

## 人脐带间充质干细胞分离扩增方法的优化

杨 卿, 杨 扬, 刘剑戎, 潘国政, 张英才, 陈规划, 张 琪\*

(中山大学附属第三医院肝移植中心//广东省肝脏疾病研究重点实验室, 广东 广州 510630)

**摘要:**【目的】探讨一种高效稳定分离和扩增人脐带间充质干细胞(hUC-MSC)的方法。【方法】取脐带 20 条, 获得 Wharton's Jelly 组织, 分别用酶联合消化法(12 例)和酶序贯消化法(8 例)来分离、提取 hUC-MSC, 比较两种方法分离 hUC-MSC 的成功率、原代培养时间及获得的细胞数量; 利用低糖 DMEM(LG-DMEM)完全培养基和 LD-Mesen 培养基(MesenPro RSTM 与 LG-DMEM 的混合培养基)分别培养 hUC-MSC, 比较两种培养体系的扩增效率。对所获取细胞的免疫表型以流式细胞术进行鉴定, 并诱导成脂、成骨分化验证其多向分化潜能。【结果】酶联合消化法和酶序贯消化法成功率分别为 100%(12/12)和 12.5%(1/8), 两者相比有显著统计学差异( $P = 1.03 \times 10^{-4}$ ), 前者原代培养平均时间为  $(14.17 \pm 1.14)$ d, 获得细胞  $(1.30 \pm 0.14) \times 10^6$  个。  $2 \times 10^5$  个 hUC-MSC 用 LD-Mesen 和 LG-DMEM 两种体系培养 12 d 后, 扩增所得的细胞数分别为  $(14.86 \pm 0.08) \times 10^6$  和  $(5.08 \pm 0.08) \times 10^6$ , 两者有显著统计学差异 ( $P = 1.38 \times 10^{-8}$ )。hUC-MSC 高表达 CD73、CD105、CD90、CD29、CD44, 不表达 CD31、CD34、CD45、HLA-DR; 并可向成骨细胞及脂肪细胞诱导分化。【结论】酶联合消化 Wharton's Jelly 组织并以 LD-Mesen 体系进行扩增可高效获取 hUC-MSC, 效率明显优于传统方法。

**关键词:** 间充质干细胞; 脐带; 细胞分离

中图分类号: R318.14 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2011)06-0818-06

### Optimized Isolation of Human Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord

YANG Qing, YANG Yang, LIU Jian-rong, PAN Guo-zheng, ZHANG Ying-cai, CHEN Gui-hui, ZHANG Qi\*

(Department of Liver Transplantation, Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

**Abstract:** 【Objective】To optimize the isolation and expansion protocol of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUC-MSC). 【Methods】Human UC-MSC were isolated from 20 umbilical cords by combined enzyme digestion ( $n = 12$ ) or by sequential enzyme digestion ( $n = 8$ ). The derivation efficiency, primary cell culture period as well as cell yield were compared. The hUC-MSC proliferation capacity was compared between complete low glucose-Dulbecco's modified eagle medium (LG-DMEM) condition and LD-Mesen medium (a medium mixed with MesenPro RSTM (Invitrogen) and LG-DMEM) condition. The phenotypic characteristics of hUC-MSC were determined by FACS and multi-lineage differentiation capacity was confirmed by induced adipogenesis and osteogenesis. 【Results】The hUC-MSC derivation efficiency using combined enzymatic digestion was 100% (12/12), significantly higher than that of sequential enzymatic digestion [12.5%(1/8),  $P = 1.03 \times 10^{-4}$ ]. With combined enzymatic digestion,  $(1.30 \pm 0.14) \times 10^6$  cells can be obtained during a mean primary cell culture period of  $(14.17 \pm 1.14)$  d. Moreover,  $2 \times 10^5$  hUC-MSC were cultured for 12 days, more cells can be obtained using LD-Mesen culture medium than using LG-DMEM culture medium [ $(14.86 \pm 0.08) \times 10^6$  vs  $(5.08 \pm 0.08) \times 10^6$ ,  $P = 1.38 \times 10^{-8}$ ]. hUC-MSC express CD73, CD105, CD90, CD29, and CD44 surface markers, but do not express CD31, CD34, CD45 and HLA-DR. They can be also differentiated into osteoblasts and adipocytes in vitro. 【Conclusion】hUC-MSC can be efficiently derived by combined enzymatic digestion from Wharton's Jelly and expanded by LD-Mesen expansion system, which is significantly superior to the conventional protocol.

