

人中期胚胎、新生儿脐血及成人骨髓间质干细胞 基本生物学特性的比较

朱美玲^{1,2}, 陈汝光³, 刘 华², 胡燕芬², 娜晓东¹, 雷俊霞¹, 张秀明¹, 李树浓¹

(1. 中山大学病理生理教研室, 广东 广州 510080; 2. 深圳市宝安区血站脐血库, 广东 深圳 518101;

3. 深圳市宝安区西乡人民医院, 广东 深圳 518102)

摘 要: 【目的】比较人中期胚胎脐血、新生儿脐血以及成人骨髓 3 种来源的间质干细胞 (MSC) 生物学特性, 为临床治疗选择细胞来源提供实验依据。【方法】采用 *L*-DMEM 培养液分离培养 3 种来源 MSC, 流式细胞仪进行细胞表型、细胞周期、细胞凋亡分析, 成骨、成脂诱导液分别诱导细胞分化, 携带绿色荧光蛋白报告基因的重组腺病毒转染 MSC, 荧光显微镜和流式细胞仪检测 3 种细胞表达外源基因特性。【结果】3 种来源标本中均可分离培养出 MSC, 但新生儿脐血中阳性获得率最低, 为 29.17% (7/24); 3 者细胞形态、表面抗原表达、体外分化特性相似, 但 2 种脐血 MSC 原代培养时间长达 30 d 左右, 处于 G_0/G_1 期细胞百分比大于成人骨髓; 3 者均能转染表达外源基因, 但胚胎脐血 MSC 中表达率最高, 达 $(66.32 \pm 3.28)\%$ 。【结论】胚胎、新生儿脐血以及成人骨髓中均可分离培养出 MSC, 中期胚胎脐血 MSC 适用于胎儿自体宫内基因转移/治疗 (UGT) 靶细胞, 成人骨髓 MSC 在组织工程、细胞治疗、基因治疗等领域具有广阔的应用前景, 而新生儿脐血 MSC 的临床应用有待进一步研究。

关键词: 间质干细胞; 脐血; 骨髓; 胚胎; 新生儿

中图分类号: R329.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554 (2004) 06-0504-04

Comparative Study of Basic Biological Characteristics of Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Fetal, Newborn Cord Blood, and Adult Bone Marrow

ZHU Mei-ling^{1,2}, CHEN Ru-guang³, LIU Hua², HU Yan-fen², NA Xiao-dong¹, LEI Jun-xia¹,
ZHANG Xiu-ming¹, LI Shu-nong¹

(1. Department of Pathophysiology, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Shenzhen Bao'an Blood Center and Cord Blood Bank, Shenzhen 518101, China; 3. Shenzhen Xixiang Hospital, Shenzhen 518102, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the differences of biological characteristics of mesenchymal stem cells (MSC) derived from human second-trimester fetal, newborn cord blood, and adult bone marrow. 【Methods】*L*-DMEM medium was used to cultivate MSC. The immunophenotype, cell cycle, and cell apoptosis were analyzed by flow cytometry. Adipogenic and osteogenic mediums were used to assess the differentiation ability of the cells. Adenovirus vector delivered green fluorescent protein gene (Ad-GFP) was used to transfect the cells. 【Results】Fetal, newborn cord blood, and bone marrow derived cells cultured in *L*-DMEM gave rise to adherent cells with fibroblast-like morphology, but the positive rate in newborn cord blood was the lowest as 29.17% (7/24). These cells were similar in cell morphology, antigenic phenotype, differentiation potential, and cell apoptosis rates. The primary culture time of cord blood derived MSC was longer than that of bone marrow derived cells. The percentage of G_0/G_1 cells in cord blood was higher than that in bone marrow. These cells

收稿日期: 2004-05-13

基金项目: 国家重点基础研究课题 (73) 基金资助项目 (2001CB509904); 广东省十五重大攻关基金资助项目 (2001A3020101)

作者简介: 朱美玲 (1970 -) 女, 湖南湘乡人, 博士生, 李树浓, 导师, 通讯作者. E-mail: snli@gzsums.edu.cn

transfected and expressed the transgene, but the fetal derived cells expressed at the highest level ($56.32 \pm 3.28\%$). **【Conclusion】** Human second-trimester fetal cord blood MSC is an promising target cell in fetal uterus gene transfer/therapy; the adult bone marrow derived MSC is useful in bioengineering, cell and gene therapy; whereas the application of newborn cord blood MSC need more researching.

