

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.45.007

[http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

刘继春, 胡红涛, 许国华, 蒋玉权, 徐宁, 叶晓健. 一种改良人骨髓间充质干细胞分离培养的方法[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(45):8394-8397.

一种改良人骨髓间充质干细胞分离培养的方法***

刘继春¹, 胡红涛², 许国华², 蒋玉权², 徐宁², 叶晓健²

¹解放军第184医院骨科, 江西省鹰潭市 335000;
²解放军第二军医大学附属长征医院骨科, 上海市 200003

刘继春★, 男, 1983年生, 安徽省淮北市人, 汉族, 2012年解放军第二军医大学医学硕士, 主要从事脊柱外科研究。
3-9-8-1@163.com

通讯作者: 叶晓健, 教授, 博士生导师, 解放军第二军医大学附属长征医院骨科, 上海市 200003
yexj2002@163.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344(2012)45-08394-04

收稿日期: 2012-03-19
修回日期: 2012-07-15
(20111219003/M·C)

文章亮点: 实验采用松质骨冲洗液直接培养法从人松质骨中短时间内获得大量间充质干细胞。实验方案较常规方法具有周期短、操作简单、对细胞损伤较少的特点, 从细胞贴壁生长形态、成骨成脂肪分化能力、特定表达表面抗原 3 个方面可以认定为骨髓来源的间充质干细胞。

关键词: 松质骨; 骨髓间充质干细胞; 分离; 培养; 鉴定; 成骨分化; 成脂肪分化; 干细胞

摘要

背景: 分离培养鼠、兔骨髓间充质干细胞的科研实践较多, 而组织工程临床实践大多以同种属种子细胞的科研为基础。

目的: 建立一种稳定、高效, 满足临床和实验室需要的人骨髓间充质干细胞分离培养方法。

方法: 使用骨穿针于人髂前上棘处抽取骨髓和松质骨, 用 15 mL 培养体系冲洗松质骨并收集冲洗液, 采用直接培养法, 利用细胞贴壁性能初筛细胞; 流式细胞仪检测细胞表面抗原(CD29、CD34、CD44、CD45、CD105), 分别进行成骨、成脂肪诱导分化, 在诱导过程中进行细胞形态学观察对干细胞进行初步鉴定。

结果与结论: 松质骨冲洗液直接培养法在培养第 5 天的时候出现细胞集落, 细胞稳定表达 CD29、CD44、CD105, 不表达 CD34、CD45。成骨诱导 20 d 后出现明显钙结节, 茜素红染色呈红色结节。成脂诱导 7 d 后脂滴明显形成, 油红素 O 染色见大量脂质沉淀。结果可见采用松质骨冲洗液直接培养法可以从人松质骨中短时间内获得大量间充质干细胞, 其具有良好的细胞形态, 稳定表达的细胞抗原及成骨、成脂分化能力。

A modified method of isolating and culturing human bone marrow mesenchymal stem cells

Liu Ji-chun¹, Hu Hong-tao², Xu Guo-hua², Jiang Yu-quan², Xu Ning², Ye Xiao-jian²

Abstract

BACKGROUND: Experiments for the isolation and culture of rat or rabbit bone marrow mesenchymal stem cells are more common, but the clinical experiments of tissue engineering are often on the basis of the seed cells of the same species.

OBJECTIVE: To establish a protocol for isolating and culturing human bone marrow mesenchymal stem cells which is stable and efficient and consistent with the needs of clinical and laboratory experiments.

METHODS: Bone marrow and spongy bone were obtained from the human anterior superior iliac spine, and then the bone marrow, the spongy bone was flushed by 15 mL culture medium and then the rinse solution was collected. The cells were primary screened on the basis of adhesion function by direct cultivation method; the surface antigens, including CD29, CD34, CD44, CD45 and CD105 were detected by flow cytometry. Bone marrow mesenchymal stem cells were differentiated into osteoblasts and adipocytes, and the differentiated mesenchymal stem cells were identified by morphological observation.

