

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.01.027

## 人胎盘绒毛膜间充质干细胞分离培养方法研究\*

陈凤<sup>1,2</sup>, 卿玲<sup>2</sup>, 崔璐<sup>2</sup>, 王森<sup>2</sup>, 王菲<sup>1△</sup>

(1. 中山大学附属第七医院消化医学中心, 广东深圳 518107; 2. 广东省深圳市第三人民医院妇产科 518112)

**[摘要]** **目的** 比较不同方法分离培养人胎盘绒毛膜间充质干细胞(MSC)的差异,并鉴定其生物学特性。**方法** 选取健康孕妇胎盘绒毛膜组织分别采用组织块贴壁法、胶原酶消化法、胰酶消化法进行分离培养,流式细胞仪分析细胞表面标志物的表达,台盼蓝染色计数法绘制细胞生长曲线并计算群体倍增时间,逆转录聚合酶链反应和成脂诱导分化试剂盒分别检测细胞多能性相关基因及分化潜能。**结果** 胶原酶消化法原代培养周期均明显短于组织块贴壁法和胰酶消化法,培养相同时间内获得的活细胞数量均明显高于组织块贴壁法和胰酶消化法,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );3种方法来源细胞均表达 MSC 表面标志物——CD44、CD105,不表达造血细胞表面标志物——CD34、CD45;3种方法来源细胞生长曲线均呈“S”形,第4代细胞群体倍增时间比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ );3种方法获得细胞均表达多能性相关基因——Oct4、Nanog,且具有成脂分化能力。**结论** 组织块贴壁法、胶原酶消化法、胰酶消化法均可分离培养获得绒毛膜 MSC,但结合培养时间及细胞纯度等因素认为,胶原酶消化法更具有优势。

**[关键词]** 胎盘绒毛膜间充质干细胞;组织块贴壁;胶原酶;胰酶;生物学特性

**[中图分类号]** Q28 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2022)01-0122-05

## Research on isolation and culture methods of human placental chorionic mesenchymal stem cells\*

CHEN Feng<sup>1,2</sup>, QING Ling<sup>2</sup>, CUI Lu<sup>2</sup>, WANG Miao<sup>2</sup>, WANG Fei<sup>1△</sup>

(1. Digestive Medicine Center, Seventh Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Shenzhen, Guangdong 518107, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Shenzhen Municipal Third People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518112, China)

**[Abstract]** **Objective** To compare the differences among different methods for isolating and culturing human placental chorionic mesenchymal stem cells(MSC), and to identify their biological characteristics. **Methods** Placental chorionic tissue from healthy pregnant women were selected to conduct the isolation and culture by tissue explants adherent, collagenase digestion and trypsin digestion method, respectively. The expressions of cellular surface markers were analyzed by flow cytometry, the growth curve was drawn by trypan blue staining and count, and the population doubling time (PDT) was calculated, the cell pluripotency related genes and differentiation potential were tested by RT-PCR and adipogenic induction kits, respectively. **Results**

The primary culture cycle in the collagenase digestion method was significantly shorter than that in the tissue explants adherent and trypsin digestion methods, the number of obtaining living cells by the same culture time in collagenase digestion method was significantly higher than that in the tissue explants adherent and trypsin digestion methods ( $P < 0.05$ ). The cells derived from three methods expressed the MSC surface makers CD44 and CD105, but did not express the hematopoietic cell surface markers CD34 and CD45. The cells growth curve obtained by three methods presented the S-shape, PDT of 4 generation cells showed no statistically significant difference ( $P > 0.05$ ), the cells obtained by 3 methods all expressed the pluripotency related genes Oct4, Nanog, moreover had the ability of adipogenic differentiation. **Conclusion** The tissue explants adherent, trypsin digestion and collagenase digestion methods all can isolate, culture and obtain chorionic MSC. But it is considered that the collagenase digestion method has more advantages by combining with the culture time and cellular purity.

