

鹿茸干细胞成骨诱导（微粒体）培养体系的建立

孙红梅 杨福合 邢秀梅 刘琳玲 李春义**

（中国农业科学院特产研究所吉林省特种经济动物分子生物学省部共建实验室 特种经济动物种质资源遗传改良重点开放实验室 吉林 132109）

Establishment of micromass culture system for antler stem cell induction toward osteoblast differentiation in vitros

SUN Hong-mei YANG Fu-he XING Xiu-mei LIU Lin-ling LI Chun-yi**

（Institute of Special wild Economic Animal and Plant Science CAAS, Jilin 132019）

摘要：为了解决活体实验周期长、耗资大，对动物损伤大等问题，本研究利用在培养液中加入 TGF- β 1、地塞米松、抗坏血酸、 β -磷酸甘油等对鹿茸再生干细胞进行了体外诱导，成功建立了一种鹿茸干细胞体外诱导成骨的培养体系，模拟鹿茸软骨内骨化的生长过程。为鹿茸生物学、再生、骨化等领域研究提供有效的研究手段。

关键词：鹿茸干细胞；成骨；微粒体培养；

鹿茸是鹿科动物头盖骨上的附属性骨质器官，它不仅具有很高的药用价值，而且，因为其每年能够脱落并完全再生一次，生长极其迅速，骨组织分化过程很详细等特点引起了许多研究者的重视，使之成为难得的再生医学、骨组织骨化等的研究模型。研究表明，鹿茸的发生及再生是基于干细胞的过程，这些干细胞位于生茸区及角柄的骨膜中，被称为鹿茸再生的干细胞。为了研究鹿茸再生、生长、骨化等过程的机理，解决活体实验周期长、耗资大，对动物损伤大等问题，本研究建立了一种鹿茸再生干细胞体外诱导成骨的培养体系，模拟鹿茸软骨内骨化的生长过程。为鹿茸生物学、再生医学以及长骨骨化等领域的研究提供有效的研究手段。许多学者已经进行了脂肪源干细胞、骨髓基质细胞等的诱导分化研究

1 材料方法

1.1 实验材料

3 岁龄梅花鹿一头，来源于中国农业科学院特产研究所实验动物基地茸鹿养殖场。

青霉素、链霉素购于 Sigma 公司；地塞米松购于日本光和本药；DMEM 培养基、标准胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶、胶原酶 I (collagenase I)、谷氨酰胺、hepes 等购于 invitrogen 公司；抗坏血酸、二甲基亚砜(DMSO)购于 Sigma 公司；甘油磷酸钠购于北京经科宏达；TGF- β 1 购于 Peprotech 公司；其他化学试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 鹿茸再生干细胞的原代培养

将刚处死的梅花鹿的鹿头带回实验室,刮净角柄及其周围的毛,用碘酒进行皮肤消毒(图 1),然后用酒精棉球脱碘,消毒好后在无菌室无菌取出角柄骨膜(图 2),将角柄骨膜剪成 1 立方毫米大的组织块,然后用 100 单位的 I 型胶原酶 37℃ 进行消化,当组织块周围出现毛边时,离心去除消化液,用 DMEM 清洗一次,然后接种到细胞培养瓶中 37℃、5%CO₂ 及饱和湿度条件下培养 5~7 天,待细胞生长至 80%融合时用 0.08%胰酶消化,传代,备用。

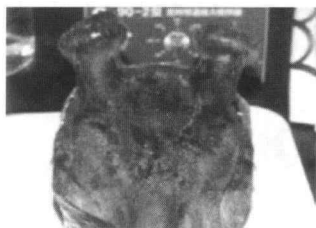


图 1 梅花鹿角柄
Fig 1 Pedicles of a sika

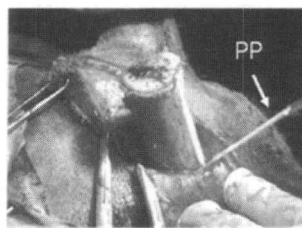


图 2 角柄骨膜取出
Fig 2 Sampling of pedicle periosteum

1.2.2 鹿茸再生干细胞的微粒体培养

取生长至 80%~90%的传代细胞,用胰酶消化,计数,将含有 1×10^7 个单细胞的细胞悬液转移至 50 毫升离心管中,1000 转、离心 5 分钟,完全去除上清液。加入 100 微升 DMEM 培养基重悬细胞,将细胞悬液加到六孔细胞培养板的中央,在其周围分散滴加大约 200 微升完全培养基,5% CO₂、37℃ 细胞培养箱孵育 3 小时。然后,缓慢加入 2 毫升 软骨诱导培养基(DMEM 含 10%FBS、双抗、 10^{-7} M 地塞米松、 2.5×10^{-4} 摩抗坏血酸、10 纳克/毫升 TGF- β 1) 每隔 3~4 天 换一次培养基。3 周后,更换骨化诱导培养基(DMEM 含 10%FBS、双抗、 10^{-7} M 地塞米松、 2.5×10^{-4} 摩抗坏血酸、 7×10^{-3} β -甘油磷酸钠)继续培养 2~3 周。

