

336-341

5 R329.2

## 人骨髓基质细胞的长期培养及其对病毒的敏感性

杨吉成<sup>1</sup>, 盛伟华<sup>1</sup>, 李丽娥<sup>1</sup>, 董宁征<sup>1</sup>, 杨宗华<sup>2</sup>, 王晓东<sup>3</sup><sup>1</sup>(苏州医学院基因工程研究室, 江苏省苏州市, 215007)<sup>2</sup>(常熟市第一人民医院骨科, 江苏省常熟市, 215500)<sup>3</sup>(苏州市儿童医院骨科, 江苏省苏州市, 215003)

**摘要:**为了长期培养人骨髓基质细胞和研究其对病毒的敏感性,我们采用静置贴壁培养法,体外长期培养了胎儿、儿童和成人骨髓基质细胞,并将传至5代以上的肌样骨髓基质细胞采用微量细胞病变(CPE)法,开展了对5种病毒的敏感性试验。结果表明,人骨髓基质肌样细胞对滤泡性口腔炎病毒,脊髓灰质炎病毒、I型和II型单纯疱疹病毒均敏感,能产生明显的CPE,其效价(TCID<sub>50</sub>)可达 $10^{-3} \sim 10^{-4}$ ,其中胎儿骨髓基质肌样细胞对病毒敏感性至少比儿童高2倍,比成人高4倍,即胎儿>儿童>成人,但对B<sub>3</sub>型柯萨奇病毒均不敏感。我们的研究结果不仅可为人骨髓基质细胞体外长期培养提供了确实可行的简便方法,而且为该细胞对病毒的敏感性提供了实验依据,并为该细胞的利用开辟了新的应用前景。

**关键词:**人骨髓基质肌样细胞;体外长期培养;微量细胞病变法;病毒敏感性

**中图分类号:**R394.8 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-5125(2000)04-0336-06

人骨髓基质细胞包括成纤维细胞、内皮细胞、脂肪细胞、巨噬细胞等,体外长期培养既利于观察上述各类细胞独特的细胞形态<sup>[1]</sup>,又利于研究细胞的生物学特性及其表型特征<sup>[2]</sup>。近年来国外在基质细胞的造血调控<sup>[3]</sup>、成骨效应<sup>[4]</sup>和软骨缺损修复功能<sup>[5]</sup>等方面的研究虽已取得了较大的进展,但仍需进行深入研究,特别是人骨髓基质细胞对病毒敏感性研究至今未见报导,为此,我们将来源于胎儿、儿童、成人的骨髓基质细胞进行了体外长期传代培养,并将传至5代以上的肌样细胞(成纤维样细胞)开展了滤泡性口腔炎病毒(VSV),脊髓灰质炎病毒(Polio V),B<sub>3</sub>型柯萨奇病毒(Cox B<sub>3</sub>),I型和II型单纯疱疹病毒(HSV-I和HSV-II)的敏感性研究,现报告如下:

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 人骨髓基质细胞的来源:胎儿骨髓基质细胞取自于孕期5个月人工流产的正常胎儿骨髓(由苏州市二院妇产科提供)。儿童骨髓基质细胞取自2岁骨折健康儿童骨髓(由本院附属儿童医院骨科提供),成人骨髓基质细胞取自20岁骨折健康青年骨髓(由本院附属一院骨科提供)。

1.1.2 病毒:脊髓灰质炎病毒(Poliiovirus, Polio V)为混合型疫苗株(由苏州市卫生防疫站提供)。B<sub>3</sub>型柯萨

收稿日期:2000-01-14 修回日期:2000-06-12

作者简介:杨吉成(1942年-),男,安徽巢湖人,教授,硕士研究生导师,主要从事病毒学、免疫学和分子生物学研究。

奇病毒(Coxsackievirus $B_3$ , Cox $B_3$ )由上海中山医院杨英珍教授惠赠。滤泡性口腔炎病毒(Vesicular stomatitis Virus-Indiana株, VSV),单纯疱疹病毒(Herpes simplex virus) I型和II型(HSV-I SM44株, HSV-II sax株)均为本室保存。各病毒的效价(TCID $_{50}$ )均可达 $10^{-4}$ 。

