

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.07.004

人脐带间充质干细胞体外分离培养及其生物学特性的研究*

韩 潇^{1,2}, 白 海^{2△}, 赵 强², 杨 柯², 欧剑锋²

(1. 兰州大学第二医院血液内科, 兰州 730030; 2. 兰州军区兰州总医院血液科/全军血液病中心, 兰州 730050)

[摘要] **目的** 研究人脐带间充质干细胞(MSCs)详细的生物学特性,包括其细胞形态、免疫表型、纯度及增殖能力,从而建立稳定的 MSCs 体外分离培养体系。**方法** 将剔除动静脉及内膜的新鲜人脐带组织剪切成 1 mm³ 小块,用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养,得到贴壁细胞。观察贴壁细胞形态,利用 CCK-8 试剂盒测定生长曲线,流式细胞术研究特殊细胞表面抗原 CD29、CD73、CD90、CD105、CD31、CD14、CD34、CD45、CD11b、HLA-DR 表达,并检测细胞周期。**结果** 体外培养 7~10 d 后,可见细胞从组织块中游出;细胞主要呈纺锤体样、成纤维细胞样形态;生长曲线显示其增殖能力强;特殊表面抗原 CD29、CD73、CD90、CD105 表达强阳性,造血性抗原标志 CD31、CD14、CD34、CD45、CD11b、HLA-DR 表达均呈阴性,流式细胞仪周期检测结果显示 G₀/G₁ 期细胞超过 80%。**结论** 利用组织块法可有效获得人脐带 MSCs,具有高纯度、低成本优点,并在体外较易培养、扩增。

[关键词] 流式细胞术;人脐带间充质干细胞;培养;分离;组织工程

[中图分类号] R329

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)07-0876-04

The study of isolation and culture in vitro of human umbilical cord mesenchymal stem cells and their biological properties*

Han Xiao^{1,2}, Bai Hai^{2△}, Zhao Qiang², Yang Ke², Ou Jianfeng²

(1. Department of Hematology, Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730030, China;

2. Department of Hematology, Lanzhou Military Area General Hospital/

Center for Hematologic Diseases of Chinese PLA, Lanzhou, Gansu 730050, China)

[Abstract] **Objective** To identify a detailed biological characterization of mesenchymal stem cells (MSCs) isolated from human umbilical cord(UC) tissue regarding their morphology, immunophenotype, purity and proliferative capacity and establish a reasonably cultured and amplified system. **Methods** After stripping off arteries and veins, the remaining parts of umbilical cord were cut into 1 mm³ small sections and cultured with DMEM/F12 containing 10% fetal bovine serum. Adhere cells were obtained and the morphology of the cells was observed under inverted phase contrast microscope. The growth curves of them were drawn by CCK-8 and the cell cycle and surface antigens (CD29, CD73, CD90, CD105, CD31, CD14, CD34, CD45, CD11b, HLA-DR) were detected by flow cytometry. **Results** Seven to ten days after primary culture, adhere cells came out of fragments. The MSCs harvested were a high purity and mainly presented as a fibroblast-like morphology. UC-MSCs had a strong ability of proliferation through the cell growth curve. The special surface antigens CD29, CD73, CD90, CD105 were positive expression, while CD31, CD14, CD34, CD45, CD11b, HLA-DR were negative. More than 80% cells of MSCs were found at G₀/G₁ phase. **Conclusion** Human UC-MSCs could be cultured and proliferated in vitro.

[Key words] flow cytometry; human umbilical cord mesenchymal stem cells; culture; isolate; tissue engineering

