

人脐血间质干细胞一般特性及其多向分化潜能

王 晶¹, 李志忠¹, 徐 茅², 迟作华³

(1. 暨南大学附属第一医院骨科, 广东 广州 510630; 2. 广东省水电二局医院外科, 广东 广州 511300;
3. 广州暨南大学医学院血液研究所, 广东 广州 510632)

摘要:【目的】观察人脐血间质干细胞增殖能力、细胞表面分子标志及多向分化潜能。【方法】从人脐血中分离出单个核贴壁细胞并进行体外培养。将细胞以单克隆抗体标记后用流式细胞仪进行检测。向培养细胞中加入成骨、成软骨和成脂肪诱导剂, 检测其多向分化能力。【结果】脐血间质干细胞原代培养时间为7周。流式细胞分析显示这些细胞CD29、CD13、CD44等表达为阳性, 但是它们不表达造血干细胞表面标志物。加入成骨诱导剂会导致细胞碱性磷酸酶的表达。采用微球培养法并加入软骨诱导剂对细胞进行诱导, 用阿尔新蓝染色显示有蛋白多糖表达。在加入成脂诱导剂后, 会导致细胞形态学改变, 且油红O染色为阳性。【结论】通过体外传代培养的方法可以从人脐血单个核贴壁细胞中得到纯化的间质干细胞, 脐血有望成为间质干细胞的替代来源。

关键词: 脐血; 间质干细胞; 分化

中图分类号: R318

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)04-0418-04

Characteristics and Multilineage Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cells from Human Umbilical Cord Blood

WANG Jing¹, LI Zhi-zhong¹, XU Mao², CHI Zuo-hua³

(1. Department of Orthopedics, The First Affiliated Hospital, Jinan University, Guangzhou 510630, China; 2. Department of Surgery, The Hospital of Second Bureau of Guangdong Water Power, Guangzhou 511300, China; 3. Institute of Hematology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the cell proliferation, surface markers, and multilineage differentiation potential of mesenchymal stem cells (MSC) from human umbilical cord blood. 【Methods】The mononuclear adherent cells from human umbilical cord blood were isolated and cultured in vitro. Cells were labeled with monoclonal antibodies and examined by flow cytometry. Multilineage differentiation potential was evaluated by incubating the cells with osteogenic, chondrogenic, and adipogenic agents. 【Results】It spend 7 weeks to establish the MSC from human umbilical cord blood in primary culture. Flow cytometry showed that these cells were positive for CD29, CD13, and CD44 expression, but they failed to express hematopoietic cell surface markers. Exposure of these cells to osteogenic agents resulted in expression of alkaline phosphatase. The cells were induced by micromass culture method with chondrogenic agents; proteoglycans was visualized by Alcian blue staining. Incubation with adipogenic agents resulted in cells morphological change and positive staining for Oil Red O. 【Conclusion】Through subcultivation in vitro, it is possible to obtain purified MSC from human umbilical cord blood mononuclear cells, and it can serve as an alternative source of MSC.

Key words: umbilical cord blood; mesenchymal stem cells; differentiation

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(4):418-421]

脐血中富含造血干细胞已为人们所熟知,且脐血造血干细胞移植在临床上应用已有超过10

年时间^[1],并已成为继骨髓之后造血干细胞移植的又一重要来源。而对于脐血中是否含有间质干细

收稿日期: 2006-11-28

基金项目: 广东省卫生厅基金资助项目(A2006348)

作者简介: 王 晶(1972-),男,广东普宁人,主治医师,在读博士生,研究方向为干细胞与骨组织工程学, E-mail: jnuwangjing@163.com

胞 (mesenchymal stem cells, MSC) 这一问题上, 学者们却一直存在分歧。Erices 等^[2]的实验发现, 从脐血分离的贴壁细胞表达间质干细胞相关抗原。而 Mareschi 等^[3]研究却显示, 从骨髓中容易分离出间质干细胞, 而脐血中却不能。而且还有研究发现脐血中非造血干细胞表达内皮细胞^[4]或树突状细胞的表面分子^[5]。由此可见, 对于脐血中非造血干细胞的定性方面, 学术界仍无最终定论。本实验拟从脐血中分离并培养间质干细胞, 对其一般生物学特性进行研究, 同时对其进行成骨、成软骨以及成脂肪等诱导, 观察其多向分化的潜能。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

