

石桂英,黄艺滢,雷雪裴,等. 小鼠肺间充质干细胞的分离、培养和鉴定 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(8): 16-20.
Shi GY, Huang YY, Lei XP, et al. Isolation, culture, and characterization of mouse lung-resident mesenchymal stem cells [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(8): 16-20.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.08.003

小鼠肺间充质干细胞的分离、培养和鉴定

石桂英,黄艺滢,雷雪裴,路亚岚,白琳*

(中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,国家卫生健康委员会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)

【摘要】目的 建立稳定的小鼠肺间充质干细胞分离、培养、鉴定技术,利用小鼠肺间充质干细胞研究肺组织修复和再生机制。**方法** 无菌分离小鼠肺,采用胶原酶消化和组织贴壁法分离培养肺间充质干细胞,观察细胞形态和生长特性,流式分析细胞表面标记,进行体外成脂、成骨诱导分化。**结果** 两种方法都成功分离培养了肺间充质干细胞,流式分析显示 Sca-1、CD90、CD29、CD44 均为高表达,CD31、CD45 均为低表达。体外诱导后,肺间充质干细胞可以分化成脂肪细胞和成骨细胞。**结论** 本研究利用两种方法分离培养小鼠肺间充质干细胞,两种分离方法获得的细胞均具有间充质干细胞类似的表面标记物,具有成脂、成骨分化能力。

【关键词】 肺间充质干细胞;流式分析;诱导分化

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 08-0016-05

Isolation, culture, and characterization of mouse lung-resident mesenchymal stem cells

SHI Guiying, HUANG Yiyong, LEI Xuepei, LU Yalan, BAI Lin*

(Institute of Laboratory Key Laboratory of Human Disease Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences(CAMS); Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College(PUMC), Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, National Health Commission of the People's Republic of China; Key Laboratory of Human Disease Key Laboratory of Human Disease Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To establish a stable method for the isolation, culture, and characterization of mouse lung-resident mesenchymal stem cells, which will then be used to study lung repair and regeneration mechanisms. **Methods** Mouse lungs were obtained via germ-free procedures and were mechanically minced and/or digested with collagenase. Cell morphology was observed by phase-contrast microscopy, cell surface markers were detected by flow cytometry, and cells were induced to differentiate into adipocytes or osteoblasts. **Results** We successfully isolated and cultured mouse lung-resident mesenchymal stem cells. FACS analysis demonstrated high expressions of Sca-1, CD90, CD29, and CD44, and low expressions of CD31 and CD45. The lung-resident stem cells differentiated into adipocytes or osteoblasts. **Conclusions** We isolated cells that expressed mesenchymal stem cell markers and had multi-directional differentiation ability.

【Keywords】 lung-resident mesenchymal stem cell; FACS analysis; induced differentiation

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(31672374);中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2019-I2M-1-006);北京市自然科学基金重点项目(5171001)。

【作者简介】 石桂英,女,副主任技师,研究方向:干细胞临床转化。E-mail:guiying_shi77@163.com

【通信作者】 白琳,女,副研究员,研究方向:干细胞临床转化。E-mail:bailin49@163.com

间充质干细胞是一群能够形成克隆的成纤维样细胞。国际细胞和基因治疗学会(International Society for Cell & Gene Therapy, ISCT)对间充质干细胞的分类标准是:高表达 CD73、CD90 和 CD105,不表达血液细胞标记如 CD34、CD45、CD11b 等^[1]。间充质干细胞在组织再生修复、免疫调节等方面具有重要作用,在各组织器官中都有组织特异性的间充质干细胞^[2]。肺作为多种动物的呼吸器官,机体通过肺与外界环境进行气体交换,各种有害物质如化学氧化剂、蛋白酶、病毒、细菌等都可造成肺损伤。尽管存在众多因素会导致肺损伤,但正常个体仍能保持正常的肺功能,这说明肺部具有强大的损伤修复和再生能力^[3]。肺间充质干细胞(lung-resident mesenchymal stem cell, lr-MSc)首先是在肺灌洗液中发现的,2014 年 Rolandsson 等^[4]在支气管壁和肺实质的血管周组织中分离出 lr-MSc,证实了 lr-MSc 的位置和表型等特征。与骨髓间充质干细胞相比,lr-MSc 表达相似的表面蛋白,在转录组、蛋白质组和分泌组学等方面均有所不同^[5-6],其在肺生理和病理过程中的作用,以及在治疗肺部疾病中的应用前景,还有待深入研究^[2]。

