

人早期胚胎间充质干细胞的定位和体外初步分离培养

仵敏娟¹, 刘善荣¹, 刘厚奇^{*}, 惠宁², 杨玲¹, 王凤玫¹, 汤淑萍¹

(1. 第二军医大学基础医学部组织胚胎学教研室, 上海 200433; 2. 长海医院妇产科, 上海 200433)

[摘要] **目的:** 从早期人胚分离培养人早期胚胎间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC), 并初步鉴定其生物学特性。**方法:** 取 4~6 周胚龄的人胚, 用免疫组织化学法, 结合特定抗体 SH-2, 对 MSC 在人胚中的分布进行定位, 分离组织进行培养。免疫组化和流式细胞术检测 MSC 的相对特异性抗原 SH-2、CD44、OCT-4、S-100、CD34、 α -smooth-actin 在分离培养细胞中的表达。**结果:** 在胚胎的四肢、躯体部紧邻神经管的下方(不包括原肠等内脏部位)有大量的 MSC 分布。分离培养可得到成纤维状的 MSC, 贴壁生长, 有生长优势, 可多次传代并保持 MSC 生物学特性不变。**结论:** 通过机械分离和胰酶消化的方法, 可从早期人胚得到 MSC。利用 MSC 的贴壁生长特性及生长优势, 经 4~5 次传代后可得到纯度很高的 MSC。

[关键词] 间充质干细胞; 胚胎; 细胞分离; 细胞培养**[中图分类号]** Q 2-33; Q 813.11**[文献标识码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2004)08-0818-04*In vitro* isolation and cultivation of human fetal mesenchymal stem cells

WU Min-Juan¹, LIU Shan-Rong¹, LIU Hou-Qi^{*}, HUI Ning², YANG Ling¹, WANG Feng-Mei¹, TANG Shu-Ping¹ (1. Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Gynecology and Obstetrics, Changhai Hospital, Shanghai 200433)

[ABSTRACT] **Objective:** To isolate and cultivate human fetal mesenchymal stem cells (MSCs) and to study their biological characteristics. **Methods:** Human MSCs distribution were detected by histological staining with specific antibody SH-2 at different stages of human embryo from 4 to 6 weeks, then the tissues were isolated and cultured *in vitro*. The expressions of SH-2, CD44, OCT-4, S-100, CD34, and α -smooth-actin in the cultured cells were detected by immunocytochemistry and flow cytometry (FCM). **Results:** MSCs mainly located in the limb bud and under the neuraxis (not include primitive gut or hepatic bud). The fibroblast-like cells were isolated and cultured, which had the ability to proliferate and adhere. The MSCs were passaged many times without significant biological changes. **Conclusion:** Human fetal MSCs can be obtained from human early fetus by mechanical isolations and trypsinizations. After passaged for 4-5 times the MSCs are very pure.

[KEY WORDS] mesenchymal stem cells; embryo; cell separation; cell culture

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(8): 818-821]

间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)最早由 Fridenshtein 鉴定^[1], 他将骨髓基质细胞在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养, 一些贴壁的成纤维状的细胞克隆可以分化为骨、软骨等^[2], 传 20~30 代之后仍然保持其分化多能性。目前研究较多的仍然是从骨髓分离得到的 MSC^[3]。这是一个较为传统和经典的获得 MSC 方法。随着研究深入, MSC 的来源也越来越多, 如成人体的滑膜、胎儿的肝脏、脾脏和骨髓血液及脐带内皮下外周脐带血中等均有 MSC 分布^[4~6]。从人早期胚胎中分离 MSC 的研究较少, 有报道^[7]将胚胎来源的 MSC 和成体来源的 MSC 相比较, 前者的生物活性、分化能力和增殖能力都明显强于后者。MSC 易于培养, 并且具有分化多向性, 近年来的科学研究证实某些种类的 MSC 具有分化全能性^[8]。本实验拟从早期人胚分离培养人早期胚胎 MSC, 并初步鉴定其生物学特性。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂 4~6 周人胚, 取自长海医院妇产科门诊(均源自 RU486 终止妊娠的自愿者, 且经本人同意, 填写知情同意书, 并报医院伦理委员会批准)。抗体和主要试剂: 即用型第 2 代免疫组化 En-Vision plus 广谱试剂盒(福州迈新生物技术开发公司)。SH-2、S-100、 α -smooth-actin (DAKO); CD44 和 CD34(北京中山生物科技有限公司); OCT-4(自制); DMEM 培养基(GibcoTM); 胎牛血清(GibcoTM); DAB 显色剂(博士德生物工程有限公司); NBT/BCIP(上海华舜生物工程有限公司); 羊抗兔 IgG-HRP、羊抗鼠 IgG-HRP(华美生物工程公