Key words: msenchymal stem cells; cord blood; bone marrow; fetal; newborn

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2004, 25(6): 504 - 507]

已有研究证明间质干细胞(MSC)具有高度增殖和多向分化潜能,是一种理想的组织工程种子细胞,能高效转染表达外源性目的基因,在基因治疗领域具有广阔的应用前景^[1-3]。来源广泛,从骨髓、脐血、血液、皮肤、脂肪等不同组织分离出MSC已相继报道。那么不同来源MSC生物学特性和临床适用性是否存在差异?近年来,宫内基因转移/治疗(in utero gene transfer/therapy, IUGT)治疗重度地中海贫血、重症联合免疫缺陷病等多种胎儿遗传性疾病越来越受到重视,是否某种来源的MSC适合IUGT靶细胞?为此,本课题探讨比较胚胎、新生儿脐血与成人骨髓MSC生物学特性,旨在为临床治疗时选择细胞提供实验依据,报告如下。

1 材料和方法

1.1 标本来源

水囊引产中期胚胎5份:胎龄 17^{+3} 周至 22^{+2} 周,平均 20^{+4} 周;24份新生儿胎盘脐带血;5份成人骨髓抽取液,均获得供者同意。

1.2 主要试剂

高糖/低糖达乐伯克改良必需基本培养基(H-DMEM/L-DMEM),胰蛋白酶,胎牛血清(FBS)(美国GIBCO BRL公司);鼠抗人单克隆抗体包括:HLA DR-FITC、CD29-PE、CD34-PE、CD42a-FITC、CD44-FITC、CD45-PerCP、CD59-PE、CD80-FITC、CD86-FITC、CD105-PE、CD166-PE、Annexin-V-FITC、PI(美国Pharmingen公司);抗坏血酸、地塞米松、 β -甘油磷酸钠、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(BMX)和吡哆美辛(美国Sigma公司);293细胞引自ATCC,经本室传代保存;携带绿色荧光蛋白报告基因的重组腺病毒(adenovirus vector delivered green fluorescent protein gene, Ad-GFP)由军科院微生物流行病学研究所周育森博士惠赠;胰岛素(宏业生化制药厂)、油红O、茜素红(中国医药集团上海化学试剂公司)。

1.3 MSC分离、培养

水囊引产胚胎脐静脉处抽取脐血3~20 mL,采

用Ficoll分离液梯度离心方法分离获取脐血中有核细胞(包括大量有核红细胞),加入含体积分数10%FBS的L-DMEM培养液,调整有核细胞密度为 $10^6/\text{cm}^2$ 后接种在培养瓶中, 37°C ,体积分数5% CO_2 ,全饱和湿度环境下培养;3 d后全量换液,弃除非贴壁细胞,以后每5 d换液1次,细胞达80%~90%融合时,加入胰酶,室温消化,按1:3比例传代。新生儿脐血和成人骨髓MSC分离培养方法按本实验室以往报道方法进行^[4,5]。

1.4 流式细胞仪分析细胞表型

胰酶常规消化3种来源MSC,血清灭活胰酶活性,加流式细胞仪专用鞘液洗涤细胞2次,按不同荧光抗体的使用说明分别加入抗体, 4°C 孵育30 min,鞘液洗除未标记抗体,10 g/L多聚甲醛固定或即刻在流式细胞仪上检测细胞表面多种抗原的表达。

1.5 细胞周期分析

细胞生长融合达70%时,消化细胞,加入终体积分数70%冷乙醇,充分混匀后在 4°C 固定24 h,离心去乙醇,鞘液洗涤细胞2次后,在细胞沉淀中加入0.4 mL鞘液,充分悬浮细胞后加入10 g/L Rnase A 10 μL , 37°C 水浴10 min,加入0.1 g/L碘化丙啶(PI)避光染色30 min,用流式细胞Cellquest检测,用ModFIT软件分析结果。

