

蒙古马脂肪来源间充质干细胞体外成脂和成骨诱导分化

刘宗正, 韦林盖, 苏小虎, 张焱如, 芒 来
(内蒙古农业大学 生命科学学院, 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要:取蒙古马背臀部皮下脂肪组织,通过 I 型胶原酶消化、离心等步骤分离培养脂肪组织来源的间充质干细胞 (Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, ADSCs), 经过原代培养和传代培养, 分别加入成脂诱导剂和成骨诱导剂培养, 采用倒置显微镜观察诱导后的细胞形态变化, 并通过油红 O 染色和茜素红染色法对其脂肪细胞和成骨细胞表型进行鉴定。结果显示: ADSCs 呈成纤维细胞样贴壁生长, 其经成脂、成骨诱导培养 2 周后形态、体积发生明显改变。经油红 O 染色, 细胞质内出现橙红色脂滴; 茜素红染色表明聚集的细胞团中央能形成钙化结节。说明马 ADSCs 经体外诱导培养后可向脂肪细胞和成骨细胞分化, 并具有明显的成脂和成骨表型, 表明 ADSCs 具有多向分化潜能。

关键词:蒙古马; 脂肪来源间充质干细胞; 脂肪细胞; 成骨细胞; 细胞分化

中图分类号: Q813.1; Q254

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2011)03-0097-04

Differentiation of Mongolia Horse Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells into Adipocytes and Osteoblasts *in Vitro*

LIU Zong-zheng, WEI Lin-gai, SU Xiao-hu, ZHANG Yan-ru, MANG Lai
(College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China)

Abstract: To investigate the multilineage differentiation capacity of mesenchymal stem cells isolated and cultured from equine adipose tissue, adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) were obtained from adipose tissue of Mongolia horse. The cells appeared like fibroblast in the culture medium. Adipose tissue was minced and digested with collagenase type I. The obtained cells were plated and expanded in DMEM/F12 medium. Whereas the passage cells were cultured in adipogenesis medium and stained with Oil Red O for identification. The cells were cultivated in osteoblast-inducing culture medium, and osteoblast phenotype was assayed with Alizarin Red staining. The cells were daily observed under inverted microscope. Results indicated that ADSCs grew as adherent cells, appeared like fibroblast *in vitro*, stably proliferate and passed. Under the inverted microscope, significant lipid drops were found around the cell nucleus after adipogenesis-inducing cultivation. Alizarin Red staining resulted in the formation of mineralized nodules in extracellular matrix. It proved that ADSCs isolated and cultured from equine adipose tissue can be induced to adipogenesis and osteo-inducing, suggesting that the cells have multilineage differentiation.

Key words: Mongolia horse; adipose tissue-derived mesenchymal stem cells; adipocytes; osteoblasts; cell differentiation

脂肪间充质干细胞 (Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, ADSCs) 是从脂肪组织中分离出来的具有多向分化能力的成体干细胞。它具有和骨髓间充质干细胞 (Bone marrow-derived mesenchymal

收稿日期: 2011-02-28

作者简介: 刘宗正 (1985—), 男, 硕士研究生; 通信作者: 张焱如 (1964—), 女, 教授, 博士, E-mail: yanru1964@163.com; 芒来 (1962—), 男, 教授, 博士, E-mail: dmanglai@yahoo.com.cn

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金 (2009MS0408); 内蒙古农业大学科技创新团队“内蒙古马业科学研究与开发利用”支撑计划 (NDTD2010-12)

stem cells, BMSCs)相似的表型和多向分化能力,可以向脂肪细胞、成骨细胞、软骨细胞、平滑肌细胞、心肌细胞、肝细胞、神经细胞、内皮细胞、内分泌细胞、造血细胞等多个方向分化^[1]. 脂肪干细胞来源丰富,易于从自身获取,对机体损伤较小,能满足种子细胞具备的基本条件,有可能替代 BMSCs,成为兽医临床细胞治疗的种子细胞^[2-3].

马在训练和竞技比赛中常会出现肌肉、韧带拉伤、骨骼裂缝,甚至出现骨折损伤,在治疗马因运动导致的这些损伤时,ADSCs无疑具有广阔的应用前景.为此,我们以蒙古马为试验对象,研究其 ADSCs 的体外分离、纯化、扩增以及定向分化条件,为建立马 ADSCs 细胞体外快速分离、增殖分化体系,并将马 ADSCs 应用于其运动损伤的临床细胞治疗提供理论依据和技术方法,同时对人类临床医学的细胞治疗提供方法借鉴.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 6岁雄性蒙古马,内蒙古农业大学动物科技学院动物园提供.

