局解手术学杂志 2008年第17卷第6期
J Regional Anat & Operative Surg, 2008, Vol. 17, No. 6

·论 著·

山羊骨髓间充质干细胞的分离培养及鉴定

侯天勇，罗 飞，许建中 （第三军医大学附属西南医院骨科，全军矫形外科中心，重庆 400038）

［摘 要］ **目的** 分离培养山羊的间充质干细胞，并为其在骨组织工程研究中的应用奠定基础。**方法** 应用常规的密度梯度离心法结合贴壁培养法从山羊骨髓中分离间充质干细胞，并通过观察分离培养细胞的形态，检测其表面的CD分子表达，以及RT-PCR和免疫组化病理染色方法证实成骨、成软骨、成脂肪多方向分化潜能来对细胞进行鉴定。**结果** 分离的细胞具有成纤维细胞样形态，第三代细胞的表面分子CD29和CD44阳性率为98.70%、99.54%，而CD62L和CD45阳性率为1.10%和0.73%。RT-PCR和免疫组化病理染色证实分离细胞具有成骨、成软骨、成脂肪多方向分化潜能。**结论** 成功地分离培养山羊的骨髓间充质干细胞，使山羊间充质干细胞应用于骨组织工程的研究成为可能。

［关键词］ 骨组织工程；山羊；骨髓间充质干细胞；鉴定
［中图分类号］ R687；Q813.11 ［文献标识码］ A ［文章编号］ 1672-5042(2008)06-0376-03

Isolation culture and characterization of bone marrow mesenchymal stem cell from goat

HOU Tian-yong, LUO Fei, XU Jian-zhong (Department of Orthopedics, Orthopedics Center of PLA, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To isolate and culture goat mesenchymal stem cells (MSCs) from bone marrow, and explore their application in bone tissue engineering. **Methods** Cells were isolated from goat bone marrow by conventional methods. The identification of cell was made by cell morphous, expression of cell epitope profile, and multilineage differentiation of osteogenesis, chondrogenesis, and adipogenesis assayed RT-PCR and immunohistology staining. **Results** The cells were fibroblast-like, whose positive rate of CD29 and CD44 were 98.70% and 99.54%, and the percentage of CD62L and CD45 were 1.10% and 0.73%. The results of RT-PCR and immunohistology staining showed multilineage differentiation potential of cell. **Conclusion** MSCs were successfully isolated from goat bone marrow and it is possible that they will be used in the research field of bone tissue engineering.

Keywords: bone tissue engineering; goat; bone marrow mesenchymal stem cells; identification

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是多潜能干细胞，具有向骨、软骨、脂肪等组织分化的能力[1]。目前研究发现其来源广泛，存在于骨髓组织、脂肪组织和脐血中等[2-4]。来源于骨髓组织中的MSCs具有增殖快、诱导成骨能力较强特点，因而成为目前骨组织工程中重要的种子细胞来源，其与支架材料复合后移植体内能明显改善骨缺损的修复[5]。本实验对来源于山羊骨髓组织的MSCs进行分离、纯化和鉴定，为将其应用于组织工程骨相关实验研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 MSCs的纯化与培养

抽取体重为25 kg雄性山羊(由第三军医大学动物中心提供)髂骨骨髓10 mL，等量稀释后加入到含有等体积的密度为1.07 g/mL的Percoll(Amresco)分离液的离心管中，以3 000 r/min离心20 min，吸取中间乳白色云雾状有核细胞层，漂洗后加入DMEM/F-12培养基(Hyclone)和体积比10%的胎牛血清(Hyclone)，制成单细胞悬液，以$2\times10^6/cm^2$的细胞密度接种培养瓶，3 d后首次全量换液，弃去大量悬浮细胞，以后根据培养基的颜色，每2~3 d换液。待细胞长满单层后，用含有0.25%胰酶的EDTA溶液(0.01%，w/v)消化传代。

