

SD 大鼠骨髓间充质干细胞的分离培养和鉴定*

赵 瑛

(重庆师范大学 生命科学学院,重庆 400047)

摘 要:目的:探讨体外分离培养 SD 大鼠骨髓间充质干细胞 rMSCs 的方法,检测传代细胞的细胞周期,并分析部分细胞表型,对 rMSCs 进行初步的鉴定。方法:密度梯度离心结合贴壁培养法分离培养 rMSCs,传代扩增,倒置显微镜进行细胞形态学观察,免疫组化检测细胞表面抗原,流式细胞仪检测细胞周期。结果:密度梯度离心结合贴壁培养法能有效分离纯化 rMSCs,细胞呈均一的成纤维细胞样,细胞周期显示 90.16% P1 代细胞处于 G₀/G₁ 期,免疫组化结果为:CD44、CD29 阳性、CD34 阴性,说明培养的细胞即非造血干细胞,也非成纤维细胞。结论:本实验分离培养的细胞群与间充质干细胞的生物学特性吻合,说明密度梯度离心结合贴壁培养法能有效分离纯化 rMSCs,细胞稳定表达 CD44、CD29,是实用、可行的方法,所培养的细胞可用于细胞移植等研究。

关键词:SD 大鼠;骨髓间充质干细胞;分离培养;鉴定;细胞周期

中图分类号:Q952.6

文献标识码:A

文章编号:1672-6693(2008)01-0075-04

MSCs 因为具有高度自我更新能力和多向分化潜能,是细胞治疗和基因治疗的首选靶细胞^[1]。但骨髓中 MSCs 的含量非常少,每 10 万个单个核细胞中大约只有 1 个 MSCs^[2],且随着年龄的增长细胞数量逐渐减少,如此微量的 MSCs 难以满足治疗的需要^[3]。因此,寻找适宜的 MSCs 体外分离纯化方法,对于进一步研究 MSCs 的生物学特性,为临床服务尤为重要。

1 材料和方法

1.1 材料

清洁级 SD 大鼠(第三军医大学动物实验中心);密度为 1.073g/mL 的 percoll 淋巴细胞分离液(天津 TBD 公司),LG-DMEM 和胎牛血清(Hyclone 公司),胰蛋白酶(Sigma USA),兔抗大鼠 CD44、CD29、CD34(博士德公司),CO₂ 恒温培养箱(SANYOMCO-15AC 型),OLYMPUS CK-40 型倒置相差显微镜,PBS。

1.2 方法

1.2.1 rMSCs 原代培养 选用 6 周龄健康 SD 大鼠(约 150g 雌雄不限),颈椎脱臼法处死。准备两套已消毒的手术器械,用第 1 套器械除去大鼠双下肢腿部的皮肤,然后在尽量保持大鼠双股骨和胫骨的完整性的条件下,将大鼠双下肢剪下,将剪下的股骨

胫骨置于已消毒并盛有含双抗的 PBS 平皿中,转移置于超净工作台上。然后在无菌条件下,用第 2 套器械处理股骨胫骨上残留的肌肉,用剪刀分别剪去股骨胫骨的两端,暴露骨髓腔,用 5 mL 注射器吸取 4 mL 含 15% 胎牛血清的 LG-DMEM 冲出骨髓,用吸管将平皿中的细胞悬液吹打混匀,然后将悬液轻轻加入到预置等体积 percoll 分离液(1.073 g/mL)的离心管中,悬于上层,离心,2500 r/min,30 min,收集云雾状白膜层的单个核细胞于另一离心管中,LG-DMEM 洗涤两次(1000 r/min,5 min),弃上清液,用含 15% 胎牛血清 LG-DMEM 重悬细胞,以 1.5 × 10⁵/cm² 接种细胞于培养瓶中,于饱和温度、37℃、pH7.2 5% CO₂ 恒温培养箱,并标记为原代(Passage 0, P0)。以后每 3 d 换液 1 次,换液后于显微镜下观察细胞生长情况和形态特征。

1.2.2 rMSCs 传代培养 原代细胞达 80% 融合时,0.25% 胰蛋白酶消化贴壁细胞 2~3 min,按 1:3 比例传代培养,直到贴壁细胞接近融合,再重复上述操作,反复传代扩增,并标记为 P1-P5 代等。