1.1.2 主要试剂 DMEM 培养基(Gibco, USA),胎牛血清(Hyclone, USA), β -磷酸甘油钠(β -GP),胰岛素(丹麦公司),IBMX(1-甲基-3-异丁基-黄嘌呤)(Biosource, USA),吡啶美辛(Cayman Chemical, USA),油红 O(Sigma, USA),培养板、培养瓶(Corning, USA).

1.2 方法

1.2.1 马 ADSCs 的分离与培养 马自然站立,按体质量皮下注射地托咪定(0.04 mg/kg)使之镇静 30 min,臀部皮下注射 2% 的利多卡因 3 mL 进行局部麻醉,在已麻醉的臀部皮肤和皮下刮取约 50 g 脂肪组织.脂肪组织首先用 PBS 冲洗 2 次,无菌条件下手术刀切碎脂肪组织,分装入 50 mL 离心管中,加入与脂肪组织等体积的 PBS(含有 φ 为 1% 的 BSA, I 型胶原酶 7.5 mg/mL),37 °C 温箱中震荡酶解 60 min,1 200 r/min 转速下离心 10 min,除去上层脂肪组织,加入等体积红细胞裂解液作用 20 min,离心弃上清液,基本培养基重悬沉淀,即得到脂基质干细胞.

细胞培养:按细胞 $6 \times 10^5 \text{ cm}^{-2}$ 的接种密度,在 T75 培养瓶中加入 15 mL 基本培养基(DMEM + φ 为 1% 的氨苄 + φ 为 10% 的 FBS),于 37 °C、 $\varphi(\text{CO}_2)$ 为 5% 条件下对 ADSCs 进行培养.当贴壁细胞的生长达到 80% 融合时,即可进行传代培养.

1.2.2 生长曲线的绘制 取马 ADSCs 常规消化、计

数,调整细胞浓度为 $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$,接种于 96 孔细胞培养板,每孔 100 μL . 每日取 3 孔,消化计数,计算均值,以接种后培养时间为横坐标,细胞数为纵坐标,绘制生长曲线.根据 Patterson 公式 $T_D = t \lg 2 / \lg(N_t / N_0)$ 计算细胞群体倍增时间,式中, T_D :细胞倍增时间; t :细胞培养时间; N_t :培养细胞终末数目; N_0 :培养细胞起始数目.

1.2.3 脂肪诱导分化 取传代培养 3 代(P3)的 ADSCs,在培养板中加入成脂诱导培养基(DMEM/F12 + φ 为 3% 的 FBS + φ 为 1% 的 antibiotic + 33 $\mu\text{mol/L}$ 生物素 + 17 $\mu\text{mol/L}$ 泛酸 + 1 $\mu\text{mol/L}$ 胰岛素 + 1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松 + 0.5 mmol/L IBMX + 5 $\mu\text{mol/L}$ 罗格列酮 + φ 为 5% 的兔血清)培养 3 d,然后换为无罗格列酮和 IBMX 的维持培养基继续培养,每 3 d 更换 1 次新鲜分化培养基.之后用 φ 为 10% 的甲醛室温下固定 20 min,油红 O 染色 20 min,蒸馏水冲洗 3 次,相差显微镜下观察脂滴的形成.

1.2.4 成骨诱导分化 将 P3 代 ADSCs 置于成骨诱导培养基(含 DMEM-Ham'sF12、 φ 为 10% 的 FBS、 φ 为 1% 的氨苄、10 mmol/L β -2 磷酸甘油、20 nmol/L 地塞米松、50 $\mu\text{g/mL}$ 抗坏血酸)中诱导培养 7 ~ 14 d,每 3 d 换液 1 次.用 150 nmol/L NaCl 冲洗 3 次, φ 为 70% 的乙醇 4 °C 固定,0.02 g/mL(pH 4.2)茜素红染色 10 min,蒸馏水冲洗 5 次,相差显微镜下观察矿化骨结节的形成.

