

## 组织块法分离培养小鼠脾脏间充质干细胞

丁 丽<sup>1</sup>, 朱 恒<sup>2</sup>, 张海宏<sup>3</sup>, 杨 洋<sup>1</sup>, 韩冬梅<sup>1</sup>, 王志东<sup>1</sup>, 郑晓丽<sup>1</sup>,  
董 磊<sup>1</sup>, 闫洪敏<sup>1</sup>, 刘 静<sup>1</sup>, 朱 玲<sup>1</sup>, 薛 梅<sup>1</sup>, 郭子宽<sup>4</sup>, 王恒湘<sup>1</sup>

(1. 中国人民解放军空军总医院血液科, 北京 100142; 2. 军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850;  
3. 中国人民解放军空军总医院普外科, 北京 100142; 4. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850)

**【摘要】 目的** 通过组织块培养法, 建立一种高效可靠的小鼠脾脏间充质干细胞分离扩增策略。**方法** 无菌条件下取小鼠脾脏组织充分碾碎, 使用胶原酶消化获得的脾脏基质组织, 将消化后的组织块种于培养瓶中, 观察从组织块中迁移出的细胞形态, 采用流式细胞术分析其表型, 并将其做成骨和成脂肪诱导分化。**结果** 消化后的脾脏组织块中迁移出大量梭形纤维样细胞, 流式细胞术检测结果表明, 该种细胞高表达 CD29、CD44、Sca-1 和 CD105, 低表达 CD11b、CD34、CD45 和 Ia。多向分化实验结果表明: 小鼠脾脏基质组织中迁移出的细胞具有较好的成脂肪和成骨分化能力。**结论** 组织块法可以分离培养出小鼠脾脏间充质干细胞, 所获得的细胞纯度高, 分化能力强, 为开展相关研究提供了良好的细胞模型。

**【关键词】** 组织; 细胞培养; 脾脏; 间充质干细胞

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)10-0056-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.10.011

## Primary culture of murine spleen-derived mesenchymal stem cells by explant culture

DING Li<sup>1</sup>, ZHU Heng<sup>2</sup>, ZHANG Hai-hong<sup>3</sup>, YANG Yang<sup>1</sup>, HAN Dong-mei<sup>1</sup>,  
WANG Zhi-dong<sup>1</sup>, ZHENG Xiao-li<sup>1</sup>, DONG Lei<sup>1</sup>, YAN Hong-min<sup>1</sup>, LIU Jing<sup>1</sup>,  
ZHU Ling<sup>1</sup>, XUE Mei<sup>1</sup>, GUO Zi-kuan<sup>4</sup>, WANG Heng-xiang<sup>1</sup>

(1. Department of Hematology, Air Force General Hospital of Chinese PLA, Beijing, 100142, China;  
2. Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing, 100850;  
3. Department of General Surgery, Air Force General Hospital of Chinese PLA, Beijing, 100142;  
4. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing, 100850)

**【Abstract】 Objective** This study aimed to establish a reliable primary culture protocol for preparing murine spleen-derived mesenchymal stem cells (MSCs) by tissue explant culture. **Methods** Healthy mouse spleens were crushed by syringe handle to harvest spleen mesenchymal tissues. Then the tiny pieces of spleen tissue were digested by collagenase II before seeded into culture flasks. The morphological characteristics of spleen tissue-derived cells were observed under the inverted microscope. Further, the surface antigen profile of the cells was analyzed by flow cytometry (FACS). The cells

**【基金项目】** 国家自然科学基金项目(81500083, 81371945, 81572159, 81101342); 空军总医院院级课题(KZ2014023); 北京市自然科学基金项目(7132133)。

**【作者简介】** 丁丽(1975-), 女, 博士, 研究方向: 干细胞与血液病学。E-mail: dingli7578@163.com。

**【通讯作者】** 王恒湘, 硕士, 主任医师, 从事血液系统疾病的研究与治疗, wanghengxiang123@aliyun.com; 郭子宽, 博士, 研究员, 主要从事转化医学研究 guozk@bmi.ac.cn; 朱恒, 博士, 副研究员, 主要从事干细胞与再生医学研究, E-mail: zhudingdingabc@163.com。

were induced to differentiate into osteoblasts and adipocytes. **Results** The murine spleen-derived MSCs exhibited a spindle-shaped appearance. The FACS results showed that the spleen-derived MSCs highly expressed CD29, CD44, CD105 and Sca-1, but weakly expressed CD11b, CD34, CD45 and Ia. In addition, the spleen-derived MSCs steadily differentiated into osteoblasts and adipocytes in the induction medium. **Conclusions** A method of primary culture of murine spleen-derived MSCs by explant culture is successfully established. The harvested MSCs exhibit high purity and cell proliferation ability, and provide a reliable cell model for related researches.

