

成人骨髓间充质干细胞体外扩增和定向诱导 分化为骨和软骨细胞的研究*

杨 莉¹ 王冬梅¹ 洪 欣¹ 李 梁¹ 冯 凯¹
白慈贤¹ 李廷玉² 裴雪涛^{1**}

1. 军事医学科学院输血研究所、干细胞研究中心, 北京 100850; 2. 重庆医科大学附属儿童医院, 重庆 400014

摘要 体外扩增和定向诱导成人骨髓间充质干细胞(MSC)向骨细胞和软骨细胞分化。从正常成人骨髓中分离 MSC, 经纯化和扩增后分别用地塞米松、 β -甘油磷酸钠和维生素 C 诱导 MSC 向成骨细胞分化; 用无血清培养基和转化生长因子- β 诱导 MSC 向软骨细胞分化; 诱导期间用光镜检测分化情况, 并通过细胞化学和免疫组化方法检测钙沉积、碱性磷酸酶、软骨细胞分泌的酸性蛋白聚糖以及 I 和 II 型胶原表达情况。5. 5×10^5 个成人骨髓 MSC 在体外扩增 15 代后可获得 7.5×10^{12} 个细胞, 扩增约 1.36×10^7 倍; 在地塞米松、 β -甘油磷酸钠和维生素 C 诱导培养的第 7 天, 光镜下可观察到少数细胞逐渐由梭形变成多角形, 碱性磷酸酶呈阳性, 于培养的第 21 天可观察到钙沉积, I 型胶原呈阳性反应。成人 MSC 在无血清培养基中和 TGF- β 诱导下可向软骨细胞分化, 阿普蓝染色可观察到蓝染的酸性蛋白聚糖, II 型胶原呈阳性反应。因此, 成人骨髓 MSC 在体外可定向诱导分化为骨细胞和软骨细胞。

关键词 骨髓 间充质干细胞 成骨细胞 成软骨细胞

骨髓中除造血干细胞外还含有另一类干细胞-间充质干细胞(MSC), 它是一群具有多向分化潜能的均质性细胞, 在特定的诱导条件下可分化为多种间充质组织细胞, 如成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞、成肌细胞和神经细胞等^[1]。在体外长期培养的过程中, MSC 始终保持其多向分化潜能, 且遗传背景相当稳定, 体内植入反应较弱, 是一种理想的组织工程种子细胞。然而, 人体内骨髓中 MSC 的含量极其稀少, 每 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个单个核细胞中大约有 1 个 MSC^[2]。组织工程中对种子细胞的数量要求巨大, 如此微量的 MSC 难以满足需要, 因此体外纯化和扩增 MSC 就显得尤为重要。动物体内实验表明, 用全骨髓移植到骨缺损处可观察到骨和软骨的形成^[3], 但这种转化具有随机性, 且转化效率比较低, 因此本研究拟在体外研究 MSC 的分离、纯化和扩增以及定向分化为骨细胞和软骨细胞的条件, 为 MSC 的临床应用提供理论依据、技术方法和丰富的种子细胞。

2000-12-28 收稿, 2001-02-22 收修改稿

* 北京市“二四八”重大创新工程基金(编号: 9550213800)资助项目

** 联系人, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

1 材料与方 法

1.1 MSC 的分离、纯化和扩增培养

成人肋骨来源于非血液系统疾病的胸外科手术中摘取的肋骨。无菌条件下挤出骨髓,加入 20 mL 含 10% 胎牛血清的 DMEM(GIBCO) 培养液中充分混合, 1500 r/min 离心 5 min。弃上清及脂肪层后, 加入 5 mL 完全培养基(含 10% 胎牛血清的 DMEM), 充分混匀后, 将骨髓液轻轻叠加到密度为 1.073 的 Percoll 分离液上, 1500 r/min 离心 20 min, 取白细胞膜层以上的部分, 加入 Mesencult 培养基(Stem Cell Co.) 充分混匀, 离心洗涤备用。

