

人骨髓间充质干细胞体外长期传代培养及恶性转化趋势实验研究

黄英华, 韦 瑛, 蔡 捷, 朱名毅, 李小平, 邹维艳, 温冠媚, 邝晓聪

基金项目: 广西自然科学基金项目(青 0447026), 广西留学回国人员科学基金项目(桂科回 0731016)

作者单位: 530021 南宁, 广西医科大学病理生理学教研室(黄英华, 韦 瑛, 朱名毅, 邝晓聪); 广西医科大学实验中心(蔡 捷, 李小平);

510182 广东, 广州医学院病理生理学教研室(温冠媚); 233003 安徽, 蚌埠医学院组织胚胎学教研室(邹维艳)

作者简介: 黄英华(1982-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 肿瘤干细胞与肿瘤耐药

通讯作者: 邝晓聪, 广西医科大学病理生理学教研室, 副教授。E-mail: bekxc@yahoo.com.cn

【摘要】 目的 探讨人骨髓间充质干细胞体外长期传代培养、扩增及其生物学特性, 观察其恶性转化趋势的可能性。**方法** 采用密度梯度离心差速贴壁法对人骨髓来源的间充质干细胞进行分离纯化, 并进行体外长期传代, 观察细胞形态及生长方式; 鉴定细胞分化能力; 相关癌标志 P53、Ki67 的表达与成瘤性检测。结果经过长期体外培养的人间充质干细胞, 至 36 代时, 细胞逐渐老化; 成骨分化诱导能力丧失; 相关癌标志表达阴性; 无成瘤性。**结论** 人骨髓间充质干细胞在体外可以有有限传代, 无显著恶性转化趋势。

【关键词】 人骨髓间充质干细胞; 细胞培养; 恶性转化

【中图分类号】 Q 343 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1674-3806(2009)06-0552-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2009.06.03

Investigation of long term in vitro culture and malignant transformation of human mesenchymal stem cell

HUANG Ying-hua, WEI Ying, CAI Jie, et al. Department of Pathophysiology, Guangxi Medical University, Nan-ning 530021, China

【Abstract】 Objective To discuss the biological properties of human bone marrow derived mesenchymal stem cell (hBMSC) after long term in vitro culture and it's malignant transformation. **Methods** hBMSCs were isolated and enriched by the gradient centrifugation protocol and cultured in vitro for long term. During in vitro culture, the cell line's morphology were observed; It's differentiation were evaluated; The expression of cancer relative markers: P53、Ki67 were detected, and the tumor-initiate ability were assessed. **Results** When culture to the 36th passage, hMSC were gradually aging, cannot differentiate to ossification, cancer relative markers were still negative, there was no tumor initiation. **Conclusion** hBMSCs can be cultured in vitro for limited time, there was no significantly malignant transformation during the limited term.

【Key words】 Human bone marrow derived mesenchymal stem cell; Cell culture; Malignant transformation

人类间充质干细胞(human mesenchymal stem cell, hMSC)是一种成体多能干细胞,具有多种分化能力,能够分化成各种血液细胞、成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、心肌细胞、神经细胞等^[1]。因此,在组织工程和细胞再生治疗中起着重要的作用,成为研究的热点。但目前对 hMSC 的体外研究大都是短期研究,对 hMSC 的体外的长期培养以及相关研究国内外鲜有报道。为此,我们在对成人骨髓来源的 MSC 进行分离、纯化的基础上,将其进行体外长期传代培养,以及对其相关生物学特性进行研究,并着

重关注其恶性转化趋势,为 MSC 的临床应用提供进一步的实验基础。

1 材料与方法

1.1 标本来源 骨髓标本来源于广西医科大学附属第一医院无血液病知情同意的自愿捐献者。骨髓取自髂后上棘,采集量 5~10 ml,肝素抗凝浓度为 60 U/ml,样品在采集后 2 h 内分选。共 7 例,患者年龄 25~50 岁。

1.2 试剂来源 低糖的 DMEM(L—DMEM,美国 GIBCO 公司)、胎牛血清(FBS,美国 Hyclone 公司)、

Ficoll 分离液(中国医学科学院生物工程所源洋生物公司)、肝素(上海生化药业公司)、青、链霉素(华北制药股份有限公司)、胰蛋白酶(Amresco 公司)、L-谷氨酰胺(Samland-chem International Inc.)、磷酸盐缓冲液(福州迈新生物技术开发有限公司)、噻唑蓝(MTT, 华美公司), 抗人 P53、Ki67 抗体(迈新公司)。

