

• 短篇论著 •

三种胎盘间充质干细胞的分离培养及生物学特性对比研究

刘丽¹, 黎渊明¹, 刘琴¹, 张亚光¹, 毛圆圆¹, 宋云庆^{2*}

摘要:目的 分离培养人胎盘羊膜、绒毛膜和蜕膜三种间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs), 进行生物学特性对比研究。方法 酶消化法分离胎盘羊膜、绒毛膜和蜕膜内干细胞, 体外培养传代, MTT法测定细胞生长曲线, 流式细胞术检测细胞表面标志, 茜素红和油红O检测成骨和成脂能力。结果 表面标记鉴定分离的胎盘细胞为间充质干细胞, 细胞具增殖和分化能力。三种细胞在传代过程中细胞形态、表面标志表达、分化能力维持稳定, 但增殖能力存在差异。结论 成功分离获得三种胎盘MSCs, 可以作为临床前研究用MSCs来源。

关键词: 胎盘间充质干细胞; 分离培养; 生物学特性

中图分类号 R329.2 文献标识码 A 文章编号 1009-9727(2012)12-1528-02

Isolation and biological characteristics of three kinds of human placenta-derived mesenchymal stem cells. LIU Li, LI Yuan-ming, LIU Qin, et al. (Department of Gynecology of Kunshan Municipal First People's Hospital, Suzhou 215300, Jiangsu, P. R. China; Corresponding author: SONG Yun-qing, E-mail: yunqing@beike.cc)

Abstract: Objective To isolate mesenchymal stem cells from human amnions, chorions and decidua basalis, and compare their biological characteristics. **Methods** Stem cells were obtained by enzymatic digestion method from human amnions, chorions and decidua basalis and cultured in vitro. Cell growth curves were made by MTT method. Cell surface markers were assayed by flow cytometry. Osteogenic and adipogenic differentiation capacity was determined by alizarin red and alizarin red staining. **Results** Three kinds of placenta-derived mesenchymal stem cells were confirmed by cell surface markers assay. And these cells possess proliferation and differentiation ability. Cell morphology, surface markers and differentiation ability maintained stability during passage. However difference was detected in growth ability. **Conclusion** Three kinds of human placenta-derived stem cells were isolated and cultured successfully, and they could be used as seed cells in later preclinical study.

Key words: Placenta-derived mesenchymal stem cells, Biological characteristics

本研究首次将胎盘内羊膜、绒毛膜和蜕膜来源MSCs一同分离和培养, 并对三种MSCs的生物学特性进行了初步的研究。

1 材料与方法

1.1 材料来源 胎盘经产妇及家人同意后采集, 产妇无传染性疾病。主要试剂: 噻唑蓝(MTT)、胰酶、胶原酶和二甲基亚砜(DMSO)购自Sigma公司; 鼠抗人CD14、CD45、CD73、CD105、CD34、HLA-DR、CD90、CD79 α 单克隆抗体购自BD公司; 成脂培养基和成骨培养基购自Gibco公司; 油红O染色试剂盒和茜素红钙染色试剂盒购自GenMed公司, 无血清培养基由江苏北科生物科技有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 干细胞分离与培养 胎盘经生理盐水清洗后, 分离出羊膜、绒毛膜和蜕膜组织, 剪碎后胶原酶消化60 min, 离心去上清, 无血清培养基重悬后接种培养瓶, 置于37℃、5%CO₂培养箱中培养。当细胞融合率达到70%~80%时, 胰酶消化传代。三种间充质干细胞从P0代传代至P10代。

1.2.2 细胞生长曲线的测定 取P2代对数期的细胞, 设3个平行孔, 每孔加5mg/mL的MTT溶液20 μ L培养4h, 100 μ L DMSO溶解, 室温震荡10 min, 490nm下测吸光度值, 连测7d绘制细胞生长曲线。

1.2.3 流式细胞仪检测干细胞表面标志物 细胞酶消化后经PBS洗涤2次, 鼠抗人CD14-FITC、CD45-FITC、CD73-PE、CD105-PE、CD34-PE、HLA-DR-PE、CD90-APC、CD79 α -APC单克隆抗体细胞悬液4℃避光孵育30min, PBS洗涤3次后流式细胞仪检测分析结果。以FITC、PE或APC标记的小鼠同型免疫球蛋白为阴性对照。

1.2.4 干细胞诱导分化 (1) 成骨诱导: 细胞融合度达到80%, 加入成骨诱导培养基培养, 每3d换液。21~28d后, 进行茜素红染色。(2) 成脂诱导: 细胞融合度达到80%, 加入成脂诱导培养基培养, 每3d换液。14~21d后, 进行油红O染色。

2 结果

2.1 三种胎盘干细胞的分离及培养 三种干细胞都呈成纤维细胞状, 原代培养2~3周细胞融合达80%~

作者单位: 1. 昆山市第一人民医院妇产科, 江苏 昆山 215300; 2. 江苏省干细胞库, 江苏 泰州 225300

作者简介: 刘丽(1966~), 女, 本科, 副主任医师, 副教授, 研究方向: 高危产科、妊娠高血压相关疾病、脐带血干细胞未来应用前景。

*通讯作者 E-mail: yunqing@beike.cc

90%。形态良好,传代过程中未见明显形态变化。

2.2 流式检测表面标记表达 三种胎盘干细胞 P0、P2、P5 和 P10 代流式结果(图1),阳性检测指标(CD105、CD90 或 CD73)>95%,阴性检测指标(CD45、CD34、CD14、HLA-DR 和 CD79 α)<2%,符合 MSCs 鉴定标准。细胞表面标记在传代过程中维持稳定。

