

小鼠脐带间充质干细胞的体外诱导分化

朱慧^{1,2Δ}, 叶莉^{3Δ}, 何洁¹, 余璞^{1,2}, 王金祥¹, 王强¹, 赵晶¹, 庞荣清^{1*}, 白杰英^{3*}

(1. 成都军区昆明总医院云南省干细胞工程实验室, 昆明 650032; 2. 昆明医科大学昆明总医院临床学院, 昆明 650032;
3. 军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071)

【摘要】 目的 分离扩增小鼠脐带间充质干细胞(mouse umbilical cord mesenchymal stem cells, mUCMSCs)探讨其是否可诱导成软骨、脂肪和成骨细胞。**方法** 通过贴壁培养法将 mUCMSCs 体外分离、扩增、纯化, 倒置显微镜下观察细胞的形态特征, 运用流式细胞仪检测分析细胞的抗原标志表达进行鉴定。运用诱导培养液对分离的 mUCMSCs 分别定向诱导培养为软骨、脂肪和成骨细胞。**结果** 运用组织贴块培养法可从新鲜脐带中分离到贴壁生长的成纤维样细胞, 这些细胞高表达 CD29、CD90 和 CD105, 低表达 CD34。成软骨诱导后阿新兰染色呈蓝色; 成脂诱导后油红 O 染色, 出现红色脂滴; 茜红素染色成骨诱导的 mUCMSC, 可见红色结节。**结论** 贴壁培养法分离培养所获得的 mUCMSCs 在体外可诱导分化为软骨、脂肪和成骨细胞。

【关键词】 小鼠; 脐带间充质干细胞; 细胞培养; 成软骨诱导; 成脂诱导; 成骨诱导

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015)06-0622-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.06.015

Isolation and differentiation in vitro of mouse umbilical cord mesenchymal stem cells

ZHU Hui^{1,2}, YE Li³, HE Jie¹, YU Pu^{1,2}, WANG Jin-xiang¹, WANG Qiang¹,
ZHAO Jing¹, PANG Rong-qing^{1*}, BAI Jie-ying^{3*}

(1. Key Laboratory of Stem Cells and Regenerative Medicine, PLA Kunming General Hospital of Chengdu Military Region, Kunming 650032, China; 2. Kunming Medical University Clinical College in Kunming General Hospital Kunming 650032; 3. Laboratory Animal Center of the Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

【Abstract】 Objective To isolate, culture and identify mouse umbilical cord mesenchymal stem cells(mUCMSCs) and to study whether they can be induced to differentiate into adipocytes, chondrocytes and osteoblasts. **Methods** The mUCMSCs were isolated and expanded by adherent culture from fresh mouse umbilical cord. The morphological characteristics of the resulting cells were observed under inverted phase contrast microscope, and their expression of mesenchymal surface markers was identified and analyzed by flow cytometry. Then mUCMSCs were induced to differentiate into chondrocytes, adipocytes and osteoblasts in vitro. **Results** Fibroblast-like cells could be isolated from the fresh umbilical cord by adherent culture. These adherent cells highly expressed mesenchymal markers including CD29, CD90 and CD105 while low expression of CD34. The cells were successfully induced to differentiate into chondrocytes, adipocytes and osteoblasts. **Conclusions** The mUCMSCs isolated from fresh mouse umbilical cord by adherent culture have potential of differentiation into chondrocytes, adipocytes and osteoblasts.

