维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2008)06-0665-04

胎儿骨髓间充质干细胞生物学特征及荧光标记

田 静[1],王 蓓[1],张建华[2],姜 蓉[1],汪维伟[1]

(1. 重庆医科大学基础医学院组织胚胎学教研室,2. 重庆医科大学附属第一医院妇产科;重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨分离、培养、扩增和荧光标记胎儿骨髓间充质干细胞(Bore mesenchymal stem cell,BMSCs)的方法及其生物学特征。方法:取 4~5 个月胎儿四肢骨骨髓,Ficoll 离心、贴壁筛选法分离 BMSCs,体外扩增,传至第 12 代。检测 BMSCs 的生长曲线,细胞周期和细胞表型,酶活性及糖原含量,以及 DAPI 标记 BMSCs 的标记率。结果:(1)BMSCs 主要呈长梭形,漩涡状排列。传代细胞生长快于原代细胞,12 代后的细胞出现衰老征象;(2)流式细胞术检测第 3、8 代细胞表达 CD29、CD71,不表达 CD34、HLA-DR;G_0 和 G_1 期细胞约为 93.73%,S、M 和 G_2 期为 6.27%;(3)第 5 代细胞的非特异性酯酶及糖原均为阳性,碱性磷酸酶为弱阳性;(4)DAPI 标记后的 BMSCs 生长正常,标记率为 100%,后逐渐减弱,3 周时标记率仅 15%。结论:分离获得的胎儿 BMSCs 具有 MSCs 的特征。DAPI 标记是短期示踪 BMSCs 的有效方法。

【关键词】胎儿;骨髓间充质干细胞;分离培养;DAPI

【中国图书分类法分类号】Q254 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-09-28

The biological character and fluorescent labeling of the fetal bone mesenchymal stem cells

TIAN Jing, et al

(*Department of Histology and Embryology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the isolation, culture, proliferation and fluor-labelling of the fetal bone mesenchymal stem cell (BMSCs), and their biological character. *Methods*: Limb bone marrow samples from fetus aged 4 to 5 months were obtained, BMSCs were isolated by Ficoll centrifugalization and adherence screening method, and then cultured, proliferated to the 12th generation in vitro. The growth curve, cell cycle, phenotype, enzymatic activity, glycogen and the DAPI fluor-labelling of BMSCs were observed. *Results*: (1)Major BMSCs were fusiform, arranged as whirlpool. After the 12th generation, BMSCs presented the signs of senility. The subcultured cells proliferated faster than primary cells. (2)The 3rd and 8th generation of BMSCs expressed CD29, D71, but not CD34, HLA-DR; the G_0, G_1 period cells were 93.73%, and the S, M, G_2 period cells were 6.27%. (3)The 5th generation cells were positive of nonspecific esterase and glycogen, but weak positive of alkaline phosphatase. (4)DAPI labeled BMSCs grew normaly, and the marking rate of BMSCs was 100%, but decreased gradually, and only 15% cells were labbelled for the 3th week. *Conclusion*: The acquired fetal BMSCs have the character of MSCs. The DAPI labeling is a modus operandi for the short period tracing BMSCs.

【Key words】 Foetus; Bone mesenchymal stem cell; Isolated culture; DAPI

间充质干细胞是目前倍受关注的干细胞之一,被广泛用作组织工程的种子细胞和多种疾病的细胞移植治疗[1,2]。骨髓中的 MSCs 含量极少,只占单个核细胞的 0.001%~0.01%,鉴于骨髓细胞组成的不均一性以及 BMSCs 的低丰度,分离纯化并大量扩增 BMSCs 成为重要的实验步骤。本实验拟研究 BMSCs 的生长曲线、细胞酶化学特性、细胞表型和周期,以及 DAPI 标记,建立分离、培养、扩增、鉴定、标记 BMSCs 的实验方法,为进一步研究 BMSCs 奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验标本及材料

