

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.27.011 [http://www.crter.org]

刘静, 林婉君, 刘印忠, 李晓眠, 郭洪刚. 联合诱导兔脂肪源性基质细胞的成肌潜能[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(27):5012-5018.

## 联合诱导兔脂肪源性基质细胞的成肌潜能\*☆

刘静<sup>1</sup>, 林婉君<sup>1</sup>, 刘印忠<sup>2</sup>, 李晓眠<sup>2</sup>, 郭洪刚<sup>3</sup> (<sup>1</sup>天津市中心妇产科医院普妇科, 天津市 300100; <sup>2</sup>天津医科大学基础学院, 天津市 300072; <sup>3</sup>天津医科大学总医院骨科, 天津市 300052)

### 文章亮点:

根据 Pubmed 检索结果, 目前涉及细胞因子和 5-氮杂胞苷联合诱导脂肪源性细胞成肌潜能分化的研究国内外报道较少, 实验在种子细胞成肌诱导方面具备先进性, 研究表明, 联合诱导法是脂肪源性基质细胞分化成肌细胞的理想方法, 是成肌细胞体外培养的有效途径, 为培养肌源性干细胞提供了良好的尝试, 具有潜在的临床应用价值。

### 关键词:

干细胞; 脂肪干细胞; 脂肪源性基质细胞; 转化生长因子  $\beta 1$ ; 成肌分化因子; 5-氮杂胞苷; III型胶原; 诱导成肌; 成肌细胞; 细胞培养; 结蛋白; 省级基金; 干细胞图片文章

### 摘要

**背景:** 成肌种子细胞是构建工程化成肌复合物的基础, 如何优化其扩增是过渡到临床应用的核心。

**目的:** 分析将 MyoD、转化生长因子  $\beta 1$  及 5-氮杂胞苷不同模式下联合诱导兔脂肪源性基质细胞体外成肌潜能的变化。

**方法:** 取兔腹部脂肪, 采用胶原酶消化法分离获取脂肪源性基质细胞, 分别以不同方式进行成肌细胞诱导: 5-氮杂胞苷诱导组; MyoD+转化生长因子  $\beta 1$  诱导; 5-氮杂胞苷+ MyoD+转化生长因子  $\beta 1$  联合诱导组; 并设空白对照。于诱导第 1, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 天观察细胞形态学特点, 行 MTT 比色法、流式细胞仪和免疫组织化学检测鉴定细胞, 检测 III 型胶原含量。

**结果与结论:** 联合诱导组与其他组相比, 细胞生长迅速, 16 d 增殖达高峰, 20 d 肌管数量增多, 体积增大, 排列规则, 呈结蛋白强阳性表达, 细胞周期显示联合诱导组脂肪源性基质细胞的 DNA 复制期细胞比例增加, 间隙期细胞减少, III 型胶原含量明显增高, 差异有显著性意义。结果提示, 多因子联合 5-氮杂胞苷模式能有效促进脂肪源性基质细胞向成肌细胞定向分化, 细胞增殖显著, 是成肌细胞体外诱导的理想方法。

## Myogenetic potential of rabbit adipose-derived stromal cells

Liu Jing<sup>1</sup>, Lin Wan-jun<sup>1</sup>, Liu Yin-Zhong<sup>2</sup>, Li Xiao-mian<sup>2</sup>, Guo Hong-gang<sup>3</sup> (<sup>1</sup>Department of General Gynecology, Tianjin Central Hospital of Obstetrics and Gynecology, Tianjin 300100, China; <sup>2</sup>College of Basic Medicine, Tianjin Medical University, Tianjin 300072, China; <sup>3</sup>Department of Orthopedics, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Myogenetic seed cells are the fundamental for construction of tissue-engineered smooth muscle, and optimizing the amplification of seed cells is the key in further clinical application.

**OBJECTIVE:** To analyze the myogenetic potential of rabbit adipose-derived stromal cells induced with the combination of MyoD, transforming growth factor  $\beta 1$  and 5-azacytidine, and to investigate a new way to induce cells.

**METHODS:** The rabbit abdominal fats were isolated and then the adipose-derived stromal cells were separated by collagenase digestion method for myogenetic induction with different methods: 5-azacytidine induction group, MyoD+transforming growth factor  $\beta 1$  induction group, 5-azacytidine+MyoD+transforming growth factor  $\beta 1$  combination induction group. The blank control group was set. The morphological characteristics of cells were observed at 1, 4, 8, 12, 16, 20, 24 and 28 days after induction, and the collagen type III level were detected with 4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay, flow cytometry and immunohistochemistry.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Compared with the other groups, the cell activity was higher in the combination induction group and reached peak at 16 days after induction, the number and volume of myotubes were increased at 20 days with regular arrangement, and desmin showed strong expression. Cell cycle showed the ratio of adipose-derived stromal cells in the DNA replication phase was increased in the combination induction group, the ratio of cells in the clearance period was decreased; the level of collagen type III was increased significantly, and the difference was significant. The results indicate that 5-azacytidine combined with multiple factors can promote the differentiation of adipose-derived stromal cells into myoblasts with significant cell proliferation, which is considered as the ideal method to *in vitro* induction of myoblasts.

