

碱性成纤维细胞生长因子对大鼠骨髓间质干细胞增殖的影响

刘爱军, 项平, 黄锦桃, 李海标

(中山大学中山医学院组胚教研室, 广东 广州 510080)

摘要: 【目的】研究碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 对大鼠骨髓基质干细胞 (MSC) 增殖的影响。【方法】用 α -MEM 冲洗骨髓腔, 收集骨髓细胞悬液, 接种在塑料培养瓶中, 经体外扩增、纯化, 观察其生长特性, 用免疫组织化学 SABC 法检测波形蛋白和纤粘连蛋白的表达, 并研究不同浓度 bFGF 对 MSC 生长曲线和克隆形成率的影响。【结果】原代培养时形成由基质干细胞组成的细胞集落, 细胞集落 14 d 时接近融合, 传代后细胞体积变大, 约 5~7 d 传代 1 次, 免疫组化显示 MSC 呈波形蛋白阳性, 而纤粘连蛋白阴性。浓度 10 ng/mL 和 20 ng/mL bFGF 组的 MSC 的细胞数和克隆形成率比 5 ng/mL bFGF 组和对照组 (无 bFGF) 明显增加, 具有高度显著性 ($P < 0.01$)。【结论】bFGF 可明显促进 MSC 的增殖。

关键词: 骨髓基质干细胞; 碱性成纤维细胞生长因子; 生长曲线; 克隆形成率

中图分类号: R329.25

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2004)06-0508-04

Effect of Base Fibroblast Growth Factor on Proliferation of Rat Mesenchymal Stem Cells

LIU Ai-jun, XING Ping, HUANG Jin-tao, LI Hai-biao

(Department of Histology and Embryology, Zhongshan Medical College, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the effect of base fibroblast growth factor (bFGF) on proliferation of bone mesenchymal stem cells (MSC) of SD rat. 【Methods】MSCs were isolated from young rat femur marrow flushed out with α -MEM using a needle and syringe, then planted in plastic culture flask. The proliferative characteristics of MSC were observed. Through expanded to 4 passages, vimentin and laminin were detected by immunohistochemistry. The effects of different concentration of bFGF on growth curve and clone-forming rate of MSC were studied. 【Results】Clones of MSC were formed in primary culture and contacted with one another at the 14th day. In passage cultured, the cells became somewhat bigger than that in primary culture and can be subcultured one generation in 5-7 days. The MSC showed positive expression of vimentin, but the expression of laminin was negative. The cell numbers and clone forming rates of MSC cultured with 10 ng/mL and 20 ng/mL bFGF groups were higher than those of 5 ng/mL bFGF group and control group (no bFGF). The differences were high significant ($P < 0.01$). 【Conclusion】bFGF had significant effects on promoting the proliferation of MSCs.

Key words: mesenchymal stem cells; base fibroblast growth factor; growth curve; clone-forming rate

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2004, 25(6): 508 - 511]

如何防止种子细胞老化? 怎样扩增种子细胞? 是当前组织工程需着重解决的问题。骨髓间质干细

收稿日期: 2004-04-09

基金项目: 国家重点基础研究 (973) 基金资助项目 (G1999054301-2)

作者简介: 刘爱军 (1972 -) 女, 河南新乡人, 博士生, 讲师, 李海标, 教授, 博士生导师, 通讯作者. E-mail: lajzpjys@yahoo.com.cn

胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 有自我更新和增殖能力,具有多向和横向分化的潜能,可分化为3个胚层来源的多种组织细胞^[1-3];MSC取材方便,易于培养,遗传背景稳定,自体移植无明显免疫排斥反应,不涉及伦理道德等问题,因而被认为是组织工程理想的种子细胞。骨髓中MSC的数量有限,且在体外培养多次传代以后,细胞的增殖能力下降。因此如何简便有效的在体外大量扩增MSC,具有重要的现实意义。碱性成纤维细胞生长因子 (base fibroblast growth factor, bFGF) 是一种内源性多肽生长因子,有促进中胚层和神经外胚层细胞有丝分裂的作用^[4],本研究观察不同浓度的bFGF对体外培养的SD大鼠MSC的生长曲线及克隆形成率的影响,探讨bFGF对MSC增殖的影响,为体外简便、高效的提高MSCs的增殖提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

