

[文章编号] 1000-2200(2010)10-0982-04

· 基础医学 ·

人脐带间充质干细胞分离培养建立及其生物学特性观察

谢扬虎¹, 李玉云²

[摘要] **目的:**建立从人的脐带组织中分离和培养脐带间充质干细胞(UC-MSCs)的方法,并探讨 UC-MSCs 的生物学特性。**方法:**分别采用原代贴壁培养法和酶消化法(胶原酶 II 和胰酶)分离培养 UC-MSCs,瑞氏染色观察细胞形态,流式细胞术检测第 3 代以后的 UC-MSCs 表面特异标志物表达,MTT 法检测 P7 细胞增殖情况。UC-MSCs 同外周血单个核细胞共培养后,用 MTT 法测定细胞增殖率,Hoechst 与 PI 双染色,观察 UC-MSCs 对健康人淋巴细胞增殖的影响。**结果:**原代贴壁培养法 1 周左右可见成纤维样细胞从组织块边缘爬出,成簇生长;酶消化法 3~5 天可见成纤维样细胞均匀生长。传代培养后,UC-MSCs 均呈长梭形、旋涡状生长;细胞核大,核仁清晰;免疫表型:CD29 阳性率为(95.71 ± 2.23)%,CD31 和 CD34 阳性率分别为(2.47 ± 0.54)% 和(3.24 ± 0.34)%;第 7 代 UC-MSCs 仍具有较强的分裂增殖能力。UC-MSCs 对淋巴细胞的增殖反应具有抑制作用,呈细胞数量剂量依赖性,而淋巴细胞对 UC-MSCs 的生长未见影响。**结论:**从人脐带中成功分离培养的细胞具有 UC-MSCs 生物学特性。

[关键词] 干细胞,间充质;脐带;分离;培养;淋巴细胞

[中国图书资料分类法分类号] R 329.24 [文献标识码] A

Experimental study of human umbilical cord mesenchymal stem cell isolation, culture and biological characteristics

XIE Yang-hu¹, LI Yu-yun²

(1. Research Center of Clinical Laboratory Science, 2. Department of Clinical Laboratory, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for isolation and culture of umbilical cord mesenchymal stem cells (UC-MSCs) from human umbilical cord *in vitro*, and explore its biological characteristics. **Methods:** Human UC-MSCs were isolated and expanded in culture with explantation technique and enzyme digestion (collagenase II and trypsin), respectively; the cell morphology was observed by Wright-staining; after the third passage, the surface markers of UC-MSCs were detected and identified by flow cytometry, and the seventh passage, the cell proliferation was analyzed by MTT assay. After UC-MSCs were co-cultured with peripheral blood mononuclear cells, the impact on the T cells were observed by Hoechst and PI double staining. **Results:** About one week after explantation, the fibroblast-like cells sprawled out from the edge of the tissue, growing in cluster; 3-5 days after enzyme digestion, cells were watched growing fiber-shaped. After passaged, UC-MSCs showed the status of long, spindle-shaped and circinate growth; they had large nucleus and clear nucleolus. Immunophenotype analysis showed that they had strong positive expression for CD29 (95.71 ± 2.23)%, but weak expression for CD31, and CD34 were (2.47 ± 0.54)% and (3.24 ± 0.34)%, respectively; the seventh passage UC-MSCs still had strong proliferation ability; UC-MSCs suppressed T cells proliferation in a dose-dependent manner; lymphocytes did not affect the growth of UC-MSCs. **Conclusions:** The cells isolated successfully from the umbilical cord have biological characteristics of the mesenchymal stem cell. **[Key words]** stem cell, mesenchymal; umbilical cord; isolation; culture; lymphocyte

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是来源于早期中胚层的具有高度自我更新能力和多向分化潜能的多能干细胞,广泛存在于全身多种组织中,可在体外培养扩增,并能向骨、软骨、肌肉、韧带、肌腱、脂肪及基质细胞分化^[1-2]。目前,MSCs 主要来源为骨髓,但由于骨髓源性 MSC 存在高度病毒

