

树鼩骨髓间充质干细胞体外分离培养及成脂成骨诱导

陆彩霞, 李晓飞, 王文广, 孙晓梅, 仝品芬, 匡德宣, 代解杰

1. 中国医学科学院, 北京协和医院医学生物学研究所树鼩种质资源中心, 昆明 650118;
2. 云南省重大传染病疫苗研发重点实验室, 昆明 650118)

【摘要】 目的 探讨树鼩骨髓间充质干细胞(BM-MSCs)的体外分离、传代及定向诱导为脂肪细胞和成骨细胞的可行性。**方法** 通过密度梯度离心联合贴壁培养法对树鼩骨髓间充质干细胞进行体外分离、扩增、纯化, 倒置相差显微镜进行形态学观察。用成脂诱导液(DMEM/F12 + 10% FBS + 100 U/mL 青霉素 + 100 μg/mL 链霉素 + 1.0 μmol/L 地塞米松 + 0.2 mmol/L 吡啶美辛 + 0.01 mg/mL 胰岛素 + 0.5 mmol/L IBMX)和成骨诱导液(高糖 DMEM + 10% FBS + 100 U/mL 青霉素 + 100 μg/mL 链霉素 + 50 ng/mL BMP-2)对分离的树鼩 BM-MSCs 分别定向诱导为脂肪细胞和成骨细胞。**结果** 原代和传代细胞为梭形或三角形, 可增殖形成克隆。BM-MSCs 成脂诱导后油红 O 染色细胞内出现红色脂滴, 成骨诱导后茜素红染色可观察到矿化结节。**结论** 密度梯度离心联合贴壁培养法分离培养树鼩 BM-MSCs 简便可行, 获得的 BM-MSCs 可体外诱导分化为脂肪细胞和成骨细胞。

【关键词】 树鼩; 骨髓间充质干细胞; 细胞培养; 成脂诱导; 成骨诱导

【中图分类号】 R329 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 03-0010-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.003.003

Isolation, culture, adipogenic and osteogenic induction of *Tupaia* bone marrow mesenchymal stem cells

LU Cai-xia, LI Xiao-fei, WANG Wen-guang, SUN Xiao-mei, TONG Pin-fen, KUANG De-xuan, DAI Jie-jie

1. The Center of Tree shrew Germplasm Resources, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Kunming 650118, China;
2. Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research & Development on Severe Infection Diseases, Kunming 650118, China)

【Abstract】 Objective To study the isolation, culture, adipogenic and osteogenic induction *Tupaia* bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs). **Method** The BM-MSCs from tupaia were isolated and expanded by combination of gradient centrifugation and adherence culture, then subcultured and observed for morphology under inverted phase contrast microscope. BM-MSCs were induced to adipocytes and osteoblasts in vitro **Result** Cells were spindle or triangle-shaped, and clone proliferation. Cells were successfully induced into adipocytes and osteoblasts **Conclusions** The method of isolation BM-MSCs from *tupaia* by combination of gradient centrifugation and adherence culture is simple and feasible, BM-MSCs have differentiation potential into adipocytes and osteoblasts.

【Key words】 *Tupaia*; Bone marrow mesenchymal stem cells; Cell culture; Adipogenic induction; Osteogenic induction

[基金项目] 国家科技支撑计划 (2011BAI15B01-21; 2012BAI39B01; 2014BAI01B01)。

[作者简介] 陆彩霞, 女, 助理研究员, 研究方向: 实验动物与人类疾病动物模型, E-mail: lcx@imbcams.com.cn。

[通讯作者] 代解杰, 男, 研究员, E-mail: dj@imbcams.com.cn。

骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cell, BM-MSCs) 是一群来源于骨髓组织中的非造血细胞, 具有自我更新和可诱导分化为脂肪细胞、肌细胞、成骨细胞、软骨细胞、神经细胞和肝细胞等具有多向分化潜能的细胞^[1]。BM-MSCs 能分泌细胞因子和生长因子, 可通过旁分泌和内分泌机制发挥免疫调节作用修复受损的组织器官^[2], 在组织工程中具有良好的应用前景。目前已从人、猴、犬、兔、羊和大小鼠中分离培养出 BM-MSCs, 但各物种的 BM-MSCs 在形态和反应性上存在种属差异, 如体外贴壁生长时, 不同种属的 BM-MSCs 细胞形态明显不同, 对同样诱导剂的反应不同^[3]。树鼯作为一种新型实验动物, 近年来在生物医学研究中其应用范围越来越广, 开展树鼯 BM-MSCs 的分离培养, 研究其形态特征和反应性, 为探索树鼯 BM-MSCs 作为种子细胞应用于疾病干细胞治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