【Key words】 Mouse; Umbilical cord mesenchymal stem cells; Cell culture; Chondrocytes induction; Adipocytes induction; Osteoblast induction

【基金项目】 云南省基金项目(2011HB050, 2013DA004); 十二五重大项目(2011ZXJ09201-031); 国家自然科学基金(31272385); 北京市自然科学基金(5152023)。

【作者简介】 朱慧(1982-), 女, 硕士研究生, 研究方向为干细胞工程, E-mail: 839589513@qq.com; 叶莉(1988-), 女, 实习研究员, 研究方向为人兽共患病疾病模型, E-mail: 18066045532@163.com。Δ 为本研究的共同第一作者。

【通讯作者】 庞荣清(1971-), 男, 副主任医师/副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为干细胞与再生医学, E-mail: pangrq2000@aliyun.com; 白杰英(1977-), 男, 副研究员, 研究方向为人兽共患感染性疾病致病机理, E-mail: baijieying@126.com。

随着干细胞生物学研究不断发展,分离间充质干细胞用于干细胞治疗疾病动物模型和干细胞自身或诱导为体外细胞模型成为生物疗法、新药研发等应用领域的两个重要发展方向。小鼠是常用的实验动物,分离小鼠间充质干细胞是开展干细胞诱导分化、干细胞治疗实验、干细胞模型研究的前提条件,是拓展小鼠作为实验动物在医学研究中广泛应用的有效手段。间充质干细胞最早从骨髓^[1]分离获取,目前较受研究者关注,但骨髓来源的间充质干细胞活性容易受到供体年龄的限制^[2],而且骨髓采集数量有限。小鼠骨髓分离间充质干细胞更是如此,一方面其体型小,骨髓数量非常有限,另一方面从小鼠骨髓扩增出间充质干细胞本身就存在一系列困难^[3]。我们前期研究发现脐带是间充质干细胞的一个重要来源,本实验首次分离鉴定了小鼠脐带间充质干细胞(mouse umbilical cord mesenchymal stem cells, mUCMSC)并开展了体外诱导分化实验,丰富了小鼠间充质干细胞的来源,为以小鼠作为实验动物开展再生医学和干细胞药物筛选研究提供了技术方法和重要的实验材料。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级 C57BL/6 雌性小鼠,每次取材 1~2 只,8 周龄,怀孕 14~15 d,体重 25~27 g,由昆明医科大学实验动物中心提供【SCXK(滇)2013-0001】,饲养并取材于昆明总医院动物实验中心【SYXK(滇)2014-0010】。实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》,按 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂和仪器

DMEM/F12 培养液、胎牛血清和 trypsin-EDTA 均购自 Invitrogen 公司;青-链霉素溶液购自 Biological Industries。细胞增值分析溶液(CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent Cell Proliferation Assay)购自 Promega 公司;FITC 标记的抗小鼠流式单抗 CD29、CD34 和 PE 标记的 CD105 均购自 eBioscience 公司,APC 标记的 CD90 购自 R&D 公司。仪器主要有二氧化碳培养箱(Healforce)、显微镜(Nikon)、酶标仪(Rayto)和流式细胞仪(BD)。

1.3 实验方法

1.3.1 mUCMSCs 的分离与培养

取怀孕 16~17 d 的 C57BL/6 小鼠,采用脱颈处死法处死,将串珠状子宫浸泡于 1% 双抗液中带入细胞室超净工作台,无菌采集脐带一根或数根混合一起,生理盐水清洗两遍后,置于 1.5 mL 离心管,用剪刀剪碎成糊状,加入含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液(500 μ L)悬浮组织和细胞,转移至底面积为 25 cm² 的培养瓶后放入 37℃、5% CO₂ 培养箱中静置培养,注意尽量使组织碎片和细胞均匀铺于瓶底。显微镜下观察细胞生长特性及形态特征,培养 24 h 后可见贴壁细胞,补足全量培养液,72 h 全量换液。以后每 2~4 d 换液,待细胞生长至 90% 以上融合状态时,用 0.25% 的 trypsin-EDTA 消化传代。

