

• 专题报道 •

脐血间充质干细胞体外培养方法的改良及其生物学特性研究

王 琪¹, 苟三怀^{1*}, 汤亭亭², 刘 岩¹, 欧阳跃平¹, 席焱海¹, 韩庆林¹

(1. 第二军医大学长征医院骨科, 上海 200003; 2. 上海交通大学医学院第九人民医院骨科, 上海 200011)

[摘要] **目的:** 对体外分离培养脐血间充质干细胞(UCB-MSCs)的传统方法进行改进, 以提高培养成功率, 同时观察其生物学特性。**方法:** 无菌条件下取 28 份足月产新生儿脐血, 以密度梯度离心法分离其中的单个核细胞, 以含 10% FBS 的 α -MEM 培养基进行体外培养。原代培养 5~7 d 后半量换液, 后每隔 3~4 d 全量换液 1 次。细胞贴壁之后按改良方法进行培养: 方法一, 当基底圆形巨核细胞融合、梭形纤维样细胞脱落时将细胞悬液移入新的皿中培养; 方法二, 待基底圆形巨核细胞渐渐占据优势时, 将培养基换为含 15% FBS 的 α -MEM, 当圆形巨核细胞大部脱落后换回含 10% FBS 的 α -MEM 培养基。显微镜下观察 UCB-MSCs 的形态, 流式细胞仪测定细胞免疫表型, 体外成骨及成脂诱导并进行细胞化学染色。**结果:** 28 份脐血中 20 份培养出贴壁细胞, 其中 13 份培养出能融合且可稳定传代的成纤维样细胞, 成功率为 46.4%, 可传至 22 代而无形态上的变化, 而且强烈表达 CD105、CD29 等 MSCs 表面标志, 而 CD34、CD45 和 CD106 等表达呈阴性。在特定条件下, UCB-MSCs 可分化为成骨细胞和脂肪细胞。**结论:** 脐血中存在 MSCs, 培养方法经改良后可提高 UCB-MSCs 的培养成功率。UCB-MSCs 具有与其他来源的 MSCs 类似的表型及分化潜能, 且易于体外扩增、传代稳定, 可望在骨组织工程学研究中有广阔的应用前景。

[关键词] 脐血; 间充质干细胞; 细胞, 培养的; 免疫表型分型

[中图分类号] Q 813.11

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-879X(2007)01-0027-05

Improvement of *in vitro* culture method for umbilical cord blood mesenchymal stem cells and study of biological characteristics of cultured cells

WANG Qi¹, GOU San-huai^{1*}, TANG Ting-ting², LIU Yan¹, OUYANG Yue-ping¹, XI Yan-hai¹, HAN Qing-lin¹ (1. Department of Orthopaedics, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Orthopaedics, the 9th People's Hospital of Shanghai, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200011)

[ABSTRACT] **Objective:** To improve the traditional *in vitro* culture method for umbilical cord blood mesenchymal stem cells (UCB-MSCs) in an effort to increase the successful culture rate and to study the biological characteristics of the cultured cells.

Methods: Full-term UCB samples were obtained with the mothers' consent and processed within 12 h of collection ($n=28$). Mononuclear cells (MNCs) were isolated from UCB by centrifugation at 2 500 r/min for 20 min and were suspended in presence of α -minimum essential medium(α -MEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS) and 100 U/ml penicillin. The medium was half changed after 5-7 days' primary culture and then was totally changed at a 3-4 days' interval. After the cells adhered to the culture wall, the following procedures were carried out according to our improved methods. In group I, the suspension containing detached mesenchymal-like cells were removed onto a new culture dish when osteoclast-like cells reached over 80% confluence. In group II, 15% calf serum instead of 10% FBS was used in the culture medium when osteoclast-like cells were growing confluence, and α -MEM medium containing 10% PBS was used again until most of the osteoclast-like cells were detached. The morphology of UCB-MSCs was observed under microscope and the phenotypes of them were examined by flow cytometry. The 5th passage cells were cultured with osteogenic medium and adipogenic medium separately and cytochemical staining was carried out subsequently. **Results:** Adhered cells were cultured from 20 of the 28 samples. UCB-MSCs were cultured from 13 of the 20 samples, which could grow to confluence and could be stably passaged to P22. The cultured UCB-MSCs were all positive for MSC-related antigens, such as CD29 and CD105, but negative for CD34, CD45, and CD106. We also found that the cultured UCB-MSCs could differentiate into osteoblasts and fat cells under specified conditions. **Conclusion:** MSCs do exist in UCB, and improvement of culture method can increase the yielding of UCB-MSCs. The cultured cells, with the similar phenotype and differentiation potential as those derived from other resources, can be amplified easily and passaged stably *in vitro*, making them promising seed cells for future bone tissue engineering.

