

廖新爱,蔡丹妮,游若兰,等. 小鼠骨髓间充质干细胞分离方法的比较与探讨 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(1): 1-9.

Liao XA, Cai DN, You RL, et al. Comparison and discussion of methods for isolating mouse bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(1): 1-9.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.01.001

小鼠骨髓间充质干细胞分离方法的比较与探讨

廖新爱,蔡丹妮,游若兰,黄慧芳*

(福建医科大学附属协和医院 中心实验室,福州 350001)

【摘要】 目的 探讨可高效分离小鼠骨髓间充质干细胞(mBMSCs)的技术方法。**方法** 分别采用骨片消化爬片法、全骨髓贴壁法、骨片消化液上清法和骨片消化研钵法等四种方法分离 7 ~ 9 周龄雄性 C57BL/6 小鼠的 mBMSCs;于倒置显微镜下观察原代 mBMSCs 形态;运用流式细胞术检测 mBMSCs 特征性免疫表型;采用多向分化诱导检测 mBMSCs 成骨分化能力与成脂分化能力。**结果** 分离获得的原代细胞首次换液后于倒置显微镜下观察:骨片消化爬片法分离的细胞,仅见大量骨碎片和杂细胞,该法所分离细胞不再进行后续检测评估;全骨髓贴壁法分离的细胞,仅可见少量多角形贴壁细胞,夹杂大量杂细胞;骨片消化液上清法分离的细胞也可见较多长梭形、三角形贴壁细胞,但杂细胞较多;骨片消化研钵法分离的细胞,可见较多长梭形、多角形贴壁细胞,杂细胞少。分离细胞经培养传代到第 3 代(P3 代)时,一方面采用流式细胞术分析 mBMSCs 特征性免疫表型,结果表明骨片消化液上清法和骨片消化研钵法分离的 mBMSCs 纯度均较高,全骨髓贴壁法不理想;另一方面,进行成骨分化诱导与成脂分化诱导,结果表明与全骨髓贴壁法分离的细胞相比,骨片消化液上清法和骨片消化研钵法所分离出的细胞具有较强的多向分化潜能。**结论** 骨片消化液上清法和骨片消化研钵法分离获得的 mBMSCs 纯度较高、质量较好。

【关键词】 小鼠骨髓间充质干细胞;骨片消化爬片法;全骨髓贴壁法;骨片消化液上清法;骨片消化研钵法

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 01-0001-09

Comparison and discussion of methods for isolating mouse bone marrow mesenchymal stem cells

LIAO Xinai, CAI Danni, YOU Ruolan, HUANG Huifang*

(Central Laboratory of Fujian Medical University Union Hospital, Fujian University, Fuzhou 350001, China)

Corresponding author: HUANG Huifang. E-mail:huanghuif@fjmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To achieve the efficient isolation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells (mBMSCs). **Methods** mBMSCs from C57BL/6 mice, aged 7 to 9 weeks, were isolated by four method: the bone fragment digestion and crawl method, whole-bone-marrow adherent method, bone fragment digestive fluid supernatant method, and bone fragment digestion and mortar method. An inverted microscope was used to observe the morphology of the mBMSCs, and their characteristic immunophenotype was detected by flow cytometry. The osteogenic and adipogenic differentiation abilities of mBMSCs were detected through multidirectional differentiation induction. **Results** Isolated primary cells were observed under an inverted microscope after the first fluid change. A large number of bone fragments and miscellaneous cells only were found in the primary cells isolated by the bone fragment digestion and crawl method, and this method was no longer evaluated. Only a small number of polygonal adherent cells and a large number of miscellaneous cells were observed in the whole-bone-marrow adherent-extracted sample. The cells isolated by the bone fragment digestive fluid supernatant method were longer spindle-shaped and triangular adherent cells, but there were many miscellaneous cells. The

[基金项目] 国家自然科学基金(82070145),高水平实验研究平台建设项目(闽 201704)。
Funded by National Natural Science Foundation of China(82070145), the Government-Funded of the Construction Project of High-Level Laboratory (Min201704)。

[作者简介] 廖新爱(1992—),女,在读博士研究生,研究方向:骨髓微环境与血液肿瘤化疗耐药。Email:lxanewlove@outlook.com

[通信作者] 黄慧芳(1971—),女,教授,研究方向:骨髓微环境与血液肿瘤化疗耐药。Email:huanghuif@fjmu.edu.cn

cells isolated by the bone fragment digestion and mortar method were longer spindle-shaped and polygonal adherent cells, and there were fewer miscellaneous cells. The isolated cells were cultured to passage 3, and the characteristic immunophenotypes of mBMSCs were analyzed by flow cytometry. The result showed that the purity of mBMSCs isolated via the bone fragment digestive fluid supernatant method and bone fragment digestion and mortar method was higher than that of cells isolated via the whole-bone-marrow adherent method. When osteogenic differentiation and adipogenic differentiation were induced, cells isolated by the bone fragment digestive fluid supernatant method and bone fragment digestion and mortar method had stronger multidirectional differentiation potential than those isolated with the whole-bone-marrow adherent method. **Conclusions** mBMSCs isolated using the bone fragment digestive fluid supernatant method and the bone fragments digestion and mortar method were of higher purity and quality than those from the other method.

