文章编号:1000-5404(2013)10-0965-04

论著

Fibronectin 差别黏附法筛选、纯化软骨终板干细胞

王 海,黄 博,周 跃,李长青,王 建 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院骨科)

[摘要] **目的** 通过 Fibronectin 介导进行差别黏附筛选软骨终板干细胞,观察筛选的效果及其初步生物学性能。**方法** 从脊柱融合术中获取椎间盘软骨终板标本,机械-酶消化法获取原代软骨终板细胞,体外扩增至第 2 代后接种于 Fibronectin包被过的培养瓶,孵育 20 min 后将未贴壁细胞及培养液转移至新培养瓶再孵育 40 min, 吸弃未贴壁细胞及培养液,所得 2 瓶细胞进行体外扩增,流式细胞仪检测细胞表面标志物。对筛选后的细胞进行向多系细胞诱导分化。**结果** 第 2 代细胞筛选前,细胞形态个体差异较大,呈三角形或多角形,融合时呈铺路石样外观,筛选后细胞形态比较均匀,形成细胞克隆群。流式细胞仪检测发现:经 Fibronectin 筛选后所获软骨终板干细胞 CD90、CD73 表达阳性率 >95%, CD105 表达阳性率 >85%;经诱导能向骨、软骨及脂肪细胞方向分化。**结论** Fibronectin 筛选所得的软骨终板细胞基本符合国际细胞治疗协会对间充质干细胞的定义标准。Fibronectin 差别黏附筛选法得够有效筛选、纯化软骨终板干细胞。

[关键词] 纤维连接蛋白;软骨终板干细胞;差别黏附筛选法
[中图法分类号] R322.71;R329-33 [文献标志码] A

Fibronectin differential adhesion assay for selection and purification of cartilage endplate-derived stem cells

Wang Hai, Huang Bo, Zhou Yue, Li Changqing, Wang Jian (Department of Orthopaedics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, 400037, China)

[**Abstract**] Objective To select cartilage endplate-derived stem cells by fibronectin differential adhesion assay, to evaluate the efficiency, and to observe the preliminary biological properties of obtained stem cells. Methods The samples of intervertebral disc cartilage endplate were collected from spine fusion surgery, and primary cartilage endplate cells were obtained by mechanical method combined with collagenase. Primitive cells expanding to passage 2 were transferred to culture flasks coated with fibronectin. After 20 min the non-adherent cells and media were transferred to a second flask to incubate for 40 min, and both of the two flasks were added with fresh media and cultured after the media and non-adherent cells in the second flask were removed. The cells after selection were detected by flow cytometry and were induced to differentiate into osteoblasts, chondrocytes and adipocytes. Results The discrepancy of cell morphology among cells of passage 2 was observed, but the cells became comparatively uniform after selection. The results of flow cytometry showed these cells were positive for 3 cell markers including CD73, CD105 and CD90, but negative for CD34 and CD45. The percentages of CD73- and CD90-positive cells were more than 95%, while the percentage of CD105-positive cells was more than 82%. The cells could differentiate into osteoblasts, chondrocytes and adipocytes. Conclusion The results of cartilage endplate-derived stem cells obtained by fibronectin differential adhesion assay fulfill the majority of criteria used to define mesenchymal stem cells stated by the International Society for Cellular Therapy. By the method we can obtain cartilage endplate-derived stem cells efficiently and reliably.

