

论著·基础研究

短期冻存兔骨髓间充质干细胞对其生物特性的影响^{*}

武成聪,李 强[△],陈佳滨,茹 嘉,蔡伟良,宁寅宽
(桂林医学院附属医院骨科二病区,广西桂林 541000)

摘 要:目的 探讨短期冻存对兔骨髓间充质干细胞(BMSCs)的增殖、生物特征及成骨能力的影响。方法 选取第 5 代兔 BMSCs 冻存,30 d 后复苏、体外培养至第 10 代作为实验组,设相同代数未冻存的 BMSCs 为对照组。MTT、细胞周期、细胞表面标志及成骨诱导分化后碱性磷酸酶(ALP)水平、I 型胶原及钙结节染色作为其增殖、生物特征及成骨能力的评价指标。结果 冻存后 BMSCs 生长潜伏期延长,但生长状态无明显影响;增殖指数和 G₁ 期细胞所占比例分别为 42.9%±3.4%、57.0%±3.4%,细胞表面标志 CD44 阳性率为 93.62%±1.05%,不表达 CD45;成骨诱导第 7、14 天 ALP 水平(U/gprot)分别为 6.73±1.92、15.99±4.36,第 14、21 天,I 型胶原、钙结节茜素红染色阳性;以上结果与对照组比较差异均无统计学意义(P>0.05)。结论 短期冻存对兔 BMSCs 增殖、生物特征及成骨分化潜能无明显影响,冻存后可继续进一步研究。

关键词:骨髓间充质干细胞;冻存;生物特性

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.04.031

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)04-0459-03

The effects of short-term cryopreservation on the bio-characteristics of rabbit BMSCs^{*}

Wu Chengcong, Li Qiang[△], Chen Jiabin, Ru Jia, Cai Weiliang, Ning Yinkuan

(Second Department of Orthopaedics, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin, Guangxi 541000, China)

Abstract: Objective To study the effects of short-term cryopreservation on the proliferation, bio-characteristics and osteogenic capability of rabbit BMSCs and lay the foundation for the further study. **Methods** The 5th generation of rabbit BMSCs were cryopreserved by liquid nitrogen for 30 days, and then thawing the cells to culture it to the 10th generation in vitro, put the non-cryopreserved and the same generation BMSCs as the control group. The MTT, cell cycle, cell surface marker, the content of ALP and the immunohistochemical staining for collagen type I and alizarin red staining for calcium after differentiation induced by osteogenesis were used to evaluate the proliferation, bio-characteristic and osteogenic differentiation capability of rabbit BMSCs. **Results** The growth incubation period of BMSCs after cryopreserved was extended, but it gradually recover through serial passage. The proliferation index and the proportion of BMSCs in G₁ phase were 42.9%±3.4% and 57.0%±3.4% respectively. The positive rate of cell surface marker of CD44 was 93.62%±1.05% without expression of CD45. The contents of ALP(U/gprot) were 6.73±1.92 and 15.99±4.36 in BMSCs after 7th day and 14th day with osteogenic induction, respectively. The collagen type I and alizarin red staining for calcium indicated positive at BMSCs after 14th day and 21th day with osteogenic induction, respectively. These results showed no significant difference compared with the control group(P>0.05). **Conclusion** Short-term cryopreservation has no obvious impacts on the proliferation, bio-characteristic and osteogenic capability of BMSCs and it could be used for further study.

Key words: bone marrow mesenchymal stem cells; cryopreservation; bio-characteristic

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是组织工程中重要的种子细胞之一,大量具有良好分化能力的干细胞经多次传代后老化、分化能力下降或者死亡^[1]。将良好分化能力 BMSCs 冻存则可在需要时及时复苏应用。而冻存复苏过程是否会对 BMSCs 生物特性、骨化潜能造成影响。本实验旨在探讨短期冻存兔 BMSCs 对其生物特征及其成骨分化能力的影响,为后期组织工程骨构建奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 清洁级新西兰白兔 3 只,1 月龄,体质量约 0.5 kg,购于桂林医学院动物实验中心,实验过程符合动物伦理学要求^[2]。

1.2 主要试剂 低糖 DMEM、胰蛋白酶、胎牛血清购于美国 Hyclone 公司;MTT、维生素 C、β-磷酸甘油、地塞米松购于韩国 BIOSHARP 公司;小鼠抗兔 CD44/CD45 单克隆抗体、小鼠抗兔 IgG1、PerCP 生物素标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)分别购