6 例 4~5 个月水囊引产胎儿(重庆医科大学临床学院产

作者介绍:田 静(1978-),女,硕士,研究方向:干细胞分化。

通讯作者:汪维伟,女,教授,E-mail:wwwpzn@163.com。

维普资讯 http://www.cqvip.com

科提供),经伦理委员会讨论通过。DMEM-F12 培养基、D-Hanks 液(Hyclone 公司);胎牛血清(杭州四季青公司);小鼠抗人 CD29-FITC、CD34-PE、CD71-FITC、HLA-DR-PE、IG1-FITC、IG2a-PE 单抗(天津协和干细胞有限公司),4,6- 乙酰基 -2- 苯基吲哚(DAPI)(Sigma 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 BMSCs 的分离、纯化与扩增 无菌取 4~5 个月引产胎儿的四肢骨骨髓细胞,加入 Ficoll 离心,收集单个核细胞。DMEM-F12 洗涤,调细胞浓度到 5.0×10^5 个 /ml,接种于培养瓶中,加入含 10%FBS 的 DMEM-F12(含青霉素钠 100U/ml,链霉素 100U/ml)培养液(后同),置 37℃,5% 的 CO_2 孵箱培养;3d 后换液,去非贴壁细胞,以后每 3d 换液。细胞传代培养至第 12 代(P12)。

1.2.2 生长曲线测定 取 P3、P8 细胞各 5 例,每孔 5.0×10^3 个 /ml 接种于 96 孔培养板,培养同前。于第 2~7d,每日取 3 孔加入 MTT 溶液(5mg/ml)20μl,继续孵育 4h 后弃上清液,每孔加入 150μl 二甲基亚砜,振荡 10min,酶联免疫检测仪,490nm 波长测定各孔吸光度值,以平均值绘制生长曲线。

1.2.3 组化染色 取 P5 制作细胞爬片,用乙酸 - α - 萘酯 - 固蓝 B 盐法、钙钴法、过碘酸雪夫反应[3]分别显示细胞的非特异性酯酶、碱性磷酸酶活性及糖原含量,计数 200 个细胞中的阳性细胞数。

1.2.4 BMSCs 的表面标志检测 取 P3、P8 细胞各 5 例,制成 5×10^5 个 /ml 细胞悬液。每例 3 管,分别加入荧光标记的小鼠抗人单克隆抗体:CD29-FITC/CD34-PE、CD71-FITC /HLA-DR-PE、同型阴性对照小鼠抗人 IG1-FITC/IG2a-PE 各 20μl。每管各加入细胞悬液 100μl;室温下反应 20min,加入 1.5ml PBS,混匀后 1 800r/min 离心 5min,弃上清液;加入 500μlPBS,流式细胞仪检测,Cell-Quest 软件分析。

1.2.5 细胞周期分析 取 2.0×10^5 个 P8 细胞,70% 冰乙酸固定 18h,PBS 洗涤 2 次,加入 200μl 牛胰核糖核酸酶(1mg/ml),37℃水浴孵育 30min;加入碘化丙啶染色液(50μg/ml)避光反应 30min,流式细胞仪检测,Multicycle 软件分析。

1.2.6 DAPI 标记 BMSCs 取 5×10^6 个 /ml 的 P5 细胞,培养融合达 80%~90%时,加入终浓度分别为 50μg/ml、40μg/ml、25μg/m、5μg/ml 的 DAPI,孵育 2h;D-Hanks 洗去未结合的 DAPI,加入完全培养基培养,避光换液。分别于标记后的 2h,1、2、3 周在荧光镜下计数 DAPI 阳性细胞,标记率 =DAPI 阳性细胞数 / 细胞总数。

1.2.7 统计学处理 用 SPSS12.0 统计软件进行均数 t 检验或 u 检验。数据以均数 ± 标准差($x\pm s$)表示,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 BMSCs 的分离、培养及扩增

原代培养细胞呈圆形,约 4h 开始贴壁;24h 多呈短梭形;24~72h 出现散在细胞集落,细胞呈长梭形、三角形及多角形等(图 1)。3~12d 细胞数量迅速增多,呈旋涡状生长(图 2)。P3 后 BMSCs 变得较为同质,大小均匀。至 P12 后,部分细胞变得宽大扁平,胞内出现颗粒等衰老征象(图 3)。

2.2 BMSCs 的生长曲线

P8 细胞的增殖速度较 P3 稍慢,但差异无统计学意义,$P>0.05$。两代细胞具有共同生长特征:生长滞留期约为 24~48h,对数增殖期约为 3~6d,7~8d 后进入平台期(图 4)。