1.3.2 mUCMSCs 的生长曲线

消化收集第 4 代细胞,计数后用 10% FBS 培养液调整细胞浓度为 2×10^4 个/mL,取 100 μ L/孔接种于 96 孔培养板除四周边缘之外的孔,每孔设置 9 个复孔。第 3 天和第 7 天全部细胞换液。接种后 24 h 开始,每天同一时间点取一组复孔换液后加入细胞增殖分析液 200 μ L,加液后 3 h 用酶标仪测 490 nm 处吸光度值,连续测试 8 d 之内细胞增殖情况。取各时间点吸光度的平均值,以时间为横坐标、吸光度值为纵坐标,绘制细胞生长曲线。

1.3.3 mUCMSCs 表面标志测定

消化收集第 4 代细胞,调整细胞浓度至 5×10^5 个/mL,取 1 mL 细胞分别加入单克隆抗体 CD29-FITC、CD34-FITC、CD90-APC、CD105-PE 充分混匀,避光室温孵育 30 min,加入 PBS 离心(1500 r/min, 4 min)漂洗去除未结合抗体后,流式细胞仪检测细胞表面抗原标志的表达。

1.3.4 mUCMSCs 成软骨诱导分化

收集第 4 代 mUCMSCs 并调整细胞悬液为 1.6×10^7 个/mL,每孔加 5 μ L 到 12 孔板的中心,形成一个细胞滴,2 h 后再缓慢加入成软骨诱导分化培养液,2~3 d 换液一次。连续培养 14 d 后,4% 多聚甲醛固定后石蜡包埋作病理切片,脱蜡后加入阿新蓝染色。

1.3.5 mUCMSCs 向脂肪细胞诱导分化

消化收集第 4 代 mUCMSCs 以 4×10^4 个/孔接种细胞于 12 孔板中培养 6 h 后,更换培养液为间充质干细胞成脂诱导分化培养基 A 液,3 d 后吸走 A 液,加入 B 液,24 h 后换回 A 液,A、B 两液交替左右 4 次,继续用 B 液培养,连续培养至第 14 天,4% 多

聚甲醛固定后加入油红 O 染色。

1.3.6 mUCMSCs 成骨细胞诱导分化

消化收集第 4 代 mUCMSCs 以 4×10^4 个/孔接种细胞于 12 孔板中培养 6 h 后, 更换培养液为成骨诱导分化培养液, 3~4 d 换液 1 次, 培养 21 d 后, 固定并加入茜素红染色。