RESULTS AND CONCLUSION: Cell colony could be seen at 5 days after cultured with spongy bone washing liquid. These cells were uniformly negative for CD34, CD45 and positive for CD29, CD44 and CD105. Calcium nodules were observed after osteogenic induction for 20 days and positive for alizarin red staining. The lipid droplets could be seen after adipogenic induction for 7 days and oil red O staining showed a large number of lipid deposition. The study shows that a large amount of mesenchymal stem cells can be isolated and cultured from adult human spongy bone in short time by direct cultivation methods, and the mesenchymal stem cells are uniform in morphology, the cells can express the antigens stably and differentiate into osteoblasts and adipocytes.

Liu JC, Hu HT, Xu GH, Jiang YQ, Xu N, Ye XJ. A modified method of isolating and culturing human bone marrow mesenchymal stem cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(45):8394-8397.

0 引言

骨髓间充质干细胞是一类具有特定生物学行为, 固定表面抗原表达和多向分化潜能的干细胞^[1]。骨髓间充质干细胞具有多向分化的能力、调节免疫的作用^[2], 其在组织工程和临床治疗中的广泛应用已获得了极大的关注^[3-6]。传统常用的细胞分离培养方法存在操作复杂、对细胞损伤较大, 需要仪器工具较精密, 进而费用较高以及获取原代细胞集落出现时间较晚、细胞量较少等缺点^[7-8], 本实验研究目的在于采用一种改良的方法从人体松质骨内获得间充质干细胞, 利用流式细胞仪检测细胞表面抗原的表达, 并采用成骨诱导分化和成脂诱导分化初步对细胞进行鉴定^[6, 9], 为骨髓间充质干细胞的临床应用和实验研究提供一种新的方法。

1 材料和方法

设计: 随机分组设计实验。

时间及地点: 实验于2011-11-21在解放军第二军医大学生物医学工程研究所完成。

材料:

实验试剂、设备	来源
体积分数为 10%胎牛血清、90%低糖 DMEM 培养基	Gibco
成骨诱导体系 (HUXMA-90021-200), 成脂诱导体系 (HUXMA-90031-200)	Cyagen
0.05%Trypsin-0.04%EDTA、1%双抗	Invitrogen
CD29-PE、CD45-PE、鼠抗人单克隆抗体 CD34、鼠抗人单克隆抗体 CD44、鼠抗人单克隆抗体 CD105、PE/Cy5 mouse IgG1、klsotype Ctrl	Biologend
羊抗鼠二抗-FITC	Biologend
CKX41 型倒置相差显微镜	OLYMPUS 公司
TD5Z 台式低速离心机	湖南凯达科学仪器有限公司
SW-CJ-2F 型双人双面净化工作台	苏州市苏纬净化设备有限公司
流式细胞仪	美国 BD 公司

方法:

人骨髓间充质干细胞的分离培养与传代: 选择年轻(18-30岁)、无血液系统、肿瘤等疾病的患

者^[10-11], 无菌条件下于髂前上棘取松质及骨髓, 浸泡于培养体系中密封, 置入4 °C保温桶内。在转运过程中保持样品不与冷冻剂直接接触, 转运过程不超过2 h。15 mL培养体系(体积分数为10%胎牛血清、90%低糖DMEM培养基、1%双抗)冲洗松质骨并收集冲洗液, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 2 mL培养基重悬细胞。将重悬液置于直径10 cm的培养皿内进行培养, 每皿加入培养基约10 mL。置于37 °C, 体积分数为5%CO₂的孵育箱内培养, 每3 d换液。倒置显微镜下观察细胞生长, 当发现大量血细胞悬浮时可适当吸弃5 mL培养基后, 再加入5 mL培养基进行培养。观察细胞当融合80%-90%时用胰蛋白酶消化, 1:2或1:3传代。

细胞表面抗原的检测: 第3代细胞约80%融合时, 消化并计数, 按照 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的细胞密度接种于6孔板, 待细胞约90%融合后, 消化2 mL EP管收集细胞, 300×g离心5 min, 弃上清液。

抗体直接标记: 各个EP管内加入抗体, 用最大量程为200 μL的移液枪小心吹打混匀(CD29-PE 15 μL, CD45-PE 15 μL, κ Isotype Ctrl 15 μL); 4 °C避光孵育30 min; 每EP管内添加适量(1.5-2.0 mL)PBS, 用最大量程为1 mL的移液枪小心吹打混匀。300×g离心3 min, 吸去上清液。每EP管加入400 μL PBS, 重悬细胞, 上机检测。

