

小鼠骨髓间充质干细胞体外扩增的实验研究

邵文琳¹⁾, 张丹丹²⁾, 王殿华²⁾

(1) 昆明医学院第二附属医院检验科, 云南 昆明 650101; 2) 昆明医学院药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 云南 昆明 650100)

[摘要] **目的** 研究确立全骨髓贴壁法培养小鼠骨髓间充质干细胞体外培养和优化组合最佳实验条件, 建立一个简便易行的小鼠骨髓间充质干细胞体外扩增方法. **方法** 观测不同周龄小鼠、不同浓度胎牛血清和不同种植密度条件下的细胞增殖活性. 光镜下观察最佳实验条件培养骨髓间充质干细胞的形态. 流式细胞检测细胞周期和表面抗原标志. **结果** 4~6周龄小鼠、5%~10%的胎牛血清和 $5\sim 8\times 10^7/L$ 的细胞种植密度最适宜MSCs的体外培养, 细胞形态、表面抗原标志和细胞周期检测均具有骨髓间充质干细胞的特征. **结论** 本实验室优化选择的培养条件可成功分离纯化、扩增小鼠骨髓间充质干细胞, 为下一步深入研究奠定基础.

[关键词] 骨髓间充质干细胞; 全骨髓贴壁法; 研究

[中图分类号] R329.2*8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706(2011)01-0016-06

The Research of Mouse Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells Culture Condition in vitro

TAI Wen-lin¹⁾, ZHANG Dan-dan²⁾, WANG Dian-hua²⁾

(1) Dept. of Clinical Laboratory, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101; 2) School of Pharmacy and Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650031, China)

[Abstract] **Objective** To research the whole bone marrow adherence culture condition of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells, select the best condition, and establish an expansion method of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro. **Methods** We detected the proliferation ability of the bone marrow mesenchymal stem cells in different ages mouse, different concentration of serum and cell density, and found out the optimum culture condition. BMSCs were cultured in the optimum culture condition, and light microscopy and flow cytometry were used to study the morphology and biological characteristics of BMSCs. **Results** The optimum culture conditions for BMSCs were 4~6 weeks mouse, 5%~10% fetal bovine serum, and $5\sim 8\times 10^7/L$ cell density. The cells cultured in the optimum culture conditions showed the typical morphological and biological characteristics of BMSCs. **Conclusion** The whole bone marrow adherence method we optimized in our laboratory can isolate, purify and amplify BMSCs of mice in vitro, and may provide basis for further study.

[Key words] Marrow-derived mesenchymal stem cells; The whole bone marrow adherence culture method; Research

[作者简介] 邵文琳 (1970~), 女, 湖北宜昌市人, 在读博士研究生, 副教授, 主要从事干细胞治疗急性肺损伤的机理研究工作.

[通讯作者] 王殿华. E-mail:wangdianhuakm126.com

骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs) 来源于中胚层, 是骨髓组织中除造血干细胞外另一大类具有多向分化潜能的多能干细胞, 主要作为滋养层支持造血干细胞的生长^[1]. BMMSCs 具有跨系谱、跨胚层分化的潜能, 在一定环境和特异因子诱导下可分化为多种造血以外的组织细胞, 如软骨细胞、心肌细胞、神经细胞、肝细胞、支气管上皮细胞、肺泡上皮细胞等多个胚层来源的细胞, 并且 MSCs 具有容易获得、容易体外培养增殖、长期传代不改变生物学特征、抗原性小、组织修复能力强、不涉及医学伦理问题等特征, 为临床疾病的治疗提供了一个全新的思路 and 策略^[2].

然而, MSCs 在骨髓中的含量很低, 仅为骨髓单个核细胞的 0.001% ~ 0.01%, 而 BMMSCs 临床治疗和实验研究要求获得较高的纯度以及足够的细胞数量. 因此, 本实验旨在摸索选择确立最适宜、有效的培养条件, 建立简单、高效、稳定的 BMMSCs 体外培养方法, 获得大量高纯度的小鼠 BMMSCs.