流式细胞仪 (Coulter-Elite), 荧光标记小鼠抗人抗体: CD13-PE、CD106-PE、CD14-PE、CD45-PECY5、CD34-FITC、CD29-FITC、CD44-FITC、CD54-FITC、CD49f-FITC、HLA-DR-FITC (BD Pharmingen), TGF- β 1 (PEPRO THCH)。

1.2 脐血间质干细胞的分离与培养

1.2.1 羟乙基淀粉沉淀法分离脐血间质干细胞

无菌条件下采集孕 33~41 周顺产或剖宫产胎儿脐血 50~80 mL, 肝素抗凝。孕妇无传染性疾病, 胎儿无畸形, 并征得家属及孕妇同意。将脐血与 6% 的羟乙基淀粉 4:1 比例混匀, 室温静置 60 min, 待红细胞与血清分界清楚, 吸取上清以 400 \times g 离心 5 min, 弃上清, 有核细胞沉淀于管底, PBS 洗涤 2 次。

1.2.2 脐血间质干细胞的原代及传代培养 将 DMEM/F12+10%胎牛血清加入离心管中, 吹打制成单细胞悬液。以 $5 \times 10^6/\text{cm}^2$ 密度接种于 T25 培养瓶中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、饱和湿度, 体积分数为 5% CO_2 孵箱中培养。5 d 首次全量换液, 去掉未贴壁的悬浮细胞。以后每周换液 1 次, 待细胞长到 80% 汇合时, 按照 1:2 的比例传代。传代后每周换液 2 次, 细胞汇合达 80% 时继续按 1:2 比例传代培养。

1.3 细胞表面标记物检测

将第 3 代细胞以 0.25% 胰酶消化后, PBS 洗涤 3 次, 制成 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 的细胞悬液。将待检细胞样品分为每管 0.1 mL, 阴性对照管加入鼠 IgG-FITC、IgG-PE 或 IgG-PECY5, 其它管分别加入鼠抗人 CD13-FITC、CD106-FITC、CD14-FITC、CD45-

PECY5、HLA-DR-FITC、CD34-FITC、CD29-FITC、CD44-FITC、CD54-FITC、CD49f-FITC 各 20 μL , 室温孵育 30 min, 流式细胞仪计数 5 000~10 000 个细胞, 仪器自带软件分析。

1.4 细胞周期测定

取第 3 代细胞, 用 0.25% 胰酶室温消化, PBS 洗涤 3 次, 弃上清。向离心管中加入 1 mL 预冷的 70% 的酒精, 充分吹打成单细胞悬液, 细胞浓度约为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中固定 24 h 后, 离心, 去上清, 沉淀物重悬在 1 mL 碘化丙啶染液中 (含 RNase A 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 碘化丙啶 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min。上流式细胞仪检测分析细胞周期。

1.5 脐血间质干细胞向成骨细胞诱导

成骨细胞诱导培养基: DMEM/F12, 10% FBS, 10^{-8} mol/L 地塞米松, 10 mmol/L β -磷酸甘油和 50 mg/L 抗坏血酸。取第 3 代细胞, 以 $5 \times 10^3/\text{cm}^2$ 密度接种于预置盖玻片的 6 孔板内。用成骨培养基诱导 21 d 取出盖玻片进行碱性磷酸酶染色 (钙-钴法)。

1.6 脐血间质干细胞向软骨细胞诱导

软骨细胞诱导培养基: 高糖 DMEM, 1% FBS, 胰岛素 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 维生素 C 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 地塞米松 10^{-8} mol/L, 10 ng/mg TGF- β 1。将 $2.5 \times 10^5/\text{mL}$ 细胞加入 15 mL 离心管内, 150 \times g 离心 15 min, 使细胞成微团。加入软骨诱导培养基, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱内培养, 每 2 d 换液。分别于第 1、2、3 周将细胞微团取出, 用 4% 多聚甲醛固定。脱水, 石蜡包埋, 行 5 μm 切片, Alcian blue 染色。