**Key words:** mesenchymal stem cells; umbilical cord; isolation

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(6):818-823]

收稿日期: 2011-04-25

基金项目: 中山大学青年老师培养项目, 教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-08-0583); 广东省科技计划项目(2009A03020006, 2010B05700003); 广州市科技计划支持项目(2010J-E121)

作者简介: 杨卿, 硕士, 研究方向: 肝胆外科; \* 通信作者: 张琪, 副研究员, 硕士生导师, E-mail: keekee77@126.com

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)是最早于骨髓中发现的一类非造血干细胞,有着广阔的临床应用前景。除骨髓外, MSC 亦可从脂肪<sup>[1]</sup>、脐带血<sup>[2]</sup>、胎盘<sup>[3]</sup>和脐带<sup>[4]</sup>等组织中分离获取。脐带为分娩废弃物, MSC 含量丰富, 无需有创穿刺, 较骨髓来源的 MSC 扩增能力更强<sup>[5-8]</sup>, 成为近来 MSC 研究的重要来源之一。目前分离人脐带间充质干细胞 (human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSC) 的方法主要有植块法<sup>[9-11]</sup>和酶消化法, 后者又进一步可分为脐带静脉内膜消化法<sup>[12]</sup>和酶序贯消化 Wharton's Jelly 组织法<sup>[13]</sup>; 扩增体系多采用添加细胞因子的低糖 DMEM (Low glucose-Dulbecco's modified eagle medium, LG-DMEM) 完全培养基。酶消化 Wharton's Jelly 组织分离 hUC-MSC 有一定优势, 但所采用消化酶的种类及消化的步骤却有多种<sup>[10,13-14]</sup>, 利用传统的酶序贯消化法来提取 hUC-MSC 各家报道不一, 存在矛盾和争议<sup>[10,13]</sup>, 且传统的分离扩增方法存在原代培养需时长、成功率低、增殖速度慢、细胞易老化等缺点, 效率相对较低, 因此本研究拟探究一种更为高效的分离扩增体系, 以利于将来 hUC-MSC 细胞库平台的建立。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

脐带均来自我院产科足月妊娠的健康剖宫产产妇(2010年12月至2011年4月)。经产妇知情同意, 术前签署同意书, 自愿将胎盘、脐带等分娩废弃物交由医院处理或供科研所用。产妇产前须做艾滋病病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、梅毒螺旋体、支原体等病原体检测, 全部合格确保安全后方可采集脐带标本。

### 1.2 hUC-MSC 的分离和培养

1.2.1 酶联合消化 Wharton's Jelly 组织法分离培养 hUC-MSC 脐带(取材12条)采集后, 用含双抗 PBS 缓冲液浸泡, 置4℃保存, 4 h 内处理。清洗血渍, 将脐带剪成约5 cm 一段, 剔除血管。将脐带剪碎成约10 mm<sup>3</sup> 的小块, 加入 I 型胶原酶 (Invitrogen, 1 g/L) 和透明质酸酶 (Sigma, 1 g/L), 置于恒温振荡器 37℃消化4~5 h。消化液过100目滤网, 离心后用 LG-DMEM 完全培养基重悬, 接种于 T25 细胞培养瓶并置培养箱培养(37℃, 体

积分数为5%的CO<sub>2</sub>)。每3 d 全量换液, 第2次换液后开始使用 LG-DMEM 完全培养基和 MesenPro RSTM 减血清培养基 (Invitrogen) 按 1:1 比例混合的培养基(下文简称 LD-Mesen 混合培养基), 以后培养扩增过程均使用该混合培养基。原代细胞培养至 12~16 d 后, 胰蛋白酶消化后传代, P1 后各代细胞, 达 90% 以上融合时传代。

