

绵羊胚胎肌源性干细胞的生物学特性

张 萍, 马月辉, 关伟军* (中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

摘要:为研究绵羊胚胎肌源性干细胞的生物学特性,取 30 日龄的绵羊胚胎,采用联合酶消化法及差速贴壁法分离培养获得均质的肌源性干细胞,并对其进行一系列生物学特性检测。结果显示,绵羊肌源性干细胞能传代培养至 35 代以上;免疫荧光染色和 RT-PCR 鉴定肌源性干细胞表面标记物 Sca-1、CD34、CD144 和 Desmin 呈阳性表达;生长曲线和细胞周期结果显示绵羊肌源性干细胞具有较强自我更新能力;通过不同的诱导方法可以将肌源性干细胞成功地诱导为肝样细胞和胰岛样细胞,Schiff 染色和双硫腙染色均呈阳性,RT-PCR 检测肝样细胞特异性标记物 AFP 和 ALB 以及胰岛样细胞特异性标记物 Insulin 均呈阳性表达,进一步证明了其诱导分化潜能。结果表明,本试验成功地分离培养获得了均质并具有较强自我更新潜能的绵羊肌源性干细胞,这种干细胞具有向肝样细胞和胰岛样细胞分化的潜能,这为临床治疗提供了潜在的理论基础和大量的种子细胞。

关键词:绵羊;肌源性干细胞;分离培养;诱导分化;细胞周期

中图分类号:S826 文献标志码:A 文章编号:1005-4545(2017)10-1973-07

DOI:10.16303/j.cnki.1005-4545.2017.10.30

Biological characteristics of muscle-derived stem cells from sheep embryonic

ZHANG Ping, MA Yue-hui, GUAN Wei-jun* (*Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China*)

Abstract: The 30-day-old sheep embryo limb skeletal muscle were taken to isolate and culture the homogeneous muscle-derived stem cells by enzymatic digestion and differential adherence method. A series of biological characteristics were studied. The sheep muscle-derived stem cells could be subcultured to more than 35 generations; the surface marker Sca-1, CD34, CD144 and Desmin of muscle-derived stem cells were identified to be positive by means of immunofluorescence staining and RT-PCR; the growth curve and cell cycle analysis showed that the muscle-derived stem cells had a strong cell proliferation ability; the muscle-derived stem cells were induced into hepatic-like cells and islet-like cells successfully by different induce treatment, and Schiff staining and dithizone staining were positive, meanwhile, RT-PCR detection showed that hepatic-like cell specific markers AFP and ALB and islet-like cell specific marker insulin were positive expressed. The above identification further demonstrated its induction differentiation potential. This test results showed that the sheep muscle-derived stem cells were isolated successfully, and had the potential of self-renewal and induction differentiation of hepatic-like cells and islet-like cells. This provides potential theoretical basis and great quantity of seed cells for clinical therapy.

收稿日期:2016-04-19

基金项目:中国农业科学院科技创新工程基金资助项目(ASTIP-IAS01);国家绒毛用羊产业体系基金资助项目(nycytx-40-01);国家养动物种质资源平台基金资助项目(2015year)

作者简介:张 萍(1989-),女,硕士研究生。

* 通讯作者, E-mail: wjguan86@iascaas.net.cn

Keywords: sheep; muscle-derived stem cells; isolation and culture; induction differentiation; cell cycle

* Corresponding author, E-mail: wjguan86@iascaas.net.cn

骨骼肌中至少存在两种干细胞,一种是单分化潜能的成肌干细胞-骨骼肌卫星细胞(skeletal muscle satellite cells),另一种是具有多分化潜能的肌源性干细胞(muscle-derived stem cells, MDSCs)。MDSCs 起源于胚胎血管祖细胞^[1],是一种成体多分化潜能干细胞,在适当的条件下,可向不同胚层进行分化,这种可塑性吸引了众多研究者的目光。MDSCs 是一种很好的基因载体,已成为临床医学和组织工程学的新型种子干细胞并被广泛应用。

目前,研究者已成功地分离出人、鼠、牛等肌源性干细胞^[2-6],但对绵羊组织中的肌源性干细胞的分离培养及分化潜能的研究尚未见报道,本试验采用联合酶消化法和差速贴壁法成功分离得到绵羊胚胎的肌源性干细胞并证实该细胞具有发育形成肝样细胞和胰岛样细胞的分化潜能。

