

脐带血来源间充质干细胞体外 分离培养条件的优化*

范秀波¹⁾ 刘天庆^{1)**} 郝永杰¹⁾ 刘洋¹⁾ 马学虎¹⁾ 崔占峰²⁾

¹⁾大连理工大学精细化工国家重点实验室, 干细胞与组织工程研究室, 大连 116023;

²⁾Department of Engineering Science, University of Oxford, Oxford OX1 3PJ, UK)

摘要 脐带血间充质干细胞(umbilical cord blood mesenchymal stem cells, UCB-MSCs)不仅可以作为滋养层细胞支持造血干细胞在体外的大规模扩增, 在造血移植过程中还能够降低并发症的发生率以及加速造血重建功能的恢复. 但是, 目前 UCB-MSCs 的原代分离培养成功率一般只有 30%左右, 为进一步提高该成功率, 利用正交实验方法对 UCB-MSCs 体外培养的主要影响因素: 细胞的接种密度、细胞因子的组合及用量、是否添加血清和滋养层细胞, 进行逐层筛选, 并对培养出的间充质干细胞进行了流式细胞分析和向成骨、软骨及脂肪方向的诱导分化检测, 以期获得 UCB-MSCs 培养的最佳方法. 实验结果表明, 细胞的接种密度是 UCB-MSCs 培养最显著的影响因素($P < 0.1$), 接种密度越大, MSCs 越容易生长, 能够培养出 MSCs 的几率就越大, 其次为细胞因子, 添加细胞因子能有效地刺激 MSCs 的生长. 在高接种密度的基础上, 添加细胞因子 IL-3(15 $\mu\text{g/L}$)和 GM-CSF (5 $\mu\text{g/L}$), 可大大提高 UCB-MSCs 体外原代培养的成功率, 从 30%左右提高到 90%以上. 流式细胞检测结果显示, 所分离培养的细胞表达间充质干细胞的抗原(CD13⁺、CD29⁺、CD44⁺、CD105⁺、CD166⁺), 不表达造血细胞的抗原(CD34⁻、CD45⁻、HLA-DR⁻), 并能够向成骨、软骨及脂肪方向分化, 这与源于骨髓的间充质干细胞相一致. 所建立的培养方法能够为 UCB-MSCs 的临床应用提供大量优质的种子细胞.

关键词 正交设计, 脐带血, 间充质干细胞, 培养条件优化, 细胞因子

学科分类号 Q2

脐带血(umbilical cord blood, UCB)间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)为中胚层发育的早期细胞, 具有多向分化潜能, 其形态和生物学特点与骨髓来源 MSCs 相似^[1]. 在一定条件下进行体外培养和诱导分化后能向神经细胞(神经元和神经胶质细胞)、成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肌腱、肌肉和心肌细胞等方向分化, 可作为细胞治疗的种子细胞和基因治疗的载体细胞^[2~4].

近年来研究表明, 按照传统方法, 即培养基中只添加血清, 虽然可以从脐血中培养出 MSCs, 但是培养成功率很低, 一般只有 20%~30%的脐血样本培养后能分离出 MSCs. Yang 等^[5]采用在 α -MEM 培养基中添加 10%胎牛血清的方法, 培养脐血来源的间充质干细胞, 在 411 份脐血当中仅有 95 份成功地培养出了间充质干细胞, 占总数的 23%. 而 Both 等^[6]通过对培养基以及接种密度等培养条件的优化, 确定了骨髓来源的 MSCs 的适宜培养条件: α -MEM 培养基要优于 DMEM 培养基,

细胞低密度接种优于高密度接种, 添加地塞米松也能够促进细胞的快速生长. Liu 等^[7]以 1×10^6 cells/cm² 接种密度在含有 20%FBS 的 IMDM 培养基中原代培养脐带血来源的间充质干细胞, 在 144 份脐带血中有 108 份成功地培养出间充质干细胞, 占总数的 75%. 但对于脐带血来源的 MSCs 原代培养条件的优化, 目前还未见文献报道. 如此低的成功率极大地浪费了脐带血资源, 限制了其在临床上的应用, 因此提高 UCB-MSCs 的培养成功率显得尤为重要^[7,8].

正交实验设计法是研究与处理多因素实验的一种科学方法, 其已被广泛应用于化工、纺织、医药、电子及机械等领域^[9~11]. 它在实践经验与理论

* 国家自然科学基金资助项目(30670525).

** 通讯联系人.

Tel: 0411-84706360, E-mail: liutq@dlut.edu.cn

收稿日期: 2007-12-18, 接受日期: 2008-03-03

认识的基础上, 利用规格化的表格——正交表, 科学地挑选实验条件, 合理安排实验. 其优点在于能从很多实验条件中选出代表性强的少数几个实验条件, 并能对实验结果进行统计分析, 从而得到最优或较优的实验方案.

因此, 本文采用正交实验设计法, 对 UCB-MSCs 体外培养的主要影响因素, 包括细胞的接种密度(inoculate density, ID)、细胞因子的组合及用量(cytokines)^[12]、是否添加血清(serum)和滋养层细胞(stromal)进行逐层筛选, 确定了 UCB-MSCs 体外培养的最佳条件, 使 UCB-MSCs 的原代培养成功率提高到 90%以上.

