



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102424813 A

(43) 申请公布日 2012. 04. 25

(21) 申请号 201110438641. 1

(22) 申请日 2011. 12. 25

(71) 申请人 复旦大学附属中山医院

地址 200032 上海市徐汇区枫林路 180 号

(72) 发明人 过常发 王春生 朱铠 赖颢

徐德民

(74) 专利代理机构 上海申汇专利代理有限公司

31001

代理人 翁若莹

(51) Int. Cl.

C12N 5/074 (2010. 01)

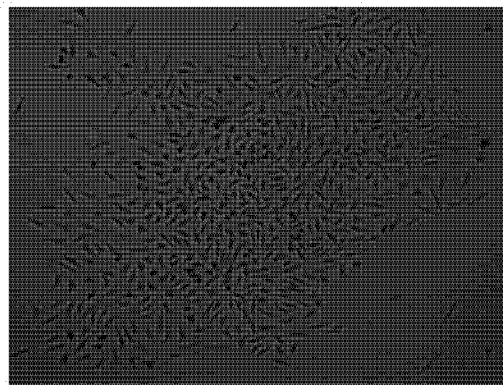
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种高纯度小鼠骨骼肌卫星细胞的简易提取方法

(57) 摘要

本发明提供了一种高纯度小鼠骨骼肌卫星细胞的简易提取方法, 其特征在于, 具体步骤为: 第一步: 于小鼠四肢肌注射盐酸布比卡因; 第二步: 处死小鼠, 剔出四肢肌肉, 去除血管、脂肪及筋膜, 将肌肉剪成 $0.5 \sim 1.5\text{mm}^3$ 小粒; 第三步: 加入混合消化酶孵化, 过滤细胞悬液, 将所得滤液离心, 弃上清, 细胞沉淀用生长培养基重悬; 第四步: 依次将 60%Percoll 分离液、20%Percoll 分离液、细胞悬液沿管壁注入, 用长头吸管小心吸出 20%Percoll 分离液与 60%Percoll 分离液分界面的细胞悬液, 离心, 得细胞沉淀; 第五步: 将细胞沉淀培养, 得到小鼠骨骼肌卫星细胞。本发明方法简易、快速, 骨骼肌卫星细胞纯化率及产率高, 具有较高的增殖及分化能力, 可进行体外基因修饰或体内移植。



1. 一种高纯度小鼠骨骼肌卫星细胞的简易提取方法，其特征在于，具体步骤为：

第一步：取 5～7 周龄 C57BL/6 小鼠，于小鼠四肢肌注射 0.75% 盐酸布比卡因 0.05～0.15mL；

第二步：36～60 小时后，处死小鼠，用 75vol% 酒精浸泡 10～20min，在超净工作台内剔出四肢肌肉 0.5～1.5g，去除血管、脂肪及筋膜，无菌 PBS 液冲洗，将肌肉剪成 0.5～1.5mm³ 小粒，加入 PBS 液静置 3～7min，离心，弃上清液；

第三步：加入 1～5mL 混合消化酶，置于 37℃、CO₂ 体积浓度为 5% 的孵箱中孵化，每隔 10～20min 用吸管吹打震荡 3～7min，重复 3 次，加入 3～7mL 含 15vol% 胎牛血清的 F12/DMEM 培养基中止消化，过滤细胞悬液，将所得滤液离心，弃上清，细胞沉淀用生长培养基重悬至 2～4mL 待用；

第四步：以胎牛血清润湿离心管管壁后，依次将 60%Percoll 分离液 2～4mL、20%Percoll 分离液 2～4mL、细胞悬液 2～4mL 沿管壁注入，离心，用长头吸管小心吸出 20% Percoll 分离液与 60% Percoll 分离液分界面的细胞悬液 0.5～1.5mL，离心，得细胞沉淀；

