

## 骨髓间充质干细胞无血清培养

吴伟, 周燕, 谭文松

华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

**摘要:** 为建立一种化学成分明确的、能用于体外扩增骨髓间充质干细胞的无血清培养基, 且骨髓间充质干细胞经无血清培养扩增后仍能保持其多向分化的潜能。采用密度梯度离心结合贴壁法从 1 月龄新西兰大白兔股骨中分离骨髓间充质干细胞, 比较在含 10%胎牛血清的培养基(SCM)和自制的化学成分明确的无血清培养基(CDSFM)中骨髓间充质干细胞的形态、增殖能力, 以及扩增后的骨髓间充质干细胞的细胞周期、集落形成能力和成骨、成脂肪分化能力。经过 10 d 的培养, 骨髓间充质干细胞在自制的无血清培养基中扩增了 50 倍, 在含 10%胎牛血清的培养基中扩增了 40 倍。在无血清和有血清培养基中扩增后的细胞中 G0/G1 期比例分别为(80.31%±0.58%)和(75.24%±4.05%), 两者无显著差异( $P>0.05$ )。无血清培养扩增后的骨髓间充质干细胞集落形成率(12.7%±4.0%)低于有血清培养组(28.7%±4.2%), 两者比较差异显著( $P<0.01$ )。经过无血清培养扩增的骨髓间充质干细胞在成骨、成脂肪诱导分化培养基中能够分化成成骨和脂肪细胞。自制的化学成分明确的无血清培养基能够在体外培养扩增骨髓间充质干细胞, 并且维持其干细胞特性, 可以用于细胞治疗以及生物医学研究。

**关键词:** 骨髓间充质干细胞, 无血清培养基, 增殖, 多向分化, 组织工程

## *In vitro* culture of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a chemically-defined serum-free medium

Wei Wu, Yan Zhou, and Wensong Tan

State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

**Abstract:** This study is aimed to design a chemically-defined serum free medium (CDSFM) to support *in vitro* culture of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs). BM-MSCs were isolated from the femoral bones of one month old New Zealand Rabbits with density gradient centrifugation. We compared the proliferation capability, cell cycle, colony-forming efficiency, osteogenic and adipogenic differentiation capabilities of BM-MSCs cultured in CDSFM with those cultured in serum-containing medium (SCM). After 10 days culture, BM-MSCs were expanded by 50 folds in CDSFM, while only 40 folds in SCM. EGF, bFGF and hy-drocortisone were the most important additives and significantly stimulated BM-MSCs proliferation. The percentage of cells at G0-G1 cell cycle was 80.31% ± 0.58% after CDSFM culture, with no significant difference ( $P>0.05$ ) compared to 75.24% ± 4.05% for SCM culture. However, the cloning efficiency of BM-MSCs cultured in CDSFM was significantly lower than that in SCM ( $P<0.01$ ). The expanded BM-MSCs in CDSFM preserved differentiation potentials into mesenchymal lineages *in vitro*, including adipocytes and osteoblasts. We have designed a chemically-defined serum free medium that could support *in vitro* proliferation and maintain the properties of BM-MSCs as stem cells, which could be applied to cell-based therapy and biomedical research.

**Received:** July 11, 2008; **Accepted:** November 19, 2008

**Supported by:** the National Natural Science Foundation of China (Nos. 20576036, 20776044).

**Corresponding author:** Wensong Tan. Tel: +86-21-64250948; Fax: +86-21-64252250; E-mail: wstan@ecust.edu.cn

国家自然科学基金项目(Nos. 20576036, 20776044)资助。

**Keywords:** bone marrow-derived mesenchymal stem cells, serum free medium, proliferation, multilineage differentiation, tissue engineering

骨髓间充质干细胞(Bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BM-MSCs)是存在于骨髓基质系统中非造血性的成体干细胞,能在体内和体外诱导分化成骨、软骨、脂肪、肌肉<sup>[1]</sup>等组织,且具有免疫调节功能<sup>[2]</sup>,因而可以作为组织工程理想的种子细胞来源。但骨髓中间充质干细胞含量极少,必须在体外进行扩增以获得足够的细胞数量来满足应用需求。

添加了胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)的培养基被认为是体外扩增骨髓间充质干细胞最有效的培养基<sup>[3]</sup>。然而,血清成分不明确,其中可能含有动物携带的已知的或未知的病原体,在临床应用中具有潜在的危险,因而研究人员致力于开发适合骨髓间充质干细胞的无血清培养基。早期开发的无血清培养基通常缺乏贴壁因子<sup>[4]</sup>,细胞需要在含血清的培养基中贴壁完全后,再更换无血清培养基进行培养,因此不是严格意义上的无血清培养。如今,人们通常在间充质干细胞的无血清培养基中添加血清替代物以促进细胞贴壁和增殖<sup>[5]</sup>,但这些血清替代物的成分并不明确,不利于进一步的分析研究,且含有未知的动物来源的蛋白,仍具有潜在的危险性。

