果见表 2。



A:P^{4}代培养关节软骨细胞;B:P^{4}代培养关节软骨细胞中分选的干细胞

图 1　培养第 4 天 P^{4}代关节软骨细胞及分选后干细胞　(倒置显微镜×100)

表 2　2 种免疫磁珠方法分选人关节软骨来源 CD105$^+$/CD166$^+$细胞的效能比较(%,$n=5$)

方法	细胞数量	细胞活度		分选时间(h)	CD105$^+$/CD166$^+$细胞	
		分选前	分选后		比率	收获率
间断法	1×10^7	95.6±2.3	94.6±1.14	120.0±10.21	90.1±2.43	68.5±7.0
连续法	1×10^7	95.6±2.3	93.8±1.48	6.8±0.40[a]	93.8±3.95[b]	62.0±7.5

a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与间断法比较



A:P^2代 $CD105^+/CD166^+$细胞成骨诱导后(钙钴法 ALP 染色×100);B:P^2代 $CD105^+/CD166^+$细胞成软骨诱导前(Ⅱ型胶原免疫组化染色×100);C:P^2代 $CD105^+/CD166^+$细胞成软骨诱导后(Ⅱ型胶原免疫组化染色×100)

图2 P^2代培养 $CD105^+/CD166^+$细胞成骨、成软骨特性观察

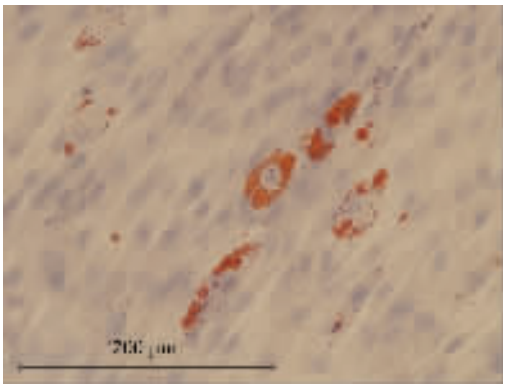


图3 人关节软骨来源 $CD105^+/CD166^+$细胞成脂肪特性观察
(油红O染色)

结果显示,人关节软骨 P^4代培养细胞中,免疫磁珠连续法分选 $CD105^+/CD166^+$细胞的百分比高于间断分选法($P<0.05$),且分选所需时间显著缩短($P<0.01$)。

2.3 人关节软骨来源 $CD105^+/CD166^+$细胞的多向分化特性

免疫磁珠连续法分选的 P^2代培养 $CD105^+/CD166^+$细胞经成骨诱导后,Gomori 钙钴法 ALP 染色可见细胞质中许多浅棕至棕黑色的细小颗粒,细胞着色程度不一(图2A);成软骨诱导前细胞Ⅱ型胶原染色呈弱阳性(图2B),诱导后染色呈阳性(图2C)。成脂肪诱导后细胞内出现脂滴,油红染色呈红色(图3)。

3 讨论

CD105 和 CD166 共表达可作为关节软骨 MSCs 的鉴定标志。目前研究认为,人类成体 MSCs 的表面标志物包括 CD13、CD29、CD44、CD49、CD51、CD54、CD58、CD71、CD73、CD90、CD102、CD105、CD106、CDw119、CD120a、CD120b、CD123、CD124、CD126、CD127、CD140a、CD166[4,7],而某一组织中的成体 MSCs 并非所有这些标志物均同时阳性。因此,通常选择其中1个或2个标志物进行成体 MSCs 的筛选及其多向分化能力的检测,以确定其干细胞特性。CD105 是 TGF-βⅢ型受体,最早被称为 SH-2,通过调节 TGF-β与其受体的结合而参与细胞信号传导;CD166 又称为白细胞活化黏附因子(activated leukocyte cell adhesion molecule,ALCAM),是淋巴细胞抗原 CD6 的配基,主要在白细胞和胸腺上皮细胞上表达;二者作为 MSCs 的表面标志物之一于近年研究中得到广泛承认[8,9],并有研究认为 CD105 和 CD166 共表达可作为骨髓基质干细胞的表面标志物[10]。本课题组刘军等[11]证实以 CD105 和 CD166 共表达为表面标志物能够分选 OA 关节软骨来源的 MSCs。

