

全骨髓直接贴壁分离人骨髓间充质干细胞的生物学特性****☆

张 颢^{1,2}, 张 斌², 程 梅¹, 陶艳玲¹, 扈江伟², 徐 曼², 陈 虎²

Isolation and characterization of human bone marrow mesenchymal stem cells using a whole bone marrow adherent culture technique

Zhang Hao^{1,2}, Zhang Bin², Cheng Mei¹, Tao Yan-ling¹, Hu Jiang-wei², Xu Man², Chen Hu²

Abstract

BACKGROUND: Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) are widely used in cell therapy and tissue regeneration, so their isolation and culture are a key technique for research and clinical application.

OBJECTIVE: To isolate the BMSCs by whole bone marrow adherent culture technique and to establish an easy and effective method to isolate and culture BMSCs.

METHODS: The BMSCs were isolated by whole bone marrow adherent culture technique, and purified and amplified by passage. BMSCs were induced to differentiate into adipocytes, osteocytes and chondrocytes in special differentiation condition.

RESULTS AND CONCLUSION: The purity of the BMSCs isolated by whole bone marrow adherent culture technique was more than 90%. The adherent cells displayed an abundant presence of CD73, CD90, CD105 and absence of Hematopoietic cell phenotype CD34, CD45 and HLA-DR which were detected by flow cytometry. The cell doubling time was (24.04±0.49) hours; Cell cycle showed that there was percentage of stem cells as G₀/G₁ 71.63% and S+G₂+M 28.37% respectively. The induced and differentiated results showed that BMSCs could be differentiated into adipocytes, osteocytes and chondrocytes. Based on these findings, the whole bone marrow adherent culture technique is a better method to obtain MSCs from human bone marrow.

Zhang H, Zhang B, Cheng M, Tao YL, Hu JW, Xu M, Chen H. Isolation and characterization of human bone marrow mesenchymal stem cells using a whole bone marrow adherent culture technique. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(1):27-30. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

摘要

背景: 体外分离培养骨髓间充质干细胞成为实验研究和临床应用的关键环节。

目的: 采用全骨髓培养法分离人骨髓间充质干细胞, 建立一种简单、有效的分离培养骨髓间充质干细胞的方法。

方法: 通过全骨髓培养法分离培养人骨髓间充质干细胞, 并通过传代进行纯化和扩增培养。分别在特定诱导体系中诱导人骨髓间充质干细胞向脂肪、成骨及软骨细胞分化。

结果与结论: 采用全骨髓培养分离法能获得 90% 以上纯度的骨髓间充质干细胞; 流式细胞仪检测结果显示, 贴壁细胞均表达 CD73、CD90、CD105, 不表达造血细胞表型 CD34、CD45 和 HLA-DR; 细胞倍增时间为(24.04±0.49) h; 细胞周期分析表明: G₀~G₁ 期和 S+G₂+M 期所占比例分别为 71.63% 和 28.37%; 诱导分化结果显示, 人骨髓间充质干细胞能够向脂肪、骨和软骨细胞分化。说明全骨髓培养法是一种较好的分离人骨髓间充质干细胞的方法。

关键词: 全骨髓培养; 间充质干细胞; 分离; 培养; 分化

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.01.005

张颢, 张斌, 程梅, 陶艳玲, 扈江伟, 徐曼, 陈虎. 全骨髓直接贴壁分离人骨髓间充质干细胞的生物学特性[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(1):27-30. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

0 引言

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是来源于发育早期中胚层的具有高度自我更新能力和多向分化潜能的一类多能干细胞, 最初来源于骨髓。在一定诱导体系下可分化为骨细胞、脂肪细胞及软骨细胞等, 广泛应用于细胞治疗和组织重建^[1-2], 成为当今许多学者研究的热点。目前国内外骨髓源间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)分离的常规方法为密度梯度法, 其缺点是所需骨髓液量大, 丢失BMSCs。实验采用全骨髓培养法分离培养人BMSCs, 并对其进行生物学特性研究, 以寻找人BMSCs更为理想的分离培养方法。

1 材料和方法

设计: 细胞学体外实验。

时间及地点: 于2009-03/2011-05在哈尔滨血液病肿瘤研究所细胞实验室完成。

材料:

骨髓: 供者为2009-03/2011-05在哈尔滨血液病肿瘤研究所的住院患者, 共13例, 男6例, 女7例, 中位年龄25.4(7~55)岁。其中缺铁性贫血5例, 原发性血小板减少性紫癜2例, 上呼吸道感染2例, 过敏性紫癜1例, 慢性粒细胞白血病1例, 急性重型再生障碍性贫血1例, 多发性骨髓瘤1例。骨髓标本经供者及家属同意, 并签订知情同意书。

¹Harbin Institute of Hematology, Oncology, the First Hospital of Harbin, Harbin 150010, Heilongjiang Province, China; ²Hematopoietic Stem Cell Transplantation Center, Affiliated Hospital of Academy of Military Medical Science of Chinese PLA, Beijing 100071, China

The First Hospital of Harbin and the Affiliated Hospital of Academy of Military Medical Science of Chinese PLA were co-considered as the first units.

Zhang Hao☆, Doctor, Associate chief physician, Harbin Institute of Hematology, Oncology, the First Hospital of Harbin, Harbin 150010, Heilongjiang Province, China; Hematopoietic Stem Cell Transplantation Center, Affiliated Hospital of Academy of Military Medical Science of Chinese PLA, Beijing 100071, China gx-zhanghao@126.com

Zhang Bin☆, Doctor, Associate chief physician, Hematopoietic Stem Cell Transplantation Center, Affiliated Hospital of Academy of Military Medical Science of Chinese PLA, Beijing 100071, China zb307ctc@163.com

Zhang Hao and Zhang Bin were considered as co-first authors.

Correspondence to: Chen Hu, Doctor, Chief physician, Hematopoietic Stem Cell Transplantation Center, Affiliated Hospital of Academy of Military Medical Science of Chinese PLA, Beijing 100071, China chenhu217@yahoo.com.cn

Supported by:
Special Fund Project
for Science and
Technology
Innovation of Harbin,
No.
2009RFQSQ027*;
Research Projects of
Heilongjiang Health
Bureau, No.
2011-518*;
Major
Special Projects of
National 863
Planning, No.
2011AA020114*;
Applied Research of
Characteristic Clinical
Therapeutics of the
Capital,
No. SQ2010AA02010
08009*

Received: 2011-10-25
Accepted: 2011-11-24

¹ 哈尔滨市第一医院
哈尔滨血液病
肿瘤研究所, 黑龙
江省哈尔滨市
150010; ² 解放军
军事医学科学院
附属医院全军造
血干细胞移植中
心, 北京市
100071

哈尔滨市第一医
院和解放军军事
医学科学院附属
医院为共同第一
完成单位。

张颢☆, 男, 1973
年生, 河南省息县
人, 汉族, 2008
年解放军福建医
科大学毕业, 博
士, 副主任医师,
主要从事干细胞
基础与临床应用
的研究。
gx-zhanghao@
126.com

并列第一作者: 张
斌, 男, 1971 年
生, 河南省郑州市
人, 汉族, 2002
年解放军第四军
医大学毕业, 博
士, 副主任医师,
主要从事干细胞
及生物治疗基础
与临床应用方面
的研究。
zb307ctc@163.
com

通讯作者: 陈虎,
博士, 主任医师,
解放军军事医学
科学院附属医院
全军造血干细胞
移植中心, 北京市
100071
chenhu217@
yahoo.com.cn

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225
(2012)01-00027-04

收稿日期: 2011-10-25
修回日期: 2011-11-24
(20111010001/
WLM · C)

主要试剂:

试剂	来源
DMEM/F12、高糖 DMEM	GIBCO 公司
胎牛血清	Hyclone 公司
PE 标记鼠抗人 CD105、CD73、 FITC 标记鼠抗人 CD34、CD45、 CD90、HLA-DR	BD PharMingen 公司
地塞米松、1-甲基-3-异丁基-黄 嘌呤、抗坏血酸、丙酮酸钠	Sigma 公司
转化子因子(transforming growth factor, TGF)β3	PeptoTech 公司
油红 O、茜红素、甲苯胺蓝	Amresco 公司

实验方法:

