

小鼠骨髓间充质干细胞的稳定高效培养及外泌体的提取

程欢^{1,2} 苏盖¹ 陶思跃¹ 尤涛¹

摘要 目的 建立稳定、高效的骨髓间充质干细胞(BM-MSCs)培养及外泌体提取方法。方法 通过全骨髓、差速贴壁并辅助以低氧(5% O₂)环境的方法进行小鼠 BM-MSCs 培养,收集细胞,鉴定干细胞表面标志物,进行成骨、成脂及成软骨诱导;并收集上清液,超速分离的方法提取外泌体后鉴定。结果 小鼠 BM-MSCs 生长状态好,第3代细胞就可达到95%以上的纯度且可稳定传代至15代左右,表达间充质干细胞(MSCs)标志物,且可被成功诱导分化成骨、成脂肪及软骨组织。超速离心得到的细胞外囊泡具有典型外泌体样结构,Western blot 鉴定显示具有外泌体特征性蛋白标志物。结论 全骨髓培养方法使得小鼠 BM-MSCs 的损失最少,低氧(5% O₂)环境下的差速贴壁法使得小鼠 BM-MSCs 增殖速度快,纯度高。该方法培养的小鼠 BM-MSCs 可稳定分泌外泌体囊泡,为小鼠 MSCs 的培养及其外泌体获取提供了良好的方法。

关键词 小鼠;骨髓间充质干细胞;全骨髓;差速贴壁;低氧培养;外泌体

中图分类号 Q2-33

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)04-0518-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.04.007

干细胞是具有良好的增殖、自我复制能力以及多向分化潜能的一类细胞,已经广泛应用于医学科学研究,甚至于临床治疗。间充质干细胞(mesenchyma stem cells, MSCs)具有免疫源性低,来源丰富,具备免疫调节特性,得到特别的重视,是现在研究最为广泛的干细胞之一^[1]。现在越来越多的研究认为, MSCs 的治疗与其外分泌功能密切相关^[2]。外泌体是 MSCs 外分泌的主要成分之一,所以 MSCs 外泌体的获取是研究 MSCs 外分泌的“无细胞治疗”效应及机制的必要基础条件。小鼠因具有价格低廉、易于饲养及有多种基因型等特点,在基础科学研究中得以广泛应用^[3];但小鼠 MSCs 量极少、存活率低,其培养异常困难,也使得小鼠 MSCs 外泌体的获取也变得相当困难。该研究在总结以前方法的基础

上应用全骨髓、差速贴壁并辅助以低氧环境的培养方法进行了小鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs)的培养,并对其进行外泌体提取和检测,希望可以发现小鼠 MSCs 稳定、高效的培养以及有效提取外泌体的方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 4~8周龄 SPF 级 C57 BL/6 雄性小鼠,体质量 15~20 g,共 8 只,SPF 级饲养。

1.1.2 主要试剂 MesenCult™ 基础培养基(不含谷氨酰胺,不含青霉素、链霉素,STEMCELL TECHNOLOGIES, Cat. NO. 05514); MesenCult™ 10 × 添加物(STEMCELL TECHNOLOGIES, Cat. NO. 05515); MesenPure™ 1000 × (STEMCELL TECHNOLOGIES, Cat. NO. 05500); 0.25% 胰酶/0.02% EDTA(BI Biological Industries Cat. NO. 03055-1A); GlutaMAX™ 添加剂 100 × (Gibco Cat. NO. 35050061); 青链霉素(SIGMA Cat. NO. V900929); PBS(上海生工 Cat. NO. BN40100-0500); FBS(BI Biological Industries); EDTA(0.5 mol/L, pH8.0, Thermo Scientific Cat. NO. R1021); IBMX(MedChemExpress)。

1.1.3 主要仪器 超净工作台、细胞培养箱、离心机(Thermo Scientific),细胞培养缺氧小室(STEMCELL TECHNOLOGIES),减压阀(有流量控制器)(上海减压器厂有限公司),70 μm 细胞筛、50 ml 离心管、100 mm 细胞培养皿(BI Biological Industries)。

1.2 试剂配制 分离 buffer: 灭菌的 PBS 内加入 2% FBS、1 mmol/L EDTA 及 1% 青链霉素;完全培养基: 90% MesenCult™ 基础培养基 + 10% MesenCult™ 10 × 添加物 + 1% GlutaMAX™ 添加剂 + 1% 青链霉素 + 0.1% MesenPure™。

