

脐带间充质干细胞向成骨细胞分化的潜能**

扎拉嘎胡¹, 陈莉¹, 兰晓霞², 陈晓³, 陈小义¹

Potential of human umbilical cord mesenchymal stem cells differentiating into osteoblasts

Zhala Ga-hu¹, Chen Li¹, Lan Xiao-xia², Chen Xiao³, Chen Xiao-yi¹

Abstract

BACKGROUND: Human umbilical cord mesenchymal stem cells (UCMSCs) were rich and more primordial, had strong differentiation ability and low immunogenicity, suitable for transplanting to different individuals. Therefore, UCMSCs were an ideal target cells for cell therapy.

OBJECTIVE: To study the isolation and culture of UCMSCs and to explore the potential of osteogenesis differentiation in vitro.

METHODS: UCMSCs were sterilely isolated and cultured. The third passage of cells were divided into induction group and control group. The induction group was treated with ossify induction medium, and control group was treated with stem cell culture medium. The cell morphology was observed under an inverted light microscope. Cell proliferation was determined by MTT assay. The cell viability was detected by double immunofluorescent staining. Cell cycle and cell surface marker were determined using flow cytometry. Following induction, alkaline phosphatase (ALP) activity was measured utilizing microplate reader. Calcium deposition was analyzed using Von Kossa staining. mRNA expression of osteopontin (OPN), ALP and bone sialoprotein (BSP) was measured by reverse transplantation-polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS AND CONCLUSION: The passage cells were steady in the cell shapes, with good viability, and highly expressed CD44. Following induction, the cells were positive in von Kossa staining. ALP activity was higher in induction group compared with control group ($P < 0.05$). The ALP activity was greatest on day 21 ($P < 0.05$). RT-PCR indicated that ALP mRNA expression was higher in induction group compared with control group ($P < 0.05$). The BSP and OPN genes were expressed in induction group, which suggested that human UCMSCs can differentiate into osteoblasts.

Zhala GH, Chen L, Lan XX, Chen X, Chen XY. Potential of human umbilical cord mesenchymal stem cells differentiating into osteoblasts. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(40): 7439-7442. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 人脐带间充质干细胞含量丰富, 较为原始, 分化能力强, 免疫原性低, 是细胞治疗的理想靶细胞。

目的: 体外分离培养脐带间充质干细胞并将其定向诱导为成骨细胞。

方法: 无菌条件下培养脐带间充质干细胞, 分为诱导组和对照组, 诱导组用成骨诱导液处理、对照组为干细胞培养液处理。倒置光显微镜观察细胞形态, MTT 法测细胞增殖, 荧光双染法检测细胞活力, 流式细胞仪检测细胞周期与细胞表面标记。诱导后: 检测碱性磷酸酶, Von Kossa 染色分析钙盐沉积, RT-PCR 检测骨桥蛋白基因、碱性磷酸酶、骨唾液蛋白 mRNA 的表达。

结果与结论: 传代细胞形态稳定、活力好, 高表达 CD44。诱导后 von Kossa 染色表现为阳性。碱性磷酸酶活性诱导组比对照组高 ($P < 0.05$), 不同时间点比较 21 d 最高 ($P < 0.05$)。RT-PCR 显示: 诱导组 21, 28d 碱性磷酸酶 mRNA 表达均较与对照组增强 ($P < 0.05$)。诱导组有骨唾液蛋白和骨桥蛋白基因 mRNA 表达。提示, 人脐带间充质干细胞能够定向分化为成骨细胞。

关键词: 脐带; 间充质干细胞; 成骨细胞; 细胞分化; 诱导

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.40.007

扎拉嘎胡, 陈莉, 兰晓霞, 陈晓, 陈小义. 脐带间充质干细胞向成骨细胞分化的潜能[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(40):7439-7442. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

骨组织工程学中种子细胞的成骨潜能、体外扩增能力、细胞寿命均是人们探索的热点。从脐带分离间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSCs), 则具有取材方便, 来源丰富, 免疫原性较弱^[1-2], HLA配型不符^[3], 利于临床应用。本实验从脐带分离培养MSCs, 并探讨向成骨细胞分化的可能性。