【Keywords】 mouse bone-marrow mesenchymal stem cell; bone fragment digestion and crawl method; whole-bone-marrow adherent method; bone fragment digestive fluid supernatant method; bone fragment digestion and mortar method

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

骨髓间充质干细胞 (bone-marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 是位于骨髓间质的非造血干细胞, 低免疫原性, 具有自我更新能力和多向分化潜能, 可分化为脂肪细胞、成骨细胞、成软骨细胞、神经细胞、心肌细胞和上皮细胞等^[1-2]。BMSCs 可有效调节炎症组织中的免疫细胞, 促进血管生成, 重塑细胞外基质, 诱导祖细胞分化, 促进组织修复等^[3]; 已被应用于治疗移植抗宿主病^[4]、自身免疫性疾病^[1]、骨关节疾病^[5]和心肌梗死^[6]等疾病。同时, BMSCs 可通过分泌细胞因子、生长因子、抗炎因子和外泌体等, 影响肿瘤细胞的增殖、凋亡、侵袭、迁移和化疗敏感性^[7]。体外研究探讨 BMSCs 的作用机制可为更好地将 BMSCs 运用于临床奠定坚实的理论基础, 要在体外开展相关研究的前提与关键是获得纯度较高、质量较好、数量充足的 BMSCs。

小鼠是开展基础研究最常用的一种实验动物, 小鼠骨髓间充质干细胞 (mouse bone-marrow mesenchymal stem cells, mBMSCs) 被广泛应用于体外实验研究^[8]。但 mBMSCs 在骨髓中含量低, 易受造血细胞污染, 较难获得较大数量高纯度的 mBMSCs^[9]。全骨髓贴壁法^[10-14]和骨片消化爬片法^[15-18]是目前较常用的 mBMSCs 分离方法, 但我们采用这两种方法分离获得的 mBMSCs 纯度均较低。有研究报道, 人骨小梁经胶原酶消化后, 可在消化液中获得 BMSCs, 所以我们收集了骨片经胶原酶处理后的消化液上清, 离心获得沉淀细胞进行培养, 并将该法命名为骨片消化液上清法^[19]。该法与骨片消化爬片法的主要区别在于: 骨片消化爬片法收集的是胶原酶消化后的骨片, 骨片消化液上清法收集的是胶原酶消化后的上清液。2012 年 Houlihan 等^[20]在 *Nat Protoc* 报道了可采用骨片消化研钵法分离 mBMSCs。因此, 本文比较分析了骨片消化爬片

法、全骨髓贴壁法、骨片消化液上清法和骨片消化研钵法等四种方法所分离培养的 mBMSCs 的纯度和分化能力, 希望能从中筛选出高效分离 mBMSCs 的技术方法。

在形态上, mBMSCs 与成纤维细胞难以区分, 且 mBMSCs 表面缺乏特异标记分子^[21], 根据国际细胞治疗协会 (ICST) 提出的鉴定人间充质干细胞标准^[22], 目前比较公认的鉴定 mBMSCs 必须同时满足以下 3 点^[23]: (1) 在标准培养条件下, mBMSCs 贴壁, 呈成纤维细胞样; (2) mBMSCs 表达非造血干细胞表面抗原, 如 Sca-1、CD140a、CD29、CD44、CD54、NST、CD81、CD106 等, 同时不表达造血细胞、内皮细胞的表面抗原, 如 CD45、CD11b、CD31、CD48、CD117、CD135 等^[20, 24]; (3) 具有多向分化潜能, 可诱导分化为成骨细胞、脂肪细胞和成软骨细胞等。因此, 我们将从细胞形态学、免疫表型和分化潜能等 3 个指标评价不同方法所分离获得的 mBMSCs 的纯度与质量。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

7 ~ 9 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 12 只, 体重为 18 ~ 20 g, 购买于广东药康生物科技有限公司【SCXK(粤)2020-0054】。饲养期间小鼠自由饮水, 温度 22 ~ 25℃, 湿度恒定, 昼夜各半循环照明, 饲喂普通饲料由福建医科大学动物实验中心提供, 饲养于福建医科大学动物实验中心【SYXK(闽)2020-0005】。本实验所有操作均遵循福建医科大学实验动物伦理委员会的伦理批件(2021-0281)。

1.1.2 主要试剂与仪器

MEM Alpha Modification (1 ×) (SH30165.01,

Hyclone); DMEM 高糖培养基 (D5796, Sigma); 青、链霉素双抗 (CC-0111, 北京鼎国昌盛公司); 胶原酶 II (C8150, Solarbio); OriCell® 小鼠骨髓间充质干细胞成脂诱导分化试剂盒 (MUXMX-90031, Cyagen Biosciences); 抗坏血酸 (A103539, Aladdin); 地塞米松 (D1756, Sigma); β-磷酸甘油 (G9422, Sigma); 茜素红 (ALIR-10001, Cyagen Biosciences); 抗小鼠 FITC-CD45、PE-CD44、PE-CD140a、PerCP/Cyanine5.5-CD29、APC-Sca-1、APC-CD105、APC-CD54 (103107, 103023, 135905, 102227, 108111, 120413, 116119, Biolegend); 胎牛血清 (F8318, Sigma); 胰蛋白酶粉末 (ET355-25G, Genview); EDTA 粉末 (NEP046, Genview); 磷酸盐缓冲剂 (BF-0013, 北京鼎国昌盛公司); 4% 组织细胞固定液 (AR-0212, 北京鼎国昌盛公司); 10% 十六烷基氯化吡啶 (H108697, Aladdin); 异丙醇 (2020, 中国西陇科学); 三溴乙醇 (#HY-B1372/CS-4901, MCE); 叔戊醇 (A-103418, Aladdin)。

BD FACS Celesta (Becton, Dickinson and Company, 美国); 倒置显微镜及图像采集系统 (Leica, 德国); 酶标仪 (Agilent, 美国); 二氧化碳培养箱 (Thermo Fisher Scientific, 美国); 多用途旋转摇床 (Kylin-Bell, 中国); 生物安全柜 (苏州安泰空气技术有限公司); 离心机 (湖南湘仪科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 分离细胞

骨片消化爬片法^[25]、全骨髓贴壁法^[15]、骨片消化液上清法和骨片消化研钵法^[20]分离 mBMSCs 具

体步骤, 详见表 1。

(1) 分离下肢骨和冲洗骨髓腔: 阿佛丁麻醉后颈椎脱臼法处死小鼠, 小鼠于 75% 乙醇浸泡 3 ~ 5 min, 用镊子捏起小鼠两髋关节之间腹部皮肤, 剪开, 分离两下肢皮肤, 向下在踝处, 向上在髋关节处剪断, 游离出两条下肢, 更换新的剪刀、镊子、纱布, 将附着于股骨和胫骨的肌肉和筋膜处理干净, 将处理好的股骨和胫骨放置于含 2% FBS 的 PBS 中, 移入生物安全柜, 剪开股骨、胫骨干骺端, 暴露骨髓腔, 用 1 mL 注射器吸取含 2% FBS 的 PBS 液反复冲洗小鼠股骨、胫骨髓腔, 直至变白。