1.2.2 酶序贯消化 Wharton's Jelly 组织法 脐带(取材8条)处理基本步骤同上, 在用 I 型胶原酶和透明质酸酶消化后, 消化液中再加入终浓度为 2.5 g/L 含乙二胺四乙酸的胰蛋白酶 (Trypsin-EDTA) 37℃孵育 30 min, 离心过滤<sup>[13]</sup>, 余操作同酶联合消化法。

1.2.3 不同扩增体系下细胞增殖能力比较 取对数生长期 hUC-MSC 2 × 10<sup>5</sup> 个, 接种于 6 孔板的一孔, LD-Mesen 混合培养基培养 (LG-DMEM 完全培养基作为对照), 72 h 后消化离心, 细胞计数。取其中 2 × 10<sup>5</sup> 个细胞再次接种于 6 孔板, 进行传代培养。以后每 72 h, 进行上述同样操作, 最终以培养时间为横坐标, 计算培养不同代数所获得的细胞总数, 并绘制细胞增殖曲线。两种培养体系分别重复 3 次实验, 比较不同培养体系细胞扩增效率。

1.2.4 hUC-MSC 免疫表型鉴定 取 P3 至 P5 代 hUC-MSC, 消化洗涤后 PBS 重悬, 至 FACS 专用管, 每管 1 × 10<sup>6</sup> 个细胞, 100 μL, 加入适量抗体, 室温下避光孵育 20 min。洗涤后, 流式细胞仪 (Calibur BD) 检测, Cell Quest 软件分析。使用的流式抗体有: CD44-FITC、CD73-PE、CD166-PE (BD Pharmingen), CD34-FITC、HLA-DR-FITC (BD Bioscience), CD13-FITC、CD29-FITC、CD31-FITC、CD90-FITC、CD105-PE (eBioscience), CD45-FITC (Biolegend)。

1.2.5 hUC-MSC 多向分化潜能鉴定 取 P3 至 P5 代 hUC-MSC, LD-Mesen 混合培养基重悬后接种于 24 孔板。设置实验组和对照组, 每组 3 复孔, 实验组加入商品化的间充质干细胞成脂、成骨诱导液 (Mesenchymal Adipogenesis Kit & Mesenchymal Stem Cell Osteogenesis Kit, Chemicon, Millipore), 对照组加扩增培养基。待细胞达到 100% 融合时, 更换成脂及成骨诱导分化培养基, 诱导后行油红 O、茜素红染色鉴定。

### 1.3 统计学方法

所有数据采用 SPSS17.0 软件进行统计学分

析。定量资料以  $(\bar{x} \pm s)$  表示, 采用独立样本  $t$  检验, 定性资料采用独立样本卡方检验(Fisher 精确概率法), 检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结 果

### 2.1 酶联合消化法与酶序贯消化法获得 hUC-MSC 的比较

利用酶联合消化法分离脐带 12 条, 均成功

传代培养, 原代获得细胞数量  $(1.30 \pm 0.14) \times 10^6$  个(表 1)。原代培养至第 12 ~ 16  $(14.17 \pm 1.14)$  d, T25 培养瓶内可达到 70% ~ 95% 生长面积, 集落生长的细胞局部融合, 呈漩涡状生长, 2 次传代以后, 呈形态较为均一的梭形成纤维细胞(图 1)。采用酶序贯消化法成功率低下  $(1/8, P = 1.03 \times 10^{-4})$ , 原代培养时间较长, 获得细胞数量较少(表 1, 因仅成功一次, 数据未进行统计学比较)。

表 1 不同分离方法获得 hUC-MSC 效率的比较

Table 1 Derivation efficiency comparison of hUC-MSC by different methods

Derivation method	Established cell line	Mean time of primary culture (d)	Cell amount of primary cell ( $\times 10^6$ )
Combined enzymatic digestion	12/12	$14.17 \pm 1.14$	$1.30 \pm 0.14$
Sequential enzymatic digestion	1/8	18	0.85