1.3 小鼠 BM-MSCs 的分离和培养^[4] 颈椎脱臼法处死小鼠,酒精浸泡后剥离出股骨和胫骨,组织镊去除残余软组织;剥离完全后切除股骨上 1/3,将所得的股骨和胫骨置于研钵内,并加入适量分离 buffer。杵轻轻按压破坏骨髓腔,使细胞流出,再通过细胞筛收集细胞;反复清洗,直到骨髓腔变白。1 000

2020-01-08 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81171797)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第一附属医院骨科,合肥 230022

² 霍山县医院骨科,六安 237200

作者简介: 程欢,男,主治医师;

尤涛,男,博士,副主任医师,责任作者, E-mail: youtao@ustc.edu.cn

r/min 离心含有骨髓细胞的悬液 5 min; 去除上清液, 重悬细胞沉淀。取出细胞, 加入等量台盼蓝, 混匀后将 10 ml 全骨髓细胞铺在 100 mm 细胞培养皿。将培养皿置于充满低氧混合气(5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) 的缺氧小室后, 将其置于 37 °C 细胞培养箱培养。静置培养 3 ~ 4 d 后打开缺氧小室, 观察 MSCs 如果细胞贴壁成簇生长达到 80% 即可进行传代工作; 如果没有达到 80%, 继续培养 2 ~ 3 d。传代: PBS 清洗, 胰酶消化。加入完全培养基终止消化, 1 000 r/min 离心 5 min, 去除上清液加入完全培养基重悬细胞沉淀, 1 : 2 进行传代。2 ~ 3 d 后, 细胞汇合度达 80% 以上可再次传代。

1.4 流式细胞术鉴定 BM-MSCs 表面标志物 用流式细胞缓冲液重悬细胞。取细胞悬液至 EP 管中, 每管加入一抗, 混匀。2 ~ 8 °C 孵育 30 min 后用流式细胞缓冲液清洗样品。1 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 每组各加入流式细胞缓冲液重悬。每组各加入荧光二抗, 重悬细胞, 2 ~ 8 °C, 避光孵育 30 min 后, 用流式细胞缓冲液清洗样品 3 次后, 用 500 μl 流式细胞缓冲液重悬细胞, 等待上机检测。

1.5 BM-MSCs 诱导分化实验^[5]

1.5.1 成骨诱导分化 成骨诱导分化培养基: 89% α-MEM + 10% FBS + 1% 双抗 + 50 μmol/L 抗坏血酸 + 10 mmol/L β-甘油磷酸钠 + 100 nmol/L 地塞米松。在 6 孔板每孔中加入 1 ml 促贴壁因子, 放入 37 °C 培养箱 30 min 后吸走促贴壁因子, 晾干后, 将小鼠 BM-MSCs 接种到 6 孔板, 每孔加入完全培养基, 置于缺氧小室培养 2 ~ 3 d 后更换成成骨诱导分化培养基, 3 ~ 4 周后观察细胞完全长满皿底, 终止诱导分化。洗涤后, 每孔加入 2 ml 4% 多聚甲醛, 室温固定 15 min; PBS 洗涤, 每孔加入茜素红染液染色 5 min; 显微镜下观察成骨效率。

1.5.2 成脂肪诱导分化 配制成脂肪诱导分化培养基(诱导液): 89% 高糖(HG) DMEM + 10% FBS + 1% 双抗 + 10 μg/ml 胰岛素 + 200 μmol/L 吡咯美辛 + 0.5 mmol/L IBMX + 1 μmol/L 地塞米松。配制成脂肪诱导分化培养基(维持液): 89% HG-DMEM + 10% FBS + 1% 双抗 + 10 μg/ml 胰岛素。将小鼠 BM-MSCs 接种到 6 孔板, 每孔加入完全培养基, 于缺氧小室培养 2 ~ 3 d 后更换成成脂肪诱导分化培养基, 3 d 后更换成成脂肪诱导分化培养基, 24 h 后再换回诱导液, 反复 4 次, 用维持液培养 4 ~ 7 d。多聚甲醛固定后每孔中加入 1 ml 油红 O 染料液染色, 于倒置显微镜下观察成脂肪效率。

