

大鼠脂肪干细胞培养中一种特异细胞的表型与成骨诱导***☆

王福科¹, 刘流¹, 何晓光¹, 赵德萍², 代晓明¹, 李逸松¹

Ossification induction and phenotype of a special cell in culture process of rat adipose-derived stem cells

Wang Fu-ke¹, Liu Liu¹, He Xiao-guang¹, Zhao De-ping², Dai Xiao-ming¹, Li Yi-song¹

Abstract

BACKGROUND: In previous experiment, a type of special cell that mixed fusiform adipose-derived stem cells (ADSCs) was found. A great quantity of polyhedral cells offer nest shape growth and take on cobblestone shape morphology. This is closely related cells to ADSCs, and it is necessary to clarify its nature.

OBJECTIVE: To determine the nature of the special cell by analysis of this specific phenotype and the induction of bone formation of these cells.

METHODS: Rat ADSCs were isolate and cultured by collagenase I, cultured by the medium containing fetal bovine serum. The immunofluorescence method was used to observe expressions and distributions of some special surface marker of the polygonal and fibroblastic cells, such as CD34, CD90, CD133 and Flk-1. Cells at passage 2 were obtained and induced by osteoinductive culture medium. Alkaline phosphatase (ALP) and Von Kossa staining were done on day 14 to test the characteristic of ossification.

RESULTS AND CONCLUSION: ①Shape of cells cultured in fetal bovine serum (FBS) showed that a great quantity of polyhedral cells offered nest growth and took on cobblestone morphology, and the fusiform cells were visible. ②The fusiform cells were positive for CD90 and negative for CD34, CD133 and Flk-1; the polyhedral cells were positive for CD34 and Flk-1, and a part of polyhedral cells were positive for CD133, and negative for CD90. ③ In the process of ALP staining, a great quantity of polyhedral cells died, forming blank region; that of some fusiform cells was positive. ④The polyhedral cells died in the process of Von Kossa staining, presenting blank region; a part of fusiform cells formed red calcium nodus. The results have shown that the special cell is vascular endothelial cells in the culture process of rat ADSCs.

Wang FK, Liu L, He XG, Zhao DP, Dai XM, Li YS. Ossification induction and phenotype of a special cell in culture process of rat adipose-derived stem cells. 2010;14(40): 7509-7512. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 前期实验在大鼠脂肪干细胞培养中发现了梭形细胞中混杂一种特异细胞, 呈巢状生长, 形成铺路石样形态。这种细胞和脂肪干细胞关系密切, 有必要明确其性质。

目的: 分析这种特异细胞的表型及诱导成骨特性以判断这种细胞的性质。

方法: 采用 I 型胶原酶分离大鼠脂肪干细胞, 置于含有胎牛血清的培养基中培养, 免疫荧光法检测培养梭形细胞、多角细胞的 CD34、CD133、CD90、Flk-1 表面标志; 取第 2 代细胞, 以成骨诱导液诱导分化, 于培养 14 d 进行碱性磷酸酶和钙染色检验特异细胞的成骨分化特性。

结果与结论: ①胎牛血清培养的脂肪干细胞可见大量多角细胞呈巢状生长, 形成铺路石样形态, 间或有梭形细胞存在。②梭形细胞 CD90 为阳性, CD34、Flk-1、CD133 为阴性; 多角形细胞 CD34、Flk-1 均为阳性, CD133 部分为阳性, CD90 为阴性。③碱性磷酸酶染色多角状细胞多数死亡, 形成空白区, 梭形细胞呈碱性磷酸酶阳性。④茜素红染色多角状细胞死亡, 形成空白区, 梭形细胞集聚形成红色钙结节影。结果证实脂肪干细胞培养中的特异细胞为血管内皮细胞。

关键词: 脂肪干细胞; 免疫荧光; 血清; 血管内皮细胞; 干细胞培养与分化

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.40.022

王福科, 刘流, 何晓光, 赵德萍, 代晓明, 李逸松. 大鼠脂肪干细胞培养中一种特异细胞的表型与成骨诱导[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(40):7509-7512. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

