技术方法

文章编号:1000-5404(2005)18-1888-03

荧光蛋白标记对兔骨髓间充质干细胞体外成脂诱导的影响

Effects of green fluorescent protein labelling on adipogenic differentiation of rabbit mesenchymal stem cells *in vitro*

段小军[1],杨 柳[1],周 跃[2] (第三军医大学:[1]西南医院关节外科中心,重庆 400038,[2]新桥医院骨科,重庆 400037)

提 要:目的 探讨兔骨髓间充质干细胞经增强型绿色荧光蛋白标记后,体外成脂诱导能力的变化。**方法** 采用逆转录病毒载体 pLEGFP-N1 转染兔骨髓间充质干细胞,G418 筛选获得靶细胞,分别采用适宜的成脂诱导培养液对标记细胞和间充质干细胞进行诱导,分析两组油红 O 染色阳性细胞率。**结果** 逆转录病毒载体 pLEGFP-N1 成功标记间充质干细胞,标记细胞组与对照组在成脂诱导后,油红 O 染色阳性细胞率分别为(22.5±3.5)%与(25.3±3.1)%,2 组数据无显著性差异($P>0.05$)。**结论** 增强型绿色荧光蛋白标记对兔骨髓间充质干细胞体外成脂诱导能力无明显影响,合理应用这种新型细胞标记技术将促进成体干细胞的应用研究。

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)可以分化为骨、软骨、脂肪、骨骼肌等中胚层组织细胞,目前已成为构建工程化组织的重要种子细胞[1~3]。深入认识自体或异体 MSCs 植入体内后的功能作用,需要对细胞进行有效标记。荧光蛋白标记技术具有实时、直接、简单等特性,现已成为细胞标记的新手段[4]。本实验旨在观测增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)标记兔骨髓 MSCs 后,其体外诱导成脂能力的变化,为进一步应用该技术提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

逆转录病毒载体 pLEGFP-N1(Clontech 公司),大肠杆菌 DH5α 菌株、病毒包装细胞 PT67 由本校国家重点实验室复合伤研究分室馈赠。质粒提取试剂盒(Promega 公司),核酸内切酶(Takara 公司),脂质体 DOTAP(Roche 公司),DMEM 培养基、优等胎牛血清(Hyclone 公司),Percoll 细胞分离液(TBD 公司),地塞米松、IBMX(3-异丁基-1-甲基黄嘌呤)、胰岛素、吲哚美辛(Sigma 公司)。OLYMPUS-IX70 型生物倒置显微镜(Olympus 公司)。日本大耳白兔(本校实验动物中心)。

1.2 方法

1.2.1 质粒转化、提取及酶切鉴定 参照文献[5]的方法进行,然后 *Eco*RⅠ、*Kpn*Ⅰ、*Hind*Ⅲ酶切鉴定 pLEGFP-N1 质粒。

1.2.2 逆转录病毒的包装 参照文献[6],采用脂质体介导方法将 pLEGFP-N1 质粒转染包装细胞 PT67。

1.2.3 MSCs 的培养 ①原代培养:参考文献[7],从 2 月龄日本大耳白兔股骨粗隆($n=4$)处用骨穿针穿刺,肝素钠抗凝下抽出骨髓 1.0~1.5 ml,稀释骨髓后,使用 Percoll 分离液(密度 1.073 g/ml)进行梯度离心(2 000 r/min×20 min),以 $2\times10^5/cm^2$ 的密度进行原代培养。孵箱内培养条件:37 ℃、5% CO_2 空气、饱和湿度。②传代培养:以 $8\times10^3/cm^2$ 的密度接种,传代培养细胞长满瓶底后,按同样方法再扩增 1 代。以第 3 代细胞为实验对象。

1.2.4 荧光蛋白标记 MSCs 参照文献[6],首先用逆转录病毒感染兔 MSCs,感染液含 pLEGFP-N1 病毒液 2 ml、polybrene 终浓度 8 μg/ml,37 ℃培养 48 h;接着采用 G418 递减方法筛选标记细胞,最后以 G418(300 μg/ml)的培养液维持形成抗性克隆及常规方法传代。

