

基础研究

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2012.08.010

兔骨髓间充质干细胞的体外分离、培养及诱导分化

张超,王涛

(重庆市口腔疾病与生物医学研究中心、重庆医科大学附属口腔医院颌面外科,重庆 400015)

【摘要】目的:研究兔骨髓间充质干细胞(Rabbit bone marrow mesenchymal stem cells,rBMSCs)的体外分离培养,观察其生长特性并探讨其定向诱导分化为成骨细胞和成脂肪细胞的途径,为种子细胞的选择提供一定的实验基础。方法:乌拉坦麻醉下耳缘静脉空气栓塞处死兔子,无菌条件下取出兔股骨,用 percoll 液密度梯度离心法+全骨髓贴壁培养法相结合进行体外培养、传代,倒置显微镜下观察细胞形态。取第 3 代细胞向成骨细胞和成脂肪细胞诱导,14 d 后成骨细胞诱导组检测碱性磷酸酶,成脂肪细胞诱导组进行油红 O 染色。结果:percoll 密度梯度离心法+全骨髓贴壁培养法可成功获得 rBMSCs,具有活跃的增殖能力。第 3 代细胞的生物学特征基本一致,并能定向诱导分化为成骨细胞及成脂肪细胞。成骨细胞诱导组碱性磷酸酶检测表达呈强阳性,成脂肪细胞诱导组油红 O 染色见胞浆内出现大量红染脂滴。结论:percoll 密度梯度离心法+全骨髓贴壁培养法可成功分离和培养 rBMSCs,其生长稳定,增殖力强,能定向诱导分化为成骨细胞及成脂肪细胞,可见 rBMSCs 是组织工程的优良种子细胞。

【关键词】骨髓间充质干细胞;定向分化;兔**【中国图书分类法分类号】**R318.0**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2012-02-08

Isolation, cultivation and differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells in vitro

ZHANG Chao, WANG Tao

(Chongqing Research Center for Oral Diseases and Biomedical Science; Department of Maxillofacial Surgery, the Affiliated Stomatology Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the isolation and cultivation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells(rBMSCs) in vitro, to observe their biological characteristics and to discuss the paths of inducing the rBMSCs into osteoblasts and lipoblasts in order to provide experimental basis for selecting seed cells. **Methods:** The rabbit was put to death by air embolism to the ear marginal vein with the anesthesia of urethane. The femur of the rabbits was got under the sterilized condition. rBMSCs were separated by percoll density gradient centrifugation method and the whole bone marrow adherence culture method in vitro. The morphology of cells was observed by inverted microscope. At the third passage, rBMSCs were chosen to be induced into osteoblasts and lipoblasts. After 14 d of incubation, alkaline phosphatase detection was used in osteoblast-induced group and oil red O staining was performed in lipoblast-induced group. **Results:** The rBMSCs with good reproductive activities were obtained successfully by percoll density gradient centrifugation and the whole bone marrow adherence culture method. The biological characteristics of the cells in the third generation were identical. In osteoblast-induced group, alkaline phosphatase test showed strong positive expression. After oil red O staining, there was a large number of intracytoplasmic lipid droplets stained red in lipoblast-induced group. **Conclusions:** rBMSCs can be isolated and proliferated effectively by percoll density gradient cen-

作者介绍:张超(1988-),女,硕士,

研究方向:口腔颌面外科。

通信作者:王涛,男,教授,Email:taosan@126.com。

nant tumours-7th edition[J].Klin Onkol,2011,24(2):149-150.

[7] Jiang J, Wu C, Shen Y, et al. Clinical application of determining serum AFP-IgM complexes for diagnosis of small hepatocellular carcinoma[J]. Anticancer Res, 2011, 31(2): 687-691.

[8] Baig J A, Alam J M, Mahmood S R, et al. Hepatocellular carcinoma (HCC) and diagnostic significance of A-fetoprotein (AFP) [J]. J Ayub Med Coll Abbottabad, 2009, 21(1): 72-75.

