

评估无血清培养子宫内膜间充质干细胞的可行性

康康^{1,2}, 王蔼明^{1,2}, 尹善德², 赵勇², 王明凯², 黄绍敏¹

¹解放军医学院, 北京 100853; ²海军总医院 妇产科, 北京 100048

摘要: **目的** 使用无血清培养基体外分离扩增子宫内膜间充质干细胞, 研究其生物学特性。 **方法** 比较在无血清培养基中和含 10% 胎牛血清培养基中子宫内膜间充质干细胞细胞形态细胞表型、增殖能力、细胞活率和分化能力等生物学特性。 **结果** 无血清培养基和有血清培养基培养的子宫内膜间充质干细胞形态相似, 但是前者呈明显的漩涡状生长, 更加细长, 立体感更强; 无血清和有血清培养的子宫内膜间充质干细胞表面标记物均呈阳性; 无血清培养的子宫内膜间充质干细胞细胞活率更高、细胞增殖能力更强。 **结论** 无血清培养基能够在体外扩增子宫内膜间充质干细胞, 并使其生物学特性(细胞增殖, 细胞活率)优于胎牛血清培养的子宫内膜间充质干细胞, 且分化能力无改变, 可以取代胎牛血清用于细胞治疗, 避免有血清培养的干细胞治疗引起的人畜共患病及免疫原性反应。

关键词: 子宫内膜间充质干细胞; 细胞增殖; 细胞周期; 分化

中图分类号: R 394.26 文献标志码: A 文章编号: 2095-5227(2015)06-0563-05 DOI: 10.3969/j.issn.2095-5227.2015.06.011

网络出版时间: 2015-03-13 15:42 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3275.R.20150313.1542.003.html>

Feasibility of serum-free medium in cultivating endometrium-derived mesenchymal stem cell

KANG Kang^{1,2}, WANG Aiming^{1,2}, YIN Shande², ZHAO Yong², WANG Mingkai², HUANG Shaomin¹

¹Chinese PLA Medical School, Beijing 100853, China; ²Department of Obstetrics & Gynecology, Navy General Hospital, Beijing 100048, China.

Corresponding author: WANG Aiming. Email: one_army@sina.com

Abstract: Objective To dissect and amplify the endometrium-derived mesenchymal stem cells (EnMSCs) in serum-free medium (SFM) in vitro and assess their bionomics. **Methods** Bionomics of EnMSCs in SFM and serum-containing (fetal bovine serum) medium (SCM), such as morphology, phenotype, proliferative activity, cell viability and differentiation capability, were compared. **Results** Similar cell morphology was shown within EnMSCs cultivated both in SFM and SCM, while the EnMSCs cultured in SFM showed obvious swirling growth and stronger three-dimensional effect, which was more slender. Surface markers of EnMSCs cultivated both in SFM and SCM were all positive. Cell viability and cell proliferation were higher in SFM than in SCM. **Conclusion** According to the results of the present study, we can conclude that EnMSCs can be cultivated in SFM with no changes in their differentiating capacity in vitro, and their bionomics (proliferation and cell viability) are better performed than those cultivated in SCM. Therefore, SFM can be used in cell therapy instead of fetal bovine serum. This finding gives us a hope for future cell therapy studies and trials with little concern about zoonotic infections or immunological reaction.

Keywords: endometrium-derived mesenchymal stem cell; cell proliferation; cell cycle; differentiation

子宫内膜组织是一种高度再生的组织, 在女性育龄期经历超过 400 次的生长、分化和脱落^[1]。子宫内膜在每个月经周期内可以增长约 7 mm, 其重塑能力是其他器官不能比拟的^[2]。子宫内膜来源的间充质干细胞是细胞治疗中非常有前景的无创