**Key Words:** stem cells; adipose-derived stem cells; adipose-derived stromal cells; transforming growth factor  $\beta 1$ ;

刘静☆, 女, 1969 年生, 河北省承德市人, 满族, 2006 年天津医科大学科学毕业, 博士, 副主任医师, 主要从事妇科盆底疾患、干细胞移植与组织工程学研究。

jeanjingliu@yahoo.com.cn

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

文章编号:2095-4344 (2013)27-05012-07

收稿日期: 2012-08-29

修回日期: 2012-10-08

(20120329026/W·C)

Liu Jing☆, M.D., Associate chief physician, Department of General Gynecology, Tianjin Central Hospital of Obstetrics and Gynecology, Tianjin 300100, China  
jeanjingliu@yahoo.com.cn

Supported by: the Technology Fund of Tianjin Health Bureau No. 2011KZ68\*

Received: 2012-08-29

Accepted: 2012-10-08

myogenetic differentiation factor; 5-azacytidine; collagen type III; myoblastic induction; myoblasts; cell culture; desmin; provincial grants-supported paper; stem cell photographs-containing paper

Liu J, Lin WJ, Liu YZ, Li XM, Guo HG. Myogenetic potential of rabbit adipose derived stromal cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(27):5012-5018.

## 0 引言

正常肌肉组织的细胞源于肌卫星细胞, 是一类存在于肌组织基底膜与肌纤维浆膜间的单核梭形细胞。其分化受成肌调节因子控制, 这包括MyoD, Myf5, Myogenin及MRF4等<sup>[1-6]</sup>, 正常情况下, 肌卫星细胞处于休眠期, 当创伤、炎症、肿瘤等应激状态下被激活, 表达MRFs及参与成肌细胞分化。然而, 随着机体日渐衰老, 肌卫星细胞含量日益递减, 尤其在严重肌损伤或慢性肌源性损伤(例如中年妇女压力性尿失禁、臂丛神经损伤、重症肌无力等)的情况下, 其数量无法满足修复需求。

如何稳定表达成肌表型, 提高成肌效应是完善成肌种子细胞体外扩增技术的核心。脂肪源性基质细胞作为新型种子细胞显示出广阔的应用前景, 并日益受到青睐。理论上, 多因子联用较单一因子的成肌诱导效果更佳, 但多因子联用能否有效促进脂肪源性基质细胞成肌分化, 目前文献报道较少。实验旨在观察MyoD、转化生长因子 $\beta$ 1对脂肪源性基质细胞体外成肌潜能的影响, 并通过对比常规模式, 建立改良诱导成肌方法, 为种子细胞扩增技术及工程化组织的构建提供新的途径。

## 1 材料和方法

**设计:** 细胞学体外观察性实验。

**时间及地点:** 实验于2011年6月至2012年2月在天津医科大学基础学院完成。

**材料:** 雄性新西兰兔12只, 平均体质量2.3 kg, 由天津医科大学动物实验中心提供。

**MyoD及转化生长因子 $\beta$ 1联合5-氮杂胞苷诱导兔脂肪源性基质细胞成肌实验所需主要试剂及仪器:**

试剂及仪器	来源
胎牛血清、DMEM培养基、L-谷氨酰胺、100 U/mL青霉素、100 g/L链霉素	Gibicol Invitrogen 公司
成肌分化因子、转化生长因子 $\beta$ 1	Promega 公司
CO <sub>2</sub> 细胞培养箱	Forma
倒置显微镜	Olympus

**实验方法:**

**脂肪源性基质细胞的分离培养、培养和传代:** 无菌条件下, 用PBS冲洗、剪碎新西兰兔腹部脂肪组织, 7.5 g/L

的胶原酶37 °C消化30 min, 500×g离心10 min, 去上清。细胞周围红细胞裂解液重新悬浮并静置10 min, 再次离心300×g, 3×5 min以去除胶原酶及红细胞裂解液残余。DMEM培养基重悬细胞, 培养基含体积分数的胎牛血清、2 mmol/L L-谷氨酰胺, 100 U/mL青霉素、100 g/L链霉素。细胞种植密度约8 000个/cm<sup>2</sup>, 24 h后换培养液, 细胞生长至融合时传代, 2.5 g/L胰蛋白酶37 °C消化3.0-4.0 min, 离心, 细胞稀释至两三倍转至培养瓶中培养, 两三天换半量培养液。传代后细胞增殖速度加快, 通常3 d融合后可再次传代。

