DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.05.029
第23卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 5
2001年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2001

文章编号:1000-5404(2001)05-0553-03

论著

骨髓间充质干细胞的分离与培养

艾国平,粟永萍,闫国和,冉新泽,刘晓宏,罗成基,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 摸索体外分离培养骨髓间充质干细胞的最佳条件,并观察其部分生物学活性。方法 采用常规的细胞培养传代技术以及光、电镜技术和细胞增殖活性检测法,观察不同贴壁时间、不同浓度血清、不同种植密度对骨髓间充质干细胞生长、增殖、形态的影响,并观察培养细胞的部分生物学特性。结果 以选用4~24 h贴壁的有核细胞,加入5%~10%胎牛血清、种植密度(4~8)×10^4个/ml的培养条件为最适宜细胞生长;在此条件下,培养扩增的细胞仍具有干细胞多向分化性;其形态呈梭状,具有快速增殖的能力;培养细胞在3~4 d进入对数生长期,随后进入平台期,分裂相细胞明显减少;光镜下细胞呈梭状或类成纤维状,2~10代的细胞呈均质状;超微结构显示为早期幼稚细胞形态。结论 建立了骨髓间充质干细胞体外分离、培养的条件,探讨了骨髓间充质干细胞部分生物学特性,为进一步深入研究骨髓间充质干细胞的诱导分化和应用打下基础。

关键词:骨髓间充质干细胞;组织工程学
中图法分类号:R329.2 文献标识码:A

Cultivation and isolation of the bone marrow mesenchymal stem cells

AI Guo-ping, SU Yong-ping, YAN Guo-he, RAN Xing-ze, LIU Xiao-hong, LUO Cheng-ji, CHENG Tian-min (Department of Radiation Medicine, Institute of Combined Injury of PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe some biological features of bone marrow mesenchymal stem cells and explore the best conditions for isolating and culturing *in vitro*. Methods Common cell culture technique, light and electron microscopy were used to study the effects of the growth, proliferation, morphology of the bone marrow mesenchymal stem cells in different adherent time, concentration of serum and cell density. Results The best culture condition *in vitro* for growth was 4—24 hours adherent time, 5%—10% fetal bovine serum, (4—8)×10^4/ml cell density. The cells were spindle in shape and had a strong ability of proliferation. The time for cell duplication was 3 to 4 days. The cells showed the characteristics of stem cells in electron microscope. Conclusion The best condition for isolation and culture of bone marrow mesemchymal stem cells was successfully established and some biological features were obserred. It found a base for further investigation and using of mesenchymal stem cells.

Key words: mesenchymal stem cell; tissue engineering

干细胞是近年来研究的热点,骨髓中除造血干细胞以外,还含有另一类干细胞—间充质干细胞(Mesenchymal stem cell,MSC),在不同的诱导条件下,具有向中胚层和神经外胚层组织细胞分化的能力,如向成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞、成纤维细胞、内皮细胞、神经细胞及支持造血的基质细胞等分化的能力[1,2]。随着细胞工程学和组织工程学的发展,利用干细胞的多向分化性,选择合适的生物材料和有靶向性目的基因,已有报道MSC在骨、软骨、肌腱和神经胶质修复中的作用[3,4],国内在这方面的工作尚处于起步阶段。本实验旨在摸索体外分离培养骨髓间充质干细胞的最佳条件,为进一步研究骨髓间充质干细胞的诱导分化和应用打下基础。

1 材料与方法

1.1 骨髓MSC的分离

从胸骨无菌抽取约1~2 ml的骨髓,肝素化后,加入红细胞裂解液5 ml,混匀,1 200 r/min,离心10 min;弃上清,用0.01 mol/L的PBS(pH 7.2)洗2~3次,1 200 r/min,各离心10 min;计数,以2×10^9/ml种入10% FBS α-MEM培养基,青霉素100 U/ml、链霉素100 μg/ml,37 ℃,5% CO_2孵箱中培养;不同时相点弃悬浮细胞,用0.01 mol/L PBS(pH 7.2)尽量轻轻洗去未贴壁的细胞,加入含10%FBS α-MEM培养基。