1.1.3 病毒敏感细胞株:对Polio V, VSV和Cox $B_3$ 病毒的敏感细胞选用的Wish细胞(人羊膜传代细胞株),对HSV-I和HSV-II型单纯疱疹病毒敏感的细胞选用Vero细胞(绿猴肾传代细胞株)。按常规法传代培养,以用于病毒的繁殖、效价测定和实验时的阳性对照细胞。

## 1.2 方法

1.2.1 人骨髓基质细胞的分离和培养:取骨髓3~5 mL,用Ficoll淋巴细胞分层液(比重1.077)分离单核细胞,用PBS和培养基洗3次后,用含20%,56℃灭活30 min的小牛血清的RPMI1640静置贴壁培养,每隔3~4 d换液1次,并将悬浮的细胞移入新瓶继续静置培养,观察贴壁细胞的生长情况和不同细胞类型的形态。待贴壁的肌样成纤维细胞形成单层后,用含0.02% EDTA和0.25%胰酶消化,进行传代培养。为便于统一描述,将胎儿、儿童及成人骨髓基质肌样细胞分别用FBMSC、CBMSC及ABMSC表示,C后用数字表示代次。

1.2.2 病毒的繁殖和效价测定:Polio V, VSV, Cox $B_3$ 病毒经1:10稀释后接种形成单层的Wish细胞,于37℃培养24-48 h待细胞出现圆缩,破裂的细胞病变(CPE)达III~III时收获,于-20℃冻存,并取样在96孔板上采用Wish细胞的微量细胞病变法测定病毒效价,Polio V效价(TCID $_{50}$ )为 $10^{-5}$ , VSV效价为 $10^{-4}$ , Cox $B_3$ 效价为 $10^{-4}$ , HSV-I和HSV-II也按上述方法用Vero细胞进行病毒繁殖和效价测定,其效价(TCID $_{50}$ )二者均可达 $10^{-4}$ 。

1.2.3 胎儿、儿童和成人骨髓基质肌样细胞对病毒的敏感性试验:将Wish, Vero, FBMSC-5, CBMSC-5, ABMSC-7细胞以1:1比例消化传代的细胞悬液分别加入96孔板中,每块板的前两排(A、B排)为阳性对照细胞(Wish或Vero细胞)1至12孔每孔均加工100  $\mu$ L细胞悬液,后6排(C、D、E、F、G、H排)依次分别加入实验组FBMSC-5, CBMSC-5, ABMSC-7的人骨髓基质肌样细胞,每组2孔,100  $\mu$ L/孔,于37℃ 5% CO $_2$ 贴壁培养6 h后,将各病毒以1:100稀释后分别再进行双倍稀释,并向各组的孔中由低向高从第11孔至第1孔加入不同稀释度的病毒悬液100  $\mu$ L/孔,第12孔均加入培养基作为细胞对照(即病毒的阴性对照)。其中Vero细胞的阳性对照孔加入不同稀释度的HSV-I或HSV-II病毒液。Wish细胞的阳性对照孔加入不同稀释度的VSV、Polio V、Cox $B_3$ 病毒液,继续培养24-48 h,观察细胞病变(CPE)程度,并与阳性对照组进行比较,判定胎儿、儿童、成人骨髓基质肌样细胞对上述各类病毒的敏感性。