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是存在于多种组织中的一种非造血多能干祖细胞,可诱导分化成不同的细胞系。人体内包括骨髓、脂肪组织、皮肤、肝脏、胎盘及脐带在内的组织均可产生 MSCs^[1]。然而,来源不同的 MSCs 在分化成多种细胞系时具有不同的潜能。在活体条件下, MSCs 最重要的特性是具有较强的自我更新能力和分化潜能,如成骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞或骨骼肌细胞^[2]。最近研究表明,体外培养的 MSCs 具有修复受损组织和免疫调节的潜能,已应用于临床^[3]。但人体骨髓单核细胞功能中 MSCs 所占比例极小,其增殖分化潜能和扩增数量随着供体年龄的增加而下降,且骨髓穿刺是一种侵入性过程,也使其来源受限。因此,当前认为人脐带 MSCs 是一种理想的取代骨髓 MSCs 的资源^[4-5]。本研究从人脐带分离扩增培养 MSCs,鉴定其详细的生物学特征,为组织工程种子细胞提供有效的体外扩增培养体系和方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 脐带取自兰州军区兰州总医院产科同一足月剖宫产健康产妇,符合伦理学要求且均知情同意,收集标本后 4 h 内处理。DMEM/F12 培养液、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)及 0.25% 胰蛋白酶-EDTA(1×)均购自美国 Gibco 公司,培养皿、培养瓶及冻存管均购自美国 Corning 公司, CCK-8 购自日本 Dojindo 研究所,流式细胞仪(FACS Calibur)及 CD29-PE、CD73-PE、CD90-PE、CD105-PE、CD31-PE、CD14-PE、CD34-PE、CD11b-PE、CD45-Percp、Anti-HLA-DR-FITC 标记的抗人单克隆抗体均购自美国 Becton Dickinson 公司,二甲亚砜(DMSO)购自韩国 BIOSHARP 公司, CO₂ 培养箱购自美国 Thermo 公司,倒置相差显微镜购自日本 Olympus 公司,酶联免疫分析仪购自奥地利 Tecan 集团公司,细胞周期检测试剂盒购自上海碧云天生物技术研究所。

* 基金项目:甘肃省科技重大专项(1102FKDA005)。 作者简介:韩潇(1990—),在读硕士,主要从事血液病及间充质干细胞研究。

△ 通讯作者, E-mail: baihai98@tom.com。

1.2 细胞分离与培养 足月生产后获取新鲜人脐带,4 h 内用 DMEM/F12(含 10% FBS)培养基 4 °C 运至实验室,在超净工作台内浸入 75% 乙醇 30 s,PBS 反复冲洗直至无血液及血块后,置于 DMEM/F12 培养基大皿中,剔除动静脉血管及内膜,培养基清洗数次,剪为 1 mm³ 大小组织块,以适当密度接种于直径 15 cm 的大皿中,加入 5.0 mL 含体积分数 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基,置于 37 °C,5% CO₂ 饱和湿度的培养箱内培养。次日加入 10.0 mL 相同培养基,继续培养 3~5 d 后待组织块贴壁后半量换液,此后每 5~7 天更换 1 次培养基,10~14 d 后剔除组织块。待全血细胞贴壁融合至 80% 时,用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化收集细胞,按 1:3 的比例传代培养。

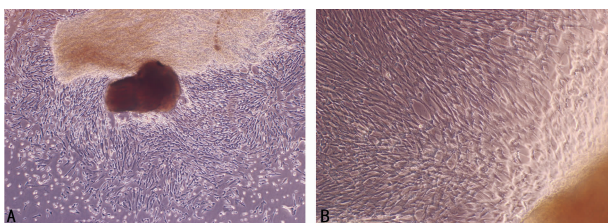
1.3 脐带 MSCs 生长曲线测定 取第 3 代细胞,按 2×10⁴/mL 密度接种于 96 孔培养板内,每板按 4×5 的规格连续接种 20 孔,每孔 200 μL,共计 7 板。接种第 2 天起,每天固定时间取 1 板加入 10 μL CCK-8 液,混匀。37 °C 继续孵育 3 h 后,酶标仪测定每孔吸光度(A)值,连测 7 d,根据 A_{450 nm} 值绘制细胞生长曲线,每板 3 次重复。

1.4 脐带 MSCs 表面抗原检测 取第 3 代细胞,弃去培养液,PBS 洗涤 1 遍,0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化收获细胞,每管加入 100 μL 密度为 1×10⁶/mL 的单细胞悬液,然后分别加入 CD29-PE、CD73-PE、CD90-PE、CD105-PE、CD31-PE、CD14-PE、CD34-PE、CD45-Percp、CD11b-PE、HLA-DR-FITC 抗体各 10 μL,室温避光孵育 30 min,PBS 洗涤重悬,流式细胞仪上机检测,Cell-Quest(Mac)软件分析,每个样本至少收获 20 000 个细胞。

1.5 脐带 MSCs 细胞周期检测 取第 3 代细胞,弃去培养液,PBS 洗涤 1 遍,0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化收获细胞,再用 PBS 液洗涤 1 遍,加入 1.0 mL-20 °C 的 70% 乙醇,混匀,4 °C 固定 24 h,离心去上清,加入 1.0 mL 冷浴 PBS,混匀,再次离心去上清后,每管加入 0.5 mL 配好的 PI 染液,混匀,37 °C 避光温浴 30 min,流式细胞仪检测,ModFitLT V3.2(Mac)软件分析,每个样至少收获 20 000 个细胞。

