

SD 大鼠骨髓间充质干细胞体外原代培养及鉴定 *

何凤璞 汪黎明 陈 鑫[△]

(南京医科大学附属南京第一医院 & 南京市心血管病医院 江苏 南京 210006)

摘要 目的:探讨骨髓间充质干细胞(BMSCs)体外分离培养以及扩增的方法并鉴定。**方法:**取 100 g 左右雄性 SD 大鼠后肢股骨、胫骨骨髓,原代全骨髓培养法,多次传代纯化,体外扩增后,观察细胞形态,并免疫组化及流式细胞仪检测 cd34、cd90、cd105 细胞因子,鉴定是否为 BMSCs。**结果:**所获取的细胞呈长梭形,呈现特征性的漩涡状生长,CD34 阴性,CD90、CD105 阳性。**结论:**利用全骨髓培养法成功分离骨髓间充质干细胞,10 代以内的细胞纯度高,活性好。全骨髓培养较为简便、易行。

关键词:骨髓;干细胞;细胞培养

中图分类号:Q95-3,R654.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2011)03-421-03

Study on Isolation, Culture and Identification of Bone Mesenchymal Stem Cells of SD Rats in Vitro*

HE Feng-pu, WANG Li-ming, CHEN Xin[△]

(Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Nanjing First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210006, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the method for isolation and amplification of the bone mesenchymal stem cells (BMSCs) in vitro and to identified it. **Methods:** Male SD rats around 100g, the bone marrow cells were obtained from hind femur and tibia, whole bone marrow primary culture, purified by repeated passage in vitro amplification. Cell morphology was observed, and expressions of CD34, CD90, CD105 cell factors were examined by flow cytometry, to identify whether it's the BMSCs. **Results:** Cells appeared spindle-shaped and showed characteristic swirling growth. The surface marker CD34 was negative, CD90, CD105 were positive. **Conclusion:** We successfully isolated the bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) by the whole bone marrow culture method, and found that cells had high purity and good activity within 10th generation. The whole bone marrow culture was simple and easy.

Key words: Bone marrow; Stem cells; Cell culture

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R654.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)03-421-03

前言

干细胞是原始的未分化的细胞,保留了分化出其它细胞类型的能力。干细胞的来源可分为骨髓干细胞、脐带血干细胞及胚胎干细胞等等。BMSCs 是存在于骨髓基质中的非造血干细胞,上个世纪 70 年代开始,大量试验证实 BMSCs 可向多种细胞分化,并表达相关的机制^[1,2]。BMSCs 具有来源广泛,易于分离及体外扩增,多种分化潜能并具有低免疫原性,成为组织工程首选种子细胞^[3]。本实验在体外通过全骨髓培养法获得 BMSCs,进行分离、纯化及扩增,观察其生物学特性,为后续 BMSCs 向血管内皮细胞及平滑肌细胞分化,并成为血管组织工程种子细胞来源提供实验理论依据。

1 材料与方

1.1 材料

SD 大鼠 100 g 左右由南京市第一医院动物中心提供(SPF 级),倒置相差显微镜(olympus 公司),37℃恒温培养箱(heal

force),低速离心机(河北安新县白洋离心机厂),超净工作台(苏州净化),低糖基本培养基(DMEM-LG)(HYCLONE 公司),胎牛血清(HYCLONE 公司),0.25%含 EDTA 胰蛋白酶(GIBCO 公司),青链霉素液(南京凯基生物有限公司),PBS 液(南京凯基生物有限公司),CD34、CD44、CD54(北京博奥森生物技术有限公司),CD34、CD90、CD105(B & D 公司),动物解剖相关手术器械(南京市第一医院动物中心提供)。

