文章编号:1000-5404(2013)11-1097-05

论著

大鼠跟腱来源肌腱干细胞的分离培养及鉴定

胡 超,唐康来,陈 万,马 林,杨广华 (400038 重庆,第三军医大学西南医院骨科,全军矫形外科中心)

[摘要] **目的** 从大鼠跟腱标本中分离培养肌腱干细胞(tendon stem/progenitor cells,TSCs)并加以鉴定。**方法** 大鼠跟腱经消化后,获取的有核细胞按不同密度在37 ℃,5% CO_2条件下培养,原代为P0代,P1~P3代用于实验研究。观察其克隆形成和增殖能力,用流式细胞仪和免疫组化染色方法对其干细胞标志物予以鉴定,以不同的全成分诱导分化液诱导,观察其多向分化潜能。**结果** 大鼠跟腱来源肌腱干细胞具有克隆生长特性,表面标记物表达为CD44h(+)、CD90(+)、CD34(-)、CD106(-),免疫荧光染色显示SSEA4、Nucleostemin及Ⅰ型胶原蛋白表达均为阳性。经诱导后能够向成骨、成脂肪、成软骨多向分化。**结论** 大鼠跟腱来源肌腱干细胞具有干细胞特性,不同条件下可能向不同方向分化。

[关键词] 跟腱;肌腱干细胞;分离;鉴定;大鼠
[中图法分类号] R322.73; R329-33; R329.2 [文献标志码] A

Isolation and identification of tendon stem cells from rat Achilles's tendon

Hu Chao, Tang Kanglai, Chen Wan, Ma Lin, Yang Guanghua (Department of Orthopedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To isolation and identify tendon stem cells from rat Achilles's tendon. **Methods** Nucleated cells isolated from rat Achilles's tendon tissues after collagenase digestion were plated at different cell densities and cultured at 37 ℃, 5% CO_2. These cells were at passage 0 (P0), and then the cells from passages 1-3 (P1-P3) were used for the following experiments. Cell proliferation assay and colony assay were used to observe the self-renewal and proliferative potential of the obtained cells. Immunocytochemical staining and flow cytometry were employed to detect the expression of stem cell markers and lineage-specific markers. Osteogenic, chondrogenic, and adipogenic multi-differentiation potentials were observed by cultured in different medium. **Results** These cells were CD44h(+), CD90(+), CD34(-), and CD106(-) indicated that they shared some common properties with mesenchymal stem cells. They also exhibited their unique characteristics by expressing tenogenic and stem cell markers SSEA4, nucleostemin, anti-Collagen Ⅰ, but not expressing CollagenⅢ. The cells also had osteogenic, chondrogenic, and adipogenic differentiation potentials by cultured in different conditions. **Conclusion** Tendon-derived stem cells with multi-differentiation potentials are successfully isolated from rat Achilles's tendon under the optimized growth and differentiation conditions.

[**Key words**] Achilles's tendon; tendon stem cells; isolation; identification; rats

Supported by the National Natural Foundation of China (81071464). Corresponding author: Tang Kanglai, E-mail: tangkanglai@hotmail.com

肌腱病(tendinopathy)在高运动量的人群中常见,以局部疼痛、肿胀、功能障碍为临床特征,常见发病部位为肩袖、岗上肌、髌腱及跟腱。目前肌腱病的发病机制尚未完全研究清楚,国内外学者一致认为肌腱内细胞异常增生、细胞外基质的变化是肌腱病发病的基础[1-2]。2007年美国学者从人和兔的肌腱中分离出一种具有自我更新能力的细胞,将其命名为肌腱干细胞或祖细胞(tendon stem/progenitor cells, TSCs)[3]。2010年香港学者从鼠肌腱中也分离出肌腱干细胞[4]。该细胞具有多向分化潜能,并且在外源性前列腺素E_2作用下异常分化。有学者提出肌腱干细胞的异常分化可能是肌腱病的发病基础[5]。目前肌腱干细胞相关研究在国内尚少见报道,大鼠是肌腱病研究常用的一种动物模型,因此我们对大鼠跟腱来源肌腱干细胞予以提取及鉴定,旨在为"肌腱干细胞-肌腱病-治疗"的进一步研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 大鼠跟腱来源肌腱干细胞分离及培养