1.2 不同贴壁时间对MSC增殖的影响

选用贴壁后1、2、3、4、6、8、12、24、48、72 h的细胞进行传代培养,观察不同时间贴壁的细胞传代、增殖能力及形态学的变化。

1.3 不同浓度胎牛血清(FBS)对MSC生长的影响

细胞按4×10^4/ml种入96孔培养板中,分别加入以下FBS浓度的α-MEM培养基:0%、1%、2.5%、5%、7.5%、10%、12.5%、15%、17.5%、20%,每个浓度6孔;培养48 h后,加入20 μl MTT(5 mg/ml二苯基四氮唑溴盐),37 ℃避光培养4 h;尽量吸掉上清液,加入150 μl二甲基亚砜,室温振荡10 min,HT-7000 plus多孔读数仪490 nm处读取D_{490}值,以培养液作空白对照。

1.4 比较不同种植密度对MSC生长的影响

用含10%FBS的α-MEM培养基;细胞按以下密度(×10^4/ml):0.3、0.6、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0种入96孔培养板中,每一密度6孔;培养48 h后,按上述方法测其D_{490}值。

1.5 培养细胞生长曲线

细胞按0.5×10^4/ml种入24孔培养板,每孔培养液为1 ml,每天取3孔测其D_{490}值,连续测8 d,绘出培养细胞生长曲线。

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(G1999054205)
作者简介:艾国平(1969—),女,四川省隆昌县人,博士研究生,讲师,主要从事组织工程学方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68752355
收稿日期:2001-01-26;修回日期:2001-03-18

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

1.6 培养细胞分裂指数曲线

按检测细胞生长曲线的细胞密度接种于放有小盖玻片的24孔培养板中，每24 h取出3块小玻片，连续8 d；用95%酒精固定，HE染色、封片。对每一时间组细胞进行计数，算出1 000个细胞中分裂相细胞的百分比。

1.7 MSC的形态学观察

在倒置显微镜下，直接观察第2、4、8代MSC的活体形态；并分别用光镜及透射电镜观察其形态结构。

1.8 统计学分析

用哈佛统计软件，进行单因素方差分析及均数间的显著性差异检验，用Microsoft Excel作图。

2 结果

2.1 不同贴壁时间对MSC的影响

通过对不同时间贴壁细胞进行传代培养和细胞形态学观察，本研究认为以选用4～24 h贴壁的细胞进行培养最合适；选用贴壁过早的细胞(1～3 h)，因贴壁细胞数量太少，细胞生长困难；选用贴壁过长的细胞(超过48 h)，在倒置显微镜下可见大量造血细胞粘附在贴壁细胞上面呈集落生长，随着培养时间的延长，贴壁细胞形态出现多样性，细胞传代周期延长，易出现细胞老化等现象。

2.2 不同浓度血清对MSC生长的影响

细胞增殖能力在5%～10%的胎牛血清浓度最适宜MSC生长，与其它各组比较，差异有显著性($P<0.05$)，见图1。

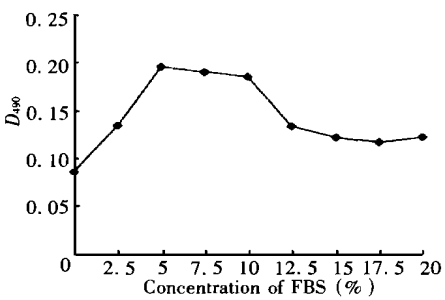


图1 不同浓度的血清对MSC生长的影响

Fig 1 Effects of different serum concentration MSC on the of growth

2.3 不同种植密度对MSC生长的影响

细胞与细胞之间存在着相互抑制的关系，细胞种植密度的多少将影响细胞生长；在一定范围内，MTT的参入随细胞数量增加而增高，以(4～8)×10^4/ml的细胞数进行种植最利于细胞生长，见图2。