应用免疫磁性分离技术高效分选目标细胞应选择适宜的时机。针对某一特异性干细胞表面标志物的阳性分选,较其阴性分选能得到更高的目标细胞富集率,故目前常用的免疫磁珠干细胞分选技术多为单标志物阳性分选或单阳性+单阴性标志物分选[5,12]。由于组织中干细胞的数量较低,各种表面标志物的阳性率不一,因此双阳性分选 MSCs 相对比较困难。自2003年 Barbero 等[13]首次发现关节软骨中含有 MSCs 以来,从最早利用细胞克隆[2,13,14]技术到近来使用免疫磁珠[3-5]、流式细胞仪[15]技术分选关节软骨组织 MSCs,均未明确高效获取纯净、足量关节软骨 MSCs 的最佳分选时机,对其细胞标志物的检测时间也无明确界定和连续观察比较[7]。前述不同培养阶段人关节软骨来源 $CD105^+/CD166^+$细胞的百分比观测结果显示,原代培养细胞中 $CD105^+/CD166^+$细胞的百分比较低,仅有(5.16±3.59)%,同以往研究结果相近[3];而传代培养细胞中的 $CD105^+/CD166^+$细胞百分比明显增高,其中 P^4代阶段达(17.81±3.80)%;进一步传代培养,其中的 $CD105^+/CD166^+$细胞百分比相近。同时也发现人关节软骨细胞在培养过程中,随着培养细胞不断增殖而进行着分化/去分化的过程[15]。因此,应用免疫磁珠技术分选关节软骨 MSCs,需要根据研究

目的选择不同时机。如果研究重点是关节软骨组织中的 MSCs,应于其原代培养细胞中进行分选;若研究重点为其诱导分化能力,则应于 P^{4}代培养细胞中分选,以获取足量的关节软骨 MSCs。

免疫磁珠连续法分选人关节软骨 MSCs 的效能优于间断分选法。前述两种免疫磁珠方法分选人关节软骨来源 CD105$^+$/CD166$^+$细胞的效能比较结果显示,于人关节软骨 P^{4}代培养细胞中,免疫磁珠连续法分选 CD105$^+$/CD166$^+$细胞的百分比高于间断分选法($P<0.05$),且分选所需时间显著缩短($P<0.01$)。提示免疫磁珠连续法分选人关节软骨来源的 MSCs 的分选效能较高,所需时间较少,操作较为简便。与单标志分离-培养-单标志分离的间断方法[3]相比,双标志免疫磁珠连续法分选的 MSCs 纯度较高,而其更大的优势在于应用直接免疫磁珠方法,避免了非特异性的结合,使其抗原抗体结合的精度更高;同时节省了等待磁珠分离的细胞培养时间,避免了培养过程中细胞表型变化对研究结果的影响,显著缩短了实验时间。而 MSCs 双标志免疫磁珠连续分选法的缺点是细胞分选过程中需要反复多次离心,导致一定的细胞损耗。实验过程发现,免疫磁珠连续分选法所获关节软骨 MSCs 的细胞贴壁时间及生长速度,与间断法所获关节软骨 MSCs 无差异,提示持续低温操作对分选细胞的活性影响较小。

不同培养阶段关节软骨细胞中 CD105 与 CD166 的表达比例有明显差异。前述不同阶段关节软骨培养细胞流式细胞仪检测结果显示,CD105$^+$细胞比例均 >80% 以上,而 CD166$^+$细胞比例均 < 20%,且与 CD105$^+$/CD166$^+$细胞比例基本相当,提示 CD166 可能与干细胞的特性相关性更高。因此,应用连续法于传代培养细胞中分选 CD105$^+$/CD166$^+$细胞时,先分离细胞量较大的 CD105$^+$细胞,并使用 LD 分离柱有效收集数量偏少 CD166$^+$细胞,可减少再次分选时的试剂消耗,而且操作比较容易,同时 CD105$^+$/CD166$^+$比例基本固定,其分选效率误差很小。

