

兔脂肪干细胞在含有转化因子和转铁蛋白培养基中向软骨细胞的分化**

杨国庆¹, 王兆杰², 安荣泽², 赵俊延², 齐新文²

Chondrogenic differentiation of rabbit adipose-derived stem cells in culture medium containing transforming factors and transferrin

Yang Guo-qing¹, Wang Zhao-jie², An Rong-ze², Zhao Jun-yan², Qi Xin-wen²

Abstract

BACKGROUND: The choice of seed cells is a key factor to the cartilage tissue engineering.
OBJECTIVE: To explore the chondrogenic potential of adipose-derived stem cells (ADSCs) in culture medium containing transforming factors and transferring.
METHODS: ADSCs were obtained from the subcutaneous adipose tissue of 6-month-old New Zealand white rabbits' neck back by mechanical digestion and enzyme digestion, and then cultured and amplified *in vitro*. The adhesion and growth of cells were observed using inverted phase contrast microscope. Two weeks after the cells were cultured in chondrogenic medium, collagen type II expression was detected by immunohistochemistry staining.
RESULTS AND CONCLUSION: The primary stem cells isolated from adipose tissue adhered on the plate in 24 hours, and reached 90% confluence in single layers after 96 hours. The cartilage nodules were observed at 7 days after ADSCs were cultured under chondrogenic medium, while collagen type II was positive 14 days later. ADSCs of rabbits can express chondrogenic phenotype when they were cultured in chondrogenic medium, which proves the ADSCs can be one of the options for cartilage tissue engineering.

Yang GQ, Wang ZJ, An RZ, Zhao JY, Qi XW. Chondrogenic differentiation of rabbit adipose-derived stem cells in culture medium containing transforming factors and transferrin. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(45): 8391-8394. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 成软骨的种子细胞的选择是软骨组织工程研究中的关键因素。
目的: 观察脂肪干细胞在含有转化因子和转铁蛋白诱导条件下向软骨细胞分化的能力。
方法: 取新西兰大白兔颈背部脂肪组织, 机械分离及酶消化法获得脂肪干细胞, 显微镜下观察细胞黏附及生长情况; 加入含有转化因子 $\beta 1$ 和转铁蛋白的诱导培养基培养 2 周后以免疫组化方法检测 II 型胶原的表达。
结果与结论: 从兔脂肪组织中分离出的干细胞原代培养时 24 h 贴壁, 96 h 后达 80% 融合; 于软骨诱导培养基内向软骨诱导 7 d 后形成软骨结节, 14 d 后 II 型胶原免疫组化阳性。结果初步表明兔脂肪干细胞经诱导后可以向软骨细胞分化。
关键词: 脂肪干细胞; 软骨细胞; 软骨组织工程; 分化; 兔
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.45.007

杨国庆, 王兆杰, 安荣泽, 赵俊延, 齐新文. 兔脂肪干细胞在含有转化因子和转铁蛋白培养基中向软骨细胞的分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(45):8391-8394. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

2001年Zuk等^[1-2]以外科切除或吸脂方式获得人和大鼠的脂肪组织, 将脂肪组织切碎, 经 I 型胶原酶消化、离心等简单处理获得在显微镜下呈成纤维细胞形态的细胞群, 进行原代培养, 传代后的细胞与骨髓间充质干细胞一样, 具有自我更新能力、活力持久及多向分化潜能, 称为脂肪源性干细胞。2003年Gimble等^[3]又进一步证实其干细胞的特性。本实验从兔脂肪组织中分离出多能干细胞, 并诱导其向软骨细胞定向分化, 初步探讨了其培养诱导条件。

1 材料和方法

设计: 观察性实验。

时间及地点: 实验于2009-09/10在遵义医学院珠海校区中心实验室完成。

材料:

实验动物: SPF级健康成年新西兰大白兔, 体质量为2.5~4.0 kg, 雌雄不拘, 常规饮食水, 分笼饲养, 由广东省医学实验动物中心提供, 动物合格证: SCXK(粤)2003-0002。

