

• 基础医学 •

文章编号: 1002 - 0217( 2018) 02 - 0103 - 03

## 大鼠腰椎终板软骨干细胞的分离与鉴定

王 效, 肖 良, 徐宏光, 金中行

( 皖南医学院第一附属医院 弋矶山医院 脊柱外科, 安徽 芜湖 241001)

**【摘要】目的:** 分离大鼠腰椎终板软骨干细胞(EPCSCs) 并鉴定其特性。**方法:** 通过单克隆法从大鼠腰椎终板软骨原代细胞中分离出 EPCSCs, 比较软骨细胞与 EPCSCs 的形态, 成骨、成脂肪及成软骨鉴定其多向分化的能力, 单克隆形成实验检测终板软骨干细胞的单克隆形成能力。**结果:** 单克隆法可以分选出 EPCSCs, 其与原代软骨细胞形态上存在明显不同。经过 12 d 的培养, 单个腰椎终板软骨干细胞可以形成大于 20 个细胞的干细胞团。EPCSCs 具有很强的成骨、成脂肪及成软骨的分化能力。**结论:** 大鼠腰椎终板软骨中存在干细胞, 并具有干细胞特性。

**【关键词】** 腰椎终板软骨; 干细胞; 增殖分化**【中图分类号】** R 681. 5; R 329. 2 **【文献标志码】** A**【DOI】** 10. 3969/j. issn. 1002-0217. 2018. 02. 001

## Isolation, culture and identification of rat lumbar endplate cartilage-derived stem cells

WANG Xiao, XIAO Liang, XU Hongguang, JIN Zhongxing

Department of Spinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, China

**【Abstract】Objective:** To isolate, culture and identify the biological characteristics of stem cells derived from the lumbar endplate cartilage(EPCSCs) of rats. **Methods:** Single antibody-forming cell clone was used to isolate the stem cells from the lumbar endplate cartilage of rats. The morphology was examined between primary chondrocytes and EPCSCs. Then the multidirectional differential potential of EPCSCs was identified through osteogenesis, adipogenesis and chondrogenesis experiment. The single cell colony-forming efficiency of EPCSCs was determined by single cell colony-forming assay. **Results:** EPCSCs were successfully isolated, and distinct from the morphology of primary chondrocytes. In 12-day culturing, single stem cell derived the lumbar endplate cartilage formed into over 20 stem cell clusters. EPCSCs were seen with strong differentiation into osteogenesis, adipogenesis and chondrogenesis. **Conclusion:** EPCSCs are present in the lumbar endplate cartilage and have typical characteristics of stem cells.

**【Key words】** endplate cartilage; stem cells; proliferation, differentiation

椎间盘由上下边界椎体终板、中间由外到内依次是纤维环和髓核组成, 其退变是由负荷、年龄、外伤等多种因素介导的慢性过程, 可以引起椎间隙狭窄、运动阶段失稳、小关节退变, 进而引起神经卡压和刺激, 进一步导致临床上的腰腿痛和下腰痛症状。临床上内科治疗多以理疗为主, 外科手术虽然能解决终末期症状, 但是无法改变脊柱在压力负荷下的退变进程。本文利用干细胞自身生长特点, 采用单克隆法培养出细胞集落, 通过成骨、成脂肪及成软骨的三向诱导, 证明了该集落具有干细胞性质, 为椎间盘退变的治疗提供了新思路。运用干细胞治疗椎间盘退变不仅能维持脊柱正常的受力形态, 而且能大幅度减少手术造成的创伤, 具有巨大的潜力和社会

经济效益。

### 1 材料与方法

1.1 主要材料 0.05% 透明质酸酶, 0.25% EDTA-胰酶(Gibco), 0.2% 二型胶原酶(Sigma), DMEM/F12(Gebico), 干细胞血清(双洙), 地塞米松, 胰岛素, 吡哆美辛,  $\beta$ -磷酸甘油, L-抗坏血酸-2-磷酸酯, 甲基异丁基黄嘌呤(IBMx), 脯氨酸, 丙酮酸钠, 胰岛素-转铁蛋白-亚硒酸混合物, 肿瘤生长因子-b3。油红 O 染色剂, 茜素红染色剂, 甲苯胺蓝染色剂, 10 cm 培养皿。