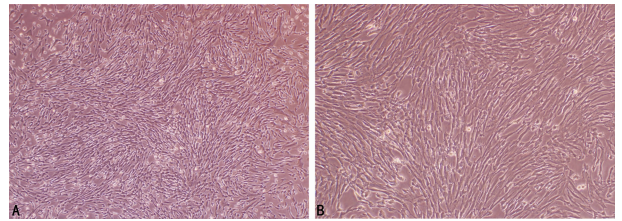
2 结果

2.1 脐带 MSCs 的形态学观察 组织块培养 7~10 d 后,可见组织块周围有细胞游出,且在组织块周围形成 50%~75% 的融合,其细胞形态呈多角形或短梭形,不规则(图 1)。继续培养 8~10 d 后去除组织块,并换液培养 3~5 d 后,贴壁细胞迅速增生,达 80%~90% 融合,形态类似于短成纤维细胞,胞质丰富,核偏大,呈平行排列、旋涡状、网状、辐射状生长,细胞界限不清楚(图 2),消化传代。传代细胞在 4~12 h 内完全贴壁,继续培养 3~5 d 后,重新变为长梭形成纤维样细胞,细胞大小均一,低倍镜下观察见细胞呈旋涡状或单极向放射状生长(图 3)。细胞传代后生长迅速,增生快,5~7 d 达到 80%~90% 融合。



A:4 倍镜下所见;B:10 倍镜下所见。

图 1 组织块培养 7 d 时形态



A:4 倍镜下所见;B:10 倍镜下所见。

图 2 去除组织块培养 3 d 后所见形态



图 3 第 1 代所见细胞形态(4 倍镜下所见)

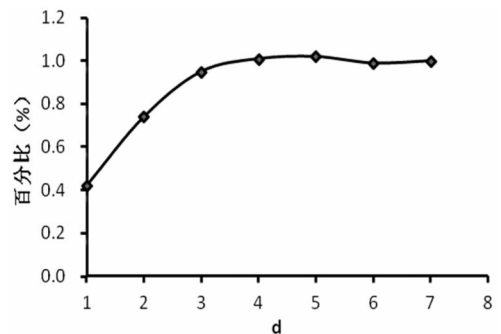


图 4 脐带 MSCs 生长曲线

2.2 脐带 MSCs 生长曲线的分析 由图 4 可见,1~3 d 曲线陡升,为细胞生长对数期,3~5 d 曲线平缓,略有上升,第 6 天开始有所下降,说明细胞生长已进入平台期,整个过程符合干细胞生长规律。经计算其倍增时间约为 50 h。

2.3 脐带 MSCs 的细胞周期分析 通过检测脐带 MSCs 细胞的 DNA 含量,发现 G₁ 期细胞超过 80%,G₂/G₁ = 1.86,说明此贴壁细胞增殖活跃,与干细胞生长特性相一致,见图 5。

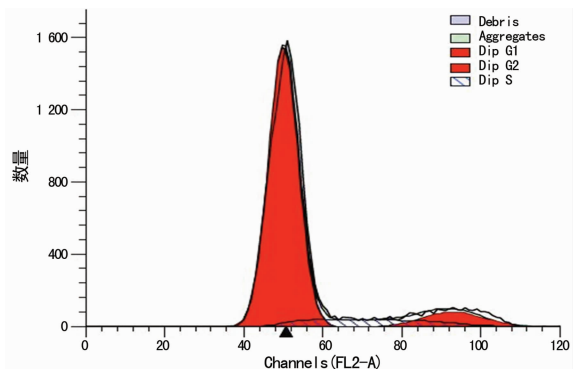


图 5 细胞周期分析结果

2.4 脐带 MSCs 细胞表面抗原特性 流式细胞仪检测抗原结果显示,脐带 MSCs 特殊表面抗原 CD29、CD73、CD90、CD105 表达强阳性,造血性抗原标志 CD31、CD14、CD34、CD45、

