

免疫磁珠法分选人骨髓多能成体祖细胞及初步鉴定

慕 宁¹,汪 艳²,谢金敏²,朱应乾²,高 毅^{2*}

(1. 第二军医大学长征医院器官移植研究所,上海 200003;2. 南方医科大学珠江医院普通外科,广州 510282)

[摘要] 目的:应用免疫磁珠法分选人骨髓多能成体祖细胞,观察其分选效果,建立体外分选纯化及培养人骨髓来源多能成体祖细胞(hMAPCs)的方法。方法:取健康成人志愿者适量骨髓后采用梯度密度离心法分离获取单个核细胞,在自制培养基下贴壁培养后,将获取的骨髓贴壁细胞通过CD45、血糖蛋白A(GlyA)免疫微磁珠(miniMACS)负分选,锥虫蓝拒染实验计数MACS分选前后细胞活力。流式细胞仪鉴定分选后细胞纯度;流式细胞仪分析培养细胞CD29、CD44、CD34和HLA-DR表达情况。结果:通过MACS分选,平均每1×10⁶/ml骨髓贴壁细胞可分选出约(5~10)×10⁴/ml hMAPCs,分选后的hMAPCs细胞生长良好,最长传代到第20代。分选前后细胞活力分别为(96.7±1.7)%和(96.0±2.4)%,无明显差异;流式细胞仪分析获取的CD45⁻、GlyA⁻细胞纯度大于98%;流式细胞仪检测hMAPCs中CD29阳性表达细胞比率为99.2%,CD44阳性细胞比率为98.3%,CD34阳性细胞比率为1.2%,HLA-DR阳性细胞比率为5.3%。结论:CD45、GlyA免疫微磁珠负分选可从骨髓中分离高纯度的hMAPCs;分选后hMAPCs在自行研制的培养基中有较强的增殖能力。

[关键词] 骨髓祖代细胞;多能成体祖细胞;免疫磁化分离;细胞培养技术

[中图分类号] R 318.12 [文献标识码] A [文章编号] 0258-879X(2006)10-1048-04

In vitro purification and culture of multipotent adult progenitor cells from human bone marrow by magnetic activated cell sorting

MU Ning¹, WANG Yan², XIE Jin-min², ZHU Ying-qian², GAO Yi^{2*} (1. Organ Transplantation Institute of PLA, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of General Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China)

[ABSTRACT] Objective: To establish a method for isolation, purification, and culture of human multipotent adult progenitor cells (MAPCs) *in vitro*, so as to lay a foundation for the application of hMAPCs in tissue-engineering research and clinical medicine. Methods: The mononuclear cells were obtained from bone marrow of healthy volunteers by gradient centrifugation and were subjected to adherence culture. The adherent cells were then subjected to magnetic activated cell sorting (MACS) (depletion selection with CD45 and GlyA microbeads). Then the purity of selected cells was identified by flow cytometer. The growth of the purified cells was observed and the expression of CD29, CD44, CD34, and HLA-DR was analyzed by flow cytometers. Results: (1) Averagely (5-10) ×10⁴/ml hMAPCs could be separated from 1 ×10⁶/ml bone marrow mononuclear cells by MACS. The cell viability was similar before ([96.7 ±1.7]%) and after ([96.0 ±2.4]%) isolation. (2) The isolated MAPCs grew well in the self-designed culture medium and could be passaged for 20 generation. (3) The purity of the CD45⁻ and GlyA⁻ cells separated from bone marrow adherent cells was more than 98% as determined by flow cytometer. (4) In hMAPCs, the positive rate was 99.2% for CD29, 98.3% for CD44, 1.2% for CD34, and 5.3% for HLA-DR. Conclusion: (1) The bone marrow-derived hMAPCs can be purified by MACS through depletion selection of CD45 and GlyA microbeads. (2) The hMAPCs can be expanded *in vitro* in self-designed medium, maintaining a non-differentiation state for a long time.