近来研究发现脂肪组织中存在一类间充质干细胞称为处理过抽脂术细胞, 因其克隆细胞株的增殖能力强, 具有多向分化潜能, 在体外培养中保持稳定的生长增殖活性, 具有与骨髓间充质干细胞一样的多向分化潜能, 故又被称为脂肪干细胞^[1]。骨髓间充质干细胞

CD49d⁺CD106⁺, 而脂肪间充质干细胞为 CD49d⁺CD106⁻[2-4]。脂肪组织来源广泛, 取材方便, 可获得基质细胞数量大^[5], 易于培养扩增, 具有多向分化潜能^[6], 越来越成为有希望在临床上应用的组织工程种子细胞之一。

在大鼠脂肪干细胞培养中, 逐渐发现梭形的干细胞中混杂了一种特殊的细胞, 这种细胞成多角形, 呈巢状生长, 形成铺路石样形态。作者认为这种细胞和脂肪干细胞关系密切, 有

¹Department of Head and Neck Surgery, ²Experimental Center, First Affiliated Hospital, Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Wang Fu-ke☆, Doctor, Lecturer, Department of Head and Neck Surgery, First Affiliated Hospital, Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China
wfk.04@126.com

Correspondence to: Liu Liu, Professor, Doctor, Doctoral supervisor, Department of Head and Neck Surgery, First Affiliated Hospital, Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China
liuliu3939@126.com

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30960388; the Special-Purpose Foundation Program of Department of Science and Technology of Yunnan Province, No. 2007C0007R*; the Doctor Innovation Foundation Program of Kunming Medical College, No. KM2007D03*

Received:2010-03-26
Accepted:2010-04-21

昆明医学院第一附属医院, 1头颈外科, 2实验中心, 云南省昆明市 650032

王福科☆, 男, 1975年生, 河南省焦作市人, 汉族, 2009年昆明医学院毕业, 博士, 讲师, 主要从事骨组织工程研究。wfk.04@126.com

通讯作者: 刘流, 教授, 博士, 博士生导师, 昆明医学院第一附属医院头颈外科, 云南省昆明市 650032 liuliu3939@126.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)40-07509-04

收稿日期: 2010-03-26
修回日期: 2010-04-21 (20100130008/GW-Q)

必要明确其性质。

本研究研究这种特异细胞的细胞表型和诱导成骨特性, 以判断这种细胞的具体性质, 以便进一步研究其与脂肪干细胞的关系。

1 材料和方法

设计: 单一样本观察, 细胞学体外实验。

时间及地点: 于2007-10/2009-12在中国科学院昆明动物研究所完成(国家级重点实验室)。

材料: 18周龄SD大鼠1只, 由昆明医学院动物科提供(动物生产许可证号 SCXK(滇)2005-0008号), 体质量(200±10)g, 雌雄不拘。实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。

主要仪器:

仪器	来源
超净工作台	Thermo Scientific
滤网, 恒温 CO ₂ 培养箱	Thermo Scientific
低温自动平衡离心机	北京医用离心机厂
倒置显微镜	Olympus
荧光显微镜	Applied Imagine

主要试剂:

仪器	来源
I 型胶原酶、胰蛋白酶、地塞米松、EDTA、维生素 C、β-甘油磷酸钠	Sigma
低糖 DMEM 培养基	Gibco
胎牛血清	JRS 公司
茜素红	上海三爱思试剂有限公司
BCIP/NBT 碱性磷酸酶显色试剂盒	碧云天生物技术研究所
兔抗大鼠 CD133 抗体、小鼠抗大鼠 Flk-1 抗体、小鼠抗大鼠 CD34 抗体、小鼠抗大鼠 CD90 抗体	Santa Cruz 公司
cy3 标记山羊抗兔 IgG、cy3 标记山羊抗小鼠 IgG	武汉博士德生物工程有限公司

实验方法:

脂肪干细胞的分离与培养^[7-8]: 脱颈处死18周龄SD大鼠在0.1%的新洁尔灭中浸泡10 min, 无菌条件下切开皮肤, 打开腹腔取出脂肪组织, 去除明显血管, PBS清洗3遍, 剪碎, 加入4倍体积 I 型胶原酶, 1倍体积BSA和双抗, 水浴箱 37 °C 孵育 45 min, 80 目滤网过滤, 加入 1 200 r/min离心8 min, 弃去上清液, 红细胞裂

解液(0.154 mol/L NH₄CL, 10 mmol/L KHCO₃ 0.1 mmol/L EDTA)室温裂解10 min, PBS 清洗3遍, 分成8份, 分别加入5 mL含体积分数10%胎牛血清L-DMEM完全培养基, 吹打均匀后加入2个底面积为25 cm²的培养瓶中, 置37 °C, 体积分数5%CO₂饱和湿度培养。

形态学观察: 原代第3, 7天在倒置相差显微镜下观察贴壁细胞的形态变化。

贴壁细胞表面标记鉴定: 待原代细胞长满后, 种植于6孔板盖玻片上各4孔, 3孔进行CD34、CD90、CD133、Flk-1免疫荧光染色, 1孔为阴性对照组。贴壁细胞PBS冲洗2遍, 40 g/L多聚甲醛固定30 min, 干燥10 min, 3%血清白蛋白(BSA)孵育标本20 min, 分别加入不同 I 抗室温孵育60 min(阴性对照组不加 I 抗), PBS洗3遍(5 min/次), 分别滴加适量山羊抗兔或抗小鼠 cy3 荧光素标记 II 抗, 湿盆中 37 °C 孵育 30 min, PBS洗3遍(5 min/次), DAPI (4', 6-二脒基-2-苯基吡啶 4', 6-diamidino-2-phenylindole)浸染1 min, 50%缓冲甘油封固, 荧光显微镜下观察。

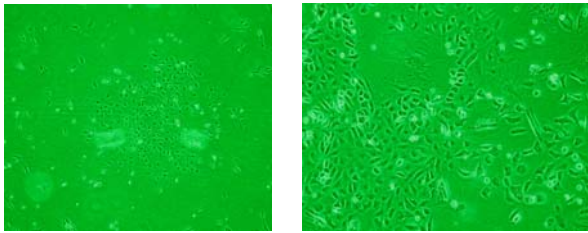
贴壁细胞诱导成骨比较: 选取第2代脂肪干细胞按照5×10⁷L⁻¹接种至6孔板各2孔, 加入成骨诱导培养基(完全培养基加上地塞米松1×10⁻⁸ mol/L, β-甘油磷酸10 mol/L, 维生素C 50 mg/L), 于14 d各取1孔进行下列染色。①茜素红钙染色: 细胞染色前用PBS冲洗2次, 滤纸吸去多余水分, 体积分数为95%的乙醇固定30 min, 再用2%茜素红染色5 min, 流水冲洗, 倒置显微镜下观察。②碱性磷酸酶检测: 染色前用PBS冲洗2次, 滤纸吸去多余水分, 用40 g/L多聚甲醛固定30 min, 再用NBT/BCIP避光染色1 h, 用流水冲洗, 倒置显微镜下观察。

主要观察指标: 培养细胞形态; CD90、CD34、CD133、Flk-1免疫荧光检测表面抗原; 成骨诱导后碱性磷酸酶和骨钙染色检测。

设计、实施、评估者: 实验设计为第一作者, 干预实施为第一作者, 评估为第二、三作者。

2 结果

2.1 相差显微镜下观察细胞形态 血清培养第3天均可见大量多角细胞呈巢状生长, 形成铺路石样形态, 间或有梭形细胞存在, 见图1a; 第7天可见生长约60%有梭形和多角形混合生长, 多角形细胞占多数, 见图1b。

