

犬骨髓基质干细胞分离培养与向软骨样细胞诱导分化的研究

王其友, 蔡道章, 徐义春, 王 昆
(中山大学附属第三医院骨科, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】探讨犬骨髓基质干细胞的提取、分离和体外扩增的最佳条件,研究其在体外培养中定向诱导分化为软骨样细胞的可能。【方法】从幼年犬骨髓中分离基质干细胞进行培养扩增,观察其生长特性,体外应用碱性成纤维细胞生长因子(b-FGF)和转化生长因子 β 1(TGF- β 1)对第3代传代细胞诱导分化,并通过细胞的染色和II型胶原免疫组化鉴定诱导分化细胞的类型。【结果】原代培养时形成由基质干细胞组成的细胞集落融合周期约6~9d左右。第3代传代细胞经碱性成纤维细胞生长因子(b-FGF)和转化生长因子(TGF- β 1)诱导后,传代细胞在形态上呈软骨样改变;甲苯氨蓝异染性、阿新蓝染色阳性;II型胶原免疫组化染色呈阳性。【结论】犬骨髓基质干细胞在体外培养条件下生长良好和持续扩增,在碱性成纤维细胞生长因子(b-FGF)和转化生长因子(TGF- β 1)作用下可被诱导分化为软骨样细胞。

关键词: 基质干细胞; 诱导分化; 生长因子

中图分类号:R318 文献标识码:A 文章编号:1672-3554(2009)01-0047-04

Experimental Study on Isolation, Cultivation and in Vitro Differentiation of Canine Bone Marrow Stem Cells into Chondrocytes

WANG Qi-you, CAI Dao-zhang, XU Yi-chun, WANG Kun

(Department of Orthopedics, The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: 【Objective】 To establish an optimal protocol for the isolation, cultivation and purifying of rat bone marrow stromal cells (BMSCs), and to explore the feasibility of inducing BMSCs to differentiate into chondrocytes in vitro. 【Method】 BMSCs were isolated from juvenile canine by means of gradient centrifugation, purified by anchoring culture in vitro, and observed for their growth characteristics. After the administration of b-FGF and TGF- β 1 with third generation passage cell, the induced differentiation of BMSCs was evaluated by staining and collagen II immunocytochemistry. 【Result】 After 6-9 d, the fusion periods of colonies of BMSCs were achieved in vitro. After third generation passage cell induced differentiation with b-FGF and TGF- β 1, the yields of positive cells by alcian blue staining, toluidine blue staining and collagen II immunocytochemistry staining and the cells morphologically became chondrocytes. 【Conclusion】 The BMSCs can be cultured and purified well in vitro, and can also be induced to differentiate into chondrocytes-like cells by b-FGF and TGF- β 1.

Key words: bone marrow stem cell; induced differentiation; growth factor

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2009, 30(1): 47-50; 55]

骨髓基质干细胞 (bone marrow stem cell, BMSCs) 体外增殖和传代能力强且具有多潜能分化特性, 一直作为组织工程学软骨的细胞来源之一, 成为创伤修复的理想细胞, 在体外特定诱导条件具有向成骨细胞、成软骨细胞、神经细胞等分

化的潜能^[1]。BMSCs 有易于从骨髓中分离和体外大量扩增纯化、供区损伤小、便于自体移植、可体内或体外的一定条件下分化形成软骨组织^[2-3]。本实验用贴壁培养方法对犬骨髓基质干细胞进行分离培养, 并用形态观察和免疫组织化学方法研究

收稿日期: 2008-09-12

基金项目: 广东省科技计划项目(2003A3020102)

作者简介: 王其友, 医学博士, 主治医师, E-mail: wqiyu@163.com

碱性成纤维细胞生长因子(b-FGF)和转化生长因子(TGF- β 1)诱导对犬骨髓基质干细胞体外转化成软骨样细胞的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