1.5.3 成软骨诱导分化 配制成骨诱导分化培养基: 89% HG-DMEM + 1% 双抗 + 10% 转铁蛋白 100 nmol/L 地塞米松 + 1 μmol/L 抗坏血酸 + 1% 丙酮酸钠 + 1% 脯氨酸 + 10 ng/ml TGF-β3。小鼠 BM-MSCs 接种到 96 孔板, 每孔加入完全培养基, 于缺氧小室培养 1 ~ 2 d 后, 换成成骨诱导分化培养基, 3 ~ 4 d 更换 1 次, 持续 3 ~ 4 周。4% 多聚甲醛固定 30 ~ 60 min, 然后加入 200 μl 1% 阿利辛蓝染色过夜, 于倒置显微镜下观察成软骨效率。

1.6 小鼠 BM-MSCs 的外泌体提取与鉴定^[6] 将小鼠 BM-MSCs 扩增至第 5 代后, 使用完全培养基培养 2 ~ 3 d, 随后将 10% MesenCult™ 10 × 添加物更换成 10% Exosome-Depleted Fetal Bovine Serum, 低氧继续培养 2 d。传下一代时收集上清液, 置于 -80 °C 保存。将收集的细胞上清液用水平转子去除死细胞、细胞碎片和大的细胞污染物; 再次收集细胞上清液, 置于超速离心管内 30 000 r/min 超速离心 2 h; 弃上清液, 重悬外泌体沉淀, 再次 30 000 r/min 超速离心 2 h 后, 500 μl PBS 重悬外泌体沉淀。上透射电镜拍照、成像。采用 Western blot 鉴定外泌体表面阳性蛋白特异性标志物 HSP70、Syntenin1、CD9、CD63、TSG101 及阴性蛋白标志物 Grp94。

2 结果

2.1 小鼠 BM-MSCs 的分离和培养 该方法培养的小鼠 BM-MSCs 生长状态好、稳定、高效, 第三代细胞就可达到 95% 以上的纯度且可稳定传代至 15 代左右。见图 1。

2.2 流式细胞仪鉴定 BM-MSCs 表面标志物 培养出来的 BM-MSCs 不表达细胞抗原 CD117 和细胞抗原 CD31, 而表达了整合素家族类抗原标志分子 CD29、黏附分子家族类抗原标志分子 CD44 和 Ly-6 抗原家族成员 Sca-1, 见图 2。

2.3 BM-MSCs 诱导分化结果

2.3.1 成骨诱导分化 细胞形态由梭形变为多角形, 细胞呈多层性、重叠性排列, 形成间质内含大量矿盐沉积的钙化结节。茜素红 S 染色矿化结节呈现红色, 见图 3A。

2.3.2 成脂肪诱导分化 诱导而成的脂肪细胞累积脂质, 脂滴变大并合并呈串珠状。经油红 O 染色呈鲜红色, 见图 3B。

2.3.3 成软骨诱导分化 多数细胞变成多边形, 核周颗粒密集排布, 部分细胞边界不清, 呈圆形, 核偏位, 核周颗粒明显, 经阿利辛蓝染色后, 在软骨细胞

周围可见到蓝染的酸性蛋白聚糖,见图 3C。

2.4 小鼠 BM-MSCs 外泌体的电镜观察及标志物检测

电镜下观察到外泌体典型的杯口状结构,同

时 Western blot 结果显示 HSP70、Syntenin1、CD9、CD63 及 TSG101 都是阳性,而 Grp94 只存在于 BM-MSCs 内,不存在于外泌体内,见图 4。