第五步：细胞沉淀用生长培养基重悬后移入鼠尾胶包被的培养瓶中，于 CO₂ 温箱中培养 0.5h，命名为 PP1，后将培养基连同非贴壁细胞一同转移到新的培养瓶中再培养 0.5h，命名为 PP2，之后将培养基连同未贴壁的细胞转入新的培养瓶中培养 24h，命名为 PP3，将 PP3 继续培养 72h 后全量换液，得到小鼠骨骼肌卫星细胞。

2. 如权利要求 1 所述的高纯度小鼠骨骼肌卫星细胞的简易提取方法，其特征在于，所述的混合消化酶配制方法为：将 II 型胶原酶 0.11g，II 型 dispease 酶 0.124g，CaCl₂ 14mg 以及 PBS 50mL 混合。

一种高纯度小鼠骨骼肌卫星细胞的简易提取方法

技术领域

[0001] 本发明提供了一种简单易行、高纯度的小鼠骨骼肌卫星细胞的提取方法,为骨骼肌卫星细胞介导的基因转染、骨骼肌及心肌再生提供种子细胞。

背景技术

[0002] 随着显微外科技术的发展和人们对小鼠模型优越性的认识,如繁殖快(只需21天)、胎仔数多、维持消耗少及基因、信号通道与人类相似度高等,小鼠模型在目前的科研中应用广泛。小鼠骨骼肌卫星细胞是骨骼肌中具有分化增殖潜能的肌源性干细胞。作为成体干细胞的一种,高纯度骨骼肌卫星细胞作为成体种子细胞及基因治疗工程细胞在缺血性心脏病的治疗中展示了良好的临床应用前景。然而,肌卫星细胞在成年骨骼肌中含量较低,约1%~5%,而其数量在个体的生命过程中由于各种因素的影响而逐渐减少,且在一般情况下处于细胞周期的G₀期,这就决定了通过原代细胞分离技术所能获取的骨骼肌卫星细胞数量必然是有限的。因此,其分离和培养技术一直在不断地摸索和改进中。传统方法多采用胶原酶和胰酶分步消化及差速贴壁的方式进行提取纯化,或者通过包有乙烯吡咯烷酮的硅胶颗粒(Percoll)梯度离心法分离卫星细胞,这些方法中,由于对消化及差速贴壁时间较难把握,且未形成统一标准,因而得到的卫星细胞依然含有大量的成纤维细胞等杂质细胞,纯度较低;而流式细胞分选术、免疫磁珠分选术和平面黏附分离法等方法可获得高纯度卫星细胞,但部分单位缺乏相应的设备条件,且实验所需抗体等试剂价格昂贵,所使用抗体也有相应的物种特异性,使这种方法的广泛应用受限。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种快速、高效、经济地获得高纯度的小鼠骨骼肌卫星细胞的方法。

[0004] 为了达到上述目的,本发明提供了一种高纯度小鼠骨骼肌卫星细胞的简易提取方法,其特征在于,具体步骤为:

第一步:取5~7周龄C57BL/6小鼠,于小鼠四肢肌注射0.75%盐酸布比卡因0.05~0.15mL;

第二步:36~60小时后,处死小鼠,用75vol%酒精浸泡10~20min,在超净工作台内剔出四肢肌肉0.5~1.5g,去除血管、脂肪及筋膜,无菌PBS液冲洗,将肌肉剪成0.5~1.5mm³小粒,加入PBS液静置3~7min,离心,弃上清液;

第三步:加入1~5mL混合消化酶,置于37℃、CO₂体积浓度为5%的孵箱中孵化,每隔10~20min用吸管吹打震荡3~7min,重复3次,加入3~7mL含15vol%胎牛血清的F12/DMEM培养基中止消化,过滤细胞悬液,将所得滤液离心,弃上清,细胞沉淀用生长培养基重悬至2~4mL待用;

第四步:以胎牛血清润湿离心管管壁后,依次将60%Percoll分离液2~4mL、20%Percoll分离液2~4mL、细胞悬液2~4mL沿管壁注入,离心,用长头吸管小心吸出20%