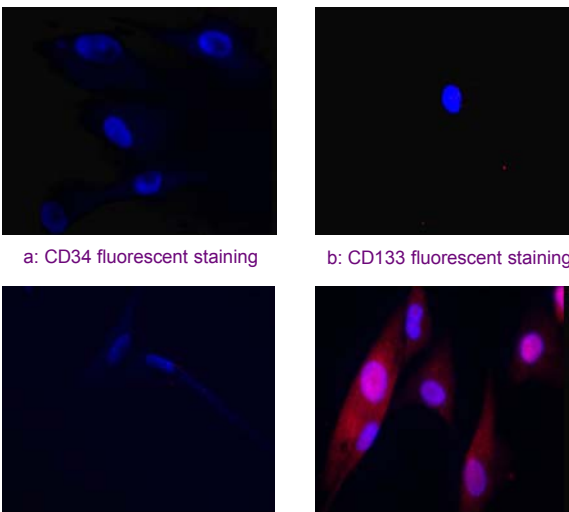


a: On d 3 ($\times 40$) b: On d 7 ($\times 100$)

Figure 1 Cell morphology in medium containing fetal bovine serum

图 1 胎牛血清培养基中细胞形态

2.2 免疫荧光法检测细胞表面标志结果 见图2~4。

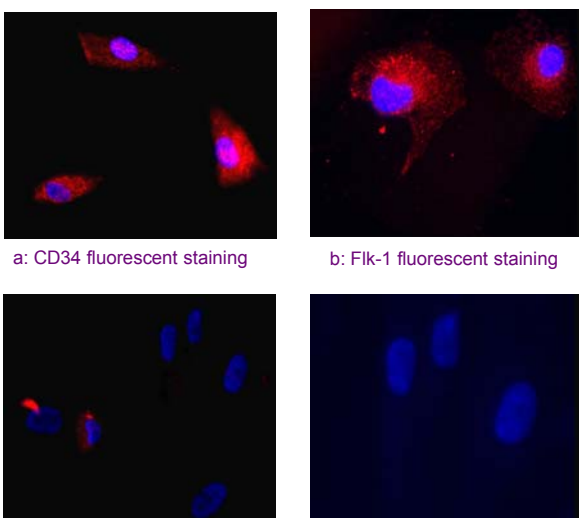


a: CD34 fluorescent staining b: CD133 fluorescent staining

c: Flk-1 fluorescent staining d: CD90 fluorescent staining

Figure 2 Identification of surface markers on fusiform cells ($\times 630$)

图 2 梭形细胞表面标记鉴定 ($\times 630$)



a: CD34 fluorescent staining b: Flk-1 fluorescent staining

c: CD133 fluorescent staining d: CD90 fluorescent staining

Figure 3 Identification of surface markers on polyhedral cells ($\times 630$)

图 3 多角形细胞表面标记鉴定 ($\times 630$)

贴壁梭形细胞免疫荧光检测可见CD90为阳性，

CD34、CD133、Flk-1染色均为阴性，见图2；多角形细胞CD34、Flk-1均为阳性，见图3a,b，细胞核被DAPI染为蓝色，细胞质内存在大量红色颗粒，CD133部分为阳性，见图3c，CD90为阴性，见图3d；阴性对照组未发现阳性细胞，见图4。

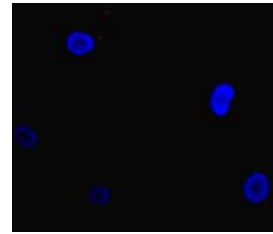


Figure 4 Fluorescent staining in control group ($\times 630$)

图 4 对照组荧光染色 ($\times 630$)

2.3 成骨诱导碱性磷酸酶检测结果 成骨诱导液诱导14 d时，可见多角状细胞死亡，形成空白区，梭形细胞呈碱性磷酸酶阳性，见图5，细胞失去漩涡状生长方式，融合成团，碱性磷酸酶阳性的蓝黑色颗粒状影像相互融合成网状，重叠生长。

