

## 骨髓间充质干细胞的贴壁培养及内毒素对其增殖活性的影响

郝彦琴 卢宁 李红 赵龙凤

**【摘要】 目的** 贴壁法分离培养大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs),并观察不同浓度内毒素对其增殖活性的影响。**方法** 采用全骨髓贴壁培养法培养大鼠BMSCs,倒置显微镜下观察细胞形态,免疫细胞化学方法检测细胞CD44、CD29、CD34的表达,流式细胞术检测细胞周期。加不同浓度的内毒素(0、0.01  $\mu\text{g/ml}$ 、0.1  $\mu\text{g/ml}$ 、1  $\mu\text{g/ml}$ 、10  $\mu\text{g/ml}$ 、100  $\mu\text{g/ml}$ )作用24 h,用四唑盐比色法(MTT)检测BMSCs的增殖。**结果** 分离培养的细胞三代以后呈均一的成纤维细胞样形态,高表达CD44,但不表达CD34、CD45。80%以上的第三代BMSCs处于G1期。不同浓度的LPS作用24 h后各组的平均吸光度值( $A$ )比较有统计学意义( $F = 3.598, P = 0.007$ );0.01  $\mu\text{g/ml}$  LPS组 $A$ 值与其余各组相比,具有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** 全骨髓贴壁培养法可以方便、快捷地获得BMSCs,其在形态学、细胞表面标志物表达和多向分化能力方面具有干细胞生物学特性;0.01  $\mu\text{g/ml}$  LPS可明显促进BMSCs的增殖。

**【关键词】** 内毒素;骨髓间充质干细胞;细胞增殖

**Adherent culturing and effects of endotoxin on proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells** HAO Yan-qin, LU Ning, LI Hong, ZHAO Long-feng. Department of Infectious Diseases, the First Clinical Medical College, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

**【Abstract】 Objective** To isolate and culture rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) in vitro by adherent culturing and to observe the effects of different endotoxin concentrations on proliferation of rat BMSCs. **Methods** The BMSCs were purified and amplified by adherent culturing in vitro. The changes of cells morphology were observed with invert microscope. The cell member antigens CD34, CD44, CD45 were examined with immunocytochemical technique. Cell cycle was detected with flow cytometry. The proliferation of BMSCs was determined through MTT method after the BMSCs were treated with different LPS concentrations for 24 hours. **Results** The morphology of P3 BMSCs were fibroblast-like. Immunohistochemical

results of BMSCs showed that CD44 was positive and CD34, CD45 were negative. About 80% of P3 BMSCs were in G1 phase. The average  $A$  values were significantly different among various LPS concentrations groups ( $F = 3.598, P = 0.007$ ); The average  $A$  value of 0.01  $\mu\text{g/ml}$  LPS group were improved significantly than that in other groups ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** BMSCs can be conveniently and quickly obtained by bone marrow adherent culturing. The cultured cells have general biological characteristics of stem cell in morphology and can express cell member antigens and multi-directionally differentiate. 0.01  $\mu\text{g/ml}$  LPS can significantly improve the proliferation of rat BMSCs.

**【Key words】** Endotoxin; Bone marrow-derived mesenchymal stem cells; Cell proliferation

肝硬化、肝衰竭、肝细胞癌等终末期肝病是临床治疗的难题。目前,原位肝移植仍是治疗终末期肝病最有效的措施,但由于肝源缺乏、费用昂贵,免疫排斥反应等问题限制其广泛应用。干细胞移植是目前最具发展潜力的一种治疗手段,其中骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs)由于具有干细胞的多向分化潜能、取材方便、易于体外分离及扩增等特点,在组织工程、基因工程及临床方面受到人们广泛关注<sup>[1,2]</sup>。然而, BMSCs 移植进入体内不可避免地要接触到患者复杂的体内环境,尤其肝病患者大多伴有肠源性内毒素血症,内毒素(LPS)对 BMSCs 的影响如何尚不清楚。本实验即通过体外培养 BMSCs 来研究不同浓度 LPS 对 BMSCs 增殖的影响,进一步揭示肠源性内毒素血症(intestinal endotoxemia, IETM)对 BMSCs 的作用。

