

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.11.010

人脐带间充质干细胞的成脂诱导分化及其相关基因鉴定*

杨雯^{1,2} 惠玲^{2Δ} 吕同德^{2Δ} 闫蔚² 王鲲²

(1 青海大学 青海 西宁 810008; 2 兰州军区总医院 甘肃 兰州 730050)

摘要 目的:探讨人脐带间充质干细胞(hUC-MSCs)的分离提取、体外诱导分化为脂肪细胞的能力及其相关基因的表达情况。**方法:**取新生儿脐带经组织培养法提取后分离培养于αMEM完全培养基中,经大量纯化与扩增后,采用倒置显微镜观察其形态与细微结构;流式技术检测其细胞周期及表面标志;以含有成脂诱导剂的αMEM培养基对P3的hUC-MSCs进行培养,诱导其向脂肪细胞方向分化,对其对诱导后的细胞进行检测。应用油红“O”染色对其进行定性鉴定;应用实时定量RT-PCR对LPL、Leptin的基因含量进行测定。**结果:**经过组织培养法后,细胞呈贴壁生长,细胞呈梭形或旋涡状,形态不规则,多数有凸起,细胞核较大,核仁明显;第7代以前的细胞具有较强的生长活性;流式技术检测发现此类细胞高表达CD44、CD73和CD105等细胞表面标记,而几乎不表达CD34、CD45、CD31和HLA-DR。培养至第3代的细胞约72.724%的细胞处G1期、S期的细胞仅占18.069%,第7代时G1期细胞约为83.875%、S期为9.606%左右;经成脂诱导剂诱导分化后,细胞经油红“O”染色,分化为脂肪细胞的细胞着色并呈红色,实时定量RT-PCR结果显示该部分细胞表达脂肪细胞的标志性基因LPL和Leptin。**结论:**P7以前的hUC-MSCs具有较强的生长分化能力,可以向脂肪细胞进行分化并表达一定量的特定标志性基因。

关键词:人脐带间充质干细胞;体外诱导;脂肪细胞;基因鉴定

中图分类号:R392.12, Q813 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)11-2043-04

Oriented Adipogenic Differentiation of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells and Identification of the Relative Genes*

YANG Wen^{1,2}, HUI Ling^{2Δ}, LV Tong-de^{2Δ}, YAN Wei, WANG Kun²

(1 Qinghai University, Xining, Qinghai, 810008, China; 2 Hospital of Lanzhou Military Region, Lanzhou, Guansu, 730050, China)

ABSTRACT Objective: To extract and isolate the human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells (hUC-MSCs) from umbilical cord, induce the oriented adipogenic differentiation and identify the biological characteristics. **Methods:** The hUC-MSCs were isolated from umbilical cord tissue of newborn babies and cultured in αMEM complete medium. After large-scale purification and amplification, the morphology of cells was observed by using an inverted microscope. The cell cycle and surface markers were detected by flow cytometry. hUC-MSCs were cultured and induced into adipocyte in an adipogenic agent αMEM medium for P3 and the induced cells were detected and confirmed. The cells were stained by Oil Red “O” for its qualitative identification and the Leptin gene expression was determined by using real-time quantitative RT-PCR for LPL. **Results:** After tissue culture, the cells grown in an adherent way. The cells were spindle or spiral-shaped, irregular, and most of them have raised and large nuclei and prominent nucleoli. Cells Before the 7th generations exhibited a strong growth activity. There was the expression of markers of cell surface, such as CD44, CD73 and CD105, etc, but the CD34, CD45, CD31 and HLA-DR had not expression. Approximately, 72.72 percent of the cells in the 3rd generation were at the G1 stage while 18.07 percent were at the S stage. For the cells in the 7th generation, 83.88 percent of the cells were at the G1 stage while 9.61 percent were at the S stage. After staining the adipogenically differentiated cells utilizing Oil Red “O”, the cell were stained and appear red. The real-time detection of RT-PCR results indicated the existence of the characteristic genes of the adipogenically differentiated cells, LPL and Leptin. **Conclusions:** The hUC-MSCs before P7 have a strong ability to differentiate toward adipocytes and to express certain amount of the characteristic genes.