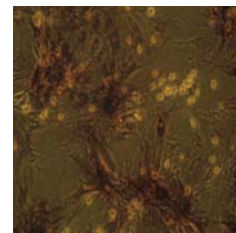


Figure 5 Alkaline phosphatase staining of cells cultured in medium containing fetal bovine serum for 14 d ($\times 200$)

图 5 胎牛血清培养基中细胞诱导 14 d 碱性磷酸酶染色 ($\times 200$)

2.4 成骨诱导茜素红钙染色结果 成骨诱导液诱导14 d时，可见多角状细胞死亡，形成空白区，梭形细胞红色钙结节影，见图6，部分互相融合，形成片状钙化影。

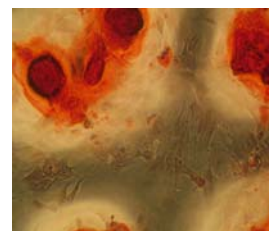


Figure 6 Alizarin red calcium staining of cells cultured in medium containing fetal bovine serum for 14 d ($\times 200$)

图 6 胎牛血清培养基中细胞诱导 14 d 茜素红钙染色 ($\times 200$)

3 讨论

各种不同细胞的表面标志是不同的，脂肪干细胞的

表面标记为: CD9, CD10, CD13, CD29, CD10, CD44, CD49e, CD49d, CD54, CD55, CD59, CD90, CD105, CD107, CD146, CD166等阳性^[2-4], 能够向骨、软骨和脂肪的等多方向分化^[9]。脂肪干细胞表达4种通用多向分化潜能干细胞标记CD105、STRO21、CD166及CD117。其中CD117是一种干细胞因子受体, 在全能或多能干细胞中表达。CD34是内皮细胞、造血干细胞和内皮祖细胞表面的跨膜蛋白^[10], Flt (VEGFR-1), Flk-1 (VEGFR-2), Flt-4等3种酪氨酸激酶膜受体是和内皮细胞生长有关的跨膜蛋白和血管内皮细胞生长因子有很强的亲和力。近来有报道显示脂肪干细胞为CD34阳性^[11-12], 本文可以证明脂肪干细胞混杂了血管内皮细胞后部分细胞就可能显示CD34阳性, 纯净的脂肪干细胞不会显示内皮细胞特征。

本实验中梭形细胞符合间充质干细胞的形态特点, 间充质干细胞标志CD90阳性, CD34、CD133、Flk-1均为阴性, 证明该种细胞不是造血来源的细胞, 成骨诱导阳性更验证了该种细胞为脂肪间充质干细胞。在脂肪组织中含有很多微血管, 在用I型胶原酶分离脂肪干细胞时会有部分微血管血管内皮细胞被分离, 在含有胎牛血清的培养基作用下, 形成铺路石样多角细胞符合成熟血管内皮细胞形态, 免疫荧光染色CD34、Flk-1均为阳性, 证实胎牛血清能促进血管内皮细胞生长, 部分CD133阳性说明有部分内皮祖细胞存在。本实验说明脂肪干细胞中的特异细胞为血管内皮细胞。

研究表明脂肪干细胞培养对营养要求不高, 在低血清或无血清的条件下还能正常生长, 保持高倍的增殖能力^[13]。但在体积分数0.5%人血清培养情况下倍增时间为1.86 d, 在无血清情况下倍增时间为5.79 d, 由此可见脂肪干细胞对血清有一定的依赖作用。

由于血清类型差异及血清成分的复杂性, 不仅含有细胞生长所需的基本营养物质, 而且含有激素、生长因子等对细胞代谢、增殖与分化有重要调节作用的生物活性物质。因此, 不同血清类型对不同细胞的不同培养阶段具有重要影响。在婴儿的不同阶段, 脐血中各种细胞的成分有很大区别, 在24~28周龄的婴儿血液中含有大量的间充质干细胞, 内皮祖细胞较少; 到33~36周含有大量的内皮祖细胞; 到37~40周间充质干细胞就很少见^[14]。可见在人33~36周龄血液中含有能促进内皮祖细胞生长的细胞因子和营养物质, 胎牛血液也有可能存在这样的效果, 由此可见出现大量的血管内皮细胞可能和所用胎牛血清有关。