来源。子宫内膜干细胞 (endometrium-derived stem cells, EnSCs) 首次于 2004 年从子宫内膜组织中分离出来, 包括上皮干细胞、间充质干细胞、侧群细胞、其中间充质干细胞应用最为广泛, 越来越多的证据表明, 子宫内膜间充质干细胞 (endometrium-derived mesenchymal stem cells, EnMSCs) 可以应用于再生医学, 其可以作为免疫调节剂以减轻炎症, 影响组织再生中血管的生成, 也能诱导成为多能干细胞^[3]。目前, 关于 EnMSCs 培养和分离均是应用胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 作为营养来源, FBS 成分尚未明确, 且有含阮病毒的风险, 据文献报道, 市售 FBS 20% ~ 50% 都含有病毒。除此之外, 经 FBS 培养出来的干细胞内含有牛血清蛋白, 可以使受者体内产生抗牛蛋白抗体, 从而引起免疫反应, 进而导致干细胞治疗作用下降甚至失效。

收稿日期: 2014-10-21

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目 (2012BAI32B05); 国家自然科学基金项目 (81000245; 81370703); 全军后勤科研课题 (CHJ 13J012)

Supported by the National Key Technology R&D Program of the Ministry of Science and Technology of People's Republic of China(2012BAI32B05); National Natural Science Foundation of China(81000245; 81370703); Scientific research Program of General Logistics Department of PLA(CHJ 13J012)

作者简介: 康康, 女, 在读硕士, 医师。研究方向: 生殖内分泌与辅助生殖。Email: kangtingting1988@126.com

通信作者: 王蔼明, 女, 博士, 主任医师。Email: one_army@sina.com

因此,发现一种高效的培养基,将干细胞的再生和分化能力保持高效,同时能够最小化疾病的传播风险,势在必行^[4]。目前,无血清培养基已经应用于骨髓间充质干细胞^[5-6]、脐带间充质干细胞^[7-8]和脂肪间充质干细胞^[9-10],但是应用于子宫内膜间充质干细胞至今未见报道。我们用无血清培养基培养 EnMSCs,从形态、增殖、分化以及表面标记物的活率来判断无血清培养基是否可以应用于子宫内膜间充质干细胞的培养。

材料和方法

1 样品来源 子宫内膜标本取自海军总医院 2014 年 1-6 月因子宫肌瘤、CIN III、宫颈癌而行子宫切除术的 10 位患者,均为育龄期女性,年龄 31~50 岁,术前 3 个月未服用过激素类药物。组织均取自远离患处,标本包含 5 mm 肌层的子宫内膜全层,获取子宫内膜组织后,立即用无菌 0.9% 氯化钠注射液冲洗,置入 10 ml 无菌冰冷 IMDM 培养液(含青霉素 100 U/ml、链霉素 100 U/ml)中,1 h 内送京蒙高科干细胞实验室培养^[11]。所有子宫内膜均经病理检查,排除子宫内膜增生症、子宫内膜炎性病变、子宫内膜恶性病变等,且证实为增殖期或分泌期子宫内膜。标本留取经医院伦理委员会批准,征得患者同意并签署知情同意书。

2 试剂与仪器 IMDM 培养基及试剂购于 Gibico 公司, MesenCult-XF 购于 Stem cell 公司, CD13-FITC、CD29-APC、CD44-PE、CD90-FITC、CD14-APC、CD19-APC、CD34-PE、CD45-FITC、CD73-PE、CD105-PercP、CD166-PE、HLA-DR-APC、HLA-ABC-FITC 全部购于 BD 公司。CCK-8 试剂盒购于 Dojindo 公司。

3 细胞的原代培养 样本送至实验室后,在平衡盐溶液中反复洗涤至去除红细胞,将标本剪成 5 mm³ 小块,置于 50 ml 离心管中,加入 5~10 ml 浓度为 0.25% 的胰酶,于 37℃ 水浴箱中消化 30 min,10 mg/ml 胰酶抑制剂中和胰酶活性。以 2 000 r/min 离心 8 min,并用 0.9% 氯化钠注射液清洗两次,加入 5~10 ml 浓度为 0.1% 的胶原酶 I 消化 1 h,以 1 500 r/min 离心 8 min,并清洗两次,置于 37℃,体积分数为 5% CO₂ 饱和湿度培养箱内培养,无血清培养体系 (serum-free medium, SFM) 为化学成分明确的商用无动物源成分的培养基,有血清培养体系 (serum-containing medium, SCM) 含有 10% 的 IMDM。72 h 后更换培养基,之后每周更换 2 次。子宫内膜间充质干细胞于每一代传代前由倒置显微镜进行拍照记录。

