

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.45.014 [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

李兵, 费舟, 胡世颀, 林伟, 李侠, 胡学安, 王冰. 外胚间充质干细胞的体外分离培养与鉴定[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(45):8435-8439.

外胚间充质干细胞的体外分离培养与鉴定*☆

李兵, 费舟, 胡世颀, 林伟, 李侠, 胡学安, 王冰

文章亮点: 实验在体外成功分离培养外胚间充质干细胞, 并采用低亲和力神经生长因子受体作为磁珠分离的细胞表面标志对其进行分选, 结果提示体外分离经磁珠筛选纯化扩增的细胞证实为外胚间充质干细胞, 其具有干细胞特征。

关键词: 外胚间充质干细胞; 干细胞; 神经嵴细胞; 分离培养; 鉴定; 表型

摘要

背景: 外胚间充质干细胞不仅可以作为组织工程研究的一种新种子细胞, 而且可以为临床神经系统肿瘤提供一种新的治疗策略。

目的: 体外分离外胚间充质干细胞, 对其进行磁珠筛选、形态及超微结构观察、神经干细胞表型鉴定及生长增殖能力检测。

方法: 从SD胎鼠的上下颌突分离出外胚间充质干细胞进行原代培养, 培养液中加入磁珠包被的低亲和力神经生长因子受体抗体, 进行磁珠筛选纯化。

结果与结论: 经磁珠筛选后的外胚间充质干细胞呈“成纤维细胞样”细胞, 为长梭形, 漩涡状生长; 透射电子显微镜显示主要为间充质样细胞, 形状不规则, 细胞增殖活性高, 处于未分化状态; 免疫组织化学染色结果显示人自然杀伤细胞1、波形蛋白、S-100在细胞浆中呈阳性表达, 而细胞角蛋白则为阴性; 生长曲线显示呈“S”形, 第3天进入对数生长期, 第6天进入平台期, 其倍增时间 $TD=40.28$ h。提示体外分离经磁珠筛选纯化扩增的细胞证实为外胚间充质干细胞, 其具有干细胞特征。

In vitro isolation, cultivation and identification of ecto-mesenchymal stem cells

Li Bing, Fei Zhou, Hu Shi-jie, Lin Wei, Li Xia, Hu Xue-an, Wang Bing

Abstract

BACKGROUND: Ecto-mesenchymal stem cells are not only a new kind of seed cells in tissue engineering research, but also an innovative therapeutic strategy for tumors in clinical nervous system.

OBJECTIVE: To observe morphology and ultrastructure, identify nerve stem cell marker and test the ability of growth and the proliferation of *in vitro* isolated ecto-mesenchymal stem cells.

METHODS: Ecto-mesenchymal stem cells were enzymatically isolated from the first branchial arch of rat embryo and maintained in an undifferentiated state with beads coated low affinity nerve growth factor receptor antibody. Then they were purified by magnetic activated cell sorting.

RESULTS AND CONCLUSION: Ecto-mesenchymal stem cells after purification by magnetic activated cell sorting grew like swirls and were fibroblast-like and long spindle-shaped. The ultrastructure of ecto-mesenchymal stem cells was characterized by mesenchymal-like cells with irregular shape, undifferentiation and high activity of proliferation. Immunohistochemical staining manifested that ecto-mesenchymal stem cells expressed human natural killer cells-1, Vimentin and S-100 but not cytokeratin. Ecto-mesenchymal stem cells grew into the exponential phase after cultured for 3 days, and reached to plateau phase after cultured for 6 days. The growth curve was “S” like and the doubling time was 40.28 hours. The evidence suggested that the cells *in vitro* cultured and purified by magnetic activated cell sorting were undifferentiated ecto-mesenchymal stem cells with stem cell characteristics.

Li B, Fei Z, Hu SJ, Lin W, Li X, Hu XA, Wang B. In vitro isolation, cultivation and identification of ecto-mesenchymal stem cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(45):8435-8439.

