

不同血清微环境对大鼠骨髓间充质干细胞体外培养的影响**☆

郑景辉, 李勇华, 王丽萍, 简维雄, 黄献平, 袁肇凯

Effects of different serum microenvironments on culture of rat bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro*

Zheng Jing-hui, Li Yong-hua, Wang Li-ping, Jian Wei-xiong, Huang Xian-ping, Yuan Zhao-kai

Abstract

BACKGROUND: During culture of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs), a certain serum is commonly added in the basic medium, such as calf serum and fetal bovine serum, but there are potential biological safety risks.

OBJECTIVE: To study the effects of different serum microenvironments on *in vitro* culture of rat BMSCs.

METHODS: BMSCs were harvested from adult rat bone marrow, and cultured *in vitro* by whole bone marrow adherence method. The cells were cultured under the following serum microenvironment. The primary cells of autoserum group were cultured with autoserum, changing the medium with fetal bovine serum after passage. The primary cells of homogeneity foreign serum group were cultured with homogeneity foreign serum, changing the medium with fetal bovine serum after passage. The primary cells of fetal bovine serum group were cultured with fetal bovine serum, and cultured with fetal bovine serum after passage. The primary cells of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) group were cultured with serum-free DMEM, changing the medium with fetal bovine serum after passage. The morphologic changes in BMSCs were detected under an inverted phase contrast microscope. Attachment rate and growth curve were measured. Surface marker CD11b, CD45 and CD90 expression was analyzed by flow cytometry.

RESULTS AND CONCLUSION: In autoserum and homogeneity foreign serum groups, the homogeneity and degrees of fusion of cell morphology were improved in comparison with other two groups and the day of first passage was less than other groups. The attachment rate was greater in the autoserum, homogeneity foreign serum and fetal bovine serum groups than the DMEM group at 24, 48, 72 hours ($P < 0.01$). Doubling rate was fastest in the growth curve of autoserum group, followed by homogeneity foreign serum group and fetal bovine serum group. However, no doubling phenomenon was found in the DMEM group. Flow cytometry results demonstrated that the rates of CD11b-positive and CD45-positive cells at passage 3 were above 98% under medium containing serum, and CD90-positive rate was less than 2%. We could obtain BMSCs of higher purity. However, CD11b-positive rate was 95.83%, CD90-positive rate was 2.07%, but CD45 positive rate was only 64.79% under serum-free microenvironment. BMSC purity was significantly lower under serum-free microenvironment than under serum microenvironment. Results indicated that the microenvironment of rat autoserum can improve the attachment rate, growth and purification of BMSCs.

Institute of Traditional Chinese Medicine Diagnosis, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China

Zheng Jing-hui☆, Studying for doctorate, Traditional Chinese Medicine Physician, Institute of Traditional Chinese Medicine Diagnosis, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China
zhengjinghui@hotmail.com

Correspondence to: Yuan Zhao-kai, Professor, Institute of Traditional Chinese Medicine Diagnosis, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China
yuanzk1520@yahoo.com.cn

Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30772696*; the Innovation Foundation of Postgraduate of Hunan Province, No. CX2009B168*

Received: 2009-11-26
Accepted: 2010-02-30

Zheng JH, Li YH, Wang LP, Jian WX, Huang XP, Yuan ZK. Effects of different serum microenvironments on culture of rat bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro*. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(14): 2497-2502. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 骨髓间充质干细胞在培养过程中, 常在基础培养基中添加一定的血清, 最常见的是小牛血清和胎牛血清, 但这存在着一定的生物安全隐患。

目的: 观察不同血清微环境对大鼠骨髓间充质干细胞体外培养的影响。

方法: 自成年大鼠骨髓中分离骨髓间充质干细胞, 采用全骨髓贴壁法培养。分别以下列血清微环境培养: 自身血清组: 分离细胞后原代用含大鼠自身血清的培养基培养, 传代后换用含胎牛血清的培养基培养; 同种异体血清组: 分离细胞后原代用含同种异体血清的培养基培养, 以后用胎牛血清培养基培养; 胎牛血清组: 分离后用含胎牛血清培养基培养, 以后一直用含胎牛血清培养基培养; DMEM组: 分离细胞后原代用不含血清的DMEM培养基培养, 传代后换用含胎牛血清的培养基培养。在倒置相差显微镜下观察细胞的形态; 细胞的贴比率; 生长曲线; 流式细胞仪观测细胞表面CD11b、CD45和CD90表达。

结果与结论: 大鼠自身血清微环境及同种异体血清微环境细胞形态均一性、在融合度均高于其他组; 首次传代天数低于其他组。24, 48, 72 h贴比率自身血清组、同种异体血清组和胎牛血清组均高于DMEM组($P < 0.01$)。在细胞生长曲线中大鼠自身血清组倍增速率最快, 其次为同种异体血清组, 再者为胎牛血清组, 而DMEM组细胞未见明显倍增现象。流式细胞仪检测含血清培养基培养条件下各组第3代细胞CD11b和CD45阳性细胞率均达到98%以上, CD90阳性率小于2%, 可以得到纯度较高的骨髓间充质干细胞。但是在无血清微环境条件下, CD11b的阳性率为95.83%、CD90阳性率达2.07%, 而CD45阳性率仅为64.79%, 可见无血清环境下培养的骨髓间充质干细胞纯度明显低于含血清微环境。提示大鼠自身血清微环境下更有利于骨髓间充质干细胞的贴壁、生长及纯化。

