

# 犬骨髓间充质干细胞体外分离、培养及鉴定方法

钟世根<sup>1</sup> 王志刚<sup>1</sup> 凌智瑜<sup>2\*</sup> 殷跃辉<sup>2</sup> 李巧<sup>1</sup> 骆杰<sup>1</sup> 李兴升<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>重庆医科大学超声影像学研究所, <sup>2</sup>重庆医科大学附属第二医院心血管内科,

<sup>3</sup>重庆医科大学附属第二医院老年科, 重庆 400010)

**摘要** 探讨一种可靠、纯度高的犬骨髓间充质干细胞(BMMSCs)体外提取分离、纯化、培养和鉴定的方法。采用骨髓穿刺、Percoll密度梯度离心法分离出犬骨髓单个核细胞,结合贴壁培养法获得纯度高的犬BMMSCs,应用细胞免疫化学和流式细胞仪对犬BMMSCs表面标记蛋白进行细胞鉴定和周期测定。结果显示分离的细胞CD29、CD44均呈阳性表达,CD31、CD34、CD45和vWF的表达为阴性;88.88%的细胞处在G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期;由此证明所分离的细胞为犬BMMSCs,2周内经3代培养即可扩增到10<sup>7</sup>细胞数量级,纯度可达到99%以上,为干细胞移植治疗缺血性心脏病提供充足的细胞来源。

**关键词** 犬;骨髓单个核细胞;间充质干细胞;细胞培养技术

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)因为其来源方便、具备体外高扩增能力、免疫原性低以及多分化潜力等特点,近年来在基础研究领域及临床组织器官修复领域,尤其对心肌损伤修复呈现诱人的前景<sup>[1-3]</sup>。由于犬BMMSCs更加接近人类,且更能够模仿人类BMMSCs移植。所以探讨其体外分离、纯化、培养和扩增方法,为干细胞移植提供充足的细胞来源,更具有临床意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

健康杂种犬(体重14±2 kg),购自第三军医大学野战外科研究所动物中心;L-DMEM培养基为Gibco公司产品;特级胎牛血清(FBS)、Percoll分离液为Pharmacia公司产品;二甲基亚砜(DMSO)、胰蛋白酶为Gibco公司产品;EDTA、细胞培养专用青、链霉素、两性霉素B混合液,MTT为Sigma公司产品;兔源一抗CD29、CD44、CD34、CD45、CD31和vWF多克隆抗体为博士德公司产品;鼠抗狗CD44单克隆抗体为Santa Cruz公司产品;FITC标记二抗兔抗小鼠IgG为晶美公司产品;二抗山羊抗兔IgG、SABC免疫组化染色试剂盒、DAB显色试剂盒为博士德公司产品;倒置荧光显微镜为OLYMPUS CK41。

### 1.2 方法

1.2.1 骨髓穿刺 髂骨穿刺点选在左侧髂后上棘后下约1 cm骨质较平处。3%戊巴比妥钠(30 mg/

kg)肌注麻醉动物、常规备皮消毒铺巾后,以12号骨穿针垂直穿入皮质,有突破感时停止,抽取骨髓10 ml(空针内含0.2 ml肝素钠)。

1.2.2 犬BMMSCs分离纯化与培养 所取骨髓按1:1比例用无血清培养基洗涤稀释置于10 ml离心管中混匀,再将骨髓稀释液按1:1比例缓慢加入到1.073 g/ml Percoll分离液之上,2 000 r/min离心30 min;离心后离心管内液体共分为4层,小心吸取第2层白色膜状层,悬浮于5 ml无血清培养基内,2 000 r/min离心5 min,离心洗涤2次;去除上清液,用L-DMEM+10% FBS悬浮于50 ml培养瓶中,放置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱内。温育24 h后更换培养液,去除红细胞、悬浮生长的骨髓造血干细胞及其他未贴壁的骨髓细胞。以后每3天更换一次培养液。

1.2.3 犬BMMSCs的培养扩增与传代 原代细胞培养到第7~10天时,80%~90%贴壁细胞融合,用2.5 ml 0.25%胰蛋白酶+0.02% EDTA消化1~2 min,倒置显微镜观察,待50%细胞变为圆形时,用2.5 ml L-DMEM+10% FBS终止消化,并按1:3的比例进行传代。倒置显微镜逐日观察,直至贴壁细胞彼此融合铺满瓶底时,重复操作,反复传代。