雄性SD大鼠,体质量80~100g,由中山大学实验动物中心提供。

1.2 试剂

α -MEM (GIBICO公司),胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (中国医学科学研究所),L-谷氨酰胺、胰酶、bFGF (均购自GIBICO公司)。细胞培养液 α -MEM含150 mL/L FBS、1 mmol/L L-谷氨酰胺。小鼠抗波形蛋白 (vimentin) 和兔抗纤粘连蛋白 (laminin) 分别购自Santa Cruz和博士德试剂公司。余试剂均为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 骨髓干间质的分离培养 无菌条件下取出大鼠股骨,剪断股骨两端,5 mL注射器吸取 α -MEM培养基,反复冲洗骨髓腔,并打散骨髓组织,收集骨髓细胞悬液,接种于25 cm²塑料培养瓶,37℃,体积分数5% CO₂培养,5 d半量换液,以后每3 d换液1次。10~14 d细胞接近融合,用1.25 g/L胰酶消化传代。

1.3.2 细胞形态学观察 应用倒置显微镜逐日观察体外培养的骨髓间质干细胞的生长状态及形态学变化。并取P4代MSC,以 3.5×10^4 /mL接种入预先放有无菌盖玻片的6孔板内制作细胞爬片,3 d后取出爬片,PBS洗3次,40 g/L多聚甲醛固定30 min, PBS洗3次,免疫组织化学染色按SABC法进行, I

抗Vimentin和Laminin浓度均为1:100,相应II抗的浓度为1:100,DAB显色,阴性对照组不加I抗,余步骤相同。

1.3.3 生长曲线的绘制 取P1、P4、P6代MSC,按 3.5×10^4 /mL接种于24孔板,每天计数1次,每次计数3孔,共计7 d,绘制细胞生长曲线,每代样本例数均为3。取P4代MSC以含不同bFGF浓度的 α -MEM培养基培养,设含bFGF 5 ng/mL组、10 ng/mL组、20 ng/mL组,对照组为无bFGF培养的P4代MSC,每组样本例数为3,绘制生长曲线,并做LSD-t检验。

1.3.4 克隆形成率的计算 P4代MSC制成单细胞悬液,以120个/孔接种入6孔板,无bFGF α -MEM培养基培养2周,PBS洗3遍,Wright's染色,Wright's染液为0.1 g Wright's染料粉溶于60 mL纯甲醇,Wright's染液染3 min,然后加等体积的磷酸缓冲液 (pH 6.5~7)不断吹打3 min,蒸馏水洗,中性树胶封片,计数6孔板内细胞数在50以上的克隆数,算出其所占种入的单个细胞数的百分比,该组设为对照组。同样的方式计算含bFGF质量浓度分别为5 ng/mL组、10 ng/mL组、20 ng/mL组MSC的克隆形成率,每组样本例数为3,并做Dunnett-t检验。

2 结果

2.1 骨髓间质干细胞的原代培养

骨髓细胞种植后,造血细胞成分居多,2 d可见细胞贴壁,3 d可见贴壁细胞呈梭形,骨髓中的造血细胞不能贴壁,随换液而被去除,4 d后,细胞逐渐形成分散的集落 (图1),多为成纤维样细胞和宽大扁平的细胞,至13~14 d时,集落中心细胞密集,周围细胞呈放射状或漩涡状排列,各集落的大小、细胞的疏密程度和细胞排列方式不尽相同。细胞密集处集落间出现重叠,原代培养潜伏期较长,约4~5 d,随后增值迅速,12~15 d接近融合。

2.2 骨髓间质干细胞的传代培养

传代细胞在24 h内贴壁,呈簇状分布,较原代细胞体积变大,呈不规则的多角形,有短而薄的胞突,培养中仍可见少量上皮样和脂肪细胞,但以成纤维样细胞为多,传至第3代后,细胞形态渐趋一致,呈梭形 (图2);免疫组化染色呈Vimentin阳性,胞浆呈棕黄色 (图3),对照组染色为阴性。Laminin染色