关键词: 微环境; 细胞培养; 骨髓间充质干细胞; 方法; 血清; 大鼠

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.14.006

郑景辉, 李勇华, 王丽萍, 简维雄, 黄献平, 袁肇凯. 不同血清微环境对大鼠骨髓间充质干细胞体外培养的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(14):2497-2502. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

湖南中医药大学
中医诊断研究所,
湖南省长沙市
410007

郑景辉☆, 男,
1976年生, 山东
省阳信县人, 汉
族, 湖南中医药
大学在读博士, 中
医师, 主要从事心
血管疾病中西医
结合诊疗的研究。
zhengjinghui@
hotmail.com

通讯作者: 袁肇
凯, 教授, 湖南中
医药大学中医诊
断研究所, 湖南省
长沙市 410007
yuanzk1520@
yahoo.com.cn

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225
(2010)14-02497-06

收稿日期: 2009-11-26
修回日期: 2010-02-30
(20090826015/
WL·Q)

0 引言

骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchyma1 stem cells, BMSCs) 是中胚层来源的干细胞, 主要存在于全身结缔组织和器官间质中, 以骨髓组织中含量最为丰富, 胎儿脐血中亦可分离得到^[1-2]。MSCs获取容易、创伤微小, 具有无限扩增和多功能分化潜能, 经体外扩增、诱导分化, 然后用于自体移植, 不存在主要组织相容性复合体限制, 无免疫原性, 易于外源基因转染和长期表达^[3-4]; 受到医学研究者的青睐。随着组织工程的兴起, MSCs成为组织工程的重点种子细胞, 用于临床将显著促进细胞移植和组织工程学的发展, 具有非常广阔的应用前景。

所以获得生长状态良好、较纯化和足够数量的BMSCs是组织工程研究实验的基础。本实验在总结前人贴壁分离法培养BMSCs的基础上, 对比分析了大鼠自身血清、同种异体血清、胎牛血清及无血清环境4种血清微环境下, BMSCs贴壁率、扩增率及纯度, 旨在为应用组织工程技术提供大量高纯度的种子细胞。

1 材料和方法

设计: 以细胞为对象的对比观察实验。

时间及地点: 实验于2008-09/2009-05在湖南中医药大学中医诊断研究所、中医药管理局病理生理三级实验室进行。

材料: 选用6~8周龄清洁级雄性SD大鼠, 体质量130~150 g, 购自湖南中医药大学动物实验中心(动物许可证号: SCXK(湘)2009-0004)。实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部2006年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准^[5]。

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
培养基 L-DMEM、胰蛋白酶	美国 GIBCO 公司
胎牛血清	杭州四季青公司
FITC 标记 CD11b、CD45、CD90 抗体	美国 SERANTEC 公司
YJ22450 医用净化工作台	苏州安泰空气技术有限公司
2300 型 CO ₂ 培养箱	美国 SHEL-LAB 公司
流式细胞仪	美国 BD 公司

实验方法:

大鼠血清培养基的配制^[6]: 实验过程中动物均

自由饮食, 采集的大鼠全血于4 °C静置30 min后, 低温离心机1 000 r/min离心15 min, 分离的血清用0.25 μm的微孔滤膜过滤除菌, 经56 °C恒温水浴30 min灭活处理后, 然后加入L-DMEM配置成10%浓度的培养液, 置于4 °C冰箱备用。

大鼠BMSCs体外培养^[7]: 6~8周龄雄性SD大鼠断头处死取完血后, 在体积分数为75%乙醇中浸泡15 min。在无菌条件下快速取胫骨和腓骨, 去除周围组织, 切除胫骨和腓骨两端, 用DMEM液反复冲洗骨髓腔, 将冲洗液收集于离心管中, 1 500 r/min离心5 min, 弃上清液。根据不同分组将相应的培养基加入离心管中, 反复吹打, 细胞计数后以 $1 \times 10^{11} \text{ L}^{-1}$ 密度接种于50 cm²培养瓶中, 37 °C、饱和湿度、含体积分数为5%的CO₂孵育箱中培养。48 h后弃悬浮液, 加入含体积分数为10%胎牛血清新培养基。每3 d换液1次, 悬浮生长的造血细胞随换液被弃去, 留下贴壁生长的BMSCs。约待细胞在瓶底融合基本达到80%, 胰蛋白酶消化传代。

实验分组: 实验分为4组, 分别以下列血清微环境培养: ①自身血清组: 分离细胞后原代用含大鼠自身血清的培养基培养, 传代后换用含胎牛血清的培养基培养。②同种异体血清组: 分离细胞后原代用含同种异体血清的培养基培养, 以后用胎牛血清培养基培养。③胎牛血清组: 分离后用含胎牛血清培养基培养, 以后一直用含胎牛血清培养基培养。④DMEM组: 分离细胞后原代用不含血清的DMEM培养基培养, 传代后换用含胎牛血清的培养基培养。