本项目从 C57BL/6J 小鼠中利用两种方法分离培养了 lr-MSc,对其的形态、生长特性、表面标记物及多向分化能力进行分析,发现 lr-MSc 为成纤维样细胞,表达 Sca-1、CD90、CD29、CD44 等干细胞表面标记,不表达血管内皮标记 CD31 和白细胞表面标记 CD45,具有成脂、成骨分化能力。lr-MSc 的分离、培养和鉴定可以为研究 lr-MSc 的功能提供体外模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57 小鼠 6 只,体重 18~22 g,4 周龄,雌雄各半,购自北京华阜康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2020-0004],实验操作在研究所解剖室进行[SYXK(京)2019-0014],实验方案经本研究所实验动物使用与管理委员会审批(BL17002),实验中按实验动物使用的 3R 原则执行。

1.2 主要试剂与仪器

细胞培养用胎牛血清(批号:1908360C)、 α -MEM(批号:2120408)、DPBS(批号:2120391)、青链霉素(批号:2076677)、胰酶(批号:2062475)、流式抗体等均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;组

织消化用 I 型胶原酶(批号:9001-12-1)购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;成骨(批号:191002G001、成脂(批号:191107G001)诱导培养液均购自赛业(苏州)生物科技有限公司;流式细胞仪为 Aria II,购自美国 Becton Dickinson 公司;CO₂ 培养箱购自美国 Thermo 公司;倒置荧光显微镜购自德国 Leica 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 肺间充质干细胞的分离培养

脱颈椎处死小鼠,75%乙醇浸泡消毒后,置于超净台上,无菌条件下分离肺组织,用 PBS 冲洗干净,剪成 1 mm³ 小组织块,一半加入 α -MEM 完全培养基(含 10%胎牛血清、1%青链霉素)直接接种 6 孔板,37℃,5% CO₂ 培养,每 3 d 换液,细胞从组织块爬出融合达 80%左右时,胰酶消化细胞进行传代,同时去除组织块;另一半加入等体积 0.1%胶原酶 I,37℃振荡消化 2 h,加入等体积 PBS 后离心,1500 r/min,5 min,弃上清,加入 2 mL α -MEM 完全培养基,经 70 μ m 细胞筛过滤,计数,接种到 6 孔板,10⁶ 细胞/孔,37℃,5% CO₂ 培养。24 h 后换液,此后每 3 d 换液,细胞融合达 80%左右时,进行传代。

1.3.2 生长曲线测定

取第 3 代生长状态良好的细胞,接种 24 孔板,10⁴ 个/孔。自接种后第 2 天起,每隔 48 h 取 3 孔消化计数,记录细胞数,绘制生长曲线。

1.3.3 流式细胞术检测干细胞比例

取第 3 代生长状态良好的细胞,胰酶消化收集细胞,计数,离心,1500 r/min,5 min,弃上清,加入适量 PBS,调整细胞浓度为 10⁷/mL,取 10⁶ 细胞加入流式抗体,进行染色,4℃,30 min。染色抗体为:CD31-FITC, CD90-FITC, CD29-PE, CD45-PE, Sca-1-PE-cy7, CD44-APC-cy7。

1.3.4 诱导成脂

取第 3 代生长状态良好的细胞,接种 24 孔板,10⁴ 个/孔,37℃,5% CO₂ 培养,当细胞融合达 80%以上时,吸弃培养基,加入 2 mL 成脂诱导培养基,之后每 3 d 换液,诱导 21 d 左右,观察细胞变化,对照组加 α -MEM 完全培养基。成脂鉴定采用油红 O 染色:吸弃诱导培养基,加 PBS 洗 2 次;加 4%多聚甲醛固定 30 min;吸弃多聚甲醛固定液,加入 60%异丙醇洗 2 次;加入油红 O 染色液,染色 60 min;吸弃染色液,加 PBS 洗 3 次,倒置显微镜观察、拍照。

