DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.01.025
第24卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 1
58 2002年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)01-0058-04

小鼠骨髓间质干细胞的生物学特点及分化潜能鉴定

周进明[1],邹仲敏[1],郭朝华[1],何 颖[2],张 勇[1],王 劲[1],王 蒙[1],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521医院,白城 137001)

提 要:目的 建立一种体外分离、培养和鉴定小鼠骨髓间质干细胞的方法,探讨体外培养中间质干细胞的一些生物学特点,为利用MSCs促进创伤修复提供实验基础。方法 分离5~6周龄的小鼠胫骨、股骨,用预冷的IMDM培养基冲洗出骨髓,经密度梯度离心得到骨髓单个核细胞,接种后12~16 d形成单层贴壁的成纤维状细胞。体外多向诱导分化鉴定分离的细胞,用传代的细胞进行生长曲线的测定、观察其接种贴壁率、检测细胞周期和超微结构。结果 体外传代培养的MSCs具有分化形成成骨和成脂细胞的能力;MSCs倍增时间约为38 h,传代后12 h贴壁达90%以上,细胞周期显示有80%细胞处于G_0/G_1期,并用电镜照片显示其超微结构。结论 在本实验条件下,体外培养的MSCs具有多向分化潜能,体外生长稳定,传代后的细胞适应性强,增殖较快,超微结构和细胞周期表现出较早期细胞特点。可望用于自体创伤促愈。

关键词:骨髓间质干细胞;细胞培养;骨髓分化潜能
中图法分类号:R-331;R329.24 文献标识码:A

Biological properties and multipotential differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells *in vitro*

ZHOU Jin-ming, ZOU Zhong-min, GUO Chao-hua, HE Ying, ZHANG Yong, WANG Jin, WANG Meng, 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 of isolating, culturing and identifying rat bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) *in vitro* and explore their biological properties in order to provide an experimental foundation for applying MSCs to trauma repair. Methods After the tibias and femurs were dissected from 5- to 6-week-old rats, the marrow was flushed out with ice-cold IMDM medium. The mononuclear cells of the marrow were obtained with density gradient centrifugation and then plated and cultured in IMDM medium. The cultured cells *in vitro* were identified with their multipotential differentiation. And the growth curve, adhensive rate, cell cycle and ultrastructures of passaged cells were observed. Results The adherent, fibroblast-shaped cells approached confluence in single layer 12~16 d after plating. The cultured MSCs *in vitro* differentiated into osteoblasts and lipoblasts. The double time of MSCs was about 38 h. More than 90% of subcultured MSCs were adhesive in 12 h. The cell cycle analysis showed that 80% of MSCs was in G0/G1 phase. The ultrastructures of MSCs demonstrated the features of infantile cells. Conclusion The subcultured MSCs possess multipotential differentiation. MSCs show stable growth *in vitro*, easy survival in the subculture and rapid proliferation in present culture condition. And MSCs also exhibit infantility in its ultrastructures and cell cycle. MSCs may be used in the healing of autogeneous trauma.

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

多年以来,人们对骨髓的研究主要集中在造血干细胞上,并取得了可喜的研究成果。但是现在人们逐渐认识到骨髓除了有造血干细胞以外,还存在一类来源于中胚层的未分化的间充质细胞(Mesenchymal cells),它具有能够分化形成至少7种组织细胞如成骨细胞、成软骨细胞、成脂细胞、成肌细胞、骨髓基质细胞等组织细胞的潜能,所以又被称为骨髓间质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)[1]。如同多能造血干细胞的存在赋予骨髓组织强大的造血功能以维持血液系统的新陈代谢一样,多潜能的MSCs存在为骨、软骨、肌肉等结缔组织的损伤修复提供了潜在的修复细胞来源。研究和利用MSCs可能为促进创伤修复提供一条新的途径。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

IMDM培养基(Hyclone, USA),10%优质胎牛血清(Hyclone, USA),胰酶(Hyclone, USA),Percoll、地塞米松、β-磷酸甘油、维生素C、胰岛素、吲哚美辛以及IBMX等均购自Sigma公司

