

ICR 小鼠骨髓间充质干细胞分离及生物学特性的探讨

杨超 辛娜 康炜 卢韬 董学君

摘要 目的 探讨分离、培养的 ICR(Institute of Cancer Research, ICR)小鼠骨髓间充质干细胞(mouse bone marrow mesenchymal stem cells, mBM - MSCs)的细胞生物学特性。**方法** 取 6~8 周龄 ICR 小鼠,利用全骨髓反复贴壁和有限稀释培养法分离纯化 mBM - MSCs,观察形态特点,测定生长曲线和活力,利用流式细胞仪分析细胞的周期和鉴定表面抗原,诱导其向成骨、软骨及脂肪细胞分化,采用染色法鉴定。**结果** 新分离的 mBM - MSCs 多呈小圆形,形态规整。培养传代后,细胞多变为梭形,大小较均匀,形态较一致。随着传代的次数增加,细胞的生长曲线、活力及周期呈现快速发育期、平台期和缓慢期;流式结果细胞 CD44、CD73、SCA - 1 呈阳性反应,部分细胞 CD90、CD105、STRO - 1 呈阳性反应,CD11b 和 CD45 呈阴性反应;诱导分化为成骨细胞后其碱性磷酸酶、茜素红和 Von Kossa 银染色均呈阳性反应,分化成脂肪细胞后油红 O 染色呈阳性反应,分化成软骨细胞后阿尔新蓝染色呈阳性反应。**结论** ICR 小鼠骨髓中分离培养出的 MSCs,生物学特点鲜明,适于做进一步研究。

关键词 ICR 小鼠 骨髓间充质干细胞 细胞培养 分化 鉴定

中图分类号 R329.2 R - 332

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.01.024

Investigation on the Isolation and Biological Characteristics of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells of ICR Mice. Yang Chao, Xin Na, Kang Wei, et al. The First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Shaanxi 710077, China

Abstract Objective To investigate the cell biological properties of isolated and cultured mBM - MSCs of ICR. **Methods** Mouse bone marrow mesenchymal stem cells of 6 - 8 weeks old ICR mice were in vitro isolated and purified by whole bone marrow repeated adherent culture and limiting dilution culture method. Cell morphology was observed. Its growth curve and vitality were measured, and its cell cycle and surface antigen markers were analyzed by flow cytometry and differentiation ability was detected to identify whether they are the BM - MSCs. **Results** The newly isolated mBM - MSCs were small round, regular shape. After subculture, cells size was uniform, and their morphology was consistent and multi - spindle. Along with the increased number of cell passage, the growth curve, viability and cycle of cells were showed the first rapid development stage, platform stage and slow activity period. Flow cytometry results showed that cell's surface maker CD44, CD73 and SCA - 1 were positive, part of the cells CD90, CD105 and STRO - 1 were positive, CD11b, CD45 were negative. After osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation, alkaline phosphatase, alizarin red, Von Kossa silver, oil red O and alcian blue staining were positive respectively. **Conclusion** The biological characteristic of isolated and cultured mBM - MSCs of ICR was homogeneous and distinct. These cells were suitable for further research.

Key words ICR mouse; BM - MSC; Cell culture; Differentiation; Identification

BM - MSCs 是骨髓内一类具有自我复制、多向分化和免疫调控能力的成体干细胞,特定条件下可向成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肝实质细胞样细胞和神经细胞样细胞等分化,是组织工程种子细胞的主要来源^[1-3]。研究发现,许多实验室已经从不同生物系如大鼠、小鼠、兔子、猪和人等骨髓中以及从各种组织器官如脂肪、骨骼肌、脐带血、骨髓和外周血中分离得到

MSCs,且各实验室对分离出的不同来源 BM - MSCs 的生物学特性也进行了相应的描述与分析^[4-8]。但目前,关于 ICR 小鼠骨髓来源的 MSCs 的分离培养及生物学特性分析的国内外相关报道较少,本实验拟在以 ICR 小鼠为研究对象,采用习惯的全骨髓反复贴壁和有限稀释培养法,探讨分离出的 BM - MSCs 生物学特性,并观察其体外多向诱导分化的能力,为本课题下一步研究打下种子基础。

材料与方法

1. 实验动物、主要试剂及仪器:6~8 周龄的 ICR 小鼠,体重 $20 \pm 2g$,购于西安交通大学医学院实验动物中心。抗体购于美国 Santa Cruz 公司和 Abcam 公司;流式细胞仪 FC500 MCL/MPL 购于美国 Beckman

