DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.07.010
第24卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 7
2002年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2002

文章编号:1000-5404(2002)07-0775-03

论著

人羊膜负载猪骨髓间充质干细胞生长的形态学研究

闫国和,粟永萍,艾国平,屈纪富,程天民 (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)

提 要:目的 建立人羊膜(HAM)负载培养骨髓间充质干细胞(MSCs)生长的组织工程方法,观察MSCs生长增殖的形态特点。方法 将贵州小香猪的MSCs原代培养,传代扩增后,以不同密度多次接种于HAM基质面,逐日于倒置显微镜下观察MSCs的生长增殖变化情况,并于培养8、18 d后进行光镜、电镜观察。结果 接种后30 min内明显见到MSCs在HAM上贴附生长,MSCs能以合适的接种密度在羊膜上良好生长。结论 HAM对MSCs有明显的促增殖作用,MSCs可以HAM为载体在体外进行培养,HAM是MSCs的良好载体。

关键词:HAM;骨髓;MSCs;形态特点
中图法分类号:R322.99;R329.24 文献标识码:A

Morphology of human amniotic membrane loading porcine bone marrow-derived mesenchymal stem cells *in vitro*

YAN Guo-he, SU Yong-ping, AI Guo-ping, QU Ji-fu, CHENG Tian-min (Institute of Combined Injuries, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the morphological characteristics of human amniotic membrane (HAM) loading mesenchymal stem cells (MSCs) derived from porcine bone marrow. Methods MSCs of Guizhou minipigs were primarily cultured and subsequently expanded and bred on the stroma surface of HAM with different densities for many times. The growth and proliferation of MSCs were observed under the invert microscope every day and under light microscope and electron microscope at d 8 and d 18 after culture. Results MSCs adhered to HAM about 30 min after inoculation. MSCs grew fine on HAM when they were bred with an appropriate culture density. Conclusion HAM promotes the proliferation of MSCs significantly. MSCs may be cultured on HAM in vitro. HAM is a good carrier of MSCs.

Key words: human amniotic membrane; bone marrow; mesenchymal stem cells; morphological characteristics

如何进一步提高对严重创伤的救治水平仍然是临床医学的重要研究课题之一。用组织工程的原理构建或预制皮肤组织是解决大面积软组织及皮肤损伤患者皮源缺乏的一个重要途径。人羊膜(Human amniotic membrane, HAM)为半透明的薄膜,它含有多种促进细胞增殖的营养成分。本研究利用细胞组织工程技术将骨髓间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)种植在HAM的基质面,观察MSCs在HAM上的生长情况,对采用HAM负载MSCs构建皮肤真皮替代物修复皮肤严重创伤提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 HAM的处理和制备

HAM取自HIV, HCV, HBV,以及梅毒等血清反应阴性供者的选择性剖官产分娩产妇的胎盘。无菌条件下,用无菌生理盐水洗去血凝块,钝性解剖器械分离HAM与绒毛膜,0.25 mol/L NH_4OH反复洗涤,尽量洗去HAM上皮细胞,再用含抗生素的0.01 mol/L PBS(pH 7.2~7.4)反复洗涤后,将HAM捆扎于塑料聚酯环(直径38 mm)上,基膜面朝向环内,用无菌干棉球擦除残余HAM上皮面细胞(以HAM卷膜切片镜检无细胞为准),浸泡于a-MEM培养基中,于4℃保存备用[1]。

1.2 MSCs的分离、培养

采用本室建立的MSCs分离及体外扩增技术[2],分离、培养MSCs。本研究共抽取3只贵州小香猪(第三军医大学实验动物中心提供)的骨髓,该小香猪雌雄不拘,月龄3~6月,体重6~8 kg。

1.3 MSCs在HAM上的接种

将第2、3代MSCs以1.54×10^5个细胞/cm^2的密度接种到由聚酯环支撑的HAM的基质面,放入培养皿(直径60 mm)中,每个培养皿加入15 ml a-MEM(内含9%的胎牛血清),在37℃,8% CO_2,饱和湿度条件下培养。2 d后用0.01 mol/L PBS(pH7.2~7.4)洗涤,去除非粘附细胞,尔后每2~3 d更换一次培养液,最长培养18 d。

1.4 HAM负载MSCs的形态学观察

1.4.1 倒置显微镜下观察HAM负载MSCs的生长情况。

1.4.2 光镜观察 取培养8 d与18 d的MSCs HAM基质,用0.01 mol/L PBS(pH 7.2~7.4)洗涤2次,10%的中性甲醛固定30 min,80%乙醇固定5~10 min,常规HE(苏木精-伊红)直接或卷膜切片染色,二甲苯透明,中性树胶封固,显微镜下观察。