**脂肪源性基质细胞鉴定:** 参考文献[7]方法进行脂肪源性基质细胞表型鉴定。

**成肌诱导化:** 按下列方式处理, ①5-氮杂胞苷诱导组: 取第3代培养细胞, 达50%融合时, 对培养基加入含10  $\mu$ mol/L 5-氮杂胞苷、体积分数5%胎牛血清和5%马血清的DMEM液作为诱导剂, 进行成肌化诱导。②MyoD+转化生长因子 $\beta$ 1诱导组: 在普通培养基中添加10  $\mu$ g/L的MyoD及30  $\mu$ g/L的转化生长因子 $\beta$ 1。③联合诱导组: 在5-氮杂胞苷常规诱导培养基中添加10  $\mu$ g/L的MyoD及30  $\mu$ g/L的转化生长因子 $\beta$ 1。各组诱导分化2周。④空白对照组: 未添加诱导培养基的细胞。

**成肌情况观察:** 培养第1, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28天, 倒置显微镜观察细胞生长形态及发育特征, ABC法行免疫化学染色, 用结蛋白抗体为一抗, 以成纤维细胞为阴性对照, DAB显色鉴定(成肌细胞阳性呈棕色, 成纤维细胞阳性为蓝色); 行成肌细胞结蛋白免疫荧光检测, 细胞常规处理后, 加入结蛋白单克隆抗体, FITC标记二抗, 荧光显微镜下检测; 按相关试剂盒说明测定细胞增殖、细胞周期及III胶原含量。

III胶原含量用双抗体两步夹心酶联免疫吸附法(ELISA)检测。将标准品、待测样本加入到预先包被III型胶原蛋白单克隆抗体的透明酶标包被板中, 温育足够时间后, 洗涤除去未结合的成分, 再加入酶标工作液, 温育足够时间后, 洗涤除去未结合的成分。依次加入底物A、B, 底物(TMB)在辣根过氧化物酶催化下转化为蓝色产物, 在酸的作用下变成黄色, 颜色的深浅与样品中III型胶原蛋白浓度呈正相关, 450 nm波长下测定A值, 根据标准品和样品的A值, 计算样本中III型胶原蛋白含量。

**主要观察指标:** 倒置显微镜观察细胞形态, 免疫组织化学、免疫荧光检测成肌细胞特异性抗原; 细胞增殖情况; 细胞周期及III胶原含量观察。

**统计学分析:** 由第五作者采用SPSS 10.0统计学软件处理, 进行单因素多水平方差分析和 $q$  检验。

## 2 结果

**2.1 脂肪源性基质细胞原代培养与传代生长情况** 原代培养的脂肪源性基质细胞在24 h呈贴壁生长, 细胞为短梭状, 折光性好, 为体积不等的多角形或三角形细胞, 见图1。



图1 兔原代培养脂肪源性基质细胞, 细胞短小, 呈圆形或类圆形(倒置显微镜,  $\times 40$ )

Figure 1 Primary passage of rabbit adipose-derived stromal cells were small and round or oval shaped (Inverted microscope,  $\times 40$ )

3-5 d呈集落样生长, 12 d后呈纺锤形, 细胞间相互融合。传代细胞30 min开始贴壁, 12 h完全贴壁, 增殖速度较原代细胞增快。联合诱导组细胞生长较其他组迅速, 伸展变形快。诱导8 d, 细胞呈团簇样、束状排列的长梭形多核细胞; 诱导16 d细胞达80%融合, 表现出“漩涡状生长形态”。细胞间出现大量网状细胞, 细胞相互融合形成多核长管状肌管, 即细胞核在中央, 肌丝在周边的肌管; 肌管为光滑长条形, 许多细胞核积聚在一起, 位于肌管的中央, 形成肌链, 肌管间长轴平行排列, 见图2, 形成丰富细胞外源性。

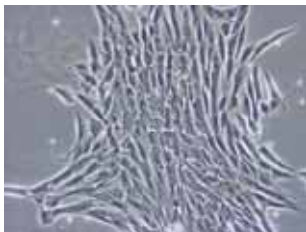


图2 5-氮杂胞苷+ MyoD+转化生长因子  $\beta 1$  联合诱导组 16 d 细胞形成排列紧密且规则的管状肌管(倒置显微镜,  $\times 40$ )

Figure 2 Regularly and closely arranged myogenetic tubes existed in 5-azacytidine+MyoD+transforming growth factor  $\beta 1$  combination induction group at 16 d (Inverted microscope,  $\times 40$ )

MyoD+转化生长因子 $\beta 1$ 诱导组在20 d细胞融合, 肌

管数量少于联合诱导组, 见图3。5-氮杂胞苷诱导组细胞生长较MyoD+转化生长因子 $\beta 1$ 诱导组慢, 细胞数量较少, 第24天出现肌管, 形成较晚, 且发育幼稚, 排列不规则, 分布不均匀。细胞外源性数量较联合诱导组少, 分布稀疏, 见图4; 对照组细胞呈现接触抑制现象, 细胞相互挤压, 形状由梭状逐渐变长变细, 呈纤维状, 伸展变形缓慢, 见图5; 最后呈现衰亡, 未见细胞融合及肌管形成。

