维普资讯 http://www.cqvip.com

·论 著·

外周血MSCs的分离培养及对G-CSF的动员反应

邓 均[1]，邹仲敏[1]，张春雷[2]，王军平[1]，艾国平[1]，粟永萍[1]（1.第三军医大学军事预防医学院防原医学教研室，全军复合伤研究所，创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室，重庆 400038；2.深圳市中医院检验科，广东 深圳 518033）

［摘 要］ **目的** 建立多种种属外周血间充质干细胞（MSCs）的分离培养方法，探讨其对粒细胞集落刺激因子（G-CSF）的动员反应。**方法** 用percoll（1.131 g/mL）分离多种种属外周血单个核细胞，进行贴壁培养MSCs。以G-CSF作为动员剂，培养骨髓和外周血来源的MSCs，计数动员前后的成纤维细胞集落形成单位（CFU-F）。**结果** 对多种种属进行外周血MSCs分离培养，成功率不同。在本实验条件下，可以稳定的直接分离培养出大鼠外周血的MSCs。G-CSF动员后，骨髓来源MSCs的CFU-F数量显著高于对照组（$P<0.01$）；外周血来源MSCs的CFU-F数量也显著高于对照组（$P<0.01$），接近4倍。**结论** 不同种属外周血MSCs分离培养难易不同，其直接原因是生理条件下外周血中存在的MSCs量少导致的。G-CSF可以有效地动员大鼠骨髓和外周血MSCs。

［关键词］间充质干细胞；动员；粒细胞集落刺激因子；细胞培养
［中图分类号］R329.28；Q813.11 ［文献标识码］A ［文章编号］1672-5042（2008）04-0225-03

The feasibility analysis of MSCs mobilization by G-CSF and its prosthetic effection in traumatic brain injury

DENG Jun, ZOU Zhong-min, ZHANG Chun-lei, WANG Jun-ping, AI Guo-ping, SU Yong-ping (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish the isolating cultural method of MSCs from some genus peripheral blood (PB), and explore the mobilization response of MSCs by G-CSF. **Methods** MSCs from some genus PB were isolated by percoll (1.131 g/mL) and carried out adherent culture. MSCs-derived bone marrow and PB were cultured and its CFU-F were counted after mobilization by G-CSF. **Results** PB MSCs were isolated and cultureed successfully or unsuccessfully from different genus. Under our experiment condition, rat's PB MSCs could been isolated and cultured steadily. A significantly higher number of CFU-F of BM-derived MSCs and PB-derived MSCs than that of control group after mobilization by G-CSF ($P<0.01$), almost 4-fold increase. **Conclusion** PB MSCs were isolated and cultured successfully or unsuccessfully from different genus, it concerned with a small number of circulating MSCs in BP. We confirmed that G-CSF mobilized BM-derived MSCs, especially PB-derived MSCs by CFU-F assay.

Keywords: mesenchymal stem cell; mobilization; G-CSF; cell culture

正常生理情况下，间充质干细胞（mesenchymal stem cells，MSCs）大量存在于骨髓，循环血液中仅有少量。已有研究证实可从胎儿和新生儿血液中分离培养出循环MSCs[1]。但从成熟个体外周血中分离MSCs，因受实验人员、环境、方法等影响，有成功[2]也有失败的[3]。对不同种属动物（或人）的外周血MSCs进行分离培养，其结果也不一样。粒细胞集落刺激因子（granulocyte colony-stimulating factor，G-CSF）作为体内重要的调节因子，自G-CSF分子克隆和基因合成成功以来，在临床上已广泛应用。而G-CSF大量应用于白血病的临床治疗，主要得益于其对造血干细胞的有效动员。那么除了动员造血干细胞外，G-CSF能否动员骨髓细胞中的MSCs或其他干细胞，还存在着很大争议[4]。因此，本研究对不同种属的外周血MSCs进行分离培养，在本实验室条件下建立成熟的分离培养外周血MSCs的方法，并探讨G-CSF能否有效动员外周血MSCs。

［基金项目］国家重点基础研究发展规划资助项目（"973"项目，2005CB522605），国家自然科学基金资助项目（30200142）

［作者简介］邓 均（1974-），男，四川省雅安市人，博士研究生，主要从事间充质干细胞在创伤修复中的应用及机制方面的研究。电话：（023）68771727，E-mail：djtmmu@tom.com