[KEY WORDS] myeloid progenitor cells; multipotent adult progenitor cells; immunomagnetic separation; cell culture technique

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(10): 1048-1051]

骨髓干细胞具有多向分化潜能^[1],特别是具有向肝脏干细胞、肝细胞及血管内皮细胞分化的潜能。由于其取材方便,可以来自患者自身,无排斥反应,具有重要的临床应用价值,因此成为当前肝组织工程学中的一大热点。Reyes等^[2]从骨髓中分离出多能成体祖细胞(multipotent adult progenitor cells from bone marrow,MAPCs),发现其具有很强的可塑性。本实验应用免疫磁珠分离(magnetic activa-

ted cell sorting,MACS)方法分选人骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)亚群hMAPCs,在自制细胞培养基中进行培养,应用流式

[基金项目] 广东省“十五”重点科技攻关专项基金(2002A3020206)。Supported by the Major Programs of Guangdong Tenth Five Year Key Technologies R & D Foundation (2002A3020206)。

[作者简介] 慕 宁,博士生。E-mail: mnwsq@163.com

* Corresponding author. E-mail: gaoyi6146@163.com

细胞仪观察分选效果和培养情况,为寻找杂交型生物人工肝(hybrid bioartificial liver, HBAL)及肝细胞移植新的种子细胞奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂 骨髓取自健康成年志愿者, miniMACS (CD45 cell isolation kit、Glycophorin A cell isolation kit、Anti FITC Microbeads)、MACS 阴性选择柱 AS 购自德国 Miltenyi Biotec 公司,胰蛋白酶、乙二胺四乙酸钙钠盐(EDTA)购自 Gibco 公司,细胞分离液(CSM)、低糖 DMEM、MCDB-201、胰岛素、转铁蛋白、牛血清白蛋白、地塞米松、硒酸钠、抗坏血酸 2-磷酸盐、L-谷氨酰胺、亚油酸均购自美国 Sigma 公司,多聚甲醛、氯仿、乙醇、异丙醇购自广州化学试剂厂,胎牛血清(杭州四季青)、表皮生长因子(rhEGF)、血小板生长因子(rhPDGF-BB)、白血病抑制因子(rhLIF)购自 Sigma 公司,Goat-Anti-Mouse IgG FITC、Goat-Anti-Mouse IgG PE 购自 KPL(晶美分装),鼠抗人 CD29-FITC、鼠抗人 CD44-FITC、鼠抗人 CD34-FITC、鼠抗人 HLA-DR-FITC 购自 Sigma 公司,Beckman Epc5-XL 流式细胞仪(美国)。

1.2 方法

1.2.1 人骨髓基质细胞的获取和培养 采集临床健康志愿者骨髓内骨髓,按临床常规骨髓穿刺操作取得红骨髓 5~20 ml。所获骨髓加 PBS 液摇匀,细胞悬液按 2:1 比例加入到淋巴分离液中一次密度梯度离心。所获单个核细胞以 1×10^6 /ml 加入自行配制的 hMAPCs 培养基中,接种于 75 ml 培养瓶内。贴壁细胞即为骨髓基质细胞^[3]。自制 hMAPCs 培养基组成(1 000 ml):低糖 DMEM 600 ml;MCDB-201 400 ml;胰岛素 5 mg;转铁蛋白 100 mg;牛血清白蛋白 1 g;地塞米松 0.039 25 mg;硒酸钠 0.05 mg;抗坏血酸 2-磷酸盐 25.62 mg;亚油酸 4.7 mg;谷氨酰胺 3.9 mg;rhEGF、rhPDGF-BB、rhLIF 各按 10 ng/ml、FCS 按 5% 浓度加入。