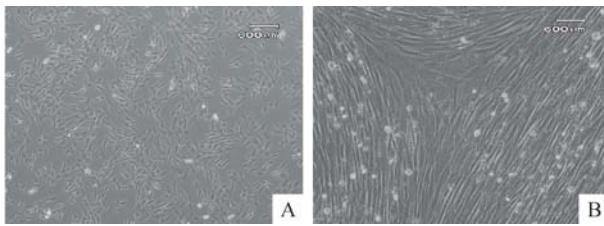
2 结果与分析

2.1 蒙古马 ADSCs 的原代及传代培养

原代培养的 ADSCs 细胞呈球形,混杂少许血细胞,培养 3 d 后,零星有 ADSCs 细胞开始贴壁生长,细胞形态逐步变为多角形,培养第 6 天第 2 次换液时,混杂的其他细胞因不贴壁被清除,贴壁细胞数明显增多.培养 7 d 后,细胞达到 50% 贴壁(图 1A),约 9 d 左右汇合达到 80% 以上,原代培养的细胞大多呈现梭形,集落形成少.培养 9 d 后传代,传代细胞增殖迅速,呈放射状向周围扩展,逐渐与邻近集落相互汇合.P3 代后的细胞形态基本一致,生长细胞为均一长梭形,6 ~ 7 d 细胞再次达 80% 汇合(图 1B).

2.2 ADSCs 生长曲线

蒙古马 ADSCs 生长曲线呈 S 形(图 2).接种后第 1 天为潜伏适应期,从第 2 天起细胞开始贴壁增殖,接着进入对数生长期,约 8 d 后达到对数生长期的峰值,以后进入平台期.由图 2 可以看出,P1、P3、P10 代细胞生长速度差异不大.经计算得知蒙古马 ADSCs 细胞倍增时间为 24 h.



A:ADSCs 原代培养 7 d;B:ADSCs 传代 P3 培养 7 d.

图 1 蒙古马脂肪干细胞的培养鉴定

Fig. 1 Culture and identification of Mongolia horse ADSCS

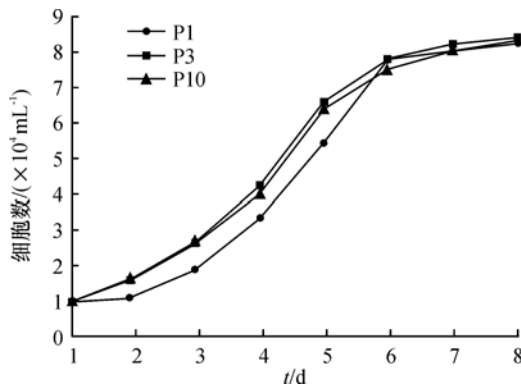
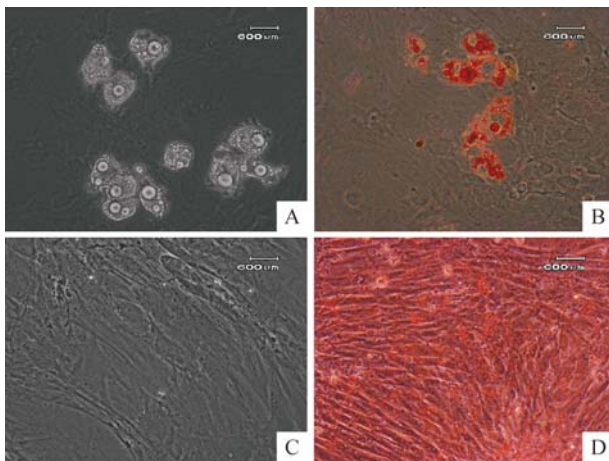


图 2 蒙古马脂肪间充质干细胞生长曲线

Fig. 2 Growth curve of Mongolia horse ADSCs

2.3 脂肪细胞诱导分化

经成脂诱导 3 d,蒙古马 ADSCs 细胞由梭形逐渐变为多角形,小部分细胞质内开始出现小脂滴,主要位于核周边.诱导后 7 d,部分细胞脂滴增多,聚集成较大的脂泡.诱导后 14 d,大部分细胞转为成脂肪细胞,呈圆形或椭圆形,细胞质内可见大量脂滴(图 3A).油红 O 染色发现大部分细胞质内大小不一的脂滴呈橘红色,细胞核被挤于细胞一侧或中央(图 3B).对照组基本无脂滴形成(图 3C、3D).



