

新生牛与成年牛骨髓间充质干细胞的生物学特性比较

封纪武^{1,2}, 柏学进^{1,2}, 赵晶¹, 赵兴¹, 董雅娟^{1,2}

(¹青岛农业大学动物胚胎工程中心, 山东青岛 266109; ²淄博小黑牛牧业科技有限公司, 山东淄博 255000)

摘要: 【目的】建立体外分离、培养和扩增牛骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 的方法, 研究牛龄对 BMSCs 增殖特性的影响。【方法】用贴壁筛选法纯化新生牛与成年牛的 BMSCs, 传代扩增, 测定生长曲线和贴壁率, 并进行形态学观察。【结果】通过体外培养, 可使体内环境下低丰度的 BMSCs 实现扩增。新生牛 BMSCs 易于分离纯化, 贴壁率及增殖能力显著高于成年牛。【结论】新生牛比成年牛更适于 BMSCs 的提取。BMSCs 的增殖生长特性与年龄密切相关, 增殖能力和活性随着年龄的增加而降低, 成功地建立了一种分离培养牛 BMSCs 的方法, 分析了 BMSCs 部分生物学特性, 为进一步深入研究 BMSCs 的诱导分化和应用打下基础。

关键词: 牛; 年龄; 骨髓间充质干细胞; 生物学特性; 增殖

A Comparative Study of Calf and Adult Cattle Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell *in vitro*

FENG Ji-wu^{1,2}, BAI Xue-jin^{1,2}, ZHAO Jing¹, ZHAO Xing¹, DONG Ya-juan^{1,2}

(¹Center of Animal Embryo Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong;

²Xiaohainiu Animal Science and Technology Corporation, Inc, Zibo 255000, Shandong)

Abstract: 【Objective】By establishing a method of isolating and maintaining bovine bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) *in vitro*, the effect of age on bovine BMSCs' proliferation was investigated. 【Method】BMSCs were isolated and purified by adherence plasticity method, then cultured *in vitro*. Growth curve and attachment rate were measured. BMSCs morphology was observed. 【Result】BMSCs in low abundance can quickly expanded when cultured *in vitro*. Calf BMSCs can be isolated and purified more easily compared to BMSC from adult cattle. Calf BMSCs adherence rate and reproductive activity were significantly higher than BMSCs from adult cattle. 【Conclusion】Calf was more feasible than adult cattle for BMSCs extraction. The age was closely related to the biological characteristics in bovine BMSCs, while proliferation capability and activity of bovine BMSCs decreased with age. The method for isolation and culture of BMSCs was successfully established in this study with some biological features observed and analyzed. It has laid a foundation for further investigation and application of BMSCs.

Key words: Bovine; Age; Bone marrow mesenchymal stem cells; Biological characteristics; Proliferation

0 引言

【研究意义】骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 来源于中胚层的成体干细胞, 具有自我复制和多向分化潜能, 可以分化为外胚层的神经元^[1]和神经胶质细胞^[2], 中胚层的成骨细胞、脂肪细胞^[3]、心肌细胞^[4]、成肌细胞和软骨细胞^[5]以及内胚层的肝细胞^[6]、内皮细胞等。其所具有的多向分化潜能特性, 使治愈不可逆病变的

疾病成为可能, 对再生医学具有重要的理论价值和临床医学的实践意义。BMSCs 还具有取材方便、易于分离、扩增迅速 (多代扩增后仍具有干细胞特性)、免疫耐受性及易于转染外源基因等特点, 符合作为种子细胞的条件。在未来组织工程、基因工程^[7]的研究中必将具有广泛的应用前景。【前人研究进展】近年来, 大量研究表明骨髓中含有可以转化为各种细胞类型的干细胞, 主要包括造血干细胞和 BMSCs 两大类型。

收稿日期: 2007-04-24; 接受日期: 2007-07-22

基金项目: 国家“863”计划重点项目资助 (2007AA100505), 山东省重大科技专项资金资助 (2007ZHZX11101)

作者简介: 封纪武 (1980-), 男, 宁夏石嘴山人, 硕士研究生, 研究方向为动物胚胎工程及成体干细胞。通讯作者董雅娟 (1964-), 女, 山东文登人, 教授, 研究方向为动物胚胎工程与克隆。E-mail: etcenter@126.com

截至目前, 研究人员已经在人^[8]、猫^[9]、狗^[10]、狒狒^[11]、兔^[12]、猪^[13]、羊^[14]、小鼠^[15]、大鼠^[16]、鸡^[17]和马^[18]等动物体内分离得到 BMSCs。【本研究切入点】到目前为止, 世界上只有日本对牛的 BMSCs 有所研究, 但还没有得到牛的 BMSCs 细胞系。BMSCs 的生物学特性受多种因素影响, 年龄的影响至关重要。因此本试验以新生牛和成年牛 BMSCs 为研究对象, 探讨其生物学特性和定向诱导分化潜能与年龄间的关系, 为 BMSCs 细胞系的建立和转基因技术平台的建立提供依据和材料, 为进一步的诱导分化研究和医学研究打下良好基础。【拟解决的关键问题】解决 BMSCs 建系中细胞易分化, 鉴定困难和没有成功经验可以借鉴的特点, 在本实验室已经建立的 BMSCs 分离培养条件基础上, 简化操作方法, 分析年龄对 BMSCs 分离培养的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本来源 骨髓取自健康荷斯坦新生牛和成年牛的股骨。