1 材料与方法

1.1 试验动物 取 30 日胎龄的绵羊胚胎,解剖后剪取大腿肌肉组织放于带有双抗的无菌的 PBS 磷酸缓冲液中,待用。

1.2 主要试剂 H-DMEM 培养基(Gibco),PBS 缓冲液(自制),鸡胚提取物(CEE,自制)胰蛋白酶,胶原酶Ⅱ、胰岛素、转铁蛋白、地塞米松均购自美国 Sigma 公司,亚硫酸钠, β -巯基乙醇,胎牛血清(FBS,美国)等。

1.3 肌源性干细胞的分离培养 将 30 日胎龄的绵羊胚胎解剖,常规消毒后,取其四肢,剔除皮肤、骨头和血管结缔组织,用加入双抗的 PBS 洗 7~9 次,用眼科剪将肌肉剪成大小为 1 cm³ 的组织块,加入 0.2% 的Ⅱ型胶原酶于 37℃ 消化 1 h;再加入 0.1% 的胰蛋白酶消化 30 min,终止消化后,用 200 目的尼龙筛过滤,1 200 r/min 离心 8 min 收集细胞沉淀,并用完全培养基(H-DMEM+100 U/mL 青霉素/链霉素+10% FBS+20 HS+2% CEE)重悬,于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 1 h,得到 PP1 代,然后将细胞悬液转移至另一新的培养皿中继续培养 2 h 得到 PP2 代,再隔 18 h 后继续差速,得到 PP3 代,

以后每隔 24 h 差速 1 次,直到 PP6 代,将 PP6 代细胞进行培养、传代,观察细胞形态,以后每隔 1 d 进行细胞换液^[7-8]。

1.4 肌源性干细胞的传代培养及冻存复苏 当细胞生长汇合至 80% 左右时进行传代培养。弃去旧培养液,用无菌 PBS 反复漂洗细胞 3 次,加入 0.125% 胰蛋白酶(含 0.02% EDTA)放在 37℃ 培养箱中进行消化。观察细胞形态,当发现大量细胞回缩变圆时,加入完全培养基轻轻吹打细胞,以 1:2 或 1:3 的比例进行传代培养。

常规消化法收集细胞,用细胞冻存液(50% FBS+40% DMSO+10% H-DMEM)将细胞沉淀重悬,将细胞悬液移置冻存管中,再放入冻存盒中,先在一 80℃ 冰箱过夜,次日投入液氮中长期保存。细胞复苏时将冻存管从液氮中取出,投入 42℃ 恒温水浴锅中,将管口向上迅速晃动使其融化,当融化到只有小豆粒大小时取出,放入提前加入培养基的离心管中,离心去除上清液,用培养液重悬细胞置于培养板中,置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中继续培养。

1.5 肌源性干细胞免疫荧光和 RT-PCR 鉴定 取第 5 代肌源性干细胞,经 4% 多聚甲醛固定, Triton X-100 通透,山羊血清封闭处理后,加入一抗,4℃ 避光孵育过夜,次日加入 FITC 标记的二抗,室温孵育 1 h, PBS 洗涤后加入 DAPI 染核 30 min, PBS 洗涤后,激光共聚焦显微镜(Nikon, D-ECLIPSE C1)下拍照。

分别取 P5、P15、P25 和 P35 代细胞,待细胞生长至 80%, 收集细胞,用 Takapa Taq RT-PCR (DR001A)试剂盒检测肌源性干细胞表面特异性标志物 desmin、sca-1、CD144 和 CD34 的表达强度。引物见表 1。

1.6 肌源性干细胞生长曲线绘制 取生长良好的第 5 代肌源性干细胞,常规法消化,以 1×10^4 个细胞的数量接种于 24 孔培养板中,以后每天同一时间随机取 3 孔细胞消化,使用血球计数板于倒置显微镜下进行计数,每孔计数重复 3 遍,持续培养 7 d。以培养时间为横坐标,细胞数量为纵坐标,绘制生长曲线。

表 1 绵羊 MDSCs 表面标记检测 RT-PCR 引物

基 因	引物序列	$t_{\text{退火}}/^{\circ}\text{C}$	循 环	产物长度/bp
GAPDH	F:5'-GAAGGTCGGAGTGAACGGATT-3' R:5'-GGTCATAAGTCCCTCCACGAT-3'	60.0	30	517
Sca-1	F:5'-TCAGGGAACCTTCACGAG-3' R:5'-CCACTGTCTGTCTCAATACCAC-3'	59.0	30	277
CD34	F:5'-CGGCATCTTCTACCCTCATC-3' R:5'-GCCTGTTCTCCTGACACA-3'	60.0	30	289
CD144	F:5'-TGGTCACACGCAAGTCCTAA-3' R:5'-TAACAACCTCCTCGCCATA-3'	61.0	30	150
Desmin	F:5'-GACCTTACGCTTCCCACCTC-3' R:5'-CATCTCTGTCTCCACATCT-3'	60.0	30	298
Insulin	F:5'-CTGGTTGAGGTGTTGGGTTT-3' R:5'-ACAGGTGCTGGTTGACGAAG-3'	61.5	30	225
AFP	F:5'-TGGAAGTAGTGGTCGGAAGA-3' R:5'-GGGAAGTGGAGGGTAGAT-3'	52.0	30	460
ALB	F:5'-TGTGGCTTTGGATCTCGT-3' R:5'-TTCTTCCGCTTGTGCTTG-3'	54.0	30	489

