

大鼠骨髓间充质干细胞的分离与培养

李延清¹, 刘霞^{1,2}

(1 延安大学 生命科学学院, 陕西 延安 716000;

2 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 为了确定大鼠骨髓间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)体外分离和培养的方法, 建立了稳定的 MSCs 体外培养扩增体系, 通过密度梯度离心和贴壁筛选法分离培养大鼠 MSCs, 观察了细胞的形态, 研究了其增殖及生长特征, 并应用流式细胞术测定了细胞周期及 CD29, CD44, CD45 和 HLA-DR 的表达。结果表明, 在体外培养条件下大鼠 MSCs 贴壁生长, 为成纤维细胞样; CD45 和 HLA-DR 的表达呈阴性, CD29 和 CD44 的表达呈阳性; 细胞周期的 G₀/G₁ 期约占 95%, 具有原始细胞的特征。说明建立的体外培养扩增体系可获得形态单一、生长稳定、增殖性较强、较均一的大鼠 MSCs。

[关键词] 大鼠; 骨髓间充质干细胞; 细胞形态; 细胞周期; 密度梯度离心; 流式细胞术

[中图分类号] Q813.1⁺1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)05-0023-04

骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是来自骨髓的两种干细胞之一, 其研究历史可以追溯到 20 世纪初期的骨髓移植研究。近年来, 因其自身所具有的特殊性而日益受到人们的关注。首先, 它是具多向分化潜能的原始骨髓细胞, 在特定条件下可向成骨细胞等多种细胞类型分化, 且易于获得和扩增, 是重要的组织工程种子细胞; 其次, MSCs 的独特增殖分裂模式使外源基因易于导入和表达, 因此, MSCs 是潜在的基因治疗靶细胞^[1-6]。但骨髓中 MSCs 的含量很少, 仅占单个核细胞的 0.001%~0.01%^[7], 因而在体外培养条件下对其进行分离、纯化和扩增是 MSCs 研究和应用的前提条件。本试验旨在探索体外分离和培养大鼠 MSCs 的方法, 以期为进一步研究骨髓间充质干细胞的诱导分化和应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

SD 大鼠、L-DMEM 培养基和 HEPES, Gibco 公司生产; Percoll 细胞分离液, Pharmacia 公司生产; 胎牛血清(FBS), 天津川页生化制品有限公司生产; CD29, CD44, CD45, HLA-DR 单克隆抗体和 FITC 标记的二抗, pharMingen 公司产品; MTT 和台盼蓝, 北京中山生物技术有限公司产品; COUL-

TER EPICS XL 型流式细胞仪, Beckman-Coulter 公司生产; 酶联免疫检测仪由香港大龙分析仪器有限公司生产。

1.2 大鼠 MSCs 的分离与培养

麻醉 SD 大鼠, 在无菌条件下取其股骨骨干, 用含 50 U/mL 肝素的低糖 DMEM(L-DMEM)冲洗骨髓腔, 将冲出的骨髓液移入预先置有等体积 1.073 g/mL Percoll 细胞分离液的离心管中, 以 900×g 离心 30 min。离心后, 收集中间层的单个核细胞, 用 DMEM 洗涤 2 次, 之后以 1.0×10⁶/mL 的浓度接种于培养瓶内, 用含体积分数 10% FBS 的 L-DMEM 在 37℃、饱和湿度及体积分数 5% CO₂ 的条件下进行培养(培养基中加 100 μg/mL 青霉素和 250 ng/mL 链霉素); 72 h 后除去非贴壁细胞, 更换新鲜培养液, 根据细胞生长情况, 每 3 d 半量换液 1 次。倒置相差显微镜逐日观察细胞形态和生长情况, 待细胞生长至铺满瓶底的 80%~90% 时, 用 2.5 g/L 的胰蛋白酶消化, 将此细胞悬液等体积分为 3 份, 分别转接于 3 个培养瓶中进行传代培养, 每 3 d 半量换液 1 次, 直至贴壁细胞彼此融合、铺满瓶底, 再重复上述操作进行传代。

1.3 台盼蓝染色排斥实验

制备浓度为 10⁶/mL 的单个 MSCs 细胞悬液,

[收稿日期] 2005-11-07

[基金项目] 国家自然科学基金项目(39900036)