[基金项目] 国家自然科学基金(90208026)。**[作者简介]** 仵敏娟(1979-), 女(汉族), 硕士生。

*Corresponding author. E-mail: houqiliu@hotmail.com

司)。

1.2 人胚 MSC 的定位 在解剖显微镜下分离胚胎,磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)清洗数次后用多聚甲醛固定,30%蔗糖脱水,组织包埋剂(OCT)包埋。冰冻切片机切片。用特异性抗体 SH-2 对 MSC 在胚胎中的分布进行定位。步骤如下:丙酮固定 10 min,彻底晾干。3% H_2O_2 甲醇封闭 15 min。加入兔抗人 SH-2 一抗(1:200),4℃过夜。PBS 洗,加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(1:100),4℃过夜。DAB 显色。

1.3 人早胚 MSC 的分离培养 将分离的组织转移到无菌容器里,机械剪碎,0.25%的胰酶消化,37℃,1 min 左右。加入 10%胎牛血清的 DMEM,37℃、5% CO_2 培养。次日换液,以后每隔 3 d 换液 1 次,待细胞铺满平皿传代。

1.4 免疫组化检测抗原 传代过程中制备细胞爬片,将细胞种在涂有明胶的血盖片上,做碱性磷酸酶显色。方法如下:将爬片取出,PBS 洗净培养基,2%多聚甲醛固定,PBS 洗 2×5 min,Tris 缓冲生理盐水 TSM1 洗 2×5 min,Tris 缓冲生理盐水 TSM2 洗 2×5 min,NBT/BCIP 显色,镜下观察,照像。对爬片做 SH-2 及 OCT-4、S-100、 α -smooth-actin、CD44、CD34 等抗原体的免疫组化检测。方法如下:将爬片取出,PBS 洗净培养基,2%多聚甲醛固定,PBS 洗 3×5 min,3% H_2O_2 /甲醇封闭,PBS 洗 3×5 min,加一抗,PBS 洗 3×5 min,加二抗,PBS 洗 3×5 min,显色,镜下观察,照像。

1.5 流式细胞术检测抗原 选择第 7 代的细胞制备 300 μ l 的单细胞悬液。按 10 μ l 抗体/50 μ l 细胞悬液的比例加抗体。然后 37℃ 孵育 30 min。PBS 洗,用流式细胞仪检测。

2 结果

2.1 MSC 的定位 在胚胎的肢芽、神经管的下方有较强的阳性信号。这些阳性的细胞为棕黄色,散在分布,细胞形状不规则,有圆形也有梭形,形状不一,但阳性的细胞一般没有很长的突起。并且在胚胎的最外层,即胎儿的皮肤也有很强的阳性信号(图 1)。

2.2 分离培养的情况 原代培养时,一般 12 h 内完成贴壁,24 h 后换液,细胞形态不一,以成纤维状细胞较多。将大约 5 周胎龄和 3 周胎龄的胚分别进行培养。原代培养时细胞生长速度都较快。但和 5 周胎龄的原代培养相比,用 3 周胎龄的胚进行原代培养时,贴壁的细胞中不规则的细胞较多,需要进行多次细胞传代才能得到纯度较高的 MSC。

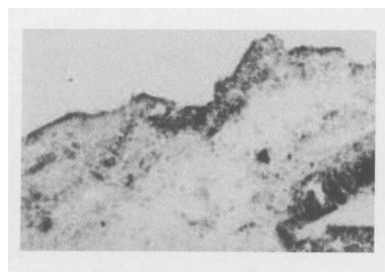


图 1 MSC 在早期胚胎中的定位

Fig 1 MSC distribution in early embryo($\times 100$)

经过换液及传代后,细胞纯度逐渐提高,成纤维状为培养细胞的主要形态。约 4~5 代后,细胞的纯度,单纯从形态上看,将近 100%。流式细胞术检测细胞凋亡情况,结果只有 0.06% 的细胞在处在细胞凋亡期。绘制第 9 代细胞的生长曲线,接种量为 10^4 ,第 3 天细胞的密度就可达到 10^5 /ml,生长速度较快。绘制第 30 代细胞的生长曲线,与 8 代时相比,发现细胞的生长速度和倍增时间变化不大。细胞出现对数生长的时间较早。

2.3 细胞免疫组化检测抗原的情况 培养细胞 SH-2、S-100、OCT-4、 α -smooth-actin、CD44 均为阳性,结果如图 2,而造血细胞谱系的特异性抗体 CD34 为阴性。在细胞中,阳性信号分布的地方不同。在原代培养的细胞中有碱性磷酸酶信号。且在原代培养时可见类似胚胎生殖嵴干细胞样生长的细胞克隆,有时,会观察到一团有规律跳动的细胞。