[KEY WORDS] umbilical cord blood; mesenchymal stem cells; cells, cultured; immunophenotyping

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(1): 27-31]

近年来,骨组织工程学研究的发展为临床治疗因伤病所致的骨缺损提供了新思路。骨髓间充质干

[作者简介] 王 琪, 博士生. E-mail: wqi1979@yahoo.com.cn

* Corresponding author. E-mail: ven15@163.com

细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)由于具有良好的成骨潜能、且易于体外扩增等优点已广泛用作骨组织工程学的种子细胞。但是骨髓取材存在来源有限、属有创操作、有感染可能及干细胞随供体年龄增大有老化倾向等问题^[1],因此,有必要为骨组织工程学探索新的种子细胞。

脐血间充质干细胞(umbilical cord blood mesenchymal stem cells, UCB-MSCs)与骨髓 MSCs 一样具有多向细胞分化潜能,而且脐血的来源丰富,收集方法简单易行,对供体无损伤,微生物和肿瘤细胞污染的可能性小,所得干细胞较为原始,免疫原性低^[2],因此,将 UCB-MSCs 作为一种新的成骨细胞来源,用于骨组织工程学的研究具有广阔的前景。

然而,UCB-MSCs 培养成功率较低^[3-5],有的作者甚至认为脐血中不存在 MSCs^[6-8]。本研究试图在体外从脐血中分离培养 MSCs,并对培养方法进行改进,同进研究 UCB-MSCs 的生物学特性,为建立一种新的骨组织工程学种子细胞来源提供理论依据和实验基础。

1 材料和方法

1.1 脐血的采集和单个核细胞的制备 脐血标本 28 份,50~90 ml/份,枸橼酸抗凝,经产妇和家属同意取自足月健康顺产新生儿。脐血采集后 12 h 内,采用密度梯度离心法分离出其中的单个核细胞,以备实验用。

1.2 原代培养及培养方法的改良 上述制备的脐血单个核细胞,接种于 100 mm×20 mm 培养皿中,细胞密度为 1×10^7 /ml,培养体系为含 10% FBS (BioSource 公司)的 α -MEM 培养液(Gibco 公司)。置于饱和湿度、5% CO₂ 的 37℃ 孵育箱中培养,原代培养 5~7 d 后半量换液,每隔 3~4 d 全量换液 1 次。

细胞贴壁之后按处理方法不同分为两组:第一组当皿底圆形巨核细胞融合、梭形成纤维样细胞脱落时将细胞悬液移入新的皿中培养;第二组待皿底圆形巨核细胞渐渐占据优势时,将培养基换为含 15% FBS(Gibco 公司)的 α -MEM,当圆形巨核细胞大部脱落后换回含 10% FBS 的 α -MEM 培养基。

1.3 传代扩增 细胞融合至 80%~90%时,以 0.25% 的胰酶消化,按 1:2~1:3 传代培养。传至第 5 代后进行 UCB-MSCs 的生物学特性的检测。

1.4 UCB-MSCs 的生物学特性

1.4.1 细胞形态观察 将 UCB-MSCs 于培养皿中传代培养,每次传代后均进行显微镜下形态观察、照相。

1.4.2 细胞表型 收集培养第 5 代的 UCB-MSCs, PBS 洗涤,调整细胞密度到 1×10^6 /ml 左右,分别加入 15 μ l 抗体(CD45 PE、CD105 PE、CD106 PE、CD34 FITC、CD29 FITC、CD71 FITC,美国 BD 公司),4℃ 环境下孵育 30 min, PBS 洗涤,离心(2 000 r/min, $r=12.5$ cm, 5 min)后弃上清, PBS 重悬,抗体标记细胞以 FACS Calibur 流式细胞仪(BD 公司)分析,结果以 CellQuest 软件(BD 公司)进行处理。

