

文章编号:1004-7220(2009)01-0028-06

利用旋转式生物反应器快速扩增骨髓间充质干细胞

倪明¹, 谢慧琪², 陈俊伟¹, 杨志明², 秦岭¹, 李刚^{1,2}

(1. 香港中文大学威尔斯亲王医院 矫形与创伤医学系; 2. 四川大学 生物治疗国家重点实验室干细胞与组织工程研究室, 成都 610041)

摘要: 目的 探讨旋转式生物反应器是否能促进骨髓来源的间充质干细胞(MSCs)的快速扩增。方法 将MSCs细胞放入盛有Myelocult™培养液生物反应器中动态培养,并在Myelocult™培养液中补充一些因子,如干细胞因子(SCF),白介素3和6(IL-3, IL-6)。检测和比较经反应器处理前后的MSCs的表型,增生和分化能力的变化。结果在生物反应器中培养8d,总细胞数、Stro-1⁺CD44⁺CD34⁻间充质干细胞和CD34⁺CD44⁺Stro-1⁻造血干细胞分别增加了9、29和8倍。实验研究结果显示,生物反应器扩增的间充质干细胞表达了原始间充质干细胞的标记物内皮因子(SH2)和波形蛋白,却没有发现与细胞系的分化有关的标记物,包括骨钙素(成骨指标),II型胶原(成软骨指标)和C/EBPα(成脂指标)。生物反应器组的细胞集落生成效率(成纤维细胞集落/天)是对照组(无生物反应器组)的1.44倍。经诱导后,生物反应器扩增的间充质干细胞可以分化成成骨细胞,软骨细胞和脂肪细胞,其分化能力与未经生物反应器处理的MSCs无区别。结论 旋转式生物反应器结合改良的Myelocult™培养液可用于快速扩增间充质干细胞。

关键词: 间充质干细胞; 造血干细胞; 生物反应器; 分化

中图分类号: R318.01 **文献标志码:** A

Rapid expansion of bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSCs) using rotary bioreactor

NI Ming¹, XIE Hui-qi², CHEN Jun-wei¹, YANG Zhi-ming², QIN Ling¹, LI Gang^{1,2}. (1. Musculo-Skeletal Research Laboratory, Department of Orthopaedics & Traumatology, The Chinese University of Hong Kong, Hongkong, China. 2. State Key Laboratory of Biotherapy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: Objective To examine the feasibility of expanding MSCs from the isolated bone marrow mononuclear cells using a rotary bioreactor system. **Methods** The cells were cultured in a rotary bioreactor with Myelocult™ medium with addition of supplementary factors such as stem cell factor (SCF), interleukin 3 and 6 (IL-3, IL-6). The MSCs were measured and compared the changed of its apparent, hyperplasia and differentiation before and after treated by the bioreactor. **Results** After 8 days of culture, total cell numbers, Stro-1⁺CD44⁺CD34⁻ MSCs and CD34⁺CD44⁺Stro-1⁻ HSCs were increased 9, 29, and 8 folds respectively. The bioreactor-expanded MSCs showed expression of primitive MSCs markers endoglin (SH2) and vimentin, whereas markers associated with lineage differentiation including osteocalcin (osteogenesis), Type II collagen (chondrogenesis) and C/EBPα (adipogenesis) were not detected. Colony forming efficiency-fibroblast per day (CFE-F/day) of the bioreactor-treated cells was 1.44-fold higher than that of the cells without bioreactor treatment. Upon induction, the bioreactor-expanded MSCs were able to differentiate into osteoblasts, chondrocytes and adipocytes, which showed no difference with that of MSCs without treating by Bioreactor. **Conclusion** It could con-

收稿日期:2009-10-15

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30872635/C160705)

作者简介:倪明,男,研究方向:生物反应器

通讯作者:李刚,教授, E-mail: gangli@ort.cuhk.edu.hk

clude that the rotary bioreactor with the modified Myelocult[®] medium reported in this study could be used to rapidly expand MSCs.

