

人髓核间充质干细胞的分离提纯方式及生物学活性鉴定

唐 勇, 阳普山, 吴剑宏, 贾治伟, 伍耀宏, 李 浩, 阮狄克, 王德利

(海军总医院骨科 100048 北京市)

【摘要】目的:探索人髓核间充质干细胞(nucleus pulposus mesenchymal stem cells, NPMSCs)的提纯方法并鉴定其生物学活性。**方法:**收集 3 例腰椎间盘突出症患者的退变髓核组织(Pfirrmann 分级均为Ⅳ级), 利用酶消化法分离细胞。采用两种方法分离提纯 NPMSCs, 一组细胞采用贴壁法培养(贴壁组), 另一组通过流式细胞分选技术利用 NPMSCs 表面阳性标志物 CD73、CD90、CD105 获得 NPMSCs (流式组)。将两种方法获得的 NPMSCs 进行体外培养扩增, 分别进行形态学观察, 细胞计数试剂盒(Cell Counting Kit, CCK-8)检测增殖能力。贴壁组 NPMSCs 采用流式细胞分选仪在进行分选之前检测免疫表型, 流式组 NPMSCs 在生长达 80%~90%融合时进行免疫表型的检测。向成骨、成脂、成软骨诱导分化, 诱导 28d 后分别进行茜素红染色观察其成骨能力、油红 O 染色观察其成脂能力、甲苯胺蓝染色观察其成软骨能力, 利用 Imag J 软件计算染色区域所占的面积百分比。比较两组 NPMSCs 在形态学、免疫表型及增殖和分化能力的差异。**结果:**形态学观察发现, 两组 NPMSCs 均呈漩涡状生长, 贴壁组 NPMSCs 可见散在的单个细胞生长; 流式组 NPMSCs 长梭形形态更长, 排列更加紧密, 少见散在的单个贴壁生长细胞。流式细胞分选后所得的 NPMSCs 占细胞总数的(89.67±2.52)%, 可以进行体外培养扩增, 细胞为典型的长梭形特征, 漩涡状生长, 在接种后 12~15d 达 80%~90%融合, 增殖能力在接种后 5~13d 明显高于贴壁组 NPMSCs($P<0.05$)。流式组 NPMSCs 的 CD73、CD90、CD105 的表达率明显高于贴壁组 NPMSCs($P<0.05$), 并且低表达 CD34、CD45 及 HLA-DR。两种方法获得的 NPMSCs 均能完成三系诱导分化, 流式组成骨、成脂、成软骨染色区域百分比均明显高于贴壁组($P<0.05$)。**结论:**利用流式细胞分选技术从人退变髓核组织中可获得较高纯度的 NPMSCs, 并能进行后续培养扩增。与贴壁法获得的 NPMSCs 相比, 流式细胞分选的 NPMSCs 具有更强的增殖与分化能力。

【关键词】髓核间充质干细胞; 流式细胞分选; 分离提纯; 生物学活性

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2015.06.10

中图分类号: Q813.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2015)-06-0533-08

Purification and identification of human nucleus pulposus mesenchymal stem cells/TANG Yong, YANG Pushan, WU Jianhong, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2015, 25(6): 533-540

【Abstract】 Objectives: To explore a method for purifying human nucleus pulposus mesenchymal stem cells (NPMSCs), and to identify its biological activity. **Methods:** Degenerative nucleus pulposus tissue(Pfirrmann Ⅳ) from 3 patients with lumbar disc heriniation was collected, cells were isolated from human nucleus pulposus tissue by using enzyme digestion. Adherent method and fluorescence activated cell sorting(FACS) method were used for purifying NPMSCs, NPMSCs were obtained by FACS accoding to the expression of surface markers including CD73, CD90 and CD105. Then, the obtained NPMSCs by two methods were cultured in vitro and the cellular morphology was observed under the microscope, cell proliferation tests were performed by using Cell Counting Kit-8(CCK-8). Immunophenotyping of NPMSCs of adherence group was detected by FACS, and NPMSCs of FACS group were detected after the fusion rate reaching 80%~90%. Differentiated potential of NPMSCs was investigated by multiple differentiation (Osteogenic, chondrogenic and adipogenic). Alizarin red staining was performed to observe the osteogenesis potential, oil red O staining was used to observe the adi-

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(编号: 81171740、81470102)

第一作者简介: 男(1988-), 硕士研究生在读, 研究方向: 脊柱外科

电话: (021)68780323 E-mail: tangyongngh@163.com

通讯作者: 王德利 E-mail: wangdelinavy@163.com; 阮狄克 E-mail: ruandikengh@163.com

pogenic potential, toluidine blue staining was used to observe the chondrogenic potential. Imag J software was used to test the stained area percentage of differentiated NPMSCs under two methods. NPMSCs of both groups were compared. **Results:** NPMSCs of both groups showed spindle shape, single cell was observed in the adherence group. NPMSCs of FACS group showed longer shuttle and rare single adherent cell. After FACS, the ratio of CD73+, CD90+, CD105+ NPMSCs from NPMSCs reached $(89.67 \pm 2.52)\%$, typically long spindle shape could be observed, 80%–90% confluence was reached after 12–15 days. Expressions of CD73, CD90 and CD105 of FACS were higher than those of adherent method ($P < 0.05$), more than adherent method 5 days later ($P < 0.05$). The multiple differentiation potentials (Osteogenic, chondrogenic and adipogenic) of NPMSCs by FACS were superior than those of adherent method ($P < 0.05$). **Conclusions:** Large proportion of NPMSCs can be obtained through FACS, which provides a reliable cell separation and purification method. Compared with method of adherence, NPMSCs obtained by FACS show better proliferation and multiple differentiation potential compared with adherent method.

