

贴壁法体外分离培养大鼠骨髓间充质干细胞的效果验证**

张岩, 陈曦海, 纪艳超, 翟哲, 吴波

Effect validation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells cultured by adherent method *in vitro*

Zhang Yan, Chen Xi-hai, Ji Yan-chao, Zhai Zhe, Wu Bo

Abstract

Department of
General Surgery,
Fourth Hospital of
Harbin Medical
University, Harbin
150001, Heilongjiang
Province, China

Zhang Yan★, Master,
Department of
General Surgery,
Fourth Hospital of
Harbin Medical
University, Harbin
150001, Heilongjiang
Province, China

Correspondence to:
Wu Bo, Master,
Professor, Master's
supervisor,
Department of
General Surgery,
Fourth Hospital of
Harbin Medical
University, Harbin
150001, Heilongjiang
Province, China
bjjsbr@126.com

Supported by: the
Tackle Key Program
of Heilongjiang
Province, No.
GC09C409-1*;
Educational
Commission of
Heilongjiang
Province,
No.11541147*

Received: 2009-11-20
Accepted: 2010-01-09

BACKGROUND: A small number of mesenchymal stem cells (MSCs) present in bone marrow, which would gradually drop with age.
OBJECTIVE: To verify the effect of adherent method on culture of bone marrow-derived MSCs.
METHODS: Under anaesthesia, bone marrow cells were obtained from femur and tibia of rats, cultured by DMEM containing calf serum, placed in an incubator containing 5% CO₂ at 37 °C. The culture medium was renewed after 24 hours, and remained periodical medium change with once per week. The weakly adherent cells were passaged. The cell morphology, growth curve, and the expression of cell-surface markers were identified by flow cytometry and immunocytochemical staining.
RESULTS AND CONCLUSION: After 24 hours of culture, the cells could adhere to the walls with fusiform or triangle shapes, proliferated faster after 2-3 days, and presented whirlpool-like or clustering. The cells reached a logarithmic growth phase after 2 days, and into the late stationary phase after 12 days, which covered the bottle after 15 days. The cultured cells were positive to CD90 and CD54. The results verified that bone marrow-derived MSCs can be isolated by adherent method. This method is easy operation, and can maintain cell activity preferably.

Zhang Y, Chen XH, Ji YC, Zhai Z, Wu B. Effect validation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells cultured by adherent method *in vitro*. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(6): 1006-1008. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

摘要

背景: 骨髓中的间充质干细胞含量不高,且随着年龄增加或体质衰弱,骨髓间充质干细胞的数量会逐渐减少。
目的: 验证贴壁法分离培养大鼠骨髓间充质干细胞的效果。
方法: 大鼠麻醉后取双侧股骨和胫骨,剪去骨骺端,暴露骨髓腔,用含小牛血清的DMEM培养基冲洗骨髓腔,收集骨髓细胞,反复吹打成单细胞悬液,接种后置于37 °C、体积分数为5%的CO₂培养箱内孵育,24 h后全量换液,以后每周全量换液1次,筛选易贴壁但贴壁不牢的细胞进行传代培养。观察细胞形态,绘制细胞生长曲线,流式细胞仪及免疫细胞化学染色鉴定骨髓间充质干细胞表面标志的表达。
结果与结论: 培养24 h后细胞能够贴壁生长,呈梭形或三角形;第二三天贴壁细胞迅速增殖;培养15 d左右出现致密的贴壁细胞层,呈漩涡状生长或成簇生长。细胞在接种后2 d进入对数生长期,12 d左右进入平台期,约15 d细胞可铺满瓶底。分离培养的大鼠骨髓间充质干细胞CD90和CD54均呈阳性表达。结果验证了采用贴壁法可在体外成功分离培养大鼠骨髓间充质干细胞,操作简单,造成污染的环节和机会较少,不需离心,可以更好的保持细胞活性。
关键词: 分离;培养;贴壁法;大鼠;骨髓间充质干细胞;干细胞
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2009.06.011

张岩, 陈曦海, 纪艳超, 翟哲, 吴波. 贴壁法体外分离培养大鼠骨髓间充质干细胞的效果验证[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(6):1006-1008. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

0 引言

近年来研究表明,骨髓间充质干细胞在特定条件下可分化为多种组织谱系的细胞^[1-4],包括脂肪细胞、成肌纤维细胞、成骨细胞、神经细胞等。由于骨髓间充质干细胞不但可在特定条件下分化为神经细胞,还具有取材方便、扩增迅速、无免疫原性、可自体移植等特点,故其在脑损伤修复和细胞治疗等方面具有广阔的应用前景^[5-9]。

