

兔骨髓间充质干细胞的分离、体外培养、鉴定及成脂诱导

戚宗泽, 罗云飞, 侯 勇, 郭永章, 朱 洪

(昆明医科大学第二附属医院肝胆胰一病区, 云南 昆明 650101)

[摘要] **目的** 分离、体外培养、鉴定兔的骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 及诱导分化为脂肪细胞. **方法** 采用健康幼龄日本大耳白兔, 麻醉致死冲洗骨髓收集骨髓液, 采用直接贴壁法分离培养 MSCs, 对 MSCs 进行形态学观察, 同时通过流式细胞分析术对 CD34、CD44、CD45、CD90 4 种表面抗原进行鉴定. 取第 5 代 MSCs, 加入 50 $\mu\text{mol/L}$ 抗坏血酸盐 2 磷酸盐, 50 $\mu\text{mol/L}$ 消炎痛和 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松诱导其分化. **结果** 第 2 代 MSCs 经流式细胞技术鉴定出细胞的 CD34 (-)、CD45 (-)、CD44 (+)、CD90 (+) 符合 MSCs 的表面抗原. 第 5 代骨髓间充质干细胞, 成脂诱导 10 d 后油红 O 染色显示有大量脂质沉积并相互融合, 细胞由长梭形变为多边形. **结论** 本研究证实了体外培养的细胞为间充质干细胞且成分单一, 具有干细胞特性, 能分化为脂肪细胞, 可作为一个细胞资源, 为组织工程和动物模型研究细胞分化机制.

[关键词] 骨髓间充质干细胞; 分离; 培养; 鉴定; 诱导; 兔

[中图分类号] Q813.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2013) 01 - 0028 - 04

Isolation, Culture in vitro, Identification and Induction into Adipocytes of Rabbit Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

QI Zong - ze, LUO Yun - fei, HOU Yong, GUO Yong - zhang, ZHU Hong

(The First Dept. of Hepatobiliaropancreatic Surgery, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101, China)

[Abstract] **Objective** To isolate, culture in vitro and identify the rabbit bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs mesenchymal stem cells) and induce them to differentiate into adipocytes. **Methods** Health juvenile Japan big-eared white rabbits were used, and the bone marrow was collected after rabbits were euthanized by anesthesia. MSCs were isolated and cultured by direct adherent culture, then the morphology of MSCs was observed. At the same time, MSCs were indentified by detecting the four surface antigens including CD34, CD44, CD45 and CD90 through flow cytometry. The fifth generation of MSCs were induced to differentiate by addition of 50 $\mu\text{mol/L}$ ascorbate2phosphate, 50 $\mu\text{mol/L}$ indomethacin and 0.5 $\mu\text{mol/L}$ dexamethasone. **Results** Flow cytometry showed CD34 (-), CD4 (-), CD44 (+) and CD90 (+) in the second generation of MSCs, which were in accordance with the surface antigens of MSCs. After the fifth generation of MSCs were induced for ten days to differentiate into adipocytes, oil red O staining showed that a large number of lipid deposition and mutual confluence, and the shape of cells became polygon from long shuttle. **Conclusions** The cells cultured in vitro by our method are pure mesenchymal stem cells, have the typical characteristics of stem cells, and can differentiate into adipocytes. The mesenchymal stem cells cultured in vitro can be used to study the cell differentiation mechanisms in tissue engineering and animal models.

[Key words] Bone marrow mesenchymal stem cells; Isolation; Culture; Identification; Induction; Rabbit

[基金项目] 云南省应用基础研究基金资助项目 (09CD088)

[作者简介] 戚宗泽 (1986~), 男, 回族, 云南寻甸县人, 在读硕士研究生, 主要从事肝胆外科及器官移植的基础与临床研究工作.

[通讯作者] 朱洪. E-mail:zhong519@163.com

骨髓是一个复杂的组织, 包含不同种类的干细胞: 造血干细胞、骨髓间充质干细胞(骨髓基质干细胞)和内皮干细胞^[1]. 间充质干细胞是来源于中胚层的成体干细胞, 是造血微环境中的一种重要细胞成分, 在不同诱导条件下, 能够向成骨细胞、成软骨细胞、成肌细胞、脂肪细胞及基质细胞等不同的细胞系分化^[2]. 近来研究发现骨质疏松、激素性骨坏死等疾病中骨髓脂肪细胞形成增加, 脂肪细胞来源于脂肪前体细胞, 脂肪前体细胞又是由间充质干细胞分化而来. 本研究建立体外诱导 BMSCs 分化为脂肪细胞方法, 旨在为骨质疏松、激素性骨坏死、肥胖症等疾病的发病机制及防治药物研究提供细胞模型, 可以作为一个细胞资源, 为组织工程和动物模型研究细胞分化机制^[3].

