

• 基础论著 •

人脐带间充质干细胞的体外分化及对犬外周血淋巴细胞增殖的影响

吕鹏飞 刘正 赵栋 薛涛 张光武

【摘要】 目的 通过体外实验检测人脐带间充质干细胞的体外多向分化及对犬 T 淋巴细胞增殖的影响,探讨其作为组织工程种子细胞的可能性。方法 体外培养人脐带间充质干细胞,分别使用含有地塞米松、转化生长因子、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤的培养基诱导其成骨、成软骨、成脂肪三系分化后进行染色鉴定,并将经丝裂霉素处理的人脐带间充质干细胞与植物凝集素刺激下的犬外周血 T 淋巴细胞共培养,5 d 后多功能酶标仪检测吸光度值。结果 人脐带间充质干细胞体外生长良好,呈长梭形,形态均一,使用成骨、成软骨和成脂培养基分别诱导分化后碱性磷酸酶(ALP)染色、骨钙素免疫细胞化学染色、茜素红染色、亚甲基蓝染色和油红 O 染色分别呈阳性,人脐带间充质干细胞与犬外周血 T 淋巴细胞混合组吸光度值较单纯犬外周血 T 淋巴细胞组吸光度值明显降低。结论 人脐带间充质干细胞具有多向分化能力,并能够抑制犬外周血淋巴细胞的增殖,有望成为创伤组织及骨组织修复的种子细胞。

【关键词】 间充质干细胞; 脐带; 淋巴细胞

Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells *in vitro* and their effects on canine peripheral lymphocytes proliferation LV Peng-fei, LIU Zheng, ZHAO Dong, XUE Tao, ZHANG Guang-wu.

Department of Orthopedics, Peking University Shougang Hospital, Beijing 100144, China

Corresponding author: ZHANG Guang-wu, Email: zhgw730@vip.sina.com

【Abstract】 Objective To explore the multiple differentiation and immune regulation on canine peripheral blood T lymphocytes *in vitro* of human umbilical cord mesenchymal stromal cells (UCMSCs), so as to study their feasibility and application value of being as seed cells of tissue engineering. **Methods** UMSCs were cultured *in vitro* and induced to differentiate into osteocytes, chondrocytes and adipocytes by using the media containing dexamethasone, transforming growth factor and 3-isobutyl-1-methylxanthine, T lymphocytes from canine peripheral blood were stimulated by phytohemagglutinin and co-cultured with mitomycin-inhibited UCMSCs and a value were measured following 5 days using multifunctional microplate reader. **Results** UCMSCs proliferated actively and exhibited spindle-shaped morphology *in vitro*, Alkaline phosphatase (ALP) staining, Osteocalcin (OCN) immunocytochemical staining, Alizarin red staining, Alcian blue staining and Oil red O staining were positive, the A value were significantly lower in the co-culture of UCMSCs and T lymphocytes group than T lymphocytes alone group.

Conclusions UCMSCs have multiple differentiation properties, and could inhibit the proliferation of canine peripheral blood T lymphocytes, they are optimal cell source for tissue engineering.

【Key words】 Mesenchymal stem cells; Umbilical cord; Lymphocyte

间充质干细胞(MSCs)由于其易于分离和扩增,具有迁徙能力、多向分化潜能、旁分泌功能和免疫调节能力而在多种疾病的生物治疗中拥有广泛的应用前景。MSCs在多种组织中均有分布,包括骨髓、脂肪组织、胎盘、肝脏,并在心血管、中枢神经、胃肠、肾、骨和造血系统的多种疾病中广泛应用^[1]。其中,骨髓间充质干细胞(BMSCs)的研究最为深入,并被视为肌肉骨骼系统

组织工程细胞种子来源的“金标准”,然而,由于骨髓中BMSC含量较少,收集过程会引起机体损伤和并发症,且细胞的增殖和分化能力会随着年龄的增长显著下降^[2]等缺点,限制了其在临床的进一步应用。人脐带间充质干细胞(UCMSCs)来源充足,收集过程无侵入,不会产生供区的缺损并具有更强自我更新能力^[3],而脐带作为医疗废弃物较少受到伦理道德的限制而得到了广泛的关注。