研究显示, 如果给予血管抑制剂阻止脂肪组织血管生长, 那么脂肪组织也会萎缩; 而脂肪组织也会分泌一些生长因子, 如血管内皮细胞生长因子、瘦素等促进血管的生成^[15-17]。因此, 可能脂肪组织细胞和血管发生有着密切的联系。脂肪干细胞与血管内皮细胞这两种关系

密切的细胞互相影响, 互相促进, 会给将来的组织工程研究提供新的手段和方法, 但是在机体内部关系如何、在什么情况下脂肪干细胞从休眠状态启动分化? 向什么方向分化? 这些问题还待进一步研究。

4 参考文献

- [1] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13(12):4279-4295.
- [2] Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, et al. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum*. 2005;52(8):2521-2529.
- [3] Strem BM, Hicok KC, Zhu M, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med*. 2005;54(3):132-141.
- [4] Li BH, Zeng QT, Wang HX, et al. *Zhonghua Qiguan Yizhi Zazhi*. 2006;27(3):142-144.
李宾会, 曾秋棠, 王红祥, 等. 脂肪来源与骨髓来源的基质干细胞的比较[J]. *中华器官移植杂志*, 2006, 27(3):142-144.
- [5] Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, et al. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol*. 2006;24(4):150-154.
- [6] Han ZB, Chen HX, Deng JX. Multipotential differentiation and potential applications of adipose-derived stem cells. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 2007;23(2):195-200.
- [7] Romanov YA, Darevskaya AN, Merzlikina NV, et al. Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: isolation, characterization, and differentiation potentialities. *Bull Exp Biol Med*. 2005;140(1):138-143.
- [8] Pei XT. *Beijing: Kexue Chubanshe*. 2006:83-100.
裴雪涛. *干细胞实验指南*[M]. 北京: 科学出版社, 2006:83-100.
- [9] Parker AM, Shang H, Khurgel M, et al. Low serum and serum-free culture of multipotential human adipose stem cells. *Cytotherapy*. 2007;9(7):637-646.
- [10] Strem BM, Hicok KC, Zhu M, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med*. 2005;54:132-141.
- [11] Varma MJ, Breuls RG, Schouten TE, et al. Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells Dev*. 2007;16(1):91-104.
- [12] D'Andrea F, De Francesco F, Ferraro GA, et al. Large-scale production of human adipose tissue from stem cells: a new tool for regenerative medicine and tissue banking. *Tissue Eng Part C Methods*. 2008;14(3):233-242.
- [13] Hattori H, Nogami Y, Tanaka T, et al. Expansion and characterization of adipose tissue-derived stromal cells cultured with low serum medium. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008;87(1):229-236.
- [14] Javed MJ, Mead LE, Prater D, et al. Endothelial Colony Forming Cells and Mesenchymal Stem Cells are Enriched at Different Gestational Ages in Human Umbilical Cord Blood. *Pediatr Res*. 2008;64(1):68-73.
- [15] Rupnick MA, Panigrahy D, Zhang CY, et al. Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(16):10730-10735.
- [16] Claffey KP, Wilkison WO, Spiegelman BM. Vascular endothelial growth factor: regulation by cell differentiation and activated second messenger pathways. *J Biol Chem*. 1992;267(23):16317-16322.
- [17] Rehman J, Traktuev D, Li J, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 2004;109(10):1292-1298.

来自本文课题的更多信息——

基金资助: 国家自然科学基金(30960388); 云南科技厅联合专项基金资助项目(2007C0007R); 昆明医学院博士创新基金项目(KM2007D03)。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的创新点: 文章首次发现脂肪干细胞培养时混杂细胞存在, 通过细胞形态, 特异表面抗原检测和成骨诱导鉴定的方法鉴定这种特异细胞, 为脂肪干细胞应用于组织工程干细胞研究提供理论参考。