1.7 肌源性干细胞细胞周期检测 取刚传代生长的第 5 代肌源性干细胞,用 0.125%胰蛋白酶消化并吹打成单个细胞悬液,加入含 10% FBS H-MDEM 培养基终止消化,1 200 r/min 离心 10 min,弃上清,用 PBS 将细胞重悬,1 000 r/min 离心 5 min,重复 2 次以去除细胞碎片,弃净 PBS,加入预冷的 70% 无水乙醇置于 4℃ 冰箱中固定,过夜之后,1 200 r/min 离心 10 min,弃去无水乙醇,PBS 重悬,1 200 r/min 离心 10 min,弃去 PBS,加入 100 mg/L 的 PI 染液,室温避光着色 20 min,流式细胞仪 (Backman COULTER, cytomics FC500MPL) 检测。

1.8 肌源性干细胞向肝样细胞诱导分化 取第 3 代的细胞以 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 个细胞数量接种于 6 孔板中,常规培养 24 h 后,更换培养基,加入诱导液,诱导液成分为:含 10% FBS、 $1 \times \text{ITS}$ (5 mg/L 胰岛素 + 5 mg/L 转铁蛋白 + 5 $\mu\text{g/L}$ 亚硫酸钠)、40 $\mu\text{g/L}$ 地塞米松、20 $\mu\text{g/L}$ FGF-4 + 20 $\mu\text{g/L}$ HGF 等因子的 H-DMEM 培养基,诱导过程中用倒置显微镜观察细胞形态,诱导 3 周后进行糖原染色,RT-PCR 检测肝样细胞标志物白蛋白 (ALB) 和甲胎蛋白 (AFP)。

1.9 肌源性干细胞向胰岛样细胞诱导分化 取第 3 代的细胞,当细胞生长至 90% 时更换细胞培养液,向胰岛样细胞诱导分 3 步,第 1 步诱导液为 H-DMEM + 10% FBS + 1 mmol/L β -巯基乙醇 + 10 mg/L bFGF,诱导 3 d;第 2 步诱导液为 H-DMEM + 10% FBS + 1 mmol/L 尼克酰胺,诱导 4 d,第 3 步诱导液为 H-DMEM + 10% FBS,诱导大概 4~5 d,诱导后用双硫腙染液进行染色鉴定,RT-PCR 和免疫荧光鉴定 insulin。

2 结果

2.1 肌源性干细胞形态学观察及冻存复苏结果 在利用 Preplate (PP) 差速贴壁法培养过程中,PP1~PP4 多以成纤维细胞为主,形态扁平,多突起,贴壁迅速,数量多,另有小部分是宽大而呈星形或不规则的杂细胞,均增殖较快 (图 1 a);PP5~PP6 的细胞数量明显减少,体积较小,贴壁缓慢,折光性强,多呈梭形或纺锤形,增殖较慢;随着细胞增殖能力的增强,细胞密度逐渐增加,当细胞生长至 80% 时进行传代培养;传代后的细胞也为梭形或纺锤形,胞体饱满,折光性强 (图 1 b~d) 随着细胞代次的增加,细胞生长缓慢,P35 代细胞开始出现衰老现象 (图 1 e),当传代至 44 代时,胞质空泡明显,细胞立体感消失,最后核固缩 (图 1 f)。

复苏后的细胞生长状态良好,在形态上与冻存前细胞无明显差异 (图 1 g, h),且细胞存活率高达 90% 以上,表明本试验所用冻存体系适合肌源性干细胞的冻存。

2.2 肌源性干细胞免疫荧光和 RT-PCR 鉴定结果

应用免疫荧光法检测肌源性干细胞表面标记标志物 Sca-1、CD34、CD144 和 Desmin (图 2 A),Sca-1、CD34 和 Desmin 呈细胞质阳性表达,CD144 呈细胞核阳性表达;

