

成人骨髓间质干细胞基本生物学特性

张丽蓉¹, 陈振光², 项鹏¹, 夏文杰¹, 张秀明¹, 李艳¹, 李树浓¹
(中山大学 1. 中山医学院病理生理教研室, 2. 附属第一医院心胸外科, 广东 广州 510089)

摘要:【目的】研究成人骨髓间质干细胞(MSC)基本生物学特性。【方法】采用 Ficoll-Paque 淋巴细胞分离液分离成人 MSC, 体外扩增, 比较不同培养基和血清含量对 MSC 生长的影响, 流式细胞仪检测 MSC 表面抗原表达。【结果】成人骨髓间质干细胞在体外扩增原代可获得 $(5\sim 6)\times 10^5$ 个细胞, 15 代可获得 $(3\sim 4)\times 10^{12}$ 个细胞, 随着传代次数的增加, 细胞的增殖能力下降。L-DMEM 培养基有利于细胞的培养扩增。细胞流式细胞仪检测结果显示 CD29、CD44、CD59、CD105、CD166 表达阳性, CD11a、CD14、CD33、CD34、CD45、CD38、CD80、CD86、CD117 表达为阴性。【结论】MSC 有很强的自我更新能力, 在组织工程中具有广阔的应用前景。

关键词: 间质干细胞; 骨髓; 细胞增殖

中图分类号: R329.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)03-0170-03

Basic Biological Characteristics of Human Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells ZHANG Li-rong¹, CHEN Zhen-guang², XIANG Peng¹, XIA Wen-jie¹, ZHANG Xiu-ming¹, LI Yan¹, LI Shu-nong¹. (1. Department of Pathophysiology, 2. Department of Cardiothoracic Surgery, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510089, China)

Abstract 【Objective】To investigate the basic biological characteristics of human mesenchymal stem cells. 【Methods】hMSC were separated from human marrow with Ficoll-Paque reagent and expanded in culture medium. The proliferation and growth characteristics were observed in primary and passage culture. To detect the surface antigens, the labeled cells were analysed on a FACScan flow cytometer. 【Results】The isolated cultured MSC comprised a single phenotypic population and displayed a fibroblast-like morphology. hMSC have a strong self-renewal capacity. After primary culture approximately $(5\sim 6)\times 10^5$ cells were obtained. After passage 15, it to be got $(3\sim 4)\times 10^{12}$ cells. The proliferation ability was decreased gradually after several passages. The decline of CFU-Fs with passage numbers was apparent from assays of three samples from different donors and some spindle shaped cells acquired a broad morphology and reduced replication capacity. L-DMEM was better for proliferation and growth of MSC. These expanded attached MSC were uniformly positive for CD29、CD44、CD59、CD105、CD166 and didn't express CD11a、CD14、CD33、CD34、CD45、CD38、CD80、CD86、CD117. 【Conclusion】hMSCs have strong self-renewal capacity and can be used as the seed cells for tissue engineering.

Key words: mesenchymal stem cells; bone marrow; cell proliferation

近年研究发现, 机体内除胚胎干细胞外还存在具有自我更新和分化能力的组织干细胞, 如来源于脑室管膜的神经干细胞可分化为神经元和神经胶质细胞^[1], 来源于骨髓的造血干细胞可分化为多种造血细胞。骨髓间质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)最初由Friedenstein发现, 具有易贴附于塑料培养板表面的特性。MSC可在体外培养扩增, 遗传背景稳定, 而且具有多向分化潜能, 可分化为成骨细胞、软骨细胞、肌肉细胞、神经细胞等多种组织细胞^[2], 是组织工程重要的种子细胞之一。目前该类细胞的生物学特性尚未完全清楚, 本实验对MSC的培养条件、特性等进行了探讨。现将实验结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

