

· 临床论著 ·

HBV对人骨髓间充质干细胞体外增殖的影响

魏开鹏 潘兴南 许正锯 王崇国

【摘要】 目的 探讨HBV对人骨髓来源间充质干细胞(MSCs)体外增殖的影响。**方法** 从成人骨髓分离纯化MSCs并体外培养至第3代,将MSCs与含高浓度HBV的人血清共培养作为实验组,并用不含HBV的健康人血清作为对照。采用MTT法绘制细胞生长曲线并计算细胞倍增时间。分别应用细胞克隆形成试验和流式细胞术检测MSCs的克隆形成能力和细胞增殖指数。**结果** 实验组的生长曲线发生右移,其对数生长期的细胞倍增时间较对照组延长($t = 2.453$, $P < 0.05$)。体外培养10 d后,实验组的细胞克隆形成率和增殖指数均明显低于对照组($t = 2.488$, $P < 0.05$; $t = 2.798$, $P < 0.05$)。**结论** HBV可抑制人骨髓间充质干细胞的体外增殖。

【关键词】 肝炎病毒,乙型;间充质干细胞;增殖

Effect of hepatitis B virus on proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells in vitro

WEI Kai-peng, PAN Xing-nan, XU Zheng-ju, WANG Chong-guo. Center of Liver Diseases, The 180 Hospital of PLA, Quanzhou 362000, China

Corresponding author: PAN Xing-nan, Email: xnpancn@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of HBV on proliferative capacity of human bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSCs) in vitro. **Methods** MSCs were isolated from human bone marrow and cultured for the third passage. They were divided into two groups: some were cocultured with HBV-containing serum as experimental group, and the others were cocultured with healthy serum as control. Cell growth curve and cell doubling time were evaluated by MTT assay. Colony-forming capacity and cell cycle were evaluated by colony-forming assay and flow cytometry. **Results** In contrast, growth curve turned right and cell doubling time significantly increased ($t = 2.453$, $P < 0.05$). After 10 days culture, colony-forming rate and proliferative index in experimental group were significantly lower than those in control group ($t = 2.488$, $P < 0.05$; $t = 2.798$, $P < 0.05$). **Conclusion** HBV could inhibit proliferative capacity of human bone marrow derived MSCs in vitro.

【Key words】 Hepatitis B virus; Mesenchymal stem cells; Proliferation

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一群中胚层来源的具有自我更新和多向分化潜能的基质干细胞^[1]。骨髓来源的MSCs因其获取方便、低免疫原性以及较好的伦理适应性而倍受关注^[2]。临床研究表明, MSCs移植可以改善终末期肝病患者的肝脏功能^[3-4]。MSC在骨髓中数目很少,常需要体外扩增来达到临床应用所需的数量^[5-6]。我国的终末期肝病患者大多是HBV感染者,而HBV与MSCs的相互作用尚未明确。本研究将含高浓度HBV的血清添加到MSCs的体外培养体系并检测其扩增性能,阐明HBV对MSCs体外增殖的影响。

资料与方法

一、一般资料

无HBV感染的成人骨髓取自解放军第180医院住院患者;含高浓度HBV的血清来源于慢性乙型肝炎患者外周静脉血,其HBV DNA为 1.2×10^8 拷贝/ml;不含HBV的血清来源于健康成人外周静脉血;供者均签署《知情同意书》。LG-DMEM培养液、胎牛血清、StemPro成骨细胞诱导分化试剂盒、StemPro软骨细胞诱导分化试剂盒和StemPro脂肪细胞诱导分化试剂盒均为美国Life公司产品。Ficoll分离液为美国GE公司产品。FITC标记的抗人CD14、CD34、CD45、CD73、CD90、CD105及抗鼠IgG1- κ 单克隆抗体均为美国Biolegend公司产品。

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.03.016

基金项目:南京军区医药卫生科研基金(No.07Z021)

作者单位:362000 泉州市,解放军第180医院肝病中心

通讯作者:潘兴南, Email: xnpancn@163.com

MTT检测试剂盒为美国Sigma公司产品。

二、骨髓来源MSCs的分离和培养

遵循临床操作规范, 从无HBV感染的成人髂后上棘抽取5 ml骨髓液, 肝素抗凝(50 IU/ml)。按照本课题组已往报道的方法^[7], 密度梯度离心分离单个核细胞, 洗涤后用含10%胎牛血清的LG-DMEM培养液混悬接种于60 mm直径的塑料培养皿中, 置于37℃、5% CO₂孵箱中培养。72 h后首次换液, 之后每3 d换液1次, 待贴壁细胞达80%~90%融合时按1:3传代, 传至第3代时收获MSCs, 并制备成5 × 10⁶/ml的细胞悬液备用。

