

# 短端粒小鼠与正常小鼠间充质 干细胞的分离培养比较

宋 舸<sup>1</sup>, 张俊伶<sup>2</sup>, 鞠振宇<sup>1</sup>

(1. 中国医学科学院, 北京协和医学院, 医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室, 国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 北京 100021; 2. 中国医学科学院放射医学研究所, 天津市分子核医学重点实验室, 天津 300192)

**【摘要】** 目的 建立从小鼠微粒骨中获取间充质干细胞(MSC)方法,并观察比较野生型小鼠(WT鼠)和端粒酶基因敲除小鼠(*Terc*<sup>-/-</sup>鼠)MSC生物学特性的差异。方法 采用体外细胞培养技术,从小鼠自体微骨片中分离纯化WT鼠和*Terc*<sup>-/-</sup>鼠的间充质干细胞,通过培养和传代,研究其增殖及生长特征。结果 原代培养及传代培养显示,WT鼠自体骨间充质干细胞比*Terc*<sup>-/-</sup>鼠具有活跃的增殖倍增能力。结论 从鼠的微骨片获取MSC的方法重复性好,细胞纯度和细胞数量优于以往从骨髓获取MSC的方法,*Terc*<sup>-/-</sup>鼠MSC生长增殖能力明显弱于WT鼠,其机制的研究有待深入。

**【关键词】** 间充质干细胞;端粒;细胞培养

**【中图分类号】** R331.2; R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)01-0018-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.001.005

## The Isolation, Cultivation of Little Bone Chip Derived Mesenchymal Stem Cells Between *Terc*<sup>-/-</sup> Mice and WT Mice

SONG Ge<sup>1</sup>, ZHANG Jun-ling<sup>2</sup>, JU Zhen-yu<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Medical Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences; Key Laboratory of Human Diseases Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine; Peking Union Medicine College, Beijing 100021, China; 2. Tianjin Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Science, Tianjin 300192, China)

**【Abstract】 Objective** To establish a method for isolation and cultivation of mice little bone chips derived mesenchymal stem cells (MSCs) and to compare their biology characters. **Methods** MSCs were isolated from mice limb bone chips and in vitro culture. The proliferation and growth characteristics of MSC were observed during primary and passage cultures. **Results** Cells culture showed that mice bone chips derived MSCs exhibited the characteristics of mesenchymal cells. MSCs clones assay of WT mice were higher than *Terc*<sup>-/-</sup> mice in primary and passage cultures ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** MSCs derived from mice bone chips can become an easy and reproducible method that does not require depletion of hematopoietic cells by sorting or immunomagnetic techniques. MSCs of short telomere mice (*Terc*<sup>-/-</sup> mice) has a more feeble feasibility in cells proliferative ability than WT mice as the seed cells for tissue engineering reconstruction.

**【Key words】** Mesenchymal stem cells; Telomere; Cell culture

[基金项目] 中国博士后科学基金特别资助(201003075)。

[作者简介] 宋舸(1972-)男,博士后。主要研究方向:间充质干细胞衰老。

[通讯作者] 鞠振宇, E-mail: zhenyuju@hotmail.com

实验小鼠作为研究间充质干细胞(MSC)功能的载体发挥着重要作用,传统获取小鼠 MSC 方法主要来自骨髓,利用 MSC 细胞具有在塑料培养皿上贴壁的特点得到。但是因为小鼠骨髓的 MSC 数量很少,并且有造血细胞的污染,常给研究带来不少不确定因素。此后不断对此方法进行改进,如通过磁珠分选、逆转录病毒转染等,然而仍旧存在不易标准化,并且有或多或少损伤细胞生物学特性的问题。因此,受到有关人体骨片中获得 MSC 的方法的启发<sup>[1]</sup>,我们尝试通过培养小鼠的下肢皮质微粒骨,同时也由于皮质骨中造血细胞污染机会很少,希望建立获得小鼠 MSC 简便稳定的方法。

