

# 小鼠骨髓间充质干细胞的培养、鉴定和 *Survivin* 的表达研究

周青松, 苟欣\*

(重庆医科大学 附属第一医院 泌尿外科, 中国重庆 400016)

**摘要:** 为培养及鉴定小鼠来源骨髓间充质干细胞, 并测定细胞中 *Survivin* 的表达情况, 采用全骨髓培养法获取骨髓间充质干细胞, 绘制生长曲线, 流式细胞仪检测细胞表面标志物, 行成骨、成脂检测, RT-PCR 测定 *Survivin* 表达情况。结果表明培养出的细胞呈梭状成纤维细胞样, 经流式细胞仪检测细胞表面高表达 CD29、CD34、CD44、SCA-1, 低表达 CD117; 细胞曲线显示传代细胞培养 1~3 d 生长缓慢, 第 4 d 生长加快并于第 7 d 达到高峰; 成骨诱导 20 d 经茜素红染色呈红色结节, 成脂诱导 14 d 油红 O 染色显示有大量脂质沉淀; RT-PCR 结果显示 *Survivin* mRNA 阳性表达。经全骨髓培养法可以培养出大量骨髓间充质干细胞, 同时 *survivin* 在小鼠骨髓间充质干细胞中正常表达, 提示可能参与骨髓间充质干细胞抗凋亡过程。

**关键词:** 骨髓间充质干细胞; 培养; 鉴定; *Survivin*

中图分类号: Q291

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2010)05-0381-05

## Culture, Identification of Mice Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and the Expression of *Survivin*

ZHOU Qing-song, GOU Xin\*

(Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract:** To culture and identify mice bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs), and to detect the expression of *Survivin*, BMSCs by whole bone marrow adherence method was adopted, charted the growth curves of the passage BMSCs, the specific surface markers were detected by flow cytometry (FCM), osteogenic and adipogenic induction was performed on BMSCs, expression of *Survivin* mRNA in BMSCs determined by RT-PCR. The results showed that the cells displayed fusiform shape as fibroblasts, the surface highly express CD29, CD34, CD44, SCA-1, lowly express CD117; the growth curve showed that cells grew slowly in the first three days, then growth accelerated and reached the top at the seventh day; after 20 days of osteogenic induction, alizarin red stain showed that alizarin red was positive in cells, and after 14 days adipogenic induction, oil red O stain showed that lipide sediment existed; *Survivin* mRNA was positive in BMSCs by RT-PCR. So BMSCs can be cultured abundantly by whole bone marrow adherence method, and expression of *Survivin* is positive, and indicating that *Survivin* may participate in the anti- apoptotic of BMSCs.

**Key words:** bone marrow mesenchymal stem cells; culture; identification; *Survivin*

(*Life Science Research*, 2010, 14(5): 381~385)

收稿日期: 2010-06-03; 修回日期: 2010-08-20

作者简介: 周青松 (1984-), 男, 四川广安人, 硕士研究生, 主要从事干细胞移植方面研究, E-mail: lobster.j@163.com; \* 通讯作者: 苟欣 (1963-), 男, 重庆人, 重庆医科大学附属第一医院教授, 硕士, 主要从事干细胞移植方面研究, E-mail: cymnk@163.com.

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有强大的增殖和多向分化的能力,尽管间充质干细胞最初是从骨髓中提取出来<sup>[1,2]</sup>,但随后在许多组织中相继发现和分离出间充质干细胞,如脂肪组织<sup>[3]</sup>、脐带血<sup>[4-7]</sup>、外周末梢血<sup>[8,9]</sup>、骨骼肌<sup>[10]</sup>等等。正是由于间充质干细胞有强大的增殖和多向分化能力,让其在多方面、多领域有着广泛的应用,诸如 Wakitani 等研究显示间充质干细胞的植入在一定程度上改善了软骨组织的再生<sup>[11,12]</sup>、Trinity J. Bivalacqua 等研究表明在海绵窦内单独注射间充质干细胞或者 eNOS-MSc 能显著增强内皮来源的 NO 的合成同时还能改善神经源性勃起功能障碍<sup>[13]</sup>。但是在体内的增殖能力有限限制了其在科研上面的应用<sup>[14]</sup>。