取8周龄SD大鼠,雄性,体质量200~250 g(由第三军医大学实验动物中心提供)。腹腔麻醉后,取出大鼠双侧跟腱,剔除腱鞘及腱周部分以防被血管及软骨污染,将肌腱均匀剪碎成1 mm×1 mm大小,每100毫克组织用加入含3 mg/mL Ⅰ型胶原酶(Sigma公司)和4 mg/mL中性蛋白酶(Roche公司)的PBS,37 ℃孵箱消化1 h。中止消化后,连同可能未消化完全的肌腱残留组织直接种于细胞培养瓶中,加入含100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素(碧云天)及10%胎牛血清(Gibco公司)的DMEM(Hy-

[基金项目] 国家自然科学基金(81071464)
[通信作者] 唐康来,E-mail:tangkanglai@hotmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130321.1105.020.html(2013-03-21)

Clone公司)培养基,置于37 ℃、5% CO_2的温箱中孵育。24 h后,残留的肌腱组织用滴管接种于新的细胞培养瓶中,继续培养8~10 d(换液周期为3 d/次),可以观察到肌腱干细胞集落形成。原代细胞为P0代,细胞扩增后,取P2~P3代用于相关实验。

1.2 观察克隆形成

取P1代肌腱来源细胞按照50、500、5 000、50 000/cm^2接种到6孔的培养板中,每个接种密度接种3个平行组。将培养皿置入CO_2孵箱,在37 ℃、5% CO_2及饱和湿度环境下静止培养10 d,每3天换液。待细胞克隆形成后,用龙胆紫(Sigma公司)染色,观察细胞克隆。

1.3 细胞增殖能力检测

取P1代跟腱来源干细胞按照200、500、1 000、2 000/cm^2接种于24孔板中,每个密度接种3个平行组,接种后置于37 ℃、5% CO_2的孵箱内培养。在预定的时间点2、4、6、8、10、12 d分别予以消化后,制成细胞悬液,予以流式细胞计数,取平均值,作为细胞基数。根据各时间点所测得的细胞增殖倍数,绘制肌腱干细胞生长曲线。

1.4 大鼠肌腱干细胞鉴定

1.4.1 不同标记物免疫荧光鉴定 取P1代细胞,消化后接种于24孔板中。待细胞贴壁后,吸去细胞培养液,尽量吸干;用PBS冲洗后,用4%多聚甲醛固定30 min,0.01 mol/L PBS/0.5% Triton X-100(Sigma公司)通透30 min;分别用一抗、二抗(博奥森,anti-Collagen Ⅰ/RBITC,anti-Collagen Ⅲ/RBITC,Nucleostemin/RBITC,anti-SSEA4/FITC)孵育;用Heochst33342(碧云天)染核;于激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

1.4.2 表面标记物流式细胞仪鉴定 为了证实所获取的肌腱来源细胞为干细胞,采用流式细胞分析仪对干细胞表面抗原进行分析。收集约2×10^6个P3代细胞,1 500 r/min离心4 min后弃去上清;Buffer液重悬,吸取100 μL细胞悬液(约3.0×10^5个细胞)加入Ep管内,按量加入抗体CD90、CD44h、CD106、CD11b(Biolegend公司),避光孵育30 min。1 500 r/min离心4 min后弃去上清。每样品管加入300 μL Buffer溶液重悬,上机检测。

1.5 大鼠肌腱干细胞多向分化潜能鉴定

1.5.1 成脂肪诱导分化 将细胞按3×10^3个接种于6孔板中,加入2 mL/孔的间充质干细胞诱导分化完全培养基A液(广州赛业RASMX-90031),3 d换液,换用诱导培养基B液,作用24 h,再更换为A液。重复该过程3次后,再维持A液诱导7 d。诱导完成后,吸除培养基,PBS冲洗后,加10%中性甲醛(Sigma公司)固定30 min,PBS冲洗2遍后,油红予以染色,观察成脂情况。