解放军第四军医大学西京医院神经外科, 陕西省西安市 710032

李兵☆, 男, 1968年生, 北京市人, 汉族, 2001年解放军第四军医大学毕业, 博士, 副教授, 副主任医师, 主要从事神经干细胞治疗的研究。
libingt1968@163.com

通讯作者: 费舟, 博士, 现任解放军第四军医大学西京医院神经外科主任, 教授, 主任医师, 博士生导师, 解放军第四军医大学西京医院神经外科, 陕西省西安市 710032
feizhou@fmmu.edu.cn

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344 (2012)45-08435-05

收稿日期: 2012-01-19
修回日期: 2012-04-03
(20111219007/WL · C)

Department of
Neurosurgery, Xijing
Hospital, Fourth
Military Medical
University, Xi'an
710032, Shaanxi
Province, China

Li Bing☆, Doctor,
Associate professor,
Associate chief
physician,
Department of
Neurosurgery, Xijing
Hospital, Fourth
Military Medical
University, Xi'an
710032, Shaanxi
Province, China
libingt1968@
163.com

Corresponding
author: Fei Zhou,
Doctor, Professor,
Chief physician,
Doctoral supervisor,
Department of
Neurosurgery, Xijing
Hospital, Fourth
Military Medical
University, Xi'an
710032, Shaanxi
Province, China
feizhou@fmmu.
edu.cn

Supported by: the
Natural Science
Foundation of
Shaanxi Province,
No.2010JM4029*

Received: 2012-01-19
Accepted: 2012-04-03

0 引言

神经嵴是脊椎动物胚胎发育过程中的一个暂时性结构,起源于神经板两侧神经褶,神经嵴来源于外胚层,是机体内最具多分化潜能性的结构之一,它的衍生物具有3个胚层衍生物结构的性质。颅神经嵴细胞向腹外侧迁移,到达颌突的中胚层后,这些细胞被称为外胚间充质干细胞,有研究证实外胚间充质干细胞具有多项分化潜能^[1-6]。但是只有获得高纯度的外胚间充质干细胞,才能对其生物学特性进行深入研究,因此获得高纯度的外胚间充质干细胞是今后研究的基础。课题组之前通过流式细胞仪分析体外培养的外胚间充质细胞中外胚间充质干细胞的数目非常少,所以如何在体外分离扩增外胚间充质干细胞就显得尤为重要。实验采用磁珠分选原代细胞中低亲和力神经生长因子受体阳性的细胞,从而分离和扩增外胚间充质干细胞,该方法分离过程对目的细胞的损伤小,故分选所得细胞可以继续研究使用。

1 材料和方法

设计: 观察性实验。

时间及地点: 实验于2011年3至10月在解放军第四军医大学西京医院神经外科实验室完成。

材料:

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
低糖 DMEM-F12 培养基(1:1) 体积分数为 15%小牛血清	Gibco 浙江金华清湖犍牛 利用研究所
白血病抑制因子	Chemicon
LSAB 加强型免疫组织化学试剂 盒, 抗大鼠波形丝蛋白多克隆抗 体, 抗大鼠细胞角蛋白多克隆抗 体, 抗大鼠 S-100 多克隆抗体, 抗 Nestin 单抗	DAKO
抗大鼠人自然杀伤细胞 1(CD57)单 克隆抗体, 兔抗大鼠低亲和力神 经生长因子受体, 抗人自然杀伤 细胞 1(CD57)单克隆抗体	Santa Cruz Bio
羊抗兔磁珠试剂盒	Dynal biotech
CO ₂ 孵箱	Heraeus
倒置相差显微镜和照相系统	OLYMPUS

实验动物: 清洁级 Sprague Dawley(SD)孕鼠 5只,妊娠十一二天(以雌雄同笼后见阴栓当日正午记为0.5 d),由解放军第四军医大学动物中心提供,实验动物许可证号 SCXK-(军) 2007-007。

实验方法:

SD大鼠外胚间充质干细胞的原代培养: 断颈处死妊娠12.5 d的SD大鼠,无菌条件下剖腹取出胎鼠,置PBS中切取胎鼠上下颌突,切成大小为0.1 mm×0.1 mm×0.1 mm左右的小块,用0.25%胰蛋白酶液37 °C消化8 min,轻轻吹打,使组织块松散,直至消失变为单细胞悬液,加入等量含血清的DMEM培养液终止消化,轻轻吹打混匀,800 r/min离心6 min,弃上清,加入含有10⁶ U/L白血病抑制因子的DMEM-F12培养液使细胞重悬,经75 μm的滤网过滤后,以去除聚集的细胞团和未消化的组织,也可以去除体积较大的细胞,然后分装入培养瓶中,加入适量的培养液,置于体积分数为5%CO₂, 37 °C饱和湿度的孵箱中40 min左右,在倒置显微镜下观察大部分细胞已经贴壁,弃上清,再加入新鲜的含有白血病抑制因子的培养液继续培养,隔日观察细胞生长状况,两三天消化进行磁珠筛选。