1.5 UCB-MSCs 诱导分化

1.5.1 成骨诱导 选取第 5 代 UCB-MSCs,培养体系为含有 10% FBS 和 100 nmol/L 地塞米松、10 mmol/L β -甘油磷酸钠、50 μ mol/L 维生素 C(美国 Sigma 公司)的 α -MEM 培养基。每 3~4 d 换液 1 次。成骨诱导 1 周后,取标本进行碱性磷酸酶染色,镜下观察,照相。

1.5.2 成脂诱导 选取第 5 代 UCB-MSCs,培养体系为含有 10% FBS 和 0.5 mmol/L IBMX、1 μ mol/L 氢化可的松、0.1 mmol/L 吡啶美辛(美国 Sigma 公司)的 α -MEM 培养基。每 3~4 d 换液 1 次。成脂诱导 2 周后,取标本进行油红染色,镜下观察,照相。

2 结果

28 份脐血中有 20 份于原代培养 5~7 d 后出现贴壁细胞(第一组 6 份/10 份,第二组 14 份/18 份),其中 13 份培养出能融合且可稳定传代的成纤维样细胞(第一组 4 份,第二组 9 份),成功率为 46.4%,高于国内其他作者及多数国外作者报道的结果。另外 8 份原代培养时即未发现贴壁细胞,其中 1 份因离心机故障未成功取得单个核细胞层,1 例于采集脐血后 14.5 h 进行分离,其他 6 份可能与取单个核细胞时操作不当有关。

2.1 UCB-MSCs 形态 原代培养 5~7 d 后贴壁细胞呈两种形态(图 1A、1E):梭形成纤维样细胞和圆形巨核细胞,前者即 UCB-MSCs。2~3 周两种细胞即可长满(图 1B、1F)。改良第一组 6 份脐血中有 4 份于原代培养 4~5 周形成成纤维样细胞集落(图 1C、1G);改良第二组 14 份脐血中有 9 份于原代培养 5 周左右形成成纤维样细胞集落(图 1D、1H),形态与骨髓 MSCs 相似,呈较均一的长梭形,经传代至 22 代形态无明显变化(图 2)。

