

大鼠脂肪基质干细胞的培养及其向成骨细胞分化的研究

王骏骅, 杨惠林, 耿德春, 唐天驹, 陈 亮

(苏州大学附属第一医院骨科 215006 江苏省苏州市)

【摘要】目的:研究大鼠脂肪基质干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)分离培养的方法,探讨大鼠脂肪基质干细胞在体外向成骨细胞分化的能力。**方法:**取成年 Sprague-Dawley 大鼠腹股沟处脂肪组织,胶原酶消化分离,接种于自制基础培养基中分离传代。于基础培养基中传至第二代时改换诱导培养基,诱导向成骨细胞分化,培养 2~4 周,用碱性磷酸酶染色和 Von Kossa 染色鉴定成骨细胞分化能力。**结果:**大鼠脂肪中能够分离培养出生长旺盛的脂肪基质干细胞;经向成骨细胞诱导培养后,碱性磷酸酶染色和 Von Kossa 染色阳性,证实细胞能够分化为成骨细胞。**结论:**大鼠脂肪组织可分离培养出脂肪基质干细胞,生物学特性与骨髓基质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)相似,能够向成骨细胞分化,有望成为组织工程的种子细胞来源。

【关键词】脂肪组织;脂肪基质干细胞;成骨细胞;大鼠

中图分类号:Q813.1 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2005)-09-0553-03

Culture and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells in Sprague-Dawley rat/WANG Junhua, YANG Huilin, GENG Dechun, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2005, 15 (9): 553-555

【Abstract】 Objective: To study the method of isolating and culturing stem cells from rat adipose tissue and to determine the osteogenic capacity of adipose-derived stromal cells (ADSCs) harvest from rat in vitro. **Method:** ADSCs isolated from rat inguinal fat pads were digested with collagenase. After primary culture in control medium and expansion to the 2nd passages, the cells were incubated in induced medium for 2~4 weeks to induce osteogenesis. Osteogenic differentiation was tested by alkaline phosphatase and Von Kossa staining. **Result:** ADSCs could be isolated from rat adipose tissue, after osteogenesis induction, the result for alkaline phosphatase and Von Kossa staining was positive. **Conclusion:** Adipose-derived stromal cells can be isolated from rat adipose tissue, their biological characteristics are analogy to mesenchymal stromal cells (MSCs), and have the potential to differentiate into osteogenic lineage. It may be a source for tissue engineering.

【Key words】 Adipose tissue; Adipose-derived stem cells; Osteocyte; Rat

【Author's address】 Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital, Suzhou University, Suzhou, 215006, China

目前关于组织工程种子细胞的研究主要集中在骨髓来源的基质干细胞,体外与体内试验都已证实骨髓基质干细胞具有向成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞以及神经细胞等分化的能力^[1,2],在组织工程中显示出广阔的应用前景。但传统的骨髓获取手段会导致取材点的疼痛,且骨髓基质干细胞的纯化率较低,仅为 $1 \times 10^5/30\text{ml}$ 骨髓^[3]。脂肪同骨髓一样起源于中胚层,2001 年 Zuk^[4,5]等从人脂肪

组织中分离培养出一种多能基质干细胞,认为该细胞也能够向成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞及肌细胞分化,因此将其命名为脂肪基质干细胞。最近还有人证实其可以分化为心肌细胞^[6]。本研究旨在探讨大鼠脂肪基质干细胞的分离培养方法及该细胞是否具有向成骨细胞分化的能力,以期证实脂肪组织可作为干细胞库的来源,成为组织工程的种子细胞来源。

第一作者简介:男(1978-),住院医师,医学硕士,研究方向:脊柱外科

电话:(0512)65223637-8493 E-mail:wangjunhua@163.com

1 材料与方法

1.1 实验动物及材料

Sprague-Dawley 雄性大鼠 12 只, 体重 300g 左右(苏州大学动物试验中心提供); CO₂ 培养箱; 超净工作台; 倒置显微镜; DMEM、胎牛血清(FBS) (购自 Gibicol 公司); naphthol ASBI、Fast Red TR (购自 Sigma 公司)。基础培养基配方: DMEM, 10%FBS, 100U/ml 青霉素, 100U/ml 链霉素; 诱导培养基配方: DMEM, 10%FBS, 0.1 μ M 地塞米松, 50 μ M 维生素 C, 10mM β -甘油磷酸钠, 100U/ml 青霉素, 100U/ml 链霉素; 碱性磷酸酶染色液配方为: 1% naphthol ASBI, 1mg/ml Fast Red TR。