抗体间接标记: 各EP管内加入相对应的一抗, 用最大量程为200 μL的移液枪小心吹打混匀(CD34 3 μL, CD44 3 μL, CD105 3 μL)。室温避光孵育30 min。每EP管内添加适量(1.5-2.0 mL)PBS, 用最大量程为1 mL的移液枪小心吹打混匀。300×g离心3 min, 吸去上清液。重复洗涤1次, 吸去上清液。每EP管内各加入100 μL PBS。每样品管内加入1 μL二抗, 用最大量程为200 μL的移液枪小心吹打混匀。室温避光孵育30 min。每EP管内添加适量(1.5-2.0 mL)PBS, 用最大量程为1 mL的移液枪小心吹打混匀。300×g离心3 min, 吸去上清液。每EP管加入400 μL PBS, 重悬细胞, 上机检测。

定向诱导骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的方法与鉴定: 取第4代细胞, 按 $5\ 000/\text{cm}^2$ 接种于6孔板, 每孔加入2 mL培养体系, 37 °C, 体积分数为5% CO₂孵育, 待细胞80%-90%融合后

¹Department of Orthopedics, the 184 Hospital of Chinese PLA, Yingtan 335000, Jiangxi Province, China; ²Department of Orthopedics, Changzheng Hospital of Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

Liu Ji-chun★, Master, Physician, Department of Orthopedics, the 184 Hospital of Chinese PLA, Yingtan 335000, Jiangxi Province, China 3-9-8-1@163.com

Corresponding author: Ye Xiao-jian, Professor, Doctoral supervisor, Department of Orthopedics, Changzheng Hospital of Second Military Medical University, Shanghai 200003, China yexj2002@163.com

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No.81071477*; 973 Planning Program, No.2009CB930000*

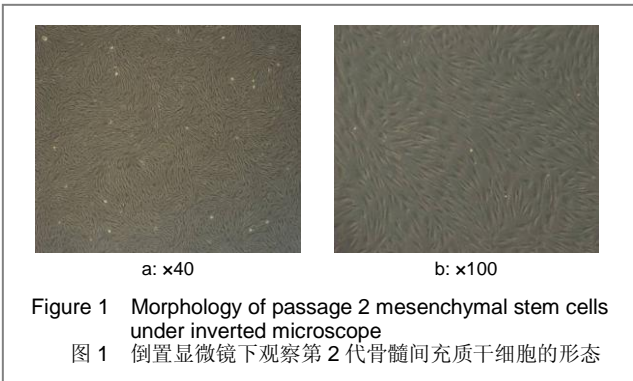
Received: 2012-03-19 Accepted: 2012-07-15

换用成骨培养体系约2 mL, 每3 d换液, 诱导约4周, 诱导期间对钙结节出现及增多情况进行观察, 取诱导21 d的细胞进行茜素红染色。

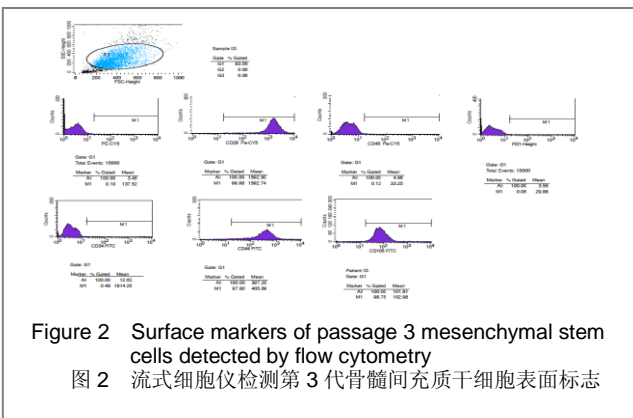
定向诱导骨髓间充质干细胞向脂肪细胞分化的方法与鉴定: 取第4代细胞, 按5 000/cm²接种于6孔板, 每孔加入2 mL培养体系, 37 °C, 体积分数为5% CO₂培养箱孵育, 待细胞90%–100%融合后, 换用成脂诱导体系A培养基2 mL, 孵育3 d后换用B培养基2 mL, 维持24 h。再次更换培养基A, 进行3–5个循环。取诱导4个循环后的细胞进行油红素O染色。