1.2.3 双重染色

阿尔氏申蓝可以将软骨染成蓝色,茜素红可以将骨染成红色,因此本实验用二者进行双重染色,以检验培养的微粒体的成骨情况。

染色液的配制:0.3%阿尔氏申蓝(Phentex Corp. USA) 70 %乙醇溶液,0.1%茜素红(Fluka) 95 %乙醇溶液、冰醋酸,各一份依次溶于 17 份 70%乙醇中,混匀。

取出培养 5 周左右的微粒体组织块,用 95%的乙醇固定 1 天左右,用自来水洗后,放入染色液,37℃,2 天。

分色与透明:蒸馏水浸洗片刻,0.5%KOH,30 分钟,当骨呈玫瑰红色时,将其依次浸入不同比例的纯甘油与 0.5%KOH 溶液中,标本沉底为止,纯甘油中长期保存。

1.2.4 切片制作

取出微粒体,以 PBS 洗一次;中性福尔马林固定。经过脱水、透明、浸蜡、包埋后,将其切成 4 微米的切片,60℃ 烘干。

1.2.5 甲苯胺蓝染色

用质量分数 2%的甲苯胺蓝酒精染液染色 5 分钟,并以体积分数 95%的酒精分化片刻,水洗后以体积分数 70%、80%、90%和 100%的酒精逐级脱水,二甲苯透明,树胶封片,显微镜下观察拍照。

1.2.6 茜素红染色

用 0.1%茜素红 Tris-HCl (pH8.3) 37℃ 染色 30 分钟。蒸馏水冲洗,干燥,封片。显微镜下观察。

2 结果

2.1 鹿茸再生干细胞的原代培养

观察培养情况表明:组织块消化法培养的鹿茸干细胞,消化后的组织块均匀飘浮于培养基中,2~3 天后,组织块逐渐粘附于细胞培养瓶底部,5~7 天后观察细胞的生长情况。培养基颜色略黄,组织块四周发散状爬出细胞,在靠近组织块的中央区细胞排列极其紧密,紧密程度依次向四周递减。呈梭状,胞体较大,传代培养后,12~24 小时可完全贴壁,细胞呈较均一的长梭形,3 天左右细胞可铺满整个培养瓶底面,可继续传代扩增。传代后的细胞形态无明显变化,性质稳定(图 3)。

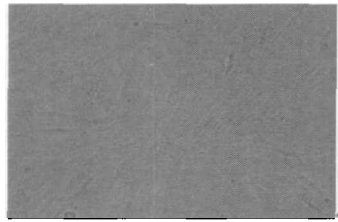


图 3 传代培养的鹿茸再生干细胞。

Fig 3 Subcultured antler stem cells.

2.2 微粒体培养

高浓度细胞重悬液孵育 3 小时后,形成一肉眼可见的白色圆形沉淀圈,在添加诱导培养液后沉淀圈并不浮起或漂移。72 小时后沉淀圈消失,培养基中出现一肉眼可见的白色微球(图 4)。在光学显微镜下该微球表现为黑色的不透明椭圆形沉淀物,原沉淀圈区域细胞消失,仅在其边缘有一环形的残余细胞带。

2.3 染色鉴定

阿尔氏申蓝可以将软骨染成蓝色,茜素红可以将骨染成红色,因此本实验用二者进行双重染色,以检验培养的微粒体的成骨情况。双重染色将培养 5 周的组织块染成红色,没有蓝色(图 5),说明鹿茸角柄骨膜干细胞经过微粒体培养,成骨诱导后形成了骨组织。

甲苯胺蓝是软骨的标志性染剂,培养 21 天的组织切片甲苯胺蓝染色呈蓝色说明该组织有软骨存在(图 6),经过两周成骨诱导后茜素红染色呈玫瑰红色,说明经过成骨诱导后,有骨组织存在(图 7)。

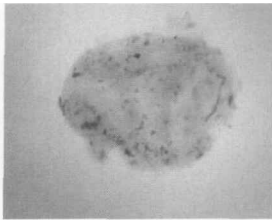


图 5 双重染色的组织块

Fig 5 double staining tissue

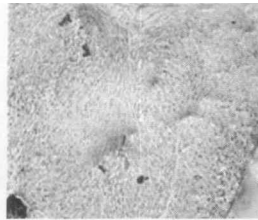


图 6 甲苯胺蓝染色

Fig 6 toluidine blue staining

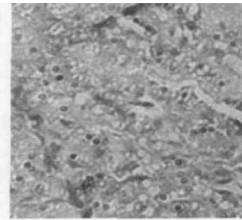


图 7 茜素红染色。

Fig 7 alizarin Bordeaux staining.