1 材料与方 法

1.1 实验动物

健康雄性昆明小鼠由昆明医学院实验动物科提供, 4~8 周龄, 体重约 15~28 g. 所有动物处置过程符合动物伦理学要求.

1.2 主要试剂及仪器

优质胎牛血清 (FBS) 及 DMEM 培养基, 赛默飞世尔生物化学制品 (北京) 有限公司; 胰蛋白酶, Beijing Solarbio Science and Technology Co. Ltd; CD45-FITC、CD34-PE、CD14-PE、CD90-FITC、CD105-FITC、CD106-FITC, Biolegend 公司; 细胞周期试剂, Beckman coulter 公司; SW-CJ-2FD 型超净工作台, 苏州净化设备有限公司; 37 °C 恒温培养箱, Thermo Fisher scientific; 倒置显微镜, Nikon diaphot; 离心机, Beckman coulter 公司.

1.3 骨髓间充质干细胞的分离

颈部脱臼处死小鼠, 75% 酒精消毒全身, 无菌操作取出四肢胫骨和股骨, 去除所有骨表面附着的肌肉和结缔组织, 用 FBS 反复冲洗 3 次. 剪断两端骨骺, 用装有含 10% FBS 的 DMEM 培养基

的注射器从一端冲洗骨髓腔和干骺端, 收集另一端冲出的骨髓悬液, 均匀混合后反复轻轻吹打, 制备成单细胞悬液. 接种于含 8 mL DMEM 培养基的 100 mm² 的培养皿中, 放在 37 °C, 5% CO₂ 的饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养. 48 h 后首次换液, 以后每隔 2~3 d 换液一次, 前两次换液用高糖的 DMEM 培养, 后改用低糖 DMEM 培养.

1.4 MTT 方法检测不同周龄小鼠骨髓间充质干细胞生长

分别取 4、6、8 周龄雄性昆明小白鼠按各 5 只按照上述方法分离培养 MSCs, 消化计数, 调整细胞浓度为 2×10^7 /L 分别接种于 5 个 24 孔板内, 置于 5% CO₂ 饱和湿度, 37 °C 培养箱中继续培养, 每隔 1 d 取不同周龄每只小鼠的 3 孔细胞进行计数, 计算均值, 以细胞生长时间为横坐标, 以细胞数 (10^7 /L) 为纵坐标, 绘制细胞生长曲线, 分析细胞生长情况.

1.5 MTT 方法检测不同浓度胎牛血清条件下 BMMSCs 的生长

细胞按 5×10^7 /L 种入 96 孔培养板中, 分别加入含 2.5%、5%、7.5%、10%、12.5%、15%、17.5%、20% 不同浓度 FBS 的 DMEM 培养基, 每个浓度 5 孔; 培养 6 d 后, 取各浓度 5 孔细胞分别计数, 计算均值, 以胎牛血清浓度为横坐标, 以细胞数 (10^7 /L) 为纵坐标, 绘制第 6 天时不同胎牛血清浓度对 MSCs 生长的影响曲线.

1.6 MTT 方法检测不同种植密度时 MSCs 扩增

用含 10% FBS 的 DMEM 培养基调整细胞密度为: 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 ($\times 10^7$ /L) 种入 96 孔培养板中, 每一密度 5 孔; 培养 6 d 后, 取不同种植密度 5 孔细胞分别计数, 计算均值, 以种植密度为横坐标, 以细胞数 (10^7 /L) 为纵坐标, 绘制对数生长期第 6 天时不同细胞接种密度对 MSCs 生长的影响曲线.

1.7 光学显微镜观察小鼠 BMMSC 形态

取 6 周龄小鼠、7.5% 的胎牛血清、 5×10^7 /L 的细胞种植密度按照上述方法分离培养 MSCs, 14 d 长至 80% 融合时用 0.25% 胰蛋白酶消化贴壁细胞, 按 1:3 传代培养, 倒置显微镜下观察细胞形态.

