

网络出版时间: 2018-4-27 9:40 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180426.1411.014.html>

## 内皮祖细胞条件培养基对脂肪干细胞成骨分化的影响

曹乐<sup>1</sup>, 方晓<sup>1</sup>, 丁振飞<sup>1</sup>, 王涛<sup>1</sup>, 黄威<sup>2</sup>, 饶先亮<sup>3</sup>, 尹宗生<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探究 SD 大鼠骨髓来源的内皮祖细胞( EPCs) 条件培养基( EPC-CM) 对脂肪间充质干细胞( ADSCs) 增殖和成骨分化能力的影响。方法 体外分离、培养、扩增并鉴定 SD 大鼠 ADSCs 与 EPCs。实验设置 3 个不同浓度的 EPC-CM 培养 ADSCs, 分别为对照组( 不含 EPC-CM) 、50% EPC-CM 组和 100% EPC-CM 组。采用 CCK-8 检测各组 ADSCs 的增殖活性; 采用茜素红及碱性磷酸酶( ALP) 染色及茜素红染色定性检测各组 ADSCs 的成骨分化能力; 使用 ALP 及钙离子定量检测比较各组 ADSCs 成骨分化能力。结果 免疫荧光检测提示 ADSCs 高表达表面特异性蛋白 CD90, 且经诱导可向成骨、成软骨和成脂方向分化。第 2 代 EPCs 高表达 CD133 和血管内皮生长因子受体-2( VEGFR-2) ; 在铺有基质胶的 96 孔培养板中可形成管腔样结构, 能够特异地摄取乙酰化低密度脂蛋白和 FITC-UEA-I。与对照组相比 50% EPC-CM 组和 100% EPC-CM 组 ADSCs 增殖活性均明显增加, 且与 EPC-CM 浓度相关( $P < 0.05$ )。ALP 定量检测培养 14 d 及 21 d 后 50% EPC-CM 组和 100% EPC-CM 组 ADSCs 的 ALP 活力均高于对照组( $P < 0.05$ )。培养 14 d 和 21 d 后, 50% EPC-CM 组和 100% EPC-CM 组钙离子含量均高于对照组( $P < 0.05$ )。结论 EPC-CM 能够促进 ADSCs 的增殖与成骨分化能力, 为阐明血管化细胞影响骨形成的机制提供了一定依据。

**关键词** 脂肪间充质干细胞; 内皮祖细胞; 成骨分化

**中图分类号** R 681.8

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2018)05-0727-08

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.05.014

脂肪间充质干细胞( adipose-derived mesenchymal stem cells, ADSCs) 具有较强的增殖能力和多向分化潜能, 能够满足组织工程对细胞数量和种类的要求, 因而被认为比较可靠的应用于骨组织工程的种子细胞来源<sup>[1]</sup>。但单一的干细胞移植往往因干细胞生

2018-01-31 接收

基金项目: 国家自然科学基金( 编号: 81171173)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学第一附属医院骨科, 合肥 230022

<sup>2</sup> 安徽医科大学附属安徽省立医院骨科, 合肥 230001

<sup>3</sup> 安徽医科大学第四附属医院骨科, 合肥 230022

作者简介: 曹乐, 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

存所需微环境在体内难以完全复制, 结果导致移植效率较低。虽然人们早已认识到血管化在骨形成和修复中的重要作用, 但是成血管细胞能否促进骨再生及其机制尚未完全明了。该研究通过特定的条件培养基培养种子细胞来部分模拟体内多细胞之间相互作用的环境, 从而在细胞水平探讨具有成血管潜能的内皮祖细胞( endothelial progenitor cells, EPCs) 通过间接接触对具有成骨潜能的 ADSCs 的增殖和成骨能力的生物学影响, 为阐明血管化与骨形成之间的生物耦联机制提供依据。

### 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 80~100 g SPF 级雌性 SD 大鼠 2 只; 200~220 g SPF 级雌性 SD 大鼠 4 只, 均购自安徽省实验动物中心。