按 1×10^6 /mL 密度接种 MSC 于 Mesencult 培养基中, 放置于 37°C , 5% CO_2 , 饱和湿度的孵箱内培养。培养 3 d 后, 更换培养基, 弃掉未粘附的细胞。以后每 4 d 换液一次。细胞达到 80% 融合单层后胰酶消化, 将细胞重新悬浮并继续扩增培养。

1.2 体外诱导 MSC 向骨细胞分化

将体外扩增不同代数的 MSC 按 3×10^5 /mL 浓度接种于事先放置有消毒盖玻片的六孔板内制备细胞爬片, 培养液为含 15% 胎牛血清的低糖 DMEM。接种 24 h 后, 更换培养液并加入 10^{-7} mmol/L 地塞米松, 10 ng/mL β -甘油磷酸钠(β -GP) 和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 维生素 C, 同样条件下继续培养, 每 3~4 d 用含新鲜的塞米松、 β -GP 和维生素 C 的低糖 DMEM 换液。

1.3 体外诱导 MSC 向软骨细胞分化

无血清软骨培养液组成成份为: 高糖 DMEM(GIBCO), 胰岛素 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 转铁蛋白 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 牛血清白蛋白 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 丙酮酸钠 1 mmol/L, 亚油酸 5.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 维生素 C 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 地塞米松 10^{-7} mol/L。用以上培养液代替 Mesencult 培养基, 并调整细胞浓度为 4×10^5 /mL, 转移 1 mL 细胞悬液于 15 mL 离心管内, 500 g 低速离心 15 min, 使细胞形成微团, 加入 10 ng/mL TGF- β (PEPRO TECH 公司), 放置于 37°C , 5% CO_2 的孵箱内培养, 每 2~3 d 用上述培养基加新鲜的 TGF- β 换液。

1.4 细胞染色

碱性磷酸酶(AKP)染色采用钙-钴显示法^[4]。钙沉积的检测采用 Von Kossa 方法^[4]。用阿茜蓝染色显示软骨细胞分泌的酸性蛋白聚糖, 具体步骤是将聚集诱导软骨培养 18 和 21 d 的细胞团经冰冻切片机切成厚度为 5 μm 的切片, 甲醇 4°C 固定 10 min, 切片用去离子水洗 3 次后, 浸于 10% 的阿茜蓝(溶于 0.1 mol/L HCl) 中室温过夜。PBS 洗 3 次后光镜下观察蓝染的酸性蛋白聚糖。

1.5 免疫组织化学显示 I, II 型胶原

参照 HistostainTM-SP 试剂盒(中山公司)操作方法进行。

1.6 统计学处理

实验数据采用 t 检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 MSC 的分离、纯化、扩增

用密度为 1.073 的 Percoll 分离液分离骨髓 MSC 细胞, 以 1×10^6 /mL 密度接种于含 7 mL Mesencult 培养基的 25 cm^2 塑料培养瓶中培养, 残留的各种类型的血细胞在培养的第 3 天通过

全量换液而逐渐除去. 此时贴壁生长的 MSC 呈单个分散存在或形成只有几个细胞的克隆, 细胞形态均一, 呈长梭形(图 1(a)). 贴壁的 MSC 增殖迅速, 培养 14 d 左右每个克隆就包含了约 100 个细胞, 培养至 21~23 d 细胞生长达 80%~90% 融合单层, 每个克隆约数百至数千个细胞(图 1(b)). 融合单层的 MSC 用胰酶消化后可获得 5.5×10^5 个 MSC, 将这些细胞扩增培养后, 形态与原代细胞相似, 传代细胞一般生长 7~10 d 达融合单层, 可继续传代扩增.