1.2 表面分子鉴定

取传3代后的贴壁细胞，PBS溶液洗3次，用含有0.25%胰酶的EDTA溶液(0.01%，w/v)消化制成单细胞悬液，计数后制备流式细胞仪上机样品。其中一抗为CD29、CD60L和CD45(均购自VMRD，小鼠单克隆抗体，1 mg/mL)，CD44(购自Abcam，大鼠单克隆抗体，1 mg/mL)；二抗为FITC(购自Southern-Biotech，兔抗大鼠，1 mg/mL)和PE(购自生物晶美，羊抗小鼠)。

［基金项目］ 国家高新技术研究发展计划(863)重大专项资助项目(2006AA02A122)；重庆市重点科技攻关资助项目(2006AB5008)；军队十一五医药卫生科研基金攻关资助项目

［作者简介］ 侯天勇(1979-)，男，辽宁省大连市人，医学博士，主要从事骨组织工程方向的研究。电话：(023)60683680
［通讯作者］ 许建中，电话：(023)68754164，E-mail：spine@mail.tmmu.com.cn

［收稿日期］ 2008-07-18 ［修回日期］ 2008-08-24

同上方法取第一代至第三代的MSCs进行CD29和CD44双染。

1.3 体外分化

1.3.1 成骨分化 取传3代后的MSCs接种后,用成骨诱导培养基(DMEM/F-12培养基中加入0.1 μmol/L地塞米松、10 mmol/L的β-磷酸甘油和0.05 mmol/L的维生素C,均购自Sigma)替换普通培养基,每周换液2次[6]。

1.3.2 成软骨分化 取传3代后的MSCs,1 000 r/min离心5 min在离心管底形成细胞团,将其移入培养瓶,轻轻加入含有0.2 mmol/L维生素C和1 ng/mL重组人的TGFβ1(北京博奥森)的DMEM/F-12培养基继续培养,每周换液2次[7]。

1.3.3 成脂分化 取传3代后的MSCs,在DMEM/F-12培养基中加入1%胎牛血清、0.1 μmol/L地塞米松和1 nmol/L胰岛素(购自Sigma),每周换液2次[7]。

1.4 RT-PCR

收集成骨、成软骨和成脂诱导21 d的细胞,以未经任何诱导的第三代MSCs作为对照,按照Qiagen RNeasy Mini Kit的使用说明书,将细胞裂解、抽提和纯化得到相应的RNA。通过分光光度计测得RNA浓度,按照Promega试剂盒说明,在制定20 μL的逆转录反应体系中加入1 μg的RNA和0.5 μg的随机引物,在M-MLV(RTaseH-)逆转录酶的作用下,25 ℃保温5 min,42 ℃保温60 min,70 ℃灭火15 min,得到cDNA。成骨方向分化表达的基因:转录因子核心结合因子1(core-binding factor alpha subunit 1,cbfa-1),Ⅰ型胶原(collagen type Ⅰ),碱性磷酸酶(ALP),骨桥蛋白(osteopontin,OPN),骨结合素(osteonectin,ON)。成软骨方向分化表达的基因:Ⅱ型胶原(collagen type Ⅱ)和X型胶原(collagen type X)。成脂方向分化表达的基因:过氧化物酶体增生物激活受体γ(peroxisome Proliferator- activated receptor γ,PPARγ)。根据天根Taq酶Mix kit设计25 μL的PCR反应体系加入1 μL的cDNA产物(RT-PCR引物序列见表1),反应过程如下:94 ℃ 3 min,1个循环;94 ℃ 30 s,退火温度30 s,72 ℃ 60 s,35个循环;72 ℃ 5 min,1个循环。取5 μL的PCR产物上样,2%的TAE琼脂糖凝胶电泳成像。