## 材料和方法

### 一、材料

1. 实验动物:健康雄性 Wistar 大鼠,清洁级,体重 160 ~ 180 g,由山西医科大学实验动物中心提供。

2. 主要试剂:DMEM/F12、胎牛血清购自美国 Gibco 公司;兔抗大鼠 CD34、CD44、CD45 生物素化二抗(羊抗兔)、SABC、DAB 染色试剂盒均购自武汉博士德公司。

### 二、方法

1. BMSCs 的分离和培养:(1) BMSCs 的分离:实验大鼠断颈处死,无菌操作取四肢骨髓,用含 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 完全培养基重悬骨髓细胞并计数,以  $2 \times 10^6$  个细胞接种于 25  $\text{cm}^2$  培养瓶,置 37℃、5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度的培养箱内无菌培养;(2) BMSCs 的培养及传代:第 1 天观察有无细菌生长。原代细胞记为 P0,24 h 后轻摇培养瓶并取悬浮细胞及上清移入新培养瓶继续培养,以后每 3 d 换液 1 次,待细胞长至 80% ~ 90% 融合时,以 1:3 进行传代培养,记为 P1,以此类推。传代细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 完全培养基培养,每次传代用

新培养瓶,弃去贴壁非常牢固的细胞,通过多次传代对细胞进行纯化。

2. 形态学观察:用倒置显微镜观察培养细胞的生长状况和形态变化。

3. BMSCs 细胞周期测定:取 3 瓶生长状态良好的 P3 代细胞常规消化离心,设 3 个复管,PBS 洗 2 次(1200 r/min 离心 5 min),弃上清,70% 冷乙醇4℃固定 24 h,离心去除乙醇,PBS 洗涤细胞 2 次,将细胞悬浮于 0.5 ml PBS 中,加入 5 mg/100 ml 碘化丙啶 4℃避光 30 min,用流式细胞仪检测并分析结果。

4. 细胞表面分子的表达与图像分析:采用 SABC 细胞免疫组织化学法。取生长状态良好的 P3 代细胞以  $1 \times 10^5$ /孔的细胞密度接种于 6 孔板(孔中预先置盖玻片),用于检测 CD34、CD44、CD45 细胞抗原分子,用 PBS 代替一抗作为阴性对照组。用 SABC 法按照说明书染色步骤进行染色。用 IPP 6.0 软件分析,每个指标做 3 个复孔,各随机抽取 10 个不重叠视野计算阳性细胞数量。

5. MTT 法检测细胞增殖活性:取生长良好的第三代细胞消化离心后以 10% 胎牛血清的培养液调整细胞浓度至  $2 \times 10^4$ /ml,以每孔 100  $\mu$ l 接种于 3 块 96 孔板,每板接种 60 孔,四周 36 孔加培养基防止干燥。培养 4 h 后,弃原培养液及未贴壁细胞,PBS 液冲洗 3 次后均换用 100  $\mu$ l 无血清的培养液,继续培养 24 h,使细胞相对同步化。弃培养液,PBS 液冲 3 次。将接种细胞的 60 孔,分为每 10 孔一组,共 6 组。其中 5 组为不同浓度的 LPS 组,分别加入含 LPS 0.01  $\mu$ g/ml、0.1  $\mu$ g/ml、1  $\mu$ g/ml、10  $\mu$ g/ml、100  $\mu$ g/ml 的无血清培养液 100  $\mu$ l。放入培养箱孵育 24 h,检测前每孔加入浓度为 5 mg/ml 的 MTT 液 20  $\mu$ l,培养箱内孵育 4 h,加入 DMSO 150  $\mu$ l,震荡 10 min,置酶标仪上于 492 nm 波长检测吸光度值(A),空白对照为不含 BMSCs 的培养液。实验重复 3 次,取其平均值。