**【Key words】** Tissue explant; Cell culture; Spleen; Mesenchymal stem cells; Osteoblast differentiation; Adipocyte differentiation; Mice

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)是一种具有多向分化潜能和高度自我更新能力的干细胞<sup>[1,2]</sup>。MSC 最早由 Friedenstein 等<sup>[3]</sup>等在骨髓中发现,随后研究人员陆续在骨、脐带、脂肪等多种组织中分离成功。MSC 在适宜的条件下可以大量扩增,并且分化为成骨细胞、脂肪细胞、内皮细胞、神经细胞等多种组织类型的细胞,是目前组织工程领域最常用的种子细胞之一<sup>[1]</sup>。此外,MSC 还具有造血支持能力,能够调节造血干细胞分化为多种谱系的造血细胞,是造血微环境的重要组成部分<sup>[4]</sup>。更有意义的是,MSC 还能够调节多种免疫细胞如巨噬细胞、树突状细胞、T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞等的发育和功能,有助于维持机体免疫反应和免疫稳态<sup>[5]</sup>。

脾脏是人和动物体内重要的造血器官和免疫器官<sup>[6]</sup>。在人和动物的胚胎发育早期,脾脏有造血的功能。出生后脾的造血功能基本消失,但在极端条件下,如机体出现严重造血障碍时,脾脏也可重新出现造血功能。此外,某些啮齿类动物如小鼠的脾脏可以终身造血<sup>[6]</sup>。脾脏还是重要的免疫器官。脾脏内含有大量的 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、巨噬细胞和树突状细胞(dendritic cells, DCs)等免疫细胞,是机体细胞免疫和体液免疫的中心。其中的树突状细胞能够摄取机体内的肿瘤抗原或者外源入侵的抗原,加工递呈给相应的 T 细胞,促进相关的 T 细胞亚群增殖分化,并启动 B 细胞为主的体液免疫,实现肿瘤清除和病原清除<sup>[7]</sup>。

值得关注的是,脾脏内造血细胞和免疫细胞的发育分化过程受到脾脏微环境的调控<sup>[8,9]</sup>。MSC 及由 MSC 分化而来的成纤维细胞和内皮细胞等不仅为造血细胞和免疫细胞发育分化提供空间结构,而且表达多种调节因子(如细胞因子、膜微粒和一氧化氮等)和细胞间粘附分子,共同构成脾脏微环境,从而发挥调节作用。因此,分离获得脾脏 MSC,深入开展功能研究,对于了解脾脏基质微环境尤为重

要。然而,多年以来有关脾脏 MSC 分离培养的策略一直报道不多<sup>[10]</sup>。鉴于此,我们在参阅大量文献的基础上,探索了胶原酶消化联合组织块培养法,以期建立出稳定、重复性好、细胞纯度高的脾脏 MSC 分离策略,从而为开展脾脏相关的造血和免疫学相关研究奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

健康 C57BL/6 和 BALB/c 小鼠,6~8 周龄,雌雄不限,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号[SCXK(京)2012-0001]。

### 1.2 仪器与试剂

干细胞培养用胎牛血清、 $\alpha$ -MEM 培养基、高糖 DMEM 培养基和磷酸盐缓冲液(PBS)购自美国 Gibco 公司; $\beta$ -磷酸甘油、磷酸化维生素 C、地塞米松、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)、胰岛素、油红 O 染液、II 型胶原酶、胰酶、碱性磷酸酶试剂盒购自美国 Sigma 公司;MSC 流式表型检测用抗体:PE-anti-mouse CD11b、PE-anti-mouse CD29、FITC-anti-mouse CD34、PE-anti-mouse CD44、FITC-anti-mouse CD45、PE-anti-mouse CD105、PE-anti-mouse Ly-6A/E(Sca-1)、PE-anti-mouse Ia 购自美国 Ebioscience 公司;细胞培养板和培养瓶购自美国康宁公司;流式细胞仪购自美国 Becton Dickinson 公司;细胞培养箱购自英国 Thermo 公司;倒置显微镜购自日本 Olympus 公司。