表1 RT-PCR引物序列

基因	正向序列	反向序列	产物(bp)	退火温度(℃)
Cbfa-1	CCACCCGGCCGAACTGGTCC	CCTCGTCCGCTCCGGCCCACA	238	59
Col Ⅰ	TCCAACGAGATCGAGATCC	AAGCCGAATTCCTGGTCT	195	54
ALP	ACGTGGCTAAGAATGTCATC	CTGGTAGGCGATGTCCTTA	475	54
OPN	TTCCAAGTAAGTCCAACGAAAG	GTGACCAGTTCATCAGATTCAT	180	54
ON	ATGAGGGCCTGGATCTTCTT	GCTTCTGCTTCTGAGTCAGA	580	54
Col Ⅱ	GTGGAGCAGCAAGAGCAAGGA	CTTGCCCCACTTACCAGTGTG	333	59
Col Ⅱ A/B	GTGAGCCATGATTCGCCTCGG	CACCAGGTTCACCAGGATTGCC	…	61
Col X	CCCTTTTGCTGCTAGTATCC	CTGTTGTCCAGGTTTTCCTGGCAC	466	55
PPARγ	GGAAAGACAACAGACAAATCAC	TGCATTGAACTTCACAGCAAAC	414	54
GAPDH	CAAATTCCATGGCACCGTCA	GGAGTGGGTGTCGCCTGTTGA	715	55

1.5 免疫组织化学与病理染色

取传3代后的MSCs接种于灭菌的盖玻片上,分别按照上述成骨、成软骨和成脂诱导21 d。收集盖玻片,PBS溶液清洗后,4%多聚甲醛溶液固定30 min,按照晶美免疫组化试剂盒(抗小鼠和兔,Histostain-Plus Kit)说明和免疫组织化学常规染色方法操作。用于成骨表达的一抗:Ⅰ型胶原(collagen type I,COL I)和骨钙素(osteocalcin,OC),均购自Abcam,小鼠抗羊单克隆抗体。用于成软骨表达的一抗:Ⅱ型胶原(collagen type Ⅱ),购自Santa Cruz,兔抗多克隆抗体。用于成骨诱导检测的钙结节染色为茜素红和von Kossa;成脂诱导检测的为油红O染色。

2 结果

2.1 MSCs及诱导后细胞的形态

原代培养的MSCs形态表现为条索状或是具有明显折光性的圆形,少数呈多角状,个别不规则,胞核明显,可见1~2个核仁。7 d后,细胞增殖变密集,条索状细胞增多。14 d时细胞已可长满培养瓶底,细胞呈条索状排列生长。第二代细胞形态比较规则,大多数呈条索状。第三代细胞可呈漩涡状生长。

成骨诱导后7 d可见细胞开始变得扁平,呈多角形,10 d已可见大量细胞聚集形成大小不等的结节,21 d可见大量钙化的结节和结晶体。成软骨诱导3 d即可见细胞分泌大量的细胞外基质,7 d可见分泌的基质将细胞包裹形成白色的细胞团,21 d时细胞团变得更紧密。成脂诱导7 d可见胞浆内脂滴出现,以后脂滴逐渐增多变大,细胞核被增大的脂滴挤至胞浆的一侧,21 d可见大量充满脂滴的细胞出现在视野中。

2.2 MSCs表面分子的表达

第三代MSCs的表面分子CD29阳性率为98.70%,CD44阳性率为99.54%,而CD62L阳性率仅为1.10%,CD45则为0.73%。第一代至第三代MSCs的CD29和CD44双染后CD29阳性率依次为67.94%、81.71%和98.30%;而CD44阳性率依次为99.36%、99.67%和99.51%。

2.3 MSCs成骨、成软骨和成脂诱导后相关基因的表达

MSCs经过成骨诱导21 d后,cbfa-1、Ⅰ型胶原、ALP和骨桥蛋白基因表达,而骨结合素基因未表达。经过成软骨诱导21 d后,Ⅱ型胶原、Ⅱ A/B型胶原和X型胶原基因表达。经过成脂诱导21 d后,PPARγ基因表达。

2.4 MSCs成骨、成软骨和成脂诱导后免疫组化和病理染色检测

MSCs经过成骨诱导21 d后，Ⅰ型胶原组化染色可见细胞浆里充满棕黄色的颗粒，胞核着蓝色；骨钙素染色也可见大量阳性棕黄色颗粒。MSCs成软骨诱导21 d后，Ⅱ型胶原染色可见胞浆和细胞外基质着棕黄色。茜素红和von Kossa染色可见经过成骨诱导21 d后的细胞分泌的细胞外基质着色；油红O染色可见成脂诱导21 d的细胞胞浆里的油滴呈桔红色，胞核呈蓝色。