主要试剂:

主要试剂	来源
I 型胶原酶、维生素 C	Invitrogen, 美国
高糖 DMEM	Gibco, 美国
标准胎牛血清	中国医学科学院生物工程研究所
TGF- $\beta 1$ 、胰蛋白酶	Amresoco, 美国
转铁蛋白、胰岛素	Sigma, 美国
II 型胶原小鼠抗兔单克隆抗体	Calbiochem, 美国
免疫组化 SP 试剂盒	天津灏洋生物

¹Department of Surgery, Meitan County Hospital, Zunyi 564100, Guizhou Province, China; ²Department of Orthopedics, Fifth Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zhuhai 519100, Guangdong Province, China

Yang Guo-qing, Associate chief physician, Department of Surgery, Meitan County Hospital, Zunyi 564100, Guizhou Province, China
yangguoqing6666@sina.com

Correspondence to: Wang Zhao-jie, Doctor, Chief physician, Professor, Department of Orthopedics, Fifth Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zhuhai 519100, Guangdong Province, China
zhaojiawang@163.com

Supported by: Guizhou Science and Technology Bureau, No. [2006]62-2*; the Medical Key Foundation of Zhuhai City, No. [2008]80*

Received: 2011-07-29
Accepted: 2011-09-05

¹ 湄潭县医院外科, 贵州省遵义市 564100; ² 遵义医学院第五附属(珠海)医院骨科, 广东省珠海市 519100

杨国庆, 男, 1956年生, 贵州省贵阳市人, 汉族, 1980年遵义医学院毕业, 副主任医师, 主要从事骨与关节损伤修复及重建的研究。
Yangguoqing
6666@sina.com

通讯作者: 王兆杰, 博士, 主任医师, 教授, 遵义医学院第五附属(珠海)医院骨科, 广东省珠海市 519100
zhaojiewang@163.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2011)45-08391-04

收稿日期: 2011-07-29
修回日期: 2011-09-05
(20110729006/M - W)

方法:

兔脂肪干细胞获取与扩增: 耳缘静脉气栓法处死后, 颈背部皮肤备皮, 消毒; 颈正中切口, 取皮下脂肪, 仔细去除包膜及肉眼可见血管组织, PBS冲洗两遍, 剪刀剪碎至糊状, 加入两倍体积0.1%的 I 型胶原酶, 于37 °C 温箱中振荡20 min。加入等倍体积高糖DMEM+体积分数为10%胎牛血清培养液, 1 000 r/min离心10 min, 弃上清。沉淀用高糖DMEM+体积分数为10%胎牛血清吹打均匀, 140目筛网过滤后, 收集于2瓶50 mL培养瓶中。于37 °C、体积分数为5%CO₂ 孵箱内培养。24 h首次换液。以后细胞长满瓶底80%时用0.25%胰蛋白酶消化按1:2或1:3传代培养。

向软骨细胞方向诱导分化: 收集第3, 4代细胞, 调节细胞浓度为 $5 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 置于含有10 µg/L 转化生长因子β1+6.25 mg/L胰岛素+10 mg/L转铁蛋白+ 10^{-7} mol/L 地塞米松+50 nmol/L维生素C的培养基内培养, 每24 h半量换液。

主要观察指标: 倒置显微镜观察细胞黏附和生长情况; 向软骨方向诱导14 d后行II型胶原免疫组化染色观察细胞形态变化和是否有软骨结节形成。

2 结果

2.1 细胞形态观察 原代细胞接种后5~7 h, 少数细胞开始贴壁并伸出伪足, 变为纺锤形或长梭形, 24 h后80%以上细胞贴壁, 大部分细胞为三角形或不规则形, 单核, 见图1。