Key words: Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells; Induction in vitro; Adipocytes; Gene detection

Chinese Library Classification(CLC): R392.12, Q813 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)11-2043-04

* 基金项目: 甘肃省自然科学基金(1107RJZA106)

作者简介: 杨雯(1986-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 干细胞治疗, 电话: 0931-8994587

Δ通讯作者: 惠玲, 女, 电话: 0931-8994587, E-mail: zyhuil@hotmail.com;

吕同德, 男, 电话: 0931-8994587

(收稿日期: 2013-11-14 接受日期: 2013-12-10)

前言

美丽是人类共同的追求,特别是近年来随着整形美容科学与技术的发展,整形美容越来越受到关注,也被更多的人所接受,已经成为改善人类生活质量,重塑人生的重要方式。目前,有关整形美容的方法主要以创伤、填充仿生材料等为主。然而,这些填充材料多为人工制造所得,与此同时创伤美容方法不可避免地会引起一些机体的排异反应,给机体造成伤害,甚至会酿成严重的医疗事故。随着组织工程与生物医学的飞速发展,人们研究发现可以通过干细胞作为种子细胞,诱导其定向分化成不同的组织,实现各种疾病的治疗^[1,2]。近年学者已经证明全身移植或者局部移植间充质干细胞(MSCs)对治疗皮肤损伤有重要作用^[3]。MSCs移植能促进皮肤的愈合^[4]、内皮细胞的转化及血管的形成^[5-7]。然而,当前相关的研究主要基于骨髓干细胞以及成体干细胞,临床上骨髓取材有一定的创伤性,供体有限,随年龄增长骨髓MSCs多向分化能力下降,且存在病毒污染等缺陷,这些都限制了骨髓干细胞的进一步实验研究与应用^[8]。

脐带作为新生儿的一部分分娩废弃物,不存在伦理学的问题,因此脐带间充质干细胞(hUC-MSCs)日益受到基础研究以及临床工作者的重视。hUC-MSCs是存在于脐带沃顿胶和血管周围组织中的一种干细胞^[9],于2003年被Mitchell^[10]和Romanov等^[11]成功地从人脐带基质中分离出来,此后开始引起了研究者的广泛关注。作为一种新型的原始干细胞,hUC-MSCs与传统的骨髓间充质干细胞和脂肪间充质干细胞等相比具有诸多的优点,其相对而言更原始,免疫原性更弱,并且具有较强的多向分化能力以及在再生医学与细胞组织工程中具有潜在应用前景。因此,本研究从剖宫产胎儿脐带中分离培养hUC-MSCs,进一步研究其体外成脂诱导分化能力同时鉴定其相关基因,为hUC-MSCs作为一种新型的干细胞用于组织工程领域提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

α MEM 干粉培养基、胰酶、PBS 平衡盐溶液(Sigma 公司,美国);胎牛血清(Hyclone,美国);RNA 提取试剂盒(Takara);人 Leptin、LPL 的引物(购买于 Takara);医用净化工作台(Esco);离心机(长沙湘仪离心机公司,中国);Real-time PCR 仪(Applied Biosystems 公司,美国);倒置显微镜(奥林巴斯)。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 hUC-MSCs 的分离和培养 脐带来源于甘肃兰州军区总医院妇产科足月健康剖宫产胎儿。(1)于无菌条件下剪取 15 cm 左右的脐带浸泡于 PBS 缓冲液中,采集后半小时内超净工作台用 PBS 除去血渍;(2)于无菌条件下用眼科剪将脐带剪至 0.5 cm³ 大小的组织块,并将这些组织块移至培养皿中加入 3 mL 浓度为 15% 的 FBS、1000 U/mL 青霉素与 100 μ g/mL 链霉素 α MEM 培养液,置 37 $^{\circ}$ C,5% 的 CO₂ 细胞培养箱中培养;(3)7-10 天左右换液,弃未贴壁的细胞后继续培养。