### 三、统计分析

计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,用 SPSS 13.0 软件分析数据,组间比较用单因素方差分析,两组均数的比较采用 SNK 检验,以  $P < 0.05$  有统计学意义。

## 结 果

### 一、BMSCs 形态学观察

1. BMSCs 的原代培养:原代分离的细胞接种后可见到大小不一、圆形、折光性强的细胞,内混有大量双凹圆盘状的红细胞。24 h 后几乎所有细胞均沉积于瓶底,轻晃培养瓶可见大部分细胞随培养液晃动,仅少部分细胞贴壁。轻摇培养瓶并取悬浮细胞及上清移入新培养瓶继续培养。48 h 后可见培养的细胞呈球形、椭圆形或梭形,细胞贴壁性增强。培养 6 d 后,细胞大量增殖,呈不规则形贴壁生长,多次换液后双凹圆盘状的红细胞几乎消失,培养 10 ~ 12 d,细胞呈旋涡状或平行状排列,细胞边界不甚清晰(图 1 ~ 4)。

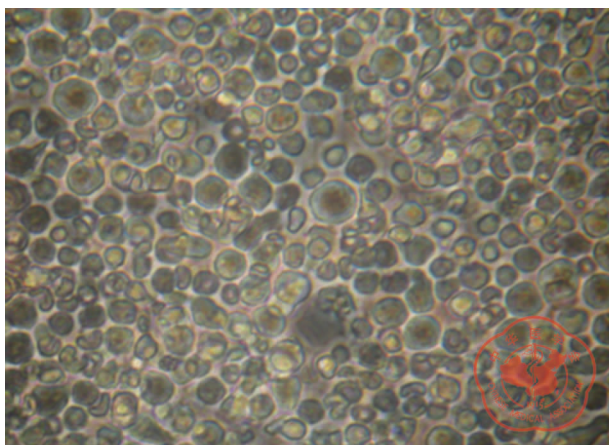


图1 BMSC 原代培养 24 h(200 ×)

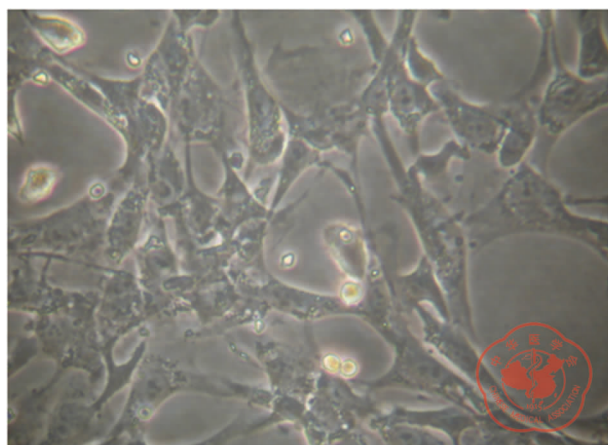


图2 BMSC 原代培养第 6 天(200 ×)

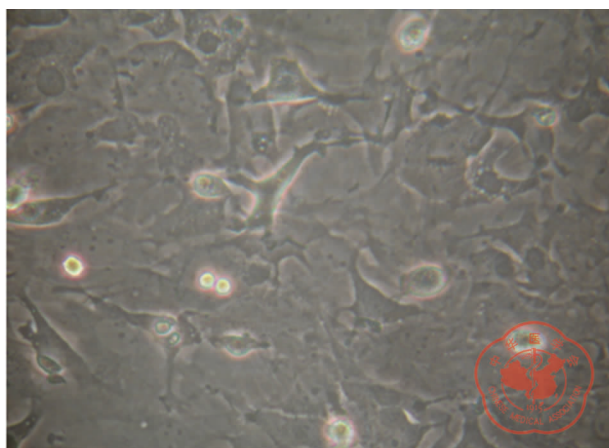


图3 BMSC 原代培养第 10 天(200 ×)

