维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)09-0926-04

体外培养大鼠骨髓基质细胞生物学特性研究

杨 琴[1],曾志磊[1],谢 鹏[1],杨 军[1],吕发金[2]

(1. 重庆医科大学附属第一医院神经内科;2. 重庆医科大学附属第一医院影像科,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察体外培养大鼠骨髓基质细胞生物学特性,为诱导骨髓基质细胞分化形成神经元及分化机制和移植治疗脑缺血大鼠的研究奠定基础。方法:取 4 周龄 Wistar 大鼠,全骨髓法体外培养骨髓基质细胞,利用倒置相差显微镜观察原代及不同传代细胞生长形态特点,并应用间接免疫荧光法鉴定原代及不同传代细胞表型。结果:培养的骨髓基质细胞第 3 代,细胞增殖能力已趋于稳定,骨髓基质细胞表面标志 CD54、CD44 阳性的细胞已占到 95.18%、94.36%。造血干细胞表面标志 CD14 阳性的细胞已从原代的 23.19%降低到 2.37%。结论:传 3 代的细胞已适合于细胞诱导分化,可作为理想细胞移植治疗的细胞来源。

【关键词】Wistar 大鼠;骨髓基质细胞;细胞培养

【中国图书分类法分类号】R331.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-01-30

Study of biological properties of bone marrow stromal cells in vitro in wistar rats

YANG Qin, et al

(*Department of Neurology, the First Hospital Affiliated, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe the biological properties of bone marrow stromal cells (MSCs) in vitro in Wistar rats for inducing MSCs to differentiate into neurons and transplantating MSCs to treat cerebral ischemic stroke. *Methods*: The Wistar rats for 4 weeks old were sacrified, the bone marrow separated and the MSCs cultured, and the biological properties of the cells observed by phasecontrast microscope. Cell surface markers were evaluated by indirect immunofluorescence cycochemistry staining in primary and different generation cells. *Results*: 95.18% and 94.36% of the third generation cells showed positivity to CD54 and CD44 (MSCs surface marker). The percentage of hematopoietic lineage marker CD14 decreased obviously from 23.19% in primal culture of the cells to 2.37% in the third generation. *Conclusion*: The third generation cells can be used as the seed-cells for study of cells induce and differentiation and the resoure of cells transplantation.

【Key words】 Wistar rats; Bone marrow stromal cells; Cell culture

骨髓基质细胞 (Marrow stromal cells, MSCs)又称骨髓间充质干细胞 (Mesenchymal stem cells, MSCs),是成体干细胞之一,具有多项分化潜能,能向骨、软骨、肌肉、神经等中胚层或外胚层组织细胞分化[1-4],是组织工程中重要的种子细胞之一,并且还具有取材方便,扩增迅速,可自体移植等特点。因此,具有广泛的应用前景。本实验采用全骨髓贴壁法体外分离培养大鼠骨髓基质细胞,并对其生物学特性进行了研究,现将结果报告如下。

作者介绍:杨 琴(1970-),女,博士生,副教授,主要研究方向:脑血管疾病和干细胞移植。

基金项目:重庆市卫生局科学基金(04-2-143),重庆市自然科学基金(CSTC,2005BB5315)。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康 4 周龄 Wistar 大鼠,雌雄不限,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂

DMEM/ F12 培养基购自 Hycolne 公司;胎牛血清购自杭州四季清公司,0.25%胰蛋白酶—0.04%EDTA 购自 Hycolne 公司,MTT 购自 sigma 公司,兔抗大鼠 CD54、CD44、CD14 一抗及羊抗小鼠二抗—FITC 购自武汉博士德公司,其余试剂均为国产分析纯。

1.3 大鼠 MSCs 的体外分离和原代培养

参考文献的方法[5]并有改动。将大鼠脱颈处死,浸入 75%酒精中 5min ,无菌条件下取出双侧股骨、胫骨、肱骨,剔除肌肉和脂肪组织,露出骨骺端,用5ml DMEM/F12 完全培养液

