

• 论 著 •

不同年龄患者骨髓间充质干细胞体外生长特性^{*}

陈国军¹, 王亚莉^{1△}, 方 凤¹, 刘厚奇²

(1. 武警浙江总队医院, 浙江嘉兴 314000; 2. 第二军医大学发育生物学研究所, 上海 200433)

摘 要:目的 观察不同年龄患者骨髓间充质干细胞(hMSCs)体外增殖特性。方法 使用密度梯度离心法分离患者骨髓 hMSCs, 对其进行培养并保留贴壁细胞传代。观察项目: 细胞生长情况, 第 1、2、3 代细胞传代时间, 扩增至治疗所需细胞数量时间。20 例患者分组: A 组(11 个月~3 岁)6 例、B 组(4~20 岁)6 例、C 组(21~40 岁)5 例、D 组(41~60 岁)3 例。结果 (1)原代时间: A、B 和 C 组 3 组首次传代时间相仿($t=0.12, t=0.55, P>0.05$)差异无统计学意义, D 组首次传代时间明显长于其他 3 组, ($t=2.73, P<0.05$)。 (2)第 2 次传代时间: A 组和 B 组明显短于 C 组和 D 组($t=4.84, P<0.01$); (3)第 3 次传代时间: A 组最快($t=2.42, P<0.05$), 其余 3 组传代时间差异无统计学意义($t=1.23, t=0.64, P>0.05$)。 (4)20 岁以内患者培养达到治疗数量细胞所需的时间明显小于 20 岁以上年龄的患者($t=4.06, P<0.01$), A 组以及 B 组所需时间差异无统计学意义($t=0.97, P>0.05$)。结论 hMSC 的体外培养增殖速度随着年龄的增加而降低。

关键词: 间质干细胞; 细胞培养; 增殖; 年龄

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.19.012

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)19-2189-03

Effects of age on in vitro proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells^{*}

Chen Guojun¹, Wang Yali^{1△}, Fang Feng¹, Liu Houqi²

(1. Zhejiang Armed Police Hospital, Jiaxin Zhejiang 314000, China; 2. Institute of Developmental Biology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: **Objective** To determine whether proliferation and differentiation capability of human mesenchymal stem cells(hMSCs) might be influence by age. **Methods** hMSCs cultures were obtained by using density centrifuge method from 20 donors aged from 11 months to 56 years old, including 6 cases less than 3 years old as group A, 6 cases less than 20 years old as group B, 5 cases less than 40 years old as group C and 3 cases less than 60 years old as group D. The cell growth, the time required for passage 1, 2 and 3 generation and the time required for amplification to needed cell population were investigated. **Results** There was no significant difference of the first passage time between group A, B and C ($t=0.12, t=0.55, P>0.05$), but that of group D was longer than the previous 3 groups ($t=2.73, P<0.05$). The second passage time of group A and B was significantly shorter than the other two groups ($t=4.84, P<0.001$). The third passage time of group A was the shortest ($t=2.42, P<0.05$), but those of the other three groups were not significantly different ($t=1.23, t=0.64, P>0.05$). The time required for amplification to needed cell population of group A and B was shorter than that of group C and D ($t=4.06, P<0.01$), but not significantly different between group A and B ($t=0.97, P>0.05$). **Conclusion** The in vitro proliferation rate of hMSC decreased with the age increasing of donors.

Key words: mesenchymal stem cells; cell culture; proliferation; aging

早在 20 世纪 70 年代中期, 已经证实哺乳动物的骨髓基质中, 存在具有形成骨、软骨、脂肪、肝细胞、神经和成肌细胞能力的多种分化潜能的细胞亚群, 称之为骨髓间充质干细胞(marrow mensenchymal cells, MSCs)。目前, 国内外已有大量关于以骨髓间充质干细胞做为种子细胞, 在体外成功培养、分化为神经干细胞、血管内皮细胞、肝细胞、软骨组织、骨组织等的报道。随着临床上组织工程应用的推广, 种子细胞的来源、培养活性以及生长速度成为临床最为关注的问题^[1-2]。虽然胚胎干细胞以其全能性和无限增殖能力有望成为组织工程中种子细胞的新来源, 但其伦理问题、提纯和分化控制的技术难题等限制了胚胎干细胞的应用, 人体骨髓间充质干细胞(human marrow mensenchymal cells, hMSCs)是临床研究的重点^[3]。Wexler 等^[4]研究表明成年人 hMSCs 是最好的组织工程种子细胞来源, 但不同年龄的 hMSCs 体外增殖、分化特点有很大差异。所培养的自体 hMSCs 的增殖、分化为所需要的细胞的能力是否能满足临床修复不同类型疾病损伤的需要, 怎样把握培

