

人骨髓基质干细胞的单细胞克隆培养与鉴定***☆

滕勇¹, 徐建丽², 李旭升¹, 胡蕴玉³, 王臻³

Single-cell clonal culture and identification of human bone marrow stromal stem cells

Teng Yong¹, Xu Jian-li², Li Xu-sheng¹, Hu Yun-yu³, Wang Zhen³

Abstract

¹First Department of Orthopedics, Urumqi General Hospital of Lanzhou Command, PLA, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; ²Department of Hematology, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; ³Institute of Orthopedics, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Teng Yong☆, M.D., Associate chief physician, Master's supervisor, First Department of Orthopedics, Urumqi General Hospital of Lanzhou Command, PLA, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
orthtengyong@163.com

Supported by: Medical Science and Research Development of Lanzhou Command, No.LXH2007014*; the National Natural Science Foundation of China, No.51165044*; a grant from the Twelfth "Five-Year" Development Program Foundation of Chinese PLA, No.CWS11J01*

Received: 2011-09-24
Accepted: 2012-02-01

BACKGROUND: Bone marrow stromal stem cells lack of specific surface marker and their identification challenges scholars all the time.
OBJECTIVE: To explore the culture condition for clonal isolation of human bone marrow stromal stem cells (BMSCs) and identify their surface markers and differentiation potentials.
METHODS: Human bone marrow was taken and BMSCs were isolated using density gradient centrifugation. Clone-like cells were selected by single cell limiting dilution. The surface antigens of the cloned BMSCs were analyzed by flow cytometry and immunocytochemistry. Multi-differentiation capacities were evaluated by inducing BMSCs into osteoblasts, chondrocytes and cardiocytes. RT-PCR and immunocytochemistry were applied to detect the three multi-differentiations.
RESULTS AND CONCLUSION: Single cell-derived BMSCs could be expanded to passage 28 *in vitro* which still maintained active proliferation ability. The expanded BMSCs expressed CD29, CD44, CD106, but not CD14, CD34, CD45, HLA-DR. They could be induced to differentiate into osteoblasts, chondrocytes and cardiocytes. These findings suggest that cloned BMSCs can maintain the phenotypes of stem cells during *in vitro* culture.

Teng Y, Xu JL, Li XS, Hu YY, Wang Z. Single-cell clonal culture and identification of human bone marrow stromal stem cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(10): 1742-1747. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 骨髓基质干细胞缺乏特异的表面识别分子, 其鉴定一直是研究中的难题。
目的: 探索人骨髓基质干细胞培养条件, 获得体外克隆化培养的成人骨髓基质干细胞, 并对其进行表型分析及分化潜能鉴定。
方法: 外科手术取髂骨术中抽取骨髓, 采用密度梯度离心法初步分离骨髓基质干细胞, 用极限稀释法进行克隆化培养; 流式细胞仪对克隆化培养的骨髓基质干细胞进行细胞表面标志检测, 并进行体外成软骨、成骨及心肌细胞诱导, 免疫组织化学及 RT-PCR 检测成软骨、成骨及心肌细胞表达, 确定其表型及分化潜能。
结果与结论: 单个细胞来源骨髓基质干细胞在体外 1:3 传代一般可以传 28 代左右, 24 代以前生长状态良好; 经流式细胞仪检测, 骨髓基质干细胞表达 CD29, CD44, CD106, 不表达 CD14, CD34, CD45, HLA-DR; 骨髓基质干细胞体外可向成骨、成软骨及心肌细胞分化, 提示体外克隆化培养的骨髓基质干细胞能保持良好的成体干细胞生物学特性。
关键词: 单克隆培养; 骨髓基质干细胞; 多能成体干细胞; 鉴定; 分化
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.10.008

滕勇, 徐建丽, 李旭升, 胡蕴玉, 王臻. 人骨髓基质干细胞的单细胞克隆培养与鉴定[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(10):1742-1747. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

骨髓基质干细胞(bone marrow stromal stem cells, BMSCs)因其获取容易, 具有多项分化的成体干细胞特性, 在组织工程种子细胞研究中成为热点, 但由于缺乏特异的细胞表面识别分子, 因此其鉴定一直是研究中的难题^[1-2], 目前国际上还没有公认的直接鉴定方法, 大多采取间接鉴定。实验应用单细胞克隆培养, 通过细胞的多向分化能力分析, 结合流式细胞技术来间接鉴定 BMSCs^[3], 试图建立一种 BMSCs 的鉴定方法。

1 材料和方法

设计: 细胞观察实验。

时间及地点: 实验于2009-09/2011-01在解放军兰州军区乌鲁木齐总医院完成。

材料:

主要试剂:

试剂	来源
L-DMEM 低糖培养基、胰酶、 Trizol RNA 提取试剂盒	美国 Gibco BRL 公司
胎牛血清	美国 Hyclone 公司
地塞米松、β-甘油磷酸、维生素 C、 转化生长因子 β、5-氮胞苷、 兔抗人 I、II 型胶原单克隆抗体	美国 Sigma 公司
鼠抗人骨钙素、肌动蛋白单 克隆抗体	美国 R&D 公司
抗 CD14、CD29、CD34、CD44、 CD45、CD106、HLA-DR 等 FITC	美国 Immunotech 公司
免疫细胞化学检测试剂盒	
RT-PCR 引物	上海基康公司合成

主要仪器:

仪器	来源
24孔板、50 mL 一次性塑料培养瓶	美国 Coster 公司
CO ₂ 孵箱	德国 Heraeus 公司
YJ-875 型超净工作台	苏州净化设备厂
倒置相差显微镜和照相系统, MPS60 图像采集分析系统	德国 Leica 公司
RQ1 RNase-Free DNase	美国 Promega 公司
Titan™ One Tube RT-PCR Kit	德国 Boehringer Manheim 公司
凝胶成像分析系统	上海天龙仪器公司

完全培养基组成: L-DMEM加入体积分数为10%胎牛血清, 青、链霉素终浓度100 U/mL; 软骨诱导条件培养基: 完全培养基加地塞米松、转化生长因子 β 、维生素C, 终浓度分别为 10^{-8} mol/L, 5 μ g/L, 10 mmol/L; 成骨诱导条件培养基: 完全培养基加地塞米松、 β -甘油磷酸、维生素C, 终浓度分别为 10^{-8} mol/L, 50 mg/L, 10 mmol/L; 心肌细胞诱导条件培养基: 完全培养基加3 μ mol/L 5-氮胞苷。

骨髓来源: 解放军兰州军区乌鲁木齐总医院骨科行腰椎峡部裂融合手术取髂骨时抽取髂骨骨髓4 mL, 共5例, 平均年龄24岁, 均为男性(患者对实验知情同意, 均签署知情同意书)。骨髓加入装有5 mL PBS的离心管, 吸管吹打混匀, 250 g离心10 min, 弃去上层脂滴及上清, 剩余上清与细胞混匀备用。

实验方法:

BMSCs的原代培养: 用5 mL完全培养基重悬细胞, 然后沿管壁缓慢滴加入底部装有Percoll(密度1.073 g/L)分离液的离心管中, 900 g离心30 min, 吸取界面云雾状白膜层, 加入完全培养基混匀细胞, 250 g离心10 min, 洗涤2遍, 计数。以 2×10^6 L⁻¹浓度接种于50 mL培养瓶, 6 d后第1次换液, 此后两三天换液1次, 细胞90%汇合时0.25%胰酶消化, 1:3传代, 传代细胞90%汇合时0.25%胰酶消化, 进行克隆培养。

BMSCs的克隆培养: 用0.25%胰酶消化后的传一代细胞, 250 g离心10 min, 收集细胞, 重悬, 参照文献[4]用有限稀释的方法进行细胞克隆培养: ①取传一代细胞, 消化液消化后制成单细胞悬液并计数。②细胞计数后, 以10倍等阶式稀释细胞悬液浓度为 1×10^6 L⁻¹, 将此细胞悬液100倍稀释即为 1×10^4 L⁻¹, 最后将浓度 1×10^4 L⁻¹的细胞悬液经2倍稀释, 即为 5×10^3 L⁻¹。③将稀释好

的细胞悬液分别接种于96孔板中, 每孔加液0.1 mL。然后体积分数为5%CO₂, 37 °C条件下培养。④2 d后, 倒置显微镜下观察培养板各孔细胞数, 挑选只含1个细胞的孔, 做好标记并补加0.1 mL培养液, 继续培养。⑤培养期间, 视培养液pH值的变化, 决定是否更换培养液。细胞培养12 d左右, 孔中即形成较大克隆, 原位消化重悬, 贴壁培养, 待克隆细胞长到70%融合时, 消化转种于24孔培养板、6孔板及培养瓶中培养扩大培养。⑥共选取培养17个生长良好的成纤维样细胞克隆, 将所有的单克隆细胞均扩大培养, 并冻存。⑦选取形态较好的克隆2、5的细胞进行以下实验。

BMSCs的生长曲线: 取第6代细胞, 细胞长满瓶底消化后进行以下实验: 调整细胞浓度为 2×10^7 L⁻¹, 接种9块96孔培养板, 2组/板, 6孔/组, 150 μ L/孔, 继续完全培养液培养。参照文献[5], 每24 h取出1板, MTT比色实验测生长曲线。以时间为横坐标, 6孔吸光度的平均值为纵坐标, 绘制生长曲线。