1 材料与方法

1.1 试剂、仪器及脐带血

IMDM 培养基、胎牛血清、马血清、青霉素链霉素和 Trypsin-EDTA 均购自 GIBCO 公司; Ficoll 细胞分离液购自 GE-healthcare 公司; 重组人生长因子 SCF、TPO、FL、IL-3、G-CSF、GM-CSF 均购自 Peprotech 公司; 抗人 CD13-PE、CD29-FITC、CD34-FITC、CD44-FITC、CD45-FITC、CD105-FITC、CD166-PE、HLA-DR-PE 单克隆抗体均购自 BD Pharmingen 公司; 地塞米松、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)、 β -甘油磷酸钠、吡啶美锌、胰岛素、转铁蛋白、ITS⁺、甲苯胺蓝、油红均购自 Sigma 公司.

离心机购自德国 HERMLE 公司; 倒置显微镜购自日本 OLYMPUS 公司; FACSCalibur 流式细胞仪购自美国 BD 公司; 24 孔培养板购自 FALCON 公司.

脐带血来自健康产妇足月分娩或足月剖腹产婴儿, 每次脐带血采集量平均为 50~100 ml, 大连市沙河口区妇幼保健院.

1.2 UCB 单个核细胞的分离

脐带血采集后用密度为 1.077 g/ml 的 Ficoll 细胞分离液以 2 500 r/min, 25 min 密度梯度离心后获得单个核细胞(mononuclear cells, MNCs), Ficoll 分离液与脐带血的体积比为 1:1~1:2. 分离后的细胞用 IMDM 基础培养基离心洗涤 2 次(1 000 r/min, 5min), 调整细胞密度备用.

1.3 UCB-MSCs 的体外培养条件筛选

细胞的接种密度(inoculate density, ID)、细胞因子(cytokines)、血清(serum)及基质层支持(stromal)这 4 个影响因素对 UCB-MSCs 的生长单独起作用

还是交互起作用, 到目前为止尚未有明确的结论, 因此有必要进一步研究. 实验设计 4 因素 2 水平的 8 组正交实验 L8(2⁴), 如表 1 所示. 其中添加因子组合及用量为 SCF 50 μ g/L, FL 15 μ g/L, TPO 15 μ g/L, IL-3 15 μ g/L, G-CSF 5 μ g/L, GM-CSF 5 μ g/L, 依据神经网络模型关于细胞因子定义的公式^[13], 计算其值 Cytokine=5, 而当没有添加细胞因子时 Cytokine=0; Serum=1 及 Stromal=1 分别代表没有添加血清和没有基质层, Serum=2 及 Stromal=2 分别代表添加了血清和有基质层. 按照表 1 的条件, 进行 8 组正交实验. 在第 4 天时, 利用显微镜 CCD 系统对培养的细胞进行随机拍照, 统计 10 张照片中每平方毫米内成纤维状细胞的个数, 取平均值作为各影响因素的评价指标, 进行正交实验分析.

1.4 UCB-MSCs 体外培养时添加细胞因子种类的筛选

根据 1.3 中的实验结果, 在高细胞接种密度的条件下, 细胞因子对 UCB-MSCs 的生长起主要促进作用. 为进一步明确适宜的细胞因子的种类, 有必要作进一步的探究. 由于共有 6 种细胞因子, SCF、FL、TPO、IL-3、G-CSF、GM-CSF, 因此设计 6 因素 2 水平的 8 组正交实验 L8(2⁶), 如表 2 所示. 将分离得到的脐血单个核细胞 MNCs 以 2 \times 10⁶ 个/ml 密度接种到 24 孔板中, 每组实验接种 3 个孔, 加入含 10% FBS 的 IMDM 培养基, 置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养, 在第 3 天时, 利用显微镜 CCD 系统对培养的细胞进行随机拍照, 成纤维状细胞的个数统计方法同 1.3.

1.5 适宜细胞因子用量的筛选

根据 1.4 的实验结果, GM-CSF 和 IL-3 对 UCB-MSCs 的生长具有促进作用, 因此有必要确定 GM-CSF 和 IL-3 两种细胞因子的适宜添加量. 设计 2 因素 2 水平正交实验 L4(2²), 如表 3 所示. 将分离得脐血单个核细胞 MNCs 以 2 \times 10⁶ 个/ml 密度接种到 24 孔板中, 每组实验接种 3 个孔, 加入含 10% FBS 的 IMDM 培养基, 置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养, 在第 4 天时, 利用显微镜 CCD 系统对培养的细胞进行随机拍照, 成纤维状细胞个数的统计方法同 1.3 中.

1.6 UCB-MSCs 的流式检测

将分离得到的脐血单个核细胞 MNCs 以 2 \times 10⁶ 个/ml 密度接种到 6 孔板中, 加入含 10% FBS+IL-3 (15 μ g/L)+GM-CSF (5 μ g/L)的 IMDM 培

培养基, 置 37°C, 5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中, 2~3 天后进行半量换液, 去除未贴壁细胞. 以后每 3 天半量换液 1 次, 待细胞融合达 80%~90%, 用 0.125 %胰酶+0.02% EDTA 消化, 按 1:2 的比例传代. 传至第三代(P3)时将细胞消化进行流式检测. 其方法为: 收集 UCB-MSCs 细胞, 以 1 000 r/min 离心 5 min, 用 PBS 洗涤一次, 调整细胞浓度为 10⁷ 个 /ml, 加入 5 μl 荧光标记抗体 CD13-PE、CD29-FITC、CD44-FITC、CD166-PE、CD34-FITC、CD45-FITC、CD105-FITC、HLA-DR-PE, 于冰上孵育细胞 30 min, 用 PBS 洗涤 1 次, 1 000 r/min 离心 5 min, 用 500 μl 的 PBS 重悬细胞, 使细胞浓度在 10⁶ 个 /ml 左右, 然后流式上机分析.