1.1.2 主要试剂 L-DMEM, 胰蛋白酶, PBS 干粉, 青霉素-G, 硫酸链霉素, L-谷氨酰胺, 油红 O, 异丙醇, 甲醇 (以上均购自 Sigma 公司), 马血清 (HS, Hyclone 公司), FBS (Gibco), EDTA (天津博迪化工有限公司), AKP 和瑞氏-吉姆萨 (南京建成生物技术有限公司)。

1.2 BMSCs 的分离培养

无菌条件下分别抽取 3 ml 新生牛和成年牛股骨骨髓 (以下简称新生牛组和成年牛组), 迅速置于预先准备好的两个加有 10 ml、38.5℃PBS 的 100 mm 大平皿中。用 10 ml 注射器反复抽吸采集到的骨髓, 将其缓慢打散, 制成细胞悬液, 过双重 200 目不锈钢细胞筛网, 除去多余的脂肪, 收集悬液转移至 15 ml 离心管中, 80×g 离心 6 min, 弃上清液, 沉淀中加入 4 ml L-DMEM 完全培养液 (含 120 ml·L⁻¹FBS, 10 ml·L⁻¹L-谷氨酰胺, 100 U·ml⁻¹青霉素及 100 μg·ml⁻¹链霉素), 用移液枪将其缓慢打散制成细胞悬液, 1:2 接种于 35 mm 的培养皿中, 置 38.5℃, 5% CO₂, 饱和湿度的 CO₂ 培养箱内常规培养, 每隔 24 h 在倒置相差显微镜下观察细胞形态, 拍照, 记录观察结果。24 h 后首次全量换液, 用 PBS 缓慢冲洗 3 遍, 除去大量未贴壁细胞, 每个平皿最终再加入 2 ml 新鲜培养液, 继续培养, 以后每隔 72 h 全量换液一次。直至细胞完全融合, 弃去

废液, PBS 冲洗 3 遍, 加入 0.5 ml 含 0.25% 胰蛋白酶-0.02% EDTA 消化液室温下消化 (1~2 min), 收集细胞, 转移至 15 ml 离心管中 80×g 离心 2 min, 弃上清液, 在沉淀中加入 4 ml L-DMEM 完全培养液重悬细胞, 1:2 接种于 35 mm 培养皿中, 记为第一代(P1), 置 38.5℃, 5% CO₂ 饱和湿度培养箱内常规培养。每 24 h 在倒置相差显微镜下观察细胞的形态, 拍照, 记录观察结果。再次融合时按以上步骤操作, 依次传代, 做好记录。

1.3 BMSCs 生长曲线的绘制

取新生牛和成年牛的原代以及对数生长期的 P3、P6 和 P10 代 BMSCs, 制备单细胞悬液, 调整细胞浓度为 4×10³cells·cm⁻², 接种于 24 孔板中, 每孔 400 μl, 置 38.5℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。每隔 72 h 全量换液一次, 每过 24 h 分别取每个培养板中的 1 孔细胞消化, 用细胞计数板计数, 每孔重复 3 次, 取平均值, 以细胞生长时间(h)为横坐标, 以细胞数(×200 cells·cm⁻²)为纵坐标, 绘制细胞生长曲线。

1.4 BMSCs 贴壁率的测定

制备新生牛和成年牛的 P2、P7 和 P12 代单细胞悬液, 以 4×10³ cells·cm⁻² 的浓度分别接种于 24 孔板中, 每孔 400 μl, 于 38.5℃、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养。每过 1 h 分别取出每个培养板的三孔细胞, 吸去培养液, 用 PBS 冲洗 3 次, 以充分除去未贴壁细胞, 用含 0.25% 胰蛋白酶-0.02% EDTA 的消化液室温下消化 (1~2 min), 计数, 取平均值, 按下式计算每个时间点的贴壁率。

$$\text{贴壁率} = \frac{\text{已贴壁细胞数}}{\text{接种时的细胞数}} \times 100\%$$

分别取各代细胞贴壁率的平均值, 以贴壁时间(h)为横坐标, 以贴壁率(%)为纵坐标, 绘制各代细胞贴壁率曲线。

1.5 BMSCs 的染色

1.5.1 BMSCs 瑞氏-吉姆萨 (RS-GMS) 染色 取一皿纯化达 95% 并接近融合的新生牛和成年牛 P3 BMSCs, 弃去原培养液, 用 PBS 冲洗干净, 加入 3~5 滴染色液 I, 边加边轻轻晃动平皿, 使细胞充分接触到染色液 I, 1 min 后直接加入 5~10 滴染色液 II (以覆盖平皿底壁为准), 5~10 min 后用蒸馏水冲洗干净, 置倒置相差显微镜下观察细胞形态。

