

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.06.009 [http://www.crter.org]

李世龙, 刘毅, 惠玲. 携带人胰岛素基因腺病毒载体转染人脐带间充质干细胞及其成脂分化[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(6):999-1003.

携带人胰岛素基因腺病毒载体转染人脐带间充质干细胞及其成脂分化*[◆]

李世龙¹, 刘毅², 惠玲³

1 兰州大学第二临床医学院, 甘肃省兰州市 730050

2 解放军兰州军区兰州总医院, 全军烧伤整形外科中心, 甘肃省兰州市 730050

3 解放军兰州军区兰州总医院, 甘肃省干细胞与基因药物重点实验室, 甘肃省兰州市 730050

文章亮点:

胰岛素是成脂诱导剂的重要组成成分。将人胰岛素基因通过腺病毒载体导入到人脐带间充质干细胞, 旨在解决干细胞随着传代次数增加而成脂能力减弱及成活力低下的问题, 同时在不加诱导剂的情况下能主动分化为脂肪细胞。实验在细胞水平证明了转染人胰岛素基因的作用, 为今后体内研究奠定了基础。

关键词:

干细胞; 脐带脐血干细胞; 人胰岛素基因; 间充质干细胞; 腺病毒载体; 基因转染; 细胞分化; 其他基金; 干细胞图片文章

摘要

背景: 胰岛素是成脂诱导剂的重要组成成分。然而胰岛素存在半衰期, 会随着体内代谢不断灭活及降解, 植入体内的细胞或材料无法像体外那样以更换培养液来达到目的。实验拟通过转染胰岛素基因, 使转染后的干细胞稳定分泌胰岛素, 促进其成脂分化。

目的: 探讨携带人胰岛素基因腺病毒载体转染人脐带间充质干细胞后对其成脂分化能力的影响。

方法: 取第3代人脐带间充质干细胞, 以感染复数为20转染腺病毒载体。实验分为4组: 对照组为第4代人脐带间充质干细胞; 实验组1为腺病毒转染的第4代人脐带间充质干细胞; 实验组2为第4代人脐带间充质干细胞+成脂诱导液; 实验组3为腺病毒转染的第4代人脐带间充质干细胞+成脂诱导液。

结果与结论: 转染48 h后实验组1和实验组3的人脐带间充质干细胞在荧光显微镜下显现弱荧光, 72 h后荧光较强。经脂肪诱导培养液培养14 d后, 实验组1, 2, 3油红O染色后显微镜下呈红色, 对照组未见脂滴形成, 实验组1可见一些细小脂滴形成; 实验组3与实验组2相比, 脂滴大且多, 定量分析显示, 实验组3油红O染色阳性的面积和吸光度大于实验组2($P < 0.05$)。由此说明携带人胰岛素基因腺病毒载体转染人脐带间充质干细胞后可促进其成脂能力。

李世龙, 男, 1985年生, 江西省吉安市永丰县人, 汉族, 2010年南昌大学毕业, 主要从事脂肪组织工程的研究。

lsllwxkp@126.com

通讯作者: 刘毅, 主任医师, 教授, 解放军兰州军区兰州总医院全军烧伤整形外科中心, 甘肃省兰州市 730050
liuzhih20002003@yahoo.com.cn

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

文章编号:2095-4344
(2013)06-00999-05

收稿日期: 2012-05-03

修回日期: 2012-06-15

(20120503005/M·C)

Adipogenic differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells transfected by insulin gene-modified adenovirus vector

Li Shi-long¹, Liu Yi², Hui Ling³

1 The Second Clinical Medical College of Lanzhou University, Lanzhou 730050, Gansu Province, China

2 Center of Military Burns and Plastic Surgery, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Command of Chinese PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China

3 Gansu Provincial Key Laboratory of Stem Cells and Gene Drugs, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Command of Chinese PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China

Li Shi-long, the Second Clinical Medical College of Lanzhou University, Lanzhou 730050, Gansu Province, China
lslwxkp@126.com

Corresponding author: Liu Yi, Chief physician, Professor, Center of Military Burns and Plastic Surgery, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Command of Chinese PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China
1iuzhih20002003@yahoo.com.cn

Supported by: Key Issues of Twelfth Five-Year Development Program of Military Medical Research, No. BWS11C061*

Received: 2012-05-03
Accepted: 2012-06-15

Abstract

BACKGROUND: Insulin is an important component of adipogenic inducers. Insulin has the half-life, which can continuously inactivate and degrade with the *in vivo* metabolism, and the cells and the materials implanted in the body cannot replace the culture medium to achieve the purpose like in *in vitro* environment. Transfection of insulin gene can make the transfected stem cells secrete the insulin stably which can promote the adipogenic differentiation.

