

密度梯度离心及贴壁分离筛选相结合分离培养大鼠骨髓间充质干细胞

王英慧, 郑 瑞, 陈 莉(武警后勤学院临床医学系实验技术教研室, 天津市 300162)

文章亮点:

1 高频率的关节使用使关节软骨的损伤和病废成为临床骨科常见现象。由于体内关节软骨的低分化和无血管、神经分布的解剖特点,使其自身修复能力有限,一旦造成损伤和病变很少自愈而形成骨性关节炎导致关节功能病废。如何修复关节软骨和软骨下骨的损伤、促进关节软骨自身修复、重建关节功能成为临床医师和研究人员需要解决的重要问题。

2 实验采用密度梯度离心及贴壁分离筛选相结合的方法对细胞的破坏性更小,且提取时间缩短,明显减少细胞污染的概率。此方法分离到的骨髓间充质干细胞具有较强的扩增能力,并且细胞形态和生物学特性稳定性好。

关键词:

干细胞; 骨髓干细胞; 贴壁分离筛选法; 骨髓间充质干细胞; 生物学特性; SD 大鼠; 细胞形态; 细胞周期; 增殖

主题词:

骨髓; 间质干细胞; 细胞, 培养的; 大鼠, Sprague-Dawley

摘要

背景: 在正常情况下骨髓来源间充质干细胞含量很少,且易与其他细胞相混杂,因此,建立一种简便可行的体外培养扩增方法,获得大量稳定的骨髓间充质干细胞具有重要的理论意义和应用价值。

目的: 建立一种简便可行的体外培养扩增方法,获得大量稳定的骨髓间充质干细胞。

方法: 采用密度梯度离心法及贴壁分离筛选法相结合体外分离培养 SD 大鼠骨髓间充质干细胞。倒置光学显微镜下观察细胞形态变化,透射电镜观察细胞亚微结构,锥虫蓝拒染法计算活细胞数,绘制细胞生长曲线,流式细胞仪分析细胞周期,免疫细胞化学检测 c-kit 和 CD45 的表达,流式细胞仪分析 CD45 的表达情况。

结果与结论: ①接种后 24 h 倒置光学显微镜下可见有细胞贴壁并伸出伪足,4 d 时可见有细胞集落形成,14 d 时细胞可达到 90% 融合。经传代后细胞趋于一致,为纤维样细胞,呈漩涡或火焰状生长。②透射电镜下可见第 3 代骨髓间充质干细胞体积较小核大,核仁明显。染色质分布稀疏,电子密度低。细胞表面有微绒毛,胞质疏松,内有丰富核糖体,而内质网、线粒体、高尔基复合体等细胞器少见,提示细胞处于原始未分化状态。③第 3 代骨髓间充质干细胞接种后第 1 天细胞数量有所减少,第 2 天细胞开始增长,第 3 天细胞进入指数增生期,第 7 天进入平台期,第 9 天细胞数量开始下降,绘制的生长曲线呈“S”形。④第 3 代骨髓间充质干细胞经 DNA 染色后采用流式细胞仪测定其 DNA 含量证明 S 期细胞比率为 21.1%。⑤免疫细胞化学染色和流式细胞术证明 c-kit 阳性细胞比率为 53.3%,CD45 表达阳性率为 1.68%。⑥骨髓间充质干细胞向成骨细胞诱导分化 16 d 后,细胞的胞体呈椭圆形,有短突起彼此相连,胞浆较暗,提示可能富含粗面内质网和高尔基复合体,并具有分泌类骨质的功能。结果证明该方法获得的大鼠骨髓间充质干细胞生长稳定,增殖活跃。

王英慧, 郑瑞, 陈莉. 密度梯度离心及贴壁分离筛选相结合分离培养大鼠骨髓间充质干细胞[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(28):4463-4468.

Isolation and culture of rat bone marrow mesenchymal stem cells using density gradient centrifugation and adherence separation screening

Wang Ying-hui, Zheng Rui, Chen Li (Research Room of Experimental Technology, Department of Clinical Medicine, Logistics University of People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China)

Abstract

BACKGROUND: Bone marrow mesenchymal stem cell content is less under normal conditions, and easily confounded with other cells. Therefore, to establish a simple feasible *in vitro* cultured amplification method and to obtain a large number of stable bone marrow mesenchymal stem cells are of important theoretical significance and application value.

OBJECTIVE: To establish a simple feasible *in vitro* culture and amplification method and to obtain numerous stable bone marrow mesenchymal stem cells.