*Survivin* 基因是近年来发现的凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族最小成员,具有强大的抗凋亡以及调节细胞增殖功能<sup>[15]</sup>。国内鲜有骨髓间充质干细胞中 *Survivin* 的表达的报道。因此我们培养小鼠骨髓间充质干细胞并测定其中 *Survivin* 表达情况,以期找到 *Survivin* 在骨髓间充质干细胞中的生物学作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

4~6 周龄 SPF 级健康雌性 C57BL/6 小鼠购自于重庆医科大学实验动物研究中心; LG-DMEM 细胞培养基购自美国 Hyclone 公司; 胰蛋白酶、优质胎牛血清购自美国 Gibco 公司; C57BL/6 骨髓间充质干细胞成骨诱导分化完全培养基、成脂诱导分化完全培养基 A、成脂诱导分化完全培养基 B、中性甲醛、油红 O 储液、茜素红染液购自 Cyagen 公司; 流式抗体均为 Biologend 产品; TRI REAGENT 购自美国 MRC 公司; RQ1 RNase-Free Dnase 购自美国 Promega 公司; RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit, Taq DNA Polymerase, dNTP Mix, GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder 购自美国 Fermentas 公司。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 小鼠骨髓间充质干细胞的分离及培养

采用全骨髓培养法培养骨髓间充质干细胞,无菌条件下完整取出 C57BL/6 小鼠双侧股骨、胫骨, 1 mL 注射器吸取无血清的 LG-DMEM 培养液并反复冲洗骨髓腔制备骨髓细胞, 1 500 g 离心 8~10 min 后弃上清, 加入 5 mL 含 10%胎牛

血清、100 U/mL 青霉素、100 mg/L 链霉素的 LG-DMEM 完全培养液重悬前体细胞,用巴氏管吹打混匀后接种至塑料培养瓶内,将培养瓶放入 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱培养,首次换液于 48 h 后去除非贴壁细胞,以后每隔 3 d 更换一次培养液,待细胞融合到 80%~90%时用 1%胰酶消化,按 1:2 比例传代培养。取第 11 代细胞进行相关实验。

#### 1.2.2 小鼠间充质干细胞形态学观测

在倒置显微镜下观察原代及传代细胞骨髓间充质干细胞的形态及结构。

#### 1.2.3 传代细胞生长曲线的绘制

消化一瓶细胞,计数。按每孔  $2 \times 10^4$  的细胞量种植到 12 孔板中,每天消化计数一次,一共计数 8 d。

#### 1.2.4 流式细胞仪检测 DC 表面分子的表达

收集细胞, 250 g 离心 4 min 后弃去上清。以 Buffer 溶液重悬,吸取 100  $\mu$ L 细胞悬液(约  $3.0 \times 10^5$  个细胞)加入 Ep 管内。按量加入抗体,避光孵育 30 min。每样品管加入 1.5~2 mL Buffer 溶液, 250 g 离心 4 min 后弃去上清。每样品管加入 300  $\mu$ L Buffer 溶液重悬, FACScan 流式细胞仪进行检测。

#### 1.2.5 向成骨细胞诱导分化

待细胞达到 80%~90%融合时,吸去旧培养液,常规消化后以  $1 \times 10^5$  接种于 6 孔板中,加入每孔 2 mL 的 C57BL/6 骨髓间充质干细胞完全培养基,放入 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 1 d。诱导组加入每孔 2 mL 的成骨诱导分化完全培养基,对照组加入等量完全培养液。每 3 d 换液一次, 2~3 周后,进行茜素红染色。

#### 1.2.6 向成脂细胞诱导分化

待细胞达到 80%~90%融合时,吸去旧培养液,常规消化后以  $1 \times 10^5$  接种于 6 孔板中,加入每孔 2 mL 的 C57BL/6 骨髓间充质干细胞完全培养基,放入 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 1 d。待细胞达到 100%融合时,吸去旧培养液,加入每孔 2 mL 的成脂诱导完全培养基 A 开始诱导, 3 d 后更换为成脂诱导完全培养基 B,维持 24 h 后,再次更换为成脂诱导完全培养基 A,如此进行 3 个循环,对照组加入等量完全培养液。14 d 后进行油红 O 染色。