BMSCs表面标志检测: 取第6代细胞0.25%胰酶消化, 离心, PBS洗涤收获细胞, 计数调整细胞浓度为 5×10^9 L⁻¹, 取100 μ L细胞悬液分别与CD14, CD29, CD34, CD44, CD45, CD106, HLA-DR单克隆抗体室温闭光反应30 min, 用洗涤液洗涤2次, 离心, 送流式细胞仪检测表面标记。

BMSCs向成骨细胞诱导分化: 取生长良好的第6代细胞, 更换培养液为成骨条件培养液培养, 分别取诱导后6, 12, 18, 24 d细胞以 2×10^8 L⁻¹浓度接种于孔底, 预先铺好0.8 cm²经酸处理过细胞玻璃爬片的24孔板, 36 h细胞完全贴壁后, 做以下实验(未诱导细胞为阴性对照; 培养人成骨细胞为阳性对照):

I型胶原的表达: 细胞爬片浸入PBS洗涤2次, 40 g/L多聚甲醛固定20 min, PBS洗涤3次/5 min。体积分数为0.3%甲醇-H₂O₂溶液37 °C孵育30 min, 阻断内源性过氧化物酶活性, PBS振洗各3 min \times 2次。滴加正常山羊血清37 °C孵育30 min, 封闭细胞中的非特异结合位点。倾去血清, 滴加1:50稀释的兔抗人I型胶原单克隆抗体, 4 °C过夜。37 °C复温1 h, 滴加1:100稀释的生物素化山羊抗兔IgG, 37 °C孵育30 min, 最后滴加1:100稀释的辣根酶标记链霉卵白素, 37 °C孵育30 min。滴加新鲜配制DAB-H₂O₂液显色, 脱水透明封固。以PBS替代一抗作阴性对照。

¹ 解放军兰州军区乌鲁木齐总医院骨科一科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000;
² 新疆医科大学第一附属医院血液科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000;
³ 解放军第四军医大学西京医院骨科研究所, 陕西省西安市 710032

滕勇^{*}, 男, 1972年出生, 重庆市人, 汉族, 2005年解放军第四军医大学毕业, 博士, 副主任医师, 硕士生导师, 主要从事骨组织工程、骨缺损修复方面的研究。
orthtengyong@163.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225(2012)10-01742-06

收稿日期: 2011-09-24
修回日期: 2012-02-01
(20110524005/WL-S)

骨钙素的表达: 参照上述免疫细胞化学检测方法检测骨钙素表达, 免疫荧光显色。

碱性磷酸酶检测: PBS清洗3次, 4 °C 丙酮固定30 min, 碱性磷酸酶钙-钴法染色。观察阳性细胞百分比: 随机抽取5张爬片, 每张随机观察200个细胞, 计算碱性磷酸酶染色阳性者并计算平均值和百分比。

钙结节染色: $2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 浓度接种, 24 h贴壁后继续条件培养液培养, 2周左右细胞密集, 有结节形成, 40 g/L 多聚甲醛固定30 min, 饱和茜素红溶液染色。

BMSCs向软骨细胞诱导分化: 取生长良好的第6代细胞, 更换培养液为成软骨条件培养液, 分别取诱导后6, 12, 18, 24 d以 $2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 浓度接种于孔底预先铺好 0.8 cm^2 经酸处理过细胞玻璃爬片的24孔板, 36 h细胞完全贴壁后, 取出玻片40 g/L 多聚甲醛固定20 min后作以下处理(未诱导细胞为阴性对照; 培养人肋软骨细胞为阳性对照):

苏木精-伊红染色: 细胞爬片固定30 s~1 min; 水洗; 染苏木精3~5 min; 分化: 于碱水中返蓝20 s; 伊红染色10~20 s; 脱水, 透明, 中性树胶封固, 观察细胞及细胞核形态。

甲苯胺蓝染色: 细胞爬片1%甲苯胺蓝1 min; 体积分数95%乙醇分化; 丙酮脱水2次, 4 min/次; 透明封固。

II型胶原表达: 方法参照本实验上文所述免疫细胞化学染色, DAB显色。

BMSCs向心肌细胞诱导分化: 取生长良好的第6代细胞, 更换培养液为心肌细胞诱导条件培养液, 分别取诱导后6, 12, 18, 24 d以 $2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 浓度接种于孔底预先铺好 0.8 cm^2 经酸处理过细胞玻璃爬片的24板, 36 h细胞完全贴壁后, 取出玻片用40 g/L 多聚甲醛固定20 min后作以下处理(未诱导细胞为阴性对照; 培养人心肌细胞为阳性对照)。

苏木精-伊红染色: 细胞爬片固定30 s~1 min; 水洗; 染苏木精3~5 min; 分化: 于碱水中返蓝20 s; 伊红染色10~20 s; 脱水, 透明, 中性树胶封固, 观察细胞及细胞核形态。