养不同年龄阶段的 hMSCs 的生物学特点以获取生活活力好、足够的种子细胞, 确定不同年龄阶段患者骨髓间充质干细胞体外增殖特点, 目前尚缺少对这方面的系统研究。

1 资料与方法

1.1 一般资料 骨髓样本 20 例来自年龄 11 个月~55 岁患者, 男 11 例, 女 9 例, 其中脑瘫 11 例, 运动神经元疾病 2 例, 脑出血后遗症 1 例, 缺血缺氧性脑病昏迷 1 例, 肝硬化 2 例, 系统性红斑狼疮 1 例, 强直性脊柱炎 1 例, 粒细胞缺乏 1 例。分为 A 组(11 个月~3 岁)6 例、B 组(4~20 岁)6 例、C 组(21~40 岁)5 例、D 组(41~60 岁)3 例, 所有患者均签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂 MSC 培养基(含 DMEM、MCDS、优级 FBS、LAA, Sigma 公司); Tris-NH₄Cl 红细胞裂解剂(Sigma 公司); 0.05% Trypsin-EDTA(GIBCO 公司); PBS 缓冲液; bFGF; 倒置显微镜; CD34、CD109、CD29 和 CD44 单抗; 大皿(直径 100 mm)和中皿(60 mm)培养基。

1.3 hMSCs 的原代细胞分离培养 根据 0.6~1 mL/kg 体质

量取右侧髂后上嵴采集骨髓 8~55 mL,骨髓收集管中按 100 U/mL 加入肝素抗凝,骨髓样分装到多支 15 mL 离心管,每管 5 mL,加入等量的 PBS 溶液,配平,1 000 r/min,离心 7 min。离心结束,小心取出,用移液管抽取上层液体,弃掉,用细管抽取中间白膜层(尽量少带入红细胞),抽到新管内,加入 PBS 清洗 2 次后,用培养基重悬后倒入培养皿中标记 A 皿。原管加 Tris-NH₄Cl 等量 3~4 mL,置 4℃ 5 min 后,1 000 r/min,离心 5 min,去掉上清液,再次抽取白膜层,PBS 清洗后,倒去上清液,用培养基重悬,分装到 1 个培养皿中标记 B 皿。根据骨髓量的多少以及白膜层是否明显决定放入大皿或是中皿内。置 37℃,5% CO₂ 饱和湿度孵箱内孵育,48 h 半量换液,4 d 后全量换液,弃去大量的悬浮细胞,以后每 3~4 d 根据培养基颜色换液。

1.4 hMSCs 的传代培养 待原代细胞达到覆盖培养皿的 60%~80% 后,给予 1:3 传代。弃去上清液,PBS 清洗 2 次后,滴加 0.05% 的 Trypsin-EDTA 液消化,在显微镜下观察细胞触角收缩,细胞变成圆形后,添加培养基终止消化,将细胞悬液分装在不同的培养皿中。3~4 d 根据培养基颜色换液。

1.5 活体细胞显微镜观察 倒置相差显微镜逐日观察原代及传代细胞生长情况和形态特征。

1.6 hMSCs 的细胞标志检测 采用第 2 代或第 3 代细胞(第 1 次移植治疗时),当细胞数量达到 10⁷ 时,用 PBS 清洗 2 次后,滴加 0.05% 的 Trypsin-EDTA 液消化,后加培养基终止消化,制成(1~3)×10⁶ 的细胞悬液,用流式细胞仪进行检测显示 CD34 阴性,CD109 阴性、CD29 和 CD44 阳性率均大于 95%。