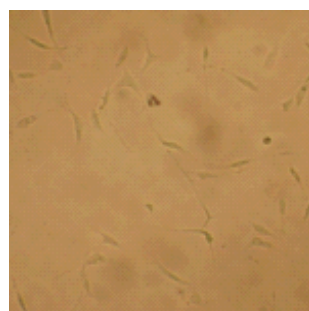


Figure 1 Morphology of adipose derived stem cells after cultured for 24 h (×200)
图1 培养24 h脂肪干细胞形态(×200)

48 h后, 细胞开始分裂增殖, 以分散集落方式生长; 两三天达到增殖高峰, 见图2; 在第5天时达到80%以上铺满瓶底且相互融合, 细胞几乎完全呈长梭形, 以集落方式生长; 传代后, 细胞贴壁及倍增时间明显加快, 其形状

略变大, 见图3。贴壁在4 h内完成, 倍增时间18~20 h, 96 h可传代。



Figure 2 Morphology of adipose derived stem cells after cultured for 72 h (×200)
图2 培养72 h脂肪干细胞形态(×200)

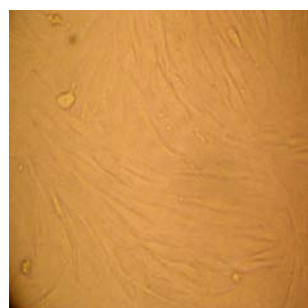


Figure 3 Morphology of the third generation of adipose derived stem cells (×200)
图3 第3代脂肪干细胞形态(×200)

2.2 II型胶原免疫组织化学染色观察细胞形态变化和软骨结节 向软骨细胞诱导分化后, 细胞生长缓慢, 并由长梭形渐向多边形、圆形转化, 且局部细胞聚集, 1周左右形成软骨样结节。2周后II型胶原免疫组化阳性, 尤以结节处明显, 见图4~6; 而未诱导的脂肪干细胞无结节形成, 免疫组化染色阴性。

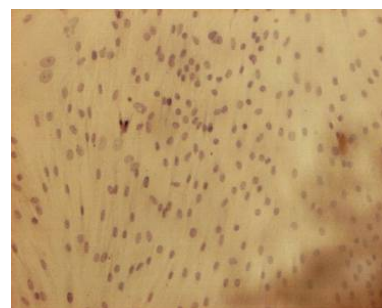


Figure 4 Immunohistochemistry staining of adipose derived stem cells collagen type II (×200)
图4 脂肪干细胞II型胶原免疫组织化学染色(×200)

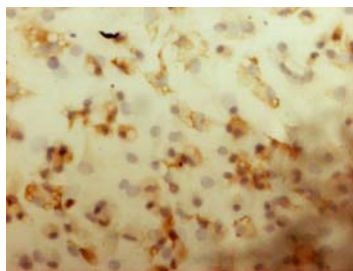


Figure 5 Immunohistochemistry staining of adipose derived stem cells collagen type II after cultured for 14 d (x200)

图5 诱导转化 14 d 后的细胞 II 型胶原免疫组织化学染色 (x200)

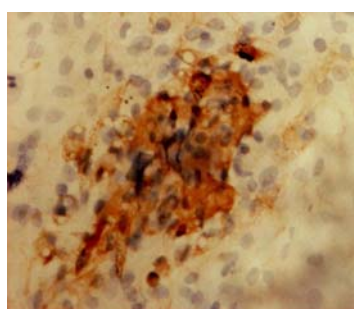


Figure 6 Immunohistochemistry staining of cartilage nodule type II after cultured for 14 d (x200)

图6 诱导转化 14 d 后的软骨结节 II 型胶原免疫组织化学染色 (x200)

3 讨论

在软骨组织工程研究中,寻找一种优秀的“种子细胞”至关重要。自体软骨细胞存在供区有限、体外培养4代后易出现去分化现象以及随年龄增长细胞数量和质量下降等问题^[4],因此寻找一种可以代替软骨细胞的种子细胞成了骨科研究的热点。脂肪干细胞最早由Zuk等人从抽脂术中抽取的脂肪组织悬液中分离培养,并证实为多能干细胞。因其来源广泛、采集容易、痛苦小、增殖迅速、分化潜能大^[5-7],成为软骨组织工程种子细胞的热选之一。