METHODS: Bone marrow mesenchymal stem cells were isolated from Sprague-Dawley rats and cultured *in vitro* using density gradient centrifugation and adherence separation screening. Cell morphological changes were observed under an inverted light microscope. Submicroscopic structure of cells was observed under a

王英慧, 女, 1974 年生, 河北省丰润县人, 汉族, 2012 年河北医科大学毕业, 硕士, 实验师, 主要从事细胞分化的研究。

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.28.006
[http://www.crter.org]

中图分类号:R394.2
文献标识码:A
文章编号:2095-4344
(2014)28-04463-06
稿件接受:2014-05-30

Wang Ying-hui, Master, Experimentalist, Research Room of Experimental Technology, Department of Clinical Medicine, Logistics University of People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China

Accepted: 2014-05-30

transmission electron microscope. Living cell number was counted using Trypan blue exclusion method. Cell growth curve was drawn. Cell cycle was analyzed using flow cytometry. The expression of c-kit and CD45 was measured using immunocytochemistry. CD45 expression was analyzed using flow cytometry.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Cell adhesion and pseudopodia could be seen under an inverted light microscope at 24 hours after inoculation; cell colony formed at 4 days; 90% cell confluence was found at 14 days. After passage, the cells were tended to homogenous and became fibroblast-like cells, which showed whirl-like growing or flamboyancy growing. (2) The size of passage 3 bone marrow mesenchymal stem cells was small and nucleolus was large, with clear nucleoli under a transmission electron microscope, with the presence of sparse chromatin and low electron density. There was microvillus on the surface of cells, abundant ribosomes could be seen in the cytoplasm with few other cellular organs such as endoplasmic reticulum, mitochondria and Golgi complex. These showed that ultrastructural structure had undifferentiated features. (3) The number of passage 3 bone marrow mesenchymal stem cells was reduced at 1 day after inoculation. The cells began to grow at 2 days, and entered the period of exponential growth at 3 days, entered the flat period at 7 days and the number of cells began to decrease at 9 days. Growth curve exhibited "S" shape. (4) The percentage of S phase cells was 21.1% as detected by flow cytometry after passage 3 bone marrow mesenchymal stem cells were stained by DNA. (5) Immunocytochemistry and flow cytometry had proved that the c-kit positive rate of cells was 53.3% and CD45 positive rate was 1.68%. (6) After osteogenic induction of mesenchymal stem cells for 16 days, cells became oval, and short processes connected each other. The cytoplasm was dark, suggesting that it may be rich in rough endoplasmic reticulum and Golgi complex. They can secrete osteoid. Results verified that obtained bone marrow mesenchymal stem cells stably grew, and actively proliferated.

Subject headings: bone marrow; mesenchymal stem cells; cells, cultured; rats, Sprague-Dawley

Wang YH, Zheng R, Chen L. Isolation and culture of rat bone marrow mesenchymal stem cells using density gradient centrifugation and adherence separation screening. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(28):4463-4468.

0 引言 Introduction

关节软骨是存在于人体各个部分的滑膜关节, 它对于维持关节正常功能必不可少。高频率的关节使用使关节软骨的损伤和病废成为临床骨科常见现象。由于体内关节软骨的低分化和无血管、神经分布的解剖特点, 使其自身修复能力有限, 一旦造成损伤和病变很少自愈而形成骨性关节炎导致关节功能病废。如何修复关节软骨和软骨下骨的损伤、促进关节软骨自身修复、重建关节功能成为临床医师和研究人员需要解决的重要问题。

软骨细胞等作为种子细胞来源有限, 且这类细胞在体外培养过程中极易老化, 失去分泌基质的功能。骨髓间充质干细胞因取材方便, 具有增殖能力强、多向分化能力的特性, 使其作为种子细胞构建组织工程软骨愈来愈受到重视。然而在正常情况下含量很少, 且易与其他细胞相混杂, 因此, 建立一种简便可行的体外培养扩增方法, 获得大量稳定的骨髓间充质干细胞具有重要的理论意义和应用价值。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 细胞学体外观察实验。

时间及地点: 实验于2010年9月至2012年3月在武警后勤学院临床医学系生物及遗传学教研室完成。

材料:

实验动物: 二三周龄SD雄性大鼠10只, SPF级, 体质量50 g, 由军事医学科学院提供, 许可证号(SCX-(军)K2007-004。实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

SD大鼠骨髓间充质干细胞的分离培养及鉴定实验用主要试剂和器材:

试剂和仪器	来源
H-DMEM培养基、胰蛋白酶	GIBCO公司
胎牛血清	BIOIND公司
兔抗大鼠C-kit抗体、兔抗大鼠CD45抗体	Santa Cruz公司
SP试剂盒	北京中山生物技术公司
多孔培养板	GIBCO公司
CO ₂ 孵育箱	美国Napco公司
SW-CZ-ZFO超净工作台	苏州安泰空气技术有限公司
CK-2倒置相差显微镜	日本OLYMPUS公司