肌动蛋白表达: 参照本实验上文所述, 按试剂盒说明书免疫细胞化学染色, A-P法。

RT-PCR检测: 取3种诱导前和诱导后6, 12, 18, 24 d的细胞, 成骨诱导检测 I 型胶原、骨钙素, 成软骨诱导检测 II 型胶原, 心肌细胞诱导检测心室肌特异性肌球蛋白轻链MLC-2V的mRNA表达。

RNA的提取: 细胞接种于35 mm平皿, 待长满约80%后, 吸弃培养液, PBS洗涤细胞3次→加1 mL Trizol, 室温放置5 min→吹打均匀, 移入1.5 mL离心管→加氯仿200 μL , 振荡15 s混匀→室温孵育5 min→4 °C, 12 000 r/min离心15 min→吸取上层水样带, 转移入另一离心管→加6/10体积异丙醇, 混匀→4 °C, 12 000 r/min

离心10 min→弃上清, 加体积分数为75%乙醇1 mL洗涤→4 °C, 7 500 r/min离心5 min→弃上清, 干燥5 min, 加无RNase水20 μL 重溶→加入RQ1 RNase-Free DNase以消化混杂的基因组DNA→参照文献[6]进行RNA的琼脂糖变性胶(1%)电泳分析, 核酸蛋白分析仪进行浓度和纯度的测定。-70 °C 保存备用。

RT-PCR: 根据Gene Bank数据库人 I 型胶原、骨钙素、II型胶原、MLC-2V的mRNA序列, 采用PCGENE软件设计PCR扩增的2条引物:

RT-PCR引物设计(5'→3'):

基因	Forward	Reverse
hCOL I	ATC CGC AGT GGC CTC CTA AT	GCA TCT CAT AGT GCA TCT GG
hCOL II	CTG GCT CCC AAC ACT GCC AAC GTC	TCC TTT GGG TTT GCA ACG GAT TGT
hOC	CGC AGC CAC CGA GAC ACC AT	GGG CAA GGG CAA GGG GAA GA
MLC-2V	GCC AAG AAG CGG ATA GAA GG	CTG TGG TTC AGG GCT CAG TC

采用Titan™ One Tube RT-PCR Kit 进行 RT-PCR。反应体系为: 2 μL 模板RNA, 0.2 mmol/L dNTP, 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 引物, 5 mmol/L DTT, 10 $\mu\text{mol/L}$ RNasin, 1.5 mmol/L MgCl_2 , 1 μL Enzyme Mix, 加无菌双蒸水至50 μL 。RT-PCR参数: 50 °C 30 min; 94 °C 10 s, 56 °C 30 s, 68 °C 45 s, 10个循环; 94 °C 10 s, 56 °C 30 s, 68 °C 2 min, 25个循环; 68 °C 7 min。同时设空白对照和阴性对照(第3代人血管内皮细胞总RNA)。RT-PCR产物1%琼脂糖凝胶电泳分析。

主要观察指标: ①BMSCs的克隆培养生长及生长曲线。②条件培养基对BMSCs的诱导分化。③BMSCs表面标志的表达。④BMSCs的生长情况和鉴定结果。

统计学分析: 由第一作者采用SPSS 13.0软件完成统计处理。

2 结果

2.1 BMSCs的克隆培养 相差显微镜观察刚接种的原代细胞呈球形悬浮于培养液, 并混有少量血细胞。6 d后换液, 残留的外周血细胞及造血干细胞等非贴壁细胞被除去, 可见大量单核细胞, 贴壁, 未完全伸展; 4~7 d可见贴壁单核细胞变成梭形或多角形; 7 d后逐渐增多并连接成片, 形成多个成纤维样细胞集落; 11 d细胞逐渐汇集, 胰酶消化传代后单细胞克隆培养, 96孔板培养2 h后, 可见不同形状单个细胞, 有成纤维细胞样、多角形以及圆形和小三角形, 第2天有的已经开始增殖, 第12天可见细胞克隆形成, 见图1, 成纤维细胞样细胞形成克隆快, 数目较多, 多角形次之, 圆形和小三角形

细胞未见明显克隆形成。选取17个成纤维细胞样细胞克隆扩大培养。



Figure 1 Cell clone under phase contrast microscope (×40)
图1 相差显微镜观察细胞克隆形成(×40)

细胞扩大培养后呈漩涡状生长，排列整齐，多呈长梭形，较薄、有突起，突起的数目及形态各不相同，见图2。

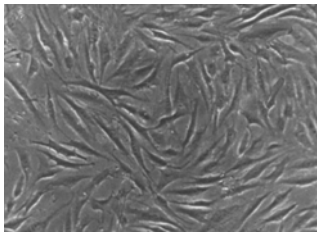


Figure 2 The cultured bone marrow stromal stem cells grew in a whirlpool manner, lined up in order and exhibited a shuttle-shaped appearance (×200)
图2 细胞扩大培养后呈漩涡状生长，排列整齐，多呈长梭形(相差显微镜，×200)

