DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.04.005
第25卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 4
2003年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2003

文章编号:1000-5404(2003)04-0291-03

论著

人骨髓间充质干细胞的分离培养及部分生物学特性的实验研究

张 勇[1],杜宏伟[2],邹仲敏[1],郭朝华[1],周进明[1],王 劲[1],范文辉[3],罗成基[1],程天民[1] ([1]第三军医大学预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所,重庆 400038;[2]解放军第464医院门诊部,天津 300381;[3]第三军医大学附属西南医院神经内科,重庆 400038)

提 要:目的 建立一种体外分离和培养人骨髓间充质干细胞(MSCs)的方法,并探讨其部分生物学特性。方法 无菌条件下抽取正常健康人骨髓3~5 ml,经密度梯度离心得到单个核细胞,接种入含10%胎牛血清的IMDM培养液,测定其生长曲线,并观察其贴壁率、细胞周期和超微结构变化。结果 培养的MSCs 3~4 h开始贴壁,贴壁率为60%~80%,2~3 d即可见集落形成,14 d左右融合90%以上,基本上为梭形成纤维细胞状形态,流式细胞检测显示有70.03%的细胞处于G_0/G_1期,电镜观察表现出早期细胞的特点。结论 成功地建立了一种分离培养人骨髓MSCs的方法,获得的细胞形态单一、生长稳定、增殖较快,为进一步应用MSCs促进创伤修复提供了实验基础。

关键词:骨髓;间充质干细胞;细胞培养
中图法分类号:R322.7;R329.24 文献标识码:A

Experimental study of the culture, isolation and biological properties of human bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro*

ZHANG Yong, DU Hong-wei, ZOU Zhong-min, GUO Chao-hua, ZHOU Jin-ming, WANG Jin, FAN Wen-hui, LUO Cheng-ji, CHENG Tian-ming (Institute of Combined Injury of PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish a method for the isolation and culture of human bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) *in vitro* and explore their biological properties. Methods Mononuclear cells acquired after density gradient centrifugation of the collected bone marrow of 3~5 ml from normal healthy people under aseptic condition were inoculated into IMDM medium containing 10% fetal bovine serum. Growth curve was detected and adhesiveness rate, cell cycle and ultrastructure observed. Results MSCs began to be adhesive after culture for 3~4 h with the rate of 60%~80%. Formation of colony could be observed on the second to third day. More than 90% MSCs, fused at 14th day, were basically fibroblast-shaped. About 70.03% of MSCs at G_0/G_1 phase were found by flow cytometry. The ultrastructures of MSCs demonstrated the features of infantile cells. Conclusion The isolated and cultured MSCs by the method successfully established in this study are of singular configuration, stable growth and rapid proliferation. This might provide an experimental foundation for trauma repair.

Key words: bone marrow; mesenchymal stem cells; cell culture

骨髓中除了造血干细胞外,还存在着间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)。目前已知道,来源于中胚层的MSCs具有分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肌腱细胞、成肌细胞、骨髓基质细胞和神经细胞等潜能[1],研究和利用MSCs有望为骨、软骨和肌肉等组织的修复提供强大的备用库。为此我们建立了一种体外分离和培养人MSCs的方法,并探讨其部分生物学特性,为应用MSCs促进创伤修复奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及来源

IMDM培养粉、胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)、胰酶、G418:Hyclone公司;Percoll:Sigma公司。

1.2 标本来源

取自附属西南医院正常健康人髂骨骨髓。

1.3 实验方法

1.3.1 MSCs分离、培养与扩增 参照文献[3~5],略作改进。改进方法有二:一是原代分离细胞后,在接种培养24 h后换液,而不是3~4 h,因为MSCs贴壁较晚;二是传代时用0.25%胰酶消化5~7 min,不超过15 min,因为MSCs易于消化,用此方法得到的MSCs相对较纯。

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054205)
作者简介:张 勇(1967-),男,四川省武胜县人,博士,主治医师,讲师,主要从事干细胞基础方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)65387300
收稿日期:2002-05-17;修回日期:2002-07-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3.2 骨髓MSCs贴壁率 制备单细胞悬液，调整细胞浓度为1×10^5/ml。每代接种6个直径为2 cm的培养皿，按前述条件培养。每2 h取出一个平皿倒掉培养液(含未贴壁细胞)，以0.25%的胰酶消化贴壁细胞，按照下列公式计算每个时间点的贴壁率。

贴壁率= 已贴壁细胞总数/接种细胞总数× 100%

1.3.3 骨髓MSCs生长曲线 分别取生长状态良好的传代细胞，消化制备单细胞悬液，计数，调整细胞浓度为5×10^3/孔，接种于96孔培养板，每个时相点细胞接种4孔，每孔200μl细胞悬液。置于37℃、5% CO_2培养箱培养。从第2天起，每天上午固定时间开始加入浓度为5 mg/ml的四唑氮蓝液20μl，混匀、孵育4 h后吸弃培养液，加入150μl分析纯的二甲基亚砜，用640型分光光度计检测每个孔的吸光度值(A)。以时间(d)为横坐标，吸光度值为纵坐标，绘制生长曲线。