[Key words] Nucleus pulposus mesenchymal stem cells; Fluorescence activated cell sorting; Purification; Biological activity

[Author's address] Department of Orthopaedics, Navy General Hospital, Beijing, 100048, China

随着细胞移植技术的发展,利用干细胞治疗椎间盘退行性疾病逐渐成为椎间盘移植技术的研究热点^[1-3]。椎间盘细胞移植技术亟待解决的一个问题是种子细胞的来源。近来的研究发现,椎间盘组织内存在前体细胞^[4-6],这类细胞贴壁生长、特征性表达一系列间充质干细胞表面标志物、可完成三系诱导分化,符合国际细胞治疗学会(International Society for Cellular Therapy, ISCT)有关间充质干细胞的鉴定标准^[7],并将其命名为髓核间充质干细胞(nucleus pulposus mesenchymal stem cells, NPMSCs)。因此,NPMSCs可能成为椎间盘细胞移植治疗技术的新的种子细胞来源。体外分离、纯化 NPMSCs 是研究的关键,但目前尚无研究对 NPMSCs 进行进一步提纯。流式细胞分选仪(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS)广泛应用于细胞的分离纯化,可实现几个抗原组合标记进行细胞分选^[8]。目前,流式细胞分选技术已成功应用于分选肿瘤干细胞^[9,10]、外周血细胞^[11]、造血干细胞^[12]、神经细胞^[13]。与传统方法比较,流式细胞分选技术能快速对所需要的细胞进行分选。本研究采用贴壁法和流式细胞分选两种方法分离提纯 NPMSCs,并从细胞的增殖、免疫表型、三系分化等方面评价 NPMSCs 的生物学活性,旨在建立一种简便、有效的 NPMSCs 体外分离提纯体系,为未来 NPMSCs 的临床应用及生物学机制的研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 标本来源

标本来源于我院骨科收治的 3 例 L4/5 腰椎间盘突出症患者,年龄 31~49 岁,术前 Pfirrmann 分级均为 IV 级,手术方式为 L4/5 椎间盘切除+融合手术,术中取出腰椎间盘突出变的髓核。研究经我院伦理委员会同意,患者均签署知情同意书。

1.2 主要仪器试剂

低糖 DMEM 培养基 (Cyagen Biosciences, 中国广州),胎牛血清 (Hyclone, 美国),胰蛋白酶 (Solarbio, 美国),PBS (Sigma, 美国),细胞计数试剂盒 (Cell Counting Kit, CCK-8) (同仁化学研究所, 日本);PE 偶联 CD73、CD90、CD105、CD45、CD34 单克隆抗体,V450 偶联 CD105 单克隆抗体、APC 偶联 CD90 单克隆抗体、人类白细胞抗原 (HLA)-DR (eBio-science, 美国);人 MSCs 成骨诱导培养液,成软骨诱导培养液,成脂诱导培养液 (Cyagen, 美国),FC500 流式细胞仪 (Beckman Coulter, 美国);MoFlo 高速流式细胞分选仪 (Dako Cytomation 公司, 美国)。

1.3 贴壁法分离获取 NPMSCs

无菌条件下用 PBS 清洗髓核组织 2 遍,齿镊及眼科剪仔细分离髓核组织,剪碎至 $0.5 \times 0.5 \times 0.5 \text{ mm}$ 大小,置于浓度为 0.02% 的 II 型胶原酶溶液中,5% CO_2 、37℃ 培养箱下消化 4h,无菌钢丝网 ($200 \mu\text{m}$) 过滤组织碎片。1500r/min 离心 5min,弃上清液,收集细胞,加入含 10% FBS、1% 青霉素/链霉素的低糖 DMEM 完全培养基,置于 5% CO_2 、37℃ 条件培养箱培养。静置培养 2 周待细胞贴壁

后每 2d 或 3d 换液 1 次,待细胞融合达到 80%~90% 时进行传代培养,0.25%胰酶、0.02%EDTA 消化 3min,按照 5×10^3 个细胞/cm² 重新接种于培养瓶进行传代培养。待细胞传至 P2 代达 80%~90% 融合时获取 NPMSCs。

1.4 流式细胞分选获取 NPMSCs

采用贴壁培养方法培养 NPMSCs 至 P2 代达 80%~90% 融合时,用 0.25%胰蛋白酶、0.02%EDTA 消化,制备单细胞悬液,1500r/min 离心 5min,加入含 4%FBS 的 PBS,加入鼠抗人 PE-CD73、APC-CD90、V450-CD105 单克隆抗体,4℃ 避光孵育 30min,再离心去上清,用含 4%FBS 的 PBS 洗 2 遍,MoFlo 高速流式细胞分选仪进行细胞分选,分选目的细胞为 CD73+、CD90+、CD105+ 的细胞。分选后的 NPMSCs 以 5×10^3 个细胞/cm² 的密度接种于培养皿进行体外扩增,置 37℃、5%CO₂ 培养箱内培养,培养 2 周后进行各项检测。