1.2 实验方法

1.2.1 脂肪基质干细胞的分离和培养 动物称重后, 戊巴比妥钠过量麻醉处死, 无菌条件下取出腹股沟处脂肪(因大鼠腹股沟脂肪较少, 故为了取得足够的脂肪组织, 取 12 只大鼠的脂肪共同分离培养), 尽量剔除软组织和小血管, PBS 缓冲液冲洗 3~5 次, 将脂肪组织剪成小块, 用含 30% 抗生素的 DMEM 浸泡 30~50min, PBS 缓冲液反复冲洗, 37℃ 下 0.075% I 型胶原酶消化 30min, 含 10% FBS 的 DMEM 等体积中和, 1000 转/min 离心 10min 后弃去上清, 160mmol/L NH₄Cl 裂解红细胞 10min, 离心弃去上清, 含 10%FBS 的 DMEM 重悬细胞, 筛网过滤后离心, 以 10⁶/ml 密度接种至含基础培养基的培养瓶。48h 后换液, 除去未贴壁细胞。细胞生长至亚融合状态时传代, 37℃ 下 0.25% 胰酶消化, 离心弃上清, 细胞稀释 2~3 倍接种至培养瓶, 每 3d 更换培养基。

1.2.2 成骨细胞分化 培养至第二代的细胞, 胰酶消化后, 以 10⁵ 个/ml 密度接种传代, 基础培养基培养 1d 后更换为诱导培养基, 每 3d 更换培养基。

1.2.3 碱性磷酸酶染色 成骨方向诱导培养至第 2 周的细胞, 吸出培养液, 用缓冲液冲洗, 37℃ 染色 30min, 8% 多聚甲醛固定 10min, 自来水冲洗后荧光显微镜下观察。

1.2.4 Von Kossa 染色 成骨方向诱导培养至第 2 周的细胞, 吸出培养液, 用缓冲液冲洗, 4% 多聚甲醛固定 60min, 5% 硝酸银避光孵育 30min, 自来水冲洗, 尽量去除染色液, 紫外线照射 1h 后, 显微镜下观察。

2 结果

2.1 脂肪基质干细胞原代培养及传代生长情况

原代细胞开始培养时, 细胞短小, 呈圆形或类圆形, 胞体透亮, 悬浮于培养液中, 24h 后可见瓶底有少量细胞贴壁, 48h 贴壁细胞明显增多, 并开始分裂增殖, 以分散集落方式生长(图 1a, 后插页 I)。待长满培养瓶趋于融合时, 细胞变得细长呈纺锤形, 形态与骨髓基质干细胞相似(图 1b, 后插页 I)。在基础培养基中, 传代培养的细胞 2d 左右可增殖 1 倍。

2.2 成骨细胞诱导

诱导培养的细胞形态逐渐发生变化, 由纺锤形向立方形转化, 与人骨髓基质干细胞向成骨方向诱导类似。

2.3 成骨细胞鉴定

诱导至 2 周后的细胞进行成骨细胞鉴定, 碱性磷酸酶染色阳性(图 2, 后插页 I), 表明诱导细胞有内源性碱性磷酸酶表达; Von kossa 染色阳性, 细胞周围可见黑色斑块(图 3, 后插页 I), 说明诱导培养的细胞外基质中有钙化结节出现。

3 讨论

Friedenstein^[7]在 20 世纪 70 年代发现骨髓中的单个核细胞经培养可分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞等。Owen^[8]证实, 骨髓基质细胞中的成纤维细胞集落形成单位(CFU-F)具有多向分化潜能, 将之称为骨髓基质干细胞。对培养传代的骨髓基质干细胞用地塞米松、 β -甘油磷酸钠和 L-维生素 C 等单独或联合诱导, 可以形成聚集体或矿化结节, 碱性磷酸酶活性增强, 基质明显钙化, 出现钙盐沉积, 细胞分化为成骨细胞。其后, 骨髓基质干细胞被广泛地应用于组织工程的研究, 但人体骨髓取材不易且量少, 不能满足实验及临床应用的需要。脂肪组织同骨髓一样起源于中胚层, 因此有学者假设在脂肪组织中是否同样存在具有多向分化潜能的干细胞。Zuk 等^[4]在 2001 年从人脂肪组织中分离出具有多向分化潜能的基质干细胞, 认为其也具有向成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞及肌细胞分化的能力。