本实验拟通过检测UCMSCs的体外分化及其对犬淋巴细胞增殖的影响,探讨其作为创伤组织及骨组织修复种子细胞的可能性,为进一步的应用奠定实验

基础。

材料和方法

1. 主要试剂与仪器:UCMSCs 由北京英默生物科技有限公司提供,DMEM 低糖培养基、标准胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶-EDTA、RPMI-1640 基础培养液购于HyClone 公司(Utah, USA),碱性成纤维生长因子(bFGF)购自PeproTech 公司,地塞米松、 β -磷酸甘油钠、L-2-磷酸抗坏血酸、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)、茚甲新、植物血凝素(PHA)购自Sigma 公司(Sigma, USA),转化生长因子(TGF)购自Invitrogen 公司,Cell-Titer 96[®] AQueous 单溶液细胞增殖检测试剂盒购自Promega 公司。

2. 实验方法:(1)UCMSCs 的体外培养:取第4~9代的冻存UCMSCs,复苏后将细胞悬液按 $1.2 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的密度接种于100 mm²培养皿,用脐带间充质干细胞基础培养基(即含有10% FBS、5 ng/ml bFGF、100 U/ml 青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素的DMEM 低糖基础培养基)置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱内培养。

(2)UCMSCs 的体外成骨分化及鉴定:取培养第4~9代处于对数生长期的UCMSC,按 $3 \times 10^3/\text{cm}^2$ 接种在6孔板中,用脐带间充质干细胞基础培养基培养至80%融合,换用成骨细胞诱导培养液(即含有10% FBS、0.216 g/L NaHCO₃、100 U/ml 青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素、100 mmol/L 地塞米松、10 mmol/L β -甘油磷酸钠、0.2 mmol/L L-抗坏血酸盐的低糖DMEM 细胞培养液),每3 d更换一次培养液,诱导14 d后固定,进行碱性磷酸酶(ALP)染色,诱导21 d后固定,进行骨钙素(OCN)免疫细胞化学染色,诱导28 d后固定,进行茜素红染色。

(3)UCMSCs 的体外成软骨分化及鉴定:取培养第4~9代处于对数生长期的UCMSCs,取 2.5×10^5 个细胞放入15 ml离心管离心(150 $\times g$, 5 min),使细胞在离心管底部形成小球,然后用成软骨分化诱导培养基(即含有1% 胰岛素铁硒传递蛋白、FBS 1.25 mg/ml,地塞米松 10^{-7} mol/L,维生素C磷酸酯50 $\mu\text{g}/\text{ml}$,L-脯氨酸40 $\mu\text{g}/\text{ml}$,丙酮酸钠100 $\mu\text{g}/\text{ml}$,转化生长因子10 ng/ml,青霉素100 U/ml,链霉素100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的低糖DMEM 细胞培养液),每3 d更换一次培养液,28 d后将细胞固定,石蜡包埋切片后进行亚甲基蓝染色。

(4)UCMSCs 的体外成脂肪分化及鉴定:取培养第4~9代处于对数生长期的UCMSCs,按 $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 接种在6孔板中,用脐带间充质干细胞基础培养基培养至80%融合,换用成脂分化诱导培养基[即含有10% FBS,L-谷氨酰胺2 mmol/L,青霉素100 U/ml,链霉素

100 $\mu\text{g}/\text{ml}$,茚甲新60 $\mu\text{mol}/\text{L}$,地塞米松1 $\mu\text{mol}/\text{L}$,3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)0.5 mmol/L,胰岛素5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的低糖DMEM 细胞培养液],每3 d更换一次培养液,28 d后进行油红O染色。

(5)混合淋巴细胞反应:普通级成年Beagle 犬常规备皮、消毒、铺巾,抽取静脉血10 ml,取3 ml 静脉血加入等量Hank's 液混匀,制成静脉血稀释液,将3 ml 1.077 g/ml Ficoll 液加入15 ml离心管中,小心加入静脉血稀释液,2000 r/min离心20 min,小心吸取中间白色淋巴细胞层,加入5~8 ml生理盐水离心洗涤2次(1200 r/min,5 min),得到犬外周血单个核细胞(PBMCs)。