(2) 过滤骨髓液: 冲出的骨髓液经 70 μm 细胞过滤器过滤。

(3) 剪碎骨片: 骨倒入含 2% FBS 的 PBS 的研钵中, 剪刀将骨头剪碎至 1 ~ 3 mm³。

(4) 捣磨骨碎片: 骨片在研钵中用杵轻轻压碎, 捣磨骨髓的缓冲液弃去, 添加新鲜的含 2% FBS 的 PBS 重复捣磨并清洗 2 ~ 3 次后, 骨头碎片变成豆腐渣状并且捣磨骨髓的缓冲液清澈时可停止研钵。

(5) 胶原酶 II 消化: 用镊子将碎骨移至 15 mL 离心管, 加入含胶原酶 II (终浓度为 1 mg/mL) 的 DMEM 培养液 (加入量覆盖骨片), 多用途旋转摇床 110 r/min, 37℃ 孵育 1.5 h, 骨碎片松散时停止。

(6) 清洗骨碎片: 弃去上清消化液, α-MEM 完全培养基洗骨碎片 3 次, 将骨碎片移至 25 T 培养瓶, 加入 α-MEM 完全培养基。

(7) 过滤消化液并终止消化: 用 70 μm 细胞过滤器过滤胶原酶消化过的细胞悬液于 50 mL 离心

表 1 四种方法分离 mBMSCs 步骤

分离方法 Isolation methods	步骤 Steps
骨片消化爬片法 Bone fragment digestion and crawl method	分离下肢骨和冲洗骨髓腔+剪碎骨片+胶原酶 II 消化+清洗骨碎片+细胞培养 Isolating lower limb bone and cleaning of bone marrow cavity + cutting bone + collagenase II digestion+ washing bone fragments + culturing cells
全骨髓贴壁法 Whole-bone-marrow adherent method	分离下肢骨和冲洗骨髓腔+过滤骨髓液+重悬细胞沉淀+细胞培养 Isolating lower limb bone and cleaning of bone marrow cavity + filtering bone marrow fluid + resuspending cell precipitation + culturing cells
骨片消化液上清法 Bone fragment digestive fluid supernatant method	分离下肢骨和冲洗骨髓腔+剪碎骨片+胶原酶 II 消化+过滤消化液并终止消化+ 重悬细胞沉淀+细胞培养 Isolating lower limb bone and cleaning of bone marrow cavity + cutting bone + collagenase II digestion + filtering digestive fluid and stopping digestion + resuspending cell precipitation + culturing cells
骨片消化研钵法 Bone fragment digestion and mortar method	分离下肢骨和冲洗骨髓腔+剪碎骨片+捣磨碎片+胶原酶 II 消化+过滤消化液并终止消化+ 再次捣磨并清洗收集细胞悬液+重悬细胞沉淀+细胞培养 Isolating lower limb bone and cleaning of bone marrow cavity + cutting bone + crushing bone fragments + collagenase II digestion + filtering digestive fluid and stopping digestion+ crushing again and washing to collect cell suspension+ resuspending cell precipitation + culturing cells

管,并将胶原酶细胞悬液置于冰上使胶原酶灭活。

(8)再次捣磨并清洗收集细胞悬液:将剩余骨碎片置于研钵中,用 5 mL 含 2% FBS 的 PBS 重悬,并用杵将骨碎片轻压 50 次,再加入 5 mL 含 2% FBS 的 PBS,吸出液体收集于离心管,重复该步骤,使总体积达到 50 mL 左右。

(9)重悬细胞沉淀:收集细胞悬液于 4℃, 1200 r/min 离心 10 min;弃上清,使用 α -MEM 完全培养基重悬细胞沉淀,种入 25 T 培养瓶中。

(10)细胞培养:放置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,每 3 d 换 1 次液。

1.2.2 细胞传代

分离培养的原代细胞生长至 80% ~ 90% 融合时,吸弃培养液,PBS 洗涤 2 遍,加入胰蛋白酶 1 mL 覆盖瓶底,37℃、5% CO₂ 培养箱消化 5 min,加入等量 α -MEM 完全培养基终止消化,1200 r/min 离心 8 min,弃上清,加入 α -MEM 完全培养基重悬,按 1:2 比例传代。

1.2.3 细胞形态学观察

原代细胞首次换液去除悬浮细胞后,在倒置显微镜下观察细胞形态和细胞成分组成,记录细胞生长至传代密度(80% ~ 90% 融合)所需时间,以及细胞形态和细胞成分组成的变化,运用图像采集系统拍照记录。

1.2.4 流式细胞术检测 mBMSCs 特征性免疫表型

分离获得的细胞传至第三代(P3 代),采用胰蛋白酶消化,PBS 洗 2 遍。含 2% FBS 的 PBS 重悬细胞,每管 2×10^6 个细胞加入荧光标记的抗小鼠 FITC-CD45 (泛白细胞标志抗原)、PerCP/Cyanine5.5-CD29 (整合素家族类抗原标志分子 VLA β)、PE-CD44 (黏附分子家族类抗原标志分子 HCAM)、APC-CD54 (细胞黏附分子-1)、APC-Sca-1 (干细胞抗原 1)、PE-CD140a (血小板衍生生长因子 α),全程避光染色 30 min。流式细胞术检测细胞表面抗原表达。

1.2.5 诱导成骨分化和成脂分化

分离获得的细胞传至 P3 代,胰蛋白酶消化后将待诱导的细胞按照 1×10^4 cells/cm² 接种于经 0.1% 明胶处理过的 12 孔板,每孔加入 1 mL α -MEM 完全培养基,放入 37℃、5% CO₂ 培养箱培养,当细胞汇合度达到 100% 时,小心吸弃孔内完全培养基,分别加入成骨(或成脂)分化诱导剂。