1.5.2 碱性磷酸酶 (AKP) 染色 取一皿纯化较好接近融合的新生牛和成年牛 P3 BMSCs, 弃去原培养液, 用 PBS 冲洗干净, 加入 5 滴固定液 (甲醇溶液) 固定

5~10 min, 然后加入预先配置好的新鲜底物液铺满平皿底部, 放置 37℃ 湿盒中, 15 min 后水洗, 自然晾干, 镜检, 拍照。

1.6 BMSCs 的诱导分化试验

分别取生长状态良好的新生牛和成年牛 P4 代 BMSCs 消化 (得到 P5 代 BMSCs), 调整细胞浓度, 以 $4 \times 10^3 \text{ cells}\cdot\text{cm}^{-2}$ 分别接种于预先置有盖玻片的 2 个六孔板中 (分为新生牛组和成年牛组), 当细胞达 70%~80% 融合时, 弃去原培养液, 用 PBS 冲洗 3 遍, 加入脂肪细胞诱导分化液 I, 置 38.5℃、5% CO_2 饱和湿度培养箱培养, 每 24 h 在倒置相差显微镜下观察细胞形态的变化, 每隔 3 d 半量换液一次。于诱导第 5 周时取一组中的两个平皿进行油红 O 染色, 并用苏木素复染, 鉴定脂肪细胞分化情况。

1.7 BMSCs 的冷冻保存与复苏

将体外培养生长状态良好的对数生长期细胞消化后, 离心, 在沉淀中加入 L-DMEM 完全培养液, 调整细胞浓度为 $8 \times 10^3 \text{ cells}\cdot\text{cm}^{-2}$, 再加入等量预先配置好的含 40% 马血清-20% DMSO 细胞冻存液, 充分混匀, 此时细胞终浓度为 $4 \times 10^3 \text{ cells}\cdot\text{cm}^{-2}$, 冻存液终浓度为 20% 马血清-10% DMSO。以每个冻存管中加入 1 ml 细胞悬液分装, 迅速置于 4℃ 冰箱中平衡 2~4 h, 再在 -196℃ 液氮罐表面熏蒸过夜, 最后投入液氮深度冷冻保存, 冻存 3~6 个月。解冻时从液氮罐中取出迅速投入预先准配好的 37℃ 水浴中快速复苏, 转移至 15 ml 离心管中, 加入 5 ml L-DMEM 完全培养液洗涤离心, 去上清, 再加入 L-DMEM 完全培养液, 重悬细胞, 调整细胞浓度为 $4 \times 10^3 \text{ cells}\cdot\text{cm}^{-2}$, 接种于 35 mm 塑料平皿中, 置 38.5℃, 5% CO_2 , 饱和湿度培养箱内常规培养, 检测冷冻复苏后 BMSCs 的生长情况, 形

态特征及分化潜能。

2 结果与分析

2.1 BMSCs 的分离培养

刚接种于平皿内的细胞均为圆形, BMSCs 的含量很少, 以杂细胞为主, 会随着每次换液逐渐被除去。接种 24 h 时首次全量换液, 镜下观察可见少量梭形细胞出现, 形态较均一, 部分细胞聚集在一起, 形成小集落 (由 60~100 个 BMSCs 形成, 图 1), 每隔 24 h 观察一次。结果表明, 梭形细胞不断增加, 呈漩涡状排列, 有一定方向性, 集落逐渐扩大, 与其它集落融合在一起。72 h 时再次换液, 镜下观察发现, 新生牛组已有 40% 的 BMSCs 出现 (图 2-A), 而成年牛组只有 20% 的 BMSCs 出现 (图 2-B)。以后仍然每隔 72 h 全量换液一次, 原代培养第 6 d 时镜下观察发现新生牛组已有 80% 的 BMSCs 融合; 而成年牛组只出现 30% 的 BMSCs, 在 11~13 d 时接近融合, 融合后的细胞应立即消化传代, 否则再培养一段时间后部分

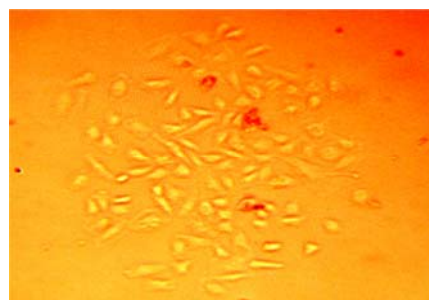
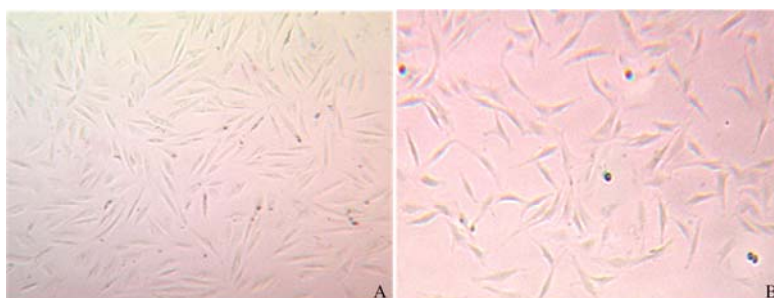