OBJECTIVE: To investigate the adipogenic differentiation potential of human umbilical cord mesenchymal stem cells transfected by insulin gene-modified adenovirus vector.

METHODS: Passage 4 human umbilical cord mesenchymal stem cells were collected and transfected with adenovirus vector with the multiplicity of infection of 20. The experiment was divided into four groups. Passage 4 human umbilical cord mesenchymal stem cells were included in the control group. Passage 4 human umbilical cord mesenchymal stem cells transfected with adenovirus vector were included in experimental group 1, passage 4 human umbilical cord mesenchymal stem cells + adipogenic liquid were used in the experimental group 2, and passage 4 human umbilical cord mesenchymal stem cells transfected with adenovirus vector + adipogenic liquid were used in experimental group 3.

RESULTS AND CONCLUSION: After transfected for 48 hours, weak fluorescence in human umbilical cord mesenchymal stem cells was observed in experimental groups 1 and 3 through the fluorescence microscope and strong fluorescence appeared after transfected for 72 hours. After cultured with adipose-inducing culture medium for 14 days, the cells in the experimental groups 1, 2, 3 were red under microscope after oil red O staining, no lipid droplets were observed in the control group; the lipid droplets in the experimental group 3 were larger and more than those in the experimental group 2. Quantitative analysis showed the positive area of oil red O staining and the absorbance value in the experimental group 3 were greater than those in the experimental group 2 ($P < 0.05$). The results show that the human umbilical cord mesenchymal stem cells transfected by insulin gene-modified adenovirus vector can promote cell adipogenic differentiation.

Key Words: stem cells; umbilical cord/umbilical cord blood stem cells; human insulin gene; mesenchymal stem cells; adenovirus vector; gene transfection; cell differentiation; other grants-supported paper; stem cell photographs-containing paper

Li SL, Liu Y, Hui L. Adipogenic differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells transfected by insulin gene-modified adenovirus vector. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(6):999-1003.

0 引言

人脐带间充质干细胞是存在于华氏胶中的一种具有自我更新、增殖和多向分化潜能的成纤维细胞样细胞。它与脂肪间充质干细胞、骨髓间充质干细胞、胚胎干细胞相比,具有以下优势:来源丰富,成本低,不受年龄影响,不涉及伦理问题,不会给捐献者带来伤害,表达胚胎干细胞某些特异标志等^[1]。故人脐带间充质干细胞是一种很有潜力的应用于组织工程的种子细胞。

腺病毒表达载体是进行基因功能研究和基因治疗研究的有利工具,腺病毒可以有效感染人脐带间充质干细胞。实验主要观察携带人胰岛素基因腺病毒载体转染人脐带间充质干细胞后对其成脂分化能力的影响。

1 材料和方法

设计: 体外细胞水平观察性实验。

时间及地点: 实验于2011年9至12月在解放军兰州军区兰州总医院骨科研究所、医学科学实验中心(甘肃省干细胞与基因药物重点实验室)完成。

材料:

脐带: 取自解放军兰州军区兰州总医院妇产科足月剖宫健康产妇,取材前均经产妇本人

及其家属授权同意。

主要试剂、仪器:

Main reagents and instruments:

试剂及仪器	来源
低糖 DMEM, 地塞米松、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、吡哆美辛、胰岛素、油红 O	Sigma
携带人胰岛素基因+绿色荧光蛋白的腺病毒载体	北京诺赛基因组研究中心有限公司
CO ₂ 恒温培养箱	Heracell
超净工作台	杭州净化有限公司
倒置相差显微镜、荧光显微镜	Olympus 公司
台式离心机	长沙湘仪离心机仪器有限公司
体积分数为 10% 胎牛血清	兰州民海生物工程有限公司

实验方法:

人脐带间充质干细胞的分离与培养: 按本实验室建立的方法分离与培养人脐带间充质干细胞^[2-4]。

体外多向诱导分化: 取第 3 代人脐带间充质干细胞, 在细胞培养融合达 80% 时, 分别成脂、成骨诱导 14 d, 并行油红 O 及茜素红染色观察。

人脐带间充质干细胞的腺病毒转染: 取第 3 代人脐带间充质干细胞, 培养至贴壁细胞融合成单层, 用 0.25% 胰酶消化, 以 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 种于 4 个 6 孔板, 待细胞长到 80% 融合时, 取 2 个 6 孔板, 去培养基, 加入 1 mL 无血清培养基和感染复数为 20 时计算所需病毒液, 摇匀置入 37 °C, 体积分数为 5% CO₂ 恒温培养箱, 每 15 min 再次摇匀, 使病毒颗粒充分与细胞接触。1 h 后, 加入 1 mL 10% 完全培养基过夜。24 h 后更换培养基, 48, 72 h 后观察荧光表达。