(1)体外诱导成骨分化

加入成骨分化诱导剂(含有 10% FBS、50 μ mol/L 抗坏血酸、 10^{-7} mol/L 地塞米松、10 mmol/L β -磷酸甘油的 DMEM),每 3 d 更换新鲜成骨分化诱导剂,诱导 3 周后,4% 组织细胞固定液室温固定 30 min,PBS 轻柔洗涤 3 次,茜素红染色 10 min,用 PBS 轻柔洗涤 3 次,充分洗去染色液,每孔加入 1 mL PBS,置显微镜下观察成骨染色效果。结束后用 100 μ L 10% 十六烷基氯化吡啶溶解钙结节上的茜素红、酶标仪检测 OD₅₆₂,对钙结节形成情况进行相对定量检测。

(2)体外诱导成脂分化

按照 OriCell® 小鼠骨髓间充质干细胞成脂诱导分化试剂盒说明书操作,诱导 2 周后,4% 组织细胞固定液室温固定 30 min,PBS 轻柔洗涤 3 次,油红 O 染色 30 min,用 PBS 轻柔洗涤 3 次,充分洗去染色液,每孔加入 1 mL PBS,置显微镜下观察成脂染色效果。观察结束后用 100 μ L 异丙醇溶解脂滴上的油红 O,用酶标仪检测 OD₅₀₀,对脂肪细胞形成情况进行相对定量检测。

1.3 统计学分析

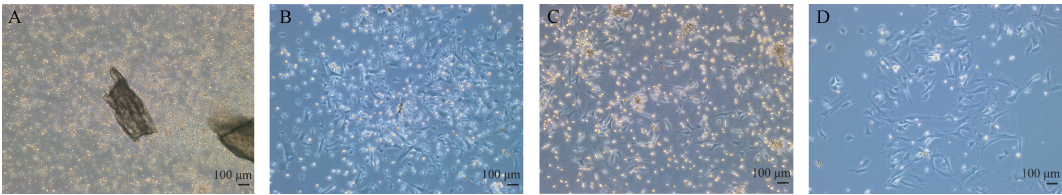
独立实验重复 3 次,采用 GraphPad Prism 9.1.1 软件进行统计分析和作图。满足正态分布、方差齐性前提下,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。实验结果以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 原代细胞的细胞成分组成

骨片消化爬片法、全骨髓贴壁法、骨片消化液上清法和骨片消化研钵法 4 种方法分离培养的原代细胞首次换液后,倒置显微镜下观察细胞形态和细胞成分组成,结果详见图 1 与表 2。

比较 4 种方法分离培养的原代细胞生长至传代密度所需时间,除骨片消化爬片法,其余 3 种方法均可在 1 周内传代,结果详见表 3。在倒置显微镜下观察传代前细胞形态和细胞成分组成,结果详见图 2。与首次换液相比,全骨髓贴壁法、骨片消化液上清法和骨片消化研钵法分离的细胞,形态与杂细胞占比均没有发生明显变化。骨片消化爬片法分离的原代细胞,增殖速度慢,第 20 天只有极少数骨片旁可见长梭形贴壁细胞成簇生长,呈放射状、均匀排列,其余部位存在大量杂细胞团;可见,该方法所分离获得的细胞质量并不理想,在后续实验中不再研究该方法。



注:A:骨片消化爬片法;B:全骨髓贴壁法;C:骨片消化液上清法;D:骨片消化研钵法。(下同)

图 1 倒置显微镜观察首次换液后原代细胞

Note. A. Bone fragment digestion and crawl method. B. Whole-bone-marrow adherent method. C. Bone fragment digestive fluid supernatant method. D. Bone fragment digestion and mortar method. (The same in the following figure)

Figure 1 Primary cells observed under the inverted microscope after the first fluid change

表 2 原代细胞中贴壁细胞及杂细胞形态和组成

Table 2 Morphology and content of adherent cells and heterocells in primary cells

分离方法 Isolation methods	贴壁细胞形态 Morphology of adherent cell	贴壁细胞占比 Proportion of adherent cells	杂细胞形态 Morphology of miscellaneous cells	杂细胞占比 Proportion of miscellaneous cells
骨片消化爬片法 Bone fragment digestion and crawl method	未见 None	无 None	圆形 Round	多 More
全骨髓贴壁法 Whole-bone-marrow adherent method	多角形 Polygonal	少 Few	圆形、短梭形 Round, short spindle	较多 Many
骨片消化液上清法 Bone fragment digestive fluid supernatant method	长梭形、三角形 Long spindle, triangular	较多 Many	圆形、短梭形 Round, short spindle	较多 Many
骨片消化研钵法 Bone fragment digestion and mortar method	长梭形、多角形 Long spindle, polygonal	多 More	圆形、短梭形 Round, short spindle	少 Few

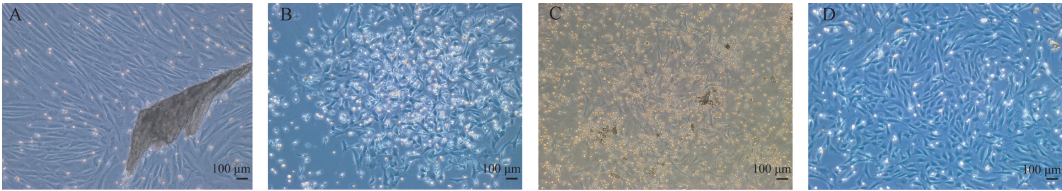


图 2 倒置显微镜观察传代时原代细胞形态

Figure 2 Primary cell morphology observed under inverted microscope during passage