F1 代成年树鼯 (雌雄不限, 体重 110 ~ 130g, 来自中国医学科学院医学生物学研究所, 实验动物生产许可证 SCXK(滇)K2013-0001, 使用许可证 SYXK(滇)K2013-0001)。

1.2 主要试剂及仪器

人淋巴细胞分离液 (天津灏洋生物制品有限公司)、DMEM/F12 (Thermo)、高糖 DMEM (Thermo)、胎牛血清 (Thermo)、地塞米松 (Enzo)、3-异丁基-1 甲基黄嘌呤 (IBMX)、胰岛素、吡啶美辛 (Sigma)、噻唑蓝 (MTT)、油红 O (Sigma)、DMSO (Sigma)、茜素红 (Solarbio)、BMP-2 (PeproTech)、胰酶、肝素钠、青霉素、链霉素、倒置显微镜、二氧化碳孵箱、酶标仪。

1.3 实验方法

1.3.1 BM-MSCs 的原代取材、分离与培养: 取 F1 代成年树鼯, 采用颈椎脱臼法处死动物, 无菌条件下取出树鼯的双股骨和胫骨, 粘膜用碘酒浸泡后移入超净工作台, 用生理盐水清洗 2 遍后, 剪去骨头两端, 露出骨髓腔。1 mL 注射器吸取肝素钠并沿骨髓腔吸取骨髓, 之后用生理盐水冲洗骨髓腔, 反复 2 次, 并将吸取物和冲洗物移入离心管, 对倍加入 PBS 混悬细胞。在离心管中先加入 2 mL 淋巴细胞分离液再沿管壁缓慢加入细胞悬液, 室温 3500 r/min 离心 30 min, 取中间层, 加入 PBS 混悬细胞, 室温 1500 r/min 离心 10 min, 倒掉上清, 用含 10% FBS、100 U/

mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM/F12 重悬细胞, 吹打混匀后移至 25 cm² 培养瓶中, 在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 条件下培养。

1.3.2 BM-MSCs 的传代培养: 培养 72 h 后全量换液, 以后每 3 ~ 4 d 换液, 待细胞生长至 90% 融合后, 用 0.25% 胰酶消化按 1:2 传代培养。倒置相差显微镜下观察细胞形态及生长状况。

1.3.3 树鼯 BM-MSCs 生长曲线测定: 取第 5 代的 BM-MSCs, 0.25% 胰酶消化后制备细胞悬液, 调整细胞浓度为 4 \times 10⁴ 个/mL, 接种 96 孔板, 每孔 200 μ L, 每 3 d 换液。分别于 1、2、3、4、5、6、7、8 d, 每天取 3 孔行 MTT 法检测 (每孔加入 MTT 20 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h 后吸出上清, 每孔加入 150 μ L DMSO, 震荡 10 min) 在酶标仪 490 nm 处测定吸光度值, 绘制细胞生长曲线。

1.3.4 树鼯 BM-MSCs 向脂肪细胞诱导: 取第三代树鼯 BM-MSCs, 0.25% 胰酶消化后以 1 \times 10⁴ 个/mL 接种 6 孔板, 常规培养基培养细胞贴壁融合至 90% 后, 培养液改为成脂诱导液 (DMEM/F12 + 10% FBS + 100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素 + 1.0 μ mol/L 地塞米松 + 0.2 mmol/L 吡啶美辛 + 0.01 mg/mL 胰岛素 + 0.5 mmol/L IBMX), 每隔 48 h 换液, 诱导 2 周后进行油红 O 染色。