近年来,有报道使用浓缩的血小板裂解物(Platelet Lysates, PL)作为安全的血清替代物在体外扩增骨髓间充质干细胞<sup>[6]</sup>,但其化学成分仍不明确,且应用过程中需要大量的外周血,无法满足大规模扩增骨髓间充质干细胞的需求。因此迫切需要开发能够大量扩增骨髓间充质干细胞的化学成分明确的无血清培养基。本研究旨在建立一种化学成分明确的无血清培养基,在实现骨髓间充质干细胞体外扩增的同时,能够维持其自我更新和多向分化潜能。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

兔骨髓间充质干细胞取自于1月龄新西兰大白兔股骨和胫骨, $\alpha$ -MEM培养基、DMEM培养基和胰蛋白酶均购自Gibco公司,胎牛血清购自Biochrom AG公司,氨基酸浓缩液(由本实验室自行配制,含20种氨基酸,均购自Sigma),胰蛋白酶抑制剂、碱性成纤维生长因子(bFGF)、表皮生长因子(EGF)、牛

血清白蛋白(BSA)、还原型谷胱甘肽、 $\beta$ -巯基乙醇、地塞米松、氢化可的松、SITE(亚硒酸钠、胰岛素、转铁蛋白、乙醇胺)、I型鼠尾胶原、抗坏血酸、地塞米松、 $\beta$ -甘油磷酸钠、IBMX、消炎痛、茜素红、油红-O、EDTA、二甲基亚砜(DMSO)均购自Sigma。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 BM-MSCs 的分离、培养和扩增

空气栓塞法处死1月龄新西兰大白兔,无菌分离股骨和胫骨,并在75%乙醇中浸泡5 min。PBS冲洗3~5遍,用碎骨钳去除骨两端骨髓,用注射器反复冲洗骨髓腔,获得骨髓细胞悬液,将得到的骨髓细胞悬液离心后重悬,缓慢铺到离心管中预先加好的等体积的Ficoll淋巴细胞分离液(密度1.077 g/mL)液面上,3000 r/min离心30 min,以尖头吸管小心吸取中间云雾状细胞层,加入PBS冲洗并离心除去残留Ficoll,即得单个核细胞。台盼蓝染色进行活细胞计数后用含10%胎牛血清的 $\alpha$ -MEM培养基调整单个核细胞密度至 $1 \times 10^6$  cells/mL,接种到100 mm培养皿(Nunc)中,每皿10 mL,置于37°C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱(REVCO)中培养。24~48 h后倒置相差显微镜(Nikon)下观察细胞贴壁,换液除去悬浮细胞。之后每3 d换液,待培养皿中的原代BM-MSCs生长至80%汇合后,用含0.02% EDTA的0.25%胰酶溶液消化,加入含FBS的培养液终止胰酶作用,以1:(3~4)进行传代培养。

#### 1.2.2 细胞增殖能力检测和传代培养

原代BM-MSCs生长至80%汇合后,用含0.02% EDTA的0.25%胰酶溶液消化,10 mg/mL胰酶抑制剂中和胰酶活性,PBS洗涤后制备BM-MSCs单细胞悬液,调整细胞密度为 $0.5 \times 10^4$  cells/mL,接种于预铺了I型鼠尾胶原的24孔板(Nunc)中,每3 d换液,每天取样,血球计数板计细胞数,绘制细胞生长曲线。每组实验设3个平行样本,共进行2批实验,进行统计分析。有血清培养体系(SCM)为 $\alpha$ -MEM培养基添加10%胎牛血清,无血清培养体系(CDSFM)为 $\alpha$ -MEM培养基添加10 mg/L bFGF、10 mg/L EGF、5 g/L BSA、1.5 mg/L 还原型谷胱甘肽、0.1 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇、1% (V/V) SITE、10 mg/L 氢化可的松、10 nmol/L 地塞米松和氨基酸浓缩液。按下列公式计

算各生长参数:

扩增倍数: 扩增倍数(Dn)=n 代收获的细胞数/n 代接种的细胞数

平均倍增时间: 平均倍增时间(ADT)=( $t_2-t_1$ )/ $\log_2(N_2/N_1)$

为了检测 BM-MSCs 在无血清的连续传代能力, 同上制备 BM-MSCs 的单细胞悬液, 以  $1 \times 10^5$  cells/well 的接种密度, 接种于预铺了 I 型鼠尾胶原的 6 孔板中, 每组实验设 3 个平行样本, 每 3 d 进行传代培养, 计细胞数, 并计算累积扩增的细胞总数。

### 1.2.3 有效因子分析

BM-MSCs 在无血清培养 1 代后, 取细胞密度为  $1 \times 10^4$  cells/mL 的单细胞悬液, 每孔 1 mL 接种于预铺了 I 型鼠尾胶原的 24 孔板中。将 bFGF、EGF、地塞米松、氢化可的松两两添加至不含这 4 种组分的 CDSFM 中, 对照组为无血清的  $\alpha$ -MEM 培养基和 CDSFM, 每组实验设 3 个平行样本。培养 3 d 后计细胞数。

### 1.2.4 细胞周期检测

BM-MSCs 在无血清和有血清培养 1 代后, 以  $0.5 \times 10^4$  cells/mL 的密度接种于 100 mm 培养皿中, 分别经过无血清和有血清培养 6 d 后收获细胞, 以  $-20^\circ\text{C}$  预冷的 70%乙醇固定, 50  $\mu\text{g/mL}$  碘化丙锭(PI)染色, 流式细胞仪(BD 公司)检测 DNA 含量。每组实验均取 3 个样本, 进行显著性差异分析。