1.2 实验动物

BALB/C小鼠,6~8周龄,雌雄不拘(第三军医大学实验动物中心提供)。

1.3 小鼠骨髓MSCs的体外分离培养

将小鼠脱臼处死后置于75%酒精浸泡约5 min,无菌条件下分离出小鼠的股骨和胫骨。用注射器冲出骨髓后,将骨髓液依次经7号和4号针头吹打,制成单细胞悬液备用。然后缓慢

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:周进明(1974-),男,四川省蒲江县人,硕士,医师,主要从事骨髓间质干细胞应用基础方面的研究。电话:(023)68752000-71552
收稿日期:2001-04-16;修回日期:2001-06-14

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

将单细胞悬液注入预先加有密度为 1.082 的 Percoll 细胞分离液的试管中, 4 ℃ 500× g 离心 30 min, 取中间的单个核细胞层, 以 PBS 清洗 2 次, 以 1.5× 10^5 /cm^2 的密度接种于 IMDM 培养基(含青、链霉素各 100 U/ml, 胎牛血清 10%), 置于 5% CO_2 饱和湿度 37 ℃培养。1 d 后更换培养基, 去掉非贴壁细胞, 以后每 3、4 d 换液 1 次。12~16 d 细胞生长融合, 0.25%的胰酶消化, 以 6× 10^3 /cm^2 的密度传代培养。选取生长良好的 1、2、3 代细胞进行下列实验。

1.4　培养细胞的诱导分化鉴定

①成骨诱导培养: 细胞传代后加入诱导剂包括 0.1 μmol/L 的地塞米松(Dex)、50 μg/ml 的抗坏血酸(Vc), 10 mmol/L β-磷酸甘油(β-GP)进行联合诱导培养; ②成脂诱导分化: 细胞接种在正常培养体系中 3~7 d, 细胞接近融合后; 加入诱导性培养基包括 1 μmol/L 的地塞米松(Dex)、0.5 mmol/L IBMX、10 μg/ml 胰岛素、100 μg/ml 吲哚美辛和 10%FBS, 继续培养 48~72 h; 换加维持培养基包括 10 μg/ml 胰岛素、10%FBS 维持培养 24 h; 可重复以上步骤至出现脂滴。

1.5　骨髓 MSCs 的生长曲线测定

制备单细胞悬液, 计数, 调整细胞浓度为 1× 10^4 /ml, 接种 96 孔培养板, 每孔 200 μl。从第 2 天起行 MTT 比色法测定生长曲线。取各时相点吸光度的平均值, 以时间(d)为横坐标, 吸光度(表示细胞相对数量)为纵坐标, 绘制生长曲线。

1.6　骨髓 MSCs 贴壁率检测

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%

1.7　骨髓 MSCs 细胞周期检测

取传代生长良好的细胞, 消化后制作细胞悬液, 4 ℃预冷的 70%乙醇固定 30 min, 预冷 PBS 漂洗离心, 37 ℃ 1 mg/ml 的 RNAseA 处理 30 min, 离心; 加入 10 mg/ml 碘化丙啶(PI) 0.5 ml 4 ℃避光染色 30 min; 流式细胞仪 488 nm 检测。

1.8　透射电镜观察骨髓 MSCs 的超微结构

传代生长良好的细胞, 0.25%的胰酶消化, PBS 清洗离心后, 预冷的 2%戊二醛固定, 透射电镜标本, 观察。

2　结果

2.1　原代培养过程中

在接种 24 h 后可见成纤维状的细胞以散在的方式贴壁, 2~3 d 就可见一些集落形成, 7~10 d 后集落迅速增多, 并且逐渐长大融合成片。其基本上为梭形的成纤维细胞状形态, 但是也可见一些内皮样细胞, 见图 1。随着集落生长的不断扩大而融合为单层。传代培养后细胞不再以成集落的方式生长, 而是呈均匀分布生长。

