

网络出版时间: 2019-12-2 13:42 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20191126.1716.015.html>

IGF-1 对兔脂肪干细胞增殖和成骨分化的影响

朱思斌¹ 张 雪² 江 飞² 许易诚² 尹宗生¹

摘要 目的 探讨胰岛素样生长因子(IGF-1)对兔脂肪干细胞(ADSCs)增殖和成骨分化的影响。方法 无菌条件下从兔颈后部取出脂肪组织, I型胶原酶消化法将ADSCs从脂肪组织中分离, 观察细胞生长。采用免疫荧光法检测ADSCs表面特异性标志物CD90。P₃代ADSCs在成脂和成骨诱导培养液的诱导下向成脂和成骨方向分化, 油红O、茜素红染色定性鉴定。在成骨诱导培养基中加入IGF-1, 设置培养基IGF-1浓度为0、5、10、20 ng/ml四组, 观察不同浓度IGF-1对ADSCs增殖活性、碱性磷酸酶(ALP)和钙离子含量的影响。CCK-8法检测各组ADSCs的增殖活性, 茜素红染色定性检测各组ADSCs的成骨分化能力; 通过测定ALP和钙离子含量定量检测各组ADSCs成骨分化能力。结果 原代及传代的兔ADSCs均呈长梭形或成纤维细胞样外观, 生长分化活跃。免疫荧光检测ADSCs高度表达表面特异蛋白CD90, 培养的细胞具有成骨分化和成脂分化的能力。IGF-1可以促进ADSCs增殖活性和提高ADSCs的ALP、钙离子含量。IGF-1浓度越高, ADSCs增殖活性和ALP、钙离子含量越高。结论

IGF-1可以促进兔ADSCs的增殖与成骨分化。

关键词 胰岛素样生长因子; 脂肪干细胞; 成骨分化

中图分类号 R 681.8

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)12-1913-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.12.015

传统上, 治疗骨折创伤主要有手术治疗和复位外固定保守治疗, 骨组织工程是近期提出和快速发展的新的治疗手段^[1], 相比旧的治疗方法, 骨组织工程治疗过程中创伤的骨组织可以更快恢复, 骨组织修复过程加快, 骨折预后功能可以更快接近之前的水平。不同种子细胞的增殖能力和多功能分化潜力各不相同, 在不同骨科疾病中的治疗效果差异巨大。现在常用的种子细胞有骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)和脂

肪干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)。ADSCs于2001年第一次被发现, 是从脂肪组织中提取的成体干细胞^[2]。ADSCs起源于胚胎的中胚层, 可以向多种细胞方向分化^[3-4], 最终分化成成骨、成脂、成软骨细胞。胰岛素样生长因子1(insulin like growth factor 1, IGF-1)是一种结构类似于胰岛素的生长因子, 在调节细胞生长、促进细胞分化、促进骨与软骨的合成代谢、创伤修复过程中起着重要的作用^[5]。研究^[6]表明IGF-1可以促进BMSCs的增殖和成骨分化。目前, ADSCs在体外培养下仍有生长增殖较慢, 成骨分化所需时间较长的缺陷, 为研究培养方法, 该实验通过在培养基中加入不同浓度的IGF-1, 探寻IGF-1对体外培养下ADSCs的增殖和成骨分化能力的生物学影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 6月龄SPF级健康新西兰白兔9只, 雌雄不限, 体质量2.0~3.0 kg, 由安徽医科大学实验动物中心提供。饲养环境温度18~29℃, 相对湿度达40%~70%, 新鲜空气换气次数10次/h, 气流速度≤0.18 m/s, 压差25 Pa, 洁净度一万级, 氨浓度15 mg/m³, 噪音≤60 dB, 照度150~300 Lux。