2.4 培养细胞生长曲线

培养细胞在种植后1～3 d为生长滞留期，第4天达到对数生长期，以后进入到平台期，见图3。

2.5 细胞分裂指数曲线

细胞分裂指数曲线的趋势与生长曲线基本类似，在达到对数生长期后，分裂相的细胞明显减少，见图4。

2.6 培养不同代细胞的显微观察

体外培养的第2、4、8代人MSC细胞形态呈梭形状，较均一，胞体细长，前10代细胞传代周期为3～4 d，以后生长速度逐渐减慢，见图5。

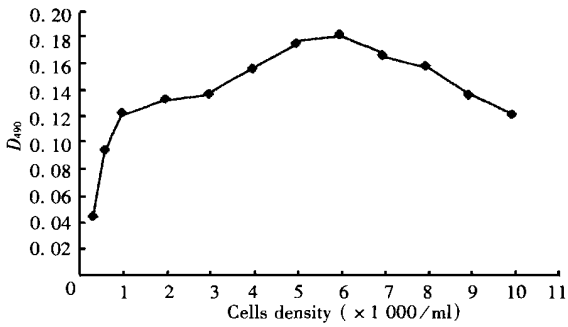


图2 不同种植密度对MSC生长的影响

Fig 2 Effects of different cells density on the growth of MSC

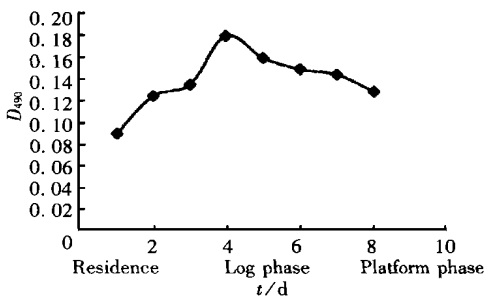


图3 MSC生长曲线

Fig 3 Growth curve of MSC

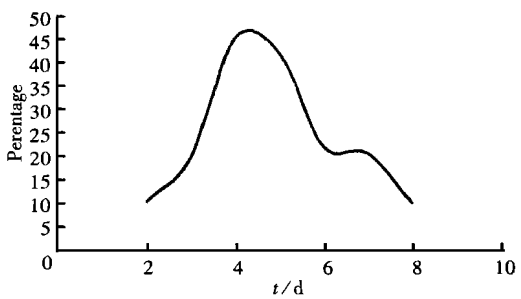


图4 MSC分裂指数曲线

Fig 4 Curve of MSC mitotic index

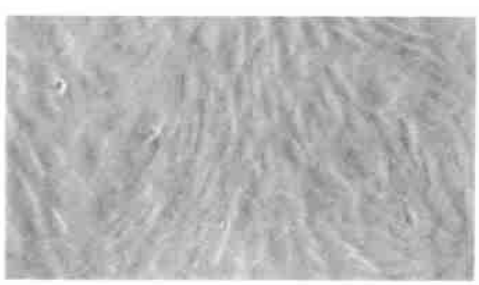


图5 倒置显微镜下培养的MSC呈梭状 (×100)

Fig 5 Spindle shaped MSC under inverted microscope (×100)

HE染色光镜观察，细胞形态呈梭形状，胞核着深蓝色，胞浆着浅红色，未见纤维丝等结构，各代之间形态较一致。

透射电镜观察提示该细胞为较幼稚的细胞，细胞核较大，

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

核形状多样, 以圆、类圆形细胞为主; 染色质分布稀疏、电子密度较低; 胞浆细胞器少, 线粒体、高尔基器、内质网等不发达, 未见纤维丝, 见图 6。

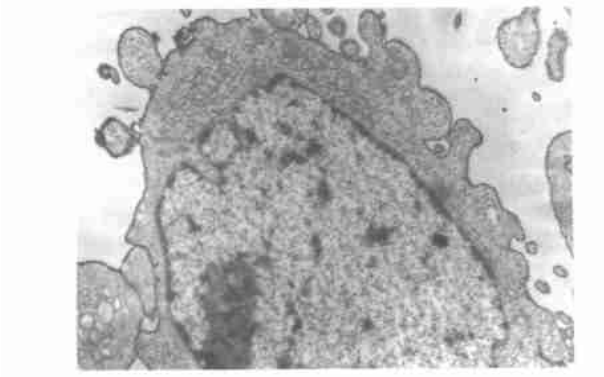


图 6　电镜下见细胞表面有许多胞质突起(CP), MSC 核大, 染色质分布弥散, 电子密度较低, 胞浆细胞器少, 不发达 (TEM× 5 000)

Fig 6　Cell surface irregular, many cytoplasmic protuberances were found on the cell surface. Nucleas large and irregular in shape, chromatin poorly stained and doffusely distributed oraanelles poorly developed (TEM× 5 000)