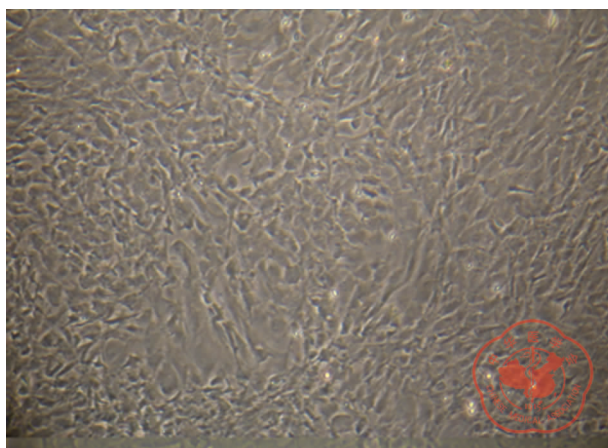


图4 BMSC 原代培养第 12 天(100 ×)

2. BMSCs 的传代培养:刚传代的 BMSCs 呈圆形,2 h 后即开始贴壁,开始为多角形,逐渐变成短梭形、长梭形,胞质可见空泡或黑色颗粒。细胞形态逐渐趋于一致,以梭形为主,细胞增殖融合后排列有明显方向性,呈漩涡状、网状或放射状(图5)。P3 代以后细胞的形态较为稳定、贴壁性更强、细胞增殖速度较快,4 d 即可传代一次(图6)。

## 二、BMSCs 细胞周期检测

取 P3 代 BMSCs 检测,其中 G1 期细胞占( $80.13 \pm 1.24$ )%, G2 期细胞占( $8.35 \pm 0.30$ )%, S 期细胞占处于( $11.53 \pm 1.16$ )%。80% 以上的细胞处于 G1 期(DNA 合成前期),说明细胞增殖能力强(图7)。



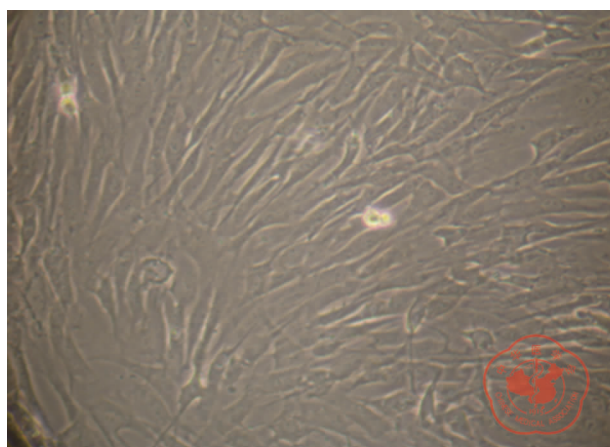


图5 BMSC 体外培养 P1 代(200 ×)

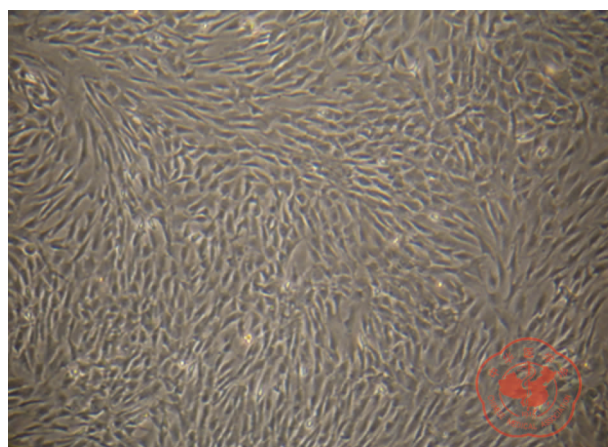


图6 BMSC 体外培养 P3 代(100 ×)