维普资讯 http://www.cqvip.com

（含 10%胎牛血清，1%青、链霉素）冲出骨髓，吸管充分吹打混匀，制成单细胞悬液，稀释后，调整接种密度为 2×10^6 /ml 接种 25cm² 塑料培养瓶内，置 37℃、5%CO_2 饱和湿度的 CO_2 细胞培养箱培养。24h 后弃去未贴壁细胞，更换培养液，以后每 3 天换液 1 次。贴壁细胞接近 80%～90%融合后，结束原代培养。

1.4 大鼠 MSCs 传代扩增培养

取出贴壁细胞接近 80%～90%融合的 25cm² 塑料培养瓶，用 0.25%胰蛋白酶 -0.04%EDTA 约 1ml 消化 5min，待细胞形态开始皱缩变圆，用等量完全培养液终止消化，反复轻轻吹打，移入离心管，1000r/min 离心 5min，弃上清，加入完全培养液，按 1:3 比例传代培养。

1.5 细胞形态观察

原代培养 4h 后，在倒置相差显微镜下每天观察细胞的形态变化。对原代及不同传代细胞选取视野拍照。

1.6 大鼠 MSCs 贴壁率曲线的观测

取生长良好的第 3 代细胞，血球计数板计数法计数，调整接种浓度为 1×10^5/ml，接种在 24 孔板内，每孔 1ml，每时间点 3 孔，然后放置于二氧化碳培养箱内培养，第 2、4、6、8、10、12、24h 各取出 3 孔，倒掉培养液和非贴壁细胞，用 0.25%胰蛋白酶 -0.04%EDTA 消化贴壁细胞并用计数板计数。计算不同时间点的细胞贴壁率，最后以贴壁率（%）为纵坐标，时间（h）为横坐标绘制细胞的贴壁率曲线。贴壁率又称接种存活率，其计算公式如下：贴壁率（%）= 贴壁细胞数 / 接种的细胞总数 ×100%。

1.7 MTT 法大鼠 MSCs 生长曲线绘制

取第 1、2、3、4 代细胞制备单细胞悬液，调整细胞浓度为 1.5×10^4 /ml，接种在 96 孔培养板，每孔 200μl，每 3 天换液 1 次。从第 2 天起每隔 24h 取 8 孔加入 MTT 溶液（5mg/ml）20μl，37℃孵育 4h，终止培养，小心吸取培养孔内上清液，每孔加入 150μl 二甲亚枫（DMSO），轻轻震荡 10min，使结晶充分溶解。选择 570nm 波长，在酶联免疫检测仪上测定各孔的光吸收值，以时间为横值，光吸收值为纵轴绘制 9 天的细胞生长曲线。

1.8 间接免疫荧光法鉴定细胞表型

原代，第 3 代的 MSCs 接种于预先置有盖玻片的 24 孔板，培养 3 天，PBS 缓冲液冲洗 3 次，4%多聚甲醛固定 30 min，PBS 缓冲液洗涤 3 次，0.3% Triton—X—100 破膜 30min，PBS 缓冲液洗涤 3 次，正常血清封闭 20 min，吸去血清，不洗，分别加入兔抗大鼠 CD54（1∶100），兔抗大鼠 CD44（1∶100），兔抗大鼠 CD14（1∶100）一抗，对照组用 PBS 液代替一抗，4℃过夜，PBS 缓冲液洗涤 3 次，加入羊抗小鼠二抗—FITC（1∶50）室温孵育 2h，50%甘油封片，激光共聚焦显微镜观察拍照，并且随机计数 5 个高倍视野下阳性细胞百分数，求均数。

2 结 果

2.1 形态学观察

大鼠全骨髓细胞悬液接种于塑料培养瓶后，4h 倒置显微镜观察，少数细胞贴壁，呈圆形、短梭形或三角形，核位于中央。12h 时短梭形或三角形贴壁细胞增多，更换培养液后，2~3 天出现长梭形贴壁细胞，圆形细胞减少，并可见细胞集落形成。初期的细胞集落由几个或几十个细胞组成；5~6 天圆形细胞进一步减少，而梭形细胞集落增多。集落中心细胞密度增大，外周细胞逐渐稀疏，呈放射状分布，细胞集落大小不等（见图 1）；1 周左右，细胞密度进一步增加，细胞接近 80%~90%融合时原代培养结束。原代培养消化后细胞数达（5~6）×10^5。刚传代的细胞呈圆形，散在均匀分布于瓶底，8h 后形态重新变为长梭形成纤维细胞样，生长潜伏期较短，为 1~2 天，2~4 天是细胞快速增殖期，5~6 天达到大部分融合。传至 3 代后，细胞形态很均匀，呈单层漩涡状排列的长梭形成纤维样细胞，细胞仍然保持良好的增殖能力（见图 2）。