1.4.3 透射电镜观察 取培养8 d与18 d的MSCs HAM基质,用0.01 mol/L PBS(pH 7.2~7.4)洗涤2次,2.5%戊二醛磷酸缓冲液固定,再以1%锇酸后固定,逐级丙酮脱水,环氧树脂618包埋,醋酸铀-枸橼酸铅双重电子染色,LKB超薄切片机切片,JEM-2000EX型透射电镜60 kv观察、照相。

1.4.4 扫描电镜观察 取培养8 d与18 d的MSCs HAM基质,用0.01 mol/L PBS(pH 7.2~7.4)洗涤2次后,2.5%戊二醛磷酸缓冲液固定,0.1 mol/L PBS浸洗2次,每次5 min,梯度乙醇脱水,醋酸乙戊酯置换,临界点干燥,镀膜观察、照相。

1.5 HAM对不同种植密度MSCs的影响

将约1 ml MSCs以不同的密度(0.84×10^5, 1.54×10^5, 2.75×10^5个细胞/cm^2)分别接种到由聚酯环支撑的HAM的基质面,放入培养皿(直径60 mm)中进行培养,观察HAM基质对不同种植密度的MSCs生长的影响。

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:闫国和(1968-),男,四川省古蔺县人,硕士研究生,实验师,主要从事组织工程学方面的研究。电话:(023)68752278
收稿日期:2001-12-12;修回日期:2002-02-20

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

2 结果

2.1 HAM 的处理

HAM 经低浓度的氨水处理后经卷膜切片镜检已无细胞成分，处理后的 HAM 能负载 MSCs 良好地生长。

2.2 倒置显微镜下 HAM 负载 MSCs 生长的观察

MSCs 接种在 HAM 的基质面后很快贴附生长，30 min 内就可见到 MSCs 在 HAM 基质面上的贴附生长象。24 h 后可见几乎全部 MSCs 贴附生长，细胞活力好，折光度强，48 h 后融合为单层，第 4～18 天可见 MSCs 在 HAM 的基质面密集生长，细胞形态难以辨认。

2.3 光镜、电镜下 HAM 负载 MSCs 生长的观察

HAM 负载 MSCs 生长 8 d 直接 HE 染色可见 MSCs 在 HAM 的基质面呈放射状、漩涡状或平行生长，胞体较大，呈梭形，胞核居中、深染、大而清晰，细胞形态较为一致，见图 1。HAM 负载 MSCs 卷膜切片，HE 染色可见 MSCs 在 HAM 基质面牢固粘附生长，见图 2。

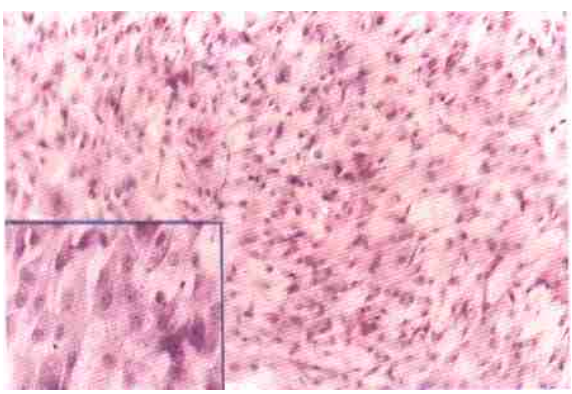


图 1 **HAM 负载 MSCs 生长 8 d，MSCs 已全部覆盖 HAM** （HE×33），插图为高倍像 （HE×66）

Fig 1 MSCs completely cover HAM 8 d after being loaded （HE×33） **Magnified picture(left lower)** （HE×66）

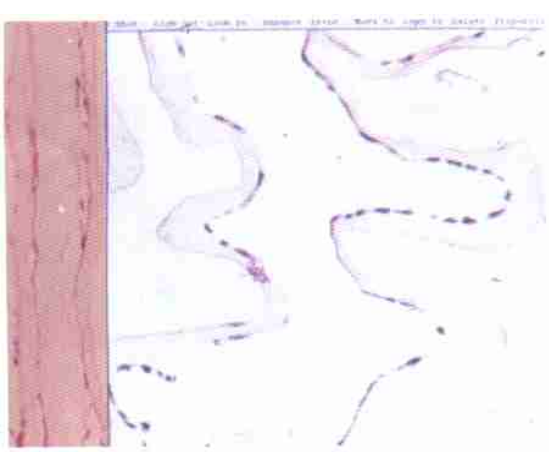


图 2 右：**HAM 负载 MSCs 8 d** 卷膜切片，**MSCs** 在 **HAM** 上良好生长（↑） （HE×33）左：去除上皮细胞的 **HAM** （HE×33）

