

人骨髓间充质干细胞培养方法

王挺 姚行¹ 张铭*

(浙江大学生命科学院细胞与遗传研究所, 杭州 310058; ¹湖州中心医院, 湖州 313000)

摘要 骨髓间充质干细胞(BMMSCs)是一种多潜能的成体干细胞, 在细胞治疗和组织工程上具有广阔的应用前景。对供体年龄、分离方法、培养密度、培养基和培养基质表面性质对细胞增殖的影响进行了比较, 重点阐述了用人自体血清结合多种细胞因子, 替代胎牛血清培养 BMMSCs 的效果, 转染端粒酶基因的 BMMSCs 的增殖能力和分化潜能, 以及灌注培养反应器用于大规模培养的技术进展。

关键词 人骨髓间充质干细胞; 胎牛血清替代物; 增殖; 灌注培养

骨髓间充质干细胞(BMMSCs)是一种具有多分化潜能的成体干细胞^[1]。上世纪 60 年代人们发现它们能在体外或体内分化为成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞。随后又陆续有报道能分化成心肌、骨骼肌、神经细胞、造血干细胞、肌腱、肝组织、肾组织和连接组织^[1, 2]。在临床上, 人们已经成功地将骨髓间充质干细胞移植到患者体内, 用于治疗骨组织缺损和心肌梗塞等疾病^[3, 4]。由于其较强的增殖能力和较低的免疫原性, 间充质干细胞也很有可能为治疗帕金森综合征提供新的途径, 在细胞治疗和组织工程上拥有越来越广阔的前景^[5, 6]。

由于细胞治疗通常需要高剂量(10^9 个左右) BMMSCs, 因此, 改进 BMMSCs 培养方法, 提高 BMMSCs 的扩增效率, 同时保持多向分化潜能, 克服血清的影响, 是达到治疗需要的关键。本文报道了这些领域的最新进展。

1 细胞来源

1999 年, Pittenger 等^[7]首先用单细胞培养的方法获得了人骨髓基质细胞集落, 又将这些来自一个克隆的细胞分化为成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞, 证明了骨髓基质中确实存在具有多向分化能力的干细胞。这些成纤维样细胞被称之为间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)。近年来, 科学家们还发现除骨髓以外, 间充质干细胞广泛存在于脂肪、皮肤、胎盘、胸腺、滑膜、骨膜、牙髓、骨骼肌、外周血、脐带血、胚胎肝脏、脑、胰腺、脾、肾、和阑尾等组织中^[1, 8, 9]。Meirelles 等^[9]进一步指出 MSCs 可以在出生后所有组织中定

居。他们认为血管周围的生境有利于 MSCs 生存, 因此 MSCs 可以从血管中迁出, 在血管周围定居。这些不同组织来源的 MSCs 形态相似, 表面标志通常表现为 CD45⁻, CD34⁻, CD14⁻, STRO-1⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺^[10]。但是, 到目前为止, 还没有发现间充质干细胞的特有标志。而且这些细胞具有相似的分化潜能, 它们都能在一定条件下分化为成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞等。除直接从成体组织中获取外, 人骨髓间充质干细胞还可以由胚胎干细胞体外分化而来, 这些细胞同样保持了向成骨细胞和脂肪细胞分化的潜能^[10]。

最近的研究认为, 骨髓间充质干细胞的活力, 增殖能力和分化潜能与捐献者年龄和取材部位有关。来自幼年个体的细胞增殖需要的时间较短, 扩增迅速, 细胞活力较高。而来自老年个体的细胞较难培养。Mareschi 等^[11]研究后认为来自儿童的 BMMSCs 增殖速度是成人 BMMSCs 的 2 倍以上。Zhang 等^[12]发现幼年大鼠骨髓中的间充质干细胞多于老年大鼠, 随着年龄的增加, 骨髓细胞的克隆形成单位(CFU-F)递减, 出生 2 周的大鼠比 2 岁的大鼠高 5 倍。而来源于不同性别的个体, 细胞在增殖能力上的差异不显著^[13]。不同组织来源的间充质干细胞在增殖和分化能力上表现并很不一致。Sakaguchi 等^[14]的研究认为滑膜来源的间充质干细胞增殖能力高于来自脂肪组织的细胞, 在培养到第 10 代(140