Key words: Mesenchymal stem cells; Hematopoietic stem cells; Bioreactor; Differentiation

传统静态细胞培养方法扩增间充质干细胞既费时又易被污染^[1]。随着间充质干细胞在临床应用的增加,急需一种能快速扩间充质干细胞的方法^[2]。早期研究表明,间充质干细胞在转瓶中与造血干细胞一起培养并没有丢失其多间质分化潜能^[3,4]。在这样的悬浮液中混合培养,是模拟体内正常生理状态下的骨髓微环境,包含有各种细胞因子,炎症趋化因子和生长因子,有利于间充质干细胞和造血干细胞的生长^[5]。三维旋转式生物反应器是一种有着独特培养环境的新型转瓶。其突出特点在于旋转过程可提供极低的剪切力和微重力培养环境,这对哺乳动物细胞的生长至关重要,而且利用这种生物反应器系统大规模扩增造血干细胞已获得成功^[6]。

本研究旨在探索是否可利用旋转式生物反应器从骨髓单核细胞中分离扩增间充质干细胞。在生物反应器中培养 8d,总细胞数、Stro-1⁺CD44⁺CD34⁻间充质干细胞和 CD34⁺CD44⁺Stro-1⁻造血干细胞分别增加了 9、29 和 8 倍。生物反应器扩增的间充质干细胞表达了原始间充质干细胞的标记物,持续高水平的集落生成效率——成纤维细胞集落/天 (CFE-F/day),并且在适当诱导下能分化成软骨细胞,成骨细胞和脂肪细胞。实验结果证实旋转式生物反应器可以促进(原始)间充质干细胞和造血干细胞快速扩增。

1 材料和方法

1.1 骨髓细胞的准备

全麻下,从全髌关节置换患者的髌嵴处抽取骨髓血。1~3 h 内将收集到的骨髓血用 PBS 漂洗。为了分离出骨髓单核细胞,将所有含骨髓血的漂洗液放入淋巴细胞分离剂(1.077 g/ml; Nycomed Amersham, Norway),室温下 1 840 r/min 离心 30 min。离心后,收集血沉棕黄层的单核细胞。

1.2 间充质干细胞分别在静态条件和生物反应器中培养

静态培养组:将上述分离提取到的单核细胞移

入 T75 的培养瓶,细胞密度为 1×10^5 个/cm²,采用 DMEM 培养液(包含 10% FBS,100 U/ml 盘尼西林,100 mg/l 链霉素,2.5 mg/l 两性霉素,2 mmol/l 谷氨酰胺),在 37 °C,5% CO₂ 的培养箱中培养。

生物反应器组:将新鲜收集到的单核细胞接种到两个 50 ml RCCS[™] 生物反应器(SYNTHETON, INC., Texas, USA) [图 1],细胞浓度为 1×10^6 个/ml,分别采用两种不同的培养液。第 1 种是改良的 Myelocult[™] 培养液(StemCell Technologies Inc., London, UK),含有 50 μg/l 干细胞因子(SCF),10 μg/l 白介素 3 and 6(IL-3, IL-6)(PeproTech EC Ltd., London, UK)和 1 μmol/l 氢化可的松。第 2 种是 DMEM 培养液,含有 10% FBS,100 U/ml 盘尼西林,100 mg/l 链霉素,2.5 mg/l 两性霉素,2 mmol/l 谷氨酰胺。生物反应器转速为 20 r/min。在 37 °C,5% CO₂ 培养箱中培养 8 d。第 3 天时换 20% 培养液,而且生长因子浓度降为 10 μg/l 干细胞因子(SCF),2 μg/l (IL-3、IL-6),以后采用有限稀释换液方法每天换液^[3]。每次从生物反应器中取细胞做细胞计数(培养初期的两天从生物反应器中随机抽取 50 μl)和流式细胞仪分析。



图 1 本实验中所用的旋转式生物反应器。

1.3 成纤维细胞集落生成效率评估

成纤维细胞集落生成效率(CFE-F)评估用来测定改良 Myelocult[™] 生物反应器扩增的间充质干细胞的特性。将刚收集到的单核细胞(对照组)和生物反应器扩增的细胞(实验组)再分别种到 6 孔板上,

密度为 1×10^5 个/cm²。第3组采用改良的 Myelocult™ 培养液静态培养单核细胞。在 37 °C, 5% CO₂ 条件下培养, 第1周时做第1次换液, 之后每周2次, 直到细胞集落出现。细胞集落用 95% 酒精固定, 然后用苏木精染色。细胞集落计数: 成纤维细胞集落生成效率 = 细胞集落数/10⁶ 单核细胞数。3组之间的集落形成时间少有差异, 因为生物反应器组的细胞比静态培养组较早出现细胞集落, 所以用 CFE-F/d 来校正 CFE-F 的时间差异。