### 1.2.5 集落形成检测

BM-MSCs 在无血清和有血清中分别培养 1 代、2 代、3 代后, 以 200 cells/well 的密度接种于预铺了 I 型鼠尾胶原的 6 孔板(Nunc)中, 每 3 d 换液, 7 d 后结晶紫染色集落, 相差显微镜下计集落数, 超过 50 个细胞计为一个集落。每组实验设 3 个平行样本。按下面公式计算集落形成率:

集落形成率(Colony-forming efficiency, CFE) (%) = (集落数/接种细胞数)  $\times$  100%

### 1.2.6 诱导 BM-MSCs 成骨分化

BM-MSCs 在无血清和有血清培养 1 代后, 以  $1 \times 10^5$  cells/well 接种于预铺了 I 型鼠尾胶原的 6 孔板中, 待细胞达到 50%汇合时更换培养基为成骨诱导培养基。成骨诱导培养基为 DMEM 培养基添加 10% 胎牛血清、1  $\mu\text{mol/L}$  地塞米松、50  $\mu\text{g/mL}$  抗坏血酸、0.01 mol/L  $\beta$ -甘油磷酸钠。对照组为添加 10%胎牛血清的 DMEM 培养基。每 3 d 换液, 诱导 14 d 后, 95%

乙醇固定, 茜素红染色, 显微镜下观察胞外钙基质沉积。钙测定试剂盒(南京建成)测定胞外钙基质沉积。每组实验设 3 个平行样本。

### 1.2.7 诱导 BM-MSCs 成脂肪分化

BM-MSCs 在无血清和有血清培养 1 代后, 以  $1 \times 10^5$  cells/well 接种于预铺了 I 型鼠尾胶原的 6 孔板中, 待细胞达到 80%汇合时更换培养基为脂肪诱导培养基。脂肪诱导培养基为 DMEM 添加 10%胎牛血清、10  $\mu\text{g/mL}$  胰岛素、1  $\mu\text{mol/L}$  地塞米松、0.5 mmol/L IBMX、0.1 mmol/L 消炎痛。对照组为添加 10%胎牛血清的 DMEM 培养基。每 3 d 换液, 诱导 14 d 后, 10%多聚甲醛固定, 饱和油红-O 染液染色, 显微镜下观察胞内着色脂滴。异丙醇萃取脂滴内的油红-O, 在 510 nm 下测定光吸收值, 进行脂滴定量分析。每组实验设 3 个平行样本。

### 1.2.8 统计学处理

数据结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 组间差别采用双尾  $t$  检验和方差分析(结果以  $P < 0.05$  为有较显著性差异,  $P < 0.01$  为显著性差异)。

## 2 结果

### 2.1 形态学观察结果

接种 24 h 后(图 1 a, b), 无血清和有血清培养的 BM-MSCs 均呈典型的短小梭形, 形态均一, 轮廓清晰, 两者无明显差异, 无血清组较有血清组漂浮的细胞少, 贴壁效果理想。培养至汇合时(图 1c, d), 无血清培养的细胞密度较高, 细胞较短小, 而有血清培养的细胞则较细长。

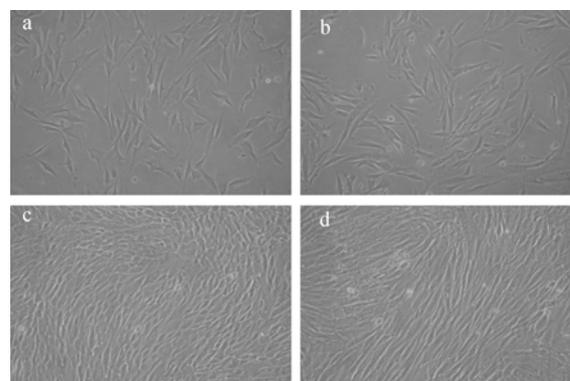


图 1 骨髓间充质干细胞的形态 ( $\times 100$ )  
Fig. 1 Morphology of BM-MSCs in CDSFM and SCM ( $\times 100$ ). Cultured for (a) 1 day in CDSFM; (b) 1 day in SCM; (c) 4 day in CDSFM; (d) 4 day in SCM.