收稿日期: 2006-05-08 接受日期: 2006-08-09

浙江省重大项目资助 (No.J20020579-30116)

* 通讯作者。Tel: 0571-88273423, Fax: 0571-88273423, E-mail: zhangming_ls@zju.edu.cn

天)后仍然保持增殖能力, 而来自脂肪组织的细胞在第5代(70天)时增殖能力就消失了。并且滑膜间充质干细胞有较强的分化为脂肪和软骨细胞的能力。在这个意义上, 滑膜是用于细胞治疗的间充质干细胞的理想来源。但 Dickhut 等^[15]却认为脂肪组织是间充质干细胞最理想的来源, 因为其来源非常丰富且取材简单, 而且捐献者可以避免痛苦。

2 培养方法

2.1 分离和接种

通常, 骨髓间充质干细胞约占有核细胞的百万分之一到十万分之一。早期的培养主要采用全血法和密度梯度离心法。这些方法分离的细胞纯度极低, 在早期培养时很难对 BMMSCs 进行观测和研究。近年来, 免疫磁珠分离技术使 BMMSCs 纯度大幅提高。Gronthos 等^[16]利用免疫磁珠分离技术从单核细胞中分离了 STRO-1 阳性细胞群, 其中, BMMSCs 的比例提高到 3/10000。Shahdadfar 等^[17]利用这种技术反向除去了单核细胞中的 CD14⁺ 细胞, 结果显示所得的 BMMSCs 占种植细胞比例提高到 1/1 000。

尽管目前绝大部分报道都采用较高(大于 1 000 个/cm²)的细胞密度进行细胞传代, 以便在较短时间内达到集落汇合, 但 Sotiropoulou 等^[18]实验表明, 细胞的传代密度过高会影响最终收获的细胞数量。低密度(50~10 个/cm²)传代比高密度(5 000 个/cm²)传代得到的细胞多 100 倍。Sekiya 等^[19]研究也表明, 低密度接种细胞生长更快。当以 10 个/cm² 的密度接种时, 12 天后细胞数量增加到 500 倍, 而以 1 000 个/cm² 接种时, 12 天后细胞只增加 30 倍。低密度接种后所获得的细胞克隆形成率达 35%, 而高密度接种后细胞克隆形成率只有 15%。因此, 低密度传代和接种更有利于细胞增殖。

BMMSCs 的生长对基质表面性质有一定要求。通常人们采用塑料培养瓶培养间充质干细胞。

Nunc、Greiner、Costar 和 Falcon 等厂商生产的培养瓶都能满足细胞生长。Sotiropoulou 等^[18]通过比较, 认为 Falcon 培养瓶效果最好。Falcon 公司生产的培养瓶表面用特殊工艺处理, 对细胞具有更强的亲和性, 使细胞能更好的生存和增殖, 提高了最终的细胞收获数量。

2.2 营养条件

2.2.1 培养基选择 目前, 已有高糖 DMEM(含谷氨酰胺)、低糖 DMEM(含谷氨酰胺)、 α -MEM(含谷氨酰胺)、IMDM、DMEM-F12 等多种培养基被用于 BMMSCs 培养。Sotiropoulou 等^[18]对这些培养液研究后显示, α -MEM 培养的细胞增殖能力最强。Cambrex 公司(<http://www.cambrex.com>)专门开发一种基础培养液 MSCGM 用于间充质干细胞培养, 从原代细胞扩增到第三代细胞过程中, 用 MSCGM 培养的细胞增殖倍数达到 1 600, 而高糖 DMEM 只达到 8, α -MEM 也只达到 865。用 Glutamax 代替谷氨酰胺添加到培养基中, 通常能增加细胞活力和增殖能力。Glutamax 二肽是一个 L-谷氨酰胺的衍生物, 其不稳定的 α -氨基用 L-丙氨酸来保护。细胞可以逐渐裂解二肽, 释放 L-谷氨酰胺供利用。Glutamax 非常稳定, 能高压灭菌, 它被细胞利用后不产生游离的氨基, 因而降低了对细胞的损害^[18]。此外, 不同物种的 BMMSCs 对培养基有不同偏好。用 IMDM 培养小鼠 BMMSCs 能取得较好生长效果, 然而用它培养人的 BMMSCs 却不能成功^[18]。