1.2 主要试剂与仪器 低糖DMEM培养基购自美国Hyclone公司; 兔脂肪干细胞成骨诱导培养基、兔脂肪干细胞成脂诱导培养基购自美国Cyagen公司; 胎牛血清购自美国Gibco公司; 人重组IGF-1粉剂购自美国R&D公司; CCK-8细胞增殖试剂盒为南京诺唯赞生物科技有限公司产品; I型胶原酶、胰蛋白酶购自美国Sigma公司; CD90单克隆抗体为北京博奥森生物技术有限公司产品; 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性测定试剂盒为南京建成公司产品。CO₂细胞恒温培养箱、超速离心机为美国Thermofisher公司产品; 倒置荧光显微镜为日本Olympus公司生产; 酶标仪为美国BIO-TEK公司产品。

1.3 兔ADSCs的分离与培养 取兔1只, 戊巴比妥钠麻醉, 颈后术区剃毛备皮, 俯卧位固定于手术台上, 消毒, 铺单, 在无菌手术间, 沿颈后正中切口逐层

2019-03-09 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81171173)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院¹ 骨科、² 普外科, 合肥 230022

作者简介: 朱思斌, 男, 硕士研究生;

尹宗生, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: yinzongsheng1961@sina.com

切开,分离出皮下脂肪,用添加1%含量双抗的PBS冲洗3次,在超净工作台中,仔细剔除组织中的小血管、外包膜和其他组织。使用眼科剪将脂肪剪碎至乳糜状,加入两倍脂肪体积的0.1% I型胶原酶,搅拌均匀,将离心管放置于37℃水浴中振荡消化60 min,1 200 r/min离心10 min,去除上层油脂、残余脂肪组织。沉淀重悬细胞后,放入200目细胞筛过滤,滤液1 200 r/min离心5 min。使用含10%胎牛血清的低糖DMEM重悬细胞沉淀,接种至细胞瓶,放入恒温细胞箱中培养,首次换液于24 h后,漂洗去除未贴壁细胞,每日镜下观察细胞形态和生长情况,待细胞长满80%左右时,用胰酶在37℃恒温细胞培养箱中消化2 min左右,加入血清L-DMEM中和胰酶,设置离心机转速为1 200 r/min,时间5 min,将细胞离心,离心后弃去上清液,将细胞按1:3传代。

1.4 ADSCs表面抗体的检测 初代ADSCs传代至P₂细胞在培养皿增殖至80%融合时,用胰酶消化细胞,再用含血清的低糖DMEM终止消化反应,消化后放入离心机1 200 r/min离心5 min,弃去上清液,用细胞培养基重悬,调整细胞浓度为 3×10^5 /ml,接种于铺好细胞爬片的24孔板上,每孔0.5 ml。待细胞贴壁后,用4%多聚甲醛固定,用PBS浸洗3次,加山羊血清等待30 min。再滴加山羊抗兔CD90一抗,放入湿盒,在4℃环境下过夜。第2天用PBST冲洗爬片,重复3次,滴加荧光二抗,湿盒孵育1 h, PBST冲洗爬片3次。滴加DAPI,孵育5 min对ADSCs细胞核染色。染色后在荧光显微镜下观察并拍照。

1.5 兔ADSCs向脂肪细胞诱导分化 取P₂代ADSCs细胞生长至80%~90%融合时,用0.25%胰酶消化细胞,调整细胞密度为 5×10^4 /ml,以每孔2 ml接种于6孔板中,2 d后,待细胞生长完全融合,依照兔ADSCs成脂诱导培养基说明书,使用兔成脂诱导培养基A液培养3 d,3 d后换为兔成脂诱导培养基B液培养1 d, A液和B液相互交替培养3~5次,每日镜下观察细胞形态,待脂滴足够大,足够圆,用油红O染色,在倒置显微镜下观察并拍照。

1.6 兔ADSCs向成骨细胞诱导分化 取80%融合的P₂代ADSCs,加入浓度为0.25%的胰酶消化,调整细胞密度为 5×10^4 /ml,以每孔2 ml接种于6孔板中,传代后第2天,待细胞贴壁,换用兔成骨诱导培养基培养4周,镜下观察细胞形态转变后,用茜素红染色,在倒置显微镜下观察并拍照。