[9] Trevisani F, D'Intino P E, Morselli-Labate A M, et al. Serum alpha-fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease; influence of HBsAg and anti-HCV status [J]. J Hepatol, 2001, 34(4): 570-575.

[10] Lee H Y, Jung J H, Kang Y S, et al. Clinical significance of transiently elevated serum AFP level in developing hepatocellular carcinoma in HBsAg positive-liver cirrhosis [J]. Korean J Gastroenterol, 2004, 43(4): 252-259.

[11] 何泽宝,朱坚胜,蔡修熙,等.甲胎蛋白与肝炎病毒关系研究[J].中华传染病杂志,2001,6(3):176-177.

He Z B, Zhu J S, Cai X X, et al. Relationship of Alpha-fetoprotein and hepatitis virus [J]. Chinese Journal of Infectious Diseases, 2001, 6(3): 176-177.

(责任编辑:冉明会)

trifugation method and the whole bone marrow adherence culture method. The cultured rBMSCs grow up and reproduce stably and could be induced and differentiated into osteoblasts and lipoblasts. So rBMSCs are excellent seed cells in tissue engineering.

【Key words】bone marrow mesenchymal stem cells; orientating differentiation; rabbits

近来研究发现骨髓间充质干细胞 (Bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 是存在于骨髓中非造血干细胞的另外一种干细胞^[1]。现普遍认为 BMSCs 是中胚层发育的早期细胞, 具有多向分化的潜能, 不仅能分化为造血实质, 支持造血, 还能分化为多种造血以外的细胞。在一定的实验条件下, 可以向中胚层和神经外胚层来源的组织细胞分化, 如成骨细胞^[2]、表皮细胞^[3]、软骨细胞^[4]、心肌细胞^[5]、成纤维细胞等^[6], 然而具体向哪一方向分化则是由周围微环境所调控。因此 BMSCs 成为组织工程及种子细胞研究的热点。理想的组织工程种子细胞应具备以下特点: 易获取、易体外培养扩增、对机体损伤小、具有较强的传代繁殖能力、组织修复能力强、植入体内能够耐受机体免疫以及具有良好的生物相容性^[7,8]。来源于自体 BMSCs 完全具备这些特点, 因而可以作为细胞移植的供体细胞。本实验旨在探讨一种体外分离、培养、扩增 BMSCs 的方法, 然后将培养的 BMSCs 向成骨细胞和成脂细胞进行诱导分化, 深入了解干细胞特性, 为进一步探讨其作为种子细胞应用于组织工程打下实验基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

胎牛血清 (FBS, Gibico 公司)、地塞米松、维生素 C、 β -磷酸甘油钠、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX) (美国 Sigma 公司); 碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, ALP) 染色试剂盒 (南方建成生物公司); CO₂ 恒温培养箱 (美国 Thermo 公司)、超净工作台 (苏州医疗设备厂)、光学显微镜 (日本 Olympus 公司)、倒置相差显微镜 (日本 Nikon 公司)、油红 O (上海雅吉生物科技有限公司)。

完全培养基的组成: DMEM 培养基加入 10% 胎牛血清, 青、链霉素终浓度均为 100 U/ml。

条件培养基的组成: 成骨诱导培养基, 完全培养基中加入地塞米松 10^{-8} mol/L、抗坏血酸 50 μ g/ml 及甘油磷酸钠 10 mmol/L; 成脂诱导培养基, 完全培养基中加入地塞米松 10^{-8} mol/L、抗坏血酸 50 μ g/ml 及 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 0.5 mmol/L。

