

# 低氧增强骨髓间充质干细胞增殖维持分化潜能

康少平<sup>1</sup>, 刘淑艳<sup>1</sup>, 李永升<sup>2</sup>, 李萍<sup>1\*</sup>

(1. 河北北方学院医学检验学院, 河北 张家口 075000; 2. 张家口市第二医院骨外科, 河北 张家口 075000)

**【摘要】目的** 观察低氧增强人骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)体外增殖并维持其多向分化潜能的作用。**方法** 分离10例骨髓血标本BMMSCs, 分别进行低氧(低氧组)及常氧(常氧组)培养, 观察BMMSCs的形态、增殖能力及成骨、成脂分化能力。**结果** 低氧组BMMSCs保持其长梭形, 鱼群样分布, 增长状态良好, 常氧组BMMSCs形态呈多角形或扁平状, 低氧组BMMSCs数量及生长速率较常氧组增加( $P < 0.05$ ), 且低氧组BMMSCs具有成骨、成脂分化能力。**结论** 低氧能促进BMMSCs的体外增殖且维持其多向分化潜能。

**【关键词】** 低氧; 骨髓间充质干细胞; 增殖; 多向分化

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 07-0070-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.07.013

## Hypoxia promotes proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells and maintains their potential of differentiation

KANG Shao-ping<sup>1</sup>, LIU Shu-yan<sup>1</sup>, LI Yong-sheng<sup>2</sup>, LI Ping<sup>1\*</sup>

(1. College of Laboratory Medicine, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China; 2. Department of Orthopedics, The Second Hospital of Zhangjiakou, Zhangjiakou 075000)

**【Abstract】 Objective** To observe the promoting effect of hypoxia on proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) and maintaining their potential of multi-directional differentiation *in vitro*. **Methods** BMMSCs were isolated from bone marrow blood samples of patients with bone fracture, and cultured under hypoxic (group A) or normoxic (group B) conditions. The morphology, proliferation and osteogenic and adipogenic potential of the BMMSCs were observed. **Results** BMMSCs in the group A showed a long spindle shape and a fish shoal-like distribution, and were well-grown, while the morphology of cells in the group B appeared polygonal or flat. The quantity and growth rate of BMMSCs in the group A were increased compared with the group B ( $P < 0.05$ ), with an osteogenic and adipogenic potential. **Conclusions** Hypoxia can promote the proliferation of BMMSCs *in vitro* and maintain their multi-directional differentiation potential.

**【Key words】** Hypoxia; Human bone marrow mesenchymal stem cells; Proliferation; Multi directional differentiation

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)是一种具有自我更新及向成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞以及神经细胞等多种类型的组织细胞分化能力的非造血干细胞<sup>[1]</sup>。近年

来, BMMSCs已被广泛应用于多个领域, 包括骨病的病理生理学研究、细胞和基因治疗及骨再生组织工程等<sup>[2,3]</sup>。由于BMMSCs在骨髓单个核细胞中的比例非常小, 仅占0.1%左右; 尽管其在体外表现出一

[基金项目] 张家口市科学技术研究与发展计划项目(1321052D)。

[作者简介] 康少平(1981-), 女, 讲师, 研究方向: 干细胞。Email: kang\_shao\_ping@163.com

[通讯作者] 李萍(1969-), 女, 教授, 研究方向: 干细胞。Email: zjkliping@163.com

种独特的增殖能力,但仍然难以满足组织工程和细胞治疗的需要<sup>[4]</sup>。因此,探索理想的 BMMSCs 体外扩增条件具有重要的理论与临床应用价值。本研究通过对 BMMSCs 进行体外低氧培养,观察其增殖及多向分化能力,从而建立理想的 BMMSCs 体外扩增方法,为 BMMSCs 的临床应用提供参考依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

骨髓血标本取自张家口市第二医院骨科收治的 10 例新鲜股骨颈骨折患者,患者在行全髋关节置换术中抽取骨髓血,分离获得 BMMSCs。患者均无血液系统疾病和家族遗传病史。该项研究经医院伦理委员会批准并征得患者知情同意。

