

巴马香猪骨髓间充质干细胞的分离 扩增及初步鉴定

林英忠, 王 虹, 刘 斐, 李旭平, 林丽萍, 覃丽萍

基金项目: 广西自然科学基金资助项目(编号:桂科自 0640057)

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院心内科

作者简介: 林英忠(1960-), 男, 大学本科, 医学硕士, 主任医师, 研究方向: 冠心病的介入诊治。E-mail: yingzhonglin@sina.com

通讯作者: 王 虹(1975-), 女, 大学本科, 医学硕士, 副主任医师, 研究方向: 心血管疾病的临床诊治及相关基础研究。E-mail: iriswh@163.com

[摘要] **目的** 建立巴马香猪骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)分离、培养、扩增的方法, 并进行鉴定。**方法** 采用梯度离心法分离并结合贴壁筛选法传代纯化培养猪的 MSCs; 采用倒置相差显微镜观察 MSCs 的形态学特征; 流式细胞仪检测第 3 代细胞表面标志抗原 CD71、CD34 的表达率。**结果** 原代培养的 MSCs 于 6 h 后贴壁, 贴壁细胞呈集群生长趋势。培养 7~9 d 后可见细胞融合, 14~21 d 达到 95% 融合。第 3 代细胞表面标记物 CD71 阳性率为 95%, CD34 阳性率为 0%。**结论** 采用全骨髓梯度离心法分离并结合贴壁筛选法能够成功分离和培养巴马香猪的 MSCs, 在第 3 代可获得高纯度 MSCs。

[关键词] 细胞培养; 间充质干细胞; 分离

[中图分类号] Q 343 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2011)04-0289-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2011.04.01

Isolation, cultivation and identification of mesenchymal stem cells in Bama minipigs LIN Ying-zhong, WANG Hong, LIU Fei, et al. Department of Cardiovascular Disease, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To establish a method for isolation and culture of bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) from Bama minipigs in vitro and to identify characteristic of the cells. **Methods** MSCs were isolated and cultured from the bone marrow of Bama minipigs by gradient centrifugation followed by adherent method. The morphology of MSCs was observed under phase contrast microscope. The expression of CD71 and CD34 of the third generation cells were analyzed by flow cytometry. **Results** After 6 hours primary culture, MSCs adhered to plastic surface of the culture dish. About 7~9 days later, the cells proliferated in colonies. Primary MSCs reached 95% of confluence between 14 and 21 days approximately. The positive rates of CD71 and CD34 in MSCs at third generation were 95%, 0%, respectively. **Conclusion** MSCs can be successfully isolated and cultivated by gradient centrifugation followed by adherent method. And higher purity MSCs can be picked up after culture expansion at passage 3.

[Key words] Cell culture; Mesenchymal stem cells; Isolation

骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)因其易获取、易生长和有较强的增殖能力,并能多向诱导分化,从而成为组织工程常用的种子细胞^[1]。但骨髓中 MSC 的数量少、含量极低,通常 $10^5 \sim 10^6$ 个骨髓有核细胞中仅有 1 个 MSC^[2]。为研究经皮冠状动脉植入 MSCs 治疗巴马香猪急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)模型的疗效,我

们探讨了巴马香猪 MSCs 的分离和体外培养扩增,并对其表型特征进行初步鉴定。旨在为 MSCs 植入治疗巴马香猪 AMI 模型的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物来源 选取健康小型雄性巴马香猪, 3~4 月龄, 体重 20~30 kg, 由广西大学动物实验中心提供。

1.2 主要试剂与仪器 (1)分离试剂:Ficoll-Paque 细胞分离液(Sigma 产品),DMEM 培养基(Dulbecco's modified eagle medium,Gibco 产品),胰蛋白酶(Sigma 产品)。(2)流式相关抗体:anti-CD34-FITC、anti-CD71-PE(均为 BD PharMingen 产品)。(3)主要仪器:流式细胞仪(FACS Calibur,Becton Dickinson 产品)、倒置相差显微镜(Olympus)、荧光显微镜(Olympus)、细胞培养箱、低温离心机、细胞培养瓶(Corning)、超净工作台。