人脐带间充质干细胞定向成脂诱导分化: 实验分 4 组, 实验 1 组, 实验 2 组, 实验 3 组与对照组。实验 1 组为腺病毒转染的第 4 代人脐带间充质干细胞; 实验 2 组为第 4 代人脐带间充质干细胞+成脂诱导液; 实验 3 组为腺病毒转染的第 4 代人脐带间充质干细胞+成脂诱导液; 对照组为单纯第 4 代人脐带间充质干细胞。实验 2 组、实验 3 组 6 孔板于转染 72 h 后更换成脂诱导液, 每 3 d 更换培养液, 诱导 14 d 后油红 O 染色。使用 Imge-Pro Plus 图像分析软件(Version 5.0), 在实验 2 组、实验 3 组中各孔随机取 1 个放大 400 倍的视野, 对油红 O 染色为阳性的进行定量分析, 计算每视野阳性染色的积分吸光度和面积作为最终数据。

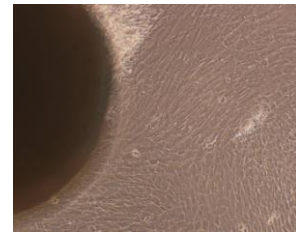
主要观察指标: 细胞形态, 油红 O 染色阳性的面积和吸光度。

统计学分析: 应用 SPSS 11.0 统计学软件对数据进

行两独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 人脐带间充质干细胞体外培养的形态学特点 原代培养 5-7 d 时, 在倒置相差显微镜下可观察到成纤维状细胞从脐带组织块周围爬出, 14-16 d 时细胞可达 80% 融合, 连续传至 10 代未见细胞形态有明显改变, 见图 1。

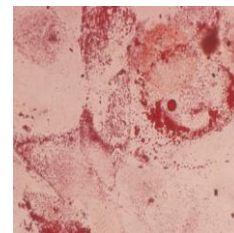


注: 在倒置相差显微镜下观察到培养 16 d 时人脐带间充质干细胞可达 80% 融合。

图 1 原代培养第 16 天人脐带间充质干细胞的形态(x100)

Figure 1 Morphology of human umbilical cord mesenchymal stem cells after primary culture for 16 d (x100)

成脂诱导 3 d 左右细胞形态由长梭形转变为椭圆形、圆形, 第 14 天时镜下可见胞质内大量小脂滴, 部分脂滴融合形成较大的脂滴, 油红 O 染色呈阳性, 见图 2。

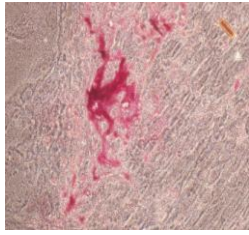


注: 成脂诱导第 14 天时镜下可见胞质内大量小脂滴, 部分脂滴融合形成较大的脂滴。

图 2 成脂诱导 14 d 人脐带间充质干细胞油红 O 染色呈阳性(x400)

Figure 2 Oil red O staining of human umbilical cord mesenchymal stem cells after adipogenic induction for 14 d (x400)

成骨诱导 3 d 左右细胞形态由长梭形转变为多角形、方形、三角形等, 第 14 天时细胞生长密集, 部分细胞出现层叠样生长, 茜素红染色后镜下可见细胞密集处有红色的结节状沉积物, 提示有钙化结节形成, 见图 3。以上证明从脐带分离出来的贴壁细胞为人脐带间充质干细胞。

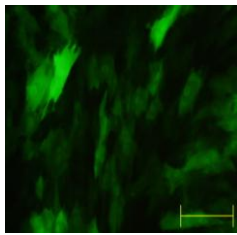


注: 成骨诱导第 14 天时细胞生长密集, 茜素红染色后镜下可见细胞密集处有红色的结节状沉积物。

图 3 成骨诱导 14 d 人脐带间充质干细胞有钙化结节形成 (茜素红染色, ×100)

Figure 3 Formation of calcified nodules could be seen in human umbilical cord mesenchymal stem cells after adipogenic induction for 14 d (×100)

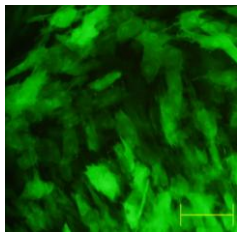
2.2 腺病毒转染人脐带间充质干细胞的荧光表达 按感染复数为20的条件体外转染人脐带间充质干细胞, 48 h 后自荧光显微镜下观察, 发现在部分细胞中开始有弱荧光表达, 72 h后荧光明显增强, 转染率达80%, 见图4, 5。