Fig 2 MSCs（↑）growing fine on HAM 8 d after the breeding （Right, HE×33） **and HAM without epithelial cells** （Left, HE×33）

扫描电镜下，MSCs 在 HAM 的基质面生长 8 d，排列密度适中，胞体肥大呈不规则的长多边形扁平状，粗细突起丰富，部分突起相互连接交织成网，个别地方细胞边缘见重叠现象。胞膜形成突起牢固粘附于 HAM 基质上，见图 3。

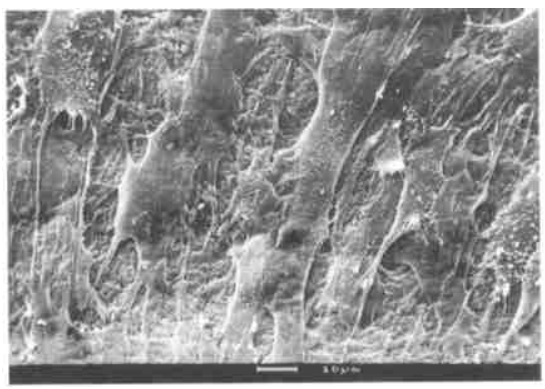


图 3 **HAM 负载 MSCs 8 d，MSCs 已全部覆盖 HAM，MSCs 胞体肥大呈多边形，多见胞膜突起 SEM 标尺＝100 μm**

Fig 3 MSCs covere HAM completely 8 d after the loading with large and polygon-like bodies and many processes （SEM Bar＝100 μm）

透射电镜下，MSCs 在 HAM 的基质面生长 8 d 切面，MSCs 在 HAM 上大多成双层生长，细胞呈长梭形，胞核两端胞质突起较长，互相重叠，染色质以常染色质为主，核仁明显，可见丰富细胞器，如粗面内质网，线粒体，见图 4。



图 4 **HAM 负载 MSCs 8 d，MSCs 与 HAM 粘附良好 TEM 标尺＝1 μm**

Fig 4 MSCs adhered tightly to HAM after being loaded for 8 d （TEM Bar＝1 μm）

2.4 HAM 促进不同种植密度的 MSCs 生长的比较性观察

将细胞以不同的密度接种在由聚酯环（直径 38 mm）支撑的 HAM 的基质面进行观察，观察 0～18 d。倒置显微镜下，以 0.84×10^5 个细胞/cm^2 的密度接种的 MSCs，细胞排列不规则、稀疏，间距大。以 1.54×10^5 个细胞/cm^2 的密度接种的 MSCs，细胞生长排列规则，密度适中，24 h 前细胞轮廓清楚，细胞活性好。以 2.75×10^5 个细胞/cm^2 的密度接种的 MSCs，细胞拥挤生长，12 h 后不见细胞轮廓，多见非贴附细胞，随时间的推移，细胞老化快，细胞碎屑多见。

光镜下可见，以 0.84×10^5 个细胞/cm^2 的密度接种的

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

MSCs 细胞稀疏散在, 间距较大, 胞核大, 深染。以 1.54× 10^5 个细胞/ cm^2 的密度接种的 MSCs 细胞排列有序呈放射状、漩涡状或平行生长, 间距适度。以 2.75× 10^5 个细胞/ cm^2 的密度接种的 MSCs, 细胞排列拥挤, 紊乱, 胞核密集深染。

扫描电镜下, 以 0.84× 10^5 个细胞/ cm^2 的密度接种的 MSCs 胞体肥大, 呈不规则的长多边形扁平状, 见粗细突起, 细胞间距大。以 1.54× 10^5 个细胞/ cm^2 的密度接种的 MSCs, 细胞密度适中, 胞体肥大, 呈不规则的长多边形扁平状, 粗细突起较多, 突起相互连接交织。细胞边缘有重叠现象。以 2.75× 10^5 个细胞/ cm^2 的密度接种的 MSCs, 细胞拥挤重叠生长, 周围突起不明显, 边缘卷折, 细胞碎屑多见。

3　讨论

皮肤组织工程(Tissue engineering, TE)的第一步是选择种子细胞。近年来, 尽管人们已成功应用自体成熟细胞, 如成纤维细胞和角质细胞来修复皮肤缺损。但 MSCs 与这些分化细胞相比具有更大的优势, 因在体外培养过程中, MSCs 可以保持未分化表型不断增殖, 达到所需数目, 然后经诱导可分化为所需表型, 这些表型包括脂肪细胞、内皮细胞、成骨细胞、软骨细胞、成肌细胞、成纤维细胞、肌腱、韧带等多种间充质来源的细胞[3~6], 而已分化细胞来源有限, 在体外培养时, 增殖速度慢, 且存在去分化问题。再者, MSCs 易于从骨髓中分离获得, 而避免了通过手术从病人自身获取成熟细胞所造成的二次损伤。因此, 可选择体外培养增殖的 MSCs 作为 TE 的种子细胞, 用以修复皮肤组织缺损。