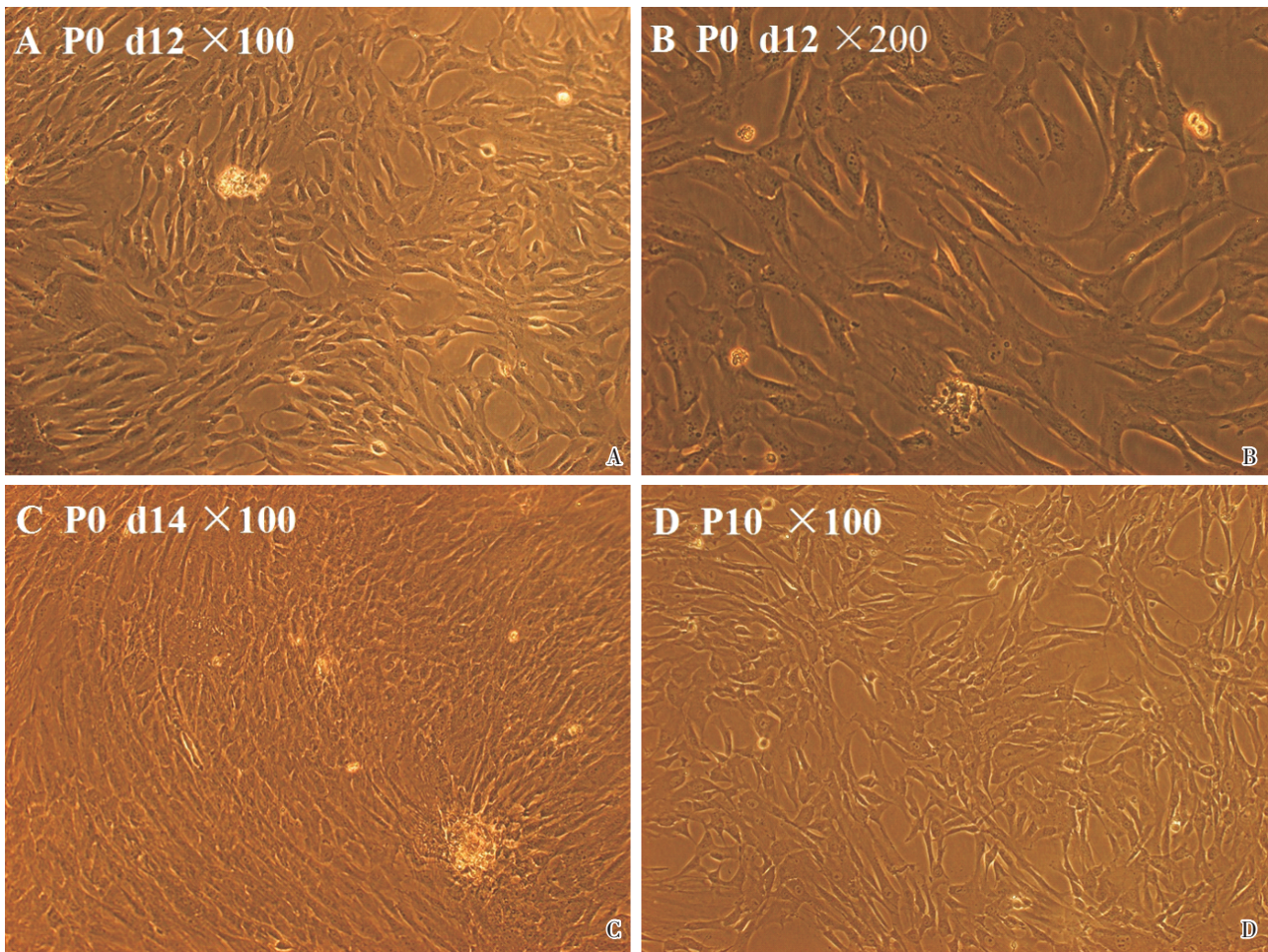


图 1 人脐带间充质干细胞光镜下观察

Fig.1 Morphology of hUC-MSC under light microscope

A: Primary non-confluent cells on day 12 after derivation ( $\times 200$ ); B: Primary fibroblast-like and polygonal cells under high power ( $\times 200$ ); C: Cell confluency observed on day 14 after derivation ( $\times 100$ ); D: Morphology of hUC-MSCs cultured at passage 10 in vitro ( $\times 100$ ).