4 EnMSCs 流式细胞分析 细胞培养至第 3 代时分别进行免疫表型分析,鉴定所培养的细胞为间充质干细胞。用 0.125% 胰酶 EDTA 钠溶液消化采集细胞,离心,弃去上清,用 PBS 以 1×10⁶ 的密度重悬,分别向预加好抗体 CD13-FITC、CD29-APC、CD44-PE、CD90-FITC、CD14-APC、CD19-APC、CD34-PE、CD45-FITC、CD73-PE、CD105-PercP、CD166-PE、HLA-DR-APC、HLA-ABC-FITC 的 FALCON 管各加 100 μl 细胞悬液, Mouse IgG1-FITC, Mouse IgG1-APC, Mouse IgG1-PE, Mouse IgG1-PercP 做阴性对照。在 3 h 内上机检测。EnMSCs 细胞活率测定用 0.125% 胰酶 EDTA 钠溶液消化采集细胞,1 500 r/min,5 min,离心,弃上清,7-AAD 抗体加 2 μl/test,立即上机检测。

5 EnMSCs 细胞生长曲线测定 将第 3 代细胞分别以 1 000/孔的密度接种到 96 孔板中,重复种植 4 个 96 孔板,分别检测 1~8 d 细胞的增殖,并设置空白对照组,450 nm 条件下检测吸光度值。用酶标仪检测,以时间为横坐标,每组细胞平均吸光度为纵坐标,绘制细胞增殖曲线。

6 EnMSCs 成脂、成骨、成软骨诱导分化 1) 成脂分化取第 3 代细胞,3×10⁴/孔接种于 12 孔板中。待细胞达到 70%~80% 融合时,分别吸去培养基,加入成脂分化培养基,每隔 2~3 d 更换新鲜的成脂分化培养基。分化诱导 3 周后,进行油红 O 油滴染色。成脂分化培养基在含 IMDM 培养基中补充有 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素、12 mmol/L L-谷氨酰胺、10 μmol/L 胰岛素 (Sigma 公司)、200 μmol/L 吡啶美辛 (Sigma 公司)、1 μmol/L 地塞米松和 0.5 mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX, Sigma 公司)。2) 成骨分化取第 3 代细胞,3×10⁴/孔接种于 12 孔板中。待细胞达到 70%~80% 融合时,分别吸去培养基,加入成骨分化培养基,每隔 2~3 d 换液新鲜的成脂分化培养基。分化诱导 3 周后,用茜素红进行油滴染色。成骨分化培养基低糖 IMDM 培养基中补充有 10% 胎牛血清、100 μmol/L 抗坏血酸、10 mmol/L β-甘油磷酸盐和 100 mmol/L 地塞米松 (Sigma 公司)。3) 成软骨分化取第 3 代细胞,将 P3 代细胞按照 5×10⁵/ml 的量加入成软骨分化培养基重悬细胞,吸取 10 μl 滴到 6 孔板上,放置 24 h,24 h 后加入新鲜的诱导分化培养基,分化诱导 3 周后,用阿利信蓝染色。成软骨分化培养基 IMDM 培养基中补充有 10% 胎牛血清、1 μmol/L 地塞米松、2 ml ITS 和 10 ng/ml TGF-β 3 (Sigma 公司)。

7 统计学方法 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理与统计分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异采用双尾 t 检验和方差分析测试进行统计分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 EnMSCs 贴壁细胞的形态及传代 子宫内膜细胞分别用 SFM 和 SCM 接种 24 ~ 72 h 后贴壁, 倒置显微镜下观察呈现梭形; 72 h 后全量换液去除未贴壁的组织 and 细胞, 此时细胞多呈长梭形和纺锤形, 此后贴壁细胞迅速增殖, 细胞集落明显增大、增多。经过传代, 细胞逐渐表现为均一的长梭形。SFM 接种的 EnMSCs 与 SCM 接种的 EnMSCs 相比, 形态相似, 但是前者呈明显的漩涡状生长, 立体感更强。见图 1。