1.3 hMSC 的分离、培养和扩增^[2] 将无菌肝素化骨髓 5 ml 加入等体积的 DMEM-LG-10% FBS 培养液混合, 轻轻吹打分散细胞; 室温下离心, 800 转/min $\times$ 5 min, 弃上清液。加入 6~8 ml DMEM-LG-10% FBS 培养液, 重悬细胞。在离心管中加入等体积 Ficoll (1.077 g/ml) 分离液, 然后将上述骨髓细胞悬液分别轻轻叠加至分离液上。2 000 转/min $\times$ 20 min, 室温下离心。轻轻吸取离心管中的云雾状单核细胞层, 转移至另一离心管中。加入 5 ml PBS 溶液混合, 室温下离心, 1 000 转/min $\times$ 5 min $\times$ 2 次, 弃上清液; 用 DMEM-LG-10% FBS 培养液重悬离心管中的单核细胞, 计数单核细胞数量, 以 1×10^6 /ml 的密度接种于塑料培养瓶中, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、100% 饱和湿度的培养箱中培养, 48 h 后换液, 以后每 3~4 d 换液 1 次。当细胞生长融合达 90% 时, 记录培养天数, 用 0.25% 胰蛋白酶消化分散细胞, 1:2 传代培养。此时记为第 1 代, 每 3~4 d 换液 1 次。此后的细胞传代同此方法进行, 并计数所得细胞数及每代扩增所需时间。

1.4 形态学分析

1.4.1 置倒置相差显微镜下逐日观察培养细胞的生长状况、方式和形态变化特点。

1.4.2 HE 染色和瑞氏染色形态学分析: 细胞悬液涂片用 0.25% 胰蛋白酶消化液收获第 4 代 hMSCs, 取一滴细胞悬液做细胞推片, 待其自然风干后按常规行瑞氏染色(滴加瑞氏染液 1 min 后, 加入瑞氏染液缓冲液与之混匀共同染色 10~12 min, 缓冲液洗 3 次, 封片), 光学显微镜下观察并拍照。

1.5 成骨细胞诱导分化及鉴定 取第 4 代 hMSC 与第 30 代 hMSC, 以 1×10^5 /孔的密度接种于 6 孔板中, 实验组和对照组各 3 孔, 48 h 后全量换液, 实验组加入成骨细胞诱导培养液(DMEM-LG 培养液、10% FBS、8~10 mol/L 地塞米松、50 mg/L 维生素 C、10 mmol/L β -甘油磷酸钠), 对照组加入 DMEM-LG-10% FBS 培养液, 每 3~4 d 换液。诱导 18 d 后, PBS 洗涤 2 次行茜素红染液浸染 10 min, 再次 PBS 洗涤 3 次, 显微镜下观察细胞形态。

1.6 裸鼠体内成瘤性实验与 P53、Ki67 蛋白免疫组织化学染色: 分别取第 5 代、第 10 代、第 20 代、第 30 代 hMSC, 将培养瓶中培养液去掉, 用无血清 LG-DMEM 培养液洗一遍, 再将其弃掉。用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 镜下观察待细胞变圆, 细胞与培养瓶底脱离时, 用含 10% 胎牛血清的 LG-DMEM 终止消化。移入离心管, 离心(800 rpm, 5 min), 弃掉上清液, 用 10% 胎牛血清的 LG-DMEM 培养液重悬, 调整细胞密度至 2×10^6 /ml, 0.2 ml 注射至裸鼠右腋窝皮下, 观察成瘤性, 并同时取相应的细胞爬片进行 P53、Ki67 蛋白的免疫组织化学染色, 操作流程严格按照试剂盒步骤进行。

2 结果

2.1 hMSC 的分离、培养和扩增 倒置显微镜下观察, 骨髓 MNC 接种于 50 ml 培养瓶后, 12~24 h 后细胞大部分已贴壁。48 h 更换培养液, 偶见细胞展开呈小短梭形。此后, 贴壁细胞数量逐渐增多, 呈梭形或多角形, 核居中, 1 至多个核仁不等。第 7 天贴壁细胞数量明显增多, 细胞形态多为长梭形, 呈结节状或并列生长。第 10 天后, 细胞呈集落生长方式, 数量较前迅速增加。第 15~17 天细胞生长即可达 80%~90% 融合, 贴壁细胞紧密排列成漩涡状、放射状, 有一定的方向性, 非贴壁细胞经换液绝大部分可被去除(图 1-1)。传代细胞接种后 1~2 h 即开始