污染的可能,且随着年龄增长其细胞数量和扩增、分化能力出现明显下降趋势^[3],寻找其他来源的 MSC 成为近年来的研究热点。由于脐带具有取材方便,无伦理学争议等优点^[4-5],近年成为关注的焦点。本研究主要观察来源于脐带的 MSCs 体外的分离、培养及其在免疫调节方面的生物学特性,旨在为又一来源 MSC 的临床应用提供技术方法和理论依据。

1 材料与方法

1.1 标本、主要试剂和仪器 足月剖宫产健康产妇脐带(安徽省蚌埠市第一人民医院提供),胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),胶原酶 II (Sigma, USA),胰蛋白酶(Gibco, USA),DMEM/F12

[收稿日期] 2010-04-02

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究资助项目(2006KJ392B)

[作者单位] 蚌埠医学院 1. 临床检验诊断学实验中心, 2. 临床检验诊断学教研室,安徽蚌埠 233030

[作者简介] 谢扬虎(1976-),男,硕士研究生,主管检验师。

[通讯作者] 李玉云,研究生导师,副教授。

培养基(Gibco, USA), CD29-PE、CD31-PE、CD34-PE(eBioscience, USA), Heochyst、PI(碧云天生物技术研究), Ficoll 分离液(天津灏洋生物公司)、RPMI-1640 培养液(Gibco, USA)和 LGR16-W 型高速低温离心机(北京医用离心机厂), 流式细胞仪(BD FACSCalibur FACS101), Multiskan Ascent 酶标仪(Thermo Fisher Scientific)等。

1.2 UC-MSCs 的分离培养 在无菌条件下取出脐带浸入无血清的 DMEM/F12 培养基中, 用含有青霉素和硫酸链霉素的 PBS 缓冲溶液洗涤去除残存血, 剔除动静脉和外包膜将脐带剪碎至 $1\text{ mm} \times 1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ 大小。分别采用贴壁细胞培养法和酶消化法(先后经 0.1% 胶原酶 II 和 0.25% 胰酶消化), PBS 洗涤, 以 $1.0 \times 10^6/\text{cm}^2$ 接种到 25 cm^2 培养瓶, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$ 饱和湿度条件下细胞培养箱中培养, 1 周左右更换培养液。至 $10 \sim 14$ 天单层贴壁细胞接近 80% 汇合时, 0.25% 胰蛋白酶消化, $1:2$ 传代。以后随细胞扩增均于 80% 左右汇合时按 $1:2$ 持续体外传代培养。

1.3 流式细胞术检测细胞表面标志物 待细胞培养至第 3 代后, 接近 80% 汇合时, 0.25% 胰蛋白酶消化收集细胞, 取约 1×10^6 个细胞悬于 100 ml PBS 中, 分别加入适量 PE 标记 CD29、CD31、CD34 抗体避光染色 30 min 。最后用 1% 多聚甲醛重悬, 流式细胞仪检测分析。

1.4 细胞生长曲线的测定 将第 7 代贴壁细胞用 0.25% 胰酶消化后, 按 1×10^4 接种 96 孔板, 每组设 5 个复孔, 同时以无细胞培养液作为空白对照, 于 490 nm 处酶标仪测各组细胞的吸光度(OD 值), 取均值绘制生长曲线。

1.5 UC-MSCs 对淋巴细胞增殖的影响

1.5.1 外周血单个核细胞(PBMC)分离 取健康人外周血 5 ml 与体积相同的预温 RPMI-1640 培养液混匀平铺于 Ficoll 分离液上层, 恒温离心机 1800 r/min 离心 15 min , 收集中间白膜层细胞, 加入 RPMI-1640 培养液洗涤 2 次, 置于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养液中, 加入刺激剂, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$ 孵箱中培养 2 h 后, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 备用。