2.3 细胞化学染色结果

P5-BMSCs 的非特异性酯酶呈阳性率为 82% ± 3.8%,糖原阳性率为 86% ± 2.45%,碱性磷酸酶弱阳性,阳性率为 5% ± 0.76%(图 5~7)。

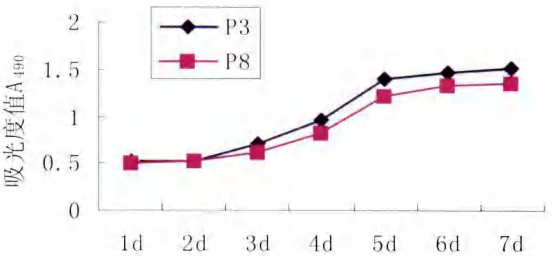


图 4 P3 与 P8 的 BMSCs 生长曲线



图 1 Bm-MSCs 原代培养 72h,×200



图 2 BMSCs 原代培养 10d,呈旋涡状生长,×400



图 3 P12-BMSCs,细胞出现衰老,×200

维普资讯 http://www.cqvip.com

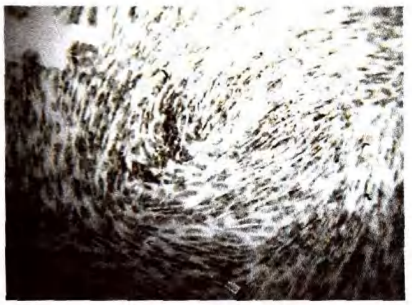


图 5 P5-BMSCs，ANAE 阳性，×100

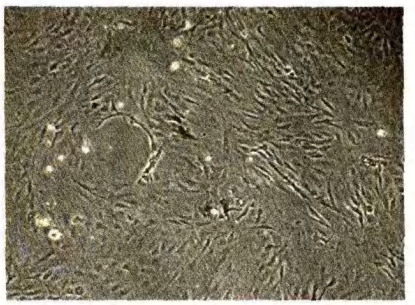


图 6 P5-BMSCs，碱性磷酸酶弱阳性，×100



图 7 P5-BMSCs，PAS 反应阳性，×200

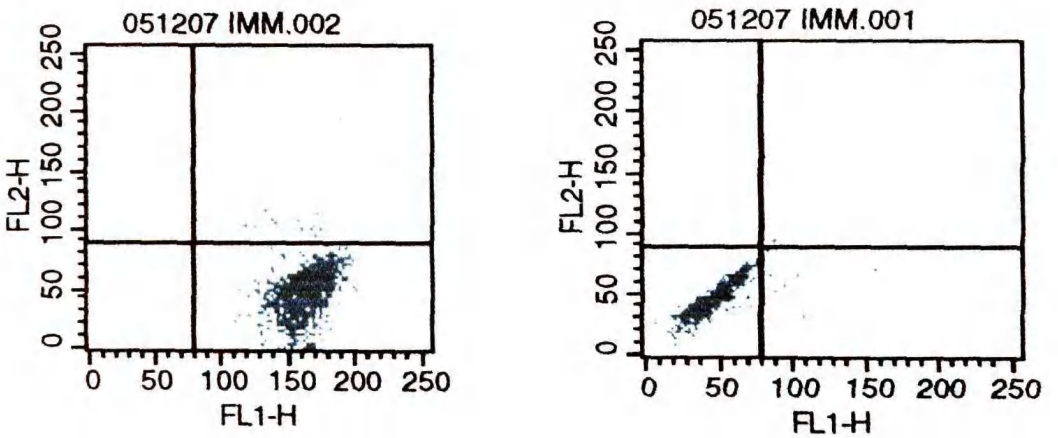


图 8 P8 -BMSCs 表达 CD29 及 CD71，不表达 CD34 及 HLA-DR

2.4 流式细胞术检测结果

P3、P8-BMSCs 均表达 CD29 及 CD71，不表达 CD34 及 HLA-DR(表 1 和图 8)。CD29 与 CD71 的表达率分别为 99.26% ± 0.32%及 98.68% ± 0.49%，其荧光强度的差异无统计学意义，$P>0.05$。P8 的细胞周期分析，G_0+G_1 期细胞为 93.73%，$S+G_2+M$ 期为 6.27%。