［通讯作者］粟永萍，电话：（023）68752279，E-mail：suyp2003@yahoo.com.cn

［收稿日期］2008-04-15 ［修回日期］2008-06-05

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂

2月龄的健康清洁SD大鼠，体重100～150 g，雌雄不拘。健康C57BL/6小鼠，雌雄不拘，SPF级，6周龄，体重20～25 g。

维普资讯 http://www.cqvip.com

健康日本大耳白兔。动物均由本校实验动物中心提供。MEM/F12培养基、胎牛血清(Gibco公司,美国),G-CSF(齐鲁制药有限公司)。

1.2 外周血MSCs的直接分离和培养

1.2.1 实验标本 为了探讨在本实验条件下,能否直接从外周血中分离培养出MSCs,拟对小鼠、大鼠、兔、人的外周血进行MSCs分离培养。标本分别为:①C57BL/6小鼠4只;②SD大鼠4只;③日本大耳白兔外周血4份;④人(志愿者)外周血4份。小鼠和大鼠外周血标本通过剪开的股动脉采集,用肝素化管分别收集0.8 mL和5 mL外周血;兔外周血标本为股动脉处抽取5 mL血液;人外周血标本为肘部静脉抽取5 mL血液。

1.2.2 细胞分离和培养 分别将各外周血标本用percoll(1.131 g/mL)分离单个核细胞,制成细胞悬液,计数后以$6\times10^5/cm^2$密度接种于培养瓶,置于5% CO_2、37 ℃孵箱。48 h后全量换液,去除悬浮细胞,以后3~4 d半量换液。细胞达80%~90%融合后,用0.25%胰酶消化传代。

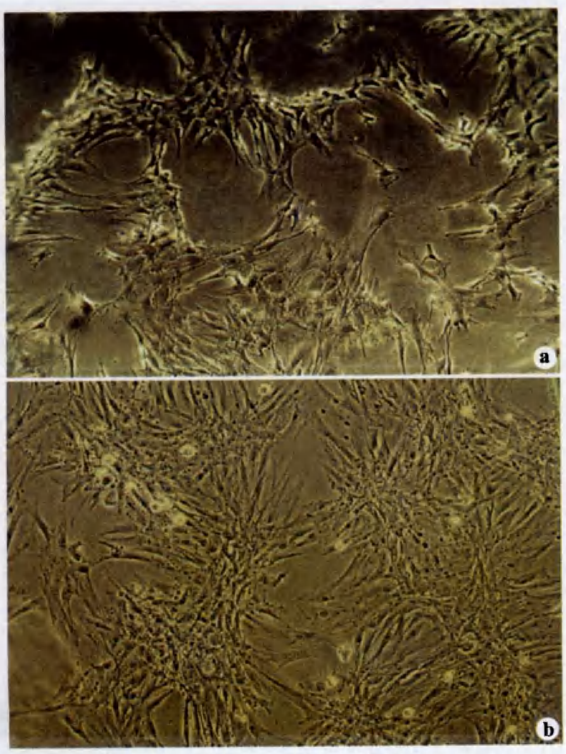
1.3 G-CSF对大鼠MSCs的动员效应

1.3.1 实验分组 2月龄的8只SD大鼠分为2组。正常对照组(BMN表示骨髓源MSCs对照组,PBN表示外周血MSCs对照组):4只大鼠连续5 d尾静脉注射0.9% NaCl 0.5 mL。G-CSF动员组(BMG表示骨髓源MSCs的G-CSF动员组,PBG表示外周血MSCs的G-CSF动员组):4只大鼠连续5 d尾静脉注射G-CSF($20\ \mu g\cdot d^{-1}\cdot kg^{-1}$)0.5 mL。

1.3.2 外周血和骨髓样本的收集培养 对照组和G-CSF动员组5 d后收集骨髓样本,获取MSCs。具体操作为,游离股骨,清除股骨周围软组织,离断股骨头。用DMEM/F12(含20%胎牛血清)培养基冲洗股骨头断端,制成细胞悬液,计数后以$5\times10^5/cm^2$密度接种于培养瓶,置于5% CO_2、37 ℃孵箱。48 h后全量换液,去除悬浮细胞,以后3~4 d半量换液。细胞达80%~90%融合后,用0.25%胰酶消化传代。外周血样本的收集:剪开大鼠股动脉,用肝素化管收集5 mL外周血。用percoll(1.131 g/mL)分离单个核细胞,制成细胞悬液,计数后以$6\times10^5/cm^2$密度接种于培养瓶,以后方法同骨髓MSCs的培养。