2 结 果

2.1 不同年龄段细胞生长情况 分离的 hMSCs 细胞第 2 d 可见贴壁生长,先呈圆点形,逐渐伸出触角成梭形,原代细胞贴壁较慢,24 h 后逐渐贴壁,换液培养,去除 hMSCs,贴壁细胞渐形成集落。20 岁以下患者供体形成集落明显,细胞数较多,细胞呈长梭形较集中,生长密集,生长速度快,死细胞较少。20 岁以上患者形成集落小,细胞数较少,细胞较大呈短梭形散在分布,死细胞较多。见图 1~4。

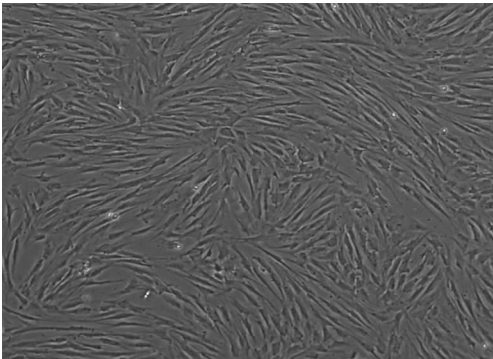


图 1 11 个月女性患者培养 3 周(×40 倍)

2.2 不同年龄段细胞传代时间分析 (1)A、B 和 C 组 3 组 P1 传代时间相仿(*t* 分别为 0.12,0.55,均 *P*>0.05),但 D 组首次传代时间较其他 3 组明显较长(*t*=2.73,*P*<0.05)。(2)P2 传代时间 A 组和 B 组比较差异无统计意义(*t*=1.95,*P*>0.05),C 组和 D 组比较差异无统计意义(*t*=0.49,*P*>0.05),但 C 组和 D 组传代时间明显长于 A 组和 B 组。(3)P3 传代时间 A 组需要时间最短,B、C 和 D 组 3 组均长于 A 组;B、C 和 D 组差异无统计学意义(*t* 分别为 1.23,0.64,均 *P*>0.05)。见表 1。

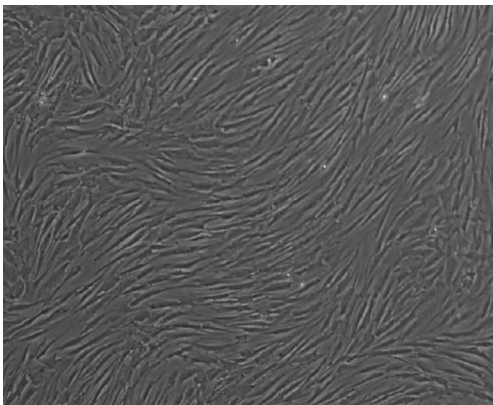


图 2 13 岁女性患者培养 3 周(×40 倍)

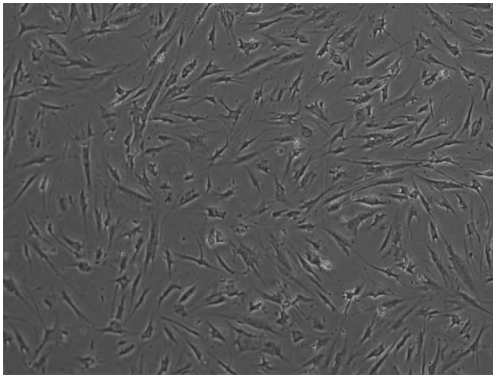


图 3 35 岁女性患者培养 3 周(×40 倍)

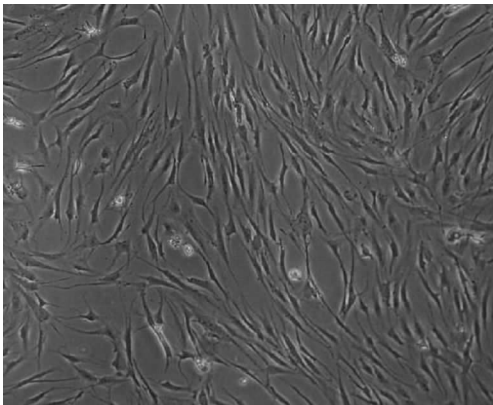


图 4 56 岁男性患者培养 3 周(×40 倍)