1.4 生物反应器扩增的间充质干细胞的三系分化

除了少数试剂特别注明外, 其他试剂均购买于 Sigma 公司。实验组(生物反应器组)细胞采用常规方法进行诱导分化。将第一代间充质干细胞种到培养皿中, 细胞密度为 2×10^4 个/cm²。成软骨分化, 培养液由不含血清的 DMEM 培养液组成, 补充 0.1 μmol/l 地塞米松, 0.2 mmol/l 维生素 C, 1 mmol/l 丙酮酸钠和 1: 100 稀释的 ITS + Premix (BD Biosciences, Oxford, UK)。隔天换一次培养液, 然后加 TGF-β1, 浓度为 10 μg/l。培养 28 d 后做 II 型胶原染色, 同时将细胞团石蜡包埋做阿新蓝染色或做透射电子显微镜检测。成骨分化, 培养液由 DMEM 培养液加 10% FBS, 补充 0.1 μmol/l 地塞米松, 0.2 mmol/l 维生素 C 及 10 mmol/l β-甘油磷酸酯。每周换液 2 次。培养 18 d 后, 做 Von Kossa 和 ALP 染色, 成骨细胞的免疫细胞化学检测, I 型胶原、波形蛋白和 CD105 的表达。成脂分化, 培养液是 DMEM 培养液添加 0~6 mol/l 地塞米松, 0.50 mmol/l 1-甲基-3-异丁基-黄嘌呤和 50 μmol/l 吡啶美辛。培养液每周换 2 次, 培养 12 d 后用油红染色脂肪空泡。

1.5 统计学分析

不同细胞群的平均值用 SPSS 13.0 统计分析软件及方差分析比较组间差异, $P < 0.05$, 有统计学意义。所有数据用均数 ± 标准差表示。

2 结果

2.1 细胞扩增动力学

接种后最初的增殖比较慢, $(2.55 \pm 0.42) \times 10^6$ 个/ml (第3天, 图2)。第1次换液后, 总细胞数在第4天达到 $(4.07 \pm 0.44) \times 10^6$ cells/ml, 接下来的两天扩增速率仍然很高。扩增速度在第7、8天时逐渐减慢, 生长曲线也开始变得平滑。培养结束时, 细

胞密度从开始的 1×10^6 个/ml 增加到 $(8.93 \pm 0.41) \times 10^6$ 个/ml, 平均净增长了约 9 倍。然而用 DMEM 培养液在生物反应器中培养, 总细胞数迅速下降, 在第8天时几乎测不到。细胞数从第1天的 1×10^6 cells/ml 减少到第4天的 $(0.11 \pm 0.03) \times 10^6$ 个/ml (见图2)。第8天后, 少量细胞仍然存活, 即扩增后只剩下 10% 左右。

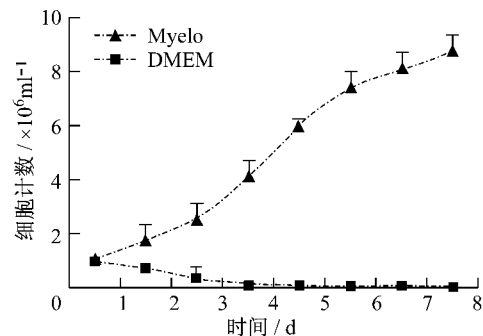


图2 生物反应器中不同培养液组的总细胞数-时间曲线。将分离的成人骨髓单核细胞分别用改良 Myelocult™ 培养液 (▲) 和 DMEM 培养液 (■) 接种到生物反应器中, 密度为 1×10^6 cells/ml。培养过程中, 每次取细胞样本后必须计数。8 天后, 扩增的细胞总数两组分别增加了 (8.93 ± 0.41) 倍 (改良 Myelocult™ 培养液) 和 (0.11 ± 0.03) 倍 (DMEM 培养液)。

2.2 不同条件下获得的间充质干细胞的成纤维细胞集落生成效率 (CFE-F/day) 比较

改良 Myelocult™ 培养液生物反应器培养组细胞的 CFE-F/day 是 DMEM 培养液静态培养组的 1.44 倍 ((2.3 ± 0.2) 对 (1.6 ± 0.4) , $P < 0.05$, 表 1)。然而, 改良 Myelocult™ 培养液静态培养组细胞的 CFE-F/day 比 DMEM 培养液静态培养组的减少了 40% ((1.0 ± 0.2) 对 (1.6 ± 0.4))。改良 Myelocult™ 培养液生物反应器培养组的平均集落形成时间是 12 d, 而改良 Myelocult™ 培养液静态培养组的是 16 d。在第 12 d, 在改良 Myelocult™ 培养液生物反应器培养组可见到形态较好的细胞集落 (图 3a), 然而 DMEM 培养液静态培养组的细胞集落却比较小 (图 3b)。