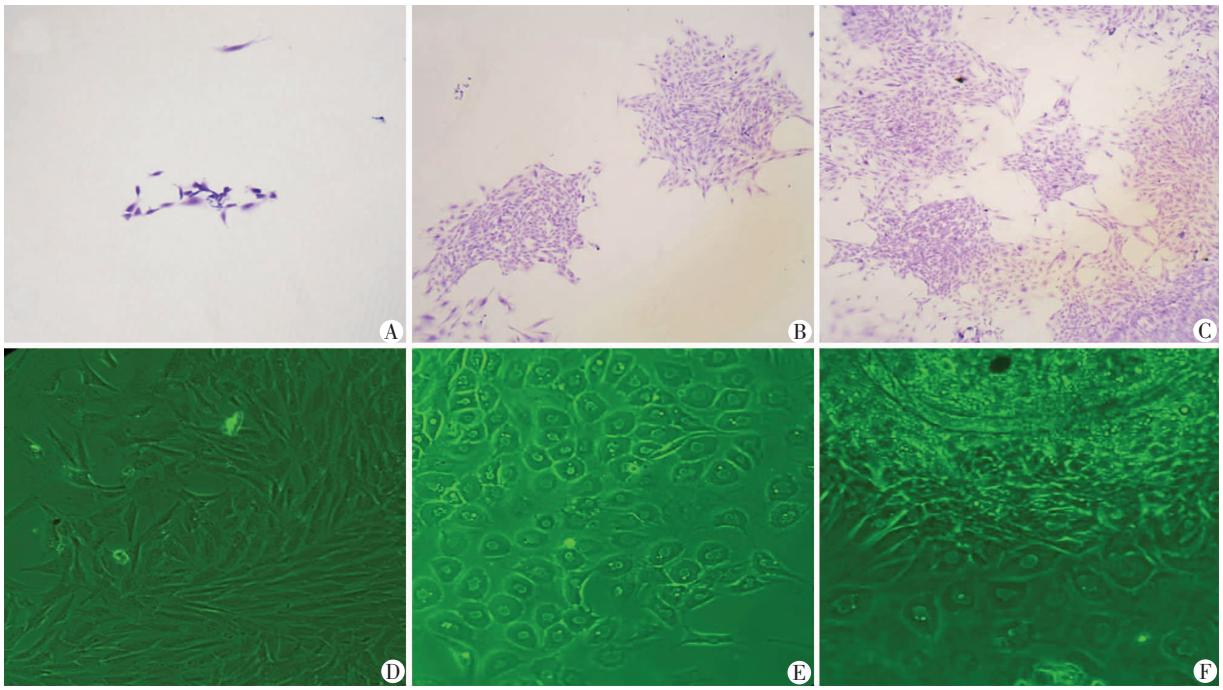
1.5.2 成骨诱导分化 取P2代TSCs进行诱导,待细胞达到80%~90%融合时,消化。将细胞按3×10^3个接种于6孔板,加入2 mL/孔的间充质干细胞诱导分化完全培养基(广州赛业RASMX-90021)每3天换液,诱导2~3周。诱导完成后,吸除培养基,PBS冲洗后,加10%中性甲醛固定30 min,PBS冲洗2遍后,茜素红予以染色,观察成骨情况。

1.5.3 成软骨诱导分化 将细胞按1×10^5个细胞置于离心管内离心后,用成软骨完全诱导培养基(广州赛业RASMX-90041)重悬浮,并再次离心制成微细胞球,不去上清,将离心管直接置于37 ℃、5% CO_2培养箱内培养。24 h内严禁扰动细胞球,每2~3天更换培养基,诱导2~3周。诱导完成后,取出细胞球,石蜡包埋后切片,甲苯胺蓝予以染色,观察成软骨情况。