1.8 流式细胞仪检测细胞表面抗原标志

最优条件培养的第 3 代贴壁细胞达到 80% ~ 90% 融合时用 0.25% 的胰蛋白酶和 1 mmol/L EDTA

消化后,用含1%的小牛血清PBS调整细胞至 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 。分别加入抗小鼠的单克隆抗体和同型阴性对照 $20 \mu\text{L}$,置 4°C 孵育 30 min ,PBS洗涤2遍,进行流式细胞仪测定。

1.9 流式细胞仪检测细胞周期

将最优条件培养的第3代贴壁细胞消化后,调整密度至 $5 \times 10^6/\mu\text{L}$,PBS洗3遍后用70%乙醇 4°C 固定过夜,用 1 mL PBS重悬细胞后加入 $500 \mu\text{L}$ PI溶液(0.1 mg/mL PI含0.1 mg/mL RNase), 37°C 孵育 30 min ,上流式细胞仪检测, Multicycle 软件分析数据。

2 结果

2.1 不同周龄小鼠的BMMSCs体外培养生长曲线

实验结果显示4周龄、6周龄小鼠BMMSCs生长曲线基本重叠,其中1~3 d为生长静止期,此时细胞为了适应体外环境,细胞数量没有明显增加,特别是在第2天反而出现减少的现象,这属于增殖较慢的时期。3~7 d为对数增长期,细胞增长活跃,细胞数增加较快。7~10 d是平台期,由于细胞老化,细胞数不再增加。8周龄小鼠1~3 d是生长静止期,3~6 d为对数增长期,比4周龄、6周龄小鼠对数增长期缩短,并且细胞增殖数量均低于4周、6周龄小鼠。选择4~6周龄小鼠的分离BMMSCs进行体外培养最佳,见图1。

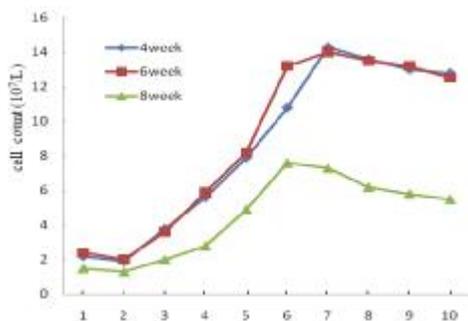


图1 不同周龄小鼠的BMMSCs体外培养生长曲线
Fig. 1 Growth curve of different weeks mouse's BM-MSCs

2.2 不同浓度胎牛血清对BMMSCs生长的影响 小鼠BMMSCs生长曲线显示对数增长期第7

天时细胞数量最多,计数培养7 d后的不同浓度胎牛血清培养的BMMSCs数量发现用2.5%的胎牛血清培养时MSCs生长较慢,细胞数量少。5%~10%的胎牛血清培养MSCs,细胞增殖最快,此浓度最适宜MSCs的生长。10%~20%胎牛血清培养MSCs,细胞数量具有逐步减少趋势,见图2。

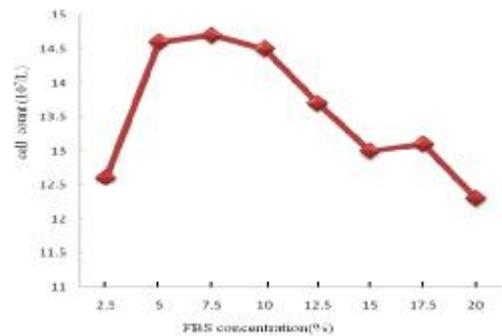


图2 不同浓度胎牛血清对MSCs生长的影响(第6天时)

Fig. 2 Effects of different FBS concentration on the growth of MSCs (6th day)

2.3 不同接种密度对小鼠BMMSCs扩增的影响

细胞接种密度与MSCs的体外扩增速度密切相关,细胞间的接触会抑制细胞的生长。结果表明当细胞种植密度为 $1 \sim 5 \times 10^7/\text{L}$ 时,细胞数量随细胞接种密度的增加而增加,在 $5 \sim 8 \times 10^7/\text{L}$ 时细胞生长最活跃,细胞数量达到高峰。8~10%时细胞数量开始减少。细胞接种密度为 $5 \sim 8 \times 10^7/\text{L}$ 时最有利于MSCs的增殖,见图3。最优实验条件培养MSCs的形态学观察,见图4。