1.5 细胞形态学观察

分选后的 NPMSCs 按照 5×10^3 个细胞/cm² 接种于培养瓶,于接种后 4~6h 进行细胞形态学观察并记录分选后 NPMSCs 的形态学特征。

1.6 NPMSCs 增殖能力的检测

取流式组与贴壁组的 NPMSCs,胰酶消化,细胞计数后调整细胞悬液密度,按照每孔细胞数 5×10^3 、200μl 培养基接种于 96 孔板,每组复 6 孔。以不含细胞的培养液为空白对照。外周添加适量 pH 值 7.4 的 PBS 溶液以避免培养液挥发。将 96 孔板放置于 37℃、5%CO₂ 饱和湿度培养箱中孵育培养,分别于接种后 4h 及 1、3、5、7、9、11、13d 在流式组与贴壁组每孔添加 10μl CCK-8 溶液,空白对照组每孔添加 10μl CCK-8 溶液,孵育 2h 后用酶标仪测定光密度(OD)值,检测波长为 450nm,将细胞培养各孔所得 OD 值减去空白对照 OD 值后,计算流式组与贴壁组的 OD 值平均值,进行比较并绘制细胞增殖曲线。

1.7 贴壁组与流式组 NPMSCs 免疫表型的检测

贴壁法获取的 NPMSCs 在进行流式分选之前采用 MoFlo 高速流式细胞分选仪进行 CD73、CD90、CD105 免疫表型的检测。流式组 NPMSCs 接种后进行体外扩增,待生长达 80%~90% 融合时,分别加入 CD73、CD90、CD105、CD34、CD45、HLA-DR 单克隆抗体,并送流式细胞仪检测各表面标志物的表达情况。

1.8 CD73+、CD90+、CD105+细胞三系诱导分化

1.8.1 成骨诱导分化 取流式组与贴壁组的 NPMSCs,胰酶消化制备单细胞悬液,按照 5×10^3 个细胞/ml 密度接种于 6 孔板中,用含 10%FBS 的 DMEM 培养液培养至 60%融合,加入成骨诱导分化液,每 3d 换液 1 次,连续培养 28d,镜下观察细胞内有黑色不透光区域时去除诱导液,PBS 洗 2 次或 3 次,加入 4%多聚甲醛固定约 30min,PBS 洗 3 次后加入 1ml 茜红素染液,常温染色 30min 后吸去染液,PBS 洗 3 次后镜下观察钙盐形成情况并摄片,用 Imag J 软件进行图像分析^[14],测定红染面积所占百分比。

1.8.2 成脂诱导分化 取流式组与贴壁组的 NPMSCs,按照 2×10^4 个细胞/cm² 密度接种于 6 孔板中,常规培养直至细胞生长达到 95%融合,吸除常规培养液,加入 2ml 成脂诱导 A 液。3d 后将 A 诱导液吸除换成脂诱导培养液 B,24h 后吸出诱导 B 液,再次加入 2ml 成脂诱导 A 液进行诱导,重复 3~4 个循环,连续观察,在第 3 个循环后可看到细胞内有大小不等的光亮圆形脂滴形成,第 4 个循环后换成成脂诱导 A 液,每 3d 换液 1 次,培养 1 周,最后吸干成脂诱导 A 液,PBS 洗 1 次,4%多聚甲醛固定约 30min,再次 PBS 洗涤后加入 1ml 油红 O 染色 30min,PBS 洗 2 次或 3 次,镜下观察脂滴形成情况并摄片,摄片后应用 Imag J 软件测定脂滴染色面积所占百分比。

1.8.3 成软骨诱导分化 取流式组与贴壁组的 NPMSCs,胰酶消化后 1500r/min 离心 5min 弃上清,加入不含转化生长因子-β3(TGF-β3)的软骨诱导基础培养液并重悬细胞,再次 1500r/min 离心 5min,弃上清,加入含 TGF-β3 的软骨诱导完全培养液重悬细胞;吸取含 2.5×10^5 个细胞的细胞悬液转入 15ml 离心管中,1500r/min 离心 5min 制备成细胞团块,放入 37℃、5%CO₂ 中孵育,3d 后换新鲜的软骨诱导完全培养液,换液后轻弹细胞团脱离瓶壁使其悬浮于培养液中。每 3d 换液 1 次,诱导 28d 后收集细胞微球,4%多聚甲醛固定约 30min 后进行石蜡切片,脱蜡后甲苯胺蓝染色,镜下观察蓝染的软骨细胞并摄片,摄片后应用 Imag J 软件测定蓝染软骨细胞所占面积百分比。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析,对贴壁组与流式组 NPMSCs 不同培养天数的细胞

OD值、Imag J 软件测得的三系分化染色区域面积百分比与 CD73、CD90、CD105 的阳性表达率进行方差齐性检验后,采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流式细胞分选结果

本实验共进行了 3 次分选,流式细胞分选仪以 PE-CD73、APC-CD90、V450-CD105 作为表面标志阳性,分选出 CD73+、CD90+、CD105+ 的 NPMSCs (图 1a、b),NPMSCs 获得数为 $(3.53 \pm 0.78) \times 10^6$ 个,约占细胞总数的 $(89.67 \pm 2.52)\%$ 。

2.2 流式组与贴壁组 NPMSCs 形态学观察

贴壁组原代细胞在接种 5~7h 后贴壁,P0 代细胞呈长短不一的短梭形,贴壁组 NPMSCs 培养至 P2 代细胞呈典型的长梭形,细胞增殖主要表

现为漩涡状生长,亦可见部分散在单个贴壁细胞 (图 2a)。贴壁组 NPMSCs 在接种后 15~20d 细胞达 80%~90% 融合。流式组 NPMSCs 在培养 4~6h 后贴壁生长,细胞的克隆增殖表现出漩涡状排列生长,成纤维细胞样的长梭形形态更长,排列更加紧密、整齐,少见散在的单个贴壁生长细胞,12~15d 细胞可达到 80%~90% 融合 (图 2b)。