1.7 CCK-8法检测IGF-1对ADSCs增殖活性的影响 取P₂代ADSCs,以 2×10^4 /cm²的密度分别接种于96孔板中培养,每孔加入100 μl培养基。依据说明书,将重组人IGF-1粉剂溶于无菌PBS中,加入成骨诱导培养基,配置成0、5、10、20 ng/ml四种浓度。设置为A组(对照组,0 ng/ml IGF-1)、B组(5 ng/ml IGF-1)、C组(10 ng/ml IGF-1)、D组(20 ng/ml IGF-1),每组设置3个复孔,培养24 h后加入100 μl含10% CCK-8的低糖培养基,在37℃、5% CO₂下反应4 h,酶标仪检测450 nm波长处各孔的吸收值。每日重复CCK-8增殖实验,重复3次,检测7 d。

1.8 茜素红染色检测钙结节及定性分析 取P₂代ADSCs,以 5×10^4 /cm²的密度分别接种于24孔板中培养,每孔1 ml。细胞贴壁后,换用加入IGF-1的兔成骨诱导培养基,按每培养基IGF-1的浓度将24孔板设置为4组, A组(对照组,0 ng/ml IGF-1)、B组(5 ng/ml IGF-1)、C组(10 ng/ml IGF-1)、D组(20 ng/ml IGF-1),在培养21 d后,每组对钙结节茜素红染色,定性检测钙结节。

1.9 ALP与钙离子含量的检测及定量分析 按上述实验分组在24孔板中培养ADSCs,在第14天和第24天时,每组取3个孔进行钙离子定量检测,每孔加入1%氯化十六烷基吡啶500 μl,在常温下反应10 min,选择560 nm波长,用酶标仪检测钙离子的含量。每组另外3个孔用胰酶消化后,用含血清的低糖DMEM中和反应,离心去除残余的胰酶,用PBS冲洗细胞两次,加入0.1% Trizol X-400裂解细胞后收集裂解液,在高速离心机中20 000 r/min离心10 min后取上清液,依据ALP检测试剂盒说明书的步骤进行ALP定量检测。

1.10 统计学处理 使用SPSS 17.0软件分析数据,组内比较采用独立样本 t 检验,组间比较使用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 兔ADSCs的形态 原代培养后,兔ADSCs于48 h内贴壁,原代细胞呈短梭形或小多角形,72 h后观察,细胞增殖后密度增高时为长梭形或纤维细胞样外观。见图1A。原代培养7 d左右,细胞铺满围绕各中心呈集落样生长。见图1B。

2.2 ADSCs免疫荧光鉴定结果 免疫荧光鉴定P₂代脂肪干细胞,显示结果为DAPI细胞核染色阳性,见图2A; FITC标记的CD90染色阳性,见图2B。

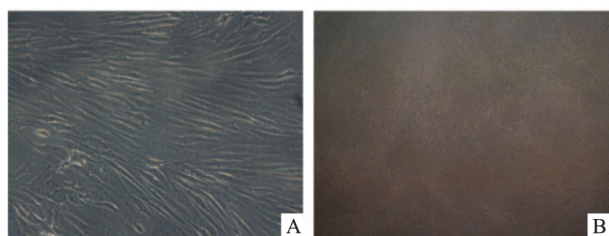
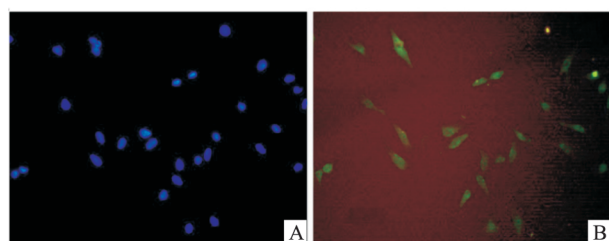