图 1 BMSCs 集落 ($\times 40$)

Fig. 1 Colony of BMSCs ($\times 40$)

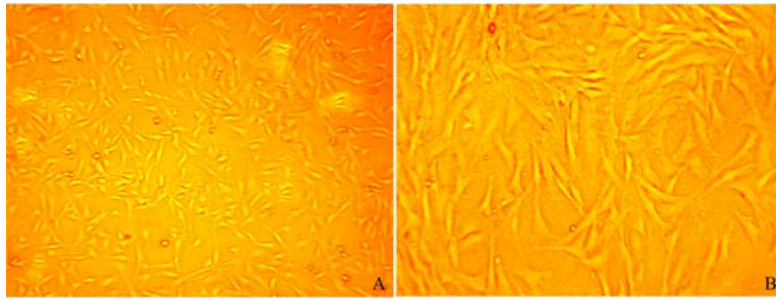


A: 新生牛 ($\times 40$); B: 成年牛 ($\times 100$)

A: Primary calf ($\times 40$); B: Adult cattle ($\times 100$)

图 2 培养 4 d 的新生和成年牛原代 BMSCs

Fig. 2 Primary calf and adult cattle BMSCs were cultured at four days



A: P5 代新生牛 BMSCs (×40) ; B: P5 代成年牛 BMSCs (×100)
 A: P5 calf BMSCs (×40); B: P5 adult cattle BMSCs (×100)

图 3 接近融合的 P5 代新生牛和成年牛 BMSCs

Fig. 3 P5 calf and adult cattle BMSCs reach to confluence

细胞会开始分化、衰老。镜下观察传代接种后的 BMSCs 呈圆形，新生牛组于 12 h 后完全贴壁，成年牛组贴壁时间稍微长些，贴壁后的 BMSCs 在形态上发生改变，重新变为梭形，多角形或扁平形，形态与原代贴壁 BMSCs 相似，细胞仍然呈漩涡状排列生长，有方向性(3 代后的 BMSCs 这种呈漩涡状生长的现象就很少见了)，细胞活力增强，增殖速度加快，12 代以内的新生牛组 BMSCs 均在 3 d 内即可传代，而成年牛组在 8 代后其传代时间逐渐延长，一般需 4~6 d 才可传代(图 3-A、B)。多次传代后的细胞其形态逐渐变得不均一，细胞突起增多，大量多角形细胞出现，并且增殖能力逐渐减弱。

2.2 BMSCs 生长曲线的绘制

根据细胞计数绘制出的生长曲线表明(图 4、5)，新生牛组接种后的原代细胞 1~3 d 为潜伏生长期，此期主要为细胞适应体外环境，贴壁生长阶段，增殖较

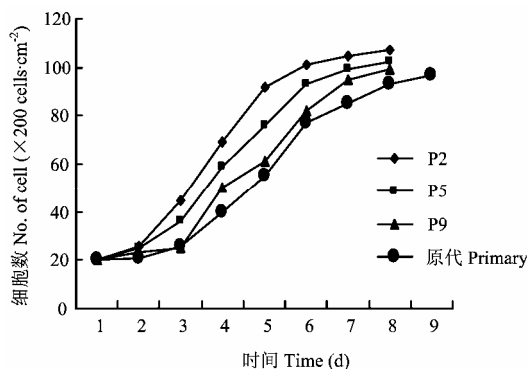


图 4 新生牛 BMSCs 的生长曲线

Fig. 4 The growth curve of calf BMSCs

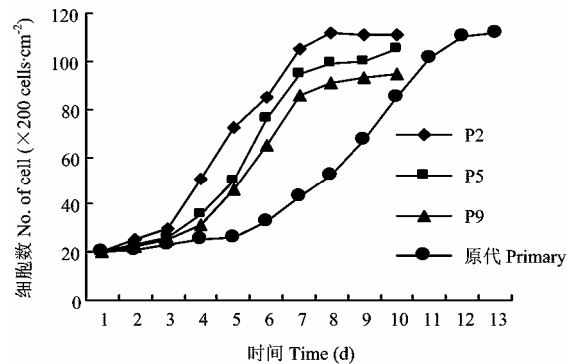


图 5 成年牛 BMSCs 的生长曲线

Fig. 5 The growth curve of adult cattle BMSCs

慢；4~7 d 为对数生长期，此期细胞生长活跃，增殖较快；此后由于细胞接触紧密，相互间存在抑制作用，增长速度逐渐减慢，进入平台期；而成年牛组接种后的原代细胞 1~5 d 为潜伏生长期；7~11 d 为对数生长期；之后进入平台期，此时应及时传代。传代后可见，新生牛组和成年牛组细胞潜伏生长期和对数生长期均明显缩短。