#### 1.2.7 RT-PCR 检测 *Survivin* 的表达情况

根据 GenBank 上报道的小鼠 *Survivin* 序列

(NM-009689)设计一对引物,上游序列 5'-CTGG GAACCCGATGACAACCC-3',下游序列 5'-GCAG CCAGCTGCTCAATTGACT-3',产物长度 222 bp;以三磷酸甘油醛脱氢酶(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)作为内参,引物上游序列 5'-TCG TCC GGT AGA CAA AAT GG-3',下游序列 5'-GAG GTC AAT GAA GGG GTC GT-3',产物长度 130 bp.按照试剂说明书提取 RNA 后逆转录为 cDNA,PCR 反应体系:10× Taq Buffer with (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 μL; 2 mmol/L dNTP Mix 3 μL; 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 2 μL; 10 μmol/L 上游引物, 1.5 μL; 10 μmol/L 下游引物 1.5 μL; Taq DNA Polymerase, 1.5 U; cDNA template, 0.6 μL (0.01~1 μg); 补水至总体积 30 μL; PCR 条件: 94 °C 3 min, 94 °C 30 s, 60 °C 1 min,

72 °C 1 min, 30 个循环, 4 °C 保存. 反应结束后,所有 PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳、溴化乙锭染色鉴定,应用 BIO-RAD 系统进行分析.

## 2 结果

### 2.1 小鼠骨髓间充质干细胞的分离、培养结果

刚接种的骨髓间充质干细胞呈圆形,单细胞分布. 48 h 后见细胞基本贴壁,有集落形成,进行第一次换液(图 1A). 换液后清除悬浮细胞,骨髓间充质干细胞开始贴壁生长,约第 8 d 左右,细胞铺满瓶底(图 1B). 传代后细胞依然贴壁生长,但生长较原代迅速,第 3 代时可见细胞以梭形为主. 传代至第 11 代仍可见细胞生长旺盛,呈长梭、漩涡状排列(图 1C).

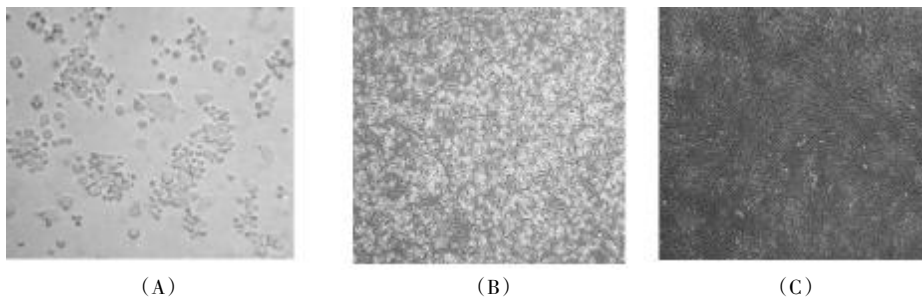


图 1 光镜下骨髓间充质干细胞形态观察

Fig.1 Observation of BMSCs by microscope

(A) 2 d, ×100; (B) 8 d, ×100; (C) P11×100.

### 2.2 传代小鼠 MSCs 生长曲线结果

传代细胞培养前 3 d 细胞生长缓慢,甚至第 1 d 细胞数比接种时少,但自第 4 d 起细胞生长迅速,到第 7 d 时达到高峰,见图 2.

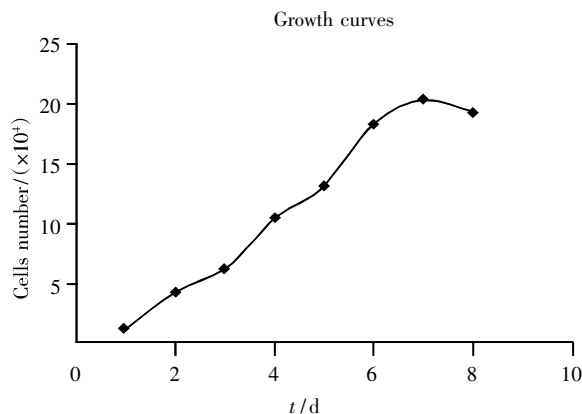


图 2 传代骨髓间充质干细胞的生长曲线

Fig.2 Growth curves of the passage bone marrow mesenchymal stem cells

### 2.3 MSCs 流式细胞检测结果

流式细胞仪检测结果显示小鼠 MSCs 表面高表达 CD34、CD29、CD44、SCA-1,表达率分别为 99.95%、97.19%、86.90%、99.16%;低表达 CD117,表达率为 14.65%,见图 3.