细胞形态学观察: 倒置显微镜下, 每天观察贴壁分离培养、密度梯度离心培养条件下原代及传代细胞的生长情况和活体形态特征。

细胞贴壁率的测定: BMSCs按 $2 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 密度接种于25 cm²培养瓶中3 mL, 接种细胞后24, 48, 72 h分别随机选取各组培养细胞3瓶。弃去旧培养液, 重新加入新培养液后, 在OlympusTM倒置显微镜下进行尺度定标, 200倍视野定标直径为190 μm, 则视野定标面积为28 352.9 μm²。然后在每个培养瓶中随机选取15个视野, 对贴壁细胞进行计数, 计算贴壁率。

$$\text{贴壁率(\%)} = \frac{\text{每个视野细胞数}}{\left[\frac{\text{每瓶细胞总数}}{\text{瓶底面积}} / \text{每个视野定标面积} \right]} \times 100\%$$

每组3个样本, 实验重复2次。

$$\frac{\text{每个视野细胞数}}{[6 \times 10^6 / (25 \times 10^5 \mu\text{m}^2 / 28\ 352.9 \mu\text{m}^2)]} \times 100\% = \frac{\text{每个视野细胞数}}{68\ 027} \times 100\%$$

细胞生长曲线测定^[8]: 取生长良好的第3代细胞制备单细胞悬液, 计数, 调整细胞浓度为 $2 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 接种到24孔板, 每孔接种0.5 mL, 置于培养箱培养, 每天随机选取3个培养孔, 胰酶消化, 计算每孔细胞数, 取均值, 待细胞长满时停止计数。以时间为横坐标, 细胞数为纵坐标, 绘制生长曲线, 连续观察10 d, 未计数细胞每3 d换液1次。

BMSCs“纯化”度的检测^[9]: 取第2代处于对数生长期且生长良好的BMSCs, 0.25%胰蛋白酶消化后用含0.1%BSA的PBS悬浮, 调整密度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 取标本细胞悬液100 μL , 分别加入连接有荧光标记的CD11b、CD45、CD90兔抗鼠单克隆抗体10 μL 及对照组用PBS, 流式细胞仪检测, 观察CD分子细胞标记率。

主要观察指标: 倒置相差显微镜下观察细胞的形态; 细胞的贴比率; 生长曲线; 流式细胞仪观测细胞表面CD11b、CD45和CD90的表达。

设计、实施、评估者: 实验设计为第一作者, 干预实施为全部作者, 评估为第三、四作者, 采用盲法评估。

统计学分析: 由第一作者采用SPSS 13.0软件完成统计处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 经正态性、方差齐性检验后, 方差齐时两组间样本比较采用完全随机设计t检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义, $P < 0.01$ 为差异有非常显著性意义。

2 结果

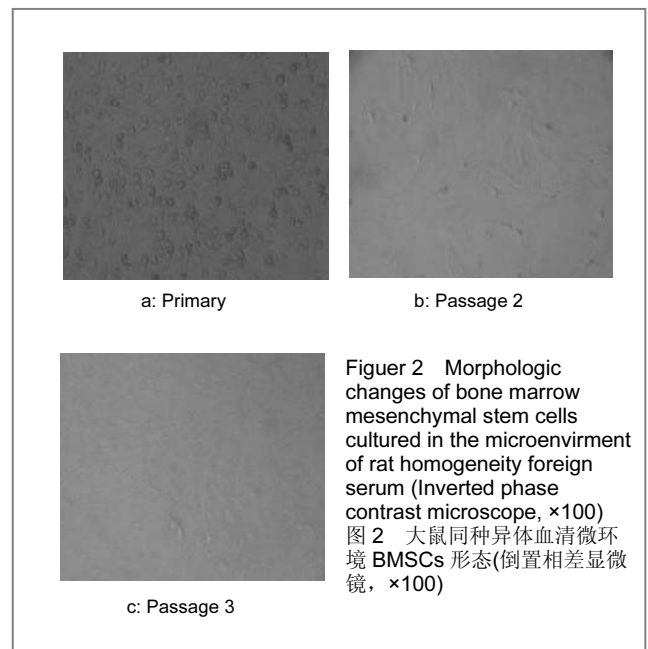
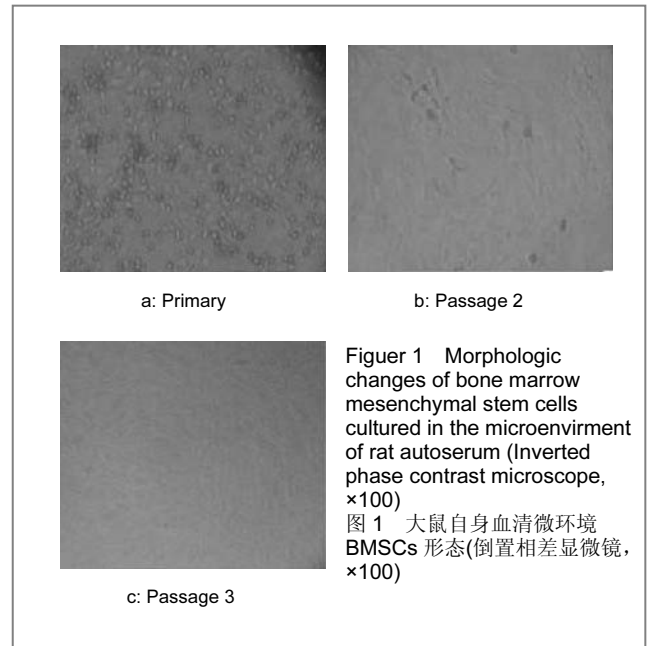
2.1 细胞形态观察结果 各组刚分离的细胞镜下呈圆形, 大小不一, 数目较多。细胞培养24 h后, 培养液中均可见大量细胞, 其中数目较多的是小圆形悬浮细胞。