### 1.2 主要仪器和试剂

倒置相差显微镜,德国 Leica 公司;三气细胞培养箱,美国 Thermo 公司;胎牛血清(FBS)、DMEM/F-12 培养基、青霉素-链霉素(双抗)、0.25% 胰蛋白酶-EDTA,均购自美国 Gibco 公司;CCK-8 细胞增殖检测试剂盒,上海贝博生物有限公司;人外周血淋巴细胞分离液(Percoll),天津市灏洋生物制品科技有限责任公司;成骨诱导分化试剂盒、成脂诱导分化试剂盒、茜素红染液、油红 O 染液,均购自苏州赛业生物科技有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 BMMSCs 的分离与培养

手术过程中取 5 mL 骨髓血标本置于肝素抗凝管,轻轻混匀,与等量 DMEM/F-12 混合,1000 r/min 离心 10 min;弃上清及脂肪层,并用 DMEM/F-12 重悬细胞,以等体积比缓慢沿管壁叠加在 Percoll 液面上,2000 r/min 离心 25 min;吸取乳白色环状细胞层即单个核细胞层,PBS 洗涤 2 次,1000 r/min 离心 10 min;用细胞培养基(DMEM/F-12,10% FBS,1% 双抗)重悬细胞,混匀后以  $1 \times 10^6$ /mL 接种至六孔板中,镜下观察细胞分布均匀;分别置于低氧(5%  $O_2$ ,低氧组)及常氧(21%  $O_2$ ,常氧组)下进行培养。细胞低氧培养是在三气细胞培养箱中进行,即在充满 5%  $O_2$ 、5%  $CO_2$  和 90%  $N_2$  的混合气体,最终  $O_2$  浓度为 5%。48 h 更换新鲜培养液,去除未贴壁细胞;以后每隔 3 d 换液一次,细胞在培养箱外换液的时间不超过 5 min,以免低氧、复氧效应发生。

#### 1.3.2 BMMSCs 形态观察

倒置相差显微镜下观察低氧组及常氧组细胞生长状况及形态特征。

#### 1.3.3 BMMSCs 增殖测定

应用 CCK-8(Cell Counting Kit-8)法对 BMMSCs 进行增殖分析。收集第 3 代低氧或常氧组细胞分别以  $6.25 \times 10^3$ 、 $1.25 \times 10^4$ 、 $2.5 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ /mL 密度接种于 96 孔板,绘制一条以细胞数量为横坐标,OD 值为纵坐标的标准曲线。将第 3 代低氧及常氧组细胞以 3,000 个/孔(100  $\mu$ L 细胞悬液)接种于 96 孔板,分别置于低氧及常氧环境中培养 1、2、3、4、5、6、7 d,培养终末时间每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 溶液孵育 3 h,使用酶标仪测定 450 nm 各孔的 OD 值。

#### 1.3.4 BMMSCs 成骨诱导与钙结节染色

将第 3 代低氧、常氧组细胞按  $3 \times 10^4$ /cm<sup>2</sup> 接种于 6 孔板中,基础培养基(DMEM/F-12、10% FBS、1% 双抗)进行培养,24 h 后使用成骨细胞诱导分化培养基(DMEM/F-12、10% FBS、1% 双抗、0.1  $\mu$ mol/L 地塞米松、10 mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸、60  $\mu$ mol/L 抗坏血酸),分别置于低氧、常氧下进行成骨诱导,每隔 2 d 换液 1 次,成骨诱导培养第 14 d 使用茜素红染液做钙结节染色。PBS 洗涤细胞 2 次,4% 冷甲醛固定 15 min,双蒸水洗涤 3 次,茜素红染液染色 10 min,双蒸水洗涤 2 次。在低倍镜下观察每个视野中阳性钙结节的个数,每孔随机选取 5 个视野,取其均数做统计学分析。

#### 1.3.5 BMMSCs 成脂诱导与脂滴染色

将第 3 代低氧、常氧组细胞按  $2 \times 10^4$ /cm<sup>2</sup> 接种于六孔板中,基础培养基进行培养,每隔 2 d 换液一次,待细胞达到 100% 融合后,使用成脂细胞诱导分化培养基(DMEM/F-12、10% FBS、1% 双抗、1  $\mu$ mol/L 地塞米松、10  $\mu$ g/mL 胰岛素、0.5 mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤),分别置于低氧、常氧下进行成脂诱导分化。每隔 2 d 换液 1 次,成脂诱导培养第 14 d,使用油红 O 染液进行脂滴染色。PBS 洗涤细胞 2 次,4% 中性甲醛固定 60 min,双蒸水洗涤 3 次,待干,加入预配并过滤后的油红 O 染液,染色 15 min,吸去多余染液,PBS 洗涤 2 次。倒置相差显微镜下观察形成的脂滴。