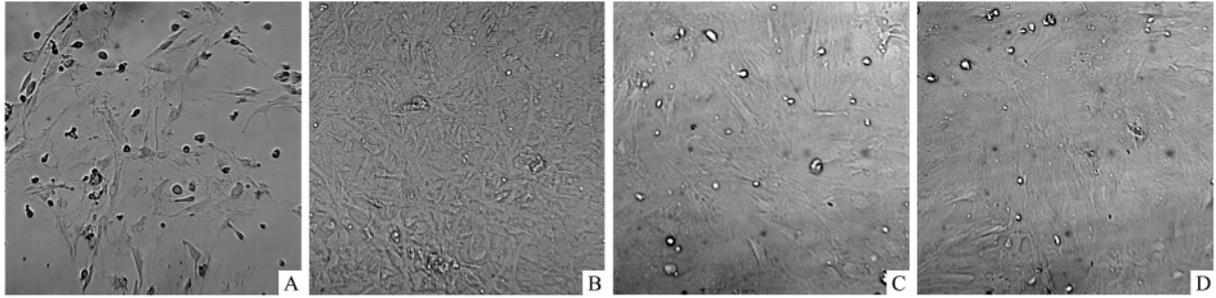


图 1 小鼠 BM-MSCs 培养及传代 ×200

A: 第 1 次换液后 MSCs 镜下成像; B: 第 1 次传代前 MSCs 镜下成像; C: 第 1 次传代后 MSCs 镜下成像; D: 第 10 代 MSCs 镜下成像

