维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2004)06-0715-03

大鼠骨髓间充质干细胞适宜分离和培养条件的研究

吕铁伟[1], 田 杰[1], 朱 静[2], 刘官信[2]

(1.重庆医科大学儿科学院心内科;2.重庆医科大学儿科研究所,重庆 400014)

【摘 要】目的:寻求适宜有效的大鼠骨髓间充质干细胞(mensechymal stem cell,MSCs)体外分离、纯化和培养的条件,为 MSCs 进一步的实验研究打下基础。方法:分别用贴壁筛选法和密度梯度离心法来分离和纯化 MSCs,并用不同的接种密度、不同的血清浓度和不同的培养基检测细胞的生长情况,绘制出细胞的生长曲线;流式细胞仪检测 MSCs 生长周期 结果:细胞贴壁呈纤维状生长,以 $2\cdot10^9$ 的浓度接种,在含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中,37℃、5%CO_2 细胞培养箱中,细胞生长状况良好;细胞在培养的最初几天处于生长的潜伏期,而后呈指数级生长,随着时间的延伸,细胞的生长速度减慢;而流式细胞仪检测示细胞大多处于 G_0G_1 期。结论:在适宜的培养条件下,MSCs 在体外培养的过程中生长状态良好,增殖速度快,为进一步的研究打下了基础。

【关键词】骨髓间充质干细胞;细胞培养;大鼠

【中国图书分类法分类号】R331.22 【文献标识码】A 【收稿日期】2004-02-27

Study on suitable isolation and culture of mesenchymal stem cell of rats in vitro

LU Tiewei, et al

(*Department of Cardiology, College of Pediatrics, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the method of isolation, purification and culture of rat mesenchymal stem cells (MSCs) in vitro in order to provide an experimental basis for further study. *Methods*: MSCs were acquired by adhesive screening and density gradient centrifugation methods. The growth of MSCs at different plate densities, different serum concentrations and different culture media were observed and their growth curves were charted. The cell cycle was detected by flow cytometer. *Results*: The adherent and fibroblast-shaped cells were in good growth state, which were plated at $2\cdot10^9$/ml and cultured in DMEM/F12 medium supplemented with 10% fetal bovine serum and placed in 37℃, 5%CO_2 incubator. Cells grew slowly the first several days after plated, then the growth accelerated at index speed. The results of the cell cycle detection demonstrated that most of MSCs were in G_0G_1 phase. *Conclusion*: In suitable conditions, MSCs show stable growth and rapid proliferation in vitro.

【Key words】Mesenchymal stem cell; Cell culture; Rat

骨髓间充质干细胞(MSCs)是中胚层来源的具有多向分化能力的干细胞,存在于不同种属如鸡、鼠、兔、犬包括人在内的动物体内,主要分布在全身结缔组织和组织器官中,以骨髓组织中含量最为丰富,胎儿脐血中亦可分离得到[1]。其在不同的诱导条件下具有向成骨细胞、成肌细胞、成软骨细胞、肌腱细胞、脂肪细胞和基质细胞等中胚层细胞分化的能力[2~4],其多向分化的潜能为心血管疾病、神经系统疾病和骨关节疾患的治疗提供了一条全新的探索空间。而 MSCs 的体外培养、分离纯化和培养是进行以上实验研究的第一步,探寻一适宜和有效的 MSCs 的培养条件,以期获得生长状态良好、较纯化和足够数量的 MSCs,为进一步的研究打下基础

1 材料与方法

1.1 主要试剂及实验动物

DMEM/F12 培养基(Hyclone, USA),优等胎牛血清(Hyclone, USA),胰酶(上海生工),磷酸盐缓冲液(北方同正) Wistar 大鼠,体重 150g 左右,雌雄不限,购于重庆医科大学实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 MSCs 的体外分离培养

采用贴壁筛选和密度梯度离心两种方法来分离大鼠

作者介绍:吕铁伟(1973-),男,助教,硕士,
主要研究方向:干细胞研究

基金项目:国家自然科学基金资助项目(项目编号:30271381)

维普资讯 http://www.cqvip.com

MSCs,并比较由此获得 MCSs 的纯化及生长情况。异戊巴比妥钠(20mg/kg)过量腹腔麻醉致死,严格无菌条件下取出大鼠双侧股骨及径骨,用不含血清的 DMEM/F12 培养基对骨髓腔进行反复冲洗,将冲洗获得的细胞悬液转入离心管,1500r/min 离心 5min,弃上清,在细胞沉淀中加入适量含 10% 胎牛血清的 DMEM/F_{12} 培养基,小心吹打制成细胞悬液,计数,以 1×10^6/ml、2×10^6/ml、3×10^6/ml 的浓度种入分别含 5%、10%、20% 胎牛血清的 DMEM/F_{12} 培养基中,转入 50cm^2 的培养瓶,37℃、5% CO_2 培养箱中培养;如用密度梯度离心法时,在第一次离心后获得的细胞悬液小心注入预先加有密度为 1.077 的 Ficcoll 细胞分离液的试管中,1500r/min 离心 10min,取中间的单核细胞层,以 1×10^5/ml、2×10^5/ml、3×10^5/ml 的浓度接种,分别种入如上不同浓度血清的培养基中,置入细胞培养箱培养。