实验采用机械分离脂肪组织, I 型胶原酶消化细胞外基质的方法分离脂肪干细胞,获得的细胞1 d内大部分贴壁及变形,48 h后便快速增殖,倍增时间为18~20 h,96 h长满瓶底,表明分离的细胞具有数量多、活性好的特点。机械分离使脂肪组织具有较大的表面积,有利于 I 型胶原酶的消化,而 I 型胶原酶仅消化细胞外基质,对细胞的影响非常小。本课题组多次使用此方法分离脂肪干细胞,均获得满意数量和贴壁、增殖活性的细胞^[8-9]。证明本实验所用的脂肪干细胞分离方法稳定可靠。

应用外源性细胞因子来模拟软骨细胞发育的微环境来诱导干细胞向软骨细胞转化的研究近年获得了非

常大的进展^[10-12]。如转化生长因子 $\beta 1$ 可以通过Smad信号传导通道向细胞提供一个具有活性的磷酸根,调节 II 型胶原的表达^[13]。Mehlhorn等^[14]应用转化生长因子 $\beta 1$ 成功的将脂肪干细胞诱导为软骨细胞。转铁蛋白具有促进细胞合成蛋白质的作用,能促进细胞外基质的分泌。朱惠娟等^[15]在无血清培养人前脂肪细胞并诱导分化能力实验中发现基础及转化诱导培养基中加入10 mg/L转铁蛋白明显增加人脂肪干细胞增殖及转化能力。本实验联合转化生长因子 $\beta 1$ 和转铁蛋白来诱导脂肪干细胞向软骨分化取得满意效果,细胞 II 型胶原免疫组化染色阳性,其中软骨结节处为强阳性。若能增加应力和低氧张力^[16-17],必将经一步提高转化率。

软骨组织工程3个要素包括:种子细胞、细胞因子和载体,细胞因子和载体为种子细胞分化提供微环境,种子细胞的质和量是软骨修复的关键因素。干细胞所处的微环境决定细胞分化方向,因此细胞因子是软骨修复质量的重要因素。本实验采用机械分离和酶消化法获得了满意的种子细胞,而所选用的细胞因子具有将脂肪干细胞向软骨细胞诱导的能力,若配以合适的载体将构建出适合修复软骨的组织工程软骨。

4 参考文献

- [1] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7(2):211-228.
- [2] 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.
- [3] Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy.* 2003;5(5):362-369.
- [4] Saadeh PB, Brent B, Mehrara BJ, et al. Human cartilage engineering: chondrocyte extraction, proliferation, and characterization for construct development. *Ann Plast Surg.* 1999;42(5):509-513.
- [5] Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, et al. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast Reconstr Surg.* 2002;109(1):199-209.
- [6] Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, et al. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;290(2):763-769.
- [7] Rangappa S, Fen C, Lee EH, et al. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *Ann Thorac Surg.* 2003;75(3):775-779.
- [8] An RZ, Wang ZJ, Zhang Q, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009;13(36):7052-7057. 安荣泽,王兆杰,张强,等.改良诱导方案诱导SD大鼠脂肪源性干细胞定向分化为软骨细胞[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(36):7052-7057.
- [9] Yang Z, Jian YK, An RZ, et al. Guizhou Yixue. 2008;32(5):54-58. 杨震,简月奎,安荣泽,等. SD大鼠脂肪干细胞的体外分离培养及实验研究[J].贵州医学,2008,32(5):54-58.
- [10] Estes BT, Wu AW, Guilak F. Potent induction of chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells by bone morphogenetic protein 6. *Arthritis Rheum.* 2006;54(4):1222-1232.
- [11] Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, et al. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev.* 2002;16(21):2813-2828.
- [12] Goessler UR, Bugert P, Bieback K, et al. In-vitro analysis of the expression of TGFbeta -superfamily-members during chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and chondrocytes during dedifferentiation in cell culture. *Cell Mol Biol Lett.* 2005;10(2):345-362.
- [13] Zuscik MJ, Ma L, Buckley T, et al. Lead induces chondrogenesis and alters transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein signaling in mesenchymal cell populations. *Environ Health Perspect.* 2007;115(9):1276-1282.