于美国 ANTIGENIX、eBioscience、Jackson ImmunoResearch 公司;小鼠抗兔 Collagen I 购于武汉博士德生物工程有限公司;山羊抗小鼠 IgG/辣根酶标记、DAB 显色试剂盒购于北京中杉金桥公司;茜素红购于国药集团化学试剂有限公司;碱性磷酸酶(ALP)测试盒购于南京建成生物工程研究所。

1.3 方 法

1.3.1 细胞分离、冻存 无菌条件下穿刺股骨大转子抽取骨髓、分离,界面层细胞以含 15%胎牛血清的完全培养基,37℃、5% CO₂、饱和湿度培养。48 h 后首次换液,细胞铺满瓶底 80%左右传代。第 5 代加入冻存保护液,程序降温后液氮保存。30 d 后复苏培养,冻存后第 10 代 BMSCs 作为实验组;冻存期间再次分离原代细胞第 10 代 BMSCs 作为对照组。

1.3.2 MTT 比色法测定吸光度(OD) 实验组、对照组各以 2.5×10³ 个/孔 BMSCs 接种 96 孔板,每组 8 个复制孔,按 MTT 检测流程操作,波长 490 nm 下测定 OD 值,连续检测 7 d,每天 OD 均值代表细胞增殖情况。

^{*} 基金项目:国家自然科学基金资助项目(31160199)。 作者简介:武成聪(1987—),在读硕士,主要从事骨与软骨组织工程、生物材料研究。 [△] 通讯作者, Tel: (0773)2827759; E-mail: li.q12251970@163.com。

1.3.3 细胞周期检测 随机收集实验组、对照组各 3 皿细胞固定,流式细胞仪进行细胞周期检测。重复 3 次,得出细胞各周期的百分率并计算增殖指数(PI)=(S+G₂M)/(G_{0/1}+S+G₂M)。

1.3.4 BMSCs 表型检测 选取实验组、对照组每组各 3 皿细胞,设空白管、同型对照管、实验管,按操作说明分别标记 CD44/45-PerCP,流式细胞仪检测。重复 3 次,各组阳性率做统计分析。

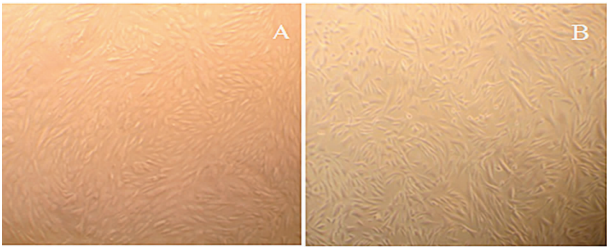
1.3.5 成骨分化检测 实验组和对照组各以 10⁵ 个/孔接种 6 孔板(免疫组织化学,茜素红组作爬片处理)。细胞铺满瓶底 80%后更换成骨诱导液(含 10 nmol/L 地塞米松,15 mmol/L 维生素 C,10 mmol/L β-磷酸甘油)作不传代培养诱导 7、14 d,各组取 3 孔,按 ALP 试剂盒说明操作,计算 ALP 水平。第 14 天,每组 3 张细胞爬片,I 型胶原免疫组织化学染色(SP 法)。Image-Pro Plus(IPP)图像软件取 3 个区域测量(100 倍,九点法),平均光密度代表单位面积 I 型胶原水平。第 21 天茜素红染色,IPP 以红色结节为标志分析钙结节面积(总像素数)。均重复 3 次。

1.4 统计学处理 采用 SPSS11.0 统计软件进行分析,对各组数据作两独立样本 *t* 检验,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 BMSCs 培养情况 原代分离 48 h 后首次换液,镜下贴壁细胞即为 BMSCs,数量较少,呈短梭状,散在簇集状分布,随

培养时间延长及传代后细胞形成大量的小集落,呈长梭状,汇合成片,旋涡状排列(图 1A);实验组细胞复苏后 24 h 内细胞可贴壁,不贴壁细胞数目较对照组增加,细胞梭形,较瘦长,部分细胞出现老化,总体而言细胞生长情况影响不大(图 1B)。