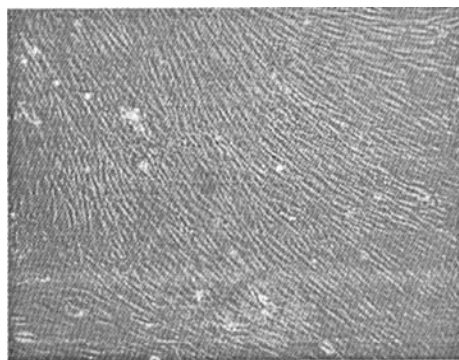


图 1-1 骨髓基质细胞贴壁培养 D17 100 $\times$

附壁, 初为类圆形, 12 h 内完全贴壁, 部分细胞展开呈长梭形, 24 h 内增殖缓慢, 第 3 天进入对数生长期, 第 7~8 天即可达到完全融合。P5 代细胞仍可呈高度均质梭形细胞群, 平行或漩涡方式生长。细胞爬片经瑞氏染色后, 于光镜下可见成纤维细胞样和上皮细胞样两种形态, 呈梭形或多角形, 以梭形较多, 成平行排列生长或漩涡状生长, 胞浆淡染, 核大、居中, 核染色质粗, 并可见双核细胞。7 例人骨髓间充质干细胞系的细胞传代培养为 30 代至 36 代, 细

胞逐渐变宽大扁平、形状不规则,胞浆空泡化,出现衰老现象,36代后细胞无传代能力(图1-2)。



图1-2 传至第36代的骨髓基质细胞 100×

2.2 hMSC 体外诱导成骨分化实验 第4代hMSC经成骨细胞诱导培养液孵育18d后,多角形、不规则形细胞增多,体积变大,含较多胞浆颗粒,茜素红染色可见胞质内矿化结节呈橙红色(图2)。但是,第36代hMSC诱导失败。

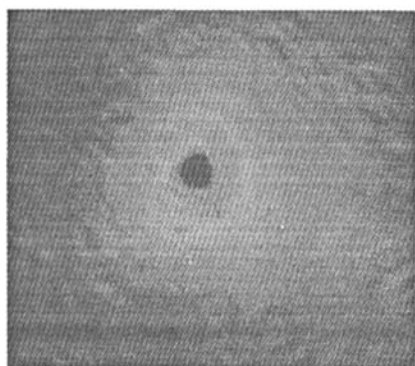


图2 人骨髓间充质干细胞成骨诱导(茜素红染色,100×)

2.3 细胞成瘤实验与P53、Ki67的表达 第5代、第10代、第20代、第30代hMSC人骨髓基质细胞注射于裸鼠腋窝皮下,未见成瘤。免疫组化结果显示各代细胞P53与Ki67表达均阴性。

3 讨论

3.1 骨髓中存在一类具有独特的干细胞生物学特性的基质细胞群,它们可进行自我更新,能在体外长期扩增,并具有多向分化潜能,如可分化为骨、软骨、肌腱、肌肉、脂肪以及骨髓造血基质等中胚层起源的组织细胞。此外,骨髓基质细胞还具有免疫原性低的优点,Liechty等^[3]用人的骨髓基质细胞移植绵羊,细胞能在异基因的环境中存活。而且由于人骨髓基质细胞独特的增殖分裂模式使外源基因易于导入和表达。因此,骨髓基质细胞有望成为细胞治疗

中的理想干细胞来源和基因治疗的靶载体。

3.2 在本实验中,采用密度梯度离心法分离骨髓人骨髓基质细胞,所用的分离介质是Ficoll,可以成功分离出人骨髓基质细胞群。再结合差速贴壁法,在细胞传代过程中进一步去除造血细胞。对培养液的选择,我们选择了DMEM-LG,其培养的MSC在7代以内增殖速度保持稳定,细胞形态并不随传代次数增加而发生明显改变,提示DMEM-LG适合人骨髓基质细胞的培养液。这与何少键等^[4]报道的适宜人骨髓基质细胞的培养条件相似。其次,培养液中血清的含量也是影响细胞生长的重要因素,我们用了10%、15%、20%三个浓度的胎牛血清培养人骨髓基质细胞。通过比较,10%和15%的胎牛血清对细胞增殖的速度并无明显差异,而采用20%胎牛血清培养的细胞在第5代以后细胞增殖速度逐渐减慢。提示10%~15%的胎牛血清较适于人骨髓基质细胞培养。