1.6 细胞凋亡分析

P5、P10、P15融合达70%时,常规消化细胞,离心,在细胞沉淀中无菌加入0.4 mL DMEM充分混匀细胞,按试剂盒使用说明加入Annexin V-FITC和PI各5 μL 避光染色30 min,加入流式鞘液洗涤细胞中未结合的抗体和PI后,上机检测,Cellquest分析结果。

1.7 细胞多向诱导分化

向3种来源P5细胞中分别加入脂肪细胞诱导液(含 1×10^{-3} mmol/L地塞米松, 5×10^{-3} g/L胰岛素, 0.5 mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤, 60×10^{-3} mmol/L吡哆美辛)和成骨细胞诱导液(含 1×10^{-4} mmol/L地塞米松, 10 mmol/L β -甘油磷酸

钠, 50×10^{-3} g/L 抗坏血酸), 观察细胞形态变化, 油红 O 染色评估细胞向脂肪细胞分化情况, 茜素红染色检测钙化基质沉淀。

1.8 MSC 转染、表达 GFP

细胞融合达 80% 时, 去培养液, 加入病毒滴度 (MOI) 为 1 000 的 Ad-GFP 吸附细胞 2 h 后, 加入含体积分数 2% FBS L-DMEM 维持培养液 3 mL, 37 °C, 体积分数 5% CO₂ 全饱和湿度环境下培养。逐天观察细胞荧光表达情况, 第 30 天收获细胞, 流式细胞仪检测细胞表达转基因 GFP 阳性率。

2 结果

2.1 MSC 分离培养和生长特点

采用 L-DMEM 完全培养液, 能从中期胚胎、

新生儿脐血和成人骨髓中分离培养出 MSC。原代培养时, 中期胚胎脐血中混杂有大量有核红细胞且部分破碎, 多次换液后碎片被弃除, MSC 呈长梭形漩涡状生长, 长满时间为 28 ~ 35 d; 新生儿脐血原代培养首次换液后可见梭形细胞呈单个散在存在、多个细胞呈集落样或与其它圆形、扁平形、多边形等细胞交织呈混杂性集落生长, 生长缓慢, 经 2 ~ 3 次换液后, 混杂细胞脱落, 留下形态均一的梭形细胞, 长满时间为 25 ~ 35 d; 骨髓经首次换液后, 可见梭形细胞散在分布, 细胞浆丰富, 核大, 核染色质细, 长满时间为 10 d; 3 者传代培养 15 代, 细胞形态不发生改变, 仍呈长梭形(图 1)。中期胚胎脐血 3 mL 即可分离培养出细胞, 而新生儿脐血中 MSC 阳性获得率最低, 仅为 29.17% (7/24)。

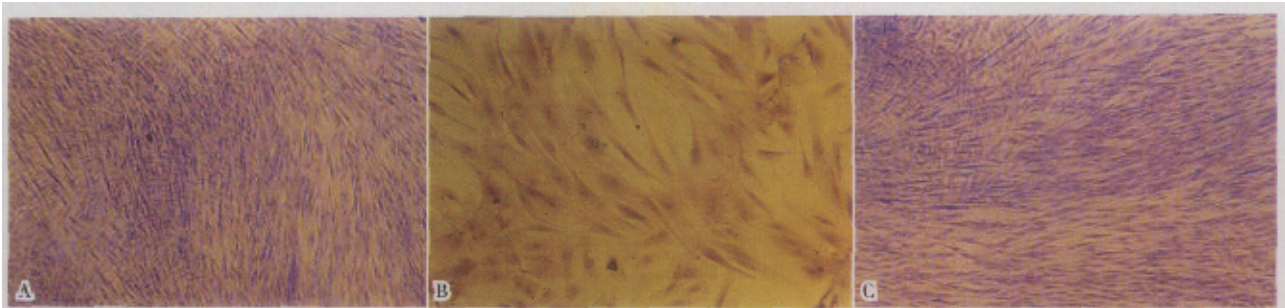


图 1 P15 MSC 生长形态

Fig. 1 The morphometrics of P15 mesenchymal stem cells (Wrights staining, $\times 40$)