BMSCs的分离纯化及培养: 在无菌条件下, 全部供者在体积分数1%利多卡因局部麻醉下, 以含有肝素的5 mL无菌性注射器取骨髓液 3 mL, 直接加入含体积分数10%胎牛血清的DMEM/F12完全培养基的T75培养瓶中, 置37 °C、体积分数5%CO₂培养箱中培养。两三天首次换液, 以后每周换液2次, 当细胞生长融合度达80%以上时, 2.5 g/L胰酶和1 mmol/L EDTA消化, 按1:3传代。倒置显微镜下观察细胞的形态和生长情况。

流式细胞仪检测BMSCs免疫表型: 取第3代处于对数生长期的BMSCs, 按每管1×10⁵个细胞, 依次加入10 μL PE标记的CD105、CD73和FITC标记的CD34、CD45、CD90、HLA-DR鼠抗人单克隆抗体及其同型对照标记细胞, 室温避光30 min; 用PBS洗两三次, 流式细胞仪检测。

生长曲线的绘制: 将贴壁细胞用2.5 g/L胰酶消化后, 按1×10⁴细胞/孔接种在24孔板内, 每隔24 h消化3个孔, 收集细胞, 并用体积分数0.4%的锥虫蓝染色计数活细胞, 绘制生长曲线。

流式细胞仪检测细胞周期: 在细胞生长的对数期, 消化细胞, 体积分数70%冷乙醇4 °C固定并透膜24 h, 10 mg/L的RNase A 37 °C孵育30 min, 加入50 mg/L碘化丙啶4 °C避光孵育5 min, 流式细胞仪检测细胞周期, ModifIT软件分析结果。

BMSCs的诱导分化:

向脂肪细胞诱导分化: 取第3代细胞以2×10⁴/孔接种于六孔板, 诱导分化体系为含体积分数10%胎牛血清、1×10⁻⁶ mol/L地塞米松、100 mg/L 1-甲基-3-异丁基-黄嘌呤、50 mg/L 抗坏血酸的IMDM培养基。每3 d半量换液1次。

倒置显微镜下观察脂肪滴的形成, 第14天采用油红O染色检测脂肪滴。

向成骨细胞诱导分化: 收集第3代细胞, 以2×10⁴/孔接种于六孔板, 诱导分化体系为含1.0×10⁻⁸ mol/L地塞米松, 2.0×10⁻⁴ mol/L抗坏血酸, 7.0×10⁻³ mol/L β-磷酸甘油的IMDM培养基, 每3 d半量换液1次。第14天用茜红素染色检测钙化基质沉淀。

向软骨细胞诱导分化: 收集第3代细胞, 取2×10⁵细胞放于10 mL塑料管内, 1 500 r/min离心10 min, 弃上清液, 加入0.5 mL软骨诱导培养液, 软骨诱导分化体系为含体积分数10%胎牛血清、体积分数1%ITS(胰岛素、转铁蛋白、硒混合物)、0.1 μmol/L地塞米松、50 μmol/L抗坏血酸、1 mmol/L丙酮酸钠、10 μg/L TGF-β3的高糖DMEM培养基。每3 d全量换液, 培养3周后, 石蜡包埋、切片, 进行甲苯胺蓝染色鉴定。

主要观察指标: 分离培养的BMSCs的形态、表型、生长情况及向脂肪、骨、软骨细胞的分化能力。

2 结果

2.1 分离培养的BMSCs的形态 见图1。



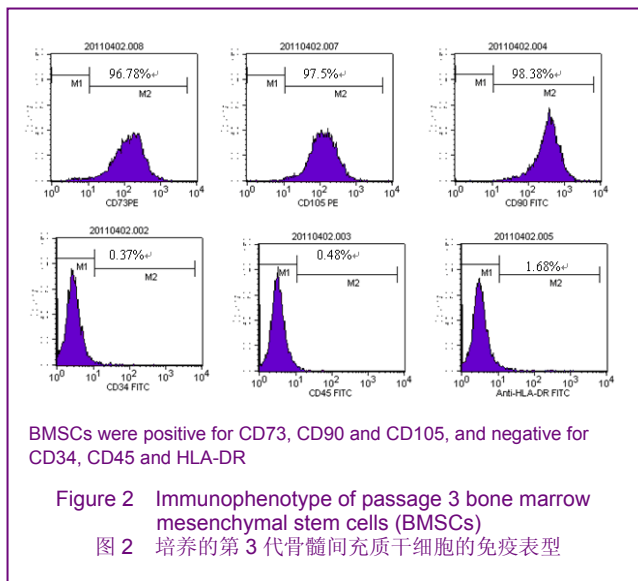
Figure 1 Morphology of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) culture in vitro (×100)

