

新生小鼠颅盖骨间充质干细胞原代培养模型的建立

盛云露, 吕珊, 祁寒梅, 俞静, 丁国宪*

(南京医科大学第一附属医院老年医学科, 江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:**探索新生小鼠颅盖骨间充质干细胞原代培养的方法。**方法:**取新生小鼠颅盖骨,采用胶原酶消化获得间充质干细胞,观察细胞的形态及增殖情况,通过细胞周期分析细胞增殖能力,通过流式测定细胞表面标志来分析细胞纯度,对细胞进行成骨成脂诱导分化,并分别予茜素红及油红O染色定性,荧光定量PCR检测成骨标志基因Osteocalcin及成脂标志基因PPAR γ 、Fabp4表达情况。**结果:**培养出的纺锤形细胞均一性好、增殖能力强。流式测定细胞表面标志显示细胞纯度好,高表达CD29、CD44,几乎不表达CD34、CD45。诱导分化后分化率高,茜素红染色及油红O染色分别可见较多矿化结节及脂滴,荧光定量PCR显示随分化相关标志基因均明显增高。**结论:**本研究成功建立了新生小鼠颅盖骨间充质干细胞原代培养模型,为进一步研究间充质干细胞奠定基础。

[关键词] 颅盖骨;间充质干细胞;原代培养;鉴定;诱导分化

[中图分类号] Q254

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)10-1356-06

doi:10.7655/NYDXBNS20131005

Establishment of culture model for primary mesenchymal stem cells from neonatal mouse calvaria

Sheng Yunlu, Lv Shan, Qi Hanmei, Yu Jing, Ding Guoxian*

(Department of Geratology, the First Hospital Affiliated of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:**To establish a culture method for primary mesenchymal stem cells from neonatal mouse calvaria. **Methods:** Mesenchymal stem cells were collected from neonatal mouse calvaria with collagenase. The morphological changes and proliferation of the cultured cells were observed. Cell cycle stages were analyzed by flow cytometry. The expression of cell-surface antigens were detected by flow cytometry. The potential of the isolated cells to differentiate into osteogenic and adipogenic lineages was examined. The mineralization and the intracytoplasmic lipid were detected using alizarin red staining and oil red O staining, respectively. Differentiation abilities were further validated by RT-PCR analysis of osteoblast specific gene and adipocyte specific genes. **Results:** The cultured spindle-like cells showed highly homogeneous appearance with active proliferation. The cells were positive for CD29 and CD44, while negative for CD34 and CD45. Visible mineralized nodules and lipid droplets were observed with alizarin red staining and oil red staining, respectively. In addition, the mRNA expression of osteoblast specific gene and adipocyte specific genes increased obviously after induction. **Conclusion:** Our research successfully established a culture method for primary mesenchymal stem cells from neonatal mouse calvaria. This method might be important for further studies of mesenchymal stem cells.

[Key words] calvaria; mesenchymal stem cell; primary cell culture; identification; cell differentiation

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(10): 1356-1361]

间充质干细胞是一类多能基质细胞,具有自我更新和定向分化的潜能,能够在体外定向分化为成骨细胞、脂肪细胞和软骨细胞等基质细胞。因其临床应用的巨大潜力而成为近年来研究的热点。

间充质干细胞最初被认为是存在于骨髓中的非造血细胞,能够分化为多种间质细胞^[1]。有趣的是,随着对间充质干细胞越来越深入的研究,发现除了骨髓,在胎儿和成人很多组织内都存在这些多能干细胞,包括脐带血、牙髓、胎盘、脂肪组织^[2-5]。间充质干细胞具有自我更新和定向分化的潜能,对于组织器官的功能维持和损伤修复具有重要作用^[6-7]。另

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(81100236)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: Dinggx@njmu.edu.cn

外,间充质干细胞具有潜在的免疫抑制功能,最近被用来治疗一系列自身免疫性疾病^[8-10]。目前,间充质干细胞已经被应用于一些临床试验,给移植物抗宿主病、Crohn's 病、多发性硬化、骨关节炎、冠心病等疾病的治疗带来曙光。