图 1 原代第 7 天 MSCs（×200）

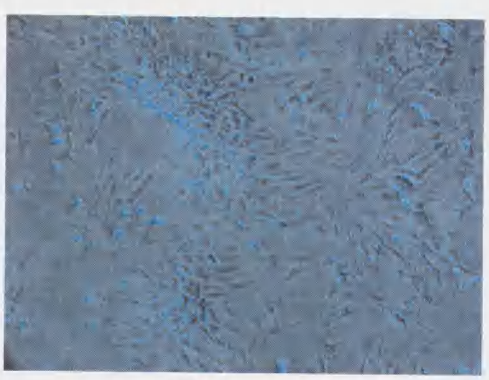


图 2 第 3 代 MSCs（×200）

2.2 细胞贴壁率和生长曲线

贴壁率曲线显示，传代细胞培养 2h 出现部分细胞贴壁，培养 8h 贴壁细胞超过 70%，培养 12h 贴壁

维普资讯 http://www.cqvip.com

率达最高，为 93%，其形态与原代细胞无明显区别，24h 细胞已开始增殖。

细胞生长曲线显示，第 1 代、第 2 代细胞生长不规则。第 3 代开始，细胞从传代后第 2 天，数量即开始增加，第 4~5 天增幅最大，至第 6 天细胞达峰值，以后略有下降，传代后对数生长期为 2~4 天，对数生长期结束后，第 7 天细胞生长缓慢，进入平台期。

2.3 间接免疫荧光法鉴定细胞表型

从原代至第 3 代各代细胞表达 CD54 依次为：73.38%、83.46%、91.23%、95.18%；表达 CD44 依次为 76.56%、85.37%、90.78%、94.36%；表达 CD14 依次为 23.19%、12.36%、6.78%、2.37%；这表明我们培养的 MSC 传到第 3 代后纯度已达到 90%以上(见图 3~8)。



图 3 CD14 原代(×200)

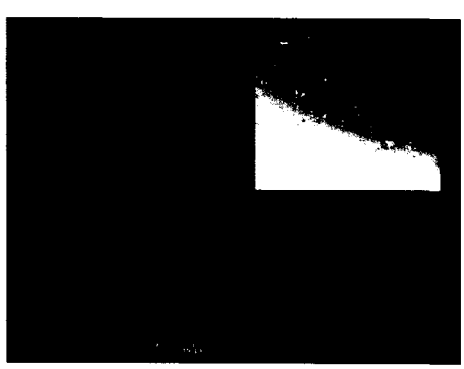


图 4 CD14 第 3 代 (×200)

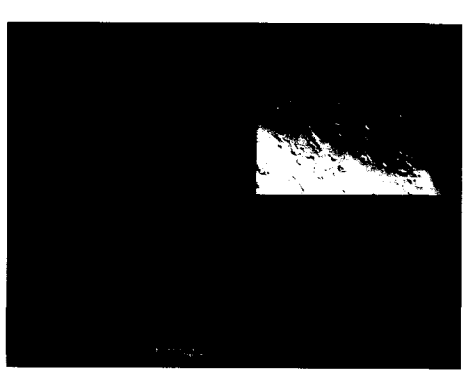


图 5 CD44 原代 (×200)

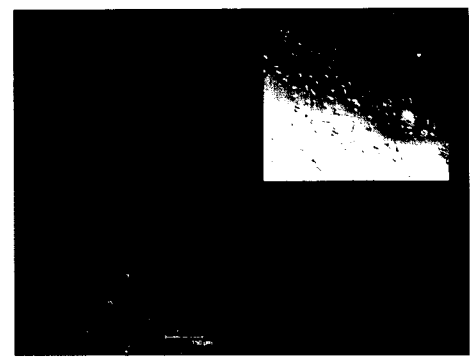


图 6 CD44 第 3 代 (×200)