表 1 P3、P8 MSCs 表达表面抗原的荧光强度($\bar{x} \pm s$)

BMSCs	CD29	CD71	CD34	HLA-DR
P3	149.31 ± 3.5	74.95 ± 2.8	0	0
P8	140.20 ± 3.3	68.20 ± 2.5	0	0

2.5 DAPI 标记 BMSCs 的结果

荧光显微镜下，DAPI 标记的细胞核发明亮蓝色荧光，标记率达 100%；随时间延长，荧光亮度和标记率均逐渐降低；以 40 μg/ml DAPI 标记细胞生长最好。统计显示：40 μg/ml 组的阳性率高于 25、5 μg/ml 组，$P<0.01$，与 50 μg/ml 组间的差异无统计学意义；各组标记浓度与时间的标记率间有明显的交互作用，即随时间增加 4 种浓度的荧光标记率均递减(表 2 和图 9、10)。

表 2 不同浓度 DAPI 标记 BMSCs 的标记率 (n=9)

分组	浓度(μg/ml)	2h 标记率(%)	1 周标记率(%)	2 周标记率(%)	3 周标记率(%)
1	50	100	88.01 ± 2.40	51.31 ± 2.81	15.67 ± 1.72
2	40	100	80.48 ± 2.27	48.79 ± 2.07	14.76 ± 1.19
3	25	100	45.62 ± 10.13*	14.01 ± 1.49*	5.65 ± 0.42*
4	5	100	21.83 ± 2.71*	6.73 ± 1.84*	1.29 ± 0.98*

注：高浓度组标记率高于低浓度组，$P<0.05$

维普资讯 http://www.cqvip.com

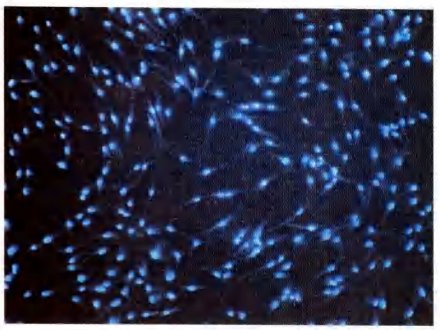


图 9 DAPI 标记 BMSCs 1d,×200



图 10 DAPI 标记 BMSCs 后 2 周,×200

3 讨 论

BMSCs 为贴壁生长细胞,常采用密度离心与贴壁筛选相结合的方法收集[4]。但因细胞来源和各实验室的条件和试剂的不同,所报道细胞的生长和表型常常不完全一致。BMSCs 主要为梭形,呈旋涡状生长,培养至 P10,细胞出现衰老征象[5,6],本研究收集胎儿骨髓细胞,体外培养 72h 后细胞贴壁较稳定。传代培养至 P3 后,细胞大小形态均一,具有 MSCs 的形态特征。P12 细胞才出现细胞形态变异等衰老征象。

传代后 BMSCs 增殖速度加快,贴壁时间提前,对数增殖期约为 3~6d、7~8d 后可达融合,细胞间接触抑制不明显,细胞可重叠生长。FCM 分析只有少数 P8 细胞处于活跃的增殖期(6.27%),大部分的细胞处于静息期(93.73%)。这表明本实验的 P8-BMSCs 符合干细胞增殖特点[5]。

BMSCs 的表型无特异性,一般认为不表达血细胞及内皮细胞的表面抗原以及 HLA Ⅱ 类抗原[7,8]。CD29、CD71 等为骨髓基质细胞的特异性表面标志;CD34 是造血干 / 祖细胞及内皮细胞阳性表达的脂多糖受体,HLA-DR 是单核细胞人类白细胞抗原 Ⅱ 类分子,抗原呈递细胞及激活的 T 细胞阳性表达。本实验收获的 BMSCs 表达 CD29 及 CD71,不表达 CD34 及 HLA-DR,符合 BMSCs 的特点。另外,P3、P8 细胞的 CD29 荧光强度均明显高于 CD71,可能提示 BMSCs 上 CD29 的位点多于 CD71。