为进一步探讨骨髓间充质干细胞移植治疗

脑损伤的修复机制,实验尝试从成年大鼠骨髓中分离培养和鉴定骨髓间充质干细胞。

1 材料和方法

设计: 细胞学体外观察。

时间及地点: 于2007-08/2008-08在哈尔滨医科大学动物实验中心完成。

材料: 2~4月龄雌性SD大鼠40只,体质量200~300 g,由哈尔滨医科大学实验动物中心提供,动物质量合格证号2008D211,实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准。

实验方法:

骨髓间充质干细胞的分离培养^[9-11]: 大鼠用1%异戊巴比妥钠(3 mL/kg)腹腔内注射麻醉, 颈椎脱位处死; 严格无菌条件下取出其双侧股骨和胫骨, 去除骨表面的肌肉组织, PBS漂洗, 剪去骨骺端, 暴露骨髓腔; 以无菌注射器插孔, 并用含体积分数为10%小牛血清的DMEM培养基冲洗骨髓腔, 收集骨髓细胞, 反复吹打制成单细胞悬液; 然后接种于25 cm培养瓶中, 置于37 °C、体积分数为5%的CO₂培养箱内孵育。24 h后全量换液, 以后每周全量换液1次。

骨髓间充质干细胞的鉴定:

流式细胞仪检测^[12-14]: 取体外分离培养的骨髓间充质干细胞, 经2.5 g/L胰蛋白酶和1 mmol/L EDTA消化, 常规处理后, 加入含体积分数为1%小牛血清的PBS, 调整细胞浓度至 $1 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$, 分别加入CD45-PE, CD54-PE, CD90-FITC小鼠抗大鼠单克隆抗体, 置4 °C孵育30 min, PBS洗1遍, 直接进行流式细胞仪分析。

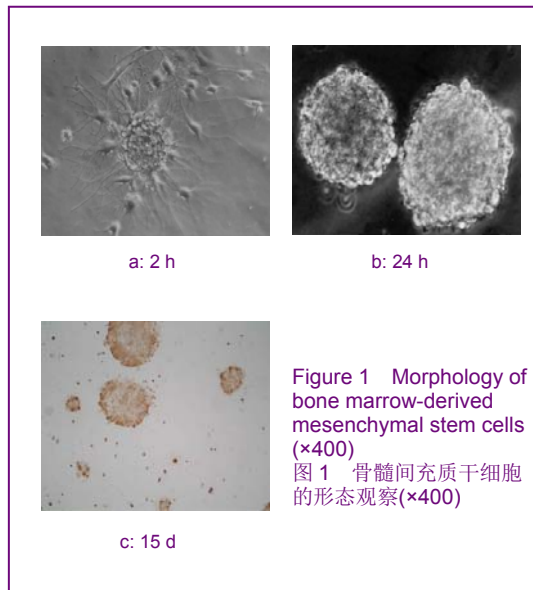
免疫荧光染色检测^[15]: 取体外分离培养的骨髓间充质干细胞, 分别采用CD45-PE, CD54-PE, CD90-FITC小鼠抗大鼠单克隆抗体进行免疫荧光染色。

骨髓间充质干细胞生长曲线绘制^[16]: 取生长状态良好的原代骨髓间充质干细胞制备成单细胞悬液, 按 2×10^4 /孔接种于96孔板, 每孔加入100 μL 培养基, 以后每天取8个孔, 加入0.5~1.0 g/L的MTT 20 μL , 37 °C孵育4 h, 然后吸弃上清, 加入100 μL 异丙醇充分溶解后, 于560 nm酶标仪测定吸光度值, 如此持续12 d, 绘制细胞生长曲线。

主要观察指标: ①骨髓间充质干细胞形态观察。②骨髓间充质干细胞的表型鉴定。③骨髓间充质干细胞生长曲线分析。

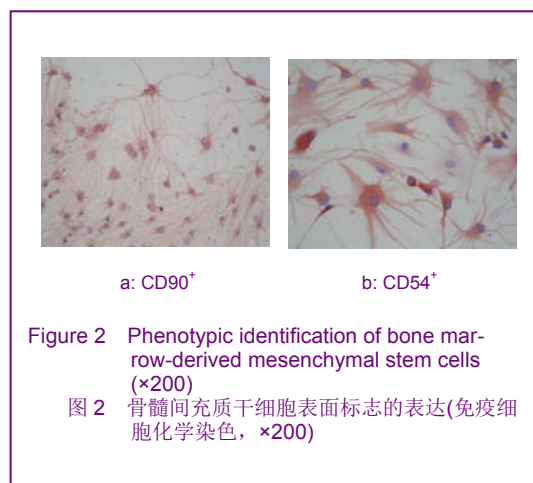
设计、实施、评估者: 设计与评估由第一作者完成, 实施由第一~五作者完成, 均经过系统培训, 未使用盲法评估。