1.7 UCB-MSCs 的诱导分化

按照 1.6 中的方法培养 UCB-MSCs, 传代培养到第三代时, 收集 UCB-MSCs 细胞, 将细胞浓度调整为 5×10⁴ 个 /ml, 接种到 24 孔板中, 每孔 1 ml, 培养 3 天后吸出含 10%FBS 的 IMDM 培养液. 分别添加向成骨、软骨、脂肪方向诱导分化的诱导剂, 每 3 天换液一次, 诱导 4 周时间, 分别在 1 周、2 周、3 周和 4 周进行 ALP、Vonkossa、软骨和脂肪诱导检测. 其中成骨诱导剂的成分为: IMDM 中添加 10%FBS, 0.1 μmol/L 地塞米松、10 mmol/L β- 甘油磷酸钠、50 μmol/L 维生素 C. 脂肪诱导剂的成分为: IMDM 中添加 10%FBS, 0.1 mmol/L 3- 异丁基 -1- 甲基黄嘌呤、1 μmol/L 地塞米松、0.2 μmol/L 吲哚美辛和 10 μmol/L 胰岛素. 软骨诱导剂的成分为: IMDM 中添加 0.1 μmol/L 地

塞米松, 50 mg/L 维生素 C、100 mg/L 丙酮酸钠、10 μg/L 转化生长因子(TFG-β3)、500 μg/L 骨形成蛋白(BMP-6)及 50 g/L ITS⁺.

2 结 果

2.1 影响 UCB-MSCs 体外培养的关键因素

经过 4 天的培养, 表 1 所示的 1[#]~8[#] 实验组观察到成纤维状细胞的数量有所不同(图 1). 从图 1a 可以看到, 有大量成纤维状细胞均匀分布; 图 1c 和图 1g 中的成纤维状细胞量要略少于图 1a 中的; 图 1b, f, h 中的次之; 而图 1d, e 几乎未见有成纤维状细胞. 对每组实验在 96 h 时随机位置拍摄的 10 张照片中成纤维样细胞的个数进行统计分析(转化成单位平方毫米面积内成纤维样细胞的个数), 来评价各影响因素对 UCB-MSCs 生长作用的主次关系. 各影响因素的显著性水平经正交实验极差和方差分析后汇总到表 1 中, 从中可以看出, 细胞的接种密度(ID)是细胞培养最显著的影响因素($P < 0.1$), 接种密度越大, MSCs 越容易生长, 能够培养出 MSCs 的几率就越大, 其次为细胞因子, 添加细胞因子要比不添加细胞因子更有利于 MSCs 的生长. 从第 1 组的实验结果也能看出, 在未添加血清和滋养层细胞支持, 仅添加细胞因子的情况下, 出现了大量的成纤维状细胞, 而在第 5 组实验中, 虽然也是采用高密度细胞接种, 但在未添加细胞因子的情况下, 几乎未见成纤维状细胞的出现. 这充分说明除了高密度接种细胞以外, 细胞因子也是 UCB-MSCs 生长至关重要的影响因素.

Table 1 Orthogonal experiment of influence factors for the culture of UCB-MSCs

Group	ID (×10 ⁻⁵ cells·ml ⁻¹)	Cytokines	Serum	Stromal	Number of MSCs/(mm ² , 96 h)
1	20	5	1	1	500
2	5	0	2	2	150
3	20	5	2	2	313
4	5	0	1	1	0
5	20	0	1	2	0
6	5	5	2	1	125
7	20	0	2	1	313
8	5	5	1	2	75
T ₁	1 128	1 012	576	940	
T ₂	352	464	900	540	ID > Cytokines > Stromal > Serum
R _j	194	137	81	100	
SS _j	76 750	37 538	13 122	21 478	SS _e =70 998
f _j	1	1	1	1	f _e =6
F	6.486	3.172	1.109	1.815	f(1,6,0.9)=3.78

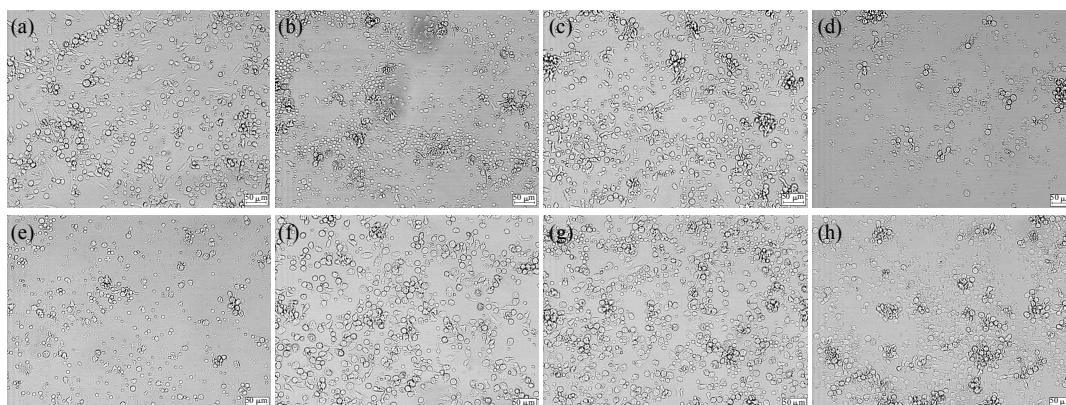


Fig. 1 Morphological characterization of UCB-MSCs under different culture conditions

(a)~(h): Test group of 1 to 8; $\times 100$, 96 h, black and white bright field.