1 材料和方法

设计: 细胞形态学观察。

时间及地点: 实验于2008-03/2009-12在武警医学院细胞生物学实验室完成。

材料: 取健康产妇产足月新生儿脐带(胎龄37~40周), 由天津武警医学院附属医院产房提供, 采集后4℃保存, 6 h内处理。

主要试剂、仪器及来源:

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	德国 Biochrom 公司
鼠抗人 CD44 单克隆抗体、	美国 Napco 公司
SUNRISE 全自动酶标仪	奥地利 Tecam 公司

方法:

脐带MSCs的分离培养: 采用贴壁筛选法^[4], 在

¹Department of Cell Biology, Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China; ²Research Room of Epidemiology, Department of Preclinical Medicine, Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China; ³Department of Gynaecology and Obstetrics, Hospital Affiliated to Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China

Zhala Ga-hu★, Master, Lecturer, Department of Cell Biology, Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China
Zhalaga2003@sina.com

Correspondence to: Chen Xiao-yi, Master, Master's supervisor, Professor, Department of Cell Biology, Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China
chenxiaoyi6111@163.com

Supported by: the Scientific Research Program of Chinese People's Armed Police Forces, No. WY200806*

Received: 2010-05-04
Accepted: 2010-07-09

武警医学院, ¹细胞生物学教研室, ²预防医学系流行病学教研室, 天津市 300162; ³武警医学院附属医院妇产科, 天津市 300162

扎拉嘎胡★, 女, 1972年生, 内蒙古自治区通辽市人, 蒙古族, 2003年内蒙古大学毕业, 硕士, 讲师, 主要从事间充质干细胞基础和应用方面的研究。zhalaga2003@sina.com

通讯作者: 陈小义, 硕士, 硕士生导师, 教授, 武警医学院细胞生物学教研室, 天津市 300162 chenxiaoyi6111@163.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)40-07439-04

收稿日期: 2010-05-04
修回日期: 2010-07-09
(20100504018/D·Q)

无菌条件下取脐带, 分离弃去脐静脉和脐动脉, 用PBS冲洗除血, 剪切1.0 mm²的组织块, 6孔板接种, 加入L-DMEM(含10%胎牛血清, L-谷氨酰胺2 mmol/L, 80 U/mL庆大霉素), 置37℃、5%CO₂及饱和湿度条件下培养。96 h后首次换半液, 5 d组织周围爬出细胞, 7 d换液弃去组织块, 传代, 取第3代细胞备用。

检测指标:

生物学特性的鉴定: ①细胞形态学: 倒置显微镜观察UMSCs活体形态, 并摄像纪录。②MTT法检测生长曲线: 细胞经消化, 密度以 3×10^8 , 1.5×10^8 , 8×10^7 , 4×10^7 , 2×10^7 , 5×10^6 , 2×10^6 mL⁻¹接种于96孔板中, 每组设8个复孔, 3, 5, 7, 9 d加入MTT(5 g/L) 20 μL, 4 h后, 离心10 min, 弃上清, 加入DMSO 200 μL, 振荡, 酶标仪测定570 nm处吸光度值。③细胞坏死率^[5]: Hoechst 33342和PI进行荧光染色, 洗涤后滴片, 荧光显微镜观察。④细胞周期与表面抗原表达: 细胞消化, PBS洗, 制单细胞悬液(1×10^9 L⁻¹), 体积分数75%乙醇固定, 4℃保存。检测时加入100 mg/L碘化丙锭500 μL, 4℃避光染色30 min, 流式细胞仪分析细胞周期各时相比率和细胞表面CD44、CD45、CD34。

细胞分化: 诱导组换为成骨诱导液, 设3个复孔: ①观察诱导后细胞形态。②von Kossa染色检测钙化结节, 第21天用PBS洗3次, 浸泡2 h, 10%甲醛4℃固定过夜。蒸馏水洗, 入5%硝酸银, 紫外照射30 min, 蒸馏水洗, 5%硫代硫酸钠5 min, 水洗后观察。③碱性磷酸酶(ALP)活性检测, 诱导3, 7, 14, 21, 28 d弃旧培养液, 入75 μL AMP缓冲液, 入75 μL对硝基苯磷酸钠, 37℃避光孵育40 min, 0.2% mol/L NaOH终止反应, 酶标仪405 nm处测吸光度值。④RT-PCR检测骨桥蛋白(osteopontin, OPN), ALP, 骨唾液蛋白(bone sialoprotein, BSP) mRNA表达。