不同代次 RT-PCR 检测结果与之相符 (图 2 B),但各代次间在表达强度上有所差别,Desmin 和 Sca-1 随着代次的增加,细胞表达量有所下降,其他均无明显的变化。

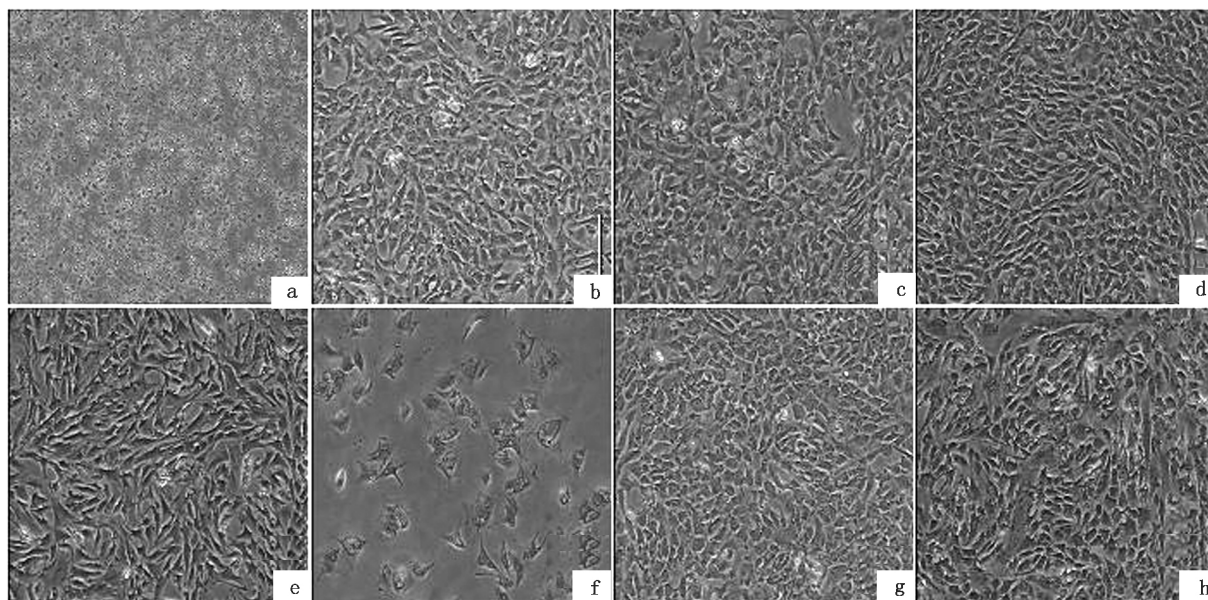


图 1 细胞形态图 a.PP1;b.PP5;c.PP6;d.P1;e.p35;f.P44;g.冻存前;h.复苏后

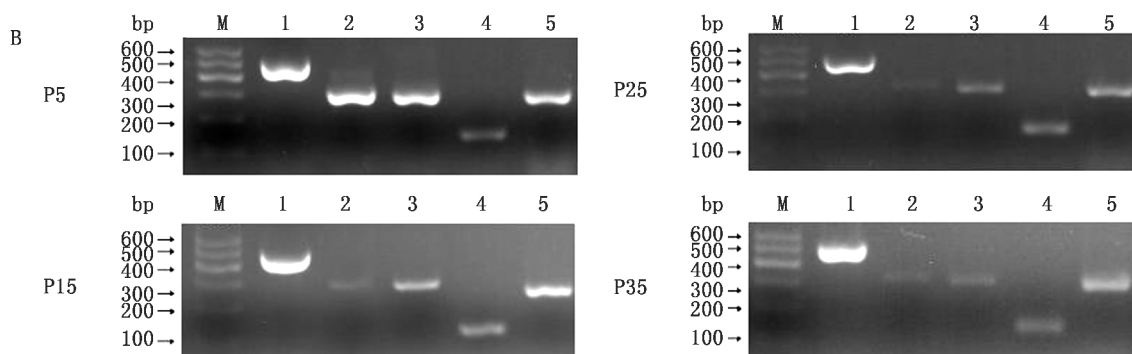
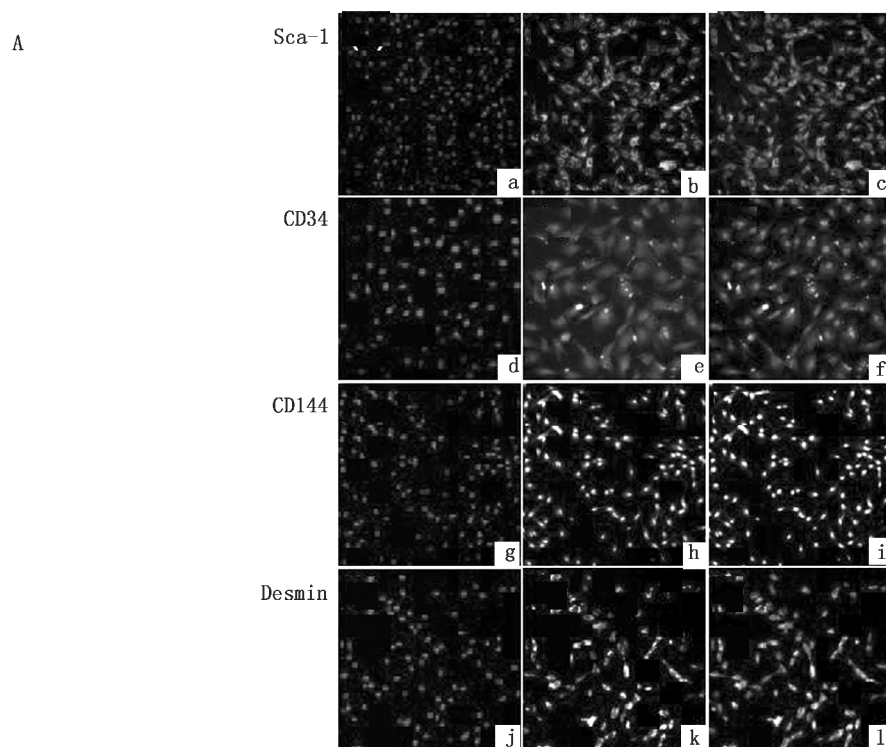