2 EnMSCs 间充质干细胞免疫表型流式细胞仪检测结果显示, CD90、CD73、CD105、CD166、HLA-ABC、CD13、CD29、CD44 均呈阳性表达, CD34、CD45、CD14、HLA-DR、CD19 呈阴性表达。见图 2。

3 EnMSCs 细胞活率 EnMSCs 细胞活率流式细胞仪检测结果表明, SFM 体系培养的 EnMSCs 成活细胞数目为 $94.27\% \pm 2.43\%$ ($n=5$), SCM 体系培养的 EnMSCs 成活细胞数目为 $92.65\% \pm 2.92\%$ ($n=5$)。SFM 体系培养的 EnMSCs 细胞活率较高 ($P < 0.05$)。见图 3。

4 EnMSCs 细胞增殖和倍增时间 细胞贴壁后开始生长, 1 ~ 2 d 生长比较慢, 于 3 ~ 5 d 进入对数期, 6 ~ 8 d 进入平台期, 根据吸光度值绘制的生长曲线呈“S”形, 有明显的滞留期, 对数生长期及平台期。SFM 与 SCM 体系比较, 1 ~ 2 d 吸光度值无统计学差异 ($P > 0.05$), 3 ~ 8 d SFM 的吸光度值明显优于 SCM ($P < 0.05$), 表明经 SFM 培养的 EnMSCs 增殖能力更强, 细胞生长状况更好。见图 4。

5 EnMSCs 成脂、成骨、成软骨诱导分化
1) 成脂分化两种培养基扩增的 EnMSCs 成脂诱导分化 21 d 并经油红 O 染色后, 倒置显微镜下观察到细胞质中充满红色的油滴, 提示细胞已经分化呈脂肪细胞。2) 成

骨分化 EnMSCs 经成骨诱导分化 21 d 后, 运用茜素红进行钙化结节染色, 可见致密生长的细胞中散在出现大小不一的橘红色矿化结节。染色结果显示两种培养基扩增的 EnMSCs 均有成骨分化能力。3) 成软骨分化 EnMSCs 经成软骨诱导分化 21 d 后, 阿利辛蓝染色可见细胞呈亮绿色, 提示两种培养体系培养出的细胞均能有成软骨分化能力。见图 5。

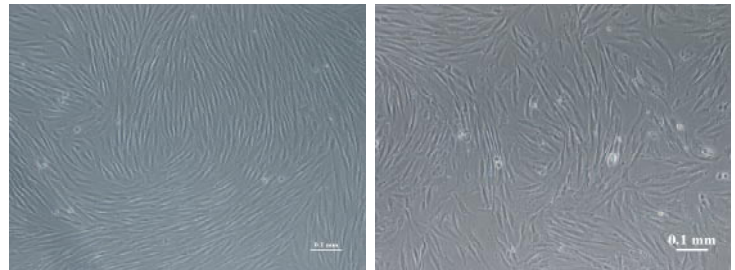


图 1 无血清培养条件下子宫内膜间充质干细胞(左);有血清条件下子宫内膜间充质干细胞(右)($\times 100$)

Fig.1 EnMSCs in SFM (left) and in SCM (right)($\times 100$ magnification)