2 结果

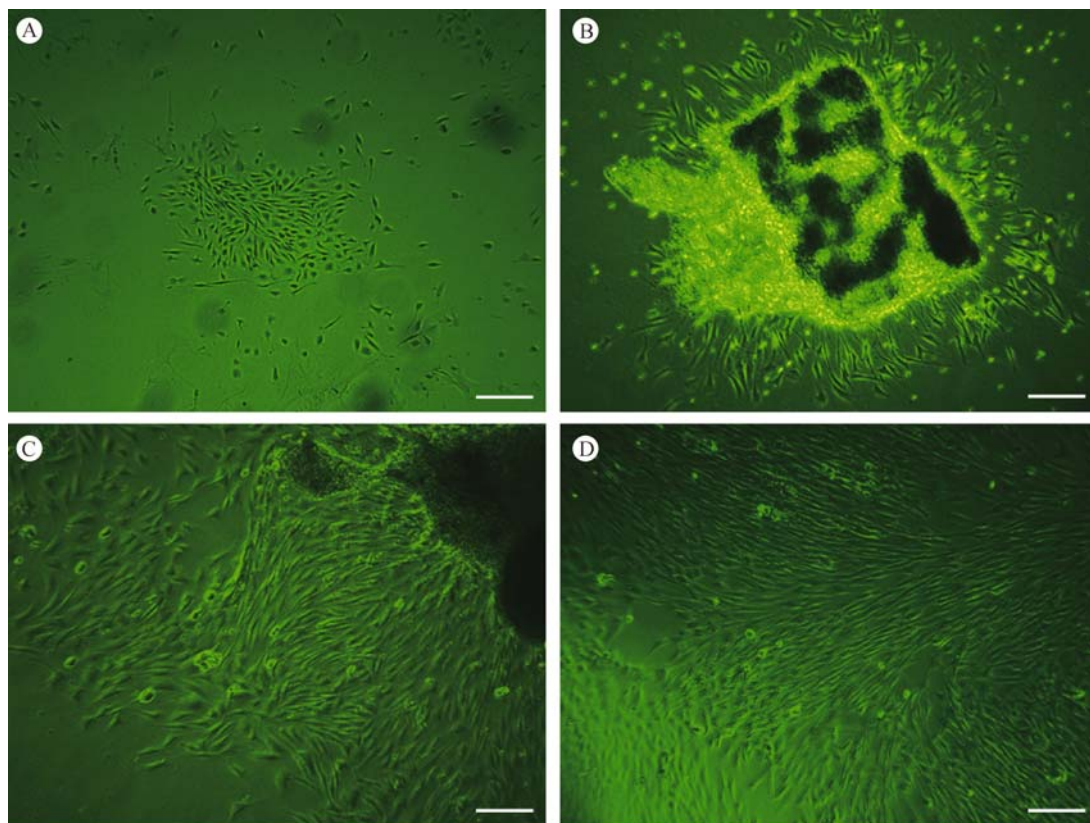
2.1 mUCMSCs 形态学观察

原代细胞: 从 1 只健康临产的 C57BL/6 小鼠, 一次可获得约 1 cm 长的脐带约 10 根, 剪碎后贴壁法静置培养 24 h 以后, 即可在倒置显微镜下观察到少许梭形贴壁细胞由组织块边缘或以散在的方式长出(见图 1A), 48 h 后贴壁细胞增多(见图 1B), 72 h

后可见少数细胞集落形成(见图 1C), 第 7~10 天可见细胞生长至 80% 融合状态。

传代细胞: 原代细胞培养至第 10 天左右可第一次传代, 之后每 3~5 d 传代 1 次, 传代后细胞生长较快, 镜下可见这些细胞形态较为均一, 呈梭形如成纤维细胞样, 密集排列呈现漩涡状生长(见图 1D)。传代时消化接种后 30 min 即有细胞贴壁, 此时细胞仍为圆形, 1.5 h 可见较多细胞贴壁且已变为梭形, 3 h 左右贴壁细胞达 70% 以上。

单独将一根脐带剪碎后用上述方法培养, 也可分离到贴壁生长的成纤维细胞样细胞, 只是不太容易分离成功, 常见到原代细胞较少或死亡, 且增长速度较慢, 但细胞数量较多后细胞增殖速度明显加快, 传代后增长速度较快。



注: A. 培养 24 h 后散在贴壁生长的原代 mUCMSCs (bar = 40 μm); B. 培养 48 h 组织块边缘长出的原代 mUCMSCs (bar = 40 μm); C. 培养 72 h 呈漩涡状生长的原代 mUCMSCs (bar = 40 μm); D. 传代后地天呈漩涡状生长的 P4mUCMSCs (bar = 40 μm)。

图 1 C57BL/6UCMSC 在光镜下的形态特征

Note. A. Scattered primary cells with adherent growth (scale bar = 100 μm); B. Primary cells growing from the cutting edge of tissue (scale bar = 40 μm); C. Swirly growing primary cells (scale bar = 40 μm); D. Swirly growing cells with dense arrangement after passage (scale bar = 40 μm).