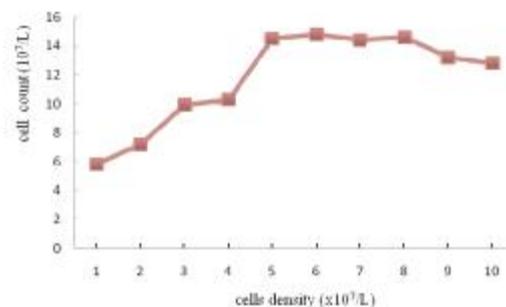


图3 不同细胞密度对MSCs生长的影响(第6天)
Fig. 3 Effects of different cell density on the growth of MSCs (6th day)



图 4 倒置显微镜下 MSCs 形态 (×100)

Fig. 4 The morphous of P3 rats' bone marrow mesenchymal stem cells (×100)

2.5 MSC 表面标志和细胞周期

最优实验条件培养的第 3 代昆明小鼠 MSCs CD14、CD34、CD45 阴性, CD90、CD105、CD106 阳性. MSCs 细胞周期中 G₀/G₁ 期约为

81.1%, S+G₂+M 期约为 18.9%, 这说明大部分细胞处于静止期, 只有少部分处于活跃的增殖期, 此条件培养的 MSCs 大多数处于未分化状态, 见图 5、图 6.

