小鼠骨髓与骨内膜间充质干细胞分析

Flow Cytometry Analysis of Mouse Bone Marrow and Endosteum Mesenchymal Stromal Cells

谢嘉怡, 王璿, 赵萌*

中山医学院, 中山大学, 广州, 广东

*通讯作者邮箱: zhaom38@mail.sysu.edu.cn

引用格式: 谢嘉怡, 王璿, 赵萌. (2019). 小鼠骨髓与骨内膜间充质干细胞分析. *Bio-101* e1010338. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010338.

How to cite: Xie, J. Y., Wang, J. and Zhao, M. (2019). Flow Cytometry Analysis of Mouse Bone Marrow and Endosteum Mesenchymal Stromal Cells. *Bio-101* e1010338. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010338. (in Chinese)

摘要: 骨髓间充质干细胞 (Mesenchymal Stromal Cells, MSCs) 是骨髓中具有自我更新能力, 和成骨、成软骨和成脂肪多向分化潜能的成体干细胞。MSC 具有在体外形成纤维细胞集落 (CFU-F) 和在体内、外分化为骨、软骨和脂肪细胞的能力。本文以小鼠骨髓组织为例, 使用 5 种一抗和 1 种二抗, 介绍在骨髓腔和骨内膜分离、标记 MSC 的方法, 用此法标记的 MSCs 还可进行细胞周期、凋亡等实验。

关键词: 小鼠, 间充质干细胞, 流式细胞术

材料与试剂

1. 15 ml 离心管
2. 1.5 ml EP 管
3. 70 μ m 滤膜 (Fisherbrand, catalog number: 22363548)
4. 小鼠 (C57BL/6J, 6~8 周龄, 雄雌各半)
5. 胎牛血清 (FBS, Gibco, catalog number: 10100147)
6. Liberase (Roche, catalog number: 5401020001)
7. DNase I (Roche, catalog number: 10104159001)
8. 流式抗体如表 1

表 1. 流式抗体

抗体	抗体标记	品牌	货号	克隆号
CD16/32	purified	Biolegend	101302	93
Ter-119	APC	ebioscience	17-5921-83	TER-119
CD45	APC	Biolegend	103112	30-F11
CD31	PE/Cy7	Biolegend	102524	MEC13.3
Pdgfra	SuperBright 436	ebioscience	62-1401-82	APA5
LepR	Biotin	R&D	BAF497	—
Streptavidin	APC/Cy7	Biolegend	405208	—

9. 同型对照抗体如表 2

表 2. 同型对照抗体

抗体	荧光	抗体类型	同型对照抗体
Ter-119	APC	Rat IgG2b, κ	ebioscience, 17-4031-82
CD45	APC	Rat IgG2b, κ	Biolegend, 400611
Pdgfra	SuperBright 436	Rat IgG2a, κ	ebioscience, 62-4321-82
LepR	Biotin	Polyclonal Goat IgG	R&D, BAF108

10. 磷酸缓冲液 (10× PBS, Sangon biotech, catalog number: E607016-0500)
11. 氯化铵 (天津大茂化学, catalog number: 12125-02-9)
12. 碳酸氢钠 (Sigma-Aldrich, catalog number: S5761, 500G)
13. EDTA 粉末 (鼎国, catalog number: LE568)
14. 7-AAD (Biolegend, catalog number: 420404, 50 $\mu\text{g/ml}$)
15. HBSS (Corning, catalog number: 26616008)
16. MSC 消化酶 (见溶液配方)
17. 磷酸缓冲液 (1× PBS) (见溶液配方)
18. 红细胞裂解液 (500 ml) (见溶液配方)

仪器设备

1. 离心机 (Eppendorf, catalog numbers: 5804R, 5424R)
2. 移液器
3. 水浴锅
4. 恒温摇床
5. 摇床
6. 流式细胞仪 (Thermo Fisher Scientific, Attune NxT)

