

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.06.006

文章编号: 1005-8982 (2018) 06-0033-05

## 大鼠脂肪干细胞冷冻复苏后的生物学特性 及成骨细胞分化潜能的研究\*

章立群, 刘学, 任英华, 杨芬, 邓碧霞

(广东医学院附属南山医院 口腔科, 广东 深圳 518052)

**摘要:目的** 研究冻存复苏后大鼠脂肪干细胞(ADSCs)的生物学特性及其体外诱导成骨细胞分化的潜能。**方法** 冷冻保存 6 个月的大鼠 ADSCs 复苏后传代培养, 显微镜下观察细胞形态; CCK8 检测细胞增殖, 流式细胞仪检测 CD44, CD105。第 3 代细胞诱导成骨培养 2~3 周后碱性磷酸酶(ALP)和茜素红染色, 观察成骨情况。**结果** 复苏后 ADSCs 形态类似成纤维细胞, 增殖迅速。成骨诱导培养后表现出成骨细胞特性, ALP 染色活性增加, 茜素红染色出现矿化结节。**结论** 冷冻保存复苏后的 ADSCs 细胞生物性能稳定, 定向诱导后可分化为成骨细胞, 可作为骨组织工程的种子细胞。

**关键词:** 脂肪组织; 干细胞; 成骨诱导; 成骨细胞

**中图分类号:** R394.2

**文献标识码:** A

## Biological characteristics and osteogenic differentiation potential of adipose tissue derived stem cell\*

Li-qun Zhang, Xue Liu, Ying-hua Ren, Fen Yang, Bi-xia Deng

(Department of Stomatology, Nanshan Hospital Attached to Guangdong Medical University, Shenzhen, Guangdong 518052, China)

**Abstract: Objective** To investigate biological characteristics of rat adipose derived stem cells (ADSCs) after cryopreservation and its osteogenic differentiation potential. **Methods** Rat ADSCs were revived and cultured. The morphological changes were observed under microscope. Cell proliferation were determined by CCK8. Flow cytometry was performed to measure CD44 and CD105 expression. In the 3rd generation of ADSCs, cells were induced for 2-3 weeks for osteogenesis. Osteogenic differentiation was determined by measuring expression of alkaline phosphates and Alizarin Red. **Results** ADSCs were successfully revived following cryopreservation, morphologically similar as fibroblast with fast proliferating capacity. Osteogenesis induction led to increased expression of ALP. Alizarin Red staining indicated mineralized nodules. **Conclusion** ADSCs functions well after recovery from cryopreservation and maintain differential potential to osteocyte, which suggests that ADSCs may be acceptable material for bone engineering.

**Keywords:** adipose tissue; stem cells; osteoinductive differentiation; osteoc

骨缺损的修复是临床研究面临的难题之一。目前骨组织工程技术在修复上下颌骨和牙槽骨缺损的

研究中广泛应用, 研究发现脂肪来源干细胞(adipose derived stem cells, ADSCs)和骨髓基质干细胞有相似

收稿日期: 2017-08-14

\* 基金资助: 深圳市科技研发资金(No: JCYJ20150402152130186)

的多项分化潜能<sup>[1]</sup>, 由于其来源丰富, 取材简单、获得率高, 体外增殖能力强且对供体损伤小等特点成为近年来研究的热点<sup>[2-3]</sup>。但体外长期培养的 ADSCs 会产生衰老而造成表型不稳定, 污染或培养箱故障等不利因素会对研究产生影响。此外传代过程产生过剩细胞, 较浪费耗材和时间, 因而低温冷冻适时复苏的细胞为比较合理的使用方法。由于干细胞低温保存效果的优劣直接影响干细胞的数量和质量, 因此经过低温保存后的干细胞是否能存活并保持其生物学活性决定着相关研究和治疗的重要因素之一。本研究旨在了解冷冻保存复苏后 ADSCs 的生物学特性和诱导成骨分化潜能, 为干细胞存储后的性能和组织工程的进一步研究提供实验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