1.2.2 MACS 分选骨髓多能成体祖细胞 原代培养 1 周后将骨髓基质细胞用 0.25% 胰酶消化,用标准 Buffer 重悬为单细胞悬液,将密度调整到 1×10^6 /ml。按 Reyes 等^[2]方法,分别用 CD45、Glycophorin A (GlyA) 微型免疫磁珠,进行两次阴性选择得 CD45⁻、GlyA⁻ 细胞。调整细胞密度为 $(1 \sim 5) \times 10^4$ /ml,连续培养。在分选前后不同时期进行形态学观察。锥虫蓝拒染实验计数 MACS 分选前后细胞活力。

1.2.3 流式细胞仪检测 hMAPCs 细胞纯度及其表

面分子标志表达 吸取上述部分样品,参照文献^[2]检测分选细胞纯度;于传至第 4、8、12 代分别以流式细胞仪检测其 CD45、GlyA 阴性细胞的纯度,以评价传代 hMAPCs 的免疫学稳定性;检测分选后 hMAPCs 表面 CD29、CD44、CD34 和 HLA-DR 表达。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 10.0 统计软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,显著性检验采用 *t* 检验,显著性水平为 0.05。

2 结果

2.1 相差显微镜下观察不同时期细胞生长情况 初接种的骨髓单个核细胞呈圆球状分散悬浮于培养液中,有少量造血细胞,48 h 后换液去除非黏附细胞,留下来的细胞大多贴壁成梭型生长。培养 1 周左右时,梭型细胞基本铺满瓶底(图 1A)。分别计数 MACS 分选前后细胞数,平均每 1×10^6 /ml 贴壁细胞可分选出约 $(5 \sim 10) \times 10^4$ /ml 数量级的 hMAPCs。经 MACS 分选出的 hMAPCs,培养 24 h 内,即可见贴壁细胞,数目不断增加,48 h 后细胞基本贴壁,更换培养基,细胞形态和骨髓基质细胞接近,贴壁生长,呈长梭型,但细胞纯度高,几乎无其他类型细胞(图 1B),约 5 d 后有细胞克隆团形成。平均 9~14 d 传代 1 次,体外扩增 5 代细胞数大约能达到 1×10^8 。本研究传至 20 代,镜下观察传代的、未行诱导分化的 hMAPCs 细胞形态稳定,未出现异常分化现象(图 1C)。

2.2 分选前后细胞活力的测定 MACS 分选前后,锥虫蓝拒染试验计数 MACS 细胞活力,细胞存活率(%)分别为 96.7 ± 1.7 、 96.0 ± 2.4 ,无显著差异,证明 MACS 分选技术对细胞活力无损伤。

2.3 流式细胞仪检测分选后 CD45⁻、GlyA⁻ 细胞纯度 流式细胞仪检测经 MACS 分选获取的 CD45⁻、GlyA⁻ 细胞纯度大于 98%。传代第 4、8、12 代细胞经流式细胞仪检测,CD45⁻、GlyA⁻ 细胞比率仍大于 98%。

2.4 流式细胞仪检测分选后 CD29、CD44、CD34 和 HLA-DR 表达情况 流式细胞仪检测传代 MAPCs 中 CD29 阳性表达细胞比率为 99.2%,CD44 阳性细胞比率为 98.3%,CD34 阳性细胞比率为 1.2%,HLA-DR 阳性细胞比率为 5.3%(图 2)。