细胞在完全培养液下，1:3传代一般可以传28代左右，部分克隆可以传34代以上代。24代以前生长迅速，平均5d左右传代1次；以后增殖缓慢，六七天传代1次，细胞伸展不良，胞体增大，胞质稀薄，折光性减弱，同时伴细胞崩解、死亡。BMSCs生长曲线见图3。

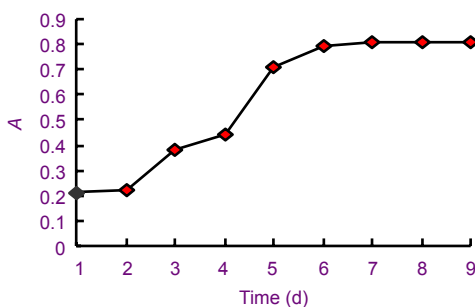


Figure 3 Growth curve of bone marrow stromal stem cells at different stages
图3 骨髓基质干细胞培养不同时间的生长曲线

2.2 BMSCs表面标志检测 经流式细胞仪检测，BMSCs表达CD29，CD44，CD106，不表达CD14，CD34，CD45，HLA-DR，表明培养细胞不是造血系细胞，见图4。

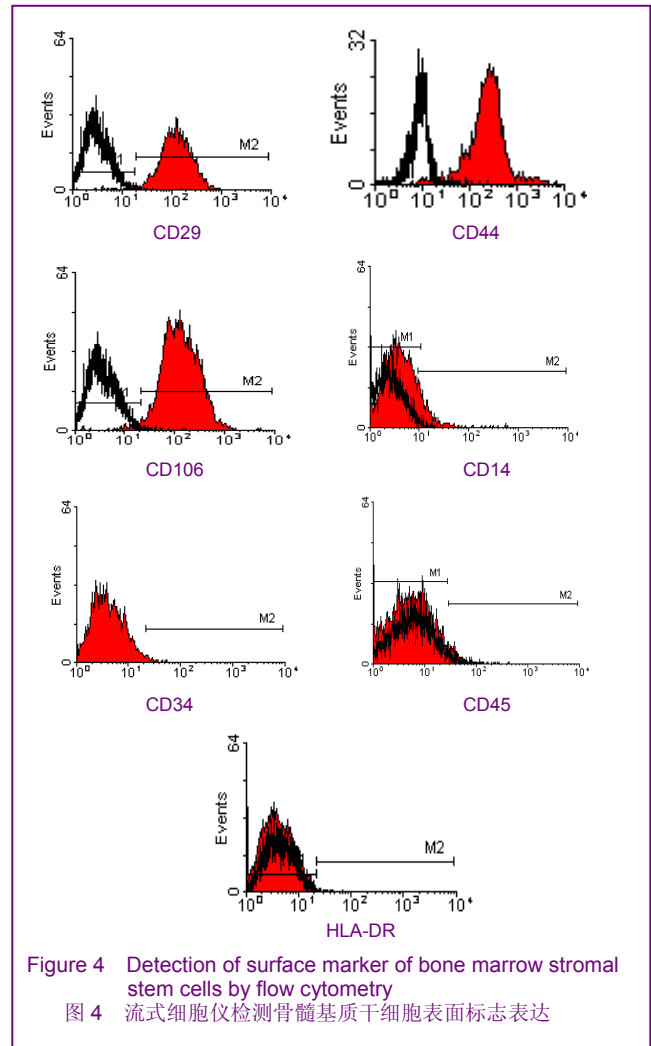
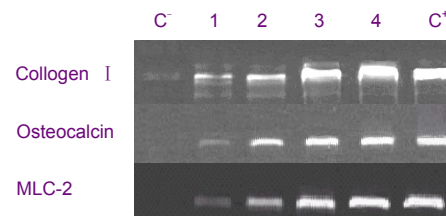