1.2.3 rMSCs 细胞周期的测定 取 P1 代 rMSCs,弃培养基,PBS 冲洗,胰酶消化后,PBS 制成单细胞悬液,1000 r/min 离心 5 min,重复 2 次,75% 冷乙醇固定,1000 r/min 离心 5 min,弃乙醇上清液,加入等体积的碘化丙啶与细胞悬液混合,于 4℃ 放置 20~30

* 收稿日期 2007-07-30 修回日期 2007-11-05

资助项目:重庆师范大学科研基金资助

作者简介:赵瑛(1962-)女,四川彭州人,副教授,研究方向为生物医学工程。

min,测定前用300目尼龙膜过滤样品于10 mL专用小试管中,上流式细胞仪检测。

1.2.4 rMSCs的表型分析 取P4生长状态良好的细胞,制成细胞爬片,40g/L多聚甲醛固定,PBS冲洗,0.1% Triton-100通透,过氧化氢消除内源性过氧化氢酶,加5% BSA,加一抗(兔抗大鼠CD44、CD34、CD29),同时用PBS作为一抗设置阴性对照,37℃孵育1h,加生物素化二抗,加SABC,DAB显色,苏木素染色,脱水、封片、显微镜下观察。

2 结果

2.1 细胞培养情况

骨髓单个核细胞接种于培养瓶后,细胞呈圆型,大小不一,悬浮于培养液中。24 h后部分细胞开始贴壁,呈圆形或多角形。第3 d换液后,可见少量短梭形、星形细胞分散贴壁生长,伸出伪足呈逗点状或短棒状,6 d左右可见放射状排列的细胞集落,伸出长短不一、粗细不均的突起,胞核大、核仁清晰(图1)。约14 d细胞融合80%~90%,呈漩涡状(图2)。传代细胞比原代细胞贴壁快,24 h内已全部贴壁、伸展,增殖迅速,均匀分布生长,6~7 d可见长梭形细胞80%~90%铺满培养皿形成单层。

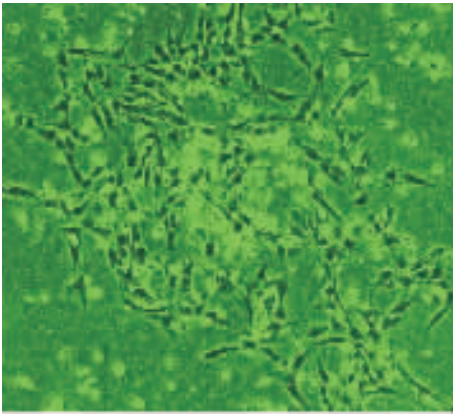


图1 第6天P0代rMSCs

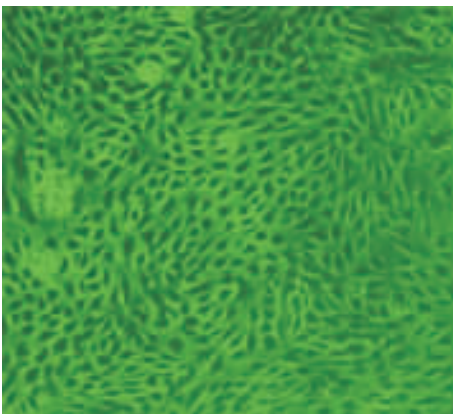


图2 第14天P0代rMSCs

2.2 细胞周期测定

P1代rMSCs第6 d的流式细胞周期检测: G_0/G_1 期为90.16%, $S+G_2/M$ 期为9.85%,在本实验所获得的rMSCs绝大多数处于静止期,只有极少量细胞处于增殖期。