1.2 实验用动物

选取普通级新西兰大白兔, 4~6 周龄 [由重庆医科大学实验动物中心提供, 动物质量合格证号: SCXK (渝) 2007-0001] 6 只, 雌雄不限。

1.3 实验方法

1.3.1 兔骨髓间充质干细胞 (Rabbit bone marrow mesenchy-

mal stem cells, rBMSCs) 分离与培养 20% 乌拉坦按 5 ml/kg 剂量麻醉新西兰大白兔, 耳缘静脉空气栓塞处死兔子, 无菌条件下取出兔股骨, 移入超净工作台。中间剪开骨干, 1 ml 注射器吸取培养基将髓腔内容物反复冲出。离心管内先加入 70% 的 percoll 液 3~4 ml, 再将髓腔内容物垂直加入离心管内, 离心 (2 000 r/min, 20 min), 核细胞形成白色云雾状的分层界面, 小心吸取该细胞层, 用含体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM 以 1 000 r/min 离心 5 min, 然后进行细胞计数。最后将细胞悬液以 10^6 个/ml 接种于 25 cm² 培养瓶, 将培养瓶置于温度为 37 $^{\circ}$ C、体积分数为 5% 的 CO₂ 饱和湿度培养箱中, 24 h 后观察其贴壁情况。3 d 后首次换液, 弃去未贴壁或已死去的细胞, 继续培养, 以后每隔 48 h 换液。贴壁细胞融合至 80%~90% 后用 0.25% 胰酶 37 $^{\circ}$ C 消化 (约 3 min)。用 DMEM 培养液终止消化, 轻轻吹打, 制成单细胞悬液, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入含 10% FBS 的 DMEM 培养液, 吹打成细胞悬液, 按照 1:2~1:3 的比例进行传代培养, 倒置显微镜下逐日观察细胞形态及生长情况。把原代细胞记为 P₀, 以后依次为 P₁, P₂, P₃……

1.3.2 细胞爬片的制作及成骨诱导 1 cm² 盖玻片用洗涤灵清洗干净, 泡酸 24 h, 自来水洗 10 遍, 过蒸馏水, 95% 酒精浸泡过夜, 蒸馏水洗 2 遍, 风干, 高压灭菌, 铺于 24 孔板底备用。取生长状态良好的第 3 代细胞以 2.0×10^4 个/ml 接种于预置有盖玻片的 24 孔培养板中。1~2 d 后待细胞达到 80%~90% 融合时, 改用成骨诱导培养基, 每 48 h 换液, 14 d 后取出玻片, 进行 ALP 染色及茜素红染色, 每组随机抽取 5 张爬片, 每组爬片随机观察 500 个细胞, 计数阳性细胞个数, 并计算其百分率。

1.3.3 成脂诱导 取第 3 代 rBMSCs, 0.25% 胰酶消化下来后离心 (1 000 r/min, 5 min), 去上清, 重悬细胞, 吹打混匀计数以 2.0×10^4 个/ml 接种于预置有盖玻片的 24 孔培养板中, 常规培养细胞贴壁融合至 80%~90% 后培养液改为成脂诱导培养基, 每隔 48 h 换液, 诱导 2 周后取出玻片, 进行油红 O 染色, 每组随机抽取 5 张爬片, 每组爬片随机观察 500 个细胞, 计数阳性细胞个数, 并计算其百分率。

2 结果

2.1 rBMSCs 细胞形态特点

原代细胞培养 24 h 后倒置显微镜下观察其生长情况, 可见少数单个核细胞贴壁, 呈短小梭形或多角形, 散在分布。3 d 后首次换液, 见贴壁细胞数量增多, 呈散在或集落样生长 (图 1)。6~10 d 后细胞增殖速度加快并且集落与集落间细胞发生融合, 细胞可达 90% 融合, 排列呈漩涡状或辐射状, 细胞形态以长梭形为主, 可传代 (图 2)。经传代后, 细胞生长迅速, 接种 3~4 h 已见细胞贴壁, 2~3 d 后可传下 1 代。传至第 3 代时, 细胞形态均一, 呈长梭形贴壁, 生长呈鱼肉状 (图 3)。

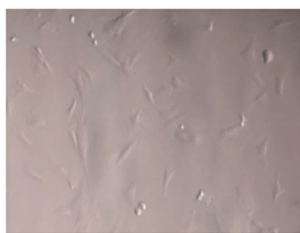


图 1 原代 rMSCs P_0 , 3 d (40 $\times$)
Fig.1 Original generation of rMSCs
 P_0 , 3 d (40 $\times$)

