

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.08.003

MSCs 2 种分离培养方法及其培养液中的 VEGF、SDF-1 α 浓度比较*

潘家义¹,周胜华^{2△},黄 峰²,白忠乐²

(1. 贵阳医学院附属医院心内科,贵阳 550004;2. 中南大学湘雅二医院心内科,长沙 410011)

[摘要] **目的** 通过 2 种分离培养方法所得骨髓间充质干细胞(MSCs)的生长特征和微环境中细胞因子的比较,提供一种可以快速、安全、高效地为临床和实验提供大量优质 MSCs 的方法。**方法** 提取 C57BL/c 小鼠的骨髓,分别作密度梯度离心法和全骨髓贴壁培养分离法分离培养 MSCs,通过流式细胞仪检测细胞表面 CD29⁺、CD31⁺、CD34⁺、CD45⁺ 表达水平,并比较各自所得细胞的生长曲线;ELISA 检测培养液中的血管内皮生长因子(VEGF)、SDF-1 α 浓度并比较二者的差异。**结果** 与密度梯度离心法比较,全骨髓贴壁分离法所得原代细胞有较快的生长速度,较短的生长周期;培养液中 VEGF 和 SDF-1 α 浓度也稍高于密度梯度离心法。**结论** 全骨髓贴壁培养法可以快速、方便、有效地为临床和实验提供大量 MSCs,所得细胞的培养环境优于密度梯度离心法,减少了对细胞功能的损害。

[关键词] 密度梯度离心法;全骨髓贴壁分离法;骨髓间充质干细胞

[中图分类号] R329

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)08-1017-05

Comparison of isolation ways of MSC and VEGF and SDF-1 α concentration in respective culture medium*

Pan Jiayi¹, Zhou Shenghua^{2△}, Huang Feng², Bai Zhongle²

(1. Department of Cardiology, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang, Guizhou 550004, China;

2. Department of Cardiology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410011, China)

[Abstract] **Objective** To choose one protocol that can quickly, safely and effectively provide amount enough of bone marrow derived mesenchymal stem cells(MSCs) for use of clinical or experimental test through comparison of their growth characteristics and growth factors levels in culture solution. **Methods** Cells extracted from bone marrow of C57BL/C mice respectively underwent two different isolation protocols: whole bone marrow adherent culture(WBMAC) or gradient density separation(GDS); characteristic surface antigens of MSCs were identified by flow cytometry on cells isolated in different ways; the distinct growth curve of primary stem cells cultured in vitro described their different proliferation rate; levels of vascular endothelial growth factor(VEGF) and stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α) in culture medium were detected by ELISA. **Results** Primary MSCs obtained by WBMAC proliferated at higher speed and exhibited shorter growth cycle than those separated by GDS; on MSCs from both groups, surface antigens CD29 were detected positively, and antigens including CD31, CD34 and CD45 were assayed negatively; concentration of VEGF and SDF-1 α in both two nutrient solution primarily keep at low levels, comparatively, level of VEGF and SDF-1 α in the dishes which contain MSCs by WBMAC was higher than the one in the dishes which contain MSCs by GDS. **Conclusion** MSCs extracted by WBMAC shows unimpaired cell function, can build automatically more suitable microenviroment for their growth; this classic method was qualified for clinical and experimental use in a safe, rapid, effective way.

[Key words] BMSCs; whole bone marrow adherent culture; gradient density separation

骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是具有多向分化潜力的非造血干细胞,由于具有低免疫源性和取材方便等特点,成为缺血心脏病干细胞治疗的首选干细胞。目前,提取骨髓 MSCs 方法包括全骨髓贴壁分离法、密度梯度离心法、流式细胞仪和免疫磁珠分离法。后者由于提取过程中 MSCs 功能受到很大影响,费用昂贵,很难方便、快速地为临床提供大量 MSCs,因此,全骨髓贴壁分离法、密度梯度离心法才是比较常用的提取方法。Xue 等利用富含血小板的血浆代替胎牛血清来培养 MSCs,认为这种血浆为 MSCs 提供了更为有益、安全的生长条件;Lucarelli 等^[1]证实富含血小板的血浆中含有不同浓度的、微量的各种生长因子。凡此种尝试让作者提出了培养微环境的概念,不少文献也证实了少量生长因子可以为 MSCs 营造适宜生长环境,促进其增殖。本研究比较了密度梯度离心法和全贴壁离心法,并将培养液中生长因子浓度作比较,试图从微环境的角度评价 2 种方法的优劣。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 6 周龄 C57BL/c 小鼠(由湖南省斯莱克达实验动物有限公司提供)。