2.2.2 无胎牛血清培养 BMMSCs 的培养通常离不开胎牛血清(FBS)的支持。但在用于治疗时, BMMSCs 应当尽量避免和胎牛血清接触, 因为在胎牛血清中可能存在疯牛病毒等污染, 欧洲法律禁止临床上将接触过胎牛血清的细胞移植给患者^[20]。为了避免胎牛血清引起的问题和风险, 科学家正在积极寻找无胎牛血清培养 BMMSC 的方法(表 1)。理想的胎牛血清替代物除了能够支持细胞增殖以外, 还必须保持

表 1 无胎牛血清培养人 MSCs 研究进展

作者	时间	培养基配方
Meuleman	2006	Ultra-culture medium 无血清培养基 (Cambrex), 2% Ultrosor G 血清替代物 (Pall BioSeptra) ^[21]
Mizuno	2006	DMEM 培养基, 10% 自体血清 ^[22]
Shahdadfar	2005	DMEM/F12 培养基, 10% 自体血清 ^[17]
Doucet	2005	α -MEM 培养基, 5% 血小板提取物 ^[6]
Stute	2004	低糖 DMEM 培养基, 10% 自体血清 ^[23]
Reyes	2001	60% 低糖 DMEM 培养基, 40% MCDB-201 培养基, 10 ng/ml EGF, 10 ng/ml PDGF, 10 ng/ml bFGF(或 IGF-1) ^[24]
Kuznetsov	2000	α -MEM 培养基, 0.5% ITS ⁺ 血清替代物 (Collaborative Biomedical Products) ^[20]

细胞转录水平的稳定,即尽可能减少细胞自发的分化和衰老。人自体血清已被证明在这些方面有相当的优势。与胎牛血清相比较,人自体血清能促进BMMSCs更快地增殖,并且在培养过程中能维持细胞转录水平的稳定,减少细胞自发分化,抑制多次传代后的细胞衰老。利用人自体血清培养的BMMSCs已经被证明保持了成骨,软骨和脂肪分化的潜能^[17]。Mizuno等^[22]简化了自体血清采集方法,他们用完全密封的无菌装置收集血清,并完成离心和分装。收集到的血清无需过滤除菌就可直接使用,并被成功用于BMMSCs培养。由于人血小板提取物中含有丰富的生长因子,如碱性成纤维细胞生长因子(bFGF),转化生长因- β (TGF- β),胰岛素样生长因子-1(IGF-1)等,因此能替代胎牛血清用于BMMSCs培养。与胎牛血清比较,含血小板提取物的培养基能使细胞增殖更快,集落形成更大,达到汇合时间更短。已经证明用它培养的细胞保持了向成骨,软骨和脂肪分化的潜能,同时保持了免疫调节的能力^[6]。此外,Meuleman等在商用培养基Ultra-Culture medium(Cambrex)中添加2%的血清替代物Ultrosor G(Pall BioSeptra),这种培养基含有多种生长因子、结合蛋白、维生素和激素,能较好地满足MSC生长的需要。他们成功地分离并培养了人BMMSCs,原代培养所得的细胞数比 α -MEM培养基(15% FBS)高2倍,传代培养时也获得了较高的克隆形成率(CFU-F)和较短的倍增时间^[21]。然而人异体血清在同类试验中却没有成功^[17]。

2.2.3 细胞生长因子作用 多种细胞生长因子如血小板源性生长因子(PDGF)、bFGF、TGF- β 、IGF-1和表皮生长因子(EGF)等生长因子单独或联合使用,都能促进BMMSCs的增殖^[6, 18, 20, 24]。在这些生长因子中,bFGF的作用最突出。bFGF作为有效的有丝分裂原用于BMMSCs,保持分化潜能,增加端粒长度^[1, 25, 26]。通常人BMMSCs培养不超过20代,而Bianchi等^[25]添加bFGF后,细胞培养超过50代,仍具有增殖能力。同时,在促进增殖方面,bFGF也有多重效应。它能增强HLA抗原表达,增加免疫原性,同时促进成骨分化,而抑制其他方向(如神经)分化^[18]。如何合理使用这些生长因子,维持稳定增殖,减少分化,正成为当前研究的热点。