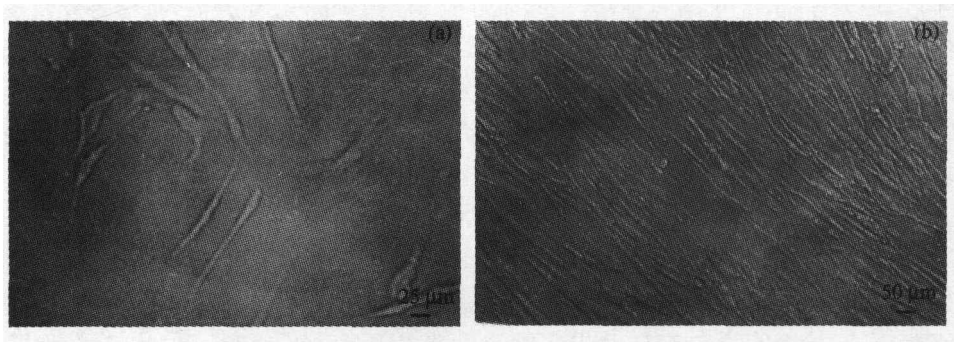


图 1 原代 MSC 形态
(a) 生长 3 d 的 MSC; (b) 生长 21 d 的 MSC

2.2 MSC 向骨细胞转化过程中的形态变化

MSC 在地塞米松、 β -GP 和维生素 C 诱导下, 在培养的第 7 天可观察到少许 MSC 细胞逐渐由梭形变成多角形(图 2(a)), 随着诱导时间的延长, 多角形的细胞增多并聚集成团, 培养 21 d 后, 可观察到较大的细胞结节(图 2(b)).

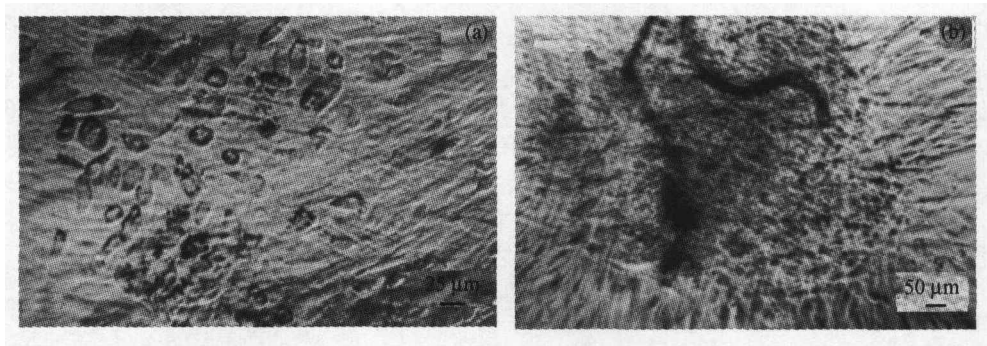


图 2 光镜下观察骨诱导过程中细胞形态的变化
(a) 诱导 7 d 时镜下可观察到少数的多角形细胞; (b) 诱导 21 d 时多角细胞增多并聚集成团

2.3 细胞染色结果

在 MSC 向骨细胞分化培养体系中, 用钙-钴法检测碱性磷酸酶的表达情况. 在诱导培养的第 7 天, 可观察到碱性磷酸酶呈弱阳性反应, 阳性细胞呈褐至黑色, 诱导的第 14 天, 碱性磷酸酶呈强阳性反应(图版 I-1).

在 MSC 向骨细胞分化培养体系中, 用 Von Kossa 方法检测了 21 d 时钙沉积的情况. 镜下观察到 Von Kossa 强阳性为较大的黑色结节, 成骨细胞因包埋在钙化基质中而见不到清晰的细

胞轮廓(图版 I -2)。

2.4 免疫组化检测 I 型胶原表达

分泌 I 型胶原是骨细胞的特征之一,在 MSC 向骨细胞分化培养体系中,我们检测了 I 型胶原表达,诱导培养 21 d 后在结节周围检测到呈黄褐色的 I 型胶原(图版 II -1)。