图1 培养的骨髓间充质干细胞的形态(×100)

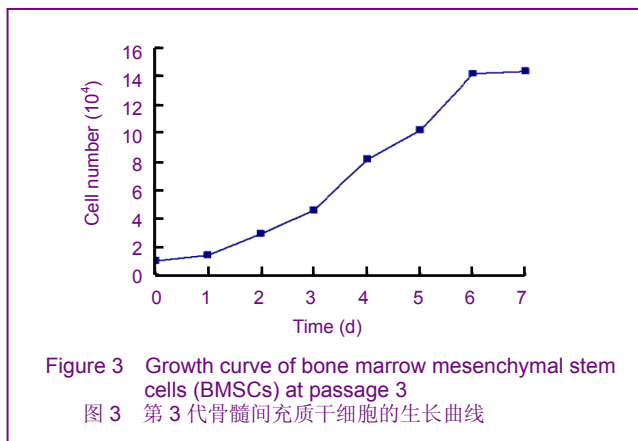
全骨髓液在接种两三天后见散在的少量贴

壁细胞, 呈梭形或多角形, 三四天首次全量换液, 7~14 d以后增长速度加快, 可见成纤维细胞样克隆形成, 此后增生成为形态相对均一的梭形细胞, 呈平行排列生长或旋涡状生长。培养12~38 d, 细胞融合度达80%以上, 镜下可见贴壁细胞呈梭形、多角形。同样方法以1:3传代, 细胞形态均呈旋涡状生长, 贴壁培养后无明显悬浮细胞。传至第7~15代, 细胞仍生长旺盛, 形态与第3代细胞无明显差异。

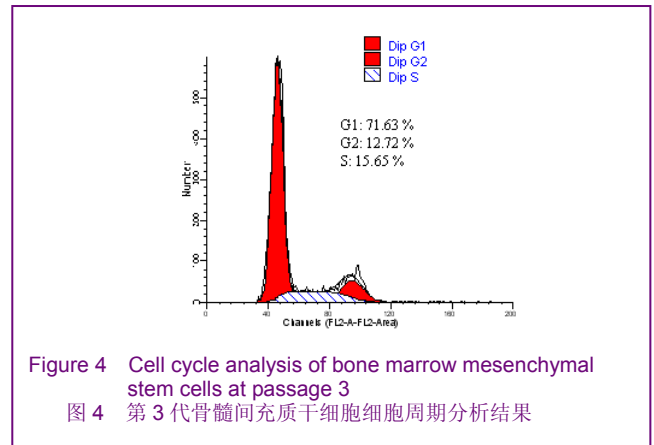
2.2 BMSCs的免疫表型分析结果 流式细胞仪检测结果发现贴壁细胞均表达CD73、CD90和CD105, 不表达造血细胞表型CD34、CD45和HLA-DR, 由此初步说明, 从骨髓分离出来的贴壁细胞为MSCs, 见图2。