2.2 mBMSCs 特征性免疫表型检测

mBMSCs 细胞表面特征性免疫表型是 CD45⁻和 CD44⁺、CD29⁺、CD54⁺、CD140a⁺、Sca-1⁺。全骨髓贴壁法、骨片消化液上清法和骨片消化研钵法所分离的细胞,取 P3 代细胞,流式细胞术检测细胞免疫表型。结果如图 3 所示:全骨髓贴壁法分离的细胞,CD45⁻ 仅为 29.1%, CD29⁺ (15.4%)、CD44⁺ (33.8%)、CD54⁺(58.5%);骨片消化液上清法分离的细胞,CD45⁻ (90.6%)、CD29⁺ (99.0%)、CD44⁺ (98.1%)、Sca-1⁺ (99.3%)、CD140a⁺ (97.8%);骨片消化研钵法分离的细胞,CD45⁻ (90.2%)、CD29⁺ (98.0%)、CD44⁺ (97.6%)、Sca-1⁺ (93.1%)、CD140a⁺(98.4%)。说明骨片消化液上清法和骨片消化研钵法分离培养的 mBMSCs 纯度均较高,全骨髓贴壁法分离培养的 mBMSCs 纯度低。

表 3 四种方法分离培养的原代细胞传代时间

Table 3 Passage time of primary cells isolated and cultured by four methods

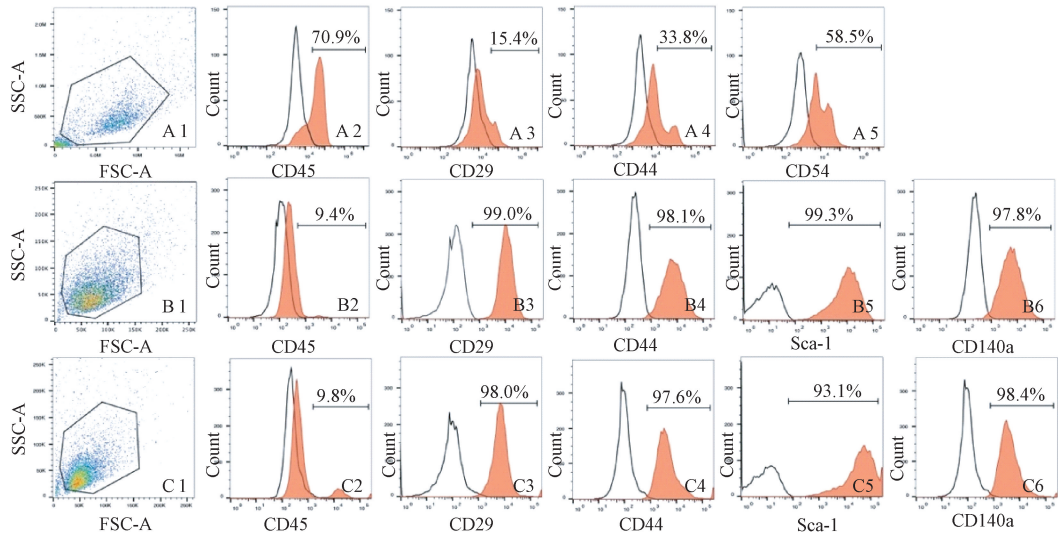
分离方法 Isolation methods	原代细胞传代时间 Passage time of primary cells
骨片消化爬片法 Bone fragment digestion and crawl method	第 20 天 Day 20
全骨髓贴壁法 Whole-bone-marrow adherent method	第 4 ~ 5 天 Day 4 ~ 5
骨片消化液上清法 Bone fragment digestive fluid supernatant method	第 5 ~ 6 天 Day 5 ~ 6
骨片消化研钵法 Bone fragment digestion and mortar method	第 6 ~ 8 天 Day 6 ~ 8

2.3 体外诱导成骨分化能力

全骨髓贴壁法、骨片消化液上清法和骨片消化研钵法分离培养的 P3 代细胞经成骨诱导培养 3 周后,细胞排列紧密,体积变小,呈铺路石样改变。

3 种方法分离培养的 P3 代细胞成骨诱导后经茜素红染色,镜下可观察到橘红色钙结节,均表现出成骨分化特性(图 4)。且骨片消化液上清法和骨片消

化研钵法获得的钙结节数量明显较全骨髓贴壁法多(图 4),说明经这两种方法分离培养的细胞能获得更多的具有成骨分化能力的 mBMSCs。

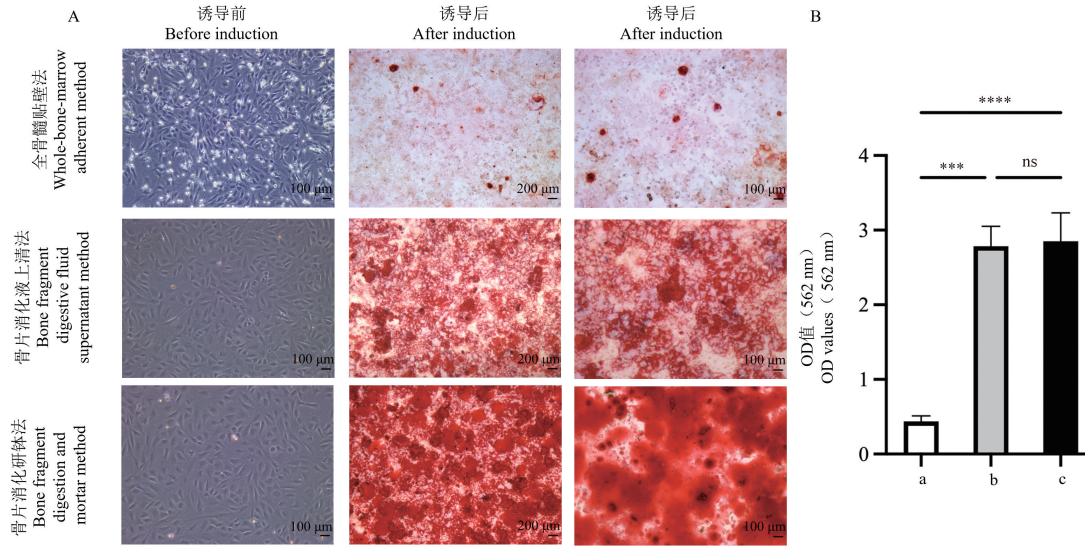


注:不同方法分离培养的 P3 代细胞 mBMSCs 特征性免疫表型流式检测结果。A1 ~ A5:全骨髓贴壁法;B1 ~ B6:骨片消化液上清法;C1 ~ C6:骨片消化研钵法。

图 3 流式细胞术检测细胞 mBMSCs 特征性免疫表型

Note. Characteristic immunophenotype of P3 mBMSCs isolated and cultured by different methods was detected by flow cytometry. A1 ~ A5. Whole-bone-marrow adherent method. B1 ~ B6. Bone fragment digestive fluid supernatant method. C1 ~ C6. Bone fragment digestion and mortar method.