Fig. 1 Morphological characteristics of the mUCMSC

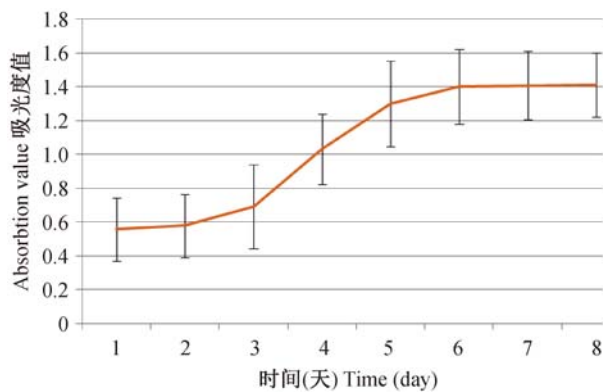


图2 P4 mUCMSC 的生长曲线

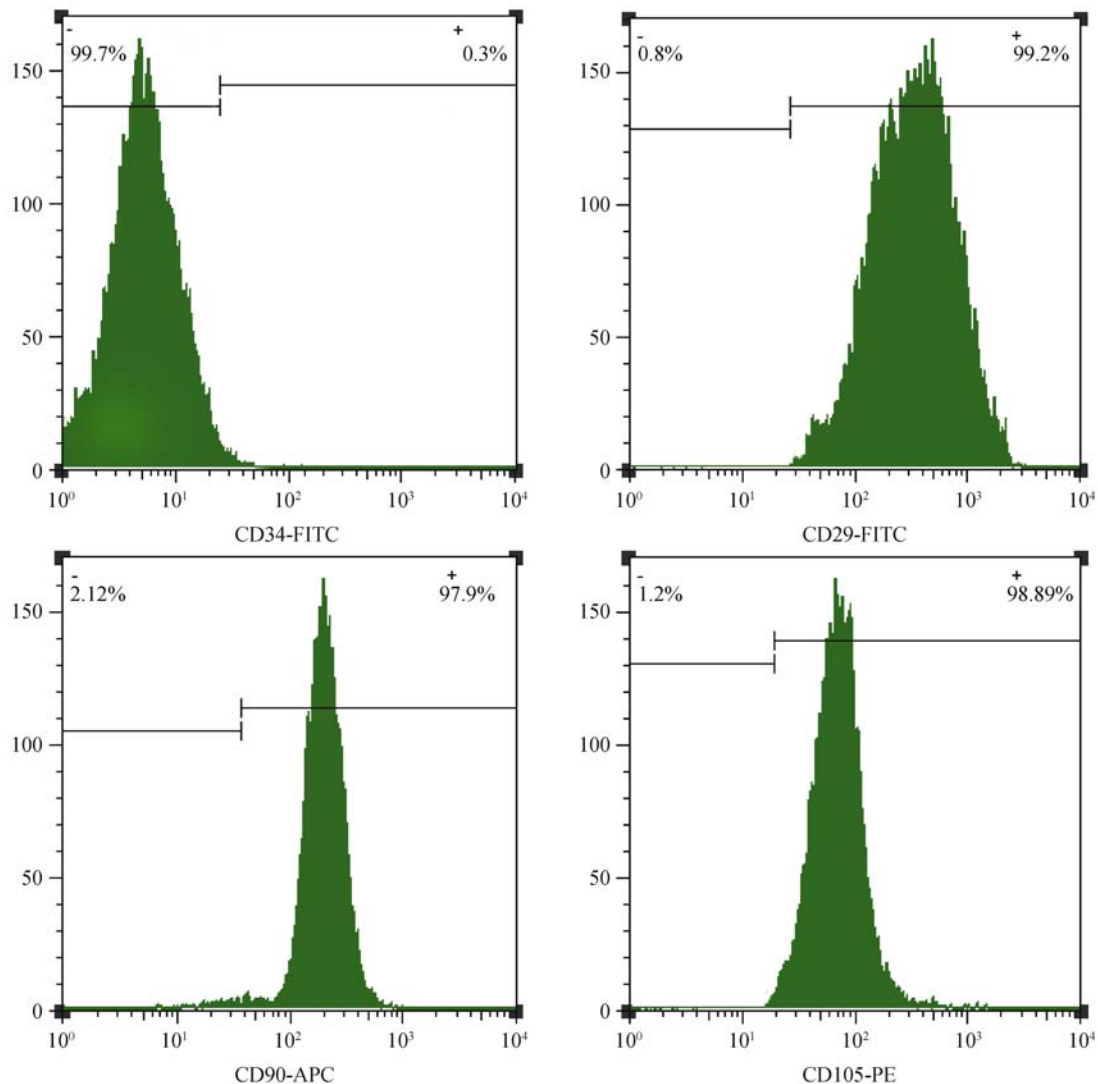
Fig. 2 The growth curve of P4 mUCMSC

2.2 mUCMSCs 生长曲线

mUCMSCs 传代后,经过 6~8 d 的增殖生长,完成一个细胞传代周期,但细胞传代后不是匀速生长,表现出明显的阶段性,第 1~2 天细胞增殖缓慢,从第 3 天开始快速增殖生长,至第 5 天达到顶点,以后进入相对稳定状态,体现了细胞潜伏期、快速增殖期和平稳期三个典型的细胞增殖生长阶段。

2.3 抗原标志测定

收集生长良好的第 4 代 mUCMSC,加入 CD29、CD34、CD90、CD105 流式单抗孵育后上机检测,细胞流式抗原标志结果显示:CD34 低表达,而 CD29、CD90、CD105 高表达(见图 3),即表达了间充质干细胞的常见抗原标志,低表达造血干细胞常见抗原标志。



注:CD34 阴性表达;CD29 阳性表达;CD90 阳性表达;CD105 阳性表达。

图3 mUCMSC 的免疫表型分析

Note. Negative expression of CD34; Positive expression of CD29; Positive expression of CD90; Positive expression of CD105.

Fig. 3 Immunophenotype analysis of the cUCMSC

2.4 成软骨诱导分化