图1 倒置显微镜下兔脂肪干细胞的形态

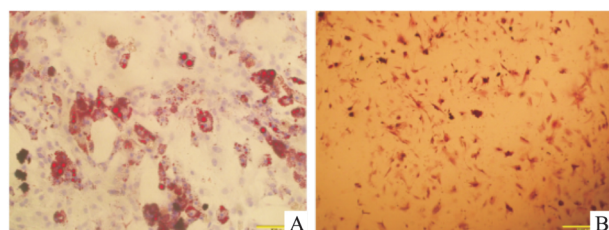
A: ADSCs 原代培养 3 d, 呈梭形成纤维样外观 $\times 200$; B: ADSCs 原代培养 7 d, 细胞铺满围绕各中心呈集落样生长 $\times 100$

图2 ADSCs 免疫荧光染色 $\times 200$

A: DAPI 细胞核染色阳性; B: FITC 标记的 CD90 染色阳性

2.3 ADSCs 成脂诱导分化结果 P_3 代 ADSCs 成脂诱导后, 培养皿中的细胞结构变得不规则, 细胞内可见球形透亮脂肪滴, 逐渐变大变圆, 诱导培养 3 周后, 进行油红 O 染色, 染色结果为阳性, 可见红色球形脂肪滴, 见图 3A, 证明 ADSCs 成脂分化。

2.4 ADSCs 成骨诱导分化结果 P_3 代 ADSCs 成骨诱导后, 细胞形态由细长的梭形结构逐渐变宽大, 变成不规则的多角形或多边形。诱导 14 d 后, 可见细胞周围分布小褐色结节。诱导 28 d 后, 形成大量钙结节, 茜素红染色后可见钙结节被染成深红色, 茜素红染色阳性, 见图 3B, 证明了体外培养的 ADSCs 有成骨分化的能力。

图3 ADSCs 的功能鉴定 $\times 100$

A: ADSCs 成脂分化后油红 O 染色阳性; B: ADSCs 成骨分化后茜素红染色阳性

2.5 ADSCs 的增殖活性曲线 CCK-8 法检测结果: 随着培养基内 IGF-1 浓度的增高, ADSCs 增殖活性逐渐增强, 从第 2 天开始, 5、10、20 ng/ml IGF-1

组的增殖活性均高于对照组, 其中 20 ng/ml IGF-1 组高于 10 ng/ml IGF-1 组和 5 ng/ml IGF-1 组, 10 ng/ml IGF-1 组高于 5 ng/ml IGF-1 组, 差异有统计学意义 ($F = 141.675$, $P < 0.05$)。见图 4。

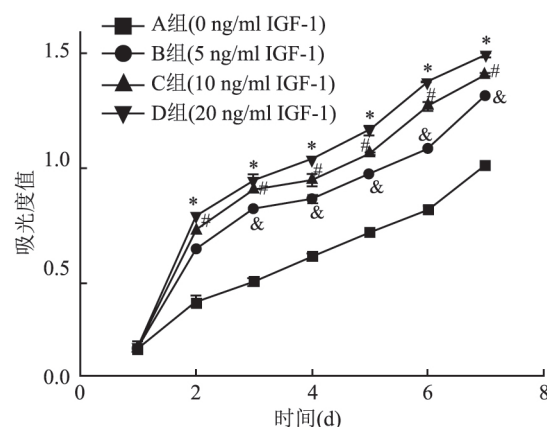
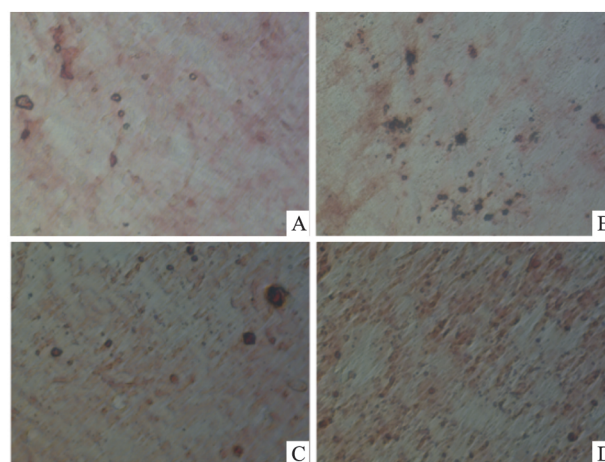


