

人脐静脉间充质干细胞的分离培养及生物学特性鉴定

张绪超* 陈惠芹 黄绍良* 魏菁 黄科 吴燕峰 包蓉

(中山大学附属第二医院干细胞研究中心, 广州 510120)

摘要 为了对人脐静脉间充质干细胞(MSC)进行分离培养及其生物学特性鉴定。采用胶原酶分步消化法获得人脐静脉间充质干细胞(hUVMSC2)并对其体外培养、形态学观察及绘制生长曲线; 利用条件培养基诱导法分析该细胞分别向成骨细胞和脂肪细胞分化能力; 流式细胞术检测细胞表面标志物 CD54、CD105、CD29、CD166、CD44、CD31、CD34、CD49、CD106 等表达情况。结果该细胞形态为梭形或成纤维样, 不表达内皮来源的 vWF 因子。在不同诱导条件下, 该细胞可分别向成骨细胞和脂肪细胞分化。hUVMSC2 细胞表面表达 CD54、CD105、CD29、CD166、CD44 等间质细胞黏附分子, 不表达 CD31、CD34、CD49、CD106 等内皮或造血细胞相关标志物。该细胞指数生长期倍增时间约为 26 h, 在添加 bFGF 条件下可迅速增殖, 指数生长期倍增时间缩短为 16 h。研究证实人脐静脉内皮层下存在间充质干细胞, 采用分步酶消化法可同时分别获得单根脐静脉的内皮细胞和间充质干细胞。hUVMSC2 间充质干细胞具有向脂肪细胞和成骨细胞分化潜能并表达多种黏附分子。

关键词 间充质干细胞; 脐静脉; 成骨细胞; 脂肪细胞; 诱导分化

间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)可从胎儿血液、肝脏、骨髓、脂肪等多种组织获得, 是一群多潜能细胞, 可以向多种组织如骨、软骨、肌肉、韧带、肌腱、脂肪及基质细胞增殖分化^[1]。由于 MSC 具有多向分化能力, 在造血移植中可被用于联合造血干细胞移植, 有助于改善预处理后骨髓造血微环境, 可促进骨髓基质中多种细胞的恢复, 从而促进造血植入。临床应用时, MSC 需求数量较大, 目前主要是从骨髓获得。但来源于骨髓的 MSC 往往随着供者年龄的增加其细胞数量和活性都会受到影响^[2,3]。其他方法如从脐血和外周血中培养 MSC 具有一定难度, 且 MSC 在足月分娩的脐血或动员的外周血中数量尚存在争议^[4,5]。为探讨 MSC 是否存在于分娩后的废弃材料脐带中及其生物学特性, 本研究从人脐静脉(umbilical cord vein, UV)分步酶消化后分离培养 MSC, 并进行形态学、分化功能和表面标志物等生物学表型鉴定。为干细胞多向分化及 MSC 促进造血机制研究及临床应用 MSC 提供了新材料来源和基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 人脐静脉的取材 无菌条件下分别获得 3

根足月妊娠分娩的人脐带, 浸于 PBS 中备用并尽快进行脐静脉灌流。

1.1.2 试剂和耗材 M199 培养基、bFGF、Glutamax-I、III 型胶原酶均购自 Gibco BRL 公司; 胎牛血清购自 Hyclone 公司; 6 孔或 12 孔细胞培养板购自 NUNC 公司; β - 甘油磷酸钠、茜素红、地塞米松、抗坏血酸、3- 异丁基-1- 甲基黄嘌呤、油红 O、胰岛素均购自 Sigma 公司; 流式细胞术抗体 PE-CD54 (ICAM-1)、FITC-CD105 (Endoglin)、PE-CD29 (β 3- 整合蛋白)、FITC-CD166 (ALCAM)、FITC-CD44 (HCAM)、FITC-CD31 (PECAM-1)、PE-CD34、PE-CD49 (α 4- 整合蛋白)、PE-CD106 (VCAM-1) 均购自 Pharmingen 公司; 免疫荧光用抗 vWF 抗体购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 脐静脉 MSC 的分离培养、形态学观察及与内皮细胞免疫荧光检测 vWF 将新鲜取得的脐带充分洗涤去血渍后, 灌流脐静脉后结扎两端用 2 g/L 胶原酶消化, 置于 37 °C 水浴摇床轻轻摇动, 前

