

分类号:
学 号: 2012109095

密 级:
单位代码: 10759

石河子大学

硕士学位论文



血管内皮前体细胞对间充质干细胞增殖能力的影响

学 位 申 请 人 冯文磊

指 导 教 师 吴向未 教授

申请学位门类级别 医学硕士

学 科 、 专 业 名 称 肿瘤学

研 究 方 向 肿瘤治疗应用基础研究

所 在 学 院 医学院

中国·新疆·石河子
2015 年 6 月

分类号:
学 号: 2012109095

密 级:
单位代码: 10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



血管内皮前体细胞对间充质干细胞增殖能力的 影响

学 位 申 请 人	冯文磊
指 导 教 师	吴向未 教授
申请学位门类级别	医学硕士
学 科、专 业 名 称	肿瘤学
研 究 方 向	肿瘤治疗应用基础研究
所 在 学 院	医学院

中国·新疆·石河子
2015 年 6 月

Research of Endothelial Progenitor Cells on regulating the

Proliferation of Mesenchymal Stem Cells

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Medicine

By

Feng Wenlei

(Oncology)

Dissertation Supervisor: Prof. Wu Xiangwei

June, 2015

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：冯文磊

时间：2015年6月9日

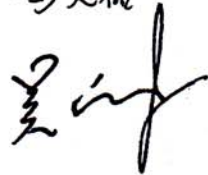
使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：冯文磊

时间：2015年6月9日

导师签名：



时间：2015年6月9日

目录

中文摘要.....	I
Abstract	II
缩略语表.....	IV
前 言.....	1
第一部分 小鼠 MSCs、EPCs 的分离、培养及鉴定.....	4
实验一 小鼠 MSCs 的分离、培养及鉴定.....	4
1 材 料.....	4
1.1 实验动物.....	4
1.2 实验主要试剂.....	4
1.3 实验主要仪器.....	5
2 方 法.....	5
2.1 细胞分离和培养.....	5
2.2 MTT 法检测 48 h 内贴壁细胞的增殖能力.....	5
2.3 流式细胞技术检测 48 h 内贴壁细胞的表面标记物.....	6
2.4 48 h 内贴壁细胞的成骨诱导分化功能鉴定.....	6
2.5 48 h 内贴壁细胞的成软骨诱导分化功能鉴定.....	7
2.6 48 h 内贴壁细胞的成脂诱导分化功能鉴定.....	7
2.7 统计学处理.....	8
3 结 果.....	8
3.1 细胞形态观察.....	8
3.2 48 h 内贴壁细胞增殖能力.....	9
3.3 48 h 内贴壁细胞向成骨、成软骨、成脂细胞分化.....	12
3.4 48 h 内贴壁细胞细胞表面标记物.....	10
4 讨 论.....	13
实验二 小鼠 EPCs 的分离、培养及鉴定.....	14
1 材 料.....	14
1.1 实验动物.....	14
1.2 实验主要试剂.....	14

1.2 实验主要仪器	14
2 方法	15
2.1 48 h 后贴壁细胞分离、培养	15
2.2 MTT 法检测 48 h 后贴壁细胞的增殖能力	15
2.3 流式细胞术检测 48 h 后贴壁细胞的表面标记物	15
2.4 48 h 后贴壁细胞体外成血管能力的功能鉴定	16
2.5 48 h 后贴壁细胞特异性表面抗原 CD31 细胞免疫荧光染色鉴定	16
2.6 统计学处理	17
3 结果	17
3.1 细胞形态观察	17
3.2 48 h 内贴壁细胞增殖能力	18
3.3 流式检测 48 h 后贴壁细胞表面标记物	19
3.4 48 h 后贴壁细胞的成血管功能	20
3.5 48 h 后贴壁细胞 CD31 免疫荧光染色	21
4 讨论	22
第二部分 EPCs 对 MSCs 增殖能力的影响	24
实验一 MTT 比色法检测 EPC-CM 培养 MSCs 对其增殖能力影响	24
1 材料	24
1.1 实验动物	24
1.2 实验主要试剂	24
1.3 实验主要仪器	24
2 方法	24
2.1 EPC-CM 的制备	24
2.2 MTT 比色法检测 EPC-CM 培养 MSCs 增殖能力	25
2.3 统计学处理	25
3 结果	25
4 讨论	26
实验二 Transwell 间接共培养体系共培养, EPCs 对 MSCs 增殖能力的影响	27
1 材料	27
1.1 实验动物	27

1.2 实验主要试剂	27
1.3 实验主要仪器	28
2 方法	28
2.1 建立 EPCs 和 MSCs Transwell 间接共培养体系	28
2.2 EdU 标记	28
2.3 统计学处理	30
3 结果	30
4 讨论	31
结 论	33
参考文献	34
综述	43
致 谢	53
作 者 简 介	54
导师评阅表	55

中文摘要

目的: 探索同时从 C57BL/6 小鼠骨髓分离培养间充质干细胞(MSCs)与内皮前体细胞(EPCs)并对其鉴定的方法,并探讨EPCs条件培养基及EPCs在非接触共培养体系里对MSCs增殖的影响。

方法: 1. 小鼠骨髓细胞经改良差时贴壁法分离,以48 h为时间点,48 h内贴壁细胞传至3代后行成骨、成软骨、成脂分化诱导实验,流式细胞术(FCM)检测其表面标记;48 h后收集未贴壁细胞,传至3代后行血管形成实验,传至5代后行CD31免疫荧光细胞染色实验,FCM检测其表面标记。

2. 将MSCs分为0 EPC-CM组(采用LG-DMEM培养)、50% EPC-CM组(采用50% EPC-CM+50% LG-DMEM培养)和100% EPC-CM组(采用100% EPC-CM培养)。

3. 取第3代MSCs和EPCs,按1:1的细胞比例接种入Transwell共培养系统中,下室接种MSCs,上室接种EPCs为实验组。同时设置相同密度单纯MSCs接种于下室为对照组。采用MTT比色法和EdU荧光标记法检测MSCs对EPCs增殖能力的影响。

结果: 1.FCM检测第3代MSCs高表达Sca-1、CD29,低表达CD45、CD11b;经诱导可向成骨、成软骨、成脂方向分化。FCM检测第3代EPCs高表达CD34、CD133和VEGFR2;在铺有基质胶的96孔培养板中可形成血管样结构。第5代48 h后贴壁细胞特异性表面抗原CD31呈阳性表达。

2. MTT比色法结果显示与对照组相比较,50% EPC-CM组和100% EPC-CM组MSCs增殖能力明显增强,且呈浓度依赖性($P < 0.05$)。

3. MTT比色法和EdU荧光标记法结果显示与对照组相比较,实验组MSCs的增殖能力在72 h后显著增强($P < 0.05$);处于DNA合成期的细胞比例也显著增多($P < 0.01$)。

结论: 利用差速贴壁法可同时分离纯化扩增MSCs和EPCs,EPC-CM能促进MSCs的增殖,EPCs在与MSCs非接触共培养时能促进MSCs的增殖。

关键词: 间充质干细胞;内皮前体细胞;条件培养基;非接触共培养;细胞增殖

Abstract

Objective

To establish a method for simultaneously isolate, culture and identify of C57BL/6 murine Mesenchymal Stem Cells (MSCs) and Endothelial Progenitor Cells (EPCs) from bone marrow and to investigate the effects of EPCs conditioned medium (EPC-CM) and co-cultured in non-contact co-culture systems on the proliferation of MSCs.

Methods

1. The cells were isolated by modified differential adhesion method from murine bone marrow and cultured for 48 h. Then the primary adherent cells at 48 h were cultured in LG-DMEM and the non-adhered cells were collected and induced by EGM-2MV complete medium in human fibronectin-coated dishes. Osteogenic, chondrogenic, and adipogenic induced multi-directional differentiation potentials were performed on the primary adherent cells, their immune phenotypes were detected by flow cytometry (FCM). Tube formation experiment on the matrigel *in vitro* and the expression of specific surface marker CD31 determined by immunofluorescence cell staining were identified for the subsequent adherent cells, and their immune phenotypes were detected by FCM.

2. The MSCs were divided into 0 EPC-CM group, 50% EPC-CM group and 100% EPC-CM group (they were all cultured by LG-DMEM). The effect of different concentration of EPC-CM on the proliferation of MSCs was detected by MTT method.

3. The passage 3 of EPCs and MSCs were harvested and placed into Transwell co-culture systems at the ratio of 1:1, MSCs were placed in the bottom and EPCs in the upper served as experimental group. Meanwhile, only MSCs were placed in the bottom at the same concentration served as control group. MTT assay and EdU fluorescent assay were applied to detect MSCs proliferation co-cultured with EPCs.

Results

1. FCM results showed that the third passage of MSCs were strongly positive for Sca-1, CD29 and negative for CD45, CD11b and had the potentials to be induced differentiation into osteoblasts and adipocytes and chondrocytes. The third passage of EPCs were cultured on Matrigel, resulted in the formation of tube-like structures and positive express CD34, CD133 and VEGFR2. The expression of the passage 5 of the subsequent adherent cells specific surface marker CD31 was positive.

2. Compared with control group, the abilities of proliferation of MSCs 50%

EPC-CM group and 100% EPC-CM group were increased($P<0.05$), which presented a percentage-depended manner.

3.Compared with the control group, the ability of proliferation of MSCs in experimental group was significantly enhanced after 3d ($P<0.05$) and the proportion of MSCs in the stage of DNA synthesis was higher as evaluated with EdU fluorescent assay ($P<0.01$).

Conclusion

The method of modify differential adhesion can simultaneously isolate,purify and amplify mouse bone marrow MSCs and EPCs.The ability of proliferation of MSCs is promoted by not only EPC-CM but also co-cultured with EPCs in non-contact co-culture systems.

Key words: Mesenchymal Stem Cells;Endothelial Progenitor Cells; conditioned medium;non-contact co-culturing;proliferation

缩略语表

缩略词	英文全称	中文全称
MSCs	mesenchymal stem cells	间充质干细胞
EPCs	endothelial progenitor cells	血管内皮前体细胞
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
LG-DMEM	low glutamine Dulbecco's Modification of Eagle's Medium	低糖 DMEM 培养基
EGM-2MV	endothelial growth medium	内皮细胞培养基
PBS	phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
Sca-1	stem cell antigen-1	干细胞抗原-1
VEGFR-2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2	血管内皮细胞生长因子受体-2
IgG	Immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
CD	cluster of differentiation	分化抗原簇
FCM	flow cytometry	流式细胞术
BTE	bone tissue engineering	组织工程骨
FN	fibronectin	纤维连接蛋白
APC	Allophycocyanin	别藻青蛋白
PE	Phycoerythrin	藻红蛋白
FITC	Fluorescein	异硫氰酸荧光素
PerCP-Cy5.5	Peridinin Chlorophylla Protein cyanine 5.5 Complexes	甲藻素叶绿素蛋白青色素串联偶联物
d	day	天
h	hour	小时
min	minute	分钟
g	gram	克
mg	milligram	毫克
L	litre	升
ml	milliliter	毫升

KD	kilodalton	千道尔顿
r	revolutions	转速
MTT	3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide	3-4,5-二甲基噻唑-2-2,5- 二甲基四氮唑溴盐
A	absorbance	吸光度
IBMX	1-methyl-3-isobutylxanthine	3-异丁基-1-甲基黄嘌呤
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砜
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine	溴脱氧尿苷
EdU	5-ethynyl-2'-deoxyuridine	5-乙基-2'脱氧尿嘧啶核苷
PI	propidium iodide	碘化丙啶
SPSS	statistics package for social science	社会科学统计软件包

前言

骨肿瘤 (bone tumor) 凡是发生在骨骼系统各种组织如骨、软骨、纤维组织、脂肪组织、造血组织、神经组织和未分化的网状内皮结构等所引起的肿瘤均属原发性骨肿瘤。原发性骨肿瘤在人群中的发病率男性约为 1.11/10 万, 女性约为 1.06/10 万, 约占全身肿瘤的 2%~3%, 良、恶性之比约为 1.9:1。良性骨肿瘤容易治愈, 预后良好; 恶性骨肿瘤 (malignant bone tumor) 约占 40%, 好发于儿童和青壮年, 病情发展变化迅速, 病残率及病死率皆高, 预后不佳。恶性骨肿瘤的主要病理特点为肿瘤细胞的异形性, 生物学行为最具有的特点为有骨组织破坏性; 主要临床特点是骨和 (或) 关节的疼痛、骨性肿块, 以及肢体功能障碍等。遗憾的是, 目前对骨肿瘤的病因和发病机制都尚未明确, 但大多数研究证明骨肿瘤的发病与基因学说、内分泌学说、电离辐射、慢性感染等相关^[1]。随着对骨肿瘤生物学形态及生物学行为等的深入了解, 以及新辅助化疗的进展, 精确的影像学、核医学诊断技术, 物理治疗及介入治疗技术的发展, 还有外科手术技术的提高和人工假体材料制备技术的改进等, 使保肢治疗得到了快速发展, 目前, 对于骨肿瘤的治疗方式, 保肢治疗已经成为主流治疗手段和发展方向, 恶性骨肿瘤保肢率达到 90% 以上^[2]。保肢治疗术后使患者的生活质量得以明显提高, 5 年生存率也提高到 60%~70%。但是问题也随之而来, 随着保肢手术的广泛应用和患者生存时间的延长, 保肢术后并发症的发生率也呈上升趋势^[3]。其中, 骨肿瘤治疗后骨缺损区域的愈合与再生更是突出的难题^[4]。

由于某种因素如外伤、感染、肿瘤等使骨丧失了一些骨质, 形成较大的间隙, 称为骨缺损 (bone defect)。骨肿瘤治疗后所致骨缺损不仅不易愈合, 还因固定和制动易导致褥疮、呼吸系统感染、泌尿系统感染及患肢废用性萎缩等多种并发症。传统的骨缺损治疗方法有自体骨移植、同种异体骨移植和人工骨移植等, 上述方法虽然在动物实验和临床治疗中显示了一定的疗效, 但均因存在着局限性而在临床应用时受到一定限制: 自体骨移植是骨缺损修复的金标准, 但供体来源毕竟有限; 同种异体骨移植植入后吸收好, 但是容易感染并且免疫排斥反应重; 人工骨移植原材料孔隙率变异较大, 成骨困难^[5-9]。

组织工程骨 (bone tissue engineering, BTE) 是一种全新的治疗方法它交叉结合了工程学和生命科学, 共包含 4 个关键元素: 具有骨传导性的支架; 释放诱导成骨的生长因子; 负载具有成骨潜能的细胞; 组织工程骨血管化或充足的血供^[10,11]。组织工程骨能否血管化以提供细胞生长的氧气和营养物质是骨组织工程能否成功的关键问题所在^[12]。然而, 机体自发形成血管的速度很慢, 每天仅为 0.1 μm , 如果需要形成超过 0.75 mm 的完整血管需要几周时间^[13]。并且, 氧气从毛细血管弥散到组织的距离仅限于 200 μm 以内^[14], 假如缺少有效的毛细血管网,

体积超过 2.0-3.0 mm³ 的工程组织植入体内后就无法存活^[15]。从移植物表层到其深部,营养物质和氧气浓度呈现逐渐降低的趋势,以致于移植物中心可能出现坏死。然而,组织工程骨血管化仍面临诸多的难题。体外构建的血管主要是通过细胞共培养及复合生长因子的共同作用来实现的,且多数处于微血管网水平,更无法与体内自然形成的微血管网相比较,这与血液中复杂的生物化学信号及血流的流体动力学影响有关^[16]。要最终实现构建的骨组织运用于人体,所需的种子细胞要符合以下几点要求:(1)体内体外增殖能力都要足够强大,还要有成骨和成血管分化潜能。(2)无或低免疫原性,无致癌性,且取材容易。(3)尽量减少有创操作来获取细胞。(4)移植后能适应材料与受区环境,细胞活性较强。(5)能够通过分子生物技术进行基因修饰,使其具有更丰富的基因表型来提高功能^[17]。

研究证明,骨髓中的干细胞是促进骨再生效果最好的自体来源的细胞^[18-22],并且骨髓中干细胞浓度越高,其生成新骨的能力就越强^[23,24]。相对来说,骨髓富含间充质干细胞(Mesenchymal Stem Cells, MSCs)^[25,26],且骨髓来源的间充质干细胞在骨及软骨组织工程学中表现出了极大的优势^[27-31];另外,骨髓中还存在着其它的干/前体细胞,如血管内皮前体细胞(Endothelial Progenitor Cells, EPCs),在血管再生中更是扮演了重要的角色^[32],这两种细胞可以共同促进新骨的再生^[33]。

MSCs 是中胚层来源的具有高度自我更新、增殖能力和多向分化潜能的亚全能干细胞^[34]。在特定条件下能分化为骨、软骨、脂肪、神经组织、皮肤、肝细胞、内皮和心肌等多种组织细胞^[35-49]。起初认为间充质干细胞只存在于骨髓中,后来发现从脂肪组织、肠道、肺、牙髓、牙周韧带、肝脏、滑膜、心脏和结缔组织中都可以提取出来^[50-53],以及从外周血、胎盘和脐带血中分离获得^[54-56]。因为 MSCs 是成骨细胞共同的源头细胞,所以其在组织工程骨修复骨缺损的能力已得到充分肯定,并已逐步应用于临床中。2001 年 Quarto 等^[57]使用 MSCs 组织工程骨技术首次在一例男性患者身上进行临床实验。他们将患者自体骨来源的 MSCs 经体外培养扩增后接种到多孔羟基磷灰石支架材料上,然后移植到患者体内成功的修复了其长骨缺损,随访显示长期修复效果良好。不久, Wakitani 等^[58]从骨性关节炎患者的骨髓中分离出 MSCs,经体外培养扩增后复合进入胶原凝胶支架材料中,移植到股骨内髌部软骨缺损处,结果表明术后 6 周缺损处出现了粉红色的柔软组织,42 周后修复区域呈现白色并可见透明软骨样的组织形成。Krebsbach 等^[59]利用小鼠源 MSCs 修复了小鼠颅面部直径 5 mm 的骨缺损。2003 年 Alhadlaq 等^[60]从鼠的骨髓中分离出 MSCs,体外诱导使其分化为成骨细胞和软骨细胞并复合进入生物支架材料,移植到小鼠皮下,8 周后取出组织后发现移植物生长形成了类似颌骨关节样的软骨结构。2006 年, Hasegawa 等^[61]将 MSCs 混合 I 型胶原植入犬的牙周骨缺损模型中,并对移植的干细胞进行示踪然后进行观察发现在牙周缺损区内新生的细胞均是来自于植入的外源性 MSCs。此类实验