1.2.4 观测不同代细胞间的增殖特性 选取第1、

收稿日期:2009-04-21 接受日期:2009-06-26

国家自然科学基金资助(No.30700166, No.30800271)

\*通讯作者。Tel: 023-63719612, E-mail: lingzhiyu1977@yahoo.com.cn

3、5代细胞,用0.25%胰蛋白酶+0.02% EDTA 消化制备细胞悬液,细胞密度调整为 $1 \times 10^4$ 个/ml,分别接种于96孔培养板内(各代细胞分别接种4孔,同时设4孔空白对照,每孔200  $\mu$ l)。从当天起每天固定时间取出1块培养板,每孔加入20  $\mu$ l 5 mg/ml MTT,混匀,温育4 h后吸去上清液,加入150  $\mu$ l DMSO,振荡10 min,用酶标仪在490 nm波长处测其吸光度(A)值,以实验组A值减去对照组A值,取其平均值,连续观测9天。以时间为横轴、A值为纵轴绘制不同代细胞的生长曲线,并进行比较。

**1.2.5 犬BMMSCs的鉴定** 取第3代细胞爬片行免疫组化检查,以兔源CD29、CD31、CD34、CD44、vWF和CD45多克隆抗体作为一抗,参照SABC试剂盒说明步骤进行细胞免疫组织化学染色,DAB显色后进行观察;流式细胞仪检测犬BMMSCs周期及表面抗原特性。

**1.2.6 细胞冻存和复苏** 选取第2代细胞,0.25%胰蛋白酶+0.02% EDTA 消化制备细胞悬液后。置入已加入细胞冻存液的冻存管内,并按4  $^{\circ}$ C 30 min、-20  $^{\circ}$ C 1 h、-80  $^{\circ}$ C过夜的顺序逐渐降温,最后将细胞冻存管置于液氮罐内保存,1~2周后取出细胞冻存管行复苏实验。观测复苏后细胞能否存活、生长状态以及对其进行免疫细胞染色。

## 2 结果

### 2.1 细胞形态观察

刚分离的细胞体积较小,折光性强,呈圆形;6 h后可见部分细胞贴壁、变形,并混有较多造血系细胞及部分细胞碎片悬浮;温育24 h后全量换液去除悬浮细胞,贴壁细胞明显增多,呈圆形、类圆形或多角形(图1A)。72 h时全量换液后,贴壁细胞基本纯化,多呈长梭形,仅少数呈圆形或类圆形,并呈集落式生长(图1B)。贴壁细胞生长迅速,约第7~10天时贴壁细胞融合可到达80%~90%,细胞贴附紧密,低倍镜下观察局部呈漩涡状生长(图1C)。传代后细胞加速生长,形态多呈长梭形,一般2~3天可传1次代。10 ml/犬的骨髓在14天时经3代培养后即可达到 $(1.5 \sim 2.6) \times 10^7$ 个细胞数。传代后细胞增殖速度增快,但随着传代次数的增加,细胞增殖能力逐渐减弱,体积逐渐变大,折光性变弱,细胞内出现空泡和颗粒状物质,提示细胞逐渐进入退变期(图1D)。

### 2.2 细胞的增殖特性

第1、3、5代细胞生长曲线测定(图2),显示

3代细胞间的细胞增殖无特异性差异。都在接种后第3天左右进入指数生长期,在第7天左右进入平台生长期。随着传代次数增加,发现细胞的生长状况呈衰减趋势。

### 2.3 细胞免疫组织化学检测

细胞免疫组织化学显示CD29、CD44呈阳性表达(图3)。阳性细胞表现为胞质呈棕黄色至棕褐色,细胞核周围较明显。以PBS代替一抗为阴性对照组,均未着色。CD31、CD34、vWF、CD45染色均为阴性表达。

### 2.4 流式细胞仪鉴定

①流式细胞仪检测细胞周期结果显示:G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub>/M期细胞所占比例分别为88.88%、6.37%、4.75%(图4)。②流式细胞仪检测细胞表面特异性抗原CD44:间接荧光标记流式结果显示对照组和实验组均检测到荧光,且彼此间荧光分布区域无明显分界,说明不适宜用阳性率表达结果,则需用荧光强度代表其抗原表达强弱,对照组平均荧光强度为5.52,实验组平均荧光强度为21.84,提示试验组细胞CD44表达阳性(图5)。