第 4 代 mUCMSCs 经成软骨分化诱导培养,不断培养细胞会形成一个细胞团漂浮起来,14 d 后,对软骨球固定并行石蜡包埋切片,阿新兰染色后可在光镜下观察到部分组织呈蓝色(见图 4A)。

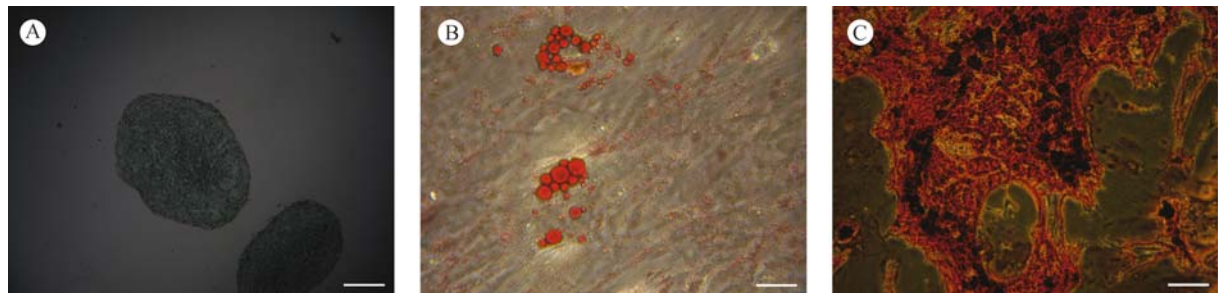
2.5 成脂诱导分化

第 4 代 mUCMSCs 成脂分化诱导培养 6 d 左右,

镜下可观察到大量脂滴的出现,A、B 液交替后,用 B 液继续培养细胞内脂滴逐渐变大变圆,14 d 后行油红 O 染色,镜下可见脂滴被染成橙红色(见图 4B)。

2.6 成骨诱导分化

第 4 代 mUCMSCs 成骨分化诱导培养 21 d 后,可观察到白色结节,行茜素红染色后,可观察到钙质结节被染成红色(见图 4C)。



注:A. 成软骨分化诱导培养后,阿新蓝染色;B. 成脂分化诱导培养后,油红 O 染色;C. 成骨分化诱导培养后,茜素红染色(A、B: bar = 100 μ m, C: bar = 40 μ m)。

图 4 mUCMSC 的体外诱导分化

Note. A. After induction culture for chondrogenic differentiation, as shown by Alcian blue staining; B. After induction culture for adipogenic differentiation, as shown by oil red O staining; C. After induction culture for osteogenic differentiation, as shown by alizarin red staining. (A, B: scale bar = 100 μ m, C: scale bar = 40 μ m).