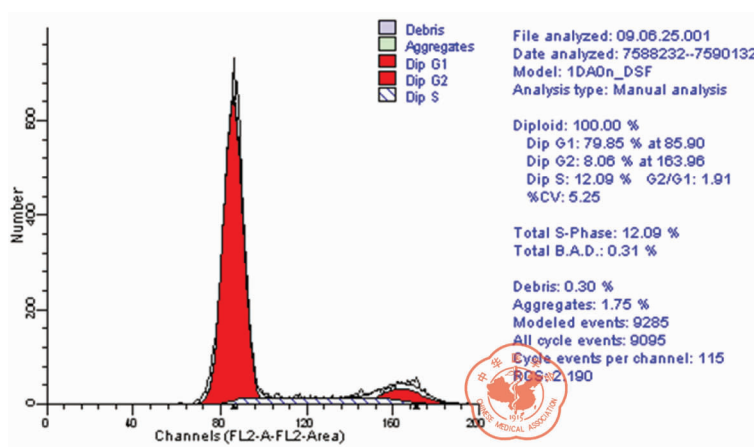


图7 BMSC 体外培养 P3 代(100 ×)

### 三、BMSCs 的表型特征

免疫细胞化学染色示实验组 97% CD44 染色呈阳性反应,阳性反应产物为棕黄色(图8),CD34(图9)、CD45 染色呈阴性反应。阴性对照组均未着色。

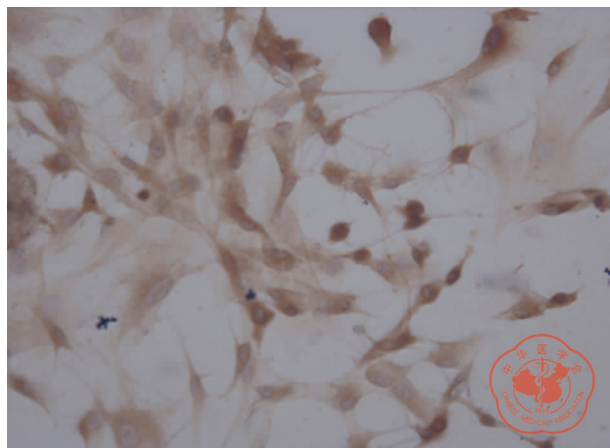


图8 BMSC 中 CD44 表达(SABC 染色,400 ×)

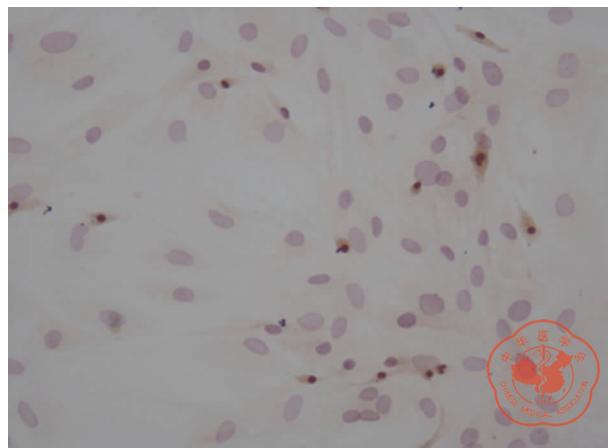


图9 BMSC 中 CD34 表达(SABC 染色,400 ×)

#### 四、LPS 作用下 BMSCs 的增殖情况

不同浓度的 LPS 作用 24 h 后各组平均吸光度值  $A$  比较有统计学意义 ( $F = 3.598, P = 0.007$ );  $0.01 \mu\text{g/ml}$  LPS 组  $A$  值与其余各组相比有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 并且  $0.01 \mu\text{g/ml}$  LPS 可明显促进 BMSCs 增殖(图 10)。