1.3.4 骨髓MSCs细胞周期测定 取50 ml培养瓶中几近长满的MSCs，常规消化离心，PBS漂洗，制备成单细胞，75%乙醇固定后送流式细胞仪进行细胞周期检测。

1.3.5 骨髓MSCs超微结构观察 取50 ml培养瓶中几近长满的MSCs，PBS漂洗，常规消化离心，3%戊二醛固定后送透射电镜检测。

2 结果

2.1 MSCs分离、培养与扩增

原代培养接种3~4 h后细胞开始贴壁，24 h后贴壁细胞数量明显增多，2~3 d就可见一些集落形成，见图1，7~10 d后集落迅速增多，14 d左右融合90%以上。MSCs基本上为梭形的成纤维细胞状形态。传代培养后的细胞不再以成集落的方式生长，而是均匀分布生长，且形态更为纤长。

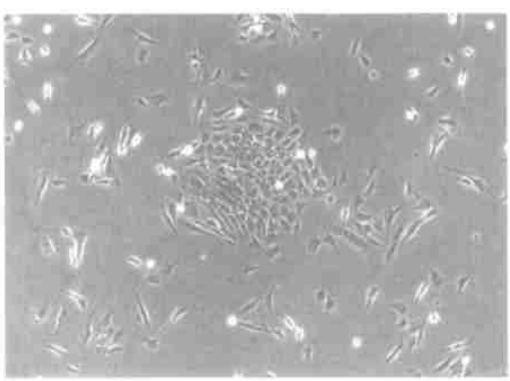


图1 培养第3天的MSCs可见集落形成 (苏木素染色× 33)

Fig 1 Formation of colony on the third day of culture (Hoematine staining× 33)

2.2 MSCs贴壁率

培养的MSCs 3~4 h开始贴壁，贴壁率为60%~80%，2~3 d即可见集落形成，14 d左右融合90%以上。

2.3 MSCs生长曲线

第1~3天吸光度值变化不大，为细胞生长的潜伏适应期；3 d后吸光度值显著增加，第6天达到顶点，提示细胞进入对数生长期；第6天d后吸光度值有所减少，提示细胞生长进入平台期，见图2。

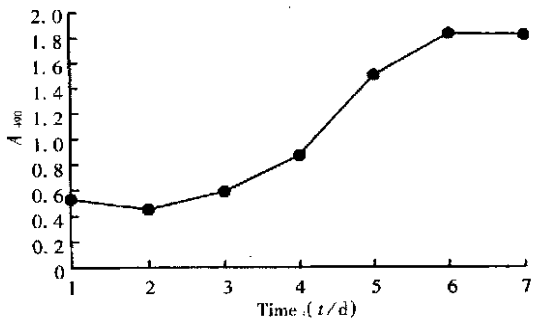


图2 MSCs生长曲线

Fig 2 Growth curve of MSCs

根据生长曲线始末两点之间A值的变化，按照公式计算出细胞数相对A值的倍增时间为34.3 h。

2.4 MSCs细胞周期

MSCs中S+G_2+M期的细胞有29.97%活跃于增殖期，而处于G_0/G_1期的细胞占70.03%，见图3。

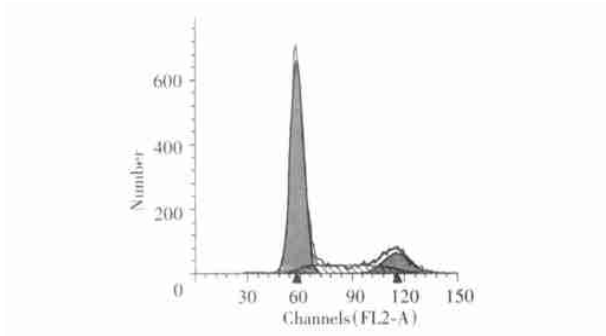


图3 MSCs细胞周期

Fig 3 Cell cycle of MSCs

2.5 MSCs超微结构

MSCs胞体较小，核/浆比例大，染色质较疏松，核仁明显，胞浆内细胞器不发达，表现出早期细胞的特点，见图4。

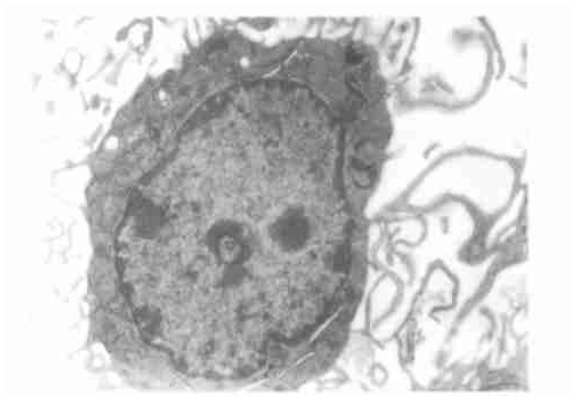


图4 MSCs超微结构 (TEM× 70 000)