图 2 MDSCs 表面标记物免疫荧光和 RT-PCR 检测 A:a,d,g,j.染核;b,e,h,k.Sca-1 阳性,CD34 阳性,CD144 阳性,Desmin 阳性;c,f,i,l.重叠;B:M.DNA 标准 Marker;1.内参;2.Sca-1;3.CD34;4.CD144;5.Desmin

2.3 肌源性干细胞生长曲线绘制 肌源性干细胞生长曲线呈“S”型(图 3)。细胞在第 3 天之后进行对数生长期,在 6~8 d 时,细胞生长缓慢,处于稳定期,由于细胞间的接触抑制现象,细胞有逐渐衰亡的迹象。

2.4 肌源性干细胞细胞周期检测结果 对第 5 代肌源性干细胞采用流式细胞仪进行分析,结果如图 4A 和 4B 所示, G_{0+1} 期细胞占细胞总数的 68.46%, S 期细胞占细胞总数的 15.60%, G_{2+M} 期细胞占细胞总数的 15.94%, 结果显示绝大多数细胞处于间隙期,即 DNA 复制还没开始, DNA 含量相对较少(4A 中第 1 个峰);进入 S 期后 DNA 开始复制,到完成复制,是 1 个 1 倍 DNA 到 2 倍 DNA 的过程,在流式结果图中显示期跨度特别大(4A 中第 2 个峰);当 DNA 复制完成至分裂的一段时间,此时细胞内含 2 倍 DNA,即处于 G2 期(4A 中第 3 个峰),在图 4B 中能明显看到 2C 和 4C 含量占细胞总数的比例较