Fig. 4 Results of induction culture in vitro for differentiation of the mUCMSC

3 讨论

本研究结果表明:1 次可以从 1 只 C57BL/6 小鼠获得约 10 根脐带,剪碎后在 10% FBS 的 DMEM/F12 培养条件下可以分离到大量贴壁,呈漩涡状生长的成纤维细胞样细胞,细胞生长呈现潜伏期、快速增殖期和平稳期 3 个典型的生长阶段。流式分析结果显示这些细胞高表达 CD29、CD90、CD105,低表达 CD34,在体外诱导分化条件下培养一定时间后可以分别分化为阿新兰染色阳性的软骨细胞、油红 O 染色阳性的脂肪细胞以及茜素红染色阳性的骨细胞,这些结果与李建国^[3]、Song 等^[4]报道的骨髓来源间充质干细胞类似。根据间充质干细胞的鉴定标准^[5],可以判定这些细胞就是 mUCMSC。实验中我们还发现:采集 1 根小鼠脐带,也可分离到 mUCMSC,但成功率较低,而将 1 只孕鼠所有脐带混合并剪碎后再直接贴壁培养,可以很容易扩增获得大量 mUCMSC。这应该与细胞密度的影响有关,细胞数量越多,细胞自分泌的生长因子越多,越有利于细胞增殖生长。细胞生长曲线显示:第 4 代 mUCMSC 经过 6~8 d 即完成一个扩增周期,从第 3 天开始加速生长,至第 5 天进入饱和稳定状态,3 d 时间内细胞

得到快速扩增,比骨髓来源间充质干细胞生长周期要快^[6],表明 mUCMSC 增殖活性较好。

脐带由两条动脉、一条静脉和大量沃顿胶(Wharton jelly)组成,后者被认为是间充质干细胞的主要来源。因此,从脐带分离间充质干细胞通常要剔除血管和外膜^[7]。C57BL/6 小鼠脐带长约 1 cm,非常柔软娇嫩,几乎不太可能剔除血管和外膜组织。本研究建立的方法可以从 C57BL/6 小鼠、人^[8]、食蟹猴^[9]脐带中轻易分离到 CD29、CD90 和 CD105 阳性率高于 95% 的间充质干细胞,表明血管和外膜组织的存在不影响间充质干细胞的分离,通过传代培养可以达到纯化间充质干细胞的目的。1 只临产的 C57BL/6 母鼠可以提供约 10 根脐带(约 0.3 cm³ 的组织块),有效解决了组织来源困难的问题,而且,脐带含有阳性表达 Oct-4、Nanog 等标志的多潜能干细胞^[10],它们具有比成体组织来源干细胞更强的增殖活性和分化潜能^[11]。可见,从小鼠脐带中分离扩增间充质干细胞,效率更高,品质更好。

本实验建立的分离培养方法,容易规模化生产,可以建立 mUCMSC 库,专供以小鼠为背景的科技工作者开展相关研究。主要包括:(1)作为种子细胞开展干细胞治疗实验。比如以 C57BL/6 小鼠构建