实验方法:

骨髓间充质干细胞体外扩增培养: ①选用两三周龄健康SD大鼠, 脱颈致死, 体积分数为75%乙醇全身浸泡消毒5 min。②准备2套已消毒的手术器械, 用第1套器械除去大鼠双下肢腿部的皮肤, 取出双侧股骨和胫骨, 去除骨表面附属组织。③拿入超净台中, 放入体积分数为75%乙醇及庆大霉素-PBS中各清洗10 s, 置于PBS中, 换第2套器械。④在无菌条件下用止血钳将分离出的双下肢夹入培养皿中, 剪刀剪断股骨, 暴露骨髓腔, 用预冷PBS冲洗骨髓腔3-5次, 尤其是股骨头位置着重冲洗至液体为清亮为止。⑤冲洗液移入离心管中静置15 min, 再小心移上清液于另一离心管内, 以1 000 r/min离心8 min, 弃上清液。⑥用适量含体积分数为10%胎牛血清的H-DMEM培养液重悬细胞, 接种于6孔板2孔中, 置37 °C, 体积分数为5%的CO₂培养箱中培养。2 d后更换半量培养液, 4 d后弃去未贴壁悬浮的造血细胞, 全量更换培养液。以后根据细胞生长情况,

每2 d半量更换新鲜培养液, 待细胞铺满培养板底约90%时进行传代。传代时, 先用0.25%胰酶冲洗培养板2次, 以清洗残留的培养液, 然后用0.25%胰酶消化细胞, 镜下观察大部分纤维样细胞变圆, 倒掉胰酶, 加入含体积分数为10%胎牛血清的H-DMEM培养液, 吸管充分吹打培养板底, 吹打时注意不要太用力, 按照1:2比例进行传代, 备用。

倒置相差显微镜观察细胞形态及生长情况: 于接种后不同时间(24, 48, 72 h和3, 5, 7, 14 d以及第2, 3, 4, 5代)分别在倒置相差显微镜下观察细胞的形态变化, 并作摄像记录。

透射电镜观察骨髓间充质干细胞超微结构: 收集第3代骨髓间充质干细胞3瓶, 在冰浴条件下每瓶加入预冷的2.5%戊二醛3 mL, 固定10 min, 用细胞刮将细胞刮下移入离心管, 加PBS 10 mL, 1 000 r/min离心10 min, 弃上清, 再加入1%锇酸固定30 min。倒掉锇酸, 蒸馏水洗3次, 乙醇梯度脱水, 环氧树脂包埋, 超薄切片, 铀铅染色。在透射电镜下观察细胞的超微结构。

细胞生长曲线的绘制: 取生长良好的第3代骨髓间充质干细胞, 用0.25%胰酶消化制备成单细胞悬液, 计数, 调整细胞浓度为 $5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$, 接种于24孔培养板, 每孔接种0.2 mL。每天随机选取3个培养孔, 0.25%胰蛋白酶消化, 用锥虫蓝拒染法, 在显微镜下计算活细胞数, 取均值, 连续计数13 d(直至细胞长满)。以培养时间为横轴, 细胞数为纵轴, 绘制生长曲线。

流式细胞术测定细胞周期: 第3代骨髓间充质干细胞常规消化后, 流式细胞仪分析细胞周期各时相细胞比率。

免疫细胞化学检测c-kit和CD45表达: 将第3代骨髓间充质干细胞调整细胞浓度为 $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$, 接种于加有盖玻片(经APES处理)的6孔培养板内。培养7 d后取出细胞爬片, 用预冷固定液(甲醇:丙酮=1:1)4 °C固定10 min, 室温PBS浸洗2次, 每次5 min。用0.1%含TritonX-100的 H_2O_2 -甲醇溶液室温封闭30 min。蒸馏水冲洗, PBS浸泡5 min。体积分数为10%山羊血清封闭, 室温孵育1 h。分别加入抗c-kit和CD45抗体50 μL , 湿盒4 °C过夜。同时设立阴性对照, 即用PBS代替一抗进行免疫组化染色。PBS室温洗涤3次, 每次5 min。滴加二抗工作液, 37 °C孵育25 min。PBS洗涤3次, 每次5 min。DAB试剂盒显色10 min。经苏木精复染后, 脱水、透明、中性树脂胶封固。