实验步骤

1. 37 °C 水浴预热 MSC 消化酶 (配制方法见“溶液配方”部分), 37 °C 预热摇床, 冰上预冷 PBS + 2% FBS。
2. 颈椎脱臼处死小鼠, 从下腹部剪开小鼠腿部皮肤, 小心剪开髋关节与踝关节, 将小鼠腿部完整取出, 分离肌肉, 取出股骨与胫骨, 浸泡在预冷的 PBS + 2% FBS 中, 置于冰上。
3. 骨髓、骨内膜 MSC 取材
 - 3.1 骨髓 MSC 取材: 小心沿骨髓剪开松质骨部分 (图 1, 沿虚线部分剪开), 用 1 ml 注射器吸取 0.5 ml 预冷的 PBS + 2% FBS, 将骨髓组织完整冲出至 1.5 ml EP 管中, 1 条股骨与 1 条胫骨骨髓置于同一个 EP 管中, 冰上静置 5 min, 吸去多余 PBS。每管骨髓组织加入 750 μ l 预热的 MSC 消化酶, 轻轻颠倒后置于 37 °C 水浴锅中 10 min, 期间拿起颠倒数次。
 - 3.2 骨内膜 MSC 取材: 冲出骨髓后剩下的 1 条股骨与 1 条胫骨骨组织置于 PBS + 2% FBS 中, 仔细剪碎骨组织, 剪碎至骨髓腔完全暴露, 且碎片面积小于 5 mm² (图 2), 将骨组织置于 750 μ l 预热的 MSC 消化酶中, 轻轻颠倒后置于 37 °C 水浴锅中 10 min, 期间拿起颠倒数次。

图 1. 小鼠股骨 (左)与胫骨 (右), 虚线表示剪开的地方

图 2. 骨内膜 MSC 取材示意图

4. 将上述骨髓组织或骨组织与消化酶的混合物侧放于 37 °C 160~220 rpm 摇床中, 消化 20 min。
5. 消化后室温静置 5 min, 取上清约 700 μ l 消化液加入至 10 ml 预冷 PBS + 2% FBS 进行中和, 注意不要吸取未消化的骨髓组织。
6. 骨髓组织或骨组织中再加入 750 μ l 预热的 MSC 消化酶, 重复第 4、5 步进行第 2 次消化, 消化后尽量吸净消化液, 加入至第 5 步的中和后消化液中。
7. 将 2 次消化后的中和后消化液于 4 °C 500 $\times$ g 离心 5 min, 弃去上清, 每管加入 1 ml 红细胞裂解液, 重悬骨髓组织, 用移液枪轻柔吹打均匀, 37 °C 静置 5min 后加入 10 ml 的预冷的 PBS + 2% FBS 终止裂解, 每管细胞准备 1 个新的 50 ml 离心管, 将 1 个 70 μ m 滤器置于离心管上, 将上述终止裂解后的 11 ml 细胞悬液分次倾

- 倒至滤器中，过滤至 50 ml 离心管中。4 °C 500 × *g* 离心 5 min，弃去上清。
8. 用适当体积预冷的 PBS + 2% FBS 重悬沉淀，用细胞计数板或流式细胞仪进行细胞计数。
9. 取 3 份 3 × 10⁶ 细胞，调整至 150 μl 体积，加入 2 μl (0.5 mg/ml) Purified CD16/32，置于冰上、80 rpm 摇床上封闭 30 min。
10. 其中 1 份细胞封闭后各加入 1 μl 以下抗体：Ter-119-APC，CD45-APC，Pdgfra-SuperBright 436，LepR-biotin，加入 0.2 μl CD31-PE/Cy7；1 份细胞封闭后加入 1 μl 以下抗体：Ter-119-APC-iso，CD45-APC-iso，Pdgfra-SuperBright 436，LepR-biotin；另 1 份细胞封闭后加入 1 μl 以下抗体：Ter-119-APC，CD45-APC，Pdgfra-SuperBright 436-iso，LepR-biotin-iso。以上 3 份细胞避光置于冰上、80 rpm 摇床上孵育 1 h。
11. 分别加入 1 ml PBS + 2% FBS 终止染色，500 × *g* 离心 5 min，弃去上清，150 μl 预冷的 PBS + 2%FBS 重悬，加入 1 μl (0.2 mg/ml) Streptavidin- APC/Cy7，置于冰上、80 rpm 摇床上孵育 30 min。
12. 分别加入 1 ml PBS + 2% FBS 终止染色，500 × *g* 离心 5 min，弃去上清，400 μl 预冷的 PBS + 2% FBS 重悬，每管加入 5 μl (50 μg/ml) 7-AAD，混匀后使用流式细胞仪收集数据。