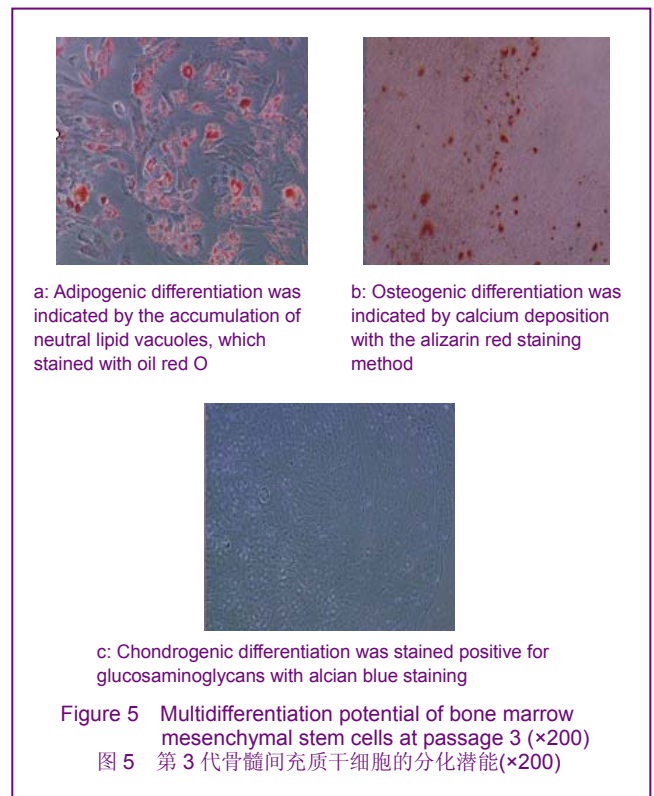
2.3 BMSCs的生长曲线 第3代BMSCs生长曲线基本符合细胞生长曲线规律, 于培养后2~6 d到达对数期, 7 d后为平台期。提示BMSCs在体外增殖相对稳定, 生长状态无异常。细胞增殖较快, 在对数生长期, 细胞倍增时间为(31.92±1.30) h, 见图3。



2.4 BMSCs的细胞周期分析结果 流式细胞仪检测发现71.63%细胞在G₀~G₁期, 28.37%的细胞处于S+G₂+M期, 见图4。



2.5 BMSCs的分化潜能 脂肪诱导7 d, 倒置显微镜下即可见胞浆内脂滴形成, 第14天, 油红O染色呈强阳性, 见图5a; 成骨诱导第14天, 茜素红染色阳性, 见图5b; 软骨诱导分化3周, 甲苯胺蓝染色阳性, 见图5c。



3 讨论

近年来研究表明, MSCs具有免疫调节及组织损伤修复等功能, 有望在临床治疗移植抗宿主病、自身免疫性疾病、组织修复等疾病^[1, 3]。目前MSCs实验研究及临床应用主要集中在骨髓, 而BMSCs具有含量极少及分离成功率低等缺点^[4-5], 且最近有学者研究发现骨髓脂滴存在间充质干细胞, 传统密度梯度法分离单个核细胞培养丢失了一部分MSCs^[6-7], 因此为克服以上缺点, 建

立一种BMSCs新的分离方法成为必要。

实验采用全骨髓培养法成功从13例患者骨髓中分离出MSCs, 成功率为100%, 且骨髓液体积仅为3 mL, 骨髓液全骨髓培养法克服了密度梯度法需要较多骨髓液及脂滴中MSCs丢失的缺点。全骨髓液在接种两三后见散在的少量贴壁细胞, 呈梭形或多角形, 三四天首次全量换液, 7~14 d以后增长速度增快, 可见成纤维细胞样克隆形成, 此后增生成为形态相对均一的梭形细胞, 呈平行排列生长或旋涡状生长。培养12~38 d细胞融合度80%达以上, 镜下可见贴壁细胞呈梭形、多角形。同样方法以1:3传代, 细胞形态均呈旋涡状生长, 贴壁培养后无明显悬浮细胞。传至第7~15代, 细胞仍生长旺盛, 形态与第3代细胞无明显差异。在培养过程中发现1例慢性粒细胞白血病患者骨髓液经过38 d原代细胞培养达80%以上融合度, 1例急性重型再生障碍性贫血患者骨髓液需要29 d, 其余患者需要12~20 d, 初步提示供者疾病类型可能影响BMSCs的培养。

实验对分离培养出来的贴壁细胞进一步研究了其生物学特性。细胞形态具有均一地成纤维细胞形态。流式细胞仪检测7~15代内细胞发现细胞表面标志无明显改变, 表达CD73、CD90、CD105, 不表达CD34、CD45及HLA-DR, 这与许多学者报道结果一致^[8-10]。BMSCs的细胞周期分析: 71.63%细胞在G₀~G₁期, 28.37%细胞在S+G₂+M期, 这表明大部分MSCs为早期细胞, 具有典型的干细胞增殖特点, 即只有少数细胞处于活跃的增殖期即S期, 大部分的细胞处于静息期G₀~G₁期。生长曲线绘制显示细胞增殖较快, 在对数生长期, 细胞倍增时间约为(31.92±1.30) h, 这表明全骨髓分离培养MSCs具有较高的增殖能力。