1.5.2 实验分组 实验分 8 组: (1) PBMC (阴性组); (2) PBMC + IL-2 (阳性对照组); (3) PBMC + 1×10^5 UC-MSCs + IL-2 (实验组 1); (4) 1×10^5 UC-MSCs (实验组 1 空白对照组); (5) PBMC + 1×10^4 UC-MSCs + IL-2 (实验组 2); (6) 1×10^4 UC-MSCs (实验组 2 空白对照组); (7) PBMC + 1×10^3 UC-MSCs + IL-2 (实验组 3); (8) 1×10^3 UC-MSCs (实验组 3 空白对照组)。每组设 5 个复孔。

1.5.3 UC-MSCs 对淋巴细胞增殖影响测定 取第

3 代融合度达 80% 的 UC-MSCs, $30\text{ Gy }^{60}\text{Co}$ 照射后, 用培养液洗 2 次, 0.25% 胰酶消化后以分组所指示数量接种于 96 孔板培养。每组分别加入 IL-2 (1000 u/ml), 同体系含 10% 胎牛血清 RPMI-1640 完全培养基使其体积 $100\text{ }\mu\text{l}$, 培养 72 h 后, 每孔加入 $20\text{ }\mu\text{l}$ MTT 溶液 (5 mg/ml , 即 0.5% MTT), 继续培养 4 h 后终止培养, 每孔加入 $150\text{ }\mu\text{l}$ 二甲基亚砜, 充分溶解结晶物。在酶标仪 490 nm 处测量各孔的吸光度。按 [(各实验组 OD 值 - 各实验组空白对照 OD 值)/阴性组 OD 值] 计算淋巴细胞增殖率。

1.6 Hoechst 与 PI 双染色 UC-MSCs 与外周血单个核细胞按 $1:1$ 接种于含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基的 6 孔板中(6 孔板中预先放有 0.1% 明胶包被好玻片), 并加入 IL-2 (1000 u/ml)。对照组不加单个核细胞, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$ 孵箱中培养 48 h 后, 采用 Hoechst ($50\text{ }\mu\text{g/ml}$) $10\text{ }\mu\text{l}$ 染色 1 h , PBS 洗涤 3 次, 再加 PI ($50\text{ }\mu\text{g/ml}$) $10\text{ }\mu\text{l}$ 染色 $5 \sim 7\text{ min}$, 弃培养液, PBS 洗涤 2 次, 封片, 荧光显微镜下观察细胞核。

1.7 统计学方法 采用 t 检验和 χ^2 检验。

2 结果

2.1 2 种方法培养结果比较 原代贴壁培养法 1 周左右可见成纤维样细胞从组织块边缘爬出, 成簇生长; 酶消化法 $3 \sim 5$ 天可见成纤维样细胞均匀生长。传代培养后, UC-MSCs 均呈长梭形、旋涡状生长; 细胞核大, 核仁清晰。2 种方法培养的细胞第 3 代后呈均一的成纤维样细胞形态, 排列紧密, 传代培养 10 代细胞形态无明显改变(见图 1A~F)。

2.2 UC-MSCs 的免疫表型分析 流式分析表明, 2 种方法培养的脐带源细胞均强表达整合素黏附分子 CD29 ($95.71 \pm 2.23\%$), 造血细胞的标志 CD34 和内皮细胞标志 CD31 仅为 ($3.24 \pm 0.34\%$) 和 ($2.47 \pm 0.54\%$) (见图 2)。以下实验所用的细胞均为贴壁培养的细胞。

2.3 UC-MSCs 的增殖生长曲线 传代潜伏期约 $24 \sim 48\text{ h}$, 细胞增殖较快的是在对数生长期, 第 $1 \sim 7$ 天的 OD 值分别为 0.102 、 0.159 、 0.259 、 0.400 、 0.507 、 0.535 、 0.558 , 到第 5 天后生长减慢。

2.4 UC-MSCs 对淋巴细胞增殖影响 预刺激的淋巴细胞在 IL-2 作用下, 淋巴细胞继续克隆性增殖。在活化淋巴细胞反应体系中加入 UC-MSCs, 淋巴细胞增殖受到明显的抑制 ($P < 0.01$) (见表 1)。MTT 法检测提示, 不同浓度 UC-MSCs 抑制淋巴细胞增殖, UC-MSCs 抑制能力呈剂量依赖性。