高,因此说明刚传代后的细胞正在分裂,跟生长曲线相符。

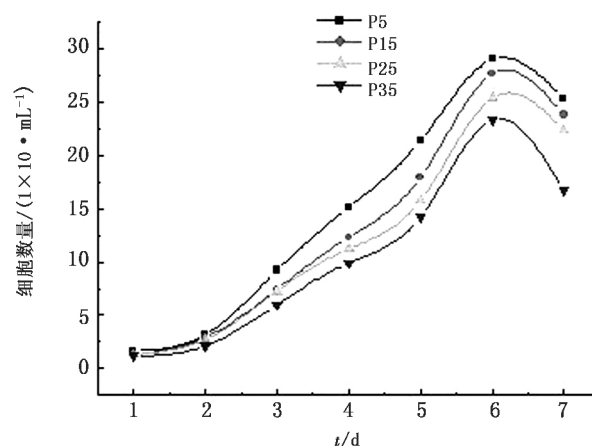


图 3 MDSCs 生长曲线

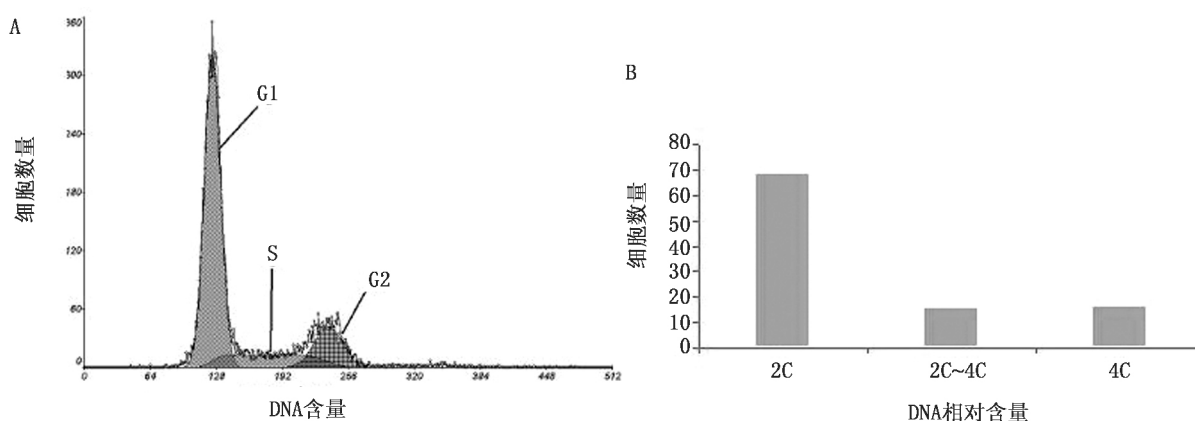


图 4 细胞周期

2.5 肌源性干细胞诱导分化结果 加入肝样细胞诱导液培养 1 周左右后,观察细胞形态上并没有太大的变化,但细胞增殖速度较为明显。诱导 1 周后,细胞增殖速度逐渐减慢,细胞形态由原来的长梭形居多的 MDSCs 细胞转变成多角形细胞,随着诱导时间的增加,上皮样细胞逐渐增加,并呈现铺路石样排列。在正常的 MDSCs 细胞全培养基培养的对照组细胞在形态特征上没有明显的变化,仍然呈长梭形。在细胞诱导 21 d 时,对对照组和诱导组进行糖原染色。结果显示,诱导组糖原染色呈阳性,而对对照组的细胞染色呈阴性(图 5A)。说明在此诱导条件下细胞逐渐形成具有糖原合成和储存功能的肝样细胞。通过 RT-PCR 检测发现诱导的细胞表达基因 AFB 和 ALB,而对对照组对 AFB 和 ALB 的检测

呈阴性,如图 5B。

加入胰岛分泌样细胞诱导液培养 1 周后,观察细胞形态上并没有明显的变化,细胞仍成长梭形,与对照组无明显变化,但细胞增殖较快。诱导 1 周后换为诱导液 3 继续诱导 4 d 后,但细胞增殖速度较为明显。诱导 1 周后,细胞增殖不明显,开始成团簇聚集生长。对照组细胞在形态上无明显变化,也没有出现细胞团簇,在细胞诱导 10 d 时,对对照组和诱导组进行双硫腺染色。结果表明,诱导组双硫腺染色呈阳性,而对对照组的细胞染色呈阴性(图 6)。RT-PCR 和免疫荧光检测发现诱导的细胞表达胰岛分泌样细胞标记基因 insulin,而对对照组对 insulin 的检测呈阴性(图 7A,B)。