48 h后首次换液弃去未贴壁细胞后:

自身血清组: 可见体积较大的椭圆或类圆形细胞及二角形、多边形细胞, 较前期的悬浮细胞体积大, 细胞核清晰呈圆形位于细胞中央; 细胞贴壁数量较多, 基本融合50%, 至第3~5天细胞大多数呈短梭形、二角形及多边形贴壁细胞, 第8天细胞可达80%融合传代; 第2代细胞五六天传代, 至第3代细胞形态较均一, 呈长梭形集落样分布, 见图1。

同种异体血清组: 首次换液后即可见体积较大的椭圆或类圆形细胞及少量短梭形、二角形及多边形的贴壁细胞; 第五六天可见上述细胞呈集落样分布, 融合50%; 至第10~12天细胞增殖至80%融合时消化传代; 第2代细

胞在五六天达到融合, 再次传代; 第3代细胞形态较均一, 呈长梭形集落样分布, 见图2。



胎牛血清组: 首次换液后以椭圆或类圆形细胞为主, 贴壁细胞数量较少, 分布稀疏。第五六天可见上述细胞呈梭形, 二角形分布, 至第12~15天细胞增殖至80%融合时消化传代; 第2代细胞在7~9 d达到融合, 再次传代; 第3代细胞形态较均一, 呈长梭形集落样分布。从首次换液后至第3代细胞, 大多为体积较大的椭圆形或类圆形细胞, 梭形细胞数量较少, 见图3。

DMEM组: 首次换液后可见体积较大的圆形或类圆形细胞, 10 d左右细胞变为细长梭形, 或细长多角形, 共培养30 d, 细胞融合约为40%, 呈集落状网状分布, 说明细胞已老化, 见图4。

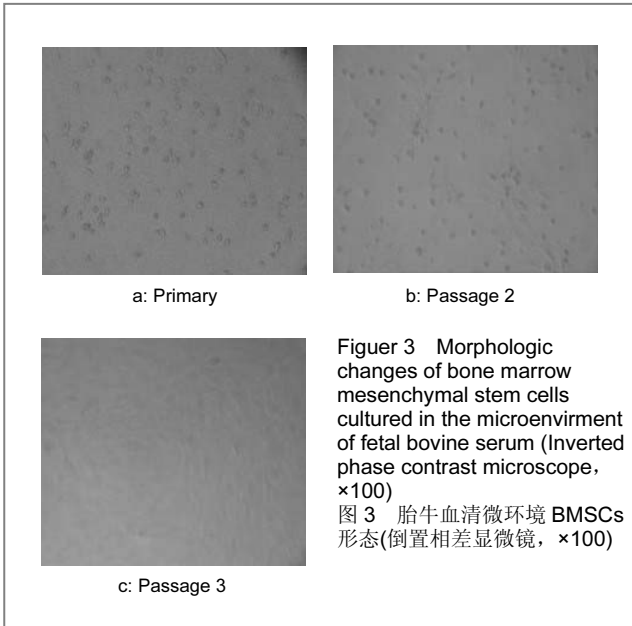


Figure 3 Morphologic changes of bone marrow mesenchymal stem cells cultured in the microenvironment of fetal bovine serum (Inverted phase contrast microscope, $\times 100$)
图3 胎牛血清微环境 BMSCs 形态(倒置相差显微镜, $\times 100$)