非血液系统疾病的胸外科手术中摘取的肋骨。高糖/低糖达乐伯克改良必需基本培养基(H-DMEM/L-DMEM, 美国GIBCO BRL公司), 极限必需培养基(α -MEM, 美国GIBCO BRL公司), 胎牛血清(Hyclone公司), Ficoll-Paque分离液(1.077 kg/L)购自Pharmacia公司, 荧光标记小鼠抗人抗体CD11a-FITC、CD14-PE、CD29-PE、CD33-FITC、CD34-PE、CD38-PE、CD44-FITC、CD45-FITC、CD59-PE、CD80-FITC、CD86-FITC、CD90-PE、CD105-FITC、CD166-FITC、CD117-PE购自Ancell公司。

收稿日期: 2001-10-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30100188); 广东省“十五”重大专项基金资助项目(A3020101)

作者简介: 张丽蓉(1965-), 女, 广东和平人, 硕士, 现在广东药学院病理生理教研室; 李树浓, 教授, 博士生导师, E-mail: lsli@gzsums.edu.cn

1.2 MSC 的分离、扩增

按本实验室以往报道的方法进行 MSC 的分离和扩增³¹。

1.3 MSC 的鉴定

培养的细胞用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤3次,用胰酶消化成单细胞悬液,1 500 r/min 离心 15 min,收集细胞沉淀,PBS 洗涤3次,分别加入荧光标记的抗体;4 °C 孵育 30 min,PBS 洗去未标记抗体,10 g/L 多聚甲醛固定;用 FACS can 流式细胞仪检测细胞 CD11a、CD14、CD29、CD33、CD34、CD38、CD44、CD45、CD59、CD80、CD86、CD117、CD90、CD105、CD166 表面抗原表达。

1.4 不同培养条件的比较

分别采用 L-DMEM、H-DMEM、 α -MEM、RPMI 1640 培养基进行 MSC 培养扩增,镜下观察细胞形态和贴壁、增殖情况。分别采用含 100 mL/L、150 mL/L、200 mL/L 血清的 L-DMEM 进行 MSC 培养扩增,镜下观察细胞形态和贴壁、增殖情况。

1.5 克隆形成能力的测定

培养的细胞胰酶消化成单细胞悬液,1 500 r/min 离心 15 min,收集沉淀加入 L-DMEM 培养液制成细胞悬液,细胞计数,然后吸取适量细胞悬液接种于 6 孔板(调整孔内细胞数密度为 $10^4/\text{cm}^2$),加入 L-DMEM 培养液置于培养箱,3 d 换液 1 次,1 周后取出 6 孔板,PBS 洗涤后用 5 g/L 结晶紫染色,计数孔中的集落数。计数标准为 50 个细胞以上者计为 1 个集落。每次培养 6 孔,取平均值,按以下公式算出第 1 代(P1)集落形成率。相同方法测定第 5 代(P5)、第 10 代(P10)的集落形成率。

$$\text{集落形成率} = \frac{\text{平均集落数}}{\text{种入的单个细胞数}} \times 100\%$$

2 结果

2.1 MSC 的分离、扩增

骨髓单核细胞悬液接种于塑料培养瓶,细胞呈圆形,散在分布于瓶底,72 h 可见细胞贴壁,形态均一呈长梭形,细胞集落由几个或 10~20 个细胞组成(图 1),培养 15~18 d 细胞接近融合(图 2),每个克隆约数百至数千个细胞,集落间重叠,细胞形态均一,黏附于贴壁细胞之上的杂细胞在换液的过程中逐渐被清除。接近融合的 MSC 经胰酶 37 °C 消化后可获得 $(5\sim6)\times 10^5$ 个 MSC。传代细胞 24 h 内完全贴壁、伸展,重新变为长梭形,增殖生长迅速,生长潜伏期较短,约 1~2 d,培养 7~10 d 即达

到完全融合。体外扩增 5 代细胞数约 1×10^8 ,扩增 10 代细胞数约 2×10^{10} ,扩增 15 代可获得的细胞数为 $(3\sim4)\times 10^{12}$ 。