## 2.2 增殖能力比较

如图 2 所示, 无血清培养前期细胞生长较缓慢, 延滞期较长, 第 4 天进入对数生长期, 培养至第 10 天, 细胞数量达  $(24.7 \pm 1.1) \times 10^4$ , 较接种时扩增了约 50 倍, 平均倍增时间 42.6 h。有血清培养时细胞生长延滞期短, 培养至第 8 天, 细胞数量达  $(20.6 \pm 0.1) \times 10^4$ , 较接种时扩增了约 40 倍, 平均倍增时间 35.8 h。

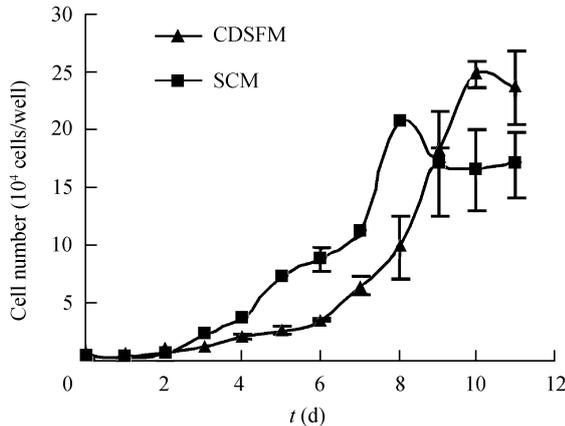


图 2 BM-MSCs 在 CDSFM 和 SCM 中的生长曲线  
Fig. 2 Growth curve of BM-MSCs cultured in CDSFM and SCM.  $n=2$ , Error bars represent standard deviations.

如图 3 所示, BM-MSCs 在前 3 代的培养中, 经无血清培养获得的累积细胞总量均高于有血清培养。培养至第 4 代, 二者累积的细胞总量持平。经过 5 代的连续培养, BM-MSCs 在无血清培养中扩增了约 1000 倍, 10%胎牛血清培养扩增了约 2000 倍。

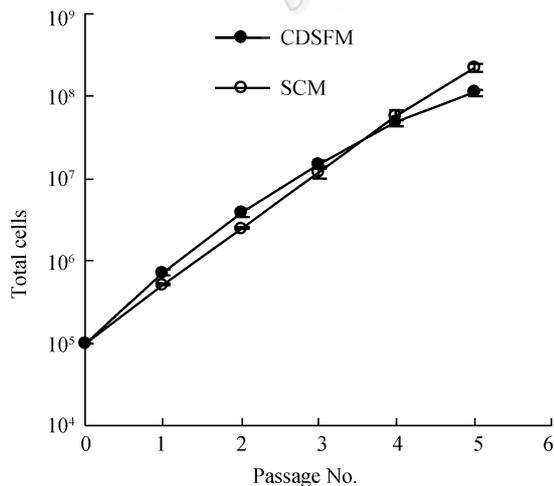


图 3 BM-MSCs 在 CDSFM 和 SCM 中的传代培养的生长曲线  
Fig. 3 Growth curve of cumulative BM-MSCs proliferation in CDSFM and SCM through a series of passages.  $n=3$ , Error bars represent standard deviations.

## 2.3 有效因子分析

在前期的研究中, 考察了无血清培养基中各添加组分分别对 BM-MSCs 增殖的促进作用, 其中 bFGF、EGF、地塞米松(Dex)和氢化可的松(Hyd)4 种组分促增殖作用较为明显, 且这 4 种组分促增殖作用相当(数据未显示)。为了进一步分析无血清培养基中对促进细胞增殖贡献最大的因子, 且考虑到各因子间可能会相互作用, 本研究设计 4 因子 2 水平的因子分析实验, 实验组合如表 1 所示。

表 1 有效因子分析

Table 1 Factorial design and experimental results

bFGF	EGF	Dex	Hyd	Total cells ( $\times 10^4$ )
+	+	-	-	2.74 $\pm$ 0.27
+	-	+	-	4.13 $\pm$ 0.20
+	-	-	+	5.03 $\pm$ 0.34
-	+	+	-	3.92 $\pm$ 0.56
-	+	-	+	4.97 $\pm$ 0.97
-	-	+	+	2.62 $\pm$ 0.10
-	-	-	-	1.17 $\pm$ 0.13
+	+	+	+	5.13 $\pm$ 0.97
10% FBS				5.15 $\pm$ 0.16

+: addition; -: no addition;  $n=3$ , results are expressed as mean value  $\pm$  standard deviation.

结果表明, bFGF 或 EGF 联合氢化可的松对于促细胞增殖的作用最明显, 获得细胞数分别为  $(5.03 \pm 0.34) \times 10^4$  和  $(4.97 \pm 0.97) \times 10^4$ , 接近于 CDSFM 和 SCM 组。

## 2.4 细胞周期比较

流式细胞仪检测细胞周期(图 4), 无血清培养的细胞  $G_0/G_1$  期、 $G_2/M$  期和 S 期所占百分比( $80.31\% \pm 0.58\%$ 、 $10.00\% \pm 0.56\%$ 、 $9.68\% \pm 1.08\%$ )与有血清培养的细胞( $75.24\% \pm 4.05\%$ 、 $9.74\% \pm 0.99\%$ 、 $15.03\% \pm 4.35\%$ )比较, 组间均无明显差异( $n=3$ ,  $P>0.05$ )。

## 2.5 集落形成比较

如图 5a 所示, 无血清扩增后的 BM-MSCs 的集落形成率为  $(12.67\% \pm 4.04\%)$ , 低于有血清组 ( $28.00\% \pm 2.00\%$ ), 二者比较差异显著( $n=3$ ,  $P<0.01$ )。随着无血清培养代次的增加, 细胞的集落形成能力略有下降, 培养了 2 代、3 代后细胞的集落形成率分别为  $(11.00\% \pm 2.64\%)$ 、 $(7.50\% \pm 1.73\%)$ , 而有血清组则维持在 28% 左右。等渗结晶紫染色细胞集落, 可见有血清组细胞的集落尺寸较无血清培养组大(图 5b)。