3.3 在倒置相差显微镜下逐日观察细胞的生长情况可见,人骨髓基质细胞分离接种于培养瓶24h后细胞大部分已贴壁,此后细胞逐渐展开,数量增多,多为长梭形,也有多边形细胞,核居中,1至多个核仁不等,呈集落生长方式,生长有一定方向性,紧密排列成漩涡状、放射状,非贴壁细胞经换液可被去除。第15~18天细胞生长即可达80%~90%融合,可进行传代培养。传代后1~2h细胞即开始附壁,初为类圆形,12h内完全贴壁,部分细胞展开呈长梭形,24h内增殖缓慢,第3天进入对数生长期,6~7d细胞生长可达90%融合。第1代到第7代细胞形态无明显区别,人骨髓基质细胞瑞氏染色后,细胞为梭形的成纤维样细胞,胞浆丰富、颗粒少或无,核居中或偏于一侧,核仁清晰,染色质疏松。第4代人骨髓基质细胞经诱导,可分化为成骨细胞,经茜素红染色钙结节呈红色,提示仍保持其分化潜能。

3.4 王忠等^[5]同样采用密度梯度分离与差速贴壁法培养的人骨髓基质细胞在7代之前具有较好的生长特性,7代以后细胞增殖速度下降较为明显,与我们的实验相符。国内外学者也常选用生长良好、细胞均质性高的第4~6代骨髓基质细胞研究其生物学特性,特别是用其作为动物细胞移植模型的“种子”细胞。

综上所述,大量对hMSC的体外实验研究都是短期研究,细胞代数大都是在10代左右,而hMSC在体外的长期传代过程中,间充质干细胞的特性是否逐渐丢失,细胞是否发生变化,甚至是恶变。我们

对其进行了相关研究。首先是 36 代的 hMSC 与较早代数(第 5 代)的 hMSC 进行比较,镜下观察其生长方式,细胞形态等细胞形态学表现,发现第 36 代 hMSC 细胞,逐渐变宽大扁平、形状不规则,胞浆空泡化等细胞老化表现。传至 36 代的 hMSC 无法进行成骨分化诱导,也说明了细胞老化。最后,癌相关基因,如 p53、ki67 在各代细胞的表达均为阴性。第 36 代的 hMSC 在裸鼠成瘤性实验中仍然没有显示出成瘤性。提示 hMSC 即使在体外长期传代仍未恶变。因此,人骨髓间充质干细胞在体外可以有限传代,无显著恶性转化趋势。

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 邹维艳,邝晓聪,韦 瑛,等. 人骨髓基质细胞输注裸鼠后的体内分布[J]. 细胞生物学杂志, 2008, 30(2):217-221.
 - 3 Liechty KW, Mackenzie TC, Shaaban AF, et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep[J]. Nature Medicine, 2000, 6 (11):1282-1286.
 - 4 何少键,陈维平,邝晓聪. 成体大鼠的骨髓间充质干细胞分离和体外培养的初步研究[J]. 广西医科大学学报,2002,19(3):304-306.
 - 5 王 忠,高 毅,汪 艳,等. 人骨髓基质细胞的分离培养与鉴定[J]. 中华神经医学杂志,2006,5(10):973-977.
- [收稿日期 2009-03-25][本文编辑 韦挥德 刘京虹]
- 1 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of

论 著

高强度可塑纤维桩在年轻恒牙冠折修复中的临床应用

刘光雪, 彭利辉, 潘小波, 钟爱喜, 施春梅

基金项目:广西科技攻关项目(桂科攻 0719006-2-20)

作者单位:530021 南宁,广西壮族自治区人民医院口腔修复科

作者简介:刘光雪(1971-),男,硕士,主治医师,研究方向:牙体、牙列缺损及牙列缺失的修复

通讯作者:潘小波,男,硕士,主任医师,研究方向:牙体、牙列缺损及牙列缺失的修复。电话:0771-2186541,

E-mail:panxiaobo0699@163.com

[摘要] 目的 探讨年轻恒牙冠折 everStick 高强度可塑纤维桩核冠修复治疗的临床效果。方法 临床选择 48 例年轻恒牙冠折的患儿共 62 颗患牙,先用 Vitapex 进行根尖诱导成形术,再对残冠残根进行高强度可塑纤维桩核冠修复,并进行定期临床检查。结果 在临床观察时间内,62 个修复体有 58 个完好,成功率为 93.5%。结论 对于年轻恒牙患者根尖诱导完成后进行 everStick 可塑高强度纤维桩修复可以满足临床要求,有一定的临床价值,值得大力推广。

[关键词] 玻璃纤维; 年轻恒牙; 根尖诱导成形术

[中图分类号] R 783.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2009)06-0555-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2009.06.04

The application of everStick high-strength glass fibers post core crown for crown fracture restoration of immature permanent tooth LIU Guang-xue, PENG Li-hui, PAN Xiao-bo, et al. Department of Oral Prosthetics, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To investigate the clinical effect of everStick high-strength glass fibers posts core crown on crown fracture restoration of immature permanent tooth. **Methods** Forty-eight patients with 62 crown fracture were selected. Vitapex was used in apexification, and the residual crowns and roots were restored with the