CD11b、HLA-DR 表达则呈阴性,见图 6。

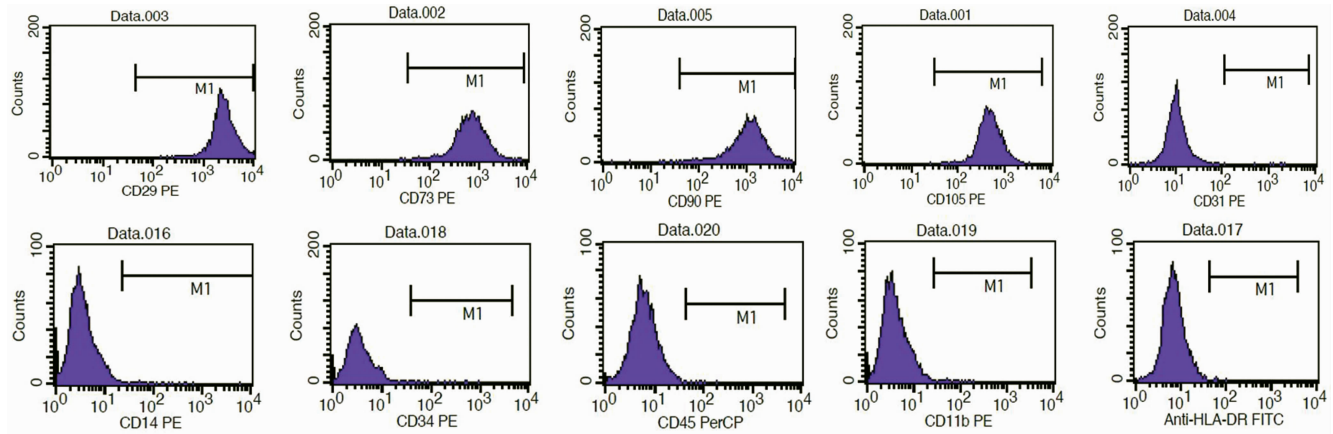


图 6 细胞表面抗原分析结果

3 讨论

1960 年,有研究者首次在骨髓间叶组织中发现一种非造血干细胞并将其命名为 MSCs,他们发现这是一种具有可塑黏附、成纤维样细胞,并可分化为软骨细胞、脂肪细胞和骨细胞。大量研究表明,MSCs 治疗对各种组织的修复具有重要意义^[6]。应用 MSCs 可减少移植后恶性疾病发展的风险,还能避免胚胎干细胞相关的伦理问题^[7]。在活体条件下,MSCs 最重要的特性是具有明显的自我更新能力和分化潜能,如脂肪细胞、成骨细胞、软骨细胞、神经元或骨骼肌细胞^[2],此分化过程是促进再生的一个基本步骤。

近年来,脐带代替骨髓作为 MSCs 的一种选择性资源,其特性优于骨髓及其他成人组织^[8]。组织块法和酶消化法是从人脐带中分离 MSCs 的两种主要技术^[9]。尽管在收集脐带后,组织块法花费更多时间才能获得细胞,但这种方法可获得更纯、少血源性细胞,且增殖率较高^[10]。相对于酶消化法,组织块法实验强度较小,且更能节省成本,因此,此法更适合临床目的。酶消化法可能引起一些问题,包括在应用于临床但未证实的不同样本中,由于细胞溶解酶活性及其对胶原酶敏感性的差异,从而减弱了细胞的生存能力^[11]。Yoon 等^[12]分别用组织块法和酶消化法从沃顿胶质中分离 MSCs,并描述了组织块法产生的细胞生存能力更强,且 MSCs 数量也更多。他们的研究显示组织块法提取 MSCs 的数量是酶消化法提取 MSCs 数量的 2.8 倍。他们也检测了培养基中由沃顿胶质碎片分泌的基础成纤维生长因子(bFGF),并发现这种生长因子在组织块法培养的主要阶段从其组织碎片中释放而出。Iftimia-Mander 等^[13]研究亦表明酶消化法从储存时间较长的脐带中分离出的 MSCs,其产量较组织块法低。这可能是由于脐带长期储存未处理,使细胞更容易分离为单个细胞,从而在消化期间更易受损。此外,脐带储存期间细胞外基质降解,从而在组织块培养过程中,间充质贴壁细胞能更好地游出组织。

本研究应用组织块法分离、培养与鉴定 MSCs。根据细胞治疗国际社会(ISCT)准则,MSCs 在标准培养条件下以可塑黏附为基础,须表达 CD105、CD90、CD73 抗原,而且 CD45、CD34 呈阴性表达^[14]。本实验通过流式细胞仪检测,脐带 MSCs 特殊表面抗原 CD29、CD73、CD90、CD105 表达强阳性,而造血细胞表面抗原 CD31、CD14、CD34、CD45、CD11b、HLA-DR 表达均为阴性,均与 ISCT 准则相符合。细胞周期显示 80% 以上的细胞处于 G₁ 期,符合干细胞自我更新特征的静止期。这些结