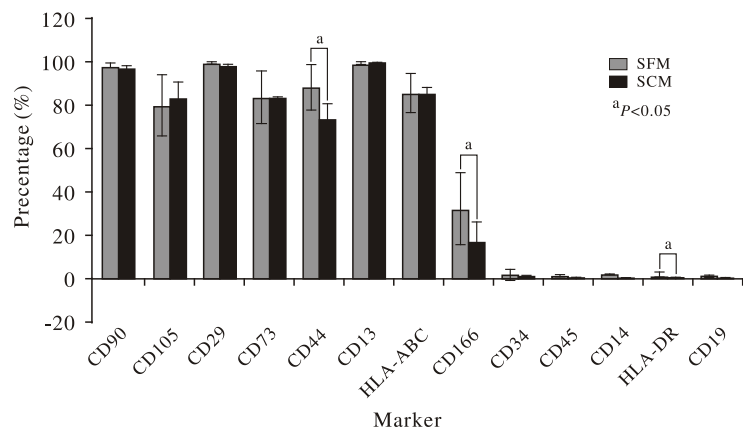


图 2 无血清和有血清子宫内膜间充质干细胞表面标记物表达对比

Fig.2 Expression of cell surface markers of EnMSCs cultivated in SCM and SFM

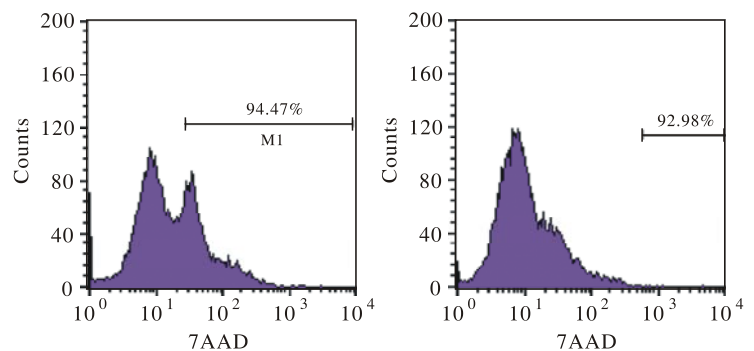


图 3 有血清培养条件下子宫内膜间充质干细胞活率的柱状图(左), 有血清条件下子宫内膜间充质干细胞的柱状图(右)

Fig.3 Histogram of cell viability in cultured EnMSCs in SFM detected by flow cytometry (left), histogram of cell viability in cultured EnMSCs in SCM detected by flow cytometry (right)