## 2 结果

### 2.1 各种人骨髓基质细胞培养情况及其形态

人骨髓细胞悬液静止培养4 d开始有大而亮的圆细胞和成纤维样细胞贴壁生长,一周后即有大量成纤维样细胞贴壁(图1-A),并有集落产生,经换液培养2周左右贴壁的肌样细胞即可形成单层(图1-B),每次换液时悬浮的细胞经移瓶继续培养仍有许多纤维样细胞贴壁生长,再次移瓶继续培养有很多单核巨噬细胞贴壁生长(图1-C),唯有肌样细胞可生长繁殖并形成单层,巨噬细胞不能增殖,但可继续存活1~2个月,单层肌样细胞经消化传代时发现肌样细胞比内皮细胞易脱壁,因此又可获比较纯的内皮细胞(图1-D)。经镜检发现,成纤维肌样细胞形体大而细长,多呈纤维状,成束排列,胞浆丰富,核大。内皮细胞形体较小,呈上皮样,排列紧密,类似蜂窝状。巨噬细胞形体大,多呈圆形或椭圆形,膜周边不齐,胞浆淡,核大而明显。现已将肌样细胞传至5~10代,长达6个月以上,现已冻存保种,仍留少量继续进行传代培养,但生长速度明显减慢。经长期传代和扩大培养后,为开展生物学特性和病毒学试验、成骨和造血效应的研究创造了条件。