的 mdx 小鼠是肌营养不良研究的常用模型^[12],开展 mUCMSC 治疗 mdx 小鼠实验可以探索临床治疗肌营养不良病人的技术方法。(2)作为细胞模型开展药理或毒理实验。以细胞模型开展药物安全及药物筛选试验是现代生物医学研究常用的实验手段,由于干细胞具有多向分化潜能等独特的生物学特性^[13],使用 mUCMSC 与药物共培养实验代替 C57BL/6 小鼠体内实验,可以直接在细胞水平进行药物筛选、毒理机制研究^[14,15],具有高效率、低成本、高敏感性等特点。(3)分化机制研究。机体组织器官功能的形成是干细胞分化演变的结果,干细胞分化是干细胞治疗的理论基础。分化机制研究是寻找疾病治疗靶点的重要手段,比如,本实验已经证明 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、地塞米松、胰岛素和吡哆美辛等成分与 mUCMSC 共培养一定时间即可将其诱导为软骨细胞,如果进一步深入研究这些成分对 mUCMSC 的影响,就可能发现这些制剂用于软骨相关疾病治疗的作用机制和发病机制。因此,本实验研究结果具有一定的理论意义和潜在的使用价值。

参 考 文 献

- [1] Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells [J]. J Embryol Exp Morphol, 1966, 16(3): 381–390.
- [2] Mundra V, Gerling IC, Mahato RI. Mesenchymal stem cell-based therapy [J]. Mol Pharmaceut, 2013, 10(1): 77–89.
- [3] 李建国, 孙永勋, 冉丕鑫, 等. 小鼠骨髓间充质干细胞的分离、培养及鉴定 [J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(12): 28–31.
- [4] Xu S, De Becker A, Van Camp B, et al. An improved harvest and in vitro expansion protocol for murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. J Biomed Biotechnol, 2010, (2010): 1–10.
- [5] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. Cytotherapy, 2006, 8(4): 315–317.
- [6] Vidal MA, Walker NJ, Napoli E, et al. Evaluation of senescence in mesenchymal stem cells isolated from equine bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue [J]. Stem Cells Dev, 2012, 21(2): 273–283.
- [7] Watson N, Divers R, Kedar R, et al. Discarded Wharton jelly of the human umbilical cord: a viable source for mesenchymal stromal cells [J]. Cytotherapy, 2015, 17: 18–24.
- [8] 庞荣清, 何洁, 李福兵, 等. 一种简单的人脐带间充质干细胞分离培养方法 [J]. 中华细胞与干细胞杂志, 2011, 1(2): 162–167.
- [9] 庞荣清, 何洁, 李瑞生, 等. 食蟹猴脐带间充质干细胞的分离与鉴定 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(4): 66–69.
- [10] Fong CY, Chak LL, Biswas A, et al. Human Wharton's jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells [J]. Stem Cell Rev, 2011, 7(1): 1–16.
- [11] Bhartiya D, Shaikh A, Nagvenkar P, et al. Very small embryonic-like stem cells with maximum regenerative potential get discarded during cord blood banking and bone marrow processing for autologous stem cell therapy [J]. Stem Cells Dev, 2012, 21(1): 1–6.
- [12] Lu A, Poddar M, Tang Y, et al. Rapid depletion of muscle progenitor cells in dystrophic mdx/utrophin^{-/-} mice [J]. Hum Mol Genet, 2014, 23(18): 4786–4800.
- [13] Borhani-Haghighi M, Talaei-Khozani T, Ayatollahi M, et al. Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells can differentiate into hepatocyte-like cells by HepG2 cell line extract [J]. Iran J Med Sci, 2015, 40(2): 143–151.
- [14] 贾源君, 裴轶劲. 干细胞在发育毒性体外模型建立中的应用研究进展 [J]. 中国医药导报, 2015, (2): 152–155.
- [15] 刘楠梅, 梅长林, 张金元, 等. 过表达 CXCR4 的骨髓间充质干细胞对共培养低氧/复氧肾小管上皮细胞的修复作用 [J]. 中华肾脏病杂志, 2013, 11(29): 830–836.

[收稿日期] 2015-06-02