2.3 BMSCs 贴壁率的测定

从绘制的细胞贴壁率曲线可以看出(图 6、7)，在接种 1 h 后各代 BMSCs 均有少量贴壁，倒置相差显微镜下观察发现细胞形态发生变化，逐渐向梭形细胞形态改变，表现出贴壁迹象。新生牛组于 12 h 后 P3 和 P7 代细胞接近全部贴壁，P12 代也有 80% 的细胞贴壁，24 h 后细胞全部贴壁。而成年牛组贴壁时间稍微长些，完全贴壁后可以全量换液除去未贴壁的杂细胞以及在消化离心过程中死去的 BMSCs，保持培养细

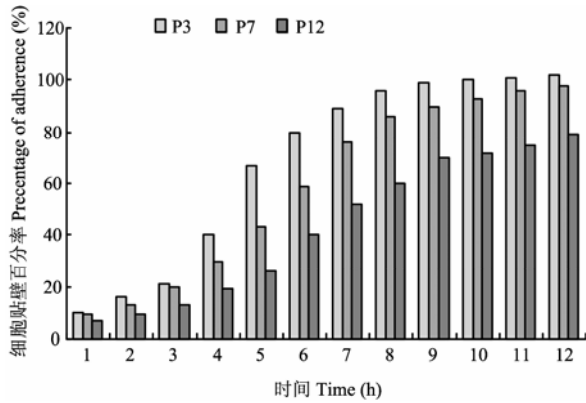


图 6 P3、P7 和 P12 代新生牛 BMSCs 贴壁率

Fig. 6 The adherence percentage of calf BMSCs at P3, P7, P12

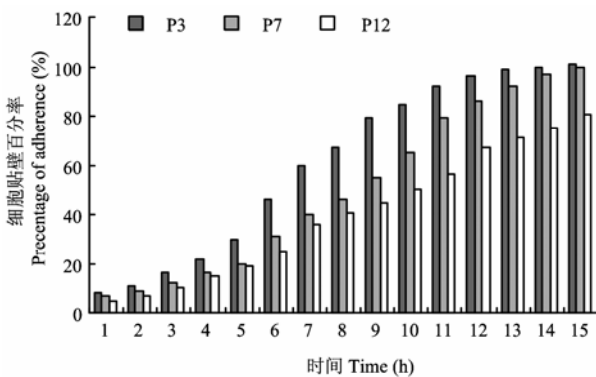


图 7 P3、P7 和 P12 代成年牛 BMSCs 贴壁率

Fig. 7 The adherence percentage of adult cattle BMSCs at P3, P7, P12

胞的纯化度，利于整个 BMSCs 的稳定生长。

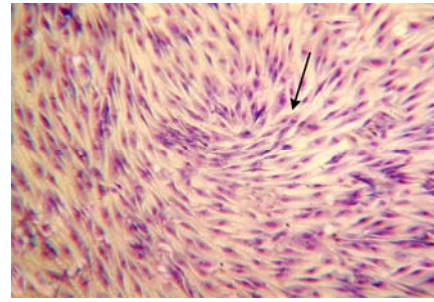
2.4 BMSCs 的染色

2.4.1 RS-GMS 染色 染色后的新生牛和成年牛 BMSCs，在倒置相差显微镜下观察发现细胞呈漩涡状排列(图 8)，细胞形态以梭形为主，少量细胞呈星形、多角形。胞体肥大，胞浆丰富，核染色质细，胞核较大，多为卵圆形。

2.4.2 AKP 染色 染色后的 BMSCs 在倒置相差显微镜下可见其胞质呈淡黄色，显弱阳性，新生牛组细胞染色阳性率达 30%，而成年牛组细胞染色阳性率只占 20% (图 9)。

2.5 BMSCs 向脂肪细胞诱导分化

成脂诱导第 1 周时，镜下观察可见部分细胞出现脂滴沉着的现象，外形多为圆形和椭圆形，大小不等。



箭头所指为分裂期的细胞核
Arrowhead direction is mitotic phase karyon

图 8 BMSCs 瑞氏-吉姆萨染色 ($\times 100$)

Fig. 8 The RS-GMS staining of BMSCs ($\times 100$)