小鼠是目前基础和临床科研应用最为广泛的动物模型,目前对于间充质干细胞的研究主要集中于骨髓间充质干细胞,但由于小鼠骨髓中间充质干细胞数量极少,位于骨内膜或密质骨,难以取得,且小鼠骨髓黏附细胞中有很大比例的造血细胞等其他细胞^[11],另外间充质干细胞属混杂细胞群,无特异性的表面标志,故小鼠骨髓间充质干细胞的培养历来是一个难点^[12]。

本课题组长期致力于骨代谢的研究,在既往研究中发现新生小鼠的颅盖骨中含有间充质干细胞。因此,本研究选取 C57BL/6J 新生小鼠颅盖骨作为间充质干细胞原代培养的组织来源,成功分离、培养出间充质干细胞,并在体外诱导其向成骨成脂分化,检测其表面标志,成功建立了新生小鼠颅盖骨间充质干细胞原代培养模型,为进一步研究间充质干细胞提供了简单有效的方法,为进行组织工程、细胞和基因治疗研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

SPF 级 C57BL/6J 雄性新生小鼠购于南京大学模式动物研究所;胎牛血清(FBS)、DMEM 高糖培养基、 α -MEM 培养基、青/链霉素、0.25%Trypsin-EDTA (Gibco 公司,美国);抗坏血酸、甘油磷酸二钠盐、地塞米松(DEX)、茜素红、胰岛素、3-异丁基-1-甲基次黄嘌呤(IBMx)、II 型胶原酶、油红 O 染料(Sigma 公司,美国);牛血清白蛋白、HEPES(Biosharp 公司,美国);消炎痛(indomethacin,和光纯药工业株式会社,日本);小鼠 CD29、CD44、CD34、CD45 流式抗体(eBioscience 公司,美国);PBS 缓冲液(武汉博士德生物工程有限公司);TRIzol Agent(Invitrogen 公司,美国);逆转录所用试剂(Promega 公司,美国);实时荧光定量 PCR 所用试剂 FastStart Universal SYBR Green Master (Rox)(Roche 公司,瑞士)。

1.2 方法

1.2.1 新生小鼠颅盖骨间充质干细胞的分离和培养

取 3~5 d 龄 C57BL/6J 雄性新生小鼠 10 只,颈椎脱臼法处死后于 75%酒精浸泡 2~3 min,在超净工作台内小心取出颅盖骨,置于预冷的 PBS 缓冲液

中。用镊子小心去除骨边的筋膜,PBS 缓冲液冲洗 2 次,用眼科剪将每块颅盖骨剪成 8 块左右,将剪小的颅盖骨转移到 1 号无菌 50 ml 离心管中,PBS 冲洗 2 次,吸弃 PBS,分别加入 1 ml 配好的组织消化液(II 型胶原酶 1.5 g/L、牛血清白蛋白 20 g/L、HEPES 1.2 g/L)、1 ml PBS、1 ml 0.25%Trypsin-EDTA,后置于 37℃水浴箱中摇晃消化 20 min,将上清小心转移至 2 号无菌 50 ml 离心管中并立即在 2 号离心管中加入 1~2 ml 完全培养液(α -MEM 培养基 + 10%FBS + 100 U/ml 青/链霉素)终止消化,同时用 1~2 ml PBS 冲洗 1 号离心管中的骨片 2 次,将冲洗液吸至 2 号离心管中,将 2 号离心管 2 500 r/min 离心 5 min,去除上清,用 6 ml 完全培养液重悬沉淀后接种于 2 个 6 cm 平皿中。将细胞置于 37℃ 5% CO₂ 细胞培养箱中培养,次日更换新鲜培养液后继续培养,以后每 2~3 d 更换培养液 1 次。当细胞生长融合达 80%~90%时,用 0.25%Trypsin-EDTA 消化细胞 1 min 左右,在显微镜下控制消化时间,以 1:3 密度扩增培养,此时标记为 P1 代,以后每 2~3 d 换液 1 次,直至细胞生长融合达 80%~90%时,继续以 1:3 传代扩增培养并记为 P2,以此类推。倒置相差显微镜逐日观察细胞形态。