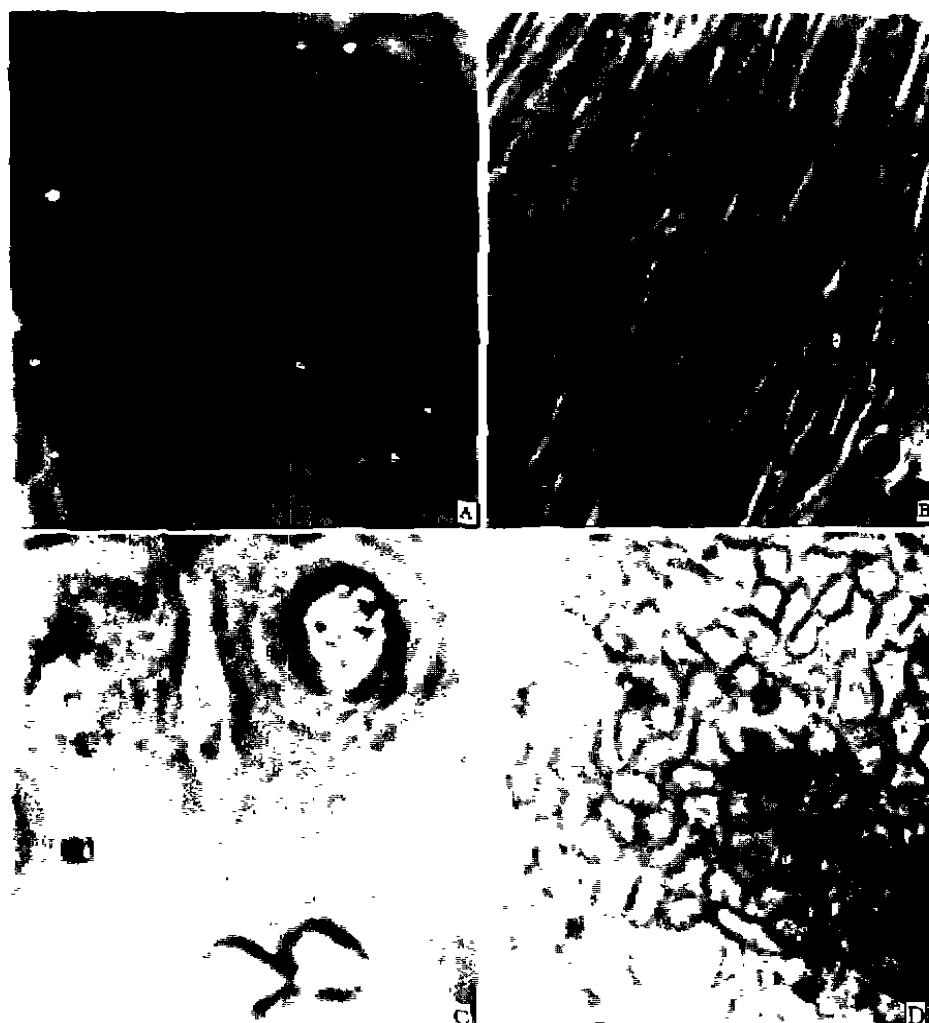


图 1 不同的骨髓基质细胞形态

- A. 培养一周的骨髓肌样细胞(网状), B. 培养二周的骨髓肌样细胞(单层),  
C. 骨髓基质细胞中的单核巨噬细胞, D. 骨髓基质细胞中的内皮细胞

Fig. 1 Shape of different bone marrow stromal cells

A. Bone marrow stromal myoid cells cultured for 1 week (reticulation);

B. Bone marrow stromal myoid cells cultured for 2 week (monolayer culture);

C. mononuclear phagocyte in culture of bone marrow stromal cells;

D. Endothelial cells in culture of bone marrow stromal cells

## 2.2 各种人骨髓基质细胞对不同病毒的敏感性

2.2.1 对 VSV 的敏感性: 滤泡性口腔炎病毒为 RNA 病毒, 常引起口腔及呼吸道感染。对鸡胚细胞、人羊膜细胞(Wish 或 FL 细胞株)、人胚肌皮细胞、L929、Hela 细胞等均敏感。本实验

选用 Wish 细胞作为 VSV 敏感的阳性对照细胞以比较 VSV 对 FBMSC、CBMSC、ABMSC 人骨髓基质肌样细胞的敏感性,其结果如表 1:

表 1 FBMSC-5、CBMSC-5、ABMSC-7 人骨髓基质肌样细胞对 VSV 病毒的敏感性

Table 1 The susceptibility of FBMSC-5, CBMSC-5, ABMSC-7 myoid stromal cells to vesicular stomatitis virus

cells	virus dilution ( $\times 10^{-2}$ )										control group (normal cell)
	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	
WISH	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	±	-	-
FBMSC-5	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	-
CBMSC-5	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	±	-	-
ABMSC-7	+++	+++	+++	++	++	+	±	-	-	-	-

由表 1 结果表明,FBMSC-5 胎儿骨髓基质肌样细胞对 VSV 病毒的敏感性比 Wish 阳性对照细胞更加敏感(高 4 倍),儿童骨髓基质肌样细胞 CBMSC-5 对 VSV 病毒的敏感性与 Wish 细胞相同,但成人骨髓基质肌样细胞 ABMSC-7 对 VSV 病毒的敏感性低于 Wish 细胞(低 4 倍),由此可见,人骨髓基质肌样细胞对 VSV 病毒的敏感性 胎儿 > 儿童 > 成人,其效价(TCID<sub>50</sub>)分别为  $512 \times 10^{-2}$ ,  $128 \times 10^{-2}$ ,  $32 \times 10^{-2}$ 。

2.2.2 对 CoxB<sub>3</sub> 的敏感性:CoxB<sub>3</sub> 病毒为 RNA 肠道病毒,对 Wish、Hep-2、Hela、Vero 细胞均敏感,其中以对 Wish 细胞更敏感,因此也选用 Wish 细胞作为 CoxB<sub>3</sub> 病毒敏感的阳性对照细胞,以比较 CoxB<sub>3</sub> 病毒对 FBMSC、CBMSC、ABMSC 人骨髓基质肌样细胞的敏感性,结果发现 CoxB<sub>3</sub> 病毒在 Wish 细胞上其效价可达  $5.12 \times 10^{-4}$ ,但对各种人骨髓基质肌样细胞,只有在 FBMSC-5 细胞上于 48 h 才产生  $10^{-1}$  病毒效价,比 Wish 细胞对 CoxB<sub>3</sub> 病毒的敏感性低 5 000 倍,而在 CBMSC-5 和 ABMSC-7 细胞上均未出现明显的 CPE,由此可见,CoxB<sub>3</sub> 对人骨髓基质肌样细胞均不敏感。

2.2.3 对 PolioV 的敏感性:PolioV 也为 RNA 的肠道病毒,对 Hep-2、Vero 以及 Wish 细胞均敏感。本实验选用的 Wish 细胞作为对 PolioV 敏感的阳性对照细胞,以比较 PolioV 对 FBMSC-5、CBMSC-5、ABMSC-7 人骨髓基质肌样细胞的敏感性。结果如表 2:

表 2 FBMSC-5、CBMSC-5、ABMSC-7 人骨髓基质肌样细胞对 PolioV 的敏感性

Table 2 The susceptibility of FBMSC-5, CBMSC-5, ABMSC-7 myoid stromal cells to poliovirus

cells	virus dilution ( $\times 10^{-2}$ )										control group (normal cell)
	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	
WISH	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	-
FBMSC-5	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	+	-	-
CBMSC-5	+++	+++	+++	++	++	++	++	±	-	-	-
ABMSC-7	+++	+++	+++	++	++	++	+	±	-	-	-

由表 2 结果表明,PolioV 对 wish 细胞最敏感,其效价可达  $5.12 \times 10^{-4}$  而 FBMSC-5、CBMSC-5、ABMSC-7 人骨髓基质肌样细胞对 PolioV 的敏感性依次比 Wish 细胞低 4, 8, 16 倍,即 FBMSC-5 > CBMSC-5 > ABMSC-7,其效价(TCID<sub>50</sub>)依次可达  $1.28 \times 10^{-4}$ ,  $6.4 \times 10^{-3}$ ,  $3.2 \times 10^{-3}$ ,说明 PolioV 感染者一旦病毒进入骨髓也可使骨髓基质细胞产生病理改变而受损伤。

2.2.4 对 HSV-I、HSV-II 的敏感性:HSV-I 和 HSV-II 均为 DNA 病毒,对 Vero、人胚肾等细胞敏感,本实验选用 Vero 细胞作为 HSV-I 和 HSV-II 阳性对照细胞,以比较 HSV-I 和 HSV-II 对 FBMSC-5、CBMSC-5、ABMSC-7 人骨髓基质肌样细胞的敏感性。鉴于 HSV-I 和 HSV-II 结

果一致,故列入同一表中。

表3 FBMSC-5、CBMSC-5、ABMSC-7人骨髓基质肌样细胞对HSV-I和HSV-II病毒的敏感性

Table 3 The susceptibility of FBMSC-5, CBMSC-5, ABMSC-7 myoid stromal cells to HSV-I and HSV-II

cells	virus dilution ( $\times 10^{-2}$ )									control group (normal cell)
	1	2	4	8	16	32	64	128	256	
VERO	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	±	-	-
FBMSC-5	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	±	-	-
CBMSC-5	+++	+++	+++	+++	++	+	+	-	-	-
ABMSC-7	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-

由表3结果表明,HSV-I和HSV-II对Vero细胞均敏感,其效价(TCID<sub>50</sub>)可达 $6.4 \times 10^{-3}$ 而FBMSC-5人骨髓基质肌样细胞对HSV-I和HSV-II的敏感性与Vero细胞相同,但CBMSC-5, ABMSC-7骨髓基质肌样细胞对HSV-I和HSV-II的敏感性分别比Vero细胞低2倍、4倍,其效价分别为 $3.2 \times 10^{-3}$ 、 $1.6 \times 10^{-3}$ 。由此可见,HSV-I和HSV-II对人骨髓基质肌样细胞的敏感性是FBMSC-5 > CBMSC-5 > ABMSC-7。

### 3 讨论

骨髓基质细胞是血液学、骨科学等诸多学科研究的热点,不同类型的基质细胞具有独特的形态学特征和表型特点,特别是基质干细胞可能有独特的生物学特性和分化机制,并通过基质细胞释放多种细胞因子及生物学活性蛋白,可为造血调控及其成骨作用提供良好的微环境<sup>[6]</sup>,不仅对培养扩增骨髓造血干细胞,用于骨髓移植有广阔的应用前景,而且通过骨髓基质细胞的成骨作用和软骨缺损恢复的试验,为扩增培养的骨髓基质细胞用于治疗软骨缺损和骨不连也有重要的医学意义和治疗应用价值。

本研究室在确立基质细胞培养方法后,通过长期传代和扩增培养,对造血效应、软骨缺损的修复和成骨作用方面已着手研究,已取得了一定的进展,有待总结,另行报告。

鉴于人骨髓基质细胞对病毒的敏感性研究经查询至今未见报告,为此本文着重研究了胎儿、儿童、成人骨髓基质肌样细胞对VSV, PolioV, CoxB<sub>3</sub>, HSV-I和HSV-II型五种病毒的敏感性。这不仅对今后开展病毒学研究提供了新的细胞来源和新思路<sup>[7]</sup>,而且也可采用单纯疱疹病毒载体开展转基因研究和基因治疗开辟了新的细胞源泉<sup>[8]</sup>。