呈阴性。细胞传代后,1~2 d 处于静止期,3 d 开始增殖,4 d 进入对数生长期,第 6 天达高峰,P1 代细胞数达 $11.8 \times 10^4/\text{mL}$,P4 代细胞数达 $10.2 \times 10^4/\text{mL}$,P6 代细胞数为 8.4×10^4 个/ mL ,可见 P1 代细胞增殖最旺盛,P4 代次之,P6 代细胞增殖较慢(图 4)。

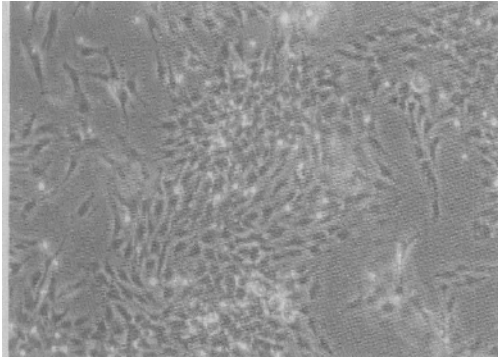


图 1 体外培养原代骨髓基质干细胞

Fig. 1 The primary cells of bone mesenchymal stem cells *in vitro* ($\times 100$)

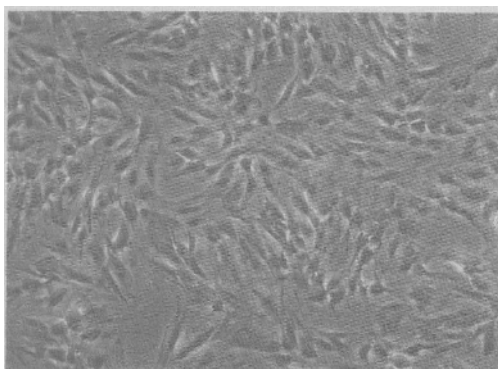


图 2 P4 代骨髓基质干细胞

Fig. 2 The fourth passaged cells of bone mesenchymal stem cells *in vitro* ($\times 100$)

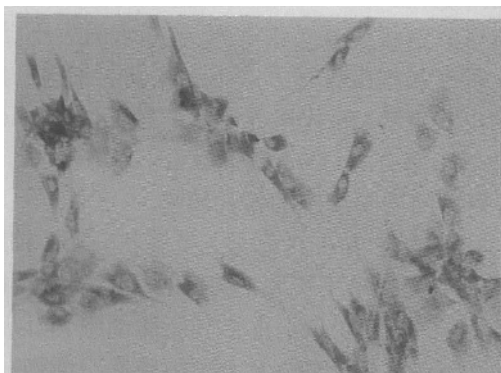


图 3 骨髓基质干细胞 Vimentin 表达阳性

Fig. 3 The positive expression of vimentin in bone mesenchymal stem cells ($\times 200$)

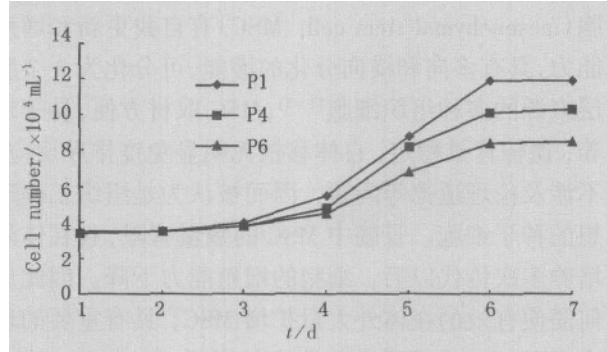


图 4 P1、P4、P6 代 MSC 的生长曲线

Fig. 4 The growth curves of MSC ($n = 3$)