1.3.5 诱导成骨

取第 3 代生长状态良好的细胞,接种 24 孔板, 10^4 个/孔, 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 培养,当细胞融合达 $60\% \sim 80\%$ 时,吸弃培养基,加入 2 mL 成骨诱导培养基,之后每 3 d 换液,诱导 21 d 左右。成骨鉴定采用茜素红染色:吸弃诱导培养基,加 PBS 洗 2 次;加 4% 多聚甲醛固定 30 min;吸弃多聚甲醛固定液,加茜素红染色液,染色 5 min;吸弃染色液,加 PBS 洗 3 次,倒置显微镜观察、拍照。

1.4 统计学方法

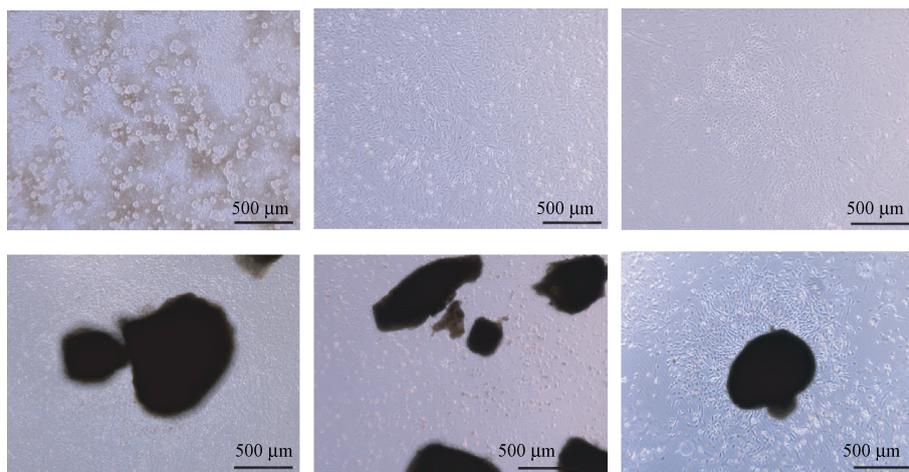
数据统计分析采用 GraphPad Prism 6 软件,结

果用平均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较用 t 检验, $P < 0.05$,认为差异显著,有统计学意义。

2 结果

2.1 生长特性

本实验采用胶原酶消化和肺组织块直接培养两种方法分离 lr-MSc。胶原酶消化法,在接种后第 2 天即可见细胞贴壁,之后迅速扩增;而组织块培养法,细胞贴壁较慢,第 4 天时可见细胞贴壁(图 1)。两种方法分离的细胞传代至第三代时,细胞均为成纤维样形态,传代时间基本一致(图 2)。

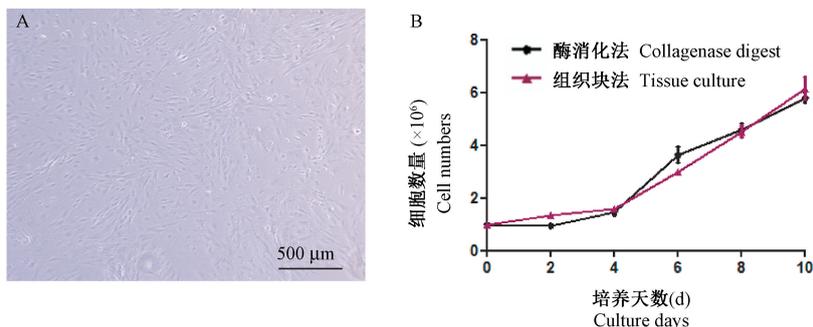


注:上行为肺组织经胶原酶 I 消化后细胞贴壁生长状态,从左到右依次为培养 2、5、8 d 的细胞;下行为肺组织直接培养的细胞贴壁生长状态,从左到右依次为培养 2、5、8 d 的细胞。

图 1 原代肺间充质干细胞的贴壁生长状态

Note. Upper line shows the status of cell adherent growth after collagenase I digestion, from left to right, the culture day is 2, 5, 8 days. Next line shows the status of cell adherent growth with lung tissues, from left to right, the culture day is 2, 5, 8 days.

Figure 1 Lung mesenchymal stromal cells



注:A:细胞形态;B:生长曲线。

图 2 肺间充质干细胞的形态和生长曲线

Note. A, Cell morphology. B, Growth curve.