传代细胞可以得到纯化。培养15 d左右出现致密的贴壁细胞层, 呈漩涡状生长或成簇生长, 见图1c。



2.2 骨髓间充质干细胞的表型鉴定 流式细胞仪检测结果显示, 骨髓间充质干细胞高表达CD90和CD54, 阳性率分别为95.3%, 96.8%低表达CD45, 阳性率仅为14.5%。

免疫细胞化学染色结果显示, 分离培养的大鼠骨髓间充质干细胞CD90和CD54均呈阳性表达, 见图2。



2.3 骨髓间充质干细胞的生长曲线 骨髓间充质干细胞原代生长曲线显示, 细胞在接种后2 d即进入对数生长期, 细胞增殖活跃, 相差显微镜下细胞向周围伸展, 多见出现两个核细胞分裂相的骨髓间充质干细胞, 细胞密度增大, 彼此相连; 12 d左右细胞生长缓慢, 进入平台期; 15 d左右细胞可铺满瓶底, 原代培养结束, 见图3。

哈尔滨医科大学附属第四医院普外科, 黑龙江省哈尔滨市 150001

张岩★, 男, 1975年生, 黑龙江省哈尔滨市人, 汉族, 哈尔滨医科大学毕业, 硕士, 主要从事器官移植方面的研究。

通讯作者: 吴波, 硕士, 教授, 硕士生导师, 哈尔滨医科大学附属第四医院普外科, 黑龙江省哈尔滨市 150001
jbsbr@126.com

黑龙江省攻关项目 (GC09C409-1)*; 黑龙江省教育厅资助项目 (11541147)*

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2010)06-01006-03

收稿日期: 2009-11-20
修回日期: 2010-01-09 (20091120008/
ZS-Z)

2 结果

2.1 骨髓间充质干细胞形态观察 细胞接种2 h后, 逐渐呈贴壁性生长, 见图1a。24 h后更换新鲜培养液, 弃去悬浮细胞, 细胞能够贴壁生长, 呈梭形或三角形, 见图1b。培养第2~3天贴壁细胞迅速增殖成簇生长, 随着不断

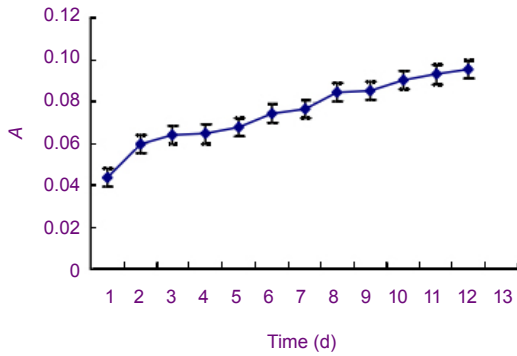


Figure 3 Growth curve of bone marrow-derived mesenchymal stem cells

图3 骨髓间充质干细胞的生长曲线

3 讨论

目前组织和细胞移植被公认为是治疗中枢神经系统损伤最有希望的方法之一^[17], 但无论是胚胎组织、周围神经, 还是神经干细胞、嗅鞘细胞, 不仅存在取材和体外培养增殖困难等问题, 而且还受到法律和伦理的制约^[18]。由于骨髓间充质干细胞不但可在特定条件下分化为神经细胞, 还具有取材方便、扩增迅速、无免疫原性、可自体移植等特点, 已成为中枢神经系统损伤修复和细胞治疗等方面研究的热点^[19]。

实验采用贴壁分离法体外培养骨髓间充质干细胞, 经流式细胞仪检测细胞表面分子表达和分离效果良好, 结果表明运用贴壁分离法操作简单, 造成污染的环节和机会较少, 不需离心, 可以更好的保持细胞的活性状态。接种培养后第2天可观察到部分细胞贴壁, 造血系干细胞及状态不好无法贴壁的细胞、细胞崩解的碎片仍然悬浮在培养基中。接种24 h后换液, 每天可观察到贴壁细胞增多, 且快速增殖、积聚, 细胞呈梭形, 团簇性生长倾向。至12~21 d时培养瓶中的细胞铺满瓶底, 悬浮造血细胞及死亡细胞已基本去除, 然后细胞就可进行传代培养。实验中观察到骨髓间充质干细胞在体外培养条件下生长状况与其他细胞一样, 经历生长潜伏期、对数增殖期和生长平台期。有人对常规培养条件下骨髓间充质干细胞生长增殖进行观察, 也发现成人骨髓间充质干细胞可以在体外分裂38次左右, 并且保持纺锤形态和成骨潜能, 直至细胞衰竭^[19]。细胞进行冷冻复苏后培养可传代达15次, 细胞的增殖分化潜能未受影响。但有研究认为, 过多传代培养会降低细胞的功能, 甚至出现骨髓间充质干细胞的凋亡。