2.4 流式细胞术检测的情况 对培养得到的细胞,流式细胞仪检测 CD29、CD44、CD90 均为阳性,阳性率依次为 99.87%、99.45%、99.08%。造血谱系的特异性抗原 CD34、CD45 的阳性率分别为 0.65%、0.77%,均在 1% 以下。

3 讨论

MSC 的分离有各种方法,大部分利用其贴壁生长特性。另一种比较普遍的方法是利用 MSC 的细胞大小和细胞的质量及形态,采用 Percoll 密度梯度离心的方法^[5]。本实验利用的是 MSC 的贴壁生长特性。不同来源的 MSC 都表达某些相对特异的抗原:SH-2、SH-3、SH-4、S-100、 α -smooth-actin、OCT-4^[8]、CD44^[9,10]、STRO-1^[11,12]等。不表达造血谱系细胞的特异性抗原也是一个很重要的鉴定指标。

本实验从早期人胚分离培养的 MSC,传 32 代后(截止到 2004 年 3 月 17 日),细胞形态均为规则的成纤维状,且继续表达 SH-2、S-100、OCT-4、 α -smooth-actin、CD44 等抗体。取第 16 代细胞做流式细胞术检测,结果细胞表达 CD44、CD29、CD90 的阳

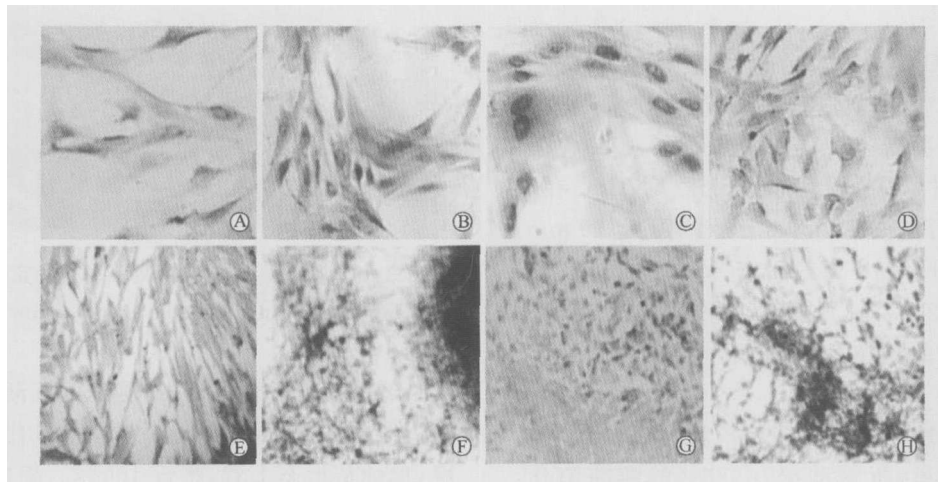


图2 细胞免疫组化检测结果

Fig 2 Cultured cells detected by immunochemistry

A;SH-2($\times 400$); B; α -smooth-actin($\times 400$); C;OCT-4($\times 400$); D;S-100($\times 400$); E;CD44($\times 200$);
F;Embryonic germ cell clone in prime culture($\times 200$); G;Alkaline phosphatase positive cells
and alkaline phosphatase negative cells($\times 200$); H;All sorts of cells in primary culture cells($\times 200$)

性率均在99%以上。而造血谱系特异的抗原CD34和CD45的阳性率在1%以下。这表明本实验分离培养的培养细胞可持久表达MSC的特异性抗原。

和其他来源的MSC相比,从人胚中分离培养的MSC有如下特点:(1)细胞来源于人的早胚,活性很强,生长速度快。有文献报道^[7]10代后,从骨髓来源的MSC有老化现象。本实验分离得到的细胞,其生长速度、细胞状态均较好。(2)细胞表达OCT-4,并有部分细胞表达碱性磷酸酶。OCT-4和碱性磷酸酶是细胞是否具有分化全能性的标志。曾有文献报道^[10]MSC表达OCT-4,并有分化全能性,但OCT-4的表达量是ES细胞的1%。目前,关于MSC分化多能性较多。OCT-4和碱性磷酸酶的表达量随细胞代数增加而产生的变化需要进一步实验来确定。(3)如果我们做原代培养时胚胎龄较小,那么,原代培养时出现的其他形状的细胞(非成纤维状)较多。碱性磷酸酶显色强度大,且所培养细胞碱性磷酸酶染色阳性保持的代数多。结合在实验中的观察,初步得到这样一个结论:胚胎龄较小者分离培养得到的MSC,其生命力略强于胎龄较大胚来源的MSC。胚的活性对原代培养也有影响。胚亦不能过小,在原代培养时胎龄小者难度大。胎龄大小不同所得到的MSC是否有分化特性的区别尚需进一步的实验验证。胎龄不同,MSC所处的分化阶段也不同,由此推测不同胎龄来源的MSC其分化潜能应该是不同的。(4)分离培养的细胞的来源不同,证据之一是同一爬片上部分细胞表达碱性磷酸酶,而其相邻