### 2.4 MSCs 成骨诱导分化结果

诱导约 7 d 细胞呈多角形,胞质内细胞颗粒增多; 13 d,胞质内充满颗粒,细胞呈集落样生长,细胞间可见钙质沉积; 17 d,细胞结节中心的细胞逐渐融合失去细胞结构,钙结节形成明显, 20 d,经茜素红染色呈红色结节,见图 4.

### 2.5 MSCs 成脂诱导分化结果

成脂诱导 72 h 后,镜下观察可见细胞立体感增强,细胞内有小脂滴出现,约一周后脂滴数量增加并相互融合,细胞由长梭形变为圆形或多边形,油红 O 染色显示有大量脂质沉淀,见图 5.

### 2.6 RT-PCR 检测 Survivin 的表达情况

BIO-RAD 凝胶图像扫描结果显示, 200 bp

附近的条带和 130 bp 附近的内参条带与实际设计的 *Survivin* 基因(222 bp)和 *GAPDH* 基因

(130 bp)大小相一致, 见图 6.

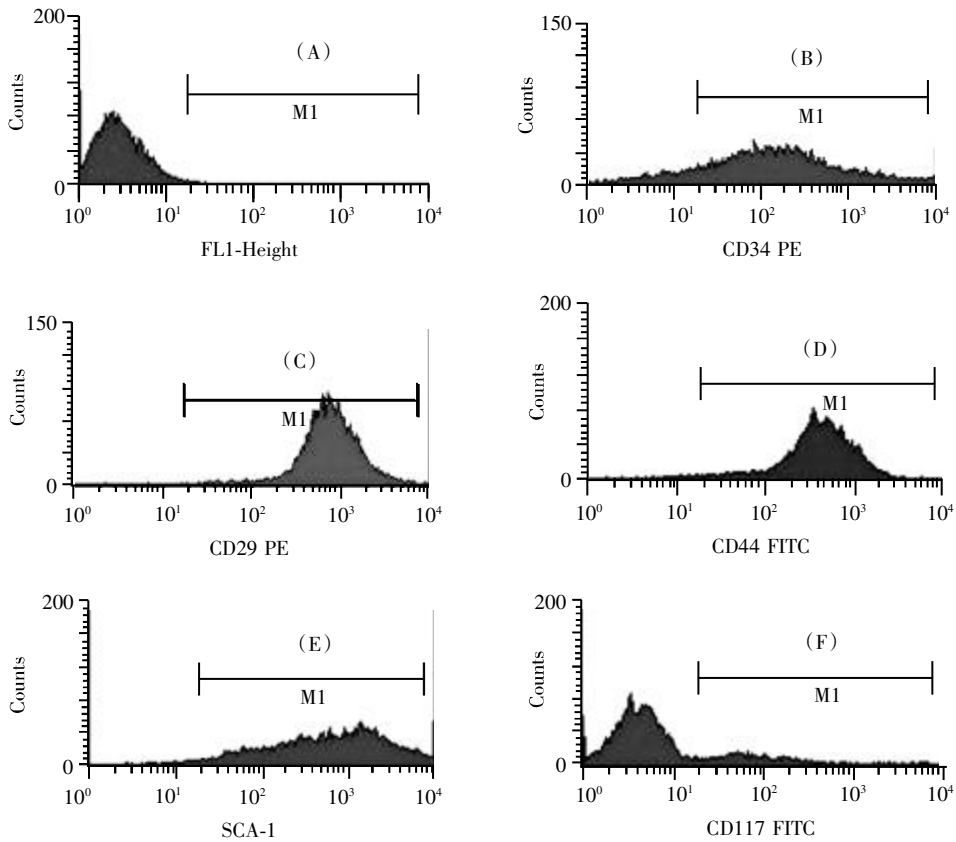


图 3 BMSCs 表型分析

Fig.3 The analysis of BMSCs's phenotypes

(A) Control; (B) CD34 PE; (C) CD29 PE; (D) CD44 FITC; (E) SCA-1; (F) CD117 FITC.