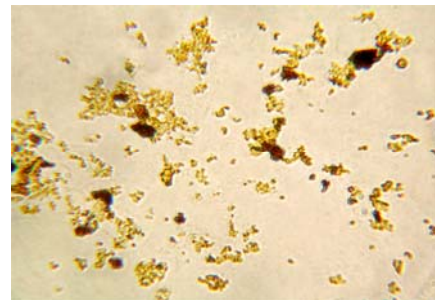


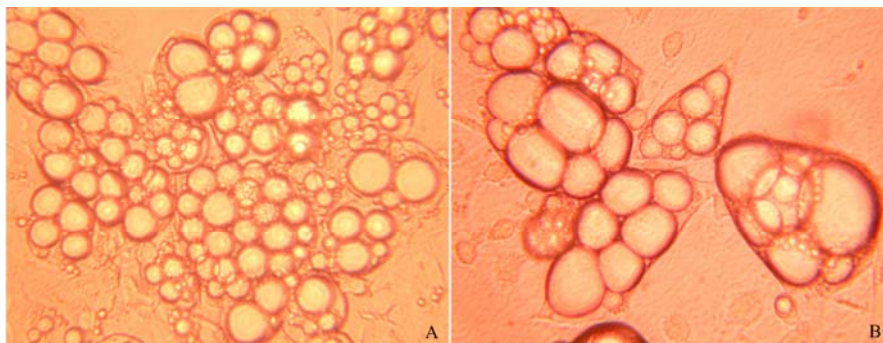
图 9 AKP 染色呈弱阳性 ($\times 400$)

Fig. 9 AKP weakly positive of BMSCs ($\times 400$)

第 5 周时镜下观察发现新生牛组脂滴逐渐融合增大，形成胞体透亮的脂肪空泡，细胞增大，变成类圆形和多角形，有的聚集成堆(图 10-A)；成年牛组也出现上述变化(图 10-B)，只是在成脂的数量上少于前者。诱导第 5 周时将各组细胞用油红 O 染色，苏木素复染，镜下观察可见胞体内含大小不一的脂肪滴，脂滴着色鲜红，胞核为蓝色，个别脂肪细胞的胞核被脂滴推向胞体的边缘(图 11 箭头所指)。

2.6 BMSCs 的冻存及复苏

将冻存 3 个月和 6 个月的 P3、P7 和 P12 代新生牛和成年牛 BMSCs 解冻培养后，细胞的形态仍然为长梭形，继续培养，其传代扩增的能力与冻存前无较大差别。对解冻培养后的细胞向脂肪细胞定向诱导分化，结果表明其仍然具有向脂肪细胞分化的能力。说明牛 BMSCs 可用液氮冷冻保存，而且不影响其生长活性及分化特性，这对牛 BMSCs 的进一步研究提供了方便可靠的细胞来源，缩短了试验周期，节省了试验费用。

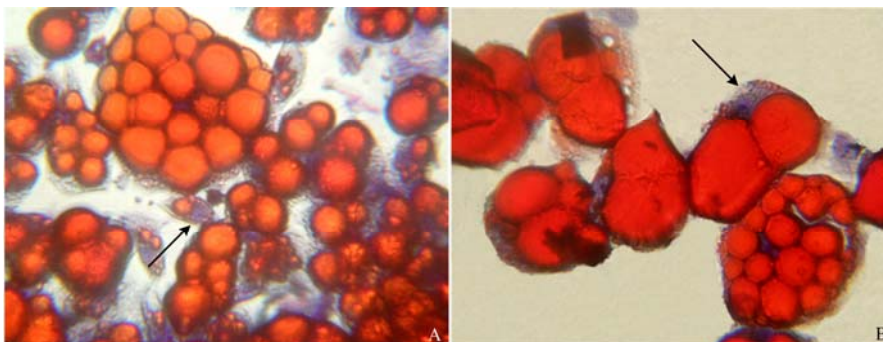


A: 出现脂滴的细胞增多, 小脂滴逐渐融合成大的脂泡 ($\times 400$); B: 经脂肪诱导液培养后检测到聚集的脂肪空泡 ($\times 400$)

A: Cells with lipid vacuoles and small lipid vacuoles blending ($\times 400$); B: BMSCs were grown in adipogenesis inducing medium, lipid vacuoles accumulation were detectable ($\times 400$)

图 10 P5 代新生牛和成年牛 BMSCs 成脂诱导第 5 周

Fig. 10 Calf and adult cattle P5 BMSCs: five weeks after adipogenic inducing



A: 苏木素复染后, 脂滴呈橙红色, 胞核呈蓝色, 箭头所指为胞核; B: 油红 O 染色后脂滴呈鲜红色, 表明 BMSCs 定向分化为脂肪细胞

A: With haematoxylin staining, lipid drop shown as orange red and nucleus shown as blue. Arrowhead direction is karyon ($\times 400$); B: Oil red O staining showed the lipid vacuoles bright red, which demonstrated the committed differentiation of BMSCs into adipoblast. ($\times 400$)

图 11 P5 代新生牛和成年牛 BMSCs 油红 O 染色

Fig. 11 The appearance of calf and adult cattle P5 BMSCs after oil red O

3 讨论

骨髓组织中除含有造血干细胞以外, 还含有 BMSCs, 传统上认为 BMSCs 的主要功能是参与构成造血干细胞的生存和分化的微环境, 可作为滋养层支持造血干细胞生长。近年来研究表明 BMSCs 具有更广泛的分化潜能, 在不同的诱导条件下, 具有向中胚层、内胚层和神经外胚层来源的组织分化的潜能, 所以又称其为间充质祖细胞 (mesenchymal progenitor cells) 或骨源性干细胞 (osteogenic stem cells)^[19], 最初是由德国病理学家 Cohnheim 于 1867 年提出在骨髓中存在非造血干细胞的观点^[20], 直至 20 世纪 70 年代中期, Friedenstien 等^[21]的研究才证明了骨髓中确实存在非造血干细胞这一事实并建立了 BMSCs 分离纯化