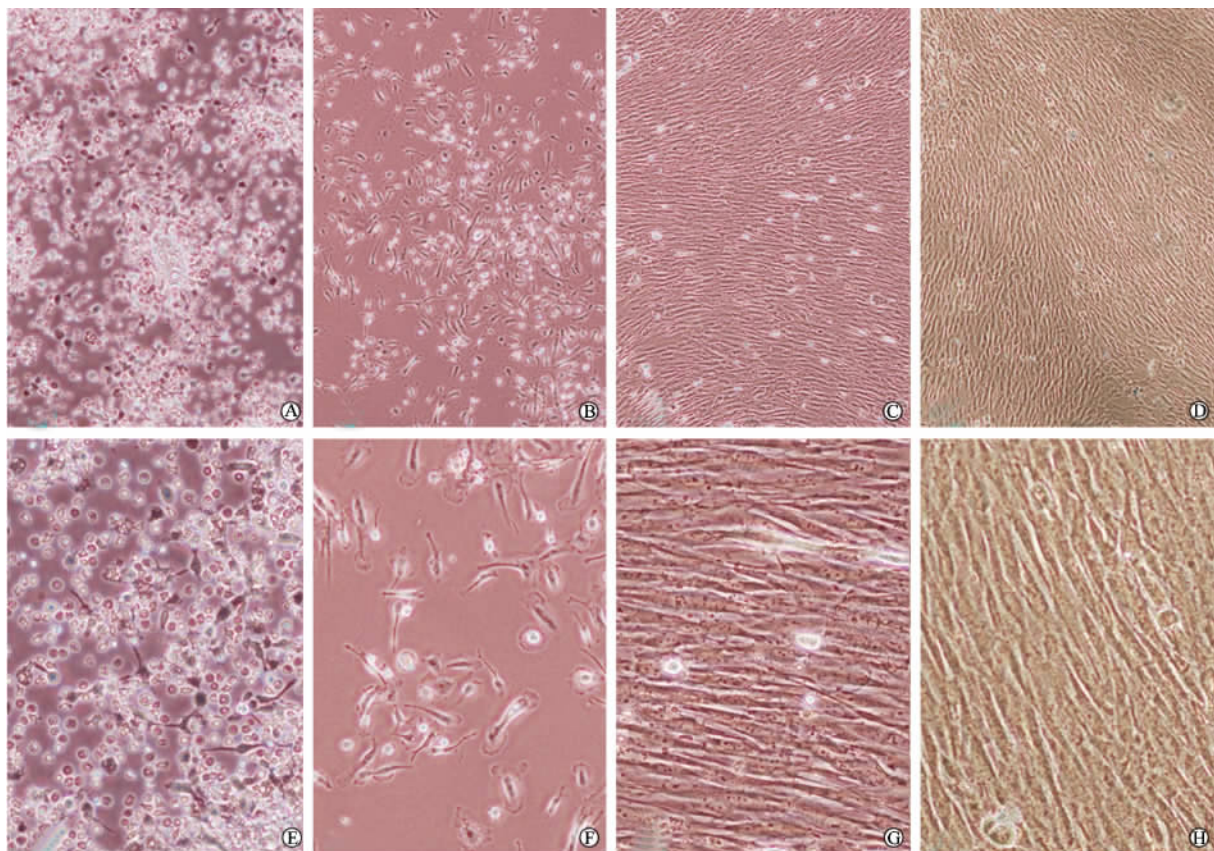


图 1 体外培养 UCB-MSCs 细胞的形态

Fig 1 Primary culture of UCB-MSCs

A,E:On the 5th day of primary culture, adherent cells appeared after half medium change, and there were still many nonadherent cells(A: ×100, E: ×200);B,F:On the 17th day of primary culture, there were 2 kinds of adherent cells, mesenchymal-like cells, and osteoclast-like cells(B: ×40, F: ×100);C,G:On the 30th day by modified method I there were scattered adherent cell colonies(spindle shape) in normal alignment(C: ×40,G: ×200); D,H:On the 27th day by modified method II there were scattered adherent cell colonies(spindle shape) in normal alignment(D: ×40,H: ×200)

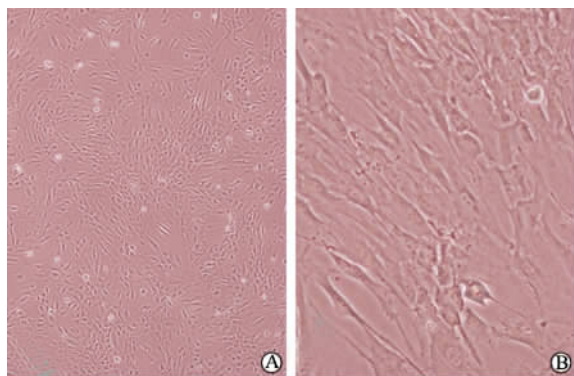


图 2 传代至 22 代的 UCB-MSCs 细胞形态无明显改变

Fig 2 UCB-MSCs were passaged 22 times without significant changes in morphology

A: ×40; B: ×200

按传统方法培养,5~7 d 后初次半量换液,后每隔3~4 d 全量换液1次,两种细胞同时增殖,但圆形

巨核细胞融合较快,逐渐占据优势,梭形成纤维样细胞夹杂其间,无法伸展融合。约 3 周后,圆形成纤维样细胞的“空间优势”越来越大,使得梭形成纤维样细胞开始脱落,镜下观察部分梭形成纤维样细胞并未死亡。继续换液,约 4 周后,皿底被圆形巨核细胞占满,梭形成纤维样细胞数量少且变得狭细,无法融合。继续观察数周,仍未见有梭形成纤维样细胞集落形成。本实验中取 5 份采血 80 ml 以上的脐血标本中的 40 ml 按照传统方法进行培养,结果都未获得成功。