1.3 方法

1.3.1 干细胞的分离 在猪耳后肌肉注射异丙嗪 25~30 mg、氯胺酮 10 mg/kg、阿托品 25 μ g/kg 及安定 5 mg。实验猪站立不稳而卧倒后,仰卧位固定,碘酒-酒精消毒皮肤,铺巾。无菌条件下髂后上棘穿刺,双侧多点抽取骨髓液 40~80 ml 置于含肝素的 50 ml 离心管中混匀,200 目滤网过滤后,室温以 2 500 r/min 离心 5 min,平头吸管反复抽吸吹打制成单细胞悬液,将骨髓液沿壁轻轻叠加到密度 1.077 g/ml 的淋巴细胞分离液上,4 $^{\circ}$ C 以 2 000 r/min 梯度离心 30 min,吸出中间 2~3 mm 厚的白绒层,PBS 离心洗涤,去除残留的 Ficoll-Paque 分离液。

1.3.2 原代培养、传代与纯化 以 1×10^6 /ml 的浓度接种于含胎牛血清的 DMEM 的培养瓶中,置于 37 $^{\circ}$ C,5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养 3 d 后换培养液,弃去未贴壁细胞。此后每隔 3 d 换培养液。约接种 10 d 后,贴壁细胞铺满培养瓶底约 80%~90% 时,用 0.15% 胰蛋白酶-EDTA 消化,按 1:3 的比例重新传代,搜集第 3 代的 MSCs 进行实验。

1.3.3 MSCs 流式细胞仪鉴定 取第 3 代 1×10^6 的 MSCs,均分为 3 管,每管分别加入 10 μ l 荧光标记抗体 anti-CD34-FITC、anti-CD71-PE,另设一管为空白对照,室温避光孵育 30 min 后用 PBS 洗涤 2 次,以减少非特异性结合,之后加入 200 μ l PBS 混匀细胞,用流式细胞仪检测。

2 结果

2.1 巴马香猪 MSCs 的分离与原代培养结果 梯度离心分离后的单个核骨髓细胞中培养 6 h 即可见到有成纤维细胞样细胞贴壁生长。72 h 换液后去除非粘附细胞后,可见贴壁生长的细胞部分成梭形,个别呈多角形,细胞核居中。培养 7 d 时,贴壁生长的细胞呈梭形、星形,呈团簇状。14~21 d 达到 95% 融合(见图 1)。

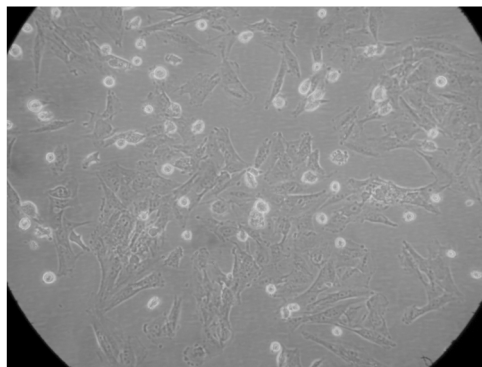


图 1 培养第 7 天($\times 200$)

2.2 巴马香猪 MSCs 的传代培养与纯化结果 细胞传代后生长较前迅速,一般 7~12 d 可传代一次,传代细胞仍呈多角形、短梭形,随着传代次数增加,细胞突起增多,以多角形为主。第 4 代以后细胞生长速度开始减慢,细胞的折光度逐渐下降,说明细胞开始衰老。传代的细胞克隆形成率降低,细胞体积增大(见图 2)。但培养扩增至第 7 代,细胞仍有增殖能力。

