DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.05.014
第24卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 5
2002年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2002

文章编号:1000-5404(2002)05-0531-03

论著

骨髓间充质干细胞在软骨细胞培养条件下生物学特点的观察

周 强,李起鸿,杨 柳,段小军 (第三军医大学附属西南医院骨科,重庆 400038)

提 要:目的 观察骨髓间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)在软骨细胞培养条件下传代培养的主要生物学特性。方法 梯度离心分离幼兔骨髓有核细胞,培养分离MSCs并进行传代培养,观测在体外软骨细胞培养条件下MSCs形态、生长特点及Ⅰ型和Ⅱ型胶原、蛋白多糖聚集体合成分泌以及碱性磷酸酶活性等方面的变化。结果 ①MSCs原代细胞呈可见的均匀分布的簇状生长,呈长梭形,在传代培养中形态特性无明显变化、均质性明显提高;②各代Ⅰ型胶原免疫组化均为阳性,Ⅱ型胶原免疫组化均为阴性。③在各代培养中碱性磷酸酶染色均为阴性,对甲苯胺蓝存在极弱的异染性反应;④细胞外基质中硫酸糖胺多糖含量亦很低。结论 传代培养中骨髓MSCs保持了常规低糖培养条件下的基本生物学特点,说明常用的软骨细胞基础培养条件同样适合骨髓MSCs的培养。

关键词:间充质干细胞;组织工程;细胞培养;种子细胞
中图法分类号:R322.71;R329.2 文献标识码:A

Biological characteristics of rabbit marrow-derived mesenchymal stem cells cultured in condition for chondrocytes

ZHOU Qiang, LI Qi-hong, YANG Liu, DUAN Xiao-jun (Department of Orthopedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To observe the main biological characteristics of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) during the passage cultivation under the condition for chondrocyte culture. **Methods** The marrow-derived MSCs were isolated from young rabbits and cultivated in the condition for culturing chondrocytes. The changes of morphology, growth and proliferation, synthesis of collagen type Ⅰ and Ⅱ and aggrecan, and activity of alkaline phosphatase (ALP) were observed during the passage cultivation of MSCs. **Results** 1) Primary MSCs proliferated in visible symmetric colonies with long-spindle shape. The morphological characteristics of marrow-derived MSCs had no change during passaging, and its homogenous rose with passaging. 2) Every passage cells showed positive staining of collagen type Ⅰ, and negative of collagen type Ⅱ. 3) The cells had negative staining of ALP, and weak heterochromatic to toluidine blue. The content of sulfate glycosaminoglycans (GAG) was very little in extracellular matrix. **Conclusion** The biological characteristics of MSCs in the basic condition for culturing chondrocytes are the same with in the regular low-glucose condition for culturing MSCs.

Key words: mesenchymal stem cells; tissue engineering; cell cultivation; seeding cell

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)因具有在适宜的体内或体外条件下分化形成软骨组织的潜能,且易于从骨髓中分离和体外大量扩增纯化,便于自体移植,故被认为是软骨组织工程最有希望的种子细胞来源之一[1~3]。未来的研究工作主要为诱导MSCs向软骨细胞高效定向分化和持续稳定地表达软骨细胞表型,其中包括大量的MSCs与软骨细胞的对比性观察。但就现有文献报道看,两种细胞的常规培养条件差别较大,例如,MSCs培养主要采用低糖的培养基,而软骨细胞则采用高糖的培养基[1]。为使对比研究具有较强的科学性和提高工作效率,有必要探索对这两类细胞采用一致的基础培养条件。因此,本实验观察了在常规的软骨细胞基础培养条件下骨髓MSCs传代培养的主要生物学特性,以为软骨组织工程中骨髓MSCs的进一步研究奠定实验基础。

基金项目:国家自然科学基金资助重点项目(39830100),全军"十五"医药卫生科研基金资助重点项目(01Z072)
作者简介:周 强(1965-),男,河北省乐亭县人,博士,主治医师,讲师,主要从事组织工程及骨病方面的研究。电话:(023)68754000-73076
通信作者:李起鸿,电话:(023)68754483
收稿日期:2002-02-04;修回日期:2002-04-19