端粒是真核细胞染色体末端的一种保护性结构,在维持染色体末端稳定性等方面起重要作用。端粒被认为是细胞衰老的生物钟。研究证明端粒的长度随着人体的衰老呈进行性缩短,端粒的长度与许多衰老相关的疾病密切相关。骨质疏松作为一种与衰老相关的疾病,也与染色体末端端粒功能的异常相关<sup>[2]</sup>。研究衰老模型的 *Terc*<sup>-/-</sup> 鼠,经过连续传代到第三代(G3),其端粒长度与人接近,而且它的骨骼畸形、骨质疏松的表型也更加容易观察,因此本实验以 WT 鼠和 *Terc*<sup>-/-</sup> 鼠 G3 为研究对象,通过体外细胞培养建立获取 MSC 的方法,初步比较它们的生物学特征,为今后深入研究其各项功能提供技术支持。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

WT 鼠和 *Terc*<sup>-/-</sup> 鼠的饲养和使用符合中国医学科学院实验动物研究所标准。研究使用的小鼠均为 G3 代,WT 为对照。分别取 2 月龄和 9 月龄鼠各 5 只,所用的动物遗传背景为 C57BL/6。WT 鼠购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心[SCXK(军)2007-004]。

### 1.2 小鼠皮质骨 MSC 的分离

小鼠脱颈处死后,浸泡在 70% 酒精中 2 min,转入 100 mm 无菌平皿,切开下肢皮肤,显微剪刀尽可能分离干净附着在股骨和胫骨上的肌肉、韧带,将骨组织放入无菌纱布上,搓去残留的肌肉和韧带。将骨组织置入 35 mm 无菌平皿中,加入 5 ml 培养液( $\alpha$ -MEM + 1% P/S + 2% FBS),为保持 MSC 细胞活性,操作不易超过 2 h。剪去骨两端的骨髓以便冲洗髓腔内的造血细胞,冲洗至髓腔变白。将骨组

织剪成 1~3 mm<sup>2</sup> 大小颗粒,转至 25 cm<sup>2</sup> 平皿中,加入 3 mL  $\alpha$ -MEM(含 1 mg/mL 胶原酶 II),在 37℃ 振荡 1~2 h。回收消化松散的骨片准备原代培养。

### 1.3 小鼠皮质骨 MSC 的原代培养

将经上述分离所得的骨片种于 25 cm<sup>2</sup> 平皿中,加入 6 mL  $\alpha$ -MEM(含 10% FBS 及 1% P/S),在 37℃,5% CO<sub>2</sub> 条件下连续培养 3 d,此间避免不必要的晃动干扰。3 d 后更换培养液,弃未黏附的细胞,加入 6 mL  $\alpha$ -MEM(含 10% FBS 及 1% P/S)继续培养 2 d。培养 5 d 后,弃培养液,加入 3 mL 0.25% 胰酶 + 0.02% EDTA(室温)消化 3 min,回收细胞。骨片仍用于继续获得 MSC 细胞,方法同前。MSC 细胞按每孔细胞  $1 \times 10^4$  个/cm<sup>2</sup> 的密度接种于 6 孔培养板内,加入  $\alpha$ -MEM(含 10% FBS 及 1% P/S)培养液,于 37℃,5% CO<sub>2</sub> 条件下培养;接种 3 d 后进行第 1 次换液,以后隔日换液。每天随机抽取 3 只实验动物的 MSC 作细胞生长动力学观察,直至贴壁细胞铺满整个培养孔的底部。

### 1.4 小鼠皮质骨 MSC 的传代培养及 MSC 的增殖分析

原代培养一旦铺满整个培养孔的表面,即可用 0.25% 胰酶 + 0.02% EDTA 液消化分离(18~25℃,3 min)贴壁细胞,传代接种培养的比例 1:3,标记为 P1,隔日换液,至贴壁细胞铺满培养孔的底面。再重复以上操作,进行下一代传代接种培养,标记为 P2,余类推。抽取 3 只实验动物 MSC 由 P1 代开始,逐代进行传代培养,直至培养细胞出现衰老征象,停止传代培养。以细胞群体倍增值(population doublings, PDs)<sup>[3]</sup>作为分析动物 MSC 的自我更新能力的指标,PDs = lg(培养后细胞计数/培养前细胞计数)/lg2。各代 PDs 值累加即得最终的累积细胞群体倍增值(cumulative population doublings, CPDs)。