引物序列及产物大小:

OPN:

引物: 上 5'-GTGCCACCATACCAGTTAAACA-3'; 下 5'-CTTACTTGGAAGGGTCTCT-3'; 长度: 148 bp

ALP:

引物: 上 5'-ATCGCCTACCAGCTCATGCAT-3'; 下 5'-GTTCTGCTGACTGCTGCTG-3'; 长度: 291 bp

BSP:

引物: 上 5'-GCATCGAAGAGTCAAATA-3'; 下 5'-TTCTTCTCCATTGCTCTTCTC-3'; 长度: 534 bp

β-actin:

引物: 上 5'-TGTTTGAGACCTTCAACACCC-3'; 下 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'; 长度: 540 bp

PCR 条件: 94℃、3 min, 94℃、1 min,

58℃、30 s, 72℃、1 min、30个循环, 72℃ 10 min。

提细胞总 RNA, 测 RNA 含量和纯度, 以 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测无降解后, 按 RT-PCR 两步法操作。1 μg 总 RNA 反转录成 cDNA, 条件: 30℃、10 min, 42℃、30 min, 99℃、5 min, 5℃、5 min。10 μL 扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶自动成像系统扫描。用 Quantity one-4.6.2 分析电泳条带吸光度值。

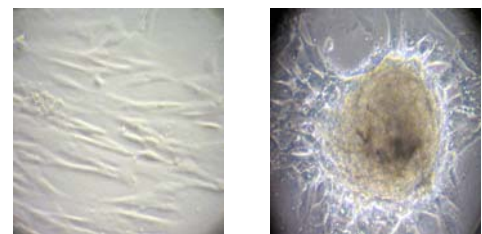
主要观察指标: 细胞形态、生长特性, 存活率, 细胞周期与表面抗原的表达从而鉴定培养细胞生物学特性。诱导后检测钙化结节、ALP 活性、相关基因的表达。

设计、实施、评估者: 设计和实施由第一作者、全部作者参加评估。

统计学分析: 统计分析由第三作者完成, 用 SPSS 11.0 软件, 数据均用“双因素重复测量方差分析”, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 细胞形态观察 接种第5天长出贴壁细胞, 呈长梭形, 折光性强, 核大明显, 第10~14天汇集成片, 漩涡状生长(图1a)。传代细胞性质稳定^[6]; 第3代生长旺盛有克隆形成(图1b)。



a: Primary culture of UCMSCs on d 15

b: Tertiary culture of UCMSCs on d 2

Figure 1 Cell morphology of UCMSCs at various phases (×100)

图1 不同时期的UMSCs镜下观察(×100)

2.2 UMSCs生长曲线测定 各组前3 d数量变化不大, 4×10^7 L⁻¹, 8×10^7 L⁻¹, 1.5×10^8 L⁻¹随着时间的延长增殖较快, 第5~9天明显增多($P < 0.05$), 以后生长较为缓慢。密度过稀或过密则细胞增殖缓慢, 见表1。

2.3 荧光显微镜观察细胞凋亡 经荧光双染后可见细胞核均匀一致, 被Hoechst33342染成蓝色荧光, 见图2。

2.4 细胞周期与细胞表面抗原表达 第2代细胞92.6%处于G₀/G₁期, 7.4%处于G₂/M期; 第11代91.5%处于G₀/G₁期, 2.5%G₂/M, 6.0%处于

S期, 见图3。第2代脐带MSCs表面抗原CD44 (71.23%), CD45 (1.13%), CD34(1.89%)表达阳性, 见图4。

表1 不同接种密度细胞生长情况比较
Table 1 Comparison of cell growth in different densities ($\bar{x}\pm s$)

Time (d)	Incubation density (L)			
	3×10^8	1.5×10^8	8×10^7	4×10^7
3	0.829±0.039	0.474±0.043	0.328±0.011	0.242±0.026
5	0.834±0.066	0.584±0.016	0.386±0.018	0.276±0.021
7	0.834±0.047	0.579±0.025	0.402±0.023	0.287±0.020
9	0.744±0.022	0.607±0.038	0.449±0.024	0.322±0.020
F	5.431 ^a	20.520 ^a	38.301 ^a	13.796 ^a
P	0.007 ^a	0.000 ^a	0.000 ^a	0.000 ^a