也于 2009 年被 Li H 等^[62]再次报道。以上的研究报道充分证明了 MSCs 作为骨组织工程种子细胞具有广阔的应用前景。但是, 研究也同时发现移植后的 MSCs 因为不良的局部微环境、缺乏必要的营养支持而导致干细胞活性降低, 功能受到限制, 修复能力也随之下降。所以如何通过改善组织工程骨和其它移植物的局部微环境及营养支持以提高 MSCs 的干细胞活性和修复是运用 MSCs 在组织工程骨中修复骨缺损亟需解决的问题。

EPCs 新生血管的优势使得解决上述问题成为可能。EPCs 具有促进组织工程骨体内早期血管化的潜力以及间接营养支持与其共培养的种子细胞的功能, 这为组织工程骨修复大段骨缺损的治疗带来了新的希望。EPCs 是一群发源于中胚层, 具有游走特性, 可以发育和分化为血管壁内皮细胞的前体细胞群^[63]。EPCs 属于成体干细胞, 起源于胚胎期位于卵黄囊中血岛的成血管母细胞。体外可以从骨髓、脐静脉血^[64]、外周血、脾脏^[65]中分离得到。脐静脉血中的 EPCs 源于胎肝^[66], 而外周血中的 EPCs 主要由骨髓中的造血干细胞 (haematopoietic stem cell, HSC) 分化而来^[67]。正常情况下, 外周血中的 EPCs 数量非常少, 仅占 0.01%。EPCs 具有干细胞和内皮细胞的双重特性, 可同时表达干细胞及内皮细胞的相关抗原。它对胚胎与成体的血管新生均起作用^[68-70]。EPCs 具有特异性归巢能力, 在生理或病理条件下, 可以动员自骨髓和外周血, 归巢于靶区域修复损伤的血管^[71]。EPCs 通过自身的分化、增殖而形成新生血管, 类似于胚胎期的“血管发生”, 所以 EPCs 在改善局部受损的组织微循环有独特的优越性^[72]。EPCs 参与血管形成的形式可分为两种: 1) 血管发生 (vasculogenesis), 是指骨髓源性 EPCs 动员、归巢并分化生成新的血管。2) 血管生成 (angiogenesis), 是指在已有血管网络结构的基础上, 经过刺激内皮细胞的迁移、增生, 最后以芽生的方式扩展出更多的血管网^[73]。在血管损伤或局部缺血刺激后, EPCs 动员入外周血, 并在趋化因子的作用下募集到损伤部位, 不仅参与修复血管内皮, 还可以促进损伤处缺血部位的再灌注^[74]。另外, EPCs 还具有维持新生血管的生长, 替代丢失的内皮细胞, 促进移植物的内皮化^[75]。

本研究以上述理论为依据, 即结合 EPCs 在成血管和改善微环境方面的独特优势, 探讨 EPCs 对 MSCs 增殖生物学行为产生的影响和其可能机制, 为进一步提高 MSCs 在骨肿瘤所致骨缺损中的再生与修复能力奠定理论基础。

第一部分 小鼠 MSCs、EPCs 的分离、培养及鉴定

实验一 小鼠 MSCs 的分离、培养及鉴定

1 材料

1.1 实验动物

4~6 周龄 C57BL/6 小鼠（购自新疆医科大学实验动物中心动物合格证号：SCXK（新）2011-0001,SPF 级饲养）

1.2 实验主要试剂

LG-DMEM	Gibco, 美国
FBS	Gibco, 美国
PBS 缓冲液	Gibco, 美国
谷氨酰胺	Gibco, 美国
胰蛋白酶	Sigma-Aldrich, 美国
青、链霉素	Gibco, 美国
DMSO	Sigma, 美国
MTT	Sigma, 美国
抗坏血酸	Cyagen Biosciences, 美国
地塞米松	Cyagen Biosciences, 美国
β -甘油磷酸钠	Cyagen Biosciences, 美国
茜素红染料	Cyagen Biosciences, 美国
ITS	Cyagen Biosciences, 美国
丙酮酸钠	Cyagen Biosciences, 美国
脯氨酸	Cyagen Biosciences, 美国
TGF- β 3	Cyagen Biosciences, 美国
阿利新蓝染料	Cyagen Biosciences, 美国
异丁基甲基黄嘌呤（IBMX）	Cyagen Biosciences, 美国
胰岛素	Cyagen Biosciences, 美国
罗格列酮	Cyagen Biosciences, 美国
油红 O 染料	Cyagen Biosciences, 美国

多聚甲醛固定液	上海化学试剂厂, 中国
甲苯胺蓝	Sigma, 美国
抗小鼠 Sca-1, CD29, CD45 和 CD11b	eBioscience, 美国

1.3 实验主要仪器

二氧化碳恒温孵箱	Thermal, 美国
YJ-875 型超净工作台	苏州净化设备厂, 中国
倒置相差显微镜及图像采集系统	Olympas, 日本
离心机	Sigma, 美国
6 孔、24 孔、96 孔培养板	Corning, 美国
60 mm、100 mm 直径细胞培养皿	Corning, 美国
流式细胞仪	BD, 美国
酶联免疫检测仪	BIO-TEK, 美国

2 方法

2.1 细胞分离和培养

- (1) 取 4~6 周龄的 C57BL/6 小鼠 1 只, 脱颈处死, 75%酒精浸泡 5 min,
- (2) 超净台中用灭菌后手术器械分离小鼠双下肢, 取股骨与胫骨并剔除干净肌肉组织与筋膜, 置于 PBS 中。
- (3) 转入另一超净台, 剪去长骨两端骨骺, 以 5ml 注射器吸取含 10% FBS 的 LG-DMEM (含青霉素钠 100 U/ml 和链霉素 100 U/ml), 培养基换 1ml 注射器针头反复冲洗骨髓腔直至发白, 冲出骨髓于 60 mm 培养皿中。
- (4) 吹打均匀放入 37°C、体积分数为 5%的 CO₂ 饱和湿度培养箱内培养。
- (5) 48 h 后换液吸去未贴壁细胞, 加入新鲜含 10% FBS 的 LG-DMEM 3ml, 以后每 48 h 换液一次。
- (6) 倒置显微镜观察细胞形态的变化, 待细胞生长至 80~90% 铺满时, 按 1:2 比例传代培养。

2.2 MTT 法检测 48 h 内贴壁细胞的增殖能力

- (1) 取第 2 代 48 h 内贴壁细胞, 2.5 g/l 胰蛋白酶消化, 3~5 min, 收集细胞, 1000 r/min 离心 5min, 弃上清, PBS 清洗 2 遍。

- (2) LG-MEM 培养基调整细胞密度为 2×10^3 /孔接种于 96 孔培养板中, 共接种 40 个孔, 每孔加入 LG-DMEM 培养基 $200 \mu\text{L}$, 轻轻拍打培养板使细胞接种均匀。
- (3) 放入 37°C 、体积分数为 5% 的 CO_2 饱和湿度培养箱内培养。
- (4) 12 h 后更换新鲜培养基, 在待测孔内加入 $10 \mu\text{L}$ 5mg/ml 的 MTT 液, 孵育 4 h。
- (5) 4 h 后弃去 MTT 液, 待测孔每孔加入 $150 \mu\text{L}$ DMSO。
- (5) 避光震荡 10 min。
- (6) 酶联免疫检测仪在 492 nm 波长处, 检测吸光度值(absorbance, A)。
- (7) 每次测量 5 个孔, 连续测量 8 d。
实验重复 3 次。

2.3 流式细胞技术检测 48 h 内贴壁细胞的表面标记物

- (1) 取第 3 代处于对数生长期的 48 h 内贴壁细胞, 2.5 g/L 胰蛋白酶消化, 3~5 min, 收集细胞, 1000 r/min 离心 5min, 弃上清, PBS 清洗 2 遍。
- (2) 加入含 3% 胎牛血清的 PBS 重悬细胞, 调整细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 吹打均匀后, 分装至流式管中, 每管 $100 \mu\text{L}$ 。
- (3) 分别加入直接荧光标记的抗小鼠 Sca-1-FITC $0.5 \mu\text{L}$, CD29-APC $0.5 \mu\text{L}$, CD45-PerCP-Cy5.5 $0.125 \mu\text{L}$, CD11b-PE $0.125 \mu\text{L}$ 孵育。分别加入相同直接荧光标记的抗小鼠 IgG-FITC $0.5 \mu\text{L}$, IgG- APC $0.5 \mu\text{L}$, IgG-PerCP-Cy5.5 $0.125 \mu\text{L}$, IgG-PE $0.125 \mu\text{L}$ 孵育为同型对照。流式管壁做好相应标记。
- (4) 室温孵育 0.5 h, 每 10 min 轻轻晃动一次。
- (5) 1000 r/min 离心 5 min, 吸弃上清液, PBS 清洗 2 遍以洗去未标记上的抗体。
- (6) 10 g/L 多聚甲醛固定 10 min。
- (7) 流式细胞仪检测表面标记物表达情况。
MSCs 以高表达 Sca-1 和 CD29, 低表达 CD45 和 CD11b 为满意结果。

2.4 48 h 内贴壁细胞的成骨诱导分化功能鉴定

- (1) 取第 2 代 48 h 内贴壁细胞, 2.5 g/L 胰蛋白酶消化, 3~5 min, 收集细胞, 1000 r/min 离心 5min, 弃上清, PBS 清洗 2 遍。
- (2) LG-MEM 培养基调整细胞密度以 $3 \times 10^4/\text{cm}^2$ 接种于 6 孔培养板, 放入 37°C 、体积分数为 5% 的 CO_2 饱和湿度培养箱内培养, 每 48 h 换液一次。

- (3) 配制成骨诱导分化培养基，培养基由含 10% FBS 的 LG-MEM 培养基，10 nmol/L 地塞米松，50 μ mol/L 抗坏血酸，10 mmol/L β -甘油磷酸钠组成。
- (4) 待细胞生长至 80%~90%铺满时，加入成骨诱导分化培养基。每 48 h 换液一次。
- (5) 诱导 21 d 后，取出 6 孔板，吸弃上清，PBS 小心润洗 2 遍，每遍 2 min，室温下 4%多聚甲醛固定 30 min，吸弃固定液，PBS 小心润洗 2 遍，吸弃。
- (6) 加入茜素红染液，避光环境里反应 30 min 后吸弃染液，PBS 润洗 2 遍，镜下观察钙沉积形成情况。
以 LG-DMEM 培养基培养为空白对照。以钙沉积被茜素红染料染为红色为阳性结果。

2.5 48 h 内贴壁细胞的成软骨诱导分化功能鉴定

- (1) 取第 2 代 48 h 内贴壁细胞待 80~90%铺满时，2.5 g/L 胰蛋白酶消化，3~5 min，收集细胞，1000 r/min 离心 5min，弃上清，PBS 清洗 2 遍。
- (2) LG-MEM 培养基调整细胞密度以 $3 \times 10^4/\text{cm}^2$ 接种于 6 孔培养板，放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为 5%的 CO_2 饱和湿度培养箱内培养，每 48 h 换液一次。
- (3) 配制成软骨诱导分化培养基，培养基由含 10% FBS 的 LG-MEM 培养基，10 nmol/L 地塞米松培养，50 μ mol/L 抗坏血酸，1mmol/L 丙酮酸钠，1% ITS，50 mg/ml 脯氨酸，20 ng/ml TGF- β_3 组成。
- (4) 待细胞生长铺满至 80%~90%后，用成软骨诱导分化培养基培养。每 48 h 换液一次。
- (5) 诱导 21 d 后，取出 6 孔板，吸弃上清，PBS 小心润洗 2 遍，每遍 2 min
- (6) 室温下 4%多聚甲醛固定 30 min，吸弃固定液，PBS 小心润洗 2 遍，吸弃。
- (7) 加入阿利新蓝染液，避光环境里反应 30 min 后吸弃染液，PBS 冲洗 2 遍，镜下观察。
以 LG-DMEM 培养基培养为空白对照。以细胞被阿利新蓝染料染为蓝色为阳性结果。

2.6 48 h 内贴壁细胞的成脂诱导分化功能鉴定

- (1) 取第 2 代 48 h 内贴壁细胞待 80~90%铺满时，2.5 g/L 胰蛋白酶消化，3~5 min，收集细胞，1000 r/min 离心 5min，弃上清，PBS 清洗 2 遍，

- (2) LG-MEM 培养基调整细胞密度以 $3 \times 10^4/\text{cm}^2$ 接种于 6 孔培养板, 放入 37°C 、体积分数为 5% 的 CO_2 饱和湿度培养箱内培养, 每 48 h 换液一次。
- (3) 配制成脂诱导分化培养基, 培养基由含 10% FBS LG-DMEM, $1 \mu\text{mol/L}$ 地塞米松, $200 \mu\text{mol/L}$ 吲哚美辛, 0.5mmol/L IBMX, $10 \mu\text{mol/L}$ 胰岛素组成。
- (4) 待细胞生长铺满至 80%~90% 后, 用成脂诱导分化培养基培养。48 h 换液一次。
- (5) 成脂诱导分化培养基培养 3 d, 换成 LG-DMEM 培养基, 24 h 换成诱导培养基, 循环 3~5 次, 再以 LG-DMEM 培养基培养 3 d。最后油红 O 染色。
- (6) 先弃去成脂诱导分化培养基, PBS 润洗 2 遍, 每遍 2 min。
- (7) 室温下 4% 多聚甲醛固定 30 min, 吸弃固定液, PBS 小心润洗 2 遍, 吸弃。
- (8) 将配好的油红染剂静置 10 min, 过滤去除沉淀物。加入油红 O 染液, 室温下避光染色 20 min。
- (9) 弃去油红, PBS 润洗 2 遍, 镜下观察脂滴染色情况。
以 LG-DMEM 培养基培养为空白对照。以脂滴被油红 O 染料染为红色为阳性结果。

2.7 统计学处理

所有实验重复 3 次。实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 数据用 SPSS 17.0 统计学软件进行分析。

3 结果

3.1 细胞形态观察

原代细胞接种 24 h 后开始贴壁, 贴壁细胞多呈类圆形, 原代培养 3 d 后, 部分细胞形态呈多角形, 不均匀分布 (图 1 A)。原代培养第 6~7 d, 细胞开始增殖, 呈漩涡状生长并形成细胞集落, 细胞多呈纺锥形。传代后, 细胞增殖速度较快, 一般 3~4 d 可融合成片, 融合率可达 80%~90%, 细胞呈漩涡状或放射状排列, 形成 MSCs 单细胞层。倒置显微镜下观察, 传代培养的 MSCs, 细胞完全伸展为长梭形 (图 1 B)。

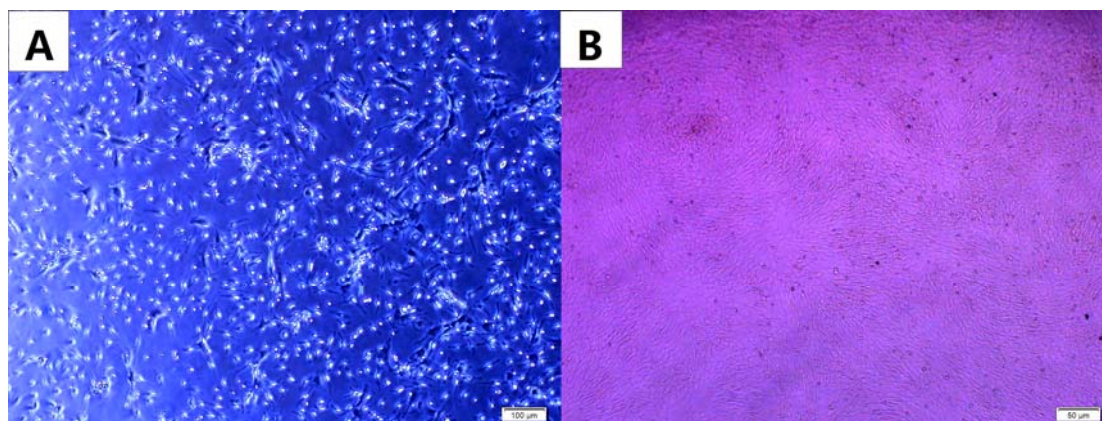


图 1 48 h 内贴壁细胞形态学动态观察 A 标尺示100 μ m; B 标尺示200 μ m

A. 48 h 内贴壁细胞第1代第2 d 形态不均一; B. 48 h 内贴壁细胞第3代第6 d 均一纺锤形;

Fig.1 Morphology characteristics of the primary attached cells at 48 h . A, bar= 100 μ m;B, bar= 200 μ m

A,The passage 1of primary adhered cells at 48 h present spindle shape but not uniformitarian at day 2; B, The passage 3 of primary adhered cells at 48 h present uniformitarian spindle shape at day 6;

3.2 48 h 内贴壁细胞增殖能力

通过对第3代 MSCs 增殖能力的检测发现,细胞体外增殖能力较强,潜伏期约为 2 d,第 3~5d 达到对数生长期,6~7 d 后进入平台期,生长曲线呈现典型的“S”形(图 2)。

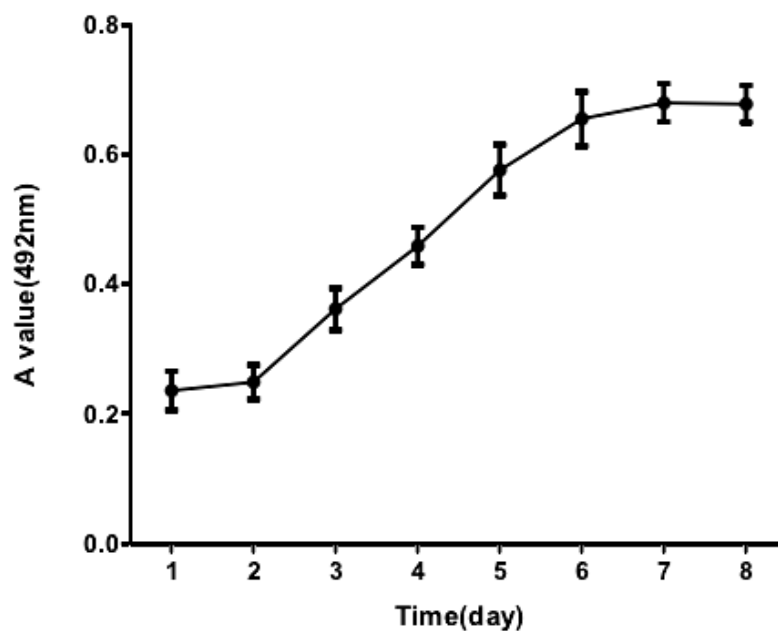


图 2 48 h 内贴壁细胞生长曲线

Fig.2 Growth curve of the primary attached cells at 48 h .