Percoll 分离液与 60% Percoll 分离液分界面的细胞悬液 0.5 ~ 1.5mL, 离心, 得细胞沉淀;
第五步: 细胞沉淀用生长培养基重悬后移入鼠尾胶包被的培养瓶中, 于 CO₂ 温箱中培养 0.5h, 命名为 PP1, 后将培养基连同非贴壁细胞一同转移到新的培养瓶中再培养 0.5h, 命名为 PP2, 之后将培养基连同未贴壁的细胞转入新的培养瓶中培养 24h, 命名为 PP3, 将 PP3 继续培养 72h 后全量换液, 得到小鼠骨骼肌卫星细胞。

[0005] 优选地, 所述的混合消化酶配制方法为: 将 II 型胶原酶 0.11g, II 型 dispease 酶 0.124g, CaCl₂14mg 以及 PBS50mL 混合。

[0006] 本发明的原理是:

骨骼肌中的肌卫星细胞存在于肌纤维的肌膜层与基底膜之间, 成体骨骼肌中卫星细胞含量极少, 当骨骼肌组织受到损伤时, 这些静息期的肌卫星细胞才会被激活, 大量分裂、增殖、分化。因此, 当以盐酸布比卡因预处理骨骼肌后, 能引起肌组织损伤, 伴有大量的炎症细胞浸润, 从而激活卫星细胞并使其大量增殖。具体机制可能为, 肌组织损伤后产生的大量单核及巨噬细胞能通过释放某些具有有丝分裂活性的细胞因子如 IL-6 等和生长因子促进肌卫星细胞的活化增殖和分化。此外, 有学者发现, 肌卫星细胞与存活的肌纤维之间的相互接触之间的接触会抑制肌卫星细胞的活化、增殖和分化, 布比卡因能选择性损伤肌纤维而对肌卫星细胞没有损伤作用, 肌纤维溶解坏死可导致这种抑制关系的削弱, 引起肌卫星细胞的活化增殖。本实验中以布比卡因预处理后, 所获得的细胞量明显增高, 为纯化后保持足量的卫星细胞提供了保障。

[0007] 传统方法多采用胶原酶和胰酶分步消化、多次离心的方式进行卫星细胞的提取。本发明在传统分离方法的基础上进行了优化和改进, 通过采用自配的混合酶消化液对骨骼肌组织进行一次性消化, 仅需一次低速离心便可获得细胞。此种改良方法避免了传统方法中多次消化离心的繁琐操作, 节省了细胞提取的时间, 从而减轻了消化酶对细胞的损伤, 减少了细胞的丢失, 增加了细胞的收获。

[0008] 在卫星细胞分离扩增培养过程中, 骨骼肌组织中的成纤维细胞会影响卫星细胞的纯度和生长状态, 两者之间存在着一种此消彼长的竞争性生长特征, 因此, 如何去除夹杂其中的成纤维细胞的污染是纯化方式不断改良的主要目标。流式细胞分选术、免疫磁珠分选术和平面黏附分离法等方法可获得高纯度卫星细胞, 但部分单位缺乏相应的设备条件, 且实验所需抗体等试剂价格昂贵, 所使用抗体也有相应的物种特异性, 使这种方法的广泛应用受限。因此, 目前研究的重点集中在如何快速、高效、经济地获得高纯度的卫星细胞。

[0009] 大部分成纤维细胞于 10-30min 内贴壁, 而卫星细胞 30min 左右开始贴壁, 但附着不牢, 轻轻晃动即浮起。普通的差速贴壁无法使一部分成纤维细胞贴壁, 卫星细胞纯度较低; 而多次反复差速贴壁纯化的最佳差速时间仍然不能确定, 因此造成提取卫星细胞的纯度无法保证; Percoll 是一种包有乙烯吡咯烷酮的硅胶颗粒, 不穿透生物膜, 对细胞无毒性, 其扩散常数低, 预先铺设的 60% 和 20% 的两个非连续密度梯度比较稳定, 在低速离心力下在数分钟至数十分钟内即可达到满意的细胞分离效果, 因此广泛应用于分离细胞、亚细胞成分、细菌及病毒的实验中。然而, 虽然 Percoll 分离法来分离细胞收获的卫星细胞纯度高于单纯差速贴壁法, 但也不能完全避免非肌源性细胞的混入。因此, 为进一步减少非肌源性细胞污染, 本发明通过反复对比研究, 优化了一系列差速贴壁时间, 并将 Percoll 分离法与之相结合, 其获得的 PP3 纯度明显高于其他纯化方法, 且提纯时间跨度仅为两天, 避免了