1.1.2 试剂 小鼠干细胞细胞分离液(中国生命科学),青霉素、链霉素(CLONTECH 公司),低糖 DMEM(Hyclone 公司),胎牛血清(Gibco 公司),含 0.02% EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶(美国 Sigma 公司),兔抗鼠 CD31FITC 抗体、兔抗鼠 CD45 FITC 抗体、兔抗鼠 CD29 FITC 抗体、兔抗鼠 CD34 FITC 抗体(Santa Cruz 公司)。

1.2 方法

1.2.1 C57BL/c 小鼠骨髓 MSCs 分离、培养的 2 种方法 取 6 周龄 C57BL/c 小鼠 4 只,体质量 16~20 g,用 10% 的水合氯醛麻醉致死,浸泡在 75% 乙醇中进行表面消毒 5~10 min;在工作台无菌操作下切开皮肤、分离皮下组织、肌肉,暴露股骨、

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30871053)。 作者简介:潘家义(1973-),主治医师,博士,主要从事心脏病研究。 △ 通讯作者, Tel:13707483674; E-mail:zhougqin@21cn.com。

胫骨;截取胫骨和股骨,剪去干骺端,使用装有消毒磷酸盐缓冲液(PBS)的 1 mL 一次性无菌注射器反复冲洗骨髓腔 4~5 遍,直到骨髓腔变为白色。(1)密度梯度离心法:将冲洗液小心加入到 2 倍体积小鼠干细胞细胞分离液 Percol 分离液的表面,28 ℃ 下 2 000 r/min 离心 15 min,小心吸取第 2 层的细胞,移入另一试管,加入 2 mL PBS,28 ℃ 下 1 000 r/min 离心 5 min,冲洗 MSCs,倒掉上清液,加入含有 15% PBS、链霉素 100 U/mL、青霉素 100 U/mL 的低糖 DMEM 培养液,反复吹打细胞,制成单细胞悬液,滴一小滴细胞悬液于血小板计数仪上计数,配成约 1×10^6 个/mL 的细胞密度,接种于塑料培养瓶中。置于 37 ℃、5% CO_2 温箱中培养。(2)全骨髓贴壁培养方法:将冲洗液小心加入离心管,28 ℃ 下 2 000 r/min 离心 15 min;倒掉上清液,如上述方法加入培养液(细胞密度 1×10^6 个/mL),接种于塑料培养瓶中。置于 37 ℃、5% CO_2 温箱中培养。

1.2.2 骨髓 MSCs 的扩增和传代 待 MSCs 长到 80%~90% 融合时,倾倒入瓶中培养液,用 PBS 液冲洗 3 次,滴入 0.25% 胰蛋白酶消化液,在 37 ℃ 恒温培养箱中消化 2 min。显微镜下可见细胞脱壁、团缩变圆,滴入 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养液终止消化,吹打、轻拍瓶底后,收细胞入离心管,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入上述培养液 4 mL,吹打管底,制成细胞悬液,按细胞密度 1×10^6 个/mL,重新接种到培养瓶中,按 1:2 的比例进行传代。置入恒温培养箱中继续培养。

1.2.3 细胞生长曲线制作 (1)准备好计数板,取生长状态良好的 P3 代细胞,制成单细胞悬液,细胞以 4×10^4 个/mL 的密度接种在 24 孔培养板内,共接种 24 个孔,每孔加入培养液 0.2 mL。接种后第 2 天开始每隔 24 h 对 3 个孔的细胞稍作胰酶消化,制成混悬液,再利用计数板进行计数细胞,共计数 8 d;以培养时间为横轴,细胞数为纵轴,描绘在半对数坐标上。连接成曲线后即成该细胞的生长曲线。