3.3 48 h 内贴壁细胞细胞表面标记物

流式检测结果显示第 3 代 48 h 内贴壁细胞 Sca-1, CD29, CD45 和 CD11b 阳性率分别为 $(98.30 \pm 0.75)\%$, $(97.47 \pm 1.32)\%$, $(1.87 \pm 0.15)\%$ 和 $(1.03 \pm 0.71)\%$ (图 3 A)。Sca-1 和 CD29 双阳性率为 $(75.77 \pm 3.13)\%$, CD45 和 CD11b 双阳性率为 $(0.67 \pm 0.53)\%$ (图 3 B) 。第 3 代 48 h 内贴壁细胞呈现 Sca-1⁺ CD29⁺CD45⁻CD11b⁻群体特征。

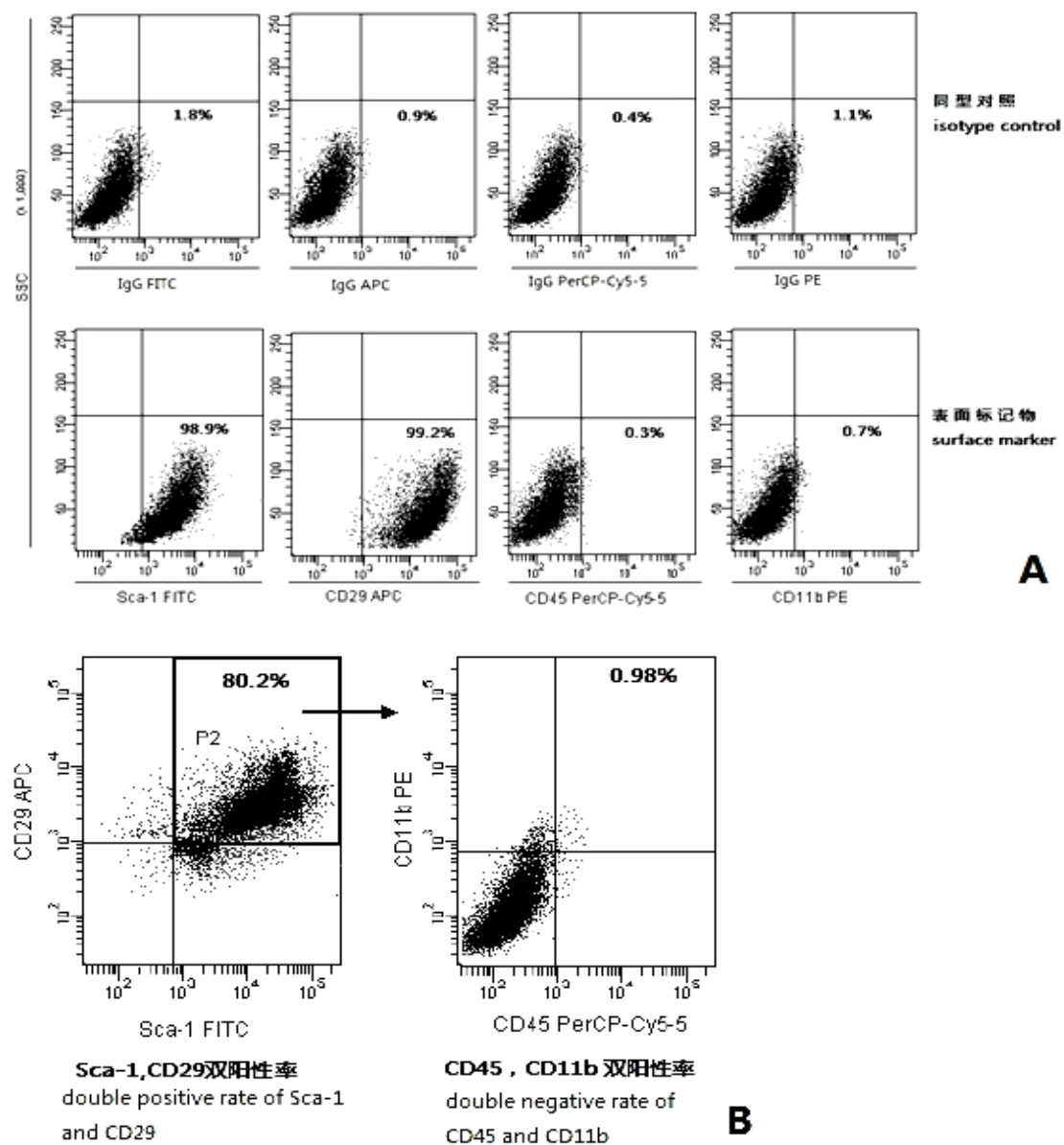


图 3 第3代48 h 内贴壁细胞的表面标记物阳性率流式检测结果

A. 第3代48 h 内贴壁细胞 Sca-1, CD29, CD45和 CD11b 表达水平; B. 第3代48 h 内贴壁细胞 Sca-1, CD29双阳性和 CD45, CD11b 双阳性表达水平

Fig.3 Cellular surface antigens on the passage 3 of primary adhered cells at 48h detected by flow cytometry

A, The expression levels of Sca-1, CD29, CD45, and CD11b; B, The double positive rate of Sca-1 and CD29 and the double negative rate of CD45 and CD11b.

3.4 48 h 内贴壁细胞向成骨、成软骨、成脂细胞分化

第3代48 h内贴壁细胞经成骨诱导后形态由梭形变为不规则形，诱导2周时可见散在分布小褐色结节，诱导21 d后结节中心的细胞逐渐铺满失去细胞结构，经茜草色素红染色呈红色(图4 A)。空白对照无钙结节形成，不能被茜草色素染色；第3代48 h内贴壁细胞经成软骨诱导后细胞形态变化不明显，诱导21d后行阿利新蓝染色，镜下观察可见诱导分化形成的软骨细胞被染成浅蓝色(图4 B)。空白对照不能被阿利新蓝染色；第3代48 h内贴壁细胞经成脂诱导后形态变不规则，部分细胞中有小脂滴形成，诱导21 d后小脂滴融合成大脂滴，经油红O染色，脂滴被染成红色(图4 C)。空白对照无脂滴形成,不能被油红O染色。

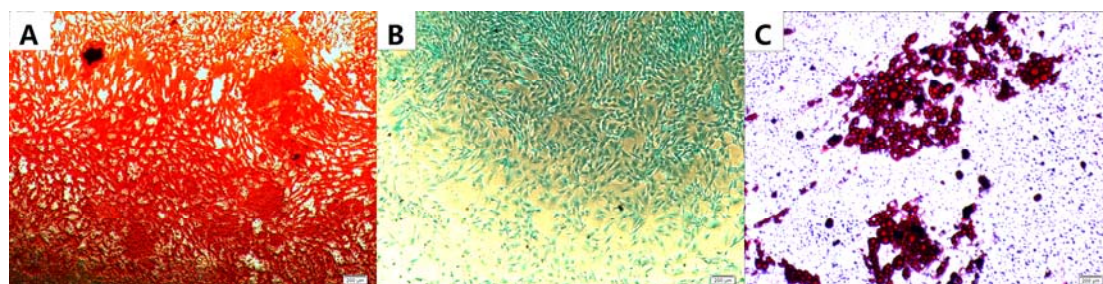


图4 第3代48 h内贴壁细胞诱导分化功能鉴定结果 A, B, C 标尺示100 μ m

A. 48 h内贴壁细胞成骨诱导后茜素红染色； B. 48 h内贴壁细胞成软骨诱导阿利新蓝染色；
C. 48 h内贴壁细胞成脂诱导后油红O染色

Fig.4 Identification of the the passage 3 of primary attached cells at 48 h differentiation into osteoblasts, chondrocytes and adipocytes visualized with light microscopy Bar=100 μ m

A,The differentiated osteoblasts were cultured in osteogenic medium for 21days, and the mineralized nodules were evaluated via Alizarin Red staining; B,The differentiated chondrocytes were cultured in chondrogenic media for 21days, and the cells were stained with Alcian blue;
4C,The differentiated adipocytes were cultured in adipogenic media for 21days,and the accumulation of numerous lipid vesicles within the cells were identified by Oil red O staining.

4 讨论

1976年,Friedenstein 等^[76]首次从骨髓中分离出 MSCs,相较于其它组织来源,骨髓中的 MSCs 含量更为丰富,且增殖能力更强^[77]。目前,从骨髓中分离 MSCs 的方法主要有:全骨髓贴壁法、密度梯度离心法、免疫磁珠分离法、流式细胞术分选法或上述方法的结合^[78,79]。后两种方法分离的细胞纯度较高,但是由于 MSCs 在全骨髓中比例很低^[80],单纯采用这两种方法获得的 MSCs 数量少,加之成本高、技术难、操作繁琐,对细胞活性有较大影响,易造成细胞损伤,出现增殖缓慢等问题,这些问题很大程度上限制了其应用。而小鼠的骨髓量远少于人、兔和大鼠等,采用密度梯度离心法获得的单个核细胞数量较少,而且长时间的高速离心以及分离液本身对细胞的毒性作用都会对细胞的生长分化产生影响。所以本实验利用 MSCs 差时贴壁的特性^[81]从骨髓中细胞直接分离出来,使其保存了旺盛的增殖能力。实验证实 MSCs 贴壁时间较快,2~4 h 左右即可贴壁,但是差时贴壁的细胞成分仍有掺杂,结合多次传代以逐渐提高细胞纯度。在实验过程中,对细胞形态及细胞增殖能力进行观察,发现第三代的 MSCs 均质性最好,细胞活性较高,增殖能力较强,与文献报道的相符^[82]。因此本实验选择第三代 MSCs 作为研究对象。

由于 MSCs 细胞形态无特异性并且细胞在不同阶段形态并不一致,所以单从形态学方面不可能对细胞进行鉴定。MSCs 较为公认的是高表达 Sca-1、CD29、CD73、CD90、CD105、CD44 同时低表达或不表达 CD45、CD11b、CD34 等^[83-85]。干细胞抗原-1(Stem cell antigen-1, Sca-1) 是小鼠 ly-6(lymphocyte activation protein-6A) 抗原家族的一员,Sca-1 几乎在所有组织、器官的干/前体细胞表面表达;CD29 是由 778 个氨基酸组成的 I 型膜贯通性糖蛋白,在细胞外有 4 个富含半胱氨酸的区域,有 12 个 N 型糖链黏着部位,分布于 T 细胞、B 细胞、单核细胞、血小板、成纤维细胞、内皮细胞等,是整合素 $\beta 1$ 链,可与各种 α 链形成异型二聚体;CD45 是具有蛋白质酪氨酸磷酸酶活性的受体蛋白,表达于造血细胞,几乎所有 B 细胞均有表达;CD11b 分子量大小为 165KD,与 CD18 相伴随形成 Mac-1 整联蛋白,主要表达于粒细胞、单核细胞、NK 细胞,具有黏附分子的功能;即 CD45 和 CD11b 是造血干细胞表面标记物,所以本研究采用 Sca-1 和 CD29 阳性表达而 CD45 与 CD11b 阴性表达的组合来检测 MSCs 的表面标记物的表达水平。与此相对, MSCs 的分化具有较强的组织特异性,在不同的组织微环境下可以分化为局部组织细胞,该细胞的分化呈多向性。而向成骨细胞,成软骨细胞和成脂细胞分化是 MSCs 三个基本分化方向,目前已作为公认的用于鉴定 MSCs 分化功能的功能鉴定的金标准^[85,86]。本实验所分离培养的 MSC 经流式检测结果显示 MSCs 呈现 Sca-1⁺ CD29⁺ CD45⁻ CD11b⁻ 细胞群体特征,与文献报道一致^[85];功能鉴定结果 MSCs 可向成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞方向分

化，与文献报道相符合^[76,85]。

由上可得出结论：应用改良差时贴壁法省去了红细胞裂解与高速离心及 Ficoll 分离液对细胞的损害又大大降低了仪器分选的成本，但仍可以分离出 MSCs，经过形态学鉴定、表面标志物鉴定、功能鉴定可确认是 MSCs。

实验二 小鼠 EPCs 的分离、培养及鉴定

1 材料

1.1 实验动物

4~6 周龄 C57BL/6 小鼠(购自新疆医科大学实验动物中心,动物合格证号: SCXK (新) 2011-0001,SPF 级饲养)

1.2 实验主要试剂

EGM-2MV Bullet Kit	Lonza , 瑞士
FN	Combrex, 美国
Matrigel 基质胶	BD, 美国
抗小鼠 CD34-FITC、CD133-PE、VEGFR2-APC 及同型对照	eBioscience, 美国
兔抗小鼠 CD31 多克隆抗体	SantaCruz, 美国
罗丹明标记羊抗兔 IgG	中杉金桥, 中国
山羊血清	中杉金桥, 中国
其余用到试剂同实验一	

1.2 实验主要仪器

CO2 恒温孵箱	Forma, 美国
YJ-875 型超净工作台	苏州净化设备厂, 中国
倒置相差显微镜	Olympas, 日本
高速离心机	Sigma-Aldrich, 美国
-20℃冰箱	海尔, 中国
荧光显微镜	Olympus Optical, 日本
其余用到仪器同实验一	

2 方法

2.1 48 h 后贴壁细胞分离、培养

- (1) 分离出小鼠骨髓细胞（分离方法同实验一）。
- (2) 48 h 后轻轻晃动培养皿，收集未贴壁细胞，1000 r/min 离心 5min。
- (3) 以 EGM-2 MV 培养基制成单细胞悬液移至预先包被纤连蛋白的 60 mm 培养皿中。
- (4) 放入 37℃、体积分数为 5% 的 CO₂ 饱和湿度培养箱内继续培养。
- (5) 48 h 后吸除旧培养基和未贴壁细胞换新鲜 EGM-2MV 培养基继续培养。细胞每 48 h 换液 1 次。
- (6) 原代培养的细胞至 80%~90% 铺满时按 1:2 传代。

2.2 MTT 法检测 48 h 后贴壁细胞的增殖能力

- (1) 取第 2 代 48h 后贴壁细胞，2.5 g/L 胰蛋白酶消化，3~5 min，收集细胞，1000 r/min 离心 5min，弃上清，PBS 清洗 2 遍。
- (2) EGM-2 MV 培养基调整细胞密度为 2×10^3 /孔接种于 96 孔培养板中，共接种 40 个孔，每孔加入 EGM-2 MV 培养基 200 μ L，轻轻拍打培养板使细胞接种均匀。
- (3) 放入 37℃、体积分数为 5% 的 CO₂ 饱和湿度培养箱内培养。
- (4) 12 h 更换新鲜培养基，在待测孔内加入 10 μ L 5mg/ml 的 MTT 液，孵育 4 h。
- (5) 4 h 后弃去 MTT 液，待测孔每孔加入 150 μ L DMSO，避光震荡 10 min。
- (6) 酶联免疫检测仪在 492 nm 波长处，检测吸光度 (absorbance, A) 值。
- (7) 每次测量 5 个孔，连续测量 8d，实验重复 3 次。

2.3 流式细胞术检测 48 h 后贴壁细胞的表面标记物

- (1) 取处于对数生长期的第 3 代 48 h 后贴壁细胞，待细胞 80%~90% 铺满时，2.5 g/L 胰蛋白酶消化 3~5 min，1000 r/min 离心 5 min，弃上清，PBS 清洗 2 遍。
- (2) PBS 重悬细胞，吹打均匀，调整细胞密度为 1×10^6 /ml，每管分装 100 μ L。
- (3) 分别加入直接荧光标记的抗小鼠 CD34-FITC、CD133-PE、

VEGFR2-APC 各 0.5 μ L。分别加入相同直接荧光标记的抗小鼠 IgG-FITC、IgG-PE、IgG-APC 各 0.5 μ L 孵育为同型对照。流式管壁做好相应标记。

- (4) 4 $^{\circ}$ C 孵育 0.5 h, 每 10 min 轻摇 1 次。
- (5) 1 000 r/min 离心 5 min, PBS 润洗 2 遍洗去未标记上的抗体。
- (6) 10 g/L 多聚甲醛固定 10 min。
- (7) 流式细胞术检测 EPCs 的表面标记物表达情况。

48 h 后贴壁细胞以均高表达 CD34、CD133 和 VEGFR2 为满意结果。实验重复 3 次。

2.4 48 h 后贴壁细胞体外成血管能力的功能鉴定

- (1) 基质胶放在冰上, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱里过夜冻融。
- (2) 在-20 $^{\circ}$ C 冰箱预冷 96 孔培养板和 200 μ L 枪头, 冰上操作, 每孔中铺 100 μ L 基质胶, 注意不可产生气泡。
- (3) 放入 37 $^{\circ}$ C、体积分数为 5%的 CO₂ 饱和湿度培养箱内孵育 0.5 h, 使其凝固成胶。
- (4) 取处于对数生长期的第 3 代 48 h 后贴壁细胞, 待细胞 80%~90%铺满时, 2.5 g/L 胰蛋白酶消化 3~5 min, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, PBS 清洗 2 遍。
- (5) EGM-2MV 培养基制成单细胞悬液, 细胞计数, 按 1×10^4 /孔细胞密度接种于基质胶上, 轻轻拍打, 使细胞接种均匀。
- (6) 放入 37 $^{\circ}$ C、体积分数为 5%的 CO₂ 饱和湿度培养箱内孵育。
- (7) 倒置显微镜动态观察小管形成情况。