反复差速贴壁法长久的耗时。

[0010] 细胞传代后,其混杂的成纤维细胞将因为较快的增殖速度形成生长优势,从而造成卫星细胞纯度迅速下降。故在每次传代时仍应通过预贴壁 30min 尽可能去除成纤维细胞,以维持传代卫星细胞一定的纯度。

[0011] 本发明方法简易、快速,骨骼肌卫星细胞纯化率及产率高,经本方法提取、纯化的小鼠骨骼肌卫星细胞体外培养具有较高的增殖及分化能力,可进行体外基因修饰或体内移植。本方法通过预处理肌肉组织,一步法混合酶消化,结合 Percoll 不等密度梯度离心,并通过优化差速贴壁时间,提取了高纯度的小鼠骨骼肌卫星细胞,为进一步的基因转染及细胞移植提供了基础。

附图说明

[0012] 图 1 为 Percoll 不等密度梯度离心后示意图:骨骼肌卫星细胞为 20% 及 60%Percoll 液交界处。

[0013] 图 2 为提纯后骨骼肌卫星细胞 desmin 免疫荧光染色图:desmin 表达强阳性。

[0014] 图 3 为小鼠成纤维细胞 desmin 免疫染色(阴性对照)图:无 desmin 表达。

[0015] 图 4 为流式细胞仪卫星细胞纯度鉴定图:红色曲线为骨骼肌卫星细胞 desmin 阳性纯度(92.59 ± 1.29%),绿色曲线为阴性对照的小鼠成纤维细胞。

[0016] 图 5 为提纯后第 4 天图:骨骼肌卫星细胞对数生长期,细胞呈梭形,形态均一。

[0017] 图 6 为肌管形成图:用马血清诱导分化后,多个相邻卫星细胞可融合可形成肌管。

具体实施方式

[0018] 下面结合实施例来具体说明本发明。本发明中所述的 PBS、PBS 液皆为 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲溶液。本发明中所有的浓度均为体积浓度。

实施例

[0019] 1. 实验动物:6 周龄 C57BL/6 小鼠,由上海斯莱克实验动物有限公司提供。

[0020] 2. 取材部位预处理:以 100 μ L 微量注射器于小鼠四肢肌注射 0.75% 盐酸布比卡因 0.1mL。

[0021] 3. 取材:48 小时后,颈椎脱臼法处死小鼠,将整个小鼠以 75% 酒精浸泡 15min,在超净工作台内剔出四肢肌肉约 1g,仔细去除肌肉上附着的血管、脂肪及筋膜,无菌 PBS 液冲洗 3 遍,将肌肉剪成约 1mm³ 肉糜小粒,加入无菌 PBS 液浸泡,静置 5min,离心,弃上清液。

[0022] 4. 一步法混合消化酶消化:加入 3mL 混合消化酶(配制方法为:将 II 型胶原酶(Sigma Aldrich, Catalog No.:C6885)0.11g, II 型 dispease 酶(Roche, Catalog No.:4942078001)0.124g, CaCl₂14mg, PBS50mL 混合),置于 37℃、5%CO₂ 孵箱中孵化,每隔 15min 用吸管吹打震荡 5min 重复 3 次,一小时后,加入 5mL 含 15% 胎牛血清的 F12/DMEM 培养基中止消化,200 目过滤网过滤细胞悬液 2 次,1400r/min 离心 10min,弃上清,细胞沉淀用 DMEM/F12 生长培养基(Gibco, Catalog No.:11330032)重悬至 3mL 待用。