Figure 3 Characteristic immunophenotype of mBMSCs was detected by flow cytometry



注:A:分离培养的 P3 代细胞成骨分化诱导前细胞形态和成骨分化诱导后茜素红染色观察到的钙结节;B:室温下,10%氯代十六烷基吡啶溶解茜素红染色后的钙结节,酶标仪检测波长 562 nm 吸光度值;a:全骨髓贴壁法;b:骨片消化液上清法;c:骨片消化研钵法;与全骨髓贴壁法比较,*** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。(下图同)

图 4 体外诱导成骨分化能力的鉴定及茜素红染色定量比较

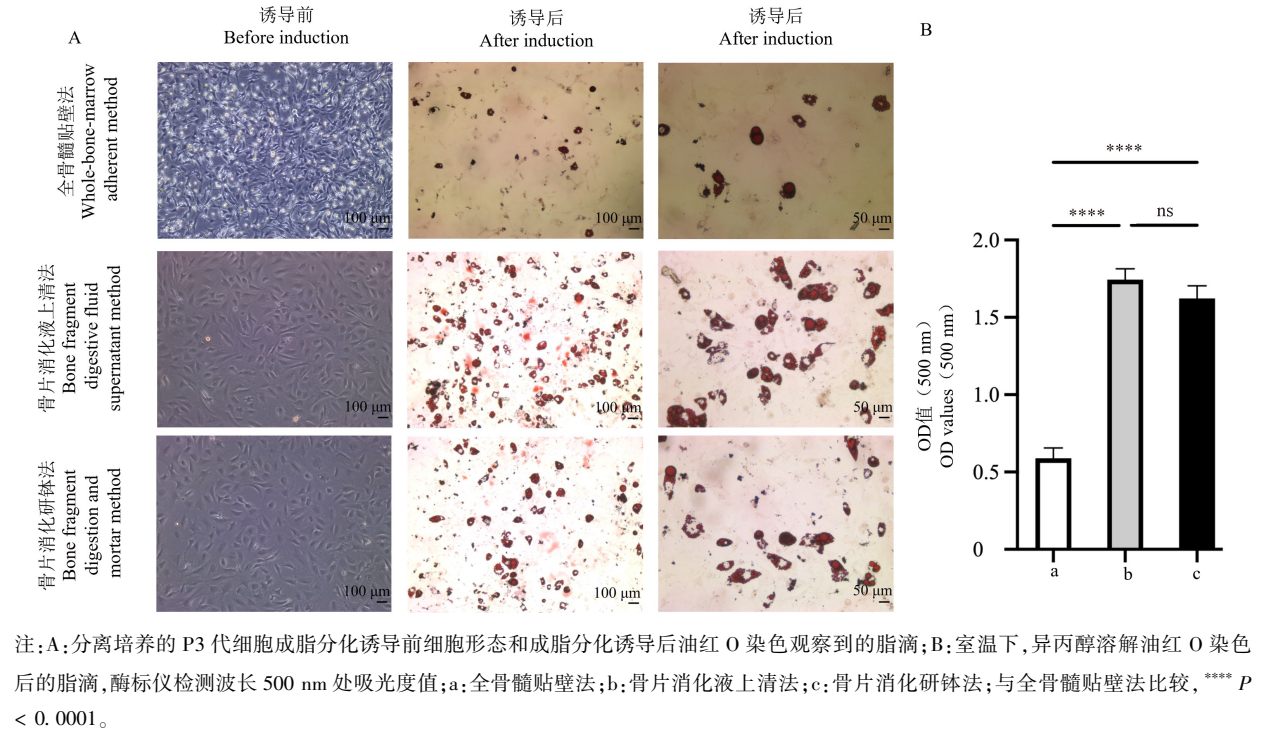
Note. A. Cell morphology before osteogenic differentiation induction and calcium nodules observed by alizarin red staining after osteogenic differentiation induction of isolated and cultured P3 cells. B. Absorbance value at 562 nm was detected by microplate reader after of 10% chlorocetylpyridine dissolved calcium nodules stained with alizarin red at room temperature. a. Whole-bone-marrow adherent method. b. Bone fragment digestive fluid supernatant method. c. Bone fragment digestion and mortar method. Compared with whole-bone-marrow adherent method, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. (The same in the following figures)

Figure 4 Identification of osteogenic differentiation ability and quantitative comparison of alizarine red staining *in vivo*

2.4 体外诱导成脂分化能力

全骨髓贴壁法、骨片消化液上清法和骨片消化研钵法分离培养的 P3 代细胞经成脂诱导培养 2 周后,细胞出现回缩现象,细胞间隙变大,转变为圆形脂肪细胞。镜下可见胞浆内含有丰富脂滴的脂肪

细胞,油红 O 染色呈红色,3 种方法均表现出成脂分化特性(图 5)。且骨片消化液上清法和骨片消化研钵法油红 O 染色强度明显较全骨髓贴壁法强(图 5),说明经这两种方法分离培养的细胞能获得更多的具有成脂分化能力的 mBMSCs。



注:A:分离培养的 P3 代细胞成脂分化诱导前细胞形态和成脂分化诱导后油红 O 染色观察到的脂滴;B:室温下,异丙醇溶解油红 O 染色后的脂滴,酶标仪检测波长 500 nm 处吸光度值;a:全骨髓贴壁法;b:骨片消化液上清法;c:骨片消化研钵法;与全骨髓贴壁法比较, **** $P < 0.0001$ 。

图 5 体外诱导成脂分化能力的鉴定及油红 O 染色定量比较

Note. A. Cell morphology before adipogenic differentiation induction and lipid droplets observed by oil red O staining after adipogenic differentiation induction of isolated and cultured P3 cells. B. Absorbance value at 500 nm was detected by microplate reader after isopropanol dissolved lipid droplets stained with oil red O at room temperature. a. Whole-bone-marrow adherent method. b. Bone fragment digestive fluid supernatant method. c. Bone fragment digestion and mortar method. Compared with whole-bone-marrow adherent method, **** $P < 0.0001$.

