

猪骨髓基质细胞的分离培养及生物学特性研究

熊奎州,张彦明,王文秀,温元鹏,解林红,张 浩,邓 文

(西北农林科技大学 动物医学院,陕西 杨凌 712100)

【摘要】 **【目的】** 探讨猪骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)的体外分离培养方法,并对猪 BMSCs 的生物学特性进行研究,旨在建立一种稳定的体外培养猪 BMSCs 的方法体系。**【方法】** 分离刚出生猪的 BMSCs 进行体外培养,传代,分别观察原代及传代细胞的形态和分化特征,绘制生长曲线,测定细胞分裂指数和贴壁率。采用细胞免疫化学染色对碱性磷酸酶(ALP)进行检测,以确定成骨分化能力,并通过免疫组化法对表面分子 CD44、CD34 进行染色鉴定。**【结果】** 猪 BMSCs 体外生长良好,细胞接种后 1~2 d 生长缓慢,2~5 d 进入对数生长期,6 d 后细胞数开始下降;猪 BMSCs 在第 4 天分裂指数最高,约为 10%;猪 BMSCs 传代后 10 h 贴壁率最高,达 90%以上。猪 BMSCs ALP 染色阳性率达到 75%;CD44 阳性率可达 98.83%,而 CD34 在第 2 代后消失;猪 BMSCs 在第 5 代以前生长形态稳定,培养至 7 代后,衰老现象严重。**【结论】** 该方法分离的猪 BMSCs 早期生长性状稳定,增殖速度快,并获得了高纯度的猪 BMSCs,据此建立了一种稳定的体外培养猪 BMSCs 的方法体系。

【关键词】 骨髓基质细胞;分离培养;猪;生物学特性

【中图分类号】 Q813.1⁺1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2008)10-0019-05

Isolation, cultivation and biological characteristics of bone marrow stromal cells of swine *in vitro*

XIONG Kui-zhou, ZHANG Yan-ming, WANG Wen-xiu, WEN Yuan-peng,
XIE Lin-hong, ZHANG Hao, DENG Wen

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** The study was to explore and establish a stable culturing system of swine bone marrow stromal cells (BMSCs) *in vitro*. **【Method】** BMSCs were isolated from the newborn pigs, primarily cultured and passaged. Growth of cells was observed and curves of cells were drawn to determine the divisional index and cells adhesive rate. Alkaline phosphatase (ALP) of cells was detected by using cytochemistry staining and CD44 and CD34 cells were detected by using immunohistochemistry staining. **【Result】** The swine BMSCs grew well *in vitro*. On the 1st and 2nd day, cell grew slowly, while between the 2nd and 5th day, they reached logarithmic growth phase. And the amount of cells declined after the 6th day. The division index reached the highest of 10% on the 4th day of culturing. 10 hours after passaged, the adhesive rate of swine BMSCs climbed to 90% or above. Positive rate of ALP staining was 75%. And the positive rate of CD44 staining reached the highest of 98.83%, while CD34 could not be detected after passage 2. Within the previous five generations, cells stayed stable in shape, whereas, they aged dramatically after the 7th generation. **【Conclusion】** All the results above indicated that pig BMSCs isolated from newborn pigs grew well at the early culturing, and cells proliferated quickly. High purification of pig SBMSCs were ob-

* [收稿日期] 2007-10-25

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30471290)

[作者简介] 熊奎州(1982—),男,四川渠县人,在读硕士,主要从事细胞培养与病毒致细胞病变机理研究。

[通讯作者] 张彦明(1956—),男,陕西南郑人,教授,博士,博士生导师,主要从事分子病原学与病毒致病机理研究。

tained. Therefore an *in vitro* culture system of swine BMSCs was established.