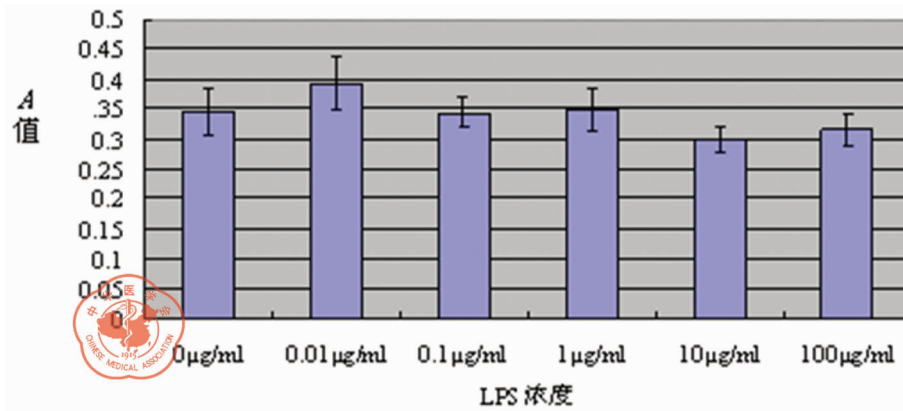


图 10 不同浓度 LPS 对 BMSCs 增殖的影响

## 讨 论

目前,干细胞移植已成为终末期器官功能衰竭治疗的研究热点,尤其在终末期肝病治疗方面具有重要意义。BMSCs 因取材方便,对机体损伤小,分离和使用 BMSCs 不存在伦理学问题,具有干细胞特性,成为细胞移植的首选材料<sup>[4]</sup>,而如何得到大量纯化的 BMSCs 是科研及临床应用细胞治疗疾病的前提。肝病患者大多伴有肠源性内毒素血症,内毒素在肝病慢性化、重型化过程中发挥着重要作用,在临床应用 BMSCs 移植治疗肝病时,不可避免地要考虑患者体内存在内毒素这个因素,但内毒素对 BMSCs 的影响如何,尚需进一步研究。本实验在体外分离纯化及培养扩增 BMSCs 的基础上进一步探讨内毒素对 BMSCs 增殖作用的影响,为 BMSCs 临床治疗肝脏病的应用提供科学的理论依据及实验证据。

目前用于分离 BMSCs 方法主要有 4 种,即贴壁筛选法、密度梯度离心法、流式细胞分选法及免疫磁珠法,各有优缺点。贴壁筛选法即将全骨髓用培养液稀释后直接培养,待细胞贴壁后通过换液去除血细胞成分而得到 BMSCs。这种方法得到的细胞数量多、贴壁时间早、增殖快、生长状态良好,缺点是得到的细胞成分复杂,纯度不足。密度梯度分离法是将收集的骨髓用淋巴细胞分离液进行密度梯度离心,以去除血细胞成分及血小板,得到的细胞较纯,对细胞活性影响小,但操作烦琐,得到的细胞数目不如贴壁培养法多,培养的细胞生长较慢。应用流式细胞术或单克隆抗体磁珠分离法可获得较为纯化的 BMSCs。但由于 BMSCs 较为脆弱,流式细胞分选法对细胞的活性影响较大,分选后的细胞大多数不贴壁,细胞功能不如未分离的异质细胞。应用免疫磁珠法需制备单克隆抗体、分离后磁珠解离困难、抗体价格昂贵等均限制了其应用<sup>[5]</sup>。

本实验采用全骨髓贴壁筛选法,为尽可能获得大量纯化的 BMSCs,笔者在培

养细节上摸索到一些规律:(1) BMSCs 原代培养首次换液要在 24 h 以后,取悬浮细胞及上清移入新培养瓶继续培养,弃去较早的贴壁细胞(较早的贴壁细胞继续培养,成纤维状细胞比较明显);(2) BMSCs 原代培养第二次换液最好半量换液,这样既可给细胞补充营养,又不至于丢失太多细胞;(3) BMSCs 原代培养 4 d 以后换液要尽可能弃去培养基以去除悬浮细胞,使贴壁细胞更好地生长;(4) BMSCs 消化传代时 1500 r/min 离心 5 min 即可,转速过高或时间过长容易使细胞聚集成团,不容易吹散,传代以后细胞生长不均匀;(5) 传代培养的培养基含 10% 血清浓度即可满足细胞生长需要,过高浓度容易使细胞老化。

