

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 XI、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XI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+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-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Takara 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1×10⁴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退火/℃	循 环	产物长度/bp
GAPDH	F:5'-GAAGGTCGGAGTGAACGGATT-3' R:5'-GGTCATAAGTCCCTCCACGAT-3'	60.0	30	517
	F:5'-TCAGGAAACCTTCACGAG-3' R:5'-CCACTGTCTGTCTCAATACCAC-3'			
Sca-1	F:5'-CGGCATCTTCTACCCTCATC-3' R:5'-GCCTGTTCCCTGACACA-3'	60.0	30	277
	F:5'-TGGTCACACGCAAGTCCTAA-3' R:5'-TAACAAACCTCCTGCCATA-3'			
CD34	F:5'-GACCTTACGCTTCCCACCTC-3' R:5'-CATCTCCTGCTCCCACATCT-3'	61.0	30	150
	F:5'-CTGGTTGAGGTGTTGGTTG-3' R:5'-ACAGGTGCTGGTTGACGAAG-3'			
CD144	F:5'-TGGAAGTAGTGGTCGGAAGA-3' R:5'-GGGAACGGAGGGTAGAT-3'	61.5	30	225
	F:5'-TGTGGCTTGATCTCGT-3' R:5'-TTCTCCGCTGTGCTTG-3'			
Desmin	F:5'-TTCTCCGCTGTGCTTG-3'	52.0	30	460
	R:5'-GGGAACGGAGGGTAGAT-3'			
Insulin	F:5'-ACAGGTGCTGGTTGACGAAG-3' R:5'-TGGAAGTAGTGGTCGGAAGA-3'	54.0	30	489
	F:5'-TGTGGCTTGATCTCGT-3' R:5'-TTCTCCGCTGTGCTTG-3'			

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,1200 r/min离心10 min,弃上清,用PBS将细胞重悬,1000 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,1200 r/min离心10 min,弃去无水乙醇,PBS重悬,1200 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 1×10^7 /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×ITS(5 mg/L胰岛素+5 mg/L转铁蛋白+5 μ g/L亚硫酸钠)、40 μ g/L地塞米松、20 μ g/L FGF-4+20 μ 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+1mmol/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+1mmol/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1a);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1b~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1e),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1f)。

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1g,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2A),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2B),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。

