

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2015.05.005

大鼠骨髓间充质干细胞体外培养体系的建立

李 丹 张金国[△]

(济宁医学院 2013 级研究生, 山东 济宁 272067; 济宁医学院附属医院, 济宁 272029)

摘 要 **目的** 本文旨在介绍大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)体外培养体系建立的一套完整方法, 及操作中的相关注意事项。**方法** 体重 100g 左右健康清洁 SD 大鼠, 取双侧股骨及胫骨, 冲出骨髓腔细胞后培养, 72h 后全量换液, 待细胞融合至 80% 左右时传代培养, 取生长良好的 P3 代细胞通过流式细胞仪, 进行 CD90、CD45 表型鉴定。**结果** 体外培养 P3 代细胞表面标记物 CD90、CD45 鉴定完全符合标准, BMSCs 纯化并大量扩增。**结论** 通过全骨髓贴壁培养法可以建立一套完整的体外培养体系。

关键词 干细胞; 骨髓间充质干细胞; 培养; 鉴定

中图分类号: R394.2 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-9760(2015)10-321-03

Establishment of an in vitro culture system of rat bone marrow mesenchymal stem cells

LI Dan, ZHANG Jinguo

(Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining 272029, China)

Abstract: Objective To introduce a complete set of methods for the establishment of rat bone marrow mesenchymal stem cells in vitro culture system and the relevant matters needing attention in the operation. **Methods** We selected healthy clean SD rats about 100g, cut out the bilateral femur and tibia, and developed the cells out of the bone marrow cavity. The cell culture fluid was all changed in 72 hours. When the cell fusion grew to 80%, we used trypsin for digestion and passaging the culture. The expression of CD90 and CD45 in P3 cells was identified by flow cytometry. **Results** The cell surface antigens CD90 and CD45 of in vitro cultured P3 cells were all in line with the standard. BMSCs were purified and amplified in vitro. **Conclusion** A complete set of in vitro culture system was established by the method of whole bone marrow adherent culture.

Keywords: Stem cells; Bone marrow mesenchymal stem cells; Culture; Identification

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是目前组织工程建设的种子细胞, 但因其骨髓中含量极低, 体外细胞纯化、扩增培养难度较大, 严重影响 BMSCs 后续实验研究。目前提取方法主要有 4 种: 全骨髓贴壁培养法、密度梯度离心法、免疫磁珠法和流式细胞仪分离法^[1]。由于全骨髓贴壁培养法获得的细胞活性强, 增殖旺盛, 并且具有操作简单, 造价低等优点, 本文采用贴壁法进行体外培养。报道如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物

体重 100g 左右健康清洁 SD 大鼠, 雌雄不限, 由济宁鲁抗生物有限公司提供。

1.2 试剂及仪器

1.2.1 试剂 DMEM/F12 1:1 (Gibco 公司); 胎牛血清 (Gibco 公司); 0.25% 胰蛋白酶 (Gibco 公司); 青链霉素混合液 (genview 公司); CD90、CD45 抗大鼠荧光表面抗体 (eBioscience 公司)。

1.2.2 仪器 超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司); 倒置显微镜 (OLYMPUS 公司); 细胞培养箱 (Thermo 公司)。

1.3 大鼠 BMSCs 体外培养体系的建立及鉴定

1.3.1 大鼠 BMSCs 的提取 称取 100g 左右健康清洁 SD 大鼠一只, 脱臼处死后完全浸泡于 75% 酒精中 5min。将大鼠置于灭菌后的手术台上, 依

[△] [通信作者] 张金国, E-mail: cck112000@aliyun.com

次剪开皮肤、皮下组织,剥离肌肉,完整取下双侧股骨及胫骨,放置装有 PBS 的无菌培养皿中,清除肌肉组织,并用 PBS 反复冲洗 3 遍。在超净台内剪开双侧骨端,用 1ml 针头吸取含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基反复冲洗骨髓腔,直至骨体发白,将骨髓液收集至 15ml 离心管中,1000rpm, 5min 离心,收集细胞。

1.3.2 大鼠 BMSCs 的体外培养 用 5ml 含 10% 完全培养基重悬细胞,反复吹打,制备单一细胞悬液。在细胞计数板上计数,以 1×10^9 /L 密度接种于 25cm^2 的细胞瓶中,置于 37°C , CO_2 浓度为 5% 的饱和适度培养箱内培养。72h 后全量换液,并用 PBS 反复冲洗,将悬浮细胞去除。每间隔 2d 换液,第 7 天细胞融合至 80% 左右,胰酶消化,并严格控制消化时间,待镜下观察梭形细胞变形后,立即用完全培养基 5ml 终止消化,收集细胞悬液,1000rpm, 5min 离心。将收集的细胞以 1:2 接种于 25cm^2 的细胞瓶中,继续培养,传代后细胞生长迅速,依次传代记为 P1, P2, P3 等。