2.2 影响 UCB-MSCs 体外培养的细胞因子种类

经过 3 天的培养, 表 2 所示的 1[#]~8[#] 实验组观察到成纤维状细胞的数量有所不同(图 2). 从图 2 中可以看到, 图 2b, d 中有大量成纤维状细胞均匀分布, 图 2e, f, g 和 h 中成纤维状细胞的数量较图 2b, d 中少, 而图 2a, c 中几乎未见成纤维状细胞. 统计每组实验在 72 h 时随机位置拍摄的 10 张照片中成纤维样细胞的个数(转化成单位平方毫米面积内成纤维样细胞的个数), 来评价各细胞因子对

UCB-MSCs 生长的影响. 正交实验极差和方差分析结果如表 2 所示, 细胞因子 GM-CSF、IL-3、G-CSF 可以促进 UCB-MSCs 的贴壁生长, 而 SCF、TPO、FL 抑制 UCB-MSCs 的贴壁生长. GM-CSF 和 IL-3 是影响 UCB-MSCs 原代培养的主要因素, 而 SCF、TPO、FL 和 G-CSF 对 UCB-MSCs 的培养影响不显著 ($P < 0.01$). 故 GM-CSF 和 IL-3 对 UCB-MSCs 生长的促进作用最为关键.

Table 2 Orthogonal experiment of cytokines for UCB-MSCs culture

Group	SCF($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	TPO ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	FL ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	IL-3 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	GM-CSF ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	G-CSF($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Number of MSCs/(mm ² ,72 h)
1	0	0	0	0	0	0	18.4
2	0	0	0	15	5	5	651.3
3	0	15	15	0	0	5	10.0
4	0	15	15	15	5	0	408.4
5	50	0	15	0	5	0	262.5
6	50	0	15	15	0	5	179.8
7	50	15	0	0	5	5	261.3
8	50	15	0	15	0	0	165.1
T_{j1}	1 088	1 112	1 096	552	373.6	854.4	GM-CSF >
T_{j2}	868.4	845.2	860	1 404.4	1 583.6	1 102.4	IL-3 > TPO >
R_j	54.9	66.9	58.9	213.1	302.5	62	G-CSF > FL > SCF
SS_j	5 832.5	9 093.5	6 571.3	90 627.5	18 3208	7 688	$SS_e=6 105.5$
f_j	1	1	1	1	1	1	$f_e=6$
F	5.73	8.94	6.46	89.06	180.04	7.55	$f(1, 6, 0.99)=13.7$

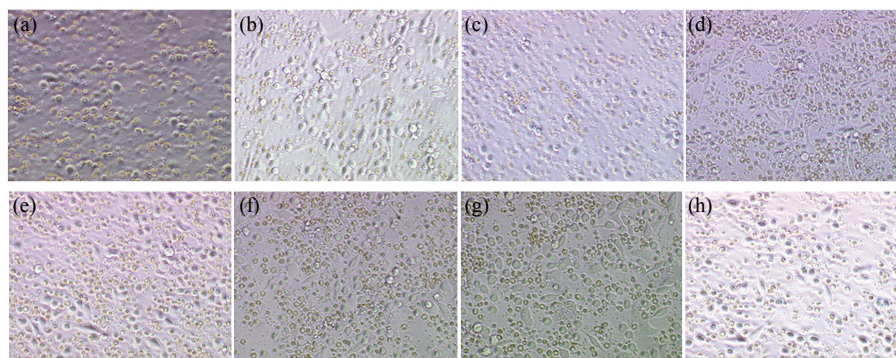


Fig. 2 Morphological characterization of UCB-MSCs with different kind of cytokines

(a)~(h) is the group of 1 to 8; $\times 200$, 72 h, phase contrast.

2.3 IL-3、GM-CSF 细胞因子的适宜用量

经过 4 天的培养, 表 3 所示的 1[#]~4[#] 实验组观察到的成纤维状细胞量有所不同(图 3)。从图 3 中可以看出, 图 3a 中有大量成纤维状细胞均匀分布, 图 3b, c, d 中的成纤维状细胞的量较图 3a 中的少。统计每组实验在 96 h 时随机位置拍摄的 10 张照片

中成纤维样细胞的个数(转化成单位平方毫米面积内成纤维样细胞的个数), 来评价 GM-CSF 和 IL-3 的添加量对 UCB-MSCs 生长的影响。正交实验的方差和极差分析结果如表 3 所示, 5 $\mu\text{g/L}$ GM-CSF 和 15 $\mu\text{g/L}$ IL-3 是 UCB-MSCs 培养的最佳用量。

Table 3 Orthogonal experiment for cytokine dose of GM-CSF and IL-3

Group	IL-3($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	GM-CSF($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Number of MSCs / (mm^2 , 96 h)
1	15	5	548.8
2	15	15	316.3
3	30	5	285
4	30	15	216.3
T_{j1}	865.1	833.8	15 $\mu\text{g/L}$ IL-3 and 5 $\mu\text{g/L}$ GM-CSF are the optimal results for MSCs culture
T_{j2}	501.3	532.6	
R_j	182	150.6	
SS_j	33 124	22 681	$SS_e=6 708$ $f_{\alpha}=2$ $f(1,2,0.95)=18.5$

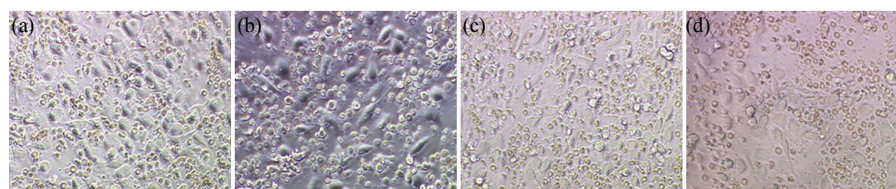


Fig. 3 Morphological characterization of UCB-MSCs with different dose of GM-CSF and IL-3

(a)~(d) is the group of 1 to 4; $\times 200$, 96 h, phase contrast.