1.2 方法

1.2.1 SD 大鼠 BMSCs 分离、培养 SD 大鼠短颈处死后于 75%酒精中浸泡 5 min,移入超净台,取出双下肢股骨及胫骨,眼科剪剪去股骨及胫骨骨髓,用 PBS 液反复冲洗骨髓腔,收集骨髓。将获得的骨髓细胞悬浮液移入离心管,以 1000 r/min 离心 5 min,弃上清,用 DMEM-LG 培养液(10% FBS,100 U/L 青霉素,100 U/L 链霉素)重悬,接种于 25 cm² 的塑料培养瓶,置于 37℃,5% CO₂ 培养箱内培养。

1.2.2 SD 大鼠 BMSCs 分离、培养 5 d 后换液一次,去除未贴壁细胞,倒置相差显微镜观察细胞生长情况及形态特征。以后每

* 基金项目:南京市科技发展计划项目(200801075)

作者简介:何凤璞(1985-),男,硕士研究生,主要研究方向:心脏大血管。E-mail:hefengpu@163.com

[△] 通讯作者:陈鑫,E-mail:stevecx@sina.com

(收稿日期:2010-11-02 接受日期:2010-11-25)

3 d 换液一次。当细胞铺满瓶底约 80 % 时,用 0.25 % 含 EDTA 胰蛋白酶室温消化 1 min,按 1:2 传代培养(图 1)。留取第 4 代、第 10 代进行免疫组化和流式细胞检测相关细胞因子。

1.2.3 MTT 法细胞生长曲线绘制 原代培养传代后,取第 1、3、5 代传代细胞按照 $1 \times 10^4/\text{ml}$ 的细胞悬液分别接种于 24 孔板培养,每孔 $200 \mu\text{l}$,隔天更换培养液,分别于 8、16、24、32、40、48、56、64、72 h,每组取 3 孔行 MTT 法检测,酶标仪读取 490 nm 吸光度值,绘制生长曲线。

1.2.4 流式细胞仪检测 检测第 5 代诱导后细胞 CD34、CD90、CD105 的表达及表达细胞比例。BMSCs 第五代细胞胰酶消化后,D-Hank's 洗涤 2 次。调整细胞密度至 $1 \times 10^6/\text{ml}$, $100 \mu\text{l}$ 每管加入相关抗体,室温避光孵育 20 min,行流式细胞仪检测。

2 结果

2.1 BMSCs 原代培养

原代培养采取全骨髓法,因而混杂大量骨髓组织呈混浊状

态,静置培养 5 d 后换液,除去大量凋亡裂解的红细胞,显微镜下密布着的细胞集落。细胞形态均一、放射状排列,伸出长短不一、粗细不均的突起,核浆比例大。

2.2 BMSCs 传代及检测

原代换液后第二天消化传代,传代细胞绝大部分在 3 h 内贴壁,呈长梭形,生长旺盛,形成典型的"漩涡状"形态,细胞核明显,核浆比例大,3 d 可铺满瓶底 80 %(图 1),前期细胞传代过程中混杂大量其他类型细胞,通过多次传代逐渐纯化 BM-SCs。细胞免疫组化检测 cd34 阴性,cd44、cd54 阳性(图 2)流式细胞仪检测 CD34 阳性率 1.32 %,CD90 阳性率 97.32 %,CD105 阳性率 99.67 %,本次获得的细胞为 BMSCs,而不是造血干细胞及成纤维细胞。从骨髓间充质干细胞生长曲线可以看出:骨髓间充质干细胞潜伏期较短约 6-12 h,大约在换液后 8 h 进入对数生长期,此时生长旺盛,细胞呈对数生长,48 h 后达平台期(图 3)。