[**Key words**] fibronectin; cartilage endplate-derived stem cells; differential adhesion assay

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81101364, 81071498). Corresponding author: Zhou Yue, Tel: 86-23-68755608, E-mail: happyzhou@vip.163.com

[基金项目] 国家自然科学基金(81101364,81071498)
[通信作者] 周 跃,电话:(023)68755608,E-mail:happyzhou@vip.163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130327.1445.003.html(2013-03-27)

椎间盘退变性疾病(intervertebral disc degenerative disease, DDD)临床常见,目前的治疗手段主要包括保守和手术治疗,但都不能从根本上解决椎间盘退变带来的腰腿痛问题,远期效果并不理想[1-2]。随着再生医学的发展,基于干细胞的DDD治疗手段为临床治疗提供了新的思路,目前已有实验和临床研究证实干细胞治疗具有明显的优势[3-4]。胚胎干细胞因伦理问题等因素受到明显制约,而成体干细胞的来源有限,其在原代细胞中含量极低,约十万分之一,通过组织的原代细胞筛选获得较高浓度的干细胞变得尤为重要。临床研究中应用最多的是间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs),该类细胞缺少特异的细胞表面标记物,不易通过免疫方法筛选和纯化。目前,对于外周MSCs的筛选常采用琼脂糖悬浮培养法,但该方法周期长、效率低、操作极度复杂,严重限制了它的广泛应用。因此,探讨简易、可靠、有效的筛选方法具有重要的意义。纤维连接蛋白(fibronectin,FN)是一种高分子糖蛋白,具有多种生物学功能,能够介导细胞黏附、迁移、增殖及组织形成,而且是细胞与细胞间联结的重要因子[5]。软骨祖细胞广泛地表达FN的传统受体-整联分子α5β1,有研究人员通过FN差别黏附筛选法从表皮和关节软骨分离出干/祖细胞,这些细胞的克隆形成率与β1的表达水平正相关,而终末细胞即无分化能力的细胞β1表达水平极低,而且在一定时期内贴壁非常困难,这为FN差别黏附筛选法筛选MSCs细胞提供了理论和实验依据[6-7]。本课题组前期研究[8-9]通过琼脂糖悬浮培养法从退变的人椎间盘软骨终板中分离出类似于MSCs的干细胞,但琼脂糖悬浮培养法操作复杂,程序繁多,极易污染导致失败,给干细胞的筛选带来了一定的困难。软骨终板也具有软骨特性,因此,本研究通过FN法从软骨终板中分离出软骨终板干细胞,经流式细胞术和向骨、软骨及脂细胞诱导分化以证实FN筛选的目标细胞具有干细胞特性,从而初步建立从大量的临床标本获取软骨终板干细胞的实验模型,以期为后续实验研究及临床应用提供大量的干细胞来源。

1 材料与方法

1.1 软骨终板细胞的分离与原代培养

椎间盘标本取自2011年6月至2012年8月在本科行脊柱融合术的6例患者(包括男性2例,女性4例),其中腰椎间盘突出5例(4例L4/5,1例L5/S1),腰椎滑脱1例(L5/S1),退变椎间盘Thompson分级Ⅱ~Ⅲ级。术前患者签署知情同意书,本研究获医院伦理委员会批准。从椎间盘摘除手术获得的软骨终板标本,在无菌状态下置无菌操作台,用含100 U/mL双抗的PBS液冲洗直至组织无血迹及杂质,在眼科显微镜下修剪去掉残留的纤维环和白色棉絮状的髓核组织,剩下透明状的软骨终板,将其剪成约1 mm×1 mm×1 mm大小组织块,将剪碎的标本转移入罗口烧瓶,加入5倍体积含0.020% Ⅱ型胶原酶(Sigma公司)无血清培养基,拧紧盖口并以封口膜封口,室温下置于摇床以120 r/min震荡2 h,再置37 ℃、5% CO_2培养箱6 h,以200目不锈钢滤网过滤,虑液1 000 r/min离心5 min,弃上清液,加入约3 mL含100 U/mL双抗的10% DMEM/F12(HyClone公司)合成培养基洗涤细胞2次,收集细胞再以合成培养基制作细胞悬液,种植于50 mL的培养瓶(Corning公司)中,在37 ℃、5% CO_2、95%湿度条件的孵箱中培养,倒置相差显微镜下观察生长情况,每3天换液1次,细胞达90%融合后,0.25%胰蛋白酶(含0.02% EDTA,HyClone公司)消化传代。