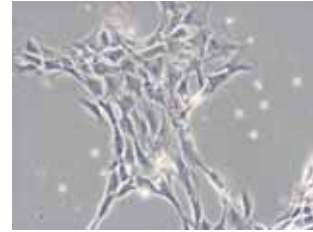


图3 MyoD+转化生长因子  $\beta 1$  诱导组 20 d 细胞形成排列疏松的肌管(倒置显微镜,  $\times 40$ )

Figure 3 Loosely arranged myogenetic tubes existed in MyoD+transforming growth factor  $\beta 1$  induction group at 20 d (Inverted microscope,  $\times 40$ )

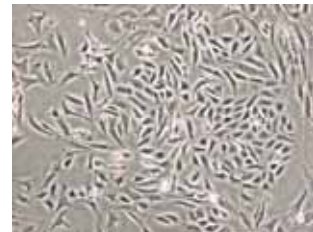


图4 5-氮杂胞苷诱导组 24 d 细胞少量肌管形成, 排列紊乱(倒置显微镜,  $\times 40$ )

Figure 4 Myogenetic tubes existed in 5-azacytidine induction group was decreased and arranged irregularly at 24 d (Inverted microscope,  $\times 40$ )

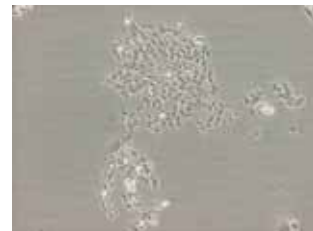


图5 空白对照组细胞呈现接触抑制, 未见肌管(倒置显微镜,  $\times 40$ )

Figure 5 Contact inhibition without myogenetic tubes occurred in the blank control group (Inverted microscope,  $\times 40$ )

**2.2 各组细胞免疫化学检测结果** 诱导8 d后, 联合诱导组中间丝蛋白结蛋白在脂肪源性基质细胞胞质中呈强阳性表达, 胞质染色呈深棕色, 见图6; 生长因子及5-氮杂胞苷诱导组, 细胞分别在12, 16 d开始表达结蛋白, 胞浆呈浅棕色, 细胞核呈紫色, 见图7; 对照组脂肪源性基质细胞胞质不着色, 为阴性表达, 见图8。

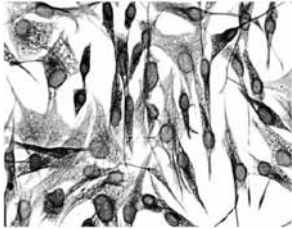


图6 5-氮杂胞苷+ MyoD+转化生长因子 $\beta$ 1联合诱导组第8天兔脂肪源性基质细胞呈肌蛋白染色强阳性(倒置显微镜,  $\times 100$ )

Figure 6 Adipose-derived stromal cells were strongly positive for desmin staining in the 5-azacytidine+MyoD+transforming growth factor  $\beta$ 1 combination induction group at 8 d (Inverted microscope,  $\times 100$ )

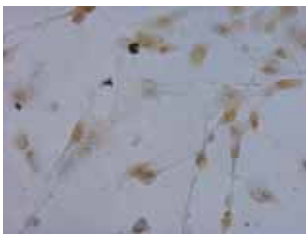


图7 MyoD+转化生长因子 $\beta$ 1诱导组第16天兔脂肪源性基质细胞呈肌蛋白染色弱阳性(倒置显微镜,  $\times 100$ )

Figure 7 Slight expression of desmin in the adipose-derived stromal cells of MyoD+transforming growth factor  $\beta$ 1 induction group at 16 d (Inverted microscope,  $\times 100$ )

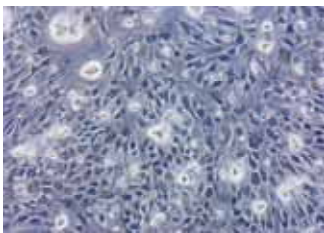


图8 空白对照组兔脂肪源性基质细胞呈肌蛋白染色阴性(倒置显微镜,  $\times 40$ )

Figure 8 Negative expression of desmin in adipose-derived stromal cells of blank control group (Inverted microscope,  $\times 40$ )

**2.3 各组细胞免疫荧光检测结果** 联合诱导组第4天, 脂肪源性基质细胞成肌细胞特异性抗原结蛋白开始阳性表达, 第12-16天, 表达率和表达强度随时间的延长而增加, 至20 d达高峰, 见图9, 24 d后, 表达强度有所减弱; 5-氮杂胞苷诱导组第16天开始表达, 表达率和表达强度较联合诱导及MyoD+转化生长因子 $\beta$ 1诱导组逊色, 见图10, 第24天达峰值, 此后表达消失; 对照组始终呈阴性表达。