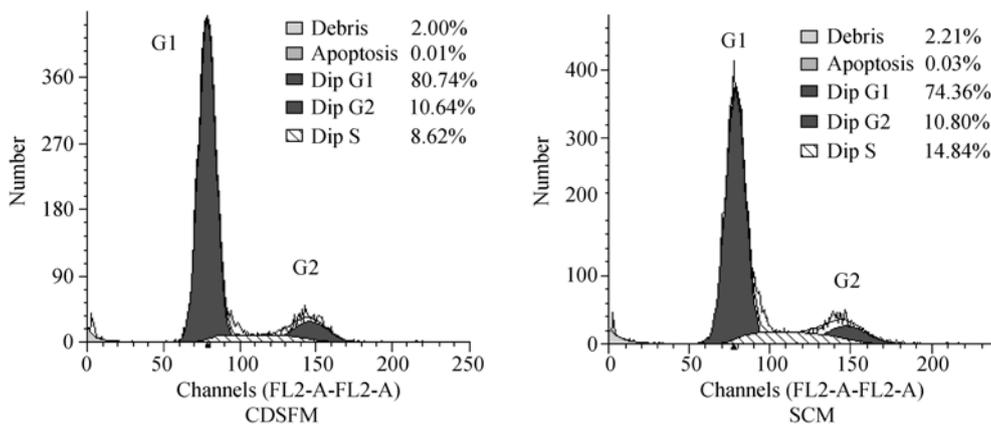


图 4 BM-MSCs 在 CDSFM 和 SCM 中的细胞周期比较

Fig. 4 Comparison of cell cycle of BM-MSCs expanded in CDSFM and SCM.

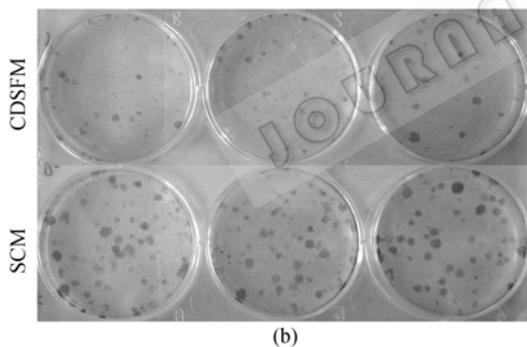
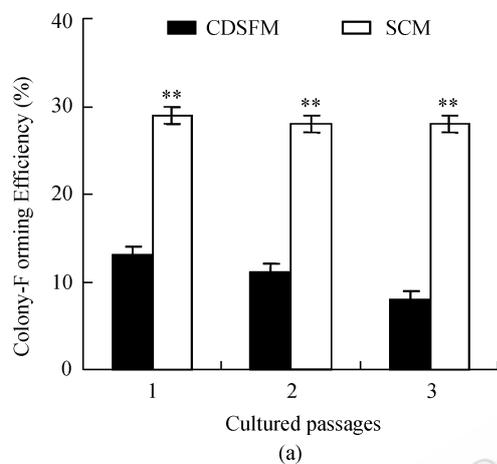


图 5 BM-MSCs 经 CDSFM 和 SCM 扩增后的集落形成比较

Fig. 5 Colony-forming of BM-MSCs cultured in CDSFM and SCM. a: colony-forming efficiency for 3 passages; b: representative crystal violet staining of BM-MSCs colonies;  $n=3$ ,  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ . Error bars represent standard deviations.

### 2.6 成骨分化比较

经过无血清或有血清培养扩增后的骨髓间充质干细胞在成骨诱导培养基中诱导 3 d 后均可见钙结节形成, 14 d 后茜素红染色呈阳性(图 6), 箭头所示为阳性区域。

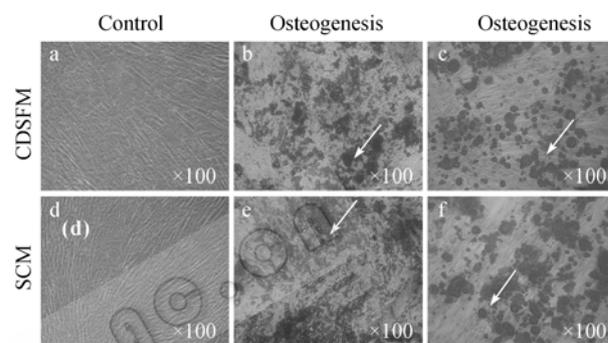


图 6 BM-MSCs 经 CDSFM 和 SCM 扩增后的成骨分化比较

Fig. 6 Osteogenesis of BM-MSCs after expanded in CDSFM and SCM at day 14 ( $\times 100$ ). The phase contrast images of BM-MSCs grown in (a) CDSFM and in (d) SCM. Calcium nodules formation in osteogenesis of BM-MSCs expanded in (b) CDSFM and (e) SCM. Alizarin red staining of calcium nodules in osteogenesis of BM-MSCs expanded in (c) CDSFM and (f) SCM.