1.2 FN筛选软骨终板干细胞

以1 mL 10 μg/mL含1 mmol/L $CaCl_2$和1 mmol/L $MgCl_2$的FN(Sigma公司)包被培养瓶24 h,培养瓶使用前以PBS(含1%血清)封闭。将培养扩增至第2代增殖较快的软骨终板细胞用PBS液轻轻漂洗2遍,0.25%胰蛋白酶(含0.02% EDTA)消化,将细胞悬液移致离心管,以1 000 r/min离心5 min,PBS漂洗细胞1次,弃上清,再以合成培养基制成细胞悬液,移入第1个培养瓶,20 min后将未贴壁的细胞悬液全部移至第2个培养瓶,40 min后将第2个培养瓶未贴壁的细胞及悬液移至第3个培养瓶,1 h后将第3瓶未贴壁的细胞及悬液移至第4个培养瓶。第1、2、3个培养瓶在移走未贴壁的细胞及悬液后立即添加2 mL新鲜的合成培养基,4个含细胞的培养瓶依次标上时间序号T1、T2、T3、T4,置37 ℃、5% CO_2、95%湿度条件的孵箱中培养,倒置相差显微镜下观察生长情况,每3天换液1次。

1.3 流式细胞仪检测细胞表面标志物

经FN筛选的软骨终板干细胞扩增至80%时,取FN筛选时标记T2和T3且增殖较好的干细胞克隆,PBS液漂洗细胞2次,0.25%胰蛋白酶(含0.02% EDTA)消化,将细胞悬液移至离心管,以1 000 r/min离心5 min,弃上清,收集细胞沉淀,PBS洗涤2次,细胞计数后,制成10^6/mL的细胞悬液,分装于EP管,每管200 μL,分别加入FITC标记的鼠抗人单克隆体Fitc-CD34、Fitc-CD45、Fitc-CD73、Fitc-CD105、Fitc-CD90 10 μL,并设立FITC同行对照组。37 ℃避光孵育30 min,离心弃上清,PBS漂洗,再离心弃上清,加入200 μL PBS上机检测。

1.4 软骨终板干细胞成骨、成软骨及成脂分化

1.4.1 成骨诱导分化 收集筛选后生长良好的软骨终板干细胞,0.25%胰蛋白酶(含0.02% EDTA)消化,收集细胞悬液,离心弃上清,PBS液漂洗细胞团2遍,以合成培养基将细胞制成细胞悬液,转移至12孔板。第2天换成成骨诱导液(Gibco公司),每3天换液1次,诱导12 d,吸弃诱导液,PBS漂洗培养孔2遍,4%多聚甲醛-戊二醛液固定1 h,茜素红染色10 min,PBS液轻轻漂洗2遍,显微镜下观察拍照。

1.4.2 成软骨诱导分化 将来源于同一细胞集落扩增的软骨终板干细胞,0.25%胰蛋白酶(含0.02% EDTA)消化,收集细胞悬液,离心后弃上清,PBS液漂洗细胞团2遍,以合成培养基吹打制成细胞悬液,将3×10^6个细胞悬液移至聚丙烯锥形离心管中,500×g离心5 min,置37 ℃、5% CO_2、95%湿度条件的孵箱中培养,24 h后换成成软骨诱导液(Gibco公司)继续培养,每

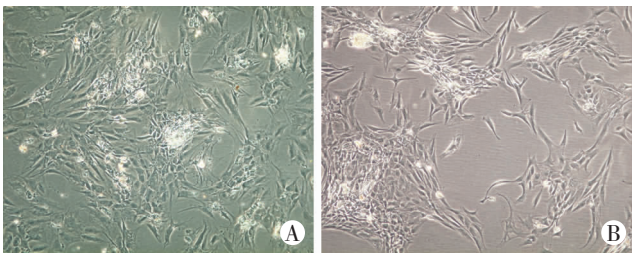
3 天换液 1 次,对照组始终以含 10% 血清的 DMEM/F12 合成培养基培养。诱导 14 d 后,细胞团块 10% 多聚甲醛固定 15 min,系列乙醇脱水,石蜡包埋,切片,阿利新蓝染色,上机观察并拍照。