图 7 CD5 原代 (×200)

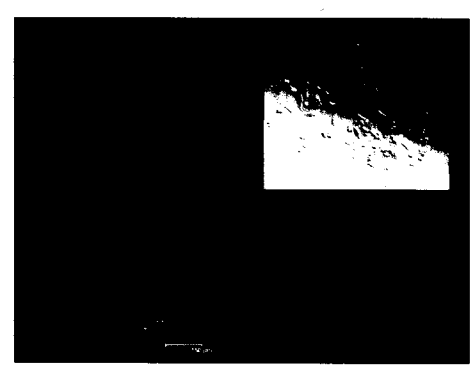


图 8 CD54 第 3 代 (×200)

3 讨 论

MSCs 是一种增殖能力较强的、存在于骨髓非造血组织中的多能干细胞。德国病理学家 Cohnheim 于 1867 年首次提出骨髓中存在 MSCs 的概念。1974 年，Friedenstein 在培养全骨髓时发现少量贴壁细胞，有成纤维细胞样的集落形成单位，并能传代和分化为纤维组织、骨、软骨，此即是 MSCs[6]。随后的研究发现 MSCs 能跨胚层，向内胚层及外胚层的组织、细胞分化[2-4]。并且在不同的组织中也发现 MSCs，按照不同组织来源分为骨髓 MSCs、脂肪源性 MSCs、脐血 MSCs 等，其中由于骨髓取材方便，

维普资讯 http://www.cqvip.com

MSCs 含量多,分离培养简便成为最主要的来源。因此我们选用骨髓分离培养 MSCs。

目前常用的 MSCs 分离培养方法有 3 种:贴壁筛选法、密度梯度离心法和免疫法[7-9]。传统的贴壁筛选法,也称全骨髓法或一步法。根据 MSCs 具有黏附贴壁生长的特性,通过换液去除骨髓单个核细胞中的造血干细胞和其他细胞,得到贴壁细胞,并利用 MSCs 培养基进行传代筛选,已得到较纯的细胞。此法操作简单,价格低廉。密度梯度离心法是根据各种骨髓细胞比重不同,加入分离液(Percoll 液或 Ficoll 液),通过离心获取单个核细胞进行贴壁培养,操作较复杂。用 Percoll 液分离时,会丢失大量的 MSCs 而不能有效地达到较高的分离率;用 Ficoll 液分离时,分离的有核细胞中混有成纤维细胞,长期培养中,由于成纤维细胞的优势生长,最后得到的贴壁细胞大部分为成纤维细胞。免疫法主要有流式细胞仪分离和免疫磁珠分选技术。是利用细胞表面特定标记物的组合而进行筛选,直接得到较纯化的细胞。流式细胞仪费用昂贵,细胞经过机械剪切和高压静电作用,很难保持细胞活性不丢失;并且无法进行无菌分选。应用特异单抗的免疫磁珠分选技术可分离某些类型的细胞,但分选的细胞分化潜能不如未分离细胞,而且目前对 MSCs 的研究尚缺乏非常有特异性的标志分子。应用多种细胞表面标记物试图分离得到真正纯化的 MSCs,如阳离子标记 CD29、CD44、CD54、CD49、CD90、CD105、CD166、SH2、SH3、SH4、和阴离子标记物 CD14、CD31、CD34、CD45、CD133、HLA-DR 等并未显示比通过简单分离、短期培养得到的细胞更为纯化[10,11]。因此我们选用贴壁筛选法培养 MSCs。细胞培养至第 3 代时,MSCs 的细胞表面标志 CD54 和 CD44 表达阳性的细胞已占到 95.18%、94.36%;造血干细胞的细胞表面标志 CD14 表达阳性的细胞已从原代的 23.19%降低到 2.37%,与 Mari 等[12-14]报道的相似。我们认为第 3 代细胞已较纯化,故选用第 3 代细胞进行细胞的诱导分化及近一步研究。