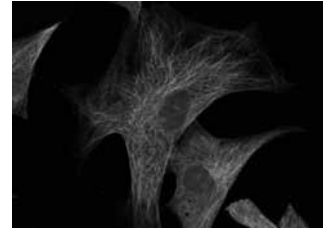


图9 5-氮杂胞苷+ MyoD+转化生长因子 $\beta$ 1联合诱导组第20天兔脂肪源性基质细胞呈肌蛋白表达显著(免疫荧光染色,  $\times 200$ )

Figure 9 Remarkable expression of desmin in adipose-derived stromal cells of 5-azacytidine+MyoD+transforming growth factor  $\beta$ 1 combination induction group at 20 d (Immunohistochemical staining,  $\times 200$ )

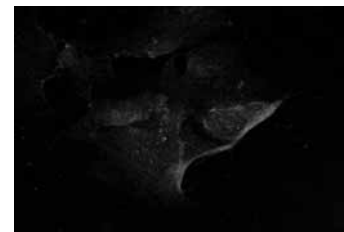
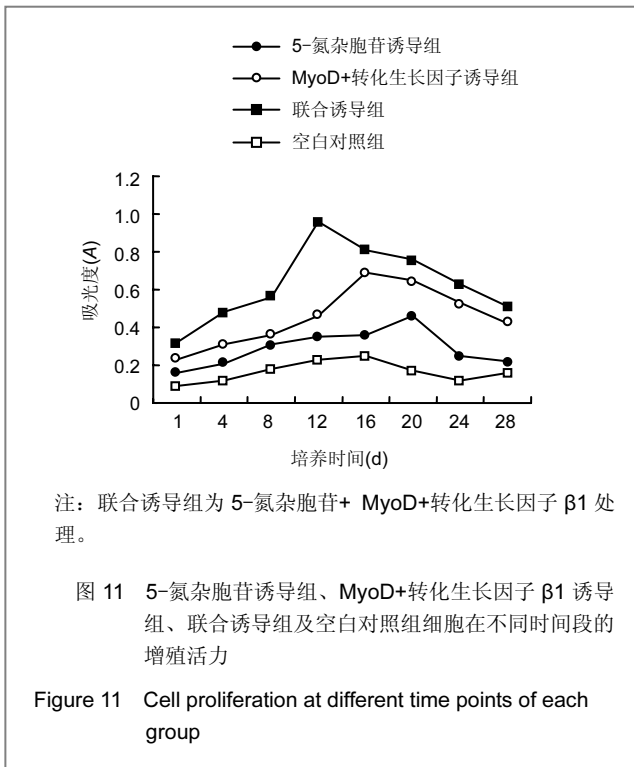


图10 5-氮杂胞苷诱导组第16天脂肪源性基质细胞呈肌蛋白表达减弱(免疫荧光染色,  $\times 200$ )

Figure 10 Slight expression of desmin in adipose-derived stromal cells of 5-azacytidine induction group at 16 d (Immunohistochemical staining,  $\times 200$ )

**2.4 各组细胞的增殖情况** 联合诱导培养的细胞较MyoD+转化生长因子 $\beta$ 1诱导组快, 细胞群体倍增时间为32 h, 大约16 d达80%融合, MyoD+转化生长因子 $\beta$ 1诱导组倍增时间为48 h, 20 d达融合; 而5-氮杂胞苷诱导组增殖缓慢, 表现为群体倍增时间延长至66 h, 约24 d达融合; 此外, 联合诱导组的细胞接种后第4天开始增殖, 第8天进入倍增期, 第12天达峰值, 第20天步入平台期, 诱导第28天细胞潜伏期延长, 增殖速度有所减慢; MyoD+转化生长因子 $\beta$ 1诱导组第12天细胞开始增殖, 第16天进入峰值, 第28天为衰减期;

5-氮杂胞苷诱导组第20天进入峰值, 第24天为衰减期; 对照组细胞增殖能力均较前两组延缓, 生长曲线见图11。



2.5 各组细胞流式细胞检测结果 联合诱导组脂肪源性基质细胞的DNA复制期细胞比例增加, 间隙期细胞减少, 提示细胞DNA合成及增殖活动增强, 5-氮杂胞苷诱导组与空白对照组比较差异无显著性意义( $P > 0.05$ ), 见表1。