1.2.4 流式细胞仪骨髓 MSCs 表面抗原鉴定 收集 C57BL/c 小鼠间充质干细胞至少 3 瓶(1×10^6 个/mL 细胞密度),倒掉培养基,用 PBS 液冲洗 2 遍,加入消化酶 1 mL,37 ℃ 孵育 2 min,轻拍后加入培养基 3 mL 终止消化,收集细胞至 15 mL 离心管,900 r/min 离心 8 min,弃上清液,PBS 6 mL 重悬,重复离心再弃上清液,用 450 μL 重悬,取 6 μL 出来稀释 10 倍,计数细胞液浓度为 1×10^5 个/mL 为好,取 500 μL 细胞悬液分入 5 个流式管(此后均避光),各管分别加入 FITC 标记 CD29、CD34、CD31、CD45 抗体各 20 μL ,一管作为空白对照,4 ℃ 避光孵育 30 min,各管内加入 600 μL PBS 液,弹均或吹均,1 500 r/min 离心 8~9 min,弃上清液,若细胞数可达 10^6 个/管,则加 300 μL PBS 液重悬,吹均,若不能达此数目,可酌情加入 100~200 μL ,于流式仪机上分析,检测荧光值。

1.2.5 ELISA 法检测培养液中血管内皮生长因子(VEGF)、SDF-1 α 的浓度 加入稀释好后的标准品 50 μL 于反应孔、加入待测样品 50 μL 于反应孔内,立即加入 50 μL 的生物素标记的抗体。盖上膜板,混匀,37 ℃ 温育 1 h;甩去孔内液体,加满洗涤液,振荡 30 s,甩去洗涤液,用吸水纸拍干并重复 3 次。每孔加入 80 μL 的亲酶素-HRP 混匀,37 ℃ 温育 30 h。再次甩去洗涤液、拍干 3 次(方法同前)。每孔加入底物 A、B 各 50 μL ,混匀,37 ℃ 温育 10 min,避光。取出酶标板,加入 50 μL 终止液后测定结果。在 450 nm 波长处测定各孔的光密度(OD)值;根据标准品 OD 值指定标准曲线,根据各检测样本的 OD 值,按标准曲线计算得出各样本浓度。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析(ANOVA),组间两两比较采用 ANOVA 中的 q 检验法,两组之间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 种方法取得 MSCs 的形态观察 细胞接种培养瓶 24 h 后,倒置相差显微镜下观察,可见大量悬浮细胞存在,全骨髓贴壁培养法经过 2~3 次换液后可去除悬浮细胞,可见贴壁细胞中有单个或几个细胞呈短棒状变化;观察中可见全骨髓贴壁原代培养时,经几次换液后瓶底可见更多棒状细胞并渐出现较为集中的集落,一般第 2~5 天为生长潜伏期,细胞增殖较慢,第 6~14 天为细胞的快速增殖期,集落中的细胞不断增殖并逐渐增大变形,并向附近迁移扩大,较大集落可见细胞呈梭形且作放射状排列,15~18 d 细胞融合可达 90%;密度梯度离心法所得细胞有更长的生长周期,增殖明显慢于全骨髓贴壁培养法,有的要达 90% 融合可能需要 3~4 周时间,方法差别的影响可以影响 2~4 代,此后差别慢慢消失。细胞生长也渐趋均匀一致,可呈菊花状和放射状生长(图 1~8)。

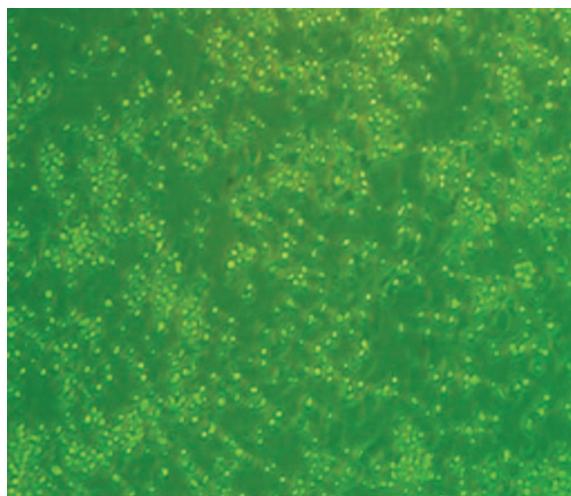


图 1 密度梯度离心 P_0D_1 ($\times 20$)