鉴于人骨髓基质肌样细胞对VSV, PolioV, HSV-I和HSV-II型病毒均敏感,说明这些病毒一旦进入骨髓可破坏骨髓中的基质细胞而使骨髓造血和成骨作用等均会造成障碍,特别是PolioV,在病毒血症后常可侵犯脊髓前角运动神经细胞,导致麻痹<sup>[9]</sup>,若随之进入骨髓同样会损害骨髓基质细胞而严重破坏骨髓的造血功能和成骨效应。本文又可为临床病理分析提供新的实验依据。

### 参 考 文 献

- [1] Hauser SP, Waldron JA, Upuda KB, *et al.* Morphological characterization of stromal cell types in hematopoietically active long-term murine bone marrow culture [J]. *J Histochem Cytoch*, 1995, 43(4):317
- [2] Ami J, Shah, Elzbieta M, Hannum C, *et al.* Flt-3 ligand induces proliferation of quiescent human bone marrow CD34 + CD38 - cell and maintains progenitor cells in vitro [J]. *Blood*, 1996, 87(9):3563

- [3] Gordon MY, Lewis JI, Marlev-SB *et al.* Stromal cell negatively regulate primitive haemopoietic progenitor cell activation via a phosphatidyl inositol-anchored cell adhesion/signalling [J]. *Br-J-Haematol*, 1997, 96(3):647
- [4] Buder SP, Kurth AA, Shea M, *et al.* Bone regeneration by implantation of purified culture expanded human mesenchymal stem cells [J]. *J orthop*, 1998, 16(2):155
- [5] Butmaru-Ephrat M, Robinson D, Mendes DG, *et al.* Resurfacing of goat articular cartilage by chondrocytes derived from bone marrow [J]. *Clin orthop*, 1996, sep; 330:234
- [6] Sensebe L, Destheseaux M, Jian Z, *et al.* The broad spectrum of cytokine gene expression by myoid cells from the human marrow microenvironment [J]. *Stem Cell*, 1997, 15:133
- [7] 盛伟华, 杨吉成, 张云. 基因工程人干扰素  $\alpha 2b$  和  $\alpha 2a$  亚型抗病毒效应的实验研究[J]. *生物学杂志*, 1998, 15(3):19
- [8] 赵莲, 罗庆良, 张洁. 骨髓基质细胞基因治疗的研究进展[J]. *国外医学输血及血液学分册*. 2000. 23(4):240
- [9] 陆德源主编: *医学微生物学* [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996 年第 4 版

## The Long-term Culture of human bone marrow stromal cells *in vitro* and their susceptibility to viruses

YANG Ji-cheng, SHENG Wei-hua, LI Li-e, *et al*

(*Gene Engineering Univ of Suzhou Medical College, Suzhou, JiangSu 215007, China*)

**Abstract:** To culture human bone marrow stromal cells long term *in vitro*, and investigate their susceptibility to virus, the fetus, child and adult bone marrow stromal cell were cultured for long time *in vitro* by the adherent assay. The myoid bone marrow stromal cells were obtained after being generated more than five times, then their susceptibility to five kinds of virus was assayed by microdose CPE. All myoid stromal cells were susceptible to VSV, PolioV, HSV-I and II. Except CoxB<sub>3</sub>, producing obvious CPE with TCID<sub>50</sub> up to  $10^{-3}$ - $10^{-4}$ . Fetal myoid stromal cells were two times higher than child, and four times than adult in terms of virus susceptibility. Our research supplies not only a simple, practicable assay for ex-vivo long-term culture of human bone marrow stromal cell, but also experimental reference for estimating the virus susceptibility of these cells, at the same time, contributes to a more extensive prospect for applying these cells.

**Key words:** Human bone marrow stromal cells; Long-term culture *in vitro*; Microdose cytopathic effect assay; Susceptibility to virus