基金项目:陕西省教育厅专项科研基金资助项目(12JK0764);西安医学院第一附属医院科研基金资助项目(XYFY11-08)

作者单位:710077 西安医学院第一附属医院检验科(杨超、辛娜、康炜);312000 绍兴市人民医院临床检验中心(卢韬、董学君)

通讯作者:杨超,电子信箱:superyang0210@163.com

公司。

2. ICR 小鼠 BM - MSCs 的分离、培养和扩增: 采取颈椎脱臼法处死 ICR 小鼠, 无菌条件下即刻分离出股骨和胫骨, 并剔除脂肪和肌肉。用 IMDM 培养液冲洗出骨髓腔内骨髓, 吹打成悬液, 1000r/min 离心 5min 收集细胞, 用含有 10% FBS、100mg/ml 链霉素、100U/ml 青霉素的 IMDM 培养液重悬细胞, 按 2×10^6 /ml 密度接种于一次性培养瓶内, 在 37°C 、5% CO_2 培养箱培养。48h 后倒去培养液, PBS 冲洗 2~3 次, 弃去未贴壁的细胞, 再加入新鲜培养液, 当原代培养的细胞覆盖瓶底面积约 90% 时, 0.25% 胰酶消化细胞, 有限稀释法接种在 96 孔板中即为 P1 代, 每 3~4 天更换培养液, 收集生长良好的细胞进行克隆、传代和扩增。

3. ICR 小鼠 BM - MSCs 生长曲线的绘制: 取形态均一的 1~12 代细胞, 胰酶消化离心收集制成 3×10^5 /ml 的细胞悬液, 接种于 24 孔培养板。每孔 1ml, 每隔 3 天, 各消化 3 孔, 用改良牛鲍计数板计数细胞, 并统计结果求均值, 绘制出生长曲线。

4. ICR 小鼠 BM - MSCs 的活力测定: 取生长良好的 1~12 代细胞, 胰酶消化离心收集制成 3×10^5 /ml 的细胞悬液, 0.4% 台盼蓝染色细胞, 细胞计数板计数活细胞和死细胞, 共 3 次, 取平均值。

5. ICR 小鼠 BM - MSCs 的细胞周期: 胰酶消化收集 P3、5、6、7、10、15 和 17 代培养的 BM - MSCs, 用预

冷 PBS 洗 2 次制成 3×10^5 个细胞/管的悬液, 加入预冷 70% 乙醇, 4°C 固定过夜, PBS 重悬细胞后离心收集, 加入碘化丙啶染液, 4°C 避光孵育染色 30min, 流式细胞仪测其细胞周期。

6. ICR 小鼠 BM - MSCs 的免疫表型鉴定: 胰酶消化收集 BM - MSCs, 室温离心 5min, 弃上清; 血细胞计数器计数细胞, PBS 稀释成 5×10^5 /ml 浓度; 取 100000~200000 数量的细胞, 加入适当比例一抗, 暗室室温孵育 20min; PBS 重悬细胞后加入适当比例二抗, 暗室室温孵育 40min; 再次 PBS 冲洗, 离心收集细胞; 最后, 用含有 0.5% 牛血清白蛋白 (BSA) 的 PBS 重悬细胞, 于流式细胞仪检测。采集 >10000 个细胞样本后, 相应软件分析结果并作图。

7. ICR 小鼠 BM - MSCs 的诱导分化特性鉴定: 取生长良好的 P4 代细胞, 调节细胞密度为每立方厘米 5×10^5 个细胞, 接种于 12 孔培养板, 24h 完全贴壁后, 更换不同分化诱导培养基, 向成骨、脂肪和软骨细胞诱导分化, 每隔 3 天更换新鲜诱导培养液, 21 天后检测钙化结节、油红染色和阿尔新蓝染色等。

8. 统计学方法: 运用 SPSS 19.0 软件, 计量资料采用以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间差异采用 χ^2 检验分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. ICR 小鼠 BM - MSCs 的形态学观察: 分离的 mBM - MSCs 形态特点见图 1。