磁珠筛选法纯化外胚间充质干细胞: 实验采用间接法免疫磁珠分离,一抗为兔抗低亲和力神经生长因子受体,首先清洗磁珠,剧烈振荡磁珠以充分混匀;将磁珠移至离心管内并放置磁力架上静置2 min后,去除上清;加入含有0.1%血清的PBS清洗,重复上一步骤,清洗3次后重悬备用。

细胞分离: 原代细胞用含有0.1%血清的PBS重悬,加入低亲和力神经生长因子受体抗体,4 °C孵育30 min,然后用含有0.1%血清的PBS清洗3次,去除残留的抗体;细胞再次重悬,按照1×10¹¹ L⁻¹的浓度加入磁珠(使用前轻晃混匀磁珠),2-8 °C孵育60 min;将分离管置于磁力架上,静置2 min,然后缓缓的弃去上清液;用含有0.1%血清的PBS重悬清洗2次,最后弃去上清。加入磁珠分离液(0.2 mol/L PH2柠檬酸盐),轻晃混匀2 min,混匀后置于磁力架上,静置2 min,取上清液;重复几次以去除残余的磁珠,将上清接种到培养液中。

形态学观察: 每日在倒置显微镜下观察细胞

生长情况和细胞形态并照相。

透射电子显微镜观察: 取磁珠筛选后第3代细胞, 消化收集细胞, 离心, 浸洗, 戊二醛固定, 包埋, 脱水, 常规制作超薄切片, 做透射电子显微镜观测。

免疫细胞化学法鉴定细胞表型特性: 取磁珠筛选后第3代细胞爬片, 将生长状况良好的第3代细胞接种于预先处理消毒过的小盖玻片(8 mm×8 mm)上, 37 °C 孵箱中孵育24 h, 用0.1 mol/L PBS洗涤3次后, 体积分数为95%乙醇固定2 h, 梯度乙醇脱水。LSAB加强型免疫组织化学试剂盒说明书进行细胞的免疫组织化学染色, 检测人自然杀伤细胞1、波形蛋白、细胞角蛋白、S-100的表达。免疫组织化学试剂盒进行细胞染色步骤如下: 0.3% Triton X-100, 15 min, 增加细胞通透性; 0.01 mol/L PBS振洗5 min×3; 体积分数为3%过氧化氢30 min, 以消除内源性过氧化物酶活性; 0.01 mol/L PBS振洗5 min×3; 10%正常牛血清白蛋白室温封闭30 min, 以阻断非特异性结合; 倾去血清, 滴加适当稀释的抗体, 4 °C 过夜。37 °C 复温1 h, 0.01 mol/L PBS振洗5 min×3; 滴加生物素标记二抗, 37 °C, 30 min。PBS洗5 min×3; 滴加辣根酶标记链霉卵白素, 37 °C, 30 min, PBS洗5 min×3。DAB显色液, 镜下控制显色, 苏木精复染, 二甲苯透明、封固。光镜下观察。

生长曲线及群体倍增时间: 取磁珠筛选后的第3代细胞, 以 1×10^4 /孔接种于24孔板, 每组设3个复孔。每日分别取1组, 用0.25%胰蛋白酶和1% EDTA各0.5 mL消化形成细胞悬液, 混匀。取少量细胞悬液, 滴于细胞计数板上, 在倒置显微镜下计数, 每孔计3次, 取其平均值。然后以时间(d)为横坐标, 细胞数为纵坐标, 绘制生长曲线。细胞群体倍增时间计算公式:

$$TD = \Delta t \log 2 / \log N_t - \log N_0$$

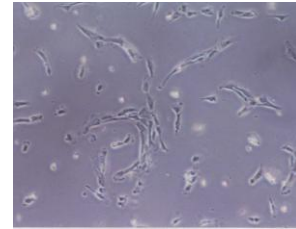
$\Delta t = t - t_0$, t_0 : 培养起始时间; t : 培养终止时间;
 N_0 : 培养起始细胞数; N_t : 培养终止细胞数。