### 1.5 数据统计分析

采用 SPSS16.0 软件,将 2 月龄和 9 月龄 WT 鼠和 *Terc*<sup>-/-</sup> 鼠 MSC 的传代生长克隆数取均数,进行计量资料的 *T* 检验比较。

## 2 结果

### 2.1 MSC 原代培养的生长特征

WT 鼠 MSC 原代培养生长显示,原代接种后的 48 h 开始从骨片迁出并贴壁,其后 24 h 可见大量细胞游出在骨片边缘,贴壁生长细胞外形为纺锤型

或梭形 3 d 为 MSC 生长的潜伏期,此期主要为 MSC 的贴壁生长阶段,培养细胞的有丝分裂活动不甚活跃;第 4~6 天开始,相差显微镜下可以观察到贴壁细胞已形成大小不一的多个细胞克隆,说明此时细胞的有丝分裂活动开始变得活跃起来(图 1);第 7~8 天这些细胞克隆进一步扩大,许多细胞克隆彼此相连,细胞生长曲线显示此阶段细胞数目呈指数级递增,此期为 MSC 原代培养生长的对数增殖期;第 9~11 天,细胞克隆彼此相连并铺满整个培养孔底面的大部分,细胞生长曲线显示 MSC 生长进入一个平台期;随后贴壁生长的 MSC 开始铺满整个培养孔底面,原代培养结束。通过比较 2 月龄和 9 月龄 WT 鼠和 *Terc*<sup>-/-</sup> 鼠 MSC 的原代生长特征,*Terc*<sup>-/-</sup> 鼠的 MSC 生长缓慢,形成克隆数量少,原代细胞形成克隆数为 WT 鼠 > *Terc*<sup>-/-</sup> 鼠。

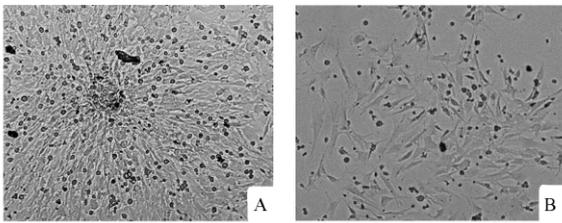


图 1 接种 4 d 后 MSC 形态镜下观察

Fig. 1 Morphology of MHCs observed by microscope

注: A 为 WT 鼠 B 为 *Terc*<sup>-/-</sup> 鼠

Note: A, MHCs from WT mice; B, MHCs from *Terc*<sup>-/-</sup> mice.

### 2.2 MSC 传代培养的生长特征

WT 鼠 MSC 传代培养多数于 P9 代以后开始出现衰老征象。传代细胞的生长较原代要快些,多于接种后 10 d 即可铺满整个培养孔的底面。对 2 月龄和 9 月龄 WT 鼠和 *Terc*<sup>-/-</sup> 鼠传代细胞培养观察比较,以镜下大于 10 个细胞的计为一个集落(图 2,  $P < 0.01$ )。传代培养潜伏期约为 24~36 h;传代培养对数增殖期约为 4~6 d;对数增殖期结束后至接种后第 10 天, MSC 生长逐渐缓慢,进入平台期。

### 2.3 MSC 自我更新能力分析

随着传代培养代数的渐次增加, MSC 的生长速度有逐渐缓慢的趋势。传代接种第 5 天后, *Terc*<sup>-/-</sup> 鼠 P4 以后的 MSC 生长速度减缓明显,至接种后第 10 天计算所得的 MSC 数目 WT 鼠 > *Terc*<sup>-/-</sup> 鼠。三种不同基因型鼠各随机抽取的 3 个样本,传代培养观察发现出现衰老征象的情况分别是: WT 鼠于 P10, *Terc*<sup>-/-</sup> 鼠于 P7,故统计 MSC 的 PDs 及 CPDs 计算至 P7。由图 3 可见,从 P1 至 P8 每代 MSC 的