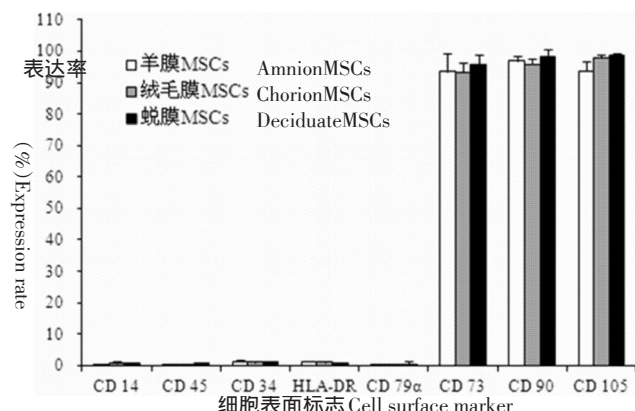


图1 三种胎盘干细胞的表面标志检测结果统计 (n=5)

Figure 1. Statistical chart of the cell surface makers of three kinds of placenta-derived MSCs

2.3 生长曲线测定 如图2所示,三种细胞都表现出较好的增殖活力,细胞间存在差异。

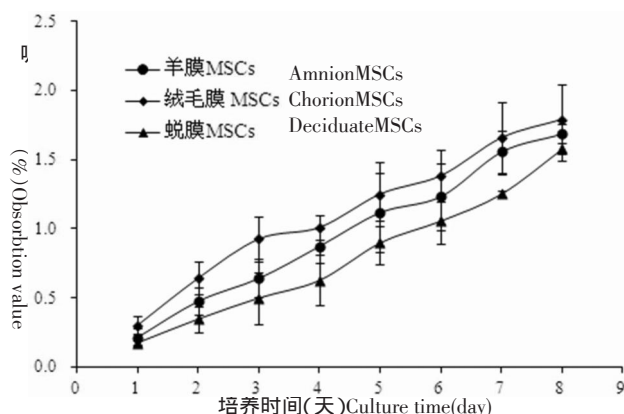


图2 三种胎盘干细胞细胞生长曲线对比 (n=5)

Figure 2. Cell growth curve of the three kinds of placenta-derived MSCs

2.4 分化能力检测 三种胎盘 MSCs 传至 P10,茜素红染色和油红 O 染色分别显示诱导生成钙素和脂滴。传代后三种胎盘 MSCs 维持分化潜能。

3 讨论

人的胎盘是妊娠期间由胚胎的胚膜和母体子宫内膜联合长成,包含了较为幼稚的胚胎干细胞及趋于成熟的成体干细胞^[1-3]。由于胎盘结构复杂,其中含有 MSCs 有多种类型。但以往关于胎盘 MSCs 的研究,有的缺少 MSCs 来源胎盘部位信息,有的仅针对胎盘内一种或两种 MSCs 进行生物学研究,目前多种胎盘

MSCs 的对比研究尚未见报道。

本研究首次将胎盘羊膜、绒毛膜和蜕膜同时分离,对三种组织来源 MSCs 体外培养后,进行生物学特性对比研究。三种胎盘干细胞均符合国际细胞治疗协会(International society for cellular therapy, ISCT)提出的界定 MSCs 的标准^[4],且这三种细胞体外扩增多代后,细胞形态、表面标志表达、分化能力维持稳定,细胞增殖能力较强。研究采用无血清培养基,不含动物源成分,培养所得三种胎盘 MSCs 有望作为临床前研究种子细胞。

研究表明胎盘 MSCs 具有多种疾病治疗的潜能,如胎盘 MSCs 的造血支持^[5]、免疫抑制和组织修复作用已经在一些研究中得到证实。Minagawa 等^[6]将人羊膜 MSCs 植入膀胱损伤的小鼠模型后,免疫组化结果显示损伤的膀胱组织和收缩功能得到较快修复。Jiang 等^[7]将胎盘 MSCs 移植应用到 10 例 II 型糖尿病重症病人的治疗,静脉输注治疗后随访观察 3 个月以上,结果发现 10 例患者胰岛素的平均用量减半,C-肽水平显著提高(P<0.05)。胎盘 MSCs 具有临床应用转化的潜力,本研究结果对进一步临床前和临床研究具有重要参考价值。

参考文献:

- [1] Huang Y, Yang Z, Jiang N, et al. Characterization of MSCs from human placental decidua basalis in hypoxia and serum deprivation[J]. Intern Cell Biol, 2010, 34: 237-243.
- [2] Semenov OV, Koestenbauer S, Riegel M, et al. Multipotent mesenchymal stem cells from human placenta: critical parameters for isolation and maintenance of stemness after isolation[J]. American J Obstetrics Gynecol, 2010, 202: 193. e1-13.
- [3] Soncini M, Vertua E, Gibelli L, et al. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes[J]. J Tissue Engineering Regen Med, 2007, 1: 296-305.
- [4] Dominici M, Le BK, Mueller I, et al. The International Society for Cellular Therapy position statement[J]. Cytotherapy, 2006, 8: 315-317.
- [5] Zhang Y, Li C, Jiang X, et al. Human placenta-derived mesenchymal progenitor cells support culture expansion of long-term culture-initiating cells from cord blood CD34⁺ cells[J]. Exp Hematol, 2004, 32: 657-664.
- [6] Minagawa T, Imamura T, Igawa Y, et al. Differentiation of Smooth Muscle Cells from Human Amniotic Mesenchymal Cells Implanted in the Freeze-Injured Mouse Urinary Bladder[J]. European Urol, 2010, 58: 299-306.
- [7] Jiang R, Han Z, Zhuo G, et al. Transplantation of placenta-derived mesenchymal stem cells in type 2 diabetes: a pilot study[J]. Frontiers Med, 2011, 5: 94-100.

收稿日期 2012-10-10 编辑 吴中华