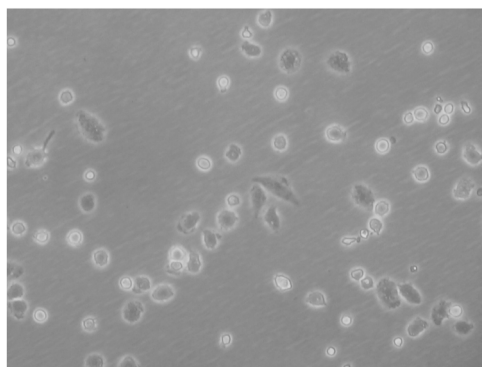


图 2 第 4 代细胞($\times 200$),培养约 5~6 周

2.3 巴马香猪 MSCs 的流式细胞仪分析与鉴定结果 经流式细胞仪分析,在 FS 和 SS 双参数点图上选取目的细胞群,采用 histogram 图表示。结果第 3 代细胞表面标记物 CD71 阳性率为 95%,CD34 阳性率为 0%(见图 3,4)。

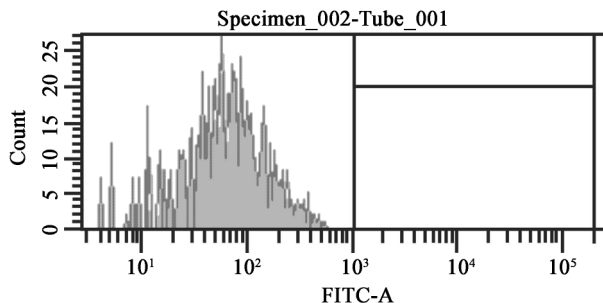


图 3 CD34-FITC 流式细胞检测示 CD34+ 细胞为 0

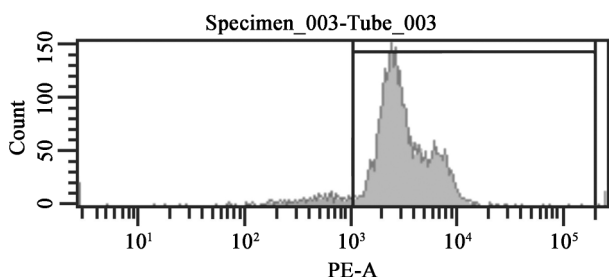


图4 CD71-PE 流式细胞检测示 CD71 + 细胞占 95%

3 讨论

3.1 骨髓中存在造血组织和非造血组织两种成分, 机体内正常造血功能的维持依赖于造血干细胞的自我更新和造血微环境的完整与稳定。20 世纪 70 年代 Friedenstein 等发现从骨髓分离出的单个核细胞在一定的条件下可诱导分化成为成骨细胞、成骨软细胞、脂肪细胞和肌母细胞。这些细胞在扩增 20 ~ 30 代后仍能保持多分化潜能。这类细胞就是骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)^[3,4]。MSCs 作为多种骨髓基质细胞的前体细胞, 参与造血微环境的稳态调控, 并为机体新陈代谢及组织损伤修复提供“库存”细胞。其不表达造血细胞的相关标志, 具有向多种中胚层和神经外胚层来源的组织细胞分化的能力。其取材方便、容易分离、易于外源基因的转染和表达, 是临床常用的移植干细胞, 在干细胞移植和组织工程中具有广泛的应用前景。但由于其在骨髓中的含量低, 因此需要将体内的 MSCs 在离体条件下进行分离纯化并进行体外扩增。MSCs 研究中, 特别是临床应用中仍存在诸如 MSCs 分离纯化、MSCs 增殖分化条件的控制、结构分化与功能分化、MSCs 与造血干细胞间相互作用、植入后的归巢等问题, 如何解决这些问题成为目前 MSCs 研究的重点。