2.5 Hoechst 和 PI 染色结果 加入 PBMC 的 UC-MSCs 和未加入 PBMC 的 UC-MSC 的细胞核并未出现变化, 与 UC-MSCs 共同培养的单个核细胞有凋亡细胞出现(见图 3)。

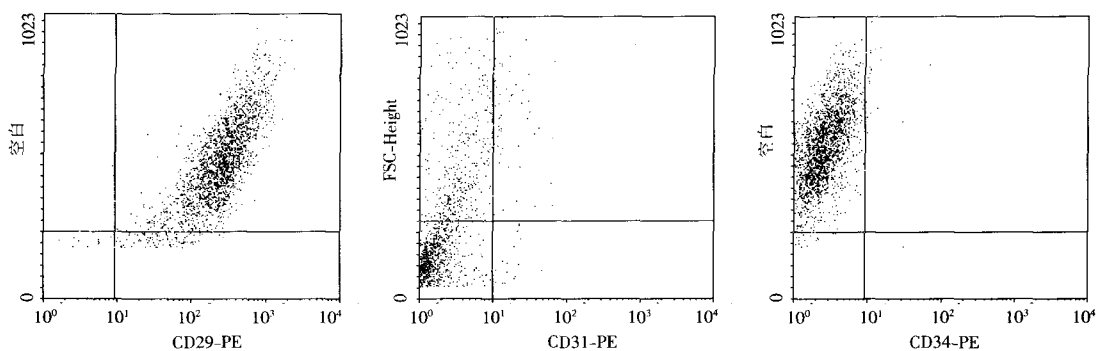
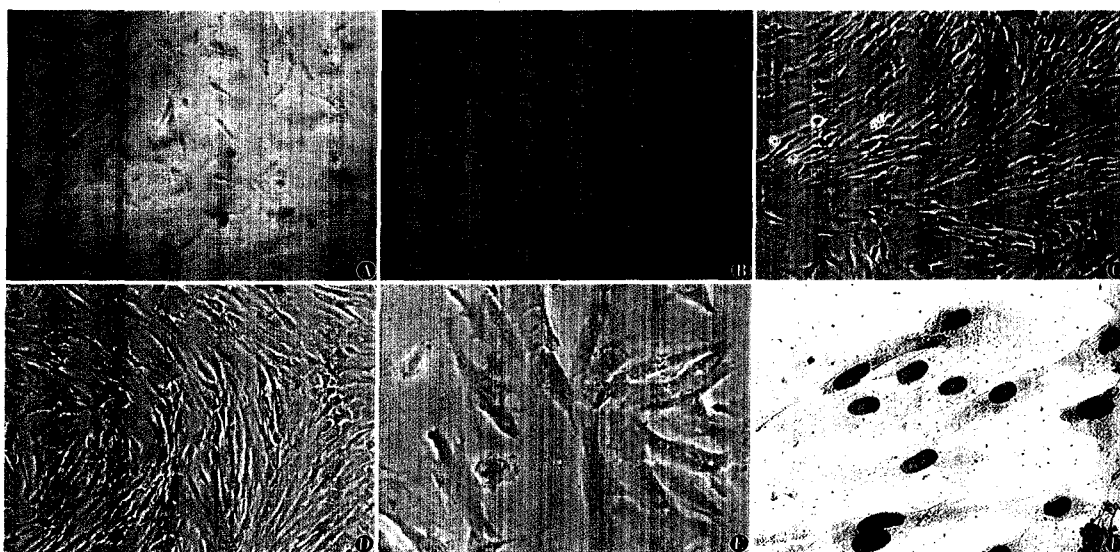


图 1 UC-MSCs 免疫表型



A:贴壁培养法第 8 天获得的人 UC-MSCs;B:酶消化法获得第 1 代 UC-MSCs;C:贴壁培养法第 3 代 UC-MSCs;D:贴壁培养法第 7 代 UC-MSCs; E:贴壁培养法第 10 代 UC-MSCs;F:UC-MSCs 形态(瑞士染色)