2.5 地塞米松及 TGF- β 对细胞聚集培养的影响

体外诱导 MSC 向软骨细胞分化的培养体系中,当细胞聚集培养 24 h 后,加入地塞米松及 TGF- β 的细胞团与管壁分离,并可在试管中持续生长达 30 d。培养第 18 天,切片经阿茜蓝染色可观察到蓝染的酸性蛋白聚糖,主要分布在切片的周边,在软骨细胞周围也可见到少许蓝染的蛋白聚糖(图版 II -2),II 型胶原弱阳性,分布于软骨细胞切片的周边。培养第 21 天,II 型胶原呈强阳性(图版 II -3)。未加地塞米松和 TGF- β 的细胞团始终粘附于管壁,在培养过程中逐渐减小,培养 14 d 后细胞团消失。

2.6 不同扩增代数的骨髓 MSC 的分化潜能

我们比较了扩增的第 1,5,10,15 代 MSC 向骨细胞和软骨细胞分化情况,并检测了钙沉积、碱性磷酸酶以及 I、II 型胶原表达情况,这几项指标的检测结果均为阳性(结果见表 1)。不同代数的 MSC 向成骨细胞分化过程中碱性磷酸酶阳性率(显微镜下记数 100 个细胞中碱性磷酸酶阳性的细胞数)经统计学分析无显著性差异($P > 0.05$),其向骨细胞和软骨细胞的分化潜能并没有随扩增代数的增加而丢失。

表 1 不同扩增代数 MSC 定向分化为成骨和软骨的能力^{a)}

细胞代数	碱性磷酸酶阳性率/%		钙沉积 21 d	I 型胶原 21 d	II 型胶原 21 d
	7 d	14 d			
1	25.8	73.8	++	+++	++
5	26.6	75.2	++	++	++
10	26	77.6	++	++	++
15	24.6	74.2	++	++	++

a) +++ 为染色强阳性, ++ 为染色阳性

3 讨论

MSC 是骨髓中的一类干细胞,因其取材方便、具有多向分化潜能、体内植入后反应较弱等优点正逐渐受到学者们的广泛关注。MSC 可以为骨、软骨、肺、脑组织等的修复和重建提供细胞来源^[5]。从退行性关节炎患者骨髓中分离 MSC,在体外扩增后,直接注射到关节腔内,可形成新的关节面,局部直接注射促进外科膝盖软骨切口的修复,MSC 还可植入愈合不良的骨伤口,以增加修复^[6]。然而,骨髓中微量的 MSC 难以满足组织工程的需要。在我们的实验中,对 MSC 的分离和培养是基于 Fridensrein 等的方法^[7]并进行了一定的改进,即首先用密度为 1.073 的 Percoll 分离液分离细胞,根据 MSC 贴壁生长的特性除去未粘附的细胞,同时采用 MSC 的专用培养基 Mesencult 对 MSC 进行进一步的纯化和扩增。Mesencult 培养基具有促进 MSC 增殖并抑制其分化的作用,通过传代培养后 MSC 的纯度可高达 95%,在我们的实验中,培养的 MSC 共传 15 代,由 5.5×10^5 个 MSC 最后获得了 7.5×10^{12} 个 MSC,扩增约 1.36×10^7 倍。尤其值得