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 DMEM-F12 液体培养基(北京索莱宝), 胎牛血清(FBS, Gibco), PBS 液(Hyclone), 0.25%胰蛋白酶(Gibco), 抗坏血酸盐 2 磷酸盐(ALEXIS), 消炎痛(ALEXIS), 地塞米松(SIGMA), 鼠抗兔 CD44-FITC(serotec), 鼠抗兔 CD90-FITC(serotec), 鼠抗兔 CD34-PE(serotec), 鼠抗兔 CD45-PS5(serotec), 羊抗鼠 IgG(H+C)-FITC(becoknew), 油红 O(SIGMA).

1.1.2 实验动物 5 周龄健康日本大耳白兔, 体重 0.8 ~ 1.0 kg, 由昆明医科大学实验动物中心提供.

1.2 方法

1.2.1 兔 MSCs 的分离和原代培养 3%戊巴比妥钠按 2 mL/kg 剂量经耳缘静脉全身麻醉致死, 70%的酒精浸泡 15 min, 在无菌操作台下, 取出其双侧股骨、胫骨, 用 PBS 液漂洗后切去两端骨髓, 用 3 号针头吸取 DMEM 培养液反复冲洗髓腔至澄清, 将细胞混液移至离心管中, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清得到重悬细胞液, 再加入 DMEM 液洗涤、离心得到重悬细胞液.

将上述重悬细胞液各取 4 mL 接种于 2 个 25 mL 培养瓶中, 加入 11 mL 含 10%FBS 的 DMEM 培养基(添加青霉素 100 IU/mL、链霉素 100 μ g/mL)混匀后, 置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中恒温培养. 48 h 后换液去除未贴壁细胞, 以后每隔 3 d 换液 1 次, 待细胞融合达 80%进行消化传代.

1.2.2 兔 MSCs 的传代培养 待细胞 80%汇合后, 加入 0.25%胰蛋白酶(一般 25 mL 培养瓶加 1 mL

消化液即可)进行消化. 在倒置显微镜下进行观察, 发现贴壁细胞胞体回缩, 细胞间隙增大, 细胞漂浮增多时, 立即加入适量含 10%FBS 的 DMEM 的培养液终止消化, 并用无菌吸管轻柔吹打瓶壁细胞, 促进细胞脱壁. 待多数细胞脱离瓶壁形成细胞悬液后, 离心后弃上清液按照 1:2 接种至 25 mL 培养瓶中, 以后 3 d 换液 1 次.

2 结果

2.1 兔 MSCs 的形态学鉴定

贴壁生长的 MSCs 形态均一, 为长梭形, 第 1 周期生长较缓慢, 多为散在的较小集落; 至第 2 周期后生长迅速, 细胞排列有一定的方向性, 呈漩涡样生长, 集落大, 约数百至数千个细胞. 随着细胞进一步的增加, 集落之间细胞个弧线重叠, 漩涡中心的细胞可以形成多细胞层^[4]. 本实验中原代(P₀代) MSCs 培养 2 d 后可以观察到细胞附壁铺伸, 呈梭形, 数量较少, 局部呈多个散在分布的细胞集落(见图 1). 第 3 天开始形成典型的、均匀分布的 MSCs 簇状, 细胞数量增多, 细胞形态呈长梭形, 紧密排列, 第 4 天后 MSCs 数量迅速扩增, 细胞簇状增生灶数量增加, 范围扩大(见图 2). 第 6 天细胞生长即可达 70%~80%的融合, 呈长梭形, 紧密排列类似漩涡状(见图 3).