A: second-trimester fetal cord blood; B: newborn cord blood; C: adult bone marrow

2.2 细胞表型分析

采用流式细胞仪技术分析 3 种来源 MSC 细胞免疫分子表达情况, 结果显示胚胎和新生儿脐血 MSC 在原代时弱表达 CD34⁺, 随着传代增加, CD34⁺ 由弱转阴, 而 CD29, CD44 等分子表达由弱向强, 至 P5, 3 者均强表达 CD29, CD44, CD59, CD90, CD105, CD166; 不表达 CD34, CD45, CD14, CD80, CD86。

2.3 细胞周期分析

流式细胞仪技术检测 3 种来源第 3 代 MSC 内 DNA 含量, 胚胎、新生儿脐血 MSC 增殖指数 (PI) 分别为: $(3.31 \pm 0.62)\%$ 和 $(5.53 \pm 0.58)\%$, 成人骨髓 MSC 为 $(10.39 \pm 1.26)\%$ 。

2.4 细胞凋亡分析

流式细胞仪技术分析生长接近融合时 3 种细胞凋亡发生率 结果显示凋亡蛋白 Annexin-V 的表达在 MSC 传代过程中不发生明显变化, 成人骨髓、新生儿

脐血及中期胚胎脐血表达分别为 $(10.98 \pm 0.89)\%$, $(1.36 \pm 1.82)\%$ 和 $(7.67 \pm 2.21)\%$ 。

2.5 细胞多向诱导分化

将 P5 代 MSC 培养体系转换成脂肪细胞诱导体系, 可见 3 者 MSC 均具有向脂肪细胞转化能力, 随着培养时间延长, 胞内出现脂滴、脂泡, 油红 O 染色阳性。经成骨诱导后, 细胞形态由原来的梭形向立方形转变, 形成结节, 茜素红染色阳性。

2.6 外源基因转染、表达

向 MSC 中滴加 Ad-GFP 后在维持培养液中生长, 于 48 h, 荧光显微镜下均出现绿色荧光, 以后逐天增强, 第 5 天达高峰后维持表达(图 2); 流式细胞仪分析第 30 天 GFP 在 3 者细胞中表达, 胚胎、新生儿脐血 MSC 中阳性率分别为 $(56.32 \pm 3.28)\%$ 和 $(51.28 \pm 3.64)\%$, 成人骨髓为 $(44.32 \pm 2.94)\%$ 。

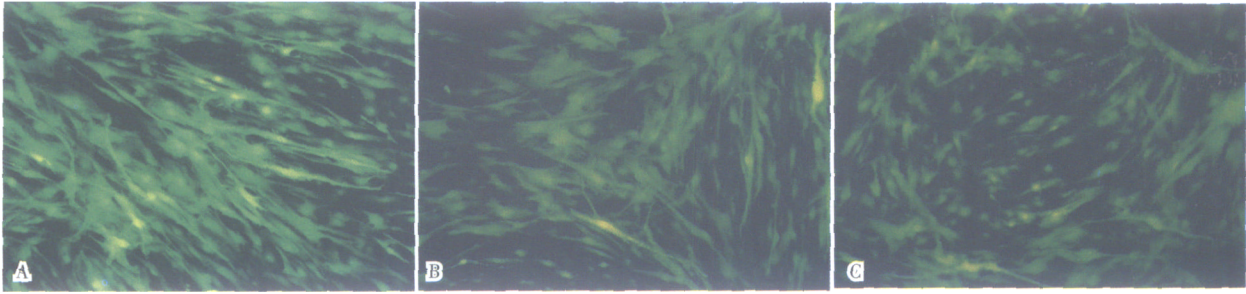


图 2 MSC 表达 GFP

Fig. 2 MSC expressed the GFP ($\times 40$)

A: second-trimester fetal cord blood; B: newborn cord blood; C: adult bone marrow