1.2.2 MSCs 的传代

每 3 天进行细胞换液 1 次,待细胞 80% 以上贴满瓶底时,用 0.25% 的胰酶进行消化,以 5×10^4/ml 的浓度,按 1:2 的比例传代培养。

1.2.3 MSCs 生长曲线测定

取 2、3 代的培养细胞,制备单细胞悬液,计数,调整细胞浓度为 5×10^4/ml,接种于 24 孔细胞培养板中,24h 后用胰酶消化孔板中 3 个孔中的细胞并计数,连续每天取 3 孔,直至细胞长满孔时停止计数,以时间(d)为横坐标,以细胞数为纵坐标,绘制生长曲线。

1.2.4 MSCs 细胞周期检测

取生长状态良好的细胞,胰酶消化后制成细胞悬液,4℃预冷的 70% 乙醇固定 30min,预冷 PBS 漂洗离心,37℃ 1mg/ml 的 RNAsin 处理 30min,离心;加入 10mg/ml 碘化丙啶(PI)0.5ml 4℃避光染色 30min;流式细胞仪检测。

2 结 果

2.1 MSCs 分离、纯化及培养

用贴壁筛选法获得的 MSCs 接种 24h 后可见大量的造血干细胞悬浮在培养基中,用无菌 PBS 冲洗后可见少量散在分布的贴壁细胞,呈多角形或短棒状(图 1),原代培养 3 天后换液,倒置显微镜观察,可见细胞呈梭状或纤维状,集落式或片状生长,其中仍悬浮有少量的造血干细胞,随着培养时间的延长,造血干细胞被倒掉而使 MSCs 得以纯化;而用密度梯度离心法获得的细胞则含有很少的造血干细胞,细胞纯化效果好,细胞贴壁速度快(图 2);两种方法获得的细胞生长周期没有明显差别,原代培养的细胞一般 7~10 天铺满瓶底,传代后细胞增殖的速度更快,呈集落式生长,细胞形态与原代相似(图 3,4),3~5 天即可传代,且细胞仍均一性高、形态好,生命力旺盛。

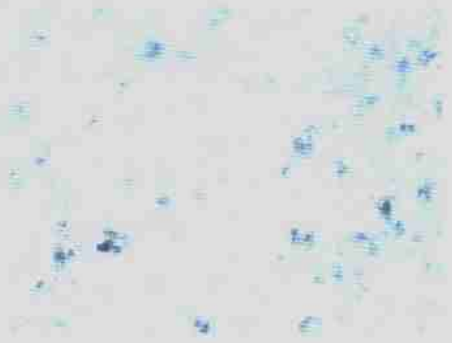


图 1 用贴壁筛选法获得的培养 3 天的细胞,可见培养基中混悬有大量的造血干细胞,而 MSCs 则基本不能看见。放大倍数:×100



图 2 用密度梯度离心法获得的培养 3 天的细胞,可见细胞背景较清晰,内含的造血干细胞很少其中 MSCs 已呈多角形。放大倍数:×100

图 3 培养 10 天的 MSCs,细胞呈纤维状分布,内有少量造血干细胞。放大倍数:×100

图 4 传代后 12h 的 MSCs,细胞形态好,均已贴壁,未见造血干细胞。放大倍数:×100

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.2 不同培养条件对 MSCs 生长的影响

分别采用 5%、10%、20% 的血清浓度来培养细胞,结果发现 5%、20% 浓度血清培养的细胞生长较 10% 的速度缓慢,同样,不同的接种密度和不同的培养基的 PH 值均会对细胞产生影响,贴壁筛选法获得的细胞以 2×10^9/ml 浓度接种、密度梯度离心法获得的细胞以 1×10^5/ml 浓度,培养基 pH 在 7.2 左右,在该条件下细胞生长状态良好。

2.3 MSCs 生长曲线

实验中发现传代后的细胞生长曲线大致相同,接种后的第 1、2 天细胞数没有明显的变化,第 2 天比第 1 天的细胞数量还稍有减少,可能为细胞的潜伏适应期。从第 3 天起,细胞大量增加,至第 6 天细胞量达到高峰,以后细胞增长速度减慢。根据细胞倍增时间的计算公式 $Td = t \times \log2/(\log N_t - \log No)$ 计算出细胞倍增时间为 42h。生长曲线如图 5 所示。