1.2.2 新生小鼠颅盖骨间充质干细胞细胞周期分析

取生长状态良好的第 2 代细胞,用 0.25% Trypsin-EDTA 消化成单细胞悬液,PBS 洗涤 1 遍后用 75%乙醇固定,采用流式细胞仪直接荧光法检测细胞周期。

1.2.3 新生小鼠颅盖骨间充质干细胞表面标志测定

取融合达 90%的第 2 代细胞,用 0.25%Trypsin-EDTA 消化成单细胞悬液置入无菌 50 ml 离心管中,1 000 r/min,离心 3 min,吸弃上清,用 PBS 洗涤 3 遍,血细胞计数板计数,调整细胞密度至 1×10^6 个/ml,分别加入荧光标记的抗体(CD29、CD44、CD34、CD45),4℃避光孵育 15 min,少许 PBS 洗去未标记抗体,1%多聚甲醛固定后应用流式细胞仪检测。

1.2.4 新生小鼠颅盖骨间充质干细胞的诱导分化及染色

成骨诱导:第 2 代细胞在完全培养基中生长至单层融合后置于成骨诱导液(α -MEM 培养基+10% FBS+100 U/ml 青/链霉素+ 50 μ g/ml 抗坏血酸 + 10 mmol/L β -甘油磷酸二钠盐 + 10^{-7} mol/L DEX)中培养 14 d,每 2~3 d 换液,约 14 d 后可见明显矿化颗粒。此时予茜素红染色,吸弃培养液,用 PBS 冲洗 2 遍,用 4%多聚甲醛室温固定 10 min,再用 PBS

冲洗2遍,加入茜素红染液(0.1 g 茜素红溶于100 ml 蒸馏水中)染色5 min 后用PBS冲洗掉多余染料,显微镜下观察。

成脂诱导:第2代细胞在完全培养基中生长至单层融合后2天,换用成脂诱导液(DMEM 高糖培养基 + 10% FBS + 100 U/ml 青/链霉素 + 0.5 mmol/L IBMX + 1 μ mol/L DEX + 5 μ g/ml 胰岛素 + 100 μ mol/L 吡啶美辛)进行成脂诱导,3 d 后换为 DMEM 高糖培养基 + 10% FBS + 100 U/ml 青/链霉素 + 5 μ g/ml 胰岛素继续培养3 d,可见较多脂滴。此时予油红染色。吸弃培养液,用10%福尔马林室温固定细胞约1 h,向固定好的细胞中加入现配的油红应用液(3份溶于异丙醇的3.75%的油红O + 2份蒸馏水)染色30 min,清水冲洗掉多余染料后显微镜下观察。

1.2.5 细胞总 RNA 抽提及 cDNA 逆转录

6孔板中细胞吸弃培养液后每孔加入1 ml TRIzol Agent 充分裂解后收集细胞,按试剂盒方法进行细胞总 RNA 抽提及 cDNA 逆转录。

1.2.6 实时荧光定量 PCR

以上述细胞的 cDNA 为模板,用相关引物进行实时荧光定量 PCR 扩增。总反应体系为 20 μ l,反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min,95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,40 个循环,72 $^{\circ}$ C~94 $^{\circ}$ C,每升高 0.5 $^{\circ}$ C 测 1 次荧光强度作出熔解曲线。以 β -actin 基因作为内参照,对目的基因的表达量进行分析。PPAR γ 引物序列:上游 5'-GACCACTCGCATTCCTTT-3',下游 5'-CCACAGACTCGGCACTCA-3';Fabp4 引物序列:上游 5'-ACACCGAGATTTTCCTTCAAAGT-3',下游 5'-CCATCTAGGGTTATGATGCTCTTCA-3';Osteocalcin 引物序列:上游 5'-CTCTGCTCACTCTGCTGG-3',下

游 5'-GCGTTTGTAGCGGTCTT-3'; β -actin 引物序列:上游 5'-TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT-3',下游 5'-CACGATGGAGGGGCCGGACTCATC-3'。