在本研究中, 我们采用胶原酶消化分离的方法, 成功地从 SD 大鼠脂肪组织中分离培养出脂肪基质干细胞, 脂肪基质干细胞向成骨方向诱导后, 细胞形态发生变化, 由纺锤形向立方形转化, 与人骨髓基质干细胞向成骨方向诱导类似。对诱导传代细胞进行成骨细胞鉴定, 碱性磷酸酶染

色阳性,表明诱导细胞有内源性碱性磷酸酶表达;Von Kossa 染色阳性,说明诱导细胞外基质中有钙化结节出现,证明分化形成的细胞为成骨细胞^[9,10]。体外试验证实该细胞具有向成骨细胞分化的能力。

同时实验过程中还发现脂肪基质干细胞贴壁能力强,体外易于培养,营养需求低,在基础培养基中生长旺盛,体外倍增时间约 16h,48h 左右可传代,快于同步培养的骨髓基质干细胞^[4,11]。与骨髓基质干细胞相比,脂肪基质干细胞可能更易于在体外培养中大量扩增,从而获得足够的细胞量以满足实验及临床应用的需要。

本研究证实,自大鼠的脂肪组织中能够分离培养出脂肪基质干细胞,生物学特性与骨髓基质干细胞相似,在体外具有向成骨细胞分化的能力。与骨髓基质干细胞相比,脂肪基质干细胞具有显著的优越性:(1)脂肪组织容易获得,可以避免骨髓获取细胞造成的损伤;(2)患者本身来源的细胞能够进行自体移植,可以克服异体的免疫排斥;(3)脂肪基质干细胞易于培养,纯化率高,体外增殖速度快,不必进行永生化处理就能获得足够量的细胞用于移植。因此脂肪基质干细胞可以作为组织工程的种子细胞,但对该细胞在体内的分化能力尚需进一步试验证实。

4 参考文献

1. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284:143-147.
2. Satake K, Lou J, Lenke LG. Migration of mesenchymal stem cells through cerebrospinal fluid into injured spinal cord tissue[J]. Spine, 2004, 29(18):1971-1979.
3. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation [J]. J Cell Biochem, 1997, 64 (2):278-294.
4. Zuk PA, 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. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells [J]. Mol Biol Cell, 2002, 13 (12):4279-4295.
6. Rangappa S, Fen C, Lee EH, et al. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes[J]. Ann Thorac Surg, 2003, 75(3):775-779.
7. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers[J]. Cell Tissue Kinet, 1987, 20(3):263-272.
8. Owen ME. Marrow stromal stem cells[J]. J Cell Sci Suppl, 1988, 10(5):634.
9. Wickham MQ, Erickson GR, Gimble JM, et al. Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee[J]. Clin Orthop Relat Res, 2003, 412:192-212.
10. Yagami K, Uyama Y, Yoshizawa Y, et al. A human chondrogenic cell line retains multi-potency that differentiates into osteoblasts and adipocytes[J]. Bone, 2004, 34(4):648-655.
11. Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, et al. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects[J]. Nat Biotechnol, 2004, 22(5):560-567.

(收稿日期:2005-03-28 修回日期:2005-06-29)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 彭向峰)

消息

欢迎订阅《中国药理学通报》

《中国药理学通报》是国家级核心期刊和权威的文献源期刊,主要刊登药理学研究论文。多次荣获国家及华东地区优秀科技期刊奖,2003、2005 年两获国家期刊奖百种重点期刊奖;被国家权威机构认定为医学类、药学类核心期刊,并被几乎所有国内相关检索性期刊及数十种国外著名检索期刊收录、利用。连续 9 年名列美国《CA 千种表》,1997 年摘引量曾名列美国《CA 千种表》收录的中国医药期刊第 1 名。本刊 1999、2002、2004 年分别获国家自然科学基金和中国科协资助基础性和高科技期刊专项资金资助。

医师用药要懂药理,药师药研人员更要懂药理。中国药理学通报,医师药师都需要。

《中国药理学通报》为月刊,大 16 开 128 页,彩色铜版纸印刷,每期定价 15.00 元(零售:20 元/期),全年 180.00 元。邮发代号:26-52,请及时向当地邮局订阅,漏订读者请直接汇款至我刊编辑部(零售价:每期 20 元),免收邮寄费。地址:安徽省合肥市安徽医科大学校内《中国药理学通报》编辑部,邮编:230032,联系人:吴慧、程西望、武明静。电话:(0551)5161221、5161222,电子信箱:cpb@ahmu.edu.cn。