Time (d)	Incubation density (L)			
	2×10^7	1×10^7	5×10^6	2×10^6
3	0.186±0.027	0.153±0.021	0.139±0.033	0.131±0.030
5	0.212±0.017	0.161±0.016	0.140±0.012	0.124±0.014
7	0.225±0.028	0.153±0.019	0.132±0.014	0.113±0.016
9	0.270±0.027	0.186±0.016	0.151±0.014	0.143±0.016
F	11.795 ^a	4.524 ^a	0.956	2.233
P	0.000 ^a	0.014 ^a	0.433	0.116

^a $P < 0.05$, vs. other densities at the same time point

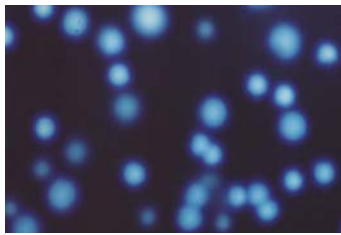


Figure 2 Hoechst 33342/PI fluorescence staining of umbilical cord mesenchymal stem cells (x200)
图2 Hoechst33342/PI 荧光双染 UMSCs (x200)

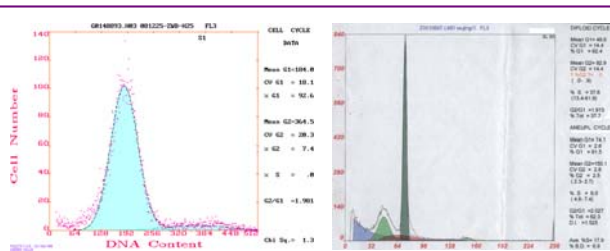


Figure 3 Cell cycles of the P3 and P11 passages of umbilical cord mesenchymal stem cells
图3 脐带 MSCs P3 及 P11 代细胞周期

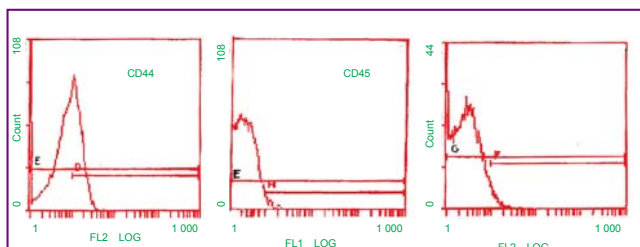


Figure 4 Expression of surface antigen of P2 passage of umbilical cord mesenchymal stem cells
图4 第2代 UMSCs 表面抗原的表达

2.5 细胞分化测定 诱导后细胞呈多样性, 胞体矮柱状或椭圆形, 短突起彼此相连。核圆, 轮廓清晰, 多位于细胞的游离端, 见图5。von Kossa染色: 细胞形成棕黑色或棕褐色结节, 排列为致密、片状, 核未染, 表现为阳性, 见图6; 对照组表现为阴性。

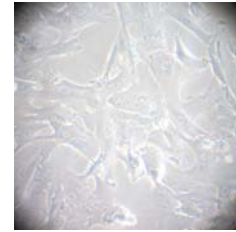


Figure 5 7th day induction (x100)
图5 UMSCs 诱导第7天(x100)

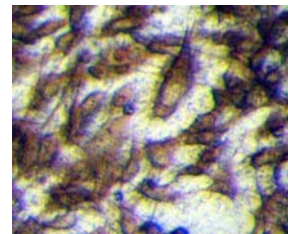


Figure 6 Von Kossa staining of Umbilical cord mesenchymal stem cells (x200)
图6 脐带 MSCsvon Kossa 染色观察(x200)

ALP 活性检测: Mauchly's 球对称检验, $\chi^2=15.964$, $P > 0.05$, 满足球对称条件。诱导剂与时间因素之间交互作用, 见表2, 3。

表2 诱导后不同时间 ALP 活性对比的结果
Table 2 Alkaline phosphatase concentration at various time points following induction ($\bar{x}\pm s$, n=10)

Group	3 d	7 d	14 d
Induction	0.81±0.05	0.40±0.19	0.86±0.09
Control	0.46±0.11	0.07±0.01	0.18±0.13
Total	0.62±0.19 ^a	0.22±0.21 ^a	0.49±0.36 ^a

