课题研究 · 论著

不同培养基及接种密度培养脐带血间充质干细胞的比较

薛行影， 柯乳香， 覃金定， 郑　萍， 吴立忠， 李炜明， 翁绳健， 康荣彬， 詹　洋， 肖荣驰

基金项目：广西医疗卫生重点科研课题(编号:重2011013)

作者单位：350000　福州,厦门大学附属福州市第二医院骨科四区(薛行影,郑　萍,吴立忠,李炜明,翁绳健,康荣彬,詹　洋)；363200　福建,漳浦县妇幼保健医院妇产科(柯乳香)；541004　广西,桂林医学院附属医院骨一科(覃金定,肖荣驰)

作者简介：薛行影(1985－),男,硕士研究生,住院医师,研究方向:脊柱关节外科疾病的诊治。E-mail:66562475@qq.com

通讯作者：肖荣驰(1966－),男,硕士研究生,教授,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:脊柱关节外科疾病的诊治。E-mail:xrongchi@sina.com

[**摘要**]　**目的**　脐带血间充质干细胞为组织工程种子细胞领域研究热点,但目前仍未得到安全、高效的脐带血间充质干细胞分离培养体系,该实验研究旨在探讨脐带血间充质干细胞的适宜培养条件。**方法**　无菌条件下取足月正常新生儿脐带血,随机分为高糖DMEM组、低糖DMEM组以及脐带血间充质干细胞组。分离提取的脐带血单个核细胞分别以1×10^4、1×10^5和1×10^6个细胞/ml的接种密度接种于脐带血间充质干细胞培养基中,观察3种培养基及不同接种密度培养下的细胞贴壁生长情况,并用流式细胞技术分析细胞的表面抗原。**结果**　高糖DMEM组未见到贴壁生长的间充质干细胞,低糖DMEM组及脐带血间充质干细胞组均可见到贴壁生长的梭形成纤维样细胞($P<0.05$),在不同的接种密度条件下,1×10^5组及1×10^6组接种密度可见到成纤维样贴壁细胞,1×10^5组得到的细胞数量及细胞生长情况更好,1×10^4组未见到细胞贴壁生长。**结论**　分离提取得到的脐带血单个核细胞在T25培养瓶中最佳接种密度为1×10^5/ml,最适合培养基为脐带血间充质干细胞培养基。

[**关键词**]　脐带血；　间充质干细胞；　分离培养

[**中图分类号**]　Q 813　[**文献标识码**]　A　[**文章编号**]　1674－3806(2015)09－0806－04

doi:10.3969/j.issn.1674－3806.2015.09.02

Different culture media, and inoculation density cultivate ectomesenchymal stem cells, umbilical cord blood

XUE Xing-ying, KE Ru-xiang, QIN Jin-ding, et al. The Fourth Department of Orthopaedics, the Second Hospital of Fuzhou City Affiliated to Xiamen University, Fuzhou 350000, *China*

[**Abstract**]　**Objective**　To explore the appropriate culture conditions of umbilical cord blood mesenchymal stem cells. **Methods**　The sterile cord blood from normal full-term newborns was randomly divided into three groups: the high sugar DMEM group, the low sugar DMEM group and the umbilical cord blood mesenchymal stem cells between groups. Extractions of umbilical cord blood mononuclear cells were inoculated in umbilical cord blood mesenchymal stem cells in the culture media by the density of 1×10^5, 1×10^4, and 1×10^6 cells/ml respectively. The three kinds of media and different inoculation density culture adherent cell growth situations were observed and analysis of cell surface antigen was performed using flow cytometry technique. **Results**　Ectomesenchymal stem cells of sugar DMEM group did not grow on the sidewall, while the growth of the spindle formation fiber sample cells was found on the sidewall in low sugar DMEM group and umbilical cord blood mesenchymal stem cell($P<0.05$). Of different inoculation densities, cells grew best at the density of 1×10^5, followed by 1×10^6. Cells failed to grow at the density of 1×10^4. **Conclusion**　Umbilical cord blood mononuclear cells in T25 culture bottle grow best at the inoculation density of 1×10^5/ml, which is the most suitable culture medium for umbilical cord blood mesenchymal stem cell.