### 1.2 方法

1.2.1 大鼠腰椎终板软骨原代细胞的获取 取 4

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(81572185); 安徽省自然科学基金项目(1708085MH185); 安徽省科技厅对外科技合作项目(1704e1002229); 芜湖市科技成果转化计划项目(2017cg20)

**收稿日期:** 2017-08-15**作者简介:** 王 效(1989-), 男, 2016 级硕士研究生, (电话) 18602529336, (电子信箱) 1624930217@qq.com;

徐宏光, 男, 主任医师, 教授, 硕士生导师, (电子信箱) pumchxuhg@126.com, 通信作者。

周龄大鼠幼鼠 1 只,给予颈椎脱臼法处死后,全部浸没于 75% 的酒精 10 min,无菌条件下分离大鼠幼鼠腰椎 L<sub>1</sub> ~ L<sub>5</sub>,解剖显微镜下分离终板软骨(图 1),然后将分离到的软骨浸泡在含有双抗的 PBS 中 10 min,取出后 PBS 冲洗 3 次,剪碎至 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小。先加入 0.05% 的透明质酸酶,室温下作用 20 min。1000 r/min 离心 5 min 后弃上清,加入 0.25% EDTA-胰酶,置于 37℃ 温水浴箱中 40 min 后再次离心并弃上清,最后加入 0.2% 二型胶原酶,重新置于水浴箱中消化 5 h 左右,每 30 min 震荡一次以加速消化。待组织完全消化后用 200 目滤网过滤,1500 r/min 离心 5 min,弃上清,重新加入培养基吹打混匀,备用。



图 1 新生 4 周龄大鼠幼鼠的脊柱标本

1.2.2 单克隆法获取腰椎终板软骨干细胞(stem cells derived from the lumbar endplate cartilage, EPC-SCs) 单克隆法已经证实可以获得间充质干细胞<sup>[1]</sup>及人纤维环干细胞<sup>[2]</sup>。是否能成功运用此法提取 EPCSCs 尚未知,故我们按照 50、100、200、300 个/cm<sup>2</sup> 把细胞接种到 10 cm 培养皿中并培养 10 d, PBS 冲洗 1 遍后用 4% 的多聚甲醛固定 30 min,继续用 PBS 冲洗 2 遍后用 0.1% 的结晶紫染色,并计算细胞集簇形成数目。

1.2.3 成骨方向诱导分化 将用单克隆法得到的细胞,用 0.25% EDTA-胰酶消化后,按照 2 × 10<sup>4</sup> 个/孔的密度接种于 24 孔板中,待 24 h 细胞贴壁后,将一般培养基更换为诱导成骨分化的培养基(包含 10% FBS、100 nmol/L 地塞米松、10 mmol/L β-磷酸甘油和 50 μmol/L L-抗坏血酸-2-磷酸酯)。每 3 d 换一次液,连续诱导 2 ~ 3 周后用茜素红染色。

1.2.4 成软骨方向诱导分化 按照 Micromass 法<sup>[3]</sup>进行成软骨方向分化,按照 2 × 10<sup>4</sup> 个/孔的密度接种于 24 孔板中,待细胞融合达 80% 时,加入诱导软骨分化培养基(包含 10% FBS、1% ITS、100 nmol/L 地塞米松、50 mg/L L-抗坏血酸-2-磷酸酯和 10 μg/L 重组人 TGFβ1),每 3 d 换液 1 次,持续诱导 3 周后用甲苯胺蓝染色。

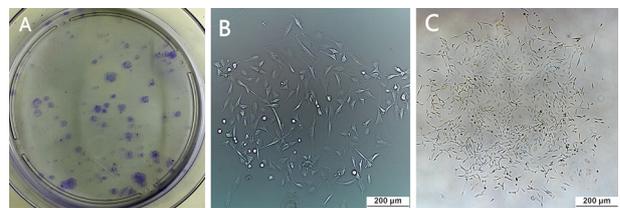
1.2.5 成脂肪方向诱导分化 按照 2 × 10<sup>4</sup> 个/孔的密度接种于 24 孔板中,待细胞融合达 80% ~

