

分离及培养脐带来源间充质干细胞

实验步骤

CORNING

前言

间充质干细胞 (Mesenchymal stem cell, MSC) 来源于发育早期的中胚层, 具有多向分化潜能、造血支持和促进干细胞植入、免疫调控和自我复制等特点, 在生物医学领域引起越来越多的关注。MSC 可以从骨髓、脂肪组织、滑膜、皮肤、牙髓以及胎儿附属物如胎盘、脐带血和脐带中分离获得¹⁻³。尽管骨髓是最广泛使用的骨髓间充质干细胞的来源, 但是骨髓穿刺的侵袭性再伦理上限制了其应用方向的可行性, 并且骨髓间充质干细胞的增殖分化能力普遍随着供体年龄增加而下降。脐带是优质的MSC的来源组织, 脐带来源的MSC具有增殖能力、分化能力强等优点, 并且其取材不涉及伦理问题, 具有广泛的应用前景⁴⁻⁵。

康宁MSC Xeno-Free SFM间充质干细胞无血清培养基化学成分明确, 不包含血清及其他任何人源以外成分, 使用方便, 无需额外添加物, 可支持不同来源 (骨髓/脂肪/脐带来源) 间充质干细胞多次传代培养。

材料

脐带组织

- ▶ Corning® MSC Xeno-Free SFM间充质干细胞无血清培养基 (Corning, Cat. No. 88-600-CV)
- ▶ Corning® CellBIND® 75cm² 细胞培养瓶 (Corning, Cat. No. 3290)
- ▶ 10 cm细胞培养皿 (Corning, Cat. No. 430293)
- ▶ TrypLE™ Select Enzyme (ThermoFisher, Cat. No. 12563029)
- ▶ 磷酸盐缓冲液PBS (Corning, Cat. No. 21-040-CV)

实验步骤

脐带来源MSC的分离和培养

1. 在生物安全柜中, 将脐带从50 mL离心管中取出转移至10 cm细胞培养皿中, 用无菌手术剪将脐带尽可能剪碎, 脐带碎片以不超过1 mm大小为佳。

注: 脐带来源MSC的分离和培养整个过程严格保持无菌状态, 否则可能因污染导致MSC细胞分离培养失败。

2. 用无菌PBS漂洗脐带组织块2次, 1,000 x g离心5分钟, 弃上清。
3. 用10 mL康宁间充质干细胞无血清培养基重悬脐带碎片, 随后将悬液转移至CellBIND® 75cm² 细胞培养瓶 (T75) 中, 置于37°C, 5%CO₂环境中培养。

注: 康宁间充质干细胞无血清培养基使用时无需对培养表面进行包被处理, 但我们推荐使用CellBIND® 表面进行培养, 可以使MSC更好地贴壁。可选择添加5% human platelet lysate (HPL) 可明显加速MSC细胞爬出与生长。

4. 培养最初7天无需更换培养基, 培养至第7天时, 显微镜下可观察到脐带碎片周围出现贴壁单细胞, 将培养基更换为新鲜培养基。
5. 继续培养至第12天时, 显微镜下观察在脐带碎片组织周围出现MSC, 更换一半培养基为新鲜培养基。
6. 培养至第15天左右, MSC细胞融合度至约90%-100%, MSC细胞可进行收获或进行传代。
7. 传代后的MSC细胞可直接用Corning MSC SFM 培养扩增, 无需加任何 HPL 或 血清替代物。

MSC的收获、传代和鉴定

8. 预热PBS, TrypLE™ Select Enzyme至室温。
9. 用PBS漂洗细胞表面2次, 弃去PBS, 加入TrypLE™ Select Enzyme 37°C孵育2-3 min。



- 当细胞开始变圆并从培养瓶底部脱离，用移液管轻柔吹打成的单细胞悬液。
- 加入间充质干细胞无血清培养基，转移至新的培养瓶，置于37℃，5%CO₂环境中继续培养，每周更换2次新鲜培养基。
- MSC的鉴定可通过流式细胞术进行，检定标准为：CD29、CD44、CD73、CD90、CD105、CD166等表达阳性（95%以上）；CD14、CD31、CD34、CD45等表达阴性（2%以内）。