[**Key words**]　Umbilical cord blood;　Mesenchymal stem cell;　Isolated culture

脐带血是婴儿出生后,留在胎盘和脐带中的血液,来源广泛,采集脐带血对产妇和新生儿均无任何不良影响。有报道认为脐带血间充质干细胞(unbilcal cord blood mesenchymal stem cells,UCB-MSCs)为较原始的间充质干细胞,具有更强的增殖、分化能力,细胞的免疫功能较弱,引起的移植物抗宿主病亦较弱。UCB-MSCs 端粒和端粒酶活性均长于和高于骨髓中的干/祖胞,移植后的寿命更长,可以更持久地维持机能,且脐带血可长期冷冻保存而性状保持不变[1~3]。目前对于脐带血是否有间充质干细胞存在仍有争议,Wexler[4] 及 Zeddou[5] 等认为脐带血中 MSCs 较稀少且缺乏,未形成安全、有效的脐带血间充质干细胞的分离培养体系,分离培养成功率低,以致影响脐带血间充质干细胞的临床应用。本文通过利用 3 种不同培养基及不同接种密度来进一步探讨影响分离培养成功率的因素,以探究脐带血间充质干细胞最适培养基和最佳接种密度。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂 2014-01 ~ 2014-06 采集脐带血标本由桂林医学院附属医院妇产科提供(健康足月顺产新生儿脐带血,每份 15 ~ 84 ml,肝素抗凝,采集后 4 h 内进行分离提取),人淋巴细胞分离液(深圳市达科为生物技术有限公司),DMEM(低糖)培养基[赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司],DMEM(高糖)培养基(Gibco)及脐带血干细胞培养基(美国 Cyagen Biosciences Inc),促细胞贴壁附着因子(Gibco),CO^2 孵箱(型号 Thermo),生物安全工作台(Steril GARD),倒置显微镜(Leica),离心机(L420,XianYi),细胞计数器(Adam)。

1.2 方法

1.2.1 脐带血采集 选桂林医学院附属医院产科 30 岁以下健康、无急慢性疾病、无传染病,抗 HIV 及乙肝血清标志物检测阴性的产妇,产妇对实验方案知情同意,采集正常足月产胎儿的脐带血 27 份。采集方法:新生儿产出后立即在距脐轮 5 ~ 7 cm 处用止血钳夹住脐带的两端,于两钳之间剪断脐带,0.5% 安尔碘消毒后,行脐带静脉穿刺,直接将脐血引流入装有肝素钠的一次性采血袋内,采血过程轻轻摇动血袋,直至无脐血流出为止。采集完毕后置冰盒内送至实验室备用,脐血样本采集后 4 h 内分离。

1.2.2 UCB-MSCs 的分离培养 将采集的脐血用 PBS(0.01 mol/L,pH 值 = 7.4)1∶1 稀释,缓缓叠加到等体积的密度为(1.077 ± 0.001)g/ml 人淋巴细胞分离液上面,2 000 r/min,离心 20 min,小心吸取中间界面白膜层,获得单个核细胞,加等量 PBS 离心洗涤 2 次,所得细胞应用细胞计数器接种于有促细胞贴壁附着因子涂层的 T-25 培养瓶,分别用含有 10% 胎牛血清的 DMEM(低糖)、DMEM(高糖)及脐带血间充质干细胞培养液中,置于 37 ℃、体积分数 5% CO^2 饱和湿度培养箱内培养,72 h 后全换液,弃去悬浮细胞未贴壁细胞,以后每 3 ~ 4 d 换液 1 次,待细胞长到 80% 融合时,用 2.5 g/L 的胰蛋白酶和 0.2 g/L 的 EDTA 混合液消化,倒置显微镜下观察,等多数贴壁细胞呈球形时,加入含胎牛血清的培养基终止消化,吹打成细胞悬液,收集离心,PBS 洗涤 3 次,1∶2 的比例传代,并标记为 P1 代。

1.3 原代细胞生长曲线测定 用含 10% 胎牛血清的脐带血间充质干细胞培养液调节单个核细胞悬液的浓度分别为 1×10^4、1×10^5 和 1×10^6 个细胞/ml,每孔 0.5 ml,接种于 96 孔培养板培养。从第 4 天首次换液开始,每隔 48 h 取 3 孔,弃去培养液,加入 0.25% 胰酶和 EDTA 消化后作细胞计数,绘制生长曲线。