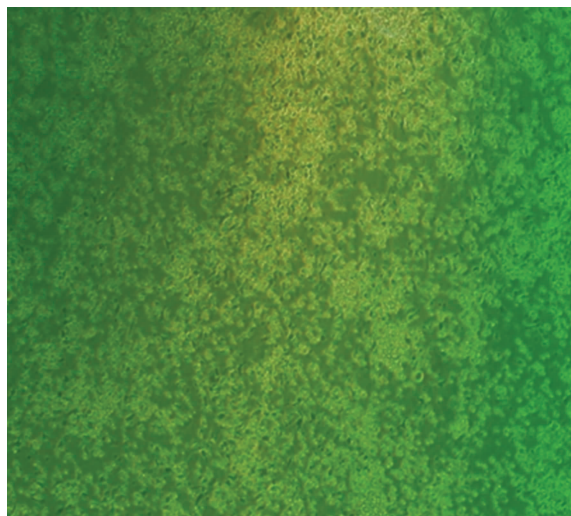


图 2 全骨髓贴壁培养刚从骨髓 P_0D_0 ($\times 20$)

2.2 流式细胞仪鉴定骨髓 MSCs 的表面抗原 流式细胞仪表面抗原分析结果,检测显示培养第 3 代细胞表面抗原阳性表达率分别为 CD29(93.02%)、CD45(5.71%)、CD31(9.51%)、CD34(4.57%),则所得细胞阳性表达 CD29,阴性表达 CD45、

CD31、CD34,与以往文献报道的 MSCs 表达的 表面抗原特征相符,见图 9~12。

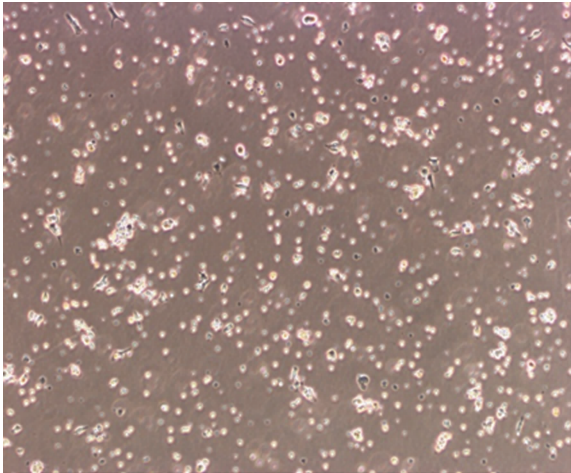


图 3 密度梯度离心 P₀D₅ (×20)

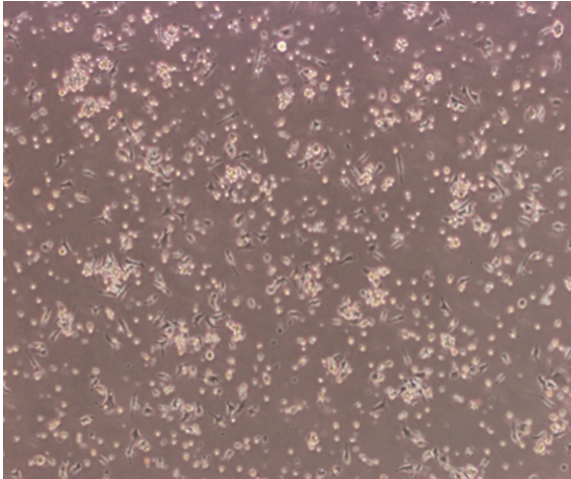


图 4 全骨髓贴壁培养刚从骨髓 P₀D₃ (×20)

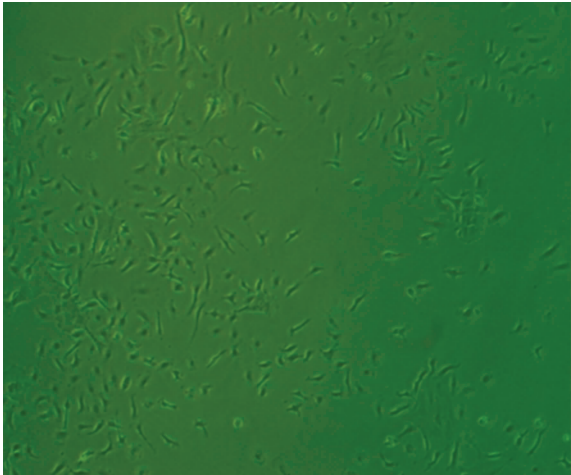


图 5 密度梯度离心 P₀D₇ (×20)