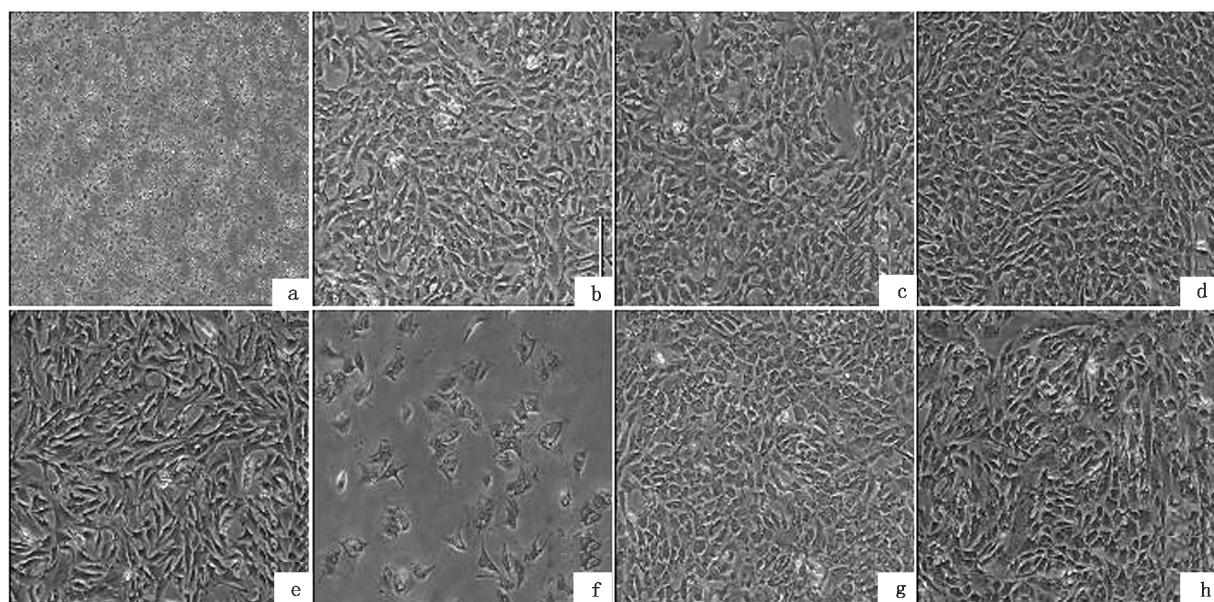


图1 细胞形态图 a.PP1;b.PP5;c.PP6;d.P1;e.p35;f.P44;g.冻存前;h.复苏后

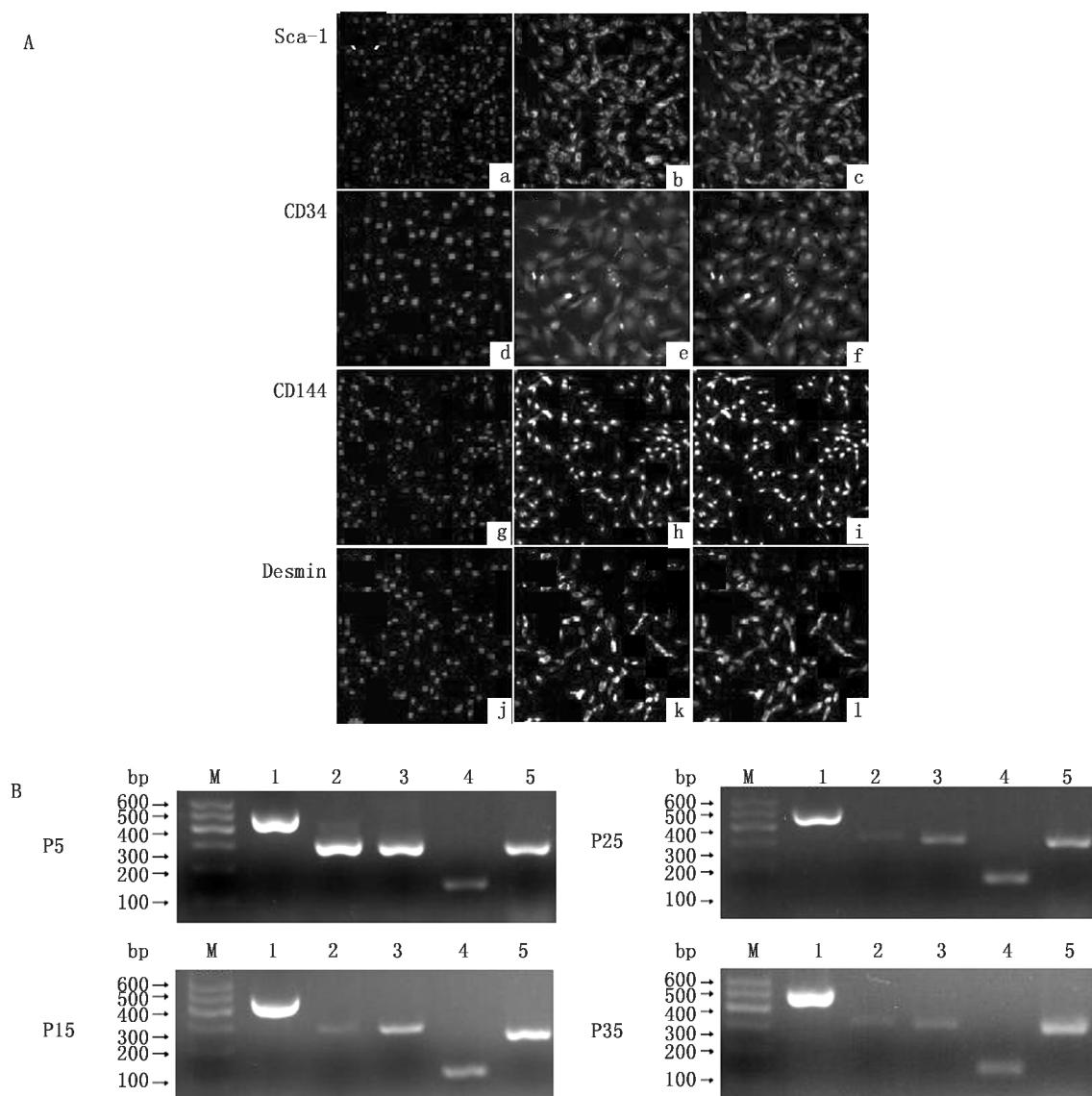


图2 MDSCs 表面标记物免疫荧光和 RT-PCR 检测 A:a,d,g,j.染核;b,e,h,k.Sca-1 阳性,CD34 阳性,CD144 阳性,Desmin 阳性;c,f,i,l.重叠;B:M.DNA 标准 Marker;1.内参;2.Sca-1;3.CD34;4.CD144;5.Desmin