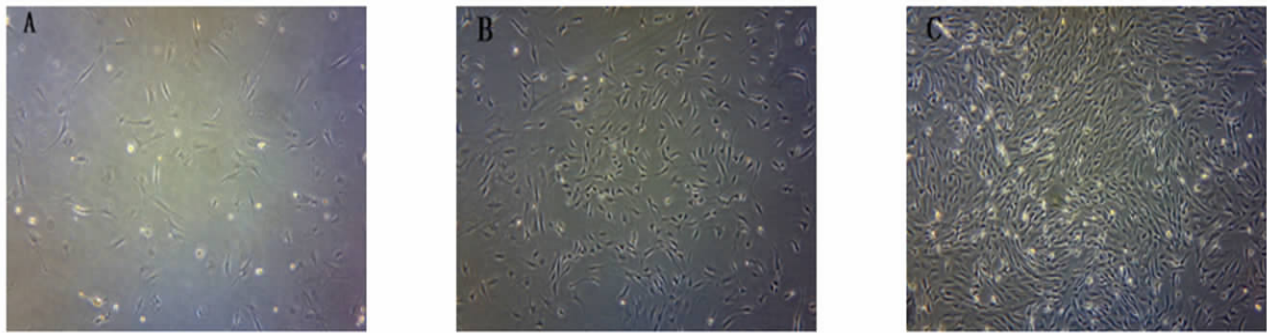


图 1 骨髓间充质干细胞相差显微镜观察($\times 100$)
A:p3 第 1 天;B:p3 第 2 天;C:典型漩涡状形态
Fig.1 Phase contrast microscopy observation of BMSCs ($\times 100$)
A: Day 1; B: Day 2; C: Characteristic swirling growth

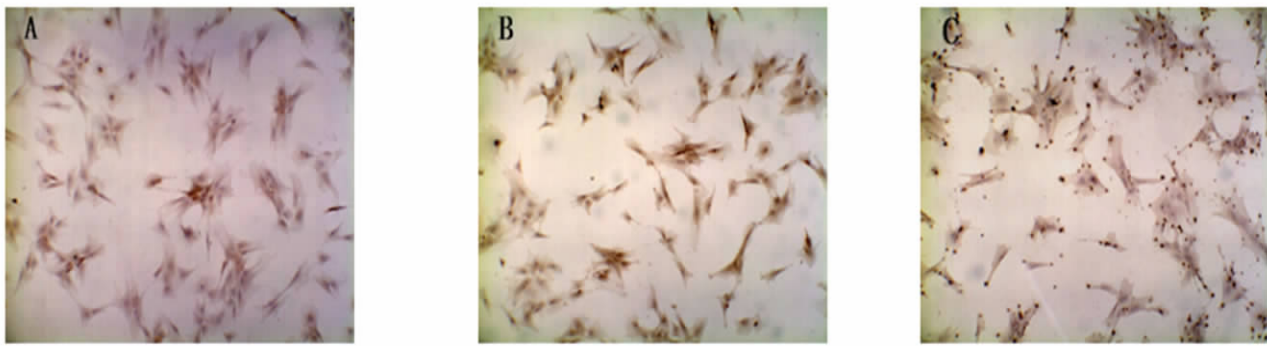


图 2 大鼠 BMSCs 免疫组化检测 CD34,CD44,CD54 的表达(DAB 染色, $\times 100$)
A:CD34;B: CD44;C:CD54
Fig.2 Immunohistochemical staining of CD34,CD44,CD54 of BMSCs (DAB staining, $\times 100$)

3 讨论

BMSCs 在骨髓中含量很低,能够在体外分离培养,并在短时间内扩增能够用于实验研究显得尤为重要。在细胞分离传代过程中必须注意:一、严格无菌操作,细胞极易污染,严格按照规范操作。二、胰酶消化的时间要严格控制,消化时间过短,细

胞无法顺利脱落;消化时间过长易使细胞老化、凋亡,以本实验为例:用 GIBCO 胰酶消化时间控制在 1 分半钟以内,显微镜下观察细胞消化过程,若细胞形态,从长梭形变为圆形,细胞突起开始收缩时终止消化,及时用含 10%胎牛血清的培养基中和,轻轻吹打,使细胞脱落。三、BMSCs 生长对细胞密度要求较高,