**[Key words]** placental chorionic mesenchymal stem cells; tissue explants adherent; collagenase; trypsin; biological characteristics

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(81800525,81873573)。 作者简介:陈凤(1991—),助理研究员,硕士,主要从事感染性疾病及干细胞治疗研究。 △ 通信作者, E-mail: fay\_wong1116@hotmail.com。

间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSC) 是来源于中胚层的一类成体干细胞,因来源丰富、制备简单、多能性、低免疫原性和致瘤性等特征越来越受到关注。MSC 可以从机体的大部分组织器官如骨髓、脂肪、脐带、胎盘、羊膜等组织中分离获得<sup>[1-2]</sup>,具有多向分化潜能<sup>[3-4]</sup>、免疫调控<sup>[5]</sup>和促进组织再生功能<sup>[6-7]</sup>,已成为全球开展临床研究项目数量最多的细胞。目前来看,骨髓来源的 MSC 仍是临床试验细胞的主要来源,但从骨髓中获取干细胞的过程创伤大、大约每  $10^5 \sim 10^6$  个单核细胞中才有 1 个目标细胞,加上随着供体年龄增加,获得细胞的数量、活力和分化能力均可能下降<sup>[8]</sup>。因此,寻找其他来源的种子细胞成为研究热点。多项研究表明,胎盘组织可为干细胞开辟一个崭新而丰富的来源,分离来自羊水、脐血、脐带、羊膜、绒毛膜部位的细胞均表达 MSC 的特性,具有不同的可塑性和分化能力<sup>[9-10]</sup>;但什么方法最适合分离培养这些组织来源的干细胞尚无定论。目前分离培养 MSC 的方法各有利弊,从中筛选一种方便、高效的方法对提高干细胞体外制备效率具有重大意义。本研究选取人胎盘绒毛膜组织,分别采用组织块贴壁法、胰酶多次反复消化法和胶原酶消化法进行分离培养,比较不同培养方法获得胎盘绒毛膜 MSC (placental chorionic mesenchymal stem cells, PCMSC) 的差异,并对不同方法获得的细胞生物学特性进行初步分析,现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料来源

人胎盘绒毛膜组织来源于广东省深圳市第三人民医院妇产科行人工流产手术的健康孕妇。本研究已获得广东省深圳市第三人民医院伦理委员会批准。杜氏改良 Eagle 培养基 (Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM) 培养基、胎牛血清、0.25% 胰蛋白酶、青霉素、链霉素、成脂诱导分化试剂盒等均购自 Gibco 公司 (美国); I 型胶原酶购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 引物序列由生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行合成; PE 偶联小鼠抗人 CD34、CD44、CD45、CD105 抗体均购自 BD BIOSCIENCES PHARMINGEN 公司 (美国); RNA 提取及反转录试剂盒均购自北京全式金生物技术有限公司。完全培养基为添加 10% 胎牛血清、1% 青霉素、1% 链霉素的 DMEM 培养基。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 PCMSC 的原代分离培养

由专业医师剪取胎儿侧的绒毛膜组织 30 mL, 经生理盐水冲洗, 采用剪刀和镊子去除组织块中残留的血丝, 放入含 1% 青链霉素的磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffered solution, PBS) 中反复冲洗 3 次, 将组织块放入 100 mm 皿中, 剪成 1 cm 左右长条块, 随后剪碎至 1 mm × 1 mm × 1 mm 左右, 转移至 50 mL 离心管中, 加入适量 PBS, 800 r/min 离心 5 min, 弃上

清液。

#### 1.2.1.1 组织块贴壁组

取 10 mL 组织块均匀铺于 60 mm 皿中, 放入培养箱中倒置培养 1 h; 随后加入适量完全培养基覆盖组织块, 放入培养箱中继续培养。

#### 1.2.1.2 I 型胶原酶消化组

取 10 mL 组织块放入干净的 50 mL 离心管中, 加入 0.1% I 型胶原酶溶液 20 mL, 于 37 °C 水浴锅放置 1 h, 每 10 分钟摇晃离心管 1 次; 1 h 后将上述混合液体按每管 15 mL 分装至 2 个 50 mL 离心管中分别加入 30 mL 完全培养基终止消化; 将上述混合液经 100 μm 细胞筛过滤去掉组织块, 过滤液 800 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入完全培养基重悬后转移至 T25 培养瓶中进行培养。