SD 大鼠脂肪间充质干细胞 (美国 Cyagen 公司); 胎牛血清 (FBS) (美国 Gibco 公司), DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司); I 型胶原酶、胰蛋白酶 (美国 Hyclone 公司)。基础培养基配方: DMEM, 10% FBS, 100 u/ml 青霉素, 100 u/ml 链霉素; 诱导培养基配方: DMEM, 10% FBS, 0.1  $\mu\text{mol/L}$  地塞米松, 50  $\mu\text{m/L}$  维生素 C, 10 mm/L  $\beta$ -甘油磷酸钠, 105 u/L 青霉素, 105 u/L 链霉素; 200  $\mu\text{mol/L}$  消炎痛; BCIP/NBT 碱性磷酸酶显色试剂盒 (上海碧海云天生物技术研究 所); CD105、CD44 流式抗体 (美国 Biologend 公司); CCK8 试剂盒 (日本同仁化工研究所); 茜素红染色试剂盒 (南京建成生物公司); 二氧化碳  $\text{CO}_2$  细胞培养箱 (德国 Memmer 公司); 倒置显微镜 (德国 Zeiss 公司), 流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

### 1.2 方 法

**1.2.1 脂肪干细胞的复苏培养和传代** 将 SD 大鼠脂肪间充质干细胞扩增至第 3 代冷冻保存, 每支含细胞  $1 \times 10^6$  个细胞。将冷冻 6 个月的 ADSCs 迅速取出立即置入  $-80^\circ\text{C}$  冰箱冷冻 2 ~ 3 min, 再迅速放入  $37^\circ\text{C}$  温水复苏, 快速晃动使管中内含物尽快融化, 然后在无菌下取出细胞。取一滴细胞悬液台盼蓝染色, 计算细胞存活率 (%) = 活细胞 / (活细胞数 + 死细胞数)  $\times$  100%。其余细胞液 1 000 r/min 离心 5 min, 去上清液, 漂洗, 接种至 T25 培养瓶。 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养, 每 2 天更换细胞培养基。当细胞融合达 80% ~ 90% 时, 加入 0.25% Trypsin-0.04% EDTA 进行传代培养。

**1.2.2 HE 染色** 选择生长良好的第 1、3 代 ADSCs 细胞, 胰酶消化后制成单细胞悬液, 以  $1 \times 10^5$  个细胞接种于事先放有盖玻片的 6 孔板中, 待细胞达到 80% ~ 90% 融合取出盖玻片, HE 染色, 显微镜下观察。同时对诱导成骨培养的 ADSCs 细胞同法进行 HE 染色, 观察细胞形态。

**1.2.3 生长曲线测定** 取生长良好的第 3 代 ADSCs 细胞, 胰酶消化后制成单细胞悬液, 调整细胞数为  $1 \times 10^4$  个/ml, 接种于 96 空培养板。分别于第 1、2、3、4、5、6、7 及 8 天时, 取样品进行 CCK8 检测, 酶联免疫监测仪读取 450 nm 处的 OD 值, 分析数据。

**1.2.4 表面抗原鉴定** 取第 3 代 ADSCs 细胞, 用 0.25% 胰酶消化后调整细胞密度为  $1 \times 10^6$  个/ml, 1 000 r/min 离心 5 min, 洗涤后弃上清液待标记。将待测管中分别加入 FITC 标记的 CD105 和 PE-CY7 标记的 CD44, 每种抗体加 5  $\mu\text{l}$ 。(以不加抗体的作为空白对照组) 用震荡器将所有样本中的抗体与细胞充分混匀后, 室温避光孵育 30 min, PBS 清洗后, 加入 500  $\mu\text{l}$  含 1% 多聚甲醛固定液, 重悬后, 流式细胞仪上机检测。

**1.2.5 诱导成骨培养** 取生长良好的第 3 代细胞以  $1 \times 10^5$  个/ml 的密度接种到 6 孔培养板中, 更换成骨诱导培养基, 每 3 天换液。以加入不含诱导剂培养基的 3 代细胞作为对照组。

**1.2.6 ALP 染色** 分别取第 7 和 14 天诱导成骨培养的 ADSCs 样品, 4% 的多聚甲醛固定 30 min; PBS 清洗 3 ~ 5 次, 加入适量 BCIP/NBT 染色工作液, 室温避光孵育 5 ~ 30 min, 去除 BCIP/NBT 染色工作液, 用蒸馏水洗涤 1 ~ 2 次即可终止显色反应, 拍照。

**1.2.7 茜素红染色** 取第 21 天诱导成骨培养的 ADSCs 细胞, 4% 多聚甲醛固定, PBS 洗涤, 加 500  $\mu\text{l}$  0.1% Triton X-100 室温通透 10 min。PBS 洗涤; 加入茜素红-S 染色液染色 30 min, PBS 清洗残留染液, 拍照成像。