1 材料与方法

1.1 主要试剂

1.1.1 细胞培养主要试剂 DMEM/Ham's-F12混合培养基(Hyclone);胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS, Hyclone);1.073 g/ml密度的梯度离心液(Pharmacia, Piscataway, NJ);非必需氨基酸(Gibico);脯氨酸(国产分析纯);维生素C钠盐(Sigma)。

1.1.2 骨髓MSCs的培养液配制 采用组织工程研究中常用的软骨细胞基础培养液配方即DMEM/Ham's-F12+584 mg/L L-谷氨酰胺+0.1 mmol/L非必需氨基酸+0.4 mmol/L脯氨酸+50 μg/L维生素C+100 U/ml青霉素+100 μg/ml链霉素[4],称之为基础培养液。

1.1.3 主要检测试剂 鼠抗兔Ⅰ型和Ⅱ型胶原单克隆抗体(Oncogene);免疫组化试剂盒(中山公司);DAB显色试剂盒(博士德公司);0.01 mol/L PBS(博士德公司);木瓜蛋白酶(Sigma)。

1.2 方法

1.2.1 骨髓有核细胞的分离 3周龄健康日本大耳白兔6只(第三军医大学实验动物中心),300~350 g,雌雄不限。分6次进行,全身肝素化后处死动物。取双侧股骨和胫骨,切除包括骺板在内的两侧骺端。用20 ml注射器16号针头,以30 ml含10%FBS的DMEM/F12(Hyclone)培养液冲洗骨髓入9 cm的

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

平皿，用注射器适当抽吸吹打使骨髓组织基本均匀分散。将骨髓混悬液等分、缓慢加入 3 支预先加有 15 ml 1.073 g/ml 密度梯度离心液的 50ml 塑料离心管(NUNCLON 公司，德国)中。以 800 × g 离心 20 min，小心收集界面上的乳白色云雾状细胞层以 DMEM/Ham's-F12 培养液漂洗，1 500 r/min 离心 5 min，弃上清，重复 1 次。加入含 10%FBS 的基础培养液，吹打混匀后，进行细胞计数[3,5]。

1.2.2 骨髓 MSCs 的原代培养 细胞悬液经适当稀释后，以 2.5× 10^5 个细胞/ cm^2 的密度、含 10%FBS 的基础培养液接种于 175 cm^2 的培养瓶(NUNCLON 公司，德国)和放有盖玻片的 6 孔板(BD 公司，美国)，置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱内。接种 48 h 后首次全量换液，以后隔两天全量换液。当细胞生长至 80%～90% 融合时，培养瓶中的细胞供传代，培养板中的细胞以 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液固定，供相应指标观测。

1.2.3 骨髓 MSCs 的传代培养 以 0.25% 胰蛋白酶/0.02% EDTA-Na_2 消化，离心收集细胞，留取消化液－20 ℃保存备检测。以 3× 10^4 个细胞/ cm^2 的密度、含 10%FBS 的基础培养液传代接种于 25 cm^2 的培养瓶(NUNCLON 公司，德国)和放有 1/4 盖玻片的 24 孔板，置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱内。接种 48 h 后首次换液，以后隔天换液。如此传代培养至第 4 代，并留取各代标本备检测。

1.3 指标观测

1.3.1 倒置显微镜动态观察

1.3.2 HE 染色 PBS 漂洗细胞盖玻片，常规 HE 染色，光镜观察。

1.3.3 甲苯胺蓝染色 PBS 漂洗细胞盖玻片，甲苯胺蓝液染色，蒸馏水中沾洗，中性树胶封片，光镜观察。

1.3.4 碱性磷酸酶染色(Alkaline phosphatase，ALP) 蒸馏水漂洗细胞盖玻片，采用钙钴法染色，中性红对比染色，中性树胶封片，光镜观察，阳性细胞为棕色。