2 结果

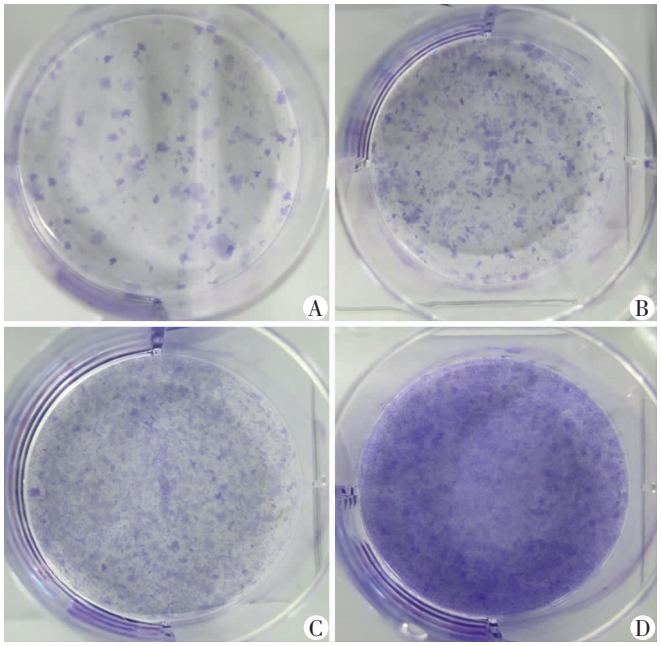
2.1 细胞形态、克隆及增殖能力的观察

未消化完全的肌腱组织周围也有TSCs生长,在显微镜下能够观察到特征性呈鹅卵石样生长的TSCs,在细胞培养7 d后,即可在镜下观察到呈集落样生长的TSCs,而细胞接种密度与细胞集落形成的大小关系明显(图1、2)。在接种后第1天开始,每2天予以细胞计数,并由此获得细胞增殖曲线(图3)。细胞潜伏期为2~4 d,对数增殖期为6~10 d,对数增殖期后至接种后第12天进入平台期。



A、B、C:TSCs P0代培养3、7、12 d时细胞集落(龙胆紫 ×40);D:呈漩涡样生长的TSCs(光学显微镜 ×400);E:细胞融合率高时,TSCs呈特征性鹅卵石样排列(光学显微镜 ×400);F:未完全消化的肌腱组织周围可见鹅卵石样TSCs生长(光学显微镜 ×400)