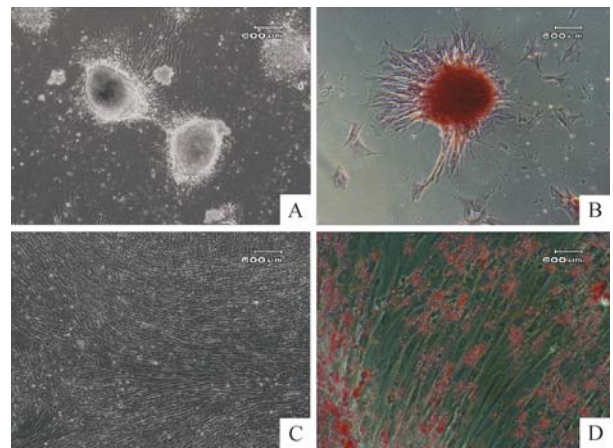
A:ADSCs 成脂诱导,未染色;B:ADSCs 成脂诱导,油红 O 染色阳性;C:未 ADSCs 成脂诱导,未染色;D:未 ADSCs 成脂诱导,油红 O 染色阴性.

图 3 脂肪干细胞成脂诱导

Fig. 3 Adipo-tissue derived MSCs were induced into fat cells

2.4 成骨细胞诱导分化

成骨诱导培养 7~9 d 后,成骨分化迹象开始出现,诱导组细胞于第 13 天左右可见细胞矿化钙结节出现,第 21 天时钙结节形成更明显(图 4A).茜素红染色诱导组细胞于第 7 天即可见阳性反应,细胞表面出现较多红色着色.第 21 天时钙结节更明显,染色可见细胞聚集处出现的红色钙结节(图 4B).对照组基本无矿化结节形成(图 4C、4D).



A:加入成骨诱导剂 21 d 的 ADSC,未染色;B:加入成骨诱导剂 21 d 的 ADSC,茜素红染色阳性;C:未加成骨诱导剂的 ADSC,未染色;D:未加成骨诱导剂的 ADSC,茜素红染色阴性.

图 4 脂肪干细胞成骨诱导

Fig. 4 Adipo-tissue derived MSCs were induced into bone formation cells

3 讨论与结论

3.1 马脂肪干细胞的分离培养

2001 年 Zuk 等^[4]首次从人抽脂术中抽取的脂肪组织悬液中分离获得了多向分化干细胞.脂肪来源间充质干细胞从此被人们认识,并进入干细胞研究领域.由于脂肪组织分布广泛,体内储备量大,可保证充足的细胞来源,相对于骨髓间充质干细胞而言,体外提取时对机体损伤较小,越来越受到人们的重视.近些年人们相继从人^[5-6]、小鼠、大鼠、兔和猪^[7-9]等动物体内分离得到类似的脂肪间充质干细胞,但对马、牛这类大动物的脂肪干细胞研究较少.本文利用胶原酶解法结合贴壁筛选纯化法成功获得了蒙古马 ADSCs,所获细胞纯度更高,在体外多次传代能保持良好的增殖和分化能力,生物学活性优良.随培养时间的延长和传代次数的增加,细胞形态均一,呈成纤维细胞状生长.用细胞计数的方法对蒙古马 ADSCs 进行了生长曲线的测定,细胞接种后 1~3 d 为增殖潜伏期,第 5 天为指数增生期,第 9 天进入平台期.经计算,蒙古马 ADSCs 培养细胞倍增时间为 24 h.

3.2 诱导成脂、成骨分化特性

本试验经成脂诱导剂培养基诱导培养 14 d 后, 90% 以上 ADSCs 转化为脂肪细胞. 据文献[9-10]报道 ADSCs 传至 P15 代仍具较强向脂肪细胞定向分化的能力, 而骨髓来源的 BMSC 在传代 3 代后其定向脂肪细胞分化的能力大大减弱, 提示 ADSCs 细胞在脂肪细胞定向分化方面较 BMSCs 有更好的潜能.