Group	21 d	28 d	Total
Induction	1.01±0.11	0.89±0.09	0.79±0.05
Control	0.57±0.11	0.42±0.06	0.34±0.05
Total	0.77±0.25 ^a	0.63±0.25 ^a	0.55±0.32

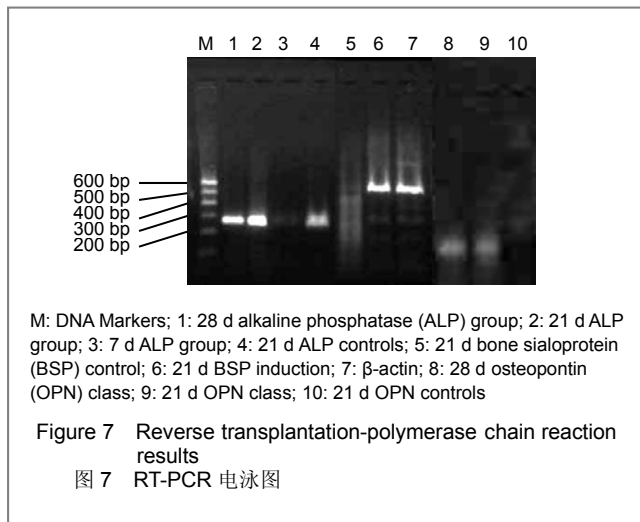
^a $P < 0.05$, paired comparison at various time points

表3 诱导剂与培养时间资料的重复测量分析结果
Table 3 Recalculation of the data of the inducers and culture times

Variation source	SS	v	MS	F	P
Management	5.628	1	5.628	520.258	0.000
Time	3.812	4	0.953	88.838	0.000
Management× time	0.413	4	0.103	9.629	0.000
Error	0.858	80	0.0107		

重复测量方差分析表明: ALP活性诱导组显著高于对照组($P < 0.05$)。不同时间点之间的差异有显著性意义, 第7天ALP活性最低, 到21 d时最高。

2.6 RT-PCR检测 诱导组21, 28 d ALP mRNA表达均较与对照组增强($P < 0.05$)。第21天诱导组有BSP, OPN mRNA表达, 对照组无表达, 见图7。



3 讨论

人脐带MSCs含量丰富, 较为原始, 分化能力强, 免疫原性低^[7-9], 适宜于不同个体之间的移植, 是细胞治疗的理想靶细胞^[10]。实验从脐带分离的细胞, 经多次传代后仍保持稳定的形态。具有MSCs的形态特征这与文献报道一致^[4, 11-13]。地塞米松, 维生素C, β -甘油磷酸钠是向成骨细胞分化和体外成骨的必要条件^[14-16]。实验中细胞诱导后形态与诱导前比发生变化, 由长棱形变为多角形, 胞体呈矮柱状或椭圆形, 有短突起彼此相连。核圆、轮廓清晰, 具有典型的成骨细胞形态。von Kossa染色诱导第21天形成棕黑色或棕褐色结节。表明经诱导可产生大量钙盐。脐带MSCs经诱导后逐渐变化呈成骨细胞形态。

ALP是成骨细胞功能性酶, 在钙盐沉积中起关键作用: ALP能够水解有机磷酸酯, 使局部磷酸根浓度增加, 而且可以破坏钙化抑制, 从而启动钙化。因此ALP活性的提高是成骨细胞分化的特异标志之一。本实验ALP活性随着时间的延长活性增加, 且诱导剂与时间因素之间存在交互作用, 说明脐带MSCs随着培养时间的延长逐渐分化为成骨细胞。诱导组第21天ALP活性最高, 说明此时细胞骨分化程度也较高, RT-PCR从mRNA表达水平上也印证了此结果, RT-PCR结果显示, 诱导组第21, 28天 ALP mRNA表达均较与对照组增强。第21天诱导组细胞BSP, OPN mRNA有表达, 提示人脐带MSCs经诱导后能表达成骨细胞特异性标记物。以上结果说明了人脐带MSCs经诱导后具有向成骨分化的能力。