1.3 统计学方法

所有数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,运用 SPSS13.0 软件进行 student's *t* 检验。 $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 新生小鼠颅盖骨间充质干细胞的分离、培养

原代培养细胞在接种后 24 h 可见贴壁细胞,形态为小圆形、多角形、梭形(图 1A),72 h 后细胞伸展为纺锤形,部分贴壁细胞可形成一些集落,此后细胞增殖较快,5 d 左右细胞生长至 90%,予 1:3 传代扩增培养,传代后 24 h,P1 代细胞基本贴壁为长梭形,但仍有少量三角形及多角形细胞,部分细胞可形成一些集落(图 1B),3 d 左右细胞生长至 90%,再次予 1:3 传代扩增培养,P2 代以后细胞形态趋于统一,呈旋涡状或均匀性分布生长(图 1C)。

2.2 新生小鼠颅盖骨间充质干细胞细胞周期分析

取生长良好的 P2 代细胞,用流式细胞仪直接检测细胞周期,可见 34.94% 的细胞处于 S 期,22.07% 的细胞处于 G2 期,表明 P2 代细胞具有很好的增殖能力(图 2)。

2.3 新生小鼠颅盖骨间充质干细胞表面标志测定

用流式细胞仪检测 P2 代细胞显示高表达 CD29 和 CD44,分别为 99.62% 和 53.73%,而 CD34 和 CD45 表达率低,分别为 1.89% 和 1.81%(图 3)。

2.4 新生小鼠颅盖骨间充质干细胞诱导分化

2.4.1 成骨成脂诱导染色

细胞经成骨诱导后形态由梭形变为多角形或立

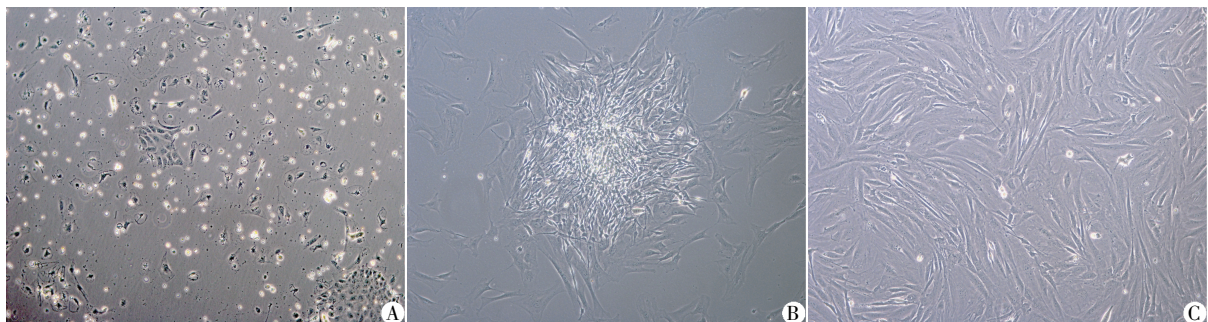


图 1 新生小鼠颅盖骨 MSCs 细胞培养
A:新生小鼠颅盖骨 MSCs 原代接种后 24 h;B:新生小鼠颅盖骨 MSCs 第 1 次传代后 24 h;C:新生小鼠颅盖骨 MSCs 第 2 次传代后 24 h($\times 100$)。