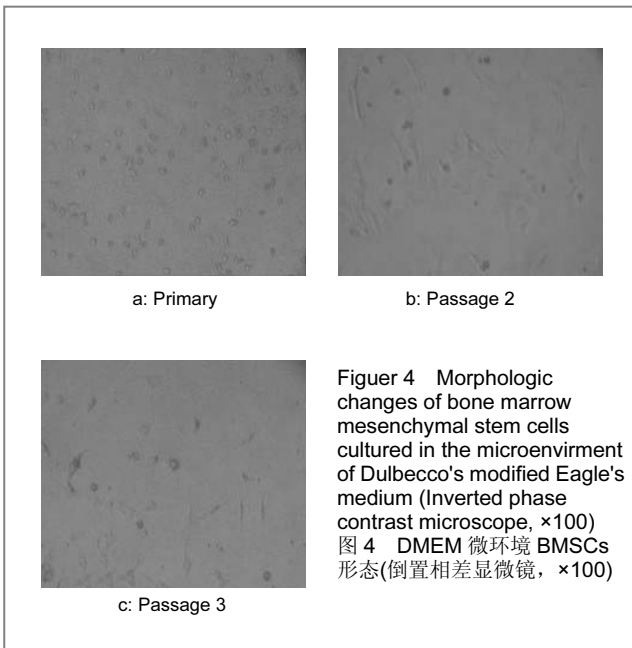


Figure 4 Morphologic changes of bone marrow mesenchymal stem cells cultured in the microenvironment of Dulbecco's modified Eagle's medium (Inverted phase contrast microscope, $\times 100$)
图4 DMEM 微环境 BMSCs 形态(倒置相差显微镜, $\times 100$)

2.2 细胞贴壁率测定结果 每组3个样本, 实验重复2次, 结果见表1。

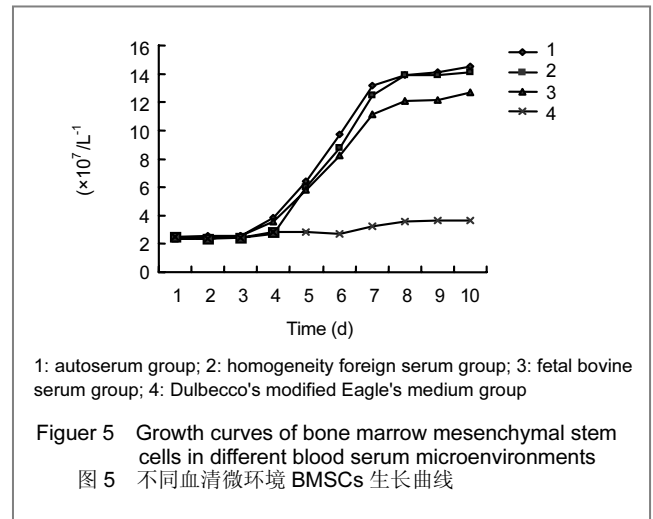
表1 不同血清微环境培养对BMSCs贴壁率的影响
Table 1 Effects of attachment rate of bone marrow mesenchymal stem cells cultured in different serum microenvironments ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$, %)

Group	24 h	48 h	72 h
Autoserum	0.526 \pm 0.028	0.586 \pm 0.064	0.619 \pm 0.045
Homogeneity foreign serum	0.504 \pm 0.038	0.540 \pm 0.071	0.589 \pm 0.065
Fetal bovine serum	0.311 \pm 0.050 ^{ab}	0.398 \pm 0.055 ^{ab}	0.439 \pm 0.037 ^{ab}
Dulbecco's modified Eagle's medium	0.142 \pm 0.019 ^{abc}	0.171 \pm 0.020 ^{abc}	0.154 \pm 0.007 ^{abc}

^a $P < 0.01$, vs. autoserum group; ^b $P < 0.01$, vs. homogeneity foreign serum group; ^c $P < 0.01$, vs. fetal bovine serum group

可以看出BMSCs全血贴壁法, 大鼠自身血清及同种异体血清贴壁率明显高于胎牛血清和无血清DMEM组, 而自身血清和同种异体血清之间未见明显差异。DMEM组贴壁率最低, 与其他组相比, 差异均有非常显著性意义($P < 0.01$)。

2.3 第3代细胞生长曲线测定结果 含血清培养基培养条件下各组第3代细胞生长曲线基本相似, BMSCs生长曲线呈S形, 经过36 h的缓慢生长期后, 从第3~8天为指数生长期, 然后进入平台期, 细胞停止增殖; BMSCs的群体倍增时间为96 h左右。其中大鼠自身血清组倍增速率最快, 其次为同种异体血清组, 再者为胎牛血清组。而DMEM组细胞未见明显倍增现象。说明大鼠BMSCs体外增殖必须血清的刺激, 其中自身血清对BMSCs体外增殖刺激作用最好, 其次为同种异体血清, 再者异种血清, 见图5。



1: autoserum group; 2: homogeneity foreign serum group; 3: fetal bovine serum group; 4: Dulbecco's modified Eagle's medium group

Figure 5 Growth curves of bone marrow mesenchymal stem cells in different blood serum microenvironments
图5 不同血清微环境 BMSCs 生长曲线