2.3 长期培养和抗衰老

Sekiya等^[9]发现骨髓间充质干细胞在长期培养

过程中形态会发生改变。细胞宽度从第4天的20 μm 逐渐增加到第10天的30 μm ,细胞面积也逐渐从1 000 μm^2 增加到2 200 μm^2 。最后,细胞由原先的细长的梭形,变成粗长的梭形。进一步研究认为细胞形态与骨髓间充质干细胞不同分化能力相关。以细长的梭形细胞为主的骨髓间充质干细胞群更容易分化为脂肪细胞,而以粗长的梭形细胞为主的细胞群更容易分化为软骨细胞。因此,可以根据实际需要,选择不同的细胞收获时期,使细胞产量和类型含量达到平衡。

体外培养的间充质干细胞和体内天然的间充质干细胞都会衰老。随着传代次数增加或捐献者年龄增加,BMMSCs逐渐变大,自我更新的细胞减少,克隆形成率降低。细胞失去多潜能性,自发分化为特殊的细胞群^[27, 28]。细胞内活性氧自由基的积累会引发细胞衰老和死亡。Ebert等^[29]在培养基中添加100 nmol/L的亚硒酸盐,恢复了BMMSCs的谷胱甘肽和硫氧还蛋白还原酶活力,增加超氧化物歧化酶(SOD)1的表达,减少了自由基积累和微核产生,降低了自由基对细胞的损伤。细胞衰老与端粒长度密切相关。Baxter等^[30]研究发现随着捐献者年龄增加,BMMSCs细胞每年丢失17 bp端粒。体外培养的人BMMSCs每次分裂都丢失端粒,当累积丢失的端粒达到10 kb时,BMMSCs不再分裂。有趣的是,端粒酶的活性同样影响细胞分化,Liu等^[31]研究认为缺少端粒酶活性的转基因小鼠BMMSCs不能分化为脂肪和软骨细胞。Zhao等^[32]在人BMMSCs中转染端粒酶基因后,有效阻止了细胞衰老,使细胞扩增到70代后仍保持多向分化能力。因此,转基因技术可能为组织工程和细胞治疗提供更好的间充质干细胞。

2.4 大规模培养

为了获得足够数量的骨髓间充质干细胞,科学家们正在积极探索BMMSCs大规模培养的方法。三维灌注培养是常见的规模培养方式。Holtorf等^[33]认为在三维灌注培养中,细胞可以黏附在多孔支架的表面和空隙内部生长,而培养液在细胞表面不断循环和补充,给细胞提供营养支持。Zhao等^[34]用实验模型和数学模型,证明三维灌注培养能给细胞提供更加充分的氧气供应,因而在这种培养下,细胞能获得更快的增长速度。传统的灌注培养系统采用静态接种法,要求将细胞接种过程和培养过程分开。即先将细胞接种到支架材料(羟基磷灰石,磷