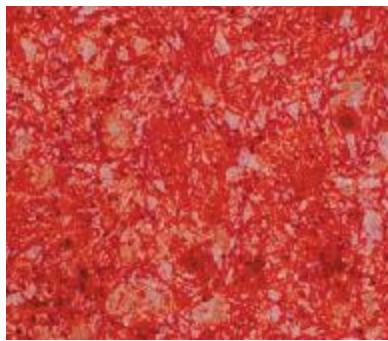


图 4 茜素红染色(x100)  
Fig.4 Alizarin red stain(x100)

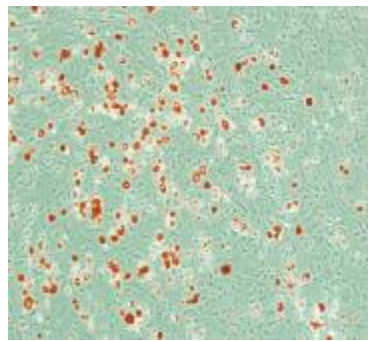


图 5 油红 O 染色(x100)  
Fig.5 Oil red O stain(x100)

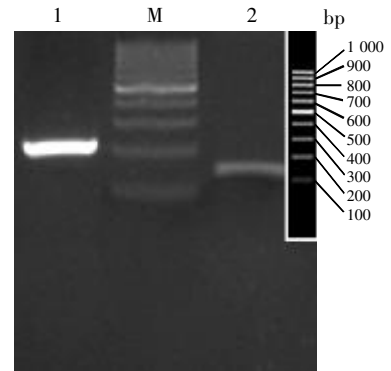


图 6 MSCs 中 *Survivin* 的表达  
Fig.6 Expression of *Survivin* in BMSCs  
1: *Survivin*; M: Marker; 2: *GAPDH*.

### 3 讨论

自从 Friedenstein<sup>[1]</sup>等于 1968 年第一次就间充质干细胞进行描述以来, 在其后的几十年里间充质干细胞受到了广泛的关注, 关注点不仅着重于其多向分化的能力, 还就起免疫抑制和组织工

程方面进行了广泛的研究. 虽然间充质干细胞具有强大的增殖能力, 但由于其在体内含量只占骨髓中有核细胞的十万分之一<sup>[16]</sup>, 且在体内的增殖能力有限<sup>[14]</sup>, 严重限制了间充质干细胞在科研中的应用, 因此, 建立一种高效的体外、体内增殖方法就显得尤为重要.

现在骨髓间充质干细胞的培养主要有全骨髓培养法、密度梯度离心法、流式细胞仪分离法、免疫磁珠法<sup>[17]</sup>。本实验选取全骨髓培养法进行骨髓间充质干细胞的培养,既避免了密度梯度法对细胞定性分化和活力的影响,又避免了流式细胞仪分离法和免疫磁珠法对细胞活性的损害。全骨髓培养法几乎可以保留所有的骨髓前体细胞,还能提供细胞生长所需要的细胞因子。利用骨髓间充质干细胞贴壁生长的特性,在以后的换液过程中逐步清除悬浮细胞以达到纯化的目的。本实验的结果也说明此方法的可行性,在刚接种的48 h,可见既有贴壁也有悬浮细胞,到第8 d几乎所有都是贴壁细胞。传代至11代仍可见细胞生长速度快,在7~8 d达到峰值。进行成骨、成脂诱导实验测定显示所培养的MSCs能很好的分化为成骨、成脂细胞,同时流式细胞分析可以发现,细胞表面高表达CD34、CD29、CD44、SCA-1,低表达CD117,这与Alexandra Peister<sup>[18]</sup>等研究结果一致。

*Survivin* 是IAP家族中最小成员,能编码产生一个由142个氨基酸组成的相对分子量为16.5 kD的蛋白,具有强大的抗凋亡和调节细胞增殖功能<sup>[15]</sup>。其调节细胞凋亡的功能主要通过抑制线粒体依赖途径的*capase-3*、*capase-7*、*capase-9*等的激活、与周期蛋白激酶*Cdk4*、*p34cdc2*相互作用阻断凋亡信号的转导等途径而抑制细胞凋亡<sup>[19]</sup>。随着检测技术的进步,我们不仅可以在各种胚胎、肿瘤等具有增殖能力的组织中检测到*Survivin*<sup>[20]</sup>,同时还在部分正常分化成熟的组织和细胞中检测到*Survivin*的表达<sup>[21]</sup>。本实验通过RT-PCR技术的测定显示在MSCs中*survivin*也正常表达,表明*Survivin*可能参与到骨髓间充质干细胞的生物学行为中。