1.3.5 树鼯 BM-MSCs 成骨细胞诱导: 取第三代树鼯 BM-MSCs, 0.25% 胰酶消化后以 1 \times 10⁴ 个/mL 接种 6 孔板, 常规培养基培养细胞贴壁融合至 90% 后, 培养液改为成骨诱导液 (高糖 DMEM + 10% FBS + 100 U/mL 青霉素 + 100 μ g/mL 链霉素 + 50 ng/mL BMP-2), 每隔 48 h 换液, 诱导 18 d 后进行茜素红染色。

2 结果

2.1 形态学观察

原代细胞: 倒置显微镜下, 刚接种后可见大量小圆形悬浮细胞, 24 h 后可见细胞开始贴壁, 48 h 后贴壁细胞开始变形, 呈椭圆形或短的梭形, 72 h 后贴壁细胞开始增殖, 细胞呈梭形或三角形。5 d 左右可见贴壁细胞分裂形成不同大小的细胞集落, 成纤维细胞逐渐增多, “菊花样”聚落形成较多, 并呈放射状向周围扩展, 逐渐与邻近集落相互融合, 8 d 左右即可达 80% 融合。原代细胞生长相对较慢, 培养 12 d 左右可融合成单层 (彩插 2 图 1)。

传代细胞: 原代细胞培养第 12 天左右可第 1 次

传代,之后每 6~7 d 即可传代 1 次,传代培养的细胞生长速度比原代快,其形态为均一梭形。接种 2 h 左右即可见细胞贴壁,4 h 左右贴壁细胞即可开始克隆生长,3 d 左右即可达 80% 融合,形态呈长梭形,多呈“菊花状”排列(彩插 2 图 2),8 d 左右生长逐渐缓慢。

2.2 细胞生长曲线

BM-MSCs 接种后 1~2 d 为潜伏期,从第 3 天起细胞开始增殖并进入对数生长期,第 5~6 天到达高峰,以后进入平台期(图 3)。

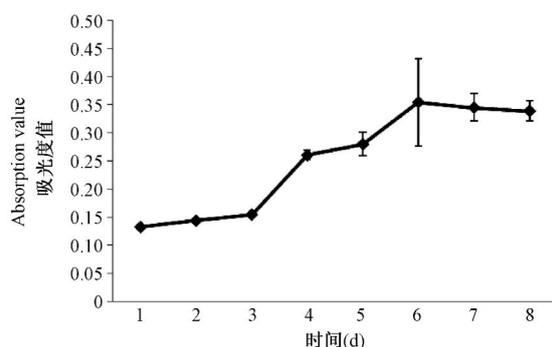


图 3 P5 代 BM-MSCs 生长曲线(4×10^4 cells/mL)

Fig. 3 Growth curve of *Tupaia* bone marrow mesenchymal stem cells

2.3 成脂诱导后鉴定

树鼩 BM-MSCs 成脂诱导 6 d 后,镜下可见细胞变圆变大,细胞内有小的脂滴形成,成“葡萄样”改变,随着培养时间的增加细胞内脂滴逐渐变大,诱导 14 d 后油红 O 染色可见脂滴被染成红色(彩插 3 图 4)。

2.4 成骨诱导后鉴定

树鼩 BM-MSCs 成骨诱导 18 d 后进行茜素红染色,镜下可见大量红色结节(彩插 3 图 5)。

3 讨论

BM-MSCs 最早由 Friedenstein 和 Petrakova 报道^[4],1999 年 Pittenger^[5] 统一将骨髓间充质干细胞作为正式的命名,其仅占骨髓内单核细胞的 $1/10^4 \sim 1/10^5$,因此分离纯化和大量扩增 BM-MSCs 使其能作为组织工程的种子细胞,其分离纯化方法就显得尤为重要。目前 BM-MSCs 的分离方法主要有四种^[6]:贴壁分离筛选法、密度梯度离心法、流式细胞仪分选法和免疫磁珠分离法。贴壁法是利用 BM-MSCs 贴壁生长而造血系细胞悬浮生长的特性,通过定期换液除去悬浮细胞,达到分离纯化 BM-MSCs