2.2　培养细胞的分化鉴定

在成骨诱导过程中检测成骨细胞的标志碱性磷酸酶(ALP), 钙-钴法行 ALP 染色, 14 d 时不明显, 在 21 d 可见阳性细胞胞浆中出现灰黑色颗粒沉淀, 见图 2; 在成脂诱导培养液中培养的细胞, 逐渐变圆, 18 d 左右在一些细胞的核周出现折光性强的脂肪小滴, 逐渐增多并融合成大脂肪滴, 见图 3。



图 1　原代培养 14 d 的 MSCs　(× 40)

Fig 1　MSCs after 14 d of primary culture　(× 40)



图 2　成骨诱导细胞表达 ALP　(× 200)

Fig 2　MSCs cultured in the medium containing osteogenic supplements expressing alkaline phosphatase(ALP)　(× 200)



图 3　成脂诱导细胞形成脂滴　(× 200)

Fig 3　Lipid vacuoles in the cells cultured in the medium containing adipogenic supplements　(× 200)

2.3　生长曲线

在实验中发现 1、2、3 代细胞的生长曲线基本是相同的。在接种后的第 1 和 2 天, 吸光度值变化不大, 且比第 1 天还稍微有所减少, 为细胞的潜伏适应期。从第 3 天起细胞大量增加, 第 5 天达顶点, 第 6 天时有所减少。根据生长曲线始末两点之间 A 值的变化, 按照以下公式计算细胞数相对 A 值的倍增时间: DT= t× lg2/(lgN_t-lgN_0)= 38 h。

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

2.4 细胞贴壁率

所检测的3代细胞贴壁率没有明显的差异，消化传代后细胞贴壁较快，在4 h时，约有65%的细胞贴壁，而到12 h时90%以上的细胞已经贴壁。

2.5 细胞周期

流式细胞仪结果显示：MSCs中S+G_2+M的细胞约占20%，而处于G_0/G_1期的细胞为80%，即静止期细胞。在上述培养条件下，只有少数的细胞处于活跃的增殖期，见图4。

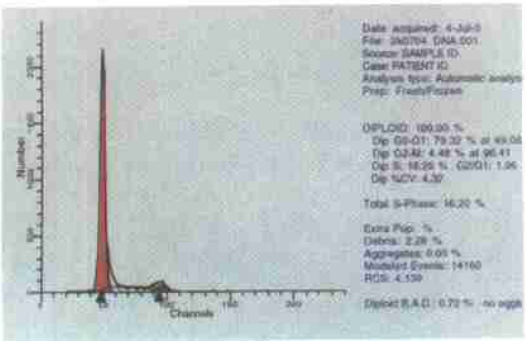


图4 MSCs细胞周期

Fig 4 Cell cycle of MSCs

2.6 超微结构观察

体外培养的骨髓MSCs，透射电镜观察其胞浆较少细胞器不发达，胞核较大，以常染色质为主，核仁明显，偶尔还可见处于分裂期的细胞，表现出早期细胞特点，见图5。



图5 MSCs的超微结构 （TEM×6 000）

Fig 5 Ultrastructure of MSCs （TEM×6 000）

3 讨论

干细胞是指那些具有高度增殖和自我更新能力，并可以分化为两种以上不同类型组织细胞的细胞。近年来，研究人员相继在成熟高等动物包括人的神经组织、肌肉组织、骨髓、皮肤和外周血等多种不同组织中发现存在着多能干细胞，可以向不同类型组织细胞分化，如神经干细胞和肌肉干细胞可分化为造血细胞等[2]。由于Freidenstein等[3]人的开创性工作，发现在成年个体的骨髓中存在一定数量的MSCs，能够分化形成多种中胚层组织，包括骨、软骨、肌腱、肌肉脂肪组织以及骨髓基质结缔组织，而且注射入脑后，还能分化为神经细胞[4]。因为骨髓取材方便容易，由骨髓分离扩增的MSCs进行移植时，不存在免疫排斥的问题，所以骨髓MSCs的研究受到广泛的关注。