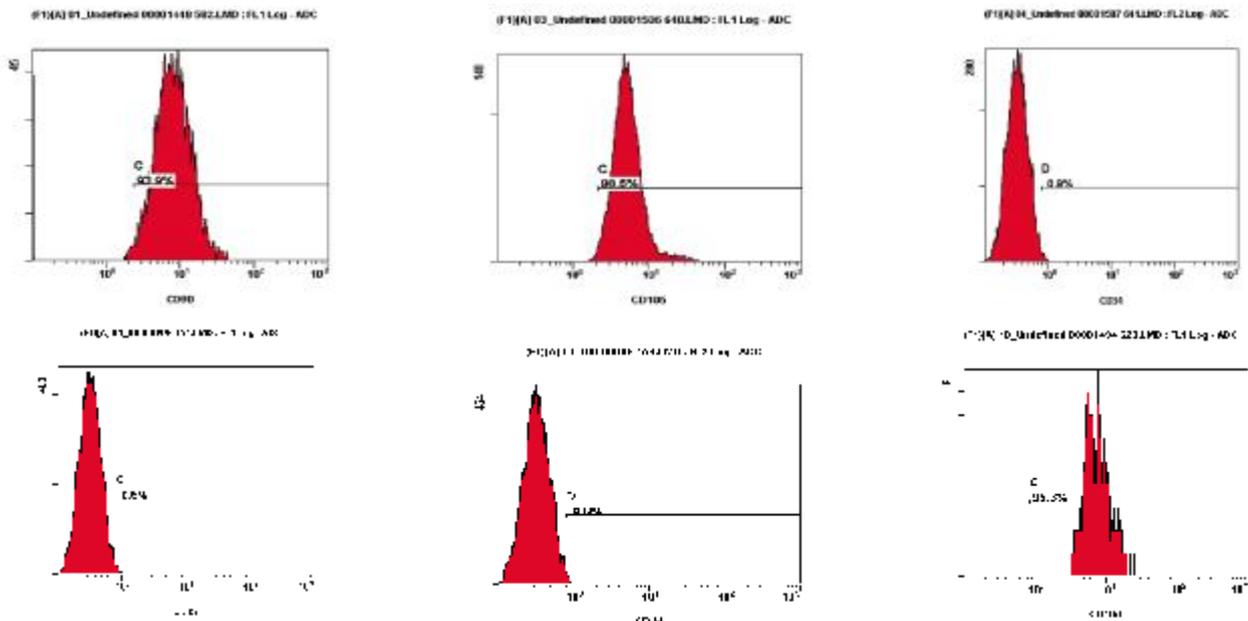


图 5 第 3 代小鼠 MSCs 表面标志物的表达

Fig. 5 Surface marker expression in P3 rats' bone marrow mesenchymal stem cells

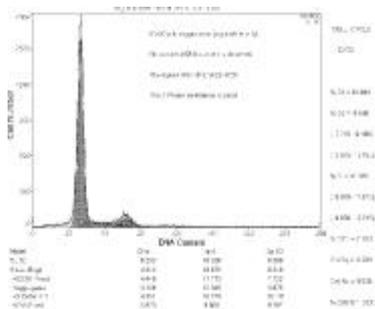


图 6 第 3 代小鼠 MSCs 细胞周期检测结果

Fig. 6 Cell cycle result of P3 rats' bone marrow mesenchymal stem cells

3 讨论

MSCs 是 130 年前德国病理学家 Cohnheim 首次在骨髓中发现的, 是骨髓中除了造血干细胞之外的另一种成体干细胞. MSCs 主要存在于全身结缔组织和器官间质中, 以骨髓组织中含最为丰富^[1]. MSCs 具有高度自我更新能力, MSCs 能附着在塑料或玻璃培养皿上呈纤维细胞样生长, 形成均匀的集落或贴壁的融合层, 易于体外分离培养和扩增. MSCs 具有跨胚层分化为多种细胞表型的

能力,可以分化为多种中胚层和神经外胚层来源的组织细胞。MSCs具有免疫调节特性,能通过多种途径发挥其对免疫细胞生物活性的调节作用^[4,5]。所以MSCs是一种较为理想的具有广阔临床应用前景的种子细胞。

但MSCs在小鼠骨髓中含量少,在临床应用和科学研究前必须进行体外扩增才能获得足够量的细胞数。因此建立一套方便实用的体外培养方法对进一步研究和应用MSCs具有重要的意义。本实验采用全骨髓贴壁筛选培养法体外扩增昆明小鼠的骨髓MSCs,此法由Friedenstein在20世纪70年代中期建立^[6]。由于MSCs具有在塑料培养瓶中贴壁生长的特性,将骨髓细胞悬液接种于培养皿4~12h后,通过换液除去未附壁的造血系细胞、内皮细胞等即获得较纯的MSCs。此法相比于密度梯度离心法、流式细胞仪分选法、免疫磁珠分选法更为简单易行,但实验中影响细胞增殖的因素较多,需要根据具体实验目的优化培养条件,才能获得高浓度、高纯度、高活性的MSCs。

小鼠的年龄对MSCs增殖影响较大,比较4周、6周、8周小鼠MSCs体外生长曲线发现4周龄、6周龄、8周龄小鼠体外培养的1~3d均为生长静止期,但4周龄、6周龄小鼠3~7d为对数增长期,细胞生长活跃,细胞增速快,细胞数比生长静止期增加了7倍。8周龄小鼠对数增长期缩短(3~6d),细胞增殖速度明显低于4周龄、6周龄小鼠,可能是由于随着周龄的增加,骨髓中的MSCs含量逐渐减少,增殖能力下降。体外培养MSCs最好选择4~6周小鼠。

胎牛血清中含有大量的增殖分化因子^[7],因此培养基中添加胎牛血清可以明显促进小鼠MSCs生长速度,但是实验结果显示FBS在10%~20%时,细胞数量并没有进一步增加反而出现了下降。这是由于较高浓度的胎牛血清导致了小鼠MSCs的快速衰老,增殖能力下降,不利于MSCs生长,同时高浓度的胎牛血清中的分化因子可促进MSCs多向分化。所以胎牛血清的浓度选择对小鼠MSCs体外扩增很重要,应要求能有效促进细胞增殖,又要保证细胞处于未分化的状态。从图2中看到最适于小鼠MSCs的培养和增殖的胎牛血清浓度是5%~10%。