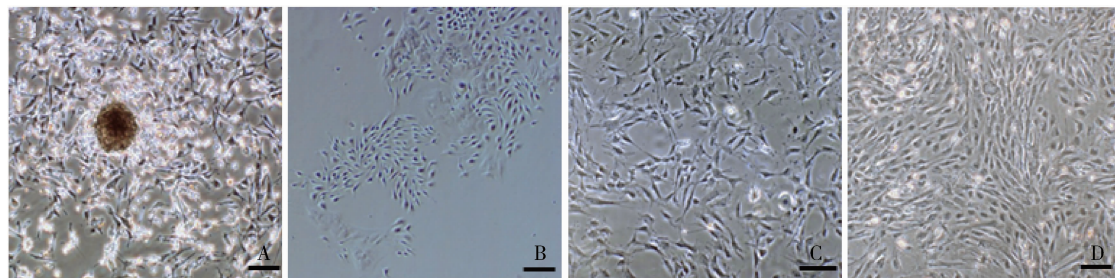


图 1 mBM - MSCs 的分离和扩增培养

A. 培养 48h 后首次更换培养液, 细胞已开始呈现短梭形、星形状, 贴壁生长; B. 细胞梭形化更加明显, 并呈放射状排列的集落, 长短不一、粗细不均; C、D. 继续培养细胞至 80%~90% 汇合, 细胞多已为梭形、形态均一, 并呈现漩涡状生长 (Bar: 50 μm)

2. ICR 小鼠 BM - MSCs 生长动力学分析: 可以看出 BM - MSCs 在接种后第 1~2 天生长速度较为平缓, 为适应期, 从第 3 天开始生长极为迅速, 进入对数生长期, 持续 2~3 天, 第 7 天达高峰, 此后细胞增殖、生长逐渐减缓, 进入平台期 (图 2)。

3. ICR 小鼠 BM - MSCs 的活力测定: P1~3 代细胞存活率大致相等, 均在 90% 以上, P5 代后其活力开

始呈现下降趋势, 且降至 85% 以下, P10 代存活率仅为 70% (图 3)。

4. ICR 小鼠 BM - MSCs 的细胞周期: 随着传代次数的增加, 处于 DNA 合成期 (S 期) 和 DNA 合成后期 (G_2 /M 期) 的细胞所占比例逐渐下降, 但是处于相对静止期 (G_0 / G_1 期) 的细胞数明显增多 ($P < 0.05$); 细胞传至 P15 代时, S 期的细胞比例几乎为零, 勉强传

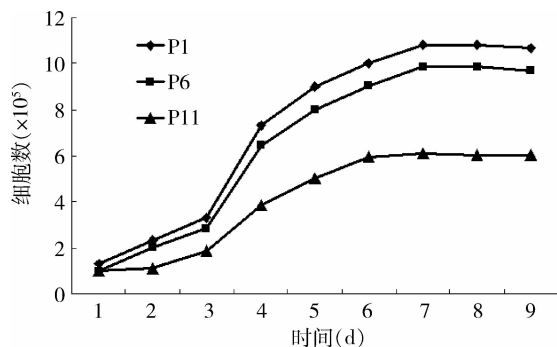


图2 不同代次 mBM-MSCs 的生长曲线

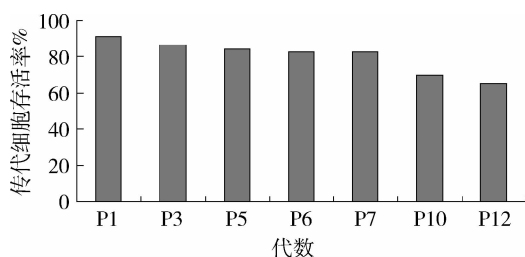


图3 不同代次 mBM-MSCs 的存活率

活细胞率(%) = (细胞总数 - 蓝染细胞) / 细胞总数 × 100%

到 P17 代时细胞已无法再传代(表 1)。

表 1 mBM-MSCs 的细胞周期

代数	G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期	S 和 G ₂ /M 期
3	62.54 ± 3.85 *	33.57 ± 2.58	6.69 ± 0.31	38.96 ± 2.85
5	64.36 ± 3.40 *	31.62 ± 3.36	6.62 ± 0.33	36.84 ± 3.33
6	65.55 ± 2.61 *	22.43 ± 1.67	14.97 ± 0.67	36.02 ± 3.11
7	73.67 ± 2.78 *	14.32 ± 2.33	13.98 ± 0.51	28.12 ± 2.79
10	83.11 ± 3.29 *	16.12 ± 1.98	3.02 ± 0.23	18.89 ± 2.39
15	90.12 ± 1.44 *	0	10.93 ± 1.34	10.93 ± 1.34
17	96.21 ± 1.53 *	0	4.78 ± 1.53	4.78 ± 1.53