Key words: bone marrow stromal cells (BMSCs); isolation and culturing; swine; biological character

骨髓基质细胞 (bone marrow stromal cells, BMSCs) 具有多种分化潜能, 能在不同诱导条件下分化为成骨细胞^[1]、成纤维细胞、软骨细胞、脂肪细胞、成肌细胞, 甚至神经胶质细胞和神经细胞^[2]。在临床试验研究中, BMSCs 常作为种子细胞用于引导骨组织再生, 以及牙周骨缺损的修复^[3-4]。由于人 BMSCs 的来源有限, 因此在许多领域的研究受到限制。猪 BMSCs 的来源较容易, 而且猪 BMSCs 是一些病毒的靶细胞, 在病毒的体外增殖和病毒致病机理研究中应用极广, 因此是一种理想的细胞模型^[5]。长期以来, 人们对小鼠、兔等动物的 BMSCs 研究较多, 但对猪的 BMSCs 研究很少。

本研究探讨了猪 BMSCs 体外分离培养的方法, 并对其生物学特性进行了初步研究, 以期为进一步建立永生化猪 BMSCs 奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

超低温冰箱, 日本三洋公司产品; 倒置相差显微镜, Nikon 公司产品。DMEM、胎牛血清、L-谷氨酸、胰蛋白酶, 均购自 Invitrogen 公司; 二甲基亚砜, Sigma 公司产品; 地塞米松、 β -甘油磷酸钠、碱性磷酸酶 (ALP) 染色试剂, 均为 Gibco 公司产品。

1.2 猪 BMSCs 的分离及原代培养

将刚出生小猪 (由西北农林科技大学实验猪场提供) 放血致死, 分离四肢皮肤及肌肉组织, 无菌条件下取出股骨和胫骨, 置于 750 mL/L 酒精中浸泡 10 min, 切除两侧干骺端, 用灭菌钢锯将其锯成两段, 再用钢钳钳破骨腔, 挤压钢钳使骨髓液流出, 收集骨髓液于无菌离心管, 1 500 r/min 离心 20 min, 弃上清, 沉淀用含体积分数 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液重悬, 轻轻吹打成单细胞悬液。取 5 mL 细胞悬液接种于 100 mL 培养瓶, 于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱内培养 3 d 后更换培养液, 倒置相差显微镜下观察细胞形态。继续培养, 每 3 d 换液 1 次, 待细胞汇合达 70%~80% 时, 用 2.5 g/L 胰蛋白酶在 37 °C 消化, 台盼蓝排斥试验测定细胞活力, 计数有核细胞数量。按 1×10^5 mL⁻¹ 浓度接种于 100 mL 培养瓶, 倒置相差显微镜下观察。

1.3 猪 BMSCs 的传代培养

待原代猪 BMSCs 铺满瓶底约 90% 时, 吸弃培

养液, 用 EDTA 洗 1 遍细胞。加入 2.5 g/L 胰蛋白酶, 显微镜下观察, 待细胞开始变圆但尚未脱落时弃去消化液, 立即加入培养液终止消化, 将细胞轻轻吹打成细胞悬液, 按 1:3 传代, 继续培养。

1.4 猪 BMSCs 生长曲线、细胞分裂指数曲线的绘制及细胞贴壁率的测定

取生长状态良好的第 2, 3, 4 代 BMSCs, 按 1×10^5 /mL 的细胞密度分别接种于 24 孔培养板, 不同代次细胞每天各取 3 个孔进行计数。以细胞数为纵坐标、培养时间为横坐标绘制生长曲线; 同样方法接种细胞于预置载玻片的 24 孔培养板中, 每天各取 3 孔细胞, 按常规方法用 PBS 进行漂洗, 梯度酒精固定, HE 染色, 显微镜下计数每 1 000 个细胞的细胞分裂指数, 以细胞分裂指数为纵坐标、培养时间为横坐标绘制细胞分裂指数曲线。分别将 2, 3, 4 代 BMSCs 按上述浓度传至 5 个培养皿, 置于培养箱内培养, 每 2 h 取出 1 皿细胞, 弃去培养液, 即除去尚未贴壁的 BMSCs, 2.5 g/L 胰蛋白酶消化贴壁细胞并计数, 根据文献[6]记载的方法计算不同时间的细胞贴壁率。

1.5 猪 BMSCs 的鉴定

1.5.1 猪 BMSCs 向成骨细胞的诱导分化 选择生长状态良好的第 2 代细胞, 用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化 3 min, 制成单细胞悬液, 以 1×10^6 mL⁻¹ 密度接种于 5 个培养皿中, 每皿预置 3 张载玻片, 待细胞长至 50% 时进行成骨细胞诱导, 即在原代培养液中加入 1×10^{-7} mol/L 地塞米松, 10 mmol/L β -甘油磷酸钠, 50 μ g/mL 维生素 C; 对照组加常规的 DMEM 完全培养液^[7]。