1.3.5 Ⅰ型和Ⅱ型胶原免组化染色 参照文献[6]的方法，按免疫组化试剂盒说明进行操作，DAB 显色液显色，光镜观察，阳性为棕黄色。

1.3.6 二甲基亚甲蓝显色法测定细胞传代消化液硫酸糖胺多糖含量 取细胞传代消化液，经木瓜蛋白酶消化后，二甲基亚甲蓝显色法[7]测定硫酸糖胺多糖(Glycosaminoglycans，GAG)，按下列公式计算硫酸 GAG 含量

$$\text{硫酸 GAG 含量}(\mu g/cm^2)=\frac{\text{消化液中硫酸 GAG 含量}(\mu g/ml)\times\text{消化液总量}(ml)}{\text{培养瓶底面积}(cm^2)}$$

1.4 统计学分析

实验所得数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，用 Microsoft Excel 数据统计处理程序进行 t 检验，$P<0.05$ 为相差显著，$P<0.01$ 为相差非常显著。

2 结果

2.1 倒置显微镜观察

骨髓有核细胞接种 48 h 后开始出现细胞附壁铺伸，呈小的短梭形或三角形。72 h 附壁铺伸细胞数量增多，呈多细胞集落性分布，彼此不相接触。第 4、5 天开始形成典型的呈均匀分布的骨髓 MSCs 簇状增生灶，且数量逐渐增多，细胞形态发生了根本的变化，呈长梭形，紧密排列，见图 1；另外，还有一种附壁细胞，外形类似马蹄印，散在分布，增殖速度很慢。第 6 天后 MSCs 迅速增殖扩增，不仅细胞簇状增生灶数量迅速增加，而且细胞增生灶不断扩大。第 9～10 天细胞生长即可达 80%～90% 的融合，呈大的长梭形，紧密排列类似旋涡状。此时马蹄形细胞消失，非附壁细胞经反复换液绝大部分已被祛除。传代细胞接种 4 h 后开始附壁铺伸，12 h 活细胞基本完成附壁，第 2、3 天迅速增殖，第 4 天即可达到 80%～90% 的融合。第 1 至 4 代细胞间的附壁和生长速度无明显区别，呈比原代更均匀的长梭形，无马蹄形细胞及悬浮细胞生长。

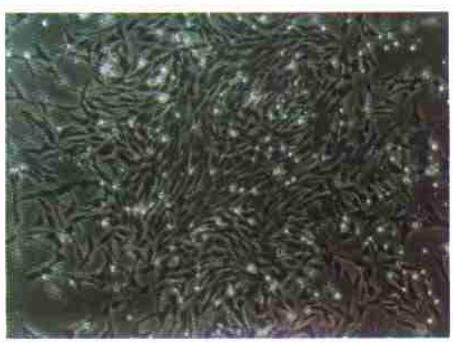


图 1 接种 5 d 后原代 MSCs 呈簇状增生，均匀的长梭形 (× 100)

Fig 1 Primary cultured cells in colonies and symmetric long-spindle shape (× 100)

2.2 细胞学染色光镜观察

细胞的形态与倒置显微镜下所见基本相同。HE 染色原代至第 4 代细胞着色均正常，胞质透亮、着色均匀，细胞核轮廓清楚、有一或两个核仁。甲苯胺蓝染色显示，原代至第四代细胞存在较弱的异染反应，见图 2A，而细胞碱性磷酸酶染色均呈阴性，见图 2B。