本研究通过对骨髓间充质干细胞的培养、鉴定说明全骨髓培养法在体外可以获得增殖能力强、数目多、纯度高的间充质干细胞,但骨髓间充质干细胞在体内有限的增殖能力限制了其在科研上面的应用<sup>[14]</sup>。*Survivin*在MSCs中的表达为我们提供了一种可能,利用其抗凋亡的特性,通过载体转入细胞中让其高表达,使MSCs在体内存活时间延长,可以有效的增加病灶细胞浓度,以达到治疗的目的,但仍需进一步的实验证实。

#### 参考文献(References):

[1] FRIEDENSTEIN A J, PIATETZKY-SHAPIRO I I, PETRAKOVA

- K V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells[J]. *Journal of Embryology & Experimental Morphology*, 1966, 16(3): 381-390.
- [2] PITTENGER M F, MACKAY A M, BECK S C, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143-147.
- [3] ZUK P A, ZHU M, MIZUNO H, *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies[J]. *Tissue Engineering*, 2001, 7(2): 211-228.
- [4] BIEBACK K, KERN S, KIUTER H, *et al.* Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood[J]. *Stem Cells*, 2004, 22(4): 625-634.
- [5] ERICES A, CONGET P, MINGUELL J J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood[J]. *British Journal of Haematology*, 2000, 109(1): 235-242.
- [6] GOODWIN H S, BICKNESE A R, CHIEN S N, *et al.* Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers[J]. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2001, 7(11): 581-588.
- [7] KOGLER G, SENSKEN S, AIREY J A, *et al.* A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2004, 200(2): 123-135.
- [8] ZVAIFLER N J, LILLA M M, ADAMS G, *et al.* Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals[J]. *Arthritis Research & Therapy*, 2000, 2(6): 477-488.
- [9] KUZNETSOV S A, MANKANI M H, GRONTHOS S, *et al.* Circulating skeletal stem cells[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2001, 153(5): 1133-1140.
- [10] JIANG Y, BEN V, TODD L, *et al.* Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain[J]. *Experimental Hematology*, 2002, 30(8): 896-904.
- [11] WAKITANI S, IMOTO K, YAMOTO 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.
- [12] YAN H, YU C. Repair of full-thickness cartilage defects with cells of different origin in a rabbit model[J]. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, 2007, 23(2): 178-187.
- [13] BIVALACQUA T J, DENG W W, USTA F F, *et al.* Mesenchymal stem cells alone or ex vivo gene modified with endothelial nitric oxide synthase reverse age-associated erectile dysfunction[J]. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 2007, 292(3): 1278-1290.
- [14] TOMA C, PITTENGER M F, CAHILL K S, *et al.* Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart[J]. *Circulation*, 2002, 105(1): 93-98.
- [15] ALTIERI D C. The case for *Survivin* as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2006, 18(6): 609-615.
- [16] PITTENGER M F, MACKAY A M, BECK S C, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143-147.
- [17] WANG T, XU Z, JIANG W, *et al.* Cell-to-cell contact induces mesenchymal stem cell to differentiate into cardiomyocyte and smooth muscle cell[J]. *International Journal of Cardiology*, 2006, 109(1): 74-81.
- [18] 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): 1662-1668.
- [19] MITA A C, MITA M M, NAWROCKI S T, *et al.* *Survivin*: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics[J]. *Clinical Cancer Research*, 2008, 14(6): 5000-5005.
- [20] RYAN B M, NORMA O, MACHAEL J, *et al.* *Survivin*: A new target for anti-cancer therapy[J]. *Cancer Treatment Reviews*, 2009, 35(7): 553-562.
- [21] PHILIPP L, WU X, BERNHARDT W, *et al.* The tumor gene *Survivin* is highly expressed in adult renal tubular cells: implications for a pathophysiological role in the kidney[J]. *American Journal of Pathology*, 2007, 171(5): 1483-1498.