2.4 BMSCs“纯化”度的检测结果 含血清培养基培养条件下各组第3代细胞CD11b和CD45阳性细胞率均达到98%以上, CD90阳性率小于2%, 见图6, 表2。

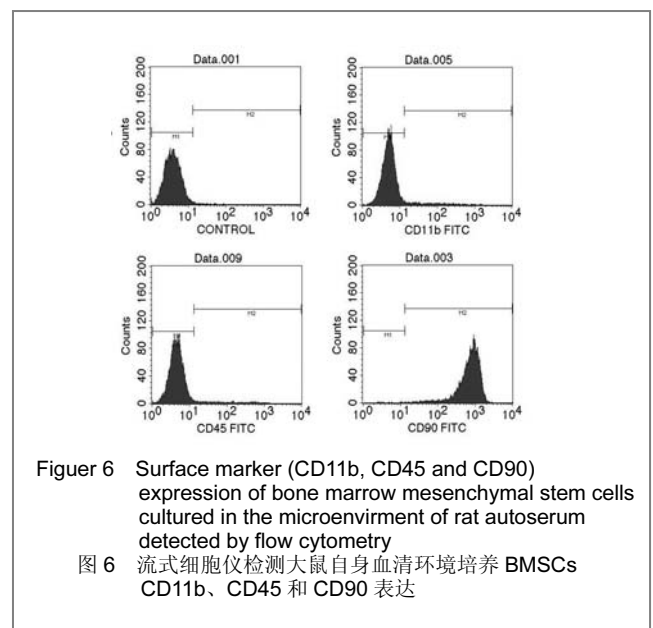


Figure 6 Surface marker (CD11b, CD45 and CD90) expression of bone marrow mesenchymal stem cells cultured in the microenvironment of rat autoserum detected by flow cytometry
图6 流式细胞仪检测大鼠自身血清微环境培养 BMSCs CD11b、CD45 和 CD90 表达

由此可以得到纯度较高的MSCs。但是在无血清微环境条件下, CD11b的阳性率为95.83%、CD90阳性率达2.07%, 而CD45阳性率仅为64.79%(见表2), 在流式细胞仪直方图上出现双峰, 见图7。可见无血清环境下培养的BMSCs纯度明显低于含血清微环境。

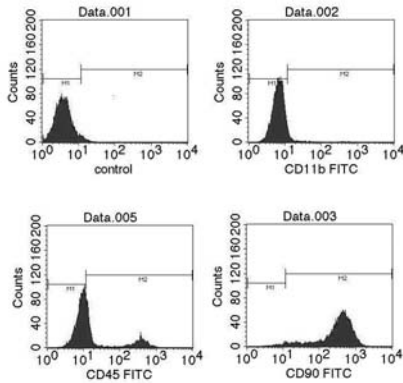


Figure 7 Surface marker (CD11b, CD45 and CD90) expression of bone marrow mesenchymal stem cells cultured in the microenvirment of Dulbecco's modified Eagle's medium detected by flow cytometry
图7 流式细胞仪检测 DMEM 环境培养 BMSCs CD11b、CD45 和 CD90 表达

表2 不同血清微环境BMSCs CD11b、CD45和CD90表达阳性百分率

Table 2 Percentage of surface marker (CD11b, CD45 and CD90) expression of bone marrow mesenchymal stem cells cultured in the different serum microenvirments (%)

Group	CD11b	CD45	CD90
Autoserum	99.41	99.22	0.61
Homogeneity foreign serum	98.86	98.56	0.54
Fetal bovine serum	99.15	98.67	1.76
Dulbecco's modified Eagle's medium	95.83	64.79	2.07

成的组织区域^[15]。包括对细胞其支持营养作用的细胞外基质及细胞生长分化的信息途径。现在对微环境的研究在肿瘤医学及组织细胞工程中应用广泛, 已发现微环境与肿瘤的演变、治疗、细胞培系的维持/分化具有密切的关系^[16-19]。因此研究不同血清微环境对细胞生长及细胞系维持具有重要意义。

骨髓中的BMSCs含量很低, 每1~10万个单核细胞中含有1个BMSCs, 因此, 建立成熟的BMSCs体外分离、培养、纯化和扩增及细胞系维持的方法是利用BMSCs进行广泛深入研究和临床应用的基础。目前对BMSCs进行体外分离、纯化、培养最主要的方法有全骨髓贴壁法、密度梯度离心法、流式细胞仪分离法、免疫磁珠法, 后两种方法可获得较为纯化的BMSCs, 但对细胞活性影响较大, 甚至导致细胞完全失去活性^[20]。全骨髓贴壁分离法是最早应用的方法, 是根据BMSCs贴壁生长的特性, 在换液及传代过程中除去骨髓中不贴壁的造血细胞成分和造血干细胞的分离方法。Friedenstein等^[21]提出BMSCs概念时所采用的分离方法即为此种方法, 此后的贴壁分离法均是在他的方法基础上不断的优化。优点是方法简单, 对细胞损伤小, 获取的细胞活力及分裂能力较强, 最主要的缺点要获得纯度较高细胞需要三四次传代。对于MSCs纯度的鉴定, 一般认为MSCs属混杂细胞群, 其表面抗原也具有非专一性, 它表达了间质细胞、内皮细胞和表皮细胞的表面标志。目前认为CD29、CD44、CD71、CD90、CD166、CD120a、CD124、SH2及SH3是MSCs的重要标志^[22-24]。MSCs不表达造血细胞表面抗原, 如造血前体细胞标志抗原CD34、白细胞标志抗原CD45, 淋巴细胞表面抗原CD11, 单一核细胞/巨噬细胞表面抗原CD14等。