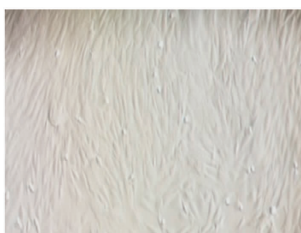


图 2 原代 rMSCs P_0 , 8 d (40 $\times$)
Fig.2 Original generation of rMSCs
 P_0 , 8 d (40 $\times$)

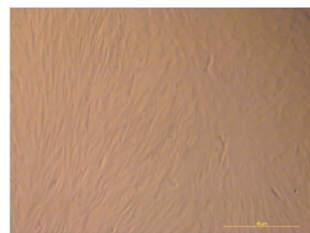
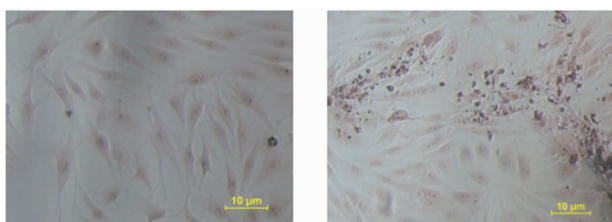


图 3 第 3 代 rMSCs P_3 (40 $\times$)
Fig.3 The third generation of rMSCs
 P_3 (40 $\times$)

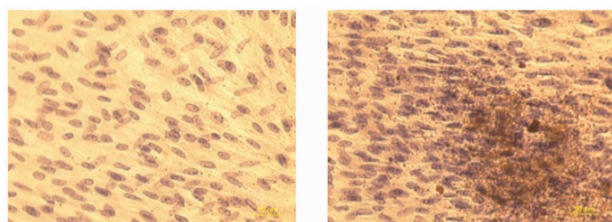
2.2 成骨细胞诱导分化鉴定

对诱导 2 周的细胞进行茜素红染色,可见大量红色矿化结节,阳性率为 45%,对照组染色未见明显结节(图 4)。ALP 染色,胞浆内出现较多的棕红色颗粒,实验组细胞呈强阳性,阳性率为 87%;对照组呈弱阳性约为 31%(图 5)。



A. 对照组 (茜素红染色, 100 $\times$) B. 实验组 (茜素红染色, 100 $\times$)
图 4 成骨诱导矿化结节的染色

Fig.4 Staining of osteogenic induced mineralized nodule



A. 对照组 (ALP 染色, 100 $\times$) B. 实验组 (ALP 染色, 100 $\times$)
图 5 成骨诱导 ALP 的染色

Fig.5 Staining of osteogenic induced ALP

2.3 成脂细胞诱导分化鉴定

显微镜下观察发现 rBMSCs 诱导 2 周后的细胞变得较大,细胞核周围可见空泡样颗粒(图 6)。对诱导 2 周后的细胞进行油红 O 染色,可见细胞内有红色脂滴,有的融合成大脂滴,有的成串珠样排列,阳性率高达 80%。对照组进行油红 O 染色未见明显胞内红色颗粒(图 7)。

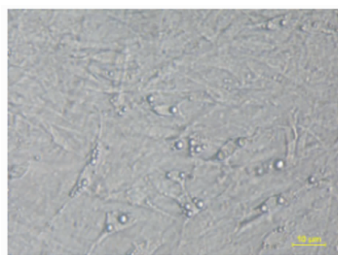
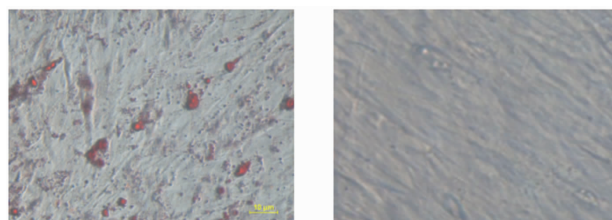


图 6 诱导成脂肪细胞实验组 (未染色, 100 $\times$)
Fig.6 Experimental group of adipogenic inducement
(no staining, 100 $\times$)