3 讨论

自从 Petersen 等^[4]首次证明骨髓来源的细胞可分化为肝细胞以来,从骨髓源中寻找具有向肝细胞方向分化能力细胞的研究成为近年来的研究热点。

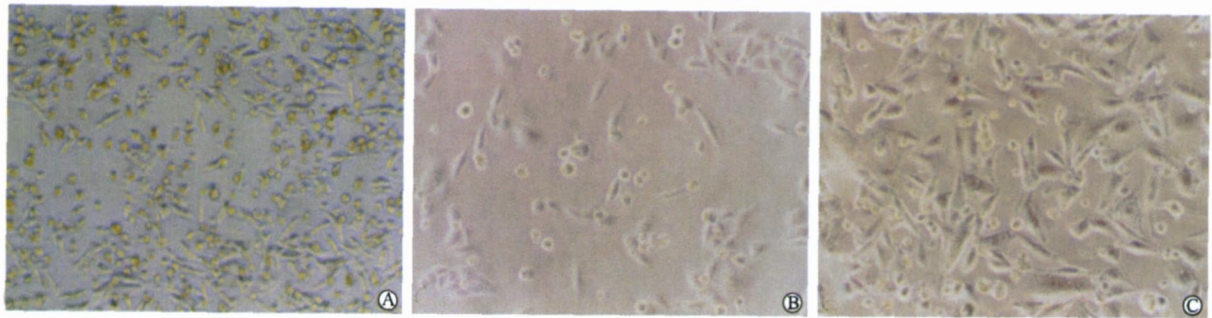


图1 分选前后细胞形态学观察

Fig 1 Morphology of cells before and after separation(×100)

A :Morphology of marrow stromal cells before hMAPCs separation (7 d of primary culture);B :Morphology of hMAPCs(3 d of primary culture) ; C:Morphology of hMAPCs (12th passage)