注意的是其向软骨细胞和骨细胞分化的潜能并没有随扩增代数的增加而丢失,这一发现将会大大推进 MSC 的临床应用。

通过体内一些观察表明, MSC 具有向软骨细胞和骨细胞分化的潜能^[5]。然而体内环境的复杂性限制了我们研究影响 MSC 增殖分化的因素。在体外分离和扩增 MSC 以及诱导 MSC 定向分化可帮助我们理解人 MSC 增殖分化相关的机制。鸟类以及胚胎哺乳动物 MSC 及细胞系体外诱导分化为软骨细胞的模式已经用于探索软骨发生的机制。因此,我们在体外建立了成人 MSC 定向分化为软骨细胞和骨细胞的模式。在 MSC 向骨细胞分化过程中,我们发现地塞米松、 β -GP 和维生素 C 是极其重要的诱导剂,诱导第 7 天就可观察到梭形 MSC 形态发生改变,并且碱性磷酸酶呈阳性反应,随着诱导时间的延长,多角形细胞逐渐增多并聚集成团,碱性磷酸酶呈强阳性反应;诱导 21 d 后可观察到钙沉积及碱性磷酸酶转为弱阳性现象,并有 I 型胶原表达,表明已成功诱导部分 MSC 转化为骨细胞。在 MSC 向成骨细胞分化过程中,维生素 C 的加入认为与胶原的合成有关, Allampall 等的实验证实维生素 C 具有调控碱性磷酸酶活性和蛋白合成的作用^[8]。加入 β -GP 的目的是为了提供骨组织在体外培养体系中发生钙沉积所需的磷离子。然而,地塞米松在骨发生中的作用机制目前仍不清楚,有研究认为地塞米松通过增强其受体与基因组中靶序列的亲合性从而调控分化细胞中的基因表达^[9]。地塞米松对骨细胞具有刺激和抑制的双重效应,这取决于细胞所处的分化阶段以及激素作用剂量和作用时间。但另有人认为地塞米松是通过影响细胞对血清中其他调控因子的敏感性而发挥作用的。血清的成分相当复杂,已知的有生长激素、胰岛素、视黄醇类、维生素 D3 代谢物、胰岛素样生长因子、上皮生长因子、成纤维生长因子以及 TGF- β 等,这些因子对细胞的分化具有复杂的效应,而地塞米松是否是影响细胞对血清中这些调控因子的敏感性还需要进一步证实。