取2月龄幼犬的肋骨,由中山大学动物实验中心提供。主要试剂:L-DMEM(Gibco BRE公司),胰蛋白酶(Sigma公司),胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 杭州四季青生物材料研究所),DMSO(Dimethyl Sulfoxide, Biobaxci Inc公司),碱性成纤维细胞生长因子(bFGF, Sigma公司),转化生长因子(TGF- β 1, PEPROTECH EC LTD),兔抗人II型胶原多克隆抗体即用型(武汉博士德公司),SP法免疫组化试剂盒及DAB显色试剂盒(福州迈新试剂公司)。

1.2 方法

1.2.1 手术 选取2月龄家犬,30 g/L戊巴比妥钠按30 mg/kg静脉麻醉,无菌条件下切取其一段肋骨,将切取的肋骨剪成长0.5 cm大小骨块,收集骨髓细胞悬浮液,接种后培养,细胞接近融和时,消化和收集细胞悬液,按1:2接种传代。

1.2.2 细胞生长曲线 取生长良好的第3代细胞,以 6×10^4 /mL密度接种培养。每天取4皿,连续取6 d,消化后离心细胞密度记数,以细胞密度为纵坐标,绘出细胞生长曲线图。

1.2.3 b-FGF和TGF- β 1诱导BMSCs 将第3代BMSCs消化后采用密度为 $(3 \sim 4) \times 10^6$ 的密度培养,先用含10 μ g/L的b-FGF的不完全培养液预诱导48h,更换含10 ng/mL TGF- β 1的完全培养液,至软骨细胞团块出现。

1.2.4 诱导软骨样细胞的鉴定 将实验组培养板底所形成的细胞团块固定、脱水、包埋后切片。分别进行:甲苯胺蓝染色、阿新蓝染色和II型胶原免疫组化染色。

2 结果

2.1 BMSCs生长的形态观察

BMSCs于接种后10 h开始贴壁,细胞呈多角形、短梭形,胞核浆分界清晰,折光性强(图1)。随

着培养时间延长贴壁细胞逐渐生长,6~9 d可见近长满培养皿底壁,此时细胞相互间紧密贴附,细胞密集排列显示出集落生长趋势(图2)连续培养传了7代,5~7代细胞融合周期变长,细胞增殖速度明显变慢。第7代细胞细胞逐渐出现衰老。

2.2 BMSCs生长曲线

细胞生长至第2天细胞进入增殖期,细胞数量即开始增加,至第6天细胞数量最大,以后数量略有下降。传代2~3 d细胞处于对数生长期,与此相应处于分裂期的细胞数增幅也最大,到第7天细胞已近长成单层,绝大多数细胞不再分裂(图3)。

2.3 b-FGF和TGF- β 1诱导下BMSCs生长状况

BMSCs在bFGF预诱导下促进基质干细胞的集落生长,细胞增殖快。加入TGF- β 1诱导培养的BMSCs 48 h后在倒置相差显微镜下观察可见BMSCs在培养板底局部密集,周边出现空区,6 d左右可见大小不等的细胞聚集团,细胞外形呈圆形样改变,细胞周围出现类似软骨陷窝样的空隙。约9 d后培养组培养板底出现肉眼可见的白色小团块或白色条带状,10 d后团块渐增大,用镊子夹细胞团块稍有韧性(图4)。

2.4 诱导细胞鉴定

甲苯胺蓝染色可见细胞核被染成蓝色,胞质异染,细胞和细胞之间有弥漫的紫红色异染性物质分布(图5)。阿新蓝染色可见间中有染成天蓝色的物质弥漫分布,和阳性对照片染色反应类似,阳性的物质主要位于细胞和细胞之间,呈网隔状分布(图6)。采用软骨特异性的II型胶原进行鉴定结果显示:大多数细胞可见II型胶原蛋白的表达阳性信号主要位于细胞浆内,细胞和细胞之间的间充质内也有少量的弱阳性信号的出现(图7),II型胶原蛋白的表达即证明了BMSCs向软骨样细胞的分化。

