· 基础研究 ·

不同年龄人群骨髓间充质干细胞的生长变化

王宇玫 张浩 李君 朱沈军 张津津 殷亚昕

【摘要】 目的 不同发育阶段的骨髓间充质干细胞性质会发生一些变化，对干细胞移植治疗产生影响，本研究试图分析不同年龄段人骨髓间充质干细胞的生长和增生情况，探讨年龄对于骨髓间充质干细胞的影响。方法 采集61例不同年龄人的骨髓，分为少年组、中青年组和老年组，分离间充质干细胞，进行体外培养，观察其形态变化，对比分析其首次传代和每次传代时间、细胞克隆形成数量、细胞增长曲线的变化情况。结果 体外培养的干细胞在形态上无年龄差异，均成梭形纤维状，早期呈克隆状生长。细胞的首次传代时间从少年到老年分别为：(12.3±5.1)d，(13.6±5.8)d和(16.7±7.2)d，呈逐渐增加的趋势，老年组明显长于另外两组；3组的体外培养倍增时间无明显差别，细胞克隆数量从少年组到老年组分别为：(32.3±3.1)，(26.4±4.8)，(18.8±5.0)个，老年组明显减少，老年组干细胞的增殖曲线也低于另外两组。结论 人骨髓间充质干细胞的生长增生能力随着增龄逐渐减退，在老年组呈现出较明显的变化。

【关键词】 间质干细胞；年龄因素；细胞，培养的

Changes in the growth and proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells in people of different ages

*WANG Yumei**, *ZHANG Hao*, *LI Jun*, *et al*

* *Department of Emergency, the First Affiliated Hospital, the Chinese PLA General Hospital, Beijing* 100037, *China*

【Abstract】 Objective To analyze the growth and proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSC) in people of different ages and to explore the effect of age on BMSC. Methods BMSCs were isolated from 61 persons of different ages, who were divided into 3 groups: teenage, middle age, and old age. The cells were cultured *in vitro* and different measures were carried out to observe their proliferation. Results There were no visual differences in the shape and size of the first generation between the 3 groups, but the BMSC of old people showed a little faster loss of spindle-formed features over cultivation and needed longer time to reach the first confluence than other 2 groups. The average time of reaching first confluence in teenage, middle age and old age groups was (12.3±5.1)d, (13.6±5.8)d and (16.7±7.2)d, respectively. Doubling time during the following passages revealed no difference. Total CFU numbers of BMSC decreased with aging: 32.3±3.1, 26.4±4.8 and 18.8±5.0, and proliferation curve of BMSC was lower in old people group than in the other 2 groups. Conclusion Human BMSC experiences a gradual decrease in proliferation and replication ability with aging, which is more obvious in old people.

【Key words】 mesenchymal stem cells; age factor; cells, cultured

近年研究发现，骨髓间充质干细胞可以分化为骨骼、脂肪、软骨、肌腱以及内皮、心肌和神经细胞等[1,2]。这些细胞在生理状态下维持着组织的代谢与修复过程。充分利用和发挥干细胞的潜力，治疗目前一些难以治疗的疾病如晚期心力衰竭，严重的中枢神经系统疾病，是许多疾病临床治疗领域的新

收稿日期：2006-12-25

作者单位：100037 北京市，解放军总医院第一附属医院急救部(王宇玫、张津津、殷亚昕)；北京市阜外心血管病医院再生医学研究室(张浩、李君、朱沈军)

作者简介：王宇玫，女，1964年11月生，浙江镇海人，医学博士，副主任医师，科副主任。E-mail：rose3042002@yahoo.com.cn

万方数据

思路。由于神经系统、循环系统疾病患者多为老年人，而衰老机体的干细胞可能存在某些变化，最终会对干细胞移植的效果产生影响，因此研究增龄过程中干细胞生物学行为特别是功能相关的改变十分必要。本研究拟从体外增殖的角度对不同年龄段人骨髓间充质干细胞（bone mesenchymal stem cell，BMSC）进行分析，探讨增龄对于成人骨髓间充质干细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 骨髓来源及分组 骨髓来源于外伤后手术患者，分3组：少年组（＜18岁）18例，平均年龄（12.3±3.5）岁；中青年组20例，19～59岁，平均年龄（42.6±9.3）岁；老年组23例，＞60岁，平均年龄（69.4±6.7）岁。本研究经过医院伦理委员会讨论，并签署知情同意书。