## 2.2 LD-Mesen 和 LG-DMEM 培养体系扩增效率的比较

取 P3 代细胞  $2 \times 10^5$ , 每 72 h 传代扩增, 传至 P7 代, 记录数据后绘制增殖曲线图(图 2)。连续传

代过程中, 相同时间细胞增殖逐渐变慢(图 2A), LD-Mesen 和 LG-DMEM 培养体系分别获得细胞  $(14.86 \pm 0.08) \times 10^6$  和  $(5.08 \pm 0.08) \times 10^6$  个, 有显著统计学差异( $dP = 1.38 \times 10^{-8}$ , 图 2B)。

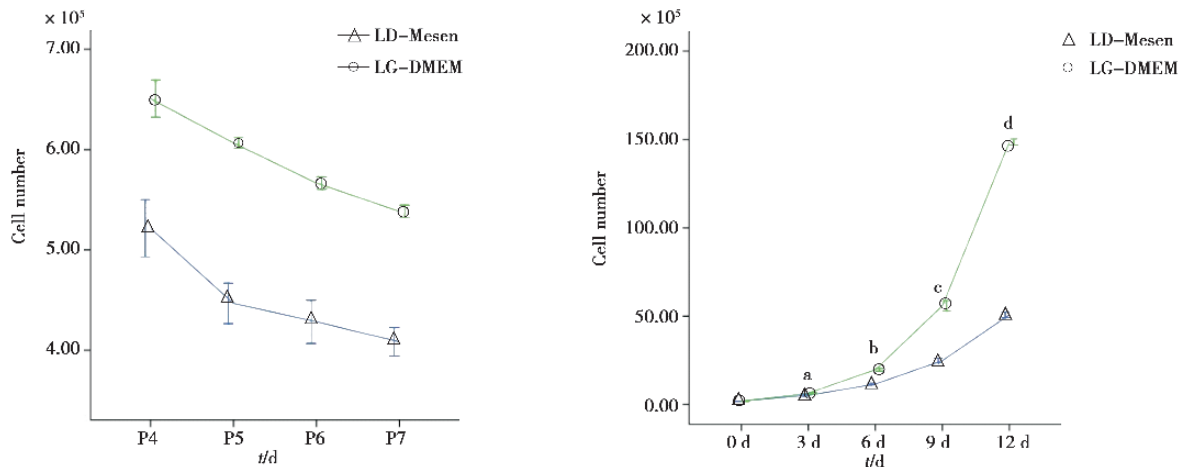


图 2 不同培养体系下细胞的增殖

Fig.2 Cell proliferation under two different culture media

A: Multiple passages leads to significant decreased rates of hUC-MSCs; B: More efficient cell expansion was observed under LD-Mesen culture condition compared with LG-DMEM culture conditions. ( $^aP = 0.003$ ,  $^bP = 9.23 \times 10^{-6}$ ,  $^cP = 4.99 \times 10^{-6}$ ,  $^dP = 1.38 \times 10^{-8}$ ).