2.3 生物反应器扩增的间充质干细胞的多向分化能力

28 d 的软骨分化诱导后, 生物反应器扩增的间充质干细胞的 II 型胶原免疫染色阳性 (图 4a); 成软骨分化的细胞在软骨基质中 (图 4b); 透射电镜观察证实了透明软骨具有多向性的胶原纤维和粘蛋

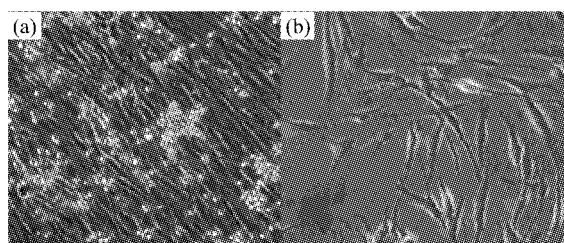


图3 成纤维细胞-集落生成效率的比较. 改良 Myelocult™ 培养液在生物反应器中培养了 8 d 的细胞 (a) 和同一患者的骨髓单核细胞 (b) 进行标准的贴壁成纤维细胞-集落生成效率评估。(a) 12 d 后, 可见致密的成纤维细胞样的细胞集落和大量的造血干细胞集落。(b) 单核细胞标准的贴壁培养在同样的时间内仅形成稀少的集落。(a) 和 (b), $\times 100$.

白颗粒的典型特征 (图 4b)。成骨分化时, 细胞经历了一个形态学的转变, 即从细长梭形细胞变成多角形细胞。13 d 时, ALP (图 4d) 和 OC (图 4e) 检测均成阳性。18 d 时, Von Kossa 染色证实了细胞外基质的矿化 (图 4c)。成脂分化平均 12 d 左右 (7 ~ 17 d), 细胞核变小, 脂质空泡聚集在细胞周围, 油红染色阳性 (图 4f)。

3 讨论

本研究旨在探讨改良 Myelocult™ 培养液结合旋转式生物反应器促进骨髓间充质干细胞快速扩增的

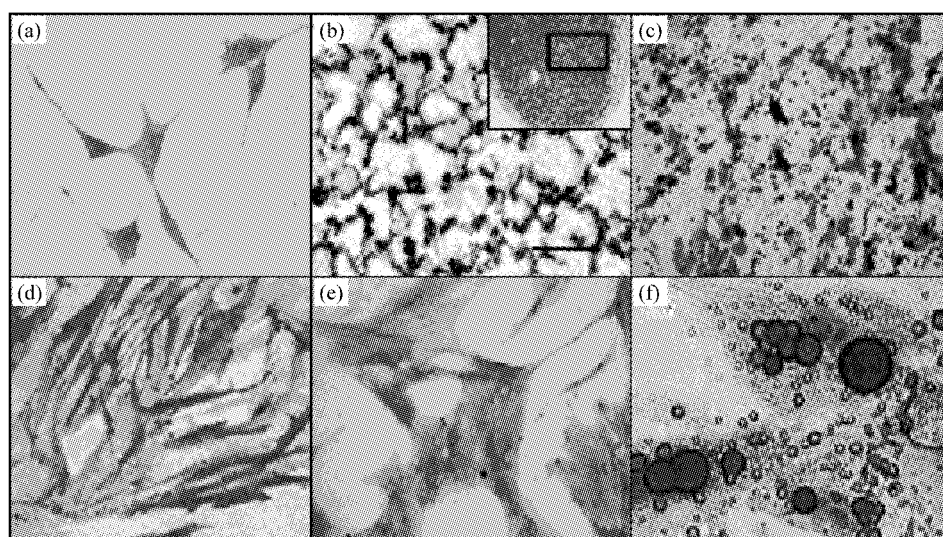


图4 生物反应器扩增的单核细胞的多向分化潜能的研究。28 d 的成软骨诱导后, II 型胶原标记阳性 (a, $\times 400$)。TEM 显示透明软骨的原纤维网细胞团含有杂乱分布的细胞集落 (b, $\times 11800$)。方框内为软骨细胞石蜡切片阿新蓝染色后的宏观形态。18 d 的成骨诱导后, Von Kossa 染色可证实矿化过程 (c, $\times 200$), 并且这些细胞的碱性磷酸酶 (d, $\times 400$) 和骨钙素染色 (e, $\times 400$) 均为阳性。成脂诱导后, 油红 O 染色脂质空泡为阳性 (f, $\times 400$)。