图 1 新生小鼠颅盖骨 MSCs 细胞培养

Figure 1 Cell culture of neonatal mouse calvaria MSCs

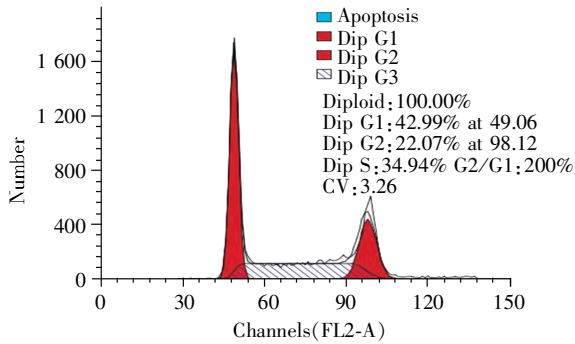


图 2 新生小鼠颅盖骨 MSCs 细胞周期

Figure 2 Cell cycle stages of neonatal mouse calvaria MSCs

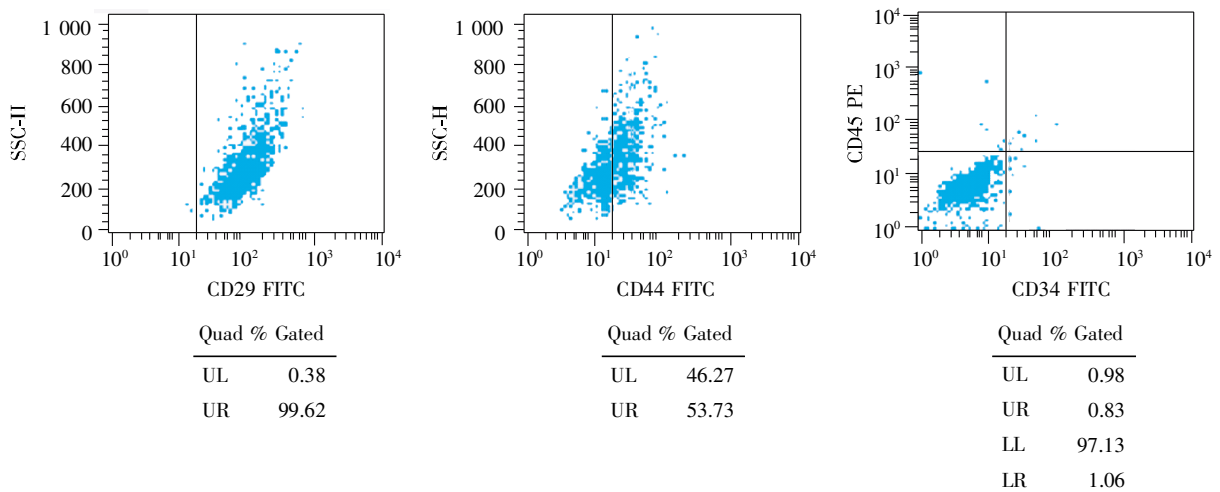
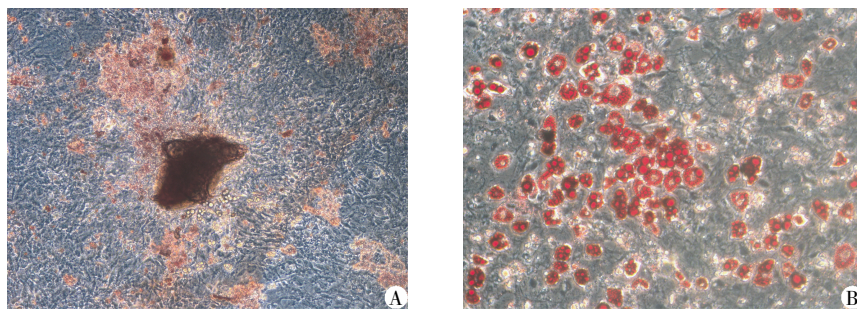


图 3 新生小鼠颅盖骨 MSCs 表面标志测定

Figure 3 Assay of cell-surface antigens on neonatal mouse calvaria MSCs



A:成骨诱导第 14 天矿化结节(茜素红染色,×200);B:成脂诱导第 6 天脂滴(油红 O 染色,×200)。

图 4 新生小鼠颅盖骨 MSCs 的体外诱导分化

Figure 4 Differentiation of neonatal mouse calvaria MSCs *in vitro*

增高并持续至分化结束(图 5A)。P2 代颅盖骨间充质干细胞成脂诱导过程中收集第 0、6 天细胞检测成脂基因 PPAR γ 、Fabp4,发现分化后较分化前 PPAR γ 及 Fabp4 表达均明显增高(图 5B、5C)。

