



# 食蟹猴脐带间充质干细胞的分离与鉴定

庞荣清<sup>1</sup>, 何洁<sup>1</sup>, 李瑞生<sup>2</sup>, 赵晶<sup>1</sup>, 朱慧<sup>1,3</sup>, 朱向情<sup>1</sup>, 阮光萍<sup>1</sup>, 潘兴华<sup>1</sup>

- (1. 成都军区昆明总医院云南省干细胞工程实验室, 昆明 650032;
2. 解放军第302医院实验技术研究保障中心, 北京 100039;
3. 昆明医科大学昆明总医院临床学院, 昆明 650031)

**【摘要】** 目的 建立食蟹猴脐带间充质干细胞的分离培养方法。方法 新鲜食蟹猴脐带剪碎为糊状, 用含10%胎牛血清的DMEM/F12培养液培养, 观察细胞形态特征, 流式细胞技术分析细胞抗原标志的表达, 并检测其体外多向分化潜能。结果 运用组织贴块法可以从新鲜脐带中分离到贴壁生长、阳性表达CD29、CD44、CD90的成纤维细胞样细胞。这些细胞在体外诱导培养后可分别检测到脂肪滴、骨和软骨细胞。结论 运用组织贴块培养法可用含10%胎牛血清的DMEM/F12培养液从食蟹猴脐带中分离到间充质干细胞。

**【关键词】** 脐带间充质干细胞; 食蟹猴; 培养方法

**【中图分类号】** R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 04-0066-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.004.013

## Isolation and identification of cynomolgus monkey umbilical cord mesenchymal stem cells

PANG Rong-qing<sup>1</sup>, HE Jie<sup>1</sup>, LI Rui-sheng<sup>2</sup>, ZHAO Jing<sup>1</sup>, ZHU Hui<sup>1,3</sup>,  
ZHU Xiang-qing<sup>1</sup>, RUAN Guang-ping<sup>1</sup>, PAN Xing-hua<sup>1</sup>

- (1. Stem Cell Engineering Laboratory of Yunnan Province, Kunming General Hospital of PLA Chengdu Military Command, Kunming 650032, China; 2. Experimental Research Support Center, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039;
3. Clinical Institute of Kunming Medical University, Kunming 650031)

**【Abstract】 Objective** To establish a method for isolation of cynomolgus monkey umbilical cord mesenchymal stem cells. **Methods** Fresh cynomolgus monkey umbilical cord was directly minced into pasty fine pieces, and the pieces were cultured in tissue flask with DMEM/F12 medium supplemented with 10% fetal bovine serum. The morphological characteristics of the resulting cells were examined, and their expression of mesenchymal cell surface markers were analyzed by flow cytometry. The multidifferentiation potential was examined in vitro, too. **Results** The fibroblast-like cells were successfully isolated from the fresh umbilical cord by an adherent culture procedure. These adherent cells expressed mesenchymal markers including CD29, CD44, and CD90, and also could be induced to differentiate into adipocytes, osteoblasts and chondrocytes. **Conclusion** Mesenchymal stem cells can be isolated from fresh cynomolgus monkey umbilical cord by using an adherent culture procedure.

**【Key words】** Umbilical cord; Mesenchymal stem cells; Cynomolgus monkey; Cell culture

[基金项目] 云南省自然科学基金项目(2011HB050, 2013DA004)。

[作者简介] 庞荣清(1971-), 男, E-mail: pangrq2000@aliyun.com。

[通讯作者] 李瑞生(1969-), 男, 博士, 副研究员, E-mail: lrsheng@sohu.com; 潘兴华(1963-), 男, 博士, 主任医师, E-mail: xinghuapang@aliyun.com。

脐带间充质干细胞是目前研究最多的种子细胞之一,在再生医学和组织工程研究方面具有广阔的应用前景<sup>[1]</sup>。食蟹猴是医学研究常用的非人灵长类实验动物<sup>[2]</sup>,虽然国内已建立了食蟹猴骨髓间充质干细胞(cynomolgus monkey bone marrow mesenchymal stem cells, cBMMSC)的分离培养方法<sup>[3]</sup>,推动了食蟹猴在再生医学研究中的广泛应用<sup>[4]</sup>,但骨髓采集数量较少,短期内很难大量扩增 cBMMSC,且 cBMMSC 活性容易受到供体年龄的限制<sup>[3,5]</sup>。目前尚未见食蟹猴脐带间充质干细胞(cynomolgus monkey umbilical cord mesenchymal stem cells, cUCMSC)分离培养的报道,因此本实验室在前期工作<sup>[6]</sup>的基础上,试图建立 cUCMSC 的分离培养方法,以满足以食蟹猴为实验动物大规模开展再生医学和组织工程研究的需要。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂和设备