1.4.3　成脂诱导分化　　将来源于同一细胞集落扩增的软骨终板干细胞,0.25% 胰蛋白酶(含 0.02% EDTA)消化,收集细胞悬液,离心后弃上清,PBS 液漂洗细胞团 2 遍,以合成培养基吹打制成细胞悬液,移至 12 孔板。孔板置 37 ℃、5% CO_2、95% 湿度条件的孵箱中培养,24 h 后换成成脂诱导液(Gibco 公司)继续培养,每 3 天换液 1 次。诱导 21 d 后,10% 多聚甲醛固定 15 min,系列乙醇脱水,石蜡包埋,切片,油红 O 染色,上机观察并拍照。

2　结果

2.1　软骨终板细胞的培养及 FN 筛选

用机械-Ⅱ型胶原酶复合培养法从临床标本中获得原代细胞,4 例标本 3 例培养出原代细胞,1 例失败,无污染情况发生。经培养的软骨终板细胞在干细胞培养基培养下贴壁生长,细胞形态呈三角或多角形,类似于成纤维细胞,细胞核较大,核仁明显,细胞体折光性强,细胞形态并非严格均匀一致,在细胞接近融合的局部区域呈铺路石样外观(图 1A)。FN 差别黏附筛选后,细胞呈克隆性集落生长,成簇性分布,集落细胞数目增殖后,呈放射状、漩涡状外观,单个细胞外观仍呈纺锤状,细胞形态筛选前后无重大改变(图 1B)。



A:筛选前;B:筛选后

图 1　倒置相差显微镜下观察贴壁培养的第 2 代软骨终板细胞生长(×100)

2.2　软骨终板干细胞表面标志物

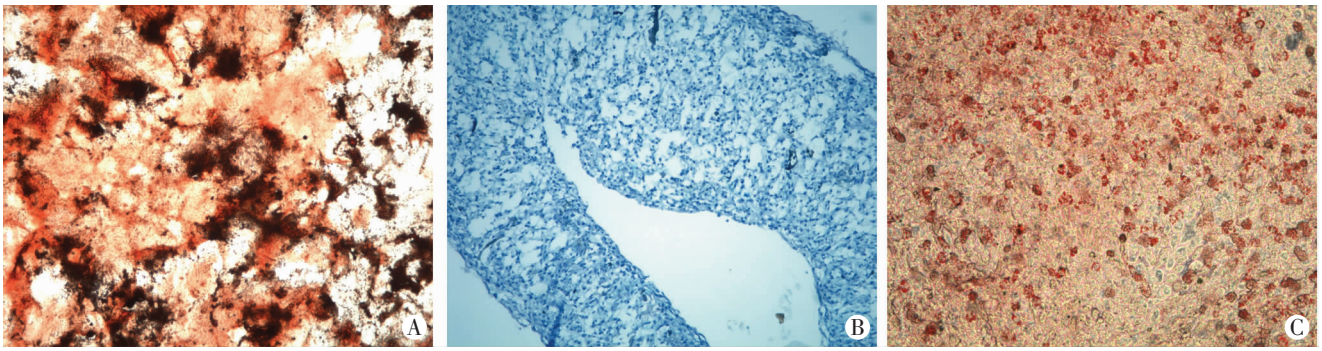
流式细胞术检测结果显示,筛选后的软骨终板干细胞不表达 CD34、CD45,而 CD73、CD90 达到 95%,CD105 则阳性率分别达到 85% 以上。