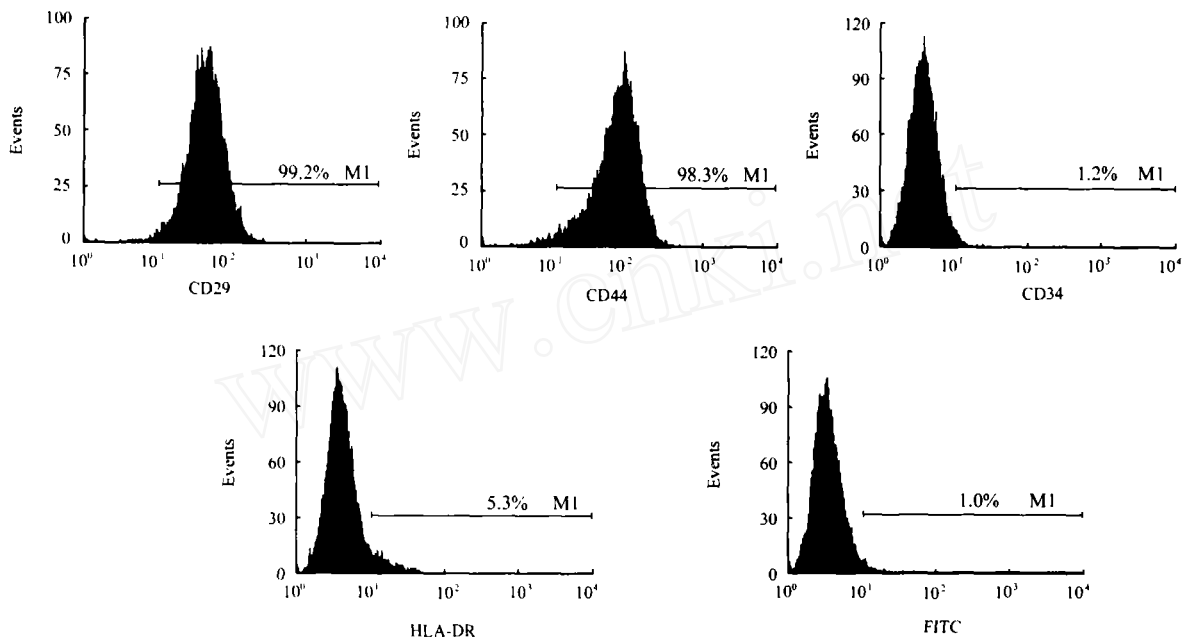


图2 分选后 hMAPCs CD29、CD44、CD34 和 HLA-DR 表达情况检测

Fig 2 Expression of CD29,CD44,CD34,and HLA-DR after isolation in hMAPCs

Fridenstein 等^[5]发现了在骨髓中存在能贴附塑料培养皿,呈长梭形成纤维细胞样的细胞,由于其来自于骨髓基质,具有支持诱导造血干细胞分化的功能,所以被称 BMSCs。骨髓基质细胞具有快速黏附、克隆样增殖的特性。有研究^[2,6]从成年白齿类动物和人类骨髓中通过梯度离心及免疫磁珠筛选出的作为 MSCs 一个亚群的 hMAPCs (CD45⁻、GlyA⁻) 具有多向分化潜能,在一定诱导、培养条件下能分化为内皮组织细胞和内胚层组织细胞,如具有肝功能样肝细胞。由于 hMAPCs 具有供源丰富、易于获得、易于调控、有自体供源、避免免疫排斥等优点,具有成为肝组织工程学细胞来源的较好的条件。

传统的 MSCs 提纯方法多采用体外培养传代筛选,存在着提纯后细胞纯度不高、一次分选细胞量

少、耗时间长等缺点。有报道还可采用流式细胞仪、差速离心等方法分选,但对细胞活力有一定影响,而且所需设备昂贵,因此未能用于大量干细胞的制备。MACS 是利用包被了单克隆抗体的免疫磁性微粒与靶物质特异性结合,使结合后的磁珠细胞复合体具有磁顺应性,继而在外加磁场的作用下复合体被滞留在磁场中,从而与其他非磁性成分分离,达到富集纯化的目的^[7]。微小磁珠可直接将筛选所得的细胞用于下一步实验而不影响细胞的生物学特性。与传统技术相比,它具有省时、简便、分离纯度高、分离容量大等优点。

寻找合理的细胞表面标记是 MACS 成功分选的前提。由于 MSCs 不表达 CD34、CD45 及 GlyA 等造血、淋巴系细胞的表面标志^[8,9]。有研究^[2]通过

阴性筛选,用 MACS 剔除骨髓中 CD45、GlyA 阳性细胞(造血和淋巴系细胞),保留 CD45、GlyA 阴性细胞进行体外培养及扩增获得 hMAPCs,并证明该细胞和 MSCs 的特性是一致的,虽然没有明确说明 hMAPCs 就是 MSCs,但认为该细胞是 MSCs 的一个亚群细胞^[6]。因此,本研究选择 CD45、GlyA 作为表面标记物。

本研究在实验过程中对有关文献报道^[2]的方法略作改进:获取骨髓单个核细胞后,没有按常规直接进行 MACS 分选,而是先行贴壁培养,初步去除不贴壁造血系细胞,待贴壁细胞长满瓶底后,消化收集,再行 MACS 分选,即通过密度梯度离心-贴壁培养筛选-MACS 分选 3 个步骤成功筛选出具有 MSCs 特性的 hMAPCs。结果发现该方法较优:(1)本研究从每 1×10^6 /ml 贴壁细胞可分选出约 $(5 \sim 10) \times 10^4$ /ml 数量级的 hMAPCs;而直接用 MACS 分选,每 1×10^6 /ml 单个核细胞仅能分出约 $(1 \sim 5) \times 10^3$ /ml 数量级的 hMAPCs^[4],分选效率高于常规约一个数量级。(2)仅用密度梯度离心的物理方法分离收集的细胞,纯度低,而流式细胞仪结果显示,本研究分选的细胞纯度仍保持在 98% 以上,与文献^[2]报道的分选效果相当。有利于保持后续研究中进一步观察其细胞生物学特性的准确性和一致性。

李秀森等^[10]指出,MSC 具有独特的表征,即 CD29、CD44、CD166 阳性,CD34、CD45、人类白细胞抗原 HLA-DR 和 荆豆素 阴性。由于在骨髓贴壁细胞中最常见的除了 MSC 外,还有成纤维细胞及造血细胞,因此本实验选择了目前较为广泛认同的 MSC 具有代表性的阳性抗原 CD29、CD44,以及阴性抗原 CD34(造血干细胞阳性)^[11]、HLA-DR(抗原递呈细胞及成纤维细胞阳性)^[12]进行检测,结果流式细胞仪检测 CD29 阳性表达细胞比率为 99.2%,CD44 阳性细胞比率为 98.3%,CD34 阳性细胞比率仅为 1.2%,HLA-DR 阳性细胞比率为 5.3%。上述结果说明本研究分离纯化的 hMAPCs 具有间充质干细胞的特征,且纯度较高。结果中 HLA-DR 略高,可能是由于传代培养过程中小部分细胞分化为成纤维细胞所致。