注: 以感染复数为 20 的条件体外转染人脐带间充质干细胞, 48 h 后荧光显微镜下发现部分细胞中开始有弱荧光表达。

图 4 腺病毒转染 48 h 人脐带间充质干细胞有弱荧光表达 (×100)

Figure 4 Weak fluorescence could be seen in the human umbilical cord mesenchymal stem cells after transfected with adenovirus vector for 48 h (×100)

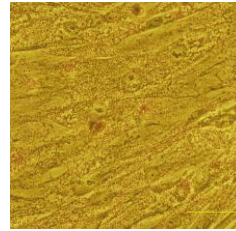


注: 以感染复数为 20 的条件体外转染人脐带间充质干细胞, 72 h 后荧光显微镜下可见人脐带间充质干细胞中荧光明显增强。

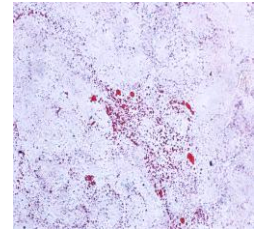
图 5 腺病毒转染 72 h 人脐带间充质干细胞荧光表达增强, 转染率 80% (×100)

Figure 5 The fluorescence expression of human umbilical cord mesenchymal stem cells was enhanced after transfected with adenovirus vector for 72 h (×100)

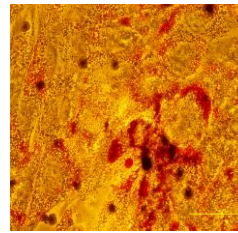
2.3 成脂诱导 经成脂诱导后, 细胞胞浆中开始出现细小油滴, 细胞排列无序, 由长梭状变成椭圆形, 14 d 后观察到形成高折光性脂滴。经油红O染色, 对照组未见脂滴, 实验1组(腺病毒转染的第4代人脐带间充质干细胞)可见脂滴形成。实验3组(腺病毒转染的第4代人脐带间充质干细胞+成脂诱导液)与实验2组(第4代人脐带间充质干细胞+成脂诱导液)相比, 脂滴大且多, 两者比较差异有显著性意义($P < 0.05$), 见图6和表1。



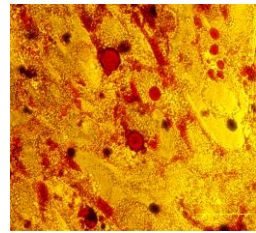
A: 对照组未见脂滴形成



B: 实验 1 组 (腺病毒转染的第 4 代人脐带间充质干细胞)



C: 实验 2 组 (第 4 代人脐带间充质干细胞+成脂诱导液)



D: 实验 3 组 (腺病毒转染的第 4 代人脐带间充质干细胞+成脂诱导液)

注: 经脂肪诱导培养液培养 14 d 后, 实验 1, 2, 3 组油红 O 染色后显微镜下可见对照组未见脂滴形成, 实验组 1 可见一些细小脂滴形成, 实验 3 组与实验 2 组相比, 脂滴大且多。

图 6 成脂诱导 14 d 各组人脐带间充质干细胞形态变化(油红 O 染色, ×400)

Figure 6 Morphological changes of human umbilical cord mesenchymal stem cells in each group after transfected with adenovirus vector for 14 d (oil red O staining, ×400)

表 1 腺病毒转染人脐带间充质干细胞后油红 O 染色阳性的面积和吸光度

Table 1 The positive area of oil red O staining and absorbance value of human umbilical cord mesenchymal stem cells after transfected by adenovirus vector ($\bar{x} \pm s$)

组别	参数	
	面积	吸光度
实验 2 组	35 279.50±7 648.02	29 692.68±6 277.62
实验 3 组	57 751.00±7 638.21 ^a	50 320.42±6 275.23 ^a

与实验 2 组比较, ^a $P < 0.05$ 。

注: 实验 2 组: 第 4 代人脐带间充质干细胞+成脂诱导液; 实验 3 组: 腺病毒转染的第 4 代人脐带间充质干细胞+成脂诱导液。

3 讨论

脂肪组织工程的首要问题是脂肪细胞的成活和吸收^[5]。种子细胞的选择是脂肪组织工程的关键因素,合适的种子细胞可以通过诱导因子的作用,促进其向脂肪细胞分化。

研究发现,间充质干细胞除可以定向分化为骨细胞、神经元等细胞外,间充质干细胞还易于被外源基因转染,且具有向损伤组织趋化聚集的特性,便于将目的基因导入病灶并发挥治疗性的作用^[6]。目前间充质干细胞主要来源是骨髓,但临床上骨髓取材困难,供体有限,随年龄增长骨髓间充质干细胞增殖能力、多向分化能力下降,且有病毒污染的可能,这些限制了骨髓间充质干细胞的进一步临床应用。近年课题组从脐带成功分离到间充质干细胞,且由于被证明与骨髓间充质干细胞具有相似的生物学特性。脐带间充质干细胞具有取材方便,来源丰富、易于采集保存,不涉及伦理问题,免疫原性相对较低,疾病传染概率下降,较为原始,分化能力强等优点^[7]。脐带间充质干细胞的成功分离必将成为组织工程和基因工程重要的靶细胞^[8]。