目前不知道干细胞生长繁殖需要什么生长因素, 没有一种生长因子的混合物能满足细胞生长需要的^[25]。不论是实验研究还是临床应用, 通常在基础培养基中添加一定的血清, 最常见的是胎牛血清和小牛血清, 此外还有鸡血清、羊血清及脐带血清等^[26-27], 这被认为是培养BMSCs的最佳条件。但是使用动物血清具有双面性。一方面血清含大量的蛋白、丰富的营养成分、细胞因子、微量元素以及贴壁因子等, 能很好地支持细胞的生长。另一方面, 血清的生物安全性隐患, 其可能含有动物来源的病原体, 诸如支原体、衣原体、黑胶虫及各种病毒; 在实验中造成细胞污染, 生长缓慢甚至死亡, 尤其一些病毒在细胞DNA整合造成所获得细胞非目的细胞, 影响实验结果。而在生产临床级别的人用细胞产品时, 理论上会导致这些病原体的传播。此外, 细胞的吞噬作用使牛血清中的蛋白分子细胞内在化, 当进行细胞移植时将导致宿主产生免疫反应^[28]。因而本实验旨在观察自身血清及同种血清构建的BMSCs培养体系的效果, 以避免这些潜在的威胁。

3 讨论

BMSCs是指许多种未经鉴定的细胞所组成的复杂的混合细胞群。机体在创伤等应激情况时, MSCs可迁移至受创部位, 并在创伤微环境中分化为相应细胞参与创伤修复。但在体外培养条件下, MSCs不会自发分化^[9]。BMSCs是从骨髓中分离得到的高度同源性的细胞, 可大量增殖, 具有多分化潜能, 在不同的微环境可被诱导分化为成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞、肌腱、肌细胞、内皮细胞、神经胶质细胞、神经细胞、心肌细胞等^[10-14], 是组织工程的理想种子细胞。因此, 微环境中的外源性诱导剂对MSCs分化有着重要作用。所谓“微环境”是指干细胞能维持自身细胞系特征的特殊环境组

本实验表明, 运用大鼠自身血清或同种异体血清微环境对BMSCs进行培养, 可以明显增加细胞的贴壁率, 提高细胞的倍增效率, 第3代细胞纯度检测, BMSCs标志CD11b、CD45和CD90表达的百分率明显优于胎牛血清及无血清培养基。这可能与大鼠自身血清及同种异体血清, 在其复杂的成分中, 诸如MHC分子, 集落刺激因子、生长因子等免疫原性更适合自身细胞, 从而使细胞内信号转导、基因表达, 蛋白合成等过程更紧密顺利, 促进了细胞增殖及细胞系的维持。再就是这种培养方法所获取的血清都是新鲜的血清, 在一定程度上避免了商品血清在运输储存过程中蛋白的降解破坏, 即随之而来产生的细胞毒物质对细胞的损害。说明运用大鼠自身血清或同种异体血在细胞培养法, 细胞的生长状态及活性良好。可以作为临床及实验中培养方法, 从而避免上述潜在的威胁。但是在操作过程中要注意无菌操作, 避免污染。