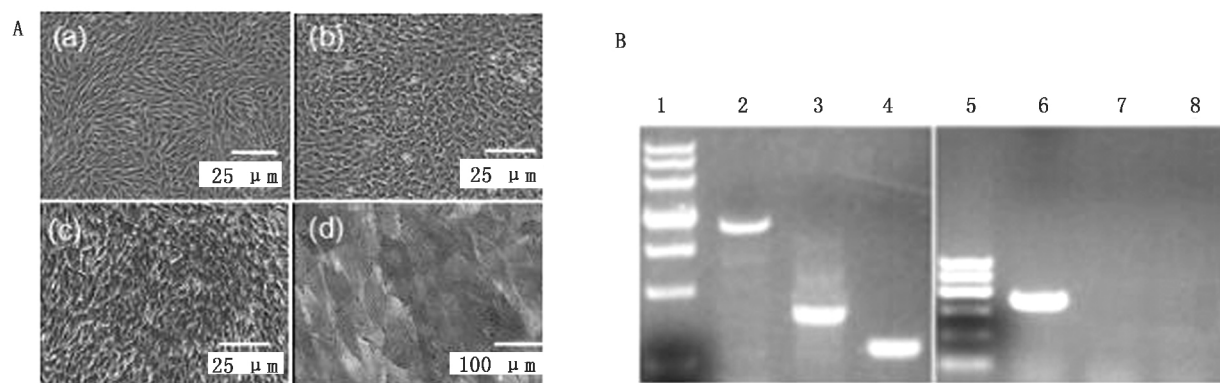


图 5 绵羊 MDSCs 向肝样细胞诱导 Schiff 试剂染色及 RT-PCR 鉴定 A:a.对照组(40 \times);b.诱导 14d(40 \times);c.诱导 14dSchiff 试剂染色(40 \times);d.诱导 14dSchiff 试剂染色(200 \times);B:1~4.为诱导组;5~8.为对照组;1,5.Marker;2,6.GAPDH;3,7.ALB;4,8.AFP

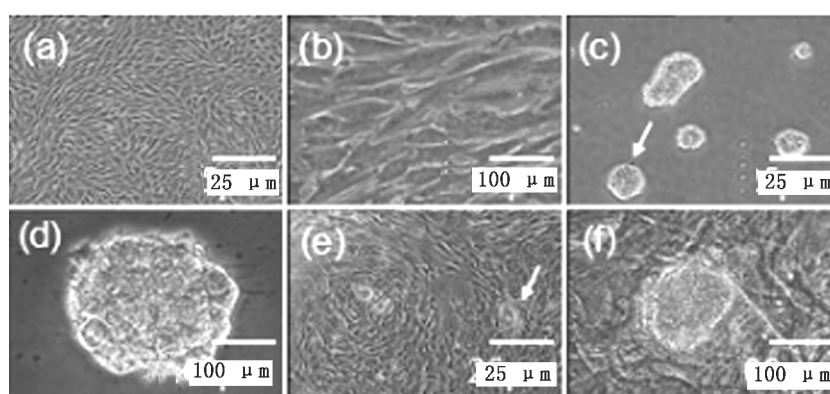


图 6 绵羊 MDSCs 向胰岛分泌样细胞诱导及鉴定 a.诱导前(40 \times);b.诱导前(200 \times);c.诱导 4d(40 \times);d.诱导 4d(200 \times);e.诱导 11d 双硫脲染色(40 \times);f.诱导 11d 双硫脲染色(200 \times)

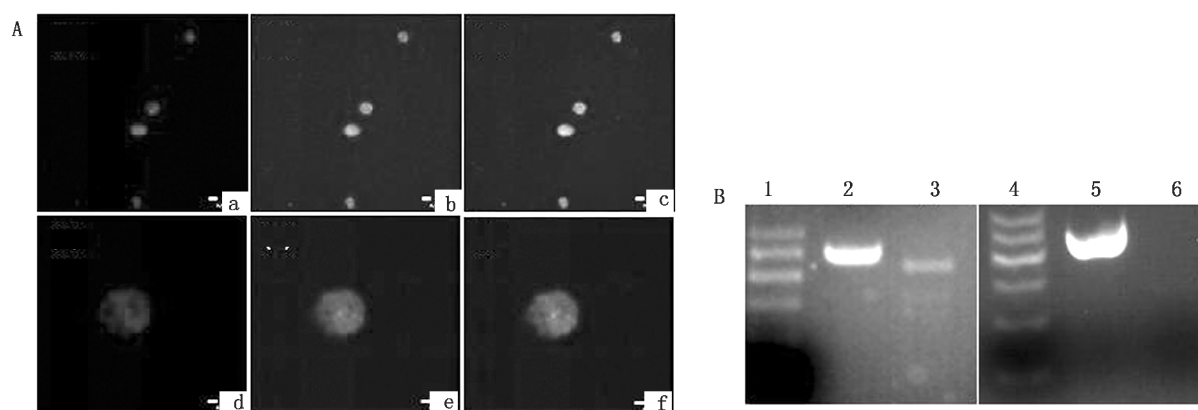


图 3 胰岛分泌样细胞诱导免疫荧光和 RT-PCR 鉴定 A:a,b.DAPI;c,d.insulin 阳性;e,f.merge;a,c,e.50 μ m;b,d,f.25 μ m; B:1~3.诱导组;4~6.对照组;1,4.Marker;2,5.GAPDH;3,6.insulin

3 讨论

我国拥有很多古老而独特的畜禽品种,是世界

上畜禽品种资源大国,但许多特有地方品种尚未被开发利用就已灭绝,非常可惜^[9]。虽然目前已有通过成纤维细胞保存畜禽遗传资源这一途径^[10],但相较于干细胞成纤维细胞属于终末分化,虽然包含全