收稿日期: 2005-01-05 接受日期: 2005-02-17

国家自然科学基金(No.30300377)、中国博士后科学基金(No.2003033432)、教育部博士点基金(No.20030558070)资助项目

* 通讯作者。Tel: 020-81332612, E-mail: hshl@gzsums.edu.cn, zhang_xuchao@yahoo.com

10~15 min 酶解获得的细胞多为内皮细胞, 收获后采用内皮细胞培养基(DMEM 含 15%FBS、5 ng/ml VEGF 及 4 ng/ml bFGF)培养。再次灌注后加胶原酶消化 10 min 后收集细胞离心洗涤, 接种于底面铺有明胶的培养板中, 以 M199 培养基加 15% 胎牛血清、4 ng/ml bFGF、2 mmol/L Glutamax-I 培养, 细胞生长融合后逐步传代扩大并冻存。相差显微镜下观察并拍照。常规免疫细胞荧光染色法检测细胞 vWF 表达情况。简述如下: 新鲜细胞用无水乙醇固定后, 二抗同种羊血清封闭 10 min, 洗涤后加兔抗人 vWF 一抗 37 °C 温育 20 min。洗涤后加 Cy3-IgG 二抗 37 °C 温育 20 min, PBS 洗涤后荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.2 细胞生长曲线的绘制 将第 7 代 hUVMSC2 (本次报告为 3 个细胞系之一的 hUVMSC2 实验结果, 参见结果部分)细胞悬液以 2×10^3 个/cm² 的密度接种于 6 孔板内, 依次于培养第 1 天至第 9 天消化细胞计数, 根据每天的细胞数绘制生长曲线。每个样本进行 3 次实验, 每次实验均采用复孔。

1.2.3 向成骨细胞诱导分化及鉴定 将第 7 代 hUVMSC2 细胞悬液以 2×10^4 个/孔接种于铺有 1 g/L 明胶的 6 孔细胞培养板, 细胞生长贴壁后培养基更换为成骨细胞诱导条件液^[2]: L-DMEM、0.1 μmol/L 地塞米松、10 mmol/L β 甘油磷酸钠、0.2 mmol/L 抗坏血酸, 培养期间观察细胞形态变化, 约 14~21 天后用茜素红染色检测成骨细胞的钙沉淀情况。即用 Hanks 液洗 3 次, 加茜素红染色 3~5 min, 弃去染料, PBS 洗涤后镜下观察染色情况并拍照。同样诱导条件下分别以成体骨髓 MSC 及人胚胎成纤维细胞作对照。

1.2.4 向脂肪细胞诱导分化及鉴定 将 hUVMSC2 细胞悬液以 2×10^4 个/孔接种于铺有 1 g/L 明胶的 6 孔细胞培养板, 细胞生长贴壁后培养基更换为脂肪细胞诱导条件液^[2]: H-DMEM 含有 5 mg/L 胰岛素、1 μmol/L 地塞米松、0.5 mmol/L 3- 异丁基 -1- 甲基黄嘌呤、60 μmol/L 消炎痛。培养约两星期后油红 O 染色, 评价脂肪细胞的生成情况。将细胞 PBS 洗后, 10% 多聚甲醛固定 10 min, PBS 洗涤, 将油红 O 染色液静置过滤后加入染色 10 min 左右, PBS 洗后镜下观察拍照。同样诱导条件下分别以成体骨髓 MSC 及人胚胎成纤维细胞作对照。

1.2.5 细胞表面标志物的流式细胞术分析 将细胞用 PBS 洗涤后, 分别加入荧光标志小鼠抗人抗体: FITC-CD105、PE-CD29、FITC-CD31、PE-CD49、PE-CD34、PE-CD106、FITC-CD166、FITC-CD44、PE-CD54, 室温温育 30 min, PBS 洗去未结合抗体, 1% 多聚甲醛固定, 应用 BD Calibur 流