1.4 脐带血间充质干细胞表面标记流式细胞仪测定 取第 3 代脐带血间充质干细胞,胰蛋白酶消化后,1 000 r/min 离心 10 min,去除上清液,用 2% 胎牛血清白蛋白的 PBS 液冲洗细胞,制成单细胞悬液,计数 1×10^6 个细胞,向其中加入 20 ul 流式单克隆抗体,包括 CD29、CD133、CD90、CD34 及 CD105,常温下避光静置 30 min,1 000 r/min,离心 10 min,去除未结合的单克隆抗体,加入 PBS 300 ul 重悬,上机测试。

1.5 培养条件的观察比较

1.5.1 不同培养基的比较 分离提取后的单个核细胞以 1×10^5 接种至 6 孔板中,应用含体积分数为 10% 的胎牛血清的 DMEM(低糖)、DMEM(高糖)及脐带血间充质干细胞培养液中分别培养,比较细胞贴壁生长情况。

1.5.2 不同种植密度的比较 在促细胞贴壁附着因子涂层的 T25 培养瓶中,采用 1×10^4,1×10^5,1×10^6 三种不同接种密度,比较细胞贴壁与生长情况。

1.6 观察指标 脐带血间充质干细胞不同培养基、不同接种密度的效果比较。

1.7 统计学方法 应用 SPSS11.5 统计软件进行数据处理,计数资料组间比较采用 χ^2 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同培养基培养成功率的比较 应用含有

10% 胎牛血清的 DMEM(高糖)培养基 7 份标本,均未见到呈梭形贴壁生长的成纤维样细胞,不能进行增殖传代。应用含有 10% 胎牛血清的 DMEM(低糖)培养基 14 份标本,有 8 份可以见到到呈梭形贴壁生长的成纤维样细胞,其中有 4 份能增殖及传代。应用含有 10% 胎牛血清的脐带血间充质干细胞培养基 6 份,有 5 份可以见到呈梭形贴壁生长的成纤维样细胞,有 5 份可以增殖及传代。三种培养基培养成功率差异有统计学意义($P=0.002$)。见表 1。

表 1　3 种不同培养基培养细胞成功率的比较[n(%)]

培养基	例数	培养效果		可传代	
		成功	失败	是	否
DMEM-低糖培养基	14	8(57.1)	6(43.9)	4(50.0)	4(50.0)
DMEM-高糖培养基	7	0(0.0)	7(100.0)	0(0.0)	0(100.0)
脐带血干细胞培养基	6	5(83.3)	1(16.7)	5(83.3)	1(16.7)
χ^2	–	12.865		1.659	
P	–	0.002		0.198	

2.2　不同接种密度的细胞生长情况　在不同的接种密度条件下,1×10^5 组原代细胞在培养 3 d 即可见到贴壁的呈梭形的成纤维细胞,35 ~ 45 d 时细胞融合达 50% ~ 60%,可以增殖传代;1×10^4 组接种密度太小,未能见到贴壁的成纤维样细胞;1×10^6 组接种密度可见到成纤维样贴壁细胞,但相对于 1×10^5 组细胞数量偏少。不同接种密度培养后细胞贴壁及生长情况见图 1 ~ 3。本实验观察到接种密度为 1×10^5 个细胞/ml 时更适合细胞贴壁生长,接种后 7 ~ 11 d 时为细胞快速增殖期,15 d 后速度减慢进入平台期。见图 4。

图 1　接种密度 1×10^4 3 d 换液后细胞贴壁生长情况(50 倍镜下观察)

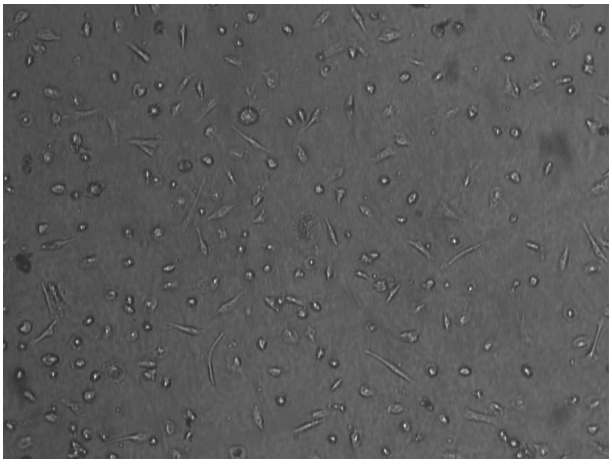

图 2　接种密度为 1×10^5 3 d 后细胞贴壁生长情况(200 倍镜下观察)