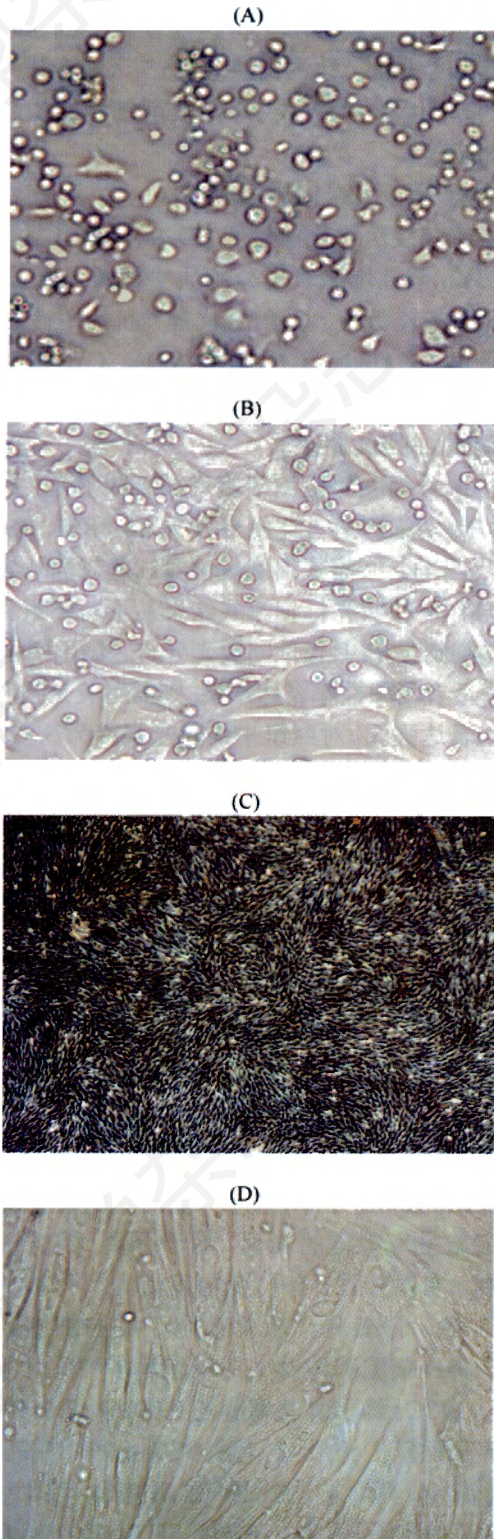
### 2.5 细胞冻存和复苏

细胞冻存2周后复苏观察到细胞变薄,形态呈多角型居多。且传一代后免疫组化显示CD34和vWF呈阳性表达(图6),而CD29、CD31、CD44和CD45均呈阴性表达。提示细胞经冻存复苏传代使细胞发生了不同程度的分化或老化现象。

## 3 讨论

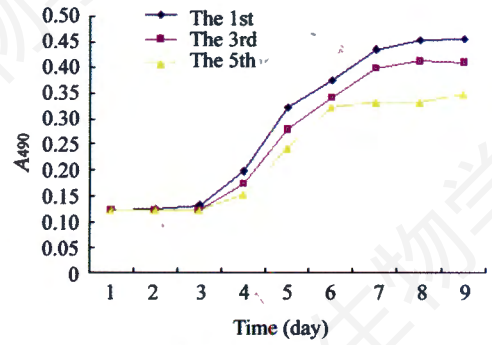
BMMSCs是一种存在于骨髓的非造血干细胞,这类干细胞呈现稳定的表型,易于分离、培养,可自我复制,多系分化,有高度增殖潜力。可以分化成心肌细胞、骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肌腱细胞、神经细胞和造血支持细胞等多种间叶组织细胞<sup>[4~6]</sup>。MSCs约占骨髓细胞的0.001%~0.01%<sup>[7]</sup>,体外培养呈贴壁生长,1~2周后,95%~99%的细胞呈单一纯系细胞,其形态类似成纤维细胞<sup>[8]</sup>。且表达与骨髓造血干细胞不同抗原:SH2、SH3、CD29、CD44、CD71及CD90阳性,而CD31、CD34和CD45为阴性<sup>[9]</sup>。

本实验采用1.073 g/ml Percoll密度梯度分离法,从犬骨髓中分离出单个核细胞,24 h后全量换液,经多次换液,去除大量为贴壁的杂细胞,7~10天后细胞融合达80%~90%,细胞呈长梭形,漩涡状生长。经