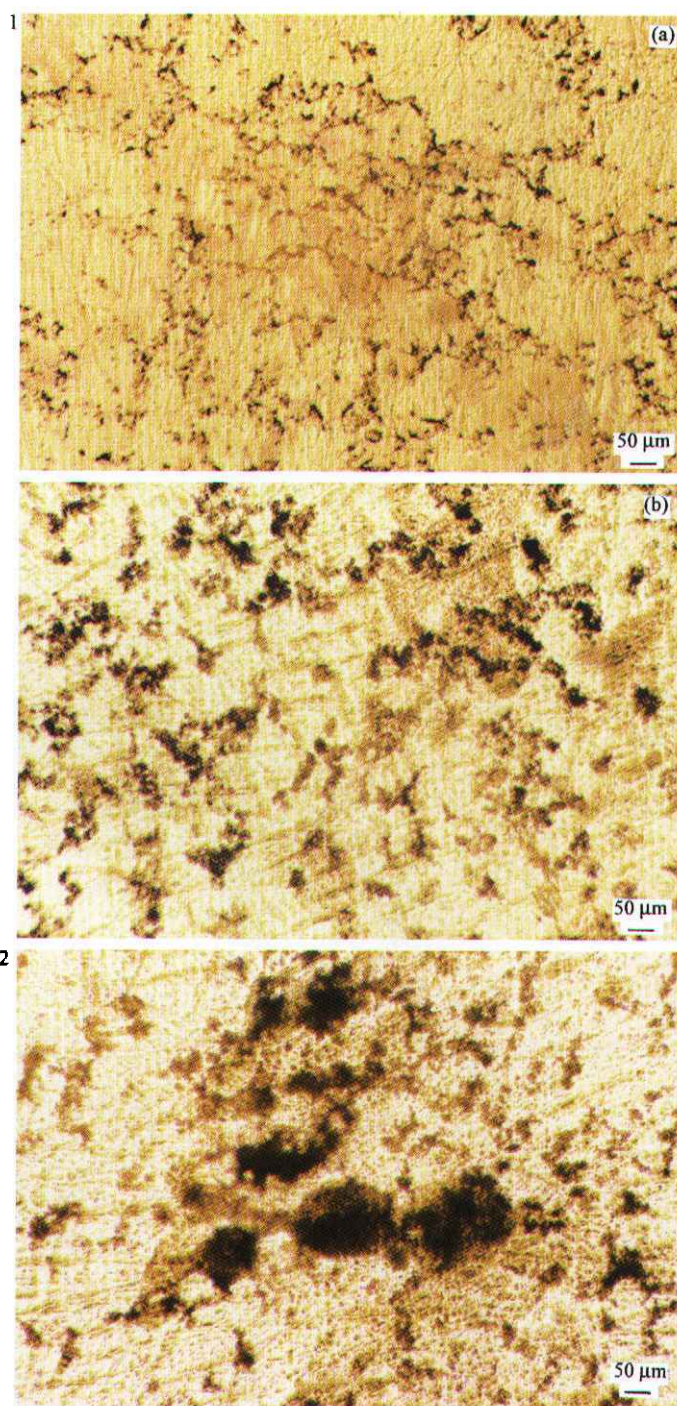
体外成功诱导软骨的发生需要特定的无血清培养基和高密度的细胞浓度。在本实验中,我们首先对细胞进行低速离心使其形成类似于致密的前软骨结构的细胞团,高密度细胞浓度表明在该培养体系中细胞间的相互作用是非常重要的。Johnston 等在体外用成年兔子骨髓 MSC 进行软骨诱导分化实验中详细阐述了体外诱导软骨分化以及维持软骨细胞表型中细胞间相互作用的重要性^[10]。TGF- β 是人 MSC 向软骨细胞分化过程中必不可少的诱导因子,胚胎期软骨发生过程中,可观察到高浓度的 TGF- β , 而 TGF- β 及其家族成员也参与了成年后软骨和骨损伤的修复过程。Kawai 等在研究小鼠胚胎细胞系 ATDC5 软骨发生过程时发现,外源性的 TGF- β 可上调纤维连接蛋白和 II 型胶原 mRNA 的表达并同时下调 N-钙粘素,提示 TGF- β 在软骨转化过程中起关键性的作用^[11]。在我们的培养体系中加入 TGF- β 的作用可能是提供了 MSC 向软骨细胞分化的胞外信号。

根据 MSC 向不同方向分化需要不同的培养条件,我们可得出这样的结论:基础的营养条件、某些激素、细胞密度、空间结构、生长因子都影响着 MSC 的分化,诱导分化过程中细胞自身分泌和旁分泌产生的细胞因子可能对维持细胞向特定方向分化起着重要作用。对这些作用机制的深入研究和阐明,将最终使我们有可能定向地扩增和诱导靶细胞形成,从而更加有效地应用于临床,为今后的细胞替代治疗和移植器官移植开辟一条新的途径。