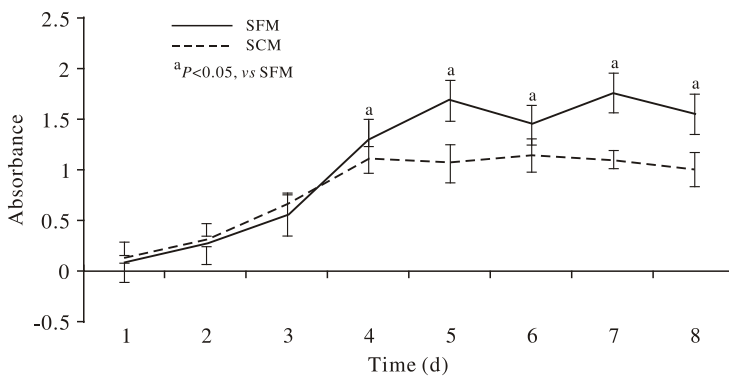


图 4 无血清和有血清条件下子宫内充质干细胞的生长曲线

Fig.4 Growth curve of EnMSCs in SFM and SCM

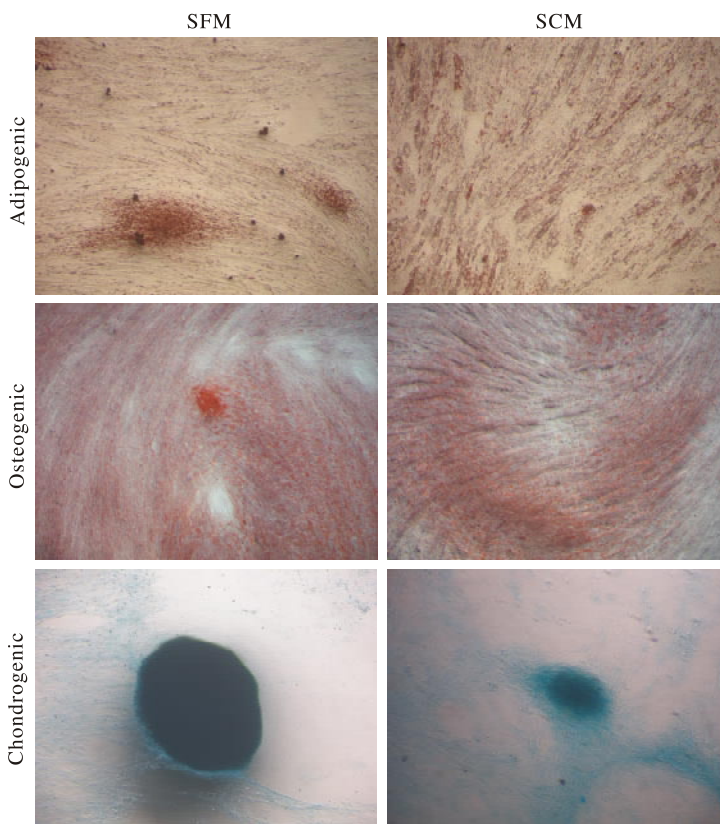


图 5 无血清培养基成脂、成骨、成软骨诱导分化(左),右图为无血清培养基成脂、成骨、成软骨诱导分化(右)($\times 100$)

Fig.5 Adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiations of EnMSCs in SFM (left); Adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiations of EnMSCs in SCM (right)

讨论

EnMSCs 是一个极具吸引力的干细胞再生治疗来源,其主要优势是非侵入性获得,是一种稳定的自体干细胞来源,且其易于扩展。迄今为止,EnMSCs 已经应用于多种临床试验以及一些小动物的研究,将 EnMSCs 移植到肌营养不良小鼠的骨骼肌中,可以观察到其对肌肉有一定的修复作用^[12]; EnMSCs 具有分化成平滑肌细胞的能力,已被尝试应用于膀胱壁的重建^[13]。也有研究将 EnMSCs 和

骨髓间充质干细胞分别移植到心肌梗死鼠模型的心脏内,可以观察到移植 EnMSCs 鼠的心脏梗死面积更小^[14]。

目前,对于 EnMSCs 培养主要用合成细胞培养基,一般会在培养基中加入 5%~10% 的胎牛血清^[15-16],这对培养产物的分离、纯化和检测会带来一定不便,在细胞的使用上也会带来病毒和免疫的隐患。并且血清的成分是未知的,变化是莫测的,已被报道可能影响再生能力^[17]。而无血清培养基组分稳定,性能一致性高,培养细胞科研评估精确,对培养细胞影响小,不含有丝分裂原抑制剂及其他生长抑制物质,可以促进细胞增殖;降低病毒、真菌、支原体等微生物污染的可能性等。然而,我国无血清培养的应用远远落后于国外,无血清培养基的来源主要依赖于国外产品,成本较高,应用也较少,至今未见关于应用无血清培养基培养子宫内充质干细胞的报道。EnMSCs 应用于人体的安全性备受关注。如何安全有效地扩展 EnMSCs 成为了亟需解决的问题。为了使子宫内充质干细胞从基础研究走向临床应用,必须应用无血清培养体系。

本研究中, SFM 培养的 EnMSCs 克隆团细胞排列紧密,形似鸟巢,呈明显漩涡状,表明所培养的细胞具有形成克隆的能力,符合 EnMSCs 的形态特征。从 SFM 和 SCM 培养条件下增殖能力可以看出, SFM 培养条件下的 EnMSCs 在细胞适应期增殖能力稍差于 SCM 体系培养的 EnMSCs,但是在细胞适应后, SFM 体系培养的 EnMSCs 表现出更强的增殖能力。据一些文献报道,低密度的干细胞在 SFM 体系扩增困难,但是当细胞扩增到一定密度,由于干细胞自身能够分泌多种生长因子,可以促进细胞的增殖, EnMSCs 能够快速扩增,且扩增能力优于 SCM。免疫表型是鉴定 MSCs 的一种重要的方法,流式细胞仪检测结果显示, CD90、CD73、CD105、CD166、HLA-ABC、CD13、CD29、CD44 均呈阳性表达, CD34、CD45、CD14、HLA-DR、CD19 呈阴性表达,证明此细胞非造血干细胞来源,均与文献描述一致^[17]。经细胞活率鉴定, SFM 体系培养的 EnMSCs 细胞活率更高,表明经 SFM 培养的干细胞更适用于干细胞的治疗,稳定性更强。