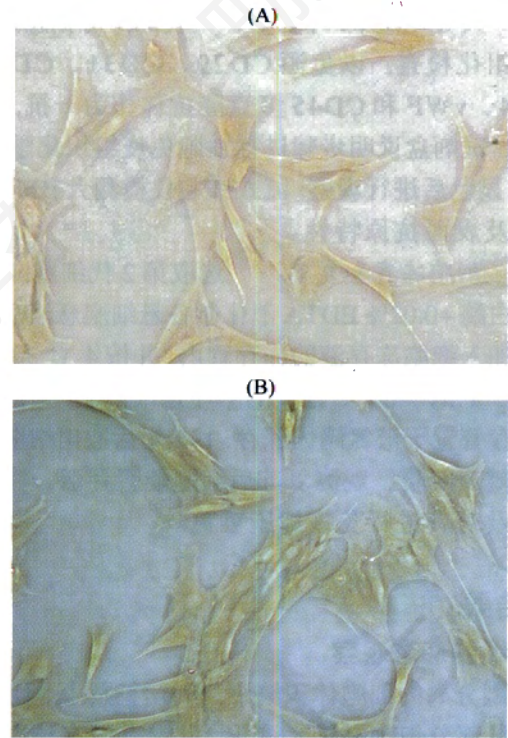


**Fig.1 Morphology of primary cell culture**

A: adherence cells significant increased and formed round and like-round or polygon after 24 hours, (200×); B: the adherence cells forming colony and fusiform and few round and like-round after 72 hours, (×200); C: The adherence cells increase rapidly and forming whirlpool, the 10 ml canine marrow cell population via 3 generation in 2 weeks can multiplication to  $(1.5-2.6) \times 10^7$ , (40×); D: the vacuole and granulo-materia presence in adherence cells (200×).

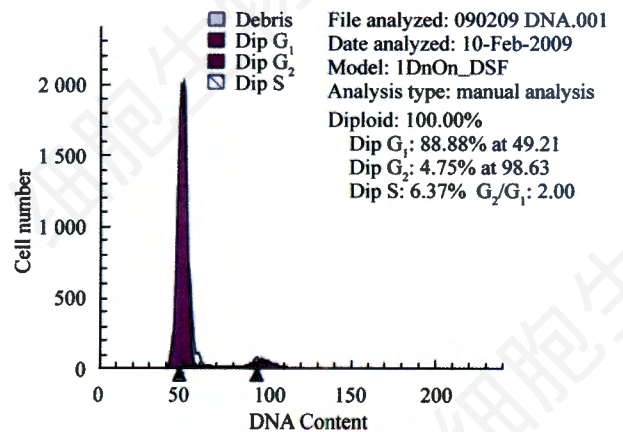


**Fig.2 The growth of the 1st, 3rd, 5th, generation cells**



**Fig. 3 Immunocytochemical stain (200×)**

A: CD29 expression; B: CD44 expression.



**Fig.4 Generation cycle detection 88.88% cells in the period of G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>**