2.3　成骨、成软骨及成脂分化

经相应诱导液诱导后,对照孔软骨终板干细胞形态变化不明显。诱导孔内细胞形态逐渐变成方形及多角形,细胞体变短,细胞透亮性变差,可见广泛结节状矿化颗粒沉着。茜素红染色显示,对照孔内细胞未见明显着色,实验孔可见广泛存在的橙红色,局部呈红褐色,着色区域内可见大量钙结节,部分结节融合呈小团块状(图 2A)。成软骨诱导实验:经 Pellet 法培养后,细胞团块呈椭圆形,行阿利新蓝染色显示中心局部地方因缺氧细胞自动分离空缺,细胞形态呈圆形或类圆形变化,细胞体蓝染,细胞间亦可见大量蓝染的粘多糖(图 2B)。经脂肪诱导培养液诱导 14 d,相差显微镜下可观察到细胞质内有水滴状的小脂滴出现,诱导接近,脂滴逐渐增大,同时细胞形状有所变化,多边形细胞增多(图 2C)。

3　讨论

干细胞具有普通细胞无法比拟的优越性,如免疫逃逸及较普通细胞能产生更多的细胞外基质等[10-11],干细胞治疗成为临床治疗手段中具有希望和前途的治疗方法之一[12-15]。干细胞来源的选择有胚胎干细胞、骨髓间充质干细胞及全身多种多组织来源的成体干细胞。相对于胚胎干细胞,以 MSCs 为代表的大量成体干细胞在来源和应用上具有一定的优势,如可以大量获取,又能避免伦理问题。目前,已有外周成体干细胞被成功分离,并进行了大量的生物学探讨,不少已经进行临床应用的前期实验,甚至已经应用于临床实验并显示出良好的效果。然而,干/祖细胞在组织标本中的含量极低,如不进行筛选,从组织标本中获取的细胞是多种分化细胞的集合体,如何能快速、可靠获得高纯度的干/祖细胞成为成体干细胞应用的难题,解决这一困难为科学实验和临床应用提供充足的干/祖细胞,具有重要的现实意义。



A:向骨细胞分化(茜素红染色);B:向软骨细胞分化(阿利新蓝染色);C:向脂肪细胞分化(油红 O 染色)

图 2　软骨终板干细胞向骨、软骨、脂肪细胞分化　(×100)

近年已有不少实验研究报道在不同组织细胞中筛选干细胞的方法。Jones 等[7]通过 FN 进行差别黏附筛选得到的人表皮干细胞纯度达到 90% 以上，Dowthwaite 等[6]也通过此方法从牛关节软骨表面分离和纯化出较高纯度的软骨祖细胞，提示 FN 可以被用于 MSCs 的筛选。软骨终板干细胞同 BM-MSCs 属间充质，表达多种细胞表面标记。国际细胞治疗协会（International Society for Cellular Therapy, ISCT）对 MSCs 的最低标准：①贴壁生长；②能向骨、软骨和脂肪细胞分化；③标志物 CD105、CD73 及 CD90 阳性率 > 95%，CD34 及 CD45 阳性表达率 < 2%[16]。本课题组前期研究[8-9]通过经典的琼脂糖悬浮培养法获得软骨终板细胞克隆，扩增后行流式细胞术检测，CD105 阳性率为 82%，CD73 阳性率为 96.10%，CD90 阳性率为 98.01%，CD34 阳性率为 0.56%，CD45 阳性率为 0.67%。本实验采用 FN 差别黏附法筛选软骨终板细胞得到的软骨终板干细胞相对于琼脂糖法，CD105 阳性表达率略有增加，其他无明显差异，所检测的表面标志物结果基本符合间充质干细胞定义的标准。CD105 的表达略高于 85% 而少于 95%，可能与以下几点有关：①分离培养取自退变的椎间盘，然而其中有些细胞受到外界环境等因素的刺激，已经分化成纤维软骨、骨样组织、神经和血管等组织[17]；②分离标本操作过程中时可能混有其他组织，使细胞本身的纯度下降；③消化传代等操作中，消化时间不均匀，部分细胞受损导致表型发生轻微变化。