48 h 后贴壁细胞以在体外基质胶上形成血管腔样结构为满意结果。实验重复 3 次。

2.5 48 h 后贴壁细胞特异性表面抗原 CD31 细胞免疫荧光染色鉴定

- (1) 取第 5 代 48 h 后贴壁细胞待细胞 80%~90%铺满时, 2.5 g/L 胰蛋白酶消化 3~5 min, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, PBS 清洗 2 遍。
- (2) EGM-2MV 培养基制成单细胞悬液, 细胞计数, 以 1×10^4 细胞/cm² 接种于放有无菌盖玻片的 24 孔板。
- (3) 放入 37 $^{\circ}$ C、体积分数为 5%的 CO₂ 饱和湿度培养箱内继续培养。
- (4) 细胞 80%~90%铺满时, PBS 洗 3 次, 每次 2 min。
- (5) 4%多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗 3 次, 每次 2 min。
- (6) 200 μ L 山羊血清室温封闭 1 h。

- (7) 滴加 200 μ L 兔抗小鼠 CD31 多克隆抗体 (I 抗, 滴度 1 : 100) , 4 $^{\circ}$ C 过夜。
- (8) PBS 洗 3 次, 每次 2 min。
- (9) 滴加 200 μ L 罗丹明标记的羊抗兔 Ig G (II 抗, 滴度 1 : 100), 室温避光孵育 1 h, 用 PBS 洗 3 次, 每次 2 min。
- (10) 同时做同型对照, 不加 I 抗, 用 PBS 代替, 余步骤同前。
- (11) 取出盖玻片, 甘油封片。
- (12) 荧光显微镜下观察, 拍照。

48 h 后贴壁细胞免疫荧光染色以表达特异性表面抗原 CD31 为满意结果。实验重复 3 次。

2.6 统计学处理

所有实验重复 3 次。实验数据以均数士标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 数据用 SPSS 17.0 统计学软件进行分析。

3 结果

3.1 细胞形态观察

倒置显微镜下对原代培养的 48h 后贴壁细胞进行动态观察 (图 1)。接种后 1~2 h, 细胞即开始贴壁, 开始多呈圆形逐渐拉伸呈短梭形。1~2 d 后, 可以观察到成簇的细胞, 其基底部可观察长梭形细胞向外周爬伸和移行。随后细胞开始快速增殖, 4 d 左右可见细胞集落形成。10 d 左右 细胞可达到 80%~90% 铺满, 位于集落中间的细胞更加密集, 形态也开始发生变化, 以类圆形和多角形细胞为主。12 d 时, 细胞数显著增加, 集落间互相连接成片, 细胞形态呈现典型的“铺路石”状。

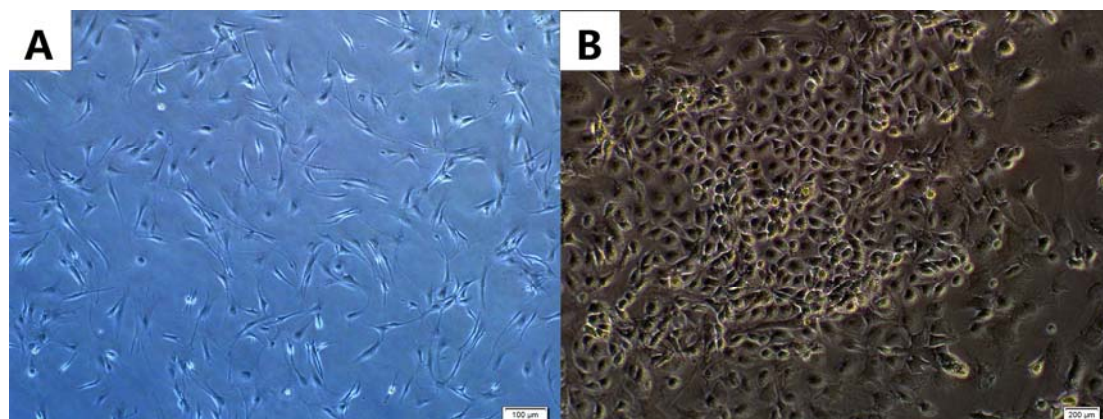


图 1 48 h 后贴壁细胞形态学动态观察 A 标尺示100 μ m; B 标尺 200 μ m

A. 48 h 后贴壁细胞第1代第2 d 呈长梭形; B. 48 h 内贴壁细胞第5代第10 d 呈铺路石样

Fig.1 Morphology characteristics of the subsequent adherent cells after 48 h.A, bar= 100μm;B, bar= 200μm

A,The passage 1 of subsequent adherent cells after 48 h became strip-shaped at day 2; B, The passage 5 of subsequent adherent cells after 48 h proliferated rapidly and arranged a typical cobblestone-like structure at day 10.

3.2 48 h 内贴壁细胞增殖能力

通过对第 3 代 48 h 内贴壁细胞增殖能力的检测发现, 细胞体外增殖能力较强, 潜伏期约为 2 d, 第 3~5 d 达到对数生长期, 6~7 d 后进入平台期, 生长曲线呈现典型的“S”形(图 2)。

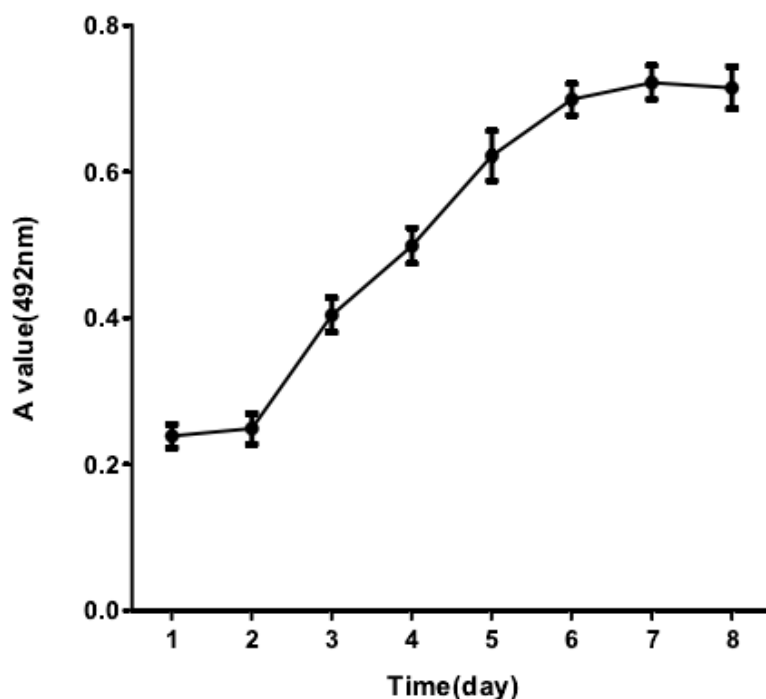
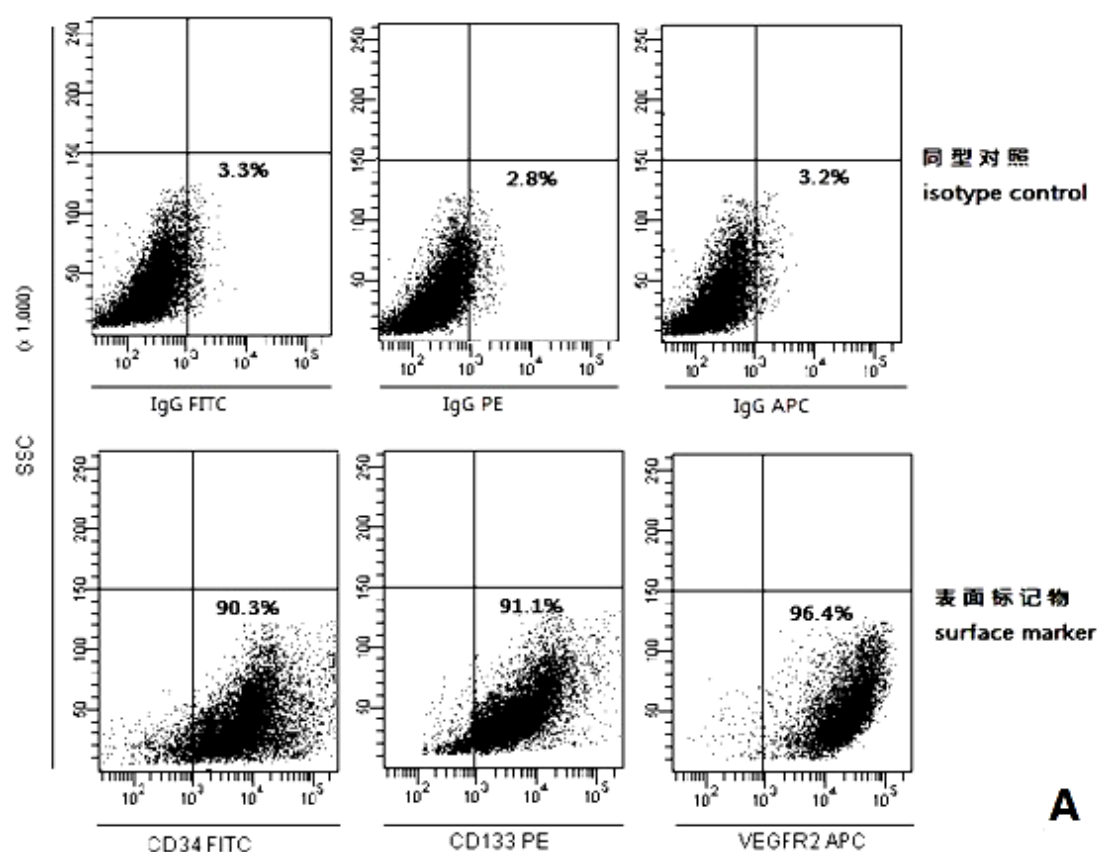


图 2 48 h 后贴壁细胞生长曲线

Fig.2 Growth curve of the subsequent adherent cells after 48h

3.3 流式检测 48 h 后贴壁细胞表面标记物表达结果

流式检测结果显示第 3 代 48 h 后贴壁细胞 CD34、CD133 和 VEGFR2 阳性率分别为 $(88.90 \pm 1.18)\%$ 、 $(92.73 \pm 2.90)\%$ 和 $(87.63 \pm 1.79)\%$ (图 3A)。CD34 和 CD133 双阳性率为 $(76.67 \pm 1.10)\%$ ，CD34、CD133 和 VEGFR2 三阳性率为 $(70.17 \pm 1.21)\%$ (图 3B)。第 3 代 48 h 后贴壁细胞呈现 CD34⁺CD133⁺VEGFR2⁺群体特征。



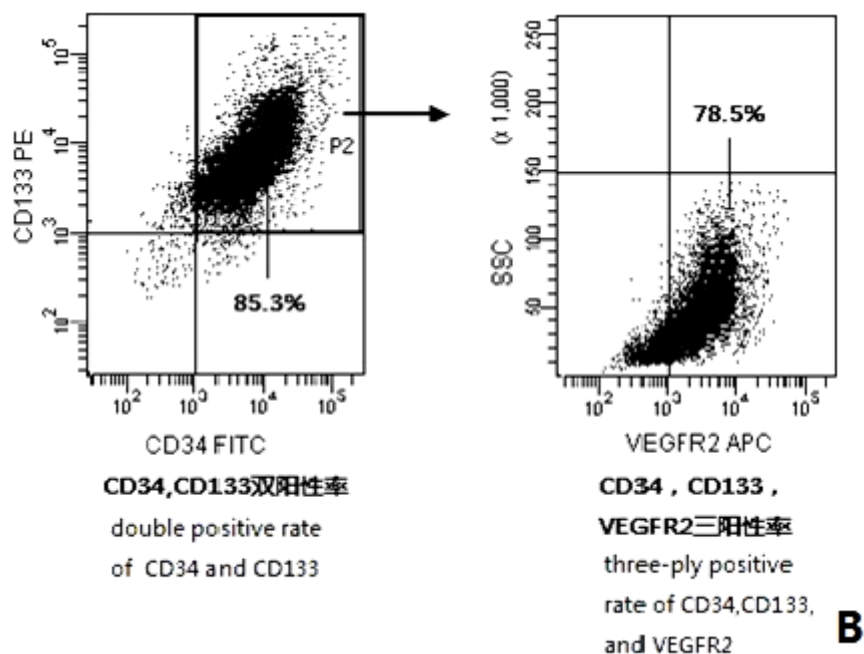


图 3 第3代48 h 后贴壁细胞的表面标记物阳性率流式检测结果

A. 第3代48 h 后贴壁细胞 CD34, CD133和 VEGFR2表达水平; B. 第3代48 h 后贴壁细胞 CD34, CD133和 VEGFR2三阳性表达水平

Fig.3 Cellular surface antigens on the subsequent adherent cells after 48 h detected by flow cytometry

A, The expression levels of CD34, CD133 and VEGFR2 of the subsequent adherent cells after 48h; B, The three-ply positive rate of CD34, CD133, and VEGFR2 of the subsequent adherent cells after 48h

3.4 48 h 后贴壁细胞的成血管功能

第3代48 h 后贴壁细胞体外形成血管腔样结构: 镜下观察, 2~4 h 后 细胞变形拉长, 6~8 h 细胞迁移聚集, 首尾相接, 形成血管腔样结构, 10~12 h 达到顶峰(图 4)。

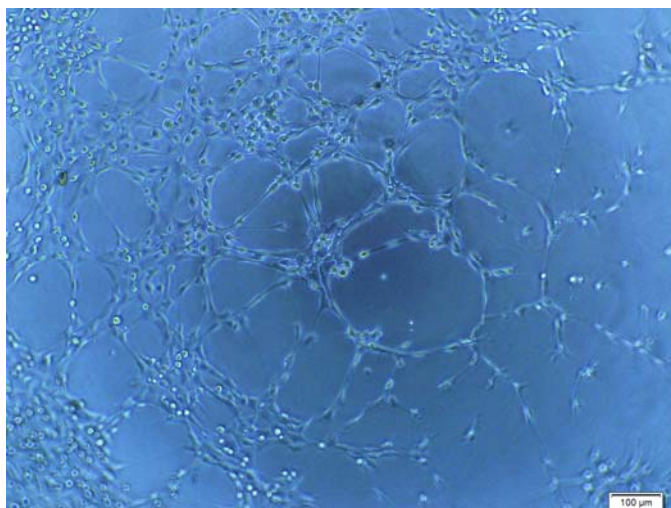


图 4 第3代48h 后贴壁细胞的体外成血管功能鉴定结果 标尺示100 μ m

Fig.4 Tube formation experiment of the passage 3 of subsequent adherent cells after 48 h visualized with light microscopy Bar=100μm

3.5 48 h 后贴壁细胞 CD31 免疫荧光染色

第 5 代 48 h 后贴壁细胞经免疫荧光染色后在荧光显微镜下观察结果显示，内皮细胞特异性表面抗原 CD31 荧光染色为阳性表达(图 5)，同型对照呈阴性表达。

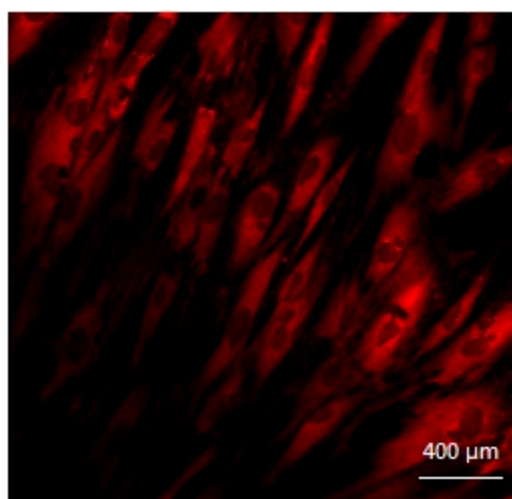


图 5 第5代48 h 后贴壁细胞 CD31 免疫荧光鉴定结果 标尺示400 μ m

Fig.5 Identification of the passage 5 of subsequent adherent cells after 48 h by CD31 immunofluorescence cell staining Bar=400 μ m

4 讨论

1997年, Asahara 等^[87]首次从外周血中分离出 EPCs, 但随后研究证实 EPCs 源于骨髓^[76,88,89]。与其它组织来源相比较, 骨髓中的 EPCs 含量相对较多, 且拥有更强的增殖能力^[77,90,91]。同样的, 目前从骨髓中分离 EPCs 方法主要有: 全骨髓贴壁法、密度梯度离心法、免疫磁珠分离法、流式细胞术分选法或上述方法的结合^[92-96]。后两种方法分离的细胞纯度较高, 但是由于 EPCs 在全骨髓中比例很低单纯采用这两种方法获得的 EPCs 数量少, 加之成本高、技术难、操作繁琐, 对细胞活性有较大影响, 易造成细胞损伤, 出现增殖缓慢等问题, 这些问题很大程度上限制了其应用。而小鼠的骨髓量远少于人、兔和大鼠等, 采用密度梯度离心法获得的单个核细胞数量较少, 而且长时间的快速离心以及分离液本身对细胞的毒性作用都会对细胞的生长分化产生影响。所以本实验利用 MSCs 与 EPCs 差时贴壁的特性^[81]从一份骨髓中一次性将两种细胞分离出来, 此方法简单易行, 避免了分选和反复离心造成的细胞损伤和丢失, 最大程度保存了 MSCs 和 EPCs 生长所需的微环境, 可使其保持旺盛的增殖能力。结果表明骨髓中的 EPC 贴壁较慢, 实验在贴壁培养 48 h 后收集未贴壁细胞另行用专用培养基培养, 可以粗略的将 MSCs 和 EPCs 分离。但是差时贴壁的细胞成分仍较复杂, 结合多次传代以逐渐提高细胞纯度。

由于 MSCs 和 EPCs 细胞形态相近并且同一种细胞在不同阶段形态并不一致, 所以单从形态学方面不可能对这两种细胞进行鉴定。目前国内外普遍结合细胞表面标志物和细胞分化功能来鉴定。EPCs 普遍认为高表达 CD34、CD133、VEGFR2^[97-100], 但仅一个表面分子抗原仍不具备特异性, 如 CD34 可同时在循环内皮细胞、内皮前体细胞、造血干细胞上表达, 利用 VEGFR2 可将内皮前体细胞与造血干细胞区分开来, 造血干细胞不表达 VEGFR2, 而 VEGFR2 又可同时表达于内皮前体细胞和成熟血管内皮细胞, CD133 则又可将内皮前体细胞和成熟血管内皮细胞区别开来, 内皮前体细胞表达 CD133 而成熟内皮祖细胞不表达。所以本实验采用三者组合阳性表达来检测 EPCs 的表面标记物表达水平。与此相对, 针对 EPCs 的功能鉴定是其能在基质胶上形成血管腔样结构^[54,86]。本实验所分离培养经流式检测结果高表达 CD34、CD133、VEGFR2, 与文献报道一致; 功能鉴定结果显示 48 h 后贴壁细胞可在基质胶上形成血管腔样结构, 细胞免疫荧光染色显示内皮细胞特异性表面标记物 CD31 表达阳性, 与文献报道相符。