的目的。密度梯度离心法是利用 Percoll 和 Ficoll 分离液将骨髓中不同比重的细胞成分分开得到单个核细胞群,再在培养瓶中培养。流式细胞仪分选和免疫磁珠法都是利用 BM-MSCs 表达 CD29/CD44,不表达 CD34/CD45 进行正选或负选而获得相对纯化的细胞。后两种分离方法过程繁琐,费用昂贵,对细胞活性影响很大,加之目前尚未发现特异性很高的表面标志分子,使其应用受限。树鼩作为一种新型实验动物,其 BM-MSCs 的细胞表面分子还未有相应的免疫试剂,故后两种分离方法显然不适用于树鼩 BM-MSCs 的分离。目前对不同物种 BM-MSCs 的分离多采用的是前两种方法,其中兔、大鼠 BM-MSCs 分离多采用贴壁分离法,分离到的 BM-MSCs 细胞比较粗短,密度大时仍呈不规则多边形,多呈阶梯状平行排列^[3,7-8]。人 BM-MSCs 分离可采用贴壁分离法和密度梯度离心法,其中⁶⁰Co 照射处理培养瓶结合贴壁法分离 BM-MSCs,获得的 BM-MSCs 活性好,传代力持久,细胞数量多,纯度高,获得的 BM-MSCs 细胞比较长,密度大时呈菊花状、蜂窝状生长^[3,9]。我们采用密度梯度离心联合贴壁法分离树鼩 BM-MSCs,经过换液和传代培养后,获得了相对较纯的细胞,细胞形态为梭形或三角形,呈蜂窝状生长与人的 BM-MSCs 细胞形态较为相似。树鼩 BM-MSCs 生长曲线呈 S 形,符合正常细胞的生长特性,1~2 d 为潜伏期,从第 3 天起细胞开始增殖并进入对数生长期。分离培养获得的树鼩 BM-MSCs 在体外生长活跃,原代细胞生长较为缓慢,传代后 3 d 左右即可达到 80% 融合,增殖能力较强,可作为组织工程中种子细胞的来源。

国际细胞治疗学会间充质及组织干细胞委员会提出鉴定人来源 BM-MSCs 有 3 条最低标准^[10]:①对塑料底物的贴附特性。②流式细胞仪检测, BM-MSCs 群体表达 CD105、CD73、CD90 阳性率 $\geq 95\%$,而 CD45、CD34、CD14 或 CD11b、CD79a 或 CD19、HLA-DR 阳性率 $\leq 2\%$ 。③具有多向分化潜能。该声明特别指出,对于动物来源的 BM-MSCs,除第二条标准不具备普遍意义的适用性外,第一、第三条标准同样适用于动物来源的 BM-MSCs。由于树鼩作为一种新型的正在实验动物化的实验动物,其 BM-MSCs 的细胞表面分子还未有相应的免疫试剂,故目前还不能采用流式细胞仪对分离到的 BM-MSCs 进行细胞表面分子表达鉴定,相关的免疫试剂还有待研发。我们对分离到的 BM-MSCs 进行

体外定向诱导分化为脂肪细胞和成骨细胞,发现用此方法分离到的 BM-MSCs 能高效向脂肪细胞和成骨细胞诱导分化。BM-MSCs 能否向脂肪细胞和成骨细胞分化,在一定程度上取决于培养条件。实验在培养基中加入了 BM-MSCs 向脂肪细胞分化所必须的成分,即 3-异丁基-1 甲基黄嘌呤 (IBMX)、地塞米松、胰岛素和吡啶美辛。IBMX 可提高细胞内 cAMP 水平,激活 cAMP 反应元件结合蛋白-CREB,调控 C/EBP α 和 C/EBP β 的表达,参与脂肪细胞的形成;地塞米松通过激活糖皮质激素受体诱导 C/EBP 的表达,并降低脂肪细胞分化抑制因子的表达;胰岛素通过与 IGF-1 受体结合后调控 CREB 的磷酸化和转录^[11-12]。实验中用含 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松、0.2 mmol/L 吡啶美辛、0.01 mg/mL 胰岛素和 0.5 mmol/L IBMX 的成脂诱导液诱导 BM-MSCs,诱导培养第 6 天即可在镜下观察到细胞内出现脂质空泡,随着诱导时间的延长,脂质空泡逐渐变大,形成“葡萄样”改变,经油红 O 染色后可见到脂质空泡被染成红色。骨髓间充质干细胞向成骨细胞诱导,经典的诱导方法是在培养基中加入维生素 C,地塞米松和 β -磷酸甘油钠^[5],也可用骨形态蛋白 2 (BMP-2),进行诱导^[13]。实验中我们采用 BMP-2 诱导,发现可以成功诱导为成骨细胞,茜素红染色可见大量红色结节。

