

骨髓间充质干细胞的二维及三维培养实验研究

赵文婧,刘玲珑,吴丽情,陈维平^①

(广西医科大学基础医学院组织学与胚胎学教研室,广西 南宁 530022)

E-mail:182801861@qq.com

摘要:目的 在二维、三维培养体系中探讨骨髓间充质干细胞(BMSCs)分裂、增殖的特性,为构建组织工程提供足够的种子细胞。方法 密度梯度离心结合全骨髓贴壁法培养 BMSCs,采用流式细胞仪检测细胞表面标志;将壳聚糖、 β -甘油磷酸钠及羟乙基纤维素按比例混合制备三维支架。选取第3代骨髓间充质干细胞分别在传统二维培养体系以及在三维支架上接种培养2周。倒置相差显微镜下连续观察细胞形态变化的特征,收集细胞支架复合物行苏木精-伊红染色,并通过扫描电镜观察 BMSCs 的超微结构。结果 传统二维条件下 BMSCs 培养2 d,贴壁细胞开始展开,呈长梭形,3 d后细胞以集落样方式分布,出现许多圆、亮的细胞,呈“放气球样”黏附于表面。在三维培养体系中,扫描电镜可观察 BMSCs 呈球形,细胞贴附于支架纤维上生长;HE染色可见大量圆形的细胞沿着支架纤维生长。结论 在三维培养体系中,支架、胶冻状物质、BMSCs、相关的细胞因子共同构成三维培养体系的微环境,与 BMSCs 共培养具有良好的组织相容性,BMSCs 表现出活跃的增殖能力。

关键词: 间质干细胞;三维支架,二维培养技术

中图分类号: R329.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2014)03-0355-02

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2014.03.014

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)作为组织工程研究中最常用的种子细胞,拥有容易获得,具有高度增殖能力及多向分化潜能等优势^[1]。组织工程的三大要素包括种子细胞、三维支架和细胞生长因子^[2]。三维支架有利于种子细胞的粘附生长,其形态、结构、机械力、材料性质等与干细胞的生长有密切关联,能够为组织的形成提供支撑。近年来,如何获取数量更多、纯度更高,保持干细胞特性的 BMSCs,越来越成为科学家们研究的焦点。本研究将 BMSCs 作为种子细胞,分别在传统的二维培养体系和三维培养体系进行培养,通过比较两种微环境下 BMSCs 的生长情况,分析、评价 BMSCs 在二维、三维培养体系中分裂增殖的能力,探讨构建组织工程所需的种子细胞的途径。

1 材料和方法

1.1 实验动物 SPF级SD乳鼠30只,体质量8~15 g,雌雄不拘,由广西医科大学实验动物中心提供。实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部2006年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准^[3]。

1.2 主要试剂及仪器 低糖DMEM培养基、高糖DMEM培养基、胎牛血清(美国Hyclone公司),JSM-T300型扫描电子显微镜(日本JEOL公司),超净工作台(苏州净化,ST-CT-1F型),CO₂恒温恒湿培养箱(新加坡ESCO公司,CCL-170B-8),倒置相差显微镜(Olympus)。

1.3 方法

1.3.1 BMSCs的分离和培养 采用全骨髓贴壁培养法培养 BMSCs,并用流式细胞仪对培养的 BMSCs 进行鉴定。选取第三代生长良好的 BMSCs,在倒置相差显微镜下观察细胞的形态变化规律。

1.3.2 BMSCs的鉴定 选第三代 BMSCs,以胰蛋白酶和 EDTA 混合消化液消化,离心弃上清收集细胞,以 PBS 重悬,1 000 r/min,离心5 min,PBS漂洗2次制成细胞悬液,细胞计数板调节密度为 1×10^7 个/毫升,分别将细胞悬液转移至流式细胞仪检测管中,加抗体 CD34、CD45、CD29、CD90,4℃避光孵育30 min,PBS漂洗2次,1 000 r/min,离心5 min,添加5 00 μ l PBS吹打混匀,流式细胞仪检测。