骨髓中MSCs的含量很低，约为0.001%～0.01%左右[1]，要利用MSCs就必需实现MSCs的体外分离培养扩增。参照Pereira等[5]贴壁分离骨髓MSCs方法，在我们的实验中，采用密度梯度分离和贴壁培养相结合的方法进行。利用Percoll将大部分的造血细胞和单个核细胞分离开来，再经过体外贴壁培养换液去除悬浮生长的造血细胞，与单纯的贴壁培养相比获得均一性更高MSCs。体外分离培养的细胞是否为骨髓MSCs，目前还没有比较好鉴定方法。在本实验中，采用地塞米松、β-磷酸甘油和维生素C联合诱导培养细胞向成骨细胞分化和地塞米松、IBMX、胰岛素以及吲哚美辛的诱导细胞向脂肪分化[1,6]，结果诱导培养的细胞分别表达ALP和脂肪，表明我们分离的细胞能够分化形成成骨细胞和成脂细胞，具有多向分化的潜能，是骨髓中的多能干细胞-间质干细胞(MSCs)；而且分化鉴定结果也表明经过体外多次传代后MSCs仍然保持其多向分化的能力，可作为细胞治疗和组织工程的种子细胞，具有重要的应用前景。体外培养的原代MSCs结果显示，在体外条件下，MSCs经历了生长缓滞期、对数增殖期和平台期。3代细胞的生长曲线表明，传代后MSCs的增殖速度加快。由其贴壁实验发现传代的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，在我们的培养条件下，只有少数的细胞处于活跃的增殖期。其超微结构也显示我们分离培养的MSCs是属于较早期的细胞，是一种生物年龄比成年动物体细胞更年轻的细胞。

理论上MSCs可以分化为所有的中胚层起源的组织细胞。于是Bruder等[7]提出了用自体MSCs来修复肌肉骨骼系统的组织创伤缺损的设想。而且研究者开始用MSCs来修复肌腱的缺损和纠正一些遗传性疾病，并取得了一定进展[8,9]。我们希望在建立MSCs的体外培养和鉴定方法的基础上，探讨应用定向诱导和转基因的MSCs作为种子细胞，参与难愈性创伤的肌肉骨骼修复的可行性。

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.

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

[2] Jackson K A, Mi T, Goodell M A. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(25): 14 482—14 486.
[3] Friedenstein A J, Gorskaja J F, Kulagina N N. Fibroblast precursors in normal and irradicated mouse hematopoietic organs[J]. Exp Hematol, 1976, 4(5): 267—274.
[4] Kopen G C, Prockop D J, Phinney D G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(19): 10 711—10 716.
[5] Pereira R F, Halford K W, O' Hara M D. *et al*. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice[J]. Proc Nat Acad of Sci, USA, 1995, 92(11): 4 857—4 861.
[6] Kadiyala S, Young R G, Thiede M A, *et al* Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro [J]. Cell Transplant, 1997, 6(2): 125—134.
[7] 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): 155—162.
[8] Awad H A, Butler D L, Boivin G P, *et al*. Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon[J]. Tissue Eng, 1999, 5(3): 267—277.
[9] 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.

（编辑 谢义霞）

文章编号: 1000-5404(2002)02-0061-01

个案与短篇

全血有形成份减少与感染关系的临床分析

Clinical analysis of the relation between all hemogram reduction in ahole blood and infection

王 劲, 张 荷, 洪 林, 许利民 （第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所血液内科, 重庆 400042）

全血有形成份减少包括外周血液中白细胞、红细胞、血小板低于正常, 常见于急性白血病、再障、恶性组织细胞病等; 部分非血液系疾病如结缔组织病、感染等在病程中亦可出现, 导致误诊, 其机制不清。1988—2000 年收治了 19 名因感染致全血有形成份降低患者, 其临床特点如下。