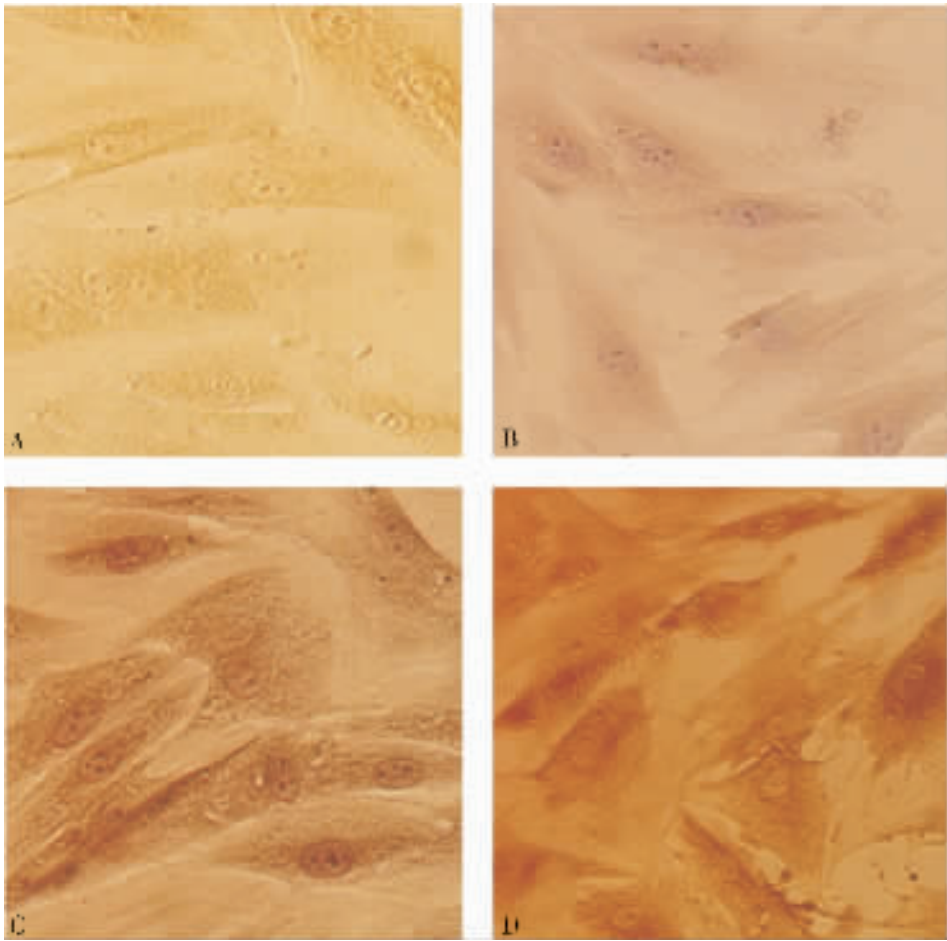
2.3 细胞表面抗原鉴定

免疫组化染色显示P4代rMSCsCD29、CD44有阳性表达,阳性细胞表现为胞浆呈棕色至棕褐色,细胞核周围最明显(图3-C、D),空白对照组(图3-A)和CD34(图3-B)均未见着色,说明各抗体均有特异性。

3 讨论

目前,获得MSC的方法主要有贴壁筛选法、密度梯度离心法、流式细胞仪分离法、免疫磁珠分选法^[4]。贴壁筛选法是利用细胞贴壁时间及贴壁牢固性的不同,逐步将非贴壁细胞和其它杂质细胞去除的一种简单易行的方法,但该方法所获得的细胞纯度不够,密度梯度离心法是根据MSC与其它细胞密度不同而采用Ficoll或Percoll分离液,其优点是对细胞的活性影响较小,流式细胞仪分离法是根据不同细胞具有不同的表面标志,以荧光抗体与细胞表面标志结合,然后用流式细胞仪进行分选,该方法的优点是分离迅速、纯度高,但仪器昂贵,费用较高,含量太低的痕量细胞难以分离,要获得无菌的细胞制剂比较麻烦,而且不能处理大量的样品。免疫磁珠分选法是根据磁珠既可结合蛋白质又可被磁铁所吸引,经过一定处理将抗体或抗原结合在磁珠上,使之成为抗体或抗原的载体,磁珠上抗体或抗原与特异性抗原或抗体结合后,形成抗原-抗体磁珠免疫复合物,这种复合物在磁力作用下,发生力学移动,使复合物与其他物质分离,从而达到分离特异性抗原或抗体的目的,该方法的优点是避免了免疫毒素和补体裂解带来的非特异性杀伤作用和可以处理大量的细胞样品,因此在临床和基础研究中具有很诱人的应用前景,但价格昂贵、操作复杂。

因每根大鼠股骨只含0.3 mL骨髓,而MSC数量又相对较少^[5]。所以本研究采用Percoll分离液,其优点是Percoll分离液的密度可调,而Ficoll分离液的密度固定(1.077 g/mL)。由于rMSCs存在于低密度细胞层且具有较强的粘附能力,所以采用1.073 g/mL的Percoll分离液和定期更换培养液,除去未贴壁细胞的方法来分离纯化rMSCs;为了缩短操作



A P4 代 rBMMSCs 免疫组化染色空白组 100 × ; B P4 代 rBMMSCs CD34 免疫组化染色阴性 100 × ; C P4 代 rBMMSCs CD29 免疫组化染色阳性 100 × ; D P4 代 rBMMSCs CD44 免疫组化染色阳性 100 ×