1.2.5 成脂诱导培养 以标记细胞为试验组,同期培养的未标记 MSCs 为对照组,待细胞长至培养瓶瓶底 80% 面积时,换成脂诱导培养液,每 2~3 d 换液,共诱导 12 d。参照文献[8],配制诱导培养液Ⅰ:DMEM 培养液+10% 胎牛血清+地塞米松(10^{-6} mol/L)+IBMX(3-异丁基-1-甲基黄嘌呤)(0.5 mmol/L)+胰岛素(10 μg/ml)+吲哚美辛(100 μg/ml);诱导培养液Ⅱ:50% 诱导培养液Ⅰ+50% DMEM 完全培养液+G418(300 μg/ml)。试验组分别用 2 种诱导培养液,对照组仅用诱导培养液Ⅰ。

1.2.6 观察与检测 ①倒置显微镜观察,了解细胞数量、形态及脂肪滴形成等;②油红 O 染色分析:分别消化细胞接种于含预处理小玻片的 24 孔培养板内,24 h 后取出小玻片经 PBS 漂洗后用甲醛-钙固定液固定 30 min,进行油红 O 染色,甘油胶封片,随机计数每组细胞的阳性率。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,应用 SPSS 10.0 软件,采用独立样本 t 检验。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270375,30300079);全军医学科学技术研究"十五"计划课题(01Z072)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30270375, 30300079) and the Research Project of the "Tenth Five-YearPlan" for Medical Science Development of PLA (01Z072)

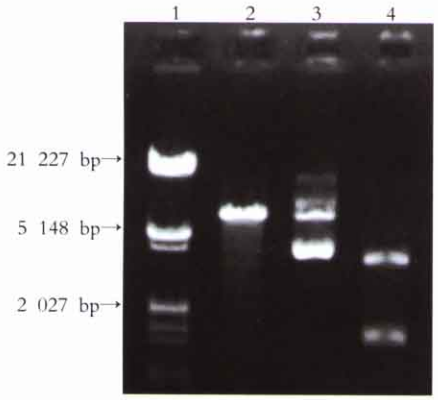
作者简介:段小军(1972-),男,四川省渠县人,博士研究生,主治医师,主要从事组织工程学方面的研究,发表论文 14 篇。电话:(023)66504026,E-mail: dxj9@163.com
通讯作者:杨 柳,电话:(023)68765280,E-mail: jointsurgery@163.com

收稿日期:2005-04-14;修回日期:2005-08-17

2　结果

2.1　质粒鉴定

pLEGFP-N1(6.89 kb)含 *Hind* Ⅲ单一酶切位点，提取质粒经 *Hind* Ⅲ、*Kpn* Ⅰ、*Eco*R Ⅰ酶切 3 h 后琼脂糖电泳，结果与预期值一致(图 1)。



1：Marker；2：pLEGFP-N1（*Hind* Ⅲ）；3：pLEGFP-N1（*Kpn* Ⅰ）；4：pLEGFP-N1(*Eco*R Ⅰ)

图 1　pLEGFP-N1 质粒的酶切鉴定

2.2　逆转录病毒方式标记

pLEGFP-N1 质粒转染 PT67 细胞后 36 h 观察到 EGFP 表达，经 G418 筛选后，超过 95% 的 PT67 细胞表达 EGFP。MSCs 经该逆转录病毒感染后，48 h 观察到 EGFP 表达，G418 筛选 1 周时未感染细胞逐渐死亡，随换液而清除，3 周后超过 60% 的细胞表达 EGFP，胞核部分比胞浆更明显。当细胞密度低时，在倒置荧光显微镜下可以清楚的观察到荧光标记细胞轮廓，呈不规则状，其清晰程度超过光学相差倒置显微镜。当细胞增殖、密度增高后，呈梭状(图 2)。