表 1 不同年龄段细胞培养参数($\bar{x} \pm s$)

组别	例数 (<i>n</i>)	平均年龄 (岁)	P1 传代时间 (d)	P2 传代时间 (d)	P3 传代时间 (d)
A 组	6	1.9±0.8	7.5±1.6	11.8±1.2	16.3±1.0
B 组	6	8.2±4.5	7.6±1.2	13.8±2.2	20.0±4.2 ^③
C 组	5	26.0±6.2	8.0±1.2	18.4±3.1 ^②	23.6±4.4 ^⑤
D 组	3	56.0±1.7	11.7±3.5 ^①	17.3±3.1 ^④	21.3±4.0 ^⑥

①②③④⑤⑥:均与 A 组比较,*t*=2.73,*P*<0.05;*t*=4.84,*P*<0.001;
t=2.42,*P*<0.05;*t*=0.49,*P*>0.05;*t*=1.23,*P*>0.05;*t*=0.64,*P*>0.05。

2.3 对不同年龄段达到移植治疗数量细胞所需要时间,以及移植细胞的数量分析 A 组和 B 组患者达到治疗数量细胞所需时间比较差异无统计意义(*t*=0.97,*P*>0.05),C 组和 D 组

患者达到治疗数量细胞所需时间比较差异无统计意义($t=0.18, P>0.05$),但 C 组和 D 组达到治疗数量细胞所需时间明显长于 A 组和 B 组 2 组。见表 2。

表 2 达到移植治疗数量细胞所需要时间($\bar{x}\pm s$)

组别	例数 (<i>n</i>)	第 1 次治疗时间 (d)	第 1 次移植细胞数 ($\times 10^7$ 个)
A 组	6	16.3 \pm 2.3	2.4 \pm 1.2
B 组	6	14.7 \pm 3.3 ^①	1.9 \pm 1.2
C 组	5	29.0 \pm 7.8 ^②	2.2 \pm 1.4
D 组	3	28.0 \pm 6.7 ^②	1.8 \pm 0.6

①②:分别与 A 组比较, $t=0.97, P>0.05; t=4.06, P<0.01$;③:与 C 组和 D 组比较, $t=0.18, P>0.05$ 。

3 讨 论

由于骨髓间充质干细胞可分离与体外培养和扩增,使其在组织修复治疗上具有广阔的应用前景。细胞治疗能否获得理想效果,间充质干细胞的实验室细胞工程质量是关键因素,研究显示骨髓 hMSCs 的含量、质量、活性等随着年龄的增长而下降^[5-7]。hMSCs 的克隆数量随年龄的增长而逐渐减少,具体表现为新生儿、青少年、50 岁及 80 岁成年人骨髓中 hMSCs 克隆与骨髓有核细胞数的比率分别为 1:10 000、1:100 000、1 400 000 和 1:1 000 000~1:2000 000^[8]。黄科等^[9]对胚胎、0~19 岁、20~40 岁以及 40 岁以上 hMSCs 体外培养细胞培养增殖速度与传代时间进行观察,显示 0~19 岁和 20~40 岁有差异,而胚胎 MSCs 原代培养时间平均为 15 d,明显长于其他年龄组的骨髓 MSCs 原代培养时间。有学者报道胎儿 MSCs 的体外扩增速度与成人 MSCs 差异无统计学意义,且融合后无接触抑制,细胞重叠生长,生长速度不受影响^[10-11]。鉴于 0~3 岁是生长发育的快速期,本组将 0~20 岁范围细分为 0~3 岁和 4~20 岁分组,结果显示 2 个年龄段细胞培养过程中传代时间和培养达到治疗数量细胞的时间均相似,表现为细胞培养满 3 周时显微镜下可见细胞较密集,呈长梭形,而 20 岁以上患者细胞呈短梭形,不密集。0~3 岁组和 4~20 岁组患者原代培养 6~9 d 传代后每隔 4~5d 传代 1 次,2~3 周后可达到治疗所需的细胞数量;而 20 岁以上患者治疗所需的细胞数量则需要 3~4 周时间。Choumerianou 等^[12]研究发现儿童骨髓来源的 hMSCs 与成人相比倍增时间短,形成的集落多,认为儿童 MSCs 是组织工程和细胞治疗较为理想的来源。本研究再次表明 0~3 岁组和 4~20 岁组骨髓 MSCs 培养的生长特征是类似的,0~3 岁组并没有显示骨髓 MSCs 培养更快速和生长高效率,综合现有报道资料表明 0~20 岁骨髓 MSCs 在短