2.3 流式组与贴壁组 NPMSCs 免疫表型的检测

流式组 NPMSCs 接种到培养瓶中进行体外扩增,待细胞增殖达 80%~90% 融合时,再次对流式组 NPMSCs 进行流式细胞仪检测,CD73、CD90、CD105 的表达率如表 1 所示,并且流式组 CD45、CD34 及 HLA-DR 等造血干细胞表面标志物的表达率均低于 4% (图 3)。应用流式细胞分选仪检测贴壁组 NPMSCs 的 CD73、CD90、CD105 的阳性表达率见表 1 和图 4。流式组 CD73、CD90、CD105

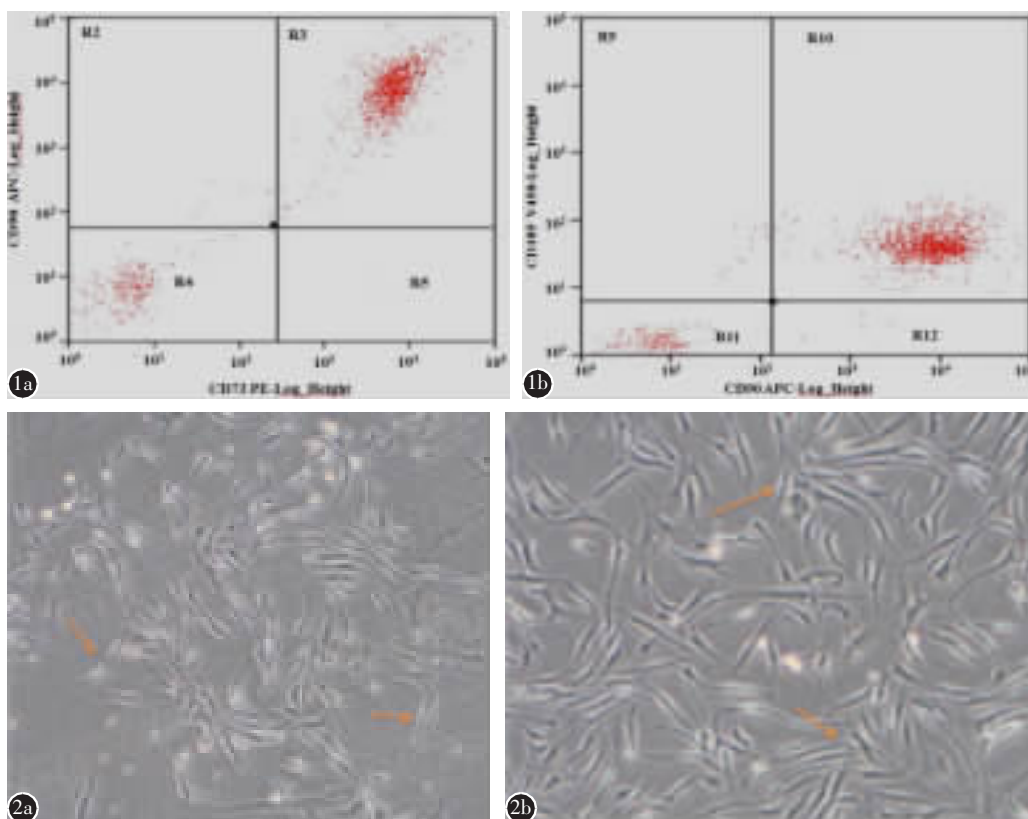


图 1 流式细胞分选仪分选结果 a R3 区域为 CD73 及 CD90 阳性表达的细胞群 b R10 区域为 CD90 及 CD105 阳性表达的细胞群 图 2 光镜下贴壁组与流式组 NPMSCs 的细胞形态 ($\times 100$) a 贴壁组 NPMSCs 贴壁生长,可见漩涡状及单个贴壁细胞 (箭头指示部分) b 流式组 NPMSCs 漩涡状生长,少见散在单个贴壁细胞 (箭头指示部分)

Figure 1 Fluorescence activated cell sorting (FACS) a The R3 area were cell population of CD73+ and CD90+ b The R10 area were cell population of CD90+ and CD105+ **Figure 2** Cellular morphology of FACS and adherence methods ($\times 100$) a NPMSCs of adherence methods showed spindle shape and single cell was observed b NPMSCs of FACS showed spindle shape and rare single adherent cell

的表达率明显高于贴壁组($P<0.05$)。

2.4 细胞增殖能力的检测

酶标仪测定流式组与贴壁组的 OD 值结果见表 2。在培养 4h~1d, 流式组增殖能力明显低于贴壁组($P<0.05$), 接种后 3d 两组 OD 值无统计学差异($P>0.05$), 但在接种后 5~13d 流式组增殖能力明显高于贴壁组($P<0.05$)。

2.5 三系分化能力的检测

流式组与贴壁组均可完成成骨、成脂、成软骨诱导分化, 诱导分化 28d 后茜素红染色可见细胞表面存在大量红染的矿化钙盐沉积(图 5a、b), 流式组红染面积明显高于贴壁组($P<0.05$, 表 3)。成脂诱导分化显示, 诱导 28d 后, 油红“O”染色均可见片状或点状的红染脂滴空泡(图 6a、b), 流式组红染脂滴明显高于贴壁组($P<0.05$, 表 3)。成软骨