经成脂、成骨、成软骨诱导分化培养, SFM 培养的 EnMSCs 具有良好的成脂、成骨诱导分化能力, 上述特征符合间充质干细胞的鉴定标准^[14]。

综上所述, 本实验证明无血清培养基可以培养出子宫内间充质干细胞, 且分化能力并未受到影响, 无血清培养基子宫内间充质干细胞代替传统的动物血清培养子宫内间充质干细胞是可行的。

参考文献

- 1 Gargett CE, Ye L. Endometrial Reconstruction from stem cells [J]. *Fertil Steril*, 2012, 98 (1): 11-20.
- 2 McLennan CE, Rydell AH. Extent of endometrial shedding during normal menstruation [J]. *Obstet Gynecol*, 1965, 26 (5): 605-621.
- 3 Verdi J, Tan A, Shoaie-Hassani A, et al. Endometrial stem cells in regenerative medicine [J]. *J Biol Eng*, 2014, 8 (1): 1-10.
- 4 Swamynathan P, Venugopal P, Kannan SA, et al. Are serum-free and xeno-free culture conditions ideal for large scale clinical grade expansion of Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells? A comparative study [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2014, 5 (4): 88.
- 5 Gottipamula S, Ashwin KM, Muttigi MS, et al. Isolation, expansion and characterization of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in serum-free conditions [J]. *Cell Tissue Res*, 2014, 356 (1): 123-135.
- 6 Agata H, Watanabe N, Ishii Y, et al. Feasibility and efficacy of bone tissue engineering using human bone marrow stromal cells cultivated in serum-free conditions [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 382 (2): 353-358.
- 7 Julavijitphong S, Wichitiwiengrat S, Tirawanchai N, et al. A xeno-free culture method that enhances Wharton's jelly mesenchymal stromal cell culture efficiency over traditional animal serum supplemented cultures [J]. *Cytotherapy*, 2014, 16 (5): 683-691.
- 8 Roy S, Arora S, Kumari P, et al. A simple and serum-free protocol for cryopreservation of human umbilical cord as source of Wharton's jelly mesenchymal stem cells [J]. *Cryobiology*, 2014, 68 (3): 467-472.
- 9 Ding DC, Chou HL, Hung WT, et al. Human adipose-derived stem cells cultured in keratinocyte serum free medium: Donor's age does not affect the proliferation and differentiation capacities [J]. *J Biomed Sci*, 2013, 20: 59.
- 10 Shih DT, Chen JC, Chen WY, et al. Expansion of adipose tissue mesenchymal stromal progenitors in serum-free medium supplemented with virally inactivated allogeneic human platelet lysate [J]. *Transfusion*, 2011, 51 (4): 770-778.
- 11 Gargett CE, Schwab KE, Zillwood RM, et al. Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium [J]. *Biol Reprod*, 2009, 80 (6): 1136-1145.
- 12 Cui CH, Uyama T, Miyado K, et al. Menstrual blood-derived cells confer human dystrophin expression in the murine model of Duchenne muscular dystrophy via cell fusion and myogenic transdifferentiation [J]. *Mol Biol Cell*, 2007, 18 (5): 1586-1594.
- 13 Shoaie-Hassani A, Sharif S, Seifalian AM, et al. Endometrial stem cell differentiation into smooth muscle cell: a novel approach for bladder tissue engineering in women [J]. *BJU Int*, 2013, 112 (6): 854-863.
- 14 Hida N, Nishiyama N, Miyoshi S, et al. Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesenchymal cells [J]. *Stem Cells*, 2008, 26 (7): 1695-1704.
- 15 Gottipamula S, Muttigi MS, Chaansa S, et al. Large-scale expansion of pre-isolated bone marrow mesenchymal stromal cells in serum-free conditions [J/OL]. <http://onlinelibrary.wiley.com/resolve/doi?DOI=10.1002/term.1713>.
- 16 Chase LG, Yang S, Zachar V, et al. Development and characterization of a clinically compliant xeno-free culture medium in good manufacturing practice for human multipotent mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2012, 1 (10): 750-858.
- 17 Lindroos B, Boucher S, Chase L, et al. Serum-free, xeno-free culture media maintain the proliferation rate and multipotentiality of adipose stem cells in vitro [J]. *Cytotherapy*, 2009, 11 (7): 958-972.