式细胞仪检测细胞上述表面抗原的表达情况, 同型 IgG 作为相应的阴性对照。结果用 CELLQuest 软件分析各表面标志物的表达细胞百分率。

2 结果

2.1 细胞形态学观察及生长曲线绘制

在研究过程中, 共获得 3 根人脐带, 均获得成功的内皮细胞和 MSC 分离培养, 将脐静脉 MSC 分别命名为 hUVMSC1、hUVMSC2、hUVMSC3, 其中 hUVMSC2 生长活性好且形态均一, 以下实验结果来自该细胞系。hUVMSC2 细胞从原代第 1 次传代后即稳定生长, 细胞形态均一为梭形或成纤维样(图 1a), 同步分离的脐静脉内皮细胞则为扁平铺路石样(图 1b)。免疫荧光染色结果为内皮细胞强阳性表达 vWF 相关抗原(图 1c), 而 MSC 则不表达 vWF, 提示该 MSC 确实为非内皮细胞。hUVMSC2 第 3 代细胞以 2×10^3 个/cm² 接种于 6 孔培养板后, 1~3 天为潜伏期, 4~7 天为指数生长期, 8 天后速度减慢进入平台期。随着传代次数的增加, 细胞生长速度无明显改变, 指数生长期细胞群体倍增时间约为 25 h。添加 4 ng/ml bFGF 细胞因子条件下将细胞以 2×10^3 个/cm² 接种于 6 孔板中, 细胞生长速度加快, 第 3 天便进入指数生长期, 第 6~7 天可长满, 生长曲线见图 2。

2.2 脐静脉 MSC 向成骨细胞诱导分化结果

在地塞米松、β 甘油磷酸钠及抗坏血酸的作用下, 约两星期后可观察到 hUVMSC 分化来源的成骨细胞中钙沉淀情况。骨髓和脐静脉来源的 MSC 经诱导后茜素红染色显示细胞中钙质沉淀均为强阳性(图 3a、图 3b), 镜下可见片状红色。而人胚胎成纤维细胞茜素红染色为阴性(图 3c)。

2.3 向脂肪细胞诱导分化

在高糖 DMEM、胰岛素、地塞米松及 3- 异丁基 -1- 甲基黄嘌呤等诱导条件下, 培养约两星期后细胞可被油红 O 染色, 提示大部分细胞均向脂肪细胞分化。脂肪细胞中可见脂肪小滴呈亮红色。图 4a 为骨髓 MSC 阳性对照, 图 4b 为脐静脉 MSC 向脂肪细胞分化, 细胞多为扁平, 伸展较开。图 4c 为人胚胎成纤维细胞阴性对照, 未见脂肪细胞生成。

2.4 流式细胞术检测结果

流式细胞术检测结果表明(图 5), hUVMSC 阳性表达 CD54、CD105、CD29、CD166、CD44 等细胞黏附分子, 而阴性表达造血细胞(CD34)或内皮细胞(CD31、CD106、CD49)等标志物。同步分离的脐静脉内皮细胞表达 CD54、CD31、CD105、CD29、CD166、CD44, 不表达 CD34、CD106、