犬PBMC 细胞计数后以 5×10^4 /孔接种于96孔板,加入细胞培养液(RPMI-1640 基础培养液,25 mmol/L的HEPES,100 U/ml 青霉素,100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素,2 mmol/L 谷氨酰胺,10% FBS),并加入1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 植物血凝素(PHA),UCMSC 经10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 丝裂霉素-C处理后以 1×10^4 /孔与犬PBMC 混合后共培养5 d,5 d后加入CellTiter 96[®] AQueous 单溶液细胞增殖检测试剂,并使用多功能酶标仪检测吸光度值(A值)。实验分组:(1)对照组:犬PBMC + PHA。(2)实验组:脐带间充质干细胞 + 犬PBMC + PHA。(3)脐带间充质干细胞组。每组取3个复孔。脐带间充质干细胞抑制率(%) = $[1 - (\text{实验组 A 值} - \text{间充质干细胞组 A 值}) / \text{对照组 A 值}] \times 100\%$ 。

3. 统计学分析:采用PASW Statistics 18 统计软件对结果进行t 检验分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. UCMSCs 的体外形态观察:细胞接种后4~6 h 即可贴壁,在倒置相差显微镜下贴壁的脐带间充质干细胞单个细胞呈纺锤状,整体细胞生长呈螺旋状。3~4 d 可达80%融合(图1)。

2. UCMSCs 体外成骨分化鉴定:(1)细胞在成骨细胞诱导培养基中培养14 d后,碱性磷酸酶染色呈阳性,细胞胞浆呈蓝、绿色(图2)。(2)细胞在成骨细胞诱导培养基中培养21 d后,骨钙素呈阳性表达,免疫细胞化学显示棕黄色(图3)。(3)细胞在成骨细胞诱导培养基中培养28 d后,细胞生长密集,显微镜下可见明显钙化结节,茜素红染色呈阳性(图4)。

3. UCMSCs 体外成软骨分化鉴定:细胞小球在成软骨分化诱导培养基中培养28 d后,细胞基质中富含蛋白多糖,并且在胞外基质中分泌较多的I型胶原,亚甲基蓝染色呈阳性(图5)。

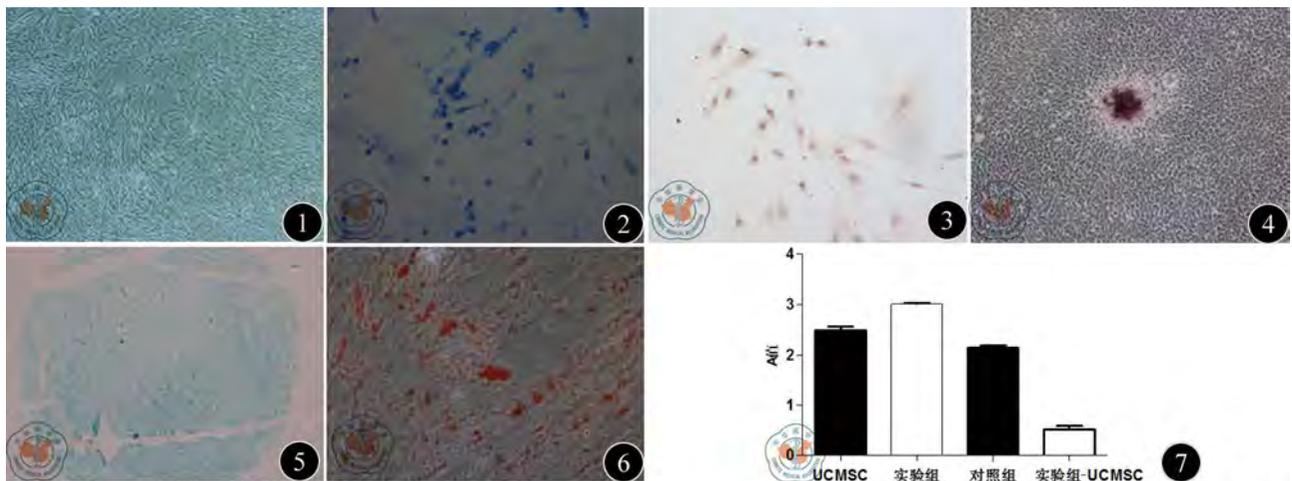


图1 人脐带间充质干细胞体外形态($\times 40$) 图2 成骨分化的ALP染色($\times 200$) 图3 成骨分化的OCN免疫细胞化学染色($\times 200$) 图4 成骨分化钙结节的茜素红染色($\times 100$) 图5 成软骨分化的亚甲基蓝染色($\times 100$) 图6 成脂分化的油红O染色($\times 400$) 图7 混合淋巴细胞反应多功能酶标仪检测各组A值