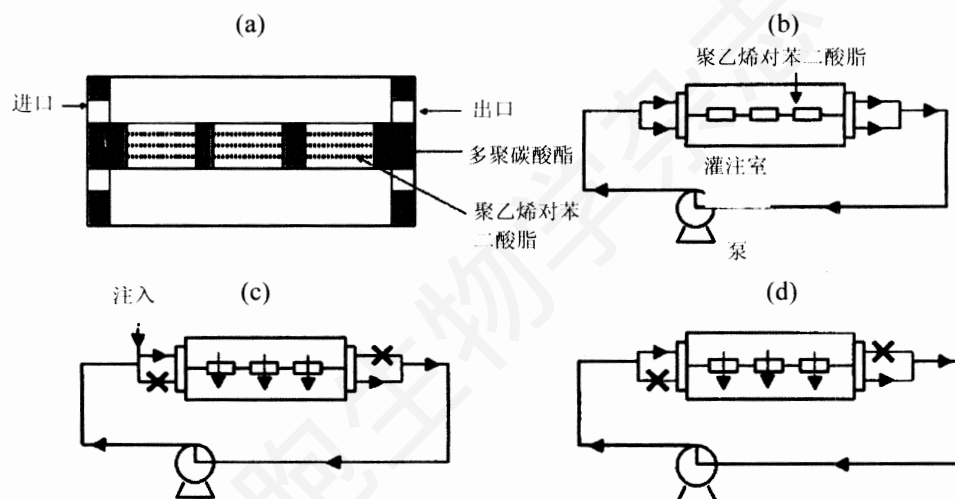


图1 动态接种示意图

a: 培养室侧视图。培养室长 10 cm, 宽 2.5 cm, 高 1.2 cm, 由不透水的多聚碳酸酯(PC)构成。培养室中间填充了多孔渗水的聚乙烯对苯二甲酸酯(PET)材料, 作为细胞培养的支架, 培养基和部分悬浮细胞可以透过支架。每个培养室各有两个入口和两个出口与泵相连, 保证上下两侧水流相等。b: 动态接种时, 首先将培养基填充到系统。c: 然后切断与培养室底部入口和顶部出口连接的管道, 将分散的悬浮细胞接种到培养室。种子细胞可以随着培养基流动。d: 没有贴壁的种子细胞在压力下可以透过 PET(聚乙烯对苯二甲酸酯)支架, 随培养基不断循环, 直到贴壁。箭头表示培养基或细胞流动方向^[37]。

酸三钙, 聚乙烯, 多聚甲醛等)上, 待细胞贴壁(6~8 h)后, 将支架连同细胞一起转移到生化反应器培养^[35, 36]。这种培养方法操作繁琐且会增加污染的风险。Zhao 等^[37]设计了动态接种培养系统。利用这套系统可以实现动态接种, 即直接将细胞接种到反应器中培养, 细胞随培养基多次循环后, 最终在支架材料上贴壁并增殖, 有效弥补了上述方法的不足(图1)。并且, 该系统还能根据需要调整培养室数量以控制反应规模。他们同时使用 4 个反应室, 总体积共计 120 ml, 培养人 BMMSCs, 接种效率达到 65%, 最终密度达到 4.22×10^7 个/ml。此外, Baksh 等^[38]研究不依赖支架材料的悬浮培养, 100 ml 悬浮培养瓶(Catalog # 1965-0010, Bellco, Vineland, NJ, USA) 培养人 BMMSCs, 3 周后细胞浓度达到 1.4×10^7 个/ml, 预示着悬浮培养的方法也可以在大规模培养系统中使用。

3 展望

综上所述, 目前的研究在间充质干细胞培养上取得了重要进展。骨髓中分离的人间充质干细胞比例已经从百万分之一提高到千分之一, 细胞体外培养时间也从 20 代延长到 70 代, 培养过程成功避免了动物血清病原体污染, 大规模培养技术已经使细胞产量达到 10^9 个数量级, 能初步满足临床使用。为了更好的应用于临床研究和治疗, 我们认为还可以

在以下几方面展开进一步工作: (1)与人自体血清相比较, 异体血清来源更加广泛。然而, 其所含的抗体与细胞形成免疫复合物, 激活补体, 最终杀死细胞, 可能是其不能用于 BMMSCs 培养的原因。我们实验室首先去除了兔异体血清中的抗体, 并加热使补体灭活。经处理后的血清能替代胎牛血清支持兔 BMMSCs 增殖, 且培养的细胞保持向成骨细胞和神经样细胞分化的潜能。人异体血清对人 BMMSCs 增殖和分化的影响有待进一步研究和试验。(2)寻找合适的支架材料供种子细胞生长是骨组织工程研究的热点。我们实验室已经发现新型纳米磷酸钙支架与 BMMSCs 具有良好的组织相容性, 并且能明显促进细胞向成骨方向分化, 其分化的调控途径正在进一步研究中。(3)BMMSCs 分离纯度还有进一步提高的可能, 而找到 BMMSCs 特异性的表面标志, 并制备其抗体是提高 BMMSCs 分离纯度的关键。(4)将端粒酶基因连接上可诱导的特异性启动子, 然后再导入细胞, 可以人为的调控端粒酶基因的表达, 防止细胞无限增殖, 提高细胞移植后的安全性。随着研究的不断深入, 这些工作将使骨髓间充质干细胞在临床上更广泛的应用成为可能。

参考文献 (References)

- [1] Baksh D et al. *J Cell Mol Med*, 2004, 8: 301
- [2] Bhatia R et al. *Congest Heart Fail*, 2005, 11: 87