2.2 UCB-MSCs 表面抗原表达 UCB-MSCs 可强烈表达 CD105、CD29 等 MSCs 表面标志,而不表达 CD34、CD45 和 CD106 等造血干细胞和内皮细胞标志(图 3)。

2.3 UCB-MSCs 的诱导分化能力 成骨诱导后 1 周碱性磷酸酶染色阳性(图 4),表明其具有成骨能力。成脂诱导后 2 周油红染色阳性(图 5),表明其具有成脂能力。

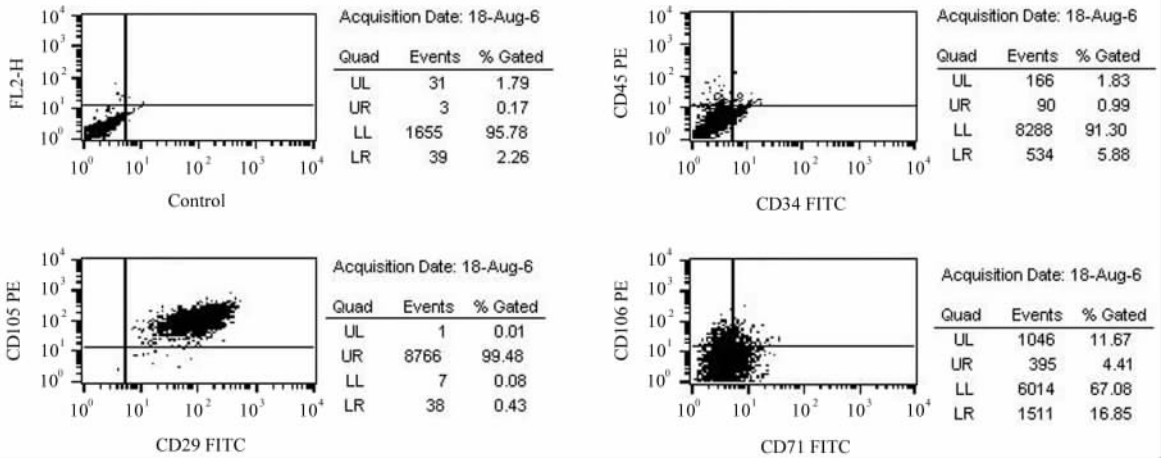


图3 流式细胞仪考察 UCB-MSCs 细胞抗原表达型

Fig 3 Immunophenotypes of UCB-MSCs by FACSCD105 and CD29 were highly expressed in UCB-MSCs, while CD34, CD45 and CD106 were not expressed