### 1.3 细胞培养

无菌条件下,打开小鼠腹腔取脾脏,在超净台内以注射器柄将其在培养皿中充分碾碎,以 PBS 冲去细胞成分,将获得的基质组织加入 0.1% 的 II 型胶原酶液中,37℃ 条件下以消化 1 h,弃消化液,将消化后的脾脏基质组织种入含有 10% 血清的  $\alpha$ -MEM 中,3 d 换液,待 MSC 爬满培养瓶后,以胰酶消化,收 MSC 分别种入贴附培养瓶和低吸附培养皿

中,在倒置显微镜下观察形态,拍照。每隔 2~3 d 传代,收取第 3~6 代细胞用于实验。

#### 1.4 流式细胞分析

参照我们前期发表的方法采用流式细胞术分析小鼠脾脏 MSC 的免疫表型<sup>[11,12]</sup>。简言之,以胰酶消化收获第 4 代细胞,制备为单细胞悬液,调整细胞数为  $1 \times 10^6$  细胞/管。按照说明书要求,分别加入抗小鼠 CD11b, CD29, CD34, CD44, CD45, CD105 和 Sca-1 和 Ia 抗体。4℃ 避光孵育 30 min。洗涤未结合的抗体后,采用美国 Becton Dickinson 流式细胞仪上机,实验数据采用 WinMDI 2.9 软件分析。

#### 1.5 细胞分化潜能的鉴定

成骨和成脂肪诱导分化实验参照以往发表的方法进行<sup>[11,12]</sup>。简言之,成骨分化以及染色取第 4 代小鼠脾脏 MSC,按照  $5 \times 10^4$  细胞/ $\text{cm}^2$  的细胞密度种于 24 孔培养板中,诱导体系为高糖 DMEM、10% 胎牛血清,维生素 C 磷酸盐 ( $50 \mu\text{mol/L}$ ),  $\beta$  磷酸甘油 ( $10 \text{ mmol/L}$ ) 和地塞米松 ( $10^{-7} \text{ mol/L}$ )。7 d 后根据试剂盒说明书要求进行碱性磷酸酶染色。成脂肪分化以及染色收获第 4 代小鼠脾脏 MSC,按照  $3 \times 10^4$  细胞/ $\text{cm}^2$  的细胞密度种于 24 孔培养板内,诱导体系为高糖 DMEM, IBMX ( $0.5 \mu\text{mol/L}$ ), 10% 胎牛血清,胰岛素 ( $10 \text{ ng/mL}$ ) 和地塞米松 ( $10^{-6} \text{ mol/L}$ )。成脂肪诱导的第 7 天,染油红 O 判断分化效率。染色结果显微镜下观察,照相。

## 2 结果

### 2.1 组织块法分离获得的小鼠脾脏 MSC 具有经典的形态特征

无菌条件下,分离小鼠脾脏,碾碎后得到脾脏基质组织(图 1A),以胶原酶消化为小组织块(图 1B)。

将胶原酶消化后的脾脏基质组织在培养基中静置培养 3~5 d 左右,即可在倒置显微镜下观察到有细胞从组织块中爬出(图 2A)。这些细胞为梭形贴壁生长,经过传递培养后,生长迅速,并可呈漩涡状或者纺锤状密集生长,符合经典的 MSC 形态和生长特点(图 2B)。

### 2.2 组织块法分离获得的小鼠脾脏 MSC 具有经典的细胞免疫表型

为了判断组织块法分离获得的小鼠脾脏 MSC 的细胞纯度,我们进一步检测了其免疫表型。流式

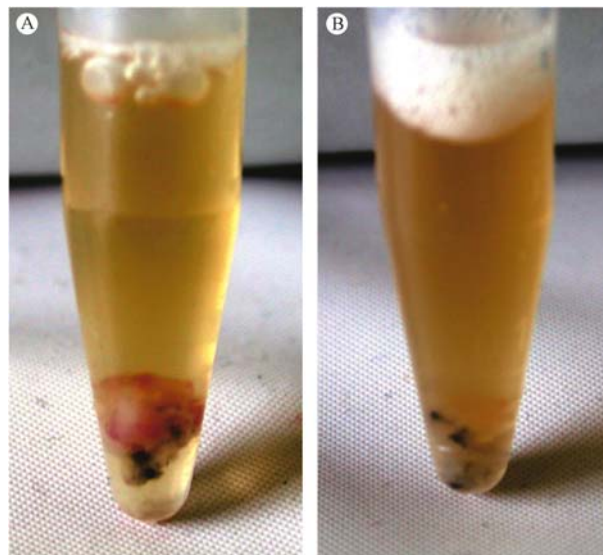
细胞术的检测结果表明,我们分离获得的小鼠 MSC 高表达间质标记 CD29, CD44, 高表达干细胞标记 Sca-1 和 CD105, 低表达造血标记 CD11b 和 CD45, 低表达造血干细胞标记 CD34, 低表达免疫共刺激分子 Ia(图 3)。该结果表明我们获得的是一群间质来源的非造血干细胞,且具有较低的免疫原性,符合经典的 MSC 免疫表型特征。