表 1 流式细胞仪测定的细胞周期

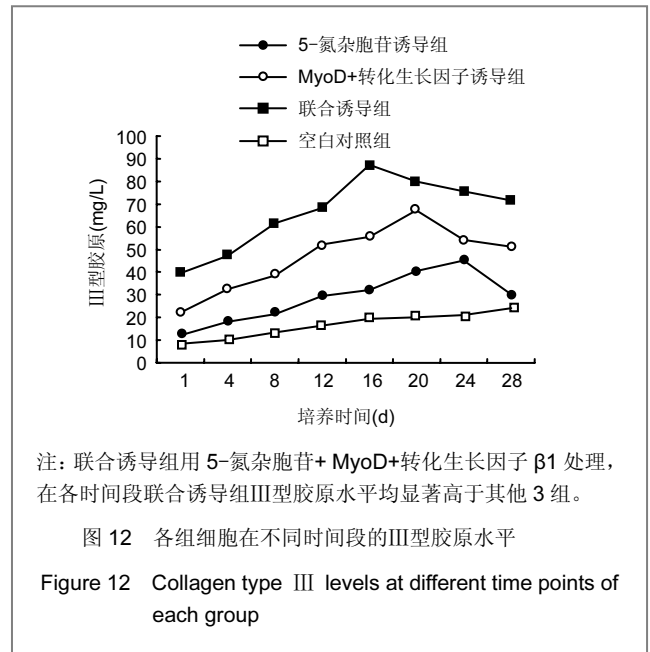
Table 1 Cell cycle detected with flow cytometry ( $\bar{x} \pm s, n=6, \%$ )

组别	G <sub>1</sub> 期	G <sub>2</sub> 期	S 期
5-氮杂胞苷诱导组	74.67±1.13	16.10±1.09	35.63±2.31
MyoD+转化生长因子 β1 诱导组	53.18±3.11 <sup>a</sup>	11.19±1.80	19.32±3.23
联合诱导组	33.92±5.12 <sup>a</sup>	4.52±3.20 <sup>a</sup>	69.38±4.21 <sup>b</sup>
空白对照组	94.32±3.13	9.16±4.15	13.68±2.18

联合诱导组为 5-氮杂胞苷+ MyoD+转化生长因子 β1 处理; 与空白组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ 。

注: 联合诱导组脂肪源性基质细胞的 DNA 复制期细胞比例增加, 间隙期细胞减少。

2.6 各组细胞III型胶原测定 第8天, MyoD+转化生长因子β1诱导组胶原活性明显增高, 第20天, 胶原含量最高, 显著高于常规诱导及对照组, 各时间段联合诱导组均高于其他3组胶原水平, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ ), 见图12。



### 3 讨论

随着组织工程学技术在泌尿生殖道修复重建领域的不断渗透, 一些学者渴望寻求一种理想的干细胞供源, 来弥补肌卫星细胞数量不足的缺陷<sup>[8-17]</sup>。移植治疗女性张力性尿失禁尚处于探索阶段, 种子细胞多为骨骼肌细胞及骨髓间充质干细胞, 虽然避免了应用胚胎干细胞所引发的伦理道德问题, 但并非完美。这主要与细胞获取方式属有创操作, 体外扩增困难等有关<sup>[18-22]</sup>。有学者发现胎儿脐血及孕妇羊水中含有间充质干细胞, 但存在疾病传播等风险<sup>[23-25]</sup>。作者认为, 理想的干细胞应是自体的, 其次是供源充足、获取方式不会对机体造成伤害。在这种前提下, 以脂肪组织为代表的脂肪源性基质细胞, 应该是较理想的种子细胞候选物。国外学者预测, 脂肪源性基质细胞有望成为迄今人类最大的成体干细胞库<sup>[26-31]</sup>。

干细胞在成肌细胞分化中表现出细胞形态与功能方面的演变, 细胞形态学演变包括细胞变形伸展能力、细胞外源性及其管排列情况等, 功能方面体现在细胞周期变化、细胞增殖能力、成肌细胞标志物的表达及III型胶原合成能力等。正常情况下, 成肌细胞发育分化过程中, 细胞出现融合, 形成肌管及肌纤维。同时, 一些成肌标志分子呈现表达, 早期表达为Pax3、Six1、Six4等, Pax7、c-met接着出现, 随后是MyoD、Myogenin、Dystrophin、结蛋白等, myf6、MRF、myosin和β-actin在分化终末期出现<sup>[2]</sup>。5-氮杂胞苷是一种DNA甲基化抑制剂, 5-氮杂胞苷使间充质干细胞的相关基因发生去甲基化, 促使成肌细胞分化的调控基因表达, 启动向成肌细胞定向分化。实验参照前期文献报道, 采用10 μmol/L

作为5-氮杂胞苷的诱导浓度, 并选择含5-氮杂胞苷的诱导培养液作为诱导脂肪源性基质细胞为成肌细胞的分化剂。

通过改变适宜细胞的某种生存环境, 就会影响到成肌细胞的分化过程。MyoD可使静止期的肌卫星细胞向成肌细胞分化, 并促使其融合, 分化为成熟的肌纤维。MyoD是向平滑肌细胞分化的“启动者”, 依次能激活肌细胞生成素、肌球蛋白、肌红蛋白和结蛋白的表达, 这些成肌因子是平滑肌最早的成肌标志之一。转化生长因子 $\beta 1$ 具有调控间充质干细胞增殖与定向分化的主要因子之一, 并能抑制多种炎症递质的生物活性。MyoD与转化生长因子 $\beta 1$ 共同作用于脂肪源性基质细胞, 可诱导细胞早期表达结蛋白, 促使细胞发生形变。