三、MSCs的鉴定

倒置显微镜下观察细胞形态。以抗鼠IgG1-κ作为同型对照, 流式细胞仪检测CD14、CD34、CD45、CD73、CD90和CD105等表面分子。取MSCs接种于6孔细胞培养板, 分别用StemPro成骨细胞诱导分化试剂盒、StemPro软骨细胞诱导分化试剂盒和StemPro脂肪细胞诱导分化试剂盒按说明程序诱导培养21 d, 采用茜素红染色、甲苯胺蓝染色和油红染色进行鉴定。

四、MTT实验

将MSCs稀释成2 × 10⁴/ml的细胞悬液, 每孔100 μl接种于96孔板, 实验组每孔加入10 μl含HBV血清, 对照组每孔加入10 μl不含HBV的血清。两组每日各取5孔分别加入MTT溶液10 μl, 置培养箱避光孵育4 h, 每孔加入溶解液100 μl继续孵育, 直至结晶全部溶解。以培养液作空白调零, 在酶标仪570 nm处测定A值, 连续测定7 d并绘制细胞生长曲线。

五、细胞克隆形成实验

将处于对数生长期的MSCs接种于6孔细胞培养板(2000个/孔), 尽量使细胞分散均匀。实验组每孔加入100 μl含HBV的血清, 对照组每孔加入100 μl不含HBV的血清。每组各设5个复孔, 于37℃、5% CO₂孵箱中培养10 d, 经甲醇固定后采用姬姆萨染液染色, 观察50个细胞数以上的克隆。

六、细胞周期的检测

将MSCs接种于直径60 mm的培养皿, 实验组每皿加入200 μl含HBV的血清, 对照组每皿加入200 μl不含HBV的血清。每组设5个复孔, 在37℃、5% CO₂条件下培养10 d。收获MSCs用PBS洗涤2遍后加2 ml PBS重悬, 加入2 ml预冷70%乙醇混匀置4℃过夜, 离心弃乙醇后用PBS洗涤重悬, 加入1 ml 碘化丙啶染液, 4℃避光孵育30 min, 上流式细胞仪检测细胞周期。

七、统计学处理

应用SPSS 16.0软件进行统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组数据间的比较采用t检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、MSCs的鉴定

接种72 h后首次换液除去非贴壁细胞, 可见少量分散的梭形细胞黏附底面生长(图1A-a)。培养21 d贴壁细胞扩增达80%~90%融合, 并列或呈漩涡状排列(图1A-b、c)。该群细胞表达CD73、CD90和CD105而不表达CD14、CD34和CD45等表面分子。诱导培养21d, 茜素红染色可见大量钙化基质沉淀(图1A-d), 甲苯胺蓝染色可见大量蛋白多糖(图1A-e), 油红染色可见大量脂肪滴(图1A-f), 提示该群细胞分别被诱导分化为成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞。以上特征表明, 本研究所获细胞为骨髓来源的MSCs。

二、HBV对MSCs生长曲线的影响

采用MTT法连续7 d检测A值并绘制MSCs的生长曲线, 可见实验组细胞的生长曲线相对于对照组发生右移且位置低于对照组, 见图2A。在生长曲线上对数生长期取3组数据, 根据最小二乘法进行直线回归, 在直线上任取两点(N_0 , N_t), 根据Patterson公式 $[T \times \lg 2 / \lg (N_t / N_0)]$ 计算细胞倍增时间。实验组的细胞倍增时间为(54.5 ± 6.6) h, 对照组的细胞倍增时间为(44.6 ± 6.1) h, 实验组对数生长期的细胞倍增时间较对照组显著延长($t = 2.453$, $P = 0.039$), 见图2B。