钙试剂盒检测细胞外钙沉积的结果见图 7, 无血清组钙含量( $2.08\pm 0.03$ )  $\mu\text{mol}/10^6$  cells 较有血清组 ( $2.29\pm 0.02$ )  $\mu\text{mol}/10^6$  cells 略低, 二者相比差异较显著 ( $n=3$ ,  $P<0.05$ )。

### 2.7 脂肪分化比较

如图 8 所示, 骨髓间充质干细胞在成脂肪诱导过程中, 随着诱导时间的延长, 细胞形态逐渐变得宽大扁平, 扩增速度变慢, 胞内开始逐渐积聚大量镜下可见的脂滴。诱导 14 d 后, 油红-O 染色呈阳性, 箭头所示为阳性区域。

胞内的油红经异丙醇萃取后, 在 510 nm 下测定吸光度, 对脂滴进行定量分析(图 9)。无血清组的油红含量略高于有血清组, 二者差异较显著 ( $P<0.05$ )。

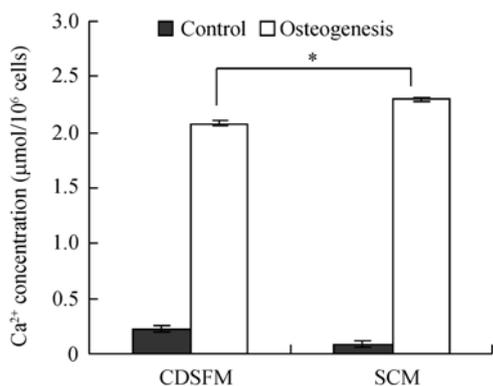


图7 BM-MSCs 经 CDSFM 和 SCM 扩增后的成骨诱导 14 d 后钙含量定量分析

Fig. 7 Calcium content of BM-MSCs constructs in osteo-induced (osteogenesis) and complete media (control) at day 14. *n*=3, \**P*<0.05. Error bars represent standard deviations.

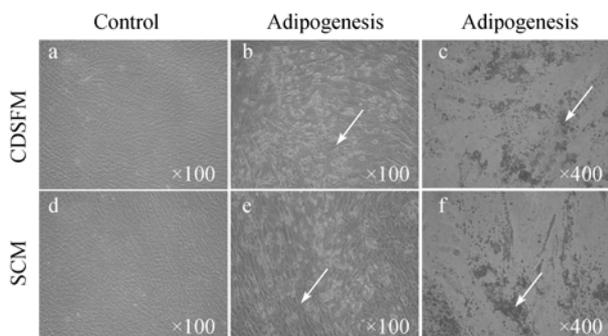


图8 BM-MSCs 经 CDSFM 和 SCM 扩增后的成脂肪分化比较

Fig. 8 Adipogenesis of BM-MSCs after expanded in CDSFM and SCM at day 14 (×100). The phase contrast images of BM-MSCs grown in (a) CDSFM and (d) SCM. Adipocyte lipid-vacuole formation in adipogenesis of BM-MSCs expanded in (b) CDSFM and (e) SCM. Oil red-O staining of lipid-vacuole in adipogenesis of BM-MSCs expanded in (c) CDSFM and (f) SCM.

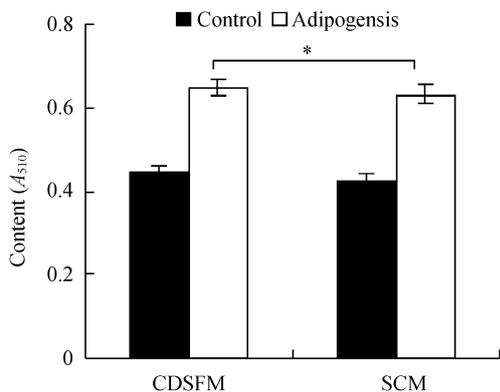


图9 BM-MSCs 经 CDSFM 和 SCM 扩增后的成脂肪诱导 14 d 油红-O 染色定量分析

Fig. 9 Adipocyte lipid-vacuole quantitative analysis of BM-MSCs after expanded in CDSFM and SCM at day 14. *n*=3, \**P*<0.05. Error bars represent standard deviations.

### 3 讨论

骨髓间充质干细胞因其具有多向分化潜能和免疫调节功能,成为组织工程良好的种子细胞。目前,体外扩增 BM-MSCs,不论是实验研究还是临床应用,通常在基础培养基中添加胎牛血清,这被认为是培养 BM-MSCs 的最佳条件<sup>[3]</sup>。但是使用动物血清具有两面性,一方面血清含大量的蛋白、丰富的营养成分、细胞因子、微量元素以及贴壁因子等,能很好地支持细胞的生长;另一方面,血清的生物安全性受到人们普遍质疑,其可能含有动物来源的病原体,在生产临床级别的人用细胞产品时,理论上会导致这些病原体的传播。此外,细胞的吞噬作用使牛血清中的蛋白分子细胞内化,当进行细胞移植时将导致宿主产生免疫反应<sup>[7]</sup>,因而本研究旨在构建一种化学成分明确的、适合骨髓间充质干细胞生长的无血清培养体系,以避免这些潜在的威胁。