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 G_2 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。

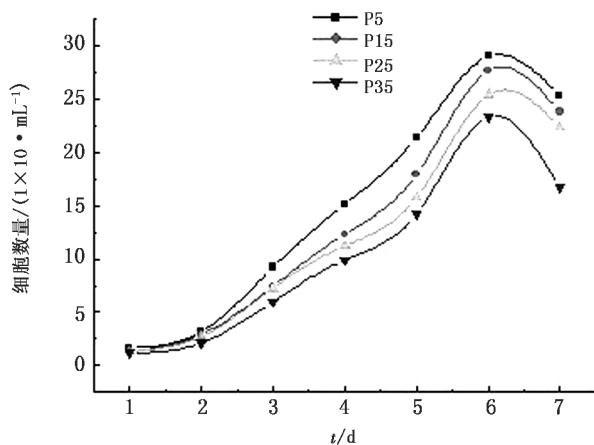


图3 MDSCs 生长曲线

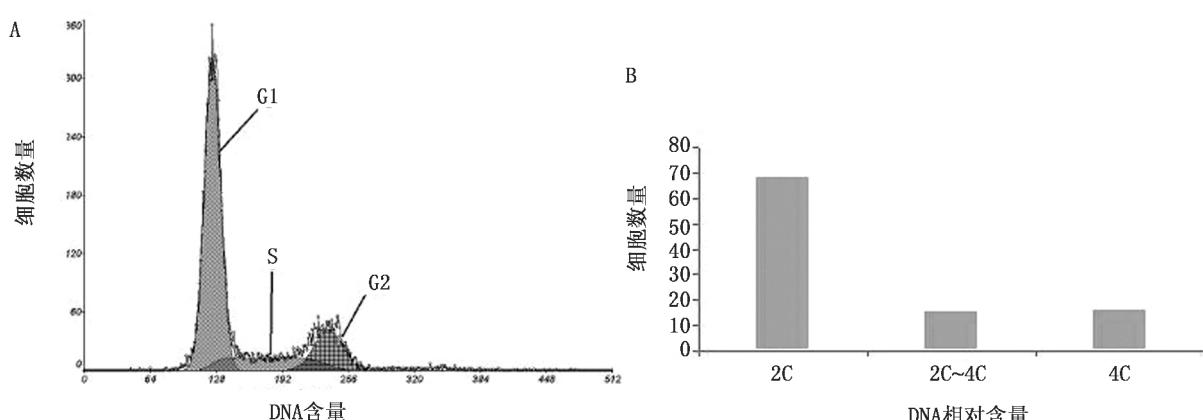


图4 细胞周期

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,而对照组对AFB和ALB的检测

呈阴性,如图5B。

加入胰岛素样细胞诱导液培养1周后,观察细胞形态上并没有没有明显的变化,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,开始成团簇集聚生长。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脲染色。结果表明,诱导组双硫脲染色呈阳性,而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素样细胞标记基因insulin,而对照组对insulin的检测呈阴性(图7A,B)。