3 讨论

3.1 BMSCs的分离及培养

20世纪70年代,Friendenstein发现一小部分骨髓中贴壁最牢固的细胞经数此传代后形成独特的纺锤形外观,具有形成成骨细胞或软骨细胞的能力。幼年动物骨髓腔内是以未分化、具有多向分化潜能的各种幼稚细胞为主的,单核细胞和巨噬

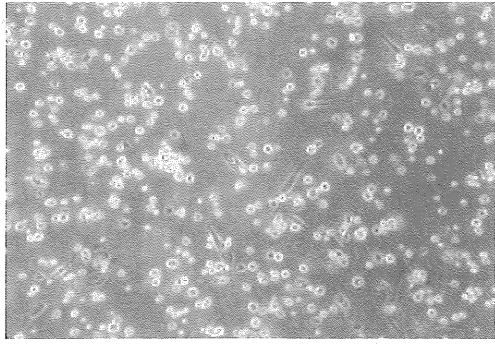


图1 BMSCs 培养 10 h 的贴壁细胞
Fig.1 BMSCs culture adherent cell for 10 h (× 100)

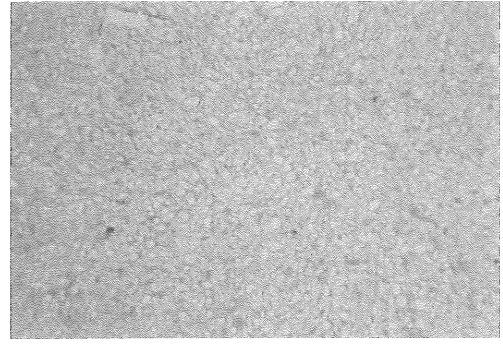


图5 诱导软骨细胞甲苯胺蓝染色
Fig.5 Induced chondrocyte toluidine blue-stain (× 100)

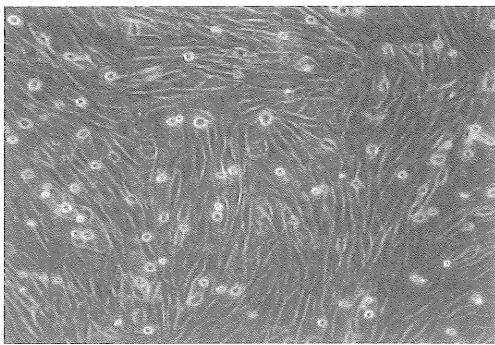


图2 原代培养 7 d 的 BMSCs
Fig.2 Primary culture BMSCs for 7 d (× 200)

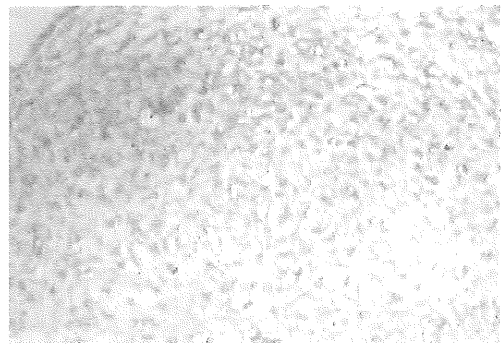


图6 诱导软骨细胞阿新蓝染色
Fig.6 Induced chondrocyte alcian bluestain (× 100)