## 1.4 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。计量数据用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异有显著性。

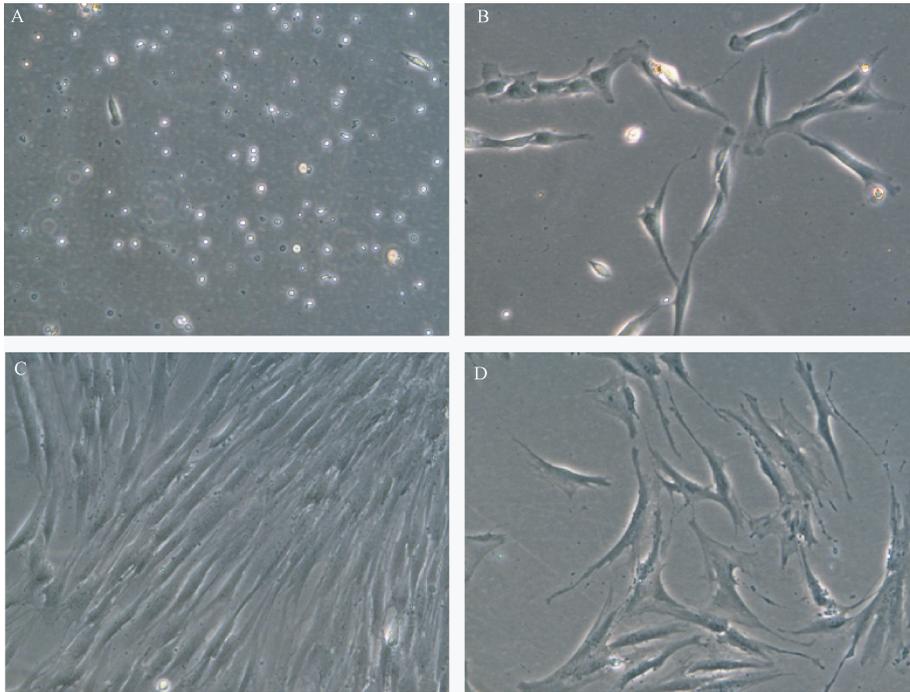
## 2 结果

### 2.1 BMMSCs 形态观察

新分离的细胞在低氧条件下培养粘附性差,第 3 ~ 5 天,大部分细胞不贴壁,悬浮在细胞培养液中

(图 1A);但在常氧条件下培养 24 h 内即有贴壁细胞生长,3 ~ 5 d 后细胞呈圆形、细长梭型(图 1B)。因此,常氧培养所有新分离的细胞直到细胞生长达到第一次融合,将融合的 BMMSCs 消化传代,传代的细胞随机分成两组:低氧组与常氧组。当细胞进

行传代培养至第 3 代,低氧组细胞形态均一,胞体小,核质比大,细胞大多呈细长梭形,鱼群样分布,增长状态良好(图 1C)。而常氧组细胞形态大小不一,细胞体积较大,胞浆量增多,形态呈多角形或扁平状(图 1D)。



注:(A)低氧条件下体外新分离的细胞,(B)常氧条件下体外新分离的细胞;  
(C)低氧组第 3 代 BMMSCs,(D)常氧组第 3 代 BMMSCs。(200 ×)

图 1 低氧组与常氧组 BMMSCs 形态观察

Note. BMMSCs Newly isolated *in vitro* under hypoxic (A) and normoxic (B) conditions; the 3rd passage of BMMSCs cultured *in vitro* under hypoxia (C) and normoxia (D).