2.4 培养细胞的流式分析

流式检测结果显示, 本研究从脐带血中分离培养的细胞其 CD13、CD29、SH₂(CD105)、CD166 和 CD44 呈阳性表达, 而 CD34、CD45 和 HLA-DR 呈阴性表达(图 4)。目前认为间充质干细胞无特

异性表面抗原, 其具有间质细胞、上皮细胞和内皮细胞的特点。一般需要同时检测多种表面抗原来确定间充质干细胞的特异性。本文检测结果与文献报道的间充质干细胞特性相吻合, 具有 MSCs 的表面特征^[4]。

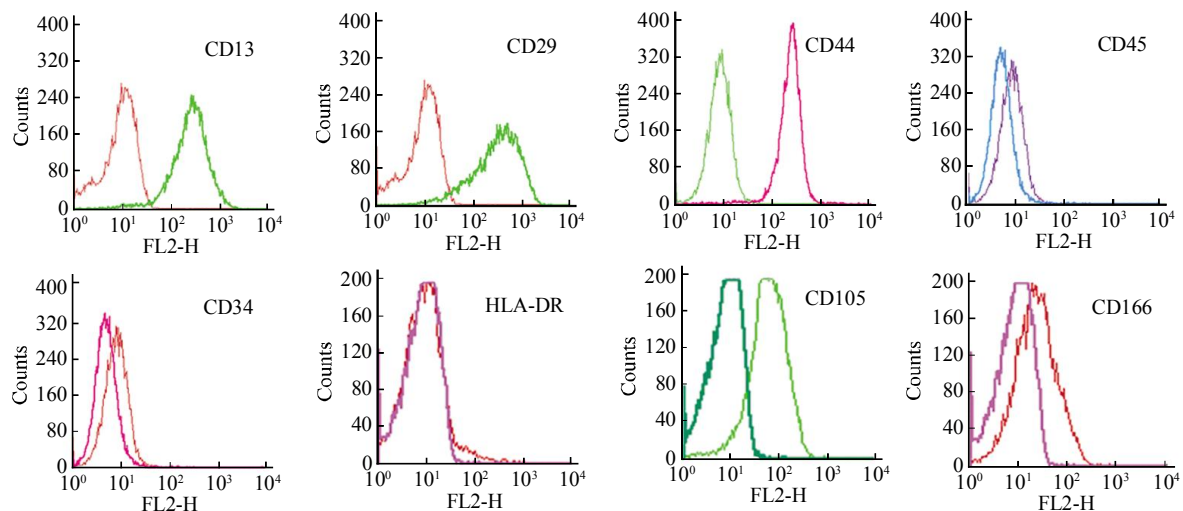


Fig. 4 Immunophenotypic characterization of MSCs derived from UCB

These cells positively expressed antigens CD13, CD29, CD44, CD105 and CD166, but negatively expressed antigens HLA-DR, CD34, CD45.

2.5 培养细胞的多向诱导分化

UCB-MSCs 应具有向成骨、软骨及脂肪等多方向分化的能力. 经钙钴法染色, 成骨诱导的 ALP 染色结果如图 5a 所示, 成骨细胞内早期表达的 ALP 呈黑褐色颗粒, 随着诱导时间的延长, 黑

褐色颗粒的表达量有所降低, 经 von Kossa 染色, 成骨诱导矿化结节的形成如图 5b 所示, 在第 1 周时, 几乎未见黑色的细胞外钙化结节形成, 但在第 2、3、4 周时, 细胞外有大量的钙化结节形成, 在第 4 周时表达量最多. ALP 染色和 von Kossa 染色