成年动物长骨骨髓腔内以黄骨髓为主,且以脂肪为主要成分。若以成年动物长骨骨髓为来源,直接进行 MSCs 培养,培养出的细胞以脂肪细胞为主,MSCs 所占比例非常小。并且骨髓中的 MSCs 含量极少,大约每 10^4~10^5 个单个核细胞中含有 1 个 MSCs。这样少的 MSCs 很难满足细胞工程等实验研究的需要。幼年动物骨髓腔内以未分化、具有多潜能分化的各种幼稚细胞为主,是培养 MSCs 来源的理想选择。本研究以 4 周龄的 Wistar 大鼠幼鼠的股骨、胫骨、肱骨骨髓为来源,进行 MSCs 培养,取得满意的结果,细胞活力强、增殖旺盛,随着多次的换液及传代,红细胞及造血干细胞等非贴壁生长细胞迅速减少,第 3 代时已较为纯化,可用于其他研究。

从形态学上观察,原代培养的 MSCs 在培养瓶壁上形成若干细胞聚集区,区内细胞形态小、排列紧密,外侧围绕少量呈漩涡状的较大细胞。用胰酶消化后,聚集区细胞分散成单细胞,重新种植仍呈聚集性贴壁生长。因此认为 MSCs 具有克隆样生长的干细胞特性,聚集区中心细胞生长活跃,外围较大的扁平细胞为聚集区内较小细胞提供滋养,有利于较小细胞的生长和增殖[13,14]。

我们对 MSCs 生长、增殖能力应用 MTT 法进行检测,发现第 1、2 代细胞生长不规则,结果可能与第 1、2 代细胞含有造血干细胞掺杂有关,第 3、4 代细胞增殖曲线有明显滞留期、指数生长期和平台期。结合细胞表面抗原 CD54、CD44、CD14 的鉴定,提示我们培养的 MSCs 从第 3 代后,细胞增殖能力趋于稳定,且相对纯化,已消除了造血干细胞对试验的影响,可用于后来的试验研究。

参 考 文 献

[1] Bianco P,Riminucci M,Gronthos S,et al.Bone marrow stromal cells:nature,biology,and potential applications[J]. Stem Cells,2001;19:180-192.

[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] Dawn B,Bolli R. Adult bone marrow-derived cells:Regenerative potential,plasticity,and tissue commitmen[J]. t.Basic Res Cardiol,2005;100(6):494-503.

[4] Wang Y,Deng Z,Lai X,et al. Differentiation of human bone marrow stromal cells into neural-like cells induced by sodium ferulate in vitro[J]. Cell Mol Immunol,2005;2(3):225-229.

[5] 杨 军,贾延劼,杨 琴,等. Notch-1 在骨髓间质干细胞分化为神经细胞中的作用[J]. 重庆医科大学学报,2005;30:781-786.

[6] Friedenstein AJ,Deriglasova UF,Kulagina NN,et al.Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected in vitro by the colony assay method[J]. Exp Hematol,1974;2(2):83-92.

[7] Aziz SA,Stokes D,Augelli BJ,et al. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brain of albi-

(下转第 934 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

1、4、12 周，A 组中神经元数目在 4 周内不断减少，但减少的速度变慢，神经元并不是一直减少下去，术后 12 周神经元数目没有继续减少，说明坐骨神经切断 4 周后，神经元数目就基本稳定，神经元的死亡不再增多。术后 1 周，各组之间相比无明显差异($P>0.05$)；术后 12 周 A 组的恢复率高于 B 组，差异有显著性($P<0.05$)；与 C 组相比无明显差异($P>0.05$)；说明 GAM 能够明显增加脊髓前角运动神经元的数目，改善神经元的功能。

3.3 GAM 对 iNOS 表达的影响

周围神经损伤后脊髓内 iNOS 合成增加，iNOS 阳性细胞产生过量的 NO，NO 可与超氧阴离子(OZ^-)反应生成亚硝基阴离子($ONOO^-$)，之后也可生成羟自由基(OH^-)和 NO，这种过程周而复始，对氧自由基产生起到级联放大作用，促发了细胞凋亡的发生[8]。因此，我们通过免疫组化来研究 GAM 对脊髓组织中 iNOS 表达的影响，以此来了解 GAM 保护神经元的机制。结果显示：术后 4 周，GDNF-GAM 能够减轻坐骨神经损伤诱导的 iNOS 合成增加；并且 iNOS 的减少和存活神经元的数量是一致的，说明 GAM 能够通过向体内转染 GDNF，表达的 GDNF 不仅可以减少 iNOS 合成[9]，而且可以对抗 iNOS 促进神经元凋亡的作用[10]，最终保护了神经元。