1 临床资料

病例: 男性 7 名, 女性 12 名, 年龄 15～51 岁, 平均 36.4 岁, 中位年龄 33 岁。

临床症状: 发热 16/19; 头昏、乏力 10/19; 出血 2/19。

辅助检查: 经血培养、骨髓穿刺、骨髓培养、外斐氏、肥大氏反应等诊断伤寒 8 例, 结核 7 例(其中血源播散型 1 例、双肺浸润型 3 例、粟粒型 2 例, 结核性腹膜炎 1 例), 败血症 3 例(其中血培养 2 例为金黄色葡萄球菌感染、1 例为肺炎双球菌感染); 亚急性感染性心内膜炎 1 例。

8 例结核患者粒系形态比例大致正常, 浆内可见颗粒增多, 单核细胞比例增高, NAP(碱性磷酸酶)积分正常; 伤寒患者粒系虽增生, 但杆状及分叶核粒细胞成熟受阻, 胞浆颗粒增多有空泡, 核质疏松, 红系增生活跃或下降, 胞浆量减少, 核分叶呈现花瓣型, 巨核细胞可见核分叶、破碎改变, 有吞噬型网状细胞; 败血症患者中性晚幼粒、杆状粒细胞比例增高, 分叶粒细胞比例下降, 浆内有空泡及中毒样颗粒, NAP 积分明显增高, 阳性率 100%。

治疗: 主要行抗痨、抗感染及输成分血等支持治疗。部分骨髓增生重度低下者予造血生长因子如 G-CSF 治疗, 除 1 例结核、1 例败血症患者因病情过重而死亡外, 其余病人血象恢复。

2 讨论

各类感染引起全血有形成份减少程度不一, 有以下特点: 多为中青年; 主要为伤寒及结核; 以发热及贫血为主症; 骨髓象并无三系同时增生重度减低等再障样改变, 亦不考虑造血功能停滞[1]。

结核病血象表现多为粒细胞的轻度增多或降低, 病程较长者有轻度贫血[2]。7 例结核病均系"重症结核", 其中 1 例三系重度低下, 有皮肤、齿龈出血, 骨髓中少数有形态的改变; 单核细胞的增多提示结核的程度较重, 结核菌毒素大量释放。血象改变机制可能与以下因素有关: ①骨髓受毒性作用, 粒细胞储备功能下降; ②细胞生长及释放功能受抑, 尤其结核以渗出坏死改变为主时, 机体免疫力下降, 不能形成肉芽肿类的增生性病变, 临床称之为"无效反应性结核病", 常见于重症结核, 此类型可伴发全血细胞下降, 甚至可发展为骨髓纤维化, 再障[3], 发病原理与结核毒素直接作用有关, 治疗效果欠佳。伤寒以发热及白细胞减少为主要表现, 与内毒素作用有关[4], 其中 6 例白细胞呈中重度降低, 1 例全血极重度降低, 骨髓象中表现出机体的应激反应, 网状细胞增生, 三系均有中毒样改变, 说明毒素作用较重, 而感染同时可引起粒系的成熟受阻, 多种因素作用下, 造成全血象降低。细菌性感染一般为粒细胞的炎症性增高, NAP 积分及阳性率均增高。其反应常取决于细菌毒力、感染范围及患者反应能力。败血症可致中性粒细胞连续消耗性减少, 核象左移, 血中出现中、晚幼粒细胞, 提示骨髓粒细胞贮存耗竭和预后不良, 当粒细胞消耗超过骨髓生成能力时, 血象反而减低, 但这并不说明感染程度减轻。3 例败血症病人, 粒系重度降低, 中度的贫血和血小板减少, 骨髓象示粒系成熟受阻, 中毒样改变, NAP 积分增高, 提示感染严重。感染性心内膜炎有进行

（下转 65 页）

作者简介: 王 劲(1968—), 男, 四川省内江市人, 博士研究生, 主治医师, 讲师, 主要从事血液病诊治及干细胞方面的研究, 发表论文 10 篇。电话: (023)68752355

收稿日期: 2000-02-29; 修回日期: 2001-10-22

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