为进一步了解 BMSCs 的生物学性状,我们取 P5 细胞做细胞化学检测,见其非特异性酯酶及糖原反应为阳性,而碱性磷酸酶反应为弱阳性,与 Guo 等[9]的研究结果一致。碱性磷酸酶是成骨细胞的标志酶,其弱阳性可能反应出 BMSCs 在体外培养过程中有少数细胞向成骨方向分化。

标记干细胞的方法有多种,如 Y 染色体标记法以及基因标记法等[10,11],能长期标记细胞,但也存在一定问题,如报告基因在目的细胞中高效稳定表达的实验周期长、成功率低等。DAPI 是一种可与 DNA 特异性结合的荧光染料,在紫外光的激发下呈蓝色荧光,无明显细胞毒性,但其衰减较快。本实验用 DAPI 标记 BMSCs,以 40μg/ml DAPI 标记 2h 效果最好,标记率达 100%,3 周以后多数细胞失去荧光。尽管在激发光长时间照射下,荧光会淬灭,但实验中始终避光操作,最大限度减少荧光漂白对实验结果的影响,DAPI 还是较好的短期细胞标记物。

参 考 文 献

[1] Barbash IM,Chouraqui P,Baron J,et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium:feasibility,cell migration,and body distribution[J]. Circulation,2003;108(7):863-868.

[2] Mahmood A,Lu D,Lu M,et al. Treatment of traumatic brain injury in adult rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells[J]. Neurosurgery,2003;53(3):697-702.

[3] 蔡文琴,主编.现代实用细胞与分子生物学实验技术[M]. 第 1 版.北京:人民军医出版社,2003.78-81.

[4] Quirici N,Soligo D,Bossoolaso P,et al. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies[J]. Exp Hematol,2002;30(7):783-791.

[5] Justesen J,Stenderup K,Eriksen EF,et al. Maintenance of osteoblastic and adipocytic differentiation potential with age and osteoporosis in human marrow stromal cell cultures[J]. Calcif-Tissue-Int, 2002;71(1):36-44.

[6] Javazon EH,Beggs KJ,Flake AW. Mesenchymal stem cells:paradoxes of passaging[J]. Exp Hematol,2004;32(5):414-425.

[7] Sordi V,Malosio ML,Marchesi F,et al. Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic

(下转第 672 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

重要的分子伴侣参与细胞内各种新生蛋白分子的组装、折叠、转运，维护了活性蛋白分子的结构和功能完整。另一方面，HSP70 也积极参与机体免疫，参与识别与排斥肿瘤细胞的反应。单纯的 HSP70 是不能起到增强肿瘤免疫原性的作用的，我们从小鼠肝癌细胞 H_{22} 中提取所得的 Exosomes 中检测出的 HSP70 是结合了抗原性多肽的 HSP，是 HSP- 肽复合物(Heat shock protein peptide complex，HSP-PC)[5]，它与一般外源性抗原不同，可诱导机体产生对其来源细胞具有杀伤活性的 CD_8^+CTL，与机体的抗肿瘤免疫有着密切关系。它不仅参加肿瘤抗原的加工呈递，而且可作为抗原递呈分子直接将肿瘤抗原呈递给 T 细胞，激发 T 细胞介导的特异性肿瘤细胞免疫。可观察到经过热休克处理后 HS-Exo 高表达 HSP70 分子，说明 HS-Exo 可能诱发机体产生更强烈的抗肿瘤免疫反应。(2)H_{22} 细胞经热休克后分泌的 Exosomes 高表达了 HSC70，研究证明肿瘤来源的 HSC70 可诱导机体产生强大的 CTL 反应并能部分消除肿瘤[6]。其次，其携带的多肽可以有效的转移给抗原呈递细胞(APC)，以便于 MHC-Ⅰ和 MHC-Ⅱ类抗原的呈递[7]。Exosomes 可以通过 Exosome-APC 和 Exosome-T 相互作用的方式促进抗原的递呈和 T 细胞的活化。甚至在缺乏任何多肽抗原刺激的情况下，HSC70 也能刺激巨噬细胞诱导的 T 细胞活化[8]。(3)HSP60 是吞噬细胞所共有的一个特性，并且结合吞噬细胞表面的 HSP60 受体，迅速引起吞噬细胞的胞饮作用。APC 如树突状细胞(DC)和吞噬细胞可有效的吞噬凋亡细胞，识别抗原并将抗原提呈给MHC-Ⅰ类分子，但是在生理状态下，由于缺乏危险信号分子的协助，这并不激活免疫系统的反应。表达于凋亡肿瘤细胞表面的 HSP60 可向 DC 和吞噬细胞提供必要的危险信号，从而使 DC 和吞噬细胞分泌致炎细胞因子，促进 DC 的成熟，并最终引起 T 细胞抗肿瘤免疫[9]。HS-Exo 中高表达的 HSP60 在肿瘤免疫过程中是诱发机体 T 细胞抗瘤免疫的必要信号分子，在它的作用下无免疫原性的肿瘤凋亡细胞获得了免疫原性。(4)ICAM-1 为免疫球蛋白家族的一种粘附分子，使细胞与细胞或基质间发生粘附，参与细胞的识别、细胞的活化和信号转导。ICAM-1 与其配体的结合具有重要的免疫学功能：首先它介导了 T细胞和 NK 细胞对靶细胞的杀伤作用；其次，它还是 T 细胞激活的共刺激信号之一[2]。