虽然 hMAPCs 可长期增殖而保持不分化,但由于其在骨髓细胞中含量极微,仅占骨髓单个核细胞的 0.5% 左右^[2]。因此,在分选成功的基础上,如何培养、扩增也是一个难题。本研究通过参照相关文献^[13,14],自行研制了 hMAPCs 培养基,对 hMAPCs 进行培养。实验结果显示,hMAPCs 平均 9~14 d 传代 1 次,体外扩增 5 代细胞数大约能达到 1×10^8 ,

本研究传代周期为 20 代。在获得高纯度的 hMAPCs 及静止培养扩增成功的基础上,可以通过微载体实现 hMAPCs 体外的大量扩增^[15]。

hMAPCs 体外纯化和大量扩增,为研究其在诱导因素作用下向肝细胞的定向分化能力,进而为 HBAL 和肝细胞移植等肝细胞组织工程提供了充足的肝细胞源。但本实验仅仅是初步探讨,对 hMAPCs 在长期增殖过程中的细胞生物学及遗传稳定性的观察还需进一步的研究。

[参考文献]

- [1] Grompe M. The role of bone marrow stem cells in liver regeneration[J]. *Semin Liver Dis*, 2003, 23:363-372.
- [2] Reyes M, Lund T, Lenvik T, et al. Purification and *ex vivo* expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells[J]. *Blood*, 2001, 98:2615-2625.
- [3] 路艳蒙,傅文玉,朴英杰.人胚胎骨髓间充质干细胞的初步培养及鉴定[J]. *现代康复*, 2001, 5: 38-39.
- [4] Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells[J]. *Science*, 1999, 284: 1168-1170.
- [5] Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes[J]. *Int Rev Cytol*, 1976, 47:327-359.
- [6] Reyes M, Verfaillie CM. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2001, 938:231-233.
- [7] Phillips P. New surgical approaches to Parkinson disease[J]. *JAMA*, 1999, 282:1117-1118.
- [8] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*, 1999, 284: 143-147.
- [9] Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98:7841-7845.
- [10] 李秀森,郭子宽,杨靖清,等.骨髓间充质干细胞的生物学特性[J]. *解放军医学杂志*, 2000, 25:346-348.
- [11] Monga SP, Tang Y, Candotti F, et al. Expansion of hepatic and hematopoietic stem cells utilizing mouse embryonic liver explants[J]. *Cell Transplant*, 2001, 10: 81-89.
- [12] Fabregat I, Sanchez A, Alvarez AM, et al. Epidermal growth factor, but not hepatocyte growth factor, suppresses the apoptosis induced by transforming growth factor-beta in fetal hepatocytes in primary culture[J]. *FEBS Lett*, 1996, 384: 14-18.
- [13] Townsend SF, Briggs KK, Krebs NF, et al. Zinc supplementation selectively decreases fetal hepatocyte DNA synthesis and insulin-like growth factor gene expression in primary culture[J]. *Pediatr Res*, 1994, 35(4 Pt 1): 404-408.
- [14] De Juan C, Benito M, Alvarez A, et al. Differential proliferative response of cultured fetal and regenerating hepatocytes to growth factors and hormones[J]. *Exp Cell Res*, 1992, 202: 495-500.
- [15] 吴清法,吴祖泽,董波,等.微载体悬浮培养成人骨髓间充质干细胞[J]. *中国实验血液学杂志*, 2003, 11:15-21.

[收稿日期] 2006-04-19

[修回日期] 2006-10-08

[本文编辑] 贾泽军