

梯度血清递减体外培养人脐带间充质干细胞

李力, 庞妍, 张航, 邝丽萍, 肖芷芳, 王耀春, 肖扬

Human umbilical cord mesenchymal stem cells cultured in serum-decremental medium *in vitro*

Li Li, Pang Yan, Zhang Hang, Kuang Li-ping, Xiao Zhi-fang, Wang Yao-chun, Xiao Yang

Abstract

BACKGROUND: The proliferation of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs) strongly depends on the culture conditions. Medium containing 10–20% fetal bovine serum (FBS) can promote cell growth.

OBJECTIVE: To build the serum-decremental technology for UCMSCs culture.

METHODS: hUCMSCs were separated using collagenase II digestion method and purified by adherent culture. The cells were cultured and expanded by the serum-decremental method: media 20% serum-free medium for the primary culture, 50% serum-free medium for the second passage, 80% serum-free medium for the third passage, and 100% serum-free medium for the fourth passage. Cells were cultured in α -MEM medium containing 10% FBS as control. Cell surface markers were tested by flow cytometry. Osteogenic induction test was performed.

RESULTS AND CONCLUSION: Cells cultured in the both media were similar in proliferative ability, morphology, and immunophenotype. Their differentiative potential kept well in both media. However, less FBS was used in serum-decremental medium. Serum-decremental medium improves the safety of hUCMSCs culture in clinical practice.

Li L, Pang Y, Zhang H, Kuang LP, Xiao ZF, Wang YC, Xiao Y. Human umbilical cord mesenchymal stem cells cultured in serum-decremental medium *in vitro*. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(6): 989-993. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

General Hospital of
Guangzhou Military
Command of Chinese
PLA, Guangzhou
510010, Guangdong
Province, China

Li Li, Associate chief
technician, General
Hospital of
Guangzhou Military
Command of Chinese
PLA, Guangzhou
510010, Guangdong
Province, China
Lily17155@yahoo.
com.cn

Received: 2011-07-17
Accepted: 2011-08-14

摘要

背景: 人脐带间充质干细胞的扩增与培养条件密切相关, 而含体积分数 10%~20%胎牛血清的培养基可促进细胞生长。

目的: 建立梯度血清递减扩增培养脐带间充质干细胞的培养技术。

方法: 采用胶原酶 II 消化分离获得脐带间充质干细胞悬液, 并通过贴壁培养进行纯化, 细胞贴壁后采用梯度血清递减方法, 即第 1 代 80%含血清培养基, 20%无血清培养基; 第 2 代 50%含血清培养基, 50%无血清培养基; 第 3 代 20%含血清培养基, 80%无血清培养基; 第 4 代 100%无血清培养基。另一种传代中始终采用含体积分数 10%胎牛血清的 α -MEM 完全培养液。用流式细胞仪检测细胞的表面标记, 进行成骨诱导试验, 同时与经典的含 10%胎牛血清的 α -MEM 培养体系进行比较。

结果与结论: 梯度血清递减培养法与经典 α -MEM 培养体系所获得的细胞在扩增能力、细胞形态、免疫表型等方面相似。细胞在两种培养体系中均能保持良好的分化潜能。但梯度血清浓度法培养间充质干细胞可使用更少量胎牛血清, 提高临床应用安全性。

关键词: 胎牛血清; 脐带; 间充质干细胞; 培养; 扩增

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.06.009

李力, 庞妍, 张航, 邝丽萍, 肖芷芳, 王耀春, 肖扬. 梯度血清递减体外培养人脐带间充质干细胞[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(6):989-993. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs) 是一类具有自我更新和多向分化潜能的干细胞, 体外可分化成多种细胞, 包括脂肪细胞, 成骨细胞, 软骨细胞, 心肌细胞, 肝细胞, 心肌细胞, 神经细胞和 β -胰岛细胞等^[1-4]。除了具有多向分化能力外, MSCs还具有低免疫原性和组织归巢能力, 使其成为治疗组织损伤、组织变性、自身免疫性疾病的理想选择^[5-7]。在胚胎形成过程中, 滋养层细胞形成胎膜、脐带、胎盘, 内细胞群形成胎儿。胎儿血循环中MSCs随胎儿的成熟, 大部分定位在脐静脉内皮下层和胎盘。这使得脐带富含MSCs。与其他组织来