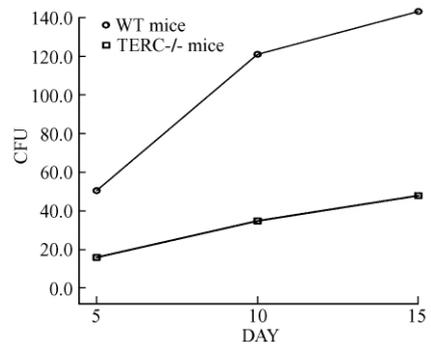


图 2 小鼠 MSC 的 P2 传代细胞培养生长情况

Fig. 2 Culture status on passage 2 cells of MSC from mice

注:横轴为细胞培养时间,纵轴为细胞克隆计数

Note: X-axis (cells culture time), Y-axis (cells clone)

PDs 值在 P3 达到高峰,而 P7 之后则仅为不足 1,说明增殖能力减弱;WT 鼠的 CPDs 值为  $10.4 \pm 1.1$ ,明显高于 *Terc*<sup>-/-</sup> 鼠,在 P1 至 P7 阶段的体外培养分离中, MSC 的有丝分裂活动旺盛,具有活跃的增殖倍增能力。

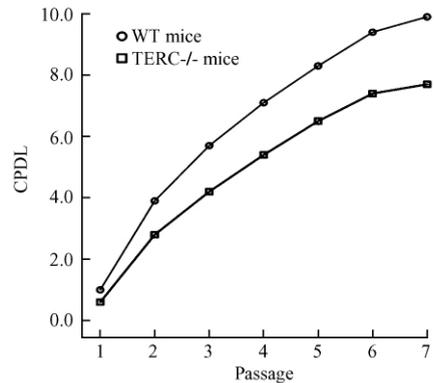


图 3 两种小鼠 MSC 传代培养的 CPDL 变化比较

Fig. 3 Cumulative population doublings difference between two type mice

### 3 讨论

间充质干细胞多来自骨髓,也存在于其它器官和组织<sup>[4]</sup>,一定条件下 MSC 可以分化成多种组织,包括骨、脂肪和软骨。MSC 的功能除了促进造血和组织修复外,更多的应用在疾病治疗方面,如骨骼缺损、糖尿病、急性移植排斥反应和类风湿关节炎等。为实现上述临床应用研究,以小鼠为研究对象进行了大量的实验研究,如何从小鼠提取足够多的 MSC 成为关键。

小鼠 MSC 分离培养方法起初由 Friedenstein 等<sup>[5]</sup>建立,利用 MSC 具有能粘贴在塑料培养瓶的特性分离 MSC,利用该方法从人类和大动物骨髓中分

离获得 MSC 比较成功,但在小鼠骨髓内获得足够多的 MSC 相对困难,因为小鼠的骨髓腔内 MSC 数量低,同时也存在造血细胞的污染。为了改进这一方法,有研究尝试使用磁珠分选、逆转录转染和建立独特培养体系等方法<sup>[6,7]</sup>,但是这些方法标准化困难,并且或多或少损伤细胞生物活性。

细胞生物学原理显示细胞的数量及密度对其增生和分化会产生很大的影响,由于小鼠 MSC 在骨髓中所占的细胞比例少,因此设法改进在体外条件下提取纯化更多 MSC 成为实验的重点。本实验以小鼠皮质骨微小骨片获得鼠 MSC 的培养方法,获得了大量的 MSC,方法简单且重复性好。相同的获取 MSC 的方法见于人体松质骨骨片<sup>[8]</sup>。与从小鼠股骨骨髓腔获得 MSC 不同,本方法通过多次冲洗髓腔,力求彻底减少造血等细胞的污染,将皮质骨切成微小骨块酶消化后置于培养液内,开始 3 d 内不需要换培养液,48 h 可见骨片周围有成纤维样细胞,72 h 可以观察到克隆形成,优于骨髓腔来源的 MSC 培养观察。这种方法可以在较短时间内获得大量(数量  $> 10^7$ ) MSC 细胞,并且培养过程中不需要额外添加细胞生长因子,渴望为今后实验研究小鼠 MSC 提供比较好的技术支撑。