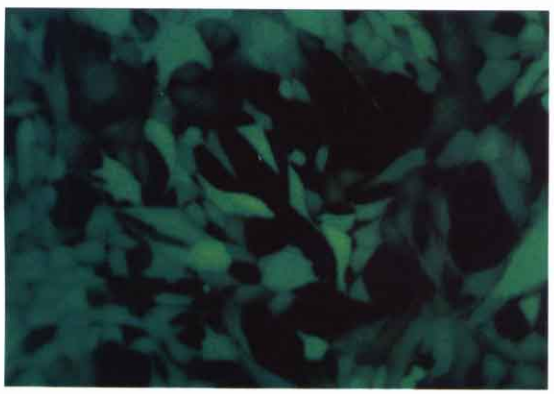


图 2　EGFP 标记兔 MSCs 的形态　(倒置荧光显微镜×200)

2.3　成脂诱导培养

MSCs 在诱导过程中，大部分细胞由短梭形逐步变为长梭形，胞内出现数目不等的折光性强的脂滴，但细胞总体数量有减少趋势(图 3)。EGFP 标记细胞在诱导培养液Ⅰ中生长不良，大部分细胞出现悬浮而随换液被清除，而在诱导培养液Ⅱ中的标记细胞则相对生长良好，与对照组类似，胞内也出现数目不等的折光性强的脂滴，而这种脂滴中几乎不含荧光蛋白，在荧光倒置显微镜下为暗区(图 4)。油红 O 染色分析，发现标记细胞组阳性率为(22.5±3.5)%，对照组为(25.3±3.1)%，2 组数据无统计学差异($t=0.589$，$P=0.577$)；而 2 组阳性细胞中均存在脂滴大小不均一的情况，大者甚至超过细胞核(图 5)，小者则似细胞分泌颗粒。

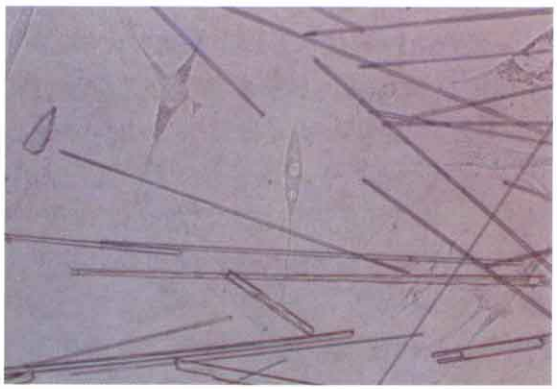


图 3　兔 MSCs 成脂诱导 12 d 后见脂滴聚积　(×200)

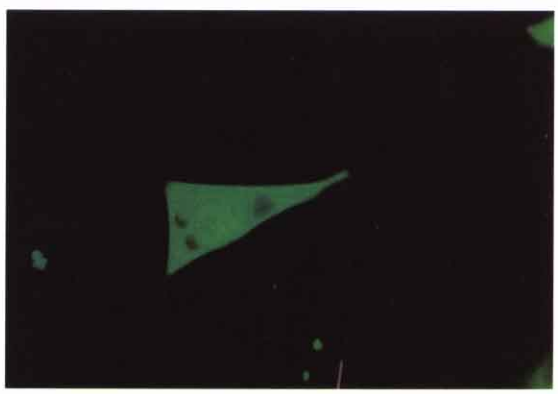


图 4　EGFP 标记兔 MSCs 经成脂诱导 12 d 见不含荧光蛋白的脂滴　(倒置荧光显微镜×200)



图 5　标记细胞诱导后的油红 O 染色显示较多脂滴　(×400)

3 讨论

由于MSCs具有自我更新、多向分化潜能，且容易获取及体外扩增培养，成为近年来成体干细胞研究的热点[3,9]。MSCs在体内既可以作为修复组织的细胞来源，还可能同时参与多种组织的更新，目前在多个领域显示出重要的应用前景，包括：组织工程的种子细胞、基因转染的细胞载体等[2]。深入认识植入MSCs在体内的功能，则必须选择适当的方法能够识别植入细胞。荧光蛋白标记技术是近年来迅速发展的一种新型细胞标记技术，具有：易于检测、表达稳定、特异性强、可以实现活细胞观察等优势[10]。1994年Chalfie等[11]首次在大肠杆菌中表达了GFP，开创了应用荧光蛋白的先河，现在荧光蛋白技术已被拓展到重组载体的报告基因、细胞示踪、细胞亚结构和蛋白分子定位、药物筛选等领域[12]。EGFP是GFP的突变型，将丝氨酸65用苏氨酸代替，苯丙氨酸64用亮氨酸代替，使荧光强度增加35倍，大大提高了检测灵敏度。