在光学显微镜下观察并计数阳性细胞, 随机选择10个不同视野($\times 200$), 计算阳性细胞率。

流式细胞术检测CD45表达: 第3代骨髓间充质干细胞常规消化后, 用预冷磷酸盐缓冲液洗涤, 收集 1×10^6 个细胞, 制成单细胞悬液。用体积分数为75%预冷乙醇5 mL固定10 min, 4 °C冰箱保存备用。加入CD45抗体一抗4 °C保湿过夜。次日, 取出PBS洗两遍, 加入FITC标记的二抗, 室温避光孵育60 min。PBS洗2遍, 500 μL PBS重悬细胞上机检测。

向成骨细胞诱导分化: 取第3代骨髓间充质干细胞, 调整浓度为 1×10^5 接种于6孔板, 培养基中添加成骨诱导剂(10^{-8} mol/L 地塞米松、10 mmol/L β -甘油磷酸钠及50 mg/L抗坏血酸), 培养16 d时在倒置光学显微镜下观察细胞分化状态。

主要观察指标: ①骨髓间充质干细胞的形态学变化。②骨髓间充质干细胞的生长曲线。③骨髓间充质干细胞的细胞周期。④免疫细胞化学检测c-kit和CD45表达。⑤流式细胞术检测CD45表达。⑥骨髓间充质干细胞向成骨细胞诱导分化情况。

2 结果 Results

2.1 骨髓间充质干细胞分离、培养与形态学变化

2.1.1 倒置相差显微镜下观察细胞形态学变化 原代培养12 h后细胞开始贴壁, 呈圆形或纺锤形, 高倍镜下长期观察有明显的细胞分裂活动。24 h后贴壁细胞可达20%, 见有细胞伪足伸展。48 h换半液后细胞呈三角形或多角型, 形成多个细胞团。4 d后细胞迅速增殖, 细胞数量明显增多, 可见有晕团样细胞集落形成, 在集落内的细胞核大, 核仁清晰, 可见较多的分裂相。第6-8天时集落迅速增多, 呈同心圆或菊花状, 向周围放射性扩展, 逐渐与邻近集落互相融合(图1A, B)。原代培养约2周后可达到90%细胞融合, 基本铺满瓶底面。传代细胞生长较原代快, 4 h内发现有贴壁细胞。24 h内完全贴壁并伸展生长, 5-7 d细胞达90%融合。原代培养细胞, 含有一些非间充质干细胞(成纤维细胞和巨噬细胞), 传代后细胞趋于一致, 呈长梭形或纤维状细胞, 平行且是漩涡样生长, 可用于实验(图1C)。

2.1.2 透射电镜下观察细胞超微结构 细胞体积较小核大, 核形状多样, 以圆形及类圆形为主, 核浆比例大。染色质分布稀疏, 电子密度低。核仁大而明显, 含1个至多个核仁不等, 以两个核仁多见。细胞表面有微绒毛, 胞质疏松, 内有丰富核糖体, 而内质网、线粒体、高尔基复合体等细胞器少见, 提示细胞处于原始未分化状态(图2A)。

2.2 骨髓间充质干细胞生长曲线的绘制 从骨髓间充质干细胞的生长曲线可见, 细胞接种后24 h内细胞数量有所下降, 但接种后48 h细胞开始增长, 72 h细胞进入对数增长期, 7 d后细胞生长进入平台期, 第9天细胞数量开始下降, 整个曲线呈“S”形(图2B)。

2.3 流式细胞术测定细胞周期各时相比率 经碘化丙啶染色后, 流式细胞术测定DNA含量可见S期细胞比率为22.1%, G_1 期细胞比率为63.5%, G_2+M 期细胞比率为14.4%, 说明进入细胞周期运转并持续增殖的细胞占全部细胞的35%以上(图2C)。

2.4 免疫细胞化学染色c-kit基因阳性细胞比率 体积较大的多角形细胞为c-kit阳性, 体积较小的成纤维样细胞为阴性细胞, 阳性颗粒主要分布在细胞膜和细胞质, 细胞核未见表达, 阳性细胞比率为55.3%(图3A)。