1.5.2 碱性磷酸酶 (ALP) 染色 分别于诱导处理后 7, 11 和 15 d 取出载玻片, 用体积分数 4% 多聚甲醛固定细胞, 进行 ALP 染色, 即先用 PBS 洗细胞 3 遍, 加入 ALP 染液, 室温孵育 20~30 min, 镜下观察, 检测成骨细胞, 阳性细胞呈紫红色, 每张载玻片随机选择 3 个视野计数 500 个细胞, 计算阳性率。

1.5.3 猪 BMSCs 的细胞免疫化学法 接种 BMSCs 于 12 孔培养板中, 待其长至 50% 时, 弃去上清, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min, 加入体积分数 4% 多聚甲醛, 固定 15 min。PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min, 加入体积分数 0.2% vTriton-X-100, 静置 10 min; 去除液体, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min。加入体积分

数 3%双氧水,室温静置 10 min,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,山羊血清封闭 30 min,弃去液体,分别加 CD44、CD29 抗体和 CD34 (1 : 100)一抗,4 ℃过夜。PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,加入生物素标记的二抗,室温下孵育 30 min。DAB 显色 2~3 min,冲洗后加入苏木素复染,倒置显微镜下观察、拍照。

1.6 衰老猪 BMSCs 的染色

分别取第 2,3,4,5,6,7 代细胞,用 β -半乳糖苷酶染色试剂盒染色,检测其衰老特性。

2 结果与分析

2.1 猪 BMSCs 的形态及培养特征

镜下观察原代培养的猪 BMSCs 可见混有大量红细胞污染,甚至掩盖已贴壁的 BMSCs,但红细胞随着换液可被逐步清除。之后可见形态各异、大小不一的贴壁细胞,大多数呈星形,多突起,细胞间借

突起相连成网状。至 3~5 d,细胞数量明显增加,胞体以多角形、短梭形为主(图 1A);原代细胞培养 6 d,经台盼蓝染色,其成活率约为 85%;培养至 7 d,细胞融合度达 80%,呈规则平行排列生长(图 1B);9 d 左右细胞铺满瓶底,大多呈成纤维样生长。

2.2 猪 BMSCs 的传代培养

传代后猪 BMSCs 2~4 h 迅速贴壁,8 h 大部分贴壁,10 h 细胞全部贴壁,并开始分裂增殖。细胞呈均匀分布,形态呈细长梭形,并沿一定方向排列。2~5 d 细胞铺满瓶底,即可消化传代。开始时大多为细长梭形,增殖速度快,细胞传代周期缩短,待传至第 7~8 代时,细胞铺展得宽大而扁薄,增殖速度减慢,细胞传代周期延长,细胞内颗粒物质增多。体外分离培养的猪 BMSCs 形态良好、增生活跃,1×10⁵ 个猪 BMSCs 经 3 代培养后,贴壁细胞数可以达到 3×10⁶~1×10⁷(图 1C)。

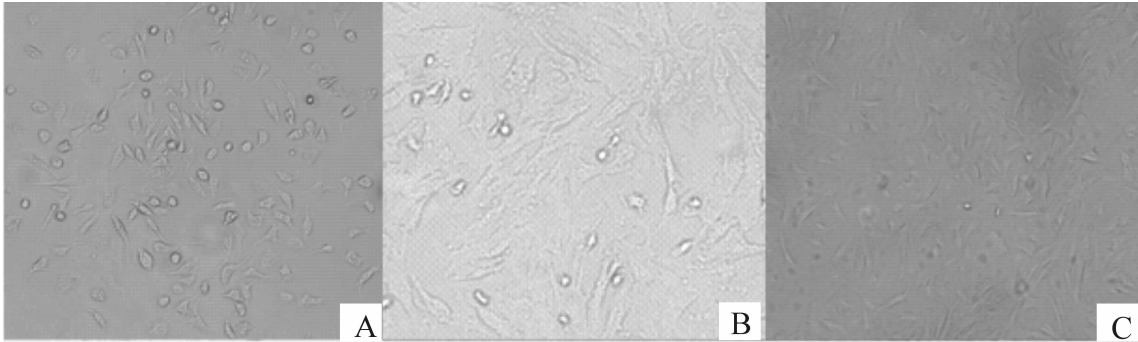


图 1 猪 BMSCs 的培养特性(×100)