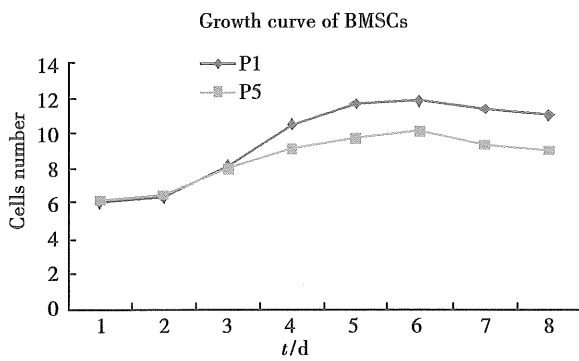


图3 犬 BMSCs 生长曲线图
Fig.3 Growth curve of BMSCs

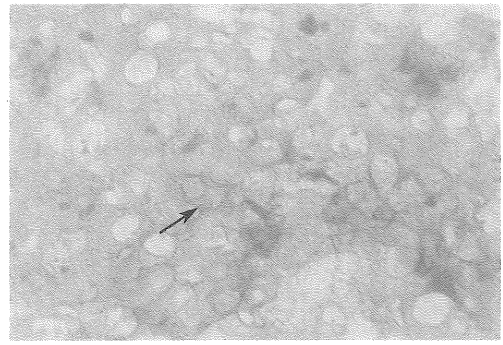


图7 诱导软骨细胞 II 型胶原阳性表达
Fig.7 Induced chondrocyte collagen II detected by immunohistochemistry (× 200)

Arrow points to intracytoplasm positive expression

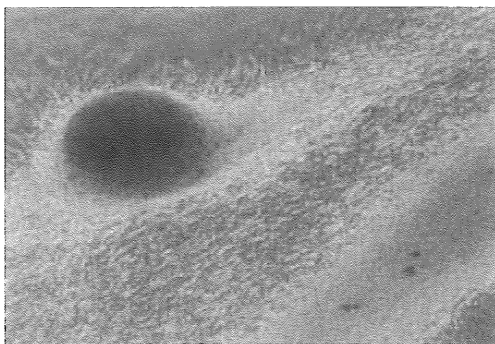


图4 TGF-β1 诱导 BMSCs 48 h
Fig.4 BMSCs induced by TGF-β1 for 48 h (× 100)

细胞含量也非常丰富, 所以培养骨髓基质干细胞应以幼年动物的骨髓为细胞的来源。但 BMSCs 是非建株的细胞, 由原代培养而来, 且在骨髓中含量极少, 故如何获取纯度较高的 BMSCs 一直是人们关注的问题, 为此, 人们提出了多种从骨髓中分离 BMSCs 的方案^[4-5]。由于骨髓内 BMSCs 在骨髓中的浓度不高, 因此进行分离纯化和体外扩增就显得尤为重要。从本实验来看, 全骨髓法较离心

法简单方便,有较多优点,由于骨髓基质干细胞数量少,离心法容易使骨髓基质干细胞丢失或破坏,操作较繁琐。从细胞生长曲线可知:传代 2~3 d 细胞处于对数生长期,与此相应处于分裂期的细胞数增幅也最大,到第 6 天细胞已近长成单层,处于平台期,绝大多数细胞不再分裂,细胞生长形态不随传代而变化。骨髓基质干细胞体外培养方法简单、快速,基质干细胞存活力和增殖力较强,培养到第 6 代时,未出现衰老现象。由于软骨组织工程要求体外支架材料上必须接种相当量的种子细胞,一般量要达到 10^{6-7} 数量级。这就要求种子细胞必须在体外进行扩增,骨髓基质干细胞获取数量相对较大,细胞易于存活并且增殖周期短。一般 1 mL 的骨髓接种 24 h 后贴壁细胞数量可达到 $(6 \sim 8) \times 10^4$, 5 mL 的骨髓 10 d 左右经 2~3 代培养后完全可达到 10^7 细胞数量级。细胞的增殖与分化是一对矛盾的统一体,对于 BMSCs 来讲,如何使其快速增殖并且向软骨细胞定向分化是体外培养的关键。如何更好的控制 BMSCs 增殖与分化的关系是进一步研究的方向。

