

大鼠骨髓间充质干细胞的分离、培养与鉴定

葛志敏^{1,2}, 郭中豪², 高飞²

1. 山西医科大学第一临床医学院, 山西 太原 030001; 2. 山西医科大学第一医院内分泌科, 山西 太原 030001

摘要: **目的** 探讨体外分离、培养与鉴定大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)的方法。**方法** 采用贴壁法培养大鼠 BMSCs,倒置相差显微镜观察细胞形态,绘制细胞生长曲线;流式细胞仪检测细胞周期、细胞表面抗原标志物;成骨与成脂诱导液诱导 BMSCs 向成骨细胞与脂肪细胞分化。**结果** BMSCs 贴壁生长,呈均一长梭形,生长曲线呈“S”型。细胞周期测定大部分处于 G1/G0 期。P3 代细胞高表达抗原 CD29、CD44,基本不表达 CD45 抗原,符合 BMSCs 表面标志物特征。成脂诱导液诱导 BMSCs 分化 21 d 后,油红 O 染色可见胞内脂滴出现;成骨诱导 28 d 后,茜素红染色可见连成一片的红色钙结节。**结论** 采用贴壁培养法可纯化、扩增 BMSCs;BMSCs 细胞表面抗原标志物特性为稳定表达 CD44、CD29,不表达 CD45;BMSCs 具有成骨和成脂分化潜能。

关键词: 骨髓间充质干细胞;成骨分化;成脂分化;细胞培养;流式细胞仪

中图分类号: R-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2015)07-0836-04

Isolation, culture and identification of bone marrow mesenchymal stem cells in rats

GE Zhi-min*, Guo Zhong-hao, GAO Fei

*Department of Endocrinology, First Clinical Medical School of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China

Corresponding author: GAO Fei, E-mail: 437987554@qq.com

Abstract: Objective To investigate the isolation, culture and identification of rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) in vitro. **Method** Rat BMSCs were cultured by adherent culture method. The cell morphology was observed by inverted phase contrast microscope, and the cell growth curve was drawn. The cell cycle and cell surface antigen marker were detected by flow cytometry, and BMSCs were induced to osteoblast and adipocyte by osteoblast and adipocyte inducing fluid. **Results** The BMSCs of adherent growth presented uniform long spindle-shaped look. The growth curve showed an “S” type. The detection of cell cycle showed that most of the cells were in G0/G1 phase. It was in agreement with the characteristics of the surface antigen markers that the P3 generation BMSCs expressed CD29 and CD44 antigens highly and didn't express CD45 antigen basically. Twenty-one days after differentiation induced by adipocyte inducing fluid, intracellular lipid droplets in BMSCs were seen by Oil Red O staining, and 28 days after differentiation induced by osteoblast inducing fluid, the coadjacent red calcium nodules were found by Alizarin red staining. **Conclusions** BMSCs could be purified and amplified by adherent culture method. The characteristics of surface antigen markers of BMSCs are to stably express CD44 and CD29 and not to express CD45. BMSCs have the potential of osteogenic and adipogenic differentiation.

Key words: Bone marrow mesenchymal stem cells; Osteogenic differentiation; Adipogenic differentiation; Cell culture; Flow cytometry

骨髓间充质干细胞(BMSCs)是属于中胚层的一类多能干细胞,以骨髓组织中含最为丰富,具有自我更新和多向分化的潜能^[1]。由于其取材方便,易于分离培养,免疫排斥反应小,是生物工程理想的种

子细胞,具有潜在的临床应用价值。BMSCs 缺乏特异性表面标志物,对其鉴定尚无统一的标准。本实验从细胞对塑料底物贴壁生长的特性、表面标志物、多向分化潜能对其进行鉴定。

1 材料与方法

1.1 实验动物 4 周龄 SD 清洁级大鼠 3 只,雄性,体重 100 g 左右。由山西医科大学动物实验中心提供。

1.2 实验材料及仪器 DMEM/F12 培养基(武汉博

DOI: 10.13429/j.cnki.cjcr.2015.07.002

基金项目: 山西省科技厅社会发展基金资助项目(20130313022-4); 太原市社会发展科技资助项目(11027604)