### 2.3 组织块法分离获得的小鼠脾脏 MSC 具有多谱系分化潜能

为观察小鼠脾脏 MSC 的多向分化潜能,我们分别进行了成骨和成脂肪诱导分化实验。碱性磷酸酶是 MSC 成骨分化过程中的重要指标。如图 4A 所示,在成骨诱导体系中培养的小鼠脾脏 MSC 碱性磷酸酶染色阳性,提示该种类的 MSC 具有成骨分化潜能。油红 O 具有较好的脂肪结合能力。小鼠脾脏 MSC 成脂肪诱导 7 d 后,即可见细胞中逐渐出现大量脂肪滴,加入油红 O 染色液之后,可观察到脂肪滴被染为红色,该结果表明小鼠脾脏 MSC 具有良好的成脂肪分化能力(图 4B)。

## 3 讨论

脾脏微环境是调节机体免疫功能、胚胎造血和出生后病理性造血的重要生理结构。但是脾脏微环境研究一直缺乏与体内环境相对应的细胞工具。



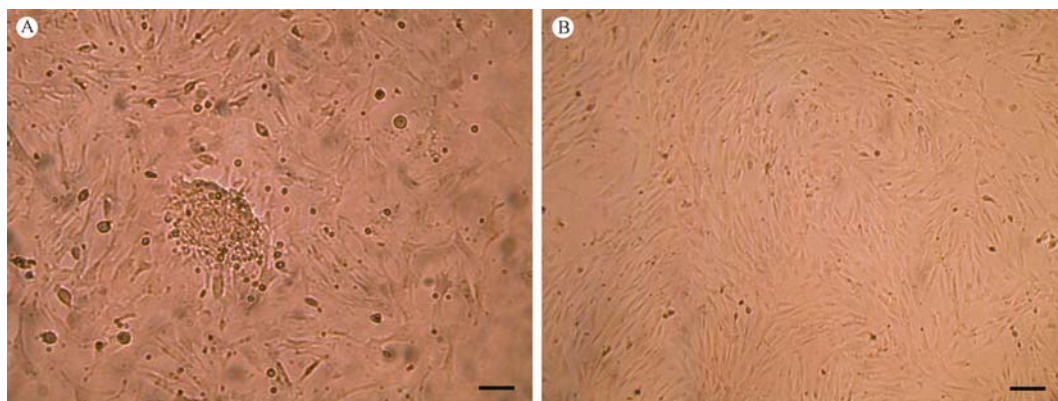
A 为未消化的脾脏基质组织,  
B 为胶原酶消化后的脾脏基质组织

图 1 分离消化脾脏基质组织

(A) Undigested spleen mesenchymal tissues;

(B) Collagenase-digested spleen mesenchymal tissues

Fig. 1 Isolation and digestion of spleen mesenchymal tissues



(A) 间充质干细胞从脾脏基质组织块中爬出; (B) 为增殖良好的脾脏间充质干细胞

图 2 原代培养脾脏间充质干细胞(标尺 = 200  $\mu\text{m}$ )

(A) Mesenchymal stem cells migrate from a spleen tissue explant. (B) Highly proliferative spleen mesenchymal stem cells