的细胞却不表达碱性磷酸酶。阳性部位的MSC可能是类似生殖嵴干细胞的克隆分化来。这两类MSC的分化特性及其他的生物学特性是否相同还不清楚。这也可以作为MSC来源较多的证据之一。

原代培养时,细胞存活的数量和质量与胚胎的活性、消化时间及消化程度有很大关系,与原代培养时细胞的密度也有很大关系。原代培养时胚的活性和细胞的状态、浓度影响原代培养时细胞存活下来的数量及细胞的生命力,原代培养时细胞太少则会产生孤独效应,可能会死亡。一定的细胞数量可以维持细胞的群体效应,细胞之间的信息可以相互交换,而这种信息的交换对细胞的生长可能是有促进作用。消化的时间不宜超过3 min,最好是细胞3个或5个成一个小群体,而不是完全的单个细胞。

[参考文献]

- [1] Fridenshtein Al. Stomal'nye kletki kostnogo mozgai krovetvornoe mikrookruzhenie. [Stromal bone marrow cells and the hematopoietic microenvironment][J]. *Arkh Patol*, 1982,44(10):3-11.
- [2] Friedenstien AJ,Chailakhyan RK,Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells; *in vitro* cultivation and transplantation in diffusion chambers[J]. *Cell Tissue Kinet*, 1987,20(3): 263-272.
- [3] 路艳蒙,傅文玉,朴英杰. 人骨髓间充质干细胞的培养及性质鉴定[J]. 第一军医大学学报,2001,21(8):571-573. Lu YM,Fu WY,Piao YJ. Culture and identification of human mesenchymal stem cells [J]. *Di Yi Jun Yi Daxue Xuebao (J First Mil Med Univ)*, 2001,21(8):571-573.
- [4] Romanov YA,Svintsitskaya VA,Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem

- cells; candidate MSC-like cells from umbilical cord[J]. *Stem Cells*, 2003, 21(1):105-110.
- [5] 郭希民,王常勇,王永红,等.人骨髓间充质干细胞分离培养及向软骨细胞定向分化的实验研究[J]. *中华口腔医学杂志*, 2003, 38(1):63-66.
Guo XM, Wang CY, Wan YH, et al. Experimental study of the isolation, culture and in chondrogenic differentiation of human bone mesenchymal stem cell[J]. *Zhonghua Kouqiang Yixue Zazhi(Chin J Stomatol)*, 2003, 38(1):63-66.
- [6] Campagnoli C, Roberts IAG, Kumar S, et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow[J]. *Blood*, 2001, 98(8):2396-2402.
- [7] 呼莹,马丽,马冠杰,等.成人和胎儿骨髓间充质干细胞的比较研究[J]. *中华血液学杂志*, 2002, 23(12):645-648.
Hu Y, Ma L, Ma GJ, et al. Comparative study of human fetal and adult bone marrow derived mesenchymal stem cells[J]. *Zhonghua Xueyexue Zazhi(Chin J Hematol)*, 2002, 23(12):645-648.
- [8] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. *Nature*, 2002, 418(6893):41-49.
- [9] Reyes M, Lund T, Lenvik T, et al. Purification and *ex vivo* expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells[J]. *Blood*, 2001, 98(9):2615-2625.
- [10] Hu Y, Liao L, Wang Q, et al. Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas[J]. *J Lab Clin Med*, 2003, 141(5):342-349.
- [11] Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells[J]. *J Cell Physiol*, 1999, 181(1):67-73.
- [12] 李胜富,卢晓风,孙明茵,等.体外培养版纳微型猪近交系骨髓基质干细胞的生物学特性[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2002, 16(5):354-358.
Li SF, Lu XF, Sun MH, et al. Biological characteristics of mesenchymal stem cells *in vitro* derived from bone marrow of banna minipig inbred line [J]. *Zhongguo Xiufu Chongjian Waike Zazhi(Chin J Rep Reconstr Surg)*, 2002, 16(5):354-358.
- [收稿日期] 2003-11-24 [修回日期] 2004-04-29
[本文编辑] 尹茶