参 考 文 献

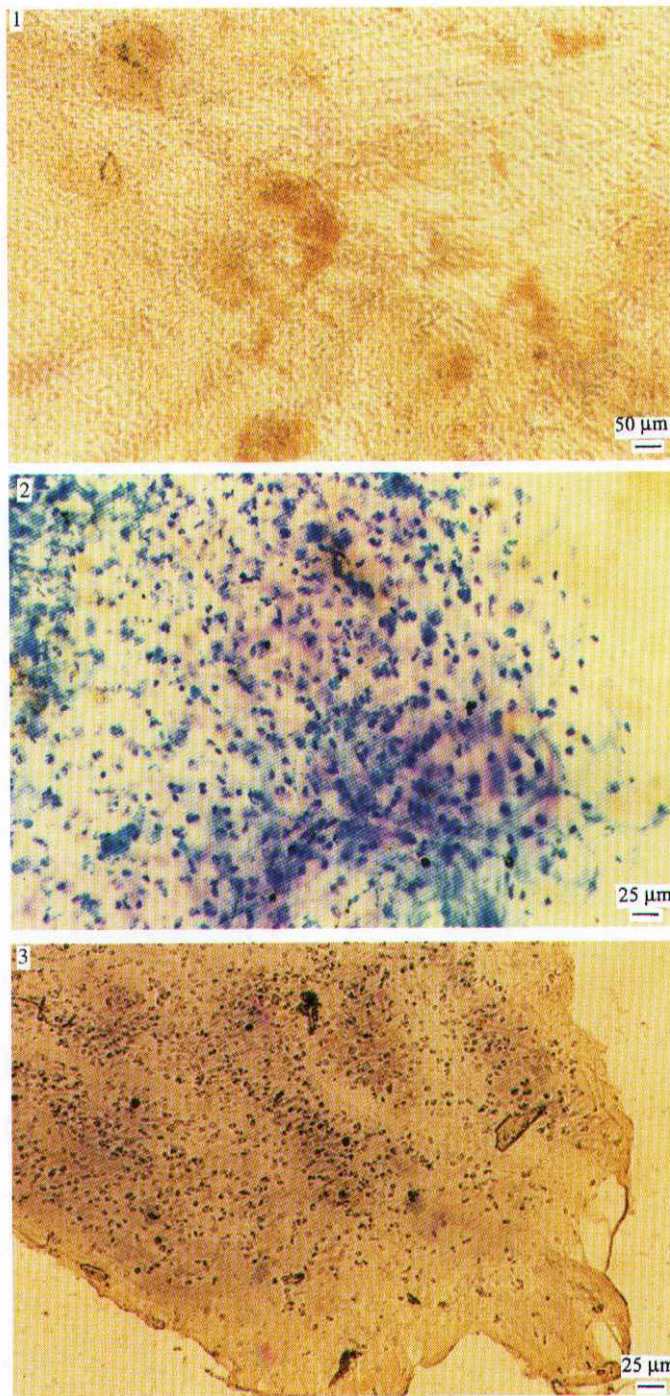
- 1 Pittenger M F, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cell. *Science*, 1999, 284: 143

- 2 Bruder S P, et al. Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1998, 355(suppl): 247
- 3 Bruder S P, et al. Osteochondral differentiation and the emergence of bone marrow cells in diffusion chambers. *Bone Miner*, 1990, 11: 141
- 4 方福德, 等主编. 现代医学实验技巧全书. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1995
- 5 Pereira R F, et al. Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 1142
- 6 Johnstone B, et al. Autologous mesenchymal progenitor cells in artilage repair. *Clin Orthop*, 1999, 367(suppl): 156
- 7 Friedenstein A J, et al. Bone marrow osteogenic stem cell: *in vitro* cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet*, 1987, 20: 263
- 8 Allampall K, et al. Effect of ascorbic acid and growth factors on collagen metabolism of flexor vetinaculum cells from individuals with and without carpal tunnel syndrome. *J Occup Environ Med*, 2000, 42(3): 251
- 9 Fu Y, et al. Significance of glycosaminoglycans content in developing mechanism of Cleft Palate. *Chung Hua Kou Chiang Hsueh Tsa Chih*(in Chinese), 1997, 32(1): 43
- 10 Johnston B, et al. *In vitro* chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exper Cell Res*, 1998, 238: 265
- 11 Kawai J, et al. Effects of transforming growth factor-beta signaling on chondrogenesis in mouse chondrogenic EC cells, ATDC5. *Eur J Cell Biol*, 1999, 78: 707



1. MSC 向骨细胞分化过程中碱性磷酸酶的表达. (a)诱导 7d; (b)诱导 14 d;

2. Von Kossa 法细胞染色显示骨诱导 21 d 时钙沉积



1. 免疫组化 SP 法检测 I 型胶原表达；2. 阿茜兰染色显示软骨细胞分泌的酸性蛋白聚糖(蓝色为阳性)；
3. 免疫组化 SP 法检测软骨细胞分泌 II 型胶原的情况