本实验表明 GDNF 基因活化的细胞外基质可以促进 GDNF mRNA 在脊髓中表达，增加前角运动神经元的存活率，其机制与 iNOS 受抑制有关。

参 考 文 献

[1] 丁 海，胡汝麟，周建生. 大鼠坐骨神经去细胞基膜管的组织形态学研究[J]. 解剖与临床，2005；10(2)：110-112.

[2] 陈哲宇，陈秀青，路长林，等. 人重组 GDNF 及其生物活性研究[J]. 生物化学与生物物理学报，1999；31(2)：207-210.

[3] Nadeau KC，Azuma H，Tilney NL. Sequential cytokine dynamics in chronic rejection of rat renal allografts：roles for cytokines RANTES and MCP-1[J]. Proc Natl Acad Sci USA，1995；92(19)：8729-8733.

[4] Burke RE. GDNF as a candidate striatal target-derived neurotrophic factor for the development of substantia nigra dopamine neurons[J]. J Neural Transm Suppl，2006；(70)：41-45.

[5] Airaksinen MS，Holm L，Hatinen T. Evolution of the GDNF family ligands and receptors[J]. Brain Behav Evol，2006；68(3)：181-190.

[6] Abrams M，Widenfalk J. Emerging strategies to promote improved functional outcome after peripheral nerve injury[J]. Restor Neurol Neurosci，2005；23(5-6)：367-382.

[7] Rogerio F，Jordao H Jr，Vieira AS，et al. Bax and Bcl-2 expression and TUNEL labeling in lumbar enlargement of neonatal rats after sciatic axotomy and melatonin treatment[J]. Brain Res，2006；1112(1)：80-90.

[8] Martin LJ，Chen K，Liu Z. Adult motor neuron apoptosis is mediated by nitric oxide and Fas death receptor linked by DNA damage and p53 activation[J]. J Neurosci，2005；25(27)：6449-6459.

[9] Pannu R，Singh I. Pharmacological strategies for the regulation of inducible nitric oxide synthase：neurodegenerative versus neuroprotective mechanisms[J]. Neurochem Int，2006；49(2)：170-182.

[10] Lee SH，Chun W，Kong PJ，et al. Sustained activation of Akt by melatonin contributes to the protection against kainic acid-induced neuronal death in hippocampus[J]. J Pineal Res，2006；40(1)：79-85.

(上接第 929 页)

no rats similarities to astrocyte grafts[J]. Proc Natl Acad Sci USA，1998；95：3908-3913.

[8] Koc ON，Gerson SL，Cooper BW，et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-bllod stem cells and expand marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy[J]. J Clincal Oncology，2000；18(2)：307-316.

[9] Colter DC，Sekiya I，Prockop DJ，et al. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells[J]. Pro Nalt Acad USA，2001；98(14)：7841-7845.

[10] Schwartz RE，Reyes M，Koodie L，et al. Mutipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiation into functional hepatocyte-like cells[J]. J Clin Invest，2002；109：1291-1302.

[11] Ye L，Haider Hkh，Sim Ek. Adult stem cells for cardiac repair：a choice between skeletal myoblasts and bone marrow stem cells[J]. Exp Biol Med (Maywood)，2006；231(1)：8-19.

[12] Mari Dezawam，Hiroshi Kanno，Mikio Hoshino，et al.Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation[J]. J Clin Invest，2004；113：1701-1710.

[13] Zhao ZG，Tang XQ，Li J，et al. Isolation and identification of chronic myelogenous leukemia bone marrow mesenchymal stem cells and their functional characteristics[J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi，2005；85(29)：2054-2057.

[14] von Drygalski A，Savatski L，Eastwood D，et al. The rate of marrow recovery and extent of donor engraftment following transplantation of ex vivo-expanded bone marrow cells are independently influenced by the cytokines used for expansion[J]. Stem Cells Dev，2005；14(5)：564-575.