部遗传信息,但在细胞 RNA 转录水平层级的研究价值大大低于干细胞,且 MDSCs 具有更强的自我更新能力和成纤维细胞所不具备的多向分化潜能,所以在物种遗传资源保存上,干细胞比成纤维细胞更加适合进行遗传资源的保存^[11]。

由试验结果可知,MDSCs 细胞形态均一,在 P38 代以内细胞无明显变化,从 P40 代以后细胞明显出现变化,分化细胞所占比例逐渐上升,细胞变大并且扁平,较之前相比没有立体感可言,细胞核固缩并且有大量空泡现象出现,以上结果表明,低代次的细胞生长能力较强,随着代次的不断增高,细胞增殖速度逐渐减慢,细胞的贴壁能力也相应的逐渐降低,细胞老化现象明显。RT-PCR 基因表达鉴定和免疫荧光着色检测显示绵羊胚胎 MDSCs 均表达 Sca-1、CD34、CD144、Desmin、CD45 为阴性,基因灰度值分析和相对荧光强度分析表明,各个代次间无显著区别。以上结果验证了体外培养的绵羊胚胎 MDSCs 具有维持干细胞的基本特性。绵羊 MDSCs 冻存前活率略大于复苏后的活率,随着代次的增高,细胞的活率有所减低,但结果并不显著,细胞整体的活率维持在 90% 以上。绵羊 MDSCs 低中高各代次的生长曲线呈典型“S”型,体外培养的细胞经历了潜伏期、对数生长期、稳定期和衰亡期,符合细胞在体外生长的一般规律。在适宜的诱导条件下,成功将绵羊 MDSCs 诱导为肝样细胞和胰岛分泌样细胞,诱导过程中分别表现出目的细胞相应的形态特征,通过特异性染色、RT-PCR 和免疫荧光检测方法进一步证明了绵羊胚胎 MDSCs 的多潜能性。

成体 MDSCs 作为再生医学的候选种子细胞,其治疗心血管及泌尿系统疾病和骨骼损伤等疾病中体现出了强大的优势。目前,在快速发展的临床移植研究中显示,MD-SCs 基因介导治疗所选择的动物模型是研究者们着重考虑的问题。然而,细胞移植无论在体内还是体外都需要 MDSCs 完整的分化和修复机制,显然,将 MDSCs 广泛的应用于临床实践仍面临巨大的挑战。刺五加注射液作为临床中药已被广泛应用,但是将其应用于干细胞治疗上,其

作用机制目前尚不明确,有待研究。因此,将药物与干细胞联合应用将是今后更多研究者所需关注的重点。

参考文献:

- [1] KARL J A M, RITA C R P. Coaxing stem cells for skeletal muscle repair[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2014 (14): 148-153.
- [2] 迟 猛, 韩剑锋, 方 波. 人肌源性干细胞的培养与鉴定[J]. 中国现代药物应用, 2008, 2(14): 61-62.
- [3] JACKSON K A, MI T, GOODELL M A. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, (96): 14482-14486.
- [4] 叶 锦, 靳风烁, 陈 锦, 等. 大鼠肌源性干细胞的分离、纯化和培养[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(14): 2596-2600.
- [5] 韩 颖, 孔庆然, 尹 智, 等. 牛肌源性干细胞的培养和鉴定[J]. 东北农业大学学报, 2008, 39(12): 47-50.
- [6] MENG J H, ADKIN C F, XU S W. Contribution of human muscle-derived cells to skeletal muscle regeneration in dystrophic host mice[J]. PloS One, 2011, 6(3): e17454.
- [7] QU ZQ, BALKIR L, VAN DEUTEKOM JCT, et al. Development of approaches to improve cell survival in myoblast transfer therapy[J]. J Cell Biol, 1998, 142(5): 1257-1267.
- [8] GHARAIBEH B, LU A, TEBBETS J, et al. Isolation of a slowly adhering cell fraction containing stem cells from murine skeletal muscle by the preplate technique[J]. Nat Protoc, 2008, 3(9): 1501-1509.
- [9] 吕宝铨. 保护我国地方畜禽品种路在何方[J]. 当代畜牧, 2011(4): 54-55.
- [10] GUAN W J, WANG D J, BAI C Y. Biological characteristic of an embryonic fibroblast line from Xiaoshan chicken for genetic conservation[J]. J Cell Anim Biol, 2012, 6(4): 46-53.
- [11] 牧 仁, 边艳超, 浦亚斌, 等. 北京油鸡胚胎肝脏间充质干细胞的生物学特性[J]. 华中农业大学学报, 2013, 32(6): 99-105.