2.3 骨髓 MSCs 的生长曲线 原代细胞培养有较长的生长周期,全骨髓贴壁分离培养法可见有较快的增长速度;4 代后两组细胞潜伏期均缩短为 2 d 左右,从第 3 天起细胞增殖开始加快,进入指数增殖期,至第 6~7 天,细胞增殖速度再次减慢,处于增殖平台期,第 4~12 代生长曲线渐趋一致(图 13)。多次传代后细胞增殖缓慢,细胞变得阔大,折光性变差,细胞凋亡逐渐增多。

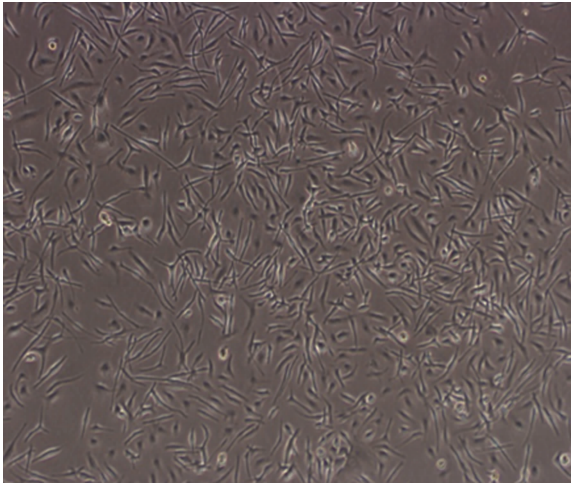


图 6 全骨髓贴壁 P₀D₇ (×20)

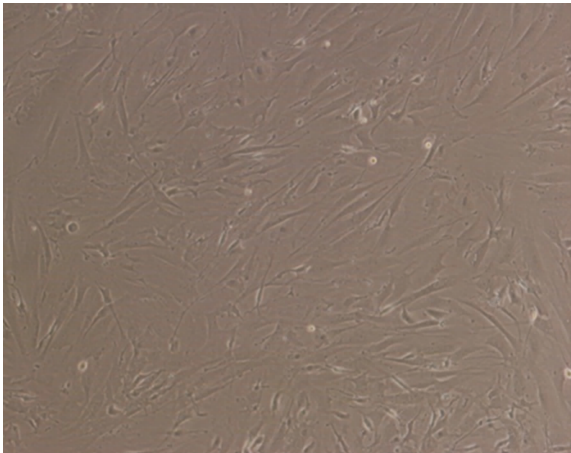


图 7 密度梯度离心 P₃D₁₆ (×20)

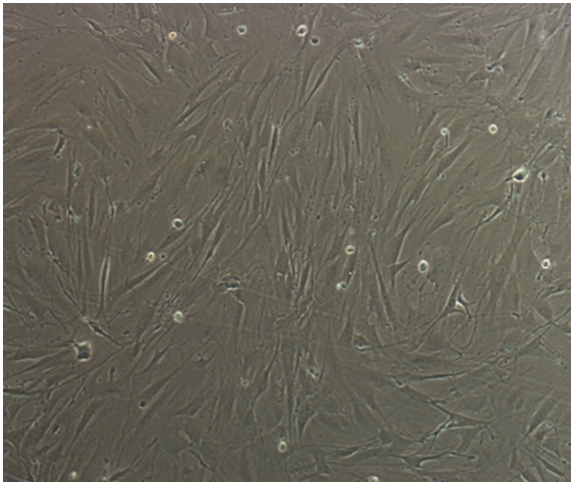


图 8 全骨髓贴壁 P₃D₁₂ (×20)

2.4 2、3 代细胞培养液中的 VEGF、SDF-1 α 的变化 留取 2、3 代细胞培养换液时的培养液作 ELISA 检测其中 VEGF、SDF-1 α 的浓度,可见培养液中始终维持着低浓度的 VEGF、SDF-1 α 。全骨髓贴壁培养组的细胞培养液中的 VEGF、SDF-1 α 平均浓度均高于密度梯度离心组,差异有统计学意义($P<0.05$)。全骨髓贴壁培养组、密度梯度离心组比较,可见培养第 3 天的 VEGF、SDF-1 α 浓度低于第 5 天和第 7 天,差异有统计学意义($P<0.05$),而第 5 天、第 7 天的 VEGF、SDF-1 α 浓度比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 12~13、表 1。