A. 实验组 (油红 O 染色, 100 $\times$) B. 对照组 (油红 O 染色, $\times 100$)

图 7 成脂诱导脂肪滴的染色

Fig.7 Staining of adipogenic induced fat drops

3 讨论

Friedenstein 等^[9]早在 1976 年就发现骨髓中存在着骨髓多能基质干细胞(Marrow stromal cells),其是一类具有多向分化潜能的干细胞,在体外不同条件下可分化成为多种细胞,如成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肌肉细胞和神经元细胞等。由于 BMSCs 独特的生物学特征及应用前景,成为目前研究的热点之一。BMSCs 属于未分化的前体干细胞,其细胞表型的分化尚不成熟,同种异体移植的排斥反应就比较弱,而且其可塑性强,因此具有成为良好种子细胞先决条件。

目前常用于分离 BMSCs 的方法主要有 4 种:全骨髓贴壁培养法、密度梯度离心法、流式细胞仪分选法和免疫磁珠分选法。①全骨髓贴壁培养法:将获得的骨髓直接加入完全培养基后培养,利用 BMSCs 贴壁生长的特性,通过换液逐渐清除其中的外周血细胞及造血干细胞等不贴壁细胞,从而纯化 BMSCs。②密度梯度离心法:利用 percoll 或 ficoll 分离液将骨髓中密度不同的细胞分开,从而得到单个核细胞进行培养。③流式细胞分选:根据 BMSCs 细胞体积小,相对缺少颗粒的特性对它进行分选。④免疫磁珠分选法:通过 BMSCs 不表达 CD34、CD45 进而纯化细胞。后 2 种方法较为复杂,费用昂贵,且对细胞活性有一定的影响。

张明鸣等^[10]认为,在遵循科学操作流程的基础上,采用全骨髓贴壁筛选法分离培养 BMSCs 是 1 种

快速、可靠、简便、稳定的技术方法。本实验采用的是密度梯度离心和全骨髓培养相结合的方法来分离 rBMSCs, 避免了用流失细胞分选及免疫磁珠分选而造成的细胞活性破坏。本实验先采用 percoll 淋巴细胞分离液分选出全骨髓中的单个核细胞, 再通过全骨髓贴壁筛选法分离并纯化出其中的贴壁细胞-BMSCs。采用这 2 种方法结合与单纯全骨髓贴壁筛选法相比, 能预先排除一些非目的细胞, 有利于下一步的纯化。本次试验证明了采用密度梯度离心和全骨髓培养法相结合能成功分离出 BMSCs, 且获得的 BMSCs 生物学特性稳定。由于目前并未发现特异性的分子标记来鉴定 BMSCs, 故本实验试图通过观察细胞形态和诱导细胞多向分化相结合的方法证实分离培养的细胞确为 BMSCs, 结果显示, 培养的细胞经诱导后可分化为成骨细胞和成脂细胞, 进一步表明该细胞群具有分化潜能, 符合干细胞特征, 而不是骨髓内的其他成熟细胞。

成骨诱导方案:在磷酸甘油钠、维生素 C 和地塞米松的诱导下, BMSCs 能够向成骨细胞分化, ALP 增高, 形成钙结节。其中地塞米松可诱导 BMSCs 分化表达骨钙素, 增加骨桥素和 I 型胶原 mRNA, 提高 BMSCs 对甲状旁腺激素和前列腺素反应的环磷酸酰苷水平^[11]。维生素 C 的作用是促进培养的细胞合成胶原, 促进钙化, 并能调节 ATP、ALP 活性和非胶原基质蛋白的合成。甘油磷酸钠在培养液中迅速被 ALP 水解, 产生大量磷酸离子, 促进生理性钙盐的沉积和钙化, 这是成骨的必要条件^[12]。本次实验组中, ALP 染色较对照组阳性反应更明显, 茜素红染色可见钙结节。