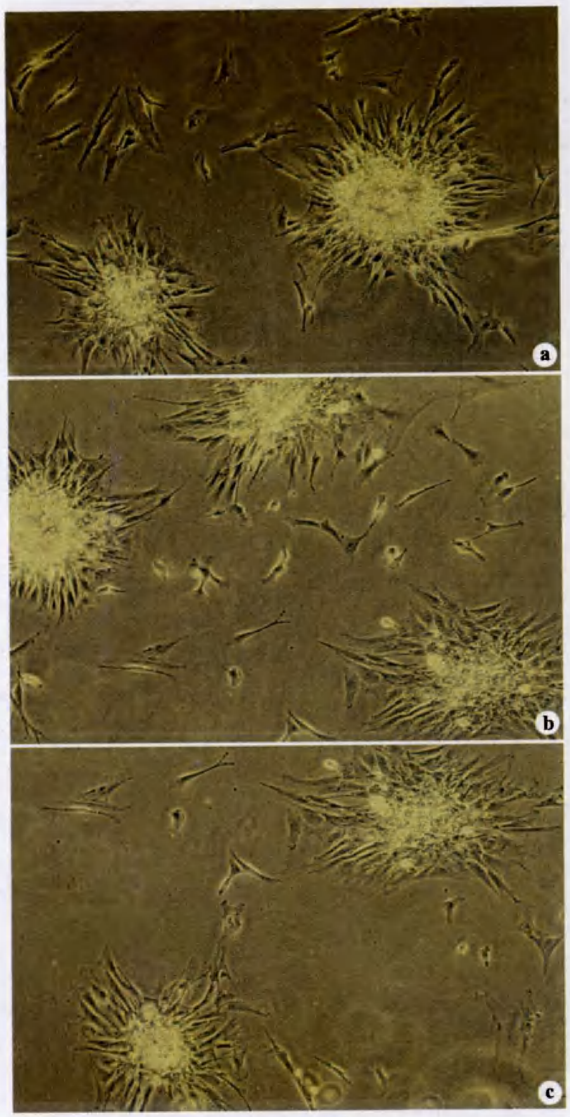
1.4 成纤维细胞集落形成单位(CFU-F)分析

细胞消化后(第一代)以10^5总量接种于25 cm^2的培养瓶,培养液为含15%胎牛血清的DMEM/F12,置入5% CO_2、37 ℃孵箱。48 h后全量换液,7 d后,计数成纤维细胞集落形



a:大鼠外周血MSCs;b:人外周血MSCs

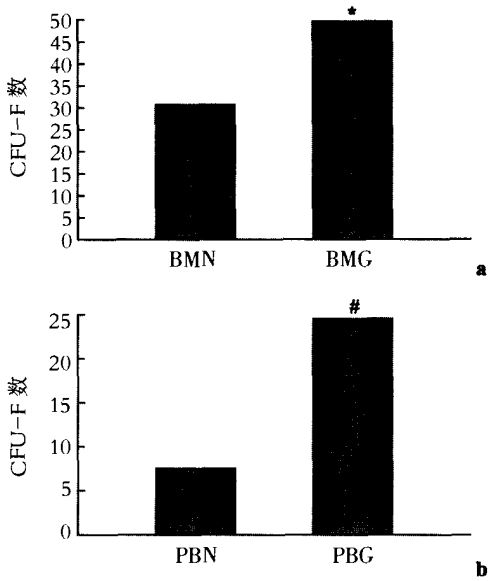
图1 直接分离、培养外周血MSCs(×100)



a:骨髓MSCs对照组;b:骨髓MSCs的G-CSF动员组;c:外周血MSCs的G-CSF动员组

图2 大鼠骨髓和外周血第一代MSCs的集落形成(×100)

维普资讯 http://www.cqvip.com



a:总数为10^5骨髓来源细胞中的CFU-F数量;b:总数为10^5外周血来源细胞中的CFU-F数量;*:与BMN比较,$P<0.01$;#:与PBN比较,$P<0.01$