#### 1.2.1.3 胰蛋白酶消化组

取 10 mL 组织块于干净的 50 mL 离心管中, 加入适量可覆盖组织块的 0.25% 胰蛋白酶溶液, 于 37 °C 水浴中消化 15 min, 将混合液体经 100 μm 细胞筛过滤, 过滤液中加入 3 倍体积的完全培养基终止消化, 组织块中继续加入 0.25% 胰蛋白酶溶液, 重复上述过程 2 次; 将收集到的过滤液 800 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入完全培养基重悬后转移至 T25 培养瓶中进行培养。第 2 天进行换液, 尽量吸走漂浮的组织块及悬浮在培养基中的血细胞, 随后每 2 天换液 1 次, 待细胞局部汇合度达 80% ~ 90% 时进行传代。

#### 1.2.2 细胞表面标记物检测

取培养至第 3 代的细胞胰酶消化收集细胞, PBS 重悬调整细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL 细胞, 取各管 200 μL 细胞悬液按照抗体使用说明书分别加入小鼠抗人 CD34、CD44、CD45、CD105 单克隆抗体, 室温下避光孵育 0.5 h, PBS 洗涤后重悬细胞, 采用流式细胞仪检测细胞表面标记物表达。

#### 1.2.3 细胞增殖能力测定

取培养至第 4 代细胞按  $1 \times 10^4$  个/孔细胞分别接种至 24 孔板中, 每天随机取 3 孔细胞用胰酶消化, 台盼蓝染色后用自动细胞计数器进行计数, 取其平均数绘制生长曲线。按公式 [细胞群体倍增时间 (PDT) =  $t \lg 2 / (\lg N - \lg N_0)$ ] 计算 PDT。其中 t 为细胞培养时间,  $N_0$  为细胞培养开始时的细胞数量, N 为细胞培养终止时细胞数量。

#### 1.2.4 多能性相关基因检测

取培养至第 5 代细胞, 按 RNA 提取及反转录试剂盒说明书进行操作, 聚合酶链反应扩增检测多能性相关基因——Oct4 (上游引物 5'-3' CCGAAAGAG AAAGCGAACCAG, 下游引物 5'-3' AT GTGGCT-GATCTGCTGCAGT)、Nanog (上游引物 5'-3' CA-GAAGGCCTCAGCACCTAC, 下游引物 5'-3' CTGT-TCCAGGCCTG ATTGTT) 的表达, GAPDH 为阳性对照 (上游引物 5'-3' CCAGGTGGTCTCCTCT-GACTTC, 下游引物 5'-3' CCAGGTGGTCTCCTCT-

GACTTC),引物序列参照文献[11]。反应程序为 95 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,35 个循环;最后 72 °C 终延伸 10 min;最后取 5  $\mu$ L 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.2.5 成脂分化检测

取培养至第 5 代细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔接种到 6 孔板中,待细胞融合约 80% 后,分化组加入成脂诱导分化液,对照组加入完全培养基,每 3 天换液 1 次,分化组在第 14 天左右停止诱导。诱导结束后使用 4% 多聚甲醛室温固定 30 min 后进行油红 O 染色。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS19.0 统计软件进行分析处理,满足正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用  $t$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 PCMSC 的原代分离培养

不同方法分离培养形成的 PCMSC 见图 1。组织块贴壁培养第 6 天部分组织块周围有少数细胞爬出,形态呈细小梭形,第 12 天左右局部细胞汇合度达 90%,细胞排列紧密,呈漩涡状生长。采用 I 型胶原酶消化法原代细胞接种第 3 天可见大量的细胞贴壁生长,形态为典型成纤维样,以长梭形为主,有少量圆而亮的未贴壁细胞,第 6 天时细胞生长汇合度达 90%,可进行传代培养。采用胰蛋白酶消化法原代细胞接种第 3 天可见少量的细胞贴壁生长,形态以细小短梭形为主,经第 3 天培养细胞量仍较少,第 12 天左右细胞汇合度达 90%。

### 2.2 获得 PCMSC 的活细胞数量

采用胶原酶消化法获得的活细胞数量均明显高于组织块贴壁法和胰蛋白酶消化法,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );组织块贴壁法与胰蛋白酶消化法比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图 2。