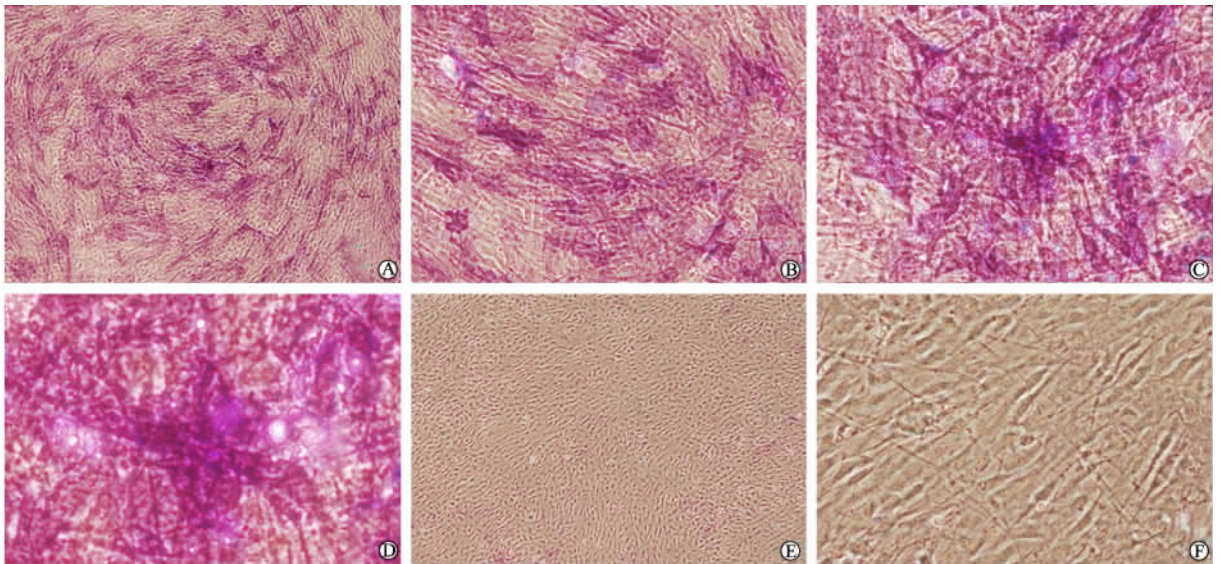


图4 成骨诱导后1周碱性磷酸酶染色结果

Fig 4 ALP staining after one-week osteo-induction

A-D: The osteogenic potential of UCB-MSCs was proved by positive ALP staining. A: $\times 40$, B: $\times 100$, C: $\times 200$, D: $\times 400$; E: Control, $\times 40$; F: Control, $\times 20$

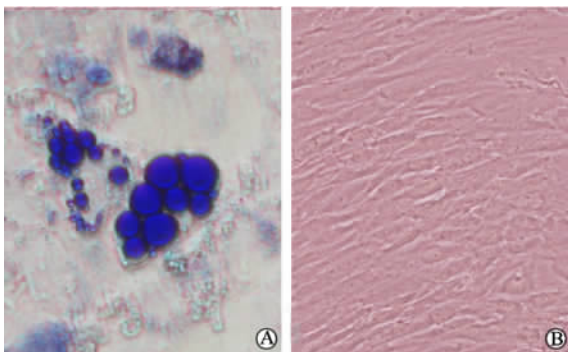


图5 成骨诱导2周后油红染色结果

Fig 5 Oil red staining after two-week adipo-induction($\times 200$)

The adipogenic potential of UCB-MSCs was proved by positive oil red staining. A: Experiment group; B: Control group

3 讨论

UCB-MSCs 的研究开展较晚,直到 1999 年, Erices 等^[3] 从脐血中分离培养出 MSCs。继 Erices 之后, Goodwin 等^[9]、Lee 等^[10]、Gang 等^[2] 也分别从脐血中成功分离出 MSCs 并对之进行鉴定。尽管文献^[6-8] 分别报道了从脐血中分离 MSCs 失败的经历,但是在越来越多已获成功的报道面前显然已经成了个例。究其失败的原因,可能是由于 MSCs 在脐血中的出现频率本来就很低,因而其生存/死亡很大程度上受到细胞培养条件的影响,而不同的实验室可能存在一些差别。

目前,多数作者已经证实了 UCB-MSCs 的存在及其多向分化的能力,对 UCB-MSCs 的研究已经深入到了蛋白质组学水平^[11]。但是 UCB-MSCs 分离培养的成功率很低这一问题仍未得到解决。Erices 等^[3]报道的结果为 22.6%(7/31),Rosada 等^[4]的结果为 33.3%(8/24),Yang 等^[5]为 23.1%(95/411),Goodwin 等^[9]报道的结果最高,为 62.7%(37/59),但未见后续重复该方法的文献报道。

细胞培养过程中发现,原代培养 5~7 d 即有细胞贴壁,但存在两种细胞形态:梭形纤维样细胞和大的圆形巨核细胞,镜下所见与 Erices 等^[3]报道的结果相似,Erices 将前者称为间充质样细胞(mesenchymal-like cells,MLCs),后者称为破骨样细胞(osteoclast-like cells,OLCs),并经免疫表型分析及成骨、成脂诱导证实了前者为间充质祖细胞(mesenchymal progenitor cells,MPCs)。

为从中得到成纤维样细胞,我们对培养方法进行如下改良:

(1)改良方法一:当皿底圆形巨核细胞融合、梭形纤维样细胞脱落时(原代培养约 3 周后),将细胞悬液移入新的皿中培养。这样,脱落的 MLCs(其中混有少量的 OLCs)在新的皿中有了贴壁融合的空间,从而很快能够形成集落。