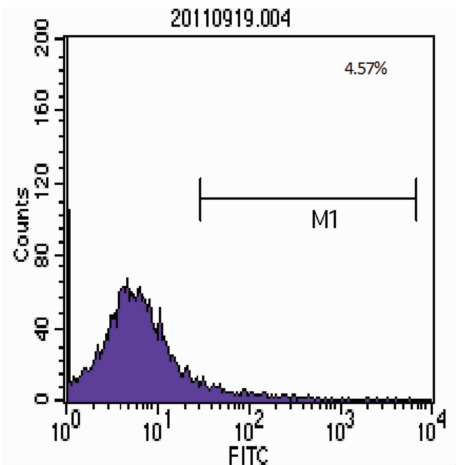


图 9 CD34⁻

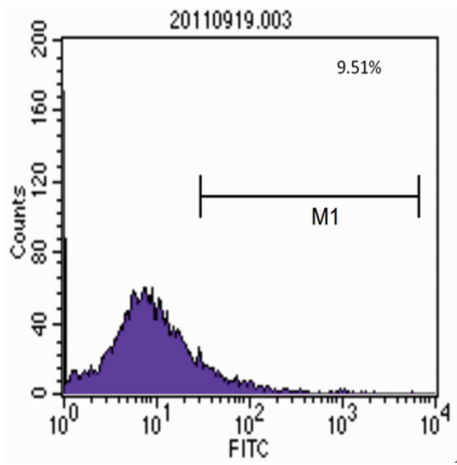


图 12 CD31⁻

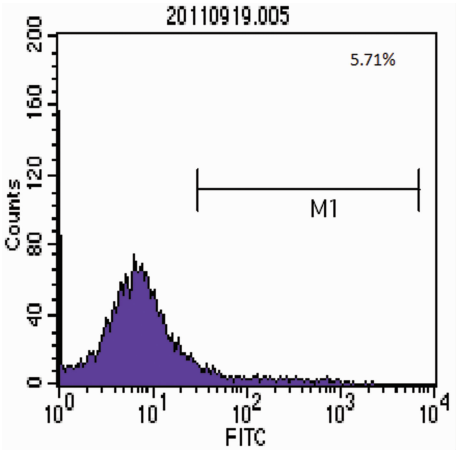


图 10 CD45⁻

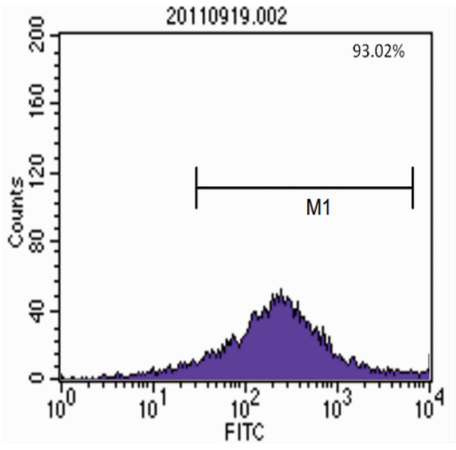


图 11 CD29⁺

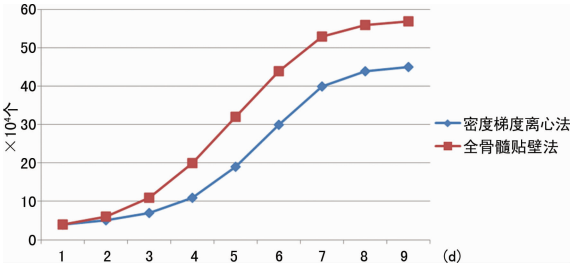


图 13 不同方法所得 MSCs 的不同生长曲线

3 讨 论

骨髓 MSCs 是有着多向分化潜力的非造血干细胞,可以分化成脂肪、骨骼肌、骨、软骨和结缔组织细胞,也能够分化成心肌细胞,这一点对心脏修复是很有吸引力的,因而,其在缺血性心脏病干细胞治疗中研究较多。除具有自我更新和多向分化潜能外,该干细胞还具有来源充足、细胞培养成活率高、低免疫排斥反应、易于外源基因的转染和表达等优点,因此,引起学者们的广泛关注。但人骨髓中的 MSCs 水平极低,在骨髓单核细胞所占比例仅为 0.01%,难以满足组织工程学的需要。因此,需选择最有效率的方法进行体外扩增也成为干细胞治疗最为关注的一方面。