1.3.3 大鼠 BMSCs 的表型鉴定 取 P3 代生长良好的细胞,胰酶消化后, PBS 反复冲洗两遍,收集离心后的细胞,根据流式细胞荧光抗体的要求,按每管 1×10^6 /L 密度置于 4 个流式专用上机管中,分别加入 CD90 抗体和同型、CD45 抗体和同型各 $5\mu\text{l}$,充分混匀细胞悬液后,避光静置 15min 后,各管加入 1ml PBS, 1200rpm, 离心 5min, 洗涤细胞。用 $400\mu\text{l}$ PBS 重悬细胞后上机,根据收集的荧光信号,判断细胞阳性率。

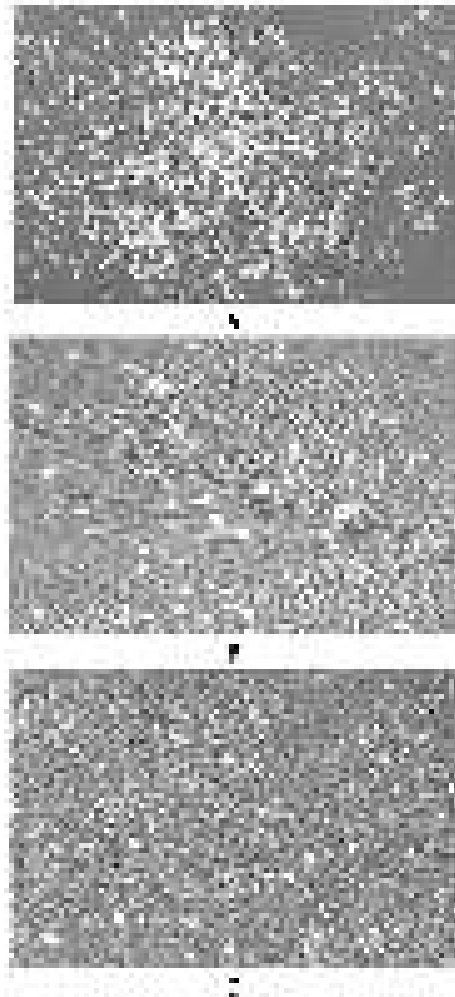
1.3.4 操作注意事项 1) 提取、培养细胞过程中严格无菌操作,添加必要抗生素,减少污染概率。2) 提取过程中注意保持股骨端的完整性,避免其它杂细胞的污染。3) 反复吹打获得的细胞悬液,制备单一的细胞悬液,有利于 BMSCs 的贴壁生长。4) 避免反复观察细胞,严格控制首次换液时间,减少培养液晃动对细胞的不利影响。

2 结果

2.1 大鼠 BMSCs 的形态特征

提取细胞接种于培养瓶后,呈大小不一的圆形,悬浮于培养液中。24h 后瓶内出现少量贴壁细胞,呈梭形、椭圆形、多角形等,小片状聚集生长,细胞生长缓慢。72h 后首次全量换液,去除不贴壁的造血细胞等悬浮细胞,可见贴壁细胞增多,呈现梭形、纺锤形,呈片状聚集生长。2 天后换液,细胞增

长速度明显增快,生长逐渐融合,继续培养至 7d,细胞融合达 80% 左右,梭形细胞为主,胰酶消化传代至 P3 代时,细胞生长速度较前明显增快,梭形细胞克隆状生长,形态趋于稳定。见图 1。



A: 原代培养 24h; B: 原代培养 7d; C: P3

图 1 不同培养时间 BMSCs 贴壁情况

2.2 大鼠 BMSCs 的鉴定结果

取生长旺盛的 P3 代细胞,应用流式细胞仪进行细胞表型鉴定:CD90 阳性表达率 99.2%, CD45 阳性表达率 0.9%,符合 BMSCs 鉴定标准,说明原代培养的 BMSCs 具有纯度高,均一性强的特性。见图 2。

3 讨论

BMSCs 因其自身具有多向分化潜能,取材容易,体外培养后可以高度纯化、大量扩增等优点,成为组织工程的种子细胞,已被应用于许多领域的研究,并成功诱导分化为骨、软骨、脂肪、神经、心肌等细胞^[2-5],使得多年以来干细胞的诱导分化,干细胞