## 2 结 果

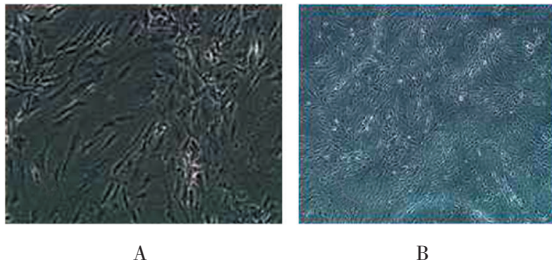
### 2.1 形 态

复苏后的细胞初始呈圆形, 12 h 后贴壁细胞明显增多, 24 h 后可见大多数细胞贴壁, 72 h 后细胞开始伸展呈短梭形或多角形。传代后细胞增长迅速, 呈分散集落方式生长, 约 7 ~ 10 d 后细胞达 80% 左右融合, 呈典型的纤维样细胞, 长梭形漩涡样生长 (见图 1、2)。细胞从 11 到 12 代开始逐渐出现衰老, 14 ~ 15 代开

始衰老细胞明显增多。成骨诱导后细胞变为多角形或不规则状, 体积有所增大。见图3。

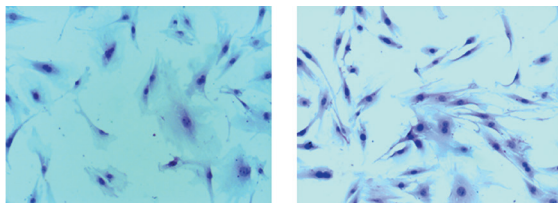
### 2.2 ADSCs 细胞接种后的生长曲线

细胞在种植后前2天为缓慢的生长期, 从第3天开始快速增殖, 到第6天时达到峰值, 第7天后细胞发生接触性抑制或者细胞量较多, 培养基消耗快, 细胞生长进入平台期, 第8天开始细胞数量减少。见图4。



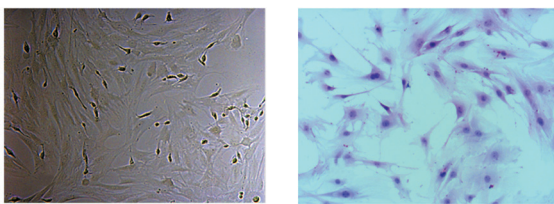
A: 细胞呈集落方式生长 (×100); B: 7~10 d 后融合, 细胞呈纤维样 (×40)

图1 复苏后传至第3代 ADSCs 细胞



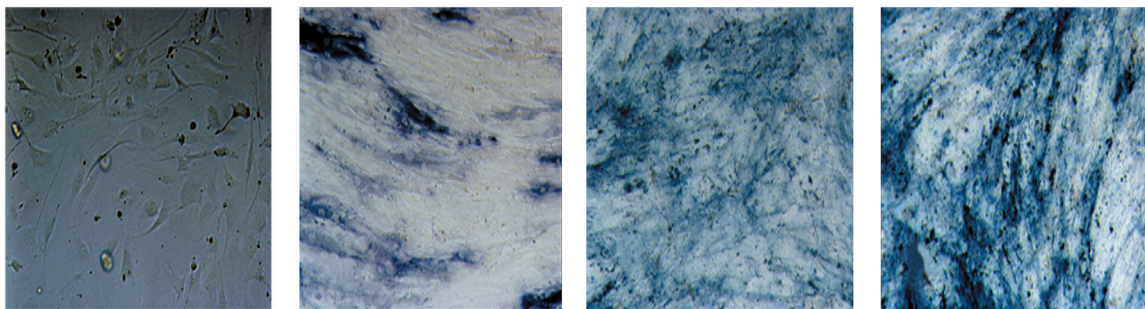
A 第1代 B 第3代

图2 复苏后第1代和第3代 ADSCs 细胞 (HE×100)



A 倒置相差显微镜 B HE 染色

图3 诱导成骨培养 14 d 后 ADSCs 细胞 (×100)



A 对照组 B 成骨诱导培养 7 d C 14 d D 21 d

图6 成骨诱导培养 (ALP 染色 ×100)

### 2.3 表面抗原鉴定结果

经流式细胞仪检测 CD105 和 CD44 在 ADSCs 中表达, 发现 CD105 和 CD44 的表达在 90% 以上, 符合 ADSCs 的免疫学表型。见图5。