## 2.3 人脐带间充质干细胞免疫表型

取第 P5 代细胞检测其免疫表型(图 3)。该方法从脐带分离扩增得到的成纤维样细胞, 高表达间质细胞标记 CD73(SH3)、CD105(SH2)及干细胞标记物 CD90, 同时表达粘附分子受体标记物 CD29、CD44, 不表达内皮细胞标记物 CD31 和造血干细胞标志 CD34、CD45, 也不表达 HLA-DR, 与相关文献报道相符<sup>[12,15]</sup>, 证实采用该方法可成功获得高纯度 hUC-MSC。

## 2.4 人脐带间充质干细胞体外诱导分化

分别经过 17 和 21 d 的诱导, 显微镜下观察, 实验组部分 hUC-MSC 成功诱导为成骨细胞及脂肪细胞, 茜素红染色可见细胞浆中有大量的钙质沉积(图 4A); 脂肪细胞胞浆内脂滴被油红 O 染色(图 4B)。

## 3 讨论

酶消化 Wharton's Jelly 组织, 是分离 hUC-MSC 的一次技术革新。传统的植块法方法简单, 但细胞从组织块中爬出需时较长, 传代后纯化时间长; 脐

静脉内膜消化法, 获取的原代细胞混杂大量静脉内皮细胞, MSC 生长受到干扰。而酶消化 Wharton's Jelly 组织, 剔除了动静脉, 排除内皮细胞干扰, 用酶短时间内将 hUC-MSC 从组织块内解离出来, 大大缩短原代培养时间。

胰蛋白酶消化对原代细胞的粘附能力损伤极大, 导致细胞不贴壁, 可能是酶序贯消化法失败的原因所在。我们发现, 采用 Seshareddy 等<sup>[13]</sup>酶序贯消化 Wharton's Jelly 组织的方法, 成功率低下, 与 Xu 等<sup>[10]</sup>报道的采用同样方法分离 4 根脐带均未成功的情况类似, 而摒弃胰蛋白酶序贯消化后, 成功率可提高至 100%。

添加透明质酸酶进行联合消化, 很大程度上降低了消化后细胞组织悬液的粘稠度, 离心后的细胞得率更高。原代细胞分离后 3 d 观察, 贴壁细胞数量可观。Xu 等<sup>[10]</sup>报道的植块法和静脉消化法原代培养时间分别为  $(18 \pm 3)$  d 和  $(27 \pm 5)$  d, Tong 等<sup>[14]</sup>报道的植块法和酶-机械分离法成功率和原代培养时间分别为 25% (1/4)、20 d 和 71.4% (5/7)、15 ~ 23 d。而我们的方法集上述 3 方面优点, 将原代培养时间缩短至平均  $(14.17 \pm 1.14)$  d。