通讯作者: 高飞, E-mail: 437987554@qq.com

士德公司), 胎牛血清、0.25% 胰蛋白酶 (GIBCO 公司), 青链霉素 (武汉博士德公司), 成骨诱导培养基、成脂诱导培养基 (Cyagen), 倒置相差显微镜 (日本奥林巴斯光学工业株式会社), 超净工作台 (苏洁净化), 细胞培养箱 (日本三洋公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 BMSCs 的提取与培养 4 周 SPF 级 SD 雄性大鼠 3 只, 脱颈法处死, 75% 乙醇浸泡 5 min, 无菌条件下分离出股骨和胫骨, PBS 反复冲洗, 去除干骺端暴露骨髓腔, 用 10 ml 注射器抽取含 10% 胎牛血清的培养基冲洗骨髓腔, 细胞吹打均匀后, 将细胞以 1.0×10^6 cells/ml 的密度种植于 25 cm² 培养瓶中, 37 °C 5% CO₂ 细胞培养箱中培养, 48 h 后细胞首次全量换液, 以后每 3 天换液 1 次。

1.3.2 BMSCs 的生长曲线测定 取 P3 代 BMSCs 用胰酶消化后, 调整细胞浓度为 1.0×10^4 cells/ml 种植于 24 孔细胞培养板, 每孔 1 ml, 每天取出 3 孔, 用血细胞计数板计数, 取平均值, 连续观察 7 d, 绘制细胞生长曲线。

1.3.3 BMSCs 细胞周期鉴定 取生长良好的 P3 代 BMSCs 细胞, 细胞数量约 1.0×10^6 cells, 经胰酶消化后, 用 PBS 清洗细胞 2 遍, 4 °C 冰乙醇固定, PBS 洗 2 次, 加入 RNaseA 20 μl, 离心去上清液, 加入碘化丙啶, 4 °C 避光保存, 30 min 后流式细胞仪上机检测。

1.3.4 BMSCs 的成骨分化 取对数生长期的 P3 代细胞, 当细胞融合至 80% ~ 90% 时, 胰酶消化后, 调整细胞密度为 3.0×10^4 cells/cm² 接种于 6 孔细胞板, 置于 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养。24 h 后换成成骨诱导培养基, 每孔 2 ml, 以后每 3 天换液 1 次。28 d 后, 茜素红染色, 显微镜下观察, 拍照。

1.3.5 BMSCs 的成脂分化 取对数生长期的 P3 代细胞, 当细胞融合至 80% ~ 90% 时, 胰酶消化后, 调整细胞密度为 2.0×10^4 cells/cm² 接种于 6 孔细胞

板, 置于 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养。待细胞铺满后, 换成成脂诱导培养基 A, 3 d 天后换成成脂诱导培养基 B, 维持 1 d。如此 3 个循环后, 成脂诱导培养基 B 维持 7 d。21 d 后, 油红 O 染色, 显微镜下观察, 拍照。

2 结果

2.1 细胞形态及生长曲线 倒置相差显微镜下观察, 首次提取的 P0 代细胞悬浮于培养基中, 细胞呈圆形, 大小不均, 数量较多。48 h 后首次全量换液, 去除悬浮细胞, 可见散在分布的贴壁细胞呈圆形、多角形、短梭形。5 d 后细胞呈集落状分布, 长梭形细胞多见, 10 d 左右细胞融合至 80% ~ 90%, 传代后呈形态均一的长梭形、纺锤形, 折光性强。P3 代细胞生长曲线呈“S”型, 接种后 1 ~ 2 d 为潜伏期, 细胞生长较慢, 3 ~ 5 d 进入对数生长期, 7 d 左右进入平台期。见图 1。

2.2 细胞周期及表面标志物测定结果 BMSCs 周期中 G1/G0 期 77.66%, G2 + M + S 期为 22.34%, 见图 2。P3 代 BMSCs CD29 阳性细胞比率为 79.95%, CD44 阳性细胞比率为 84.19%, CD45 阳性细胞比率为 1.33%。见图 3。

2.3 BMSCs 多向分化能力的鉴定 (1) BMSCs 成骨诱导的鉴定: BMSCs 成骨诱导后 10 d 左右, 细胞体积增大, 由长梭形逐渐呈多角形、短梭形改变, 细胞聚集生长, 呈“鹅卵石”状排列。随时间延长形成多层细胞, 28 d 后茜素红染色可见红色钙化结节, 连成一片。见图 4a。(2) BMSCs 成脂诱导的鉴定: BMSCs 成脂诱导 1 周后, 细胞逐渐由长梭形变为椭圆形、圆形, 出现折光性强的小脂滴; 随时间延长, 小脂滴逐渐融合形成大脂滴, 21 d 后油红 O 染色可见胞浆内红色脂滴。见图 4b。