### 2.4 ALP 和茜素红染色结果

成骨诱导 7 d 后实验组 ALP 染色阳性细胞呈深紫色, 继续诱导 14 d, 染色持续增强, 第 21 天达顶峰, 呈强阳性, 而对照组则为阴性。茜素红染色: 7 d 开始出现红色钙化结节, 并随着时间推移持续增强, 21 d 细胞聚集区钙结节互相融合, 形成片状, 不加诱导组为阴性。见图6、7。

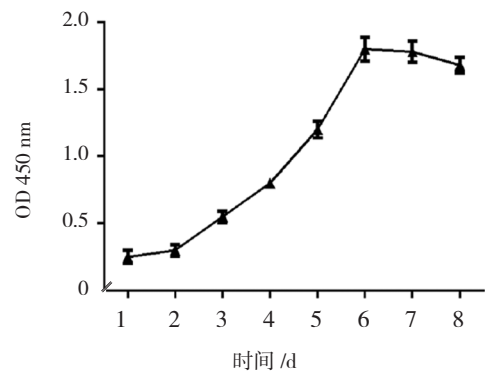


图4 生长曲线

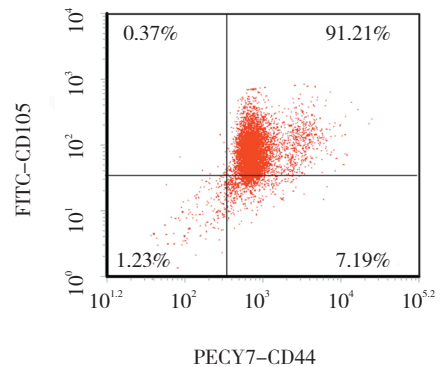


图5 流式细胞仪检测 CD105 和 CD44

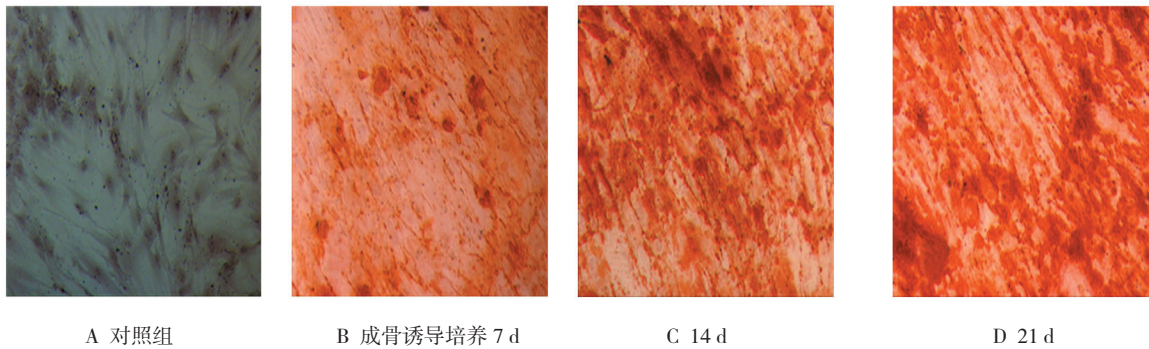


图 7 成骨诱导培养情况 (茜素红染色 × 100)

### 3 讨论

骨组织工程很大程度上依赖于种子细胞的选择, 目前研究较多的骨髓间充质干细胞, 但骨髓采集有潜在的局限性, 骨髓中干细胞含量很少, 不易获取, 扩增能力有限, 属于有创操作, 对患者伤害大。胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESC) 虽具有多向分化能力, 但是 ESC 很难获得纯化的特定细胞系, 而且其研究和应用受到伦理和法律的限制。2001 年 ZUK 等<sup>[3]</sup>首次分离 ADSCs, 后续研究发现 ADSCs 在不同的诱导条件下可以向脂肪、骨、软骨、神经、骨骼肌、心肌或胰岛细胞等多个方向分化<sup>[4]</sup>。不仅如此, ADSCs 还能够分泌多种生长因子, 促进血管新生<sup>[5]</sup>。此外, ADSCs 还具有获得率高、分离纯化简便、扩增能力强、手术供区并发症少、不受伦理法律限制等优势, 使其成为颌面修复重建较为理想的种子细胞来源。