细胞种植的密度与MSCs的体外增殖速度密切相关。小鼠MSCs的生长对接密度极为敏感,

种植的密度过低细胞数太少不利于其生长。种植的密度过高,由于细胞间接触释放了某些抑制因子明显减缓MSCs的增长速度,甚至造成MSCs生长停滞。实验证明5%~ $8 \times 10^7/L$ 的细胞种植密度最有利于MSCs的增殖。

笔者取4周龄的小鼠分离骨髓MSCs,接种 $5 \times 10^7/L$ 的MSCs于含有10%的DMEM培养基中培养扩增,24h换液后镜下细胞观察形态不一,以梭形为主,其次还有多角型、小圆形细胞。3d后可见形态相对均一的,多为折光性较强梭形、纺锤形细胞,以及少量的成纤维细胞样的细胞,以后细胞逐渐增多,进入对数生长期,细胞生长较快,8d以后细胞生长进入平台期,细胞数量扩增减慢,并开始出现融合。取第3代细胞流式细胞术检测细胞表面抗原标志发现造血细胞标志CD14、CD34、CD45阴性, MSCs的表面标志CD90、CD105、CD106阳性,说明本实验建立的培养方法能成功地分离纯化小鼠MSCs。第3代细胞的细胞周期检测说明这种分离扩增方法未刺激小鼠MSCs分化,该方法获得的小鼠MSCs仍保持在未分化状态。

以上结果说明在本实验室现有的实验条件下采用优化后的全骨髓贴壁筛选法可以成功获得的较高纯度的小鼠MSCs,此方法对骨髓需要量少,对细胞活性影响小,获得的小鼠MSCs数量丰富,可以满足符合后继研究实验的需要。

[参考文献]

- [1] YU X X, SHI Y A, XIN Y, et al. Biologic characteristics of human bone marrow mesenchymal stem cell cultured in vitro [J]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, 2007, 36(8): 550-554.
- [2] GRONTHOS S, ZANNETTINO A C. A method to isolate and purify human bone marrow stromal stem cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 449: 45-47.
- [3] CAMPAGNOLI C, ROBERTS I A, KUMAR S, et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first trimester fetal blood, liver, and bone marrow [J]. *Blood*, 2001, 98(8): 2396.
- [4] MCLINTOSH K R, BARTHOLOMEW A. Stromal cell modulation of the immune system: A potential role for mesenchymal stem cell [J]. *Graft*, 2000, 3: 324-328.

(下转第25页)

- [9] GUO Z, ZHENG C, CHEN Z, et al. Fetal BM-derived mesenchymal stem cells promote the expansion of human Th17 cells, but inhibit the production of Th1 cells [J]. *Eur J Immunol*, 2009, 39(10): 2840 – 2849.
- [10] CHEN B, HU J, LIAO H, et al. Flk-1+ mesenchymal stem cells aggravate collagen-induced arthritis by up-regulating interleukin-6 [J]. *Clin Exp Immunol*, 2010, 159(3): 292 – 302.
- [11] ROMIEU-MOUREZ R, FRANCRANOIS M, BOIVIN M N, et al. Cytokine modulation of TLR expression and activation in mesenchymal stromal cells leads to a proinflammatory phenotype [J]. *The Journal of Immunology*, 2009, 182(12): 7963 – 7973.
(2010 – 12 – 10 收稿)

(上接第 20 页)

- [5] NASEF A, ASHAMMAKHI N, FOUILLARD L. Immunomodulatory effect of mesenchymal stromal cells: possible mechanisms [J]. *Regen Med*, 2008, 3(4): 531 – 546.
- [6] FRIEDENSTEIN A J, GORSKAJA J F, KULAGINA N N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs [J]. *Exp Hematol*, 1976, 4: 267 – 274.
- [7] LENNON D P, HAYNESWORTH S E, YONG R G, et al. A chemically defined medium supports in vitro proliferation and maintains the osteochondral potential of rat marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *Experimental Cell Research*, 1995, 219(1): 211 – 222.
(2010 – 12 – 10 收稿)