由上可得出结论: 仅应用差速贴壁法就可以同时分离出 MSCs 和 EPCs, 并

经过形态学鉴定、表面标志物鉴定、功能鉴定联合鉴定确认为 MSCs 和 EPCs。本实验为同时建立 MSCs 和 EPCs 的细胞系提供了一种新方法，且简便高效稳定可重复性好，为后续研究提供了目的细胞，奠定了工作基础。

第二部分 EPCs 对 MSCs 增殖能力的影响

实验一 MTT 比色法检测 EPC-CM 培养 MSCs 对其增殖能力

影响

1 材料

1.1 实验动物

同第一部分实验

1.2 实验主要试剂

MTT Sigma, 美国
其余试剂同第一部分实验

1.3 实验主要仪器

Transwell 小室 Corning, 美国
酶联免疫检测仪 Beckman-Coulter, 美国
-80℃冰箱 海尔, 中国
高速离心机 Kubota2100, 日本
其余仪器同第一部分实验

2 方法

2.1 EPC-CM 的制备

- (1) 取经过鉴定后的第3~5代 EPCs 以 1×10^5 个细胞密度接种至60 mm 培养皿中, 细胞每48 h 换液时收集旧培养基
- (2) 2 000 r/min 离心 5 min, 取上清液加入10% FBS 即为 EPC-CM。重复制备, 直至足量。

(3) 经 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 贮存于 $-80\ ^\circ\text{C}$ 冰箱中备用。

2.2 MTT 比色法检测 EPC-CM 培养 MSCs 增殖能力

- (1) 取第2代 MSCs, 达到80~90%铺满时, $2.5\ \text{g/L}$ 胰蛋白酶消化3~5 min, $1000\ \text{r/min}$ 离心5 min。
- (2) 用含10% FBS 的 LG-DMEM 培养基制备细胞悬液, 以 $5\times 10^4/\text{ml}$ 接种于96孔培养板内, 每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ 。
- (3) 放入 $37\ ^\circ\text{C}$ 、体积分数为5%的 CO_2 饱和湿度培养箱内培养。
- (4) 培养12 h 后, 吸去培养基, 加入含10%FBS 及不同浓度 EPC-CM 的 LG-DMEM 培养基 $100\ \mu\text{L}$ 。
- (5) 实验分为: 0 EPC-CM 组 (对照组)、50% EPC-CM 组和100% EPC-CM 组, 每组设5个复孔。
- (6) 放入 $37\ ^\circ\text{C}$ 、体积分数为5%的 CO_2 饱和湿度培养箱内继续培养。
- (7) 培养48 h 后。每孔加入 $10\ \mu\text{L}$ MTT (5mg/ml), 培养4 h 后弃去上清液,
- (8) 每孔加入 $150\ \mu\text{L}$ DMSO, 震荡仪低速震荡10 min。
- (9) 酶标仪检测 492 nm 波长处的吸光度 (absorbance, A) 值。

各组设与试验平行不加细胞只加培养液的空白对照孔。最后比色以空白孔 A 值调零。实验重复 3 次。

2.3 统计学处理

实验结果重复 3 次。实验数据用 SPSS17.0 分析, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示。两组间比较采用独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

EPC-CM 对 MSCs 增殖能力影响

酶标仪检测 492 nm A 值结果显示: 实验组与对照组在 24 h 分别是(0.247 ± 0.025), (0.239 ± 0.032), (0.243 ± 0.026); 在 48 h 分别是(0.252 ± 0.027), (0.248 ± 0.027), (0.259 ± 0.029) 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。后续每隔 24 h 测得实验组与对照组的 A 值分别是(0.422 ± 0.025), (0.365 ± 0.031), (0.424 ± 0.019); (0.557 ± 0.038), (0.457 ± 0.028), (0.553 ± 0.034); (0.655 ± 0.047), (0.577 ± 0.037), (0.652 ± 0.041); (0.745 ± 0.023), (0.657 ± 0.043), (0.749 ± 0.029); (0.778 ± 0.035), (0.667 ± 0.032), (0.772 ± 0.031); (0.779 ± 0.026), (0.677 ± 0.025),

(0.775 ± 0.028)。3 d 后实验组 A 值明显高于对照组，差异均有统计学意义($P < 0.05$)，提示非接触共培养时 EPCs 能显著促进 MSCs 的增殖。

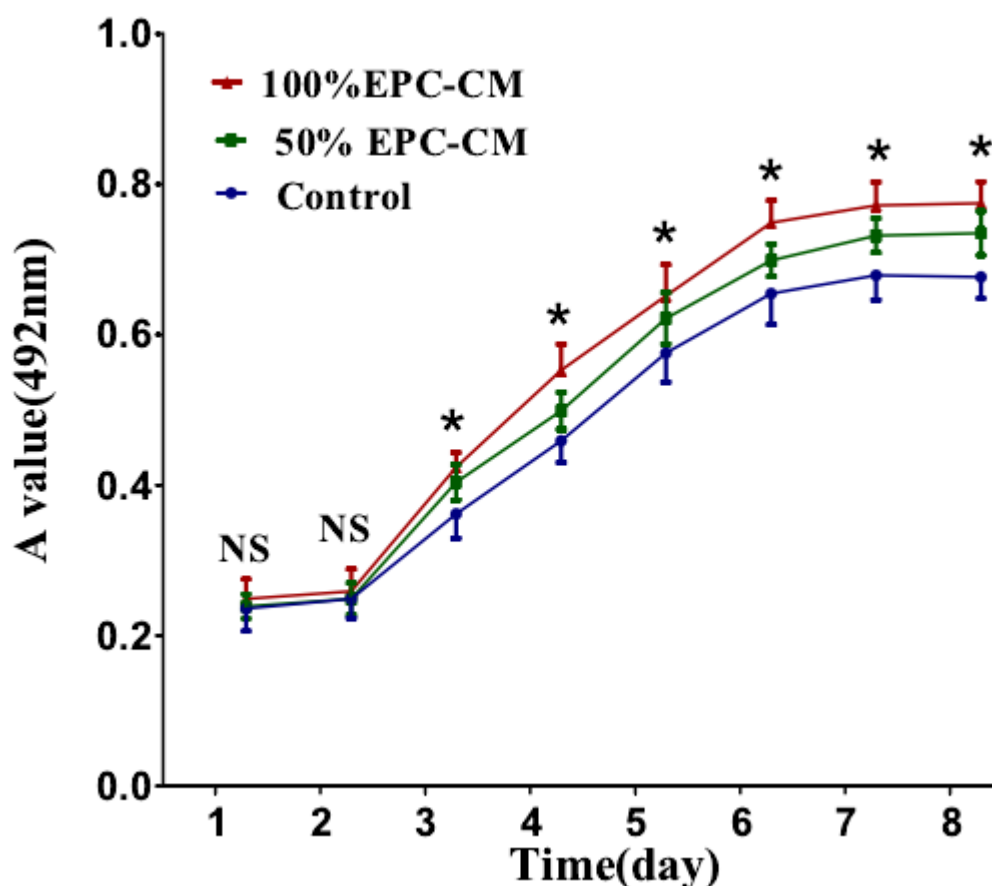


图 MTT 比色法检测共培养 EPCs 对 MSCs 增殖影响结果

注：与对照组比较 * $P < 0.05$

Fig. Results of MSCs co-cultured with EPCs (MTT assay)

note: vs.control group * $P < 0.05$

4 讨论

EPCs 可分泌血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF)、基质细胞衍生因子-1 (stromal cell-derived factor, SDF-1)、胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1)^[101]、表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF)、成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF)、肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF)^[102]、转化生长因子- β 1 (transforming

growth factor- β , TGF- β 1)^[103] 等多种生长因子, 这些生长因子对 EPCs 本身的存活、增殖和分化有促进作用, 其中直接调节血管形成的血管生长因子包括: VEGF、FGF 和 HGF; 间接调节的血管生长因子包括: TGF- β 1 和血管生成素^[104]。另外, 研究显示 IGF-1、FGF、VEGF、TGF- β 能促进成骨细胞增殖、分化能力和骨基质蛋白合成^[105-107]。

在体外进行细胞实验的目的就是希望得到细胞体外研究的结果是在体内功能的真实映照, 因此, 只有当体外的培养环境与体内更接近时, 细胞所展现出的功能才会更真实。体内一种细胞对另一种细胞产生影响主要是通过其旁分泌作用, 所以体外培养的 EPCs 一定会通过旁分泌作用将细胞因子分泌到培养基中, 检测其旁分泌作用对 MSCs 的影响, 最简单的方法就是使用含 EPCs 分泌物或代谢产物的 EPC-CM 作用于 MSCs, 观察其对 MSCs 相关功能的影响。本实验采用 MTT 比色法探讨对 MSCs 增殖的影响, 实验结果显示 EPC-CM 可以促进 MSCs 的增殖并随着 EPC-CM 浓度的增加其促增殖作用更加明显, 呈现浓度依赖性。

实验二 Transwell 间接共培养体系共培养, EPCs 对 MSCs 增殖能力的影响

1 材料

1.1 实验动物

同第一部分实验

1.2 实验主要试剂

EdU 试剂盒	锐博, 中国
TritonX-100	锐博, 中国
甘氨酸	锐博, 中国
甲醇	锐博, 中国

其余试剂同第一部分实验

1.3 实验主要仪器

Transwell 小室	Corning, 美国
激光共聚焦显微镜	zeiss LSM510, 德国
台式水平离心机	Beckman, 美国
高速离心机	Kubota2100, 日本
其余仪器同第一部分实验	

2 方法

2.1 建立 EPCs 和 MSCs Transwell 间接共培养体系

- (1) 第 2 代 MSCs 达到 80~90%融合时 2.5 g/l 胰蛋白酶消化 3~5 min, 1000 r/min 离心 5min。
- (2) 用含 10%胎牛血清的 LG-DMEM 培养基制备细胞悬液, 以 $1 \times 10^4 / \text{cm}^2$ 接种于预先放置有盖玻片的 24 孔 Transwell 培养板内下室, 然后每孔 LG-DMEM 培养基加至 600 μL 。共接种 6 孔。
- (3) 放入 37°C、体积分数为 5%的 CO_2 饱和湿度培养箱内培养。
- (4) 第 2 代 EPCs 达到 80~90%融合时, 胰酶消化 3~5 min, 1000 r/min 离心 5min, 用含 5%胎牛血清的 LG-DMEM 培养基制备细胞悬液, 以 $1 \times 10^4 / \text{cm}^2$ 接种于 24 孔 Transwell 培养板上室, 然后每小室 LG-DMEM 培养基加至 100 μL , 共接种 3 孔。
- (5) 以上室接种 EPCs 下室接种 MSCs 为实验组, 以仅下室接种 MSCs 为对照组。
- (6) 放入 37°C、体积分数为 5%的 CO_2 饱和湿度培养箱内培养。

2.2 EdU 标记

2.2.1 配置 50 $\mu\text{mol/L}$ EdU 培养基

用 LG-DMEM 细胞培养基按 1000: 1 的比例稀释 EdU 原溶液 (试剂 A), 制备 50 $\mu\text{mol/L}$ EdU 培养基。

2.2.2 EdU 培养基孵育

- (1) EPCs、MSCs 在 Transwell 间接共培养体系培养 72 h 后吸弃旧培养基, PBS 润洗 2 遍。

- (2) 加现配 50 $\mu\text{mol/L}$ EdU 培养基 500 μL ，放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为 5% 的 CO₂ 饱和湿度培养箱内培养孵育 4h。

2.2.3 细胞固定

- (1) PBS 润洗 1~2 次，每次 5 min。加入 200 μL 4% 多聚甲醛细胞固定液，室温固定 30 min，弃固定液。
- (2) 每孔加入 200 μL 2 mg/ml 甘氨酸中和多聚甲醛，保证染色反应体系，脱色摇床孵育 5min 后，弃甘氨酸溶液；
- (3) 每孔加入 200 μL PBS，脱色摇床清洗 5 min，弃 PBS；
- (4) 每孔加入 200 μL 渗透剂(0.5% TritonX-100 的 PBS)脱色摇床孵育 10 min；PBS 清洗 1 次，5 min。

2.2.4 Apollo 染色

- (1) 配制 Apollo®染色反应液 5 ml
配制顺序：
 - (1) 去离子水 4.69 ml
 - (2) Apollo®反应缓冲液 (试剂 B) 250 μL
 - (3) Apollo®催化剂溶液 (试剂 C) 50 μL
 - (4) Apollo®荧光染料溶液 (试剂 D) 15 μL
 - (5) Apollo®缓冲添加剂 (试剂 E) 44 mg
- (2) 每孔加入 200 μL 的 1 \times Apollo®染色反应液，避光、室温、脱色摇床孵育 30 min 后，弃染色反应液。
- (3) 加入 200 μL 渗透剂(0.5% TritonX-100 的 PBS) 脱色摇床清洗 2~3 次，每次 10 min，弃渗透剂；
- (4) 每孔每次加入 200 μL 甲醇清洗染料 1~2 次洗脱以降低染料背景。，每次 5 min；
- (5) PBS 清洗 1~2 次，每次 5 min。

2.2.5 DNA 染色

- (1) 用去离子水按 1000: 1 的比例稀释 PI 荧光染料，制备适量染色液，避光保存；
- (2) 每孔加入 200 μL 1000: 1 PI 染色液，避光、室温、脱色摇床孵育 30 min 后，弃染色反应液；
- (3) 每孔每次加入 200 μL PBS 清洗 1~2 次每次 2 min。

2.2.6 图像获取及分析

激光共聚焦显微镜观察镜下荧光染色情况并选取 5 个视野(中央、3、6、9、12 点位置)拍照，最后用 Aim Image Examiner 软件分析细胞核染色重合的面积比例。

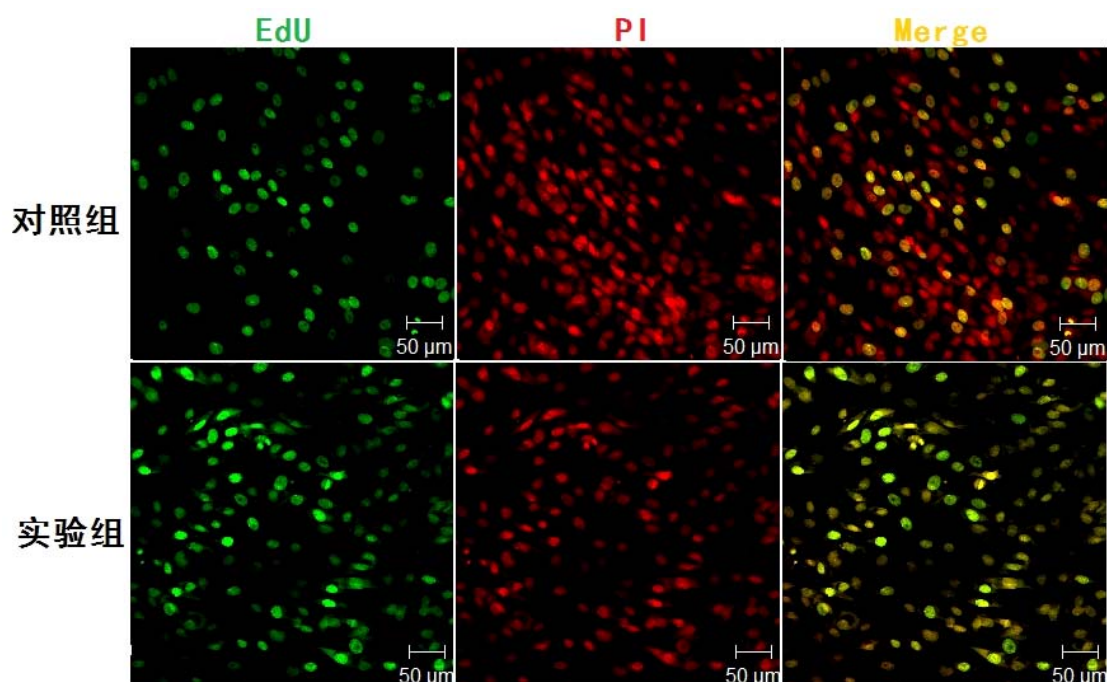
2.3 统计学处理

所有实验结果重复 3 次。实验数据用 SPSS17.0 分析，计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。两组间比较采用独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

EdU 荧光标记法检测共培养 EPCs 对 MSCs DNA 合成的影响

激光共聚焦显微镜不同通道下观察到处于细胞增殖期即 DNA 合成期的 MSCs 细胞核被染成绿色，而所有细胞核被染成红色，同一细胞核如果双染重合后则为黄色。经过 Aim Image Examiner 软件分析结果显示同样经过 72h 培养，实验组处于 DNA 合成期的比例是 $(86.00\pm 5.60)\%$ ，对照组的是 $(73.00\pm 3.58)\%$ ，差异有统计学意义($P < 0.01$)，提示非接触共培养 EPCs 能显著促进 MSCs 的 DNA 合成。