在成骨诱导分化试验中, 经成骨诱导剂(地塞米松、 β -甘油磷酸钠和左旋抗坏血酸)培养基诱导分化, 培养 7~9 d 后, 成骨分化迹象开始出现, 13 d 左右可见细胞矿化钙结节出现, 21 d 时茜素红染色显示钙结节形成更明显, 而矿化结节是成骨细胞分泌的功能指标^[11-13], 证明 ADSCs 具有向成骨细胞分化的能力. β -甘油磷酸钠能作为碱性磷酸酶的底物, 供给体外钙化所需的磷酸根离子, 促进生理性钙盐的沉积和钙化, 是 ADSCs 形成矿化结节的必要条件^[14]. 维生素 C 能促进细胞合成胶原和形成钙化. 地塞米松可促进成骨细胞的分化成熟, 促进细胞外基质胶原合成^[15].

迄今为止尚未发现 ADSCs 具有鉴定意义的特异性表面标志, 对其进行鉴定比较困难^[12]. 本试验成功地诱导蒙古马 ADSCs 分化为脂肪细胞和成骨细胞, 可以作为 ADSCs 鉴定的一条间接途径, 同时, 也进一步验证 ADSCs 的多向组织分化潜能. 干细胞必须具有自我更新和多向分化能力, 至少能向 2 个方向进行分化. 本试验中诱导 ADSCs 向成骨和成脂方向分化成功, 说明得到的 ADSCs 确实是脂肪组织中存在的干细胞.

3.3 结论

本研究基本掌握了较为稳定的蒙古马 ADSCs 分离、体外培养扩增及定向诱导分化的方法. 分离获得马的 ADSCs 与其他哺乳类如人、牛、兔、大鼠等类似, 在体外培养时表现出较高的增殖速率和多向分化潜能. 对于今后利用马脂肪干细胞构建自体细胞组织工程化骨奠定了必要的基础, 也将使赛马运动损伤的细胞治疗尽快成为可能, 并使之尽早进入临床应用. 同时研究结果对人类医学的临床细胞治疗提供技术与方法借鉴.

参考文献:

[1] JOSÉ J M, ALEJANDRO E, PAULETTE C. Mesenchymal Stem Cell[J]. SEBM, 2001, 226:507-520.
 [2] ROBERT J D, ANNEMARIE B M. Mesenchymal stem cell: Biology and potential clinical uses[J]. J Exp Hematol, 2008, 28(8):875-884.
 [3] HONGSEN C, HUANG Yi-you, JIANG Ching-chuan. Re-

pair of articular cartilage injury[J]. BME, 2005, 17(5): 243-251.

- [4] ZUK P A, ZHU M, MIZUNO H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies[J]. Tissue Eng, 2001, 7(2): 211-228.
 [5] DE-UGARTE D A, MORIZONO K, ELBARBARY A, et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow[J]. Cells Tissues Organs, 2003, 174(3): 101-109.
 [6] MARK F P, ALASTAIR M M, STEPHEN C B, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284:143-147.
 [7] REZA I, CYNTHIA T, BINDIYA P, et al. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue[J]. J Cell Biochem, 2006, 99:1285-1297.
 [8] OUSUKE H, YOSHIHIRO K, MOTOHIRO H. Comparison of osteogenic ability of rat mesenchymal stem cells from bone marrow, periosteum, and adipose tissue[J]. Calcif Tissue Int, 2008, 82:238-247.
 [9] BOQUEST A C, SHAHDADFAR A, FRONSDAL K, et al. Isolation and transcription profiling of purified uncultured human stromal stem cells: Alteration of gene expression after in vitro cell culture[J]. Mol Biol Cell, 2005, 16(3): 1131-1141.
 [10] GUILAK F, LOTT K E, AWAD H A, et al. Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells[J]. J Cell Physiol, 2006, 206:229-237.
 [11] HALVORSEN Y, FRANKLIN D, BOND A L, et al. Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells[J]. Tissue Eng, 2001, 7(6): 729-741.
 [12] SCHÄFFLERA, BÜCHLER C. Concise review: Adipose tissue-derived stromal cells-basic and clinical implications for novel cell-based therapies[J]. Stem Cells, 2007, 25(4): 818-827.
 [13] MERTIN A V, GAIL E K, MANDI J L, et al. Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: Adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells[J]. Vet Surgery J, 2007, 36:613-622.
 [14] 单秀莉, 王青, 林志勇, 等. 大鼠脂肪干细胞体外定向诱导分化为成骨细胞的研究[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2006, 16(8): 441-445.
 [15] 高晓增, 张柳, 李任增, 等. 地塞米松在人骨髓基质细胞诱导成骨细胞中的作用[J]. 中国骨质疏松杂志, 2006, 12(1):50-53.