本研究将 Friedenstein 等^[2]建立的全骨髓贴壁细胞分离法和密度梯度离心法做了比较,发现密度梯度离心法也可以有效地将红细胞、白细胞、单核细胞分层且对细胞活性影响较小,但也破坏了 MSCs 生长的骨髓微环境;而全骨髓贴壁分离法操作简便、快速;虽然所得细胞成分复杂,却可以根据 MSCs 贴壁生长而造血细胞悬浮生长的特性对二者进行分离,对细胞活性影响小,且由于保留了骨髓中有利于生长的细胞因子和促黏附物质,有着更为适宜的干细胞生长微环境,促使 MSCs 生长增殖旺盛,并且经换液传代 2~3 代后细胞纯度可达到 98% 以上。

骨髓 MSCs 培养的适宜环境研究一直是众多研究者关心的问题,包括选择适宜培养基、适宜的细胞接种密度、各种信号分子对骨髓 MSCs 的增殖分化影响等。目前,研究培养基有 α-MEM、L-DMEM、IMDM 等,其中,以 L-DMEM 和 α-MEM 为佳。本研究采用 L-DMEM 和 10% 的胎牛血清获得了较好的培养效果。另外,首次接种密度也很重要,接种密度太低会影响细胞间信息传递而使细胞生长受限,本实验首次接种密度一般在 4.0×10⁵⁻⁶ 个/mL 左右。目前,对于首次换液的时间目前无统一标准,本培养法采用 12 h 后全量换液,这样便于更好

表 1 2 种方法细胞培养液中 VEGF、SDF-1α 浓度比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

项目	时间	密度梯度离心法	全骨髓贴壁法	P
VEGF	第 3 天	3.81±0.38	5.68±0.34	<0.01
	第 5 天	5.74±0.38★	8.40±0.37★	<0.01
	第 7 天	6.37±0.42★	8.17±0.34★	<0.01
SDF-1α	第 3 天	3.58±0.29	7.22±0.42	<0.01
	第 5 天	5.48±0.41★	9.32±0.46★	<0.01
	第 7 天	6.39±0.41★	9.96±0.27★	<0.01

★: P<0.01,与第 3 天时比较。

地去除悬浮细胞,得到更为纯化的原代细胞。原代细胞生长缓慢,细胞初成圆形,贴壁后呈梭形、多边形、集落样生长。本研究中,全骨髓贴壁分离法约生长 14~18 d 左右可达 80%~90% 细胞融合,可进行传代;而密度梯度离心法则需 3~4 周左右可达 80%~90% 细胞融合,甚至更长,传 3、4 代后生长特性方渐趋相近。本研究还观察到全骨髓贴壁法所得 MSCs 传至 10 代仍可保持旺盛的生长,而密度梯度离心法细胞则变得宽大、折光性差。本研究认为 2 种方法表现出的不同生长特性和其两者的细胞生长微环境的差异有关。