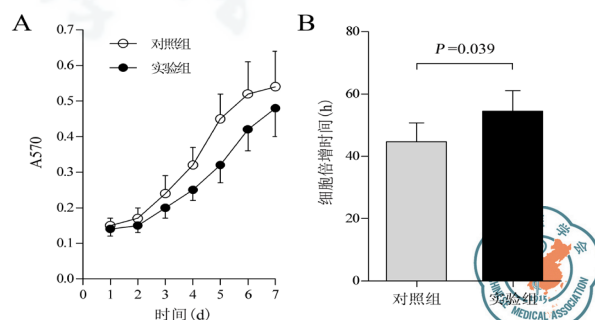
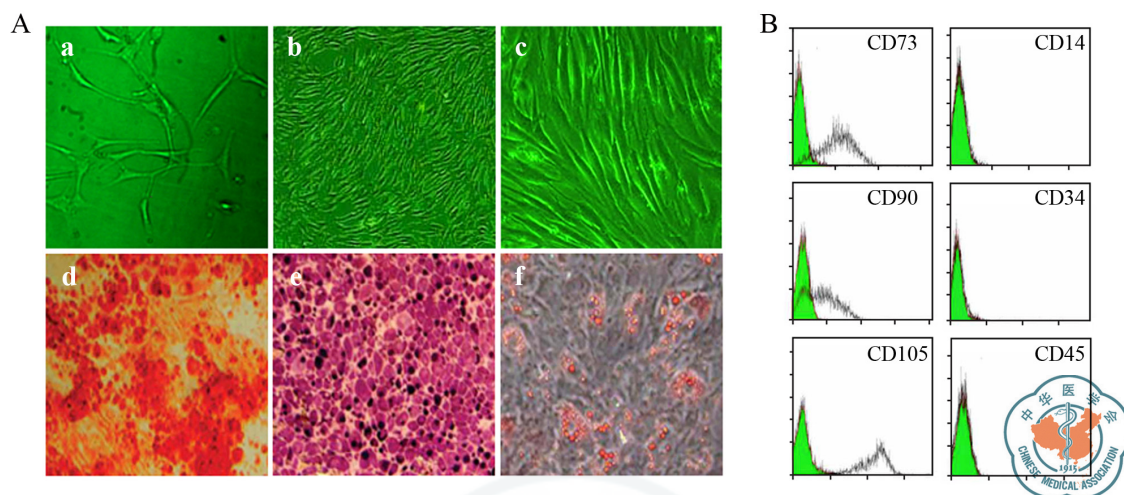


图2 MSCs的生长曲线和细胞倍增时间

三、HBV对MSCs克隆形成能力的影响

将MSCs进行克隆形成试验, 培养10 d后统计50个细胞以上的克隆数并计算克隆形成率(克隆数/接种细胞数 × 100%)。实验组细胞的克隆形成率为



注：图1A：A-a, 72 h首次换液后（400×）；A-b, 培养21 d（100×）；A-c, 培养21 d（400×）；A-d, 诱导21 d, 茜素红染色（400×）；A-e, 诱导21 d, 甲苯胺蓝染色（400×）；A-f, 诱导21 d, 油红染色（400×）。图1B：细胞表型流式结果，FITC标记的抗鼠IgG1-κ为同型对照

图1 MSCs的鉴定

(7.6 ± 2.4)%，对照组的克隆形成率为(11.8 ± 2.9)%，显著高于实验组($t = 2.488$, $P = 0.037$)，见图3。

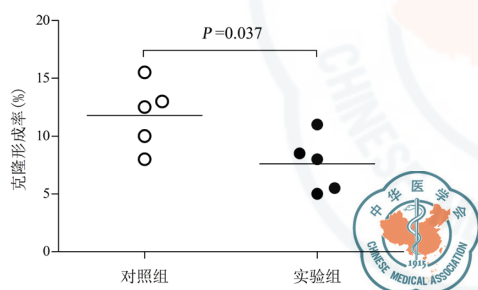


图3 MSCs的克隆形成率

四、HBV对MSCs细胞周期的影响

将MSCs培养10 d后染色上流式细胞仪检测DNA含量，DNA含量的差异可反映细胞所处的细胞周期。计算细胞的增殖指数（处于S期和G₂/M期的细胞之和占总细胞数的比例）结果发现，实验组细胞的增殖指数为(16.2 ± 4.6)%，对照组的增殖指数为(25.7 ± 6.1)%，显著高于实验组($t = 2.798$, $P = 0.023$)，见图4。

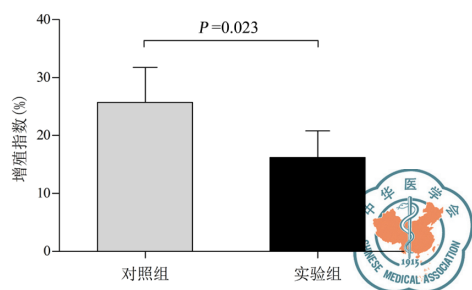


图4 MSCs的增殖指数

讨 论

由于MSCs是不均一的未分化基质细胞群，目前尚无高特异性的识别标志，一般采取联合几个指标进行综合鉴定。本研究所获得的MSCs具有以下特征：①标准的培养条件下，细胞能黏附塑料瓶壁生长，呈梭状的成纤维样形态。②细胞表面表达CD105、CD73和CD90，而不表达CD45、CD34和CD14等表面分子。③在体外可以诱导分化为成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞。这些特征符合国际细胞治疗协会（International Society for Cellular Therapy, ISCT）提出的MSCs鉴定要求^[8]。