目前, 绝大部分研究者采用的都是取新鲜脂肪组织进行分离培养, 但是这存在几个问题: ①原代细胞的培养往往需要经过动物饲养、脂肪取材到细胞培养过程, 比较耗费时间和金钱; ②部分脂肪组织富含血管和淋巴结, 分离过程中不易去除; 如果取材不当或方法不正确容易混有较多杂质细胞需要经过多次筛选; ③取材不当易造成细胞污染同时反复多次取材的结果也造成脂肪组织的浪费, 降低脂肪组织的利用率。而低温冷冻适时复苏的细胞为比较合理的使用方法, 可避免反复进行原代培养的中间环节, 极大缩短时间, 提高效率。尽管冻存复苏技术在大多数细胞的研究中较为常用, 但 ADSCs 经过一段时间的低温冻存再复苏后其生物学特性如何? 是否能够进行成骨化诱导? 该问题还需要进一步的实验数据支持。因而本研究的主要目的则为研究冻存复苏后的干细胞生物学特性, 为骨组织工程技术提供更多细胞来源和数据支持。

本实验发现, 复苏后的 ADSCs 细胞存活率约

80%, 其贴壁良好, 同样可进行扩增传代。基本形态特征, 多数呈梭形, 集落样生长, 传代后长梭形细胞大量增加。其细胞生长曲线基本呈 S 形, 表面能够表达脂肪干细胞表面标记物, 其基本生物学特性和以往研究报道原代培养的 ADSCs 特性相似<sup>[6-8]</sup>。OWE 等<sup>[9]</sup>将骨形成分为 3 期: 成骨细胞增殖、细胞外基质分泌期、细胞外基质成熟期、细胞外基质矿化期。在成骨诱导分化过程中, ALP 是成骨细胞分化的早期标志, 矿化结节是成骨细胞分泌的功能指标。因此, ALP 及矿化结节的检测对成骨细胞的鉴定有重要意义。本实验中, 复苏后的细胞经过成骨诱导培养后形态逐渐向纺锤形、多角形转变, 7 d 时 ALP 表达阳性, 14 和 21 d 表达逐渐增强, 表明不断向成骨细胞分化演变; 7 d 茜素红染色阳性, 检测到钙盐沉积的矿化结节, 表明此时已经有部分细胞进入成骨过程的细胞外基质矿化期。同样 14 和 21 d 表达逐渐增强, 说明随着时间的推移, 细胞外钙化基质也不断增加。由此证明冷冻保存复苏的 ADSCs 同样具有良好诱导成骨能力。

通过本实验发现, 冷冻复苏的 ADSCs 其生物学特性保持稳定, 成骨诱导性能良好, 为骨组织工程 ADSCs 的大量快速构建提供的实验基础。此外, ADSCs 更长期冷冻复苏后否仍能够保持其良好的形态及生长特性, 复苏后 ADSCs 经更多次传代是否仍具有成骨分化潜能, 尚需今后进一步研究。

#### 参 考 文 献:

- [1] ZUK P A, ZHU M, MIZUNO H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies[J]. *Tissue Eng*, 2001, 7(2): 211-228.
- [2] 古振. 脂肪干细胞在骨组织工程中的研究进展 [J]. *组织工程与重建外科杂志*, 2012, 8(1), 43-55.
- [3] BHATTACHARYA, GHAYOR C, WEBER F E. The use of adipose

- tissue-derived progenitors in bone tissue engineering - a review[J]. *Transfus Med Hemother*, 2016, 43(5): 336-343.
- [4] ZUK P A, ZHU M, ASHJIAN P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells[J]. *Mol Biol Cell*, 2002, 13(12): 4279-4295.
- [5] MESIMÄKI K L, LINDROOS B, TÖRNWALL J, et al. Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells[J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2009, 38(3): 201-209.
- [6] 耿德春, 徐耀增, 李荣群, 等. 大鼠脂肪基质干细胞的体外培养及其成骨细胞分化特性的研究 [J]. *苏州大学学报*, 2007, 27(4): 517-519.
- [7] 程文丹, 赵宇, 何金生. 大鼠脂肪干细胞体外定向诱导分化为脂肪细胞和成骨细胞的研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2007, 42(5): 501-504.
- [8] 单秀莉, 王青, 林志勇, 等. 大鼠脂肪干细胞体外定向诱导分化为成骨细胞的研究 [J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2006, 16(8): 441-445.
- [9] OWEN T A, ARONOW M, SHALHOUB V, et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix[J]. *J Cell Physiol*, 1990, 143(3): 420-430.

(王荣兵 编辑)