[作者简介] 李延清(1954—), 女, 陕西延安人, 副教授, 主要从事动物生理学研究。

[通讯作者] 刘霞(1970—), 女, 陕西绥德人, 副教授, 主要从事基础兽医学研究。

然后将 9 滴此细胞悬液移入小试管中,再加 1 滴 4 g/L 的台盼蓝溶液,混匀。于 3 min 内,用血球计数板在镜下分别统计活细胞数和死细胞数(死细胞被染成淡蓝色,而活细胞拒染)。

1.4 生长曲线的绘制

取第 3 代细胞用四唑盐(MTT)比色法测定细胞生长曲线,具体步骤为:细胞按 2×10^4 /mL 接种于 96 孔培养板上,每孔 0.2 mL,待细胞贴壁后每孔加 20 μ L 5 mg/mL 的 MTT 溶液,以培养液为空白对照,置于 37 $^{\circ}$ C 孵育箱中保温 2 h 以上,弃去上清液,加 DMSO 150 μ L/孔,使结晶物充分溶解,用酶联免疫检测仪于 570 nm 处测定 OD 值。每培养板接种 12 孔,每天取 1 板,连续测 8 d,绘出生长曲线。

1.5 细胞表面标志的测定

用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化后收获第 3 代细胞,其分别与抗 CD29,CD44,CD45 和 HLA-DR 的单克隆抗体饱和溶液在室温下反应 30 min,然后用 PBS 洗涤 2 次,再与 FITC 标记的二抗避光作用 15 min。最后用 PBS 洗涤并重悬于 PBS 中,以备流式细胞仪分析。

1.6 MSCs 细胞周期分析

将收获的第 3 代 MSCs 用预冷的无水乙醇固定,调整细胞数量至每份为 6×10^5 个,加入溴化丙锭,室温避光染色 15 min,流式细胞仪分析。

2 结果与分析

2.1 MSCs 的体外生长情况

大鼠骨髓经 Percoll 分离后,可获得乳白色的界面细胞层,该层细胞洗涤后接种培养 3 d,换液去除未贴壁细胞后,可见贴壁生长的 MSCs 数量较少,散在分布,呈大而扁平的梭形(图 1a),10 d 以后开始出现较大的克隆,贴壁细胞迅速增殖,均为成纤维细胞样,胞浆丰富,核大(图 1b)。18 d 左右有 80% 以上细胞融合,每个克隆细胞数量可达数百到数千,每瓶(T-25)可收获 6×10^5 个左右 MSCs,细胞呈现均一的长梭形,呈旋涡状排列(图 1c)。传代后细胞生长迅速,约 1 周左右融合(图 1d,e,f)。第 10 代以后细胞形态变平坦,细胞质疏松,可见空泡,细胞老化,增殖明显变慢。