1.3.3 三维支架的制备 ①壳聚糖溶液:在浓度为2%的100 ml乙酸中充分溶解2 g壳聚糖,高压灭菌消毒,低温保存备用。

② β -甘油磷酸钠溶液:在10 ml L-DMEM培养液中溶解 β -甘油磷酸钠粉末3.5 g,形成35% β -甘油磷酸钠溶液,0.22 μ m滤膜过滤,4℃冰箱保存备用。③羟乙基纤维素溶液:0.25 g羟乙基纤维素经过紫外线照射连续灭菌24 h。充分溶解于10 ml L-DMEM培养基中,4℃冰箱保存备用。④将2%壳聚糖、35% β -甘油磷酸钠、2.5%羟乙基纤维素按照8:3:2.5的体积比在室温下混合成液态(pH=7.2),然后浇注于24孔板中,放置到37℃培养箱中30 min左右即可凝结。⑤构建三维微环境培养体系:三维支架在培养基里浸泡24 h,使用前吸干培养基备用。选取生长良好的第3代 BMSCs,调整细胞密度为 1×10^6 /mm³的细胞悬液,每孔加入0.1 ml,在三维支架中接种。放入体积分数为5%CO₂、37℃孵箱内进行连续培养。倒置相差显微镜、HE染色方法、扫描电镜观察并拍照。

2 结果

2.1 BMSCs的鉴定 流式细胞仪检测结果显示,BMSCs CD34的阳性率为0.25%,CD45的阳性率为0.21%,CD90的阳性率为98.20%,CD29的阳性率为98.9%。

2.2 二维培养体系 培养24 h可见圆形或卵圆形细胞贴壁; BMSCs 培养2 d后,已贴壁的细胞慢慢出现伸展,呈短杆状、长梭形;3 d后大量细胞开始聚集,形成集落,细胞折光性好,胞浆丰富,许多又圆又亮的细胞出现在贴壁细胞上方(见图1),第7 d后,BMSCs开始老化,形态发生明显改变。

2.3 三维培养体系 通过倒置相差显微镜观察, BMSCs 48 h内生长期缓慢,72 h后球形细胞逐渐增多,折光性良好,细胞紧密贴附于三维支架纤维和孔隙中。培养5 d后,细胞生长旺盛,呈“8”、“品”字形增殖。培养14 d,少量细胞开始变形、拉伸,大部分细胞依旧保持低分化的状态(见图2)。对支架-细胞复合物进行苏木精-伊红染色, BMSCs 贴附生长,分布于支架纤维及孔隙中(见图3)。扫描电镜显示支架呈多层立体、纤维互相交错盘结的结构,孔隙直径在5.46~16.71 μ m,还可见部分细胞呈串珠状,蟠曲围绕于支架纤维,吸附于凹凸不平的支架表面。

3 讨论

BMSCs具有多向分化潜能^[4],具有易于获得、分离简便、免疫原性低等优点,在不同的诱导条件下可以分化为许多不同的

^① 通讯作者

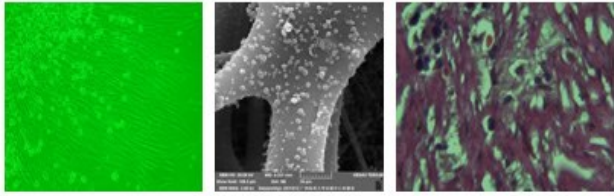


图1

图2

图3

图1 BMSCs呈“放气球样”黏附于表面($\times 10$);图2 BMSCs在三维支架上为球形,保持活跃增殖能力($\times 2\ 000$);图3 HE染色可见支架呈网状结构,BMSCs呈圆形,处于支架纤维的孔隙内($\times 40$)

组织,如骨^[5]、软骨^[6]、肝^[7]等,其高度增殖能力可满足组织工程种子细胞的需要。本实验以 BMSCs 为种子细胞,采用全骨髓贴壁法,在传统的二维培养体系和三维培养体系中进行体外培养,探讨两种微环境对 BMSCs 生物学特性的影响。实验表明,采用壳聚糖、 β -甘油磷酸钠为原料,羟乙基纤维素为交联剂制备的三维支架为纵横交错的网格纤维样结构,纤维间孔隙内含无色透明胶冻样物质。将 BMSCs 接种于三维支架中,细胞不仅沿着支架纤维表面黏附生长,还渗入孔隙内的胶冻状物质。干细胞有对称分裂和不对称分裂两种形式,与三维支架联合培养的 BMSCs,大部分细胞在培养过程中以对称分裂方式为主,分裂增殖活跃,细胞数量迅速增加。提示以壳聚糖为主要原料配制形成的三维支架,细胞毒性低,理化性质稳定,并且 BMSCs 与支架生物相容性良好。三维支架是提供 BMSCs 生长的良好载体,有利于促进 BMSCs 粘附、分裂、增殖。在传统二维培养体系中,BMSCs 培养虽贴壁生长,并在第 3 d 开始大量增殖,但二维培养体系不足以模拟体内三维微环境,因此在培养 10 d 后细胞开始变形,胞浆宽大呈扁平状。干细胞具有“环境依赖性分化”特性^[8],细胞的分裂或分化,与其所在的微环境有密切的关系。微环境中的细胞、细胞外基质、细胞因子、蛋白