BM-MSCs 来自成年的细胞,不涉及道德及伦理学方面的问题,其容易在体外培养,具有高度的扩增能力,传代后基因稳定性良好;具有多分化潜能,能在不同的诱导条件及合适的体内生长微环境中,定向分化为不同的组织细胞系;同源性 BM-MSCs 能通过各种途径输入体内,在不引起免疫排斥的同时,能在损伤部位修复受损的器官和组织^[6];可在世界各地不同条件的实验室里繁殖和复制,可对获得的 BM-MSCs 进一步细分亚类的细胞系,用于不同的治疗目的^[14]。正因为 BM-MSCs 具有这些优点,近几年来被大量应用于实验及临床研究,美国 FDA 及中国 SFDA 均已批准 BM-MSCs 进入 II 期临床实验^[15-16]。树鼯作为近年来研究比较热的新型实验动物,其 BM-MSCs 分离培养还处在摸索阶段,本实验研究发现采用密度梯度离心联合贴壁法可以成功分离树鼯 BM-MSCs,分离后的 BM-MSCs 具有向脂肪细胞和成骨细胞分化的潜能,可为树鼯 BM-MSCs 应用于疾病干细胞治疗提供实验依据。

参考文献:

- [1] JIANG Y, JAHAGIRDAR BN, REINHARDT RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow [J]. *Nature*, 2002, 13: 1185 - 1188.
- [2] Ming Li and Susumu Ikehara Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells for Organ Repair [J]. *Stem Cells International*, Volume 2013, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/132642>.
- [3] 夏冰,王捷,郭立达,不同种属骨髓间充质干细胞体外培养特性的比较研究[J]. *中国微侵袭神经外科杂志 (CMINSJ)*, 2006, 11(12):555 - 557.
- [4] Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs [J]. *Exp Hematol*, 1976, 4(5):267 - 274.
- [5] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells [J]. *Science*, 1999, 284(5411):143 - 147.
- [6] 王彤. 骨髓间充质干细胞临床研究进展 [M]. 人民卫生出版社, 2010. 1.
- [7] 庾佳佳,汪新柱,赵琳等. 兔骨髓间充质干细胞的分离培养及成骨诱导 [J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(6):974 - 979.
- [8] 刘贤华,全青英,白晓东. 人骨髓间充质干细胞体外不同分离与培养方法的比较 [J]. *武警医学*, 2012, 23(10):836 - 839.
- [9] 王寒,赵根尚,周玉阳等. SD 大鼠骨髓间充质干细胞分离提纯及鉴定 [J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2012, 26(5):436 - 438.
- [10] 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 *Cytherapy*. 2006; 8(4):315 - 317.
- [11] Nuttall ME, Gimble JM. Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and consequent therapeutic implication [J]. *Curr Opin Pharmacol*. 2004; 4:290 - 294.
- [12] Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, et al. Transcriptional regulation of adipogenesis [J]. *Genes Dev*. 2000; 14:1293 - 1307.
- [13] Pierre J Marie, Olivia Fromigué. Osteogenic differentiation of human marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *Regenerative Med*. (2006) 1(4), 539 - 548.
- [14] 王彤,黄子通. 骨髓间充质干细胞与心血管疾病 [J]. *中国急救医学*, 2008, 28(7):645:648
- [15] Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, et al. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 Aug 9; 102(32):11474 - 11479.
- [16] 赵春华. 干细胞原理、技术与临床 [M]. 北京:化学工业出版社, 2006.

[修回日期] 2014-02-12