MSCs的多向分化潜能是判断MSC的条件之一, 目前对MSCs的鉴定尚无特异性的表面标志, 除细胞表型和生长特性外, 最终判定主要通过其多向分化能力(成脂肪、成骨和成软骨分化)来鉴定。因此在一般生物学特性研究地基础上, 实验应用MSCs诱导体系, 将BMSCs进行诱导, 以进一步证实其多向分化特性。在特定地诱导体系下, BMSCs脂肪诱导第14天油红O染色呈强阳性; 成骨诱导第14天茜素红染色阳性; 软骨诱导分化3周, 甲苯胺蓝染色阳。这表明BMSCs具有多向分化潜能, 通过一般生物学特性和多向分化潜能的研究, 证实了实验从骨髓所分离出来的细胞为BMSCs基本符合MSCs国际定义标准^[11]。

总之, 全骨髓分离培养法为一种从骨髓中培养MSCs简单有效的方法, 克服了密度梯度法的一些缺点, 值得推荐为各类疾病MSCs研究及临床应用所采用。

4 参考文献

- [1] Abdallah BM, Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Therapy*. 2008;15:109-116.
- [2] Stappenbeck TS, Miyoshi H. The role of stromal stem cells in tissue regeneration and wound repair. *Science*. 2009;324(5935):1666-1669.
- [3] Giordani A, Galderisi U, Marino IR. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*. 2007;211(1):27-35.
- [4] Bonnet D. Biology of human bone marrow stem cells. *Clin Exp Med*. 2003;3(3):140-149.
- [5] Xu S, De Becker A, Van Camp B, et al. An improved harvest and in vitro expansion protocol for murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:105940.
- [6] Insausti CL, Blanquer MB, Olmo LM, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the fat layer on the density gradient separated bone marrow. *Stem Cells Dev*. In press.
- [7] Grisendi G, Annerén C, Cafarelli L, et al. GMP-manufactured density gradient media for optimized mesenchymal stromal/stem cell isolation and expansion. *Cytotherapy*. 2010;12(4):466-477.
- [8] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143-147.
- [9] Pittenger MF. Mesenchymal stem cells from adult bone marrow. *Methods Mol Biol*. 2008;449:27-44.
- [10] Petrini M, Pacini S, Trombi L, et al. Identification and purification of mesodermal progenitor cells from human adult bone marrow. *Stem Cells Dev*. 2009;18(6):857-866.
- [11] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotency mesenchymal stem cells. The International society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315-317.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 哈尔滨市科技创新人才研究专项基金项目(2009RFQSQ027), 课题名称: 胎盘间充质干细胞规模化扩增及移植中应用; 黑龙江省卫生厅科研课题(2011-518), 课题名称: 脐带间充质干细胞治疗移植宿主病的临床研究; 国家 863 重大专项课题(2011AA020114), 课题名称: 干细胞应用于恶性血液病化疗后造血损伤再生修复的研究及临床评价; 首都临床特色应用研究(SQ2010AA0201008009), 课题名称: 脐带间充质干细胞治疗移植宿主病。

作者贡献: 陈虎、张斌、张颢进行实验设计, 实验实施为张颢、程梅、陶艳玲, 实验评估为张斌, 资料收集为扈江伟、徐曼, 张颢成文, 陈虎、张斌审校, 陈虎、张斌、张颢对文章负责。张斌与张颢对文章的贡献相同, 故并列为第一作者。

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。

伦理批准: 实验经哈尔滨市第一医院伦理委员会批准通过。

本文创新性:

提供证据: 检索 Pubmed 及 CNKI 数据库 2011-10 前发表的文章, 检索词为: whole bone marrow and bone marrow mesenchymal stem cells, 未见与文章密切相关的研究。

创新点说明: 课题设计的创新之处为方法创新, 即建立一种适合研究和临床应用的骨髓间充质干细胞的分离方法, 区别于密度梯度法, 具有很大的优越性。