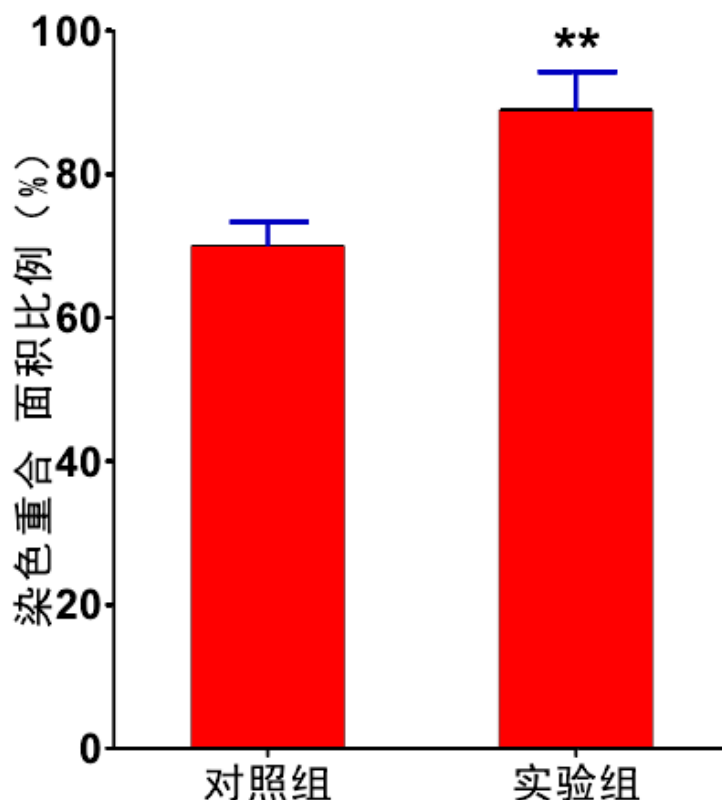


图 EdU 荧光标记法检测共培养 EPCs 对 MSCs DNA 合成影响结果

注：与对照组比较 ** $P < 0.01$

Fig. Results of MSCs co-cultured with EPCs (EdU fluorescent assay).

note: vs.control group ** $P < 0.01$

4 讨论

Transwell是一种运用特殊的共培养工具进行细胞共培养研究的实验技术，利用通透性支持物在体外共培养使得细胞可以在更为自然的极性条件下生长和研究，同时提高了细胞的分化水平，使得体外生长的细胞在形态和功能上更为接近体内的细胞。本实验在Transwell共培养体系里共培养骨髓源MSCs和EPCs，然后利用EdU荧光染色法观察 EPCs对MSCs DNA合成能力的影响，从而在分子水平观察EPCs对MSCs增殖能力的影响。

EdU (5-Ethynyl-2' - deoxyuridine, 5-乙炔基-2' 脱氧尿嘧啶核苷) 是一种胸腺嘧啶核苷类似物，能够在细胞增殖时期代替胸腺嘧啶 (T) 渗入正在复制的DNA分子中，通过基于EdU 与Apollo®荧光染料的特异性反应快速检测细胞DNA复制活

性。近年取代BrdU用来检测DNA复制及细胞增殖^[108]。标记整个细胞的过程与细胞增殖活性有关，而染色率与细胞活性有关^[109]，所以本实验根据MSCs的生长曲线选取处于对数生长期的细胞进行研究。用激光共聚焦显微镜拍照后，我们发现如果按照EdU说明书运用Image-Proplus 软件来计算 MSCs的增殖率，肉眼计数会有一些的主观性，另外大多数细胞的细胞核只被染色了大部分甚至只染上了一小部分，这类细胞如何计数缺乏客观合理的标准而无法计数，所以我们采用了Aim Image Examiner 软件计算只要有DNA合成的EPCs细胞核部位就会被染上绿色而全部细胞核被染上红色，然后计算所有被染上绿色部位的面积和与所有被染上红色部位的面积和的比例以此来检测MSCs的增殖能力。统计结果显示，与对照组相比实验组的MSCs细胞核被染上绿色的部分更多，说明实验组的MSCs的DNA合成能力更强，这与传统检测细胞增殖能力的MTT比色法结果一致，说明当MSCs与EPCs共培养时其增殖能力更强。

结 论

1. 利用差速贴壁法可以同时分离纯化扩增 MSCs 和 EPCs, 其中 MSCs 经过表面标记物鉴定呈现 Sca-1⁺CD29⁺CD45⁻CD11b⁻细胞群体特征, 经过功能鉴定可向成骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞方向分化, 呈现多向分化潜能; EPCs 经过表面标记物鉴定呈现 CD34⁺CD133⁺VEGFR2⁺细胞群体特征, 经过功能鉴定可在基质胶上形成血管腔样结构, 经过细胞免疫荧光鉴定表达内皮系细胞特异性表面抗原 CD31.
2. MTT 比色法检测结果表明 EPC-CM 可以促进 MSCs 的增殖并随着 EPC-CM 浓度的增加其促增殖作用更加明显, 呈现浓度依赖性。提示 EPCs 旁分泌的细胞生长因子等生物活性物质可以促进 MSCs 的增殖。
3. MSCs 和 EPCs 在非接触共培养体系共培养时其 DNA 合成能力更强, 传统检测细胞增殖能力的 MTT 比色法结果一致, 从侧面说明当 MSCs 与 EPCs 共培养时其增殖能力更强。

参考文献

- [1] 汤钊猷. 现代肿瘤学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 2000, 1361-1363.
- [2] Veth R, vanHoesel R, Pruszczynski M, et al. Limb salvage in musculo-skeletal oncology. *Lancet Oncol*[J]. 2003, 4(6):343-350.
- [3] Lindner NJ, Ramm O, Hillmann A, et al. Limb salvage and outcome of osteosarcoma: the University of Muenster experience. *Clin Orthop*[J]. 1999, 358:83-89.
- [4] Nishida J, Shimamura T. Methods of reconstruction for bone defect after tumor excision: a review of alternatives[J]. *Med Sci Monit*, 2008, 14(8) : RA107-113.
- [5] Rozen N, Bick T, Bajayo A, et al. Transplanted blood-derived endothelial progenitor cells (EPC) enhance bridging of sheep tibia critical size defects[J]. *Bone*, 2009, 5: 918 -924.
- [6] Yan F, Yang WL, Yang W. Repairing femur defect using biomaterials and its features evaluation[J]. *J Clin Rehabil Tissue Eng Res*, 2010, 16: 2963-2966.
- [7] Mohd Janurudin J, Ozeki K, Aoki H. Preparation of a hydroxyapatite and hydrogen peroxide composite for tooth whitening[J]. *Biomed Mater Eng*, 2007, 2: 69 -75.
- [8] Brandoff JF, Silber JS, Vaccaro AR. Contemporary alternatives to synthetic bone grafts for spine surgery[J]. *J Orthop Am*, 2008, 37: 410 -414.
- [9] Maier SSL, Pelin I, Bulacovschi V. Study on an injectable biomimetic Hydroxyapatite--atelocollagen composite[J]. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*, 2007, 4: 1079 -1083.
- [10] Cancedda R, Giannoni P, Mastrogiacomo M. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice[J]. *Biomaterials*, 2007, 28(29):4240-4250.
- [11] Berthiaume F, Maguire TJ, Yarmush ML. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges[J]. *Annu Rev Chem Biomol Eng*. 2011, 2:403-30.
- [12] Lovett M, Lee K, Edwards A, Kaplan DL. Vascularization strategies for tissue engineering[J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2009, 15:353-70.
- [13] Jain RK, Au P, Tam J, et al. Engineering vascularized tissue[J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(7):821-823.
- [14] Kannan RY, Salacinski HJ, Sales K, et al. The roles of tissue engineering and vascularisation in the development of micro-vascular networks: a review[J]. *Biomaterials*, 2005, 26(14):1857- 1875.
- [15] Shieh SJ, Vacanti JP. State-of-the-art tissue engineering: from tissue

- engineering to organ building[J].Surgery,2005,137(1): 1-7.
- [16] Borges J, Mueller MC, Padron NT, et al. Engineered adipose tissue supplied by functional microvessels[J]. Tissue Eng, 2003, 9(6):1263-1270.
- [17] Logeart - Avramoglou D, Anagnostou F, Bizios R, et al. Engineering bone: challenges and obstacles[J]. J Cell Mol Med, 2005, 9(1):72-84.
- [18] Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells[J]. N Engl J Med, 2001, 344(5):385-386.
- [19] Schimming R, Schmelzeisen R. Tissue-engineered bone for maxillary sinus augmentation[J]. J Oral Maxillofac Surg, 2004, 62(6):724-729.
- [20] Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, et al. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study[J]. Tissue Eng, 2007, 13(5):947-955.
- [21] Hibi H, Yamada Y, Ueda M, et al. Alveolar cleft osteoplasty using tissue-engineered osteogenic materia[J]. Int J Oral Maxillofac Surg, 2006, 35(6):551-555.
- [22] Lee J, Sung HM, Jang JD, et al. Successful reconstruction of 15-cm segmental defects by bone marrow stem cells and resected autogenous bone graft in central hemangioma[J]. J Oral Maxillofac Surg, 2010, 68(1):188-194.
- [23] Connolly JF, Guse R, Tiedeman J, et al. Autologous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial nonunions[J]. Clin Orthop Relat Res, 1991, (266):259-270.
- [24] Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, et al. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells[J]. J Bone Joint Surg Am, 2005, 87(7):1430-1437.
- [25] Fortier LA, Barker JU, Strauss EJ, et al. The role of growth factors in cartilage repair[J]. Clin Orthop Relat Res, 2011, 469(10):2706-2715.
- [26] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411):143-147.
- [27] Chang F, Ishii T, Yanai T, et al. Repair of large full-thickness articular cartilage Defects by transplantation of autologous uncultured bone-marrow-derived mononuclear cells[J]. J Orthop Res, 2008, 26(1):18-26.
- [28] Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial[J]. Lancet, 2002, 360 (9331):427-435.
- [29] Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ

- vascularization and regeneration[J]. Nat Med. 2003,9(6):702-712.
- [30] Higashi Y, Kimura M, Hara K, et al. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation improves endothelium-dependent vasodilation in patients with limb ischemia[J]. Circulation. 2004,109(10):1215-1218.
- [31] Umemura T, Nishioka K, Igarashi A, et al. Autologous bone marrow mononuclear cell implantation induces angiogenesis and bone regeneration in a patient with compartment syndrome[J]. Circ J. 2006,70(10): 1362-1364.
- [32] Reyes M, Lund T, Lenvik T, et al. Purification and *ex vivo* expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells[J]. Blood. 2001,98(9):2615-2625.
- [33] Yasuhara S, Yasunaga Y, Hisatome T, et al. Efficacy of bone marrow mononuclear cells to promote bone regeneration compared with isolated CD34⁺ cells from the same volume of aspirate[J]. Artif Organs. 2010,34(7):594-599.
- [34] Ghannam S, Bouffi C, Djouad F, et al. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications[J]. Stem Cell Res Ther, 2010,15; 1: 2.
- [35] Marie PJ, Fromigué O. Osteogenic differentiation of human marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. Regen Med, 2006,1(4):539-548
- [36] Heino TJ, Hentunen TA. Differentiation of osteoblasts and osteocytes from mesenchymal stem cells[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2008,(2):131-145
- [37] Matsuda C, Takagi M, Hattori T, et al. Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Chondrocytes for Construction of Three-dimensional Cartilage Tissue[J]. Cytotechnology, 2005,47(1-3):11-17.
- [38] Im GI, Kim DY, Shin JH, et al. Repair of cartilage defect in the rabbit with cultured mesenchymal stem cells from bone marrow[J]. J Bone Joint Surg Br, 2001,83(2):289-294
- [39] Gao Y, Xue J, Li X, et al. Metformin regulates osteoblast and Adipocyte differentiation of rat mesenchymal stem cells[J]. J Pharm Pharmacol, 2008,60(12):1695-1700
- [40] Ookura N, Fujimori Y, Nishioka K, et al. Adipocyte differentiation of human marrow mesenchymal stem cells reduces the supporting capacity for hematopoietic progenitors but not for severe combined immunodeficiency repopulating cells[J]. Int J Mol Med, 2007,19(3):387-392
- [41] Abouelfetouh A, Kondoh T, Ehara K, et al. Morphological differentiation of bone marrow stromal cells into neuron like cells after co-culture with hippocampal slice[J]. Brain Res, 2004,1029(1):114-119.
- [42] Mezey E. The therapeutic potential of bone marrow derived stromal cells[J]. J Cell Biochem, 2011, 112(10):2683-2687.

- [43] Li H, Fu X, Ouyang Y, et al. Adult bone-marrow-derived mesenchymal stem cells contribute to wound healing of skin appendages [J]. *Cell Tissue Res*, 2006, 326(3):725-736.
- [44] Sasaki M, Abe R, Fujita Y, et al. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type[J]. *Immunol*, 2008, 180(4):2581-2587.
- [45] Qihao Z, Xigu C, Guanghui C, et al. Spheroid formation and differentiation into hepatocyte-like cells of rat mesenchymal stem cell induced by co-culture with liver cells[J]. *DNA Cell Biol*, 2007, 26(7):497-503
- [46] Chivu M, Dima SO, Stancu CI, et al. *In vitro* hepatic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells under differential exposure to liver-specific factors[J]. *Transl Res*, 2009, 154(3):122-132.
- [47] Silva GV, Litovsky S, Assad JA, et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model[J]. *Circulation*, 2005, 111(2):150-156.
- [48] Yang MC, Wang SS, Chou NK, et al. The cardiomyogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells on silk fibroin-polysaccharide cardiac patches *in vitro*[J]. *Biomaterials*, 2009, 30(22):3757-3765.
- [49] Yan X, Lv A, Xing Y, et al. Inhibition of p53-p21 pathway promotes the differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes[J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 354(1-2):21-8.
- [50] Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: Re-visiting history, concepts, and assays[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(4):314-9.
- [51] Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp[J]. *J Bone Miner Res*, 2003, 18(4): 696-704.
- [52] Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament[J]. *Lancet*, 2004, 364(9429): 149-55.
- [53] Zannettino AC, Paton S, Arthur A, et al. Multipotential human adipose derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype *in vitro* and *in vivo*[J]. *J Cell Physiol*, 2008, 214(2): 413-21.
- [54] Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, et al. Circulating skeletal stem cells[J]. *J Cell Biol*, 2001, 153(5): 1133-40.
- [55] Kogler G, Sensken S, Airey JA, et al. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential[J]. *J Exp Med*, 2004, 200(2): 123-35.

- [56] Kim BO, Tian H, Prasongsukarn K, et al. Cell transplantation improves ventricular function after myocardial infarction: A preclinical study of human unrestricted somatic stem cells in a porcine model[J]. *Circulation*, 2005, 112(S9):I96-104.
- [57] Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells[J]. *New England Journal of Medicine*, 2001, 344(5):385-386.
- [58] Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, et al. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees[J]. *Osteoarthritis and cartilage*, 2002, 10(3):199-206.
- [59] Krebsbach PH, Mankani MH, Satomura K, et al. Repair of craniotomy defects using bone marrow stromal cells[J]. *Transplantation*, 1998, 66(10):1272-1278.
- [60] Alhadlaq A, Mao J. Tissue-engineered neogenesis of human-shaped mandibular condyle from rat mesenchymal stem cells[J]. *Journal of dental research*, 2003, 82(12):951-956.
- [61] Hasegawa N, Kawaguchi H, Hirachi A, et al. Behavior of Transplanted Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Periodontal Defects[J]. *Journal of periodontology*, 2006, 77(6):1003-1007.
- [62] Li H, Yan F, Lei L, et al. Application of autologous cryopreserved bone marrow mesenchymal stem cells for periodontal regeneration in dogs[J]. *Cells Tissues Organs*, 2009, 190(2):94-101.
- [63] Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells characterization and role in vascular biology. *Circulation research*[J]. 2004, 95(4):343-353.
- [64] Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow[J]. *Journal of Clinical Investigation*. 2002, 109(3):337-382.
- [65] Brunt KR, Hall S, Ward CA, et al. Endothelial progenitor cell and mesenchymal stem cell isolation, characterization, viral transduction[J]. *Methods Mol Med*, 2007, 139:197-210.
- [66] Martínez-Estrada OM, Muoz-Santos Y, Julve J, et al. Human adipose tissue as a source of FLk-1⁺ cells: new method of differentiation and expansion[J]. *Cardiovascular research*, 2005, 65(2):328-333.
- [67] Yoder MC, Mead LE, Prater D, et al. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals[J]. *Blood*, 2007, 109(5):1801-1809.
- [68] Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration[J]. *Nature medicine*,

- 2003;9(6):702-712.
- [69] Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, Chopp M. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse[J]. *Circulation research*, 2002,90(3):284-288.
- [70] Peng H, Wright V, Usas A, et al. Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4[J]. *Journal of Clinical Investigation*,2002,110(6):751-760.
- [71] Kunz GA, Liang G, Cuculi F, et al. Circulating endothelial progenitor cells predict coronary artery disease severity[J]. *American heart journal*, 2006,152(1):190-195.
- [72] Henrich D, Seebach C, Kaehling C, et al. Simultaneous Cultivation of Human Endothelial-like Differentiated Precursor Cells and Human Marrow Stromal Cells on β -Tricalcium Phosphates[J]. *Tissue Engineering Part C: Method*, 2009,15(4):551-560.
- [73] Zammaretti P, Zisch AH. Adult endothelial progenitor cells' Renewing vasculature[J]. *Int J Biochem Cell Biol*,2005,37(3):493-503.
- [74] Schatteman GC, Dunnwald M, Jiao C. Biology of bone marrow-derived endothelial cell precursors[J]. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*,2007,292(1):H1-H18.
- [75] Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34⁺ cells identifies a population of functional endothelial precursors[J]. *Blood*,2000,95(3):952-958.
- [76] Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs[J]. *Exp Hematol*,1976, 4(5) : 267- 274.
- [77] Lee OK, Kuo TK, Chen WM, et al. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from Umbilical cord blood[J]. *Blood*,2004,103(5):1669-1675.
- [78] Morikawa S, Mabuchi Y, Kubota Y, et al. Prospective identification, isolation and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow[J]. *Exp Med*,2009,206 (11):2483-2496.
- [79] Kode JA, Mukherjee S, Joglekar MV, et al. Mesenchymal stem cells: Immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration [J]. *Cytotherapy*,2009,11 (4) :377-391.
- [80] Kagami H, Agata H, Tojo A. Bone marrow stromal cells (bone marrow-derived Multipotent mesenchymal stromal cells) for bone tissue engineering: basic science to clinical translation[J]. *Int J Biochem Cell Biol*,2011,43(3):286-289.
- [81] Casamassimi A, Balestrieri ml, Fiorito C, et al. Comparison between total