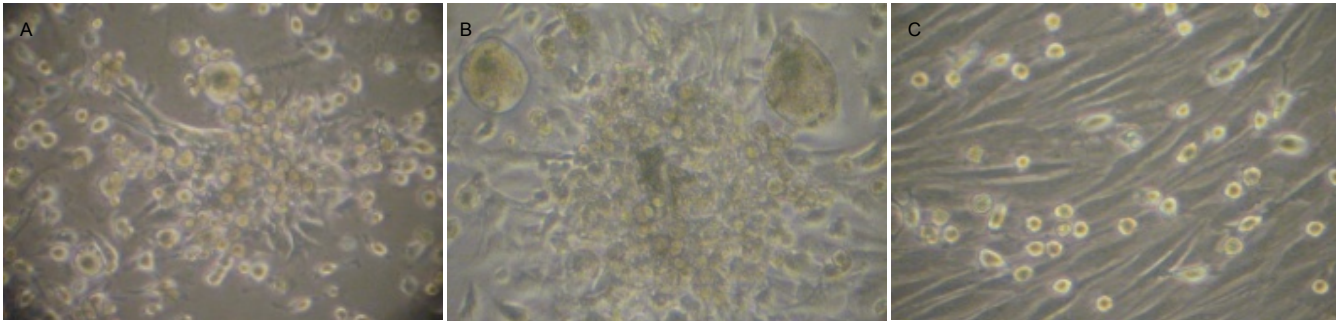


图 1 倒置显微镜下观察骨髓间充质干细胞形态学变化

Figure 1 Morphological changes of bone marrow mesenchymal stem cells under an inverted microscope

图注: 图中 A 为原代培养第 7 天, 细胞集落形成(×40); B 为原代培养第 7 天, 细胞集落形成, 呈菊花状(×100); C 为第 3 代细胞生长趋于一致, 呈长梭形成纤维状(×200)。

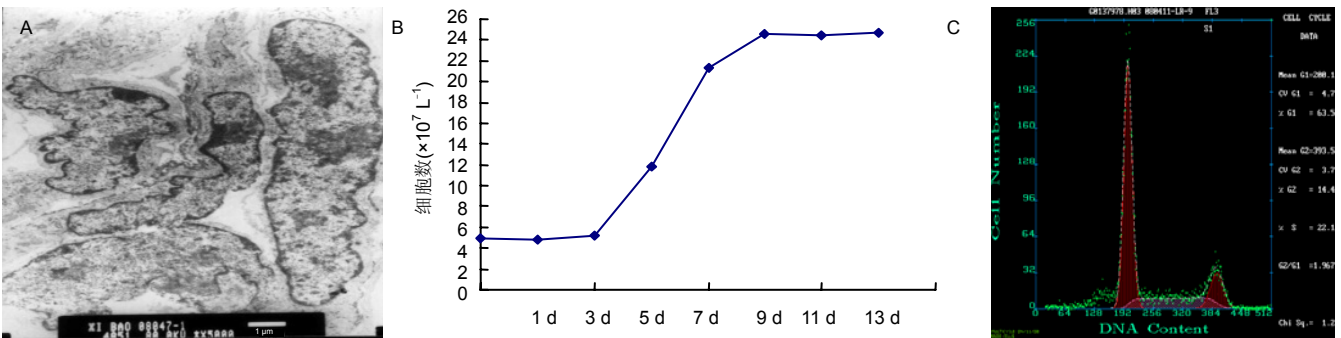


图 2 骨髓间充质干细胞的超微结构、生长曲线和细胞周期

Figure 2 Ultrastructure, growth curve and cell cycle of bone marrow mesenchymal stem cells

图注: 图中 A 为透射电镜下可见细胞体积较小核大, 染色质分布稀疏, 细胞表面有微绒毛, 胞质稀松, 内有丰富核糖体; B 为第 3 代骨髓间充质干细胞生长曲线呈“S”形: 接种后 72 h 细胞进入对数增长期, 7 d 后细胞生长进入平台期, 第 9 天细胞数量开始下降; C 为流式细胞术测定 S 期细胞比率为 22.1%, G₁期细胞比率为 63.5%, G₂+M 期细胞比率为 14.4%, 说明进入细胞周期运转并持续增殖的细胞占全部细胞的 35%以上。

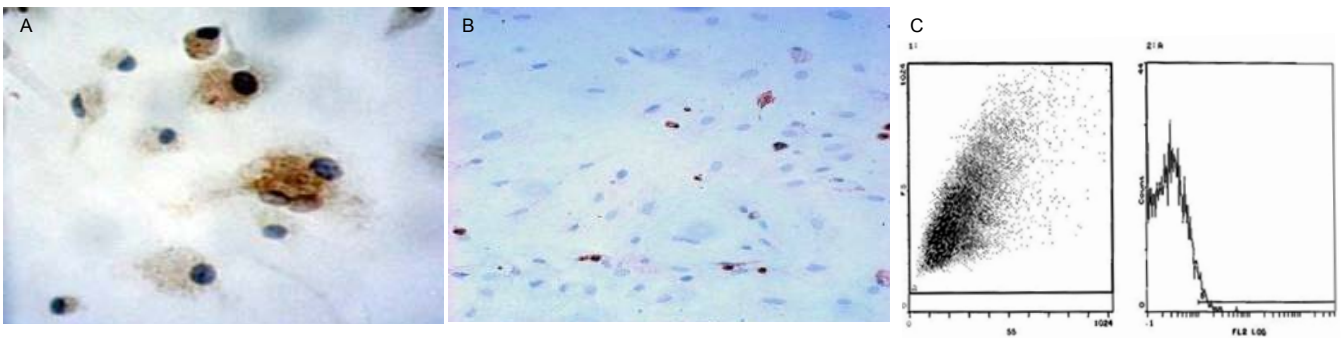


图 3 免疫细胞化学染色检测 c-kit 基因和 CD45 的表达以及流式细胞术检测 CD45 表达阳性率

Figure 3 Immunocytochemistry for detecting c-kit gene and CD45 expression and flow cytometry for measuring positive rate of CD45 expression