A. 原代培养 3 d 细胞;B. 原代培养 7 d 细胞;C. 传代 6 d 细胞

Fig. 1 Culturing characteristic of swine BMSCs(×100)

A. Primary BMSCs on the 3th day;B. Primary BMSCs on the 7th day;C. Subcultured BMSCs on the 3th day

2.3 猪 BMSCs 的生长曲线、分裂指数曲线及贴壁率

图 2 表明,猪 BMSCs 培养 1~2 d 时生长缓慢,2 d 后生长开始加快,进入对数生长期,持续 3 d 左右后进入平台期,6 d 后细胞数开始下降。从图 3 可

以看出,细胞传代 1 d 后,仅有少量细胞分裂,随后逐渐增多;到 4 d 时达到最高峰约 10%,之后时急剧下降。从图 4 可以看出,各代细胞贴壁率无明显差异,消化传代后细胞贴壁较快,4 h 贴壁细胞约为 50%,10 h 时细胞贴壁已达 90%以上。

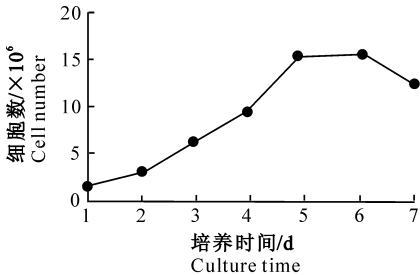


图 2 猪 BMSCs 的生长曲线

Fig. 2 Growth curves of swine BMSCs

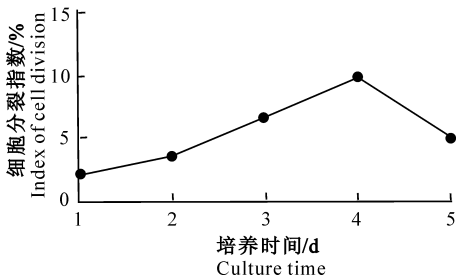


图 3 猪 BMSCs 的分裂指数

Fig. 3 Index of cell division of swine BMSCs

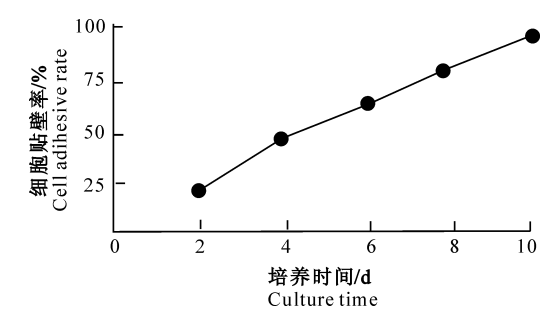


图 4 猪 BMSCs 的贴壁率

Fig. 4 Curve of cell adhesive rate of swine BMSCs

2.4 猪 BMSCs 的鉴定结果

2.4.1 猪 BMSCs 碱性磷酸酶 (ALP) 染色结果

猪 BMSCs ALP 染色阳性细胞呈现胞质内黑色和深黑色颗粒状或片块状沉淀。经计算,传至第 2 代的猪 BMSCs ALP 阳性率在 75% 以上。

2.4.2 猪 BMSCs 的细胞免疫化学鉴定结果 经

细胞免疫化学法检测 CD44、CD34,并用苏木素复染后可见,胞浆呈褐色、胞核呈深蓝紫色的 CD44 阳性细胞(图 5A)以及少量 CD34 阳性细胞。原代培养至 6 代的猪 BMSCs,各代细胞 CD44 阳性率依次为 $(52.35 \pm 6.51)\%$, $(71.35 \pm 8.36)\%$, $(83.56 \pm 10.36)\%$, $(86.43 \pm 5.31)\%$, $(89.47 \pm 5.68)\%$, $(91.34 \pm 9.21)\%$ 和 $(94.55 \pm 4.28)\%$; CD34 阳性率依次为 $(36.42 \pm 6.65)\%$, $(17.36 \pm 2.14)\%$ 和 $(1.89 \pm 3.45)\%$,传至第 2 代以后的猪 BMSCs 已检测不出 CD34 阳性细胞。以上数据显示,随着传代的增加,猪 BMSCs 的纯度随之增加。