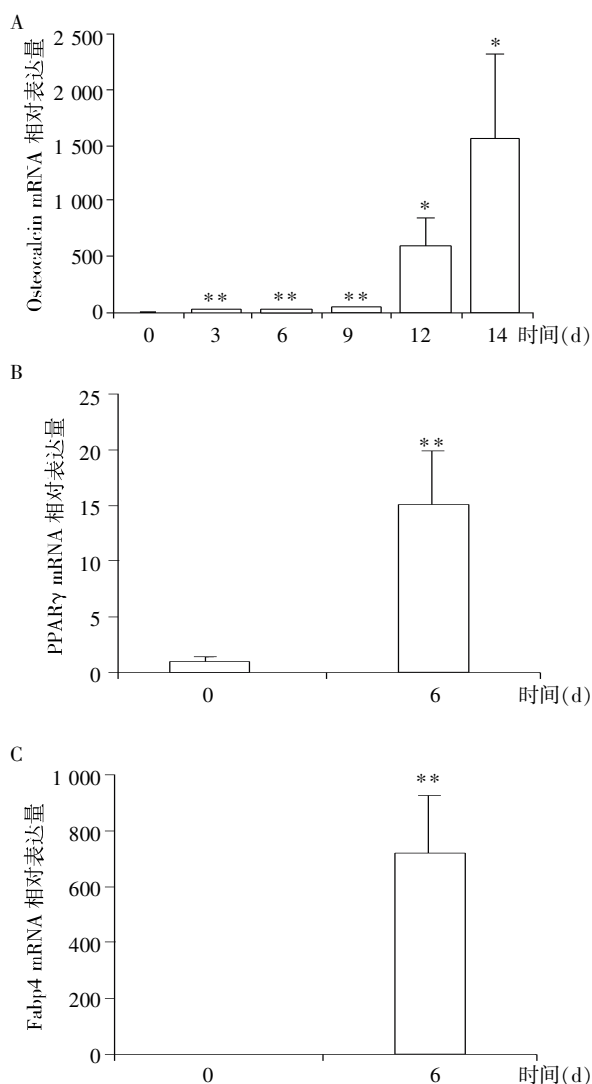
3 讨论

间充质干细胞在组织工程、创伤修复、促进造

骨、免疫抑制等方面有着相当广阔的应用前景。间充质干细胞具有贴壁功能,形态学上呈现纺锤形,在体外有较强的自我增殖能力,具有向成骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞等间质细胞多向分化的潜能。随着研究的发展,目前主要有 4 种方法分离纯化间充质干细胞,包括:密度梯度离心法、流式细胞仪(FCM)分离法、免疫磁珠法和贴壁筛选法。但各自存在优缺点,

2.4.2 成骨成脂分化过程中相关基因表达变化

P2 代颅盖骨间充质干细胞成骨诱导过程中收集第 0、3、6、9、12、14 天细胞检测成骨基因 Osteocalcin 发现,随着细胞的分化,Osteocalcin 表达明显



A: 新生小鼠颅盖骨 MSCs 成骨诱导过程中 Osteocalcin 的表达; B: 新生小鼠颅盖骨 MSCs 成脂诱导过程中 PPAR γ 的表达; C: 新生小鼠颅盖骨 MSCs 成脂诱导过程中 Fabp4 的表达。与 0 d 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 3$ 。

图 5 新生小鼠颅盖骨 MSCs 诱导分化过程中标志基因表达
Figure 5 RT-PCR analysis of specific genes during differentiation of MSCs

前三者所得细胞纯度较高,但常影响细胞活力,操作较繁琐,费用较高;而贴壁筛选法方便可行,但纯度较低。因此,建立一个简便易行的获得高纯度间充质干细胞的方法就显得尤为重要。

本研究首次将新生小鼠颅盖骨作为间充质干细胞的组织来源,通过胰酶消化、贴壁传代纯化细胞。在培养过程中,观察到原代细胞在接种后 4 h 即开始贴壁,24 h 后首次换液,去除大多数悬浮杂细胞,贴壁细胞呈多种形态,72 h 后部分贴壁细胞可形成一些集落,此后细胞增殖较快,P2 代以后细胞形态