图1. 脐带组织碎片（左图）接种在T75 CellBIND细胞培养瓶中（右图）

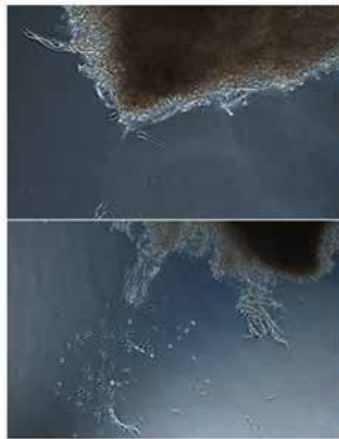


图2. 培养第7天是脐带周围出现的贴壁的单细胞

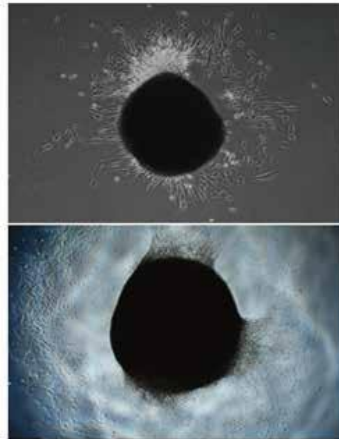


图3. 培养第12天时脐带周围出现MSC

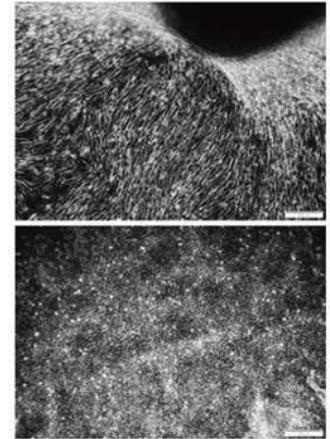


图4. 脐带来源的MSC生长至较高融合度

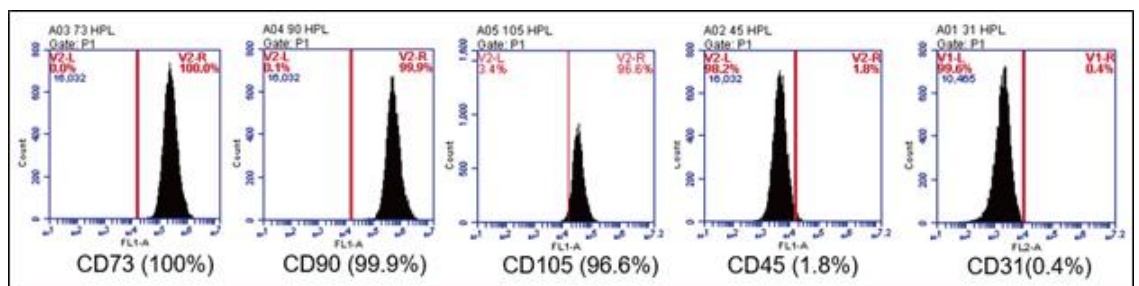


图5. 脐带来源MSC表面蛋白标志物鉴定。CD73、CD90和CD105阳性，CD31和CD45阴性。

参考文献

- Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I., Frolova, G. P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 6 (2), 230-247 (1968).
- Caplan, A. I. Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*. 9 (5), 641-650 (1991).
- Crisan, M., et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 3 (3), 301-313 (2008).
- Baksh, D., Yao, R., Tuan, R. S. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells*. 25 (6), 1384-1392 (2007).
- Manochantr, S., et al. Immunosuppressive properties of mesenchymal stromal cells derived from amnion, placenta, Wharton's jelly and umbilical cord. *Internal Medicine Journal*. 43 (4), 430-439 (2013).