源的MSCs一样, 脐带来源的MSCs同样具有自我更新和多向分化潜能, 具有低免疫原性和组织归巢能力, 且前期临床研究认为脐带MSCs静脉注射是安全的^[8]。

然而, 到目前为止, 脐带MSCs培养并未有一个广泛认可的、规范可靠的培养方法。目前, 多数实验室采用含体积分数10%~20%胎牛血清的 α -MEM培养基进行MSCs培养。然而, 胎牛血清中存在异种蛋白, 以及潜在病原体感染的风险, 限制了其在临床的应用, 无血清培养条件下MSCs的增殖能力明显变差, 无法获得临床需要的足够量的MSCs。实验采用血清体积分数梯度递减方法进行MSCs培养, 旨在尽量少使用胎牛血清, 提高细胞临床应用安全性。

解放军广州军区
广州总医院, 广东
省广州市
510010

李力, 女, 1969
年生, 湖北省武汉市人, 汉族, 1992
年解放军第三军医
大学毕业, 副主任
技师, 主要从事
间充质干细胞及
肿瘤免疫细胞的研究。
Lily17155@
yahoo.com.cn

中图分类号:R394.2
文献标识码:A
文章编号:1673-8225
(2012)06-00989-05

收稿日期: 2011-07-17
修回日期: 2011-08-14
(20110517006/W · L)

1 材料和方法

设计: 细胞学体外对比观察。

时间及地点: 于2010-01/12在解放军广州军区广州总医院细胞生物治疗与研究中心完成。

材料: 经产妇知情同意, 采集足月顺产健康胎儿脐带15份, 实验经解放军广州军区广州总医院伦理委员会批准。脐带采集之前产妇已行乙型肝炎病毒表面抗原、乙型肝炎病毒核心抗体、丙型肝炎病毒抗体、梅毒螺旋体抗体、艾滋病病毒抗体检查, 全部合格后方可采集, 采集后4℃保存, 2 h内处理。

实验用主要试剂与仪器:

试剂及仪器	来源
Ficoll 淋巴细胞分离液	天津血液病研究所供
Heraeus 离心机	Labofuge400R, Germany
T75 cm ² 培养瓶	NUNC, Denmark
倒置显微镜	OlympusBX60, Japan
流式细胞仪	Miltenyi Biotec, Germany
PE 标记的 CD44、CD106, FITC 标记的 CD29、CD34 抗体及其相应同型对照 α-MEM 完全培养液	BD, USA
胶原酶 II	Hyclone, USA
胎牛血清	Invitrogen, USA
0.25 g/L 胰酶	Invitrogen, USA (批号: 8153379) Sigma, USA

实验方法:

人脐带间充质干细胞 (human umbilical cord mesenchymal stem cells hUC-MSCs) 分离、培养: 健康足月顺产胎儿脐带标本经 D-Hank's 液冲洗后剪碎成约 1 mm × 1 mm × 1 mm 的小块, 先后经 10 g/L 胶原酶 II 消化过夜, 处理成单个细胞悬液, 接种于含体积分数 10% 胎牛血清、α-MEM 完全培养液的 T75 cm² 型塑料培养瓶中, 置 37℃、体积分数 5% CO₂, 饱和湿度培养箱培养, 三四天后全量换液, 弃去非贴壁细胞后每 3 d 全量换液, 观察细胞 > 80% 融合时, 2.5 g/L 胰酶 1 mmol/L EDTA 消化, 按 1:3 传代。传代分两种方法进行, 一种是血清梯度切换方法, 即第 1 代 80% 含血清培养基, 20% 无血清培养基; 第 2 代 50% 含血清培养基, 50% 无血清培养基; 第 3 代 20% 含血清培养基, 80% 无血清培养基; 第 4 代 100% 无血清培养基, 另一种传代中始终采用含体积分数 10% 胎牛血清的 α-MEM 完全培养液。