图1 大鼠跟腱来源肌腱干细胞克隆及形态观察



A～D:接种密度分别为 50、500、5 000、50 000/cm^2

图 2　不同接种密度对细胞克隆形成的影响

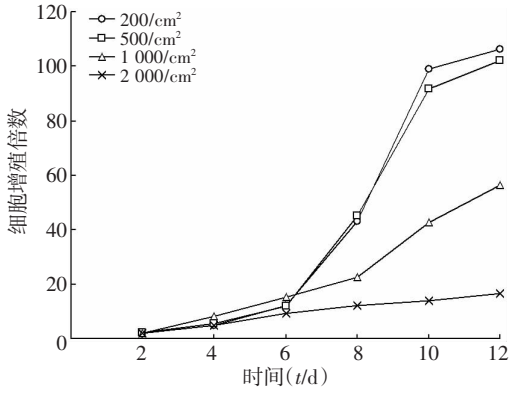


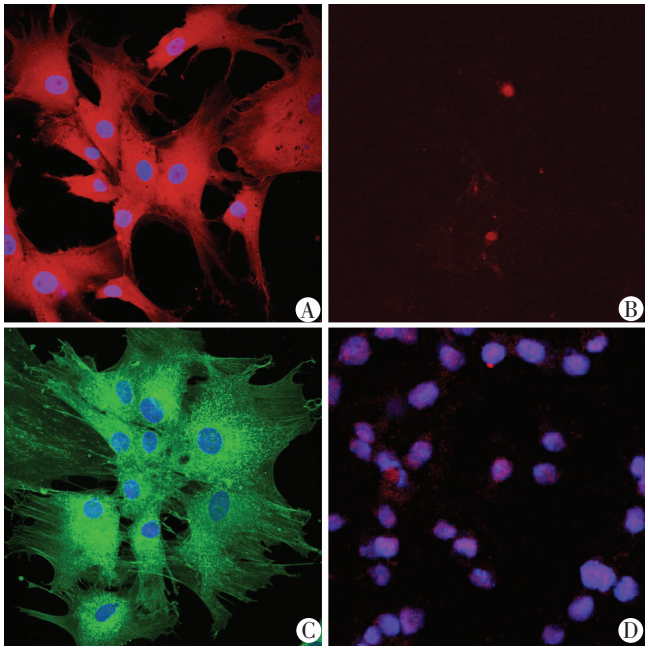
图 3　不同接种密度对细胞生长曲线的影响

2.2　细胞组织来源及干性标志物的鉴定

肌腱干细胞免疫荧光染色鉴定结果显示其Ⅰ型胶原表达呈阳性，Ⅲ型胶原表达呈阴性，阶段特异性胚胎表面抗原-4（SSEA4）、核干细胞因子（Nucleostemin）表达阳性（图 4）。流式细胞方法对细胞表面抗原鉴定的结果进一步显示大鼠跟腱来源干细胞具有明确的干细胞特性（图 5）。超过 99% 和 91% 的细胞干细胞表面标记物 CD90、CD44 呈阳性表达，而 CD34、CD106 呈阴性表达。

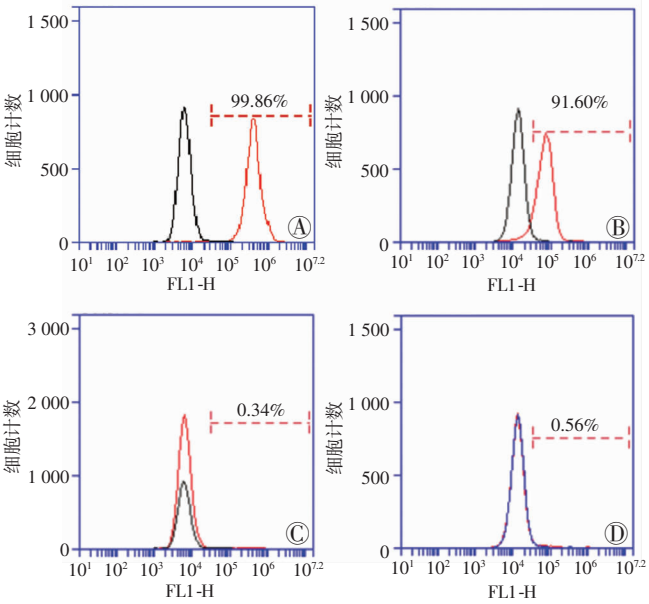
2.3　TSCs 多向分化能力的鉴定

在用成脂培养基诱导 3 周后，成脂趋势明显，光镜下可见细胞内明显脂肪颗粒形成，油红染色可见团块样脂滴形成（图 6A、B）。大鼠跟腱来源干细胞在用间充质干细胞成骨培养基诱导 4 周后，有明显的成骨趋势，茜素红染色可见明显的钙结节形成（图 6C、D）。我们采用细胞团诱导的方法，肌腱干细胞经成软骨诱导 3 周后，可形成质地较硬的软骨样组织，甲苯胺蓝染色后可见蓝染的酸性糖胺聚糖，说明细胞外有软骨基质形成（图 6E、F）。



A:Collagen Ⅰ(+);B:Collagen Ⅲ(−);C:SSEA4(+);D:Nucleostemin(+)