(上接第817页)

超定位,引导取石器械到达结石部位准确取石。左肝胆管结石伴胆管扩张者行左半肝切除或左外叶切除。右肝Ⅲ级胆道以上结石或伴局部胆管狭窄不能器械取石者,在B超引导下局部切除肝组织。本组26例均行胆总管切开取石,7例外加左肝叶(或部分)切除,3例外加右肝叶部分切除。其中5例(包括3例胆道手术史者)行肝门部胆管成形+胆肠 Roux-en-Y 吻合术。所有患者均放置18号以上T管。术后1个月行T管造影,计算残石率。术后3个月常规行纤维胆道镜胆道取石清洗,拔出T管,经窦道置入纤维胆道镜,探查结石分布和胆汁附壁情况。生理盐水冲洗各分支胆管,清除附壁胆汁。对嵌顿结石,行液电碎石,网篮取石,再次计算残石率,术后重新置入T管。1周后无异常情况再行T管造影,无结石后拔除T管。

2 结果

(1)26例IOUS检查有21例与术前影像学结果(B超、MRCP和ERCP)一致,符合率80.7%。与术前诊断不符的5例中,3例术中发现尾状叶胆管结石,1例右前叶支结石,1例左内叶结石。(2)术后T管造影示4例残余结石,数量1~2枚,直径0.3~0.8cm,均分布于右叶Ⅱ级胆管以上区域。(3)术后3个月胆道镜检查:残余结石5例,占19.2%(5/26),较T管造影增加1例,为尾叶胆管结石。有11例见胆泥膜附着胆管壁,占42.3%(11/26),7例取出胆泥膜后见膜内微小结石,直径<1mm。胆道镜发现胆管壁粗糙、破损16例,占61.4%(16/26)。术后平均随访28个月,发现2例残余结石,残石率7.7%。1例为有胆道手术史者,术后29个月B超发现右叶胆管结石,0.8cm;另1例术后32个月B超见右前叶胆管结石,0.5cm。因单发结石<1cm,且无症状暂未治疗。

3 讨论

3.1 术中B超对肝胆管结石的治疗价值 肝内胆管结石术

后残留结石是传统外科的难题之一,文献报道^[1]残石率一般在30.36%。本组术后残石5例,占19.2%。有报道^[1]术中胆道镜取石后,残石率17.4%,与本组结果接近。准确定位并彻底清除结石,是手术成功的关键之一。IOUS可显示2mm小结石,准确率98.7%^[2]。IOUS被认为比术中胆道造影更准确、方便。IOUS一方面提高了结石分辨率,另一方面在B超引导下,通过适当手法配合,动态观察取石器械与结石部位的关系,可以达到Ⅲ级以上胆管,常常是普通胆道镜无法达到的位置。肝门部胆管结石与尾状叶胆管结石影重重叠,术前常不能发现,术中忽略了结石。本组3例术前未诊断尾状叶结石,而由IOUS发现,占术前漏诊的3/5。我们建议,取净肝门部结石后再次B超探查尾叶是否有结石存在。肝叶切除患者,IOUS可以确定肝叶切除的界线,避免大血管损伤。

3.2 术后胆道镜对肝胆管结石的治疗价值 胆道镜具有直观并可配合器械操作的优点^[3]。术后胆道的再次清理是本研究的一个重要环节。T管造影无残留结石患者中,1例术后胆道镜发现小结石,占1/5。胆管结石是由胆汁代谢异常、细菌感染和胆道损伤等多种因素造成。实践中观察到,16例患者胆道镜发现胆管损伤,占61.4%。7例发现胆管壁胆泥膜附着,占26.9%。术后胆道镜再次清洗胆道,进一步清除胆泥膜和细菌附着,帮助胆道黏膜修复。本组术后平均随访28个月,2例发现结石,残石率为7.7%,低于文献报道水平。

【参考文献】

- [1] 黄志强.我国肝内胆管结石外科治疗的现状:全国4197例手术病例的分析[J]. *中华外科杂志*, 1988, 26(9):513-522.
- [2] 胡宗泽,张清泉,贾淑娴,等.术中B型超声检查在胆石手术中的应用[J]. *中华物理医学杂志*, 1990, 12(3):138-141.
- [3] 鲍恩武,马庆久,鲁建国,等.经胆道镜激光碎石治疗肝内胆管难取性结石[J]. *中国内镜杂志*, 2003, 9(3):28-29.

[收稿日期] 2003-11-26 [修回日期] 2004-03-04
[本文编辑] 曹静