时间内培养可获取足够细胞数,是细胞治疗的的理想供体。另外在培养过程中本组还发现细胞的生长速度、传代时间与患者的病种明显有关,如脑瘫患儿细胞增殖速度明显快于其他疾病患者,运动神经元疾病患者的细胞增殖速度明显减慢,但因病例数较少,需要进一步积累临床病例资料。

参考文献

[1] 车媛梅,张一,王辉,等.骨髓干细胞向肝系细胞分化的研究进展[J].国际检验医学杂志,2006,27(2):149-151.
[2] 李芙蓉,侯卫平,程悦,等.SD 大鼠间充质干细胞的分离培养及生物学特性研究[J].国际检验医学杂志,2009,30(5):425-427.
[3] Butte RLD, Bourne S, Xynos JD, et al. Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from murine embryonic stem cells[J]. Tissue Eng, 2001, 7(1): 89-99.
[4] Wexler SA, Donaldson C, Denning KP, et al. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal stem cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not [J]. Br J Haematol, 2003, 121(2): 368-374.
[5] Yu JM, Wu X, Gimble JM, et al. Age-related changes in mesenchymal stem cells derived from rhesus macaque bone marrow[J]. Aging Cell, 2011, 10(1): 66-79.
[6] Tokalov SV, Gruener S, Schindler S. A number of bone marrow mesenchymal stem cells but neither phenotype nor differentiation capacities changes with age of rats[J]. Mol Cells, 2007, 24(2): 255-260.
[7] Iagunov AS, Baumann M, Abolmaali ND, et al. Effect of maturation on the osteogenic response of cultured stromal bone marrow cells to basic fibroblast growth factor[J]. Bone, 2000, 27(16): 777-783.
[8] Service RF. Tissue engineering build new bone[J]. Science, 2000, 289(5484): 1498-1500.
[9] 黄科,周敦华,黄绍良,等.不同年龄段人骨髓间充质干细胞生物学特性的研究[J].中国实验血液学杂志,2005,13(6):1049-1053.
[10] 周敦华,黄绍良,吴燕峰,等.人骨髓间充质干细胞体外扩增及生物学特性的研究[J].中华儿科杂志,2003,41(8):607-610.
[11] 姜玉峰,慕晓玲,李思源,等.三种不同年龄段人骨髓间充质干细胞的生物学性状[J].解剖学杂志,2005,28(4):400-402.
[12] Choumerianou DM, Martimianaki G, Stiakaki E, et al. Comparative study of stemness characteristics of mesenchymal cells from bone marrow of children and adults[J]. Cytotherapy, 2010, 12(7): 881-887.

(收稿日期:2011-08-11)

(上接第 2188 页)

[15] 张宇宇,曹德生,罗迪. TSGF/CA242/CA19-9/VEGF 联检在胰腺癌诊疗中的意义[J].放射免疫学杂志,2008,21(1):65-69.
[16] 陈金华.性别和性激素对胰腺癌的影响[J].国际肿瘤学杂志,1989,2(44):314-317.
[17] Jiang JT, Wu CP, Deng HF. Serum levels of TSGF, CA242 and CA199 in pancreatic cancer[J]. Cancer, 2004, 10(11): 1675-1677.

[18] Berg EL, Robinson MK, Mansson O. A carbohydrate domain common to both sialylLe(a) and sialylLe(X) is recognized by the endothelial cell leukocyte adhesion molecule ELAM21 [J]. J Biol Chem, 1991, 266(26): 14869-14872.

(收稿日期:2011-07-21)