[0023] 5. Percoll 非连续密度梯度离心:以 2mL 胎牛血清(Gibco, Catalog No.:10099141)润湿 15mL 离心管管壁后,依次将 60%Percoll 分离液(GE Healthcare, Catalog

No. : 17-0891-01) 3mL、20% Percoll 分离液 3mL、步骤 4 中的细胞悬液 3mL 沿管壁缓缓注入, 1800r/min 离心 20min。长头吸管小心吸出 20% Percoll 分离液与 60% Percoll 分离液界面的细胞悬液约 1mL, 1000r/min 离心 5min, 得细胞沉淀。

[0024] 6. 优化差速贴壁时间: 细胞沉淀用含 15% 胎牛血清的 DMEM/F12 生长培养基重悬至 5mL 后移入鼠尾胶包被的培养瓶中, 于 CO₂ 温箱 37℃ 中培养 0.5h (第一次贴壁), 命名为 PP1, 后将培养基连同非贴壁细胞一同转移到新的培养瓶中再在 37℃ 培养 0.5h (第二次贴壁), 命名为 PP2, 之后将培养基连同未贴壁的细胞转入新的培养瓶中 37℃ 培养 24h (第三次贴壁), 获得 PP3。PP3 继续培养 72h 后全量换液。

[0025] 7. 骨骼肌卫星细胞鉴定: 取 PP3 细胞, 4g/L 台盼蓝染色计数活细胞。用 4% 多聚甲醛固定, 按常规免疫荧光染色方法鉴定成肌细胞的纯度。一抗主要采用肌卫星细胞特异性标志物结蛋白 (desmin) (abcam, Catalog No. : ab15200), Cy3 标记二抗 (Beyotime, Catalog No. : A0516), 并采用 hoechst33258 (Beyotime, Catalog No. : C1017) 复染细胞核, 观察免疫荧光结果, 流式细胞仪检测卫星细胞纯度 (以不表达 desmin 的小鼠成纤维细胞系做阴性对照)。

[0026] 8. 骨骼肌卫星细胞培养增殖、分化: 将步骤 6 所得的提纯后细胞以含 15% 胎牛血清的 F12/DMEM 培养基进行培养, 每日观察细胞形态与生长情况, 待细胞生长至 80% 接触后传代, 每次传代均预贴壁 30min, 预贴壁步骤与上述的第一次贴壁相同, 之后将培养基连同未贴壁的细胞转入新的培养瓶中 37℃ 培养完成细胞贴壁, 当细胞培养贴壁后, 将培养基更换为分化液 (配制方法为: 在 DMEM/F12 培养基中按体积比 100 : 2 加入马血清, 再按体积比 100 : 1 加入青链霉素) 进行诱导分化培养, 观察分化形成肌管的状态。

[0027] 9. 结果: 改良本方法提取、纯化方式中 Percoll 不等密度梯度离心后见图 1, 纯化后最终所获得的细胞经台盼蓝染色计数, 约有 95% 以上的细胞不着色, 提示该方法所得的细胞存活率较高。经免疫荧光染色后, desmin 呈强阳性表达 (图 2, 3), 流式细胞仪鉴定其纯度为: $92.59 \pm 1.29\%$ (图 4)。

[0028] 原代骨骼肌卫星细胞传代后贴壁速度明显加快, 0.5h 开始贴壁, 2h 内 90% 以上的卫星细胞完成贴壁。骨骼肌卫星细胞体外培养时潜伏期为 1-2d, 从第 3d 起进入对数生长期, 5-6d 开始进入细胞增殖的平台期。进入对数生长期后, 随着细胞的增殖, 形成散在分布的细胞集落 (图 5); 细胞常常拉长变细, 同时趋向于平行排列。当细胞汇合超过 60%-70% 后, 骨骼肌卫星细胞之间出现融合现象, 有散在的肌管细胞形成。至 7-8d 可见大片肌管细胞形成, 肌管细胞之间亦可相互融合。培养条件良好时, 倒置相差显微镜下可观察到肌管细胞自发性收缩。