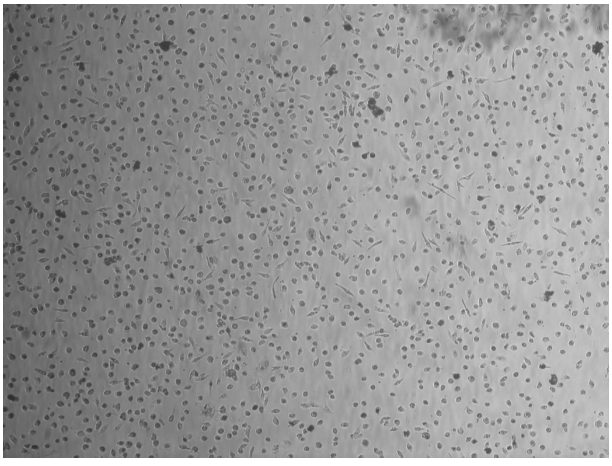

图 3　接种密度为 1×10^6 3 d 后细胞贴壁生长情况(100 倍镜下观察)

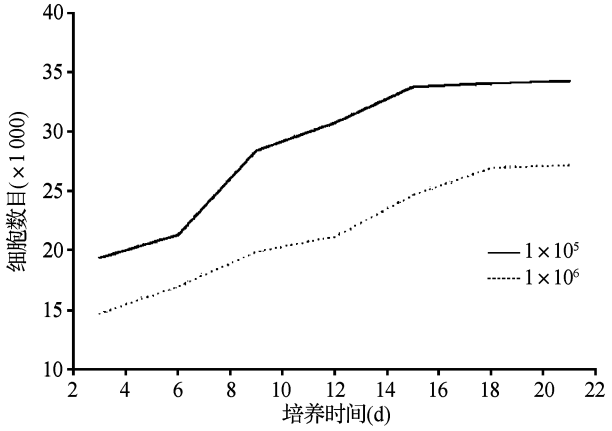

图 4　不同接种密度细胞贴壁生长情况

2.3　脐带血间充质干细胞表面标记表达　流式结果显示,第 3 代脐血间充质干细胞不表达 CD34、CD90、CD133,表达 CD29、CD105。

3　讨论

3.1　通过本实验研究结果可以看出,使用专用培养

基能得到较高比例的 MSCs。刘素芳等[6,7]一些研究者则使用 Mesencult TM 专用培养基得到较高比例的 MSCs。Bieback 等[8]在脐血实验中也使用了 Mesencult TM 培养基,效果也较好。这与本实验使用的脐带血干细胞专用培养基所得到的实验结果相符,但其进一步的原因尚未知晓,需要进一步的实验研究。高糖组 DMEM 培养基培养干细胞成功率极低,未能得到间充质干细胞,可能因为高糖培养基比较适合用于细胞代谢快的细胞,例如肿瘤细胞,而干细胞不适合用高糖培养基。迟作华[9]用高糖 DMEM 法培养干细胞,40 ~ 50 d 左右细胞开始出现形态的变化,60 d 左右会出现类似胰岛样细胞团。黄伟等[10]用 DMEM(高糖)中加入不同浓度的血清,均未获得理想的 MSCs。程文广等[11]实验共采集脐血样本 16 例,其中使用含有 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基培养 4 例,使用 10% ~15% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基培养 12 例,实验结果显示使用高糖 DMEM 培养基均获得理想的 MSC,虽然在原代培养早期有大量细胞贴壁生长,但均为大量破骨样细胞生长,均未获得均一的 MSC。故我们认为高糖 DMEM 不适合培养脐带血间充质干细胞,因其培养成功率低,且易导致干细胞分化。