- [14] Mehlhorn AT, Niemeyer P, Kaschte K, et al. Differential effects of BMP-2 and TGF-beta1 on chondrogenic differentiation of adipose derived stem cells. Cell Prolif. 2007;40(6):809-823.
- [15] Zhu HJ, Deng JY, Gong FY, et al. Jichu Yixue yu Linchuang. 2006; 26(7): 770-773.
朱惠娟, 邓洁英, 龚凤英, 等. 无血清原代培养人前脂肪细胞并诱导分化[J]. 基础医学与临床, 2006, 26(7): 770-773.
- [16] Kang HJ, Lu SB, Xu WJ, et al. Zhongguo Jiaoxing Waikexue. 2007;15(10):773-775.
康红军, 卢世璧, 许文静, 等. 人脂肪干细胞结合微载体在生物反应器中向软骨细胞分化[J]. 中国矫形外科杂志, 2007, 15(10): 773-775.
- [17] Khan WS, Adesida AB, Hardingham TE. Hypoxic conditions increase hypoxia-inducible transcription factor 2alpha and enhance chondrogenesis in stem cells from the infrapatellar fat pad of osteoarthritis patients. Arthritis Res Ther. 2007;9(3):R55.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 贵州省科技厅资助项目(黔科通 NY 字 [2006]62-2); 珠海市医学重点专科建设基金资助(珠卫 [2008]80)。

作者贡献: 实验设计为王兆杰、安荣泽, 实验实施为杨国庆、赵俊廷、齐新文, 资料收集为杨国庆、赵俊廷、齐新文, 杨国庆成文, 王兆杰、安荣泽审核, 杨国庆、王兆杰对文章负责。

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。

伦理批准: 实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。

本文创新性: 实验从新西兰大白兔脂肪组织中成功分离提取出脂肪源性干细胞, 并对其向软骨细胞定向分化的诱导条件进行了探索, 旨在探究其作为软骨组织工程种子细胞来源的可行性。

本期专题: 干细胞移植修复脊髓损伤①(本刊中文部)

植细胞进行适当的基因修饰可能会产生更好的治疗效果, 见2010年36期6751页。

- 1 神经生长因子联合神经干细胞移植治疗大鼠脊髓损伤, 见2010年14卷14期2572页
- 2 神经营养因子3基因修饰神经干细胞移植脊髓损伤的相关蛋白表达, 见2010年14卷36期6751页。
- 3 骨髓间充质干细胞立体定向移植治疗大鼠脊髓损伤。见2010年14卷14期2549页。
- 4 局部注射骨髓间充质干细胞治疗大鼠脊髓损伤: 运动功能有改善吗? 见2010年14卷14期2556页。
- 5 异体骨髓间充质干细胞移植治疗大鼠脊髓损伤, 见2010年14卷36期6729页。
- 6 嗅鞘细胞移植修复大鼠脊髓损伤的组织病理学变化, 见2010年14卷6期1053页。
- 7 接受嗅鞘细胞移植脊髓损伤大鼠电生理及后肢功能变化, 见2010年14卷1期112页。
- 8 移植人脐带间充质干细胞修复大鼠脊髓损伤, 见2010年14卷19期3483页。
- 9 体外转染绿色荧光蛋白基因的肌源性干细胞移植修复大鼠脊髓损伤, 见2010年14卷19期3477页。
- 10 蛛网膜下腔移植自体激活许旺细胞治疗大鼠脊髓损伤, 见2010年14卷14期2533页。