结果与分析

小鼠骨髓 MSCs 在 Pdgfra⁺和 LepR⁺的细胞中富集，也有部分骨髓来源的 MSC 表达 CD51，并且上述 3 个标记物有较高的共表达比例 (Morikawa 等, 2009; Zhou 等, 2014; Yue 等, 2016)。还有报道发现，Nestin-GFP (Mendez-Ferrer 等, 2010), Gli1-cre (Zhao 等, 2014; Schneider 等, 2017), Gremlin 1 (Worthley 等, 2015) 和 N-cadherin (Zhao 等, 2019) 可富集骨髓 MSCs，但这些分子标记物需要依赖荧光报告工具小鼠，故在此不介绍具体方法。在此，我们使用的小鼠骨髓和骨内膜间充质干细胞的标志为 CD45⁻ Ter-119⁻ CD31⁻ LepR⁺或 CD45⁻ Ter-119⁻ CD31⁻ Pdgfra⁺。

图 3 为同型对照的结果及画门标准，图 4 和图 5 分别为骨髓和骨内膜间充质干细胞分析流式图和画门方法。首先以 FSC-A 和 SSC-A 为轴，画出主要细胞群，然后以 FSC-A 和 FSC-H 去除粘连细胞，画出单个细胞群，再根据 7-AAD 画出活细胞群 (7-

AAD⁻)。接下来根据实验需要划出 CD45⁻ Ter-119⁻ CD31⁻ LepR⁺和 CD45⁻ Ter-119⁻ CD31⁻ Pdgfra⁺细胞群，由流式结果可以得出，在骨髓和骨内膜 MSC 中 LepR 和 Pdgfra 均有较高的共表达比例。

图 3. LepR 与 Pdgfra 同型对照结果及画门标准

图 4. 小鼠骨髓间充质干细胞分析流式图

图 5. 小鼠骨内膜间充质干细胞分析流式图

失败经验

骨髓组织未被消化：

1. 消化酶活性丧失。
*MSC 消化酶配好后-20 °C 冰箱保存，尽快使用。
2. 消化未在 37 °C 160~220 rpm 摇床中进行。
*需保证震荡的转速达 160~220 rpm 及消化时温度维持至 37 °C。

无明显 MSC 分群：

1. 消化过度或不足。
*适当调整消化时间，消化骨髓组织时消化至没有肉眼可见骨髓组织为宜。
2. 消化酶活性不足。
*Liberase 干粉-20 °C 冰箱保存，MSC 消化酶配好后-20 °C 冰箱保存，尽快使用。
*MSC 消化酶使用前需在 37 °C 先预热，加入骨髓组织后先在 37 °C 水浴锅中孵育 10 min，摇床需提前设定 37 °C，保证震荡消化时温度维持至 37 °C。
3. DNase I 未添加或浓度不够。
*DNase I 的作用为消化细胞破裂后释放的游离 DNA，过多的游离 DNA 会缠绕细胞，导致消化不充分。但不同批号 DNase I 的质量与活性单位的换算比例不同，此处使用 Roche 公司 DNase I (10104159001)。
4. 使用了无钙离子的 HBSS。
*DNase I 需在钙离子存在下发挥消化作用，故需使用添加了钙离子的 HBSS。
5. 一抗或二抗浓度过低。
*适当提高抗体浓度。
6. 抗体孵育时间过短。
*适当延长孵育时间。
7. 置于室温孵育。
*置于室温孵育易导致非特异结合增加，应置于冰上摇床孵育。
8. 置于 4 °C 冰箱静置孵育。
*应在约 80 rpm 摇床中孵育。

溶液配方

1. MSC 消化酶

Liberase 5 mg

DNase I 250 μ l (20 mg/ml) 溶于 25 ml HBSS

-20 °C 保存

2. 磷酸缓冲液 (1× PBS)