2.5 猪 BMSCs 的 β -半乳糖苷酶染色结果

猪 BMSCs 的 2 至 6 代细胞, β -半乳糖苷酶染色的蓝染率较低,细胞形态正常(图 5B);7 代细胞 β -半乳糖苷酶染色的蓝染率较高,细胞形态变圆,胞核散在,突出(图 5C)。

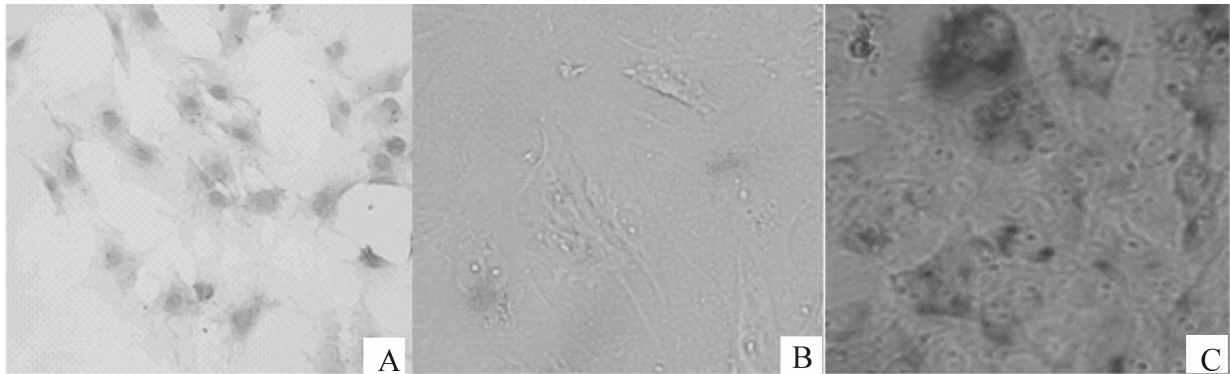


图 5 猪 BMSCs 的染色鉴定结果($\times 200$)

A. CD44 细胞免疫化学染色结果;B. 第 2 代猪 BMSCs β -半乳糖苷酶染色;C. 第 7 代猪 BMSCs β -半乳糖苷酶染色

Fig. 5 Staining identification results of swine BMSCs($\times 200$)

A. Immunohistochemistry staining of CD34 of cells;B. β -galactosidase staining of the 2nd generation of swine BMSCs;
C. β -galactosidase staining of the 7th generation of swine BMSCs

3 讨 论

在体外从骨髓分离获得 BMSCs 的方法主要有全骨髓法、密度梯度离心法、流式细胞术筛选法和免疫磁珠分离法。免疫磁珠分离和流式细胞术筛选的方法,虽然可以获得纯度较高的细胞,但对细胞活性影响较大,而且操作复杂,价格昂贵,获得的细胞数目又非常少,故应用受到限制。密度梯度离心法是根据骨髓中各细胞密度不同的特性来分离获得 BMSCs,此方法虽可排除大量红细胞对骨髓 BM-SCs 贴壁的影响,但破坏了 BMSCs 生长的骨髓微环境,也不宜采用^[8-9]。本研究采用全骨髓法,该法操作简便,将获得的骨髓直接培养,骨髓中的造血干

细胞能分泌生长因子和促贴壁物质,可促进 BMSCs 贴壁生长,根据 BMSCs 的贴壁生长特性,通过更换培养液逐步去除漂浮生长的造血干细胞,获得了纯度较高的 BMSCs,经台盼蓝染色,其成活率为 85% 左右,并且细胞功能正常。经试验观察发现,获取的 BMSCs 形态类似于成纤维细胞;开始贴壁生长时,呈短梭形或多角形,具有长短不等的数个细胞突起;在细胞密集区表现为涡旋状,随着培养时间的延长,相互重叠成多层。

由于 BMSCs 属于黏附型细胞,所以在 BMSCs 培养过程中,有报道称采用 I 型胶原包被培养皿底,可明显促进细胞黏附、贴壁及增殖^[10]。本试验发现,老龄猪的 BMSCs 量少且细胞活力很低;1 月龄