hUC-MSCs 免疫表型鉴定: 分别取 P4 贴壁细胞常规消化后以 PE 标记的 CD44、CD106, FITC 标记的 CD29、CD34 抗体及其相应同型对照标记细胞, 流式细胞仪检测。

hUC-MSCs 向成骨细胞诱导分化实验: 分别取两种培养体系所获得的 P4 细胞, 将细胞以 3 × 10⁴/孔的密度接种于

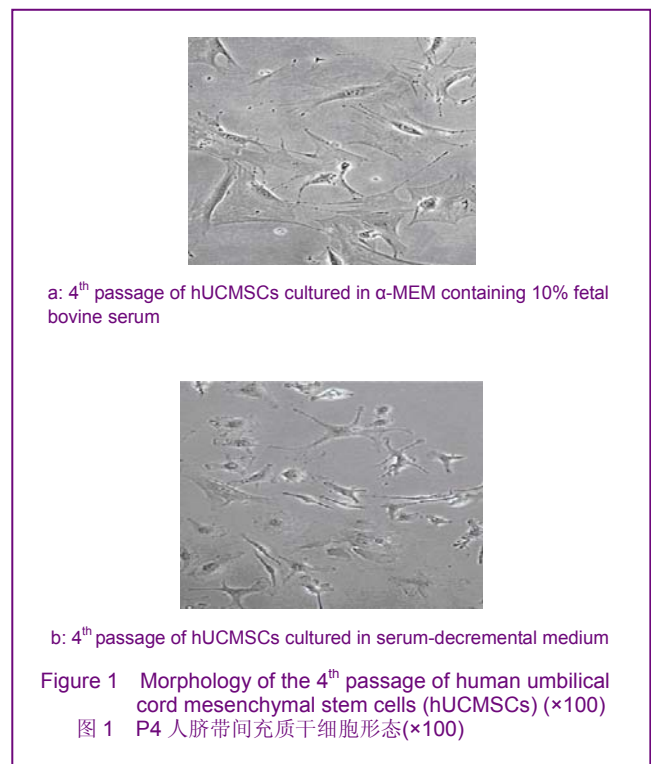
3.5 cm² 的培养皿, 12 h 后, 将培养液改为成骨诱导培养液(含 1.0 × 10⁻⁸ mol/L 地塞米松, 20 × 10⁻⁴ mol/L 抗坏血酸, 7.0 × 10⁻³ mol/L β-磷酸甘油的培养液)中, 每 3 d 半量换液 1 次。用碱性磷酸酶染色检测钙化基质沉淀。

主要观察指标: ①脐带间充质干细胞在 2 种培育体系中的生长情况。②2 种培养体系所获得的间充质干细胞的免疫表型特征。③2 种培养体系所获得的间充质干细胞诱导分化后特异性染色结果。

统计学分析: 由第一作者采用 SPSS 13.0 软件包进行统计处理分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用配对 t 检验, P < 0.05 为差异有显著性意义。