图 4　TSCs 的免疫荧光鉴定

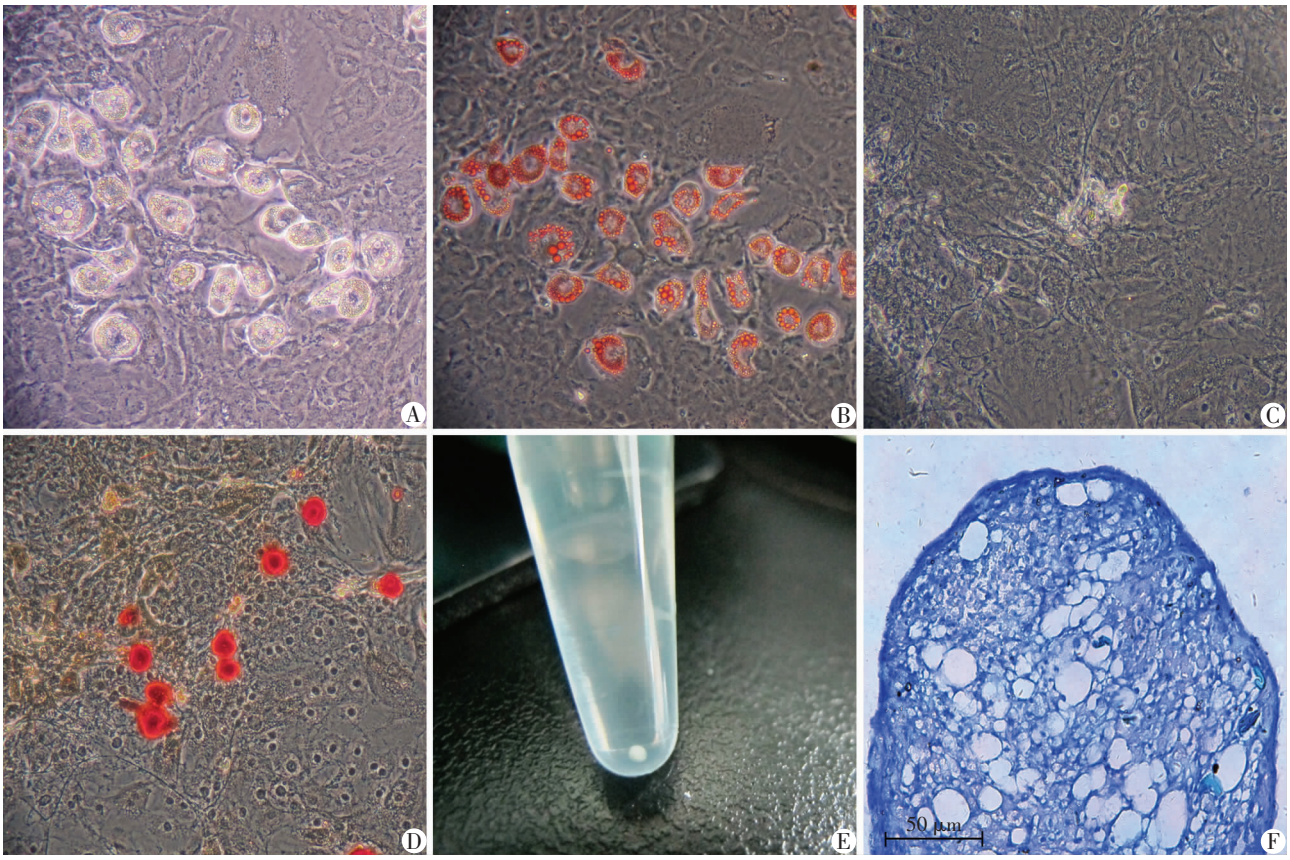


A:CD90(+);B:CD44(+);C:CD34(−);D:CD106(−)

图 5　TSCs 表面干性标记物的流式细胞鉴定

3　讨论

本研究成功从成年大鼠的跟腱中分离并鉴定了肌腱干细胞，虽然国外学者已开展相关研究，但国内实验研究尚少见报道。为获取更多的干细胞，在文献[4]的基础上，我们改进细胞培养的方法，经过消化酶消化后，在未完全消化的微小絮状肌腱纤维周围可能仍附着有一定的 TSCs，直接接种，类似于微组织块培养法。本研究表明，此法相对于原有方法能够更加有效、更多量获取 TSCs，其细胞鉴定结果与相关文献[3－4]无明显差异。