1.7 脐血间质干细胞向脂肪细胞诱导

脂肪细胞诱导培养基: DMEM/F12, 10% FBS, 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 地塞米松, 5 U/mL 胰岛素。取第 3 代细胞, 以 $5 \times 10^3/\text{cm}^2$ 接种于放置无菌盖玻片的 6 孔板内。待细胞生长到 80% 汇合时加入脂肪细胞诱导培养基。观察到胞质中有脂滴形成时, 弃培养液, PBS 洗涤, 4% 多聚甲醛固定 15 min, 行油红 O 染色。

2 结果

2.1 脐血间质干细胞培养倒置显微镜下形态观察

首次换液后, 贴壁细胞缓慢生长, 约 3 周时形成贴壁细胞集落。原代细胞呈梭形, 平行排列, 局部形成漩涡状, 混有部分圆形细胞。原代培养于 7

周时细胞可达 80%汇合。传代细胞生长速度加快，约 7 d 可以传代。传至第 3 代时细胞形态均一，增殖旺盛，折光性好(图 1)。

2.2 细胞表面分子表达特征

经流式细胞仪鉴定，第 3 代脐血间质干细胞不表达 CD14、CD45、CD34、HLA-DR、CD54、CD49f，内皮细胞标记 CD106 表达率 33%，CD29、CD13、CD44 表达强阳性(图 2)。

2.3 细胞周期测定

第 3 代脐血单个核细胞周期分析显示 82.2% 的细胞处在 G₀/G₁ 期(图 3)。

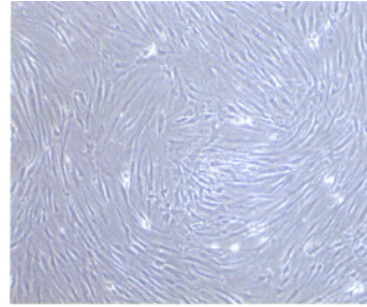


图 1 第 3 代脐血间质干细胞

Fig.1 Morphological features of the third passage of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood ($\times 100$)

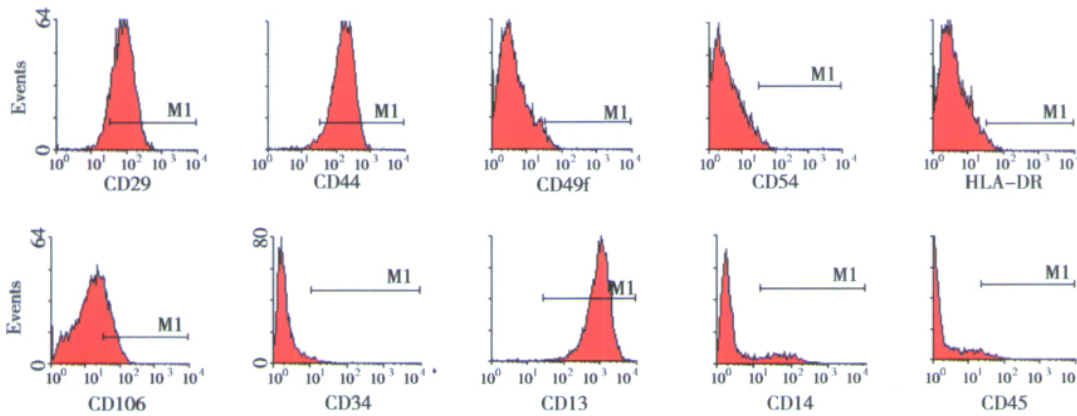


图 2 流式细胞仪检测脐血间质干细胞表面抗原的表达

Fig.2 Expression of surface antigens of MSC from umbilical cord blood

Cells were cultured for 3 passages, harvested, and labeled with monoclonal antibodies against human antigens and examined by flow cytometry