Figure 5 Identification of adipogenic differentiation ability and quantitative comparison of oil red O staining in vitro

3 讨论

mBMSCs 在骨髓中含量少,分离细胞中往往存在多种杂细胞污染,不能满足研究需求。因此,需要建立一种有效分离培养 mBMSCs 的方法体系。本研究比较分析了骨片消化爬片法、全骨髓贴壁法、骨片消化液上清法和骨片消化研钵法等 4 种方法,希望实验结果能为从事 mBMSCs 相关研究的同道提供有价值的参考依据,避免因方法学选择不当造成时间和资源浪费,甚至影响研究结果的客观性和可靠性。

全骨髓贴壁法是利用 mBMSCs 的塑料贴壁特性进行分离培养,但这种方法分离的 mBMSCs 不纯,容易被多种杂细胞污染^[26],本研究的实验结果也是如此。有研究表明通过早期首次换液可以减

少杂细胞的黏附^[9],因此,本研究在应用全骨髓贴壁法时,曾采用第 1 天首次换液,但培养后 mBMSCs 数量极少,可能是由于在培养早期换液,在一定程度上会损失 mBMSCs。有文献报道,在培养第 4 天首次换液,比在培养第 1 天首次换液,会更容易获得高增殖能力的 mBMSCs^[27],与我们的实验结果一致。分离培养的原代细胞镜下形态和 P3 代细胞表面免疫表型分析结果均说明,全骨髓贴壁法获得的 mBMSCs 量少,且存在多种杂细胞。与 Cai 等^[26]的研究报道相似,本实验中全骨髓贴壁法分离培养的 mBMSCs 成骨成脂分化现象不及骨片消化液上清法和骨片消化研钵法。该现象可能与以下两个方面相关:一方面由于全骨髓贴壁法本身获得的 mBMSCs 纯度较低;另一方面也可能是体外培养时其他细胞混杂一定程度上抑制 mBMSCs 的分化潜

能。因此全骨髓贴壁法不适合用于 mBMSCs 体外研究。

骨密质中造血细胞稀少,从骨密质中分离 mBMSCs,可减少造血细胞与其他基质细胞的污染。冲洗骨髓腔,去除骨髓中大量造血细胞后,用胶原酶消化骨片,使密集结构的骨质松弛,可促进 mBMSCs 从骨片迁移到培养基中^[25]。骨片消化液上清法和骨片消化研钵法都是利用此原理分离 mBMSCs,分离后的 P3 代细胞表面免疫表型分析以及成骨分化能力、成脂分化能力检测均说明这两种方法分离获得的 mBMSCs 纯度较高、质量较好。且骨片消化研钵法所分离的细胞传至 P1 代时,镜下观察到细胞呈均一成纤维样形态,但该法必须把握好研钵力度,否则容易导致细胞受损。骨片消化爬片法虽也是基于此特点,但所获得的 mBMSCs 极少且生长缓慢,无法满足研究需求,可能是经过消化后 mBMSCs 大部分存在胶原酶消化液中,也有可能是培养初期移动培养瓶时骨片受到晃动,影响 mBMSCs 爬出^[25]。

此外,参考人 BMSCs 的分离方法^[28-29],本研究也曾尝试收集小鼠全骨髓,通过 Ficoll 方法分离出小鼠骨髓单个核细胞进行贴壁后获取 mBMSCs,但贴壁细胞零星无几,难以进一步展开实验,因此,单个核细胞贴壁法不在本研究探讨范围内。

采用免疫磁珠分选法和流式细胞荧光分选法也可获得较高纯度的 mBMSCs 群体,但费用昂贵,操作繁琐,且影响 mBMSCs 的活力^[9]。mBMSCs 的体外生存活力不仅受到分离方法的影响,也与培养条件有关。mBMSCs 存在于骨髓基质中,受到骨髓微环境的调控,小鼠骨髓中的氧含量低于 5%^[30]。有研究表明,与 10%和 21%的氧含量相比,在 5%的氧含量条件下,mBMSCs 表现出更高的增殖活性和克隆形成能力。因此,要根据研究目的,探讨优化 mBMSCs 的培养条件。

总之,本文探讨的 4 种 mBMSCs 分离培养方法中,骨片消化液上清法和骨片消化研钵法在较短时间内可获得纯度较高、分化能力较强的 mBMSCs。虽然这两种方法步骤较全骨髓贴壁法繁琐,但能够满足后续实验对 mBMSCs 的质量和数量要求,且成本低。因此,推荐采用骨片消化液上清法和骨片消化研钵法分离培养 mBMSCs。

参 考 文 献 (References)

[1] 李宁,金世柱,杨宁宁. 间充质干细胞通过免疫调节机制治

疗炎症性肠病的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(12): 121-125.

Li N, Jin SZ, Yang NN. Advances in the study of mesenchymal stem cells for the treatment of inflammatory bowel disease by immunoregulation [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(12): 121-125.

[2] 路亚岚, 石桂英, 王克维, 等. 骨髓间充质干细胞治疗阿尔兹海默病模型小鼠研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(6): 122-127.

Lu YL, Shi GY, Wang KW, et al. Progress in research using mouse models of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for treatment of Alzheimer's disease [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(6): 122-127.

[3] Shi Y, Wang Y, Li Q, et al. Immunoregulatory mechanisms of mesenchymal stem and stromal cells in inflammatory diseases [J]. Nat Rev Nephrol, 2018, 14(8): 493-507.

[4] Zhao L, Chen SQ, Yang PX, et al. The role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation: prevention and treatment of graft-versus-host disease [J]. Stem Cell Res Ther, 2019, 10(1): 182-195.