的方法, 到了 90 年代很多研究小组又对其进行了改进, 后来人们对 BMSCs 的多向分化潜能进行了多方面的探讨性研究。至今, 大量研究都已提高了我们对 BMSCs 的生物学特性、表型、分化潜能和实际应用的认识。

由于骨髓中细胞成分复杂, BMSCs 的含量极为有限, 约占骨髓有核细胞总数的 0.001%~0.01%。因此, 体外分离培养、获得纯化稳定的 BMSCs 非常重要。目前, 体外获得 BMSCs 的方法很多, 如贴壁筛选法 (全骨髓法)、密度梯度离心法、流式细胞仪分选法和单克隆抗体磁珠分离法等。本试验根据 BMSCs 在体外培养条件下易于黏附于塑料平底皿底壁, 而白细胞及骨髓造血干细胞主要呈悬浮生长的特性, 采用贴壁筛选法分离培养 BMSCs, 通过定期换液逐渐除去不贴

壁的白细胞、造血干细胞及其它杂细胞,达到分离纯化 BMSCs 的目的,此方法操作简单,分离培养所需仪器设备的条件不高,并且获得的 BMSCs 能够稳定增殖传代。本试验用此法体外分离培养获得的牛 BMSCs 已经传至 28 代,并对个别代次的细胞进行冷冻保存,为相关试验提供方便可靠的细胞来源。

本试验培养的新生牛和成年牛 BMSCs 的生长曲线显示, BMSCs 在体外培养条件下的生长与其它细胞一样经历了潜伏生长期,对数生长期和平台期。传代后细胞生长速度明显增快,新生牛 BMSCs 原代培养 6~8 d 即可传代,再次传代只需要 3 d;成年牛 BMSCs 原代培养需 9~11 d,再次传代需要 3~5 d。由此可以证实, BMSCs 在骨髓中的含量较低,另一方面则说明 BMSCs 的分裂增殖能力十分活跃,并且新生牛在这方面表现的更加突出。从贴壁时间的测定中也能发现,传代后细胞能在较短的时间内贴壁,12 h 后贴壁率可达到 95% 以上,并且接种成活率高,所以实现体外大量扩增 BMSCs 是可能的。牛 BMSCs 的传代培养的结果表明,在传至 16 代后,细胞的增殖能力逐渐减弱,传代培养后的细胞融合时间延长,成年牛组更加明显,细胞分裂增殖能力和年龄有着很大的关系。有研究表明, BMSCs 含量随着年龄的增长而下降^[22]; Bruder 和 Quarto 等人^[23,24]研究指出,成骨前体细胞的数量随着年龄的增大而减少; Mueller 等人^[25]证实 65 岁以上 BMSCs 的增殖速度远小于 65 岁以下者。从本研究中分离培养后的 BMSCs 表现出的部分生物学特性可以证明, BMSCs 和年龄有着很大的关系,应尽量从年龄小的牛体内获得 BMSCs,因其体内的 BMSCs 含量多,分化潜能高。由于新生牛骨髓腔中的红骨髓占 90% 以上,随着年龄的增长,红骨髓逐渐减少,黄骨髓逐渐增加,而 BMSCs 主要存在于红骨髓中,这也是年龄影响 BMSCs 的生长、扩增以及多潜能分化的主要原因之一。

到目前为止 BMSCs 的体外分离培养方法已基本成熟,但由于其缺乏特异性表面标记,并且细胞在增生传代过程中,表面标记的表达会发生变化,尚无一种公认的 BMSCs 的表面标志,因此对于体外培养的 BMSCs 的鉴定主要是通过形态学特征、细胞染色以及是否具有多向分化能力来进行的。本试验在倒置相差显微镜下观察到形态均一的成纤维样细胞外观,排列紧密,有一定方向性;通过 RS-GMS 染色后发现 BMSCs 的形态更加清晰,多为梭形外观,核仁明显,可见 2~4 个核仁。AKP 染色细胞阳性率只有 20%~

30%,这可能与种属差异以及年龄大小有关。

4 结 论

本研究证明 BMSCs 和年龄有着很大的关系,从年龄小的牛体内获得 BMSCs 用于进一步的试验研究效果好;可采用贴壁筛选法分离培养 BMSCs,通过定期换液逐渐除去不贴壁的白细胞、造血干细胞及其它杂细胞,达到分离纯化 BMSCs,此方法的特点在于操作简单,分离培养所需仪器设备的条件不高,并且获得的 BMSCs 能够稳定增殖传代,对不同代次的细胞进行冷冻保存,为相关试验提供方便可靠的细胞来源;可借助倒置相差显微镜,通过 RS-GMS 染色,观察 BMSCs 的形态学特性;通过 AKP 染色确定细胞阳性率,通过定向诱导分化,确定本试验分离培养的这群细胞具备了分化潜能及自我更新能力,证明从牛骨髓中分离出的这种单核细胞是 BMSCs。