图4 ADSCs 增殖曲线

与 A 组比较: * $P < 0.05$; 与 B 组比较: # $P < 0.05$; 与 C 组比较: & $P < 0.05$

2.6 钙离子茜素红染色的检测结果 成骨诱导分化 3 周后, ADSCs 的茜素红染色结果为阳性, A 组细胞镜下均可见红色钙结节。见图 5。在镜下观察钙结节密度, 密度从大到小排列依次为 D 组、C 组、B 组和 A 组, A 组密度最低。证明了 IGF-1 对 ADSCs 钙离子的生成的促进作用。

图5 ADSCs 钙结节的定型鉴定 $\times 200$

A: A 组 (0 ng/ml IGF-1) 茜素红染色; B: B 组 (5 ng/ml IGF-1) 茜素红染色; C: C 组 (10 ng/ml IGF-1) 茜素红染色; D: D 组 (20 ng/ml IGF-1) 茜素红染色

2.7 ALP 和钙离子的定量检测 ALP 定量检测: ADSCs 诱导培养 14 d 时, D 组、C 组、B 组中 ALP 活性均高于 A 组, 且 D 组活性高于 C 组和 B 组, C 组

高于 B 组,差异有统计学意义 ($F = 60.619, P < 0.05$)。培养 21 d 时, D 组、C 组、B 组中 ALP 活性均高于 A 组,且 D 组活性高于 C 组和 B 组, C 组高于 B 组,差异有统计学意义 ($F = 162.816, P < 0.05$) (见图 6)。钙离子定量检测:诱导培养 14 d 时, D 组、C 组、B 组的钙离子含量均高于 A 组, D 组高于 B 组, C 组高于 B 组,差异有统计学意义 ($F = 142.931, P < 0.05$) ,而 D 组和 C 组钙离子含量差异无统计学意义,诱导培养 21 d 时, D 组、C 组、B 组的钙离子含量均高于 A 组,而且 D 组高于 C 组, D 组高于 B 组, C 组高于 B 组,差异有统计学意义 ($F = 71.286, P < 0.05$) (见图 7)。