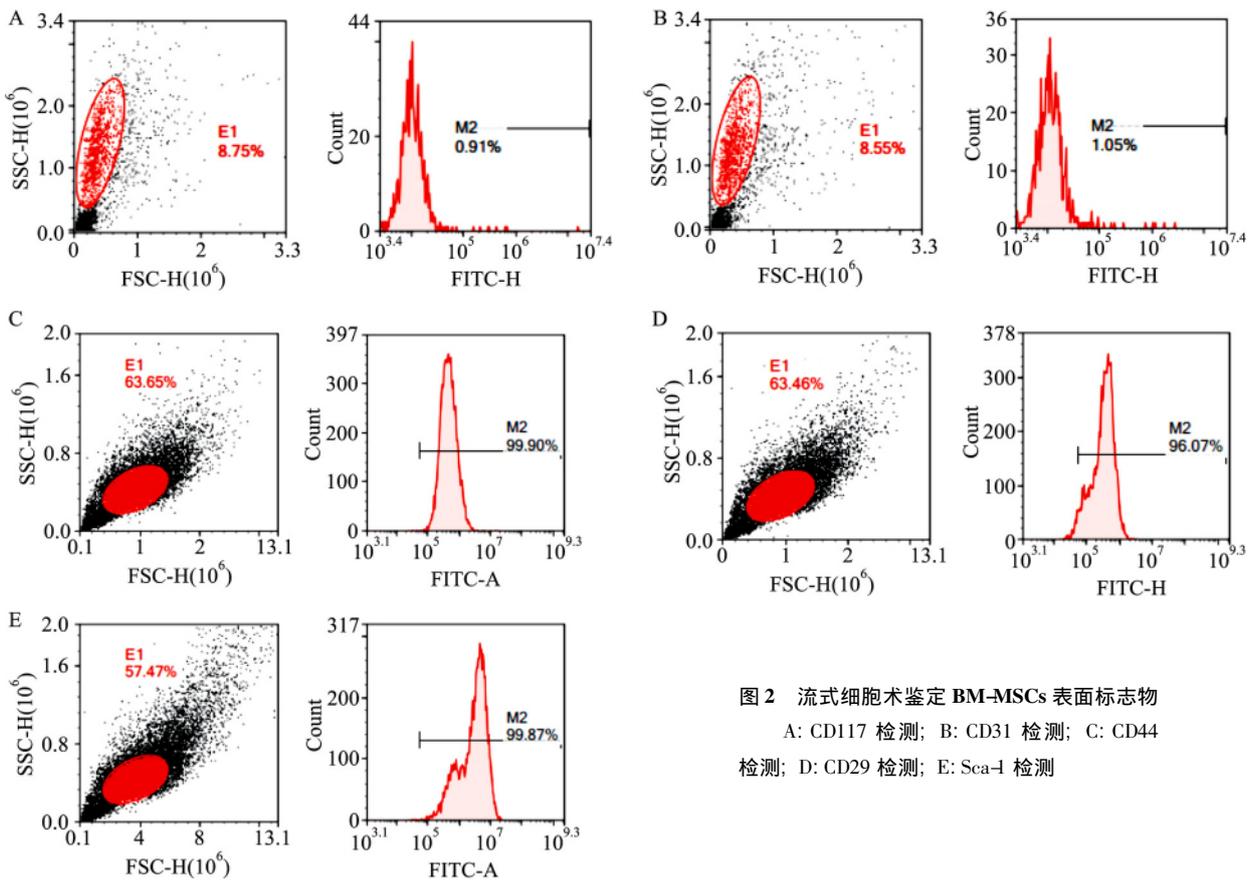


图 2 流式细胞术鉴定 BM-MSCs 表面标志物

A: CD117 检测; B: CD31 检测; C: CD44 检测; D: CD29 检测; E: Sca-1 检测

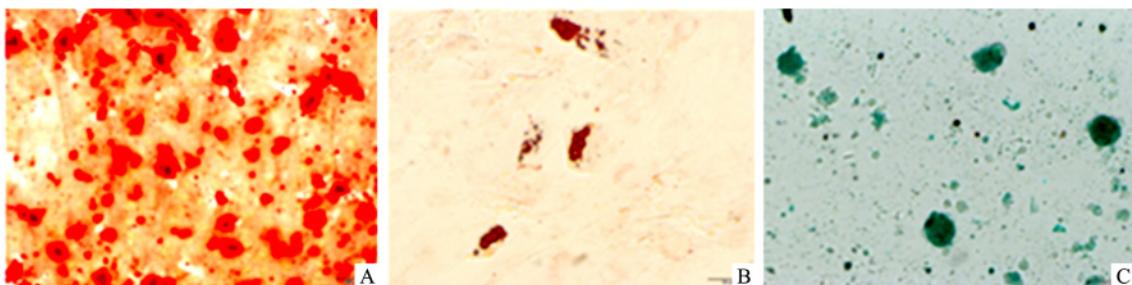


图 3 BM-MSCs 诱导分化实验 ×100

A: 成骨分化; B: 成脂肪分化; C: 成软骨分化

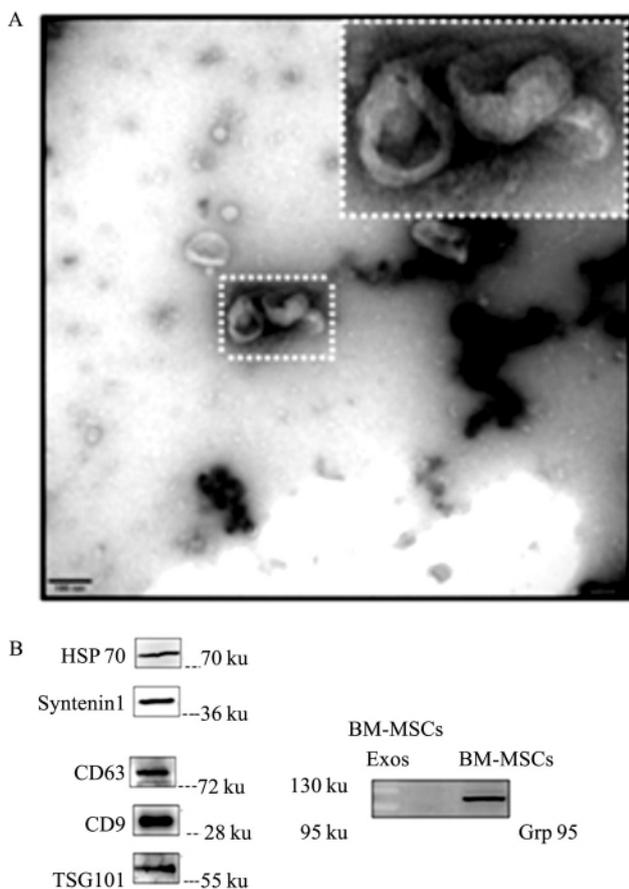


图4 小鼠 BM-MSCs 外泌体的提取与鉴定

A: 电镜下观察到外泌体典型的杯口状结构 $\times 100\ 000$; B: 外泌体标志物的检测

3 讨论

MSCs 是最为常见的干细胞之一,其主要存在于骨髓组织中,具有分化成多种结缔组织细胞的潜能^[1]。人们从骨、脂肪、脐血等多种组织中成功分离培养出 MSCs,但目前从骨髓中分离培养仍为获取 MSCs 的最主要方法^[4]。BM-MSCs 具有病原微生物感染率低、生物性能稳定、低免疫原性及移植免疫排斥反应弱等特性,且可为诸如骨及软骨损伤中组织再生修复提供了很好的材料^[7]。BM-MSCs 在造血、心肌梗死或关节疾病患者中的有效性在临床上已得到充分证明。基础实验中的 BM-MSCs 常来源于大鼠、兔、狗等形体较大动物,但它们具有不便于饲养、价格较高、繁殖较慢以及缺乏基因型的缺点。小鼠的基因与人的基因相似度近 99%,且较大鼠及其他实验动物而言,具有形体较小、饲养方便、易于管理、价格低廉、生产繁殖及成熟快,尤其是具有诸多基因型等优点,是现代基础研究中必不可少的,最为常见的实验动物之一。此外,成功培养后的 BM-MSCs 具有干细胞特性稳定、传代次数多,可达 10 代