本实验成功进行EGFP标记兔骨髓MSCs，并在此基础上研究细胞体外成脂诱导能力的变化。兔骨髓MSCs在由胎牛血清、地塞米松、IBMX、胰岛素、吲哚美辛和DMEM培养液组成的混合诱导液中培养一定时间后，部分细胞产生明显的脂肪颗粒，证实MSCs的脂肪细胞分化能力。采用逆转录病毒方式，将兔骨髓MSCs标记EGFP后，直接使用常规的成脂诱导培养液时，由于培养液的骤然改变，导致细胞大量死亡；而将成脂诱导培养液改良为常规成脂诱导培养液与常规扩增培养液二者的混合，并添加适量的G418，则发现标记细胞死亡数量明显减少，细胞能够适应该诱导环境，既表现出脂肪细胞分化能力，又稳定了EGFP表达。本实验中的逆转录病毒载体来源于Molloney小鼠白血病病毒改良，遗传背景清楚，可以高效的将外源基因EGFP整合入分裂期靶细胞的基因组中，从而实现长期表达该外源基因。作者目前体外培养EGFP标记的MSCs已达6月，发现只要培养液中含G418(300 μg/ml)，MSCs就可以一直稳定表达EGFP。

以逆转录病毒方式进行EGFP标记MSCs，并不影响干细胞的脂肪分化的能力。该结论提示：①采用这种标记技术研究MSCs在体内的成脂分化机制是可行的；②在利用MSCs作为脂肪组织工程的种子细胞时，为了准确了解植入细胞在某区域的分布与功能作用，选用这种荧光蛋白标记技术也是适宜的。

关键词：荧光蛋白；间充质干细胞；细胞分化；脂肪细胞
中图法分类号：R329-33 **文献标识码**：B

参考文献：

[1] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, *et al*. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411): 143-147.

[2] Jiang Y, Jahagirdar B, Reinhardt R L, *et al*. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. Nature, 2002, 418(6893): 41-49.

[3] 李 忠，杨 柳. 骨组织工程学间充质干细胞研究进展[J]. 中华创伤杂志，2003，19(12)：766-768.

[4] Rosochacki S J, Matejczyk M. Green fluorescent protein as a molecular marker in microbiology[J]. Acta Microbiol Pol, 2002, 51(3): 205-216.

[5] 萨姆布鲁克 J，拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 第3版. 北京：科学出版社，2002. 27-99.

[6] 段小军，杨 柳，周 跃，等. 兔骨髓间充质干细胞同种异体皮下移植研究[J]. 中华创伤杂志，2005，21(7)：512-516.

[7] 杨 柳，段小军，戴 刚，等. 人间充质干细胞体外成骨诱导培养及其生物学特性变化[J]. 第三军医大学学报，2002，24(5)：509-512.

[8] Sottile V, Halleux C, Bassilana F, *et al*. Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells[J]. Bone, 2002, 30(5): 699-704.

[9] Verfaillie C M. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency[J]. Trends Cell Biol, 2002, 12(11): 502-508.

[10] Jones J J, Bridges A M, Fosberry A P, *et al*. Potential of real-time measurement of GFP-fusion proteins[J]. J Biotechnol, 2004, 109(1-2): 201-211.

[11] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, *et al*. Green fluorescent protein as a marker for gene expression[J]. Science, 1994, 263(5148): 802-805.

[12] 段小军，杨 柳，周 跃，等. 不同荧光蛋白标记技术对兔骨髓基质干细胞体外增殖的影响[J]. 中会创伤骨科杂志，2004，6(7)：731-734.

(编辑 薛国文)