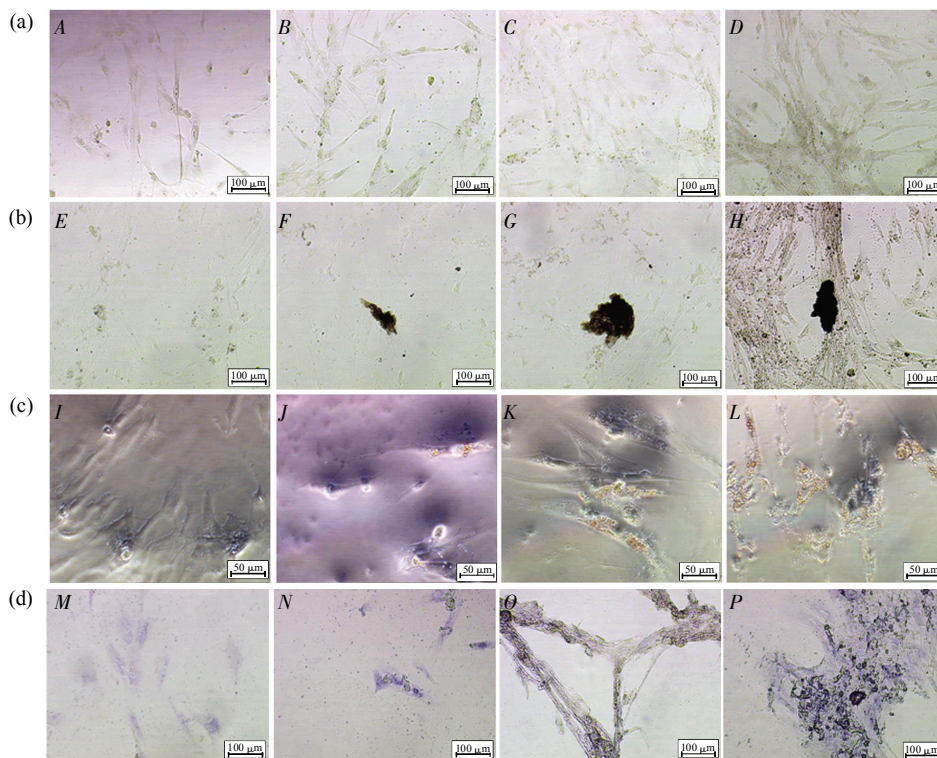


Fig. 5 Differentiation potential of UCB-derived MSCs

(a) ALP staining for osteogenic differentiation. A: 1 week; B: 2 weeks; C: 3 weeks; D: 4 weeks; bright field×100. (b) Vonkossa staining for osteogenic differentiation. E: 1 week; F: 2 weeks; G: 3 weeks; H: 4 weeks; bright field×100. (c) Oil red staining for adipogenic differentiation. I: 1 week; J: 2 weeks; K: 3 weeks; L: 4 weeks; phase contrast×200. (d) Toluidine blue staining for chondrogenic differentiation. M: 1 week; N: 2 weeks; O: 3 weeks; P: 4 weeks; bright field×100.

的结果可以证明, 本研究所培养的细胞具有向成骨方向分化的能力. 经过油红染色, 细胞向脂肪方向诱导分化的结果如图 5c 所示, 从图 5c 中可以看出, 在第 1 周时, 胞内未见红色的脂滴形成, 第 2 周时, 胞内有少量的脂滴形成, 至第 4 周时, 胞内有大量的红色脂滴形成, 诱导率大于 50%, 随着诱导时间的延长, 细胞的体积逐渐变大. 该结果说明, 所培养的细胞具有向脂肪细胞分化的能力. 经甲苯胺蓝染色, 细胞向软骨方向诱导分化的结果如图 5d 所示, 从图 5d 中可以看出, 细胞单层贴壁, 并有聚集成团的特性, 细胞间外基质呈现蓝紫色, 随着诱导时间的延长, 聚团现象更加明显, 蓝紫色表达量也随之增多. 甲苯胺蓝染色结果可以说明, 所培养的细胞具有向软骨方向分化的能力.

3 讨 论

为了有效地提高 UCB-MSCs 原代培养成功率, 我们应用正交实验设计法来考察 MSCs 培养的主要影响因素. 实验发现, 除了细胞的接种密度外, 适宜的细胞因子种类和用量是 MSCs 成功培养的关键因素. 在传统培养 MSCs 培养方法的基础上, 通过添加细胞因子 IL-3 (15 $\mu\text{g/L}$) 和 GM-CSF (5 $\mu\text{g/L}$) 可以使 UCB-MSCs 的原代培养成功率由传统方法的 25% 左右提高到 90% 以上 ($n=11$). 同时, 免疫表型分析和诱导分化分析证明传代培养获得的 UCB-MSCs 仍然保持着干细胞特性. 其表达间充质干细胞相关表面标志, 如 CD13、CD29、SH2 (CD105)、CD166 和 CD44, 而不表达 CD34、CD45 和 HLA-DR. 脐带血来源的间充质干细胞所表达的表面标志与骨髓来源的间充质干细胞的表面标志相一致^[6, 15~23]. 另外, 通过诱导分化, 证明其具有向成骨、软骨及脂肪等多方向分化的能力. 这与骨髓来源的间充质干细胞的诱导分化结果相一致^[2, 3, 8, 20, 21, 24~28].

从第二个正交实验的结果可以看出, 细胞因子 GM-CSF、IL-3、G-CSF 可以促进 UCB-MSCs 的贴壁生长, 而 SCF、TPO、FL 则抑制 UCB-MSCs 的贴壁生长. 其中的作用机理可以从细胞信号转导方面来加以解释.

细胞因子作为蛋白质大分子信息物质, 通过结合与作用受体胞外域来激活细胞的表面受体, 并能够识别与结合化学信号, 触发靶细胞产生特异的生理效应. 前人的研究表明, IL-3 能够直接作用

于 MSCs, 而 SCF 只能起间接作用. Baksh 等^[29]为了研究 IL-3 和 SCF 信号是否能直接转导于 CD45-表达细胞, 通过流式分析示踪了 CD123(IL-3 受体) 和 CD117(SCF 受体) 的表达. 结果证明添加 IL-3 后, 来源于人骨髓的 CD45⁻CD123⁺细胞的表达量有所增加. 更重要的是, 在他们的研究中没有检测到 CD45⁻CD123⁺CD117⁺ 或 CD45⁻CD123⁻CD117⁺ 细胞群的表达, 由此证明了 SCF 对间充质干/祖细胞的促增殖作用是间接的. SCF 信号能够直接转导于 HSCs 并分泌大量的小分子活性物质, 抑制 MSCs 的增殖并使其处于 G0 期. 另外, FL 不能单独直接刺激祖细胞集落的形成, 只能通过协同其他细胞因子, 如 SCF、IL-3、IL-6 和 GM-CSF 共同发生作用^[30~32]. 尽管我们不能直接解释为什么 FL 抑制 MSCs 增殖的现象, 但可以推测它与自分泌细胞因子的信号激活作用有关. TPO 作为一种支持造血干细胞扩增的糖蛋白生长因子及巨噬细胞生长与分化的调节因子^[33], 其作用机理与 G-CSF 极为相似. TPO、G-CSF 和 GM-CSF 均为自分泌型细胞因子, 但 GM-CSF 对 MSCs 的增殖起到正反馈作用, 而 TPO、G-CSF 却是负反馈作用.