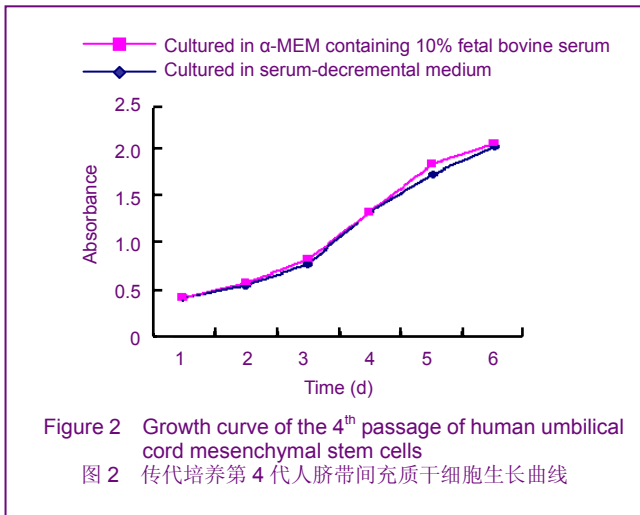
2 结果

2.1 不同培养方法对 hUC-MSCs 培养结果的影响 采用梯度血清培养法培养的原代细胞多于 24~48 h 内贴壁, 培养一两周, 倒置显微镜可见贴壁细胞呈梭形、多角形, 2 周以后增长速度较快, 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, 于第两三周可形成 80% 融合贴壁细胞层。连续传 20 代, 细胞形态无明显改变。采用含体积分数 10% 胎牛血清的 α-MEM 培养的细胞生长情况同前相似。见图 1。

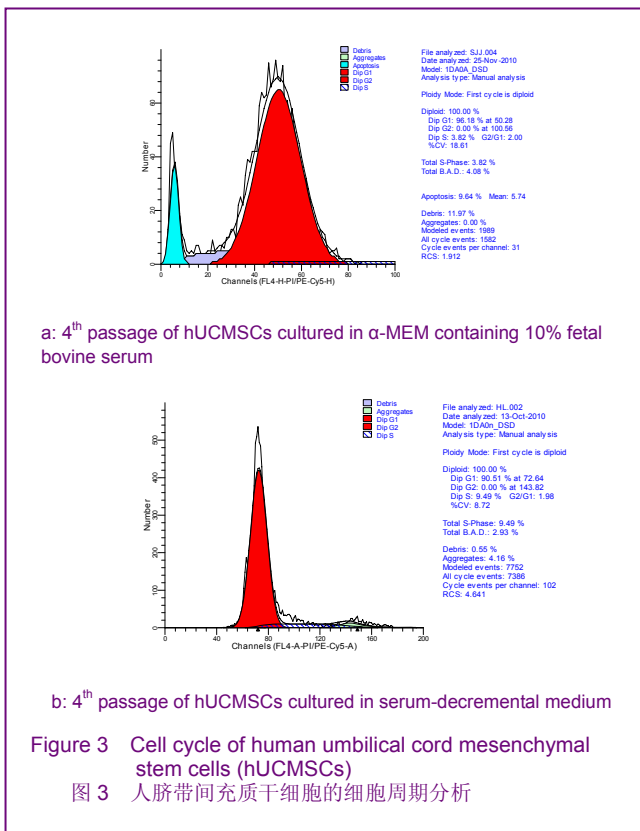


2.2 hUC-MSCs 的生长曲线及细胞周期情况 hUC-MSCs 生长曲线呈 S 形, 接种后第 0~1 天为潜伏期, 从第 2 天起细胞开始增殖并进入对数生长期, 第 5 天达到高峰, 以后进入平台期。根据生长曲线可知 hUC-MSCs 的群体倍增时间为 45 h, 见图 2。增殖曲线显示两组间