DMEM/F12 培养液、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和 trypsin-EDTA 均购自 Invitrogen 公司; FITC 标记的抗猴流式单抗 CD29、CD34、CD44、CD90 购自 NeoMarkers 公司;成脂、成骨、成软骨诱导分化试剂盒购自 Invitrogen 公司;显微镜为 Nikon 公司产品,流式细胞仪为 BD 公司产品。

### 1.2 细胞培养

手术环境条件下,剖宫产取足月食蟹猴胎猴脐带,送至无菌实验条件下参照我们建立的方法<sup>[6]</sup>分离培养 cUCMSC。即用双抗液冲洗脐带,然后将其在离心管内剪碎为糊状,加入少许含有 10% FBS 的 DMEM/F12 并转移至培养瓶中,于 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 的条件下静置培养,适时换液。观察细胞生长特性及形态特征。待细胞生长至融合状态时,用 trypsin-EDTA 消化传代细胞。

### 1.3 流式细胞分析

参照我们建立的方法<sup>[6]</sup>收集生长良好的第三代细胞,加入流式抗体 CD29、CD34、CD44、CD90 室温条件下避光孵育 30 min,漂洗去除未结合抗体后,用流式细胞仪检测抗原标志的表达。

### 1.4 细胞分化潜能的鉴定

参照本实验室的实验数据,依据试剂盒说明书推荐的方法和实验浓度进行,即收集生长良好的第三代细胞完成体外诱导实验<sup>[6]</sup>。成脂分化:接种细

胞( $4 \times 10^4$ /孔)于 12 孔板中培养 6 h 后,更换培养液为成脂诱导分化培养液,3 至 4 天换液 1 次,连续培养 14 d 后,4% 多聚甲醛固定后加入油红 O 染色;成骨分化:按照上述成脂分化培养细胞,成骨诱导分化培养 21 天后,固定并加入茜素红染色;成软骨分化:收集细胞并调整细胞密度为  $1.6 \times 10^7$ /mL,每孔加 5  $\mu$ L 到 12 孔板的中心,形成一个细胞滴,2 h 后再缓慢加入成软骨诱导分化培养液,2 至 3 天换液一次,随着培养细胞会形成一个细胞团漂浮起来,连续培养 14 d 后,4% 多聚甲醛固定后石蜡包埋作病理切片,脱蜡后加入阿新蓝染色。

## 2 结果

### 2.1 UC MSC 的形态特征

从健康足月的剖宫产胎猴,可以一次获得约 5 cm 长的脐带,将其剪碎后采用贴壁培养的方法,在少许含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液中静置培养 5 d,即可在倒置相差显微镜下观察到少数梭形贴壁生长的细胞,或见到组织块周围长出的贴壁生长细胞。这些细胞传代后可快速密集排列呈漩涡状生长,显示与 cBMMSC 类似的生长特征(图 1,见彩插),初步判断这些贴壁生长的成纤维细胞样细胞就是 cUCMSC。