等对干细胞的分化有一定的影响。将 BMSCs 在两种微环境中的培养进行对比,传统二维培养体系存在 BMSCs 纯度较低、易分化等问题。在三维培养体系中,支架、胶冻状物质、BMSCs、相关的细胞因子共同构成三维培养体系的微环境,与 BMSCs 共培养具有良好的组织相容性,BMSCs 表现出活跃的增殖能力。

参考文献:

- [1] Cordonnier T, Layrolle P, Gaillard J, et al. 3D environment on human mesenchymal stem cells differentiation for bone tissue engineering[J]. J Mater Sci Mater Med, 2010,21(3):981-987.
- [2] Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage [J]. Biomaterials, 2000, 21(24): 2529-2543.
- [3] 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见[S]. 2006-09-30.
- [4] 张巧玲,覃莉珍,解继胜,等. 脐带血间充质干细胞研究进展及应用前景[J]. 右江民族医学院学报,2005,27(1),101-103.
- [5] Ohgushi H. Osteogenically differentiated mesenchymal stem cells and ceramics for bone tissue engineering[J]. Expert Opin Biol Ther,2014,14(2):197-208.
- [6] Gao WJ, Lin ML, Liang AJ, et al. Melatonin enhances chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. Journal of pineal research, 2014,56(1): 62-70.
- [7] Du ZI, Wei C, Cheng K, et al. Mesenchymal stem cell-conditioned medium reduces liver injury and enhances regeneration in reduced-size rat liver transplantation[J]. J Surg Res, 2013,183(2):907-915.
- [8] Dus HS, Joseph A, Shanmuganathan VA, et al. Stem cell differentiation and the effects of deficiency [J]. Eye, 2003,17(8):877-885.

收稿日期:2014-04-01;修回日期:2014-05-07

SOX2 在成年小鼠室周器官细胞的表达及其意义

陈金绪¹,陈月新²,颜池¹

(1. 广西科技大学医学院解剖组胚教研室,广西 柳州 545106 E-mail:gxcjx@126.com;

2. 广西玉林市第一人民医院检验科,广西 玉林 537000)

摘要:目的 探讨 SOX2 在成年小鼠室周器官(CVOs)细胞的表达及其意义。方法 应用免疫组织化学法检测成年 C57BL/6 小鼠脑 CVOs 细胞中 SOX2 的表达情况。结果 SOX2 在最后区(AP)、正中隆起(ME)、穹窿下器(SFO)、联合下器(SCO)和脉络丛(ChP)细胞均有强表达,且室管膜上皮细胞几乎都 100% 阳性表达 SOX2,除 SCO 外,CVOs 表达 SOX2 阳性的细胞数量明显少于侧脑室的室下区表达 SOX2 阳性的细胞数量($P < 0.05$)。结论 在成年小鼠脑 CVOs 分布有大量的 SOX2 阳性细胞,表明成年小鼠 CVOs 可能存在具有增殖和分化潜能的神干细胞和/或神经祖细胞。

关键词: SOX2;小鼠;室周器官

中图分类号: R99

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2014)03-0356-03

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2014.03.015

SOX2 属于 SOX(sry-related HMG box)基因家族中的一员,定位在染色体的 3q26.3-q27 位点上。它是一种高度保守的转录因子,具有调节胚胎干细胞自我更新的作用,是目前研究发现的唯一对维持胚胎干细胞分化潜能起重要作用的 SOX 基因,也是诱导成体细胞成为多能干细胞的—种关键因子^[1-2]。从胚胎到成年,SOX2 在中枢神经系统(central nervous system, CNS)中的多能神经干细胞中持续表达,从而可以将 SOX2 作为分辨神经干细胞和神经祖细胞的生物标志物^[3]。而成年脑的

许多部位,如大脑皮层、小脑、脊髓等存在有神经干细胞和/或神经祖细胞,可以增殖分化为神经元和/或胶质细胞^[4-5]。室周器官(circumventricular organs,CVOs)是位于第三、第四脑室室壁上的微小器官,由特化的室管膜细胞组成,血脑屏障缺乏,其主要功能是参与调节脑脊液分泌、传递脑与脑脊液和血液之间的信息,包括终板血管器(organum vasculosum of lamina terminalis,OVLT)、穹窿下器(subfornical organ,SFO)、正中隆起(median eminence,ME)、联合下器(subcommissural organ,