骨髓间充质干细胞的体外扩增与种植密度关系密切, 有研究者发现人骨髓间充质干细胞传代时, 以 5×10^3 个/cm²的密度接种, 大约2周后能扩增为3~5倍的单层,

推测骨髓间充质干细胞细胞之间存在接触抑制^[20]。由于细胞极低密度接种培养时获取大量细胞的时间会很长, 所以调整细胞接种浓度, 在尽可能短的时间内获得大量细胞尤为重要。实验原代培养时采用的细胞浓度为 $1 \times 10^8 L^{-1}$, 证实是一种较为合适的接种密度。由于取材及分离方法不同, 此浓度应随情况的改变而作出调整。典型的骨髓间充质干细胞形态与细胞密度有关。当以低密度种植时大部分细胞大而扁平, 部分细胞为小的梭形或圆形; 当细胞接近铺满瓶底时, 其形态即呈梭形的成纤维细胞样。

总之, 贴壁分离法分离培养骨髓间充质干细胞是一种简单、有效的好方法, 骨髓间充质干细胞具有强大的扩增能力, 并且细胞形态和生物学特性稳定性好, 其体外扩增速度与种植密度关系密切, 应根据取材以及分离方法不同调整细胞接种密度。

4 参考文献

- [1] Friedenstain AJ, Genkaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Haematol.* 1976;4(5):267-274.
- [2] Ryden M, Dicker A, Gotherstrom C, et al. Functional characterization of human mesenchymal stem cell-derived adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;311(2):391-397.
- [3] Direkze NC, Forbes SJ, Brittan M, et al. Multiple organ engraftment by bone-marrow-derived myofibroblasts and fibroblasts in bone-marrow-transplanted mice. *Stem Cells.* 2003;21(5):514-520.
- [4] Millesi H. Surgery of post-traumatic brachial plexus lesions. *Handchir Mikrochir Plast Chir.* 2004;36(1):29-36.
- [5] Millesi H. Bridging defects: autologous nerve grafts. *Acta Neurochir Suppl.* 2007;100:37-38.
- [6] Millesi H. Techniques for nerve grafting. *Hand Clin.* 2000;16(1):73-91.
- [7] Ourednik V, Ourednik J, Park KI, et al. Neural stem cells—a versatile tool for cell replacement and gene therapy in the central nervous system. *Clin Genet.* 1999;56:267-278.
- [8] Koda M, Okada S, Nakayama T, et al. Hematopoietic stem cell and marrow stromal cell for spinal cord injury in mice. *Neuroreport.* 2005;16(16):1763-1767.
- [9] Wang PP, Wang JH, Yan ZP, et al. Expression of hepatocyte-like phenotypes in bone marrow stromal cells after HGF induction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;320(3):712-716.
- [10] Hassan HT, El-Sheemy M. Adult bone-marrow stem cells and their potential in medicine. *J R Soc Med.* 2004;97(10):465-471.
- [11] De Vries M, Cooper HM. Emerging roles for neogenin and its ligands in CNS development. *J Neurochem.* 2008;106(4):1483-1492.
- [12] Metin C, Deleglise D, Serafini T, et al. A role for netrin-1 in the guidance of cortical efferents. *Development.* 1997;124:5063-5074.
- [13] Braisted JE. Netrin-1 promotes thalamic axon growth and is required for proper development of the thalamocortical projection. *J Neurosci.* 2000;20:5792-5801.
- [14] Dickson BJ. Molecular mechanisms of axon guidance. *Science.* 2002;298:195.
- [15] Keleman K, Dickson BJ. Short- and long-range repulsion by the *Drosophila* Unc5 netrin receptor. *Neuron.* 2001;32:605-617.
- [16] Cole SJ, Bradford D, Cooper HM. Neogenin: A multi-functional receptor regulating diverse developmental processes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(9):1569-1575.
- [17] Wilson NH, Key B. Neogenin: one receptor, many functions. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(5):874-878.
- [18] Liu G, Beggs H, Jürgensen C, et al. Netrin requires focal adhesion kinase and Src family kinases for axon outgrowth and attraction. *Nat Neurosci.* 2004;7(11):1222-1232.
- [19] Li W, Lee J, Vikis HG, et al. Activation of FAK and Src are receptor-proximal events required for netrin signaling. *Nat Neurosci.* 2004;7(11):1213-1221.
- [20] Del Río JA, González-Billault C, Ureña JM, et al. MAP1B is required for Netrin 1 signaling in neuronal migration and axonal guidance. *Curr Biol.* 2004;14(10):840-850.