由于携带有丰富免疫分子如 HSP70、HSC70、HSP60、ICAM-1 的热休克肿瘤细胞来源的 Exosomes 为非细胞性结构，且未经基因修饰和外源基因导入，不含遗传物质，因此对机体潜在危害作用小，且制备简单易行，为研制有临床应用前景的新型生物制剂和肿瘤疫苗提供了新途径。

参 考 文 献

[1] Vidal M，Mangeat P，Hoekstra D.Aggregation reroutes molecules from a recycling to a vesicle-mediated secretion pathway during reticulocyte maturation[J]. Cell Sci，1997；110(Pt16)：1867-1877.

[2] 李 静，沈 宜，汤为学.小鼠肝癌细胞(H_{22})源 Exosomes 的制备及其免疫相关蛋白的初步研究[J]. 中华肝脏病杂志，2007；15(6)：421-423.

[3] Timmerman JM，Levy R.Dendritic cell vaccine for cancer immunotherapy[J]. Annu Rev Med，1999；50(2)：507-529.

[4] Chaput N，Schartz NE，Andre F，et al. Exosomes for immunotherapy of cancer[J]. Adv Exp Med Biol，2003；532：215-221.

[5] 郑金平，祝寿芬.热休克蛋白与抗肿瘤免疫及其应用[J]. 山西医科大学学报，2003；34(4)：354-358.

[6] Blott EJ，Griffiths GM.Secretory Lysosomes[J].Nature Rev.Mol.Cell Biol，2002；3：122-131.

[7] Savina A，Furlan M，Vidal M，et al.Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells[J]. J Biol Chem，2003；278(22)：20083-20090.

[8] Pelham HR.SNARES and the specificity of membrane fusion[J]. Trands Cell Biol，2001；11：99-101.

[9] 张 明，刘立思.热休克蛋白 60 与肿瘤关系的研究进展[J] .国外医学分子生物学分册，2003；25(2)：105-108.

(责任编辑：冉明会)

(上接第 668 页)

islets[J]. Blood，2005；106(2)：419-427.

[8] Le Blanc K，Ringden O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation [J]. Biol Blood Marrow Transplant，2005；11(5)：321-334.

[9] Guo Z，Yang J，Liu X，et al. Biological features of mesenchymal stem cells from human bone marrow[J]. Chin Med J(Engl)，2001；114(9)：950-953.

[10] Yao M，Dieterle T，Hale SL，et al. Long-term outcome of fetal cell transplantation on postinfarction ventricular remodeling and function[J]. J Mol Cel Cardiol，2003；35(6)：661-670.

[11] Idilman R，Kuzu I，Erden E，et al. Evaluation of the effect of transplant-related factors and tissue injury on donor-derived hepatocyte and gastrointestinal epithelial cell repopulation following hematopoietic cell transplantation[J]. Bone Marrow Transplant，2006；37(2)：199-206.

(责任编辑：谭乐勤)