与 S 期各代的细胞数比较, * $P < 0.05$

5. ICR 小鼠 BM-MSCs 免疫表型的检测:分离出的成纤维样细胞 100% 可表达 CD44、CD73、SCA-1 3 种表面分子标志物,部分表达 CD90、CD105、STRO-1 3 种表面分子标志物,不表达 CD11b 和 CD45(图 4)。

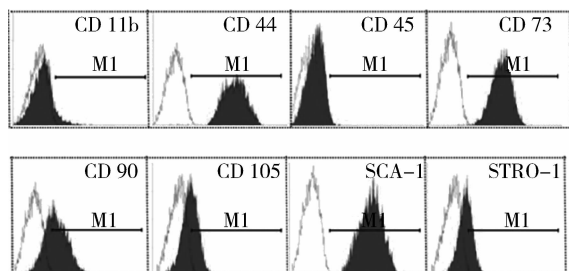


图4 mBM-MSCs 表面标志物的检测

6. ICR 小鼠 BM-MSCs 的诱导分化特性鉴定: mBM-MSCs 经过不同的条件培养液分别诱导 15 ~ 20 天后,成骨、脂肪、软骨细胞检测均呈阳性。详见图 5。细胞于诱导第 5 天开始出现矿化结节,随着时间的延长其结节中央逐渐变浓,14 天时结节大部分已融合,ALP 钙钴法染色示矿化沉着的钙结节呈黑色(图 5A),茜素红和 Von Kossa 银染色后,前者矿化沉着钙结节呈红色(图 5B),后者呈棕褐色(图 5C);脂肪诱导液培养 7 天后,细胞逐渐转变为类圆形,体积变大,胞质内出现少量圆形的透亮小滴,伴随着时间的延长,细胞中的透亮小滴逐渐增多,经油红 O 染色后,脂滴呈橘红色(图 5D),未经染色的脂滴(图 5E);经阿尔新蓝染色后,随着时间的延长,细胞密度不断的增加图 5F。第 14 天时,染色的细胞内外可见较多蓝色斑块状的着色,说明分化细胞具有胞外基质合成和分泌能力。

讨 论

骨髓 MSCs 是具有造血支持、免疫调节、多向分化和高度自我更新等多项潜能,且利于转染和表达外源基因,是细胞和基因治疗理想的载体和靶细胞。目前,研究者也已探究分析了不同品系和器官来源的 MSCs,但均存在不少问题,如分离的细胞数量较少,培养传代的效率不高,细胞活力和潜能维持时间不长等^[9-13]。但对于体外分离 ICR 小鼠 BM-MSCs 作为种子细胞应用于未来组织器官的修复和替代的研究报道甚少,本实验通过以 ICR 小鼠为模型,汲取先前研究的经验,阐述分离的 BM-MSCs 的生物学特性及诱导分化能力,便于更好地使 BM-MSCs 运用到组织工程研究中。

ICR 小鼠来源的 BM-MSCs 具有获得简便、增殖能力强、来源广泛、免疫原性低、自身移植无排斥反应、无涉及伦理道德等优点。本实验形态学结果显示,分离培养的 ICR 小鼠 mBM-MSCs 具有同种类小鼠来源的 BM-MSCs 共有的形态学特点;细胞免疫分型结果显示 mBM-MSCs 表面可表达 CD44、CD73、SCA-1,部分表达 CD90、CD105、STRO-1,不表达 CD11b 和 CD45;不同诱导分化能力结果表明:ICR 小鼠 BM-MSCs 向成骨、软骨和脂肪细胞分化能力与大部分实验所鉴定的 BM-MSCs 的生物学特性相一致,且分离得到的大量 BM-MSCs 更具有可塑性和分化特性。符合 2006 年国际细胞移植治疗学会在其官方期刊《Cytotherapy》上提出的 MSCs 鉴定标准,可用于组织工程和细胞治疗等研究^[14]。