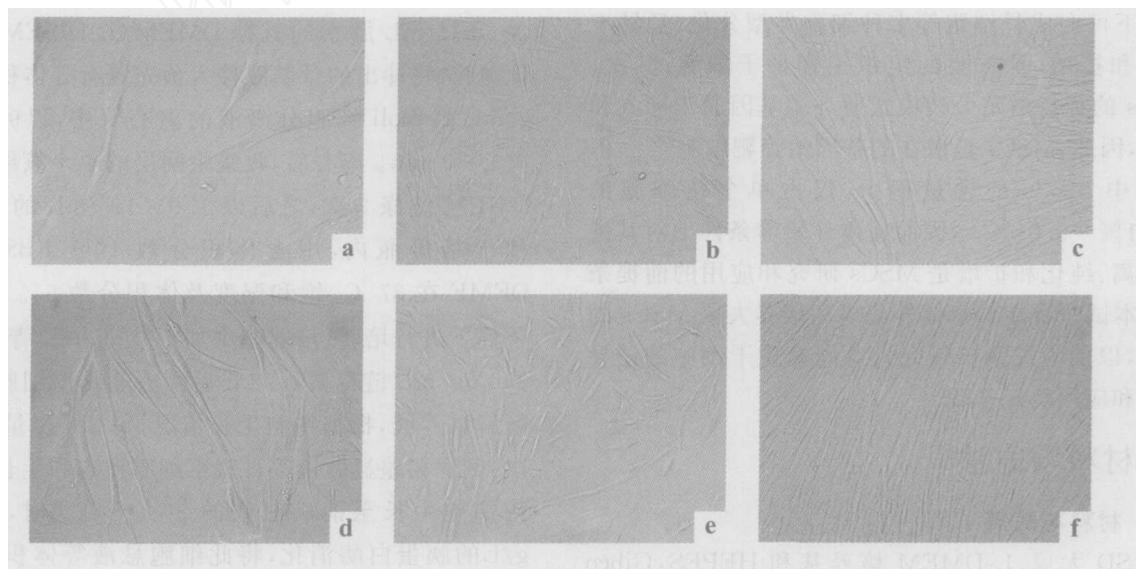


图 1 原代和第 1 代大鼠 MSCs 的体外生长

a. 培养 3 d 的原代 MSCs($\times 100$); b. 培养 10 d 的原代 MSCs($\times 50$); c. 培养 18 d 的原代 MSCs($\times 50$);
d. 培养 2 d 的第 1 代 MSCs($\times 100$); e. 培养 3 d 的第 1 代 MSCs($\times 50$); f. 培养 7 d 的第 1 代 MSCs($\times 50$)

Fig. 1 MSCs like-cells derived from rat bone marrow

a. Primary cells cultured 3 d($\times 100$); b. Primary cells cultured 10 d($\times 50$); c. Primary cells cultured 18 d($\times 50$);
d. Passage 1 cultured 2 d($\times 100$); e. Passage 1 cultured 3 d($\times 50$); f. Passage 1 cultured 7 d($\times 50$)

2.2 MSCs 的生长曲线

由图 2 可知,第 3 代 MSCs 从接种后的第 2 天起生长加速,至第 5 天细胞密度达到最高值,此期间为对数生长期,此后细胞数变化不明显,细胞倍增时

间约为 36 h。台盼蓝染色排斥试验显示,消化得到的细胞 95% 以上具有活力。

2.3 MSCs 的表面抗原特性

用流式细胞仪检测 4 种 MSCs 的表面抗原标志

结果表明,培养的 MSCs 均一地表达 CD29 和 CD44,而几乎不表达 CD45 和 HLA-DR,CD29 和 CD44 的阳性率分别达 97.10%和 98.25%,而 CD45 和 HLA-DR 的阳性率仅为 4.4%和 3.6%。

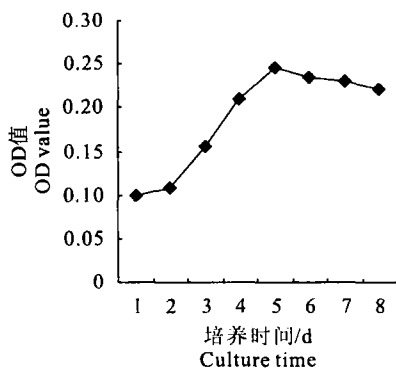


图2 MSCs 的生长曲线

Fig. 2 Growth curve of MSCs

2.4 MSCs 细胞的周期分析

用流式细胞仪测定 MSCs 的细胞周期结果表明,仅少量细胞处于分裂期($S+G_2+M=5.3\%$),约有 95%的细胞处于 G_0/G_1 期。

3 结论与讨论

MSCs 来源于中胚层,分布在人体多种组织器官内,以骨髓中最多,但其含量仍极低,成人骨髓 10 万个有核细胞中平均含有 1 个,且随着年龄的增加,

细胞数量逐渐减少^[7],生理状态下 20%为静止期细胞^[8]。由于间充质干细胞的数量少,因此,如何探寻一个适宜 MSCs 体外生长扩增而又不分化的分离培养条件,对 MSCs 生物学特性和诱导分化的进一步研究尤其重要。