虽然骨髓来源的MSCs具有高度的体外扩增能力，但其连续传代培养10代后会出现增殖性能减弱，并且原代MSCs培养时间过长也会引起增殖抑制^[9-10]。与其他细胞类似，不同培养方法和条件对MSCs的增殖具有显著影响^[11]。因此，本研究选取传至第3代的MSCs在标准培养条件下测试其增殖性能。为更好地反映HBV对MSCs的影响，本研究选用含较高浓度HBV的血清进行共培养，并用不含HBV的健康人血清进行对照，经过培养液的稀释后，HBV与MSCs的比例仍可维持在10:1以上。

本研究发现，MSCs与HBV共培养时生长曲线发生右移，其对数生长期的细胞倍增时间明显延长（图2），提示HBV能够干扰MSCs的体外增殖。为进一步验证HBV对MSCs体外增殖的影响，细胞克隆形成试验发现体外培养10 d后，与HBV共培养MSCs的克隆数显著减少，提示HBV导致MSCs的群体依赖性增加而增殖能力减弱。在细胞增殖周期

中, DNA含量会随各时相产生相应的变化, S期和G₂/M期的细胞比例可以从一个侧面反映细胞增殖的活跃情况。本研究发现, 与HBV共培养MSCs的增殖指数明显低于未暴露于HBV的对照组(图4), 这表明HBV抑制MSCs从G₀/G₁期进入S期和G₂、M期, 处于分裂相的细胞减少而增殖活性下降。以上几个指标相互印证提示, HBV在体外与MSCs共培养时会抑制MSCs增殖。

虽然HBV属嗜肝病毒, 具有较强的组织选择性, 但其并非只能感染肝细胞, 目前已有HBV感染肝干细胞、造血干细胞以及单核细胞等多种细胞的报道^[12-14]。有研究表明, HBV可以在体外感染造血干细胞并在胞内复制, 感染HBV的造血干细胞的增殖能力会减弱^[15]。因此, 推测暴露于HBV的MSCs可能会被HBV感染而引起一系列的生物学性能改变, 但尚需进一步研究以证实。

参 考 文 献

- 1 Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(4): 313-319.
- 2 Otto WR, Wright NA. Mesenchymal stem cells: from experiment to clinic. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2011, 4(9): 20-33.
- 3 Kallis YN, Alison MR, Forbes SJ. Bone marrow stem cells and liver disease. *Gut*, 2007, 56(5): 716-724.
- 4 Houlihan DD, Newsome PN. Critical review of clinical trials of bone marrow stem cells in liver disease. *Gastroenterology*, 2008, 135(2): 438-450.
- 5 Habib NA, Gordon MY. Clinical applications of stem cell therapy: the pros and cons of stem cell sources. *Regen Med*, 2006, 1(3): 301-302.
- 6 Kuo TK, Hung SP, Chuang CH, et al. Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success of using bone marrow mesenchymal stem cells. *Gastroenterology*, 2008, 134(7): 2111-2121.
- 7 魏开鹏, 潘兴南, 王崇国. 两种成人骨髓间充质干细胞体外分离方法的比较研究. *实用肝脏病杂志*, 2011, 14(2): 95-97.
- 8 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. *Cytotherapy*, 2006, 8(4): 315-317.
- 9 Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells*, 2007, 25(6): 1384-1392.
- 10 Lennon DP, Schluchter MD, Caplan AI. The effect of extended first passage culture on the proliferation and differentiation of Human marrow derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Transl Med*, 2012, 1(4): 279-288.
- 11 Solchaga LA, Penick K, Goldberg VM, et al. Fibroblast growth factor-2 enhances proliferation and delays loss of chondrogenic potential in human adult bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*, 2010, 16(3): 1009-1019.
- 12 王姝, 金敏, 郭向飞, 等. 人胎肝干细胞体外感染乙型肝炎病毒模型的建立. *解放军预防医学杂志*, 2011, 29(3): 168-172.
- 13 Liang R. How I treat and monitor viral hepatitis B infection in patients receiving intensive immunosuppressive therapies or undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 2009, 113(14): 3147-3153.
- 14 Pontisso P, Vidalino L, Quarta S, et al. Biological and clinical implications of HBV infection in peripheral blood mononuclear cells. *Autoimmun Rev*, 2008, 8(1): 13-17.
- 15 张立婷, 王珊, 李俊峰, 等. 人骨髓间充质干细胞上清液对体外肝星状细胞增殖周期及MMP-1表达的影响. *临床肝胆病杂志*, 2012, 28(11): 836-838.

(收稿日期: 2012-10-21)

(本文编辑: 孙荣华)

魏开鹏, 潘兴南, 许正锯, 等. HBV对人骨髓间充质干细胞体外增殖的影响[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2013, 7(3): 395-398.