90% 时,加入诱导脂肪分化培养基(包含 10% FBS、500 μmol/L 甲基异丁基黄嘌呤、1 μmol/L 地塞米松、60 μmol/L 吡啶美辛和 5 mg/L 胰岛素),诱导 3 d,然后更换为维持脂肪分化培养基(包含 10% FBS、10 mg/L 胰岛素),诱导 1 d,然后再更换为诱导脂肪分化培养基诱导 3 d,如此循环 3 个周期后用油红 O 染色,苏木素复染后镜下观察。在此需注意的是将原代融合 80% ~ 90% 时更利于脂肪诱导分化,2 种不同类型的培养基更换时不要使细胞处于无培养基状态。

1.2.6 单克隆形成能力检测 单克隆形成能力是干细胞的一个重要特性,为了验证经过单克隆法获取的细胞集落是否具有这一性质,将原代获得的细胞集落用酶消化法消化后,按照 100、200、300 个/cm<sup>2</sup> 细胞接种于 10 cm 的培养皿中,一式三份,加入培养基培养 10 ~ 12 d,然后用 0.1% 结晶紫染色,计数肉眼能观察到的细胞集簇。

## 2 结果

2.1 单克隆法提取 EPCSCs 结果显示:当大鼠腰椎终板软骨细胞接种在 10 cm 培养皿后,大部分细胞在 2 ~ 3 d 之内仍保持原来形态,可见极少数细胞贴壁。在单克隆 3 d 后,可见培养皿中有细胞集簇形成,5 d 后,集簇明显,且大体形态呈梭形,细胞排列有序。培养 10 d 后细胞接近融合,此时进行传代培养。结晶紫染色可见细胞集簇,按照大于 20 个/簇的标准计数,发现以 200 个/cm<sup>2</sup> 的密度接种时,细胞集簇形成最多(图 2)。

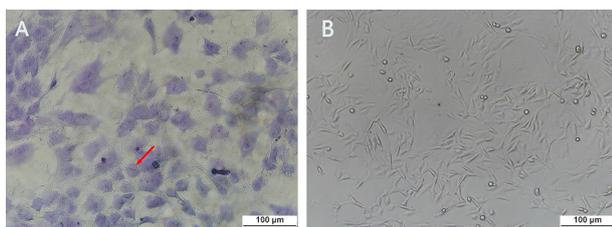


A. 原代细胞经单克隆法培养后形成的细胞集落; B. 3 d 后观察集落形成(400 ×); C. 5 d 后可见明显细胞集落。

图 2 单克隆法提取 EPCSCs

2.2 腰椎终板软骨细胞与干细胞的形态比较 在倒置相差显微镜下,刚接种的软骨细胞呈圆形,培养 24 h 后贴壁,呈圆形或椭圆形,继续培养后呈不规则四角形或者三角形,类似铺路石样。而经过单克隆培养获得的细胞,细胞整体形态较软骨细胞小,多呈椭圆形或梭形,且细胞排列方向一致(图 3)。

2.3 成骨诱导分化 经过 2 ~ 3 周的成骨诱导后,实验组和对照组经过茜素红染色,显微镜下观察发现,经过单克隆培养获得的细胞可以形成钙结节而被染成红色,对照组无钙结节而不着色(图 4)。



A. 软骨细胞正常培养甲苯胺蓝染色(400 ×); B. 细胞集落高倍镜下形态(400 ×)。

图3 成骨诱导分化

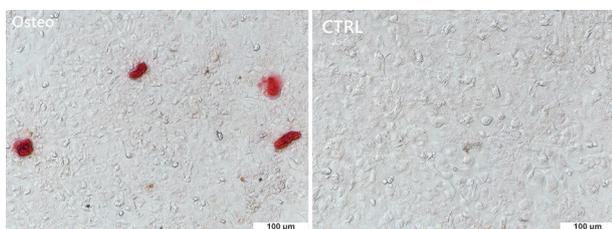
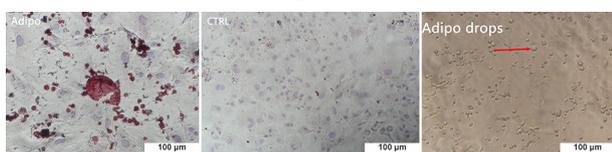


图4 成骨诱导后实验组与对照组经茜素红染色后对比(400 ×)