Figure 2 Morphology and growth curve of lung mesenchymal stromal cells

2.2 干细胞比例

取第三代细胞标记间充质干细胞表面标记物, 阴性标记物 CD45、CD31 均为低表达, 阳性标记物 Sca-1、CD90、CD29、CD44 的表达量均在 90% 以上 (图 3)。从细胞表面标记物表达来看, 所得细胞符合干细胞特性。

2.3 诱导成脂能力

为检测 lr-MSC 的成脂分化能力, 取第三代细胞接种至 24 孔板, 成脂诱导液诱导 21 d 后, 油红 O 染色, 可见细胞内有红色脂滴, 但仍有部分细胞未分化为脂肪细胞 (图 4)。

2.4 诱导成骨能力

为检测 lr-MSC 的成骨分化能力, 取第三代细胞接种至 24 孔板, 成骨诱导液诱导 21 d 后, 茜素红染色, 可见钙盐沉积着红色 (图 5)。

3 讨论

作为机体与外环境进行气体交换的器官, 肺组织结构复杂, 构成细胞较多, 包括多种上皮细胞、内皮细胞和间充质细胞等^[7]。Hegab 等^[8]分离了 lr-MSC, 发现这些细胞表型为 Sca1⁺ CD45⁻ CD31⁻, 体外培养时能够自我更新, 并能分化成内皮细胞、肺泡上皮细胞等, 同时还具有间充质干细胞的特性; 将 lr-MSC 移植到肺损伤小鼠模型中, 可以提高小鼠的生存率, 减少肺损伤。已有研究表明, lr-MSC 是肺组织修复和再生的重要调节因子, 特发性肺纤维化是由 lr-MSC 分化为成肌细胞所导致的^[9-10]。本研究采用胶原酶消化和肺组织块直接培养两种方法分离 lr-MSC。胶原酶消化法, 细胞贴壁快, 可在较短时间内获得大量细胞; 而组织块培养法, 细胞

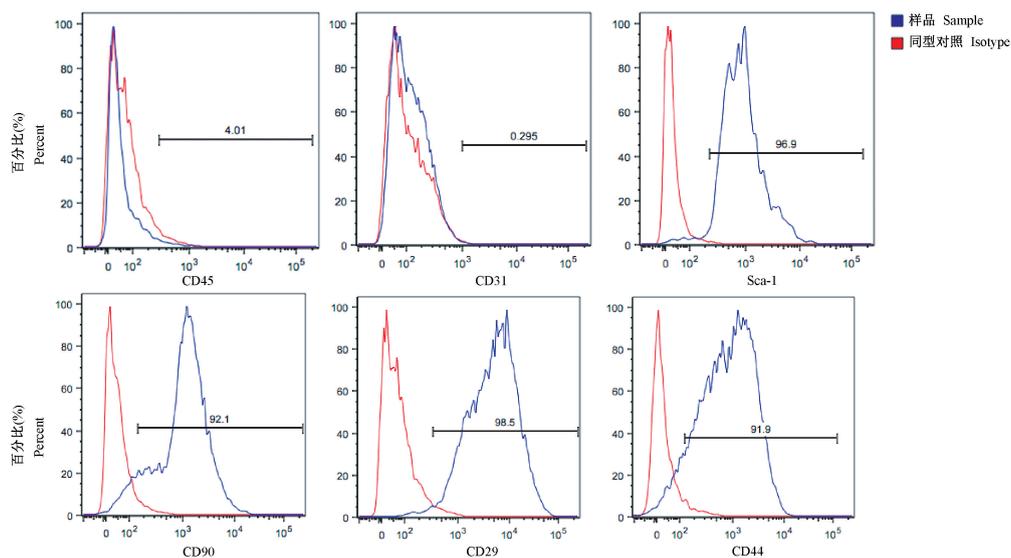
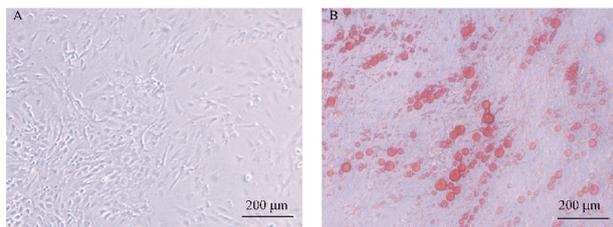