主要观察指标: 磁珠分选后原代及传代外胚间充质干细胞形态, 及透射电子显微镜观察超微结构; 免疫细胞化学法鉴定细胞表型人自然杀伤细胞1、波形蛋白、细胞角蛋白、S-100的表达; 绘制生长曲线, 计算群体倍增时间。

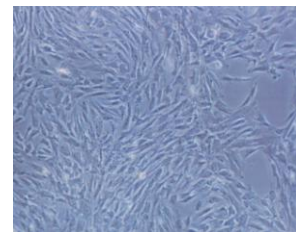
2 结果

2.1 磁珠筛选后的细胞生长状态 磁珠筛选后的SD大鼠外胚间充质干细胞在37 °C 孵箱中培养40 min后, 大

部分细胞已贴壁, 弃上清和未贴壁的悬浮细胞, 加入新鲜培养液, 两三个小时后细胞开始伸展, 次日细胞全部伸展开, 大部分呈星形, 核为卵圆形、位于胞质中央, 呈栅栏样生长, 似成纤维细胞样细胞。每3-5 d传代1次。细胞呈旋涡状生长, 随培养时间的延长更加明显, 见图1。



a: Morphology of LNGFR⁺ cells after cultured for 12 h



b: Morphology of LNGFR⁺ cells after passaged to the third generation

Figure 1 Morphology of positive low affinity nerve growth factor receptor antibody (LNGFR⁺) cells after magnetic activated cell sorting (×100)

图1 磁珠分选低亲和力神经生长因子受体阳性细胞形态观察(×100)

2.2 细胞超微结构 透射电子显微镜下观察显示外胚间充质干细胞主要为间充质样细胞, 形状不规则, 呈多突起的星形或梭形, 突起不规则; 核、浆比例大; 核仁明显, 大、靠边; 常染色质多, 异染色质少; 含有大量的线粒体及少量粗面内质网及核糖体。提示细胞增殖活性高, 处于未分化状态, 见图2。

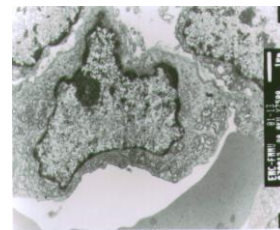
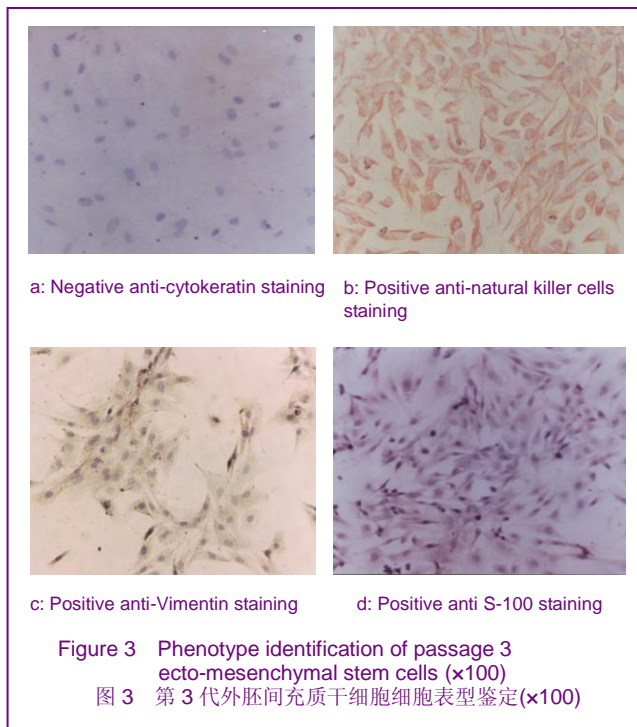


Figure 2 Ultrastructure of the third passage of low affinity nerve growth factor receptor antibody cells (×7 500)