实验结果提示, MyoD+转化生长因子 $\beta 1$ 诱导组较5-氮杂胞苷诱导组的细胞活性较强, 作者分析, MyoD与转化生长因子 $\beta 1$ 诱导时效早于5-氮杂胞苷诱导, 这可能与不同的诱导机制有关。5-氮杂胞苷可能为间接诱导模式, 而MyoD与转化生长因子 $\beta 1$ 为直接诱导模式。

如何确保干细胞的大规模扩增是脂肪源性基质细胞过渡到临床的核心问题, 通过改变细胞诱导环境及延长时效是完善细胞体外扩增的主要策略。实验基于常规5-氮杂胞苷诱导前提下, 添加了MyoD及转化生长因子 $\beta 1$ 。通过检测成肌细胞特异性抗原结蛋白表达, 比较成肌诱导效果, 结果显示联合诱导组诱导第4天, 检测到结蛋白表达, 随着诱导时间延长, 结蛋白表达率逐渐升高, 至20 d达高峰; 5-氮杂胞苷诱导组在16 d表达, 在24 d达高峰, 表达时效均较联合诱导组延缓, 而且表达率较联合诱导组低, 差异有统计学意义。对照组均未检测到结蛋白表达。

多核肌管的形成是脂肪源性基质细胞分化为成肌细胞的重要形态学标志。倒置显微镜下显示, 联合诱导组诱导细胞呈长梭形、多核化, 细胞融合较充分, 细胞变形、伸展能力较常规组强。这提示通过细胞因子和5-氮杂胞苷改变了脂肪源性基质细胞生长环境, 诱导第16天可见多核性肌小管结构, 细胞外基质分泌旺盛。此外, S+G<sub>2</sub>M 期细胞百分比为增殖指数, 代表了细胞群体中的增殖期数量, 反映出细胞的增殖状态。通过比较各组流式细胞术细胞周期不同阶段的效应, 说明转化生长因子 $\beta 1$ 能增加G<sub>2</sub>M 期的细胞比例, 依靠缩短细胞周期达到增殖作用。MTT结果也证明了联合诱导组出现类似效应。

综上所述, 实验表明联合诱导法是脂肪源性基质细胞分化成肌细胞的理想方法, 是成肌细胞体外培养的有效途径, 为培养肌源性干细胞提供了良好的尝试。肌肉再生是一个复杂的生物学过程, 涉及多种生长因子间相互作用。脂肪源性基质细胞真正应用到临床尚存在一些距离, 例如, 经诱导的成肌细胞能否与神经突触建立联

系, 这影响到移植的成肌细胞是否具有协调神经功能等。这些未知领域有待今后深入研究。

**基金资助:** 天津市卫生局科技基金资助项目(2011KZ68)。

**作者贡献:** 实验设计为第一作者, 实施为第一、三、四、五作者, 实验指导为第二作者, 评估为第三、五作者, 资料收集为第四、五作者。第一作者成文, 第二作者审核, 第一作者对文章负责。

**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。

**伦理要求:** 实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

**学术术语:** 肌管-边周含有肌原纤维的长条形多核细胞, 由成肌细胞融合而成, 最后分化成成熟的肌纤维。

**作者声明:** 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

#### 4 参考文献

- [1] Hashimoto N, Murase T, Kondo S, et al. Muscle reconstitution by muscle satellite cell descendants with stem cell-like properties. *Development*. 2004;131(21):5481-5490.
- [2] Buckingham M. Skeletal muscle progenitor cells and the role of Pax genes. *C R Biol*. 2007;330(6):530-533.
- [3] Konning M, Werker PM, Van Luyn MJ, et al. A global downregulation of microRNAs occurs in human quiescent satellite cells during myogenesis. *Differentiation*. 2012; 84(4): 314-321.
- [4] Perrucho MH, Ecolan P, Sorensen IL, et al. In vitro characterization of proliferation and differentiation of pig satellite cells. *Differentiation*. 2012;84(4):322-329.
- [5] Le Grand F, Grifone R, Mourikis P, et al. Six1 regulates stem cell repair potential and self-renewal during skeletal muscle regeneration. *J Cell Biol*. 2012;198(5):815-832.
- [6] Brohl D, Vasyutina E, Czajkowski MT, et al. Colonization of the satellite cell niche by skeletal muscle progenitor cells depends on notch signals. *Dev Cell*. 2012;23(3):469-481.
- [7] 刘杰, 傅强. Beagle 犬上皮细胞原代培养鉴定及脂肪干细胞诱导成肌的实验研究[J]. *中华临床医师杂志*, 2011, 5(10):2864-2871.
- [8] 刘静, 糜若然. 组织工程学技术治疗女性张力性尿失禁研究进展[J]. *中国妇幼保健*, 2010, 25(2):278-280.
- [9] Mitterberger M, Pinggera GM, Marksteiner R, et al. Adult stem cell therapy of female stress urinary incontinence. *Eur Urol*. 2008;53(1):169-175.
- [10] Xu Y, Fu W, Li G, et al. Autologous urothelial cells transplantation onto a prefabricated capsular stent for tissue engineered ureteral reconstruction. *J Mater Sci Mater Med*. 2012;23(4):1119-1128.
- [11] Chun SY, Kim HT, Lee JS, et al. Characterization of urine-derived cells from upper urinary tract in patients with bladder cancer. *Urology*. 2012;79(5):1-7.