2.3 bFGF 对骨髓间质干细胞增值的影响

2.3.1 bFGF 对骨髓间质干细胞生长曲线的影响

加入 bFGF 以后,从图 5 中可见,前 3 d 不同浓度的 bFGF 对 MSC 增殖的影响不明显,其细胞数与对照组(无 bFGF)差别不大,4 d 后细胞增殖明显,6 d 达高峰,20 ng/mL bFGF 组细胞数为 $13.7 \times 10^4/\text{mL}$,10 ng/mL bFGF 组细胞数 $13.4 \times 10^4/\text{mL}$,5 ng/mL bFGF 组细胞数为 $11.4 \times 10^4/\text{mL}$,P4 代细胞数为 $10.2 \times 10^4/\text{mL}$ 。LSD-*t* 检验结果显示:10 ng/mL 和 20 ng/mL bFGF 组与 5 ng/mL bFGF 组比较差异有高度显著性 ($P < 0.01$),10 ng/mL 和 20 ng/mL bFGF 组无显著性差异 ($P > 0.05$);5 ng/mL bFGF 组与对照组比较有高度显著性 ($P < 0.01$)。

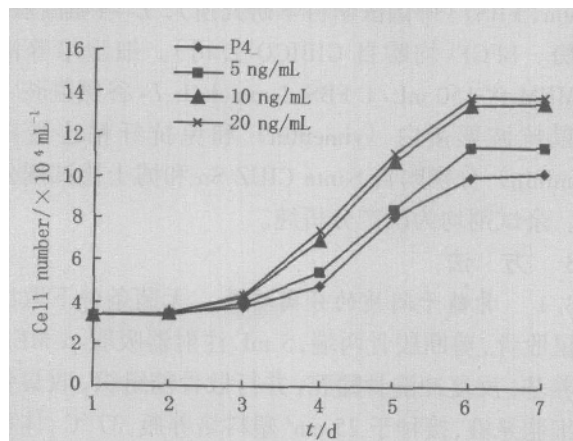


图 5 bFGF 代作用 P4 代 MSC 生长曲线

Fig. 5 The growth curves of P4 MSC with bFGF ($n = 3$)

2.3.2 bFGF 对骨髓间质干细胞克隆形成率的影响

MSC 克隆形态如图 6,从表 1 中可见 0、5、10、20 ng/mL bFGF 培养条件下,克隆形成率依次为 14.7%、17.2%、26.9%、29.8%。Dunnett-*t* 检验结果:10 ng/mL 和 20 ng/mL 的 bFGF 对克隆形成率的影响明显高于 5 ng/mL 的 bFGF,差异有显著性 ($P < 0.01$);10 ng/mL 和 20 ng/mL 的 bFGF 对克隆形成率的影响无显著性差异 ($P > 0.05$)。

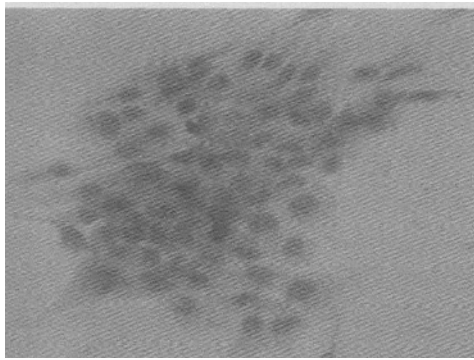


图6 骨髓基质干细胞克隆 Wright's 染色

Fig. 6 Clone of bone mesenchymal stem cell stained by Wright's ($\times 200$)

表1 P4代MSCs克隆形成率

Table 1 The clone-forming rates of P4 MSC				
bFGF (ng/mL)	n	Clone number	Implanted cell	Clone-forming rate (%)
0	3	17.7 \pm 1.5	120	14.7
5	3	20.7 \pm 0.6	120	17.2
10	3	32.3 \pm 2.1	120	26.9 ¹⁾
20	3	35.3 \pm 2.3	120	29.8 ¹⁾

Dunnnett-*t* test: 1) compared with 0 ng/mL & 5 ng/mL, $P < 0.01$. There were no significant differences between other groups