图 3 免疫组化染色鉴定细胞表面抗原

时间,避免骨髓凝固和污染,保持细胞活力,实验中采用非酒精浸泡,在大鼠脱颈后,用第 1 套手术器械迅速取出去皮肤的下肢,含双抗的 PBS 冲洗,用第 2 套手术器械去肌肉,剪开骨端的办法。

原代细胞生长较缓慢,细胞形态多样,约 14 d 左右才能传代,而传代细胞生长较快,形态趋于一致,说明同源性较好,7 d 左右可传代。流式细胞仪所测 P1 代 rMSCs 细胞周期的 G_0/G_1 期百分比高,符合干细胞分化较原始的特征,说明采用 Percoll (1.073 g/mL) 密度梯度分离和贴壁培养法相结合的方法能够成功分离纯化 rMSCs。

因为骨髓间充质干细胞目前还没有公认的独特抗原表型^[6],故本实验从细胞形态、细胞周期以及 CD29、CD44、CD34 等三方面来鉴定 rMSCs。结果培养的细胞稳定表达 CD29、CD44,而 CD34 阴性,说明本试验培养的细胞既非造血干细胞,也非成纤维细胞。

综上所述,本研究建立了采用 Percoll(1.073

g/mL) 密度梯度离心方法结合贴壁法体外分离纯化 rMSC 的方法,应用此方法分离纯化所得的 rMSC 纯度高,具有干细胞特征,适用于基因治疗和细胞治疗的基础研究。

参考文献:

- [1] DIPPOLITO G, DIABIRA S, HOWARD G A, et al. Marrow-isolated Adult Multilineage Inducible (MIAMI) Cells, a Unique Population of Postnatal Young and Old Human Cells With Extensive Expansion and Differentiation Potential[J]. *J Cell Sci*, 2004, 117: 2971-2981.
- [2] PITTENGER MF, MACKAY AM, BECK SC, et al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells [J]. *Science*, 1999, 284: 143.
- [3] HONG L, PEPTAN I, CLARK P, et al. Ex Vivo Adipose Tissue Engineering by Human Marrow Stromal Cell Seeded Gelatin Sponge [J]. *Ann Biomed Eng*, 2005, 33: 511-517.
- [4] 邱丽燕,王金福. 骨髓间充质干细胞的研究进展册 [J]. *生物工程学报*, 2003, 19(2): 136-140.

- [5] BRUDER SP , FINK DJ , CAPIAN AI. Mesenchymal Stem Cells in Bone Development , Bone Repair , and Skeletal Regeneration Therapy[J]. Cell Biochem , 1994 , 56 : 283.
- [6] PEISTER A , MEIAD JA , LARSON BL. Adult Stem Cells from Bone Marrow(MSCs) Isolated from Different Strains of Inbred Mice Vary in Surface Epitopes , Rates of Proliferation and Differentiation Potential[J]. Blood , 2004 , 103 : 1662-1668.

Isolation , Cultivation and Identification of SD Rat Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells

ZHAO Ying

(College of Life Sciences , Chongqing Normal University , Chongqing 400047 , China)

Abstract Objective : To establish a new method of isolating and culturing rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells(rMSCs) in vitro and to analyse cell cycle and their phenotypical properties of the cells after culture expansion as well as rMSCs identified preliminarily. **Methods :** rMSCs are separated and expanded by gradient centrifugation and adherence culture. Then the morphology of rMSCs are observed by invert microscope and identified by immunohistochemistry method. Cell cycle is detected with flowing cytometry. **Results :** Density gradient centrifugation and plastic adherence method are used for isolation and cultivation of SD rMSCs , rMSCs are fibroblast-like cells about 90.16% of P1 rMSCs are in G_0/G_1 phase. The results of immunohistochemistry of rMSCs show that both CD44 and CD29 were positive and CD34 , negative , which shows that these cells are no hemopoietic stem cells and fibroblasts. **Conclusion :** The cells isolated in this test are consistent with MSCs in biological characteristics ; gradient centrifugation and plastic adherence methods might be a ideal method for isolation and cultivation of rMSCs , it is feasible MSCs used in cell transplant.

Key words SD rat ; bone marrow-derived mesenchymal stem cells ; isolation and cultivation ; identification ; cell cycle

(责任编辑 李若溪)