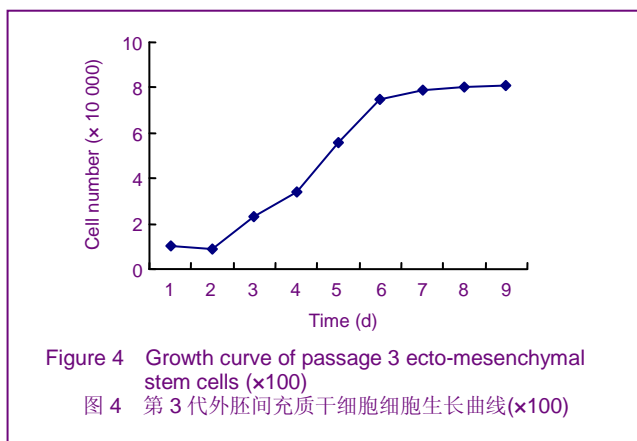
图2 低亲和力神经生长因子受体阳性细胞第3代超微结构(×7 500)

2.3 免疫细胞化学法鉴定细胞表型特性 磁珠筛选后第3代细胞经免疫细胞化学染色结果显示, 人自然杀伤

细胞1、波形蛋白、S-100在细胞浆中呈阳性表达(衬染), 而细胞角蛋白为阴性(胞浆无着色), 见图3。



2.4 生长曲线和群体倍增时间 细胞计数结果, 在接种后1 d, 细胞数量有所下降, 但在接种后2 d开始增加, 到第3天进入对数生长期, 第6天进入平台期, 第8天开始下降, 整个曲线呈“S”形, 见图4。根据公式推算出SD大鼠外胚间充质干细胞的倍增时间TD=40.28 h。



3 讨论

外胚间充质干细胞是颅神经嵴细胞迁移到达面突中胚层时形成的, 是一种具有多向分化潜能的细胞, 从谱系方面来看, 它既有外胚层神经干细胞的一些表型, 又具有中胚层的表型特征, 这为它在多向分化方面提供了可能性。在过去的研究中已经证实具有成骨原性、成

软骨原性、神经源性、牙源性、生肌源性^[1-6]。如能建立稳定的颌突外胚间充质干细胞的体外培养模型, 对于研究中枢神经系统免疫机制以及定向诱导分化将起到一定的推动作用, 目前关于成体外胚间充质干细胞的研究也越来越受到重视^[7-8]。

免疫磁珠分离干细胞是比较有效的分离纯化方法^[9-10], 其应用日趋广泛, 尤其在免疫学检测、细胞分离、蛋白质纯化等方面取得巨大的进展。这一方法的核心是在磁珠表面包被具有免疫反应原性的抗体, 直接与靶细胞的抗原分子或与事先结合在靶细胞表面的抗原进行抗原抗体反应, 在细胞表面形成玫瑰花结, 这些细胞一旦在强大的磁场下, 就会与其他未被结合的细胞分离, 具有超强顺磁性的磁珠脱离磁场后立即消失磁性, 这样就可以提取或去除所标记的细胞, 从而达到阳性或阴性选择细胞的目的, 细胞分离是免疫磁珠目前应用最主要的一个方面。免疫磁珠分离细胞的作用方式有两种: 直接法和间接法, 本实验采用的是间接法免疫磁珠分离细胞。低亲和力的神经生长因子受体已经被很多研究证明是神经嵴干细胞的标志^[5]; 另外, 磁珠分离所需的细胞标志必需是位于细胞膜上, 这样磁珠才能与之结合, 从而分离细胞, 因此本实验采用低亲和力神经生长因子受体作为磁珠分离的细胞表面标志。

初步的形态学观察外胚间充质干细胞为成纤维样细胞, 大部分细胞呈星形, 细胞核为卵圆形、位于胞质中央。通过对磁珠分离前后的细胞计数, 发现原代细胞中外胚间充质干细胞的数量较少, 大约只有5%。在培养了6代之后超微结构观察显示大多数外胚间充质干细胞处于未分化状态, 此时干细胞的比例很高。说明磁珠筛选法可以起到分离纯化扩增外胚间充质干细胞的作用。

免疫细胞化学染色显示, 抗波形蛋白着色较强, S-100着色较浅, 抗细胞角蛋白染色为阴性, 显示其间充质特性及神经嵴来源。而抗人自然杀伤细胞1的着色则较为特别, 细胞均有着色, 但着色程度有差别, 大部分细胞着色较深, 少部分细胞着色较浅。人自然杀伤细胞1为迁移中神经嵴细胞的特异性抗体^[11], 在其他的中胚层细胞和内、外胚层的细胞中几乎不表达, 因而用抗人自然杀伤细胞1单抗可以将来源于颅神经嵴的外胚间充质干细胞和其他细胞分开^[12]。