3 讨 论

MSC 的独特生物学特性, 已引起人们的重视, 尤其是对于组织工程、临床细胞治疗、IUGT 等基因治疗专家来说, MSC 的发现给他们各自研究领域取得突破性进展带来希望。他们希望找到最能满足他们需求的 MSC 来源, 因为已有研究证明, 人 MSC 的来源非常广泛, 但其生物学特性不尽相同^[6]。本研究比较胚胎脐血、新生儿脐血和成人骨髓 MSC 生物学特性, 为临床治疗时选择细胞提供了实验依据。

实验中采用含体积分数 10% FBS L-DMEM 培养液, 能从 3 种来源中分离培养出 MSC, 但是发现 MSC 含量不一致, 胚胎脐血中含量最高, 3 mL 脐血即可成功分离培养出细胞, 而新生儿脐血含量低, MSC 阳性分离率仅为 29.17%; 2 种脐血 MSC 原代培养时间长, 经 2 个月体外培养, 3 mL 胚胎脐血只能培养出 0.1×10^9 MSC, 20 mL 成人骨髓则能培养出 $10^9 \sim 10^{10}$ MSC; 实验结果表明, 经短期细胞培养后, 在数量上, 中期胚胎脐血 MSC 只能满足低体重患者治疗需求, 骨髓 MSC 能满足范围更广病人的需求, 而新生儿脐血因为其分离成功率低, 只适用于科研。

采用流式细胞仪技术分析 3 者细胞表型、细胞周期、细胞凋亡, 结果显示, 3 者细胞表型一致, 虽然在胚胎和新生儿脐血 MSC 培养过程中, CD34⁺ 由弱表达向阴性转变, 这可能是 MSC 中混杂有造血干细胞。细胞周期分析结果显示, 胚胎和新生儿脐血 MSC 增殖指数低于成人骨髓, 这与 MSC 原代以及最初几代生长缓慢现象吻合, 随着代数增加, 脐血增殖指数增加, P5 以后与骨髓同代细胞比较, 不存在显著性差异。细胞凋亡分析结果也显示, P5 后 3 者 MSC 凋亡率接近, 该两方面实验结果均与 P5 后胚胎、新生儿、成人骨髓 MSC 生长速度相近吻合。但是为什么胚胎以及新生儿脐血 MSC 在原代培养以及最

初几代培养过程中生长均缓慢, 而成人骨髓 MSC 却生长快速, 原因不明确, 可能骨髓与脐血 MSC 在生物学特性方面确实存在目前尚未明确的重大差异, 有待进一步深入研究。体外诱导分化结果显示, 3 者均具有成脂肪、成骨细胞功能。外源基因转染结果显示, 3 者均能有效表达外源性目的基因 GFP, 但是 GFP 在胚胎脐血 MSC 阳性表达率高达 $(56.32 \pm 3.28)\%$, 高于新生儿脐血和成人骨髓, 这为中期胚胎脐血 MSC 应用于胚胎自体 IUGT 提供了重要的实验依据。

根据以上实验结果, 认为成人骨髓 MSC 在组织工程, 成人自体细胞治疗、基因治疗方面具有广阔的临床应用前景, 而胚胎脐血 MSC 较其它来源 MSC 更适用于自体宫内基因转移/治疗 (IUGT) 靶细胞; 新生儿脐血 MSC 的临床应用有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Pittenger M F, Mackay A M, Jaiswai S C, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143-7.
- [2] 温冠媚, 李浩威, 肖庆忠, 等. 人骨髓间质干细胞向造血细胞分化潜能的实验研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2003, 19(2): 157-62.
- [3] Van Damme A, Vanden Driessche T, Collen D, *et al.* Bone marrow stromal cells as targets for gene therapy[J]. *Curr Gene Ther*, 2002, 2(2): 195-9.
- [4] 朱美玲, 那晓东, 雷俊霞, 等. 人胚胎脐血间质干细胞生物学特性研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2004, 20(6): 1003-8.
- [5] 项 鹏, 夏文杰, 王连荣, 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): 321-3.
- [6] Campagnoli C, Roberts I A G, Kumar S, *et al.* Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow [J]. *Blood*, 2001, 98(8): 2396-402.

(编辑 张敏瑞)