本实验原代分离的骨髓细胞贴壁培养 48 h 后可见培养的细胞呈球形、椭圆形、短梭形,细胞贴壁性增强。多次传代之后形态呈均一的长梭形,旋涡状排列。取 P3 代细胞采用细胞免疫化学法检测细胞表型,培养的细胞表面不表达造血干细胞、内皮细胞所特有的表型分子 CD34 和白细胞特异性抗原 CD45,而表达间充质干细胞特异性的 CD44,说明所培养的细胞不是造血干细胞、内皮细胞及白细胞。细胞周期检测结果示,所培养的 P3 代细胞 80% 以上处于 G1 期,表明细胞增殖能力很强。

根据本实验结果,采用全骨髓贴壁培养法可取得较高纯度的 BMSCs,此方法简便、快捷,同时可最大限度保持细胞的活性;培养的细胞不表达 CD34、CD45,而表达 CD44,具有干细胞的一般生物学特性,是一种简便、快速、经济的实验室分离培养方法。

内毒素是革兰阴性杆菌细胞壁外膜表层构成成分,主要为脂多糖(LPS)。赵强等<sup>[6]</sup>运用 CCK-8 检测 LPS 对 BMSCs 增殖的影响发现,在 0 ~ 5  $\mu\text{g/ml}$  LPS 浓度范围内,随着 LPS 剂量加大,BMSCs 增殖能力增加,但 LPS 浓度进一步增加,BMSCs 增殖能力呈逐步下降趋势。本实验通过 MTT 法检测不同浓度 LPS 对 BMSCs 增殖的情况,结果显示不同浓度的 LPS 作用 24 h 后各组 BMSCs 的增殖情况明显不同,0.01  $\mu\text{g/ml}$  LPS 可显著促进 BMSCs 的增殖,而 0.1 ~ 100  $\mu\text{g/ml}$  LPS 范围内,随着 LPS 浓度加大增殖效应反而降低,可能与 LPS 的双相效应有关,过高浓度的 LPS 对 BMSCs 具有一定不良反应。本实验与赵强等<sup>[7]</sup>研究的 LPS 浓度范围不同,得出的结论有所差异,可能与所采用的检测方法及实验条件不同有关,但同样说明了小剂量的 LPS 可以促进 BMSCs 增殖,过高浓度的 LPS 可抑制 BMSCs 增殖。有研究报道,BMSCs 表面表达 TLR4,LPS 可激活 TLR4 信号通路发挥作用,但具体机制尚不清楚。

本研究证实,通过全骨髓贴壁分离法可获得能满足移植需要且均一性良好的 BMSCs,通过 MTT 法检测 LPS 对 BMSCs 增殖活性的影响,初步探讨了内毒素对 BMSCs 生物学特性的影响,对其具体作用机制及 BMSCs 临床应用的风险性仍需进一步研究。

## 参 考 文 献

- 1 Yao YW, Zhang FM, Wang LS, et al. Lipopolysaccharide preconditioning enhances the efficacy of mesenchymal stem cells transplantation in a rat model of acute myocardial infarction. *J Biomed Sci*, 2009, 16: 74-85.
- 2 Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36: 568-584.
- 3 韩德五. 肠源性内毒素血症是肝炎、肝病的危险因素. *山西医科大学学报*, 2006, 37: 1-4.
- 4 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284: 143-147.
- 5 Zohar R, Sodek J, McCullon CA. Characterisation of stromal progenitor cells enriched by flow cytometry. *Blood*, 1997, 90: 3471-3481.
- 6 赵强, 张馥敏, 王连生, 等. Toll样受体4及其配体脂多糖对骨髓间充质干细胞增殖的影响. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2008, 28: 345-349.
- 7 Mo IF, Yip KH, Chan WK, et al. Prolonged exposure to bacterial toxins downregulated expression of toll-like receptors in mesenchymal stromal cell-derived osteoprogenitors. *BMC Cell Biol*, 2008, 9: 52-64.

(收稿日期: 2009-11-23)

(本文编辑: 孙荣华)

郝彦琴, 卢宁, 李红, 等. 骨髓间充质干细胞的贴壁培养及内毒素对其增殖活性的影响[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2010, 4(2): 138-145.