3.2 关于脐带血单个核细胞接种密度各文献报道不一,Seo 等[12]认为比较适合的接种密度为 2×10^5 ~ $2\times10^6/cm^2$。龚敏等[13]认为比较适合的接种密度为 3×10^4/ml,可见目前在接种密度方面未形成统一的标准。由于采用的培养皿的材质、直径大小等不一,故也仍未提出使用 T25 培养瓶培养时的最佳接种密度。在脐带血间充质干细胞的原代培养时单个核细胞的接种密度要合适,若密度太小,干细胞数量太少,不易于形成集落;如果密度太大,间充质干细胞的生长空间缩小,干细胞不能很好地贴壁与伸展。我们实验结果表明 1×10^5/ml 的接种密度最适合细胞贴壁生长。

3.3 本实验也存在许多的局限性,例如实验例数较少、各组间的例数不均衡、脐带血采集时间差异性等均会对实验结果造成误差,需要同质性更好的进一步实验研究。

3.4 有学者认为脐带血中无干细胞[14],本实验的研究表明,人脐带血中可以分离得到间充质干细胞,这与 Bicknese[15]和 Ha[16]实验结果一致,实验表明分离提取得到的脐带血单个核细胞在 T25 培养瓶中最佳接种密度为 1×10^5/ml,最适合培养基为脐带血间充质干细胞培养基,但因影响脐带血间充质干细胞分离培养效率的因素很多,要得到安全、高效、价廉的分离培养体系,仍需要进一步的实验研究。

参考文献

1 Hayashi N,Takahashi K,Abe Y,et al. Placental/umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell-like stromal cells support hematopoietic recovery of X-irradiated human CD34 + cells[J]. Life Sci,2009,84(17 - 18):598 - 605.

2 Bieback K, Kern S,Kocaömer A,et al. Comparing mesenchymal stromal cells from different human tissues: bone marrow, adipose tissue and umbilical cord blood [J]. Biomed Mater Eng, 2008, 18 (1Suppl):S71 - S76.

3 Secco M, Zucconi E, Vieira NM, et al. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood[J]. Stem Cells, 2008, 26 (1):146 - 150.

4 Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, 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 Zeddou M, Briquet A, Relic B, et al. The umbilical cord matrix is a better source of mesenchymal stem cells (MSC) than the umbilical cord blood[J]. Cell Biol Int,2010,34(7):693 - 701.

6 刘素芳,鄢文海,韩雪飞,等. 人脐血间充质样细胞体外培养的形态学变化[J]. 郑州大学学报(医学版),2006,41(1):89 - 91.

7 刘素芳,鄢文海,韩雪飞,等. 人脐血间充质细胞体外分离培养方法及培养基特性[J]. 中国临床康复,2005,9(46):34 - 35.

8 Bieback K, Kern S, Klüter H,et al. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood[J]. Stem Cells,2004,22(4):625 - 634.

9 迟作华,陆 琰,张 洹. 高糖诱导人脐血间充质干细胞向胰岛样细胞分化[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版),2007,28(4):332 - 336.

10 黄 伟,祝建中,苗宗宁,等. 人脐带血间充质干细胞的体外培养及影响因素[J]. 中国交通医学杂志,2005,19(3):215 - 217,220.

11 程文广,罗高兴,黄正根,等. 人脐带血间充质干细胞体外分离培养及生物学特性研究[J]. 现代生物医学进展,2008,8(3):424 - 426.

12 Seo KW, Lee SR, Bhandari DR, et al. OCT4A contributes to the stemness and multi-potency of human umbilical cord blood-derived multipotent stem cells (hUCB-MSCs) [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009,384(1): 120 - 125.

13 龚 敏,李 涛,雷靖祎,等. 脐血 MSCs 移植对急性心肌梗死大鼠心肌的修复作用[J]. 江苏大学学报(医学版),2012,22(5): 369 - 373.

14 Goodwin HS, Bicknese AR, Chien SN, et al. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2001, 7(11): 581 - 588.

15 Bicknese AR,Henderson V,Sinclair-Goodwin HS,et al. Cells derived from human fetal cord blood express markers for neurons, astrocytes and oligodendrocytes[J]. Exp Neurol,2001, 170(3): 199 - 204.

16 Ha Y, Choi JU, Yoon DH, et al. Neural phenotype expression of cultured human cord blood cells in vitro[J]. Neuroreport, 2001, 12 (16): 3523 - 3527.

[收稿日期 2014 - 12 - 15][本文编辑 刘京虹]