图 2 UC-MSCs 镜下形态

表 1 各实验组对淋巴细胞体外活化细胞增殖率(%) (n = 33; $\bar{x} \pm s$)

分组	细胞增殖率
阳性对照组	1.377 ± 0.109
实验组 1	0.822 ± 0.098
实验组 2	1.097 ± 0.104
实验组 3	1.239 ± 0.089
F	184.64
P	< 0.01
MS _{组内}	0.010

3 讨论

脐带包括 1 条静脉和 2 条动脉,周围是 Wharton's Jelly 组织,外层由羊膜来源的上皮包裹。近年报道^[6-7]的分离方法有很多种,主要包括贴壁细胞培养法、酶消化脐带 Wharton's Jelly 组织或酶

消化脐静脉内膜法等。本实验采用 Wharton's Jelly 组织贴壁细胞培养法、酶消化脐带 Wharton's Jelly 组织培养法,获得的细胞高表达黏附分子 CD29 (95.71 ± 2.23)%,低表达造血干细胞表面标志 CD34 (3.24 ± 0.34)% 和内皮细胞表面标志 CD31 (2.47 ± 0.54)%。另外,细胞形态、增殖活性等具有与既往报道^[6,8]的 UC-MSCs 相似的性质。同时也发现组织贴壁培养方法简单,细胞多沿组织块边缘成簇生长;胶原酶消化法细胞生长均匀,但操作过程中产生的胶原难以去除,酶消化的时间都会导致细胞难以贴壁。2 种方法培养的第 3 代以后无区别。通过对第 7 代细胞生长曲线的绘制发现,传代潜伏期约 24 ~ 48 h,细胞增殖较快的是在对数生长期,到第 5 天后生长减慢,减慢的原因有可能为接触抑制。本实验结果也提示从脐带来源的基质细胞是 MSCs,具有 MSCs 的特性,并有与骨髓 MSCs 相同的免疫表型^[3,9]。

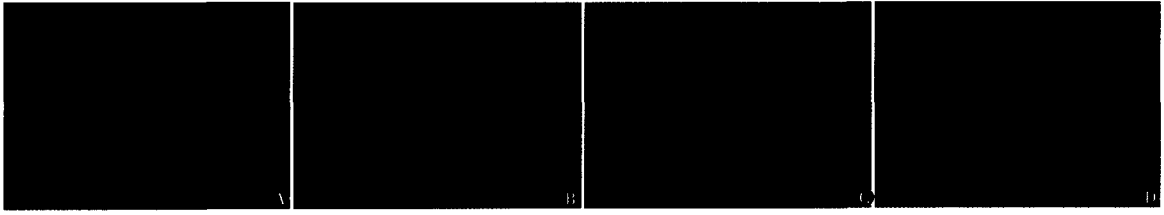


图 3 A、B 为 Hoechst 和 PI 对 UC-MSCs 染色;C、D 为 Hoechst 和 PI 对共培养的 UC-MSCs 同淋巴细胞染色, C 未见 UC-MSCs 核有变化,D 可见凋亡的淋巴细胞