A:对照组第 5 代 BMSCs;B:实验组第 10 代 BMSCs。

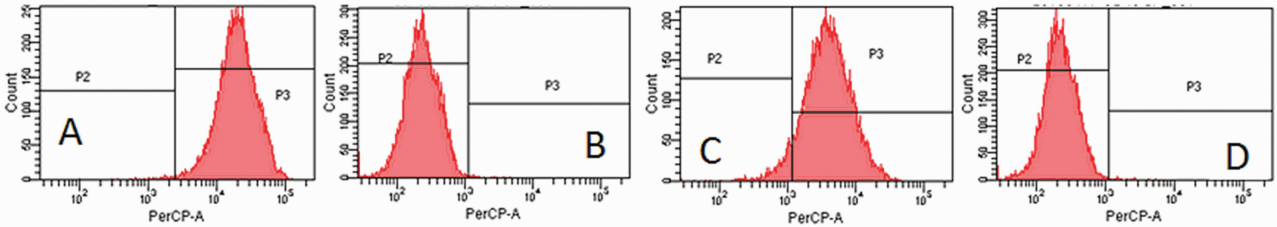
图 1 冻存前后兔 BMSCs 生长情况(×40)

2.2 MTT 检测 OD 值 实验组细胞生长潜伏期延长,MTT 检测 OD 值从第 3 天开始增加(即细胞增殖速度),第 4 天后增殖速度能够与对照组持平,差异无统计学意义(*P* > 0.05, *n* = 8),随后进入平台期,见表 1。

2.3 BMSCs 表面标志 实验组、对照组表面抗原阳性率分别为 CD44: 93.62% ± 1.05%、93.95% ± 0.71%; CD45: 0.24% ± 0.11%、0.29% ± 0.10%,二者差异无统计学意义(*P* > 0.05),冻存复苏对 BMSCs 表面抗原无明显影响,细胞并未因冻存而发生变异,见图 2。

表 1 MTT 检测 OD 值(̄x ± s)

组别	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
实验组	0.03±0.00	0.03±0.00	0.08±0.01	0.29±0.05	0.40±0.13	0.47±0.06	0.53±0.07
对照组	0.03±0.00	0.06±0.00	0.18±0.04	0.38±0.03	0.48±0.07	0.53±0.08	0.54±0.07
<i>P</i>	0.21	0.00	0.00	0.00	0.14	0.17	0.81



A:实验组 CD44;B:实验组 CD45;C:对照组 CD44;D:对照组 CD45。

图 2 第 10 代 BMSCs 表面标志表达情况

2.4 BMSCs 周期检测 实验组与对照组 G₁、S、G₂/M 期的细胞比例及 PI 比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05),见表 2。

表 2 第 10 代 BMSCs 各期细胞比例(̄x ± s, %)

组别	G ₁	S	G ₂	PI
实验组	57.00±3.47	33.70±3.17	9.29±0.52	42.9±3.4
对照组	56.84±2.27	34.20±0.94	8.93±2.41	43.0±2.3
<i>P</i>	0.933	0.756	0.768	0.960

2.5 ALP 表达情况 实验组和对照组经成骨诱导后 7、14 d,随诱导时间增加 ALP 水平呈递增趋势,两个时间点实验组和对照组 ALP 水平变化差异无统计学意义(*P* > 0.05),见表 3。

2.6 I 型胶原 SP 法检测 成骨诱导 14 d,实验组和对照组 I 型胶原染色均呈阳性表达,细胞胞质出现棕黄色颗粒,大小

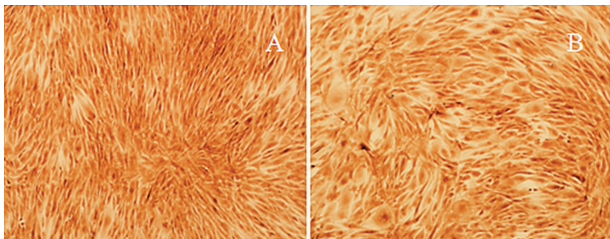
形态均一(图 3)。经冻存后 BMSCs I 型胶原蛋白表达量(平均光密度分析)变化与未冻存组相比,差异无统计学意义(*P* > 0.05),见表 4。

表 3 成骨诱导后第 7、14 天 ALP 水平(̄x ± s, U/gprot)