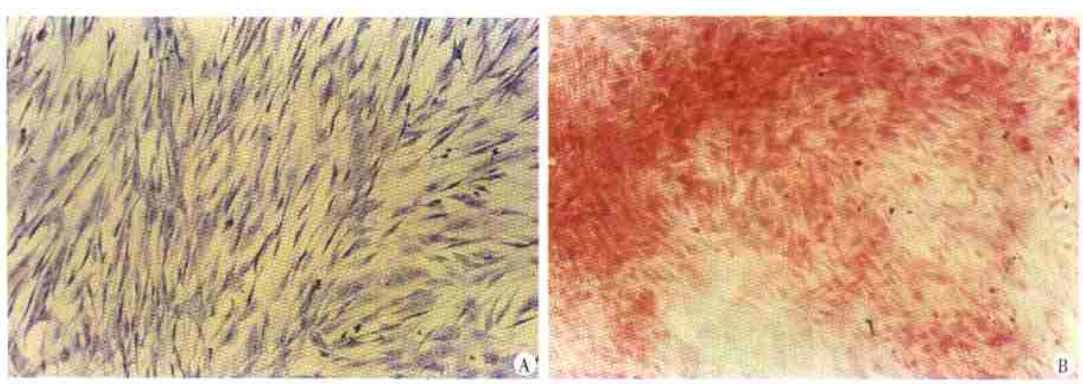


图 2 第 3 代 MSCs 甲苯胺蓝染色呈较弱的异染反应 (A，TB× 100)；碱性磷酸酶染色均呈阴性 (B，AIP× 100)

Fig 2 MSCs at passage 3 showing weak metachromatic to toluidine blue (A，TB× 100) **and negative staining of ALP** (B，AIP× 100)

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

2.3　Ⅰ型和Ⅱ型胶原的免疫组化

MSCs 各代Ⅰ型胶原免疫着色均为阳性, 着色强弱无明显区别, 见图 3A, 而Ⅱ型胶原免疫着色均为阴性, 见图 3B。

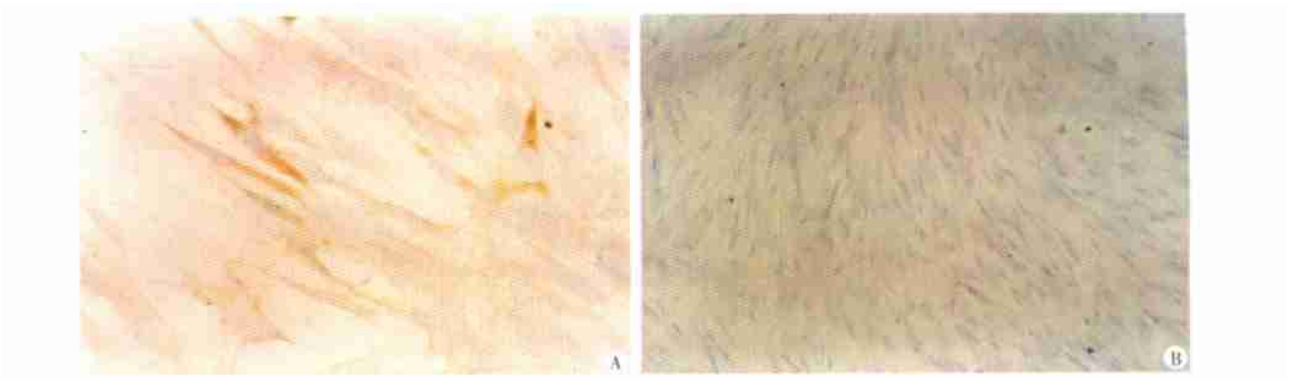


图 3　第 4 代 MSCsⅠ型胶原免疫着色为阳性　(A, S-P× 400); Ⅱ型胶原免疫着色为阴性　(B, S-P× 200)

Fig 3　MSCs at passage 4 having positive staining of collagen typeⅠ　(A, S-P× 400) **and negative for collagen type**Ⅱ　(B, S-P× 200)

2.4　不同代次胞外基质的硫酸 GAG 含量变化

MSCs 除第 4 代显著地($P<0.05$)低于原代外, 第 1、2、3 代均与原代无显著差别, 详见表 1。

表 1　不同代次 MSCs 胞外基质的硫酸 GAG 含量($n=6$, $\bar{x}\pm s$, $\mu g/cm^2$)

Tab 1　Content of sulfate glycosaminoglycans (GAG) in extracellular matrix of different passaged MSCs($n=6$, $\bar{x}\pm s$, $\mu g/cm^2$)

Number of passage	Primary	1	2	3	4
Content of GAG	34.28±4.84	30.03±6.08	26.05±5.29	22.61±6.36	16.54±3.83△