Fig 4 Ultrastructure of MSCs (TEM× 70 000)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3 讨论

作为创伤修复的理想细胞，MSCs 具备许多优点，但 MSCs 是非建株的细胞，由原代培养而来，且在骨髓中含量极少，在 0.001%～0.01%左右[6]，故如何获取纯度较高的 MSCs 一直是人们关注的问题。

目前常用的分离 MSCs 的方法有 3 种：密度梯度离心、贴壁分离筛选和流式细胞仪分离。密度梯度离心分离法简便易行，利用 Percoll 分离液（γ 在 1.073～1.082 g/ml）可获得均一性较高的 MSCs[4~7]，为此我们选用 Percoll γ 为 1.080 g/ml。同时，MSCs 虽然在接种 3～4 h 即开始贴壁，但大部分人的 MSCs 在 24 h 后贴壁，且 MSCs 易消化[4~7]，为此我们选择接种后第 1 次换液的时间至少在 24 h 以后，传代时胰酶消化的时间在 5～7 min，利用以上方法传 3～4 代后 MSCs 的纯度相对较高。此种方法获得的 MSCs 细胞形态单一、生长稳定、增殖性较强。

同时我们注意到传代后的 MSCs 增殖速度加快，传代的 MSCs 能够在短时间内贴壁，具有较高的接种成活率，因此在体外实现快速大量扩增 MSCs 是可能的。体外培养的 MSCs 细胞周期分析表明，只有少数的细胞处于活跃的增殖期。电镜观察结果也显示我们分离培养的 MSCs 具有早期细胞的形态学特点，是一种生物年龄比成年动物体细胞更年轻的细胞。

MSCs 具有分化为所有中胚层起源的组织细胞的潜能。我们建立的 MSCs 体外分离培养方法将为应用 MSCs 促进创伤修复奠定基础。

参考文献：

[1] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, *et al*. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411): 143－147.

[2] Dennis J E, Merriam A, Awadallah A, *et al*. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse[J]. J Bone Miner Res, 1999, 14(5): 700－709.

[3] 周进明，邹仲敏，郭朝华，等. 小鼠骨髓间充质干细胞的生物学特性及分化潜能鉴定[J]. 第三军医大学学报，2002, 24(10): 58－61.

[4] 刘晓丹，郭子宽，李秀森，等. 人骨髓间充质干细胞分离与培养方法的建立[J]. 军事医学科学院院刊，2000, 24(4): 282－284.

[5] Jaiswal N, Haynesworth S E, Caplan A I, *et al*. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells *in vitro*[J]. J Cell Biochem, 1997, 64(2): 295－312.

[6] Bruder S P, Kurth A A, Shea M, *et al*. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells[J]. J Orthop Res, 1998, 16(2): 1551－1562.

[7] 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.

（编辑 薛国文）

文章编号：1000-5404(2003)04-0293-01

个案与短篇

10 例婴幼儿颅内出血的护理

Nursing care of 10 cases of infants with intracranial hemorrhage

薛 媛 （第三军医大学附属西南医院儿科，重庆 400038）

婴幼儿颅内出血死亡率高，而早期发现颅内出血、及时治疗、采取有效的护理措施将有助于减少病死率，促进患儿早日康复。我科从 2000 年 1 月至 2002 年 10 月收治的婴幼儿颅内出血 10 例，现报告如下。

1 一般资料

10 例患儿中，男 6 例，女 4 例；年龄为出生后 2 h 至 4 岁，其中 2 h 至 5 d 6 例，6～28 d 1 例，3 月 1 例，1～4 岁 2 例。

2 病因与临床表现

2.1 病因

新生儿窒息 3 例，早产儿 2 例，先天性心脏病 1 例，再生障碍性贫血 1 例，晚发性维生素 K 缺乏 1 例，颅脑外伤 2 例。

2.2 临床表现

本组主要临床表现为嗜睡 2 例、昏迷 4 例、呕吐 6 例、眼球凝视 3 例、拒乳 3 例、易激惹惊跳 4 例、脑性尖叫 2 例、烦躁 3 例、瞳孔对光反应迟钝 2 例、瞳孔对光反应消失 1 例、前囟饱满或紧张 3 例、颅神经受累 2 例、上眼睑下垂 1 例、膝反射活跃或亢进 3 例、膝反射减弱或消失 2 例、病理征阳性 2 例、脑膜刺激征阳性 3 例、伴随其它部位出血 2 例（皮肤出血 1 例，针眼出血 1 例，粪便带血 2 例）。

3 实验室检查

脑电图检查异常 1 例。头部 CT 检查 10 例，异常 10 例，阳性率 100%。出血部位，基底节 1 例，顶枕部 2 例，颞顶 3 例，硬

（下转 297 页）

作者简介：薛 媛（1964－），女，四川省邛崃市人，主管护师，主要从事儿科临床护理管理方面的研究。电话：（023）65459885

收稿日期：2002-02-17；修回日期：2002-06-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net