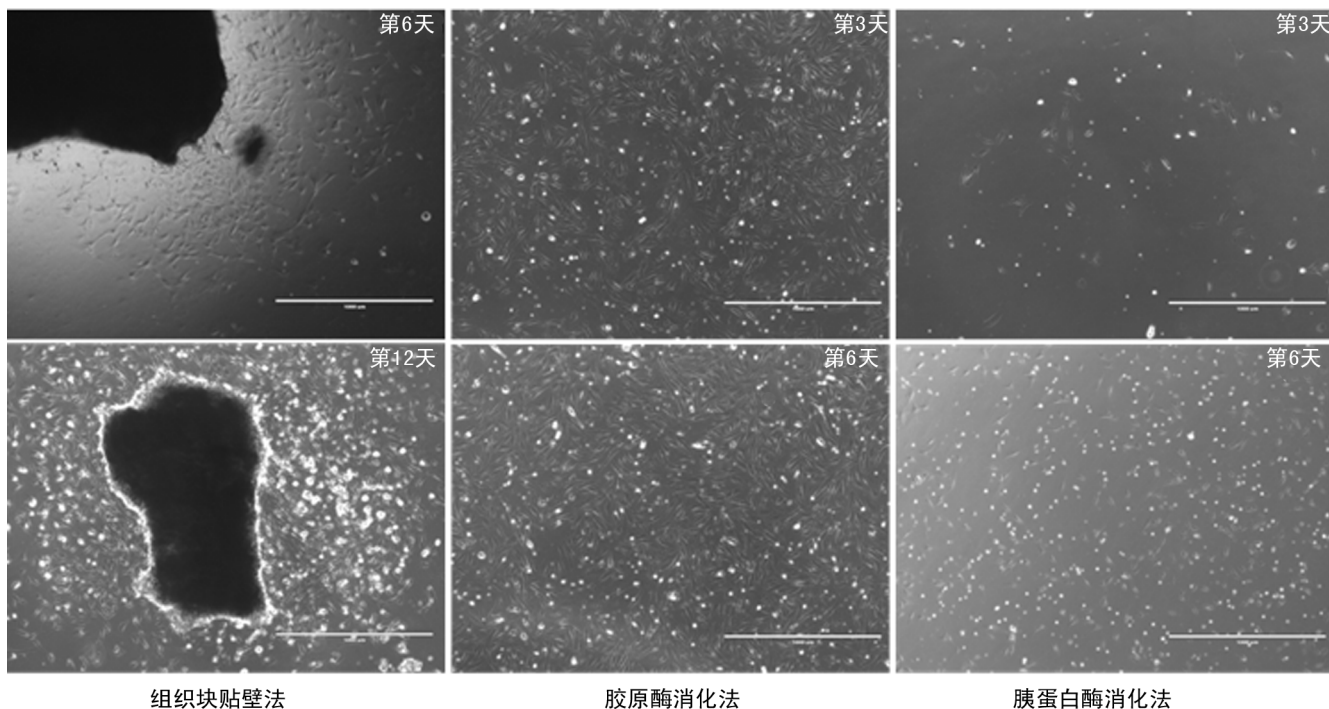
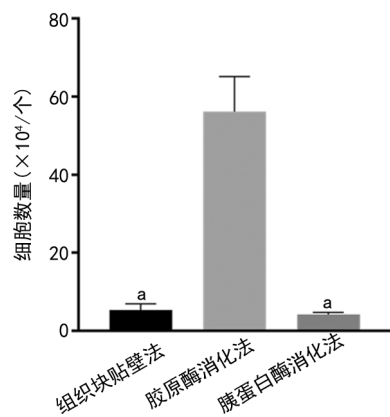


图 1 PCMSC 的原代分离培养(40 $\times$ )



<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ ,与胶原酶消化法比较。

图 2 3 种方法分离培养 PCMSC 的活细胞数量比较

### 2.3 细胞表面标志物表达

3 种方法分离培养的细胞均高表达 MSC 表面标志物——CD44、CD105,低表达造血细胞的表面标志物——CD34、CD45。与组织块贴壁和胶原酶消化法获得的细胞比较,来源于胰蛋白酶消化的部分细胞呈 CD34、CD44、CD45、CD105 阴性,见图 3。