免疫磁珠连续法分选的 CD105$^+$/CD166$^+$细胞具有 MSCs 多向分化功能。前述免疫磁珠连续法分选的 P^{2}培养 CD105$^+$/CD166$^+$细胞经成骨诱导后 Gomori 钙钴法染色呈阳性;成软骨诱导细胞Ⅱ型胶原染色阳性,而成软骨诱导前呈弱阳性;成脂肪诱导后细胞内出现圆形折光的脂滴,油红 O 染色呈红色。提示人关节软骨来源的 CD105$^+$/CD166$^+$细胞具有成骨、成软骨、成脂肪诱导分化特性,可能在维持关节软骨损伤与修复的动态平衡中起着至关重要的作用[1]。

(致谢:感谢第三军医大学西南医院周新、罗海水、段小军、王富有、王凤玲、陶兴、曾玲及预防医学院褚群对本实验的帮助和指导!)

参考文献:

[1] Luyten F P. Mesenchymal stem cells in osteoarthritis[J]. Curr Opin Rheumatol, 2004, 16(5): 599-603.

[2] Dowthwaite G P, Bishop J C, Redman S N, *et al*. The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population[J]. J Cell Sci, 2004, 117(Pt 6): 889-897.

[3] Alsalameh S, Amin R, Gemba T, *et al*. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage [J]. Arthritis Rheum, 2004, 50(5): 1522-1532.

[4] Baksh D, Song L, Tuan R S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy [J]. J Cell Mol Med, 2004, 8(3): 301-316.

[5] 仝识非, 宋治远, 姚　青,等. 小鼠骨髓间充质干细胞的分离与纯化培养的实验研究[J]. 第三军医大学学报,2007, 29 (10): 907-910.

[6] 周　强,李起鸿,戴　刚, 等. 三步酶消化法高效分离兔原代关节软骨细胞及体外培养观察[J]. 中华外科杂志, 2005, 43(8): 522-526.

[7] 王　忠,高　毅,汪　艳, 等. 人骨髓间充质干细胞的分离培养与鉴定[J]. 中华神经医学杂志, 2006, 5(10): 973-977.

[8] 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.

[9] Lee R H, Kim B, Choi I, *et al*. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue[J]. Cell Physiol Biochem, 2004,14(4-6): 311-324.

[10] Majumdar M K, Thiede M A, Mosca J D, *et al*. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells[J]. J Cell Physiol, 1998, 176(1): 57-66.

[11] 刘　军, 戴　刚, 杨　柳. 人骨关节炎关节软骨间充质祖细胞的免疫磁珠分选和鉴定[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(47): 9239-9242.

[12] 罗海水, 彭代智, 周　新, 等. 免疫磁珠分选人角朊干细胞的实验研究[J]. 现代生物医学进展, 2007, 7(6): 812-814.

[13] Barbero A, Ploegert S, Heberer M, *et al*. Plasticity of clonal populations of dedifferentiated adult human articular chondrocytes[J]. Arthritis Rheum, 2003, 48(5): 1315-1325.

[14] Thornemo M, Tallheden T, Sjogren-Jansson E,*et al*. Clonal populations of chondrocytes with progenitor properties identified within human articular cartilage[J]. Cells Tissues Organs, 2005, 180(3): 141-150.

[15] Fickert S, Fiedler J, Brenner R E. Identification of subpopulations with characteristics of mesenchymal progenitor cells from human osteoarthritic cartilage using triple staining for cell surface markers[J]. Arthritis Res Ther, 2004, 6(5): R422-R432.

(编辑　吴培红)