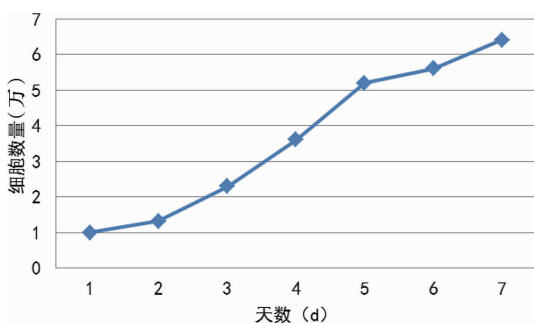


图 1 BMSCs 生长曲线鉴定

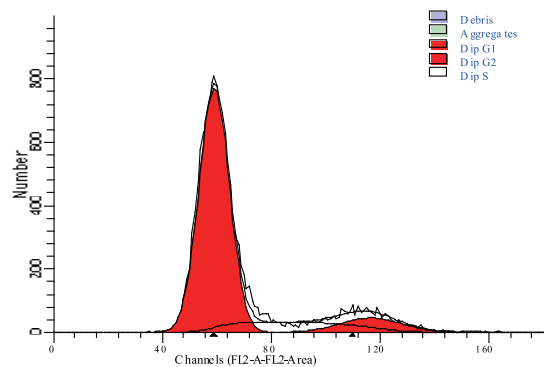


图 2 P3 代 BMSCs 细胞周期鉴定

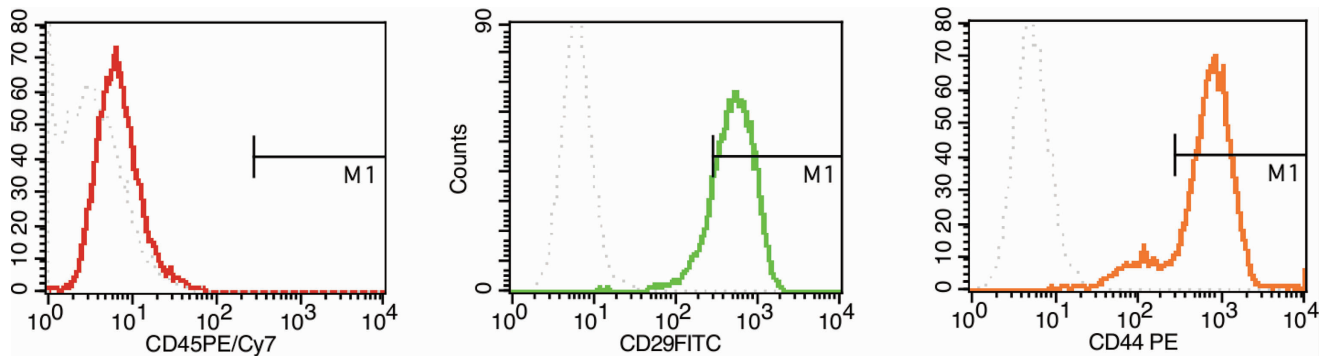
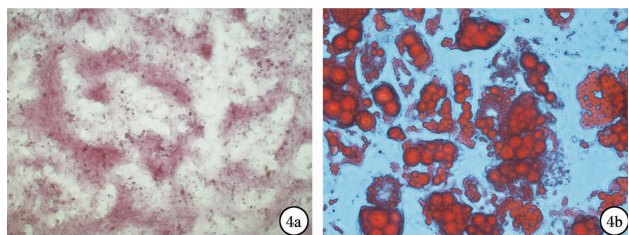


图3 流式细胞仪检测 BMSCs 表面抗原



注:4a:BMSCs 成骨诱导($\times 40$);4b:BMSCs 成脂诱导($\times 100$)。

图4 BMSCs 多向分化能力的鉴定图

3 讨论

目前, BMSCs 的体外分离方法主要有贴壁法、密度梯度离心法、流式细胞术和免疫磁珠分选法^[2]。密度梯度离心法根据骨髓中不同类别细胞的密度不同, 采用离心法将 BMSCs 与其他细胞分离开, 此法操作要求严格, 人为操作误差大会影响细胞的纯度。流式细胞术和免疫磁珠分选法依据细胞特异性表面标志物来纯化 BMSCs, 由于 BMSCs 缺乏特异性表面标志物, 此法对细胞损伤大, 细胞需要量较大, 故其在实际应用中受到限制。贴壁法是根据 BMSCs 贴壁生长的特性, 通过换液去除不贴壁的杂细胞。骨髓中主要有 BMSCs 和造血细胞, BMSCs 对塑料底物有贴壁的特性^[3], 而造血细胞无贴壁特性, 可通过换液将其去除。由于贴壁法所得细胞分化潜能好, 且能缩短原代细胞培养时间, 方法简单易行, 是目前普遍采用的一种方法。因此, 本实验采用贴壁法分离纯化 BMSCs。