### 2.4 细胞增殖能力

3 种方法分离培养的 PCMSC 生长曲线均呈“S”形,1~2 d 为细胞生长潜伏期,增殖不明显,2~5 d 细胞进入对数生长期,增殖速度加快,6~7 d 细胞进入平台期,增殖缓慢,见图 4A。3 种方法获得的细胞 PDT 分别为 1.90、1.86、1.85 d。3 组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图 4B。

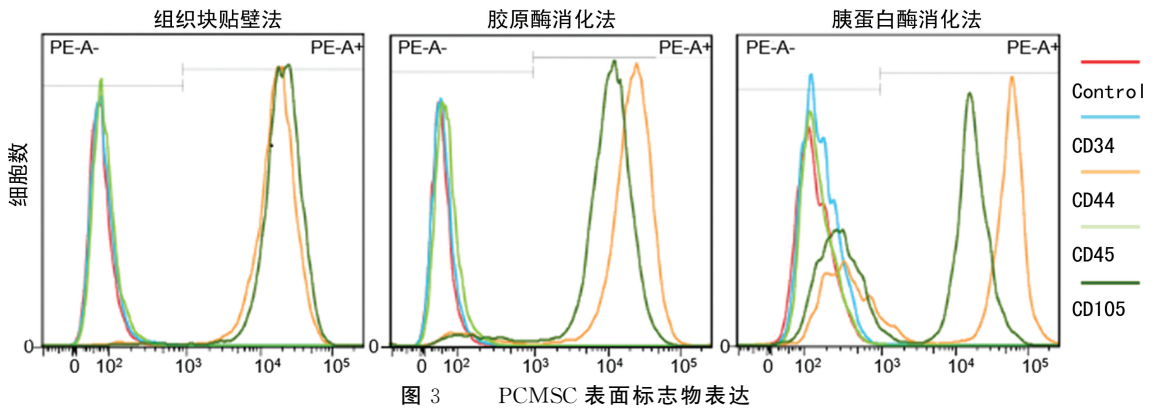
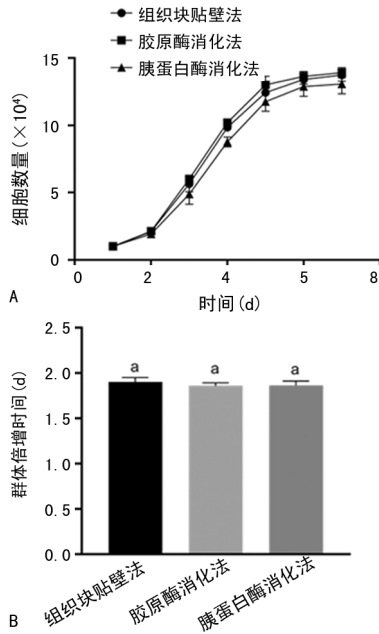


图 3 PCMSC 表面标志物表达



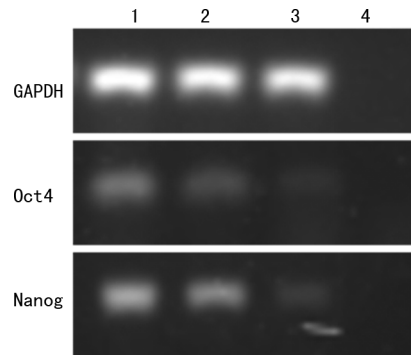
A: PCMSC 生长曲线; B: PDT。

图 4 PCMSC 的增殖能力

### 2.5 多能性相关基因表达

3 种方法分离培养获得的 PCMSC 均表达 Oct4、

Nanog, 见图 5。



1: 组织块贴壁法; 2: 胶原酶消化法; 3: 胰酶消化法; 4: 阴性对照。

图 5 PCMSC 的多能性相关基因表达

### 2.6 成脂分化能力

3 种方法分离培养来源的细胞在诱导前 5 d 细胞形态均无明显变化, 诱导第 7 天开始部分细胞形态发生改变, 细胞体积增大, 可见少量小脂滴于胞浆中, 诱导 10 d 左右含脂滴细胞数量明显增多, 未加诱导分化液的对照组细胞堆积生长, 但细胞形态无明显变化, 也未见脂滴生成, 取第 14 天细胞进行油红 O 染色脂滴为红色, 见图 6。