目前,采用的骨髓 MSCs 分离方法有细胞贴壁筛选法、密度梯度离心法、细胞表面分子标记分选法和细胞筛筛选法等。细胞贴壁筛选法简单易行,但分离所得的细胞纯度较低;密度梯度离心法分离与培养的 MSCs 大小均匀,纯度较高,已被广泛采用;细胞表面分子标记分选法分离细胞的纯度与所选择的 MSCs 的表面分子密切相关,但由于目前仍未找到 MSCs 特异性的细胞表面标记,虽然韩国学者已报道^[9]克隆出 3 种用于鉴定人类 MSCs 的单克隆特异抗体,但其是否可靠尚需进一步实验证实,所以该法较少采用;细胞筛筛选法筛选出来的 MSCs 纯度较高,但对操作要求也较高。本试验采用 Percoll 密度梯度离心法对大鼠 MSCs 进行了体外分离与培养,结果表明,分离所得的大鼠 MSCs 具有早期细胞的形态特征,且细胞成活率较高,增殖速度较快,细胞组成比较均一,说明 Percoll 密度梯度离心法同样可以实现大鼠 MSCs 的体外分离与扩增,这为进一步深入研究骨髓间充质干细胞的诱导分化和应用奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Caplan A I. Mesenchymal stem cells[J]. J Orthop Res, 1991, 9(5): 645-650.
- [2] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284: 143-147.
- [3] 章静波, 宗书东, 马文丽, 等. 干细胞[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2003: 1-10, 130-135.
- [4] Loeffler M, Roeder I. Tissue stem cells: definition, plasticity, heterogeneity, self-organization and model-a conceptual approach[J]. Cells Tissue Organs, 2002, 171(1): 8-26.
- [5] Barry F P, Murphy J M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization[J]. IJBCB, 2004, 36(4): 568-584.
- [6] 李 府, 沈柏均. 间充质干细胞的来源、特性及临床应用前景[J]. 国外医学儿科学分册, 2004, 31(2): 104-107.
- [7] Ohgushi H, Caplan A I. Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering[J]. J Biomed Mater Res, 1999, 48(6): 913-927.
- [8] Conget P A, Mingue L J. Phenotypal and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells[J]. J Cell Physiol, 1999, 181(1): 67-73.
- [9] Yoo H J, Yoon S S, Park S, et al. Production and characterization of monoclonal antibodies to mesenchymal stem cells derived from human bone marrow[J]. Hybridoma (Larchmt), 2005, 24(2): 92-97.

Isolation and culture of rat marrow-derived mesenchymal stem cells *in vitro*

LI Yan-qing¹, LIU Xia^{1,2}

(1 College of Life Science, Yan'an University, Yan'an, Shaanxi 716000, China;

2 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: To investigate the isolation and culture of mesenchymal stem cells (MSCs) *in vitro* from rat bone marrow, a steady culture system of MSCs for future study was established. The mononuclear cells derived from rat marrow were obtained from rat bone marrow by density gradient centrifugation and selected by cell attachment. The morphology of MSCs was observed by microscope. The cell cycle and surface antigens were identified by flow cytometry. The growth curve of cells was analysed through MTT experiment. The results showed that MSCs were fibroblast-like cells. They were positive for CD29 and CD44, but were negative for CD45 and HLA-DR. About 95% of MSCs were in G₀/G₁ phase and MSCs had some primordial cells characteristics. Morphology of MSCs was singula and their growing was stable. In addition, proliferation of MSCs was high.

Key words: rat; bone marrow mesenchymal stem cells; cell morphology; cell cycle; density gradient centrifuge separation; flow cytometry

(上接第 22 页)

Abstract ID:1671-9387(2006)05-0018-EA

Purification of anti-clenbuterol hydrochloride polyclonal antibody by GoldMag nanoparticles

WANG Hui-rong¹, ZHU Hong-li¹, HUI Wen-li², ZHANG Zhi-feng¹, CHEN Chao¹, CUI Ya-li¹

(1 Biochip Research and Development Center, National Engineering Research Center for Miniaturized Detection Systems,

Northwest University, Xi'an, Shaanxi 710069, China;

2 Shaanxi Lifegen Ltd, Xi'an, Shaanxi 710002, China)

Abstract: Using GoldMag (Fe₃O₄/Au composite) nanoparticles as a separating medium, a new method for removing the anti-BSA antibody from anti-clenbuterol polyclonal antibody was investigated. As an immunogenic complex, CBL was conjugated with BSA via diazotized method first, then the polyclonal antibodies were produced in immunized rabbit with CBL-BSA complex. BSA was successfully immobilized onto the GoldMag particles of 50 nm diameter, then the polyclonal antibodies reacted with the BSA on the surface of GoldMag particles and the anti-BSA antibody could be collected on the particle surface, the purified anti-CBL antibody was left in the liquid phase after magnetic separation, the titer of antibodies against CBL and BSA before and after purification was determined by indirect ELISA. The result showed that the immobilization capacity of BSA reached 236 μg on 1 mg GoldMag particles by one-step. When the ratio of BSA-GoldMag complex and the polyclonal antibody was 7 : 1 and reacted more than 2 hours at 4 °C, the antibodies against BSA can be removed effectively while the titration of antibodies against CBL remained at the same level. This method may become a simple, rapid and effective method for removing the unrelated antibodies in polyclonal antibodies against small molecules.

Key words: clenbuterol hydrochloride; GoldMag particles; affinity adsorption; antibody purification