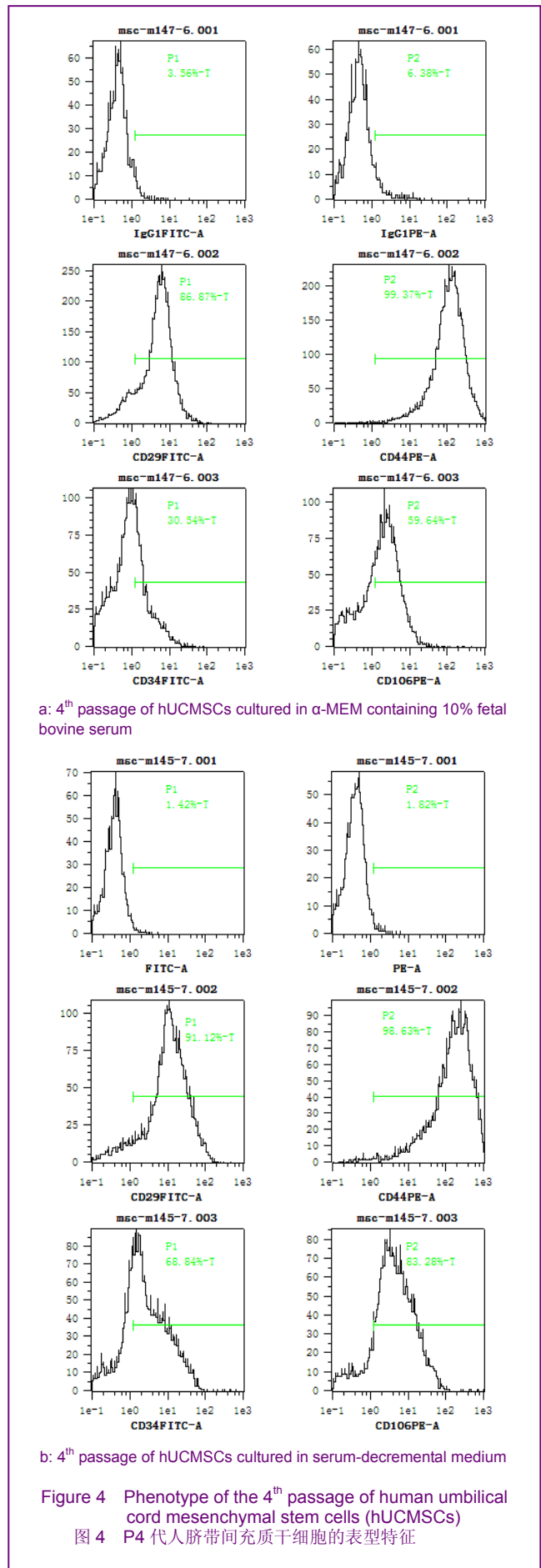
差异无显著性意义($P > 0.05$), 说明实验中经典培养法与血清递减法对细胞增殖速率影响无明显差异。



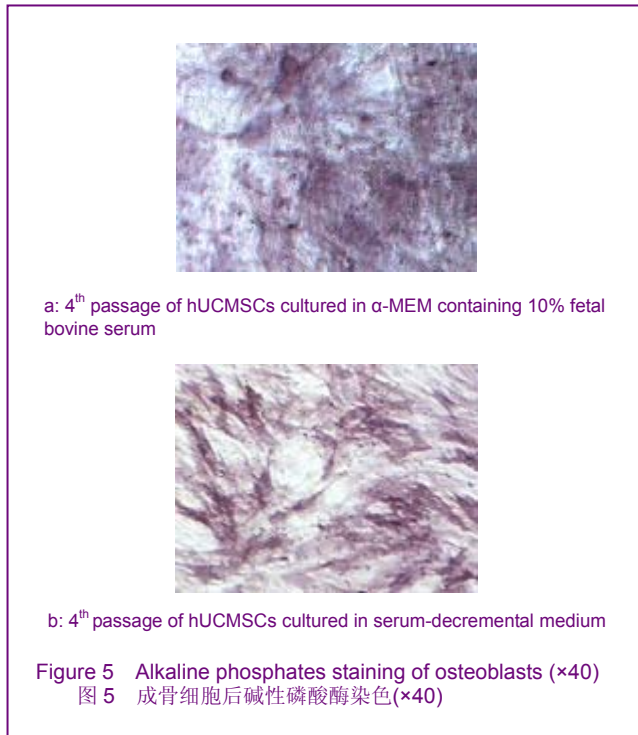
对处于对数增长期的细胞按BD Cycle TESTTM PLUS DNA Reagent Kit操作法进行周期检测, 两种培养方法所获细胞均有90%以上处于G₀/G₁期, 约10%细胞处于增殖的S+G₂+M期, 见图3, 两组间差异无显著性意义($P > 0.05$), 说明实验中经典培养法与血清递减法对细胞周期影响无明显差异。