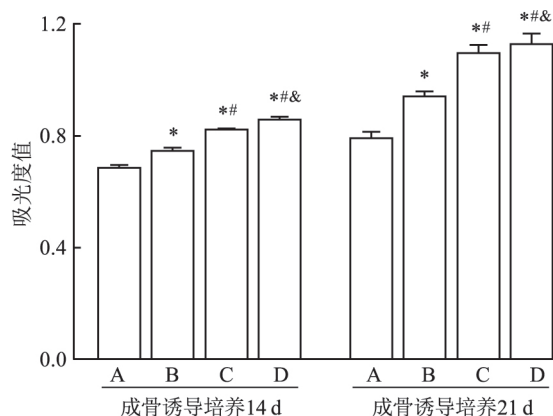


图 6 ALP 定量检测

与 A 组比较: * $P < 0.05$; 与 B 组比较: # $P < 0.05$; 与 C 组比较: & $P < 0.05$

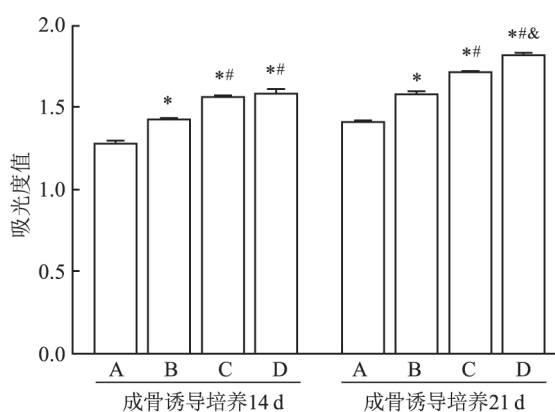


图 7 钙离子定量检测

与 A 组比较: * $P < 0.05$; 与 B 组比较: # $P < 0.05$; 与 C 组比较: & $P < 0.05$

3 讨论

骨科临床上,股骨头坏死是最常见的一种疾病,患病年龄多发于 35~50 岁,发病病因和机制非常复杂,受多种因素影响^[7],在近年来的研究中,利用 BM-

SCs 等干细胞治疗早期股骨头坏死是热门的研究对象。BMSCs 可在体外培养,并向成骨方向和成软骨方向分化,广泛应用于治疗骨坏死等骨科疾病实验研究中^[8]。但 BMSCs 体外培养需要从动物的骨髓腔中取材,其来源少,取材困难,细胞增殖速度较慢。与 BMSCs 相比,ADSCs 来源广泛,取材和培养过程简单,细胞增殖和分化速度快^[9]。有研究^[10]表明,在体外环境下,ADSCs 的增殖能力和向成骨细胞分化潜力强于 BMSCs,是骨组织工程中更优秀的种子细胞。

生长因子是一种活性多功能肽物质,由特定细胞分泌,通过与靶细胞结合,可以调节细胞增殖和促进细胞分化。IGF-1 是一种生长因子,来源于体内肝细胞、肾细胞、脾细胞等十几种细胞自分泌和旁分泌作用于周围组织,但大部分来自于肝细胞。受垂体分泌的生长激素调控,参与调节绝大部分器官的生长和功能,对细胞的增殖、分化具有非常重要的作用^[11-12]。骨质疏松患者中,血清 IGF-1 水平下降,IGF-1 可以促进骨形成、抑制骨破坏、减少骨的吸收,对骨质疏松具有改善作用^[13]。IGF-1 的结构与胰岛素相似,主要存在于血液中,可以降低血糖、促进糖异生、抑制脂肪分解、促进组织利用葡萄糖,对糖尿病继发骨质疏松有着良好的治疗效果。有研究^[14]表明,IGF-1 会影响骨细胞代谢,是骨形成和骨重建过程中的关键蛋白,又有研究^[15]表明,IGF-1 可以增强胰岛素生长因子结合蛋白 5 在成骨细胞中的表达,对成骨细胞的增殖有促进作用。本实验通过在培养基中加入不同浓度的 IGF-1,观察其对 AD-SCs 的增殖和成骨分化的影响。本次实验证明,含有 5~20 ng/ml IGF-1 的成骨培养基,可以增加 AD-SCs 的增殖活性和 ALP 及钙离子含量,培养基中的 IGF-1 含量越高,ADSCs 的增殖和成骨分化能力越强,具有剂量反应关系,IGF-1 对 ADSCs 的生长增殖和成骨分化具有促进作用。有研究^[16]表明,IGF-1 通过 efn-Eph 信号通路和其他多种通路作用于 AD-SCs,刺激 ADSCs 的增殖和成骨分化。本实验在成骨培养基中加入的 IGF-1 最大浓度为 20 ng/ml,但增强细胞成骨分化能力的最佳 IGF-1 浓度仍不能确定,有待进一步实验。

参考文献

- [1] Liu W, Cui L, Cao Y L. Recent advances in tissue engineering of cartilage, bone, and tendon[J]. Curr Opin Orthop. 2004, 15(5): 364-8.