- [3] Adachi N *et al. J Rheumatol*, 2005, **32**: 1615
- [4] Katritsis DG *et al. Catheter Cardiovasc Interv*, 2005, **65**: 321
- [5] Weiss ML *et al. Stem Cells*, 2005, **24**: 781
- [6] Doucet C *et al. J Cell Physiol*, 2005, **205**: 228
- [7] Pittenger MF *et al. Science*, 1999, **284**: 143
- [8] De CP *et al. J Surg Res*, 2006, **135**: 85
- [9] Meirelles LD *et al. J Cell Sci*, 2006, **119**: 2204
- [10] Olivier EN *et al. Stem Cells*, 2006, **24**: 1914
- [11] Mareschi K *et al. J Cell Biochem*, 2006, **97**: 744
- [12] Zhang H *et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, **289**: 2089
- [13] Bertram H *et al. Clin Oral Implants Res*, 2005, **16**: 524
- [14] Sakaguchi Y *et al. Arthritis Rheum*, 2005, **52**: 2521
- [15] Dickhut A *et al. Ann Hematol*, 2005, **84**: 722
- [16] Gronthos S *et al. J Cell Sci*, 2003, **116**: 1827
- [17] Shahdadfar A *et al. Stem Cells*, 2005, **23**: 1357
- [18] Sotiropoulou PA *et al. Stem Cells*, 2006, **24**: 462
- [19] Sekiya I *et al. Stem Cells*, 2002, **20**: 530
- [20] Kuznetsov SA *et al. Transplantation*, 2000, **70**: 1780
- [21] Meuleman N *et al. Eur J Haematol*, 2006, **76**: 309
- [22] Mizuno N *et al. Cell Biol Int*, 2006, **30**: 521
- [23] Stute N *et al. Exp Hematol*, 2004, **32**: 1212
- [24] Reyes M *et al. Blood*, 2001, **98**: 2615
- [25] Bianchi G *et al. Exp Cell Res*, 2003, **287**: 98
- [26] Solchaga LA *et al. J Cell Physiol*, 2005, **203**: 398
- [27] Stenderup K *et al. Bone*, 2003, **33**: 919
- [28] Sharpless NE *et al. J Clin Invest*, 2004, **113**: 160
- [29] Ebert R *et al. Stem Cells*, 2006, **24**: 1226
- [30] Baxter MA *et al. Stem Cells*, 2004, **22**: 675
- [31] Liu L *et al. Exp Cell Res*, 2004, **294**: 1
- [32] Zhao Z *et al. Bone Marrow Transplant*, 2005, **36**: 355
- [33] Holtorf HL *et al. Ann Biomed Eng*, 2005, **33**: 1238
- [34] Zhao F *et al. Biotechnol Prog*, 2005, **21**: 1269
- [35] Ma T *et al. Tissue Eng*, 1999, **5**: 91
- [36] Bancroft GN *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 12600
- [37] Zhao F *et al. Biotechnol Bioeng*, 2005, **91**: 482
- [38] Baksh D *et al. Exp Hematol*, 2003, **31**: 723

The Culture of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

Ting Wang, Xing Yao¹, Ming Zhang*

(College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

¹Huzhou Center Hospital, Huzhou 313000, China)

Abstract Bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) are a kind of adult stem cells with multiple potential functions in cell proliferation and differentiation and will be widely used for cell therapy and tissue engineering in the future. Many factors are reviewed in this paper which include donors' age, isolation methods, cell culture density, surface materials and their effects on cell proliferation. It is emphasized that the development of different substitution, such as growth factors and human autologous serum, for fetal bovine serum (FBS) to avoid the risk from some viruses. The BMMSCs introduced by the plasmid with telomerase gene have shown stronger proliferation ability and multiple differentiation potential. The development of perfusion culture systems will make the preparation of BMMSCs more suitable for clinical application.

Key words human bone marrow mesenchymal stem cells (hBMMSCs); fetal bovine serum replacement; proliferation; perfusion culture

Received: May 8, 2006 Accepted: August 9, 2006

This work was supported by the Key Program of Zhejiang Province (No.J20020579-30116)

*Corresponding author. Tel: 86-571-88273423, Fax: 86-571-88273423, E-mail: zhangming_ls@zju.edu.cn