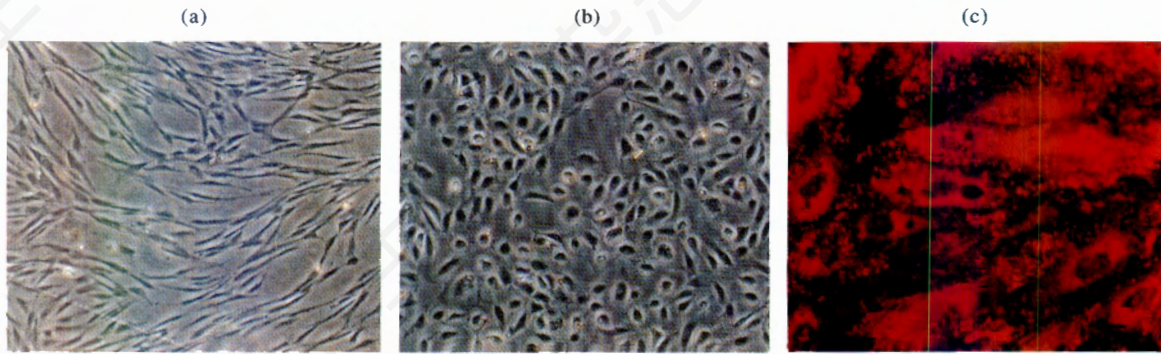


图1 单根人脐带中MSC(hUVMSC2)和内皮细胞(EC)分离后体外培养形态及vWF因子表达分析

(a) MSC形态为成纤维样或梭形(40×); (b) EC细胞为典型的扁平铺路石样(40×); (c) 免疫荧光染色显示内皮细胞表达vWF相关抗原^[6], 而vWF在MSC阴性表达(100×)。

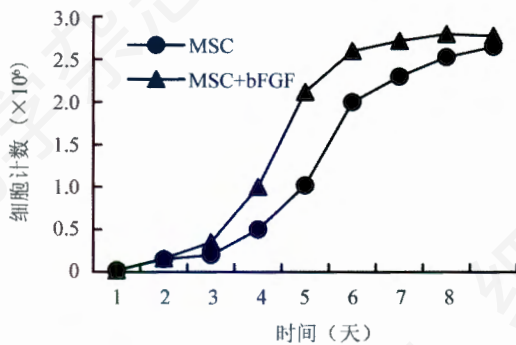


图2 人hUVMSC2细胞生长曲线图

CD49。结果表明该MSC与内皮细胞为不同细胞群体。

3 讨论

在细胞治疗领域,干细胞有着良好的应用前景。干细胞分为胚胎干细胞和成体干细胞两种。目前应用较为成熟的成体干细胞有造血干细胞和间充质干细胞(MSC)等。其中MSC是近年来干细胞生物学研究中发现的重要细胞之一,其存在于多种组织中,且在组织的损伤修复过程中起重要作用。如造血组织中MSC具有自我更新和多向分化能力,其产生的微环境对造血干细胞的归巢、干性维持和细胞增殖分化均具有重要意义^[7]。MSC存在于骨髓、滑膜、脂肪组织、胎儿血液等组织器官中,然而其在外周血和脐血中的含量尚存争议。Wexler等^[8]认为脐血和动员的外周血不含MSC。有学者认为出生前胚胎血中循环的MSC有助于各组织器官的发育塑型,而出生后MSC可能在胎儿成熟分娩时逐渐在脐血外周血中退去而作为成体干细胞潜伏在各组织中^[2]。本研究旨在探讨从人脐静脉中分离MSC方法效率及其生物学特性。

在分步进行酶消化后,第一步得到的细胞多为内皮细胞,免疫荧光和流式分析表达vWF和CD31(PECAM-1)细胞表面分子。在第二步消化后得到的多为间充质干细胞,在不加VEGF和bFGF培养条件下原代细胞生长旺盛,此时无生长因子培养条件可将少许污染的内皮细胞去除。第一次传代后细胞形态可达均一,多为梭形或成纤维样。由于用温和的胶原酶短时间分步消化,其他处于静脉壁深层的细胞成分如成纤维细胞或平滑肌细胞不会被消化下来造成污染。同时作为大血管的脐带静脉内也不会有管周细胞(pericyte)污染,因为后者存在于微血管体系。本研究者取得3条脐带,均获得成功的内皮细胞和MSC的同步分离和培养。本研究的分离培养方法效率较高(3/3),较Kim等^[9]从50个脐带中仅成功获得3份MSC培养物(3/50)有很大的进步。以hUVMSC2为研究,MSC细胞具有成纤维样形态,不表达内皮细胞标志物vWF和PECAM-1。而同时分离培养的内皮细胞呈扁平铺路石样,表达内皮标志物vWF和PECAM-1。第三代的MSC细胞在不加bFGF的培养条件下指数生长期倍增时间为约25h,在bFGF刺激下细胞增殖较快,指数生长期倍增时间缩短约为16h。无生长因子条件下培养传代约8~10代后细胞逐渐老化,生长减缓,形态不均一。加bFGF培养似乎可不受传代限制,目前已经传代达40多代,细胞形态仍然较均一,生长速度无明显变化。若在铺有明胶的培养板中生长,生长活性更好。从功能分化角度研究显示,该细胞能够向成骨细胞分化,表现为细胞中钙质沉淀。也可以向脂肪细胞分化,表现为细胞中脂滴积聚可被油红染料着色。流式细胞分析结果表明人脐静脉MSC阳性表达CD54(ICAM-1)、CD105(Endoglin)、CD29(β3-整联蛋白)、CD166(ALCAM)、CD44(HCAM)等细胞黏附分子,不表达CD31(PECAM-1)、