组别	7 d	14 d
实验组	6.73±1.92	15.99±4.36
对照组	6.76±0.91	16.41±2.22
<i>P</i>	0.97	0.79

2.7 钙结节茜素红染色 实验组和对照组成骨诱导分化培养到约 10 d 细胞呈梭形表面粗糙,细胞间隙紧密,细碎颗粒、扁平样改变,14 d 左右漩涡中心形成细胞团,21 d 形成钙化结节,肉眼可见培养皿底散在白色状物,染色后均为红色(图 4),

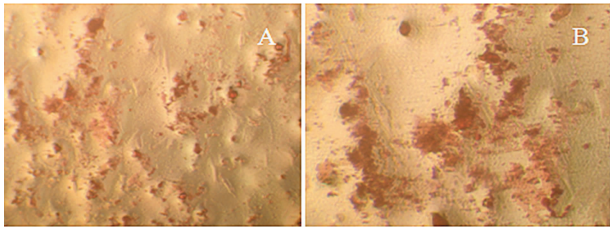
两组钙结节面积差异无统计学意义($P>0.05$),见表 4。



A:实验组;B:对照组。

图 3 成骨诱导后 14 d I 型胶原染色(SP×100)

表 4 I 型胶原、钙结节染色情况($\bar{x}\pm s$)		
组别	平均光密度	钙结节面积(像素)
实验组	0.442±0.022	1 055 811.0±199 798.5
对照组	0.456±0.015	1 155 874.0±222 157.3
P	0.16	0.32



A:实验组;B:对照组。

图 4 导后 21 d 钙结节茜素红染色(×100)

3 讨 论

BMSCs 在特定的条件下能向骨、软骨、脂肪、肌等细胞分化^[3]。本研究采用密度梯度离心法^[4]成功分离兔 BMSCs,其生长状态良好,能够满足后期骨组织工程种子细胞的要求。而 BMSCs 体外实验中,其随传代增加会使细胞老化、分化能力逐渐下降或者死亡^[5]。低温冻存 BMSCs 则是存贮种子细胞的有效途径,理论上在-196℃及冻存保护液作用下细胞生化反应与活力代谢基本静止,可无限期冻存细胞^[6]。但实际效果不佳,冻存时细胞所处环境对细胞影响较大,其机制可能为溶质反应导致^[7]。本实验中,短期冻存 BMSCs 后,虽然生长增殖速度较对照组缓慢,但细胞状态并未发现明显变化,其增殖能力能与对照组相当。细胞周期中实验组和对照组的绝大部分 BMSCs 处于 G₁ 期,具有较强的增殖分化能力,冻存后仍具有典型的干细胞增殖特点。

骨髓由多组细胞系组成,对于实验分离得到及后续冻存复苏后的 BMSCs,是否是种子细胞或者其生物特征是否因细胞冻存过程而改变^[8]。本研究通过标记细胞阳性表达的 CD44 和阴性表达的 CD45 检测发现,通过密度梯度离心法获得的靶细胞为 BMSCs,实验组对照组 CD44 阳性率均超过 90%,不表达的 CD45,经统计分析说明了经过短期冻存后的 BMSCs 并没有发生分化或变异。

BMSCs 成骨、成软骨、成脂分化这一生物特性可以用来鉴定其多向分化潜能^[9-10]。BMSCs 的成骨分化必须在特定条件下进行,特定的化学物质(β-磷酸甘油、地塞米松、维生素 C 等)可促使 BMSCs 向成骨细胞分化并能通过骨化标志性产物 ALP、I 型胶原、矿化结节等验证^[11]。ALP 高表达是成骨过程中成熟成骨细胞特异性标志之一^[12];I 型胶原蛋白分泌量增加标志着 BMSCs 向成骨细胞系分化^[13];细胞外基质钙化与

Ca²⁺ 沉积是成骨分化的终末期表现^[14]。本研究发现,实验组和对照组的 BMSCs,其 ALP 表达量均随诱导时间的增加而相应增加;在相同时间点,实验组、对照组 I 型胶原蛋白均呈阳性表达,对比光密度发现其表达量并未因冻存细胞而改变。同样,钙结节染色也印证了低温冷冻过程并未使 BMSCs 成骨分化能力发生质的改变。

综上所述,本实验旨在为临床或实验研究缩短反复培养鉴定 BMSCs 的实验周期,采用密度梯度离心法成功获得纯度较高的兔 BMSCs,在其处于最佳状态时给予冻存复苏检测其生物特征及成骨能力是否受到影响。本研究结果显示,兔 BMSCs 在短期冻存后其增殖、生物特征及成骨分化潜能无明显变化,复苏后可用于进一步研究和应用。

参考文献:

[1] Guo KT, SchAfer R, Paul A, et al. A new technique for the isolation and surface immobilization of mesenchymal stem cells from whole bone marrow using high-specific DNA aptamers[J]. Setm Cells, 2006, 24(10): 2220-2231.