本实验通过机械-酶复合法获取软骨终板细胞，经体外扩增至第 2 代，运用 FN 差别黏附法筛选获得的干细胞克隆，经流式细胞仪检测，其表达基本符合 ISCT 对间充质干细胞的定义，而且在体外的分化试验中体现了具有较强的向骨、软骨及脂肪三系的分化能力。此外，相对琼脂糖悬浮培养法筛选法所得的细胞[8-9]，FN 筛选法同样能达到筛选的效果。因此，FN 差别黏附法能够有效筛选软骨终板干细胞，获得较高纯度的干细胞，可以为以后的实验研究乃至临床应用打下了良好的细胞学基础。而 FN 筛选所获干细胞群的相关生物学性能及其相关机制的研究，还有待进一步探讨。

参考文献：

[1] 孟壮志，朱青安，范真，等. 腰骶部椎间盘髓核摘除对脊柱稳定性影响的生物力学研究[J]. 中国临床解剖学杂志，1999，17(1)：75－76.

[2] 王海，熊承杰，黄博，等. 椎间盘组织工程学种子细胞来源的研究进展[J]. 中国脊柱脊髓杂志，2012，22(1)：77－81.

[3] Orozco L, Soler R, Morera C, *et al*. Intervertebral disc repair by autologous mesenchymal bone marrow cells: a pilot study[J]. Transplantation, 2011, 92(7): 822－828.

[4] Yoshikawa T, Ueda Y, Miyazaki K, *et al*. Disc regeneration therapy using marrow mesenchymal cell transplantation: a report of two case studies[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2010, 35(11): E475－E480.

[5] Hynes R O, Yamada K M. Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins[J]. J Cell Biol, 1982, 95(2 Pt 1): 369－377.

[6] Dowthwaite G P, Bishop J C, Redman S N, *et al*. The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population[J]. J Cell Sci, 2004, 117(Pt 6): 889－897.

[7] Jones P H, Watt F M. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression[J]. Cell, 1993, 73(4): 713－724.

[8] Huang B, Liu L T, Li C Q, *et al*. Study to determine the presence of progenitor cells in the degenerated human cartilage endplates[J]. Eur Spine J, 2012, 21(4): 613－622.

[9] Liu L T, Huang B, Li C Q, *et al*. Characteristics of stem cells derived from the degenerated human intervertebral disc cartilage endplate[J]. PLoS One, 2011, 6(10): e26285.

[10] Horwitz E M, Prockop D J, Fitzpatrick L A, *et al*. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta[J]. Nat Med, 1999, 5(3): 309－313.

[11] Sakai D, Mochida J, Yamamoto Y, *et al*. Transplantation of mesenchymal stem cells embedded in Atelocollagen gel to the intervertebral disc: a potential therapeutic model for disc degeneration[J]. Biomaterials, 2003, 24(20): 3531－3541.

[12] Henriksson H B, Svanvik T, Jonsson M, *et al*. Transplantation of human mesenchymal stems cells into intervertebral discs in a xenogeneic porcine model[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2009, 34(2): 141－148.

[13] Hiyama A, Mochida J, Sakai D. Stem cell applications in intervertebral disc repair[J]. Cell Mol Biol (Noisy le grand), 2008, 54(1): 24－32.

[14] Hohaus C, Ganey T M, Minkus Y, *et al*. Cell transplantation in lumbar spine disc degeneration disease[J]. Eur Spine J, 2008, 17 Suppl 4: 492－503.

[15] Sobajima S, Vadala G, Shimer A, *et al*. Feasibility of a stem cell therapy for intervertebral disc degeneration[J]. Spine J, 2008, 8(6): 888－896.

[16] Dominici M, Le-Blanc K, Mueller I, *et al*. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement[J]. Cytotherapy, 2006, 8(4): 315－317.

[17] Feng G, Yang X, Shang H, *et al*. Multipotential differentiation of human anulus fibrosus cells: an *in vitro* study[J]. J Bone Joint Surg Am, 2010, 92(3): 675－685.

（**收稿**：2012-11-04；**修回**：2012-12-13）

（编辑　龙　亮）