1.2.2 hUC-MSCs 的消化和传代 用 0.25% 的胰酶消化后(含 0.01% 的 EDTA)按 1:2 传代,继续于培养箱中培养,传至 P3 时

进行成脂肪细胞的诱导。

1.2.3 hUC-MSCs 的周期测定 取 P3 的细胞 3×10^6 个经 0.25% 的胰酶消化后用 PBS 洗涤,于冰上经 4 $^{\circ}$ C 预冷的 70% 乙醇固定 1 小时,弃固定液 PBS 重悬,离心 1000 rpm/min,5min,离心结束后 PI 避光染色 30 min,80 目筛网过滤后经流式细胞仪检测。

1.2.4 hUC-MSCs 免疫表型的测定 取 P3 的细胞 0.25% 的胰酶消化后,PBS 洗涤,制成 1×10^6 /ml 的细胞悬液。将细胞悬液移至 10 个管中(约 100 μ l/管),各管分别加入 PE 标记的 CD105、CD44、CD34、HLA-DR、FITC 标记的 CD29、CD13、CD90、CD45 抗体 20 μ l 各及其相应同型对照标记细胞,于 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 20 min,于每管中加入 PBS 1.5 mL,混匀,离心 1000 rpm/min,5min,弃上清,加入 500 μ l PBS,以流式细胞仪检测分析,每个标本至少分析 1×10^6 个细胞。

1.2.5 hUC-MSCs 的成脂诱导分化 取 P3 的细胞经 0.25% 的胰酶消化后,以 2×10^5 个/孔接种于六孔板中的 6 个孔中,其中 3 孔为诱导组,另外 3 孔为正常对照组。经正常 α MEM 完全培养液培养过夜后,诱导组换为成脂诱导培养基(地塞米松 1 μ mol/L、胰岛素 5 μ mol/L、吡啶美辛 0.5 μ mol/L、IBMX 0.5 μ mol/L,15% FBS 的 α MEM 培养液),对照组继续用正常的 α MEM 培养液培养,置 37 $^{\circ}$ C,5% 的 CO₂ 细胞培养箱中培养,每 3 天左右全量换液。于 7、14、21 天分别在倒置显微镜下观察细胞分化的形态,并经油红“O”染色观察细胞着色情况。

1.2.6 诱导的成脂肪细胞的鉴定 油红“O”染色,严格按染色试剂盒操作步骤进行。按 Trisol 试剂盒说明书提取总的 RNA,用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。LPL[CR457054.1]上游引物:5'-GAGAGAGGACTTGGAGATGTGGA-3',下游引物:5'-TCAACAGAGAGTCGATGAAGAGATG-3';Leptin [BC069323.1]上游引物:5'-CGGATTCTTGTGGCTTTGG-3',下游引物:5'-GACTGACTGCGTGTGTGAAATG-3'; β -actin[AB64346.0.1]上游引物:5'-CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC-3',下游引物:5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3'。按 qRT-PCR 试剂盒说明书操作步骤进行实验。

2 结果

2.1 hUC-MSCs 的培养和传代

提取的原代细胞大多数在 24 h-48 h 开始贴壁,成卵圆形;1 周左右时逐渐铺开成梭性、不规则状。经过 2 周左右细胞生长融合约 80%-90%,以 1:2 进行传代培养;原代培养时局部区域存在少许小而圆的细胞,经传代消失;传至第 3 代后,细胞形态开始比较均细胞速度生长加快,无接触抑制现象,融合后呈漩涡状。

2.2 hUC-MSCs 的周期分析

经流式细胞仪测定发现,P7 以前的 hUC-MSCs,80% 的细胞处于 G0~G1 期,活跃增殖阶段的细胞数占总细胞的比例较少。开始时细胞生长呈增长的趋势,潜伏期一般不到 36 h,之后进入对数增长期,一般持续到第 5~6 d,细胞增殖进入平台期,呈现典型的“S”型增长方式。

2.3 hUC-MSCs 的流式免疫表型测定

经流式细胞仪测定,hUC-MSCs 高表达 CD105、CD44、

CD29、CD9 及 CD130,表达量达 80%以上;少表达或几乎不表达 CD34、CD45 和 HLA-DR,表达量低于 40%。由此说明,从脐带分离出纤维样形态的贴壁细胞具有 MSCs 的免疫表型特征,可以判断其为 hUC-MSCs。