4 参考文献

- [1] Kim SW, Lee IK, Yun KI, et al. Adult stem cells derived from human maxillary sinus membrane and their osteogenic differentiation. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 200;24(6):991-998.
- [2] Kestendjieva S, Kyurkchiev D, Tsvetkova G, et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the human umbilical cord. *Cell Biol Int*. 2008;32(7):724-32.
- [3] Rossignol J, Boyer C, Thinar R, et al. Mesenchymal stem cells induce a weak immune response in the rat striatum after allo or xenotransplantation. *J Cell Mol Med*. 2009;13(8B):2547-2558.
- [4] Shi DG, Li GL, Zhang JR, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009;13(33):6411-6417. 史德刚, 栗国梁, 张积仁, 等. 重组碱性成纤维细胞生长因子基因转染对于骨髓源性成骨细胞的生物学特性及对血管生成的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(33): 6411-6417.
- [5] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance suggestion of caring laboratory animals. 2006-09-30. 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [6] Wang JY, Zheng Z, Xu ZY, et al. Effects of Feiyanning Decoction on proliferation of lung adenocarcinoma cell line and their production of interleukin-6 and interleukin-8 induced by tumor necrosis factor-alpha. *Zhong Xi Yi Ji He Xue Bao*. 2009;7(8):741-745.
- [7] Cai P, Zhu SX, Su YM, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009;13(36):7073-7077. 蔡鹏, 朱绍兴, 苏一鸣, 等. 全骨髓贴壁法分离培养大鼠骨髓间充质干细胞及其诱导分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(36): 7073-7077.
- [8] Zhang F, Sheng F, Wang XL, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009;13(1):21-26. 张芳, 盛望, 王小利, 等. 葡萄糖对人脐带间充质干细胞生长与代谢的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(1): 21-26.
- [9] Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, et al. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res*. 2007;327(3):449-462.
- [10] Martinez C, Hofmann TJ, Marino R, et al. Human bone marrow mesenchymal stromal cells express the neural ganglioside GD2: a novel surface marker for the identification of MSCs. *Blood*. 2007;109(10):4245-4248.
- [11] Wang CC, Chen CH, Lin WW, et al. Direct intramyocardial injection of mesenchymal stem cell sheet fragments improves cardiac functions after infarction. *Cardiovasc Res*. 2008;77(3):515-524.
- [12] Hakuno D, Fukuda K. Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMGcells) express functional adrenergic and muscarinic receptor. *Circulation*. 2002;105(3):380-386.
- [13] Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation*. 2001;103(6):897-903.
- [14] Liechty KW, Mackenzie TC, Shaaban AF, et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med*. 2000;6(11):1282-1286.
- [15] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>.
- [16] Juan TY, Roffler SR, Hou HS, et al. Antiangiogenesis targeting tumor microenvironment synergizes glucuronide prodrug antitumor activity. *Clin Cancer Res*. 2009;15(14):4600-4611.
- [17] Ma WW, Adjel AA. Novel agents on the horizon for cancer therapy. *CA Cancer J Clin*. 2009;59(2):111-137.
- [18] Tzukerman M, Rosenberg T, Reiter I, et al. The Influence of a Human embryonic stem cell-derived microenvironment on targeting of human solid tumor xenografts. *Cancer Res*. 2006;66(7):3792-3801.
- [19] Zheng JH, Li YH, Yuan ZK, et al. Zhongyi Zazhi. 2009;50(12):1065-1067. 郑景辉, 李勇华, 袁肇凯, 等. 从微环境的角度谈微环境辨证[J]. 中医杂志, 2009, 50(12): 1065-1067.
- [20] Ma L, Liu DJ, Li DT, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008;12(38):7401-7406. 马力, 刘大军, 李德天, 等. 不同分离方法及培养条件对兔骨髓间充质干细胞生长增殖及生物学特性的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(38): 7401-7406.
- [21] Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, et al. Heterotopic of bone marrow: Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968;6(2):230-247.
- [22] Peister A, Mellad JA, Wang M, et al. Stable transfection of MSCs by electroporation. *Gene Ther*. 2004;11(2):224-228.
- [23] Jones E, McGonagle D. Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47(2):126-131.
- [24] Liu Y, Song J, Liu X, et al. Growth and differentiation of rat bonemarrow stromal cells: does 5-azacytidine trigger their cardiomyo-genie differentiation. *Cardiovasc*. 2003;58(2):460-468.
- [25] Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res*. 2004;95(1):9-20.
- [26] McCarty RC, Gronthos S, Zannettino AC, et al. Characterisation and developmental potential of ovine bone marrow derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*. 2009;219(2):324-33.
- [27] Zhou XF, Kuang WY, Luo ZM, et al. Linchuang Xueyexue Zazhi. 2008;21(9):477-480. 周新伏, 旷文勇, 罗自勉, 等. 脐带血清体外培养临床应用人骨髓间充质干细胞的方法研究[J]. 临床血液学杂志, 2008, 21(9): 477-480.
- [28] Spees JL, Gregory CA, Singh H, et al. Internalized antigens must be removed to prepare hypo immunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. *Mol Ther*. 2004;9(5):747-756.

来自本文课题的更多信息一

基金资助: 课题为国家自然科学基金资助项目(30772696), 课题名称“养心通脉有效部位方对大鼠心肌缺血骨髓间充质干细胞移植的影响”; 湖南研究生创新基金资助项目(CX2009B168), 课题名称“心血瘀阻证微环境变化及对骨髓间充质干细胞移植的影响”。

利益冲突: 无利益冲突。

课题的意义: 实验在大鼠骨髓中分离得到间充质干细胞, 分别使用常规培养的胎牛血清、自体血清及同种异体血清进行培养。对细胞培养中常见的血清携带病原体污染、病原体传播、血清储存过程中蛋白降解后细胞毒性问题进行探讨。对间充质干细胞体外扩增、临床应用提供最佳培养条件基础支持。

课题评估的“金标准”: 暂无课题实验结果评价“金标准”。

设计或课题的偏倚与不足: 由于客观条件的限制, 实验重点观察了间充质干细胞在体外培养条件下的生长状况, 表面标志的表达。未进行活体内移植后细胞系维持、细胞分化、细胞归巢的研究。但毕竟体外模拟的微环境和机体整体级联反应条件下微环境有一定差别。再就是间充质干细胞在无血清微环境条件下, 其细胞外基质及信号转导的机制尚未做研究。课题下一步正在进行相关实验。

提供临床借鉴的价值: 本课题证明运用自身血清或同种异体血清体外培养间充质干细胞细胞增殖较快, 活性较好, 纯度较高。作为人类, 自身血清易于获得, 能够满足体外细胞培养的需要, 刚提取的新鲜血清其蛋白成分活性较高。对细胞的生长繁殖起到积极的促进作用。为临床间充质干细胞移植提供可行的方法, 以提高细胞移植后成活率、分化率。