以上的猪虽然 BMSCs 量大,但是其脂肪细胞也相应增多,BMSCs 的纯化难度增加;刚出生小猪的 BMSCs 量较大,其脂肪细胞很少,纯化容易,故本试验采用刚出生小猪作为研究对象,采取 BMSCs 进行体外培养,对其生物学性状进行了初步研究,并对表面特异性分子进行了细胞免疫化学法鉴定。结果表明,CD44 阳性率可达 98% 以上,而 CD34 在第 2 代以后消失,表明本试验方法培养的 BMSCs 纯度较高。本试验对获得的猪 BMSCs 进行体外向成骨诱导,ALP 染色阳性,并有矿化结节生成,证实猪 BMSCs 具有向成骨细胞分化的能力,与 Nandoe 等^[11]报道的一致。本试验采用第 2~4 代细胞进行研究,发现不同代次的细胞生长曲线基本一致,为类 S 形;进入对数生长期的时间为第 2~5 天;此后各项指标均略有下降。以上结果表明,本试验获得的细胞为猪 BMSCs,体外培养的 BMSCs 生长增殖旺盛,生物学性状稳定,为后期细胞的应用提供了试验材料。

[参考文献]

[1] Goldestein A S. Effect of seeding osteoprogenitor cells as dense clusters on cell growth and differentiation[J]. Tissue Eng, 2001,7(6):817.

[2] Herzog E L,Chai L,Krause D S. Plasticity of marrow-derived stem cells [J]. Blood,2003,102(10):3483-3493.

[3] Joshua R, Mauney, Claude Jaquière. *In vitro* and *in vivo* evaluation of differentially demineralized cancellous bone scaffolds

combined with human bone marrow stromal cells for tissue engineering [J]. Biomaterials,2005,26(16):3173-3185.

[4] 孙善珍,刘少华,魏奉才. 体外培养的冠髓和根髓细胞中碱性磷酸酶的活性 [J]. 上海口腔医学,2004,13(6):531-533.

Sun S Z, Liu S H, Wei F C, et al. The ALP activity of cultured dental coronal and root pulp cells *in vitro* [J]. Shanghai Kou Qiang Yi Xue,2004,13(6):531-533. (in Chinese)

[5] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养 [M]. 西安:世界图书出版公司,1996:114.

Situ Z Q, Wu J Z. Cell culture [M]. Xi'an: World Books Press, 1996:114. (in Chinese)

[6] Abdallah B M, Jensen C H, Gutierrez G, et al. Regulation of human skeletal stem cells differentiation by Dlk1/Pref-1 [J]. J Bone Miner Res, 2004,19(5):841-852.

[7] Reyes M, Verfaillie C M. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells [J]. Ann NY Acad Sci,2001,938:231-235.

[8] Service R F. Tissue engineers build new bone[J]. Science, 2000,289:1498-500.

[9] Lennon D P, Edmison J M, Caplan A I. Cultivation of rat marrow-derive mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: effects on *in vitro* and *in vivo* osteochondrogenesis [J]. J Cell Physiol,2001,187(3):345-355.

[10] Prockop D J, Sekiya I, Colter D C. Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells [J]. Cytotherapy,2001,3(5):393-396.

[11] Nandoe R D, Hurtado A, Lebi A D, et al. Bone marrow stromal cells for repair of the spinal cord: towards clinical application [J]. Cell Transplant,2006,15(7):563-577.

欢迎订阅 2009 年《中国粮油学报》

《中国粮油学报》(以下简称《学报》)是中国科学技术协会主管、中国粮油学会主办的学术期刊,为全国食品工业类中文核心期刊,主要刊载谷物、油脂化学工艺学的研究成果,以及粮油行业的发展动态和重要科技信息。

为了进一步适应科技期刊的发展,加快科技信息的传播速度,以更好地服务广大粮油科技工作者,经《中国粮油学报》编委会和中国粮油学会研究决定,报中国科学技术协会和北京市新闻出版局批准,从 2009 年开始,《中国粮油学报》由双月刊变更为月刊。改为月刊后仍为 16 开本,每期 128 页,每月 25 日出版。刊号为:ISSN 1003-0174,CODEN ZLXUFO,CN 11-2864/TS;国内邮发代号:80-720,每期定价 20 元,全年 240 元。欢迎踊跃投稿! 欢迎刊登广告!

地址:北京市西城区百万庄大街 11 号粮科大厦《中国粮油学报》编辑部;邮编:100037
电话:010-68357510/68357507;传真:010-68357510
E-mail:lyxuebao@public.bta.net.cn; lyxuebao@ccoa.info