2.4 诱导分化为成脂细胞的形态观察

倒置显微镜下观察,诱导组细胞由原来的长梭性、不规则形态逐渐变为长短比例接近的不规则形状,并有多突起,胞质中逐渐有脂滴出现。对照组细胞形态仍呈梭性生长,变化不大(图 1A)。诱导 7 天时观察,细胞大部分成短棒状,分散生长,并有少许的脂滴出现(图 1B);14 天时,显微镜视野下只有少许细胞仍为梭性,脂滴出现增多(图 1C);21 天时,细胞几乎完全是粗短的棒状,分散于视野下,并有大量脂滴出现(图 1D)。

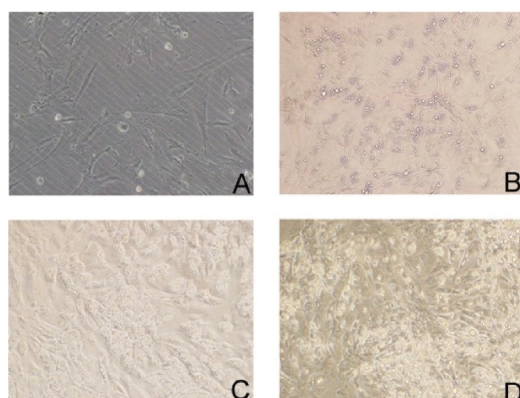


图 1 不同分化阶段的细胞形态光学显微照片:(A)初始形态;(B)诱导 7 天的细胞形态;(C)诱导 14 天的细胞形态;(D)诱导 21 天的细胞形态 40×

Fig. 1 Optical images of the hUC-MSCs at different differentiation stages: (A) Original; (B) 7 d; (C) 14 d; (D) 21 d after induction.

表 1 LPL、Leptin 基因的表达情况

Table 1 CT values of LPL and Leptin

Factors	β -actin	LPL	Leptin
Before induction	19.66657 $\pm$ 0.116	0	0
After induction	22.94993 $\pm$ 0.040532	25.33037 $\pm$ 0.101116	30.28293 $\pm$ 0.128476

* 表中所示的数值为各基因的 CT 值,诱导前 hUC-MSCs 的 LPL 和 Leptin 的 CT 值为 0,没有这两个基因的表达;

The CT values of each gene is shown in the table. The CT values of LPL and Leptin is 0 before induction, no expression of the two genes.

3 讨论

近年来关于 hUC-MSCs 的多向分化的研究越来越多,而且日趋成熟。研究发现,hUC-MSCs 可以在不同的诱导微环境中,分化为骨细胞、软骨细胞、神经细胞、内皮细胞等^[12]。这种细胞强大的分化潜能吸引了大量的临床和科研工作者的关注,同时这一方面的研究也为组织器官工程和细胞治疗带来新的希望^[13,14]。相对于其他的器官移植和细胞治疗,此类细胞具有相对较弱的免疫原性以及较好的定向分化能力,因此可以很好地与机体的免疫监督机制相统一,具有非常好的人体相容性。其次,hUC-MSCs 的来源也不涉及伦理和道德问题,使人们易于接受。最重要的是,细胞治疗比临床器官移植等节省了大量的成本,给病人及家属减轻了经济负担。其实,已有相关的研究取得了很好的进展,例如,Zhou 等利用大鼠进行 hUC-MSCs 的局

2.5 诱导分化为成脂细胞的鉴定

分别对诱导分化 7、14 和 21 天的细胞进行油红“O”染色,并置于倒置显微镜下观察拍照,正常对照组染色后细胞不着色(图 2A)。7 天时观察诱导组的细胞,有少许的红色脂滴出现(图 2B);14 天时染色后脂滴出现增多(图 2C);21 天时,染色发现有大量脂滴出现(图 2D)。