References

- [1] Woodbury D, Schwarz E J, Prockop D J, Black I B. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 2000, 61: 364-370.
- [2] Schwarz E J, Alexander G M, Prockop D J, Azizi S A. Multipotential marrow stromal cells transduced to produce L-DOPA: Engraftment in a rat model of Parkinson disease. *Human Gene Therapy*, 1999, 10: 2539-2549.
- [3] Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G, Takagi S, Okumura M, Fujinaga T. Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell and Tissue Research*, 2005, 319: 243-253.
- [4] Gojo S, Gojo N, Takeda Y, Mori T, Abe H, Kyo S, Hata J, Umezawa A. *In vivo* cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells. *Experimental Cell Research*, 2003, 288: 51-59.
- [5] Lee J W, Kim Y H, Kim S H, Han S H, Hahn S B. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and its clinical applications. *Yonsei Medical Journal*, 2004, 45: 41-47.
- [6] Petersen B E, Bowen W C, Patrene K D, Mars W M, Sullivan A K, Murase N, Boggs S S, Greenberger J S, Goff J P. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*, 1999, 284: 1168-1170.
- [7] Haynesworth S E. Mesenchymal stem cells in orthopaedics and gene therapy. *Symposium Gene Therapy*, 2000, 2-A(1): 1-4.
- [8] Pittenger M, Mackay A, Beck S, Jaiswal R, Douglas R, Mosca J, Moorman M, Simonetti D, Craig S, Marshak D. Multilineage potential

- of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284: 143-147.
- [9] Martin D R, Cox N R, Hathcock T L, Niemeyer G P, Baker H J. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Experimental Hematology*, 2002, 30: 879-886.
- [10] Kadiyala S, Young R G, Thiede M A, Bruder S P. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential *in vivo* and *in vitro*. *Cell Transplantation*, 1997, 6(2): 125-134.
- [11] Devine S M, Bartholomew A M, Mahmud N, Nelson M, Patil S, Hardy W, Sturgeon C, Hewett T, Chung T, Stock W, Sher D, Weissman S, Ferrer K, Mosca J, Deans R, Moseley A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. *Experimental Hematology*, 2001, 29: 244-255.
- [12] Wakitani S, Goto T, Pineda S J, Young R G, Mansour J M, Caplan A I, Goldberg V M. Mesenchymal cell-based repair of large full-thickness defects of articular cartilage. *The Journal of Bone and Joint Surgery (Am)*, 1994, 76: 579-592.
- [13] Ringe J, Kaps C, Schmitt B, Büscher K, Bartel J, Smolian H, Schultz O, Burmester G R, Häupl T, Sittlinger M. Porcine mesenchymal stem cells: induction of distinct mesenchymal stem lineages. *Cell and Tissue Research*, 2002, 307: 321-327.
- [14] Rhodes N P, Srivastava J K, Smith R F, Longinotti C. Heterogeneity in proliferative potential of ovine mesenchymal stem cell colonies. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2004, 15: 397-402.
- [15] Tropel P, Noel D, Platet N, Legrand P, Benabid A L, Berger F. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Experimental Cell Research*, 2004, 295: 395-406.
- [16] Kang X Q, Zang W J, Song T S, Xu X L, Yu X J, Li D L, Meng K W, Wu S L, Zhao Z Y. Rat bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into hepatocytes *in vitro*. *World Journal of Gastroenterology*, 2005, 11: 3479-3484.
- [17] Berry L, Grant M E, McClure J, Rooney P. Bone-marrow-derived chondrogenesis *in vitro*. *Cell Science*, 1992, 101: 333-342.
- [18] Koch T G, Heerkens T, Thomsen P D, Betts D H. Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. *BMC Biotechnology*. 2007, 7: 26-34.
- [19] Minguell J J, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Experimental Biology Medicine*, 2001, 226: 507-520.
- [20] Prockop D J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 1997, 276: 71-74.
- [21] Friedenstein A J, Gorskaja J F, Kulagina N N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental Hematology*, 1976, 4: 267-274.
- [22] Dressler M R, Butler D L, Boivin G P. Effects of age on the repair ability of mesenchymal stem cells in rabbit tendon. *Journal of Orthopaedic Research*, 2006, 2: 287-293.
- [23] Bruder S P, Jaiswal N, Haynesworth S E. Growth kinetics, self-renewal and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *Cellular Biochemistry*, 1997, 64: 278-294.
- [24] Quarto R, Thomas D, Liang C T. Bone progenitor cell deficits and age-associated decline in bone repair capacity. *Calcified Tissue International*, 1995, 56: 123-129.
- [25] Mueller S M, Glowacki J. Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *Cellular Biochemistry*, 2001, 82: 583-590.

(责任编辑 高雨, 林鉴非)