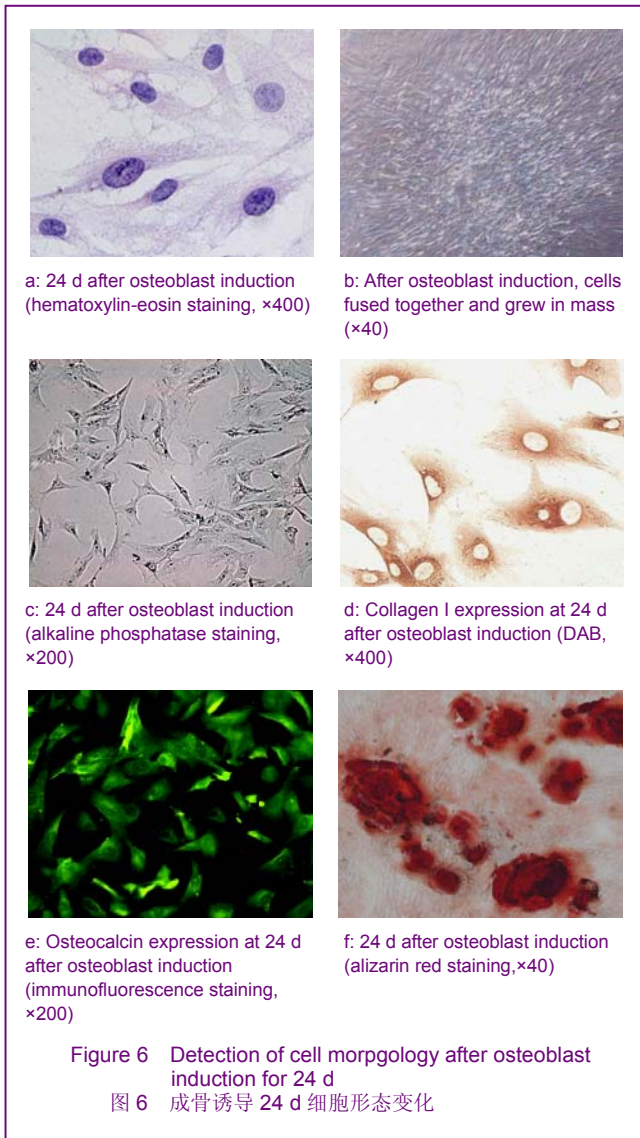
Figure 4 Detection of surface marker of bone marrow stromal stem cells by flow cytometry
图4 流式细胞仪检测骨髓基质干细胞表面标志表达

2.3 成骨细胞诱导分化检测 诱导后细胞不出现接触抑制，继续多层生长，聚集成团，有结晶样物质生成。诱导后6, 12, 18, 24 d免疫细胞化学检测细胞表达I型胶原、骨钙素，碱性磷酸酶阳性反应，随着时间延长阳性率逐渐增高，至第24天碱性磷酸酶阳性率可达95%；RT-PCR检测均有I胶原、骨钙素mRNA表达，表达量也逐渐增高，见图5；诱导后12, 18, 24 d钙结节茜素红染色细胞密集区阳性结节，见图6。

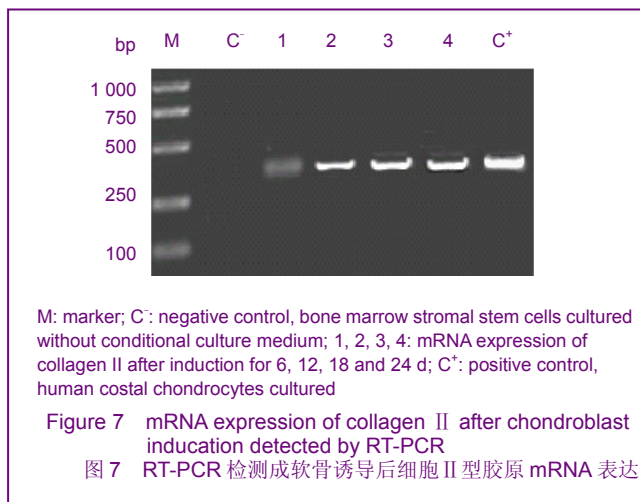


C⁻: Negative control; 1, 2, 3, 4: mRNA expression in cells after induction for 6, 12, 18, 24 d; C⁺: Positive control

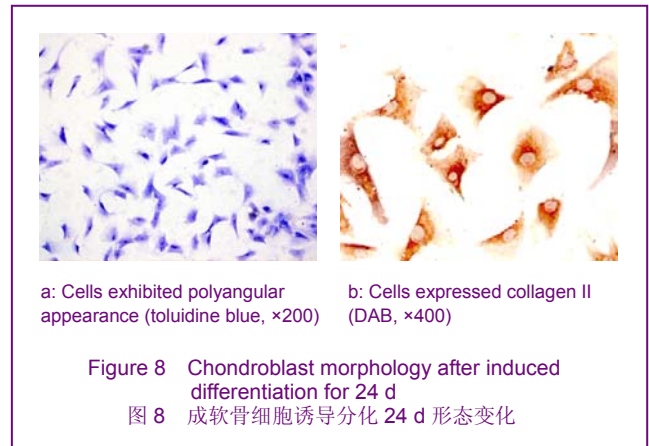
Figure 5 mRNA expression of collagen I, osteocalcin and MLC-2C after osteoblast and cardiocyte induction as detected by RT-PCR
图5 向成骨、心肌细胞诱导后 RT-PCR 检测 I 型胶原、骨钙素、MLC-2V 的 mRNA 表达