有研究^[10]证明骨髓源 MSCs 具有免疫调节特性。骨髓 MSCs 的这种免疫调节作用,不仅作用于 T 细胞,而且对树突状细胞、自然杀伤细胞和 B 淋巴细胞的免疫功能都有一定的影响^[11-13]。许多学者研究^[14]发现 MSCs 抑制淋巴细胞的途径之一可能是通过细胞之间的相互接触和分泌可溶性因子来实现。为了观察 UC-MSCs 是否有相似的免疫调节特性,本实验用 MTT 法检测 UC-MSCs 对预激活的外周血淋巴细胞增殖的影响,结果提示 UC-MSCs 能够抑制淋巴细胞的增殖,且随着 UC-MSCs 增多,其抑制淋巴细胞增殖的能力越强,具有剂量依赖性。为了观察相互接触时是否有类似现象出现,根据 PI 不能通过完整的细胞膜,但可以进入死细胞, Hoechst 染色时正常细胞的核呈蓝色,而凋亡细胞的核会呈致密浓染这一特性,对 UC-MSCs 和共培养的外周血中 PBMC 进行双染,发现 UC-MSCs 的细胞核未见明显变化,但可见到 PBMC 死亡现象发生。UC-MSCs 抑制淋巴细胞增殖的机制有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*, 1999, 284(5411):143-147.
- [2] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. *Nature*, 2002, 418(6893):41-49.
- [3] Rao MS, Mattson MP. Stem cells and aging: expanding the possibilities[J]. *Mech Aging Dev*, 2001, 122(6):713-734.
- [4] Weiss ML, Troyer DL. Stem cells in the umbilical cord[J]. *Stem Cell Rev*, 2006, 2(2):155-162.
- [5] 张彦, 黄平平. 人脐带间充质干细胞的生物学特性及应用前

景[J]. *国际移植与血液净化杂志*, 2007, 5(4):39-42.

- [6] Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, *et al.* Human umbilical cord perivascular cells: a source of mesenchymal progenitors[J]. *Stem Cells*, 2005, 23(2):220-229.
- [7] Wang HS, Hung SC, Penq ST, *et al.* Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord[J]. *Stem Cells*, 2004, 22(7):1330-1337.
- [8] Lu LL, Liu YJ, Yang SG, *et al.* Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials [J]. *Haematologica*, 2006, 91(8):1017-1026.
- [9] 张英杰, 李玉云. MSCs 分离培养及定向分化为血管内皮细胞的研究[J]. *中国现代药物应用*, 2008, 2(13):4-5.
- [10] Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, *et al.* Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic response independently of the major histocompatibility complex[J]. *Scand J Immunol*, 2003, 57(1):11-20.
- [11] Zhang W, Ge W, Li C, *et al.* Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells[J]. *Stem Cells Dev*, 2004, 13(3):263-271.
- [12] Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, *et al.* Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation [J]. *Blood*, 2006, 107(4):1484-1490.
- [13] Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, *et al.* Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions [J]. *Blood*, 2006, 107(1):367-372.
- [14] Rasmuson I, Ringden O, Sundberg B, *et al.* Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms[J]. *Exp Cell Res*, 2005, 305(1):33-41.

(上接第 981 页)

- [5] Geschwind N, Levitsky W. Human brains left-right asymmetries in temporal speech region[J]. *Science*, 1968, 161(837):186-187.
- [6] Foundas AL, Leonard CM, Gilmore RL, *et al.* Pars triangularis asymmetry and language dominance[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(2):719-722.
- [7] Watkins KE, Paus T, Lerch JP, *et al.* Structural asymmetries in the human brain: a voxel-based statistical analysis of 142 MRI scans [J]. *Cereb Cortex*, 2001, 11(9):868-877.
- [8] Cao Y, Whalen S, Huang J, *et al.* Asymmetry of subinsular anisotropy by *in vivo* diffusion tensor imaging [J]. *Hum Brain*

Mapp, 2003, 20(2):82-90.

- [9] Rodrigo S, Naggara O, Oppenheim S, *et al.* Human subinsular asymmetry studied by diffusion tensor imaging and fiber tracking [J]. *AJNR*, 2007, 28(8):1526-1531.
- [10] 张剑凯, 李雪鹏, 李少华, 等. 端脑横切面上内囊后肢不对称性研究[J]. *局解手术学杂志*, 2009, 18(3):153-154.
- [11] 汪启东, 徐晓俊, 张敏鸣. 两侧内囊非对称性的磁共振弥散张量成像研究[J]. *浙江大学学报:医学版*, 2008, 37(5):472-476.
- [12] 陆成樑. 脑内主要核团的体积研究——不对称性及其与整脑的相关性[J]. *解剖学杂志*, 1987, 10(4):299-302.