胰岛素是成脂诱导剂的重要组成成分。在代谢方面,胰岛素能促进脂肪的合成与贮存,使血中游离脂肪酸减少,同时抑制脂肪的分解氧化^[9]。胰岛素能传递外部信号刺激脂肪细胞分化,促进脂肪形成及血管发生。向胎牛血清培养基中加入地塞米松、甲状腺激素或胰岛素等诱导剂,能使前脂肪细胞和干细胞的体外分化得到加强^[10]。然而胰岛素存在半衰期,植入体内无法像体外那样以更换培养液来达到目的。通过转染胰岛素基因,使其稳定分泌胰岛素,从而促进成脂过程。

实验选用携带人胰岛素基因腺病毒载体转染人脐带间充质干细胞,结果表明:转染携带人胰岛素基因腺病毒载体能促进未诱导的人脐带间充质干细胞向脂肪细胞分化。至于如何确定准确调节胰岛素合成的转入量,有待于进一步研究。

基金资助: 全军医学科研“十二五”重点课题(BWS11C061)。

作者贡献: 实验设计第三作者,实施与资料采集为第一、二作者,实施评估为第一、二作者,均经过正规培训,采用盲法评估。第一作者成文,第二作者审校,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: 脐带由解放军兰州军区兰州总医院妇产科提供,产妇和家属同意用于科学研究,并获得解放军兰州军区兰州总医院医学伦理委员会批准。

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] Taha MF, Hedayati V. Isolation, identification and multipotential differentiation of mouse adipose tissue-derived stem cells. *Tissue Cell*. 2010;42(4):211-216.
- [2] Liu Y, Xiao HT. Zhongguo Meirong Yixue. 2011;20(5):774-776. 刘毅,肖宏涛.人脐带间充质干细胞与蚕丝蛋白支架构建组织工程脂肪的研究[J].中国美容医学, 2011, 20(5): 774-776.
- [3] Liu Y, Xue MS. Zhongguo Xiufu Chongjian Waike Zazhi. 2010; 24(7): 822-827. 刘毅,薛美思.携带人胰岛素基因慢病毒载体转染人脐带间充质干细胞的实验研究[J].中国修复重建外科杂志, 2010, 24(7): 822-827.
- [4] Xiao HT, Niu XH, Liu Y. Zhengzhou Daxue Xuebao: Yixueban. 2010; 45(2): 213-216. 肖宏涛,牛希华,刘毅.人脐带间充质干细胞的体外分离,培养及诱导分化[J].郑州大学学报:医学版, 2010, 45(2): 213-216.
- [5] Kim WS, Mooney DJ, Arany PR, et al. Adipose tissue engineering using injectable, oxidized alginate hydrogels. *Tissue Eng Part A*. 2012;18(7-8):737-743.
- [6] Annabi B, Lee YT, Turcotte S, et al. Hypoxia promotes murine bone-marrow-derived stromal cell migration and tube formation. *Stem Cells*. 2003;21(3):337-347.
- [7] Petsa A, Gargani S, Felesakis A, et al. Effectiveness of protocol for the isolation of Wharton's Jelly stem cells in large-scale applications. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2009; 45(10):573-576.
- [8] Liu AM, Luo M, Li G, et al. Zhongguo Bingli Shengli Zazhi. 2008; 24(12): 2450-2454. 刘安民,罗铭,李国,等.重组人肝细胞生长因子在人脐带间充质干细胞中高效表达[J].中国病理生理杂志, 2008, 24(12):2450-2454.
- [9] Hong SJ, Lee JH, Hong SM, et al. Enhancing the viability of fat grafts using new transfer medium containing insulin and beta-fibroblast growth factor in autologous fat transplantation. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2010;63(7):1202-1208.
- [10] Fu S, Guo SZ. Zhongguo Meirong Yixue. 2008;17(6):932-934. 付苏,郭树忠.脂肪组织工程研究进展[J].中国美容医学, 2008, 17(6): 932-934.