**1.2 主要试剂及仪器** I 型胶原酶、LG-DMEM 培养基( 上海碧云天生物技术有限公司); 大鼠 ADSCs 成骨诱导培养基、大鼠 ADSCs 成脂诱导培养基、大鼠 ADSCs 成软骨诱导培养基( 美国 Sigma 公司); EGM-2 完全培养基( 瑞士 Lonza 公司); 鼠纤维连接蛋白( 瑞士 Gene Operation 公司); 大鼠淋巴细胞分离液试剂盒( 天津灏洋生物制品科技有限责任公司); CCK-8 细胞增殖试剂盒( 南京诺唯赞生物科技有限公司); CD133、VEGFR-2 单克隆抗体( 美国 Sigma 公司); 山羊抗兔 IgG/FITC、山羊抗兔 IgG/TRITC、CD90 单克隆抗体( 北京博奥森生物技术有限公司)。

**1.3 大鼠骨髓源 EPCs 的分离与培养** 取 1 只 80~100 g SD 大鼠, 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉后使用 75% 酒精浸泡 15 min, 于超净工作台中分离大鼠下肢。剪去大鼠股骨及胫骨骨骺端, 吸取 F 液( 大鼠骨髓淋巴细胞分离液试剂盒) 反复冲洗髓腔, 冲出骨髓置于 60 mm 培养皿中吹打均匀, 1 550 r/min 离心 5 min 后弃上清液, 使用 5 ml 组织液( 大鼠骨髓淋巴细胞分离液试剂盒) 将上述骨髓组织重悬备用。将上述备用的组织液重悬的骨髓细胞缓慢加入 5 ml 淋巴细胞分离液上层, 1 550 r/min 离心 20 min, 可见骨髓细胞分层排列于淋巴细胞分离液中,

小心吸取其中白色絮状单核细胞层, 使用 EBM-2 培养基重悬清洗 2 遍后, 接种于预先包被纤维黏连蛋白(FN)(20 μg/ml) 的 6 孔板中, 放入恒温细胞培养箱内培养 48 h 后全量换液, 以后每 2 d 半量换液 1 次。原代培养的 EPCs 融合成片后按 1:2 传代。

**1.4 大鼠 ADSCs 的分离与培养** 参考文献<sup>[2]</sup> 方法 取 1 只 200~220 g SD 大鼠, 10% 水合氯醛麻醉后使用 75% 酒精浸泡 15 min, 于超净工作台中分离大鼠腹股沟皮下脂肪, 使用含 1% 双抗的 PBS 清洗 3 次。将脂肪组织剪碎后加入双倍体积的 0.1% I 型胶原酶溶液, 混合均匀。将密封的离心管置于 37 °C 恒温水浴锅中缓慢震荡消化 60 min 后, 1 200 r/min 离心 20 min, 去除上层油脂、未消化的脂肪组织及纤维结缔组织等。磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS) 重悬细胞, 200 μm 滤网过滤后, 以 1 200 r/min 离心 10 min, 去除上层液面漂浮的油脂, 重复上述步骤至去净悬浮油脂。使用含 10% 胎牛血清(fetal calf serum, FBS) 的 LG-DMEM 重悬细胞, 接种于 T25 培养瓶中, 置于恒温细胞培养箱中培养, 以后每 3 d 换液 1 次。原代培养的细胞融合成片后按 1:3 的比例传代培养。CCK-8 法测量 ADSCs 生长曲线。

**1.5 免疫荧光检测 ADSCs 和 EPCs 表面标志物** 调整第 3 代 ADSCs 和第 2 代 EPCs 浓度为  $3 \times 10^5 / ml$ , 按每孔 0.5 ml 接种于预先铺好细胞爬片的 24 孔板中。待细胞贴壁后移除培养基 4% 多聚甲醛固定后 PBS 浸洗 3 次, 山羊血清封闭 30 min。于 ADSCs 爬片上滴加稀释好的兔抗大鼠 CD90 一抗, EPCs 爬片加入稀释好的兔抗大鼠 CD133、VEGFR-2 一抗, 放入湿盒 4 °C 孵育过夜。第 2 天, PBST 浸洗爬片 3 次后吸干爬片上多余液体, 滴加稀释好的荧光二抗, 湿盒中 20~37 °C 孵育 1 h 后, PBST 浸洗爬片 3 次。滴加 DAPI 后避光孵育 5 min 后, 对上述细胞爬片进行核染, PBST 洗去多余的 DAPI 后用含抗荧光淬灭剂的封片液封片, 荧光显微镜下观察采集图像。