(2)改良方法二:待皿底圆形巨核细胞渐渐占取优势时(原代培养约 3 周),将培养基换为含 15% FBS(Gibco 公司)的 α -MEM,当圆形巨核细胞大部脱落后换回含 10% FBS 的 α -MEM 培养基。通过降低培养条件,使在 FBS 条件下增殖迅速的 OLCs 凋亡脱落,而使 MLCs 保留下来,再给以含 10% FBS 的培养基,促使 MLCs 增殖融合。

结果发现改良一组 6 份脐血中有 4 份于原代培养 4~5 周形成成纤维样细胞集落;改良二组 14 份脐血中有 9 份于原代培养 5 周左右形成成纤维样细胞集落,形态与骨髓 MSCs 相似,呈较均一的长梭形。两种改良方法在所选择的样本中成功率分别达到了 66.7%和 64.3%。

而且所得的细胞增殖旺盛,每 3~5 d 即可融合达 90%以上,传至 22 代后形态没有明显变化。

取第 5 代 MLCs 进行免疫表型分析,发现可强烈表达 CD105、CD29 等 MSCs 表面标志,而不表达 CD34、CD45 和 CD106 等造血干细胞和内皮细胞标志。这一结果与已有报道相同^[2-5,10]。表明该 MLCs 是不同于造血干细胞和内皮祖细胞的 MSCs——UCB-MSCs。该 UCB-MSCs 对 MSCs 的另一表面标记 CD71 的表达呈阴性,可能与 CD71 的表达率本身

较低有关。同时取第 5 代细胞分别进行成骨、成脂诱导,发现在含特定诱导剂培养条件下,UCB-MSCs 可分化为成骨细胞和脂肪细胞,表明 UCB-MSCs 与其他干细胞一样具有多向分化潜能。在本组另一项研究中,UCB-MSCs 与支架材料复合后在支架内部生长增殖良好,这为 UCB-MSCs 在未来骨组织工程学中作为种子细胞的应用提供了理论依据。

本实验通过对培养方法进行改良,提高了 UCB-MSCs 的分离培养成功率,证实了脐血中存在 MSCs,而且 UCB-MSCs 具有良好的传代稳定性和多向分化潜能,可望作为种子细胞在骨组织工程学研究中有广阔的应用前景。

[参 考 文 献]

- [1] Romanov Y A, Svintsitskaya V A, Smirnov V N. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord[J]. *Stem Cells*, 2003,21:105-110.
- [2] Gang E J, Hong S H, Jeong J A, et al. *In vitro* mesengenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004,321:102-108.
- [3] Erices A, Conget P, Minguell J J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood[J]. *Br J Haematol*, 2000, 109:235-242.
- [4] Rosada C, Justesen J, Melsvik D, et al. The human umbilical cord blood: a potential source for osteoblast progenitor cells [J]. *Calcif Tissue Int*, 2003,72:135-142.
- [5] Yang S E, Ha C W, Jung M H, et al. Mesenchymal stem/progenitor cells developed in cultures from UC blood[J]. *Cytotherapy*, 2004,6:476-486.
- [6] Mareschi K, Biasin E, Piacibello W, et al. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow *versus* umbilical cord blood[J]. *Haematologica*, 2001,86:1099-1100.
- [7] Wexler S A, Donaldson C, Denning-Kendall P, et al. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal "stem" cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not[J]. *Br J Haematol*, 2003,121:368-374.
- [8] Yu M, Xiao Z, Shen L, et al. Mid-trimester fetal blood-derived adherent cells share characteristics similar to mesenchymal stem cells but full-term umbilical cord blood does not [J]. *Br J Haematol*, 2004,124: 666-675.
- [9] Goodwin H S, Bicknese A R, Chien S N, et al. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat and neural markers[J]. *Biol Blood Marrow Transpl*, 2001,7:581-588.
- [10] Lee O K, Kuo T K, Chen W M, et al. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood[J]. *Blood*, 2004,103:1669-1675.
- [11] Feldmann R E, Bieback Jr K, Maurer M H, et al. Stem cell proteomes: a profile of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood[J]. *Electrophoresis*, 2005, 26: 2749-2758.

[收稿日期] 2006-09-18

[修回日期] 2006-12-28

[本文编辑] 尹 茶