2.2 hMSC 表面标志的测定

本实验检测了 10 个样本,结果显示细胞均一性较好,二代细胞均一性在 95% 以上,CD11a、CD14、CD33、CD34、CD45、CD38、CD80、CD86、CD117 表达为阴性,证明这一类细胞为非造血类细胞。CD29、CD59、CD44、CD90、CD105、CD166 表达阳性。图 5 为部分样本流式细胞仪检测的结果。

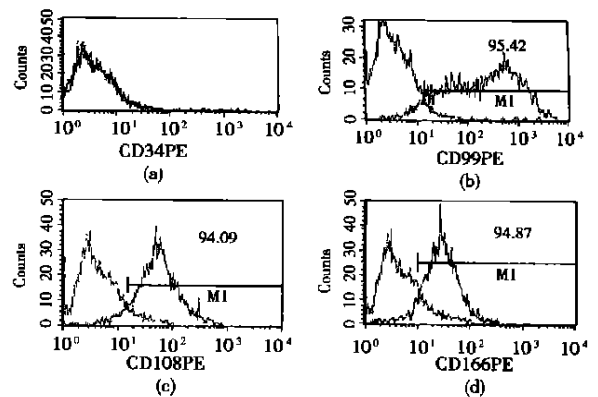


图 5 骨髓间质干细胞表面标志抗原表达

Fig 5 The expression of cell surface antigen on mesenchymal stem cells

a. unexpression CD34; b. CD90 positive cells ratio 95.42%; c. CD105 positive cells ratio 94.09%; d. CD166 positive cells ratio 94.87%

2.3 不同类型培养液对 MSC 生长的影响

用 RPMI 1640 培养基未见贴壁细胞。用 α -MEM 培养基见少数宽大、扁平的贴壁细胞,增殖速度慢,未见克隆形成。MSC 原代培养,用 L-DMEM 培养基和 H-DMEM 培养基生长情况均较好,接种后 72 h 可见长梭形贴壁细胞出现,增殖速度较快,15~18 d 细胞接近融合。P5 代以细胞数密度为 $10^4/\text{cm}^2$ 接种于 6 孔板,用 H-DMEM 培养基,细胞形态宽大扁平(图 3),而用 L-DMEM 培养基,细胞形态仍为均一的长梭形(图 4),图 6 为 L-DMEM 和 H-DMEM 对 P5 代 MSC 生长的影响,采用重复测量数据的方差分析方法检验,结果为 $F=2894.246$, $P=0.000$,有统计学意义,说明 L-DMEM 有利于 MSC 的培养扩增。

2.4 3 种体积分数血清对 MSC 生长影响

P5 代 MSC 以相同的细胞数密度 $1\times 10^6/\text{cm}^2$ 分别接种于含 100 mL/L、150 mL/L、200 mL/L 血

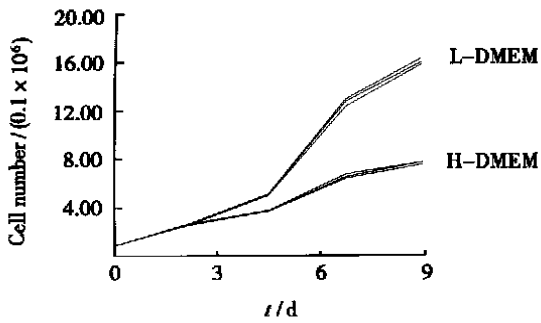


图6 L-DMEM和H-DMEM对P5代hMSC生长的影响

Fig 6 The influence of L-DMEM and H-DMEM on the growth of P5 mesenchymal stem cells (n = 3)

清的L-DMEM培养条件,9d后获得的细胞数依次为 $(1.5 \pm 0.31) \times 10^7$ 、 $(1.5 \pm 0.26) \times 10^7$ 、 $(1.6 \pm 0.17) \times 10^7$,实验结果用方差分析,差异无显著性($F = 0.348, P = 0.720 > 0.05$),提示含100 mL/L血清的L-DMEM已可满足MSC的培养条件。

2.5 MSC克隆形成能力

将低密度细胞接种到培养板上,可形成散在分布的克隆,本实验分析3个样本,P1代克隆形成率平均为25%,P5代平均为14.2%,P10代平均为4.5%,随着传代次数增加克隆形成率逐渐降低,10代以后无明显克隆出现。