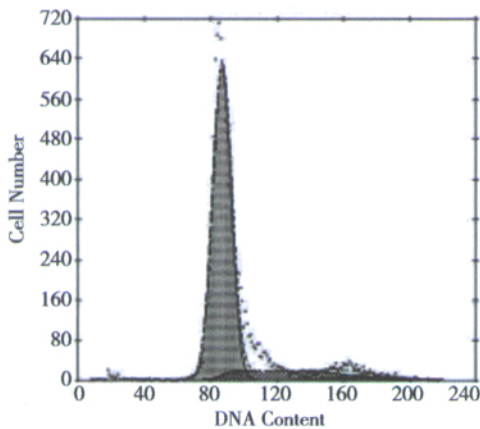


图 3 脐血间质干细胞的细胞周期测定

Fig.3 Cell cycle analysis of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood by flow cytometry

2.4 脐血间质干细胞向成骨、软骨等细胞的分化

成骨诱导：成骨诱导约 2 周时，细胞形态逐渐由长梭形渐变为立方形、多边形，有聚集倾向；3 周时诱导细胞经碱性磷酸酶染色为阳性(图 4A)。软

骨诱导：细胞团约 2 d 时与管壁分离成球形，并在培养过程中逐渐长大，2 周时经 Alcian blue 染色可观察到细胞微团中有淡蓝色酸性蛋白多糖出现(图 4B)。脂肪诱导：细胞于脂肪诱导 1 周左右，细胞形态逐渐由长梭形变为短胖梭形；于诱导约 14 d 时细胞多数变为椭圆形、圆形，第 21 天时部分细胞胞质中出现强折光性的脂滴，并随着诱导时间延长，胞质中的脂肪滴逐渐增多，28 天时油红 O 染色可见胞质中脂滴被染成红色(图 4C)。

3 讨论

有关间质干细胞的研究至今已有超过 30 年的时间，虽然陆续有研究显示可从不同组织中分离出 MSC^[6-9]，但在目前，骨髓仍然是 MSC 的主要来源。同骨髓一样，脐血中同样富含造血干细胞，但是脐血中是否也存在 MSC，不同的研究结果却不尽相同。根据定义，MSC 是应具有梭形外观，有

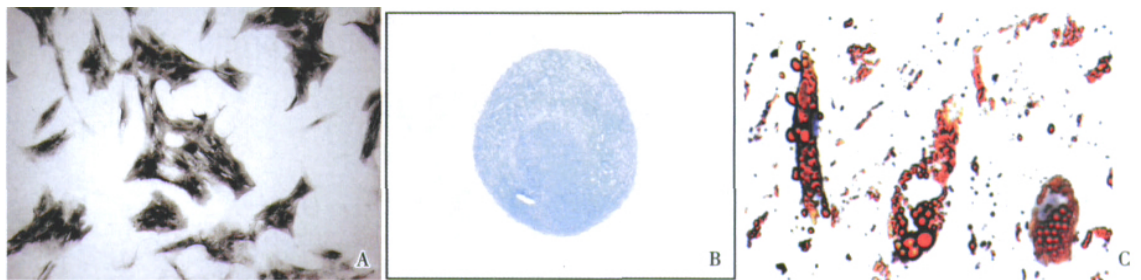


图 4 脐血间质干细胞向成骨、软骨及脂肪分化

Fig.4 Osteogenic, chondrogenic, and adipogenic differentiation of MSC from human umbilical cord blood

A :Osteogenic differentiation evidenced by morphology of cells and cytochemical staining for alkaline phosphatase after 14 days of induction ($\times 100$); B :Chondrogenic differentiation was evidenced by Alcian blue stainin ($\times 10$); C :Adipocytic differentiation was evidenced by the formation of lipid vacuoles in phase-contrast photograph and by oil-red O staining ($\times 100$)