[5] Norambuena GA, Khoury M, Jorgensen C. Mesenchymal stem cells in osteoarticular pediatric diseases: an update [J]. Pediatr Res, 2012, 71(4): 452-458.

[6] Zhang RF, Yu J, Zhang NK, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: single-blind, multicenter, randomized controlled trial [J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 33-47.

[7] Hou DY, Wang B, You RL, et al. Stromal cells promote chemoresistance of acute myeloid leukemia cells via activation of the IL-6/STAT3/OXPHOS axis [J]. Ann Transl Med, 2020, 8(21): 1346-1363.

[8] Abdallah BM, Alzahrani AM, Abdel-Moneim AM, et al. A simple and reliable protocol for long-term culture of murine bone marrow stromal (mesenchymal) stem cells that retained their *in vitro* and *in vivo* stemness in long-term culture [J]. Biol Proced Online, 2019, 21(1): 3-14.

[9] Abdallah BM, Khattab HM. Recent approaches to isolating and culturing mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal stem cells [J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2021, 16(5): 599-607.

[10] 周家旺, 陆国海, 李晓林. BMP9 通过 Orai1 途径促进小鼠骨髓间充质干细胞骨向分化 [J]. 基础医学与临床, 2021, 41(10): 1470-1475.

Zhou JW, Lu GH, Li XL. BMP9 promotes bone differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells via Orai1 pathway [J]. Basic Clin Med, 2021, 41(10): 1470-1475.

[11] 季健坤, 李克文, 赵宏涛, 等. 骨髓间充质干细胞对膝关节炎大鼠软骨损伤及 KDM6A/SOX9 信号通路的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2022, 28(4): 486-492.

Ji JK, Li KW, Zhao HT, et al. Effects of bone marrow mesenchymal stem cells on cartilage damage and KDM6A/SOX9 signaling pathway in rats with knee osteoarthritis [J]. Chin J Osteopor, 2022, 28(4): 486-492.

[12] Wu YS, Xie L, Wang MY, et al. Mettl3-mediated m⁶A RNA methylation regulates the fate of bone marrow mesenchymal stem

- cells and osteoporosis [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 4772.
- [13] Wang T, Bai JX, Lu M, et al. Engineering immunomodulatory and osteoinductive implant surfaces via mussel adhesion-mediated ion coordination and molecular clicking [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 160.
- [14] Wen ZZ, Mai Z, Zhu XL, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorate cardiomyocyte apoptosis in hypoxic conditions through microRNA144 by targeting the PTEN/AKT pathway [J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1): 36.
- [15] 杨燕美, 李红, 张雷, 等. 小鼠骨髓间充质干细胞分离培养新方法 [J]. 中国实验血液学杂志, 2013, 21(6): 1563–1567.
- Yang YM, Li H, Zhang L, et al. A new method for isolating and culturing mouse bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Chin J Exp Hematol, 2013, 21(6): 1563–1567.
- [16] 杨雷, 朱烁基, 刘健, 等. 两种骨髓间充质干细胞分离方法的对比研究 [J]. 岭南心血管病杂志, 2020, 26(2): 225–229.
- Yang L, Zhu SJ, Liu J, et al. Comparative analysis of two methods for isolation of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. South China J Cardiovasc Dis, 2020, 26(2): 225–229.
- [17] Bai J, Li LJ, Kou N, et al. Low level laser therapy promotes bone regeneration by coupling angiogenesis and osteogenesis [J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 432–450.
- [18] Li MH, Lan YJ, Gao J, et al. Rapamycin promotes the expansion of myeloid cells by increasing G-CSF expression in mesenchymal stem cells [J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 779159.
- [19] Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, et al. Suspended cells from trabecular bone by collagenase digestion become virtually identical to mesenchymal stem cells obtained from marrow aspirates [J]. Blood, 2004, 104(9): 2728–2735.
- [20] Houlihan DD, Mabuchi Y, Morikawa S, et al. Isolation of mouse mesenchymal stem cells on the basis of expression of Sca-1 and PDGFR- α [J]. Nat Protoc, 2012, 7(12): 2103–2111.
- [21] Liu YL, Wang LP, Fatahi R, et al. Isolation of murine bone marrow derived mesenchymal stem cells using Twist2 Cre transgenic mice [J]. Bone, 2010, 47(5): 916–925.
- [22] Dominici M, Blanc KL, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. Cytotherapy, 2006, 8(4): 315–317.
- [23] 杨玉彦, 王录美, 孙铭学, 等. 建立 ICR 小鼠骨髓间充质干细胞的体外分离培养及鉴定方法 [J]. 药学服务与研究, 2016, 16(2): 90–93.
- Yang YY, Wang LM, Sun MX, et al. Establishment of the protocol for isolation, cultivation and identification of ICR mice bone marrow-derived mesenchymal stem cells *in vitro* [J]. Pharm Care Res, 2016, 16(2): 90–93.
- [24] Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection [J]. J Cell Biochem, 2003, 89(6): 1235–1249.
- [25] Zhu H, Guo ZK, Jiang XX, et al. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone [J]. Nat Protoc, 2010, 5(3): 550–560.
- [26] Cai YT, Liu TS, Fang F, et al. Comparisons of mouse mesenchymal stem cells in primary adherent culture of compact bone fragments and whole bone marrow [J]. Stem Cells Int, 2015, 2015: 708906.
- [27] Hu YX, Lou B, Wu XF, et al. Comparative study on *in vitro* culture of mouse bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Stem Cells Int, 2018, 2018: 6704583.
- [28] Drela K, Stanaszek L, Snioch K, et al. Bone marrow-derived from the human femoral shaft as a new source of mesenchymal stem/stromal cells; an alternative cell material for banking and clinical transplantation [J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1): 262–275.
- [29] Zhang XY, Tu HJ, Yang YZ, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells promote resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia via the IL-7/JAK1/STAT5 pathway [J]. J Biol Chem, 2019, 294(32): 12167–12179.
- [30] Spencer JA, Ferraro F, Roussakis E, et al. Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals [J]. Nature, 2014, 508(7495): 269–273.

[收稿日期] 2022-07-12