Fig. 2 Primary culture of spleen mesenchymal stem cells

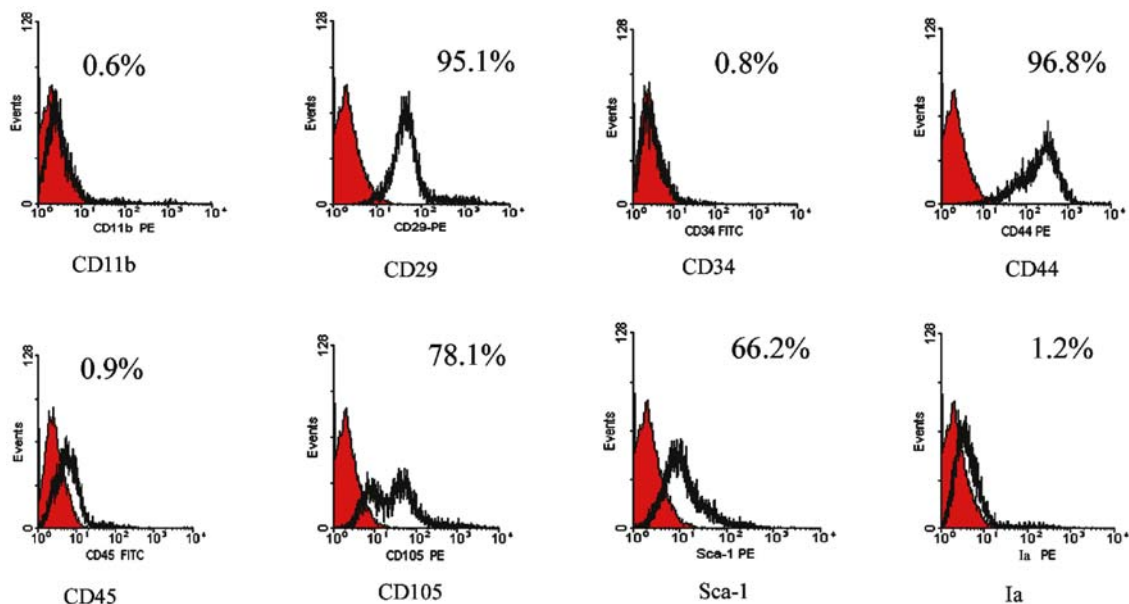
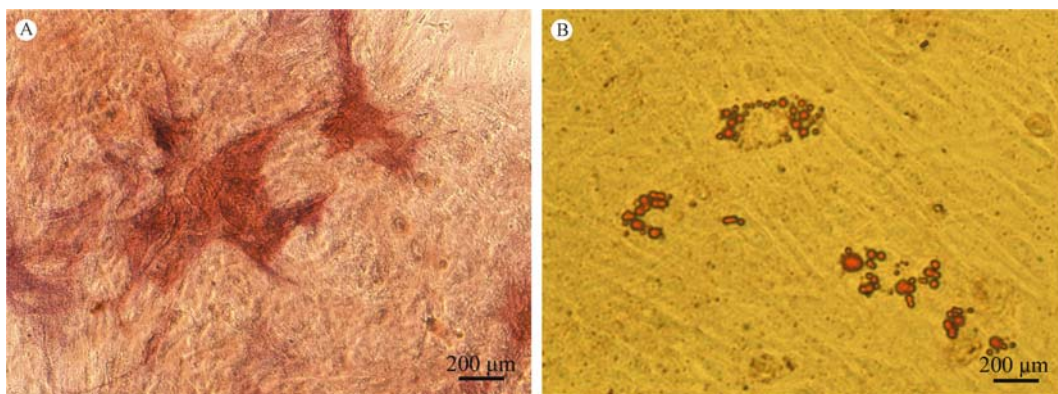


图 3 脾脏间充质干细胞的流式免疫表型

Fig. 3 Immunophenotypes of the spleen mesenchymal stem cells detected by flow cytometry



(A) 脾脏间充质干细胞成骨分化后碱性磷酸酶染色, (B) 为脾脏间充质干细胞成脂肪分化后油红 O 染色

图 4 脾脏间充质干细胞多向分化(标尺 = 200  $\mu\text{m}$ )

(A) Osteoblast differentiation of the spleen mesenchymal stem cells. ALP staining; (B) Adipocyte differentiation of the spleen mesenchymal stem cells. Oil-red O staining.