[2] 中华人民共和国科学技术部. 关于发布《关于善待实验动物的指导性意见》的通知[J]. 畜牧兽医科技信息, 2007, 23(4): 35-36.

[3] Friedenstein 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.

[4] 沈兴, 余更生, 田杰, 等. 兔骨髓间充质干细胞体外分离培养及冻存研究[J]. 实用医学杂志, 2006, 22(9): 996-997.

[5] Lippens E, Cornelissen M. Slow cooling cryopreservation of cell-microcarrier constructs[J]. Cells Tissues Organs, 2010, 192(3): 177-186.

[6] Rust PA, Costas C, Cannon SR, et al. Characterisation of cryopreserved cells freshly isolated from human bone marrow[J]. Cryo Letters, 2006, 27(1): 17-28.

[7] 雷香丽. 大鼠骨髓间充质干细胞的体外培养及体内移植实验性研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2012.

[8] McCarty RC, Gronthos S, Zannettino AC, et al. Characterisation and developmental potential of ovine bone marrow derived mesenchymal stem cells[J]. J Cell Physiol, 2009, 219(2): 324-333.

[9] Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy[J]. J Cell Mol Med, 2004, 8(3): 301-316.

[10] Tuli R, Tuli S, Nandi S, et al. Transforming growth factor-beta-mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling cross-talk[J]. J Biol Chem, 2003, 278(42): 41227-41236.

[11] Qu D, Li J, Li Y, et al. Angiogenesis and osteogenesis enhanced by bFGF ex vivo gene therapy for bone tissue engineering in reconstruction of calvarial defects[J]. J Biomed Mater Res A, 2011, 96(3): 543-551.

[12] Collignon H, Davicco MJ, Barlet JP. Isolation of cells from ovine fetal long bone and characterization of their osteoblastic activities during in vitro mineralization[J]. Arch Physiol Biochem, 1997, 105(2): 158-166. (下转第 464 页)

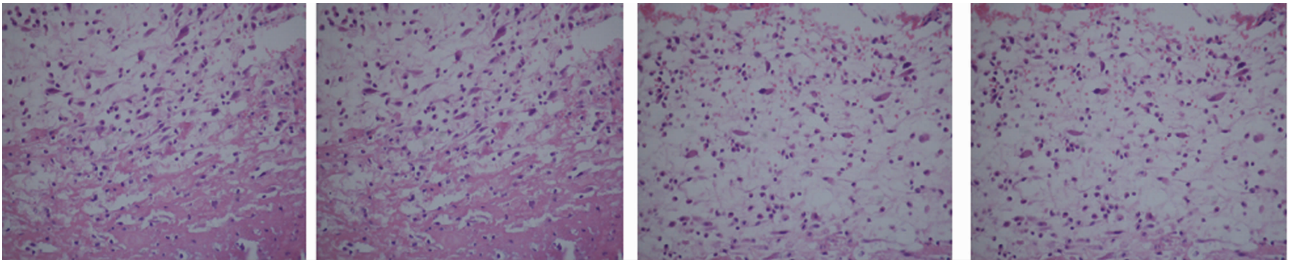


图 4 A 组第 5 天(HE×100);图 5 A 组第 7 天(HE×100);图 6 B 组第 5 天(HE×100);图 7 B 组第 7 天(HE×100)

3 讨 论

深层海水一般是指海平面 200 m 以下的水,水质稳定而洁净、富含人体细胞所需、成分比例组合与人体体液相似、人体极易吸收的矿物质成分,病原菌也极少。1996 年日本学者 Yoshiyuki^[3] 检测发现,深层海水含有 82 种元素,同时测出了各元素的含量。当前,深层海水已经应用在食品、农业、化妆品、医学等各领域,也有利用深层海水改善微量元素失衡来治疗特应性皮炎的报道^[4],而深层海水应用于创面的修复,目前国内外尚未见相关研究报道。