Fig. 1 Morphological observation of BMMSCs in the hypoxia and normoxia groups

## 2.2 低氧对 BMMSCs 体外增殖的影响

采用 CCK-8 法对第 3 代常氧及低氧组 BMMSCs 进行增殖比较分析。结果发现,细胞培养第 1 ~ 2 天两组 BMMSCs 数量差异无显著性;但从第 3 ~ 7 天,低氧组 BMMSCs 数量及生长速率较常氧组明显增加,差异有显著性( $P < 0.05$ )(图 2)。因此推断低氧具有促进 BMMSCs 增殖的作用。

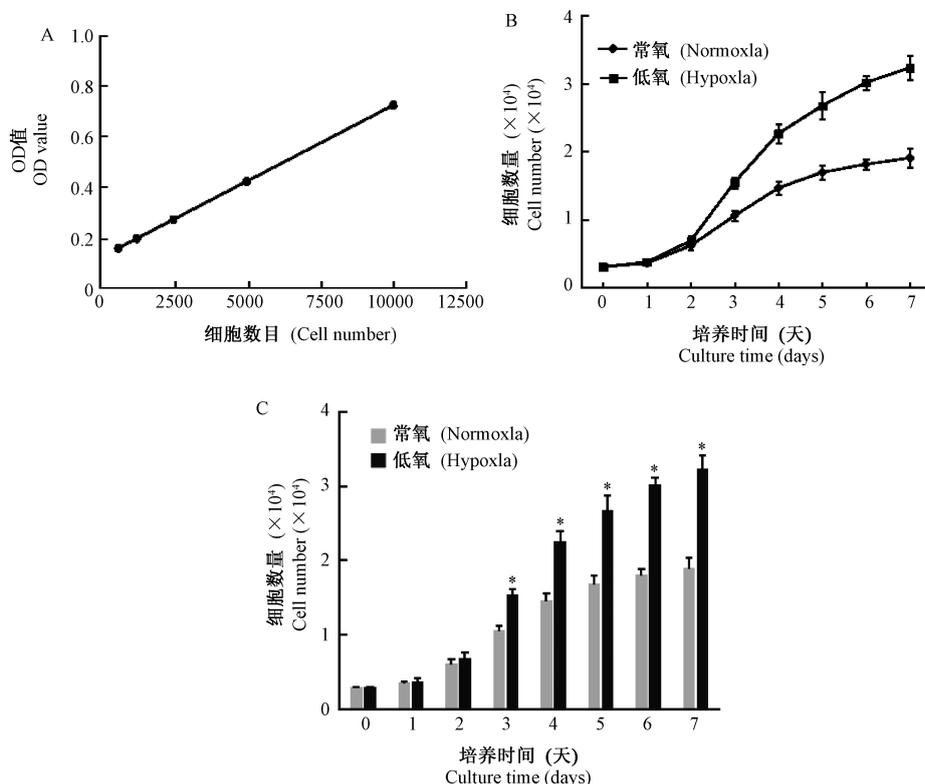
## 2.3 BMMSCs 成骨、成脂分化能力测定

低氧组与常氧组 BMMSCs 成骨诱导培养 14 d 后进行茜素红染色,倒置显微镜下观察均可见红色钙结节(图 3A,B)。低倍镜下观察,低氧组每个视野可见(18.1 ± 3.3)个钙结节,常氧组每个视野可见钙结节数目为(16.5 ± 2.6)个,两组每个视野钙结节数无明显差异( $P > 0.05$ );两组 BMMSCs 成脂诱导培养 14 d 后进行油红 O 染色,均可见红色脂滴出现(图 3C,D)。结果表明低氧环境对 BMMSCs 具

有成骨、成脂诱导分化的作用。

## 3 讨论

BMMSCs 由于具有向多种类型的组织细胞分化的能力,因此被广泛应用于细胞和基因治疗及骨再生组织工程等领域,而如何获得大量纯化并维持其干细胞特性(自我更新和分化潜能)的 BMMSCs 则成为临床干细胞应用成功的前提条件。目前国内学者致力于开发一种有效的 BMMSCs 扩增方法,包括通过改变体外细胞培养基的营养成分、生长因子和缓冲液的 pH 值等<sup>[5,6]</sup>,但很少注意到氧气浓度对细胞增殖的影响。BMMSCs 在体外原代培养中的氧浓度(21%)往往不符合体内生理状态,正常人骨髓是一典型的低氧环境,氧浓度为 1% ~ 7%<sup>[7]</sup>,即正常状态下 BMMSCs 生存在相对缺氧的微环境中。本文通过比较低氧与常氧两种不同体外培养条件



注:(A)一条以细胞数量为横坐标,OD 值为纵坐标的标准曲线;(B)低氧及常氧组 BMMSCs 细胞生长曲线(横坐标为培养时间,纵坐标为细胞数量);(C)低氧组 BMMSCs 在培养第 3 ~ 7 d,生长速率较常氧组增加,差异有显著性(\* $P < 0.05$ )。

**图 2** 低氧组与常氧组 BMMSCs 体外增殖能力

Note. A. Standard curve of cell number (horizontal axis) related to OD value (vertical axis). B. Cell growth curve of BMMSCs in the normoxia and hypoxia groups. The horizontal axis indicates culture time, and the vertical axis indicates cell number.