Fig. 4 Multi-directional differentiation of the spleen mesenchymal stem cells

相关领域研究人员采用脾脏基质细胞成份来模拟脾脏微环境,研究其对造血系统和免疫系统的调控作用,取得了较好的发现。Zhang 及其同事从小鼠脾脏中分离获得 CD106 阳性的内皮样脾脏基质细胞(ESSCs)来观察其对 DC 发育的影响<sup>[13]</sup>。相关研究结果表明 ESSCs 能够促进 CD11c<sup>high</sup>Ia<sup>high</sup> 成熟 DC 增殖并继续分化为有免疫负调控能力的调节性 DC,从而打破了成熟 DC 是终末分化细胞的定论。而 Tang 等的进一步研究表明脾脏基质细胞促进 CD34<sup>+</sup> 的造血干细胞分化为调节性 DC<sup>[14]</sup>。

值得关注的是,目前对于脾脏微环境的研究侧重于终末分化细胞(主要是基质细胞和内皮细胞等),而对处于发育源头的干细胞对脾脏微环境的影响国内外文献却报道不多。实际上,MSC 是脾脏微环境的重要参与者。首先,MSC 是脾脏微环境内多种支持细胞的起源细胞,研究 MSC 生物学特性的改变有助于从“源头”发现规律解决问题;其次,MSC 能够不断自我自我复制,即自我更新,能够为脾脏微环境提供源源不断的“种子”。基于此,我们开展了脾脏 MSC 相关的研究。

目前关于小鼠脾脏 MSC 的报道却不多。为了建立一种可靠的研究工具,我们在本研究中尝试采用组织块联合胶原酶消化法分离获得了小鼠脾脏 MSC。从细胞形态上看,我们获得的细胞具有成纤维样贴壁生长的特点。从细胞免疫表型方面看,该细胞表达经典 MSC 表面分子。然而,细胞形态和细胞免疫表型并不足以判断一种细胞是 MSC,成纤维细胞也具有同样的特点<sup>[15]</sup>。只有多向分化实验是判断 MSC 的“金标准”<sup>[16]</sup>,我们的结果表明该细胞同时具有成骨和成脂肪分化能力,从而确定了其是脾脏来源的 MSC。当然,有关该脾脏 MSC 的生理和病理特性仍有待于进一步深入研究。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2008; 8(9): 726 – 736.
- [ 2 ] Ding L, Zhu H, Yang Y, et al. Functional mesenchymal stem cells remain present in bone marrow microenvironment of patients with leukemia post-allogeneic hematopoietic stem cell transplant [J]. *Leuk Lymphoma*, 2014; 55(7): 1635 – 1644.
- [ 3 ] Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, et al. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo [J]. *Transplantation*, 1974, 17(4): 331 – 340.
- [ 4 ] Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche [J]. *Nature*, 2010, 466(7308): 829 – 834.
- [ 5 ] Wang Y, Chen X, Cao W, et al. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications [J]. *Nat Immunol*. 2014, 15(11): 1009 – 1016.
- [ 6 ] Chiu SC, Liu HH, Chen CL, et al. Extramedullary hematopoiesis (EMH) in laboratory animals: offering an insight into stem cell research [J]. *Cell Transplant*, 2015, 24(3): 349 – 366.
- [ 7 ] McGaha TL, Karlsson MC. Apoptotic cell responses in the splenic marginal zone: a paradigm for immunologic reactions to apoptotic antigens with implications for autoimmunity [J]. *Immunol Rev*, 2016, 269(1): 26 – 43.
- [ 8 ] Tan JK, O'Neill HC. Concise review: Dendritic cell development in the context of the spleen microenvironment [J]. *Stem Cells*, 2007, 25(9): 2139 – 2145.
- [ 9 ] Kiel MJ, Morrison SJ. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells [J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(4): 290 – 301.
- [ 10 ] da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organ and tissues [J]. *J Cell Sci*, 2006, 119(Pt11): 2204 – 2213.
- [ 11 ] Zhu H, Guo ZK, Jiang XX, et al. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone [J]. *Nat Protoc*, 2010, 5(3): 550 – 560.
- [ 12 ] Guo ZK, Li H, Li XS, et al. In vitro characteristics and in vivo immunosuppressive activity of compact bone-derived murine mesenchymal progenitor cells [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(4): 992 – 1000.
- [ 13 ] Zhang M, Tang H, Guo Z, et al. Splenic stroma drives mature dendritic cells to differentiate into regulatory dendritic cells [J]. *Nat Immunol*, 2004, 5(11): 1124 – 1133.
- [ 14 ] Tang H, Guo Z, Zhang M, et al. Endothelial stroma programs hematopoietic stem cells to differentiate into regulatory dendritic cells through IL – 10 [J]. *Blood*, 2006, 108(4): 1189 – 1197.
- [ 15 ] Wagner W, Wein F, Seckinger A, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood [J]. *Exp Hematol*, 2005, 33(11): 1402 – 1416.
- [ 16 ] 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.

[ 修回日期 ] 2016 – 06 – 06