微量元素作为人体内重要代谢介质,参与人体数量众多的酶类和激素的合成与活化,除对机体的代谢、免疫、细胞分裂增殖等具有调控作用外,还可影响体内氧化还原反应,并参与细胞外基质合成与分解、成纤维细胞的形成与增生及细胞因子的生成与释放,其含量的变化一定程度上影响着机体的新陈代谢和创面的愈合。近年来国内学者发现,严重烧伤后血、尿液和局部组织中微量元素的含量均发生一些异常变化,这些变化可能对创面的修复过程带来许多不利影响,并认为诸多微量元素的变化,可能与创面修复期需求量增加、持续丢失与摄入不足等因素有关,及时补充微量元素,有利于恢复其正常浓度,促进创面愈合^[5-8]。

创伤后血液和创面局部组织均可发生微量元素的异常,这一观点在医学界已基本得到认可。现市场出现各种补充微量元素的人工合成产品(如:微量元素片),含量只有几种或几十种元素,人体内所有的微量元素都存在有直接或间接的关系,彼此相互影响,其相互作用错综复杂,因此,补充部分微量元素必然达不到预期效果,有时反而适得其反。深层海水含有人体所需、易吸收、平衡的所有元素,通过口服深层海水可以达到改善机体微量元素平衡。本研究中,首先给予小鼠口服深层海水 14 d,恢复机体的微量元素平衡后,在 15 d 建立创伤创面模型,继续给予口服深层海水,改善因创伤导致的微量元素失衡,实验设计目的就是要充分利用深层海水来调节小鼠机体微量元素平衡。实验结果显示,在创伤后第 3 天就出现深层海水的促创伤愈合的优势,但此时差异无统计学意义($P>0.05$),考虑原因为微量元素是逐步调整的过程。在 5 d 以后,深层海水组的创面愈合率较自来水组有明显提高。行组织学观察同时也

发现深层海水组成熟的成纤维细胞数量增多,细胞排列成束状,较为整齐。

综上所述,深层海水可以促进创面的愈合,深层海水发挥作用的原因目前考虑为其丰富、易吸收、平衡的微量元素,下一步本研究将设计检测实验组和对照组创伤前后血液和局部微量元素的变化,以验证其理论。

参考文献:

[1] 颜世铭,洪昭毅,李增禧. 实用元素医学[M]. 郑州:河南医科大学出版社,1999:25.

[2] Verissimo MIS, Oliveira JA, Gomes MTS. Determination of the total hardness in tap water using acoustic wave sensors[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2007, 127 (1):102-106.

[3] Yoshiyuki N. Table of the elements in seawater and its remarks[J]. Bull Soc Sea Water Sci Jpn, 1997, 51:4-6

[4] Hataguchi Y, Tai H, Nakajima H, et al. Drinking deep-seawater restores mineral imbalance in atopic eczema/dermatitis syndrome[J]. Eur J Clin Nutr, 2005, 59(9):1093-1096.

[5] Berger MM, Shenkin A. Trace element requirements in critically ill burned patients[J]. J Trace Elem Med Biol, 2007, 21(Suppl 1):44-48.

[6] 李利根,郭振荣,赵霖,等. 缺锌和补锌对烫伤大鼠血清和组织锌含量,含锌酶、激素、蛋白质的影响[J]. 中国临床营养杂志, 2006, 14(1):29-32.

[7] 韩兆峰,王甲汉. 重度烧伤患者中后期肉芽创面多种微量元素的动态变化[J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(3):505-506.

[8] 何丽,张雪,府伟灵,等. 重度烧伤病人血清及 24 小时尿中 7 种微量元素的动态变化[J]. 重庆医学, 2006, 35 (23):2142-2145.

(收稿日期:2013-09-28 修回日期:2013-11-12)

(上接第 461 页)

[13] Salaszyk RM, Williams WA, Boskey A, et al. Adhesion to vitronectin and collagen I promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. J Biomed Biotechnol, 2004, 2004(1):24-34.

[14] Klees RF, Salaszyk RM, Kingsley K, et al. Laminin-5 in-

duces osteogenic gene expression in human mesenchymal stem cells through an ERK-dependent pathway[J]. Mol Biol Cell, 2005, 16(2):881-890.

(收稿日期:2013-09-10 修回日期:2013-10-28)