诱导 28d 后流式组与贴壁组均可以形成乳白色的软骨微球, 甲醛固定后切片甲苯胺蓝染色后两组细胞均可见明显蓝染的软骨细胞(图 7a、b), 流式组蓝染软骨细胞面积明显高于贴壁组($P<0.05$, 表 3)。

表 1 流式组与贴壁组 NPMSCs 表面标志物的表达率

($n=6, \bar{x} \pm s, \%$)

Table 1 The expression of surface marker of NPMSCs of FACS group and Adherence group

表面标志物 Surface maker	流式组 FACS group	贴壁组 Adherence group	P 值 P value
CD73	98.55±0.35	89.79±2.40	0.003
CD90	98.47±0.57	94.07±2.31	0.033
CD105	98.20±1.24	90.49±1.63	0.003

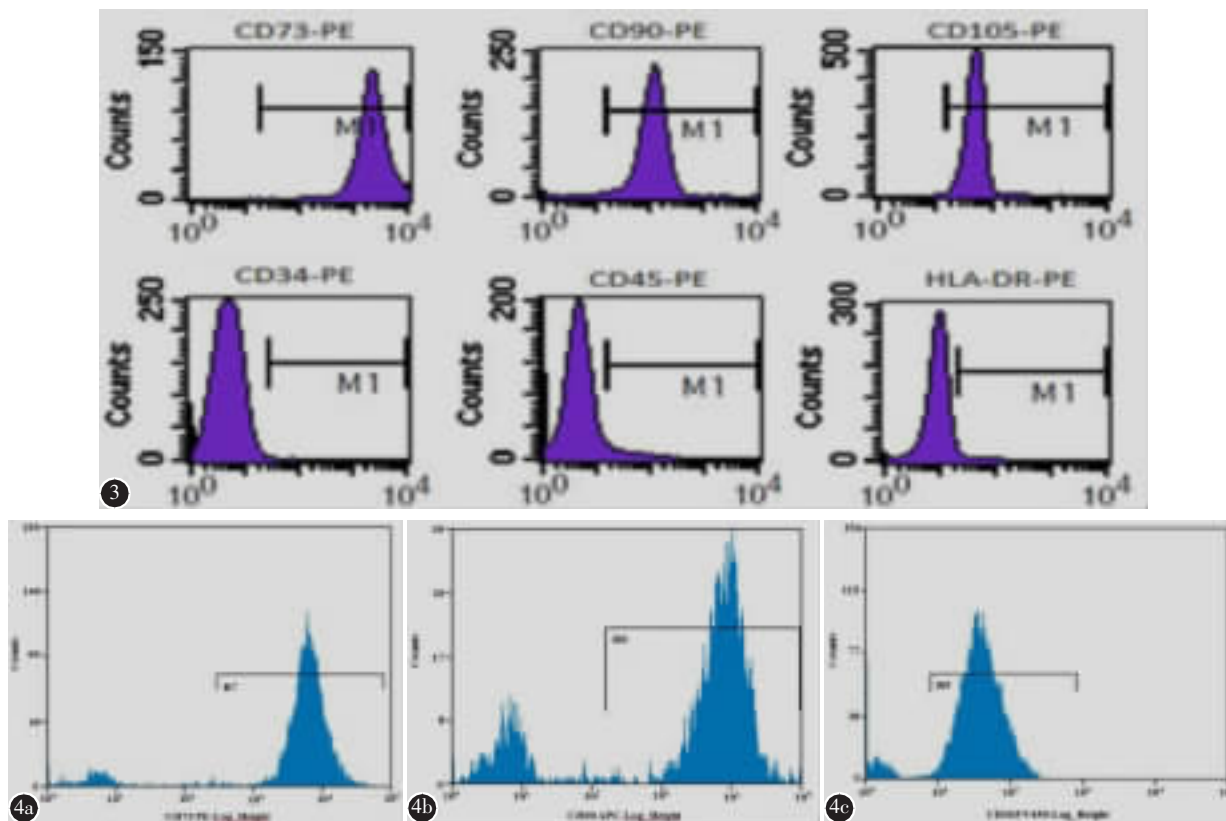


图 3 流式组 NPMSCs 的免疫表型分析, 高表达 CD73、CD90、CD105, 低表达 CD34、CD45、HLA-DR 图 4 流式细胞分选仪检测贴壁组 NPMSCs 表面阳性标志物的表达 a 贴壁组 NPMSCs CD73 的表达 b 贴壁组 NPMSCs CD90 的表达 c 贴壁组的 NPMSCs CD105 表达

Figure 3 Surface molecule marker of NPMSCs detected with fluorescence activated cell sorting(FACS), surface molecule marker of MSC(CD73, CD90, CD105) highly expressed and the hematopoietic stem cell markers (CD45, CD34, HLA-DR) expressed rarely (all less than 4%) on NPMSCs **Figure 4** Expression of positive surface marker of NPMSCs of adherence methods obtained by FACS a Expression of CD73 of NPMSCs b Expression of CD90 of NPMSCs c Expression of CD105 of NPMSC

3 讨论

椎间盘退行性疾病是一种常见的严重影响人

表 2 流式组与贴壁组 NPMSCs 不同培养时间的 OD 值
($n=6, \bar{x} \pm s$)

Table 2 The OD value at different cultruing point of FACS group and Adherence group