2 结果

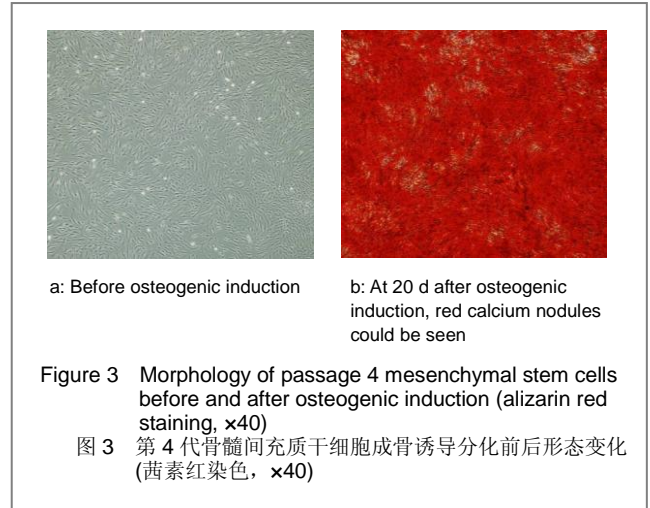
2.1 形态学观察 骨组织块离心液培养约3 d后, 可见少量长梭形贴壁细胞生长, 随着培养时间延长, 约5 d时贴壁细胞量较多, 呈漩涡状生长, 消化传代。原代培养的间充质干细胞约7 d长满。按照1:2传代后3–5 d可达80%融合, 见图1。连续培养10代, 细胞生长情况无明显差异, 但继续培养至11代, 细胞生长速度明显减慢, 细胞变大, 形状不规则, 胞内颗粒增多。



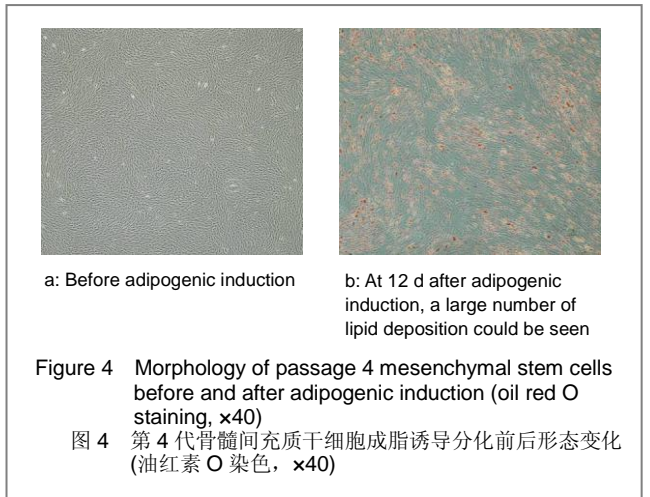
2.2 流式细胞仪表型分析 获得的第3代细胞表型表达均质性好, 高表达细胞标记CD29(99.98%)、CD44(97.80%)、CD105(98.75%), 不表达细胞标记CD45(0.12%)、CD34(0.48%), 见图2。



2.3 成骨诱导茜素红染色 第4代细胞, 诱导约7 d时细胞呈多角形, 胞质内细胞颗粒增多; 13 d时胞质内充满颗粒, 细胞呈集落样生长, 细胞间可见钙质沉积; 17 d时细胞结节中心的细胞逐渐融合失去细胞结构, 钙结节形成明显; 21 d时经茜素红染色呈红色结节, 见图3。



2.4 成脂肪诱导油红素O染色 第4代细胞成脂诱导72 h后, 镜下观察可见细胞立体感增强, 细胞内有小脂滴出现; 约1周后脂滴数量增加并相互融合, 细胞由长梭形变为圆形或多边形, 油红O染色显示有大量脂质沉淀, 见图4。



3 讨论

实验从人松质骨冲洗液中分离获得的骨髓间充质干细胞, 呈梭形, 漩涡状贴壁生长, 体外扩增至10代, 细胞形态不发生明显改变。流式细胞仪检测提示: 高表达CD29、CD44、CD105, 不表达造血细胞标记CD34、CD45。在诱导体系的作用下, 分离所得的细胞可以分