采用贴壁法通过换液去除漂浮的造血细胞及组织碎片, 经多次传代得到纯化的 BMSCs, 倒置相差显微镜下观察 P0 代细胞 48 h 后贴壁生长, 传代后的 BMSCs 4 h 后开始贴壁生长, 为形态均一的长梭形, 呈漩涡状、集落状分布。细胞生长曲线呈 S 型。细胞周期测定大部分细胞处于 G1/G0 期, 即大部分细胞处于静止期, 少部分处于功能状态, 符合干细胞周期特点^[4]。

BMSCs 由于缺乏特异性的表面标志物, 目前对其鉴定尚无统一的标准, 研究发现^[5], BMSCs 主要表达生长因子、黏附因子、细胞因子、受体、整合素等多

种细胞表面标志物。BMSCs 主要表达 CD29、CD44、CD90、CD105 等, 而不表达造血细胞标志物 CD34、CD45、CD31、CD14^[6]。本实验以 CD29、CD44、CD45 为表面标志物, 采用流式细胞仪对 P3 代细胞进行测定, 发现 CD29、CD44 表达阳性, 造血细胞表面标志物 CD45 阴性。倪玉霞等^[7]采用流式细胞仪检测细胞表面标志物 CD29、CD44、CD45、CD90、CD11b、CD34, 结果显示 BMSCs 表达 CD29、CD44、CD90, 不表达 CD11b、CD45、CD34。Jeon 等^[8]采用贴壁法分离纯化 BMSCs, 流式细胞仪检测表面标志物, 结果 CD44、Sca-1 阳性表达, CD45、CD34 阴性表达。本实验结果同国内外报道一致, 提示所提取细胞为 BMSCs。

BMSCs 具有跨胚层多向分化的潜能, 在体外适宜条件下能分化为成骨细胞、成脂细胞、软骨细胞、神经细胞等组织细胞^[9-11]。对细胞进行成骨和成脂诱导来证明提取细胞为 BMSCs 细胞。在成骨诱导液的作用下, 细胞由长梭形变为多角形、短梭形, 28 d 后茜素红染色可见红色钙结节, 证明细胞分化为成骨细胞。在成脂诱导液的作用下, 细胞变圆, 突起消失, 7 d 后脂滴形成, 21 d 后油红 O 染色可见红色脂滴形成, 证明细胞分化为脂肪细胞。

国际间充质干细胞委员会对来源间充质干细胞(MSCs)提出最低鉴定标准^[12]: 第一, MSCs 在标准培养条件下, 必须贴壁生长; 第二, MSCs 必须表达 CD105、CD73 及 CD90, 不表达 CD45、CD34、CD14 或 CD11b、CD79a、CD19、HLA-DR; 第三, 经体外诱导, MSCs 必须能向成骨细胞、脂肪细胞及软骨细胞分化。本实验从细胞贴壁生长的特性, 表面标志物、成骨和成脂分化来说明所提取细胞为 BMSCs。

BMSCs 具有强大的增殖能力和多向分化潜能, 在适宜的条件下能分化为各种细胞。BMSCs 具有免疫抑制作用, 主要通过影响 T 细胞、B 细胞、NK 细胞和单核细胞来发挥免疫重建的功能^[13-14]。BMSCs 取材方便, 易于分离、培养和扩增, 多次传代扩增后仍具有分化潜能。正是这些免疫学特性, 使 BMSCs 在

自身免疫性疾病以及细胞替代治疗等方面具有广阔的临床应用前景。BMSCs 对骨质疏松症、血液病、缺血性心脏病、自身免疫性疾病等的治疗取得了一定效果^[15-18]。