- endothelial progenitor cell isolation versus enriched CD133⁺ culture[J].J Biochem. 2007,141(4):503-511.
- [82] Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, et al. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation[J].Journal of Clinical Investigation,2004,113(12):1701-1710.
- [83] Ishii M, Koike C, Igarashi A, et al. Molecular markers distinguish bone marrow mesenchymal stem cells from fibroblasts[J].Biochem Biophys Res Commun, 2005, 332(1) : 297- 303
- [84] Lee JW,Gupta N,Serikov V,et al. Potential application of mesenchymal stem cells in acute lung injury[J].Expert Opin Biol Ther,2009,9(10) : 1259 - 1270.
- [85] Wu X, Pang L, Lei W, et al. Inhibition of Sca-1Positive Skeletal Stem Cell Recruitment by Alendronate Blunts the Anabolic Effects of Parathyroid Hormone on Bone Remodeling[J].Cell Stem Cell,2010, 7: 571-80.
- [86] Li Q, Wang Z. Influence of mesenchymal stem cells with endothelial progenitor cells in co-culture on osteogenesis and angiogenesis: an *in vitro* study[J].Arch Med Res ,2013 ,44(7):504-513.
- [87] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al.Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. Science,1997,275(5302):964-967.
- [88] Murohara T, Ikeda H, Duan J,et al.Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization[J].J Clin Invest, 2000 ,105:1527-1536.
- [89] Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization[J]. Circ Res, 1999, 85:221-228.
- [90] Cherqui S, Kurian SM, Schussler O, et al. Isolation and angiogenesis by endothelial progenitors in the fetal liver[J].Stem Cells,2006,24(1):44-54.
- [91] Tongers J, Roncalli JG, losordo DW. Role of endothelial progenitor cells during ischemia-induced vasculogenesis and collateral formation [J]. Microvasc Res,2010,79(3):200-206.
- [92] Eggermann J,Kliche S,Jarmy G,et al. Endothelial progenitor cell culture and differentiation in vitro: a methodological comparison using human umbilical cord blood[J].Cardiovasc Res,2003,58:478-486.
- [93] Weber A, Pedrosa I, Kawamoto A, et al. Magnetic resonance mapping of transplanted Endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization in ischemic heart disease[J].Eur J Cardiothorac Surg,2004,26(1):137-143.
- [94] Khan SS, Solomon MA, McCoy JP Jr. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry[J]. Cytometry B Clin Cytom,

- 2005,64(1):1-8.
- [95] Medina RJ, O'Neill CI, Sweeney M, et al. Molecular analysis of endothelial progenitor cell(EPC) subtypes reveals two distinct cell populations with different identities[J]. BMC Med Genomics,2010,3:18.
- [96] Palladino M, Gatto I, Neri V, et al. Combined Therapy with Sonic Hedgehog Gene Transfer and Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitor Cells Enhances Angiogenesis and Myogenesis in the Ischemic Skeletal Muscle[J]. J Vasc Res, 2012,49(5):425-431.
- [97] Dimmeler S. Regulation of bone marrow-derived vascular progenitor cell mobilization and maintenance [J] . Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010,30(6):1088-1093.
- [98] Sen S,McDonald S,Coates P,et al. Endothelial progenitor cells: novel biomarker Andpromising cell therapy for cardiovascular disease[J].Clin Science,2011,120: 263- 283.
- [99] Sahoo S, Klychko E, Thorne T, et al. Exosomes From Human CD34+ Stem Cells Mediate Their Proangiogenic Paracrine Activity Novelty and Significance[J]. Circ Res,2011,109: 724 -728.
- [100] Navarro-Sobrinho M, Hernández-Guillamon M, Fernandez-Cadenas I,et al.The angiogenic gene profile of circulating endothelial progenitor cells from ischemic stroke patients[J].Vascular cell,2013,5: 1-7.
- [101] Urbich C, Aicher A, Heeschen C, et al. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells[J]. J Mol Cell Cardiol,2005,39(5):733-742.
- [102] He T,Smith IA, Harrington S, et al. Transplantation of circulating endothelial progenitor cells Restores endothelial function of denuded rabbit carotid arteries[J]. Stroke,2004, 35(10):2378-2384.
- [103] Doyle B, Sorajja P, Hynes B, et al. Progenitor cell therapy in a porcine acute myocardial infarction model induces cardiac hypertrophy, mediated by paracrine secretion of cardirotrophic factors including TGFbeta1[J]. Stem Cells Dev, 2008,17(5):941-951.
- [104] Nomi M, Miyake H, Sugita Y,et al.Role of growth factors and endothelial cells in therapeutic angiogenesis and tissue engineering[J].Curr Stem Cell Res Ther, 2006,1(3):333-343.
- [105] Parekkadan B, van Poll D, Suganuma K, et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure[J]. Plos One,2007 ,2(9):e941.
- [106] Mayr-Wohlfart U, Waltenberger J, Hausser H, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts[J].Bone,

2002,30(3):472-477.

- [107] Nakajima A, Nakajima F, Shimizu S, et al. Spatial and temporal gene expression for fibroblast growth factor type I receptor (FGFR1) during fracture healing in the rat[J]. *Bone*, 2001, 29(5): 458-466.
- [108] Kiel MJ, He S, Ashkenazi R, et al. Haematopoietic stem cells do not asymmetrically segregate chromosomes or retain BrdU [J]. *Nature*, 2007, 449(7159): 238-242.
- [109] Zeng C, Pan F, Jones LA, et al. Evaluation of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine staining as a sensitive and reliable method for studying cell proliferation in the adult nervous system[J]. *Brain Res*, 2010, 1319: 21-32.

综述

骨髓间充质干细胞分离培养鉴定及生物学特性

综述 冯文磊 审阅 吴向未 教授

摘要: 间充质干细胞是干细胞领域的研究热点。本文主要对骨髓间充质干细胞的分离、培养、鉴定、生物学特性、归巢、免疫调节作用进行综述。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 分离; 培养; 多向分化鉴定; 生物学特性; 归巢; 免疫调节; 综述

Abstract: With the progress of studying in stem cells ,bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) have become the hot topic in the basic and clinical medicine study both in China and abroad. This review gives a brief overview of the concept,biological characteristics,isolation,cultivation,multi-directional differentiation ,homing and immunoregulation of BMSCs.

Key words : Bone marrow mesenchymal stem cells;isolation;cultivation; multi-directional differentiation identification; homing ; immunoregulation

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs) 是中胚层来源的具有高度自我更新能力和多向分化潜能的多能干细胞。1867年德国病理学家 Cohnheim 在研究伤口愈合时首次提出骨髓中存在非造血干细胞的观点,指出成纤维母细胞可能来源于骨髓。直至 1976 年 Friedenstien 与其同事^[1]才从骨髓细胞中培养出这种纤维原细胞,并证实其可在体外大量扩增,易贴壁,呈集落样生长,并具有定向分化特点。随后,Prockop^[2] 与 Pittenger^[3]等分别证明了这种纤维原粘附细胞包含间充质干细胞,具分化为多种间质组织如骨、软骨、脂肪和平滑肌的能力。鉴于此,这群细胞被命名为骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells ,BMSCs)。相较于胚胎干细胞,成体干细胞无伦理学限制、无免疫排斥、对供受者无损害、取材方便、纯度高而又保持生物学特性,能满足基础研究和临床应用的需要。BMSCs 是 MSCs 家族的重要成员,成为时下医学领域乃至整个生命科学领域的研究重点和前沿。

1 MSCs 来源

起初认为间充质干细胞只存在于骨髓,后来发现可从脂肪组织、肠道、肺、牙髓、牙周韧带、肝脏、滑膜、心脏和结缔组织中提取^[4-7],以及从外周血、胎盘和脐带血中分离获得^[8-10]。

2 BMMSCs 分离培养鉴定

2.1 BMMSCs 分离培养

BMMSCs 在骨髓中含量极少, 约占骨髓基质细胞的 0.02%^[11]; 因此, 建立一种较理想的 BMMSCs 分离纯化和体外扩增体系是对其进行进一步实验研究和临床应用的基础。目前用于分离 BMMSCs 的方法主要有 4 种: 全骨髓贴壁法/贴壁筛选法、密度梯度离心法、流式细胞分选法和免疫磁珠分选法。其中以全骨髓贴壁法和密度梯度离心法最为常用。

2.1.1 全骨髓贴壁法^[12-13]

全骨髓贴壁法是利用 BMMSCs 具有在塑料组织培养器皿中贴壁生长的特性对其进行分离, 该方法一般的操作步骤为: 将鼠处死, 无菌条件下分离双下肢, 低糖 DMEM 培养液冲出骨髓, 离心弃上清, 以含 10%胎牛血清的低糖 DMEM 培养液重悬沉淀, $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 浓度接种, 于 37 °C、体积分数为 5%的 CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。24 h 首次半量换液, 以后每 3 d 全量换液 1 次。待贴壁细胞达到 80%~90% 融合后, 按 1:2 比例传代。全骨髓贴壁法操作简单, 易于掌握, 不需要特殊的试剂和器材。该方法分离的 BMMSCs 较均一, 细胞活性高, 增殖能力强, 原代细胞首次融合仅需 7~10 d。由于该法是利用 BMMSCs 的较强贴壁性对其进行分离, 而细胞的生存、生长需要的某些因子来自于与其伴生的其他细胞, 该法在很大程度上模拟了体内 BMMSCs 的生长环境, 含有的若干生长因子及促黏附物质促进了 BMMSCs 的贴壁生长。

2.1.2 梯度密度离心法^[14-17]

该法是根据 BMMSCs 与其他细胞的密度不同而采用 Percoll 分离液对 BMMSC 进行体外分离和培养。据文献报道, 具体步骤如下: 将鼠处死, 无菌条件下分离双下肢, 取股骨和胫骨, 低糖 DMEM 培养液冲出骨髓, 离心弃上清液, 用 4 ml 含 10%胎牛血清的低糖 DMEM 培养液重悬细胞, 然后贴壁缓慢注入含 6 ml 密度为 1.073 g/cm^3 的 Percoll 分离液, 800 g 离心 20 min 后, 取中间黄褐色环状云雾层细胞, PBS 洗 2 次, 以含 10%胎牛血清的低糖 DMEM 培养液重悬沉淀, 按 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 浓度接种, 于 37 °C、体积分数为 5%的 CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。5 d 后全量换液, 以后每 3 d 全量换液 1 次。待贴壁细胞达到 80%~90%融合后, 按 1:2 比例传代。密度梯度离心法获得的 BMMSCs 纯度相对较高, 但贴壁细胞数量较少, 细胞生长缓慢, 活性较低, 其原代细胞首次融合需 21 d 以上。这可能是由于分离过程中采用多次离心操作, 分离 BMMSCs 时间较长, 因而失去了促进 BMMSCs 贴壁的一些生长因子及促黏附物质, 并丧失了骨髓中原有的微环境, 从而造成该法分离的 BMMSCs 生长速度较全骨髓贴壁法慢。此外, 密度梯度离心法在原代培养时所获得的 BMMSCs 虽然比全骨髓法纯度高, 但在传代后纯度并没有太大区别, 特别是在 3~4 代以后。与密度梯度离心法相比, 全骨髓

贴壁法操作步骤简单,既降低了离心对细胞的损害,又减少了污染机会,节省经费,且分离的 BMMSCs 贴壁时间短,增殖快,细胞数量多,经传代后能够纯化,有研究表明扩增后的 BMMSCs 纯度可达 95%以上^[18],提示全骨髓贴壁法是一种更加简单有效的 BMMSCs 分离方法。

2.1.3 流式细胞分选法和免疫磁珠分选法

流式细胞分选法和免疫磁珠分选法都是建立在对细胞表面标记识别的基础上而进行的体外分离纯化技术。其中流式细胞分选法是根据 BMMSCs 体积小,相对缺少颗粒的特性利用流式细胞仪对 BMMSCs 进行分选^[19]。而免疫磁珠分选法是根据 BMMSCs 表达的某些细胞表面标志进行收集或根据其表面负表达的抗原进行负分选^[20]。这两种方法分离的细胞纯度较高,但是由于 BMMSCs 在全骨髓中比例很低,单纯采用这两种方法获得的 BMMSC 数量少,活性低;加之这两种方法成本高,技术难,操作繁琐,对细胞活性有较大影响,造成 BMMSCs 损伤,出现增殖缓慢等问题,这些技术问题很大程度上限制了这两种方法的应用。

2.2 BMMSCs 的鉴定

目前对于 BMMSCs 的特征性表面标志物的表达,国内外学者尚未有统一的定论。有研究表明骨髓间充质干细胞积极表达 CD29、CD44、CD90、CD105 等阳性标志物,而不表达或低表达造血细胞表面的特异抗原 CD34、CD45、HLA-DA 等阴性标志物^[21-24]。2006 年国际间充质及组织干细胞委员会(The Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society)通过实验研究正式提出了三条最低鉴定标准来定义 BMMSCs:第一,在塑料培养皿内贴壁生长,在含血清培养基中高度增殖,呈梭形或旋涡状生长;第二,必须高表达表面抗原 CD105、CD73 及 CD90 阳性百分率大于等于 95%;同时低表达表面抗原 CD45、CD34、CD14 或 CD11b、CD79a 或 CD19、HLA-DR 分子标志物,阳性率表达小于等于 2%,甚至不表达;第三,在体外不同条件的诱导下,必须具备向成骨细胞、脂肪细胞及软骨细胞方向分化的潜能^[25]。标准化有利于骨髓间充质干细胞表面标志物表达的均一性,更有利于学者们之间的交流。

3 生物学特性

3.1 BMMSCs 的形状和超微结构

原代培养的 BMMSCs 形态多样,主要可分为三种形态:①细胞呈纺锤形或梭形,数量较少;②细胞呈扁平状,多角形,立体感不强,数量比较多;③细胞呈轻度的立方体,数量少,此类细胞增殖速度快,多向分化能力强^[26]。传代后的 BMMSCs 形态不同实验室报道有所不同^[27,28]。人 BMMSC 在透射电镜下表现为两种不同的形态结构类型:①相对静息期的细胞:核较大,椭圆形,仅含 1 个核仁,核质比较大,胞质内细胞器少;②处于相对活跃期的细胞:细胞体积大于前者,核呈不规则形,有核袋及核突,含 2~3 个核仁,核质比较小,胞质中有丰富的

细胞器,如核糖体、线粒体、粗面内质网、高尔基复合体等,提示该细胞具有较强的蛋白质合成能力,是其能够分泌许多生长因子维持自身生长分化、支持造血干细胞造血的结构基础。在相邻细胞间可见到一些细胞膜局部电子密度增高、细胞膜内颗粒相互融合的缝隙连接,缝隙连接可加强相邻细胞的连接,且是细胞的一种通讯结构,有利于细胞间信息传递,与细胞分泌、增殖、分化相关。BMMSC间缝隙连接揭示其有分泌生长调节因子的能力,增殖能力强,分化程度低。扫描电镜下 BMMSCs 呈长梭形、鱼群状排列,表面有许多微绒毛^[29],说明细胞功能活跃,分泌能力强,可摄取大量营养物质以供较强生长增殖所需。

3.2 BMMSCs 具有多向分化特性

目前已有实验证实,在特定的条件下, BMMSCs 可以分化为脂肪、成骨、软骨、骨骼肌、心肌、肌腱等中胚层源细胞,而且还可横向分化^[30]为外胚层,如神经细胞^[31]及内胚层细胞,如肝细胞和胰岛细胞^[32, 33]。另外 BMMSC 的多向分化潜能具有高度的进化保守性,人、狒狒、犬、兔、大鼠和小鼠,甚至禽类的 BMMSC 均有相似的特点^[34]。

3.3 BMMSCs 具有“归巢”特性

BMMSC 有归巢现象,尤其组织有损伤或在病理条件下。在体内,植入的 MSCs 可以在体内损伤组织微环境的作用下,迁移定位并分化为相应的组织细胞。Jiang 等^[34]将预先标记的 BMMSCs 经静脉植入急性心肌缺血模型的大鼠体内,术后在心肌缺血组织中发现了 BMMSCs 分化的心肌细胞,说明植入的 BMMSCs 归巢(homing)至受损部位并分化为心肌细胞。类似的结果还可以在肌肉损伤^[35]、脑损伤等很多疾病模型中见到。体内外实验均证实 BMMSCs 具有从血中穿过上皮细胞,到达组织中^[36-39]的能力,体外实验^[40]内皮细胞和 BMMSCs 在共培养时,BMMSCs 与内皮细胞组织接触 30 min 后形态即发生变化,2 h 后变扁与内皮细胞层整合在一起,这些结果表明,纵然在体外 BMMSCs 也可以有效的细胞和细胞接触,且开始迁徙穿过内皮细胞;体内试验^[40],BMMSCs 通过主动脉套管注入大鼠,2 h 后发现心脏血管的内皮细胞的紧密连接小时,BMMSCs 可以和内皮细胞相互作用,30 min 后在电子显微镜下发现大约 30% 的细胞穿过内皮细胞,60 min 后大约 50% 细胞穿过,此后随着时间的延长穿过的细胞数逐渐增多。

BMMSCs 自血中穿过上皮细胞,到达受损的组织,具体机制尚不清楚,但是有可能是受损的组织表达特定的受体或配体促进 BMMSCs 的迁徙、黏附和浸润到损伤的组织,就如同白细胞向炎症组织迁移。趋化因子受体和趋化因子配体是白细胞迁徙的必要物质,最近在 BMMSCs 表面也发现了这些分子。趋化细胞因子是一个小分子糖蛋白超家族成员,和很多生物过程有关系,包括白细胞运输、血细胞生成、血管发生和器官形成。研究认为 43% -70% 的人骨髓 BMMSCs 表面表达趋化因子 CCR1, CCR7, CCR9, CXCR4, CXCR5 和 CXCR6^[41]。而另一组通过反转录 PCR 和免疫组化的实验认为表达的是 CCR2, CCR8, CXCR1, CXCR2 和

CXCR3^[42]。Ponte 和他的同事^[43]研究证实 BMSCs 表达 CCR2, CCR3, CCR4 和 CXCR4, 而且 TNF- α 可以增加 CCR2, CCR3 和 CCR4 表达而不是 CXCR4。因此, BMSCs 表达多种趋化因子受体, 尽管报道不一样, 但正好反映了 BMSCs 的多样性, 这也是 BMSCs 的一个特点。事实上, 正因为 MSCs 表面表达多种趋化因子受体, BMSCs 才可以向不同组织迁徙, 起到修复受损组织或缓解炎症反应的作用。如表达 CCR9 的 MSC 可以迁徙到小肠, 或表达 CCR1 的 BMSCs 可以迁徙到有炎症的关节或有病变的脑组织。