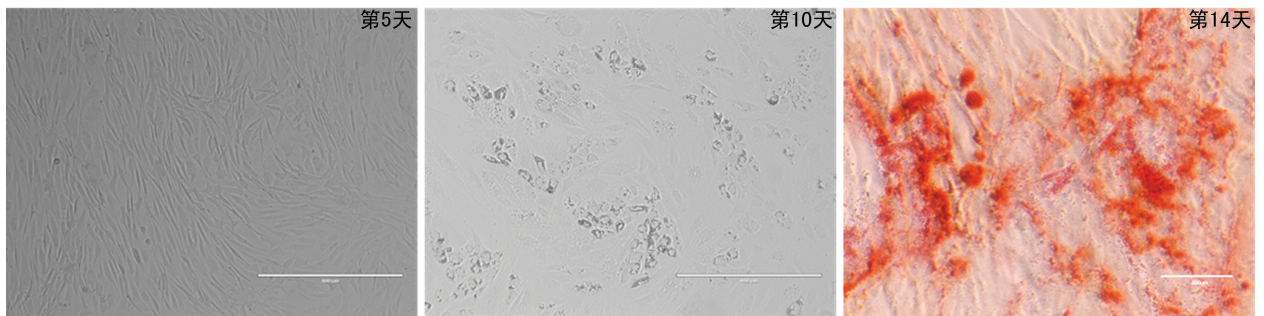


图 6 PCMSC 诱导分化过程 (100×)

## 3 讨论

胎盘绒毛膜的大部分组织起源于胚外中胚层, 其中富含大量 MSC, 是再生医学重要的干细胞来源。目前, 胎盘 MSC 的研究尚处于初级阶段, 其分离纯化及鉴定尚无统一标准, 仍需进一步探索。

分离培养 MSC 的方法多种多样, 不同的分离方法可能会特异性选择某一亚群细胞, 导致获得的细胞具有差异性<sup>[12]</sup>。目前, 主要的分离方法有酶消化法和

组织块贴壁法, 各种分离方法均有利弊, 但很少有研究在 PCMSC 的分离培养中对其进行比较。本研究采用组织块贴壁法、胰酶消化法、胶原酶消化法均可获得 PCMSC, 采用胶原酶消化法在第 3 天即可见大量细胞贴壁生长, 相比组织块贴壁法和胰酶消化法需要的原代培养时间更短。相同体积的绒毛膜组织在分离培养相同时间内胶原酶消化组获得的活细胞数量明显高于组织块贴壁法和胰酶消化法, 与近年来一篇

文献报道的结果类似,其发现采用胶原酶消化法获得羊膜 MSC 的数量明显高于胰酶消化法<sup>[13]</sup>。

MSC 具有独特的细胞表型,本研究采用流式细胞仪对细胞表面标志物进行鉴定,结果显示,3 种分离方法获得的细胞均表达 MSC 表面标志物——CD44、CD105,不表达造血干细胞——CD34、CD45 这些造血干细胞标志物,与文献报道的 MSC 表面标志物相同<sup>[14-16]</sup>。值得注意的是,来源于胰酶消化的部分细胞均不表达以上标志物,表明存在非 MSC 和非造血细胞的亚群细胞,可能为一些内皮细胞或特殊滋养层细胞<sup>[17]</sup>。3 种分离方法获得的第 4 代细胞进入潜伏期、对数生长期、平台期的各时间点均接近,群体倍增时间无明显差异,表明增殖能力无明显差异,但随着传代时间的延长,其增殖能力是否会发生变化尚需进一步研究。