3 讨论

鹿茸作为鹿科动物头盖骨上的骨质性附属器官,每年脱落并完全再生一次,再生鹿茸生长极为迅速,最快可达 2 厘米/天,而且,鹿茸的骨质结构分化很细,既有成软骨细胞、成骨细胞又有前成软骨细胞、前成骨细胞的划分,因此为医学领域断肢的再生以及长骨骨化机制的研究提供了很好的模型。

但鹿茸再生的周期较长、直接用鹿茸实验费用较高、对动物损伤较大。我们对鹿茸二十几年的研究表明,鹿茸的发生与再生都是依赖干细胞的过程,这些干细胞位于鹿角柄的骨膜中,因此鹿角柄骨膜的细胞被称为鹿茸再生的干细胞。本研究建立了一套鹿茸再生干细胞体外诱导的微粒体培养体系,可以作为鹿茸研究的体外模型,为鹿茸领域的研究奠定了技术基础。

近年来,微粒体培养体系作为骨髓间充质干细胞体外诱导及软骨内成骨研究的重要手段,受到了许多学者的关注。研究表明,这套体外培养系统可用于人类及其它动物的骨髓间充质干细胞诱导分化的研究,在离体条件下模拟软骨内成骨的过程。此外,Yue Xu 等报道,使用脂肪源性干细胞通过微粒体培养体系也可观察到软骨内成骨的早期分化。

本研究以鹿茸角柄骨膜细胞,即鹿茸再生干细胞,为研究对象,参考前人的方法,针对该细胞的特性进行改动,创立了鹿茸干细胞成骨诱导的培养体系。在培养体系中添加各种因子,对干细胞进行诱导,使其向成骨细胞方向转化。维生素 C 为合成胶原所必需,还可调节 ATP 酶与碱性磷酸酶(ALP)活性及非胶原基质蛋白质的合成。 β -甘油磷酸钠可为成骨细胞功能活动提供磷离子;地塞米松可诱导骨髓基质干细胞向成骨细胞方向转化,对成骨细胞的增殖与分化有明显促进作用。实验表明,鹿茸再生干细胞在特定培养液的作用下,72 小时后,在培养皿中形成了肉眼可见的白色微球,直径可达 3~4 毫米,继续培养 3~5 周后,对组织进行固定、切片、染色等处理,结果表明角柄骨膜干细胞已成功诱导为软骨细胞和成骨细胞。说明,鹿茸再生干细胞作为种子细胞,进行体外诱导成骨分化的微粒体培养体系,模拟鹿茸软骨内骨化的生长过程是可行的。

参考文献

- [1]B Johnstone,T M Hering,A I Caplan,V M Goldberg.In vitro chondrogenesis of bone marrow derived mesenchymal progenitor cell [J].Exp.Cell Res,1995,238:265~272.
- [2]E Otsuka,A Yamaguchi,HShigehisa,et al.Characterization of osteoblastic differentiation of stromal cell line ST2 that is induced by ascorbic acid[J].Am Jphysiol. 1999,277(46):132~138.
- [3]Ichiro Sekiya,Jussi T,Vuoristo,Benjamin L,Larson,and Darwin J,Prockop.In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis[J].PNAS,2002, 99(7):4397~4402.
- [4]Li C, Harris A J, Suttie J M. Tissue Interactions and Antlerogenesis: New Findings Revealed by a enograft Approach [J]. J Exp Zool, 2001, 290: 18~30 .
- [5]Li C, Suttie J M, Clark D E. Clark Morphological Observation of Antler Regeneration in Red Deer (Cervus elaphus) [J]. J Morphol, 2004, 262: 731~740 .
- [6]Li C, Suttie J M, Clark D E. Histological examination of antler regeneration in red deer (Cervus elaphus) [J]. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2005, 282: 163~174.
- [7]Li C, Yang F, Allan S. Adult Stem Cells and Mammalian Epimorphic Regeneration-Insights from Studying Annual Renewal of Deer Antlers [J]. Current Stem Cell Research & Therapy, 2009, 4: 237~251.
- [8]Li C. Development of deer antler model for biomedical research[J]. Recent Adv & Res Updates, 2003, 4: 255~274.
- [9]M Mastrogiacomio,R Cancedda,R Quarto.Effect of ifferent growth factors on the chondrogenic potential of human bone marroe stromal cells[J].Osteoarthritis Cartilage,2001,9:36~40.
- [10]X Yue,G Balooch,M Chiou,et al.Analysis of the material properties of early chondrogenic differentiated adipose derived stromal cell using an in vitro three dimensional micromass culture system[J].Biochemical and Biophysical Research Communications,2007,359(2):311~316.
- [11]欧阳钧,王前,王国黄,等.人骨膜成骨细胞培养及初步观察[J].中华骨科杂志, 1995, 15 (11): 123~126.