以上等优势。虽然目前已有一些成功培养小鼠 BM-MSCs 的报道^[8],但是由于小鼠骨髓腔细短,间充质细胞和非间充质细胞的“复合物”隐藏于紧密的骨内膜中^[9],难以释放出来;而且小鼠骨髓间充质的含量也非常低,仅为 0.001%~0.01%^[10],所以在实际操作中想要从小鼠骨髓中稳定、高效的获取浓度和纯度相对较高的 MSCs 仍然较为困难。本研究采用研钵和杵压碎骨髓腔及细胞筛过滤方法,使得小鼠 BM-MSCs 充分溶解释放,大大提高了初始培养阶段的 MSCs 浓度及纯度。然后根据小鼠的 BM-MSCs 较其他实验动物的 BM-MSCs 传代的潜伏期要长的特点,延长初次的培养时间至 5 d 以上^[11];此外,根据常规培养条件下,小鼠的 BM-MSCs 会逐渐失去增殖分化能力^[12]的特点,使用专用的培养基和特殊的添加物,并放置在 5% 氧浓度的低氧环境下培养,更有利于 BM-MSCs 的增殖分化^[13]。这种全骨髓、差速贴壁及低氧环境培养方法可以使得小鼠 BM-MSCs 的增殖速度加快,纯度更高,甚至传至 15 代仍然保持干细胞的活力。诱导分化实验结果亦显示此方法培养的小鼠 BM-MSCs 可很好的诱导成骨、成脂肪及成软骨,证实了其具有良好的分化能力。符合体外细胞实验的要求,可以应用于 MSCs 相关的研究。

MSCs 可以产生大量丰富的生长因子和细胞因子,越来越多的研究显示 MSCs 是通过其外分泌的无细胞治疗效应,发挥其功能的,这减轻了免疫源性,避免了干细胞成瘤性等缺点。外泌体是一类大小约 50~200 μm 的,由细胞分泌的细胞外囊泡,其可以携带多种活性蛋白、非编码 RNA 等物质介导细胞间通讯;它可促进很多疾病的发生及发展,又可作为疾病生物标志物,同时对疾病也具备治疗潜力^[14]。外泌体是 MSCs 外分泌的主要成分之一,被认为是 MSCs 旁分泌的无细胞 (cell-free) 治疗最重要的机制之一^[15]。对其研究有利于进一步阐明 MSCs 的无细胞治疗的理论及机制,是当今的热点。正如上所述,小鼠 MSCs 的培养极其困难,制约了它的外泌体的获取;但它的外泌体又是基础研究中不可缺少的材料。本研究通过“全骨髓、差速贴壁及低氧方法”成功培养小鼠 BM-MSCs 的基础上,发现其经过 5 代培养后,可自然分泌出外泌体,超速离心可得到符合实验条件的外泌体。Western blot 结果显示外泌体的蛋白标志物:特异性的标志物 HSP70、Syntenin1、CD9、CD63 及 TSG101 为阳性;排除标志物 Grp94 为阴性。透视电镜见典型的外泌体

样结构(通茶托型、一侧凹陷的半球形)符合外泌体的特征。所以可以认为应用此方法培养出小鼠 BM-MSCs 更可稳定的自然分泌外泌体,且易于提取。当然,本实验所用的小鼠为 C57 BL/6 小鼠,其他品系小鼠能否获得如此效果需进一步研究证实。

综上所述,本研究建立了一种稳定、高效的小鼠 BM-MSCs 培养方法,为 MSCs 的功能机制研究提供了良好的种子细胞;同时验证了用此方法培养的小鼠 BM-MSCs 能稳定、高效的自然分泌外泌体,且易于提取,为 MSCs 的无细胞的外泌体治疗的深入研究提供了良好的物质基础。