C. Cell growth rate of BMMSCs in the hypoxia group was increased faster than the normoxia group after culture for 3 ~ 7 d, with a significant difference (\* $P < 0.05$ ).

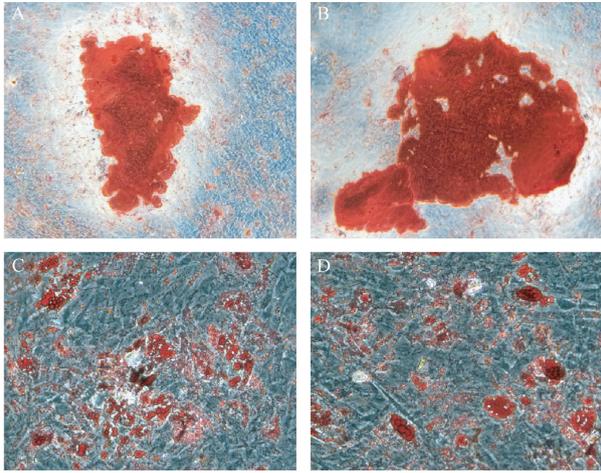
**Fig. 2** Proliferation abilities of BMMSCs in the hypoxia and normoxia groups cultured *in vitro*

对 BMMSCs 增殖的影响,从而建立理想的 BMMSCs 体外扩增方法。

本研究中,新分离的 BMMSCs 在低氧条件下贴壁黏附性差,但在常氧条件下细胞黏附性好,24 h 内即有贴壁细胞生长,推断原代细胞的粘附性可能受到低氧张力的抑制,这种“不贴壁性”可能与其在低氧条件下保持相对“未分化状态”从而维持自我更新的能力相关。D' Ippolito G 等<sup>[8]</sup>证明,低氧环境下细胞转录因子 *Oct-4*、*SSEA-4*(胚胎阶段特异性抗原-4)mRNA 的表达比常氧下高,端粒逆转录酶的活性增加,推断低氧是保持干细胞“未分化状态”的重要因素。常氧培养所有新分离的细胞直到细胞生长达到第 1 次融合,将细胞传代分组,我们发现细胞培养至第 3 代,低氧组细胞保持均一形态,大多呈细长梭形,鱼群样分布,增长状态良好,而常氧组细胞显示多角形或扁平形态。Colter 等<sup>[9]</sup>证实 BMMSCs 至少有两种不同形态细胞,分别为 RS 细胞(spindle-shaped cells)及扁

平状细胞,这两种细胞亚群在细胞传代的过程中数量不同,随着传代次数增加,细胞可出现明显的衰老标志,形态由梭形变为伸展扁平状。因此,本结果提示低氧培养可起到防止细胞衰老的作用,可以用于长期的体外扩增并维持其干细胞潜能。与我们的研究相似,Tsai 等也证实 1% 氧浓度培养 BMMSCs 可以减缓衰老<sup>[10]</sup>。之后,我们采用 CCK-8 法对第 3 代 BMMSCs 在常氧及低氧环境下进行增殖比较分析,结果发现低氧组 BMMSCs 在培养第 3 ~ 7 天细胞数量及生长速率较常氧组增加,提示低氧具有促进 BMMSCs 增殖的作用。同时对两组 BMMSCs 进行成骨、成脂诱导分化培养,均可见红色钙结节及红色脂滴形成,推断低氧并未改变 BMMSCs 向成骨、成脂细胞诱导分化的能力。