培养时间 Culture time	流式组 FACS group	贴壁组 Adherence group	P值 P value
4h	0.111±0.048	0.176±0.042	<0.05
1d	0.117±0.027	0.227±0.012	<0.05
3d	0.299±0.028	0.287±0.029	>0.05
5d	0.517±0.005	0.456±0.038	<0.05
7d	0.684±0.040	0.602±0.038	<0.05
9d	0.963±0.038	0.722±0.032	<0.05
11d	1.090±0.077	0.897±0.043	<0.05
13d	1.223±0.153	0.951±0.044	<0.05

们生活质量的疾病。椎间盘内细胞数量减少、生物学活性下降、细胞外间充质含量和成分发生变化,是诱发椎间盘退变、导致椎间盘生物力学功能紊乱和丧失的主要原因之一。因此,增加椎间盘内细

表 3 流式组与贴壁组 NPMSCs 经诱导后染色区域所占的面积百分比
($n=6, \bar{x} \pm s, \%$)

Table 3 The stained area percentage of NPMSCs after inducing of FACS group and Adherence group

多向分化 Multilineage Differentiation	流式组 FACS group	贴壁组 Adherence group	P值 P value
成骨分化 (Osteogenic differentiation)	48.75±3.75	26.75±5.84	0.000
成脂分化 (Adipogenic differentiation)	10.23±1.60	7.50±1.41	0.011
成软骨分化 (Chondrogenic differentiation)	46.03±5.59	36.77±2.88	0.005

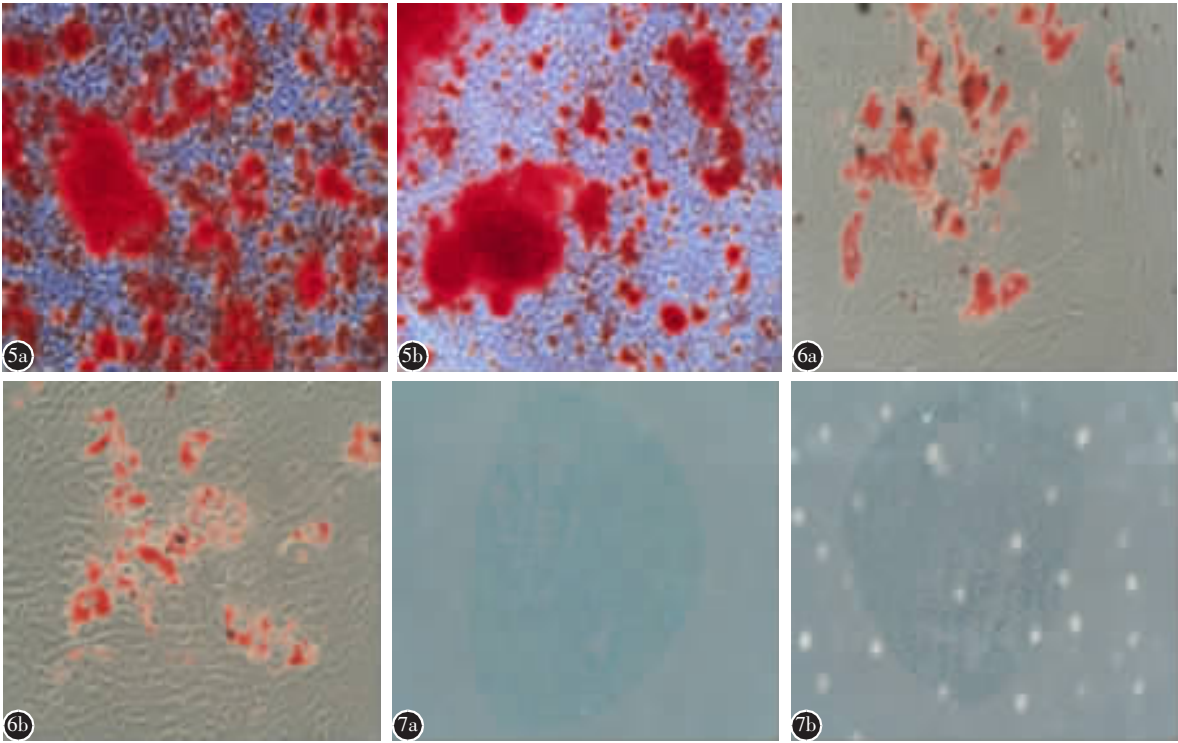


图 5 NPMSCs 成骨分化(茜素红染色, $\times 100$) a 流式组诱导 28d 可见大量红染的钙结节 b 贴壁组诱导 28d 后可见红染钙结节 图 6 NPMSCs 成脂分化(油红“O”染色, $\times 100$) a 流式组诱导 28d 可见红染脂肪滴形成 b 贴壁组诱导 28d 可见红染脂肪滴形成 图 7 NPMSCs 成软骨分化(甲苯胺蓝染色, $\times 100$) a 流式组诱导 28d 可见蓝染软骨样细胞 b 贴壁组诱导 28d 可见蓝染软骨样细胞

Figure 5 Osteogenesis of NPMSCs(Alizarin red staining, $\times 100$) a The NPMSCs of FACS formatted lots of red stained calcium salts b The NPMSCs of adherence methods also with a lot of red stained calcium salts deposited Figure 6 Adipogenic differentiation of NPMSCs (Oil red O staining, $\times 100$) a NPMSCs of FACS are stained red by Oil-Red-O, indicated it have been induced into adipocyte-like cell b NPMSCs of adherence methods also formatted many red stained lipid droplets Figure 7 Chondrogenic differentiation of NPMSCs(Toluidine blue staining, $\times 100$) a NPMSCs of FACS are stained after 28 days by toluidine blue, indicated it have been induced into chondrocyte-like cell b NPMSCs of adherence methods also stained by toluidine blue