强大自我更新能力和具有向中胚层细胞,如骨、软骨和脂肪细胞分化能力^[10]等特点。根据这一概念,我们拟从脐血单个核贴壁细胞中分离纯化出间质干细胞,并对其一般生物学特性和多向分化潜能进行研究。并从形态学、细胞表面分子表达以及分化功能等方面对脐血间质干细胞进行观察和鉴定。从实验结果可以看出,在倒置相差显微镜下观察,可见脐血间质干细胞呈梭形外观。细胞形态和排列与骨髓 MSC 十分相似。由于细胞表面分子表达是反映细胞特征的一个重要指标,对于鉴别细胞类型有着重要参考意义。因此我们对脐血间质干细胞进行了表面标志物的检测。结果显示,该细胞不表达造血细胞表面抗原 CD34、CD45 和 CD14,也不表达 HLA-DR,而黏附分子 CD44、CD29、CD13 的表达均为强阳性,这些结果与骨髓 MSC 表面分子的表达非常相似^[11]。干细胞还有一个最重要的特征就是它们具有多向分化潜能。我们在实验中对此进行了研究,所采用的诱导方案与人骨髓 MSC 三系诱导方案相同,并分别用钙-钴法、阿尔新蓝染色以及油红 O 染色等对诱导后细胞进行检测。结果显示,经相应诱导后,脐血间质干细胞中可见碱性磷酸酶的表达、蛋白多糖合成和细胞中脂滴形成。说明经诱导的人脐血间质干细胞已具有成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞的表型。这种向中胚层多向分化的能力显示脐血间质干细胞具有间质干细胞的标志性特征,而这也预示着它在诸如细胞治疗及组织工程种子细胞选择等实际应用中有重要价值。

在实验中我们还发现,与骨髓 MSC 相比,脐血间质干细胞的原代培养比较困难,对培养条件要求较高。如在培养基的选择上,与一般细胞或骨髓

MSC 的培养所需的常用的 DMEM 培养基不同,对脐血间质干细胞的培养要求养分更高的 DMEM/F12 培养基。而且在间质干细胞的分离方法也与骨髓 MSC 不同。脐血类似外周血,含有大量红细胞,如何有效将其去除而又最大程度地保留其中有活力的单个核细胞是培养成功的关键。为了减少离心次数对细胞产生的机械损伤和各种试剂对细胞的化学影响,我们选择了羟乙基淀粉物理沉淀法来去除标本中的大量红细胞,取得了较好的效果。在实验中还发现,脐血标本的克隆样细胞集落开始出现的时间较晚,约需要 3 周的时间,而且整个原代培养所需的时间长达 7 周。而本实验室人骨髓 MSC 原代培养时间约 3~4 周。但是传代后,脐血间质干细胞的增殖能力明显加快,显示出其强大的自我更新能力。我们在细胞培养过程中以及对细胞周期的测定等都证实了这一点。

从上述实验结果可以看出,脐血间质干细胞具有与骨髓 MSC 相似的梭形外观和细胞表型,有着强大的增殖能力,具有向中胚层三系分化的能力。这种形态和功能上的高度相似性说明脐血也和骨髓一样,存在有间质干细胞。而近年来的研究还发现,在一定条件下,脐血间质干细胞还可向神经细胞和肝细胞分化^[12],这提示脐血中间质干细胞具有跨胚层细胞分化的能力。可见,脐血间质干细胞有更多生物学特性和功能有待我们去研究。而且,脐血来源丰富,便于获得和保存^[13],这些都预示着脐血间质干细胞将具有重要的临床实用价值。

参考文献:

- [1] BROXMEYER H E, DOUGLAS G W, HANGOC G, et al
(下转第 429 页 to page 429)