4. UCSCs 体外成脂肪分化鉴定:细胞在成脂分化诱导培养基培养中 28 d 后,分化的细胞胞质中均能形成中性油滴,油红 O 染色呈阳性(图 6)。

5. 混合淋巴细胞反应:多功能酶标仪检测各组 A 值见图 7,表 1,UCMSC 与犬 PBMC 共培养后,对犬 PBMC 的增殖产生了抑制作用,脐带间充质干细胞抑制率为 75.6%,差异具有显著性意义($P < 0.01$)。

表 1 多功能酶标仪检测各组 A 值

组别	$\bar{x} \pm s$
UCMSC	2.495 ± 0.129
实验组	3.018 ± 0.042
对照组	2.142 ± 0.082
实验组-UCMSC	0.523 ± 0.110

讨 论

脐带间充质干细胞在胚胎发育的第 4 ~ 12 天进入 Wharton's jelly 并存活于整个妊娠期,因此可在新生儿出生后轻易获得。它同时具有胚胎干细胞(ESCs)和脂肪基质干细胞(ASCs)的特征:既有多向性分化潜能,又能在分化后维持分化组织的特性^[4]。UCMSCs 能够表达 CD105、CD73 和 CD90 等 MSC 特征性细胞表面标志,且并不表达 CD45、CD34 和人白细胞抗原(HLA)-DR 等造血干细胞标志^[5],更重要的是,UCMSCs 能够表达 ESCs 表面标志物如 Tra-1-60、Tra-1-81、SSEA-1 (阶段特异性胚胎抗原 1)、SSEA-4、碱性磷酸酶,甚至能够在体外形成胚胎小体^[6]。此外,UCMSCs 还能够表达 Oct-4、Sox-2、Nanog 等多潜能性标志,并在传代培养中至少能够保持九代而不发生改变^[7],而这些标志在包括 BMSCs 在内的成人干细胞(ASCs)中是不能够表

达的^[4]。由于 UCMSCs 在个体发育的早期形成,而 BMSC 在骨髓内含量较少且增殖能力随着年龄的增长而显著下降^[8],因此 UCMSCs 的增殖潜能与 BMSC 相比有着明显的优势^[9]。UCMSCs 能够分化成中胚层和上胚层起源的多种细胞谱系,最近的研究更表明 UCMSCs 可在体内和体外分化成内胚层起源的肝样细胞和胰岛前体细胞^[10],本实验通过体外实验观察到细胞贴壁生长良好,并成功诱导了 UCMSCs 向成骨细胞、成软骨细胞、成脂肪细胞方向进行分化,经染色鉴定成骨细胞中 ALP、OCN 显著表达,基质中有钙盐沉积,成软骨细胞外基质中分泌大量 I 型胶原,成脂肪细胞胞质中形成中性油滴,表明脐带间充质干细胞满足国际细胞治疗协会颁布的间充质干细胞的定义标准^[5]。

与组织工程中其他来源的细胞相比,MSCs 在免疫学方面具有很大的优势。MSCs 表面 MHC I、MHC II 分子低表达,使 MSCs 在同种异体或异种移植中,因其低免疫原性较少发生宿主排斥移植细胞反应和(或)移植物抗宿主病,同时 MSCs 可以通过与多种免疫细胞直接相互作用,释放免疫调节因子如 TGF- β 、干细胞生长因子(HGF)并诱导合成吲哚胺 2,3-二氧化酶(IDO)来发挥免疫抑制作用,在动物实验中,相关研究表明 MSCs 可以治愈鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎,并能够逆转鼠移植物抗宿主病(GVHD)的病情进展^[11]。对于 UCMSC,其免疫学特性也得到了一定的阐述:Selmani 等^[12]表明 UCMSCs 可以合成 HLA-G6——一种 HLA 的免疫抑制亚型,Patel 等^[13]发现 UCMSCs 能够合成免疫调节因子 IL-6。