3 讨论

MSC的研究始于1867年,德国病理学家Cohnheim提出MSC具有向造血组织以外的成分分化的潜能^[2],目前的研究已经表明MSC有多向和横向分化的潜能^[1-3],MSC作为组织工程的种子细胞也日渐得到重视。但骨髓中的MSC数量很少,据估计 $10^5 \sim 10^6$ 个骨髓有核细胞中约含有1个MSC,且随着年龄的增加或体质衰弱,MSC的数量逐渐减少,在体外培养MSC经多次传代后细胞老化,增殖能力下降,分化潜能丢失,这些都影响了MSC的应用,因此选择合适的培养条件,以促进MSC的体外大量扩增很有必要。

本实验参考Friedenstein的方法,按我们已建立的方法^[5],直接把骨髓细胞悬液接种到塑料培养瓶中,利用MSC贴壁生长的特性获取,经换液、传代来纯化细胞。目前MSC还没有特异性标记物,一般把CD29、CD44、CD105和CD106阳性的骨髓间质细胞认为是MSC^[6,7],此外,有研究认为MSC免疫组化呈Vimentin阳性反应,Laminin阴性反应^[8],我们的分离培养方法与上述文献相同,且Vimentin和Laminin免疫组化结果也相似,提示我们分离培养的细胞是MSC。

bFGF是一种活性多肽,以往的研究表明它能刺激大量中胚层和神经外胚层来源细胞的生长,是

一种有效的有丝分裂原和分化抑制因子^[4]。不同剂量的bFGF对体外培养的软骨细胞、成纤维细胞、牙髓细胞等有刺激增殖、稳定表型或诱导分化的作用,bFGF刺激细胞增殖的最佳有效浓度,不同的报道差别很大^[9,10],可能与物种差异有关。而bFGF通过什么方式发挥其生理作用呢?有报道认为它是通过作用于细胞膜上的相应受体而起作用,细胞膜上的受体数目和功能高低在不同的细胞、不同的动物有差别,当bFGF与受体的结合达到平衡时,生物作用达最大,此时再增加bFGF浓度不会继续增加生物效应^[4]。我们的结果表明,10 ng/mL和20 ng/mL bFGF可明显促进MSC数量的增加和克隆形成,但两者无显著性差异,5 ng/mL的作用较弱,与前者相比有显著性差异,提示10 ng/mL bFGF可能是刺激大鼠MSC细胞增殖的最佳浓度。本实验研究了不同浓度bFGF对大鼠MSC增殖的影响,为MSC的临床应用提供了理论和技术支持。

参考文献:

- [1] Pittenger M F, Mackym A M, Jaiswal S C, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143-7.
- [2] Prockop D J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues[J]. *Science*, 1997, 276 (5309): 71-4.
- [3] Jiang Y, Jahagirdar B N, Reinhardt R L, *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. *Nature*, 2002, 418(6893): 41-9.
- [4] Hughes S E, Hall P A. The fibroblast growth factor and receptor multigene families[J]. *J Pathol*, 1993, 170(3): 219-21.
- [5] 撒亚莲,李海标.三七总皂甙诱导骨髓间质干细胞分化为神经元样细胞[J].*中山医科大学学报*, 2002, 23(6): 409-10, 37.
- [6] 项鹏,夏文杰,王连英,等.丹参注射液诱导间质干细胞分化为神经元样细胞[J].*中山医科大学学报*, 2001, 22(5): 321-4.
- [7] 张丽蓉,陈振光,项鹏,等.成人骨髓间质干细胞基本生物学特性[J].*中山医科大学学报*, 2002, 23(3): 170-2.
- [8] 路艳蒙,傅文玉,朴英杰.人骨髓间充质干细胞的培养及性质鉴定[J].*第一军医大学学报*, 2001, 21(8): 571-3.
- [9] Matsusaki M, Ochi M. Effects of basic fibroblast growth factor on proliferation and phenotype expression of chondrocytes embedded in collagen gel[J]. *Gen Pharmac*, 1998, 31(5): 759-64.
- [10] 许燕,许冰,马纲要.碱性成纤维细胞生长因子对兔皮肤成纤维细胞增殖的作用[J].*郑州大学学报(医学版)*, 2002, 37(3): 334-5.

(编辑 张恩健)