MSCs 培养中可以自分泌或旁分泌各种细胞因子、黏附分子、生长因子,构成了培养中的微环境,促进 MSCs 增殖和分化。据研究, MSCs 可以分泌表达 IL-1、IL-6、SDF-1 α 、FGF、EGF 等^[3]。Lucarelli 等^[1]实验显示 FGF、EGF、PDGF 信号促进了 MSCs 的生长,无这些生长因子,细胞生长缓慢、形态扁平,可向纤维母细胞发展^[4]。另有研究表明 IGF 可提高增殖速度,并缩短对数增长时间,而且这种促进作用呈浓度依赖性^[5]。MSCs 分泌的各种细胞因子也可促进细胞迁移分布,不同的生长因子对细胞特异分化方向也有重要意义,例如 FGF 和 TGF 在向软骨细胞分化中起着一定作用^[6],而 VEGF 可促进 MSCs 向内皮细胞分化,有利于伤口或损伤的愈合^[7]。本研究在可见全骨髓贴壁培养组的 VEGF、SDF-1 α 等的分泌水平高于密度梯度离心分离组,这也说明了密度梯度离心方法对 MSCs 细胞功能活性有一定的负面影响,考虑与分离液和高速离心对细胞的损害有关。步骤复杂、提取时间较长也会使得一部分 MSCs 在这过程中失活、死亡。因此,密度梯度离心组的细胞要达到适当的细胞融合度需更长的生长周期。实验中还观察到两组细胞始终维持着低浓度的 VEGF、SDF-1 α ,相信这对培养细胞维持持续的增长有重要的意义。对那些 MSCs 培养失败个别培养板做生长因子检测,发现在最初的几天 VEGF、SDF-1 α 可以维持一定的浓度,此后的过程中发现其 VEGF、SDF-1 α 浓度渐渐下降,细胞生长也难以维持。因此,有研究者尝试在培养液中适当加以各种生长因子如 VEGF、IGF、FGF、SDF-1 α ^[8-9],可促进 MSCs 自分泌和旁分泌的作用,也大大促进其增殖生长,成效可见。但有研究者认为, MSCs 在特定环境中有一定的生长因子分泌模式,某一因子分泌过多会促使其向特定细胞群分化,例如成脂分化、成骨细胞分化^[10-12]等,而且生长因子会对 MSCs 的表型产生的怎样影响也需进一步探讨。微环境是 MSCs 增殖生长的土壤, MSCs 通过旁分泌自分泌各种生长因子为自身营造最佳环境,密度梯度离心过程中,各种因素对细胞的损害,也伤及其自分泌旁分泌的作用,使得在其后的生长中难以营造最佳微环境。另外,有报道认为全骨髓贴壁会增加污染的机会,这一点与作者观察的相反,本研究中密度梯度离心却表现更多污染率,可能与复杂的过程、提取时间过长有关,本研究则认为污染与操作的过程和培养环节有关。

参考文献

[1] Lucarelli E, Beretta R, Dozza B, et al. A recently developed bifacial platelet-rich fibrin matrix[J]. *Eur Cell Mater*, 2010, 20: 13-23.

[2] Friedenstien AJ, Latzinik NW, Grosheva AG, et al. Marrow microenvironment transfer by heterotopic transplantation of freshly isolated and cultured cells in porous sponges[J]. *Exp Hematol*, 1982, 10(2): 217-227.

[3] Novotny NM, Markel TA, Crisostomo PR, et al. Differential IL-6 and VEGF secretion in adult and neonatal mesenchymal stem cells: role of NFkB[J]. *Cytokine*, 2008, 43(2): 215-219.

[4] Ng F, Boucher S, Koh S, et al. PDGF, TGF- β , and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells(MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages[J]. *Blood*, 2008, 112(2): 295-307.

[5] Longobardi L, Granero-Moltó F, O'Rear L, et al. Subcellular localization of IRS-1 in IGF-I-mediated chondrogenic proliferation, differentiation and hypertrophy of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Growth Factors*, 2009, 27(5): 309-320.

[6] Ronziere MC, Perrier E, Mallein-Gerin F, et al. Chondrogenic potential of bone marrow and adipose tissue derived adult human mesenchymal stem cells[J]. *Biomed Mater Eng*, 2010, 20(3): 145-158.

[7] Rustad KC, Wong VW, Sorkin M, et al. Enhancement of mesenchymal stem cell angiogenic capacity and stemness by a biomimetic hydrogel scaffold[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(1): 80-90.

[8] Huang YL, Qiu RF, Mai WY, et al. Effects of insulin-like growth factor-1 on the properties of mesenchymal stem cells in vitro[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2012, 13(1): 20-28.

[9] Molchanova EA, Bueverova EI, Starostin VI, et al. The sensitivity of mesenchymal stromal cell subpopulations with different times of adhesion property manifestation and derived from hemopoietic organs to growth factors EGF, bFGF, and PDGF[J]. *Izv Akad Nauk Ser Biol*, 2011, 24(2): 133-144.

[10] Coutu DL, Francois M, Galipeau J. Inhibition of cellular senescence by developmentally regulated FGF receptors in mesenchymal stem cells[J]. *Blood*, 2011, 117(25): 6801-6812.

[11] Caplan AI, Correa D. PDGF in bone formation and regeneration: new insights into a novel mechanism involving MSCs[J]. *J Orthop Res*, 2011, 29(12): 1795-1803.

[12] Graham S, Leonidou A, Lester M, et al. Investigating the role of PDGF as a potential drug therapy in bone formation and fracture healing[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2009, 18(11): 1633-1654.

(收稿日期:2014-10-16 修回日期:2014-12-25)