A、B:TSCs 成脂肪诱导后细胞内脂滴及油红染色后形态(×100);C、D:TSCs 成骨诱导钙结节及茜素红染色后形态(×100);E、F:微细胞团法诱导后软骨团块大体观及切片后甲苯胺蓝染色

图6 TSCs 多向分化潜能鉴定

TSCs 在较低的接种密度下,具有更大的增殖潜能,且能形成更大的细胞集落,而在 5 000、50 000/cm^2 接种下的细胞集落形成较小。这可能是由于细胞密度过大,细胞间相互联系紧密、接触抑制造成的。这种特性与骨髓间充质干细胞研究[6-7]结果一致,也符合文献[3-4]肌腱干细胞的报道。当细胞培养超过 10 d,细胞生长进入平台期,可能与细胞融合率过高后,细胞不能充分吸收培养基养分有关。本研究表明,大鼠跟腱来源肌腱干细胞表达干细胞标记物 CD44h 和 CD90,与之前文献报道的人、小鼠及兔来源干细胞一致[3-4],与 BMSCs 表面标记物相似[8-9]。而 CD11、CD106 的表达呈阴性,表明我们的培养方法提取的 TSCs 非血液细胞来源[10],且未受其污染。胶原蛋白是肌腱的主要基质成分,Ⅰ型胶原纤维较粗,占肌腱整体胶原含量的 95% 以上,和肌腱功能一致;而Ⅲ型胶原纤维较细,占肌腱胶原含量 5% 左右,可能和肌腱修复有关[11]。本研究中 P1 代 TSCs Ⅰ型胶原表达阳性,而Ⅲ型胶原表达阴性,表明其来源于肌腱组织;同时,提示 TSCs 在正常情况下参与维持肌腱的正常功能。SSEA4 是一种早期胚胎糖脂抗原,在细胞质内表达,通常作为人未分化多能干细胞和胚泡期分解产物的标志[12],我们的实验结果与之前文献[13]报道的 BMSCs 表达相一致。核干细胞因子仅仅在干细胞的核以及部分肿瘤细胞中表达,而终末细胞是不能表达的[14],我们的实验表明所提取的 TSCs 是具有干细胞特性的,也验证了兔肌腱干细胞的鉴定结果[8]。这两个重要标志物表达阳性,显示 TSCs 具有明确的干细胞特性,与 BMSCs 相似[15-16]。这些细胞表面标记物鉴定结果显示 TSCs 具有增殖及自我更新能力,是具有明确干细胞特性的细胞。

多向诱导分化实验进一步明确了 TSCs 具有多向分化潜能,能够在不同条件下向成脂、成骨、成软骨方向分化。本实验在单层细胞诱导分化中发现在成脂、成骨诱导时,在局部钙结节沉积和脂肪堆积后,细胞围绕其呈堆积样生长(图 6A ~ D);而成软骨诱导时,能够形成软骨质地的细胞团块。而肌腱病中往往以钙盐沉积、脂肪变性为主要病理特征[1,17],肌腱干细胞在病理状态下的特征,与肌腱病的病理特征相符。因此,我们推测肌腱干细胞在一定的病理机制下的异常分化,是引起肌腱病的重要原因。同时,在病理因素未消除

的情况下,早期钙及脂肪沉积能够进一步加重肌腱病的进程。其机制仍有待进一步实验研究。

大鼠跟腱来源肌腱干细胞培养及鉴定成功,为肌腱病的进一步研究奠定基础。TSCs具有自我更新和多向分化潜能,能够为研究不同致病因素和保护因素对其影响奠定研究基础,为了解肌腱病的致病机制及临床治疗提供进一步研究方向。

参考文献:

[1] Lian O, Scott A, Engebretsen L, *et al*. Excessive apoptosis in patellar tendinopathy in athletes[J]. Am J Sports Med, 2007, 35(4): 605-611.