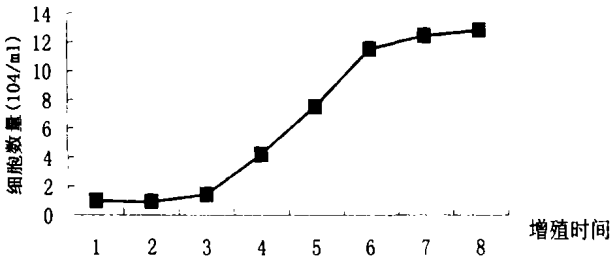


图 5 MSCs 生长曲线

2.4 MSCs 细胞周期的测定

采用流式细胞仪方法对 MSCs 进行细胞周期的检测,结果显示 MSCs 中 $S + G_0 + M$ 期的细胞约占 20%,而处于 G_0G_1 期的细胞约占 80% 以上,即大部分细胞处于静止期,显示了 MSCs 在体外只增殖不分化的特点。

3 讨 论

组织工程学是刚刚发展起来的新兴的一门应用学科,是利用组织学、细胞学和分子生物学等技术,用体外培养的方法将某些具有干细胞特性的细胞诱导分化为我们所需要的组织甚至器官,为临床上受损组织或器官的修复开辟一条新的途径,而种子细胞是组织工程学技术三大基本要素之一。MSCs 是新近发现的一种干细胞,它同样具有干细胞自我更新和多向分化的潜能,在一定的诱导条件下,可分化为多种胚层细胞,为这些系统的受损或缺如起再生和修复的作用,MSCs 主要存在机体骨髓腔中,取材方便,对机体损伤小,更重要的是进行 MSCs 移植时不会出现免疫排斥反应,故对 MSCs 的研究越来越受到广泛的关注。

本实验中分别采用贴壁筛选和密度梯度离心两种方法来分离 MSCs,贴壁筛选法是根据 MSC 在培养瓶中贴壁生长而造血系细胞呈悬浮生长的特性将两者进行分离[5],密度梯度离心法是利用 MSCs 与其他细胞的密度不同而用 Percoll、Fercoll 等细胞分离将其分离出来[6],后者的细胞纯化效果好,细胞生长快,但两者的细胞周期并没有差异,骨髓中 MSCs 的含量很少,每 10 万个单个有核细胞中大约有 1 个 MSC,且随年龄的增加细胞数量逐渐减少,但在体外培养过程中细胞生长速度加快,在培养 10 代之前细胞呈指数级生长,后随着培养时间的延伸,细胞生长减慢。通过细胞的生长曲线可知,MSCs 经历了生长迟缓期、对数增殖期和平台期,传代后细胞在短时间内迅速贴壁,接种成活率较高,增殖更快,因此在体外实现快速大量扩增 MSCs 是完全可能的。

在 MSCs 的培养过程中,培养细胞受贴壁时间、种植密度、血清浓度、培养温度和培养基的 PH 值等条件的影响[7]。贴壁时间早则细胞数量少生长困难,时间晚则使 MSCs 粘附在培养器皿表面,使细胞增殖周期延长,这可能与 MSCs 分泌的细胞因子促进细胞分化有关;细胞生长受细胞间相互作用的影响,种植密度过高会引起细胞间的接触抑制,过稀导致细胞间分泌的细胞因子不足而减慢生长,文献报道 MSCs 能分泌 IL-6、IL-7、IL-8、IL-1、G-GSF、DSF、SCF 等多种细胞因子,对支持造血和维持细胞生长分化十分重要[8];血清为培养细胞提供营养成分,低浓度血清由于营养成分含量低而不能满足细胞生长的需要,高浓度的血清中由于含有大量促进细胞生增殖的因子,易引起细胞增殖分化,使细胞过早出现老化,反而不利于细胞的生长。细胞大部分处于 G_0G_1 期,说明 MSCs 作为干细胞在体外的培养过程中只扩增而不分化的特点。

MSCs 不仅可以分化为中胚层起源的组织细胞,还可以跨越胚层分化为外胚层来源的组织细胞,因此通过 MSCs 移植修复许多组织和器官的损伤和缺失成为当今研究的一个热点,我们通过探索获得一条高效的 MSCs 分离、纯化和扩增的方法,为 MSCs 的进一步研究打下基础。 (下转第 721 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