1.2 BMSC的分离与培养 取髂骨骨髓液约10ml，注入等容积PBS溶液中，混匀后按1∶1比例小心地叠加到新鲜配制的Percoll分离液（Pharmacia公司，比重1.073kg/L）上。以450g 4℃离心30min，取单个核细胞层，PBS洗涤2次后，用含10%胎牛血清的DMEM培养液（Gibco BRL公司），再次悬浮后置于细胞培养瓶中，放入37℃，5%CO_2饱和度的CO_2孵箱中培养，定为第1代。以后每3d细胞换液1次，待贴壁细胞达到80%～90%融合后，用0.25%胰酶室温下消化，以1∶3的比例传代。培养过程中记录第1次和每次传代的间隔时间，记录第2代每份细胞的克隆形成（colony forming unit fibroblasts，CFU-F）数量，以及细胞形态的变化。

1.3 BMSC的细胞标志检测 采用第2代或第3代细胞，胰酶室温下消化，制成1×10^9/L的细胞悬液。分别加入荧光标记小鼠抗人单克隆抗体CD29-PE、CD44-FITC、CD45-FITC、CD34-PE、和同型阴性对照小鼠抗小鼠IgG1-FITC，IgG1-PE（所有抗体均为BD公司产品），室温下反应20 min，流式细胞仪检测，CellQuest软件分析。

1.4 细胞增殖曲线 用MTT法测定细胞活性。本研究采用第三代细胞，以10^3/孔的密度种植在96孔板上，次日用无血清培养液孵育1d，使细胞同步化，以后每孔100μl培养液，每2d换液1次。在培养的第2，4，6，8，10天分别每孔加入5g/L MTT 20μl，4h后去除培养孔内液体，加入DMSO 100μl，充分振荡后570nm酶标仪上读取吸光度（A），以A值变化代表细胞增殖的情况。每组处理设5个平行对照。

1.5 统计学分析 本文数据以$\bar{x}\pm s$的方法表示，计数资料用SPSS 10.0软件进行分析，以$P<0.05$作为判定显著性差异的标准。

2 结 果

2.1 细胞生长情况 分离的BMSC，最早在第3天即可见贴壁细胞，最初呈圆球形，逐渐伸展成长梭形纤维状，针状触角。一些细胞贴壁和出现梭状细胞时间较晚，可达2周，如超过3周未见细胞，则判定此BMSC无体外生长，此种情况在老年组出现3例。在随后的培养中出现大量成纤维样梭形细胞（即BMSC），呈旋涡状或平行生长，一些圆形细胞散布于梭形细胞之间，折光性较强，可见细胞分裂现象。一般细胞4～7d后即可出现显著的增长，数量明显增多，10～17d即可传第二代，最迟可达28d。以后平均5～7d可传代一次，原代和传代BMSC形态比较无明显变化，但是随着体外培养时间的延长，最初比较均一的针状和梭状细胞部分会逐渐变得扁平，小圆细胞比例逐渐减少，细胞变大，胞浆的折光性逐渐减低，倍增和传代的时间也略有延长。这种趋势在3组细胞中不同程度存在，老年组稍明显。老年人BMSC胞首次传代的时间为（16.7±7.2）d，少年组（12.3±5.1）d，中青年组（13.6±5.8）d，老年组较少年组和中青年组略延长，但是差别未达到统计学意义（$P=0.064$；表1）。

2.2 细胞克隆的形成 当细胞以较低的密度种植时，单个的MSC细胞可以形成CFU-F，其大小和数量反映了MSC的增殖能力。本研究比较了不同组CFU-F的形成数量，少年组（32.3±3.1）个，中年组（26.4±4.8）个，老年组（18.8±5.0）个，少年组明显多于中青年组和老年组（$P<0.05$），中青年组也高于老年组（$P<0.01$；表1）。不同年龄组细胞CFU-F生长状态见图1。