### 2.2 细胞免疫表型分析

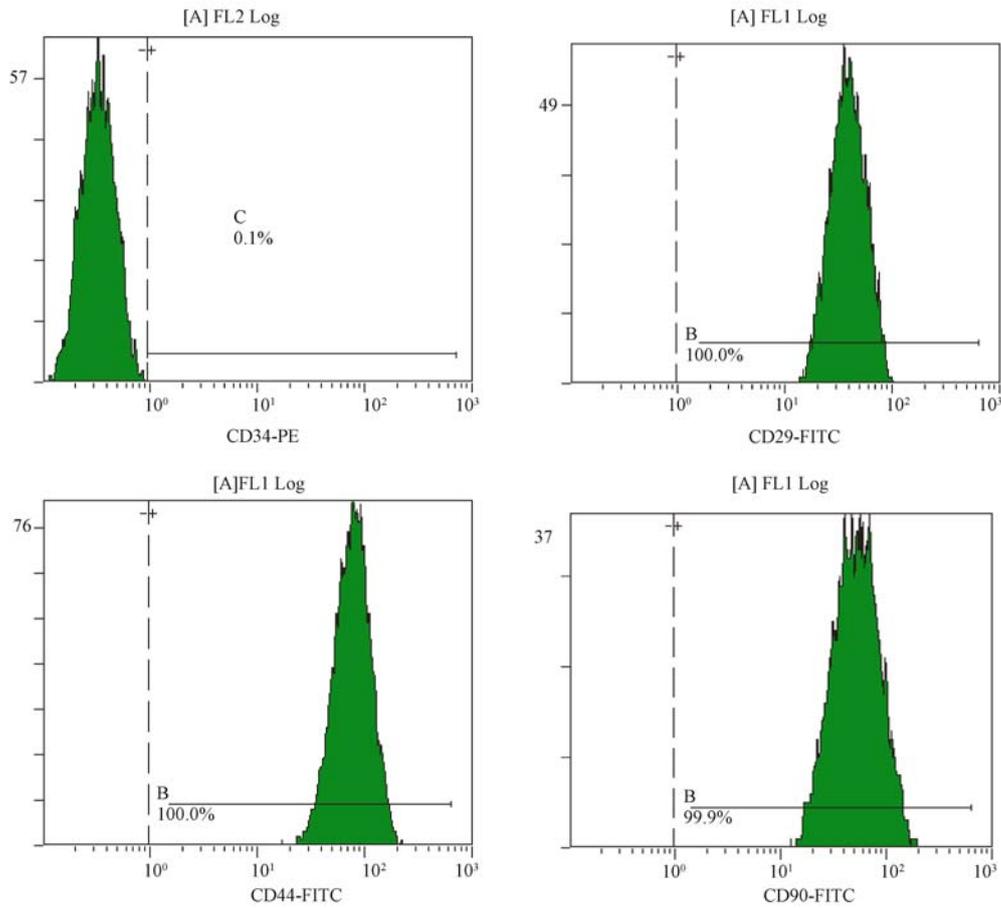
生长良好的第三代细胞经流式细胞仪检测,结果显示 cUCMSC 表达间充质细胞特异性抗原标志而不表达造血干细胞特异性标志。造血干细胞阳性标记 CD34 为阴性(图 2A),而 CD29、CD90、CD44 均阳性表达,阳性率均在 95% 以上(图 2B、2C、2D)。

### 2.3 分化潜能鉴定

体外诱导分化实验显示:第三代细胞经成软骨分化诱导培养 14 d 后,固定并行病理切片检测,可观察到大量氨基葡聚糖被阿新兰染成蓝色(图 3A, A1),即成软骨分化阳性。同样,成脂分化诱导培养 14 d 后,可观察到大量脂滴的出现,油红 O 染色后,可见脂滴被染成红色(图 3B, B1),即成脂分化阳性;成骨分化诱导培养 21 d 后,可观察到白色结节,茜素红染色后,可见钙质结节被染成红色(图 3C, C1),即成骨分化阳性(图 3 见封三)。

## 3 讨论

猴与人类基因组相似程度高达 95%,是开展人类临床前研究的珍贵实验动物。食蟹猴具有体型



注:A. CD34 阴性表达; B. CD29 阳性表达; C. CD44 阳性表达; D. CD90 阳性表达。

图 2 cUCMSC 的免疫表型分析

Note: A. Negative expression of CD34; B. Positive expression of CD29; C. Positive expression of CD44; D. Positive expression of CD90.

Fig. 2 Immunophenotype analysis of the cUCMSC

小,饲养成本低,性情温顺,便于实验操作等优点,近年来被越来越多地用于药物安全性评价等生物医学实验研究<sup>[2]</sup>。随着干细胞应用基础研究不断取得进展,迫切需要使用非人灵长类实验动物广泛开展干细胞临床应用安全性评价实验研究。脐带是连接胎儿与胎盘的索状结构组织,是胎儿与母体物质交换的主要通道。利用脐带来分离扩增间充质干细胞,取材十分方便,可一次性获得较多组织而在短时间内扩增出足够数量的细胞;其次,脐带属于胎儿组织的一部分,含有胚胎发育过程中遗留的大量原始细胞,从脐带组织中可以分离获得增殖分化能力强的原始干细胞,不像 BMMSC 那样容易受到供体年龄的限制<sup>[5,7]</sup>;此外,由于胎盘屏障的存在,使得脐带受到各种病原微生物感染的机会较低。因此,脐带是获取间充质干细胞的重要组织来源。