图3 骨髓和外周血MSCs的CFU-F分析

成单位(CFU-F),每细胞集落形成单位含50个以上细胞。

2 结果

2.1 外周血MSCs的直接分离和培养结果

小鼠外周血标本血量太少,培养48 h换液后,只有少数几个散在细胞贴壁,且不能呈梭形生长,培养一段时间后逐渐死亡。大鼠外周血标本均能培养出MSCs(图1a)。兔外周血标本全部不能培养出MSCs。人外周血标本有两份标本能培养出MSCs(图1b)。

2.2 G-CSF对大鼠MSCs的动员效应

成功培养出大鼠外周血来源和骨髓来源的MSCs。观察细胞集落的形成(图2),进行CFU-F分析。结果显示G-CSF动员后,骨髓来源MSCs的CFU-F数量显著高于对照组($P<0.01$)。BMN、BMG的CFU-F值($\bar{x}\pm s, n=4$)分别为29.50±3.87、49.75±4.57。同样,经G-CSF动员后外周血来源MSCs的CFU-F数量也显著高于对照组($P<0.01$)。PBN、PBG的CFU-F值($\bar{x}\pm s, n=4$)分别为7.25±1.26、24.75±2.63,PBG较PBN增高接近4倍(图3)。

3 讨论

近年来,干细胞由于多向分化的潜能而越来越受到重视,也成为细胞工程、再生医学中的主要选择细胞[5]。现今MSCs主要是从骨髓中获取,能否从成体外周血中分离和培养出MSCs还没有定论[2-3]。在不同的实验条件下,从外周血中分离和培养MSCs的结果也不一样。为了探讨在本实验条件下,能否直接从外周血中分离培养出MSCs,本研究对小鼠、大鼠、兔、人的外周血进行MSCs分离培养。结果表明即使在同样实验条件下,分离培养不同种属MSCs的成功率也不一样。研究显示,在培养骨髓原代MSCs时,需要接种合适的细胞量,细胞太少会减少细胞间的联系和支持,从而导致MSCs的滞长。在外周血MSCs培养过程中,本研究发现细胞培养后24~48 h内,贴壁细胞多的可以培养成功,而贴壁细胞少的则很难培养成功。本文认为动物和人的外周血中都存在MSCs,但外周血中的MSCs量少直接导致了对其分离培养的困难,如小鼠的血液能取出的量不过1 mL,所以很难培养出外周血MSCs。本实验显示在本实验条件下,能稳定地分离培养出大鼠外周血MSCs,故以大鼠为实验模型,研究动员后外周血MSCs的细胞特性较可靠。

循环血中虽然存在MSCs,但要达到细胞治疗的目的,还必须利用外来因素刺激动员骨髓内的MSCs,使其大量释放进入循环血。研究显示,G-CSF是造血干细胞的有效动员剂,但对于其他干细胞如MSCs的动员、循环,却存在着争议。CFU-F被认为是比较成熟的MSCs后代和间质的前体细胞,CFU-F分析可用来评估培养体系中MSCs的数量。在本实验中通过CFU-F分析,证实G-CSF能有效动员骨髓和外周血中的MSCs,尤其是对外周血中的MSCs动员更明显。可见经G-CSF动员5 d后,骨髓内MSCs的大量增加,可能与在壁龛(niche)内处于静止的MSCs被激活增生有关。由于正常条件下骨髓内MSCs的量远远大于外周血中的MSCs,经G-CSF动员使骨髓MSCs释放到外周血,就会导致外周血中MSCs增加量相对很高。

[参考文献]

[1] Lee MW, Choi J, Yang MS, et al. Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004,320(1):273-278.

[2] Porada CD, Zanjani ED, Almeida Porad G. Adult mesenchymal stem cells: a pluripotent population with multiple applications[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2006,1(3):365-369.

[3] Pountos I, Corscadden D, Emery P, et al. Mesenchymal stem cell tissue engineering: techniques for isolation, expansion and application[J]. Injury, 2007,38(Suppl 4):S23-S33.

[4] Zvaifler NJ, Marinova Mutafchieva L, Adams G, et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals[J]. Arthritis Res, 2000,2(6):477-488.

[5] Chan BP, Hui TY, Yeung CW, et al. Self-assembled collagen-human mesenchymal stem cell microspheres for regenerative medicine[J]. Biomaterials, 2007,28(31):4652-4666.

(编辑:余汇洋)