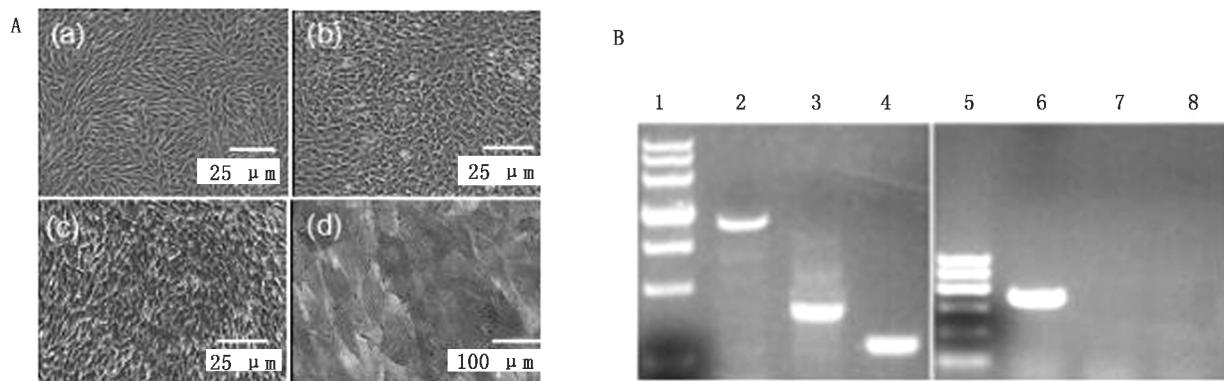


图5 绵羊MDSCs向肝样细胞诱导Schiff试剂染色及RT-PCR鉴定 A:a.对照组(40×);b.诱导14d(40×);c.诱导14dSchiff试剂染色(40×);d.诱导14dSchiff试剂染色(200×);B:1~4.为诱导组;5~8.为对照组;1,5.Marker;2,6.GAPDH;3,7.ALB;4,8.AFP

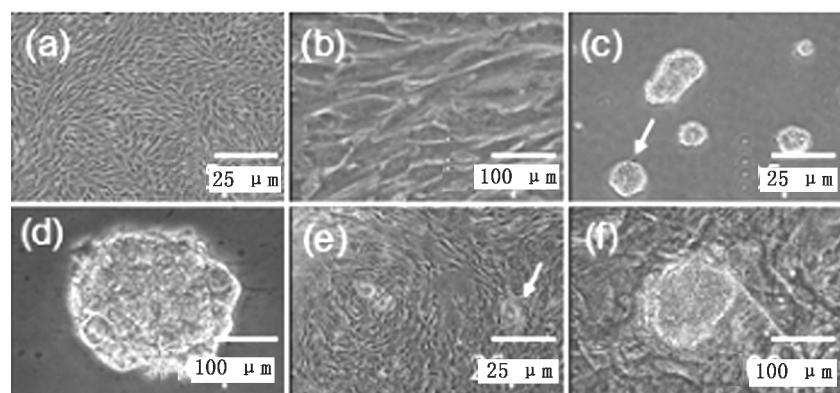


图6 绵羊MDSCs向胰岛分泌样细胞诱导及鉴定 a.诱导前(40×);b.诱导前(200×);c.诱导4d(40×);d.诱导4d(200×);e.诱导11d双硫腙染色(40×);f.诱导11d双硫腙染色(200×)

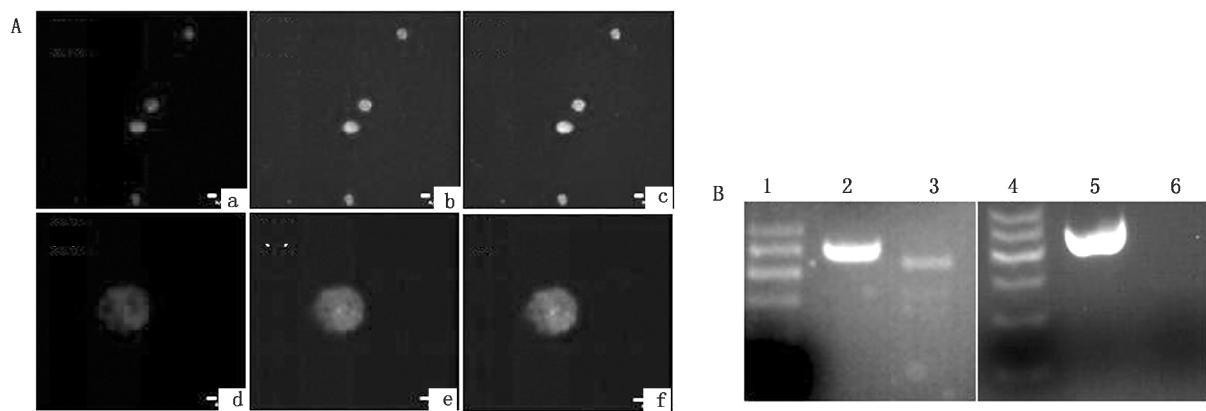


图3 胰岛分泌样细胞诱导免疫荧光和RT-PCR鉴定 A:a,b.DAPI;c,d.insulin阳性;e,f.merge;a,c,e.50 μm;b,d,f.25 μm;B:1~3.诱导组;4~6.对照组;1,4.Marker;2,5.GAPDH;3,6.insulin

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种途径^[10],但相较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,细胞变的大并且扁平,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,其在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 翎, 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 Xiao shan 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.