Oct4、Nanog 等基因通常用于评判干细胞是否具有多能性,本研究结果显示,3 种方法获得的细胞均表达 Oct4、Nanog,表明获得的细胞具有多能性,但仅从聚合酶链反应检测结果来看,胰酶消化法表达量弱于胶原酶消化法和胰酶消化法,是否与获得的细胞中含有其他类型的细胞有关尚有待于研究。胎盘 PCMSC 经成脂诱导后均在胞浆中形成了脂滴,染色鉴定显示其具有成脂分化潜能。

综上所述,采用组织块贴壁法、胶原酶消化法、胰酶消化法分离获得的细胞均表达 MSC 表面标志物——CD44、CD105,不表达造血干细胞标志物——CD34、CD45,表达 Oct4、Nanog 基因且具有成脂分化潜能,表明其具有 MSC 的生物学特性。就 PCMSC 的培养而言,胶原酶消化法具有明显优势,不仅所需的原代培养时间最少,而且不容易被污染,培养纯度和成功率更高,可大规模培养。

## 参考文献

- [1] NAJI A, EITOKU M, FAVIER B, et al. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(17): 3323-3348.
- [2] MUSHAHARY D, SPITTLER A, KASPER C, et al. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells [J]. *Cytometry A*, 2018, 93(1): 19-31.
- [3] ALMALKI S G, AGRAWAL D K. Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells [J]. *Differentiation*, 2016, 92(1/2): 41-51.
- [4] KHAN H, MAFI P, MAFI R, et al. The effects of ageing on differentiation and characterization of human mesenchymal stem cells [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2018, 13(5): 378-383.
- [5] FU X, LIU G, HALIM A, et al. Mesenchymal stem cell migration and tissue repair [J]. *Cells*, 2019, 8(8): 784.
- [6] GUADIX J A, ZUGAZA J L, GÁLVEZ-MARTIN P. Characteristics, applications and prospects of mesenchymal stem cells in cell therapy [J]. *Med Clin (Barc)*, 2017, 148(9): 408-414.
- [7] CHEN Y, YU Q, HU Y, et al. Current research and use of mesenchymal stem cells in the therapy of autoimmune diseases [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2019, 14(7): 579-582.
- [8] 洪艳, 霍思维, 陆瑶, 等. 人胎盘不同组织分离间充质干细胞的生物学特性 [J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(19): 3082-3087.
- [9] ARAÁJO A B, FURLAN J M, SALTON G D, et al. Isolation of human mesenchymal stem cells from amnion, chorion, placental decidua and umbilical cord: comparison of four enzymatic protocols [J]. *Biotechnol Lett*, 2018, 40(6): 989-998.
- [10] ERTL J, PICHLBERGER M, TUCA A C, et al. Comparative study of regenerative effects of mesenchymal stem cells derived from placental amnion, chorion and umbilical cord on dermal wounds [J]. *Placenta*, 2018, 65(1): 37-46.
- [11] 彭运, 陈凤, 黄华鑫, 等. 比较两种不同来源间充质干细胞的生物学特性及多向分化潜能 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2020, 42(4): 566-572.
- [12] CAI J, MIAO X, LI Y, et al. Whole-genome sequencing identifies genetic variances in culture-expanded human mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cell Reports*, 2014, 3(2): 227-233.
- [13] DENG Y, HUANG G, ZOU L, et al. Isolation and characterization of buffalo (*bubalus bubalis*) amniotic mesenchymal stem cells derived from amnion from the first trimester pregnancy [J]. *J Vet Med Sci*, 2018, 80(4): 710-719.
- [14] MILDMEYER-WHITE A, KHAN W. Cell surface markers on adipose-derived stem cells: a systematic review [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2017, 12(6): 484-492.
- [15] RANJBARAN H, ABEIANKENARI S, MOHAMMADI M, et al. Wharton's jelly derived-mesenchymal stem cells: isolation and characterization [J]. *Acta Med Iran*, 2018, 56(1): 28-33.
- [16] ANTEBI B, ASHER A M, RODRIGUEZ L A, et al. Cryopreserved mesenchymal stem cells regain functional potency following a 24 h acclimation period [J]. *J Transl Med*, 2019, 17(1): 297.
- [17] 张红艳, 杨乃龙. 胎盘来源间充质干细胞的生物学特征 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(40): 7535-7538.