骨髓间充质干细胞无血清体外扩增,要解决 2 个关键问题:促进细胞贴壁和增殖。在早期关于骨髓间充质干细胞无血清培养的研究中,往往通过有血清培养贴壁完全后,更换为无血清培养基进行培养<sup>[4]</sup>,这样会残留血清成分,具有潜在的危险。在本研究中,通过在培养基中添加或者在培养介质表面预铺一层胶原,可以有效地促进细胞贴壁。在无血清培养中,由于培养基表面铺有一层胶原,有利于细胞贴壁铺展,因而无血清培养中飘浮的细胞少于有血清培养。由图 2 生长曲线可见无血清培养的延滞期较长,说明细胞需要较长的时间适应无血清环境,而在有血清培养中,部分贴壁较早的细胞可能开始增殖,计算接种 24 h 后细胞的贴壁率,无血清组(50.50% ± 6.36%)低于有血清组(57.50% ± 5.30%),因而需要进一步考察 BM-MSCs 在无血清环境中 24 h 内的贴壁动力学。对于促进细胞增殖,主要通过生长维持、损伤保护和刺激增殖来实现。生长维持主要通过补充氨基酸和 SITE 来实现, SITE 是各种动物细胞的无血清培养基中必需组分,对细胞在无血清条件下生长的维持至关重要<sup>[8]</sup>。血清白蛋白、还原型谷胱甘肽、β-巯基乙醇等可以保护细胞在无血清环境中免受各种毒素和氧化损伤。

为了促进骨髓间充质干细胞增殖,本研究所采用的无血清培养基在基础培养基添加蛋白、微量元素和抗氧化剂的基础上,进一步添加了在有血清培

养中能刺激骨髓间充质干细胞增殖并维持其干细胞特性的物质。在有血清培养中, bFGF 和地塞米松能够促进骨髓间充质干细胞集落形成和增殖, 维持成骨分化潜能<sup>[9]</sup>。此外, EGF 也被认为是骨髓间充质干细胞集落形成所必需的<sup>[10]</sup>。关于氢化可的松影响细胞增殖的报道较少, Paulsen 等<sup>[11]</sup>在化学成分明确的培养基中添加氢化可的松, 用来维持鸡和鼠的间充质细胞高密度培养。Ye 等<sup>[12]</sup>在有血清培养造血祖细胞的培养中也添加了氢化可的松。考虑到无血清培养基的成本, 本研究仅选取 bFGF 和 EGF 这两种文献报道较多的生长因子, 以及氢化可的松和地塞米松这 4 种添加剂, 考察它们对骨髓间充质干细胞的促增殖作用。实验结果表明这 4 种添加剂均能在无血清培养环境中促进骨髓间充质干细胞增殖(数据未显示)。

为了进一步研究这 4 种添加剂对骨髓间充质干细胞增殖的促进作用, 并假设各添加剂不独立发生作用, 而是受到其他添加剂的影响, 对 bFGF、EGF、氢化可的松和地塞米松进行因子分析。结果表明, bFGF 或 EGF 与氢化可的松联合使用能够显著地刺激骨髓间充质干细胞增殖, 这与刘继贤等报道<sup>[13]</sup>的脐血间充质干细胞无血清培养的结果相似。Mansukhani 等<sup>[14]</sup>认为 FGF 与其受体(FGFR)结合后, 通过激活丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)旁路, 促进细胞增殖。Bianchi 等<sup>[15]</sup>认为 FGF-2 在骨髓间充质干细胞的培养中选择了端粒较长的亚群, 因而在培养基中添加 FGF-2, 表现出其增殖能力的提高。EGF 则通过与 EGFR 结合, 激活细胞外信号调节激酶(ERK)和蛋白激酶(AKT)途径, 促进骨髓间充质干细胞增殖<sup>[16]</sup>。Almawi 等<sup>[17]</sup>研究表明糖皮质激素能够促进生长因子受体表达, Scutt 等<sup>[9]</sup>发现在有血清培养中, bFGF 和地塞米松联合使用能促进骨髓间充质干细胞增殖和成骨分化。本研究表明 bFGF 或 EGF 和氢化可的松的联合使用在无血清培养中促增殖效果更好, 下一步的研究重点将是考察氢化可的松是否可能通过促进 bFGFR 和 EGFR 表达来协助生长因子刺激骨髓间充质干细胞增殖。

本研究所采用的无血清培养基在体外扩增骨髓间充质干细胞, 尽管平均倍增时间(42.6 h)较有血清时间(35.8 h)长, 但远低于 Marshak 等<sup>[18]</sup>建立的无血清培养基(96 h), 且与有血清组对照, 培养液中飘浮

的死细胞较少, 最终经 10 d 培养, 无血清组获得较高的细胞扩增倍数。在连续传代培养中, 无血清培养的细胞在前 3 代能保持较高的增殖能力。但随着代次的增加, 无血清培养的细胞增殖能力有所下降。4 代以后, 无血清培养的细胞增殖能力已不如血清培养, 但经过 5 代的无血清培养, 细胞扩增了 1000 倍, 而在 Lennon<sup>[4]</sup>和 Marshak<sup>[18]</sup>等的研究中并无传代培养的数据描述。