△: $P<0.05$ *vs* primary passage

3　讨论

骨髓 MSCs 的分离是利用 MSCs 附壁生长的特性与骨髓中其它细胞成分相区分, 通过更换培养液弃除骨髓中的其它细胞成分, 这一方法首先由 Friedenstien 在 70 年代中期建立[8]。一般认为, MSCs 的阳性标记物主要有 SH2、SH3、SH4、SB-10 抗原等, 而 CD14、CD34、CD45 则为阴性[3,9,10]。目前最常用的培养基为低糖型的 DMEM 或 α-MEM 加 10%～20%的胎牛血清。为了便于软骨组织工程中对 MSCs 的研究, 以及建立它与软骨细胞对比性研究的一致性基础培养条件, 本实验探索了采用软骨组织工程研究中常用的软骨细胞基础培养基培养骨髓 MSCs, 并观察了其传代培养的主要生物学特性。

观察结果表明, 在本实验采用的培养条件下, MSCs 的生长特性和形态特征, 与以往文献[3, 8]报道的相一致。随传代次数的增加, 细胞增殖速度无明显下降, 细胞形态的均质性经传代后明显提高。Ⅰ型胶原是 MSCs 体外培养合成分泌的主要胶原成分, 是其重要表型之一[3,8]。在本实验中各代 MSCs 均有基本一致的Ⅰ型胶原的合成及分泌。成骨细胞是骨髓 MSCs 容易分化的方向之一, 合成及分泌碱性磷酸酶是 MSCs 分化为成骨细胞的重要标志性表型[9], 而在各代培养中碱性磷酸酶染色均为阴性, 可基本表明在本实验培养条件下 MSCs 未发生向成骨细胞方向的分化。Ⅱ型胶原和硫酸软骨素蛋白多糖聚集体即聚糖体是软骨细胞的两个特异性表型。各代 MSCs 的Ⅱ型胶原免疫组化均为阴性, 甲苯胺蓝染色和细胞外基质中 GAG 含量测定可分别定性和定量的反映硫酸软骨素的合成及分泌, 而 MSCs 对甲苯胺蓝仅存在极弱的异染性反应, 细胞外基质中 GAG 含量亦很低, 表明 MSCs 无软骨细胞方向的分化。

从以上实验结果看, 在本实验的传代培养中 MSCs 保持了常规低糖培养条件下的基本生物学特点, 说明常用的软骨细胞基础培养条件同样适合骨髓 MSCs 的培养。

参考文献:

[1] 周　强, 李起鸿, 杨　柳. 骨髓间充质干细胞及在软骨组织工程中的研究进展[J]. 临床骨科杂志, 2001, 4(4): 319—323.

[2] Bianco P, Robey P G. Marrow stromal cells[J]. J Clin Inves, 2000, 105(12): 1 663— 1 668.

[3] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, *et al*. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5 411): 143—147.

[4] Freed L E, Hollander A P, Matin I, *et al*. Chondrogenesis in a cell-polymer-bioreactor system[J]. Exp Cell Res, 1998, 240(1): 58— 65.

[5] Barry F P, Boynton R E, Haynesworth S, *et al*. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes epitope on endoglin(CD105)[J]. Biochem Biophysiol Res Com, 1999, 265(1): 134—139.

[6] Kumagai J, Sarkar K, Uhthoff H, *et al*. Immunohistochemical distribution of type Ⅰ, Ⅱ and Ⅲ collagens in the rabbit supraspinatus tandon insertion[J]. J Anat, 1994, 185(Pt2): 279— 284.

[7] Farndal R W, Buttle D J, Barrett A J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue[J]. Biochim Biophys Acta, 1986, 883(2): 173— 177.

[8] Prockop D J. Marrow stromal cell as stem cells for nonhematopoietic tissues[J]. Science, 1997, 276(5 309): 71— 74.

[9] Bruder S P, Jaiswal N, Ricalton N S, *et al*. Mesenchymal stem cell in osteobiology and applied bone regeneration[J]. Clin Orthop, 1998, 355S: S247— S256.

[10] Conget P A, Minguell J J. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells[J]. J Cell Physiol, 1999, 181(1): 67—73.

(编辑　王　红)

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