2.3 hUC-MSCs免疫表型鉴定 两种培养体系所获得的贴壁细胞均表达CD29、CD44和CD106, 不表达造血细胞表型CD34。见图4。



2.4 体外诱导成骨分化 P4代贴壁细胞成骨定向诱导14 d, 未加成骨诱导培养的对照组细胞染色未见黑色矿化物沉积, 而加入成骨诱导培养基的两组细胞间布满黑色颗粒, 颗粒大小不均一, 提示有矿化基质沉积。传统的 α -MEM培养法所获得的细胞(76.4 \pm 4.4)%呈阳性, 血清梯度培养法所获得的细胞(71.1 \pm 2.7)%呈阳性($P > 0.05$)。见图5。



3 讨论

MSCs因其具有多向分化潜能和免疫抑制功能, 现已成为治疗组织损伤及自身免疫性疾病的又一新的选择。目前, 临床用的MSCs主要为骨髓来源, 但骨髓源MSCs具有以下几个缺点: 随着供者年龄增长, 细胞的增殖能力下降, 病毒感染的概率增加, 且骨髓采集对患者造成痛苦, 这极大地限制了其临床应用, 因此寻找新的MSCs来源成为必要。有研究表明, 脐带中MSCs含量远高于骨髓, 且具有更原始、更强的增殖分化能力, 而脐带取材方便, 来源充足, 对供者无伤害, 病原微生物感染概率小, 使其成为一种理想的MSCs来源^[9]。本研究中心采用机械搅碎和胶原酶消化同步法从足月胎儿脐带中分离、扩增MSCs, 为MSCs提供了一个快速有效的新来源。

目前, 体外扩增脐带MSCs, 不论是用于实验研究还是用于临床试验, 通常在基础培养基中添加体积分数10%~20%的胎牛血清, 因胎牛血清中含大量的生长刺激因子、丰富的营养成分、微量元素以及贴壁因子等, 可使细胞增殖、贴壁能力增强。已有研究显示, MSCs在

无血清及缺氧条件下暴露48 h, 99%以上的细胞会死亡, 而仅是缺氧, 48 h后仍有约50%细胞存活, 提示一定体积分数的胎牛血清对维持MSCs的存活具有重要作用^[10]。无血清条件下培养可能降低MSCs纯度^[11]。也有研究发现, 降低血清的体积分数会影响MSCs的分化潜能^[12]。但是, 因胎牛血清中含有异种成分具有免疫原性、可能被病毒污染等, 使其生物安全性受到普遍质疑^[13]。有文献报道, 输注含胎牛血清培养的淋巴细胞后患者发arthus样反应^[14], 心肌内注射含胎牛血清培养的干细胞发生恶性室性心率失常导致患者死亡^[15]。

此外, 胎牛血清还可能影响MSCs的形态、代谢、分化潜能等。有研究认为, 胎牛血清可能影响MSCs向神经干细胞的分化^[16]。临床级间充质干细胞培养需要在保证细胞数量及性能的前提下, 尽可能的减少胎牛血清的用量, 甚至做到无血清培养, 以避免上述潜在的威胁。也有研究者尝试采用异体血浆、自体血清、脐带血清、无血清、血清替代物、血小板裂解物方法^[17-26]。异体或自体血清或血浆可保持MSCs的分化潜能、促进细胞增殖, 然而随着细胞扩增, 需要的血清/血浆量逐渐增大, 而临床治疗需要相对大量的MSCs, 也就意味着需要从供者或患者处获取大量外周血, 这在临床中是受到极大限制的^[27]。无血清或血清替代物的培养都会使细胞增殖能力受到影响, 无法获得能满足临床需要的足够的细胞数。也有研究者在降低血清浓度的同时加入细胞生长因子, 如降低血清浓度至2%, 加入成纤维生长因子2, 发现MSCs可保持与经典培养方法相似的增殖能力及分化潜能^[28]。