果均显示组织块法可分离出具有干细胞特征的 MSCs。组织块法的另一个益处似乎是培养基中含有自组织碎片分泌的细胞因子和生长因子,这些因子可刺激细胞生长^[15]。因此,培养基中不需再添加额外的任何生长因子。由此在研究和临床环境中组织块法提取 MSCs 可使用单纯培养基,从而节省更多成本^[16]。

用简单可再生的组织块法从整条脐带中分离出大量成纤维细胞样的 MSCs,具有高增殖性,能较好地忍受低温保存,复苏后可长期增殖,更重要的是,他们能合成大量营养因子,如神经营养因子、促血管再生因子和造血因子^[17]。总之,从脐带分离的细胞能满足干细胞库所有需求,包括再生医学领域中细胞材料可利用的永久性。虽然组织块法限制脐带游出的细胞数量,但其获得的细胞具有更强的新陈代谢活性。实际上,通过应用组织块技术分离和培养原始细胞,细胞从体内转到体外,这个过程同时伴有相关组织碎片,且不能从其先前体内条件下立即分离出来。因此,这一过渡阶段使细胞能更好地忍受分离压力;反之,在酶消化分离技术中,当细胞转入体外后将忍受来自身体和酶干扰分离的双重压力。在这方面,Otte 等^[18]证实了 MSCs 在原始组织片段存在下的长期体外培养期间保持干细胞特性,这意味着相应组织片段提供一个 MSCs 可保持其干细胞样状态的微环境。

总之,本研究利用组织块法从人脐带中成功分离出 MSCs,且检测了其详细的生物学特性,包括其细胞形态、免疫表型、纯度及增殖能力,结果显示脐带中富含高增殖性的 MSCs,且操作简单、成本低,从而建立了稳定的 MSCs 体外分离培养体系。因此,此研究为干细胞种子工程研究和人脐带 MSCs 大规模的临床应用奠定了基础。

参考文献

- [1] Faraoni I, Antonetti FR, Cardone J, et al. miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1792(6): 497-505.
- [2] Moroni L, Fornasari PM. Human mesenchymal stem cells: A bank perspective on the isolation, characterization and potential of alternative sources for the regeneration of musculoskeletal tissues [J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228(4): 680-687.
- [3] Shi Y, Su J, Roberts AI, et al. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses [J]. *Trends*

- Immunol, 2012, 33(3):136-143.
- [4] Majore I, Moretti P, Stahl F, et al. Growth and differentiation properties of mesenchymal stromal cell populations derived from whole human umbilical cord[J]. Stem Cell Reviews and Reports, 2011, 7(1):17-31.
- [5] Schipani E, Kronenberg HM. Adult mesenchymal stem cells--Stem Book[J]. In StemBook (Cambridge), 2008, 5(6):2124-2128.
- [6] 谢文友, 王廷华. 骨髓间充质干细胞移植治疗脑外伤的研究进展[J]. 重庆医学, 2013, 42(11):1296-1299.
- [7] 李晓玲, 朱旅云, 宋光耀, 等. 脐带间充质干细胞移植治疗糖尿病下肢血管病变[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(23):3670-3675.
- [8] Christodoulou I, Kolisis FN, Papaevangelou D, et al. Comparative evaluation of human mesenchymal stem cells of fetal (Wharton's jelly) and adult(adipose tissue) origin during prolonged in vitro expansion: considerations for cytotrapy[J]. Stem Cells International, 2013, 2013:246134.
- [9] Seshareddy K, Troyer D, Weiss ML. Method to isolate mesenchymal-like cells from Wharton's jelly of umbilical cord[J]. Methods Cell Biol, 2008, 86:101-119.
- [10] Salehinejad P, Alitheen NB, Ali AM, et al. Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2012, 48(2):75-83.
- [11] Han YF, Tao R, Sun TJ, et al. Optimization of human umbilical cord mesenchymal stem cell isolation and culture methods[J]. Cytotechnology, 2013, 65(5):819-827.
- [12] Yoon JH, Roh EY, Shin S, et al. Comparison of explant-derived and enzymatic digestion-derived MSCs and the growth factors from Wharton's jelly[J]. Biomed Res Int, 2013, 2013:428726.
- [13] Iftimia-Mander A, Hourd P, Dainty R, et al. Mesenchymal stem cell isolation from human umbilical cord tissue: understanding and minimizing variability in cell yield for process optimization [J]. Biopreserv Biobank, 2013, 11(5):291-298.
- [14] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement[J]. Cytotherapy, 2006, 8(4):315-317.
- [15] Venugopal P, Balasubramanian S, Sen MA, et al. Characterization, and gene expression analysis of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells under xeno-free culture conditions[J]. Stem Cells Cloning, 2011, 21(4):39-50.
- [16] Hendijani F, Sadeghi-Aliabadi H, Javanmard SH. Comparison of human mesenchymal stem cells isolated by explant culture method from entire umbilical cord and Wharton's jelly matrix [J]. Cell Tissue Bank, 2014, 15(4):555-565.
- [17] Galderisi U, Giordano A. The gap between the physiological and therapeutic roles of mesenchymal stem cells[J]. Med Res Rev, 2014, 34(5):1100-1126.
- [18] Otte A, Bucan V, Reimers K, et al. Mesenchymal stem cells maintain long-term in vitro stemness during explant culture[J]. Tissue Eng Part C Methods, 2013, 19(12):937-948.