UCMSCs 在异种移植方面的作用也得到了一定程度的研究,Weiss 等^[14]将 UCMSCs 移植到帕金森症大鼠模型中,发现其并没有受到免疫抑制,并能够明显缓

解帕金森症大鼠的症状, Yang 等^[15]对脊髓横断大鼠进行 UCMSCs 异种移植后, 观察到大鼠症状的明显改善, 而未发生免疫排斥反应。然而, UCMSCs 对异种动物的免疫调节能力机制目前还尚不清楚, 本实验将 UCMSCs 与犬 PBMC 混合培养后, 发现了 UCMSCs 对犬 PBMC 增殖的明显抑制, 证明其可能对犬淋巴细胞具有免疫抑制作用, 然而, 由于免疫调节涉及众多细胞因子, 其免疫机制还有待于进一步探讨。

综上所述, UCMSCs 不仅具有成骨、成软骨、成脂肪的多向分化潜能, MSCs 低免疫原性, 同时可能对犬淋巴细胞具有免疫调节能力, 有望成为理想的修复骨缺损, 促进骨折愈合种子细胞和免疫调节治疗手段, 实验的结果也可为细胞移植治疗相关疾病奠定体外实验基础, 为 MSCs 治疗免疫相关疾病提供理论支持。

参 考 文 献

- [1] Brooke G, Cook M, Blair C, et al. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. *Semin Cell Dev Biol*, 2007, 18:846-858.
- [2] Lee S Y, Miwa M, Sakai Y, et al. In vitro multipotentiality and characterization of human unfractured traumatic hemarthrosis-derived progenitor cells: A potential cell source for tissue repair. *J Cell Physiol*, 2007, 210:561-566.
- [3] Wang L, Tran I, Seshareddy K, et al. A comparison of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part A*, 2009, 15:2259-2266.
- [4] Carlin R, Davis D, Weiss M, et al. Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. *Reprod Biol Endocrinol*, 2006, 4:8.
- [5] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006, 8:315-317.
- [6] Fong CY, Richards M, Manasi N, et al. Comparative growth behaviour and characterization of stem cells from human Wharton's jelly. *Reprod Biomed Online*, 2007, 15:708-718.
- [7] Jo CH, Kim OS, Park EY, et al. Fetal mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord sustain primitive characteristics during extensive expansion. *Cell Tissue Res*, 2008, 334:423-433.
- [8] Mueller SM, Glowacki J. Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *J Cell Biochem*, 2001, 82:583-590.
- [9] Lu LL, Liu YJ, Yang SG, et al. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica*, 2006, 91:1017-1026.
- [10] Wang L, Ott L, Seshareddy K, et al. Musculoskeletal tissue engineering with human umbilical cord mesenchymal stromal cells. *Regen Med*, 2011, 6:95-109.
- [11] Deuse T, Stubbendorff M, Tang-Quan K, et al. Immunogenicity and immunomodulatory properties of umbilical cord lining mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*, 2011, 20:655-667.
- [12] Selmani Z, Naji A, Zidi I, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺ CD25^{high} FOXP3⁺ regulatory T cells. *Stem Cells*, 2008, 26:212-222.
- [13] Patel S A, Sherman L, Munoz J, et al. Immunological properties of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2008, 56:1-8.
- [14] Weiss ML, Medicetty S, Bledsoe AR, et al. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. *Stem Cells*, 2006, 24:781-792.
- [15] Yang CC, Shih YH, Ko MH, et al. Transplantation of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly after complete transection of the rat spinal cord. *PLoS One*, 2008, 3:e3336.

(收稿日期:2012-09-04)

(本文编辑:张岚)

吕鹏飞, 刘正, 赵栋, 等. 人脐带间充质干细胞的体外分化及对犬外周血淋巴细胞增殖的影响[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7(3): 1113-1116.

中 华 临 床 医 生 杂 志