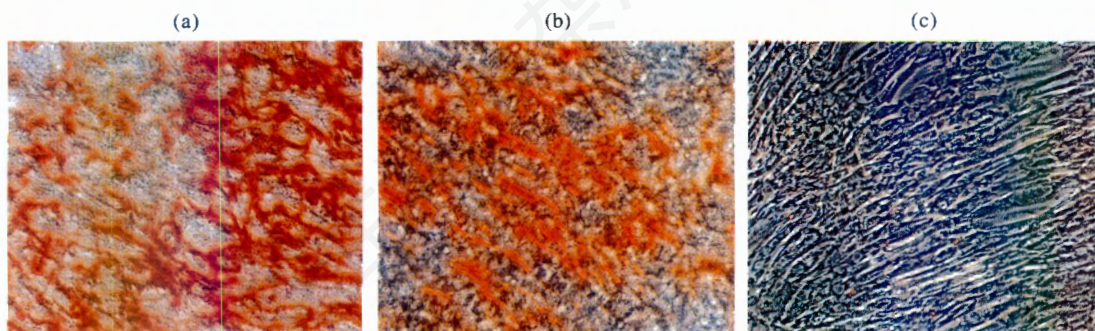


图3 hUVMSC2 向成骨细胞的诱导分化

(a) 骨髓 MSC 向成骨细胞分化阳性对照(100 ×); (b) hUVMSC2 向成骨细胞分化, 细胞中钙沉淀被茜素红着染红色(100 ×); (c) 人胚成纤维细胞阴性对照, 同样诱导条件下未见钙着色(40 ×)。

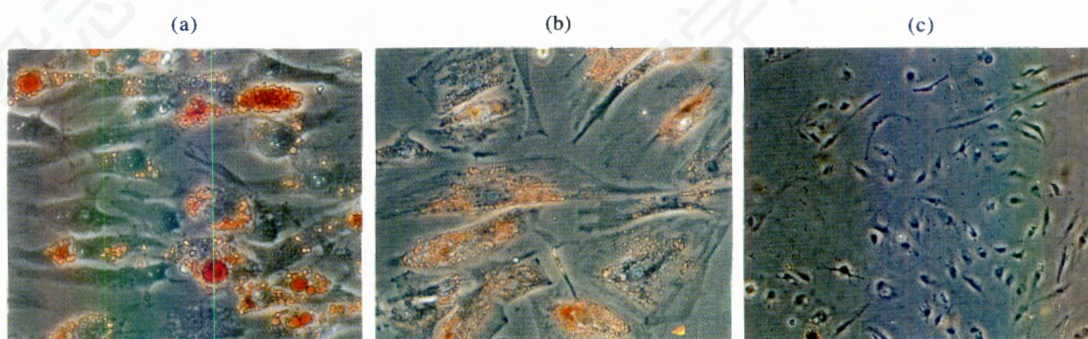


图4 hUVMSC2 向脂肪细胞的诱导分化

(a) 骨髓 MSC 向脂肪细胞分化阳性对照(100 ×); (b) hUVMSC2 向脂肪细胞分化, 细胞中脂肪小滴被油红 O 着染红色(100 ×); (c) 人胚成纤维细胞阴性对照, 同样诱导条件下未见脂肪滴着色(40 ×)。