胞数量及提高其生物学活性将是治疗椎间盘退变的有效途径。随着对干细胞研究的不断深入,其在椎间盘退行性疾病中的应用越来越受到学者们的关注^[15-17],采用干细胞治疗技术修复退变的椎间盘,是治疗早中期椎间盘退变的理想途径^[18]。NPMSCs 是学者们在椎间盘内发现的一种间充质干细胞,并有可能成为椎间盘细胞治疗的理想种子细胞。因此,如何对其分离提纯成为 NPMSCs 研究的关键问题。

近年来,利用细胞的物理及生物特性,如细胞大小、密度、电化学及疏水特性以及细胞的特异表面标志,达到了分离细胞的目的。传统的技术利用细胞的物理化学性质(包括离心、滤过膜过滤、两水相系统等)不能实现高纯度分离目的细胞的要求。然而,细胞表面特异性标志物可以被特异性的单克隆抗体、凝集素以及核酸适配体等标记,高纯度的分离技术就是利用这一特性,从而实现了细胞的分离。例如,流式细胞分选技术、免疫磁珠分选技术,这些方法不仅可以标记一个表面标志,也可以同时标记几个表面标志物进行特定细胞的分离。流式细胞术(flow cytometry, FCM)是一项新型的、发展迅速的生物学分析技术,它不仅可以对细胞、微生物等进行检测分析,而且还可以根据颗粒特性进行分选,具有检测速度快、测量指标多、采集数据量大等特点^[8]。近年来,流式细胞分选技术在干细胞的分离提纯中得到应用^[19,20],NPMSCs 表面丰富表达干细胞标志物 CD73、CD90、CD105,利用这些标志物为 NPMSCs 的纯化提供了新的思路。

我们利用 PE-CD73、APC-CD90、V450-CD105 单克隆抗体标记 CD73、CD90、CD105 三种表面抗原阳性的 NPMSCs, CD73+、CD90+、CD105+ 标记的 NPMSCs 细胞悬液被高压压入充满鞘液的流动室内,以一定速度从流动室喷口喷出,当细胞通过激光束时, NPMSCs 所携带的荧光束被激发后发出荧光进而转换成电信号,在高压电场的作用下偏转,落入各自的收集容器中,从而实现分离 NPMSCs 细胞的目的。我们的分选结果显示可以获得高纯度的 NPMSCs,并且分选后的 NPMSCs 可以进行体外贴壁培养和扩增。流式组细胞呈长梭形或多角形,与间充质干细胞形态相似。相同培养条件下,与贴壁组相比较,细胞增殖能力检测发现,在培养 4h~1d,流式组活性低于贴

壁组,我们推测此为流式分选过程对细胞造成一定的损伤所致,在接种后 5d,流式组活性明显高于贴壁组,并且在接种后 12~15d 细胞达到 80%~90% 融合。在分化能力方面,流式组与贴壁组的 NPMSCs 均能完成三系诱导分化,并且流式组分化能力高于贴壁组。在免疫表型表达率上,流式组的 CD73、CD90、CD105 的表达率明显高于贴壁组, CD45、CD34 及 HLA-DR 等造血干细胞表面标志物的表达率均低于 4%。说明流式组 NPMSCs 能够贴壁生长、高表达 CD73、CD90、CD105,低表达 CD45、CD34 及 HLA-DR,能够完成三系诱导分化实验,符合 ISCT 制定的干细胞鉴定标准,流式组 NPMSCs 的增殖和分化特点显示其是具有更强增殖能力和多向分化潜能的原始 NPMSCs 亚群。

本研究利用 CD73、CD90、CD105 NPMSCs 表面标志物,从髓核组织中直接分离提纯具有高纯度的干细胞,为 NPMSCs 的纯化及后续研究提供了新的技术路线。与贴壁法获得的 NPMSCs 相比,流式细胞分选的 NPMSCs 具有更强的增殖与分化能力,为 NPMSCs 应用于椎间盘细胞治疗打下了基础。流式细胞分选方法操作简便迅速,单次操作分离细胞数量大且纯度较高,这不仅为 NPMSCs 的分离纯化提供了可靠的方法,还为干细胞移植治疗椎间盘退行性疾病的种子细胞获取提供了更加优选的方案。

4 参考文献

1. 王海,熊承杰,黄博,等.椎间盘组织工程学种子细胞来源的研究进展[J].中国脊柱脊髓杂志,2012,22(1):77-80.
2. Wang F, Wu X, Wang Y, et al. Research situation of stem cells transplantation for inter-vertebral disc degeneration [J]. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi, 2013, 27(5): 575-579.
3. Zhang L, Ning B, Jia T, et al. Microcarrier bioreactor culture system promotes propagation of human intervertebral disc cells [J]. Ir J Med Sci, 2010, 179(4): 529-534.
4. Risbud MV, Guttapalli A, Tsai TT, et al. Evidence for skeletal progenitor cells in the de-generate human intervertebral disc[J]. Spine, 2007, 32(23): 2537-2544.
5. Blanco JF, Graciani IF, Sanchez -Guijo FM, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stromal cells from human degenerated nucleus pulposus: comparison with bone marrow mesenchymal stromal cells from the same subjects [J]. Spine, 2010, 35(26): 2259-2265.
6. 阳普山,刘子双一,陶晖,等.正常与退变髓核的髓核间充质