参考文献

- [1] Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(4): 313 - 319.
- [2] 潘莹, 龚五星. 骨髓间充质干细胞的分离、培养技术研究进展[J]. *国际输血及血液学杂志*, 2010, 33(3): 262 - 265.
- [3] Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement[J]. *Cytotherapy*, 2005, 7: 393 - 395.
- [4] 周达岸, 郑洪新, 李静. 大鼠骨髓间充质干细胞的分离、培养及鉴定[J]. *山东医药*, 2011, 51(24): 50 - 52.
- [5] 梁雪, 孔佩艳. 骨髓间充质干细胞的生物学特性及临床应用前景[J]. *西部医学*, 2007, 19(5): 949 - 952.
- [6] Al-Nbaheen M, Vishnubalaji R, Ali D, et al. Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential[J]. *Stem Cell Rev*, 2013, 9(1): 32 - 43.
- [7] 倪玉霞, 李澎, 李贻奎, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞的分离、培养和鉴定[J]. *广西医科大学学报*, 2009, 26(1): 10 - 13.
- [8] Jeon SJ, Oshima K, Heller S, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells are progenitors in vitro for inner ear hair cells[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2007, 34(1): 59 - 68.
- [9] Delorme B, Ringe J, Pontikoglou C, et al. Specific lineage-priming of bone marrow mesenchymal stem cells provides the molecular framework for their plasticity[J]. *Stem Cells*, 2009, 27(5): 1142 - 1151.
- [10] Kollar K, Seifried E, Henshler R. Therapeutic potential of intravenously administered human mesenchymal stromal cells[J]. *Haemostaseologie*, 2011, 31(4): 269 - 274.
- [11] Nombela-Arrieta C, Ritz J, Silberstein LE. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12(2): 126 - 131.
- [12] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement[J]. *Cytotherapy*, 2006, 8(4): 315 - 317.
- [13] Kode JA, Mukherjee S, Joglekar MV, et al. Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration[J]. *Cytotherapy*, 2009, 11(4): 377 - 391.
- [14] Le Blanc K, Ringdén O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience[J]. *J Intern Med*, 2007, 262(5): 509 - 525.
- [15] Mahmood A, Lu D, Chopp M. Marrow stromal cell transplantation after traumatic brain injury promotes cellular proliferation within the brain[J]. *Neurosurgery*, 2004, 55(5): 1185 - 1193.
- [16] Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(13): 8932 - 8937.
- [17] Le Blanc K, Ringdén O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2005, 11(5): 321 - 334.
- [18] Zhou Y, Wang S, Yu Z, et al. Direct injection of autologous mesenchymal stromal cells improves myocardial function[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 390(3): 902 - 907.
- [19] 仙淑丽, 刘英莉, 方均燕, 等. bMSC 对肾小管上皮细胞的保护作用及其作用机制[J]. *中华全科医学*, 2013, 11(11): 1666 - 1668.

收稿日期: 2015-03-02 修回日期: 2015-03-26 编辑: 王国品

(上接第 835 页)

- [11] Moretti A, Papi C, Aratari A, et al. Is early endoscopic retrograde cholangiopancreatography useful in the management of acute biliary pancreatitis? A meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Dig Liver Dis*, 2008, 40(5): 379 - 385.
- [12] De Waele JJ, Leppäniemi AK. Intra-abdominal hypertension in acute pancreatitis[J]. *World J Surg*, 2009, 33(6): 1128 - 1133.
- [13] Krska Z, Sváb J. Fulminant acute pancreatitis[J]. *Rozhl Chir*, 2009, 80(10): 563 - 567.
- [14] Chen H, Li F, Sun JB, et al. Abdominal compartment syndrome in patients with severe acute pancreatitis in early stage[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(22): 3541 - 3548.
- [15] Al-Bahrani AZ, Abid GH, Holt A. Clinical relevance of intra-abdominal hypertension in patients with severe acute pancreatitis[J]. *Pancreas*, 2008, 36(1): 39 - 43.
- [16] Scheppach W. Abdominal compartment syndrome[J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2009, 23(1): 25 - 33.
- [17] Mao EQ, Tang YQ, Fei J, et al. Fluid therapy for severe acute pancreatitis in acute response stage[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2009, 122(2): 169 - 173.
- [18] Kim JE, Hwang JH, Lee SH. The clinical outcome of elderly patients with acute pancreatitis is not different in spite of the different etiologies and severity[J]. *Arch Gerontol Geriatr*, 2012, 54(1): 256 - 260.
- [19] British Society of Gastroenterology. United Kingdom guidelines for the management of acute pancreatitis[J]. *Gut*, 1998, 42 Suppl 2: 1 - 13.
- [20] Kingsnorth A, O' Reilly D. Acute pancreatitis[J]. *BMJ*, 2006, 332(7459): 1072 - 1076.

收稿日期: 2015-01-25 编辑: 王国品