关($P<0.01$)，因此 Fuhrman 病理分级结合 DNA 倍体测定对肾细胞癌预后判断有着较好的应用价值。

细胞核形态参数如核大小、面积、周长和形状因子等，都可以反映细胞的异型性，核的大小是 Fuhrman 病理分级的基础要素，与临床预后关系密切。面积、周长和形状因子能较好地反映细胞核的异型性，相同面积情况下，周长和形状因子值较大时，说明胞核形状偏离圆形的偏离度增加，因而异型性也较大。

与流式细胞术(flow cytometry，FCM)相比，图像细胞术(image cytometry，ICM)在肿瘤诊断上的应用显得更为简单实用，成本低，对材料要求低，由于能定量测定癌细胞的多个参数，已广泛用于肿瘤的癌前病变与癌的鉴别的研究。采用 Feulgen 染色技术，能够通过光密度的测定，了解肿瘤细胞核 DNA 的倍体情况，又可在测定 DNA 含量的同时获得其核的多个形态参数(大小、面积、周长、形状因子等)。肾细胞癌由于临床分级系统以及传统的病理组织分型对预后的预示作用不理想，而基于细胞核形态的病理分级和 DNA 倍体分布是独立于其他指标的与预后密切相关的因素，因此我们认为，对于肾细胞癌的病例，在有条件的情况下，可应用图像分析仪进行检测，根据细胞核形态而进行较准确的病理分级并同时做 DNA 倍体分析，协助临床判断肿瘤的发展及预后和制定合理的治疗方案。

参 考 文 献

[1] Paraskevakou E, Kavantzas N, Pavlopoulos, et al. Computerized nuclear morphometry of renal cell carcinomas[J]. Gen Diagn Pathol, 1996; 142(2): 101 - 104.

[2] Nativ O, Sabo E, Madeb R, et al. Prognostic score for patients with localized renal cell carcinoma treated by nephrectomy [J]. Isr Med Assoc J, 2001; 3(1): 24 - 27.

[3] Lee JS, Jung JJ, Lee MC, et al. Value of morphometric nuclear image analysis using the Feulgen reaction in renal cell carcinoma[J]. Anal Quant Cytol Histol, 2000; 22(1): 31 - 36.

[4] Rey D, Pfister C, Gobet F, et al. Study of the prognostic value of DNA ploidy and proliferation index (Ki - 67) in renal cell carcinoma with venous thrombus[J]. Prog Urol, 2003; 13(6): 1300 - 1306.

[5] Jose LR, Miguel H, Federico G, et al. Value of deoxyribonucleic acid ploidy and nuclear morphometry for disease progression in renal cell carcinoma[J]. The J Urological, 1996; 155: 459 - 465.

[6] Abou - Rebyeh H, Borgmann V, Nagel R, et al. DNA ploidy is a valuable predictor for prognosis of patients with resected renal cell carcinoma[J]. Cancer, 2001; 92(9): 2280 - 2285.

[7] Shalev M, Gdor Y, Leventis A, et al. The prognostic value of DNA ploidy in small renal cell carcinoma [J]. Pathol Res Pract, 2001; 197(1): 7 - 12.

[8] Francois C, Decaestecker C, Lathouwer OD, et al. Improving the progrostic value of histopathological grading and clinical staging in renal cell carcinomas by means of commputer - assisted microscopy[J]. J. Pathol, 1999; 187: 313 - 320.

(上接第 717 页)

参 考 文 献

[1] Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchyaml progenitor cells in human undilical cord blood[J]. Br J Haematol, 2000; 109: 235 - 242.

[2] Ferrari G, Angelis GC, Coletta M, et al. Muscle regeneration by bone marrow derived myogenic progenitors [J]. Sciences, 1998; 279: 1528 - 1530.

[3] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotential of Mesenchymal stem cells derived form adult marrow[J]. Nature, 2002; 418: 41 - 49.

[4] Sanchez - Ramos J, Song S, Cardozo - Pelaez F, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vivo[J]. Exp Neurol, 2000; 164: 247 - 256.

[5] Zohar R, Sodek J, McCulloch CA. Characterization of stromal progenitor cells enriched by flow cytometry [J]. Blood, 1997; 90(9): 3471 - 3481.

[6] Fortier LA, Nixon AJ, Williams J, et al. Isolation and chondrocytic differentiation of equine bone marrow - derived mesenchymal stem cells[J]. Am J Vet Res, 1998; 59(9): 1182 - 1187.

[7] 艾国平，粟永萍，闫新泽，等. 骨髓间充质干细胞的分离和培养[J]. 第三军医大学学报，2001; 23(5): 553 - 555.

[8] Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow Mesenchymal progenitor cells [J]. J Cell Physiol, 1999; 181(1): 67 - 73.