成脂诱导方案:采用地塞米松、维生素 C、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤联合诱导 BMSCs 向成脂肪细胞分化。地塞米松通过激活糖皮质激素受体诱导生成, 同时减少抑制脂肪细胞分化的因子表达。3-异丁基-1-甲基黄嘌呤可增强环磷酸酰苷的表达水平, 对维持和促进脂肪细胞形成起到了关键作用^[13]。经油红 O 染色鉴定, 细胞内形成大量脂肪滴。BMSCs 生物特征稳定, 具有良好的多向分化潜能, 是组织工程中优良种子细胞。在进一步的实验研究中, 将对诱导后的细胞进行定量分析。

(致谢: 本次实验感谢日本 HI-LEX 公司中国分公司总经理张本炎先生提供的经费支持。)

参 考 文 献

[1] Gafni Y, Turgeman G, Libergal M, et al. Stem cells as vehicles for orthopedic gene therapy[J]. Gene Therapy, 2004, 11(4): 417-426.
[2] 李雪峰, 刘 亮, 王 东. 大鼠骨髓间充质干细胞体外向成骨细

胞分化培养的生物学特性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(23): 4185-4188.

Li X F, Liu L, Wang D. Biological characteristics of in vitro differentiation of bone marrow stromal cells into osteoblasts in rats[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2011, 15(23): 4185-4188.

[3] 李凌云, 杜 荣, 范熙明. 体外培养人骨髓间充质干细胞向表皮细胞分化及表皮细胞角蛋白的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(36): 6661-6664.

Li L Y, Du R, Fan X M. Mesenchymal stem cells can differentiate to epidermal cells and express keratins in vitro[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2011, 15(36): 6661-6664.

[4] 俞 猛, 于 方, 付胜良. 兔骨髓间充质干细胞体外培养定向诱导分化为软骨细胞[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(27): 4951-4954.

Yu M, Yu F, Fu S L. Differentiation of rabbit mesenchymal stem cells into chondrocytes in vitro[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2011, 15(27): 4951-4954.

[5] Xu W, Zhang X, Qian H, et al. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro[J]. Exp Bio Med, 2004, 229(7): 623-631.

[6] 付洪海, 何 悦. 骨髓间充质干细胞向成纤维细胞分化的研究进展[J]. 中国口腔颌面外科杂志, 2011, 9(3): 248-251.

Fu H H, He Y. Research advances of fibroblastic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. China Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 2011, 9(3): 248-251.

[7] Jadlowiec J A, Celil A B, Hollinger J O. Bone tissue engineering: recent advances and promising therapeutic agents[J]. Expert Opin Biol Ther, 2003, 3(3): 409-423.

[8] Rose F R, Oreffo R O. Bone tissue engineering: hope vs. hype[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 292(1): 1-7.

[9] Friedenstein A J, Gorskaja J F, Kulagina N N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs[J]. Exp Hematol, 1976, 4(5): 267-274.

[10] 张明鸣, 贾贵清, 罗 婷, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞体外两种分离方法和培养条件下生物学特点的比较[J]. 华西医学, 2009, 24(2): 371-374.

Zhang M M, Jia G Q, Luo T, et al. The comparison of biological characteristic in two method to separate and culture the bone marrow mesenchymal stem cells in vitro[J]. West China Medical Journal, 2009, 24(2): 371-374.

[11] Bellows C G, Heersche J N, Abin J E. Determination of the capacity for proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in the presence and absence of dexamethasone[J]. Developmental Biology, 1990, 140(1): 132-138.

[12] 郝瑞锋. 骨髓间充质干细胞向成骨细胞诱导的研究现状[J]. 天津医科大学学报, 2007, 13(1): 129-131.

Hao R F. The current research of inducing bone marrow mesenchymal into osteoblast[J]. Journal of Tianjin Medical University, 2007, 13(1): 129-131.

[13] Kim S S, Choi J M, Kim J W, et al. cAMP induces neuronal differentiation of mesenchymal stem cells via activation of extracellular signal-regulated kinase/MAPK[J]. Molecular Neuroscience, 2005, 16(12): 1357-1361.

(责任编辑: 冉明会)