(收稿日期:2015-09-08 修回日期:2015-11-10)

(上接第 875 页)

- [4] Kretzer NM, Cherian MT, Mao CJ, et al. A noncompetitive small molecule inhibitor of estrogen-regulated gene expression and breast cancer cell growth that enhances proteasome-dependent degradation of estrogen receptor alpha[J]. J Biol Chem, 2010, 285(53):41863-41873.
- [5] Chen S, Liu H, Li J, et al. Risk of gastric and colorectal cancer after tamoxifen use for breast cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. J Clin Gastroenterol, 2014, [Epub ahead of print].
- [6] Xie X, Wu MY, Shou LM, et al. Tamoxifen enhances the anticancer effect of cantharidin and norcantharidin in pancreatic cancer cell lines through inhibition of the protein kinase C signaling pathway[J]. Oncol Lett, 2015, 9(2):837-844.
- [7] 白文坤, 王文奇, 时昌文, 等. 他莫昔芬对人肝癌细胞增殖及 ER 表达影响的研究[J]. 中国现代普通外科进展, 2008, 11(5):386-388.
- [8] Chandanosa E, Lindblada M, Rubiob CA, et al. Tamoxifen exposure in relation to gastric adenocarcinoma development[J]. Eur J Cancer, 2008, 44(7):1007-1014.
- [9] Salami S, Karami-Tehrani F. Biochemical studies of apoptosis induced by tamoxifen in estrogen receptor positive and negative breast cancer cell lines [J]. Clin Biochem, 2003, 36(4):247-253.
- [10] Jiang X, Patterson NM, Ling Y, et al. Low concentrations of the soy phytoestrogen genistein induce proteinase inhibitor 9 and block killing of breast cancer cells by immune cells[J]. Endocrinology, 2008, 149(11):5366-5373.
- [11] Zembutsu H. Pharmacogenomics toward personalized tamoxifen therapy for breast cancer[J]. Pharmacogenomics, 2015, 16(3):287-296.
- [12] 熊玉霞, 周业江. PI9 和 GrB 在胃癌细胞表达的生物学意义[C]. 中国生理学会心血管生理学术研讨会论文集, 2011:106-107.
- [13] 雷晓晔, 周业江. 丝氨酸蛋白酶抑制剂 PI9 的研究进展[J]. 国际外科学杂志, 2010, 37(6):404-407.
- [14] 李一叶, 卢圣栋. 颗粒酶 B 抑制剂的研究进展[J]. 国际免疫学杂志, 2008, 30(3):197-200.
- [15] Cunningham TD, Jiang X, Shapiro DJ. Expression of high levels of human proteinase inhibitor 9 blocks both perforin/granzyme and Fas/Fas ligand-mediated cytotoxicity[J]. Cell Immunol, 2007, 245(1):32-41.
- [16] 李姝君, 杨志雄, 田鲜艳, 等. Survivin 在肺癌中表达意义及其与 Fas/FasL 表达的关系[J]. 中国医药导报, 2011, 8(20):17-19.

(收稿日期:2015-09-08 修回日期:2015-11-26)