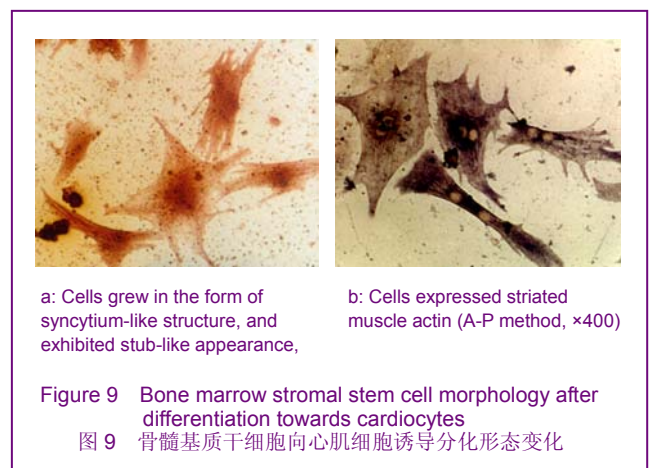
2.4 软骨细胞诱导分化检测 诱导后6, 12, 18, 24 d 多角形细胞逐渐增加; RT-PCR检测有II型胶原mRNA表达, 见图7。



免疫细胞化学检测细胞表达 II 型胶原; 甲苯胺蓝染色阳性, 随着时间延长阳性率逐渐增高, 见图8。



2.5 向心肌细胞诱导分化检测 诱导后6 d细胞胞体增大, 仍呈长梭形; 12 d后细胞变为短柱状, 突起位于两端; 诱导后18 d相邻细胞突起紧密接触, 继而相互连接; 24 d左右可见细胞连接形成合体样结构生长; 诱导后12, 18, 24 d免疫细胞化学检测细胞横纹肌肌动蛋白; RT-PCR检测有MLC-2V的mRNA表达, 见图5, 并随时间延长增高, 见图9。



3 讨论

3.1 BMSCs的纯化与鉴定 种子细胞一直是组织工程研究的核心问题之一, 理想的种子细胞应该具有容易获得、容易体外培养增殖、长期传代不改变生物学特征、抗原性小、组织修复能力强等特性。近年来, 发现骨髓基质干细胞基本具备上述条件, 成为组织工程中非常有应用前景的种子细胞, 适用于多种组织的修复重建^[7-8]; BMSCs代谢活力高, 容易通过转基因技术获得目标基因并在体内长期表达, 因此, BMSCs也可以作为基因治疗中接受目标基因的优秀载体细胞^[7-9]; 有人证实BMSCs在体外培养时能分泌细胞集落刺激因子等造血系细胞因子, 看来BMSCs还可以用于造血系统疾病的细胞治疗^[9]; 还有人尝试把BMSCs用于动物脊髓损伤

和脑卒中的治疗获得明显效果^[9]。这些特性使BMSCs在未来的医学领域中具有不可限量的应用前景。

但是, 在组织工程的研究与应用中, BMSCs的功能、均一性、规模化扩增、分化能力和衰老等是制约组织工程发展的重要瓶颈^[7-8, 10]。为了进一步研究BMSCs, 解决其规模化扩增、分化能力和老化等问题, 获得均一的BMSCs是研究的前提。BMSCs缺乏特异的表面标志, 目前公认的密度梯度离心、全骨髓贴壁和流式细胞仪分离3种方法都不能得到纯化的BMSCs^[11], 其中混有一定的单核/巨噬系细胞、内皮细胞等, 而对其研究和应用都希望得到纯化的BMSCs。

同样由于BMSCs缺乏特异的表面标志, 其鉴定也是困扰BMSCs研究的一大难题^[1-2]。Barry等^[12]观察了BMSCs表面蛋白表达SH2、SH3、CD29、CD44、Cly71、CD90、CD106、CD120a、CD124, 不表达造血系特征性标志CD14、CD34、CD45、HLA-DR, 证明了BMSCs与造血谱系不是一类细胞。Hung等^[13]利用流式细胞仪研究了人BMSCs可能存在的多种表面抗原, 发现对相应的抗体呈阴性的有CD1a、CD14、CD31、CD34、CD45、CD56和ESA。虽然经过大量努力, 目前仍然无法分离出特异的细胞表面标志, 从表面标志纯化、鉴定BMSCs的方法还有待进一步研究。实验通过克隆培养获得纯化的细胞株^[14], 然后分析克隆培养细胞的多种细胞表面标记, 排除了培养细胞是最有可能混淆的造血类细胞的可能。同时进一步向成骨、软骨、心肌细胞诱导, 证明培养细胞存在多向分化能力, 从而间接鉴定克隆培养的细胞就是BMSCs。