- 干细胞代谢活性及干性基因表达的比较[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2014, 24(5): 454-461.
7. Dominici M, Le Blanc K, 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.
 8. 石亚萍, 种银保, 王晴. 高端流式细胞分选仪的选型评价[J]. 医疗卫生装备, 2010, 31(10): 122-124.
 9. Yang ZF, Ngai P, Ho DW, et al. Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer[J]. Hepatology, 2008, 47(3): 919-928.
 10. Hassan KA, Wang L, Korkaya H, et al. Notch pathway activity identifies cells with cancer stem cell-like properties and correlates with worse survival in lung adenocarcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(8): 1972-1980.
 11. Wang D, Zheng M, Lei L, et al. Tspal is involved in late thymocyte development through the regulation of TCR-mediated signaling [J]. Nat Immunol, 2012, 13(6): 560-568.
 12. 李乔, 纪庆, 王金宏. 体外培养单个造血干细胞实验方法的建立[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(3): 435-438.
 13. 王萍, 李润今, 高学文, 等. 经流式细胞仪分选神经细胞技术方法的建立[J]. 内蒙古医学杂志, 2008, 40(12): 1416-1418.
 14. Merve Z, Serap K, Guven C, et al. Donor age and long-term culture affect differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Ann Hematol, 2012, 91(8): 1175-1186.
 15. Wang CF, Ruan DK, Wang DL, et al. Effects of adeno-associated virus-2-mediated human BMP-7 gene transfection on the phenotype of nucleus pulposus Cells [J]. J Orthop Res, 2011, 29(6): 838-845.
 16. Zhang YJ, Uitto J, Thonar E. Cell based gene therapy for the degenerating intervertebral disc[J]. Am J Phys Med Rehab, 2006, 85(3): 248-249.
 17. Moon SH, Nishida K, Gilbertson LG, et al. Biologic response of human intervertebral disc cells to gene therapy cocktail[J]. Spine, 2008, 33(17): 1850-1855.
 18. Jeffrey CW, Joseph SK. Biological or genetic modulation of intervertebral disk degeneration[J]. Curr Orthop Pract, 2008, 19(4): 366-371.
 19. Zhou JX, Chen SY, Liu WM, et al. Enrichment and identification of human 'fetal' epidermal stem cells [J]. Hum Reprod, 2004, 19(4): 968-974.
 20. Li A, Kaur P. FACS Enrichment of human keratinocyte stem cells. In: John M. Walker. Methods in Molecular Biology[M]. New York: Humana press, 2005. 289: 87-96.
- (收稿日期: 2014-12-28 末次修回日期: 2015-04-13)
(英文编审 蒋欣/贾丹彤)
(本文编辑 李伟霞)
-
- (上接第 532 页)
- Society-Schwab adult spinal deformity classification: a validation study[J]. Spine, 2012, 37(12): 1077-1082.
18. Ploumis A, Transfeldt EE, Gilbert TJJ, et al. Degenerative lumbar scoliosis: radiographic correlation of lateral rotatoryolisthesis with neural canal dimensions[J]. Spine, 2006, 31(20): 2353-2358.
 19. 王辉, 马雷, 丁文元, 等. 退变性脊柱侧凸患者脊柱-骨盆矢状位特点及各参数间的相关性分析 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2014, 24(8): 699-703.
 20. 李危石, 孙卓然, 陈仲强. 正常脊柱-骨盆矢状位参数的影像学研究[J]. 中华骨科杂志, 2013, 33(5): 447-453.
 21. Zhu Z, Xu L, Zhu F, et al. Sagittal alignment of spine and pelvis in asymptomatic adults: norms in chinese populations [J]. Spine, 2014, 39(1): E1-6.
 22. Barrey C, Jund J, Nosedo O, et al. Sagittal balance of the pelvis-spine complex and lumbar degenerative diseases: a comparative study about 85 cases[J]. Eur Spine J, 2007, 16(9): 1459-1467.
 23. Yang X, Kong Q, Song Y, et al. The characteristics of spinopelvic sagittal alignment in patients with lumbar disc degenerative diseases[J]. Eur Spine J, 2014, 23(3): 569-575.
 24. Tribus CB. Degenerative lumbar scoliosis: evaluation and management[J]. J Am Acad Orthop Surg, 2003, 11(3): 174-183.
 25. Pritchett JW, Bortel DT. Degenerative symptomatic lumbar scoliosis[J]. Spine, 1993, 18(6): 700-703.
 26. Iguchi T, Wakami T, Kurihara A, et al. Lumbar multilevel degenerative spondylolisthesis: radiological evaluation and factors related to anterolisthesis and retrolisthesis[J]. J Spinal Disord Tech, 2002, 15(2): 93-99.
 27. Barrey C, Jund J, Perrin G, et al. Spinopelvic alignment of patients[J]. Neurosurgery, 2007, 61(5): 981-986.
 28. Transfeldt E, Labelle H, Roussouly P, et al. Spondylolisthesis, pelvic incidence, and spinopelvic balance: a correlation study[J]. Spine, 2004, 29(18): 2049-2054.
 29. Vaz G, Roussouly P, Berthonnaud E, et al. Sagittal morphology and equilibrium of pelvis and spine [J]. Eur Spine J, 2002, 11(1): 80-87.
 30. Mac-Thiong JM, Labelle H, Berthonnaud E, et al. Sagittal spinopelvic balance in normal children and adolescents [J]. Eur Spine J, 2007, 16(2): 227-234.
- (收稿日期: 2014-12-29 末次修回日期: 2015-04-04)
(英文编审 蒋欣/贾丹彤)
(本文编辑 李伟霞)