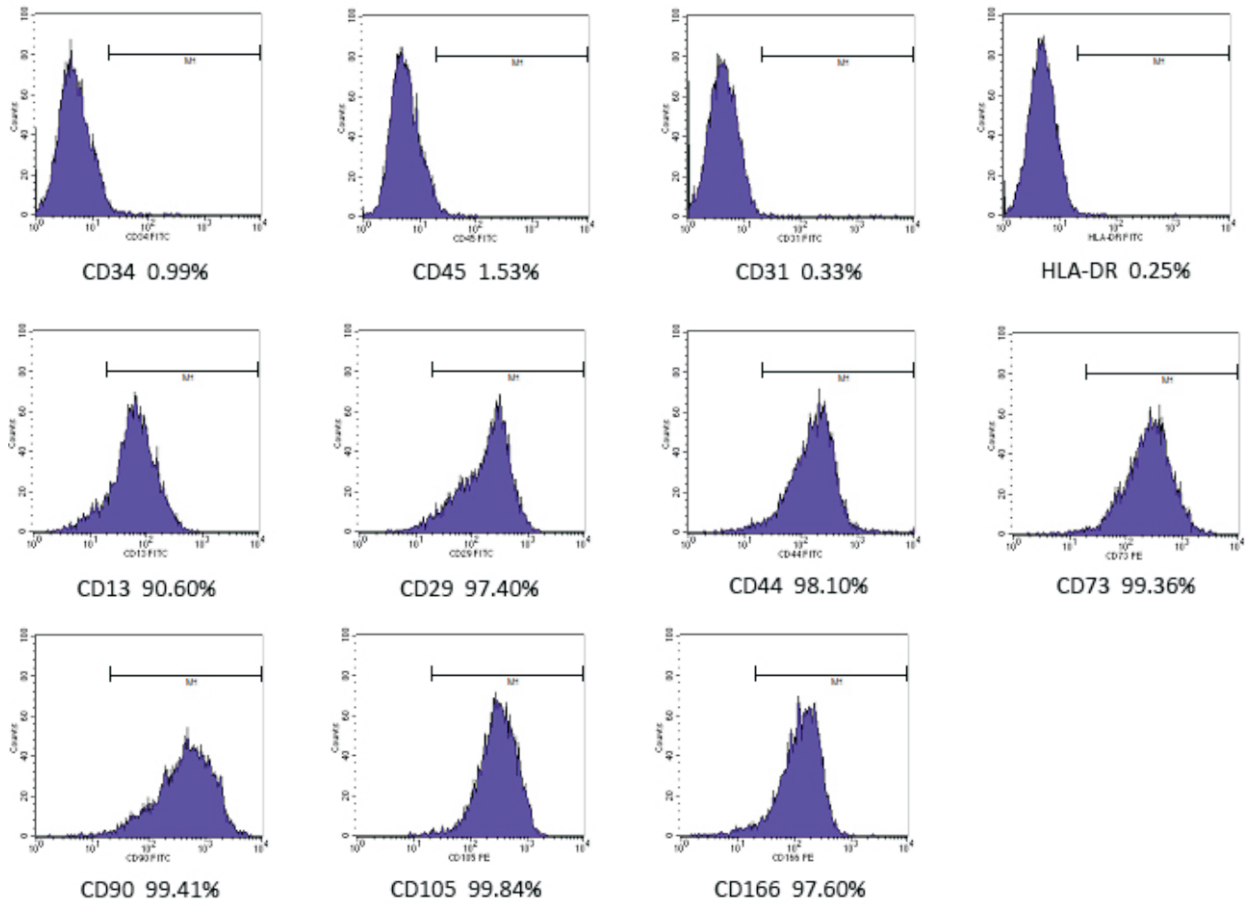


图 3 人脐带间充质干细胞免疫表型

Fig.3 Characterization of hUC-MSCs by immunophenotype

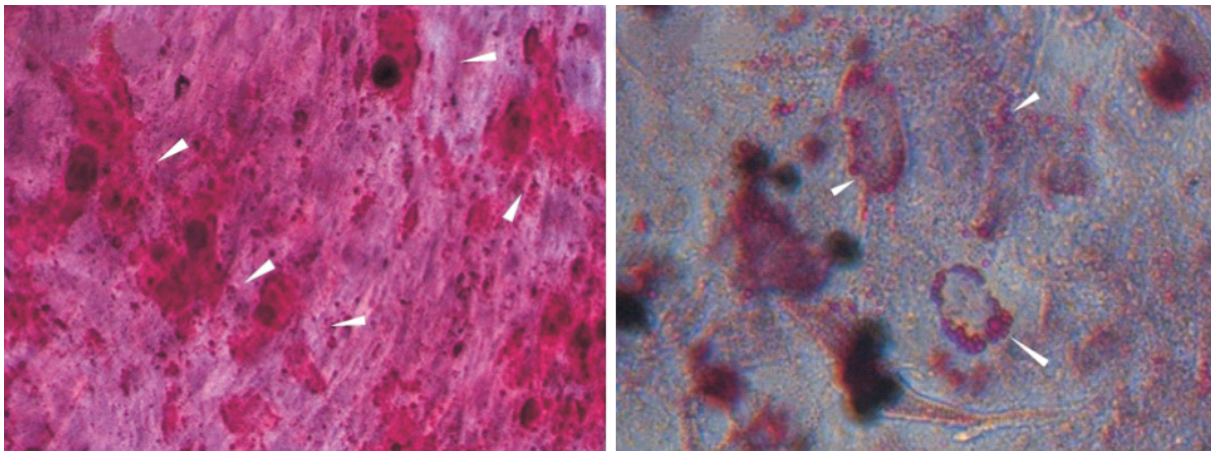


图 4 人脐带间充质干细胞体外诱导分化

Fig.4 Induced adipogenesis and osteogenesis of hUC-MSC in vitro

A: Calcium deposition was observed by Alizarin red stain (white arrows); B: Lipid vacuoles (purple) in the adipocytes were stained with Oil Red O (white arrows). × 100