3 讨论

骨髓MSCs主要来源于骨髓网状间质，在骨髓中含量很低，估计约0.001%～0.01%[1]，因此，从骨髓中分离、培养达到一定数量满足实验和临床需求就显得尤为重要。利用密度剃度离心的方法获得骨髓中单个核细胞，进而再利用贴壁特性纯化细胞，提高了MSCs的克隆性。本实验证实，利用此种方法获得的山羊的MSCs具有良好的克隆形成能力，原代培养5 d即可形成明显的克隆，14 d即可长满单层传代。体外传12代，细胞增殖能力仍较强，形态良好，仍具备多潜能分化能力。

MSCs的鉴定目前尚缺乏严格、统一的标准，根据细胞治疗国际社会推荐的标准（International Society for Cellular Therapy，ISCT）[8]，人的MSCs的鉴定标准如下：①细胞表现成纤维细胞样形态，可以贴壁生长；②具有特异的表面分子表达；③具有向骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞分化的多潜能。该标准同时提出标准①和③在各种动物间都符合，但是标准②在各动物间可能存在差异。本研究分离纯化得到的MSCs具有贴壁生长的特性，形态类似成纤维细胞；第三代MSCs表面分子CD29和CD44阳性（比例大于95%），而CD45和CD62L阴性（比例小于2%）；通过成骨、成软骨和成脂肪诱导培养基诱导21 d后，通过Ⅰ型胶原和骨钙素免疫组化染色以及茜素红和von Kossa病理染色证实分化为成骨细胞，通过Ⅱ型胶原免疫组化染色证实分化为软骨细胞，通过油红O染色证实分化为脂肪细胞。进一步，我们还通过检测相应的成骨、成软骨和成脂肪基因的表达来证实MSCs的分化情况。因此，根据目前比较广泛的可被大多数研究者接受的鉴定标准，我们从山羊骨髓中获取的这些细胞即是MSCs，其具有MSCs的基本特性。

骨缺损修复一直是医学研究的重点和热点，迄今为止，临床上对于创伤、感染和肿瘤等造成的大范围的骨缺损的修复治疗仍旧缺乏理想的解决方案。伴随着组织工程概念的提出，在骨组织的缺损替代治疗方面，通过MSCs结合组织工程支架材料构建的组织工程骨表现出良好的应用前景。已有大量的研究显示[9-11]，通过应用MSCs和支架材料体外构建的复合物，可以显著增强移植物在节段性骨缺损处形成骨组织，有利于缺损的修复。这些为我们希望通过MSCs作为种子细胞构建抗感染的组织工程骨，修复由于感染造成的骨缺损奠定基础，也将成为我们应用MSCs修复骨缺损的理论依据。

[参考文献]

[1] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411): 143-147.

[2] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. Nature, 2002, 418(6893):41-49.

[3] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells[J]. Mol Biol Cell, 2002, 13(12): 4279-4295.

[4] Lee OK, Kuo TK, Chen WM, et al. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood[J]. Blood, 2004, 103(5): 1669-1675.

[5] Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, et al. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects[J]. J Bone Joint Surg, 1998, 80(7): 985-996.

[6] Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation[J]. J Cell Biochem, 1997, 64(2): 278-294.

[7] Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors *from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical* model[J]. J Cell Sci, 2000, 113(Pt 7): 1161-1166.

[8] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement[J]. Cytotherapy, 2006, 8(4):315-317.

[9] Viateau V, Guillemin G, Bousson V, et al. Long-bone critical-size defects treated with tissue-engineered grafts: a study on sheep[J]. J Orthop Res, 2007, 25(6): 741-749.

[10] Hou R, Chen F, Yang Y, et al. Comparative study between coral-mesenchymal stem cells-rhBMP-2 composite and auto-bone-graft in rabbit critical-sized cranial defect model[J]. J Biomed Mater Res A, 2007, 80(1):85-93.

[11] Bensaid W, Oudina K, Viateau V, et al. De novo reconstruction of functional bone by tissue engineering in the metatarsal sheep model[J]. Tissue Eng, 2005, 11(5-6):814-824.

（编辑：雷 艳）