3.2 细胞因子对 BMSCs 增殖分化的影响

从理论上讲,直接用 BMSCs 修复软骨损伤不是理想的方法,因为 BMSCs 是一异质细胞群,由处于不同分化阶段的多种细胞组成。BMSCs 的多向分化性不利于向软骨细胞单一方向分化,植入体内后成骨系细胞分泌的骨形成发生蛋白(BMP)作用于非定向分化的前体细胞,使其向成骨细胞分化,而已定向分化的细胞则不受 BMP 的影响,形成相应的组织。因此,在体外诱导 BMSCs 分化为软骨细胞对软骨组织工程意义重大。研究发现转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)具有明显的诱导 BMSCs 向软骨分化的作用,有研究表明联合应用 TGF- $\beta 1$ 和 IGF-1 诱导 BMSCs 能够表达 II 胶原和合成 GAG,并且在动物体内具有较好的软骨形成能力,同时 b-FGF 是重要促细胞有丝分裂因子,是关节软骨细胞最明显的有丝分裂的刺激源之一,对中胚层来源的细胞具有明显的促有丝分裂作用^[6],研究表明 b-FGFs 对培养关节软骨细胞增殖及基质代谢有促进作用,能缩短软骨细胞 DNA 合成 G1 期及 G2M 期而达到缩短细胞周期、促进细胞分裂增殖。而 TGF- $\beta 1$ 受体大量表达,能促进软骨细胞合成蛋白多糖和 II 型胶原,维持软骨细胞表型稳定^[7-8]。在正常的软骨组织损伤修复中,

TGF- $\beta 1$ 可从周围组织的细胞外基质中获得或由迁移而来的炎症细胞分泌产生。本研究在体外模拟软骨的发生过程,序贯加入扩增细胞的 bFGF 及诱导细胞向软骨细胞分化的 TGF- $\beta 1$ 生长因子,结果诱导的细胞甲苯胺蓝染色阳性,表明诱导细胞具有分泌软骨基质的特征,细胞表现为软骨细胞形态。诱导的软骨细胞 II 型胶原免疫组化阳性,说明诱导的 BMSCs 形成的是软骨样组织。经诱导的 BMSCs 有明显的集落形成,细胞重叠生长,失去接触抑制。尽管目前其机制仍不十分清楚,但通过实验观察,人们开始了解到它在趋化性、细胞增殖、细胞分化中起着重要作用。细胞分化需要细胞与细胞、细胞与细胞基质间相互作用。有研究显示三维培养的 BMSCs 发生了定向软骨分化,而单层培养则无软骨形成。三维立体环境能容纳高密度的细胞黏附、增殖,有利于细胞间信号传递,为维系细胞的代谢活动提供适宜的微环境,细胞外基质(extracellular matrix, ECM)可良好地固守在细胞附近,因此 ECM 对细胞增殖分化及代谢的调节,在三维培养中得以充分发挥^[9-11]。本研究的结果显示在 b-FGF 及 TGF- $\beta 1$ 诱导下, BMSCs 分化为软骨样细胞,且采用较高密度的细胞培养提供软骨细胞缺氧的环境,有利于细胞与细胞、细胞与基质间相互作用以及细胞之间的信号传递,缩短体外诱导成软骨的时间。表明高密度条件下 b-FGF 及 TGF- $\beta 1$ 诱导传代培养可诱导 CFU-F 向软骨细胞方向分化,具有软骨细胞的表型。同时 BMSCs 定向软骨分化是一个复杂的过程,目前尚无方法使 BMSCs 分化的细胞稳定在软骨细胞阶段不继续分化为其终末表型。但随着对分化过程的深入了解,这一难题将迎刃而解。

参考文献:

- [1] 张志,冯英,谢富康. 骨髓间充质干细胞向肌管状结构分化的动态 [J]. 中山大学学报:医学科学版, 2006, 27(1): 34-37.
- [2] Cui Q, Wang Y, Saleh KJ, et al. Alcohol-induced adipogenesis in a cloned bone-marrow stem cell [J]. J Bone Joint Surg Am, 2006, 88(3): 148-154.
- [3] 王广斌,贺明,付勤,等. 不同分离方法对骨髓基质干细胞成软骨分化的影响 [J]. 中国骨肿瘤骨病, 2007, 6(3): 157-161.
- [4] Berger MG, Veyrat-Masson R, Rapatel C, et al. Cell

(下转第 55 页 to page 55)