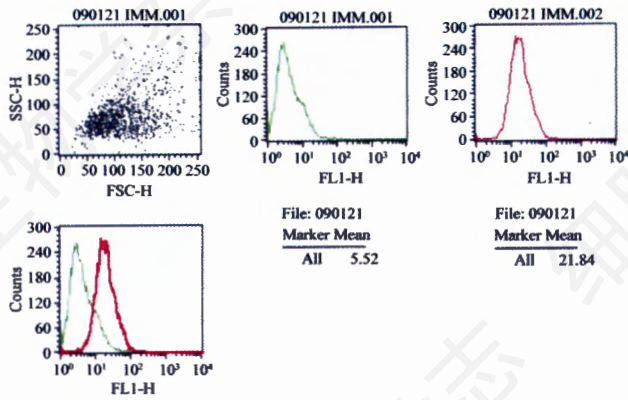


Fig.5 Cell surface marker CD44 expression via flow cytometry

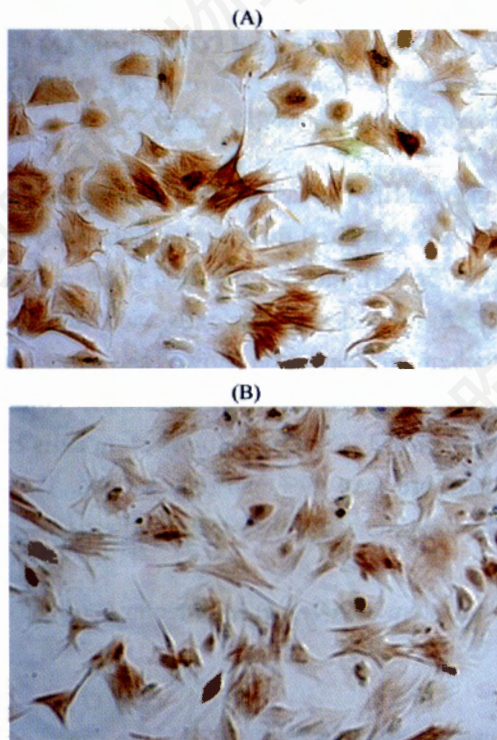


Fig. 6 Immunocytochemical stain after resuscitation (100×)  
A: CD34 expression; B: vWF expression and cell thinningz forming polygon.

传代细胞逐渐纯化, 至 3 代时采用间接荧光标记流式细胞仪检测细胞表面特异抗原 CD44 其阳性率接近 100%, 提示 BMMSCs 纯度可达 99% 以上。与既往的分离方法不同之处在于本实验采用的 Percoll 分离液密度为 1.073 g/ml, 而常规的 Ficoll 分离液密度为 1.077 g/ml, 因此更容易将 BMMSCs 同其他细胞分离。且高速分离时间较以往分离方法长, 使骨髓中更多有分化为 BMMSCs 的单核细胞保留在白色膜状

层内, 使细胞的纯化和扩增都能到达最好效果, 致使 10 ml 的犬骨髓在 2 周经 3 代培养后细胞数量可达  $(1.5\sim 2.6)\times 10^7$  个, 能够满足后续细胞移植治疗心肌梗死实验研究。细胞周期分析显示 88.88% 的细胞处于 DNA 合成前期  $G_0/G_1$  期, 说明大量细胞处于休眠期, 仅少数细胞处于细胞分裂期。直接证明分离扩增培养的细胞为处于原始状态的干细胞。细胞增殖特性观察不同代细胞间的增殖无特异性差异, 提示培养的细胞经传代后仍没有改变细胞的生长特性, 仍旧保存了细胞的自我更新能力。同时随着代数的增加, 细胞生长状态有衰减趋势且形态呈多形性表现。且细胞在冻存复苏后细胞表面发生了抗原改变, 说明细胞在经历不同环境刺激后发生不同程度的分化。上述特征说明本实验分离所得细胞具有干细胞的一般生长特性。

BMMSCs 具有多种标记而非单一性的特点, 给鉴定带来难度。我们采用多相免疫指标检测出细胞  $CD31^-$ 、 $CD34^-$ 、 $vWF^-$  和  $CD45^-$ , 由此排除所得细胞为造血干细胞和内皮等细胞的可能;  $CD29^+$  和  $CD44^+$  结合流式细胞术检测 CD44 阳性表达和细胞周期形态生长状况的观察等多项指标可以支持所培养的细胞为 BMMSCs。本实验还发现犬 BMMSCs 细胞在冻存 2 周后复苏, 细胞形态和表面标记发生改变, 因此犬 BMMSCs 不能冻存保存, 不能采用冻存复苏的细胞进行移植。分析可能是细胞在冻存复苏过程中由于环境的改变刺激了干细胞的分化。

本实验采用犬作为实验动物较啮齿类更接近于人类, 从骨髓穿刺获得干细胞, 避免了损伤供体完整的血管结构可能, 且方法简便。BMMSCs 具有的易分离培养, 多系分化增殖, 自体 BMMSCs 移植无免疫排斥等优点, 在修复损伤心肌血管新生方面有很大临床应用潜力, 因此选择犬 BMMSCs 作为模仿人类 BMMSCs 移植治疗缺血性心脏病, 更具有临床意义。

同以往实验方法相比, 本实验方法优化了骨髓分离步骤, 能在短期内获得高纯度的 BMMSCs, 更加适应细胞移植治疗缺血性心脏病的要求, 为后续研究打下了基础。

#### 参考文献(References)

- [1] Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics, *Circ Res*, 2004, 95(1): 9-20
- [2] Song L, Tuan RS. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, *FASEB J*, 2004, 18(9): 980-982