研究证实 BMSCs 表面表达整合素, 选择素, 趋化因子受体促使 BMSCs 自血液中滚动、黏附、移行穿过血管壁到达组织而发挥生物学作用, 与白细胞穿过血管壁的过程相似, 但是二者也有区别点。如多项试验证实^[44-48], BMSCs 细胞表面有 P-选择素表达, 而 L-选择素和 E-选择素表达水平低或是不表达, 故认为在最初 BMSCs 在血管壁滚动阶段 P-选择素起重要作用。研究 BMSCs 表面趋化因子受体和黏附分子的作用, 以更好实现体外培养 BMSCs 向损伤组织移行, 这将使 MSC 支持组织再生, 修正遗传缺陷, 减缓慢性炎症反应, 以及用这些细胞作为生物制剂或基因良好载体成为可能。

3.4 BMSCs 的免疫调节作用

BMSCs 属于未成熟的成体干细胞, 自身免疫原性低, 同种异体移植后无排斥反应或反应较弱^[49], 在外周耐受, 移植耐受, 自身免疫, 肿瘤逃逸以及母体-胎儿耐受过程中是重要的免疫调节剂^[50, 51]。具体的机制可能与母体能够耐受类似胎儿的异体移植物的机制相似, BMSCs 不表达与人类白细胞抗原 (HLA) 识别相关的协同刺激分子 B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86) 以及主要组织相容性复合体 (MHC) II 类分子的 H1A-DR 产物等。BMSCs 能够抑制 T 细胞和 NK 细胞行使功能, 当 BMSCs 与应答 T 细胞共同培养时非但不会引起 T 细胞聚集, 反而会抑制 T 细胞增殖, 研究证实 T 淋巴细胞的增殖被阻止在 G1 阶段, 认为是由于 BMSCs 的干预使得细胞周期蛋白 D 下调所致^[52]。而 T 细胞失去应答并不是发生凋亡, 是可逆的。如果撤除 BMSCs 的干预, 给予合适的刺激, T 淋巴细胞可以重新增殖^[53]; 另外 Corcione 等^[54]的实验证实 BMSCs 能显著减少 B 淋巴细胞 IgM、IgG、IgA 的分泌; 不仅是未分化的 BMSCs, 已分化的 BMSCs 也不会引起淋巴细胞免疫应答, 如 Le Blanc 等^[55]实验证实未分化的人胎儿 BMSCs 表达 HLA I 类分子, 不表达 H1A II 类分子, 在诱导 BMSCs 分化为成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞后, HLA I 类分子表达增加, 但在细胞表面仍检测不到 II 类分子的表达。当将诱导后的细胞作为刺激物, 与异体的 T 淋巴细胞混合培养, 仍未引起淋巴细胞的排斥反应。研究表明: 可溶性因子和细胞接触介导的机制参与此过程, 在使用一些起拮抗作用单克隆抗体阻断转化生长因子 β (TGF- β) 和肝细胞生长因子 (HGF) 的实验中表明这些因子起码部分参与了 BMSCs 免疫调节过程^[56]。尽管 BMSCs 免疫逃逸和免疫调节的机制不完全清楚, 但无疑使同种异体 MSC 的移植应用成为

可能^[57]。最近有学者利用 BMSCs 的免疫调节治疗自身免疫性疾病的患者, 收到很好的临床效果^[58]。另外应该注意的是 BMSCs 的免疫抑制作用在治疗剧烈移植物抗宿主病(GVHD) 时是非常重要的, 但对于肿瘤的治疗, 由于移植的 BMSCs 的免疫抑制作用可能会导致对肿瘤细胞免疫反应的下降, 所以可能限制 BMSCs 在肿瘤治疗中的应用。

4. 结 论

目前干细胞种类繁多, BMSCs 因其独特优势而具有较大的应用价值。BMSCs 作用机制多效而复杂, 目前仍未完全证实, 仍需大量的研究。明确 BMSCs 作用的相关机制, 将进一步促进其临床应用, 为一些疾病带来新的治疗思路。

参考文献

- [1] Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs[J]. *Exp Hematol*, 1976, 4(5): 267-74.
- [2] Prock DJ, Marrow stromal cells are stem cells for nonhematopoietic tissues[J]. *Science*, 1997, 276:71-74.
- [3] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143-7.
- [4] Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: Revisiting history, concepts, and assays[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(4):314-9.
- [5] Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp[J]. *J Bone Miner Res*, 2003, 18(4): 696-704.
- [6] Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament[J]. *Lancet*, 2004, 364(9429): 149-55.
- [7] Zannettino AC, Paton S, Arthur A, et al. Multipotential human adipose derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype *in vitro* and *in vivo*[J]. *J Cell Physiol*, 2008, 214(2): 413-21.
- [8] Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, et al. Circulating skeletal stem cells[J]. *J Cell Biol*, 2001, 153(5): 1133-40.
- [9] Kogler G, Sensken S, Airey JA, et al. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential[J]. *J Exp Med*, 2004, 200(2): 123-35.
- [10] Kim BO, Tian H, Prasongsukarn K, et al. Cell transplantation improves ventricular function after myocardial infarction: A preclinical study of human unrestricted somatic stem cells in a porcine model[J]. *Circulation*, 2005, 112(S9):I96-104.
- [11] Vallee M, Cote J E, Fradette J. Adipose-tissue engineering: taking advantage of

- the properties of human adipose-derived stem/stromal cells[J]. *Pathol Biol(Paris)*, 2009,57:309-317
- [12] 杨丽,张荣华,谢厚杰,等.建立大鼠骨髓间充质干细胞稳定分离培养体系与鉴定[J].*中国组织工程研究与临床康复*,2009, 13(6):1064-1068.
- [13] Phinney DG. Isolation of mesenchymal stem cells from murine bone marrow by immunodepletion[J].*Methods Mol Biol*,2008,449:171-186.
- [14] 蔡文琴.现代实用细胞与分子生物学实验技术[M].北京:人民军医出版社,2003,33-55.
- [15] Hung SC, Chen NJ, Hsieh SI, et al. Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow[J].*Stem Cells*. 2002,20(3):249-258.
- [16] Rosada C, Justesen J, Melsvik D, et al. The human umbilical cord blood: a potential source for osteoblast progenitor cells[J].*Calcif Tissue Int*. 2003,72(2):135-142.
- [17] 杨玉霞,郑健樑,张平,等.密度梯度离心结合贴壁法培养成年大鼠骨髓间充质干细胞的生物学特性[J].*中国组织工程研究与临床康复*, 2007,11(3):584-586.
- [18] Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, et al. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2000,97(7):3213-3218.
- [19] 傅文玉.间充质干细胞流式细胞仪分选法[J].*中国血液学杂志*, 2002,23(4):202-204.
- [20] Locatelli F, Corti S, Donadoni C, et al. Neuronal differentiation of murine bone marrow Thy-1-and Sca-1-positive cells[J].*J Hematother Stem Cell Res*, 2003,12(6):727-734.
- [21] Guo Z, Yang J, Liu X, et al. Biological features of mesenchymal stem cells from human bone marrow[J].*Chin Med J(Engl)*,2001,114(9):950-953.
- [22] Pascucci L, Curina Q, Mercati F, et al. Flow cytometric characterization of culture Expanded multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) from horse adipose tissue: towards the definition of minimal stemness criteria[J].*Vet Immunol Immunopathol*,2011,144(3-4): 499-506.
- [23] Manochantr S, Tantrawatpan C, Kheolamai P, et al. Isolation, characterization and neural differentiation potential of amnion derived mesenchymal stem cells[J]. *J Med Assoc Thai*, 2010,93(7):8183-191.
- [24] Ranera B, Lyahyai J, Romero A, et al. Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue[J].*Vet Immunol Immunopathol*,2011,144(1 -2): 147-154.
- [25] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent

- mesenchymal stromal cells[J].Cytotherapy,2006,4(8):315-317.
- [26] Javazon EH,Beggs KJ,Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging[J].Exp Hematol,2004,32(5) : 414-25.
- [27] Gregory CA,Singh H,Perry AS,et al. The Wnt signal inhibitor dickko-pf-1 is required for reentry into the cell cycle of human adult stem cells from bone marrow stroma[J]. J Biol Chem,2003, 278(30) : 28067-78.
- [28] Spees JL, Gregory CA, Singh H, et al. Internalized antigens must be re-moved to prepare hypoinmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy [J].Mol Ther,2004, 9(5) : 747-56.
- [29] 路艳蒙,傅文玉,朴英杰,等 . 人骨髓间充质干细胞的超微结构[J].电子显微学报,2002, 21(4) : 373-374.
- [30] Song L,Tuan RS. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow[J].FASEB J,2004, 18(9) : 980-2.
- [31] Kopen GC,Prockop DJ,Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum,and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains[J].Proc Natl Acad SciUSA,1999, 96(19) : 10711-6.
- [32] Ianus A,Holz GG,Theise ND,et al. *In vivo* derivation of glucose competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion[J]. J Clin Invest,2003,111(6) : 843-50.
- [33] Petersen BE,Bowen WC,Patrene KD,et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells[J].Science,1999,284(5417) : 1168-70.
- [34] Jiang W, Ma A, Wang T, et al. Homing and differentiation of mesenchymal stem cells delivered intravenously to ischemic myocardium *in vivo*: a time series study[J].Pflugers Arch,2006, 453(1) : 43-52.
- [35] Winkler T,von Roth P,Schuman MR,et al. *In vivo* visualization of locally transplanted mesenchymal stem cells in the severely injured muscle in rats[J]. Tissue Eng Part A,2008, 14(7) : 1149-60.
- [36] Chen J,Li Y,Wang L,et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats[J].Stroke,2001, 32(4) : 1005-11.
- [37] Okazaki T, Magaki T, Takeda M, et al. Intravenous administration of bone marrow stromal cells increases survivin and Bcl-2 protein expression and improves sensorimotor function following ischemia in rats[J].Neurosci Lett, 2008,430(2) : 109-14.
- [38] Devine SM,Bartholomew AM,Mahmud N,et al. Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following

- systemic infusion[J].Exp Hematol,2001,29(2) : 244-55.
- [39] Jiang WH, Ma AQ, Zhang YM, et al. Migration of intravenously grafted mesenchymal stem cells to injured heart in rats[J]. Sheng Li Xue Bao, 2005, 57(5) : 566-72.
- [40] Schmidt A, Ladage D, Steingen C, et al. Mesenchymal stem cells trans-migrate over the endothelial barrier[J]. Eur J Cell Biol, 2006, 85(11) : 1179-88.
- [41] Honczarenko M, Le Y, Swierkowski M, et al. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors[J]. Stem Cells, 2006, 24(4) : 1030-41.
- [42] Ringe J, Strassburg S, Neumann K, et al. Towards in situ tissue repair: human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CXCL12[J]. J Cell Biochem, 2007, 101(1) : 135-46.
- [43] Ponte AL, Marais E, Gally N, et al. The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: Comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities[J]. Stem Cells, 2007, 25 (7) : 1737-45.
- [44] Ruster B, Gottig S, Ludwig RJ, et al. Mesenchymal stem cells (MSCs) display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells[J]. Blood, 2006, 108(2) : 3938-44.
- [45] Shur I, Marom R, Lokiec F, et al. Identification of cultured progenitor cells from human marrow stroma[J]. J Cell Biochem, 2002, 87(1) : 51-7.
- [46] Bruder SP, Ricalton NS, Boynton RE, et al. Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation[J]. J Bone Miner Res, 1998, 13(4) : 655-63.
- [47] Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells[J]. Exp Biol Med (Maywood) , 2001, 226(6) : 507-20.
- [48] Krampera M, Pizzolo G, Aprili G, et al. Mesenchymal stem cells for bone, Cartilage, tendon and skeletal muscle repair[J]. Bone, 2006, 39(4) : 678-83.
- [49] Le Blanc K. Mesenchymal stromal cells: tissue repair and immune modulation [J]. Cytotherapy, 2006, 8(6) : 559-61.
- [50] Rasmusson I. Immune modulation by mesenchymal stem cells[J]. Exp Cell Res, 2006, 312(12) : 2169-79.
- [51] Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells[J]. Eur J Immunol, 2006; 36(10) : 2566-73.
- [52] Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells[J]. Blood, 2005, 105(7) :

2821-7.

- [53] Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, et al. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex[J]. *Scand J Immunol*, 2003, 57(1) : 11-20.
- [54] Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E. Human mesenchymal stem cell modulate B cell functions[J]. *Blood*, 2006, 107(1) : 367-72.
- [55] Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, et al. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells[J]. *Exp Hematol*, 2003; 31(10) : 890-6.
- [56] Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli[J]. *Blood*, 2002, 99(10) : 3838-43.
- [57] EL-Badri NS, Maheshwari A, Sanberg PR. Mesenchymal stem cells in autoimmune disease[J]. *Stem Cells Dev*, 2004, 13(5) : 463-72.
- [58] Jones OY, Good RA, Cahill RA. Nonmyeloablative allogeneic bone marrow transplantation for treatment of childhood overlap syndrome and small vessel vasculitis[J]. *Bone Marrow Transplant*, 2004, 33 (10) : 1061-3.

致 谢

三年的研究生生活即将结束，在这三年里，有不少挫折，更多的是收获，这将是我一生的宝贵财富。

首先衷心感谢我的导师吴向未教授，本课题是在导师的精心指导下完成，倾注了导师的大量心血。从开始的课题设计到最后论文的修改，都给予了我悉心的指导和不懈的帮助。导师严谨的治学态度、渊博的学识、认真求实的工作作风深深的感染和激励着我。三年来，导师不仅毫无保留的传授给我学习医学的经验和方法，而且教会了我许多做人的原则和做事的道理，在生活上更是给了我无微不至的关怀和帮助。在这里，再次感谢导师对我的教导、鼓励和宽容，没有您的关怀和鼓励，我将无法完成学业。任何文字都难以表达我对恩师的感激之情。他精湛的临床技术,博大精深的知识,孜孜不倦的工作作风都将使我终生受益。他崇高的医德,宽厚正直的为人,永远是我学习的榜样。

衷心感谢师母陈雪玲教授悉心培养和无微不至的关怀与照顾，她高屋建瓴的学术眼光、兢兢业业的工作精神永远值得我学习。

衷心感谢石河子大学医学院第一附属医院肝胆外科张示杰主任、杨宏强老师、吕海龙老师在开题报告及中期考核中提的宝贵建议，还有在临床上的悉心指导。

衷心感谢郭淑霞老师、曹玉文老师、徐江老师在开题报告及后续学习中的指导。

衷心感谢石河子大学医学院第一附属医院肝胆外科胡文凤护士长、邵真红老师及其他老师在实验用材上提供的便利。

衷心感谢庞丽娟老师在细胞提取方面提供的帮助。

衷心感谢新疆地方与民族高发病教育重点实验室激光共聚焦显微镜室曹薇薇老师与王良海老师在细胞拍照方面提供的帮助。

衷心感谢课题组所有同门，感谢你们在学习和生活中对我的帮助和关照，特别感谢张猛、徐芳洁、及印双红师姐在实验及实验结果处理及论文成文方面提供的帮助，特别感谢王艳杰在我实验不顺，心情低落时给予的鼓励和开导。

最后感谢我的家人多年来对我工作学习的理解、关心及精神和物质上的大力支持，没有你们在背后辛勤的付出，就不会有我的今天，谢谢你们。

作者简介

冯文磊，男，生于1987年6月，籍贯河南。2012年毕业于新乡医学院临床医学专业，获医学学士学位。同年9月就读于石河子大学医学院，专业是肿瘤学，主要从事干细胞与再生医学基础研究。

在学期间主要参与的研究项目：

1. 参加了国家自然科学基金资助项目《血管内皮前体细胞调控骨髓间充质干细胞巢的实验研究》（31271458）的部分研究工作。
2. 参加了人力资源和社会保障部留学回国人员科技活动项目《EPC在MSC生物学行为中的作用》（RSLX201201）的部分研究工作。
3. 参加了兵团科技援疆基金资助项目《MSC与EPC联合治疗血管相关代谢性疾病的关键性技术与产品研发》（2014AB407）的部分研究工作。

在学期间发表的文章：

- 1 冯文磊，张猛，印双红，等. 改良差时贴壁法分离培养鉴定小鼠骨髓间充质干细胞和内皮前体细胞 [J]. 解剖学报, 2015, 46(2):282-288.
- 2 冯文磊，张猛，徐芳洁，等. 共培养体系间充质干细胞对同源内皮祖细胞增殖和血管形成的影响 [J]. 医学研究生学报, 2015, 28(3):229-235.
- 3 冯文磊，张猛，徐芳洁，等. 内皮祖细胞条件培养基对间充质干细胞增殖和成骨分化的影响及其机制 [J]. 吉林大学学报（医学版），2015, 41(2):218-224.

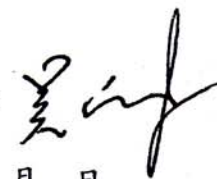
石河子大学硕士研究生学位论文 导师评阅表

研究生姓名	冯文磊	学制	三年制
专业	肿瘤学	研究方向	肿瘤治疗应用基础研究

学术评语:

冯文磊同学在攻读硕士研究生期间进行的课题“血管内皮前体细胞对间充质干细胞增殖能力的影响”。能够着眼于全球再生医学研究的热点，立足于肿瘤疾病临床研究的实际，通过应用改良差时贴壁法分离、培养、扩增并通过流式细胞术、干细胞多向分化功能实验、免疫荧光技术等鉴定得到 MSC 与 EPC；通过 MTT 检测法、EdU 荧光染色法检测 EPC 对 MSC 增殖能力的影响从而证实 EPC 促进 MSC 的增殖能力，为 MSC 与 EPC 联合应用治疗疾病提供了理论依据。该课题设计严谨、科学，方法准确、可靠，数据资料完整、详实，分析透彻、针对性强，论文格式正确，书写规范，层次清晰，行文流畅。该课题工作量大，实验周期长，研究结果为深入研究血管内皮前体细胞调控骨髓间充质干细胞生物学行为及其可能存在的作用机制有着重要意义。在校期间通过大学六级考试，完成硕士必修课，修满学分。综上所述冯文磊同学的毕业论文符合硕士学位研究生培养目标的要求，达到硕士学位水平。同意该生提交学位论文，并进行论文答辩。

指导教师签字:



年 月 日