[2] Arnoczky S P, Lavagnino M, Egerbacher M, *et al*. Matrix metalloproteinase inhibitors prevent a decrease in the mechanical properties of stress-deprived tendons: an in vitro experimental study[J]. Am J Sports Med, 2007, 35(5): 763-769.

[3] Bi Y, Ehirchiou D, Kilts T M, *et al*. Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche[J]. Nat Med, 2007, 13(10): 1219-1227.

[4] Rui Y F, Lui P P, Li G, *et al*. Isolation and characterization of multipotent rat tendon-derived stem cells[J]. Tissue Eng Part A, 2010, 16(5): 1549-1558.

[5] Rui Y F, Lui P P, Chan L S, *et al*. Does erroneous differentiation of tendon-derived stem cells contribute to the pathogenesis of calcifying tendinopathy?[J]. Chin Med J (Engl), 2011, 124(4): 606-610.

[6] Colter D C, Class R, DiGirolamo C M, *et al*. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(7): 3213-3218.

[7] Dezawa M, Ishikawa H, Itokazu Y, *et al*. Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration[J]. Science, 2005, 309(5732): 314-317.

[8] Zhang J, Wang J H. Characterization of differential properties of rabbit tendon stem cells and tenocytes[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2010, 11: 10.

[9] Shukunami C, Takimoto A, Oro M, *et al*. Scleraxis positively regulates the expression of tenomodulin, a differentiation marker of tenocytes[J]. Dev Biol, 2006, 298(1): 234-247.

[10] Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, *et al*. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle[J]. Cell Tissue Res, 2007, 327(3): 449-462.

[11] Wang J H. Mechanobiology of tendon[J]. J Biomech, 2006, 39(9): 1563-1582.

[12] Brimble S N, Sherrer E S, Uhl E W, *et al*. The cell surface glycosphingolipids SSEA-3 and SSEA-4 are not essential for human ESC pluripotency[J]. Stem Cells, 2007, 25(1): 54-62.

[13] Gang E J, Bosnakovski D, Figueiredo C A, *et al*. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow[J]. Blood, 2007, 109(4): 1743-1751.

[14] Beekman C, Nichane M, De-Clercq S, *et al*. Evolutionarily conserved role of nucleostemin: controlling proliferation of stem/progenitor cells during early vertebrate development[J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(24): 9291-9301.

[15] Lui P P, Chan L S, Cheuk Y C, *et al*. Expression of bone morphogenetic protein-2 in the chondrogenic and ossifying sites of calcific tendinopathy and traumatic tendon injury rat models[J]. J Orthop Surg Res, 2009, 4: 27.

[16] Speer M Y, Yang H Y, Brabb T, *et al*. Smooth muscle cells give rise to osteochondrogenic precursors and chondrocytes in calcifying arteries[J]. Circ Res, 2009, 104(6): 733-741.

[17] Fredberg U, Stengaard-Pedersen K. Chronic tendinopathy tissue pathology, pain mechanisms, and etiology with a special focus on inflammation[J]. Scand J Med Sci Sports, 2008, 18(1): 3-15.

(**收稿**:2012-12-26;**修回**:2013-03-01)

(编辑 龙 亮)

统计学处理时应用直线相关与回归的注意事项

1.作直线相关与回归分析的两个变量要有实际意义,不要把毫无关联的两个事物或现象作相关、回归分析。

2.正确理解直线相关和回归分析的关系和区别。相关表示两变量间的相关关系;回归表示应变量Y随自变量X变化而变化的依存关系,两变量间存在因果关系。如果两变量间有因果关系,可作直线相关与回归分析,如健康成人血液凝固时间与血液凝血酶浓度;如果两变量间无因果关系,只作相关分析,如人的身高与前臂长度。两变量间有相关关系,不一定是因果关系,可能是伴随关系;但若是因果关系,必然有相关关系。

3.在进行回归和相关分析之前,建议先绘制散点图,观察是否呈直线趋势,如果散点图呈直线趋势,可考虑做直线回归或相关分析。如果散点图呈曲线趋势,则应进行曲线拟合。

本刊编辑部