可行性。生物反应器扩增 8 d 后, 间充质干细胞在单核细胞中的比例增加了 29 倍。细胞形态学分析和功能评估证明了扩增的间充质干细胞维持着原有的干细胞特性。

早期研究已证明, 外太空的微重力条件可促进细胞的生长。在 Colvin 等^[7] 首先提出了微重力条件促进干细胞扩增的概念之后, 大量研究也证明了微重力可调节细胞生长。本实验中所用的旋转壁式生物反应器的设计源自美国航空航天局 (NASA) 在外太空模拟组织培养条件的研究, 并且被认为是新一代的转瓶。这种生物反应器提供了微重力及最小

剪应力的独特环境, 使细胞在一个类似于体内的环境中生长。哺乳动物细胞尤其对剪应力敏感, 而且在高速旋转时也不能存活。搅拌式生物反应器产生的持续流体剪切力可能影响干细胞的进一步扩增。因此, 旋转壁式生物反应器优于搅拌式生物反应器。

生物反应器系统中, 3 个重要参数影响着细胞的存活, 即换液的步骤, 剪应力和细胞培养液。本实验中采用的有限稀释 (LDF) 换液法 (有较多的优点。首先, 培养过程中干细胞快速扩增可能导致刺激性细胞因子的消耗及抑制因子的产生, 影响原始干细胞的进一步扩增^[8,9]。LDF 换液稀释了抑制因

子的浓度,同时维持了刺激因子的浓度。研究证明,不论是生物反应器还是静态培养,与隔天换液(保留所有的细胞)相比较,每天换液(不保留置换的培养液中的细胞)更加促进造血前体细胞及总细胞数的扩增^[10,11]。其次为了在体外获得最佳的扩增,生物反应器系统中的营养物质和代谢废物的相互作用应与体内相比较。悬浮培养系统每天换20%的培养液,这样可模拟骨髓中的血浆灌注率,约为0.1/min骨髓^[12]。目前的结果证实,20%稀释换液方法适合原始间充质干细胞的快速扩增。

接种细胞后,采用大剂量的细胞因子混合物,并在首次换液后转变成低浓度。初步结果显示,高浓度大剂量的细胞因子可以使细胞扩增更加迅速。大剂量细胞因子可促进原始干细胞从静止期转变到增殖期,缩短了培养周期。然而,造血干细胞培养过程中,持续大剂量的细胞因子也可促进细胞的快速增殖及细胞分化^[13]。因此,高剂量(接种后)和低剂量(第1次换液后)的细胞因子的使用确保了原始干细胞亚群的扩增和保存。

本实验中,为了防止生物反应器培养过程中的细胞聚集,试验了10、15、20、23 r/min几种转速,最终确定为20 r/min。同时还发现在生物反应器培养8 d后细胞开始聚集。这说明微重力环境促进干细胞扩增仅在短期内效果最好^[7]。随着培养的进行,采用70 μm的细胞滤器过滤聚集的细胞等方法分离细胞并不实际,因为13 d后生物反应器里的细胞已严重聚集成。当总细胞数在第8天达到峰值并开始下降,应用生物反应器扩增细胞的平均时间为8 d。已有研究证明,培养系统中的血清学因素可加速干细胞的分化,并可能对前体细胞的保留有抑制作用^[14]。即使在无血清的培养条件下晚期集落形成细胞和CD34⁺细胞有所增加,早期造血干细胞在培养9 d消失^[15]。基于上述观察结果,在生物反应器培养8 d左右细胞增殖的减慢说明早期前体细胞已消失。为了未来的临床应用,不得不避免与血清相关的一些潜在不良反应。Baksh等^[3,4]人采用多10倍的细胞因子剂量,这样扩增出来的间充质干细胞质量也很高。关于无血清培养条件的生物反应器扩增MSCs正在进一步研究。

在静态培养中,小部分的间充质干细胞参与细胞周期的增殖阶段(S+G₂+M),然而近80%处于

静止期(G₀)。生物反应器扩增组的平均集落形成时间为12 d,而静态培养对照组为16 d,说明生物反应器通过促进静止期前体细胞进入细胞周期增强了细胞的增殖能力,缩短了集落形成所需要的时间。因此,本研究中采用的旋转壁式生物反应器结合改良MyelocultTM培养液可用于原始间充质干细胞的迅速扩增。

参考文献:

- [1] Ueda T, Tsuji K, Yoshino H, et al. Expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt3 ligand, thrombopoietin, IL-6, and soluble IL-6 receptor [J]. *J Clin Invest*, 2000,105:1013-1021.
- [2] Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, et al. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells*, 2006,24:74-85.
- [3] Baksh D, Davies JE, Zandstra PW. Adult human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells are capable of adhesion-independent survival and expansion [J]. *Exp Hematol*, 2003,31:723-732.
- [4] Baksh D, Davies JE, Zandstra PW. Soluble factor cross-talk between human bone marrow-derived hematopoietic and mesenchymal cells enhances in vitro CFU-F and CFU-O growth and reveals heterogeneity in the mesenchymal progenitor cell compartment [J]. *Blood*, 2005, 106:3012-3019.
- [5] Verfaillie CM. Soluble factor(s) produced by human bone marrow stroma increase cytokine-induced proliferation and maturation of primitive hematopoietic progenitors while preventing their terminal differentiation [J]. *Blood*, 1993,82:2045-2053.
- [6] Zandstra PW, Eaves CJ, Piret JM. Expansion of hematopoietic progenitor cell populations in stirred suspension bioreactors of normal human bone marrow cells [J]. *Biotechnology*, 1994,12:909-914.
- [7] Colvin GA, Lambert JF, Carlson JE et al. Rhythmicity of engraftment and altered cell cycle kinetics of cytokine-cultured murine marrow in simulated microgravity compared with static cultures [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2002, 38:343-351.
- [8] Madlambayan GJ, Rogers I, Casper RF et al. Controlling culture dynamics for the expansion of hematopoietic stem cells [J]. *J Hematother Stem Cell Res*, 2001,10:481-492.
- [9] Zandstra PW, Petzer AL, Eaves CJ et al. Cellular determinants affecting the rate of cytokine in cultures of human

- hematopoietic cells [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1997,54:58-66.
- [10] Schwartz RM, Emerson SG, Clarke MF *et al.* In vitro myelopoiesis stimulated by rapid medium exchange and supplementation with hematopoietic growth factors [J]. *Blood*, 1991,78:3155-3161.
- [11] Schwartz RM, Palsson BO, Emerson SG. Rapid medium perfusion rate significantly increases the productivity and longevity of human bone marr [12] Mukhopadhyay A, Madhusudhan T, Kumar R. Hematopoietic stem cells: clinical requirements and developments in ex-vivo culture [J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2004,86:215-253.
- [13] Banu N, Rosenzweig M, Kim H *et al.* Cytokine-augmented culture of haematopoietic progenitor cells in a novel three-dimensional cell growth matrix [J]. *Cytokine* 2001, 13:349-358.
- [14] Bhatia M, Bonnet D, Wu D *et al.* Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells [J]. *J Exp Med* ,1999,189:1139-1148.
- [15] Bhatia M, Bonnet D, Kapp U *et al.* Quantitative analysis reveals expansion of human hematopoietic repopulating cells after short-term ex vivo culture [J]. *J Exp Med*, 1997, 186:619-624.

(上接第 27 页)

- [12] Wang S, Tarbell JM. Effect of fluid flow on smooth muscle cells in a 3-dimensional collagen gel model [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000,20:2220-2225.
- [13] Porter B, Zauel R, Stockman H, *et al.* 3-D computational modeling of media flow through scaffolds in a perfusion bioreactor [J]. *J Biomech*, 2005,38:543-549.
- [14] Reich KM, Frangos JA. Effect of flow on prostaglandin E2 and inositol trisphosphate levels in osteoblasts [J]. *Am J Physiol*, 1991,261:C428-432.
- [15] Raimondi MT, Boschetti F, Falcone L, *et al.* Mechanobiology of engineered cartilage cultured under a quantified fluid-dynamic environment [J]. *Biomech Model Mechanobiol*, 2002,1:69-82.
- [16] Weinbaum S, Cowin SC, Zeng Y. A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses [J]. *J Biomech*, 1994,27:339-360.
- [17] Burg KJ, Delnomdedieu M, Beiler RJ, *et al.* Application of magnetic resonance microscopy to tissue engineering: a polylactide model [J]. *J Biomed Mater Res*, 2002,61: 380-390.

· 信 息 ·

关于本刊更改主管单位与主办单位通知

2008 年 12 月编辑部接到中华人民共和国出版总署通知,本刊自 2009 年 1 月起,主管单位和主办单位分别更改为中华人民共和国教育部和上海交通大学,特此通知。

《医用生物力学》编辑部
2009-02-25