3 讨论

骨髓间质干细胞(MSC)具有多向分化潜能,是组织工程中较理想的种子细胞之一。但MSC在骨髓中含量极少(大约 1×10^5 单核细胞中含有1个MSC),因此对体外培养、扩增条件的要求比较严格。本实验基于Fredenstein方法进行改进,在含100 mL/L FCS的L-DMEM培养基条件下进行体外大量扩增,原代可获得 $(5 \sim 6) \times 10^5$ 个细胞,传至P5代仍可获得 1×10^8 个细胞,而且细胞均一性达95%以上,与国外的以往的研究结果相近。扩增15代,细胞数约 $(3 \sim 4) \times 10^{12}$,基本满足组织工程的需要。

对MSC培养条件中培养液的选择存在不同意见。本实验探讨了不同培养液对MSC贴壁和增殖的影响,发现用RPMI 1640培养基时没有贴壁细胞出现,用 α -MEM培养基有贴壁MSC出现但增殖速度较慢,提示上述两种培养基均不适合MSC的体外培养扩增。用H-DMEM和L-DMEM培养基,原代MSC的贴壁和增殖无显著差别,但随着传代次数增加,用H-DMEM培养的细胞逐渐变得宽

大,且增殖速度明显减慢,而用L-DMEM培养的MSC增殖速度保持稳定,贴壁细胞形态未发现显著改变,显然L-DMEM更适合MSC的培养和扩增。培养液中血清含量的选择也有不同的报道,在100~200 mL/L范围内均有采用。本实验对比研究了含100 mL/L、150 mL/L、200 mL/L血清的L-DMEM培养液对MSC贴壁和增殖的影响,结果差异无显著性,选用含100 mL/L血清的L-DMEM已可满足MSC培养和扩增的需要。

MSC的克隆形成能力和细胞增殖曲线的结果显示MSC有很强的增殖能力,但随着传代次数增加,克隆形成能力逐渐下降,10代以后无明显克隆形成。细胞增殖曲线显示MSC传代细胞的生长潜伏期较原代MSC明显缩短,仅1~2 d。传代过程中细胞形态会发生改变,部分细胞由原来的长梭形转变为宽大、扁平的细胞,增殖速度逐渐减慢。至15代后细胞出现增殖速度明显减慢、细胞核固缩、细胞脱落死亡等明显的衰老现象。

文献报道MSC表面标志并非单一性,它表达间质细胞、内皮细胞和表皮细胞的表面标志,一般认为整合素家族成员CD29、粘附分子CD44、CD166及CD105等是MSC的重要标志物^[4],而且MSC不是造血类细胞,不表达造血细胞表面抗原,如造血前体细胞标志抗原CD34、成熟造血细胞标志抗原CD38、泛白细胞标志抗原CD45、淋巴细胞表面抗原CD11a和单核细胞/巨噬细胞表面抗原CD14。本实验结果与上述报道相似,证明所分离培养扩增的细胞是间质干细胞。实验发现MSC不表达共刺激因子B7-1(CD80)和B7-2(CD86),证实MSC是一种免疫缺陷的细胞,可能不引起T淋巴细胞识别,提示MSC可用于异体移植。

(感谢骆福添教授的协助,对本文结果2.3作统计学分析)

(本文图1~4见封4 Fig 1~4 Shown in back cover)

参考文献:

- [1] Johansson C B, Momma S, Clarke D L, *et al*. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system [J]. *Cell*, 1999, 96(1): 25.
- [2] Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, *et al*. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro* [J]. *J Clin Invest*, 1999, 103(5): 697.
- [3] 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.
- [4] Pittenger M F, Mackay A M, Jaiswal S C, *et al*. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *J Science*, 1999, 284(5411): 143.