趋于统一,呈旋涡状或均匀性分布生长。分析 P2 代细胞的细胞周期,结果显示 34.94% 的细胞处于 S 期,22.07% 的细胞处于 G2 期,表明 P2 代细胞具有很好的增殖能力。而既往研究显示,骨髓间充质干细胞绝大多数处于 G0/G1 期,仅有约 10% 处于 S 期和 G2 期^[14]。间充质干细胞的一个重要功能即多向分化,本实验对 P2 代细胞进行成骨成脂诱导,发现成脂标志基因 PPAR γ 、Fabp4 表达随细胞分化天数的增加而明显升高,染色和 PCR 结果均说明 P2 代新生小鼠颅盖骨间充质干细胞具有很好的成骨成脂分化能力。小鼠间充质干细胞无特异的表面标志,不同的分离方法、培养条件能改变表面标志的表达。多项研究显示其可表达间质细胞、内皮细胞和表皮细胞的表面标志,包括 Sca-1、CD29、CD44、CD73、CD105 等,而不表达造血细胞的表面标志 CD34、CD45 等^[11-13]。本研究通过流式测定 P2 代新生小鼠颅盖骨间充质干细胞表面标志,发现其高表达 CD29、CD44,而几乎不表达 CD34、CD45,说明原代培养的 P2 代间充质干细胞纯度较高。

本研究以新生小鼠颅盖骨作为间充质干细胞组织来源,采用胰酶消化、贴壁传代纯化分离培养细胞,所需费用较低,操作简易,获得细胞活性好、纯度高,易于推广,为进一步研究间充质干细胞奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Piersma AH, Brockbank KG, Ploemacher RE, et al. Characterization of fibroblastic stromal cells from murine bone marrow[J]. *Exp Hematol*, 1985, 13(4): 237-243
- [2] Lee OK, Kuo TK, Chen WM, et al. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood[J]. *Blood*, 2004, 103(5): 1669-1675
- [3] Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp[J]. *J Bone Mineral Res*, 2003, 18(4): 696-704
- [4] Battula VL, Treml S, Abele H, et al. Prospective isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human placenta using a frizzled-9-specific monoclonal antibody[J]. *Differentiation*, 2008, 76(4): 326-336
- [5] Orbay H, Tobita M, Mizuno H. Mesenchymal stem cells isolated from adipose and other tissues; basic biological properties and clinical applications[J]. *Stem Cells International*, 2012, 2012: 461718
- [6] Stappenbeck TS, Miyoshi H. The role of stromal stem cells in tissue regeneration and wound repair [J]. *Science*, 2009, 324(5935): 1666-1669

- [7] De Bari C, Dell'Accio F, Vandenabeele F, et al. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane [J]. *J Cell Biol*, 2003, 160(6): 909-918
- [8] Liu Y, Wang L, Kikui T, et al. Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration is governed by recipient T lymphocytes via IFN-gamma and TNF-alpha [J]. *Nat Med*, 2011, 17(12): 1594-1601
- [9] Zhao S, Wehner R, Bornhäuser M, et al. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells and their therapeutic consequences for immune-mediated disorders [J]. *Stem Cells Develop*, 2010, 19(5): 607-614
- [10] Yañez R, Lamana ML, García-Castro J, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(11): 2582-2591
- [11] Sun S, Guo Z, Xiao X, et al. Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable methods [J]. *Stem Cells*, 2003, 21(5): 527-535
- [12] Nombela-Arrieta C, Ritz J, Silberstein LE. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12(2): 126-131
- [13] Morikawa S, Mabuchi Y, Kubota Y, et al. Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow [J]. *J Exp Med*, 2009, 206(11): 2483-2496
- [14] Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2001, 226(6): 507-520

[收稿日期] 2013-06-28

依据文献计量学的理论与方法,通过定量与定性相结合的综合评审,《南京医科大学学报(自然科学学报)》再次入选为中国科学引文数据库(Chinese Science Citation Database, CSCD)2013~2014 年来源期刊。