[0029] 细胞贴壁后更换为分化培养基, 发现细胞的分裂、增殖速度显著下降, 细胞维持在较低的密度水平。24h 后开始有少量骨骼肌卫星细胞相互融合, 散在的肌管细胞开始形成 (图 6), 72h 后可见绝大多数的骨骼肌卫星细胞融合, 培养皿内以肌管细胞为主。

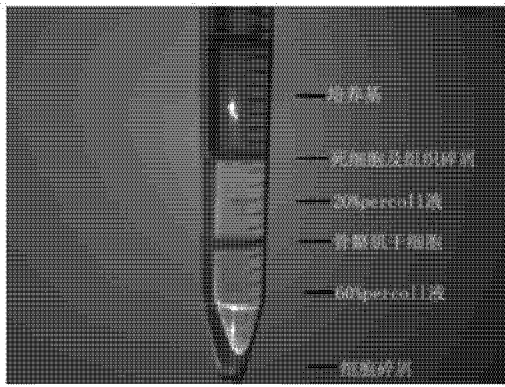


图 1

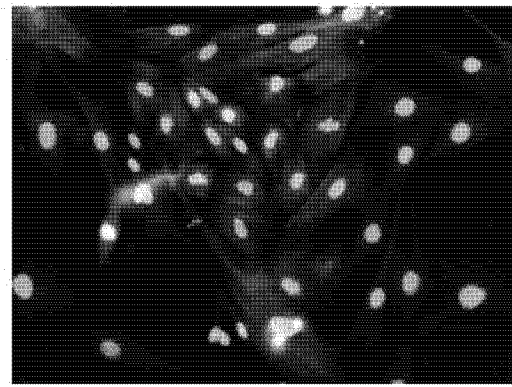


图 2

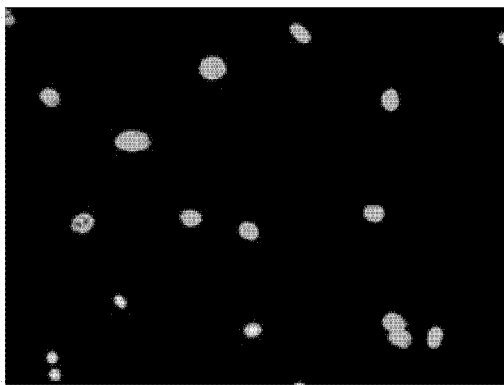


图 3

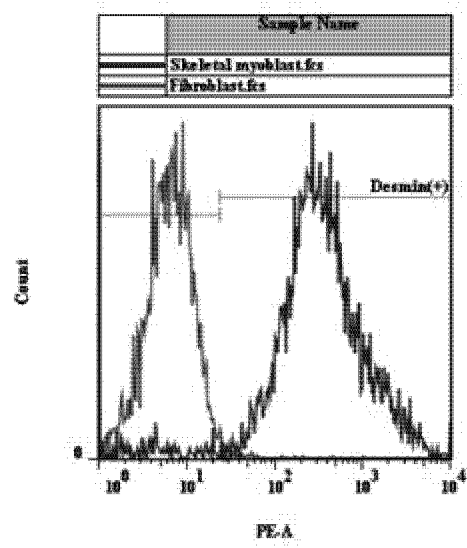


图 4

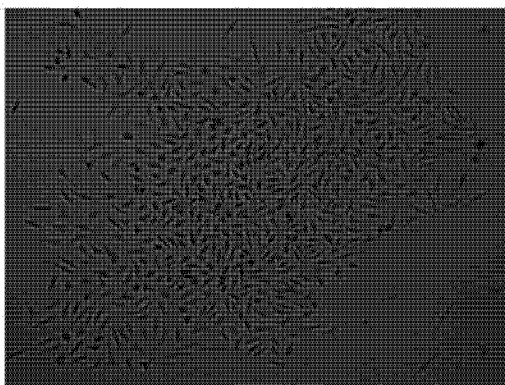


图 5



图 6