化为成骨细胞、脂肪细胞,具有多向分化能力,符合间充质干细胞的基本生物学行为,可以认定为骨髓来源的间充质干细胞。本实验初步实现了从人松质骨中快速获得骨髓间充质干细胞的方法,为进一步的细胞研究提供了基础。

骨髓中间充质干细胞在骨髓中含量较少,并且随着年龄的增长,骨髓中间充质干细胞的数量减少和增殖能力减弱^[12],成人骨髓中还存在成骨细胞、成纤维细胞、造血细胞等多种成分,因此,如何有效的分离获得纯度较高的细胞,是值得关注的问题。目前较常用的分离方法有:密度梯度离心法、全骨髓培养法、免疫磁珠或流式细胞仪分选法^[13-15]。而这几种方法存在许多不足,密度梯度离心法操作复杂, Percoll分离液等试剂损伤细胞活性,全骨髓培养法获得的细胞纯度较低,免疫磁珠或流式细胞仪分选法费用较高,细胞活性损失较大。本实验将松质骨冲洗液离心后培养。操作方法简单有效,费用较低,传代消化时采用0.05%的胰蛋白酶,在37℃下消化,作用时间减少。对细胞的操作处理较少,因而对细胞的损伤较少,可获得较好细胞活性和较高纯度的骨髓间充质干细胞。

本实验初步建立了从成人松质骨中获得和鉴定间充质干细胞的实验方案,较常规方法具有周期短、操作简单等特点,适合科研和临床中推广应用。

4 参考文献

- [1] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-147.
- [2] Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005;105(4):1815-1822.
- [3] Garcia-Fuentes M, Meinel AJ, Hilbe M, et al. Silk fibroin/hyaluronan scaffolds for human mesenchymal stem cell culture in tissue engineering. *Biomaterials*. 2009;30(28):5068-5076.
- [4] Lee JS, Hong JM, Moon GJ, et al. A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke. *Stem Cells*. 2010;28(6):1099-1106.
- [5] Freedman MS, Bar-Or A, Atkins HL, et al. The therapeutic potential of mesenchymal stem cell transplantation as a treatment for multiple sclerosis: consensus report of the International MSCT Study Group. *Mult Scler*. 2010;16(4):503-510.
- [6] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317.
- [7] Pountos I, Corscadden D, Emery P, et al. Mesenchymal stem cell tissue engineering: techniques for isolation, expansion and application. *Injury*. 2007;38 Suppl 4:S23-33.
- [8] Beyer Nardi N, da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol*. 2006;(174):249-282.
- [9] Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells*. 2004;22(3):377-384.
- [10] Zhou S, Greenberger JS, Epperly MW, et al. Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging Cell*. 2008;7(3):335-343.
- [11] Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(9):726-736.
- [12] Kasper G, Mao L, Geissler S, et al. Insights into mesenchymal stem cell aging: involvement of antioxidant defense and actin cytoskeleton. *Stem Cells*. 2009;27(6):1288-1297.
- [13] Lee OK, Kuo TK, Chen WM, et al. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*. 2004;103(5):1669-1675.
- [14] Shu XC, Zhu DH, Liu JJ, et al. In vitro studies on the growth and proliferation characteristics of rat bone mesenchymal stem cells. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*. 2010;44(10):923-927.
- [15] Shimizu K, Ito A, Yoshida T, et al. Bone tissue engineering with human mesenchymal stem cell sheets constructed using magnetite nanoparticles and magnetic force. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007;82(2):471-480.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 国家自然科学基金(81071477); 973 项目计划(2009CB930000)。

作者贡献: 实验设计、评估由第一作者和通讯作者完成,实验实施由第一、二、三、四作者完成。所有作者均经过正规培训。

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: 本实验所涉及的操作均获得研究对象的许可,无涉及伦理冲突问题。

文章要点: 本文基于组织工程中骨髓间充质干细胞的研究现状,提供了一种有效培养人骨髓间充质干细胞的技术方法,为进一步的研究工作提供了基础。

作者声明: 文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。