1 神经生长因子联合神经干细胞移植治疗大鼠脊髓损伤

范广明(天津医科大学, 天津市 300070)

推荐理由: 中枢神经再生问题一直是神经科学界和医学界在理论研究和临床实践上感到十分困惑且尚未找到有效治疗方法的重大难题。因而外伤导致中枢神经的损害尤为严重, 诸如脑皮质功能受损或消失、脊髓损伤所致的

瘫痪等。神经干细胞是中枢神经系统中保持分裂和分化潜能的细胞, 在神经系统的发育、分化以及治疗神经系统疾病中具有重要的作用, 神经干细胞的移植已成为人们探索治疗神经系统损伤的新途径。

实验将神经干细胞联合神经生长因子移植于大鼠脊髓损伤区, 连续用药1周, 可以使移植的神经干细胞更好的在损伤部位存活, 增殖分化与迁移, 促进脊髓损伤大鼠神经功能的恢复, 见2010年14期2572页。

2 神经营养因子3基因修饰神经干细胞移植脊髓损伤的相关蛋白表达

邓兴力(昆明医学院第一附属医院神经外科, 云南省昆明市 650032)

推荐理由: 目前在各种脊髓损伤的治疗方法中, 神经移植是最有前景的。尽管有实验表明神经干细胞和神经营养因子3基因修饰的神经细胞联合移植能够在移植后存活并有效促进脊髓横断后的功能恢复, 但神经营养因子3基因修饰的神经干细胞能否在脊髓受损部位发挥功能并促进脊髓损伤大鼠的功能恢复还有待探索。

为此, 实验构建了神经营养因子3基因修饰的胚胎脊髓来源神经干细胞, 将其移植入右侧脊髓半切的大鼠, 通过行为学测试评价脊髓损伤大鼠功能的恢复情况及RT-PCR和Western blot检测神经营养因子3和髓鞘碱性蛋白的表达。结果证明神经营养因子3基因修饰的神经干细胞移植后损伤局部组织内髓鞘碱性蛋白和神经营养因子3表达明显, 说明神经干细胞移植能够促进脊髓损伤后的功能恢复, 更提示了对移

3 骨髓间充质干细胞立体定向移植治疗大鼠脊髓损伤

管雅琳(天津医科大学研究生院, 天津市 300070)

推荐理由: 既往证明骨髓间充质干细胞可以促进脊髓损伤功能恢复, 但是对其作用机制尚不明确。实验证实移植的骨髓间充质干细胞在损伤脊髓内转化成的“神经细胞样细胞”具有神经细胞的功能, 可以分泌神经营养因子并促进宿主自身神经营养因子的分泌, 并对神经细胞具有保护作用, 见2010年14期2549页。

4 局部注射骨髓间充质干细胞治疗大鼠脊髓损伤: 运动功能有改善吗?

郭冕(哈尔滨医科大学附属第二医院神经外科, 黑龙江省哈尔滨市 150086)

推荐理由: 骨髓间充质干细胞所处位置及与神经纤维的联系方式和细胞表型特征, 都证明其在神经再生过程中的关键作用, 借助于体外分离纯化和培养扩增技术直接移植, 或基因修饰后移植以修复受损的中枢神经系统损伤是近年研究热点。

实验采用局部注射的方式将骨髓间充质干细胞移植进大鼠脊髓损伤区, 通过BBB评分及组织学等方法, 观察移植的骨髓间充质干细胞是否可在损伤区域存活并转化为神经细胞, 促进脊髓损伤大鼠功能的恢复。BBB评分表明细胞移植组大鼠的后肢运动功能较对照组大鼠恢复明显, 说明骨髓间充质干细胞移植能促进大鼠的后肢运动功能恢复, 见2010年14期2556页。