图 1 P₀代 MSCs 培养 2 d
Fig. 1 P₀ MSCs culture for 2 day

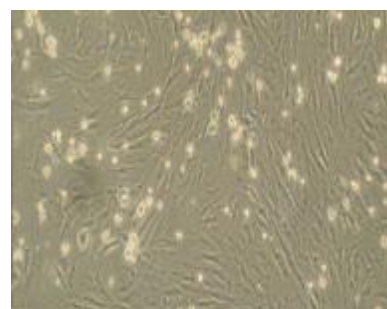


图 2 P₀代 MSCs 培养 4 d
Fig. 2 P₀ MSCs culture for 4 day

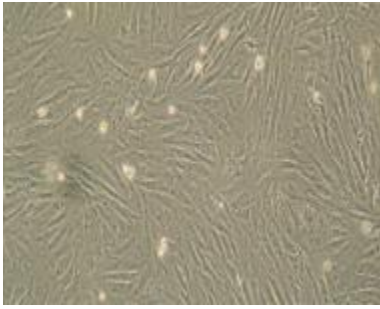


图 3 P₀代 MSCs 培 6 d
Fig. 3 P₀MSCs culture for 6 days

2.2 兔 MSCs 的表型鉴定

MSC 表型为 CD11a、CD14、CD33、CD34、CD28、CD45、CD80、CD86、CD117 阴性，CD29、CD44、CD59、CD90、CD105、CD166 阳性^[4]。本实验通过流式细胞仪分析术对 CD34 (-)、CD45 (-)、CD44 (+)、CD90 (+) 4 种表面抗原进行鉴定，验证所培养的细胞是 MSCs^[4]。方法如下：第 2 代 MSCs 经 PBS 液洗 2 遍后 0.25% 胰蛋白酶消化，用含 10% FBS 的 DMEM 培养液终止消化。将细胞悬液移至离心管中，2 000 r/min 离心 5 min，弃上清，得到重悬细胞。取 4 支 EP 管，每管各标记为 CD34、CD44、CD45、CD90，每管各加入 10 μ L 细胞悬液，CD44 管中加入 20 μ L CD44-FITC 抗体，CD90 管中加入 20 μ L CD90-FITC 抗体、CD34 管

中加入 20 μ L CD34-PE 抗体，CD45 管中加入 20 μ L CD45-PS5，避光 4 $^{\circ}$ C 下孵育 60 min，加入 PBS 液，2 000 r/min 离心 3 min，反复洗涤 3 次。CD34 管和 CD45 管中加入 20 μ L 荧光二抗羊抗鼠 IgG(H+C)-FITC 振荡 5 s 放入湿盒内置 4 $^{\circ}$ C 作用 45 min 后，PBS 液洗涤 3 次，上机检测，见图 4。

图 4 所示，所鉴定的细胞，99.1% 的细胞表达 CD90，99.8% 的细胞表达 CD44，而仅有 0.2% 的细胞表达 CD34，0.1% 的细胞表达 CD45，符合 MSCs 的抗原表型。

2.3 兔 MSCs 的成脂诱导分化

取第 5 代 MSCs，以 $4 \times 10^4/cm^2$ 接种于培养瓶中，24 h 后添加含 50 μ mol/L 抗坏血酸盐 2 磷酸盐，50 μ mol/L 消炎痛和 0.5 μ mol/L 地塞米松的完全培养液定向诱导骨髓间充质干细胞分化为脂肪细胞。每 3 d 换液 1 次，10 d 后去除培养液，用 PBS 液洗涤 2 次^[5]，常温下加入 10% 福尔马林孵化 10 min，弃去福尔马林，加入新鲜的福尔马林室温下固定 1 h，去除福尔马林后用 60% 异丙醇清洗细胞^[6]，待细胞完全干燥后，加入油红 O 工作液染色 10 min，除去油红 O 工作液，加水清洗，拍照，见图 5。

由图 5 所示，P₅MSCs 成脂诱导 10 d 后油红 O 染色显示大量脂质沉积并相互融合，细胞由长梭形变为多边形。

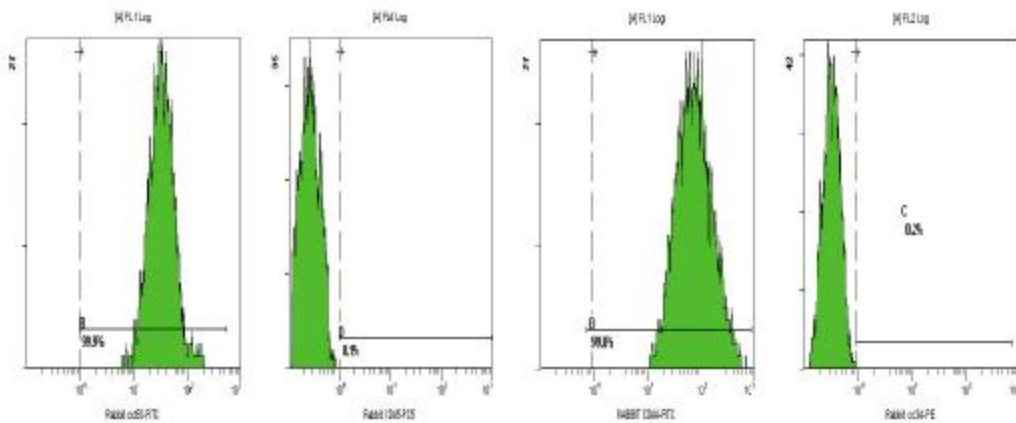


图 4 P₂代 MSCs 流式细胞仪检测
Fig. 4 P₂ generation MSCs detected by Flow cytometry

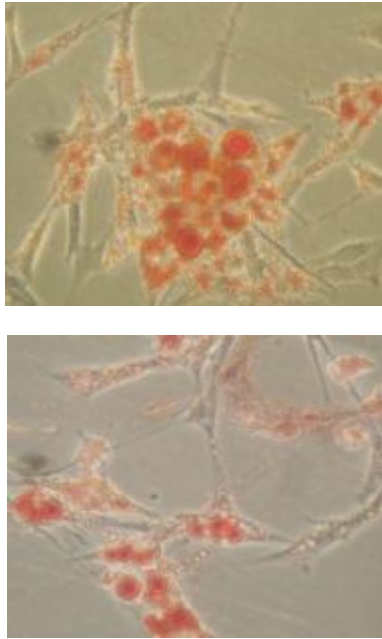


图 5 P₅MSCs 诱导 10 d 后油红 O 染色 (10×40)