另外, Liu 等在 IMDM 培养基的基础上通过添加两种血清替代成分(人血白蛋白和 SITE)及氢化可的松与碱性成纤维细胞生长因子(bFGF), 优化了 MSCs 的无血清继代培养条件, 使其可以传至第 9 代, 并且仍具有向成骨、软骨和脂肪等方向多向分化的能力, 保持了良好的干细胞特性. 但他们的培养条件并不适合脐带血 MSCs 的原代培养, 并且氢化可的松和 bFGF 这两种生长因子会诱导造血干细胞(HSCs)向定向造血祖细胞分化^[34], 因此这两种生长因子不能应用到 HSCs 和 MSCs 两种干细胞的同时扩增收获上. 而本研究的优化条件是在造血干细胞体外扩增添加细胞因子基础上所作的筛选, 其不仅可以提高 MSCs 的原代培养成功率, 同时还可以促进 HSCs 的体外扩增, 为同时扩增收获 HSCs 和 MSCs 两种干细胞打下良好的基础.

综上所述, 流式细胞仪检测和诱导分化鉴定的结果充分表明, 在传统培养方法的基础上通过添加细胞因子 IL-3(15 $\mu\text{g/L}$) 和 GM-CSF(5 $\mu\text{g/L}$) 所培养出的成纤维状细胞为脐带血来源的间充质干细胞(UCB-MSCs), 并且该方法大大提高了 UCB-MSCs 的原代培养成功率, 使其高于 90%.

参 考 文 献

- 1 He Q L, Wan C, Li G. Concise review: Multipotent mesenchymal stromal cells in blood. *Stem Cells*, 2007, **25**(1): 69~77
- 2 Deans R J, Moseley A B. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Experimental Hematology*, 2000, **28** (8): 875~884
- 3 Le Blanc K, Ringden O. Mesenchymal stem cells: properties and role in clinical bone marrow transplantation. *Current Opinion in Immunology*, 2006, **18**(5): 586~591
- 4 Jang Y K, Jung D H, Jung M H, *et al.* Mesenchymal stem cells feeder layer from human umbilical cord blood for *ex vivo* expanded growth and proliferation of hematopoietic progenitor cells. *Annals of Hematology*, 2006, **85**(4): 212~225
- 5 Yang S E, Ha C W, Jung M, *et al.* Mesenchymal stem/progenitor cells developed in cultures from UC blood. *Cytotherapy*, 2004, **6**(5): 476~486
- 6 Both S K, Van der Muijsenber A J C, Van Blitterswijk C A, *et al.* A rapid and efficient method for expansion of human mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering*, 2007, **13**(1): 3~9
- 7 Liu C H, Wu M L, Hwang S M. Optimization of serum free medium for cord blood mesenchymal stem cells. *Biochemical Engineering Journal*, 2007, **33**(1): 1~9
- 8 Song L, Baksh D, Tuan R S. Mesenchymal stem cell-based cartilage tissue engineering: cells, scaffold and biology. *Cytotherapy*, 2004, **6**(6): 596~601
- 9 Hash J, Okorafor O. Crystal Size Distribution (CSD) of Batch Salting-out Crystallization Process for Sodium Sulfate. *Chemical Engineering & Processing: Process Intensification*, 2008. 622~632
- 10 Tang C H, Wang B C, Chen Q, *et al.* A new experimental design for screening Chinese medicine formula. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2004, **36**(2): 105~109
- 11 Zeng S C, Chen B G, Jiang C A, *et al.* Impact of fertilization on chestnut growth, N and P concentrations in runoff water on degraded slope land in South China. *Journal of Environmental Sciences-China*, 2007, **19**(7): 827~833
- 12 Liu C H, Hwang S M. Cytokine interactions in mesenchymal stem cells from cord blood. *Cytokine*, 2005, **32**(6): 270~279
- 13 Fan X, Liu T, Li X, *et al.* Neural network analysis of *ex-vivo* expansion of hematopoietic stem cells. *Ann Biomed Eng*, 2007, **35** (8): 1404~1413
- 14 Chen X, Xu H, Wan C, *et al.* Bioreactor expansion of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 2006, **24** (9): 2052~2059
- 15 Majumdar M K, Thiede M A, Haynesworth S E, *et al.* Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research*, 2000, **9**(6): 841~848
- 16 Baksh D, Song L, Tuan R S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Molecular Medicine*, 2004, **8**(3): 301~316
- 17 Bielby R, Jones E, McGonagle D. The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. *Injury-International Journal of the Care of the Injured*, 2007, **38**: S26~S32
- 18 Lee K, Majumdar M K, Buyaner D, *et al.* Human mesenchymal stem cells maintain transgene expression during expansion and differentiation. *Molecular Therapy*, 2001, **3**(6): 857~866
- 19 Romanov Y A, Darevskaya A N, Kabaeva N V, *et al.* Optimum conditions for culturing of human bone marrow and adipose tissue mesenchymal precursor cells. *Bull Exp Biol Med*, 2006, **142** (4): 515~520
- 20 Zhao Z G, Tang X Q, You Y, *et al.* Assessment of bone marrow mesenchymal stem cell biological characteristics and support hemopoiesis function in patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia Research*, 2006, **30**(8): 993~1003
- 21 Majumdar M K, Thiede M A, Mosca J D, *et al.* Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cellular Physiology*, 1998, **176**(1): 57~66
- 22 Maitra B, Szekely E, Gjini K, *et al.* Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplantation*, 2004, **33**(6): 597~604
- 23 Minguell J J, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Experimental Biology and Medicine*, 2001, **226**(6): 507~520
- 24 Kang J H, Lee C K, Kim J R, *et al.* Estrogen stimulates the neuronal differentiation of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells (CD34-). *Neuroreport*, 2007, **18**(1): 35~38
- 25 Im G I, Kim D Y, Shin J H, *et al.* Repair of cartilage defect in the rabbit with cultured mesenchymal stem cells from bone marrow. *Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume*, 2001, **83B**(2): 289~294
- 26 Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, **284**(5411): 143~147
- 27 Nakahara M, Takagi M, Hattori T, *et al.* Effect of subcultivation of human bone marrow mesenchymal stem on their capacities for chondrogenesis, supporting hematopoiesis, and telomea length. *Cytotechnology*, 2005, **47**(1~3): 19~27
- 28 Bruder S P, Fink D J, Caplan A I. Mesenchymal stem-cells in bone-development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem*, 1994, **56**(3): 283~294
- 29 Baksh D, Davies J E, Zandstra P W. Soluble factor cross-talk between human bone marrow-derived hematopoietic and mesenchymal cells enhances *in vitro* CFU-F and CFU-O growth and reveals heterogeneity in the mesenchymal progenitor cell compartment. *Blood*, 2005, **106**(9): 3012~3019
- 30 Meyer C, Drexler H G. FLT3 ligand inhibits apoptosis and promotes survival of myeloid leukemia cell lines. *Leukemia & Lymphoma*, 1999, **32**(5~6): 577~581
- 31 Lisovsky M, Estrov Z, Zhang X, *et al.* Flt3 ligand stimulates proliferation and inhibits apoptosis of acute myeloid leukemia cells: Regulation of Bcl-2 and Bax. *Blood*, 1996, **88**(10): 3987~3997
- 32 Broxmeyer H E, Lu L, Cooper S, *et al.* Flt3 ligand stimulates