- Allergy, 2001, 56(12):1172- 1179.
- [4] ZUBERBIER T, EDENHARTER G, WORM M, et al. Prevalence of adverse reactions to food in - a population study [J]. Allergy, 2004, 59(3):338- 345.
- [5] SAKAMOTO Y, UENO K, YOFU S, et al. The expression of IL- 4, IL- 6 and TNF- alpha in the liver of food- sensitized mice after oral challenge [J]. Int Arch Allergy Immunol, 1999, 118(2- 4):226- 227.
- [6] BISCHOFF S, CROWE S E. Gastrointestinal food allergy: new insights into pathophysiology and clinical perspectives [J]. Gastroenterology, 2005, 128(4):1089- 1113.
- [7] SCUDAMORE C L, THORNTON E M, MCMILLAN L, et al. Release of the mucosal mast cell granule chymase, rat mast cell protease- II, during anaphylaxis is associated with the rapid development of paracellular permeability to macromolecules in rat jejunum [J]. J Exp Med, 1995, 182(6):1871- 1881.
- [8] 陈虹,陈奋华,李银涛,等. 食物过敏肠道通透性的研究[J]. 免疫学杂志, 2003, 3(19):205- 207.
- [9] LIN X P, MAGNUSSON J, AHLSTEDT S, et al. Local allergic reaction in food- hypersensitive adults despite a lack of systemic food- hypersensitive IgE [J]. J Allergy Clin Immunol, 2002, 109(5):879- 887.
- [10] COEFFIER M, LORENTZ A, MANN S M P, et al. Epsilon germ- line and IL- 4 transcripts are expressed in human intestinal mucosa and enhanced in patients with food allergy [J]. Allergy, 2005, 60(6): 822- 827.
- [11] 张春景,靳静,刘占举. 食物过敏患儿十二指肠黏膜组织内 IL- 4 和 IL- 5 mRNA 的表达 [J]. 郑州大学学报:医学版, 2006, 41(5):835- 837.
- [12] PAAJANEN L, VAARALA O, KARTTUNEN R, et al. Increased IFN- gamma secretion from duodenal biopsy samples in delayed- type cow s milk allergy [J]. Pediatr Allergy Immunol, 2005, 16(5):439- 444.

(编辑 张恩健)

(上接第 421 页 from page 421)

- al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86 (10): 3828- 3832.
- [2] ERICES A, CONGET P, MINGUELL J J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood [J]. Br J Haematol, 2000, 109 (1): 235- 242.
- [3] MARESCHI K, BIASINI E, PIACIBELLO W, et al. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood [J]. Haematologica, 2001, 86 (10): 1099- 1100.
- [4] NIEDA M, NICOL A, DENNING- KENDALL P, et al. Endothelial cell precursors are normal components of human umbilical cord blood [J]. Br J Haematol, 1997, 98 (3): 775- 777.
- [5] GUTIÉRREZ- RODRÍGUEZ M, REYES- MALDONADO E, MAYANI H, Mayani H. Characterization of the adherent cells developed in Dexter - type long - term cultures from human umbilical cord blood [J]. Stem Cells, 2000, 18 (1): 46- 52.
- [6] DE BARI C, DELL ACCIO F, TYLZANOWSKI P, et al. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane [J]. Arthritis Rheum, 2001, 44 (8): 1928- 1942.
- [7] SOTTILE V, HALLEUX C, BASSILANA F, et al. Stem cell characteristics of human trabecular bone derived cells [J]. Bone, 2002, 30 (5): 699- 704.
- [8] ZUK P A, ZHU M, ASHJIAN P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells [J]. Mol Biol Cell, 2002, 13 (12): 4279- 4295.
- [9] MIKI T, STROM S C. Amnion- derived pluripotent/ multipotent stem cells [J]. Stem Cell Rev, 2006,2(2): 133- 42.
- [10] ANDERSON D J, GAGE F H, WEISSMAN I L. Can stem cells cross lineage boundaries? [J]. Nat Med, 2001, 7 (4): 393- 395.
- [11] PITTENGER M F, MACKAY A M, BECK S C, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. Science, 1999, 284 (5411): 143- 147.
- [12] LEE O K, KUO T K, CHEN W M, et al. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood [J]. Blood, 2004, 103 (5): 1669- 1675.
- [13] ENDE N, LU S, MACK R, et al. The feasibility of using blood bank- stored (4 degrees C) cord blood, unmatched for HLA for marrow transplantation [J]. Am J Clin Pathol, 1999, 111 (6): 773- 781.

(编辑 孙慧兰)