关于低氧如何调节 BMMSCs 的增殖及分化,其机制尚不清楚,大多数研究认为与低氧诱导细胞产生的低氧诱导因子通过调控转录因子 *Oct-4*、*Sox2* 和



注: (A, B) 低氧组与常氧组 BMMSCs 体外成骨诱导培养 14 d 茜素红染色; (C, D) 低氧组与常氧组 BMMSCs 体外成脂诱导培养 14 d 油红 O 染色。(200 ×)

**图 3** 低氧组与常氧组 BMMSCs 体外成骨、成脂细胞诱导

Note. (A, B) Induction of osteoblast differentiation of BMMSCs after culture *in vitro* under hypoxia (A) and normoxia (B) for 14 d, Alizarin red staining. (C, D) Induction of adipocyte differentiation of BMMSCs after culture *in vitro* under hypoxia (C) and normoxia (D) for 14 d. Oil-red O staining.

**Fig. 3** Induction of osteoblast and adipocyte differentiation of BMMSCs after culture under hypoxia and normoxia

*Nanog* 的表达有关<sup>[11]</sup>。然而,由于间充质干细胞的来源不同、细胞接种密度不同、低氧浓度的不同及低氧培养时间不同,低氧对间充质干细胞的增殖效率的报道结果也不尽相同。一些研究发现低氧有明显的抑制细胞增殖作用<sup>[12,13]</sup>,也有发现低氧增加增殖能力或延长寿命<sup>[14,15]</sup>。本研究选择 5% 氧浓度、持续长时间的培养及合适的细胞接种密度证实低氧对 BMMSCs 增殖起促进作用。

总之,我们的研究结果证实低氧在促进 BMMSCs 的增殖及维持其多向分化潜能中起着至关重要的作用。另一方面,低氧反映干细胞增殖与分化的真实微环境,通过体外模拟 BMMSCs 体内的低氧环境,可以更好地了解细胞生物学特性及其再生潜能,这将为 BMMSCs 的大量获取及其作为种子细胞应用于细胞、基因治疗及组织工程提供参考依据。

#### 参考文献:

[ 1 ] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. *Nature*, 2002, 418(6893): 41-49.  
[ 2 ] Scotti C, Piccinini E, Takizawa H, et al. Engineering of a functional bone organ through endochondral ossification[J]. *Proc*

*Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(10): 3997-4002.  
[ 3 ] Arvidson K, Abdallah BM, Applegate LA, et al. Bone regeneration and stem cells[J]. *J Cell Mol Med*, 2011, 15(4): 718-746.  
[ 4 ] Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, et al. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cells*, 2006, 24(2): 462-471.  
[ 5 ] Chen HH, Decot V, Ouyang JP, et al. *In vitro* initial expansion of mesenchymal stem cells is influenced by the culture parameters used in the isolation process[J]. *Biomed Mater Eng*, 2009, 19(4-5): 301-309.  
[ 6 ] Yuan Y, Kallos MS, Hunter C, et al. Improved expansion of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in microcarrier-based suspension culture[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2014, 8(3): 210-225.  
[ 7 ] Chow DC, Wenning LA, Miller WM, et al. Modeling pO<sub>2</sub> distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models[J]. *Biophys J*, 2001, 81(2): 685-696.  
[ 8 ] D'Ippolito G, Diabira S, Howard GA, et al. Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MIAMI cells[J]. *Bone*, 2006, 39(3): 513-522.  
[ 9 ] Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(14): 7841-7845.  
[ 10 ] Tsai CC, Chen YJ, Yew TL, et al. Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through down-regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST[J]. *Blood*, 2011, 117(2): 459-469.  
[ 11 ] Forristal CE, Wright KL, Hanley NA, et al. Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions[J]. *Reproduction*, 2010, 139(1): 85-97.  
[ 12 ] Holzwarth C, Vaegler M, Gieseke F, et al. Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells[J]. *BMC Cell Biol*, 2010, 11:11.  
[ 13 ] Ren H, Cao Y, Zhao Q, et al. Proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells under hypoxic conditions[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 347(1): 12-21.  
[ 14 ] Fehrer C, Brunauer R, Laschober G, et al. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan[J]. *Aging Cell*, 2007, 6(6): 745-757.  
[ 15 ] Nekanti U, Dastidar S, Venugopal P, et al. Increased proliferation and analysis of differential gene expression in human Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells under hypoxia[J]. *Int J Biol Sci*, 2010, 6(5): 499-512.