经无血清扩增的骨髓间充质干细胞 80%以上处于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期, 略高于有血清组, 但组间无明显差异, 符合干细胞的慢周期特性。但前者集落形成率仅为有血清组的一半, 表明该无血清培养基中可能还缺乏促进集落形成的细胞因子。因此, 培养基组分和各组分的有效浓度还需进一步优化, 以促进干细胞的自我更新。

经过成骨和成脂肪诱导 14 d 后, 茜素红和油红-O 染色均呈阳性, 表明无血清培养基扩增后的骨髓间充质干细胞能够分化成成骨和脂肪细胞。同时, 无血清组成骨诱导后的胞外钙基质沉积略低于有血清组, 而成脂肪诱导后脂滴附着的油红则略高于有血清组。经无血清培养扩增的骨髓间充质干细胞其分化能力在不同方向上有何变化, 还需进一步的实验验证。

本研究表明, 该无血清培养基能够在体外进行骨髓间充质干细胞的扩增, 扩增后的细胞仍能保持其干细胞特性, 包括慢周期特性、自我更新能力(集落形成能力)以及多向分化潜能。

## REFERENCES

- [1] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, **284**(5411): 143-147.
- [2] Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 2005, **105**(4): 1815-1822.
- [3] Kuznetsov SA, Mankani MH, Robey PG. Effect of serum on human bone marrow stromal cell *ex vivo* expansion and *in vivo* bone formation. *Transplantation*, 2000, **70**(12): 1780-1787.
- [4] Lennon DP, Haynesworth SE, Young RG, *et al.* A chemically defined medium supports *in vitro* proliferation and maintains the osteochondral potential of rat marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res*,

- 1995, **219**(1): 211–222.
- [5] Battula VL, Bareiss PM, Trembl S, *et al.* Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation. *Differentiation*, 2007, **75**(4): 279–291.
- [6] Doucet C, Ernou I, Zhang Y, *et al.* Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol*, 2005, **205**(2): 228–236.
- [7] Spees JL, Gregory CA, Singh H, *et al.* Internalized antigens must be removed to prepare hypoimmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. *Mol Ther*, 2004, **9**(5): 747–756.
- [8] Hutchings SE, Sato GH. Growth and maintenance of hela cells in serum-free medium supplemented with hormones. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, **75**(2): 901–904.
- [9] Scutt A, Bertram P. Basic fibroblast growth factor in the presence of dexamethasone stimulates colony formation, expansion, and osteoblastic differentiation by rat bone marrow stromal cells. *Calcif Tissue Int*, 1999, **64**(1): 69–77.
- [10] Kuznetsov SA, Friedenstein AJ, Robey PG. Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation *in vitro*. *Br J Haematol*, 1997, **97**(3): 561–570.
- [11] Paulsen DF, Solursh M. Microtiter micromass cultures of limb-bud mesenchymal cells. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1988, **24**(2): 138–147.
- [12] Ye ZQ, Burkholder JK, Qiu P, *et al.* Establishment of an adherent cell feeder layer from human umbilical cord blood for support of long-term hematopoietic progenitor cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**(25): 12140–12144.
- [13] Liu CH, Wu ML, Hwang SM. Optimization of serum free medium for cord blood mesenchymal stem cells. *Biochem Eng J*, 2007, **33**(1): 1–9.
- [14] Mansukhani A, Bellosta P, Sahni M, *et al.* Signaling by fibroblast growth factors (FGF) and fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-activating mutations blocks mineralization and induces apoptosis in osteoblasts. *J Cell Biol*, 2000, **149**(6): 1297–1308.
- [15] Bianchi G, Banfi A, Mastrogiacomo M, *et al.* *Ex vivo* enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2. *Exp Cell Res*, 2003, **287**(1): 98–105.
- [16] Tamama K, Fan VH, Griffith LG, *et al.* Epidermal growth factor as candidate for *ex vivo* expansion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 2006, **24**(3): 686–695.
- [17] Almawi WY, Hess DA, Rieder MJ, *et al.* Significance of enhanced cytokine receptor expression by glucocorticoids. *Blood*, 1998, **92**(10): 3979–3980.
- [18] Marshak DR, Holecek JJ. US Patent: 464599, 1999-01-06.

## 科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

### 植物生理学实验模块实验指导

李玲 主编 李娘辉 蒋素梅 冷佳奕 王小菁 副主编

978-7-03-023053-9 ¥28.00 2008年12月出版

#### 内容简介

本书以专题形式安排14个综合性模块实验，编入实验项目64项，覆盖植物生理学的主要基础方法。通过流程图与文字讲述每个模块实验的基本过程，达到操作过程直观、重点提示清晰的效果。同时介绍了实验材料的选择、实验数据的统计分析以及撰写实验论文的方法，列举了17个反映植物生理学研究主题、适合培养设计能力的模块实验题目，使大学生在加深植物生理学基本理论的同时，强化植物生理学实验技能训练，培养科学素养和增强解决问题的能力。

本书适合师范院校、农林院校和综合性大学植物生理学实验教学使用，同时可供相关专业学生毕业论文实践及有关教师和科研工作者参考用。