3.2 目前对于 MSCs 尚无很好的纯化培养方法, 而较为常用的纯化培养方法有贴壁筛选法^[5]、密度梯度离心法^[6]、特制培养板筛选法^[7]、免疫磁珠分离法^[8]等。用单纯直接贴壁法获得的骨髓基质细胞主要包含成纤维样间质干细胞、小的非粒性细胞 (循环干细胞, RS-1)、小的粒性细胞 (RS-2) 及内皮细胞等多种细胞成分^[9]。梯度离心是目前应用最多的一种方法, 虽然有研究认为应用 1.073 g/ml 的 Percoll 较 1.077 g/ml 的 Ficoll 能得到更单一的 MSCs^[10], 但有研究发现通过 Percoll 法得到的单一的 MSCs 量小、增殖速度慢, 认为 MSCs 增殖能力与 RS-1 有关, 其对维持 MSCs 的增殖能力起到关键的作用。Majumdar 等^[11]认为 RS-1 实际上就是进入循

环的非定向的 MSCs。Lisignoli 等^[12]指出使用密度梯度离心法易使 BMSCs 向成骨细胞分化, 而降低了向其他方向分化的能力。由于 MSCs 含量低, 分离纯化存在难度, 而且单用以上的任一种方法分离得到的细胞中常含有多种祖细胞, 部分特征与 MSCs 相似, 从而对进一步研究带来一定的影响。本试验应用 Ficoll 梯度离心法分离并结合贴壁筛选法传代纯化培养 BMSCs, 研究发现应用 Ficoll 梯度离心分离后的单个核骨髓细胞中培养 6 h 即可见到有成纤维细胞样细胞贴壁生长。应用贴壁筛选法去除非粘附细胞, 得到可传代的贴壁生长的细胞大部分成梭形, 细胞核居中, 呈单层生长, 细胞呈团簇状, 呈集群生长趋势。应用流式细胞仪分析证实所得到的细胞为 CD34 - /CD71 + 细胞^[11], 提示反复贴壁筛选法代培养获取的细胞非造血干细胞, 是纯度较高的 BMSCs。

3.3 目前认为 MSCs 表面存在多种特异性抗原以及多种细胞因子和生长因子受体, 如 SH-2、CD29、CD44、CD71、CD90、CD106、CD120a、Stro-1 等, 其中 CD71 被认为是成熟 MSCs 的标志^[12,13], 而作为造血细胞的典型的表面抗原如 CD34、CD45 及 CD14 则不表达^[14~16]。MSCs 具有表型稳定的生物学特性, 本试验中采用 CD34 - /CD71 + 来鉴定 MSCs, 经流式细胞仪免疫细胞化学鉴定, 细胞强表达 CD71 而不表达 CD34, 证实所得到的细胞为 CD34 - /CD71 + 细胞^[11,15,16]。本实验中发现传代培养 4 代后, 细胞虽仍有增殖能力, 但生长速度减慢、增殖速度下降、细胞的折光度逐渐下降、传代的细胞克隆形成率降低、细胞体积增大和胰酶消化时间延长, 说明细胞开始衰老。林楚伟等^[17]比较了全骨髓贴壁并差速传代分离纯化 MSCs 与密度梯度离心法分离纯化 MSCs, 结果发现两种方法均能得到 90% 左右纯度的 MSCs, 但前者所得的 MSCs 的生长增殖能力更为旺盛。本实验显示应用 Ficoll 梯度离心法分离并结合贴壁筛选法传代纯化培养 BMSCs, 该方案具有操作简单、易于掌握、实验周期短等特点, 并可避免常规密度梯度分离法所采用的多次离心操作, 且离体分离 MSCs 时所需时间较短的不足, 保持了体外 MSCs 的活性更多, 从而使 MSCs 的细胞活力及其增殖能力更强, 结果为下一步实验研究及将来应用于临床治疗奠定了基础。流式细胞仪免疫细胞化学分析鉴定结果显示细胞强表达 CD71 而不表达 CD34。研究结果表明采用全骨髓梯度离心法分离并结合贴壁筛选法能够成功分离和培养巴马香猪的 MSCs, 传代