TE 的第二步是要选择并处理合适的细胞外基质(Extra cellular matrix, ECM)材料作细胞支架。目前在组织工程中用作细胞支架的生物材料主要是一些天然高分子、天然无机物和合成高分子。天然高分子及天然无机物一般都具有无毒、亲水性、生物相容性及细胞亲和性好的特点。合成高分子的生物相容性及细胞亲和性一般不如天然高分子[7]。HAM 是一种天然高分子生物材料, 含胶原、糖蛋白、蛋白多糖、整合素和板层体等多种成分, 它表达多种生长因子及其 mRNA 的相关蛋白, 能为细胞的增殖、分化提供丰富的营养成分, 有利于细胞的生长繁殖[8], 因此, 本研究选用 HAM 作 TE 的 ECM。

HAM 经低浓度的氨水处理后其细胞成分已不复存在, 如此处理的 HAM 能消除 HAM 上皮细胞成分的免疫源性, 有利于 MSCs 在其上良好生长, HAM 是 MSCs 的良好载体。

从骨髓中分离出的 MSCs, 经原代培养扩增, 传至第 2 代或 3 代获得足够量的细胞后, 就可种植于 HAM 基质面。从 HAM 负载不同接种密度(0.84× 10^5, 1.54× 10^5, 2.75× 10^5 个细胞/ cm^2)的 MSCs 生长 8 d 的结果显示, MSCs 要在羊膜上良好生长, 需要合适的接种密度, 接种密度过大, MSCs 缺乏应有的生存空间, 非贴附和死亡细胞增多, 接种密度过小, 细胞间间隙过大, 细胞因缺乏应有的相互接触而不能良好生长。本实验结果说明合适的接种密度为 1.54× 10^5 个细胞/ cm^2。MSCs 接种在羊膜的基质面后很快贴附生长。24 h 可见几乎全部 MSCs 贴附生长, 细胞活力好, 折光度强, 48 h 融合为单层, 第 4~18 天可见 MSCs 在羊膜的基质面密集生长。羊膜负载 MSCs 生长 8 d, MSCs 呈放射状、漩涡状或平行生长, 胞体肥大呈不规则的长多边形扁平状, 胞膜粗细突起丰富, 部分突起相互连接交织成网, 突起牢固粘附于 HAM 基质面, 见图 1, 3, 4, 而羊膜负载 MSCs 18 d 呈复层生长, 细胞因过于拥挤而隆起, 细胞因老化而形成较多碎片, 部分细胞有空洞形成。这些特点提示 HAM 能负载合适密度的 MSCs 生长形成复合物, 所形成的复合物符合真皮替代物的特性, 适宜移植, 并且将该复合物移植到创面局部需要选择合适的移植时间, 移植时间过早, 因细胞未在羊膜上牢固粘附, 在进行移植手术时, 细胞会脱落, 移植时间过晚, 细胞虽在羊膜上牢固粘附, 但细胞会因老化而使修复组织的能力大大降低。

本实验采用 HAM 负载 MSCs 进行培养, 观察了 MSCs 在 HAM 基质面的生长变化情况, 以此对运用 HAM 负载 MSCs 构建真皮替代物进行了探讨。将进一步研究把运用 HAM 负载 MSCs 所构建的真皮替代物移植到难愈性创面局部, 以期此替代物能有效促进该创面的愈合。

参考文献:

[1] Goto Y, Noguchi Y, Nomura A, *et al*. *In vitro* reconstitution of the tracheal epithelium[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999, 20(2): 312—318.

[2] 艾国平, 粟永萍, 闫国和, 等. 骨髓间充质干细胞的分离与培养[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(5): 553—555.

[3] Williams J T, Southerland S S, Souza J, *et al*. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes[J]. Amer Surg, 1999, 65(1): 22—26.

[4] 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.

[5] 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: 700—709.

[6] Horwitz E M, Prockop D J, Fitzpatrick L A, *et al*. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta[J]. Nat Med, 1999, 5(3): 309—313.

[7] 王身国. 可生物降解高分子的类型、合成和应用[J]. 化学通报, 1997, 15(2): 45—47.

[8] Koizumi N J, Inatomi T J, Sotozono C J, *et al*. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane[J]. Curr Eye Res, 2000, 20(3): 173—177.

(编辑　陈聪连)

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