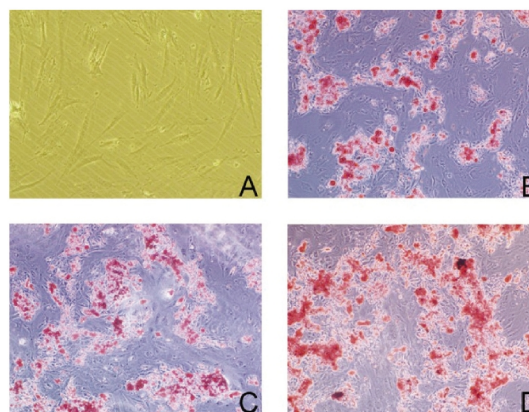


图 2 不同分化阶段的油红“O”染色细胞形态光学显微照片:(A)初始形态;(B)诱导 7 天的细胞形态;(C)诱导 14 天的细胞形态;(D)诱导 21 天的细胞形态 40×

Fig. 2 Optical images of the hUC-MSCs stained by Oil Red “O” at different differentiation stages: (A) Original; (B) 7 d; (C) 14 d; (D) 21 d after induction.

2.6 LPL、Leptin 基因的表达情况

而诱导为脂肪细胞后 LPL 和 Leptin 的基因得到表达,数值如表 1 所示;同时诱导前后细胞的骨架发生变化,所以 β -actin 的数值也会发生明显变化。CT 值的高低与基因的表达量成反比。

部移植来治疗脊髓损伤引起的运动障碍,获得了极大的疗效^[15]。同时,对 hUC-MSCs 进行诱导分化来治疗肢体缺血坏死^[16]、神经系统疾病^[15]以及癌症的治疗^[17]等都取得了不错的疗效。

本研究通过对 hUC-MSCs 成脂诱导所得的脂肪细胞进行染色及脂肪细胞特异性标志基因的鉴定,于形态及基因水平上证明了所得细胞确实为脂肪细胞,为 hUC-MSCs 成脂诱导过程用于组织工程相关应用领域提供了进一步数据支持。 β -actin 作为一个常用的管家基因,在本实验中细胞体外诱导的前后其含量也发生了明显的变化;这一结果也同样证明这个诱导方案的进行使得 hUC-MSCs 在培养过程中其细胞骨架结构也发生了巨大的变化。从本研究结果来观察和分析,图片染色发现分化过程中有越来越多脂肪细胞的出现,且能被油红“O”染色;而实时定量 RT-PCR 实验通过对分化 21 天时脂肪细胞的标志性基因 LPL 和 Leptin 的检测,诱导前 hUC-MSCs 几乎不表达 LPL^[18]

和 Leptin^[9], 而经过 21 天的诱导培养, 这两个基因的含量得到了表达。从表一数据可以看出, LPL 的 CT 值小于 Leptin 的 CT 值, 说明 LPL 的含量高于 Leptin 的含量。Leptin 作为肥胖基因的表达产物, 其主要存在与脂肪组织, 是脂肪细胞的标志之一。同样, LPL 也是脂肪细胞普遍表达的一个基因产物。因此, hUC-MSCs 成脂诱导过程于形态及基因水平上得到了证明, 脐带间充质干细胞具有较强的增殖和分化能力, 相关基因鉴定表明 hUC-MSCs 可以在体外诱导分化为脂肪细胞, 为脐带间充质干细胞用于组织工程及相关治疗领域提供了一定的理论支持与基础数据。

这一诱导方案的成功进行为临床治疗带来了一个脂肪细胞的稳定获取途径, 异体脂肪细胞的移植本来过程就很复杂而且成活率相当低。我们诱导所得到的细胞免疫原性比较低, 易于进行体外移植, 且移植排斥反应相对较低。然而, 目前对于细胞组织工程来说, 单纯的细胞移植其成功率还是没有达到人们预期的结果。选择合适的细胞支架, 例如构建明胶海绵等作为骨架, 这样更有利于细胞的粘附、成活, 更有助于其细胞血管化的形成, 同时也可以显著提高移植细胞的存活率^[20]。对于现在的工作而言, 不仅要诱导的到可靠的目的细胞, 而且要在组织工程方面进行更深层次的研究, 构建合适的移植载体, 进行一些体内研究, 使其更好地服务于临床工作。

参考文献(References)