使用去离子水稀释 PBS (10×) (去除钙、镁离子) 至 1×

3. 红细胞裂解液 (500 ml)

氯化铵 4.15 g

碳酸氢钠 500 mg

EDTA (粉末) 18.5 mg

使用去离子水定容至 500 ml, 4 °C 保存

参考文献

1. Mendez-Ferrer, S., Michurina, T. V., Ferraro, F., Mazloom, A. R., Macarthur, B. D., Lira, S. A., Scadden, D. T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G. N. and Frenette, P. S. (2010). [Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche.](#) *Nature* 466(7308): 829-834.
2. Morikawa, S., Mabuchi, Y., Kubota, Y., Nagai, Y., Niibe, K., Hiratsu, E., Suzuki, S., Miyauchi-Hara, C., Nagoshi, N., Sunabori, T., Shimmura, S., Miyawaki, A., Nakagawa, T., Suda, T., Okano, H. and Matsuzaki, Y. (2009). [Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow.](#) *J Exp Med* 206(11): 2483-2496.
3. Schneider, R. K., Mullally, A., Dugourd, A., Peisker, F., Hoogenboezem, R., Van Strien, P. M. H., Bindels, E. M., Heckl, D., Busche, G., Fleck, D., Muller-Newen, G., Wongboonsin, J., Ventura Ferreira, M., Puellas, V. G., Saez-Rodriguez, J., Ebert, B. L., Humphreys, B. D. and Kramann, R. (2017). [Gli1⁺ mesenchymal stromal cells are a key driver of bone marrow fibrosis and an important cellular therapeutic target.](#) *Cell Stem Cell* 20(6): 785-800 e788.

4. Worthley, D. L., Churchill, M., Compton, J. T., Tailor, Y., Rao, M., Si, Y., Levin, D., Schwartz, M. G., Uygur, A., Hayakawa, Y., Gross, S., Renz, B. W., Setlik, W., Martinez, A. N., Chen, X., Nizami, S., Lee, H. G., Kang, H. P., Caldwell, J. M., Asfaha, S., Westphalen, C. B., Graham, T., Jin, G., Nagar, K., Wang, H., Kheirbek, M. A., Kolhe, A., Carpenter, J., Glaire, M., Nair, A., Renders, S., Manieri, N., Muthupalani, S., Fox, J. G., Reichert, M., Giraud, A. S., Schwabe, R. F., Pradere, J. P., Walton, K., Prakash, A., Gumucio, D., Rustgi, A. K., Stappenbeck, T. S., Friedman, R. A., Gershon, M. D., Sims, P., Grikscheit, T., Lee, F. Y., Karsenty, G., Mukherjee, S. and Wang, T. C. (2015). [Gremlin 1 identifies a skeletal stem cell with bone, cartilage, and reticular stromal potential.](#) *Cell* 160(1-2): 269-284.
5. Yue, R., Zhou, B. O., Shimada, I. S., Zhao, Z. and Morrison, S. J. (2016). [Leptin receptor promotes adipogenesis and reduces osteogenesis by regulating mesenchymal stromal cells in adult bone Marrow.](#) *Cell Stem Cell* 18(6): 782-796.
6. Zhao, H., Feng, J., Seidel, K., Shi, S., Klein, O., Sharpe, P. and Chai, Y. (2014). [Secretion of shh by a neurovascular bundle niche supports mesenchymal stem cell homeostasis in the adult mouse incisor.](#) *Cell Stem Cell* 14(2): 160-173.
7. Zhao, M., Tao, F., Venkatraman, A., Li, Z., Smith, S. E., Unruh, J., Chen, S., Ward, C., Qian, P., Perry, J. M., Marshall, H., Wang, J., He, X. C. and Li, L. (2019). [N-cadherin-expressing bone and marrow stromal progenitor cells maintain reserve hematopoietic stem cells.](#) *Cell Rep* 26(3): 652-669 e656.
8. Zhou, B. O., Yue, R., Murphy, M. M., Peyer, J. G. and Morrison, S. J. (2014). [Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow.](#) *Cell Stem Cell* 15(2): 154-168.