为了保持细胞的未分化状态, 本实验在培养液中加入了白血病抑制因子。在干细胞的培养中, 为抑制分化常使用滋养层细胞, 如成纤维细胞。但操作繁琐, 观察不便, 且不能保持培养细胞的纯净并可能带来外源性病

毒污染而越来越少用。而白血病抑制因子可有效抑制分化^[13]。白血病抑制因子是一典型的多功能生长因子,对细胞的生长、增殖与分化有广泛的作用,而其最显著的生物学功能则是体外抑制胚胎干细胞的分化,维持胚胎干细胞的增殖和多能性。

实验在体外成功分离外胚间充质干细胞并进行磁珠分选,同时观察了其体外生长特性和神经干细胞特征,为下一步深入研究外胚间充质干细胞治疗神经系统肿瘤打下了良好的基础。

4 参考文献

- [1] Temple S, Alvarez-Buylla A. Stem cells in the adult mammalian central nervous system. *Curr Opin Neurobiol.* 1999;9(1):135-141.
- [2] Deng MJ, Jin Y, Shi JN, et al. Multilineage differentiation of ectomesenchymal cells isolated from the first branchial arch. *Tissue Eng.* 2004;10(9-10):1597-1606.
- [3] Deng M, Shi J, Smith AJ, et al. Effects of transforming growth factor beta1 (TGFbeta-1) and dentin non-collagenous proteins (DNCP) on human embryonic ectomesenchymal cells in a three-dimensional culture system. *Arch Oral Biol.* 2005;50(11):937-945.
- [4] Yan Z, Lin Y, Jiao X, et al. Characterization of ectomesenchymal cells isolated from the first branchial arch during multilineage differentiation. *Cells Tissues Organs.* 2006;183(3):123-132.
- [5] Zhang J, Duan X, Zhang H, et al. Isolation of neural crest-derived stem cells from rat embryonic mandibular processes. *Biol Cell.* 2006;98(10):567-575.
- [6] Nie X, Zhang YJ, Tian WD, et al. Improvement of peripheral nerve regeneration by a tissue-engineered nerve filled with ectomesenchymal stem cells. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2007;36(1):32-38.
- [7] Degistirici O, Jaquiere C, Schönebeck B, et al. Defining properties of neural crest-derived progenitor cells from the apex of human developing tooth. *Tissue Eng Part A.* 2008; 14(2):317-330.
- [8] Delorme B, Nivet E, Gaillard J, et al. The human nose harbors a niche of olfactory ectomesenchymal stem cells displaying neurogenic and osteogenic properties. *Stem Cells Dev.* 2010; 19(6):853-866.
- [9] Olsvik O, Popovic T, Skjerve E, et al. Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 1994;7(1):43-54.
- [10] Battye FL, Shortman K. Flow cytometry and cell-separation procedures. *Curr Opin Immunol.* 1991;3(2):238-241.
- [11] Sohal GS, Ali MM, Galileo DS, et al. Emigration of neuroepithelial cells from the hindbrain neural tube in the chick embryo. *Int J Dev Neurosci.* 1998;16(6):477-481.
- [12] Shimoda Y, Tajima Y, Nagase T, et al. Cloning and expression of a novel galactoside beta1, 3-glucuronyltransferase involved in the biosynthesis of HNK-1 epitope. *J Biol Chem.* 1999; 274 (24):17115-17122.
- [13] Shellard J, Perreau J, Brûlet P. Role of leukemia inhibitory factor during mammalian development. *Eur Cytokine Netw.* 1996; 7(4):699-712.

来自本文课题的更多信息—

基金资助: 陕西省自然科学基金(2010JM4029)《肿瘤基因修饰的干细胞在胶质瘤治疗中的研究》。

作者贡献: 实验设计、实施和评估均为第一作者,资料收集为全部作者,第一作者成文,通讯作者审校,第一作者和通讯作者对文章负责。

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: 实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

关键信息: ①首次运用磁珠分选纯化的方法获取大量外胚间充质干细胞。②运用透射电镜观察了外胚间充质干细胞的超微结构。③选取了神经干细胞的经典鉴定指标进行细胞免疫组织化学鉴定:人自然杀伤细胞 1、波形蛋白、细胞角蛋白、S-100。

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。