3.2 BMSCs的多向分化诱导 BMSCs为条件成骨细胞, 许多学者研究表明地塞米松、 β -甘油磷酸、维生素C是BMSCs向成骨分化的必要条件^[15-16]。地塞米松在促进细胞向成骨分化的同时提高碱性磷酸酶的活性, 调节成骨细胞分泌胰岛素样生长因子, 促进细胞外基质胶原合成。维生素C促进BMSCs合成胶原, 形成钙化, 并能调节ATP、碱性磷酸酶活性和非胶原基质蛋白的合成。 β -甘油磷酸在培养液中迅速被碱性磷酸酶水解, 产生大量磷酸离子, 促进生理性钙盐的沉积和钙化, 是BMSCs诱导发生矿化结节的必要条件, 此外, 低糖DMEM有利于BMSCs的存活, 降低细胞对凋亡的敏感性。实验进一步证实采用加入地塞米松、 β -甘油磷酸、维生素C的DMEM低糖培养基诱导分化的细胞具有典型的成骨细胞形态特征和生物学特征。

转化生长因子 β 是一种多功能细胞因子, 对多种细胞的生长和分化起重要作用^[15-16], 有研究表明, 转化生长因子 β 可以显著提高软骨细胞表型, 促进培养软骨细胞表达II型胶原和蛋白多糖。地塞米松有助于促进细胞分泌软骨基质。实验应用地塞米松、转化生长因子 β 、维生素C诱导促进BMSCs向软骨细胞分化, 结果表明在

体外诱导2周左右细胞表达软骨细胞表型, 细胞呈多边形, 胞浆有II型胶原和蛋白多糖表达。

综上所述, 是通过克隆培养的方法获取均一的BMSCs, 为下一步实验奠定基础。

4 参考文献

- [1] Maurer MH. Proteomic definitions of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Int.* 2011;2011:704256.
- [2] Li G, Chan CY, Wang H, et al. Proteomic analysis of human mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol.* 2011;698:443-457.
- [3] Yang Z, Schmitt JF, Lee EH. Immunohistochemical analysis of human mesenchymal stem cells differentiating into chondrogenic, osteogenic, and adipogenic lineages. *Methods Mol Biol.* 2011;698:353-366.
- [4] Situ ZQ, Wu JZ. Xi'an: Shijie Tushu Chubanshe. 1996:227-229. 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版社, 1996:227-229.
- [5] Situ ZQ, Wu JZ. Xi'an: Shijie Tushu Chubanshe. 1996:186-187. 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版社, 1996:186-187.
- [6] Yan ZY, Wang HL. Beijing: Kexue Chubanshe. 1998:120-145. 颜子颖, 王海林. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京:科学出版社, 1998:120-145.
- [7] English K, French A, Wood KJ. Mesenchymal stromal cells: facilitators of successful transplantation? *Cell Stem Cell.* 2010;7(4): 431-442.
- [8] Seong JM, Kim BC, Park JH, et al. Stem cells in bone tissue engineering. *Biomed Mater.* 2010;5(6):062001.
- [9] Hodgkinson CP, Gomez JA, Mirosou M, et al. Genetic engineering of mesenchymal stem cells and its application in human disease therapy. *Hum Gene Ther.* 2010;21(11):1513-1526.
- [10] Fehrer C, Lepperdinger G. Mesenchymal stem cell aging. *Exp Gerontol.* 2005;40(12):926-930.
- [11] Charbord P. Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts. *Hum Gene Ther.* 2010;21(9):1045-1056.
- [12] Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(4):568-584.
- [13] Hung SC, Chen NJ, Hsieh SL, et al. Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. *Stem Cells.* 2002;20(3):249-258.
- [14] Xiao Y, Mareddy S, Crawford R. Clonal characterization of bone marrow derived stem cells and their application for bone regeneration. *Int J Oral Sci.* 2010;2(3):127-135.
- [15] Yang Z, Schmitt JF, Lee EH. Immunohistochemical analysis of human mesenchymal stem cells differentiating into chondrogenic, osteogenic, and adipogenic lineages. *Methods Mol Biol.* 2011;698:353-366.
- [16] Turnovcova K, Ruzickova K, Vanecek V, et al. Properties and growth of human bone marrow mesenchymal stromal cells cultivated in different media. *Cytotherapy.* 2009;11(7):874-885.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 解放军兰州军区医药卫生科研计划项目(LXH2007014); 国家自然科学基金资助项目(51165044); 全军十二五课题基金资助项目(CWS11J011)。

作者贡献: 第一作者进行实验设计, 实验实施为第二、三作者, 实验评估为第五作者, 资料收集为第二作者, 第一作者成文, 第四作者审核, 第一作者对文章负责。

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。

伦理要求: 患者对实验完全知情同意, 并在充分了解本实验方案的前提下签署了“知情同意书”。

关键信息: 目前国内外尚缺乏骨髓基质干细胞的直接鉴定方法。实验采用克隆培养方法纯化细胞, 采用多个细胞表面标志物和细胞的多向分化来鉴定骨髓基质干细胞, 为组织工程种子细胞研究奠定基础。