综上所述, 实验分离了培养人脐带MSCs, 经成骨诱导液诱导后, 检测了ALP活性及相关基因表达情况, 从形态学和分子水平上明确了人脐带MSCs具有向成骨细胞诱导分化的能力。而脐带来源广泛, 采集对供者无任何损伤, 因此脐带有望成为获取间充质干细胞的新来源^[17], 从而可作为自体或异体组织工程骨的种子细胞, 在临床中得到广泛的应用。

4 参考文献

- [1] Liechty KW, Mackenzie TC, Shaaban AF, et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nature Medicine*. 2000;6(11):1282-1286.
- [2] Lechner V, Hocht B, Ulrichs K, et al. Obtaining of mesenchymal progenitor cells from the human umbilical cord. *Zentralbl Chir*. 2007;132(4):358-364.
- [3] Gotherstrom C, Ringden O, Tammik C, et al. Immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;190(1):239-245.
- [4] Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Fmbryol J Embryol Exp Morphol*. 1966;16(3):381-390.
- [5] Chen L, Zhang M, Xu RC, et al. Jiepouxue Zazhi. 2004;27(5):457-460. 陈莉, 张敏, 徐瑞成, 等. SCP诱导人胃癌细胞凋亡并下调bcl-2表达[J]. 解剖学杂志, 2004, 27(5):457-460.
- [6] Ma L, Cui BL, Feng XY, et al. *Zhonghua Erke Zazhi*. 2006;44(7):513-517. 马廉, 崔冰琳, 冯学永, 等. 人脐带间充质干细胞的生物学特性及向神经样细胞分化的研究[J]. 中华儿科杂志, 2006, 44(7):513-517.
- [7] Westerhuis R J, van Bezooijen RL, Kloen P, et al. Use of bone morphogenetic proteins in Traumatology. *Injury*. 2005;36(12):1405-1412.
- [8] Ferguson C, Alpem E, Miclau T, et al. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation. *Mech Dev*. 1999;87(1-2):57-66.
- [9] Ye XY, Li XJ, Xu Y, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2009;13(36):7028-7033. 野向阳, 李相军, 徐岩, 等. 人脐带间充质干细胞体外成骨及其免疫学特征[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(36):7028-7033.
- [10] Janorkar S, Goh T, Wilkinson J. Transcatheter closure of ventricular scp2 tal defects using the Rashkind device: Initial experience. *Cathete Cardiovasc Interv*. 1999;46(1):43-48.
- [11] Shi DZ, Hu WX. *Zhongguo Linchuang Kangfu*. 2006;10(17):24-26. 史德志, 胡卫星. 脐带源间充质干细胞体外分离培养后形态学与表面抗原的鉴定[J]. 中国临床康复, 2006, 10(17):24-26.
- [12] LÜLL, Liu YJ, Xu ZS, et al. *Fujian Yike Daxue Xuebao*. 2006;40(2):99-104. 吕璐璐, 刘拥军, 许贞书, 等. 脐带源间充质干细胞的分离和生物学形状[J]. 福建医科大学学报, 2006;40(2):99-104.
- [13] Ma L, Feng XY, Cui BL, et al. Human umbilical corg Wharton'S Jelly-derived mesenchymal stem cells differentiation into nerve-like cells. *Chin Med J*. 2005;118(23):1987-1993.
- [14] Coel Ho MJ, Fernandes MH. Human bone cel cultures in biocompatibility testing. Part2: effect of ascorbic acid β -slycephosphate and dexamethasone on osteblast diferentiafion. *J Biomaterials*. 2000;21(11):1095.
- [15] Yoon E, Dhar S, Chun DE, et al. In vivo osteogenic potential of human adipose-derived stem cells/poly lactide-co-glycolic acid constructs for bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model. *Tissue Eng*. 2007;13(3):619-627.
- [16] Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, et al. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6-to7-year outcome of a pilor clinical study. *Tissue Eng*. 2007;13(5):947-955.
- [17] Wu KH, Zhou B, Mo XM, et al. Therapeutic potential of human umbilical cord-derived stem cells in ischemic diseases. *Transplant Proc*. 2007;39(5):1620-1622.

来自本文课题的更多信息—

基金资助: 武警部队科研项目(WY200806), 课题名称: FAK介导信号通路与入脐带间充质干细胞成骨化作用。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。