3　讨论

间充质干细胞来源于中胚层, 具有很强的自我复制能力, 能产生具有各种表型的子代细胞, 在不同的诱导条件下可形成骨、软骨组织、脂肪、肌肉、肌腱以及骨髓基质结缔组织细胞等, 分布在全身各结缔组织中, 以骨髓和脐血中含量最为丰富。随着组织细胞工程学和基因工程学的发展, 利用 MSC 的多向分化潜能, 在组织工程、细胞因子替代治疗、基因治疗中以及器官移植等方面的应用研究已成为研究热点[5,6]。由于间充质干细胞的数量少, 成人骨髓平均 10 万个有核细胞中含有 1 个, 并随着年龄的增加, 细胞数量逐渐减少[7]; 生理状态下 20%为静止期细胞[8]。因此, 如何摸索一个体外适宜 MSC 生长扩增而又不分化的培养条件, 对进一步研究 MSC 生物学特性和诱导分化尤其重要。

我们利用人源性胸骨骨髓, 通过离心去除抗凝骨髓血的血浆成份, 经饱和 NH_4Cl 溶液裂解红细胞, 利用造血细胞悬浮生长特点, 比较了不同时间贴壁细胞的生长增殖和形态的变化, 认为以选用早期贴壁——4 ~ 24 h 贴壁细胞进行培养最合适。选用贴壁过早的细胞, 因细胞数量太少, 细胞生长困难; 选用贴壁过长的细胞(超过 48 h), 在倒置显微镜下可见大量造血细胞粘附在贴壁细胞上面, 并呈集落生长, 随着培养时间的延长, 贴壁细胞形态出现多样性, 细胞增殖周期延长, 这可能与造血细胞分泌的细胞因子促进细胞分化有关。体外培养细胞还受培养血清的浓度、种植细胞的密度、培养的温度、培养基的 pH 值等等。在选用早期贴壁细胞的基础上, 比较了不同浓度的血清和不同细胞种植密度对细胞生长增殖的影响, 结果显示并非血清浓度越高就能促进细胞生长, 高浓度血清中由于含有大量促进细胞生长增殖分化的因子, 易引起细胞增殖分化, 使细胞过早出现老化, 反而不利于干细胞的生长; 细胞生长还受细胞与细胞之间相互作用的影响, 细胞种植密度过密, 会引起细胞之间的接触抑制, 过稀会导致细胞之间分泌的细胞因子不足影响细胞的生长, 骨髓间充质干细胞能分泌 IL-6、IL-7、IL-8、IL-11、G-CSF、DSF、SCF 等[8]多种细胞因子, 对支持造血和维持细胞生长分化十分重要。

利用本实验条件培养细胞已培养 14 代, 原代细胞生长增殖较慢需 8 ~ 10 d, 3 ~ 10 代的细胞生长周期为 3 ~ 4 d, 10 代以后细胞生长速度开始减慢, 细胞形态呈梭状, 各代之间形态较均一; 培养细胞传代后 1 ~ 3 d 进入生长滞留期, 4 d 达到对数生长期, 以后进入平台期; 经光镜观察细胞形态为类成纤维状, 超微结构显示培养的第 2、4、8 代细胞, 细胞核大、形状不规则呈多形性, 染色质分布稀疏、电子密度较低, 胞浆细胞器少, 表现为早期幼稚细胞发育的特点。我们利用此条件培养的 MSC 细胞, 与骨髓成纤维细胞、内皮细胞和造血干细胞比较在表型上有着明显的区别, MSC 不表达成纤维细胞、内皮细胞和造血干细胞特有的抗原如Ⅰ型胶原、Ⅷ因子和 $CD34^+$ 等, 并在一定条件下成功地诱导 MSC 向成骨细胞和成软骨细胞分化, 表明 MSC 仍然保持着干细胞多向分化的特点, 见另文报道。因此, 作者认为利用此培养条件能达到 MSC 体外扩增而又不分化的目的, 为进一步研究骨髓间充质干细胞的特点和应用打下了基础。

参考文献:

[1] 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 Natl Acad Sci USA, 1995, 92(11): 4 857—4 861.

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

[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] Richards M, Huibergtse B A, Caplan A I, *et al*. Marrow-derives progenitor cell injections enchance new bone formation during distraction[J]. J Orthop Res, 1999, 17(6): 900—908.

[5] 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.

[6] Kopen G C, Prockop D J, Phinney D G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection neonatal mouse brains[J]. Cell Biology, 1999, 96(19): 10 711—10 716.

[7] Ohgushi H, Caplan A I. Stem cell technology and biocramics: from cell to gene engineering[J]. J Biomed Mater Res, 1999, 48(6): 913—927.

[8] 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　谢义霞)

?1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net