图 3 肺间充质干细胞的表面标记流式分析

Figure 3 FACS results for the surface markers of lung mesenchymal stromal cells

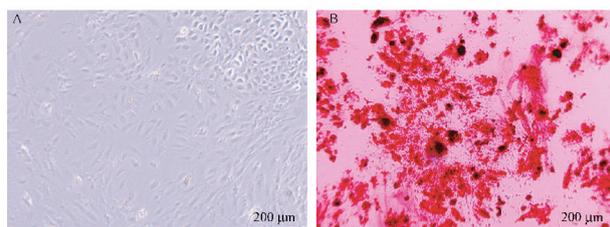


注: A: 对照组; B: 诱导组。

图 4 肺间充质干细胞成脂分化

Note. A, Control group. B, Induced group.

Figure 4 Adipogenic differentiation of lung mesenchymal stromal cells



注: A: 对照组; B: 诱导组。

图 5 肺间充质干细胞成骨分化

Note. A, Control group. B, Induced group.

Figure 5 Osteogenic differentiation of lung mesenchymal stromal cells

贴壁较慢,第 4 天时可见细胞贴壁。在之后的传代过程中,两种方法分离所得细胞的增殖速度基本一致。本研究两种方法分离的细胞表型无差别,与 Hegab 等^[8]分离的细胞表型一致,表现为 $Scal^+ CD45^- CD31^- CD90^+ CD29^+ CD44^+$ 。在分化能力方面,本研究进行了成脂和成骨诱导分化,诱导 21 d 后分别形成了脂滴和钙盐沉积,可见所得 lr-MSc 具有多向分化能力。在诱导 21 d 后仍有部分细胞未分化,这可能与诱导液的诱导效率、诱导时间,以及 lr-MSc 细胞组成等有关,在后续研究中将调整诱导液各组分的浓度、延长诱导时间以提高诱导效率,同时分析 lr-MSc 多种表面标记,以深入了解 lr-MSc 的细胞组成情况。

本研究成功分离获得了 lr-MSc,建立了稳定的 lr-MSc 分离、培养和鉴定技术体系,这将为后续深入研究提供基础。

参考文献:

- [1] Jiang W, Xu J. Immune modulation by mesenchymal stem cells [J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(1): e12712.
- [2] Sveiven SN, Nordgren TM. Lung-resident mesenchymal stromal cells are tissue-specific regulators of lung homeostasis [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2020, 319(2): L197-L210.
- [3] Kotton DN, Fine A. Lung stem cells [J]. *Cell Tissue Res*, 2008, 331(1): 145-156.
- [4] Rolandsson S, Andersson Sjöland A, Brune JC, et al. Primary

mesenchymal stem cells in human transplanted lungs are CD90/CD105 perivascularly located tissue-resident cells [J]. *BMJ Open Respir Res*, 2014, 1(1): e000027.

- [5] Rolandsson Enes S, Andersson Sjöland A, Skog I, et al. MSC from fetal and adult lungs possess lung-specific properties compared to bone marrow-derived MSC [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 29160.
- [6] Rolandsson Enes S, Åhrman E, Palani A, et al. Quantitative proteomic characterization of lung-MSc and bone marrow-MSc using DIA-mass spectrometry [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 9316.
- [7] Schiller HB, Montoro DT, Simon LM, et al. The human lung cell atlas: a high-resolution reference map of the human lung in health and disease [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2019, 61(1): 31-41.
- [8] Hegab AE, Kubo H, Fujino N, et al. Isolation and characterization of murine multipotent lung stem cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2010, 19(4): 523-536.
- [9] Cao H, Chen X, Hou J, et al. The Shh/Gli signaling cascade regulates myofibroblastic activation of lung-resident mesenchymal stem cells via the modulation of Wnt10a expression during pulmonary fibrogenesis [J]. *Lab Invest*, 2020, 100(3): 363-377.
- [10] Wang C, Cao H, Gu S, et al. Expression analysis of microRNAs and mRNAs in myofibroblast differentiation of lung resident mesenchymal stem cells [J]. *Differentiation*, 2020, 112: 10-16.

[收稿日期] 2020-11-05