实验采用传统的含体积分数10%胎牛血清的 α -MEM培养基进行原代细胞培养, 后选择血清浓度梯度递减, 最终过渡到无血清培养, 并与传统含体积分数10%胎牛血清的培养体系进行脐带MSCs生长增殖的对比实验。实验结果表明, 血清浓度梯度递减, 最终过渡到无血清培养是一种切实可行的间充质干细胞培养方法, 该培养体系也能获得同经典培养方法一样的具有贴壁生长特性、形态似成纤维细胞, 流式细胞仪检测高表达MSCsCD29、CD44、CD106, 不表达CD34的细胞。经过成骨诱导14 d后, 碱性磷酸酶染色均呈阳性, 表明血清梯度递减培养的脐带MSCs也具有多向分化潜能, 能够分化成成骨细胞。但是, 梯度血清递减培养组成骨诱导后的胞外钙基质沉积略低于传统的含体积分数10%胎牛血清的 α -MEM组。经梯度血清培养扩增的脐带MSCs其分化能力在不同方向上有何变化, 还需进一步的实验研究。

实验结果表明, 采用血清梯度递减法在体外扩增脐带MSCs, 其扩增能力、多向分化潜能不受血清用量减少影响, 可为临床提供相对更为安全的间充质干细胞, 值得进一步研究与推广。