图注: 图中 A 为免疫细胞化学染色 c-kit 基因阳性表达率为 55.3%(×200); B 为经免疫细胞化学染色可见 CD45 抗体阳性细胞比率很少(×200); C 为经流式细胞术检测证明这一造血功能标记分子 CD45 表达比率仅为 1.68%。

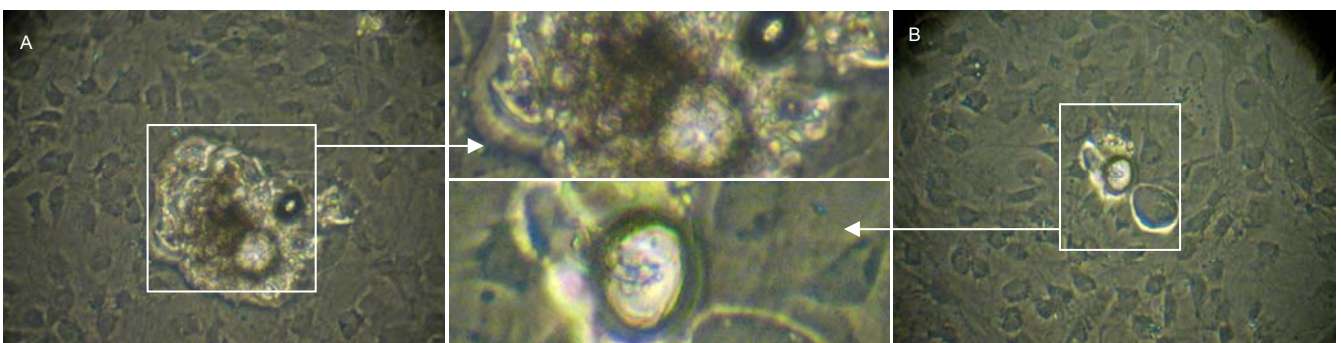


图 4 骨髓间充质干细胞向成骨细胞诱导分化情况

Figure 4 Induction and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into osteoblasts

图注: 图中 A 为向成骨细胞诱导分化 16 d, 形成钙化结节(×200); B 为向成骨细胞诱导分化 16 d, 细胞呈椭圆形, 胞浆较暗(×100)。

2.5 免疫细胞化学染色和流式细胞术检测CD45表达阳性率 经免疫细胞化学染色可见CD45抗体阳性细胞比率很少, 经流式细胞术检测证明这一造血功能标记分子CD45表达比率仅为1.68%(**图3B, C**)。

2.6 骨髓间充质干细胞诱导分化为成骨细胞 诱导16 d, 细胞的胞体呈椭圆形, 有短突起彼此相连, 胞浆较暗, 提示可能富含粗面内质网和高尔基复合体, 并具有分泌类骨质的功能。**图4**显示细胞分泌类骨质后有钙盐沉积形成的钙化结节。

3 讨论 Discussion

组织工程学是集生物学、工程学、材料学及外科为一体的新兴学科^[1]。其核心技术是利用少量的组织学细胞经过体外培养、扩增后附着在一定的支架材料上移植到体内形成新的有生命力的组织。组织工程包括三大要素: 种子细胞、支架材料、细胞因子。

软骨组织工程中的种子细胞的来源主要有2个: 软骨细胞和具有成软骨细胞能力的细胞。软骨细胞包括自体软骨细胞及异体软骨细胞。自体软骨细胞供体来源不足, 异体软骨细胞存在免疫排斥及疾病传播问题, 导致术后效果不是很理想^[2-3]。胚胎干细胞至今尚未能解决异体移植免疫排斥反应问题和产生畸胎瘤的潜在危险^[4]。另外, 提取胚胎干细胞就意味着扼杀一个新生命, 所以, 胚胎干细胞的提取和使用, 存在着法律、道德和伦理文化的制约。因此软骨细胞和胚胎干细胞都无法成为理想的种子细胞来源。于是, 人们开始把目光转向间充质干细胞。骨髓间充质干细胞因取材方便, 具有增殖能力强、多向分化能力的特性, 使其在研究构建组织工程软骨时, 作为种子细胞愈来愈受到重视^[5-6]。然而在骨髓中间充质干细胞的数量非常少, 约占整个有核细胞的十万分之一, 难以满足组织工程和细胞治疗的需要^[7], 且易与其他细胞相混杂, 因此, 建立一种简便可行的体外培养扩增方法, 获得大量稳定的骨髓间充质干细胞具有重要的理论意义和应用价值。