本研究结果表明:一只健康足月剖宫产胎猴,一

次可以获得 5 cm 长的脐带,剪碎后采用贴壁培养方法,可以分离到大量贴壁生长的成纤维细胞样细胞,流式分析结果显示这些细胞高表达 CD29、CD44、CD90,体外诱导分化实验证实这些细胞可以分化为脂肪、骨和软骨细胞,这些结果与任振华等报道的结果<sup>[3]</sup>一致。根据间充质干细胞的鉴定标准<sup>[8]</sup>,可以判定这些贴壁生长的细胞就是 cUCMSC。从这些实验结果可以看出:一次获得 5 cm 长的食蟹猴脐带组织,远远超过骨髓采集途径获得的组织数量,在短期内可以扩增获得足够数量的干细胞,相对于 cBMMSC 而言,这是 cUCMSC 最大的优势所在。比如在干细胞静脉输注治疗安全评价等实验研究<sup>[9]</sup>中,需要在 5 周之内为 1 只体重 5 kg 的食蟹猴准备  $5 \times 10^7$  的干细胞,这对干细胞安全评价试验提出了很高的要求,如果采用本研究建立的 cUCMSC 分离培养方法,很容易达到实验要求。其次,cUCMSC 不像 cBMMSC 那样容易受到供体年龄

的限制<sup>[3,5]</sup>,脐带组织含有胚胎发育过程中遗留的大量原始干细胞,通过分离扩增可以获得 Oct-4、Nanog 等抗原标志阳性的多潜能干细胞已经得到研究证实<sup>[10-12]</sup>,这些 Oct-4、Nanog 阳性的干细胞具有更大的分化潜能,被认为是组织修复治疗真正的干细胞<sup>[13]</sup>。

综上所述,本研究证明了 cUCMSC 是开展再生医学和组织工程研究更理想种子细胞,同时本研究建立的 cUCMSC 分离培养方法容易规模化生产,我们已经成功建立了 cUCMSC 资源库,可供国内外开展以食蟹猴为研究背景的科技工作者使用研究。

#### 参考文献:

- [ 1 ] McElreavey KD, Irvine AI, Ennis KT, et al. Isolation, culture and characterization of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord [J]. *Biochem Soc Trans*, 1991, 19(1): 29-33.
- [ 2 ] 唐贤丽,徐龙建,久田,等.实验用食蟹猴的生物学指标 [J]. *中国比较医学杂志*, 2007, 17(6): 325-328.
- [ 3 ] 任振华,王佳茵,邹春林,等.对比不同年龄段食蟹猴骨髓间充质干细胞的生物学特征 [J]. *中国科学:生命科学*, 2010, 40(4): 321-331.
- [ 4 ] 任振华,王佳茵,王淑艳,等.非立磁标记食蟹猴骨髓间充质干细胞的脑内移植示踪研究 [J]. *生物物理学报*, 2012, 28(3): 224-231.
- [ 5 ] Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow [J]. *Stem Cells*, 2007, 25(6): 1384-1392.
- [ 6 ] 庞荣清,何洁,李福兵,等.一种简单的人脐带间充质干细胞分离培养方法 [J]. *中华细胞与干细胞杂志*, 2011, 1(2): 162-167.
- [ 7 ] Kim DW, Staples M, Shinozuka K, et al. Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: phenotypic characterization and optimizing their therapeutic potential for clinical applications [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(6): 11692-11712.
- [ 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(4): 315-317.
- [ 9 ] 孙丽,杜杰,刘玥,等.异种和同种异体脐带间充质干细胞给予食蟹猴的安全性比较 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2013, 27(3): 506-507.
- [ 10 ] Carlin R, Davis D, Weiss M, et al. Expression of early transcription factors Oct4, Sox2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2006, 4(1): 8.
- [ 11 ] Jo CH, Kim OS, Park EY, et al. Fetal mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord sustain primitive characteristics during extensive expansion [J]. *Cell Tissue Res*, 2008, 334(3): 423-433.
- [ 12 ] Fong CY, Chak LL, Biswas A, et al. Human Wharton's jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cell Rev*, 2011, 7(1): 1-16.
- [ 13 ] Bhartiya D, Shaikh A, Nagvenkar P, et al. Very small embryonic-like stem cells with maximum regenerative potential get discarded during cord blood banking and bone marrow processing for autologous stem cell therapy [J]. *Stem Cells Dev*, 2012, 21(1): 1-6.

[ 修回日期 ] 2015-02-05