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] Kang XQ, Zang WJ, Song TS, et al. Rat bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into hepatocytes in vitro. *World Journal of Gastroenterology*. 2005; 11(22): 3479-3484.
- [3] Sanchez-Ramos JR. Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. *J Neuro Res*. 2002; 69(6): 880-893.
- [4] Chen LB, Jiang XB, Yang L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta cells. *World Journal of Gastroenterology*. 2004; 10(20): 3016-3020.
- [5] Blanc KL, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third partyhaploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. 2004; 363(9419):1439-1441.
- [6] Kassem M, Abdallah BM. Human bone-marrowderived mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential role in therapy of degenerative diseases. *Cell Tissue Res*. 2008; 331(1): 157-163.
- [7] Nakamizo A, Marini F, Amano T, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res*. 2005; 65(8): 3307-3318.
- [8] Zhang XF, Zhang MR, Hu JX, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010; 14(32): 5971-5975. 张学峰, 张美荣, 胡建霞, 等. 异种脐带间充质干细胞静脉应用的安全性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(32): 5971-5975.
- [9] Karahuseyinoglu US, Cinar O, Kilic E, et al. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells*. 2007; 25(2): 319-331.
- [10] Potier E; Ferreira E; Meunier A, et al. Prolonged hypoxia concomitant with serum deprivation induces massive human mesenchymal stem cell death. *Tissue Eng*. 2007; 13(6): 1325-1331.
- [11] Zheng JH, Li YH, Wang LP, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010; 14(14):2497-2502. 郑景辉, 李勇华, 王丽萍等. 不同血清微环境对大鼠骨髓间充质干细胞体外培养的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(14): 2497-2502.
- [12] Yokoyama M; Miwa H; Maeda S, et al. Influence of fetal calf serum on differentiation of mesenchymal stem cells to chondrocytes during expansion. *J Biosci Bioeng*. 2008; 106(1): 46-50.
- [13] Tonti GA, Mannello F. From bone marrow to therapeutic applications: different behaviour and genetic/epigenetic stability during mesenchymal stem cell expansion in autologous and foetal bovine sera? *Int J Dev Biol*. 2008; 52(8):1023-1032.
- [14] Selvaggi TA, Walker RE, Fleisher TA. Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocytes infusions. *Blood*. 1997; 89(3):776-779.
- [15] Chachques JC, Herrerros J, Trainini J et al. Autologous human serum for cell culture avoids the implantation of cardioverter-defibrillator in cellular cardiomyoplasty. *Int J Cardiol*. 2004; 95(suppl 1) :S29-S33.
- [16] Hung CH, Young TH. Differences in the effect on neural stem cells of fetal bovine serum in substrate-coated and soluble form. *Biomaterials*. 2006; 27(35): 5901-5908.
- [17] Orefo RO, Virdi AS, Triffitt JT. Modulation of osteogenesis and adipogenesis by human serum in human bone marrow cultures. *Eur J Cell Biol*. 1997; 74(3): 251-261.
- [18] Yamamoto N, Isobe M, Negishi A, et al. Effects of autologous serum on osteoblastic differentiation in human bone marrow cells. *J Med Dent Sci*. 2003; 50(1): 63-69.
- [19] Stute N, Holtz K, Bubenheim M, et al. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Exp Hematol*. 2004; 32(12): 1212-1225.
- [20] Lin HT, Tarng YW, Chen YC, et al. Using human plasma supplemented medium to cultivated human bone marrow-derived mesenchymal stem cell and evaluation of its multiple-lineage potential. *Transplant Proc*. 2005; 37(10): 4504-4505.
- [21] Kobayashi T, Watanabe H, Yanagawa T, et al. Motility and growth of human bone-marrow mesenchymal stem cells during ex-vivo expansion in autologous serum. *J Bone Joint Surg Br*. 2005; 87(10):1426-1433.
- [22] Gregory CA, Reyes E, Whitney MJ, et al. Enhanced engraftment of mesenchymal stem cells in a cutaneous wound model by culture in allogeneic species-specific serum and administration in fibrin constructs. *Stem Cells*. 2006; 24(10): 2232-2243.
- [23] Blande IS, Bassaneze V, Lavini-Ramos C, et al. Adipose tissue mesenchymal stem cell expansion in animal serum-free medium supplemented with autologous human platelet lysate. *Transfusion*. 2009; 49(12):2680-2685.
- [24] Schallmoser K; Rohde E; Reinisch A, et al. Rapid large-scale expansion of functional mesenchymal stem cells from unmanipulated bone marrow without animal serum. *Tissue Eng Part C Methods*. 2008; 14(3):185-196.
- [25] Kazemnejad S, Allameh A, Gharehbaghian A, et al. Efficient replacing of fetal bovine serum with human platelet releasate during propagation and differentiation of human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells to functional hepatocyte-like cells. *Vox Sang*. 2008; 95(2):149-158.
- [26] Kuang WY, Zhou XF, Zhang GS, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008, 12(21):4044-4048. 旷文勇, 周新伏, 张广森, 等. 脐带血清培养体系扩增人骨髓间充质干细胞及其生物学特征[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(21): 4044-4048.
- [27] Mizuno N, Shiba H, Ozeki Y, et al. Human autologous serum obtained using a completely closed bag system as a substitute for foetal calf serum in human mesenchymal stem cell cultures. *Cell Biol Int*. 2006; 30(6): 521-524.
- [28] Kishimoto S; Hattori H; Nakamura S, et al. Expansion and characterization of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells cultured on fragmin/protamine microparticle-coated matrix with fibroblast growth factor-2 in low serum medium. *Tissue Eng Part C Methods*. 2009; 15(3): 523-527.

来自本文课题的更多信息--

作者贡献: 设计为第三作者, 实施与评估为全部作者, 均经过系统培训, 未使用盲法评估。

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: 根据国务院《医疗机构管理条例》规定, 脐带的采集产妇产知情同意。

本文创新性: 国内外培养间充质干细胞采用的多为含体积分数 10%~20%胎牛血清的 α -MEM 培养体系, 但临床使用的间充质干细胞要求无异种血清存在, 故有研究者尝试采用异体血浆、自体血清、无血清、血清替代物等方法。实验首次尝试采用血清浓度递减方法, 既减少了胎牛血清的不良影响, 又保证了细胞的增殖, 是临床级间充质干细胞培养方法的一种全新的尝试。