目前用于分离骨髓间充质干细胞的方法主要有4种: 贴壁分离筛选法、密度梯度离心法、流式细胞仪法、免疫磁珠法以及细胞筛选法^[8]。

贴壁分离筛选法也称为全骨髓贴壁培养法。其原理是根据间充质干细胞贴壁生长, 而造血系细胞悬浮生长的特性, 定期换液除去不贴壁细胞, 如造血系细胞、内皮细胞等, 达到分离纯化干细胞的目的。全骨髓培养法保留了部分造血干细胞和其他杂细胞, 能够使得骨髓间充质干细胞在更接近体内的原始环境下生长, 有利于骨髓间充质干细胞的增殖, 在分离细胞的过程中残留的血小板和巨核细胞产生的细胞因子能促进骨髓间充质干细胞集落的形成。并且此种方法操作简易, 细胞丢失损伤少, 分离得到的细胞分化潜能较好。

密度梯度离心法采用密度梯度离心结合贴壁生长来分离骨髓间充质干细胞。虽然该法可以获得纯度较高的原代骨髓间充质干细胞, 但离心会导致大量细胞丢失, 同时高强度的离心力对细胞活性有影响。同时, Lisignoli等指出使用密度梯度离心法易使骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化, 而降低了向其他方向分化的能力。

免疫磁珠法能获得高纯度间充质干细胞, 但由于至今尚未发现间充质干细胞特有的标记分子, 并且经过流式细胞仪进行细胞分选对细胞损伤大。这些方法仍在探索研究^[9-10]。

综合以上种种方法, 本实验采用贴壁分离筛选法体外分离培养骨髓间充质干细胞, 经流式细胞仪及免疫细胞化学染色检测细胞表面分子表达显示分离效果良好。结果表明运用贴壁分离筛选法操作简易, 造成污染的环节和机会较少, 可以更好的保持细胞的活性状态。接种培养后12 h可观察到部分细胞贴壁, 48 h见20%细胞有伪足伸展, 以后贴壁细胞逐渐增多, 且细胞逐渐增大, 呈团簇性生长倾向, 至12-17 d时培养瓶中的细胞铺满瓶底。造血细胞不断坏死破碎, 因其不贴壁而随换液不断清除。细胞传代后, 增殖速度快, 每7 d传代1次, 随着传代次数增加, 细胞形态趋于一致, 成纺锤形和纤维形。集落形成数量随传代次数增加而减少。研究表明, 在生长过程中间充质干细胞经历潜伏期、对数增殖期和平台期, 生长曲线呈S形, 符合正常细胞的生长特性, 且倍增时间短。传代后间充质干细胞贴壁时间缩短, 增殖速度加快, 接种后5 h就有80%以上细胞贴壁, 每传代1次细胞数可增加2倍左右。表明该分离培养获得的骨髓间充质干细胞在体外有较强的扩增能力。通过透射电镜观察这些细胞体积较小核大, 核质比较高, 细胞器不很发达符合早期未分化细胞形态学特征。

培养第3代细胞, 用细胞计数的方法对其进行了生长曲线的测定, 细胞接种后1-3 d为细胞增殖潜伏期, 第4天为指数增生期, 第7天进入平台期, 经流式细胞术检测S期细胞比率为22.1%, 说明细胞增殖较为活跃。在不同类型的细胞表面均有不同蛋白表达, 这是用来鉴定各种不同类型细胞的方法。在间充质干细胞膜上就有数十种细胞表面分子的表达, 这将有助于对细胞进行鉴定。

本实验结果显示, C-kit抗体阳性细胞达55.3%, 其阳性颗粒主要分布于体积较大的多角形骨髓间充质干细胞的细胞膜和细胞质中, 而体积较小的细胞没有表达。C-kit为干细胞因子受体, 属III型酪氨酸激酶家族成员, 主要表达于肥大细胞、黑色素细胞、造血干细胞、肠间质细胞、生殖细胞和胚胎的脑和脊髓细胞等并对这些谱系的细胞发育和分化起关键作用^[11-13]。C-kit与其配体干细胞因子结合而参与多种细胞发育、分化和细胞凋亡等过程。