本文实验细胞传代按 1:2 的比例进行传代培养，细胞密度较高，传代 7 代后细胞未见老化迹象。国内也有文献指出 1:3 传代为佳^[5,6]。四、细胞生长环境 pH 值以 7.3 ± 0.5 为宜。此范围细胞生长活跃，增殖极快。在操作过程中及时用 PBS 液冲洗，维持 pH 值稳定。

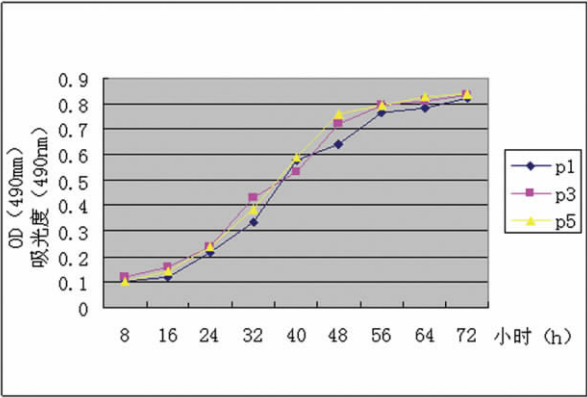


图 3 骨髓间充质干细胞生长曲线
Fig.3 Growth curve of BMSCs

BMSCs 作为易于获得的原始细胞，并且经过体外扩增、纯化后仍然保持细胞的生物学特性，能分化为多种类型的细胞，在最近几年在生物医学学科得到广泛应用^[7]。目前常用于分离 BMSCs 的方法很多如免疫磁珠分离法、密度梯度离心法、流式细胞仪分离法和全骨髓细胞培养法等，鉴定 BMSCs 的表面标志物主要有 CD34、CD44 等^[8]，本次试验中采用了全骨髓细胞贴壁培养法，多次传代纯化，免疫组化及流式细胞仪检测上述表面标志物，检测结果显示 CD34 阳性率 1.32%，CD90 阳性率 97.32%，CD105 阳性率 99.67%，BMSCs 在其表面尚未发现特异性标志物，但 BMSCs 不表达造血细胞表面抗原如 CD34、CD38、CD45、CD11a 和 CD14，而只表达 CD29、CD44、CD105、

CD166 等基质细胞和间质细胞的特异性表面标志。此次获得的细胞纯度较高，生长旺盛，检测结果符合鉴定要求^[8]，本次分离的细胞为 BMSCs，可用于后续 BMSCs 的诱导实验。

参 考 文 献(References)

[1] Friedenstien A J, Gorskaja J F, Kulagina N N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs [J]. Exp Hematol, 1976, 4:267-272

[2] Friedenstien A J, Chailakhyan R K, Gerasimov U V. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers[J]. Cell Tissue Kinet, 1987,20:263-272

[3] Huang NF, Li S: Mesenchymal stem cells for vascular regeneration[J]. Regen. Med. (2008), 3: 877-892

[4] Drab M, Haller H, Bychkov R, et al. From totipotent embryonic stem cells to spontaneously contracting smooth muscle cells: aretinoic acid and db-cAMP in vitro differentiation model [J]. FASEB J.1997, 11 (11):905-915

[5] 马萍, 贾绍斌, 刘晓方, 等. 人骨髓间充质干细胞的分离和体外培养[J]. 宁夏医学杂志,2005,27(6):363-364
Ma Ping, Jia Shao-bin, Liu Xiao-fang, et al. In vitro isolation and culture human bone marrow derived mesenchymal stem cells[J]. Ningxia Medical Journal,2005,27(6):363-364

[6] 赵凌云, 钱淑琴, 赵廷宝. 人骨髓间充质干细胞的贴壁分离与体外培养[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2007,11(28)5649-5651
Zhao Lin-yun, Qian Shu-qin, Zhao Ting-bao. Adherent separation and culture of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2007,11(28)5649-5651

[7] Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro [J]. Stem Cells, 2004, 22 (3):377-384

[8] 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, 8:315-317