参考文献

[1] Valtieri M, Sorrentino A. The mesenchymal stromal cell contribution to homeostasis [J]. *J Cell Physiol* 2008 217: 296 - 300.
 [2] 冯影, 卢士红, 王昕等. 人骨髓来源间充质干细胞分泌外泌体特性研究 [J]. *中国实验血液学杂志* 2014 22(3): 595 - 9.
 [3] 王凯. 生命科学研究中常用模式生物 [J]. *生命科学研究*, 2010 14(2): 156 - 65.
 [4] 宫晓洁, 孙莉, 黎靖宇等. 小鼠骨髓间充质干细胞的分离培养及形态学观察 [J]. *解剖学研究* 2008 30(1): 54 - 6.
 [5] Csaki C, Matis U, Mobasheri A, et al. Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study [J]. *Histochem Cell Biol* 2007 128(6): 507 - 20.
 [6] Caradec J, Kharmate G, Hosseini-Beheshti E, et al. Reproducibility

and efficiency of serum-derived exosome extraction methods [J]. *Clinical biochemistry* 2014 47(13/14): 1286 - 92.
 [7] 师彬, 杨武斌, 王平. 骨髓间充质干细胞诱导分化成骨细胞的研究现状 [J]. *中国实验方剂学杂志* 2014 20(19): 228 - 31.
 [8] 银广悦, 陈素萍, 丁俊丽, 等. 小鼠骨髓间充质干细胞的体外分离培养和鉴定方法学探讨 [J]. *中国实验诊断学* 2013 17(4): 647 - 50.
 [9] Peister A, Mellad J A, Larson B L, et al. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential [J]. *Blood* 2004 103(5): 1662 - 8.
 [10] 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 - 9.
 [11] 孔根现, 蒋知新, 沙杭, 等. 兔骨髓间充质干细胞分离培养后的活力检测 [J]. *中国组织工程研究* 2013 17(1): 62 - 7.
 [12] Sekiya I, Larson B L, Smith J R, et al. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality [J]. *Stem Cells* 2002 20(6): 530 - 41.
 [13] 陈亭, 周燕, 张治萍, 等. 间充质干细胞在低氧环境下的增殖、代谢与成骨分化: 胎盘羊膜及骨髓来源间充质干细胞的对比 [J]. *中国组织工程研究与临床康复* 2010 14(6): 957 - 61.
 [14] Conlan R S, Pisano S, Oliveira M I, et al. Exosomes as reconfigurable therapeutic systems [J]. *Trends Mol Med* 2017 23(7): 636 - 50.
 [15] Phinney D G. Concise review: MSC-derived exosomes for cell-free therapy [J]. *Stem Cells* 2017 35(4): 851 - 8.

Stable and efficient culture of mouse bone marrow mesenchymal stem cells and extraction of its exosomes

Cheng Huan^{1,2}, Su Gai¹, Tao Siyue¹, et al

(¹Dept of Orthopaedics, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Orthopaedics, Huoshan County Hospital, Lu'an 237200)

Abstract Objective To establish a stable and efficient method for the culture of mouse bone marrow mesenchymal stem cells and the extraction of exosomes. **Methods** The whole bone marrow, differential attachment and hypoxia environment were used to culture bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs). Then the cells were collected, the surface markers of stem cells were identified, and osteogenesis, adipogenesis and chondrogenesis were induced. The supernatant was collected, and the exosomes were extracted by overspeed separation and identified. **Result** The growth of mouse BMSCs was great, and the purity of the third generation cells could reach more than 95% and stable passage to about 15 generations. The cells expressed the markers of mesenchymal stem cells, and could be successfully induced to differentiate into osteogenesis, adipogenesis and chondrogenesis. The extracellular vesicles obtained by ultracentrifugation had typical exosome-like structure, and Western blot identification showed that they had characteristic protein markers of exosomes. **Conclusion** The whole bone marrow culture method makes the loss of BMSCs in mice minimum, and the differential attachment method under 5% oxygen environment makes the proliferation of BMSCs in mice fast and high purity. Moreover, the mouse BMSCs cultured by this method can secrete exosomes vesicles steadily. This provides a great method for the culture of mouse mesenchymal stem cells and the acquisition of their exosomes.

Key words mouse; bone marrow mesenchymal stem cells; whole bone marrow; differential attachment; hypoxic culture; exosomes