hUC-MSC 培养体系的选择至关重要。目前国内外主要采用添加生长因子(如碱性成纤维生

长因子、表皮生长因子)的 LG-DMEM 完全培养基<sup>[5, 10-11, 13]</sup>, 该体系对血清的质量要求较高, 而细

胞传至 P10 代左右时,体积较原代增大数倍,增殖速度也明显减慢。MesenPro 为含 20 mL/LFBS 的减血清培养基,完全采用 MesenPro 进行培养, MSC 传至 10 余代,形态无明显改变,大小均一,增殖速度保持良好。完全采用 MesenPro 培养基价格较高,使用 LD-Mesen 混合培养基,节约了生产成本,扩增 hUC-MSC 至 10 余代,形态无明显改变,增殖速度保持良好,且细胞扩增速率明显优于 LG-DMEM 培养体系。

实验中发现,孕妇低龄、妊娠期较短甚至早产者的脐带可能获取原代细胞较多,增殖能力较强,因此如何优选脐带标本可行进一步研究。常用胶原酶有四型,文献报道多采用 I 型<sup>[13]</sup>和 II 型<sup>[10, 14]</sup>,两者消化效果优劣目前尚需定论,需进一步比较。简而言之,本研究发现利用酶联合消化 Wharton's Jelly 组织并用 LD-Mesen 体系进行扩增,能够高效、简单、快速地获取 hUC-MSC,有利于间充质干细胞基础研究和临床应用的开展。

#### 参考文献:

- [1] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies[J]. *Tissue Eng*, 2001, 7(2): 211-228.
- [2] Bieback K, Kern S, Klüter H, et al. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood[J]. *Stem Cells*, 2004, 22(4): 625-634.
- [3] In't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta [J]. *Stem Cells*, 2004, 22(7): 1338-1345.
- [4] Lu LL, Liu YJ, Yang SG, et al. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials [J]. *Haematologica*, 2006, 91(8): 1017-1026.
- [5] Zeddou M, Briquet A, Relic B, et al. The umbilical cord matrix is a better source of mesenchymal stem cells (MSC) than the umbilical cord blood[J]. *Cell Biol Int*, 2010, 34(7): 693-701.
- [6] Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow [J]. *Stem Cells*, 2007, 25(6): 1384-1392.
- [7] Shetty P, Cooper K, Viswanathan C. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potentials of cord matrix, cord blood, and bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Asian J Transfus Sci*, 2010, 4(1): 14-24.
- [8] Troyer DL, Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(3): 591-599.
- [9] Ma L, Feng XY, Cui BL, et al. Human umbilical cord Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells differentiation into nerve-like cells [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2005, 118(23): 1987-1993.
- [10] 徐燕,李长虹,孟恒星,等. 人脐带间充质干细胞分离培养条件的优化及其生物学特性[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(32): 6289-6294.
- [11] Qiao C, Xu W, Zhu W, et al. Human mesenchymal stem cells isolated from the umbilical cord [J]. *Cell Biol Int*, 2008, 32(1): 8-15.
- [12] Kestendjieva S, Kyurkchiev D, Tsvetkova G, et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the human umbilical cord [J]. *Cell Biol Int*, 2008, 32(7): 724-732.
- [13] Seshareddy K, Troyer D, Weiss ML. Method to isolate mesenchymal-like cells from Wharton's Jelly of umbilical cord [J]. *Methods Cell Biol*, 2008, 86: 101-119.
- [14] Tong CK, Vellasamy S, Tan BC, et al. Generation of mesenchymal stem cell from human umbilical cord tissue using a combination enzymatic and mechanical disassociation method [J]. *Cell Biol Int*, 2011, 35(3): 221-226.
- [15] Yoo KH, Jang IK, Lee MW, et al. Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues [J]. *Cell Immunol*, 2009, 259(2): 150-156.

(编辑 徐杰)