- [12] Zhang J, Gu GL, Liu GH, et al. Ureteral reconstruction using autologous tubular grafts for the management of ureteral strictures and defects: an experimental study. *Urol Int.*2012; 88(1):60-65.
- [13] Chen BS, Xie H, Zhang SL, et al. Tissue engineering of bladder using vascular endothelial growth factor gene-modified endothelial progenitor cells. *Int J Artif Organs.* 2011;34(12):1137-1146.
- [14] Basu J, Jayo MJ, Ilagan RM, et al. Regeneration of native-like neo-urinary tissue from nonbladder cell sources. *Tissue Eng Part A.*2012;18(9):1025-1034.
- [15] Fu Q, Cao YL. Tissue engineering and stem cell application of urethroplasty;from bench to bedside. *Urology.*2012;79(2): 246-253.
- [16] Davis NF, Mooney R, Piterina AV, et al. Construction and evaluation of urinary bladder bioreactor for urologic tissue-engineering purposes. *Urology.*2011;78(9):954-960.
- [17] Subramaniam R, Hinley J, Stahlschmidt J, et al. Tissue engineering potential of urothelial cells from diseased bladders. *J Urol.*2011;186(5):2014-2020.
- [18] Kim YT, Kim DK, Jankowski RJ, et al. Human muscle-derived cell injection in a rat model of stress urinary incontinence. *Muscle Nerve.*2008;36(3):391-393.
- [19] Kwon D, Kim Y, Pruchnic R, et al. Periurethral cellular injection: comparison of muscle-derived progenitor cells and fibroblasts with regard to efficacy and tissue contractility in an animal model of stress urinary incontinence. *Urology.*2006;68(2): 449-454.
- [20] Yu J, Li Y, Li M, et al. Oxidized low density lipoprotein induced transdifferentiation of bone marrow-derived smooth muscle-like cells into foam-like cells in vitro. *Int J Exp Pathol.* 2010;91(1):24-33.
- [21] Tian H, Bharadwaj S, Liu Y, et al. Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into bladder cells: potential for urological tissue engineering. *Tissue Eng Part A.*2010;16(5):1769-1779.
- [22] Choi YS, Vincent LG, Lee AR, et al. Mechanical derivation of functional myotubes from adipose-derived stem cells. *Biomaterials.*2012;33(8):2482-2491.
- [23] Arien-Zakay H, Lazarovici P, Nagler A. Tissue regeneration potential in human umbilical cord blood. *Best Pract Res Clin Haematol.*2010;23(2):291-303.
- [24] Hauser PV, De Fazio R, Bruno S, et al. Stem cells derived from human amniotic fluid contribute to acute kidney injury recovery. *Am J Pathol.*2010;177(4):2011-2021.
- [25] Longo UG, Loppini M, Berton A, et al. Stem cells from umbilical cord and placenta from musculoskeletal tissue engineering. *Curr Stem Cell Res Ther.*2012,7(4):272-281.
- [26] 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.
- [27] Cho HH, Kim YJ, Kim SJ, et al. Endogenous wnt signaling promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation in human adipose derived stromal cells. *Tissue Eng.*2006;12(1):111.
- [28] Lin CS. Advances in stem cell therapy for the lower urinary tract. *World Journal Stem Cell.*2010; 26(1):1-4.
- [29] Shiraishi T, Sumita Y, Wakamastu Y, et al. Formation of engineered bone with adipose stromal cells from buccal fat pad. *J Dent Res.*2012;9(6):592-597.
- [30] Man Y, Wang P, Guo Y, et al. Angiogenic and osteogenic potential of platelet-rich plasma and adipose-derived stem cell laden alginate microspheres. *Biomaterials.*2012;33(34): 8802-8811.
- [31] Geng J, Liu G, Peng F, et al. Decorin promotes myogenic differentiation and mdx mice therapeutic effects after transplantation of rat adipose-derived stem cells. *Cytotherapy.* 2012;14(7):877-886.