Fig. 5 P₅ MSCs induced for ten days and oil red O staining (10×40)

3 讨论

目前 MSCs 的体外培养方法主要有密度梯度离心法、直接贴壁分离法、流式细胞分离法和免疫磁珠分离法^[7]。其中后 2 种方法所获得的骨髓间充质干细胞纯度较高,但操作复杂,费用高。所以,密度梯度离心法和直接贴壁分离法为分离 MSCs 最常用的两种方法。本研究证实了直接贴壁法分离出来的 BMSCs 纯度高,相比密度梯度离心法等其他分离法,是一种简单有效的分离纯化 BMSCs 的方法^[8]。如何鉴定骨髓间充质干细胞,尚未发现其特异性表面标志,因此还没有理想标志性分子或方法,目前主要依靠细胞的形态观察和免疫组织化学检查进行鉴定。鉴于骨髓中分离的有核细胞主要包括骨髓成纤维细胞、造血干细胞及骨髓间充质干细胞,CD34 为骨髓成纤维细胞、造血干细胞标志抗原,CD44 则主要在骨髓间充质干细胞表达,在造血干细胞表面不表达,因此 CD34 阴性、CD44 阳性表达已成为鉴定骨髓间充质干细胞的一种通用的方法^[9]。本实验中 MSCs 表面抗原 CD44、CD90 呈高表达,而 CD34、CD45 表达水平较低,证明所培养的细胞为骨髓间充质干细胞。有报道认为激素对于脂肪细胞分化的诱导主要是通过 3

条信号通路进行的:一条是 cAMP-PKA 的途径;一条是甾醇类激素的核受体途径;还有一条是胰岛素样生长因子 1 受体的磷酸酪氨酸激酶途径。这 3 条通路对于诱导细胞分化的作用是不同的,以胰岛素样生长因子 1 受体激酶的通路最重要^[10]。本研究成功将 MSCs 分化为脂肪细胞,揭示了间充质干细胞分化机制,提供了一种新的思路来防止骨质疏松、激素性骨坏死和肥胖症。

[参考文献]

- [1] ZHIHUI FENG, CHANGYING LI, SHUXIAN JIAO, et al. In vitro differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocytes [J]. *Hepato-Gastroenterology*, 2011, 58 (112): 1 - 20.
- [2] ZHANG LI, PENG LI-PAN, WU NAN, et al. Development of bone marrow mesenchymal stem cell culture in vitro [J]. *Chin Med J*, 2012, 125(9): 1 650 - 1 655.
- [3] NINOMIYA Y, SUGAHARA-YAMASHITA Y, NAKACHI Y, et al. Development of a rapid culture method to induce adipocyte differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 394(2): 303 - 308.
- [4] 陈孝平. 外科常用实验方法及动物模型的建立 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 409 - 425.
- [5] LI YA-NA, SUN YAN, ZHANG LING, et al. Differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells into adipocytes in media containing dexamethasone, 3-isobutyl-1-methylxanthine, insulin and indomethacin [J]. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2008, 12 (21): 4 193 - 4 196.
- [6] 李雅娜, 张玲, 刘旭, 等. 兔骨髓间充质干细胞定向诱导分化为脂肪细胞的研究 [J]. *昆明医学院学报*, 2005, 26 (2): 1 - 5.
- [7] 黄家志, 陈前芬, 肖增明, 等. 兔骨髓间充质干细胞的体外分离培养及鉴定 [J]. *广西医科大学学报*, 2011, 28(1): 8 - 12.
- [8] 李巍, 劳山. 体外培养兔骨髓间充质干细胞的研究 [J]. *医学信息(中旬刊)*, 2011, 5(5): 2 087.
- [9] 王峻, 吕文辉, 刘红云. 密度梯度离心与贴壁法分离培养兔骨髓间充质干细胞及其生物学特性观察 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12 (34): 6 631 - 6 634.
- [10] 郑亮, 李萍华, 刘钰瑜, 等. 诱导骨髓间充质干细胞向脂肪细胞的分化 [J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16 (32): 5 926 - 5 930.

(2012-11-10 收稿)