CD45属造血干细胞表面抗原, 本研究结果显示免疫细胞化学染色与流式细胞术均缺乏这一标记分子的表达, 说明分离的细胞是非造血干细胞。虽然至今并没有发现间充

质干细胞独有的标志分子,以便能够对其进行准确的鉴定,但这些表面分子对细胞所产生的效应和细胞分化的信号相互作用提供了线索。

间充质干细胞经成骨细胞诱导16 d, 细胞的胞体呈椭圆形,有短突起彼此相连,胞浆较暗,提示可能富含粗面内质网和高尔基复合体,并具有分泌类骨质的功能。更加有力地证明了本研究所提取的细胞是具有分化潜能的间充质干细胞。

小结: 在实验中要获得活性好、形态均一的间充质干细胞,以下细节问题值得注意:①间充质干细胞主要存在于干骺端,所以剪切股骨时尽量多留些,冲洗时多冲洗数次。②在前48 h时不要过多移动培养板,这时贴壁不牢,过多移动培养板易使贴壁细胞漂起。③ 1×10^8 是较适宜的种植密度。高密度接种细胞生长缓慢。通常解释骨髓间充质干细胞之间存在接触抑制,但是否由于在培养过程中细胞分泌某种物质导致这一现象,尚值得探索。密度太低,培养时要获取大量细胞的时间会很长,所以调整细胞接种密度,在短时间内获得大量细胞尤为重要。④严格无菌操作。

总之,贴壁分离筛选法是一种有效分离培养骨髓间充质干细胞的好方法:其操作简易,分离到的骨髓间充质干细胞具有较强的扩增能力,并且细胞形态和生物学特性稳定性好。

作者贡献: 实验设计为陈莉,实验实施为王英慧,实验评估为陈莉,资料收集为郑瑞。王英慧成文,陈莉审校,王英慧对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 超微结构-又称亚显微结构。指在普通光学显微镜下观察不能分辨清楚,但在电子显微镜下能观测到的细胞内各种微细结构(普通光学显微镜的分辨力极限约为 $0.2 \mu\text{m}$,细胞膜、内质网膜和核膜的厚度,核糖体、微体、微管和微丝的直径等均小于 $0.2 \mu\text{m}$)。

作者声明: 文章为原创作品,无抄袭剽窃,无泄密及署名和专利争议,内容及数据真实,文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Busb WD, Jamali A, Chu C, et al. Fresh osteochondral allografting of the patellofemoral joint. American Academy of Orthopaedic Surgeons 68th Annual Meeting (AAOS). 2001: 177.
- [2] Grande DA, Breitbart AS, Mason J, et al. Cartilage tissue engineering: current limitations and solutions. Clin Orthop Relat Res. 1999;(367 Suppl):S176-185.
- [3] Aubin PP, Cheah HK, Davis AM, et al. Long-term followup of fresh femoral osteochondral allografts for posttraumatic knee defects. Clin Orthop Relat Res. 2001;(391 Suppl):S318-327.
- [4] Matsumoto T, Okabe T, Ikawa T, et al. Articular cartilage repair with autologous bone marrow mesenchymal cells. J Cell Physiol. 2010;225(2):291-295.
- [5] Khan WS, Johnson DS, Hardingham TE. The potential of stem cells in the treatment of knee cartilage defects. Knee. 2010; 17(6):369-374.
- [6] Bruder SP, Jaiswal N, Ricalton NS, et al. Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. Clin Orthop Relat Res. 1998;(355 Suppl):S247-256.
- [7] Nuttall ME, Patton AJ, Olivera DL, et al. Human trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype: implications for osteopenic disorders. J Bone Miner Res. 1998;13(3):371-382.
- [8] Zohar R, Sodek J, McCulloch CA. Characterization of stromal progenitor cells enriched by flow cytometry. Blood. 1997;90(9): 3471-3481.
- [9] Fortier LA, Nixon AJ, Williams J, et al. Isolation and chondrocytic differentiation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Am J Vet Res. 1998;59(9): 1182-1187.
- [10] Ghilzon R, McCulloch CA, Zohar R. Stromal mesenchymal progenitor cells. Leuk Lymphoma. 1999;32(3-4):211-221.
- [11] Lin SC, Liu CL, Wang TI, et al. Clinical implications of C-kit gene mutation in patients with large gastrointestinal stromal tumors. J Gastroenterol Hepatol. 2006;21(10):1604-1608.
- [12] Turin L, Acocella F, Stefanello D, et al. Expression of c-kit proto-oncogene in canine mastocytoma: a kinetic study using real-time polymerase chain reaction. J Vet Diagn Invest. 2006; 18(4):343-349.
- [13] Kimura K, Song CH, Rastogi A, et al. Interleukin-3 and c-Kit/stem cell factor are required for normal eosinophil responses in mice infected with Strongyloides venezuelensis. Lab Invest. 2006;86(10):987-996.