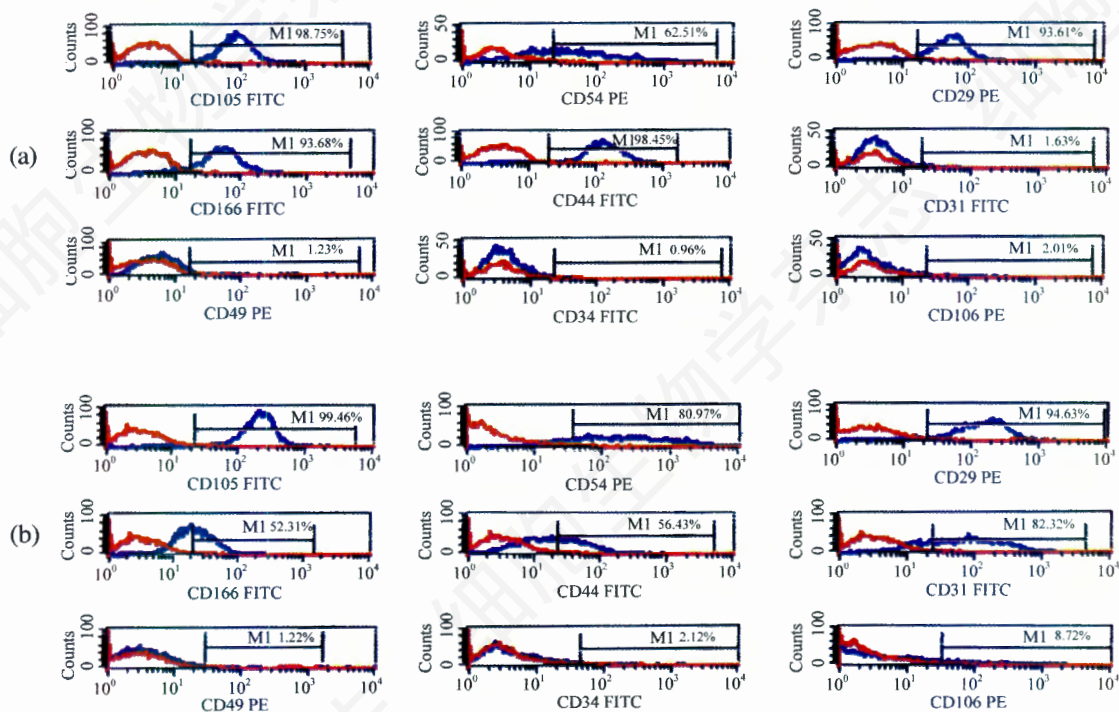


图5 hUVMSC2 和脐静脉内皮细胞的细胞表面标志物流式细胞术分析

(a) MSC 阳性表达 CD54、CD105、CD29、CD166、CD44 等细胞黏附分子, 而阴性表达 CD31、CD34、CD106、CD49 等标志物; (b) 同步分离的脐静脉内皮细胞表达 CD54、CD31、CD105、CD29、CD166、CD44, 不表达 CD34、CD106、CD49。

CD34、CD106(VCAM-1)、CD49($\alpha 4$ - 整联蛋白)等造血细胞或内皮细胞标志物。同步分离的脐静脉内皮细胞则表达 CD54、CD31、CD105、CD29、CD166、CD44, 而不表达 CD34、CD106、CD49 等分子。结果提示该 MSC 与内皮细胞实为不同细胞群体, 其中某些细胞表面分子如 $\beta 3$ - 整联蛋白、ALCAM、ICAM-1 等黏附分子对 MSC 细胞在体内生物学功能表达具有必然的重要意义, 对 MSC 如何向多种受损组织移行和功能分化具有分子水平的研究价值。

因 MSC 具有向多组织细胞分化潜能和自我更新的高增殖能力, MSC 诱导植入有望成为较广泛的细胞治疗手段。研究表明 MSC 能够植入肌肉退化组织并向肌细胞分化, 也能够促进造血干细胞的植入^[10,11]。MSC 还可应用于软骨组织重建等生物工程^[12], 也可能成为未来抗癌治疗中携带自杀基因或抗癌腺病毒药物的载体细胞^[13]。本研究以胶原酶分步消化法从单根人脐带血管分别成功分离培养出内皮细胞和