端粒是位于真核细胞染色体末端的帽状结构,主要功能是稳定染色体,保护 DNA。正常细胞每分裂一次,端粒都会缩短。端粒缩短限制了细胞的寿命,在衰老和慢性病过程中细胞的增殖能力下降,当端粒缩短到一定程度,染色体末端脱帽导致细胞衰老或凋亡。因为 WT 鼠的端粒长度是人类的五倍,所以建立 3~6 代以后的鼠,这时的端粒才会足够短,表型也容易观察<sup>[9]</sup>。通过建立观察端粒酶基因敲除鼠 G3 (*Terc*<sup>-/-</sup> 鼠第三代) 的表型,发现 *Terc*<sup>-/-</sup> 鼠存在造血功能、成骨能力以及消化系统的明显衰老,骨骼器官的衰老主要原因可能来自 MSC 的功能异常,经过原代和传代培养观察,*Terc*<sup>-/-</sup> 鼠 MSC 的增殖能力明显低于 WT 鼠。通过对 MSC 连续传代培养,结果显示,*Terc*<sup>-/-</sup> 鼠 MSC 在经历了 7 代的传代培养以后 MSC 出现衰老征象,即细胞增生速度缓慢,多数细胞出现核固缩、核碎裂及由培养孔底面脱落等,这与许多其他种类细胞的体外传代培养的结局相似。因此有关这种衰老现象出现的机理有待于通过进一步实验阐明。此外,与原代培养生长曲线相比,传代细胞的生长潜伏期较短,每代铺满培养孔底面需要时间短于原代细胞,这种共

性见于 WT 鼠和 *Terc*<sup>-/-</sup> 鼠。

组织发生生物学认为, MSC 可以向所有的中胚层起源的组织细胞方向进行分化,这是涉及诸多机制和阶段的复杂过程<sup>[10]</sup>。已有报道通过 MSC 来修复骨组织、关节软组织的缺损大都建立在大动物基础上,如兔、羊、犬等,这些大动物骨髓内的 MSC 数量虽然较多,能满足研究需要,但是面对日益复杂的疾病模型研究,大动物无法提供灵活而丰富的基因型,小鼠则具有这一优势,这无疑为 MSC 研究提供更佳选择。现在,我们成功建立小鼠的 MSC 体外分离培养方法,初步观察对比 G3WT 鼠和 G3*Terc*<sup>-/-</sup> 鼠的 MSC 生长和增殖特征,以此为基础,为我们今后深入研究 MSC 的各项功能提供启发和指导。

#### 参考文献:

- [1] Sottile V, Halleux C, Bassilana F, et al. Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells[J]. *Bone*. 2002, 30: 699 - 704.
- [2] Pignolo RJ, Suda RK, McMillan EA, et al. Defects in telomere maintenance molecules impair osteoblast differentiation and promote osteoporosis[J]. *Aging Cell*. 2008, 7: 23 - 31.
- [3] Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, et al. Characterization of cells with osteogenic potential of human marrow [J]. *Bone*. 1992, 13: 81 - 88.
- [4] Da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all postnatal organs and tissues[J]. *Cell Sci*. 2006, 119: 2204 - 2213.
- [5] Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs [J]. *Exp Hematol*. 1976, 4: 267 - 274.
- [6] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. *Nature*. 2002, 418: 41 - 49.
- [7] Kitano Y, Radu A, Shaaban A, et al. Selection, enrichment, and culture expansion of murine mesenchymal progenitor cells by retroviral transduction of cycling adherent bone marrow cells[J]. *Exp Hematol*. 2000, 28: 1460 - 1469.
- [8] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*. 1999, 284: 143 - 147.
- [9] Rudolph KL, Chang S, Lee HW, et al. Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice [J]. *Cell*. 1999, 96: 701 - 712.
- [10] 赵春华 主编. 干细胞原理、技术与临床. 北京: 化学工业出版社, 2006. 63 - 68.

(修回日期)2011-07-05