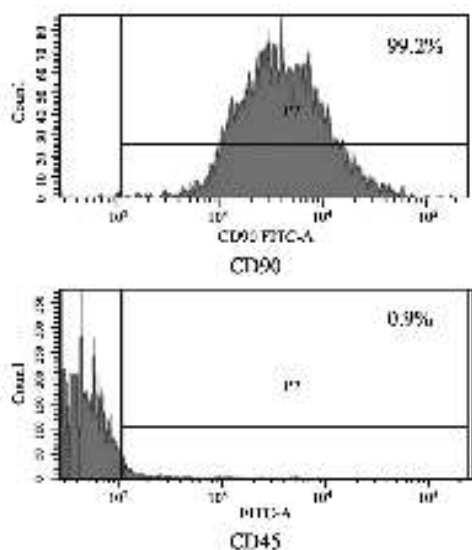


图 2 CD90、CD45 表达情况

的移植治疗始终是研究的热点^[6-7],目前这些研究已初步取得一定疗效^[8],为临床疾病的治疗提供了新思路,为临床患者带来曙光。

BMSCs 在骨髓中含量仅 0.001%~0.1%,各种分离方法各有优缺点,至今尚无最佳分离培养方案。免疫磁珠法、流式细胞仪法因其对细胞活性损伤较大,甚至导致细胞死亡,并且造价昂贵,对实验室要求较高等原因,未能广泛应用。密度梯度离心是根据骨髓中各种细胞比重不同,通过加入 percon 液或淋巴细胞分离液提取相对较纯的 BMSCs,但因多次离心,破坏了 BMSCs 生存的骨髓微环境,不利于细胞生长。而全骨髓贴壁培养法利用 BMSCs 的贴壁生长特性,通过不断换液,去除悬浮细胞,是目前操作最简单有效的方法。

由于 BMSCs 细胞表面尚未有特异抗体表达,目前多采用阳性表面标记物及阴性表面标记物相结合的办法鉴定。国际细胞治疗学会间充质及组织干细胞委员会在 2006 年提出了鉴定人来源的间充质干细胞最低的 3 条标准^[9]:1)必须具备对塑料底物的贴壁特性。2)CD105、CD90、CD73 等阳性表达率 $\geq 95\%$,而 CD45、CD34、CD14 或 CD11b, CD79a 或 CD19,HLA-DR 等的阳性表达率 $\leq 2\%$ 。3)体外诱导分化具有多向分化潜能。本文对 P3 代生长旺盛的细胞给予标记 CD90、CD45 进行表面抗原鉴定,结果显示 CD90 表面抗原阳性,CD45 表面抗原阴性,虽然大鼠与人物种存在差异,但目前鉴定标准仍采用 2006 年标准进行^[10]。

本实验成功分离、提取大鼠 BMSCs。采用全骨髓贴壁培养法建立体外培养体系,经表面抗原表型鉴定为纯化 BMSCs,并通过严格控制消化时间,严格无菌操作,成功实现 BMSCs 的体外大量扩增,为进一步的实验研究提供细胞来源,促进了干细胞诱导分化、移植治疗的进一步研究。并通过总结实验中的注意事项,大大提高了 BMSCs 提取及培养的成功率,避免了培养过程中时间的浪费,节省了科研经费,提高了科研的准确性。

参考文献:

- [1] Gamie Z, Tran G T, Vyzas G, et al. Stem cells combined with bone graft substitutes in skeletal tissue engineering[J]. Expert Opin Biol Ther, 2012, 12(6): 713-729.
- [2] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells[J]. The International Society for Cellular Therapy position statement Cytotherapy, 2006, 8(4): 315-317.
- [3] Dezawa M, Takahashi I, Esaki M, et al. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells[J]. Eur J Neurosci, 2001, 14(11): 1771-1776.
- [4] Pikir BS, Susilowati H, Hendrianto E, et al. Reversin increase the plasticity of bone marrow-derived mesenchymal stem cell for generation of cardiomyocyte in vitro[J]. Acta Med Indones, 2012, 44(1): 23-27.
- [5] Piryaei A, Soleimani M, Heidari M H, et al. Ultrastructural maturation of human bone marrow mesenchymal stem cells-derived cardiomyocytes under alternative induction of 5-azacytidine[J]. Cell Biol Int, 2015, 39(5): 519-530.
- [6] Cuiffo B G, Karnoub A E. Mesenchymal stem cells in tumor development: emerging roles and concepts[J]. Cell Adh Migr, 2012, 6(3): 220-230.
- [7] Rohaina C M, Then K Y, Ng A M, et al. Reconstruction of timbal stem cell deficient corneal surface with induced human bone marrow mesenchymal stem cells on amniotic membrane [J]. Transl Res, 2014, 163(3): 200-210.
- [8] 罗建红, 何学华. 干细胞治疗心脏疾病的研究进展[J]. 医学综述, 2013, 19(3): 410-414.
- [9] 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.
- [10] Kedziorek D A, Hofmann L V, Fu Y, et al. X-ray-visible microcapsules containing mesenchymal stem cells improve hind limb perfusion in a rabbit model of peripheral arterial disease [J]. Stem Cells, 2012, 30(6): 1286-1296.

(收稿日期 2015-09-09)