MSC, 并证实该 MSC(hUVMSC2)细胞具有多向分化能力。作为分娩后的可能含有 MSC 的两种组织材料之一, 脐血中 MSC 含量较少而难以获得临床应用。本研究成功地从脐带血管中高效分离培养 MSC 细胞, 为干细胞临床和实验研究提供了大量获得间充质干细胞的新途径。

参考文献 (References)

- [1] Baksh D *et al.* *J Cell Mol Med*, 2004, **8**: 301
- [2] Romanov YA *et al.* *Stem Cells*, 2003, **21**: 105
- [3] Rao MS *et al.* *Mech Ageing Dev*, 2001, **122**: 713
- [4] Mareschi K *et al.* *Haematologica*, 2001, **86**: 1099
- [5] 周敦华等. *中华儿科杂志*, 2003, **41**: 607
- [6] Jaffe EA *et al.* *J Clin Invest*, 1973, **52**: 2745
- [7] Bianco P *et al.* *Stem Cells*, 2001, **19**: 180
- [8] Wexler SA *et al.* *Br J Haematol*, 2003, **121**: 368
- [9] Kim JW *et al.* *Ann Hematol*, 2004, **83**: 733
- [10] Koc ON *et al.* *J Clin Oncol*, 2000, **18**: 307
- [11] 黄绍良等. *中山大学学报(医学科学版)*, 2003, **24**: 306
- [12] Fuchs JR *et al.* *J Pediatr Surg*, 2003, **38**: 984
- [13] Pereboeva L *et al.* *Stem Cells*, 2003, **21**: 389

Isolation and Culture of Human Umbilical Cord Vein Mesenchymal Stem Cells and Identification of Their Biological Characteristics

Xu-Chao Zhang*, Hui-Qin Chen, Shao-Liang Huang*, Jing Wei, Ke Huang, Yan-Feng Wu, Rong Bao
(Center for Stem Cell Research, Second Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract To isolate and culture human umbilical cord vein mesenchymal stem cells (MSCs) and identify their biological characteristics, sequential collagenase digestions were adopted to isolate human umbilical cord MSCs. Morphology and cell growth curve were detected in hUVMSC2 cell line. Different induction conditions were used to direct hUVMSC2 cells to differentiate into osteoblasts and adipocytes respectively. Flow cytometry was adopted to analyze expression of surface markers such as CD54, CD105, CD29, CD166, CD44, CD31, CD34, CD49, and CD106, etc. Morphologically hUVMSC2 cells were fibroblast-like, did not express endothelial-specific marker vWF. Under different induction conditions, hUVMSC2 cells could be directed to differentiate into osteoblasts and adipocytes respectively *in vitro*. Through flow cytometry assay, hUVMSC2 cells express adhesion molecules such as CD54, CD105, CD29, CD166, CD44, but not CD31, CD34, CD49, and CD106 endothelial or hematopoietic markers. During exponential growth period, hUVMSC2 cells doubling time is about 26 h, whereas when mitogen bFGF added, cells grew faster and the doubling time became shorter as 16 h. This investigation confirmed that human umbilical cord vein mesenchymal stem cells exist under endothelia layer. And sequential collagenase digestion method could successfully be used to isolate and culture two types of cells as endothelial cells and MSCs simultaneously from a single human umbilical cord vein. These MSCs had bi-directional differentiation potential at least, and also expressed important adhesion molecules such as ICAM-1, $\beta 3$ -integrin, and ALCAM, etc. This study also provided new MSC origin and basic data for stem cell study and clinical MSC application in combination with hematopoietic stem cell transplantation.

Key words mesenchymal stem cell; umbilical cord vein; osteoblast; adipocyte; induction and differentiation

Received: January 5, 2005 Accepted: February 17, 2005

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30300377), China Postdoctoral Science Foundation (No.2003033432), and Ministry of Education Postdoctoral Station Foundation (No.20030558070)

*Corresponding author. Tel: 86-20-81332612, E-mail: hshl@gzsums.edu.cn, zhang_xuchao@yahoo.com