2.3 细胞表面标记特征比较 用第2代的BMSC测定。图2结果显示BMSC均一性表达CD29、CD44，阳性率均在95%以上，而CD34、CD45表达为阴性。由此确定培养的细胞为BMSC[2]。

万方数据

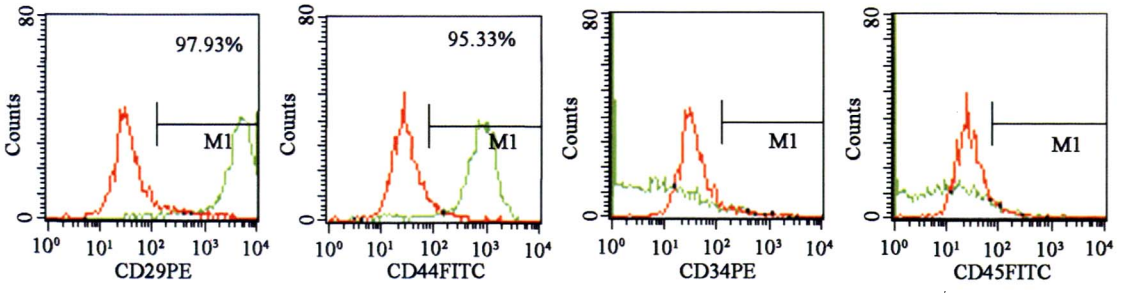
表1 各组骨髓干细胞的增殖参数比较

组别	年龄(岁)	首次传代时间(d)	2～6代传代时间(d)	第2代克隆形成数量(CFU-F)
少年组(n=18)	12.3±3.5	12.3±5.1	5.2±2.1	32.3±3.1
中青年组(n=20)	42.6±9.3#	13.6±5.8	6.1±2.4	26.4±4.8*
老年组(n=23)	69.4±6.7#△	16.7±7.2	6.2±4.0	18.8±5.0#△

注：与少年组比较，*P<0.05，#P<0.01；与青年组比较，△P<0.01

A：少年组；B：中年组；C：老年组。BMSC生长集落在少年组、中年组、老年组呈逐渐缩小，且密度减低

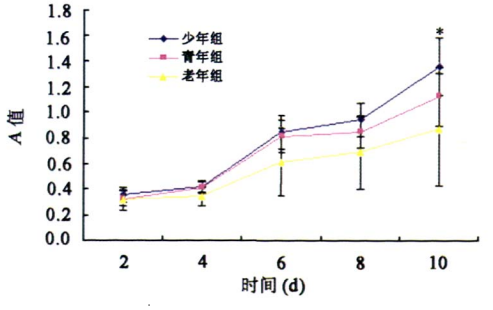
图1 不同年龄组细胞的克隆生长状态(R-G染色，×10)



红线为同型对照，绿线为标记的相应抗体

图2 BMSC的表面标记物检测

2.4 细胞增殖曲线 比较不同组BSMC的生长曲线，以MTT掺入细胞后的A值代表细胞的增殖程度。结果显示少年组和中青年组的增殖速度较老年组快。而少年组又略快于中青年组，3组的数据呈逐渐减低的趋势。但是前二者之间的差异尚未达到统计学意义。少年组的增殖速度显著高于老年组，二者差异具有统计学意义(P<0.05；图3)。



MTT的掺入随着年龄的增加呈逐渐减低，反映出细胞的生长能力逐渐降低。与老年组比较*P < 0.05

图3 不同组间BMSC的生长状况比较

3 讨 论

骨髓来源的间充质干细胞取材方便，可在体外培养、扩增，具有多项分化潜能，是细胞修复和替代治疗、特别是自体移植治疗理想的候选细胞。由于

万方数据

心血管系统疾病患者多为中老年人，因此研究衰老对于干细胞功能产生的影响能够在其应用中提供指导。

本研究结果显示，老年人的BMSC体外培养的首次传代时间从少年组、中青年组到老年组呈逐渐延长趋势，老年组延长更加明显，这一结果与国外的一些研究结果相似[2,3]。体外的首次传代需要的时间反映出细胞离开在体生长环境到体外生长，细胞本身逐渐对环境的适应过程，而这一时间的延长提示老年机体的干细胞需要更长的恢复时间恢复其增生。本研究中这个差别虽然未达到统计学意义上的差异，但是仍可看出随龄而延长的趋势。