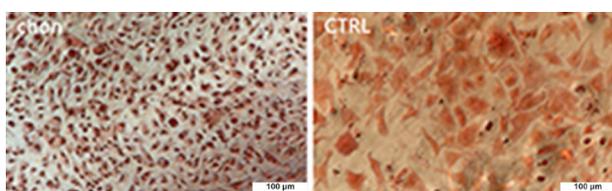
2.4 成脂肪诱导分化 经过 21 d 的成脂肪诱导,显微镜下可以观察到细胞上方出现较明显的脂肪滴,经油红 O 染色后,可见脂肪滴被染成红色,分布在细胞内。对照组无染色(图 5)。



成脂肪诱导后可见脂肪滴形成,油红 O 染色及苏木素复染后镜下对比(400 ×)。

图5 成脂肪诱导分化

2.5 成软骨诱导分化 经过 21 d 成软骨诱导后,实验组被染成深红色,说明有软骨形成,而对照组被染成浅红色(图 6)。



成软骨诱导后,实验组被染成深红色,对照组被染成浅红色(400 ×)。

图6 成软骨诱导分化

2.6 单克隆形成能力检测 将获得的细胞集簇接种于 10 cm 培养皿,培养 12 d,肉眼可见细胞集落形成(图 7)。

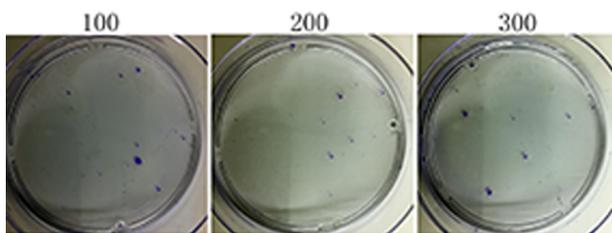


图7 获得的细胞集簇进行单克隆形成能力检测

### 3 讨论

腰椎软骨干细胞属于成体干细胞的一种,目前获得成体干细胞的方法主要有:①定向诱导胚胎干细胞分化为成体干细胞,但是诱导条件复杂,现已很少采用。②根据干细胞的生长特性,体外分离培养动物的某些部位来获取特定的细胞。此法采用较多。目前已知干细胞具有单克隆形成能力、成骨、成脂肪及成软骨分化的重要特性<sup>[4]</sup>。本文先利用单克隆法,将原代接种于培养皿中获得细胞集落,后用三向分化能力<sup>[5]</sup>、集落的单克隆形成能力检测,验证通过此法获得细胞具有干细胞特性。当然,本文的不足之处就是未通过免疫学方法验证该干细胞。但是通过部位取材、原代染色、单克隆能力检测、三向分化诱导这些严密环节,也能证明出所获取的为腰椎终板软骨干细胞。

干细胞的研究为疾病的临床治疗提供了新思路,早在 1743 年 hunter<sup>[6]</sup> 就认为软骨损伤不能修复,上个世纪 Namba 和 Meuli<sup>[7]</sup> 提出软骨的修复只发生在胚胎动物。目前成体动物缺损修复的难点在于难以获取大量的前提增殖细胞。本文提供的单克隆法大大节约了获取的经济成本,简化了获取流程,为今后进一步研究干细胞及其临床应用奠定了基础。

### 【参考文献】

- [1] LIU S, LIANG H, LEE SM, *et al.* Isolation and identification of stem cells from degenerated human intervertebral discs and their migration characteristics [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2017, 49(2): 101 - 109.
- [2] LIU C, GUO Q, LI J, *et al.* Identification of rabbit annulus fibrosus-derived stem cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e108239.
- [3] MELLO MA, TUAN RS. High density micromass cultures of embryonic limb bud mesenchymal cells: an in vitro model of endochondral skeletal development [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1999, 35(5): 262 - 269.
- [4] DOMINIC M, LE BK, MUELLER I, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. *Cytherapy*, 2006, 8(4): 315 - 317.
- [5] LIU LT, HUANG B, LI CQ, *et al.* Characteristics of stem cells derived from the degenerated human intervertebral disc cartilage endplate [J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26285.
- [6] HUNTER W. Of the structure and disease of articulating cartilages. 1743 [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1995(317): 3 - 6.
- [7] NAMBA RS, MEULI M, SULLIVAN KM, *et al.* Spontaneous repair of superficial defects in articular cartilage in a fetal lamb model [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 1998, 80(1): 4 - 10.