- costimulates the growth of myeloid stem progenitor cells. *Experimental Hematology*, 1995, **23**(10): 1121~1129
- 33 Kim M J, Park S H, Opella S J, *et al.* NMR structural studies of interactions of a small, nonpeptidyl Tpo mimic with the thrombopoietin receptor extracellular juxtamembrane and transmembrane domains. *J Biol Chem*, 2007, **282** (19): 14253 ~ 14261
- 34 Mukhopadhyay A, Madhusudhan T, Kumar R. Hematopoietic stem cells: clinical requirements and developments in *ex-vivo* culture. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2004, **86**: 215~253

Optimization for Dissociation and Culture of Mesenchymal Stem Cells Derived From Umbilical Cord Blood *

FAN Xiu-Bo¹⁾, LIU Tian-Qing^{1)**}, HAO Yong-Jie¹⁾, LIU Yang¹⁾, MA Xue-Hu¹⁾, CUI Zhan-Feng²⁾

¹⁾State Key Laboratory of Fine Chemicals, Stem Cell and Tissue Engineering Laboratory Dalian University of Technology, Dalian 116023, China;

²⁾Department of Engineering Science, University of Oxford, Oxford OX1 3PJ, UK)

Abstract Mesenchymal stem cells (MSCs) derived from umbilical cord blood (UCB) can not only support hematopoietic stem cells (HSCs) expansion *in vitro* as stromal cells, but also alleviate complications and accelerate the recovery of hematopoiesis during hematopoietic stem cell transplantation. The ratio of successful isolation and culture of UCB-MSCs, however is only about 20%~30% to date. Many cell culture parameters contribute to this outcome and hence optimization of culture conditions is critical to increase the probability of success. In order to improve this ratio and optimize the culture method for UCB-MSCs, factorial design were applied to investigate the main influencing factors, including cell inoculate density (ID), combination and dose of cytokines, presence of serum and stromal cells or not. The experimental results indicated that ID was the most significant influencing factor for UCB-MSCs culture when $P < 0.1$. Higher ID led to higher probability of success and better growth for UCB-MSCs. Then were cytokines, which could stimulate the growth of UCB-MSCs effectively. Based on the high cell ID, the optimized culture condition was determined with cytokines IL-3 (15 $\mu\text{g/L}$) and GM-CSF (5 $\mu\text{g/L}$) added in the traditional medium of MSCs. Then the probability of obtaining UCB-MSCs can be increased up to 90% from 30% with traditional culture method. Moreover, the characteristics of UCB-MSCs were tested by flow cytometric analysis and multi-lineage differentiation identification for osteoblast, chondrocyte and adipocyte. The results showed that the fibroblast-like cells expressed MSCs surface markers of CD13, CD29, CD105, CD166 and CD44 positively and CD34, CD45 and HLA-DR negatively. Meanwhile the cells could differentiate into osteoblasts, chondrocytes and adipocytes similarly to MSCs derived from bone marrow. In conclusion, an efficient protocol have been developed to culture UCB-MSCs by adding cytokines IL-3 (15 $\mu\text{g/L}$) and GM-CSF (5 $\mu\text{g/L}$).

Key words factorial design, umbilical cord blood, mesenchymal stem cells, optimization for culture condition, cytokines

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30670525).

**Corresponding author.

Tel: 86-411-84706360, E-mail: liutq@dlut.edu.cn

Received: December 18, 2007 Accepted: March 3, 2008