- [1] Weber B, Emmert MY, Hoerstrup SP. Stem cells for heart valve regeneration[J]. Swiss Med Wkly, 2012, 142: w13622
- [2] Sharma S, Raju R, Sui SG, et al. Stem cell culture engineering-process scale up and beyond[J]. Biotechnol J, 2011, 6(11):1317-1329
- [3] Moretti P, Hatlapatka T, Marten D, et al. Mesenchymal Stromal Cells Derived from Human Umbilical Cord Tissues: Primitive Cells with Potential for Clinical and Tissue Engineering Applications [J]. Adv Biochem Eng Biot, 2010, 123(12):29-54
- [4] Kramann R, Couson SK, Neuss S, et al. Uraemia disrupts the vascular niche in a 3D co-culture system of human mesenchymal stem cells and endothelial cells [J]. Nephrol Dial Transpl, 2012, 27 (7): 2693-2702
- [5] Wang SE, Yu Y, Criswell TL, et al. Oncogenic mutations regulate tumor microenvironment through induction of growth factors and angiogenic mediators[J]. Oncogene, 2010, 29(23):3335-3348
- [6] Herr D, Duncan WC, Hack G, et al. Regulated expression of the Renin-Angiotensin-System in human granulosa lutein cells: Angiotensin II increases VEGF expression but its synthesis is reduced by hCG [J]. Arch Gynecol Obstet, 2010, 281(3):409-416
- [7] Ziats NP, Anderson JM. Human Vascular Endothelial-Cell Attachment and Growth-Inhibition by Type-V Collagen[J]. J Vasc Surg, 1993, 17 (4):710-718
- [8] 刘忠, 李素萍, 杨宏友等. 人脐带间充质干细胞体外分化成骨细胞的研究[J]. 中国输血杂志, 2011, 24(5):376-382
- [9] Liu Zhong, Li Su-ping, Yang Hong-you, et al. Study of mesenchymal stem cells from the human umbilical cord induced into osteoblasts in vitro[J]. Chin J Blood Transfusion, 2011, 24(5):376-382
- [9] Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia [J]. Stem Cells, 2003, 21(2): 247-247
- [10] Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia [J]. Stem Cells, 2003, 21(1): 50-60
- [11] Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: Candidate MSC-like cells from umbilical cord [J]. Stem Cells, 2003, 21(1):105-110
- [12] Meirelles LD, Nardi NB. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells [J]. Front Biosci, 2009, 14: 4281-4298
- [13] 孙佳佳, 张梅娟, 徐运. 人脐带间充质干细胞在神经系统疾病治疗中的研究进展 [J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2011, 38(2): 157-161
- Sun Jia-jia, Zhang Mei-juan, Xu Yun. Human umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of diseases of the nervous system research [J]. Journal of International Neurology and Neurosurgery, 2011, 38(2):157-161
- [14] 范存刚, 周景儒, 张庆俊. 人脐带间充质干细胞治疗神经系统疾病的研究进展 [J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2009, 36(3): 242-245
- Fan Cun-gang, Zhou Jing-ru, Zhang Qing-yu. Human umbilical cord mesenchymal stem cells to treat neurological diseases research [J]. Journal of International Neurology and Neurosurgery, 2009, 36(3): 242-245
- [15] Zhou ZL, Zhang H, Jin AM, et al. A combination of taxol infusion and human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation for the treatment of rat spinal cord injury[J]. Brain Res 2012, 1481:79-89
- [16] Portalska KJ, Leferink A, Groen N, et al. Endothelial Differentiation of Mesenchymal Stromal Cells[J]. Plos One 2012, 7(10): e46842
- [17] Ma Y, Hao XM, Zhang S, et al. The in vitro and in vivo effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells on the growth of breast cancer cells[J]. Breast Cancer Res Tr 2012, 133(2):473-485
- [18] Yoon JH, Roh EY, Shin S, et al. Introducing pulsed low-intensity ultrasound to culturing human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells[J]. Biotechnol Lett, 2009, 31(3): 329-335
- [19] Reseland JE, Mundal HH, Hollung K, et al. Cigarette smoking may reduce plasma leptin concentration via catecholamines [J]. Prostag Leukotr Ess, 2005, 73(1):43-49
- [20] Wang LM, Singh M, Bonewald LF, et al. Signalling strategies for osteogenic differentiation of human umbilical cord mesenchymal stromal cells for 3D bone tissue engineering [J]. J Tissue Eng Regen M, 2009, 3(5):398-404