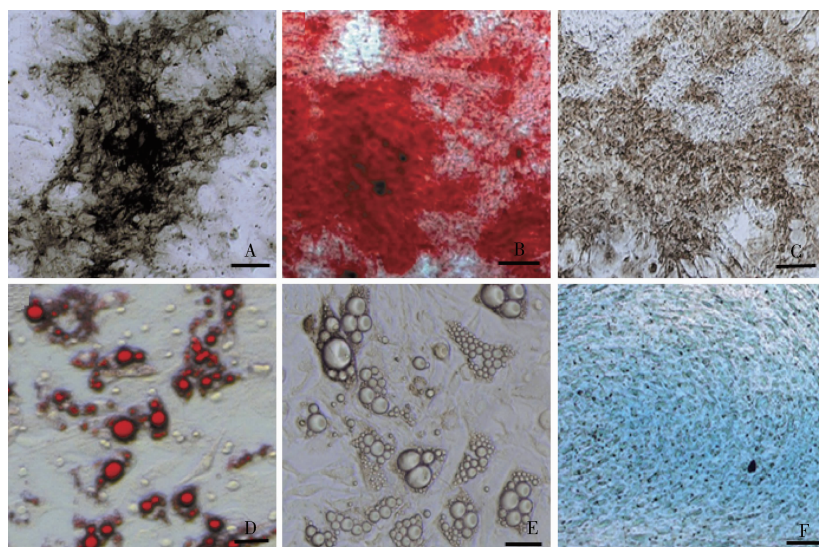


图 5 mBM-MSCs 诱导分化能力的检测

A. 成骨,碱性磷酸酶染色阳性;B. 茜素红染色阳性;C. Von Kossa 银染阳性;D. 脂肪,油红 O 染色阳性;E. 未经染色的脂肪滴细胞;F. 软骨,阿尔新蓝染色阳性(Bar:50 μ m)

从生长曲线图中可以看出不同代次的 BM-MSCs 均经细胞滞缓期后,进入快速增长期、平台期,但是随着传代次数的增加 BM-MSCs 增殖能力明显减弱,生长曲线呈现 S 型;细胞活力测定分析显示:随着细胞传代次数的增加,其增殖能力慢慢地减退,且其在体外培养越长活力会越差;细胞周期分析说明体外培养的 ICR 小鼠 BM-MSCs 的增殖能力随着传代次数的增加逐渐减弱,且传代至 15 代时,细胞基本停止增殖。因此,用于后续实验的 mBM-MSCs 选择 P3~7 为宜。

本实验结果综合说明分离培养的 ICR 小鼠来源的骨髓间充质干细胞的各种生物学特性均符合体外干细胞的特点要求标准,如若在条件诱导培养液下还可向成骨细胞、脂肪细胞和软骨细胞分化,此实验阐述了一整套 ICR 小鼠骨髓 MSCs 的形态学、表型和功能属性鉴定等生物学特点,表明 ICR 小鼠骨髓 MSCs 可以作为理想的组织工程种子细胞,为后续探讨以 mBM-MSCs 为基础的组织工程、细胞治疗和临床研究提供一种经济实用稳定的干细胞模型。

参考文献

- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. *Nature*, 2002, 418 (6893):41-49
- Mohammadian M, Shamsasenjan K, Lotfi Nezhad P, *et al.* Mesenchymal stem cells: new aspect in cell-based regenerative therapy [J]. *Adv Pharm Bull*, 2013, 3(2):433-437
- Bobis S, Jarocha D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications[J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2006, 44 (4):215-230
- Satija NK, Singh VK, Verma YK, *et al.* Mesenchymal stem cell -

based therapy: a new paradigm in regenerative medicine[J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(11-12):4385-4402

- Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, *et al.* Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(5):815-820
- Liu ZJ, Zhuge Y, Velazquez OC. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells[J]. *J Cell Biochem*, 2009, 106(6):984-991
- Beyer Nardi N, da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2006, 174:249-282
- Gnecchi M, Melo LG. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, characterization, viral transduction, and production of conditioned medium [J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 482:281-294
- Koide Y, Morikawa S, Mabuchi Y, *et al.* Two distinct stem cell lineages in murine bone marrow[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(5):1213-1221
- Kern S, Eichler H, Stoeve J, *et al.* Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue[J]. *Stem Cells*, 2006, 24(5):1294-1301
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *Science*, 1999, 284 (5411):143-147
- Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues[J]. *Science*, 1997, 276(5309):71-74
- 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
- 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

(收稿日期:2015-05-26)

(修回日期:2015-07-08)