- [2] Zuk P A , Zhu M , Ashjian P , et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells [J]. *Mol Biol Cell* , 2002 , 13 (12) :4279 – 95.
- [3] Kilian K A , Bugarija B , Lahn B T , et al. Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 2010 , 107(11) :4872 – 7.
- [4] Tapp H , Hanley E N Jr , Patt J C , et al. Adipose – derived stem cells: characterization and current application in orthopaedic tissue repair [J]. *Exp Biol Med (Maywood)* , 2009 , 234(1) : 1 – 9.
- [5] Froesch E R , Schmid C , Schwander J , et al. Actions of insulin – like growth factors [J]. *Annu Rev Physiol* , 1985 , 47(1) :443 – 67.
- [6] McGinley L , McMahon J , Strappe P , et al. Lentiviral vector mediated modification of mesenchymal stem cells and enhanced survival in an *in vitro* model of ischaemia [J]. *Stem Cell Res Ther* , 2011 , 2(2) :12.
- [7] Mont M A , Jones L C , Hungerford D S. Nontraumatic osteonecrosis of the femoral head: ten years later [J]. *J Bone Joint Surg Am* , 2006 , 88(5) :1117 – 32.
- [8] Grove J E , Bruscia E , Krause D S , et al. Plasticity of bone marrow – derived stem cells [J]. *Stem cells* 2004 , 22(4) :487 – 500.
- [9] Park A , Hogan M V , Kesturu G S , et al. Adipose – derived mesenchymal stem cells treated with growth differentiation factor-5 express tendon – specific markers [J]. *Tissue Eng Part A* , 2010 , 16 (9) :2941 – 51.
- [10] Strioga M , Viswanathan S , Darinskas A , et al. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow – derived mesenchymal stem and stromal cells [J]. *Stem Cells Dev* , 2012 , 21(14) :2724 – 52.
- [11] Mourkioti F , Rosenthal N. IGF-1 , inflammation and stem cells: interactions during muscle [J]. *Trends Immunol* , 2005 , 26(10) : 535 – 42.
- [12] Sassoon C S , Zhu E , Fang L , et al. Interactive effects of corticosteroid and mechanical ventilation on diaphragm muscle function [J]. *Muscle Nerve* 2011 , 43(1) :103 – 11.
- [13] Sun H B , Chen J C. Prevention of bone loss by injection of insulin-like growth factor-1 after sciatic neurectomy in rats [J]. *Chin J Traumatol* , 2013 , 16(3) :158 – 62.
- [14] Celiker R , Arslan S. Comparison of serum insulin-like growth factor-1 and growth hormone levels in osteoporotic and non-osteoporotic postmenopausal women [J]. *Rheumatol Int* , 2000 , 19(6) :205 – 8.
- [15] Gabbitis B , Canalis E. Insulin-like growth factors sustain insulin-like growth factor-binding protein-5 expression in osteoblasts [J]. *Am J Physiol* , 1998 , 275(2) :E222 – 8.
- [16] Lindsey R C , Rundel C H , Moha S. Role of IGF-1 and EFN-EPH signaling in skeletal metabolism [J]. *J Mol Endocrinol* , 2018 , 61 (1) :T87 – 102.

Effects of IGF-1 on the proliferation and osteogenic differentiation of rabbit adipose-derived stem cells

Zhu Sibin¹ , Zhang Xue² , Jiang Fei² , et al

(¹Dept of Orthopaedics , ²Dept of Surgery , The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230022)

Abstract **Objective** To explore the influence of insulin like growth factor (IGF-1) on the proliferation and the osteoblastic differentiation ability of rabbit adipose-derived stem cells (ADSCs). **Methods** The adipose tissue was removed from the rabbit neck in aseptic condition. Isolate adipose-derived stem cells from the adipose tissue by the method of collagenase digestion , and identify CD90 by immunofluorescence technique. Added 0 , 5 , 10 and 20 ng/ml IGF-1 into osteogenic medium , observed proliferation activity of ADSCs and the content of ALP and calcium ion. The proliferation activity of the ADSCs was detected by the CCK-8 and the osteoblastic differentiation ability was detected by alizarin red staining. Quantitative test of ALP and calcium ion was used to analyze ADSCs osteogenic differentiation ability. **Results** The original and subcultured adipose-derived stem cells were mainly spindle-shaped like fibroblast and proliferated quickly. The immunofluorescence test showed that ADSCs highly express CD90 and it could differentiate into osteoblasts and adipocytes. IGF-1 promoted the proliferation activity of ADSCs and increased the content of ALP and calcium ion. The more concentration of IGF-1 , the higher proliferation activity of ADSCs and the more content of ALP and calcium ions. **Conclusion** IGF-1 could promote the proliferation and osteogenesis differentiation ability of rabbit ADSCs.

Key words insulin-like growth factor; adipose-derived stem cells; osteoblastic differentiation