(编辑 张敏瑞)

成人骨髓间质干细胞基本生物学特性 (正文见第 170 页)

Basic Biological Characteristics of Human Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells

(Text in page 170)

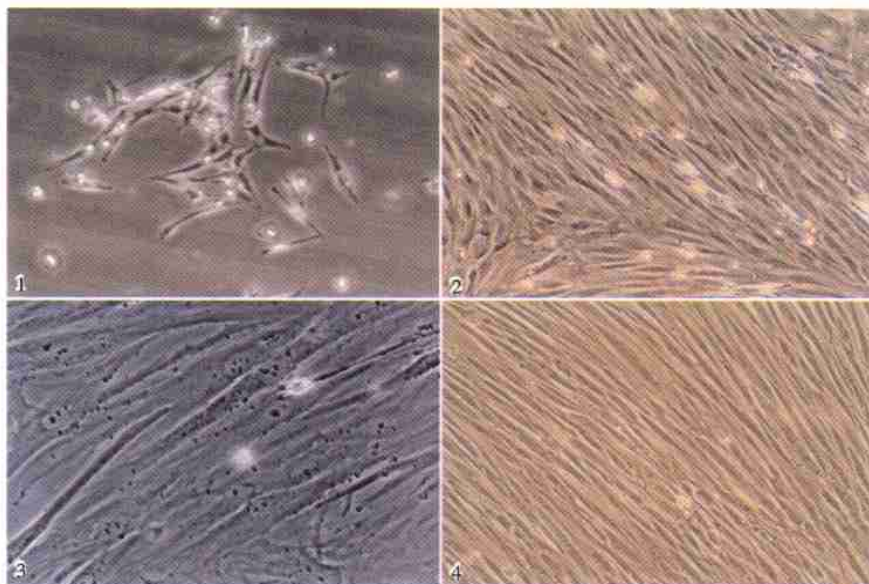


图 1 72 h 换液后的贴壁细胞

图 2 接近融合的原代 hMSC

图 3 H-DMEM 培养的 P5 代 hMSC

图 4 L-DMEM 培养的 P5 代 hMSC

Fig. 1 Primary mesenchymal stem cells were cultured at 72 h after plating ($\times 40$)

Fig. 2 Primary mesenchymal stem cells reach to confluence at 15 days after plating ($\times 40$)

Fig. 3 P5 Mesenchymal stem cells cultured with H-DMEM ($\times 100$)

Fig. 4 P5 Mesenchymal stem cells cultured with L-DMEM ($\times 40$)

兔动脉损伤后血管外膜及其细胞增殖活性的变化 (正文见第 194 页)

Changes of Vascular Adventitia and Cell Proliferation After Arterial Injury in Rabbits (Text in page 194)

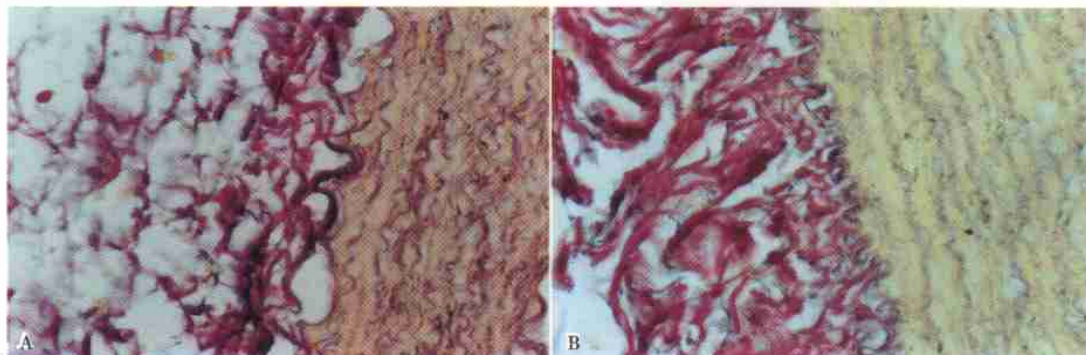


图 1 动脉损伤后血管外膜厚度

Fig. 1 Thickness of vessel adventitia after arterial injury ($\times 20$)

A: Control group; B: 3 d after arterial injury