培养第3代可获得高纯度 MSCs,显示本方法可用于 MSCs 植入治疗巴马香猪 AMI 模型自体 MSCs 的准备。

参考文献

- Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics[J]. Circ Res, 2004, 95(1): 9-20.
- Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, et al. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle[J]. Cell Tissue Res, 2007, 327(3): 449-462.
- Lin HT, Tarng YW, Chen YC, et al. Using human plasma supplemented medium to cultivate human bone marrow-derived mesenchymal stem cell and evaluation of its multiple-lineage potential[J]. Transplant Proc, 2005, 37(10): 4504-4505.
- Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method[J]. Exp Hematol, 1974, 2(2): 83-92.
- Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs[J]. Exp Hematol, 1976, 4(5): 267-274.
- Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G, et al. Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Cell Tissue Res, 2005, 319(2): 243-253.
- Romanov YA, Darevskaya AN, Merzlikina NV, et al. Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: isolation, characterization, and differentiation potentialities[J]. Bull Exp Biol Med, 2005, 140(1): 138-143.
- Ogura N, Kawada M, Chang WJ, et al. Differentiation of the human mesenchymal stem cells derived from bone marrow and enhancement of cell attachment by fibronectin[J]. J Oral Sci, 2004, 46(4): 207-213.
- Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G, et al. Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells in pellet cultural system[J]. Exp Hematol, 2004, 32(5): 502-509.
- Kuznetsov SA, Friedenstein AJ, Robey PG. Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro[J]. Br J Haematol, 1997, 97(3): 561-570.
- Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, et al. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells[J]. J Cell Physiol, 1998, 176(1): 57-66.
- Lisignoli G, Remiddi G, Cattini L, et al. An elevated number of differentiated osteoblast colonies can be obtained from rat bone marrow stromal cells using a gradient isolation procedure[J]. Connect Tissue Res, 2001, 42(1): 49-58.
- Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair-current views[J]. Stem Cells, 2007, 25(11): 2896-2902.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411): 143-147.
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. Nature, 2002, 418(6893): 41-49.
- Liu L, Sun Z, Chen B, et al. Ex vivo expansion and in vivo infusion of bone marrow-derived Flk-1 + CD31 - CD34 - mesenchymal stem cells: feasibility and safety from monkey to human[J]. Stem Cells Dev, 2006, 15(3): 349-357.
- 林楚伟, 周胜华, 杜优优. 全骨髓贴壁并差速传代分离纯化大鼠骨髓间充质干细胞与密度梯度离心法的比较[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(14): 2508-2512.

[收稿日期 2010-10-15][本文编辑 韦挥德 黄晓红]

本刊严正声明

根据有关读者举报并经本刊初步查证,近一段时间来有人冒充本刊名义和盗用本刊的合法刊号(ISSN1674-3806/CN45-1365/R)进行非法出版活动(该非法出版物的编辑部地址为:北京市100036信箱27分箱;邮政编号:100036;联系电话:010-87013678;网址: <http://www.zglcxyx010.com>; E-mail: zglcxyx010@126.com、ZGLCXYX@163.com),严重地侵犯本刊的合法权益,损害了本刊的名义,在社会上造成了极坏的不良影响。为此,本刊特严正声明如下:

(一)冒充本刊名义和盗用本刊合法刊号的违法者必须立即停止一切侵权行为和非法出版活动,并对已发生的侵权行为和非法出版活动承担法律和经济责任。

(二)本刊已委托律师通过法律手段追诉侵权和非法出版者的法律责任和经济赔偿责任。

(三)本刊一贯严格遵守和执行新闻出版的有关法律、法规和管理规定,从未在全国任何地方设立过分支机构、分部和代办点;从未委托本编辑部以外的任何人进行组稿、征稿业务活动。

(四)CN45-1365/R的标准刊号为出版物和编辑部设在广西的特定登记号,凡在广西以外出现的CN45-1365/R刊号的出版物和编辑出版机构都是非法的。

(五)本刊合法的编辑部地址为:广西南宁市桃源路6号广西壮族自治区人民医院内。邮政编码为:530021。电话号码为:0771-2186013。网址为: <http://www.zglcxyxzz.com>。E-mail: zglcxyxzz@163.com。

(六)敬请广大作者、读者务必认准本刊的标准刊号和编辑部地址,谨防上当受骗。

· 本刊编辑部 ·