在BMSC的体外培养过程中，各组的传代间隔时间差别并不明显，但是此过程中BMSC的形态变化显示衰老个体的干细胞呈现较早和较快的体外衰老，也反映了老化干细胞的衰老背景。细胞克隆的形成是反映细胞繁殖能力的一个较公认的可靠的标准[2]，本研究中BMSC细胞克隆形成数量老年组明显低于少年组和中青年组，MTT法细胞活性曲线分析也显示出同样的结果和趋势。从另一个角度再次证明随着年龄的增加，骨髓间充质干细胞的繁殖能力和活性逐渐降低。此结果与国内外的一些研究的结果相似[4,5]

分析增龄过程中机体BMSC的变化，考虑有以下两个方面原因：(1)干细胞随着机体的衰老而衰退，是机体衰老的一部分。机体的衰老过程中生命力逐渐下降，干细胞虽与体细胞有所差别，或者虽然与体细胞的衰老不同步，但仍在衰老的自然规律内。一些研究已经发现老年的干细胞端粒酶短于年轻者[6]，在体外干细胞不断培养传代的过程中也存在着端粒酶逐渐缩短的情况，且一些与衰老相关的基因如p53也存在着不同年龄之间的差异。(2)环境对干细胞的作用。干细胞的行为还受其周围环境(niche)的影响[7]，环境的变化也可以改变干细胞的功能，衰老的环境会抑制干细胞的增殖。笔者认为，老年BMSC的变化，可能是遗传和环境的综合作用的结果。本研究未包括此方面的内容，这些研究只是初步的结果，尚不完整，但仍可以对未来的研究和应用提供一些有益的基础和线索。

值得指出的是，本研究中有3例老年人的骨髓液中无法培养出干细胞，复习这几例患者的资料，发现均有严重的高脂血症，其中有1例合并糖尿病，是否高脂血症会对骨髓干细胞有某些影响[8,9]？在老年人，多数人往往还同时伴有多种系统疾病，如高血压、糖尿病、冠心病、肿瘤等(本组中的病例无肿瘤患者)，这些系统疾病往往也会对干细胞产生影响，因此严格意义上，本研究中BMSC的一系列随龄增殖变化是机体整体综合影响的结果。老年复杂的机体状况中干细胞的潜能如何变化，对未来的移植会造成怎样的影响，将是下一步的研究方向。

参考文献

[1] Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. J Cell Mol Med, 2004, 8: 301-316.

[2] Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. Ageing Res Rev, 2006, 5: 91-116.

[3] Fehrer C, Lepperdinger G. Mesenchymal stem cell aging. Exp Gerontol, 2005, 40: 926-930.

[4] Schatteman GC, Ma N. Old bone marrow cells inhibit skin wound vascularization. Stem Cells, 2006, 24: 717-721.

[5] Stolzing A, Scutt A. Age-related impairment of mesenchymal progenitor cell function. Aging Cell, 2006, 5: 213-224.

[6] Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, et al. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following *in vitro* expansion. Stem Cells, 2004, 22: 675-682.

[7] Ryu BY, Orwig KE, Oatley JM, et al. Effects of aging and niche microenvironment on spermatogonial stem cell self-renewal. Stem Cells, 2006, 24: 1505-1511.

[8] Stolzing A, Coleman N, Scutt A. Glucose-induced replicative senescence in mesenchymal stem cells. Rejuvenation Res, 2006, 9: 31-35.

[9] Zhu S, Liu X, Li Y, et al. Aging in the atherosclerosis milieu may accelerate the consumption of bone marrow endothelial progenitor cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007, 27: 113-119.

万方数据