## 1.6 ADSCs 和 EPCs 的功能鉴定

**1.6.1 ADSCs 成软骨诱导分化** 第 3 代 ADSCs 生长 80%~90% 融合后, 使用成软骨诱导分化培养基培养 3 周, 甲苯胺蓝染色后镜下观察, 以细胞被甲苯胺蓝染成蓝色为阳性结果。

**1.6.2 ADSCs 成骨诱导分化** 第 3 代 ADSCs 生长至 80%~90% 融合时, 用成骨诱导分化培养基培养 3 周, 茜素红染色后镜下观察, 以细胞基质被茜素红

染成红色为阳性结果。

**1.6.3 ADSCs 成脂诱导分化** 第 3 代 ADSCs 生长至 100% 融合或者过融合后, 使用成脂诱导分化培养基 A 液培养 3 d, 诱导 3 d 后换为成脂诱导培养基 B 液, A 液和 B 液交替作用 3~5 次。油红 O 染色后镜下观察, 以 ADSCs 胞质中可见有大小不等红色的脂滴形成阳性结果。

**1.6.4 EPCs 体外成血管能力** 参考文献<sup>[3~4]</sup> 方法 取 96 孔板, 按每孔 50 μl 铺被基底胶于皿底, 胰酶消化第 2 代 EPCs, 制备浓度为  $2 \times 10^4 / ml$  的 EPC 细胞悬液接种于各孔, 轻轻振荡均匀, 培养箱中孵育 12 h。倒置显微镜观察, 以能形成管腔样结构为阳性结果。

**1.6.5 EPCs 吞噬功能** 参考文献<sup>[4]</sup> 方法, 取融合度达 80% 的第 2 代 EPCs, 加入 4 μg/ml 的 Dil-acLDL, 培养箱中孵育 4 h。PBS 洗 3 次后多聚甲醛固定 15 min, 加入 10 mg/L 的 FITC-UEA-I, 孵育 1 h。激光共聚焦显微镜下观察并采集图像。Dil-acLDL 和 FITC-UEA-I 双染色阳性细胞被认为是正在分化的 EPCs。

**1.7 制备内皮祖细胞条件培养基(EPC-CM)** 取经过鉴定的原代培养后 1~2 代的 EPCs, 以每孔  $1 \times 10^5$  个细胞接种至 6 孔板中, 待细胞达到 80%~90% 融合后, 换用不含 FBS 的 LG-DMEM, 于 1% 氧浓度培养 48 h 后收集旧培养基, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液即为 EPC 条件培养基。重复制备, 直至足量。经 0.22 μm 滤膜过滤后, 贮存于 -80 °C 冰箱中备用。

**1.8 CCK-8 法检测不同浓度 EPC-CM 培养的 ADSCs 增殖活性** 取第 2 代 ADSCs, 用含 10% FBS 的 LG-DMEM 培养基制备细胞悬液, 调整细胞密度为  $2 \times 10^4 / ml$ , 按每孔 100 μl 接种于 96 孔培养板内, 培养 24 h 后, 吸除原培养基后, 以含 1% 的 FBS 生长培养基饥饿处理 24 h 后, 加入含 1% FBS 的不同浓度 EPC-CM 100 μl, 分别为对照组(使用 LG-DMEM 培养)、50% EPC-CM 组(使用 50% EPC-CM + 50% LG-DMEM 培养)和 100% EPC-CM 组(使用 100% EPC-CM 培养), 每组设 3 个复孔。继续培养 24 h 后, 每孔加入含 10% CCK-8 的 LG-DMEM 100 μl, 37 °C 反应 4 h, 酶标仪检测 450 nm 波长处的吸光度(absorbance, A)值, 表示各组 ADSCs 增殖活性。各组设与实验平行不加细胞只加培养液的空白对照, 以空白孔 A 值调零后比色。以后每天重复上述 CCK-8 增殖实验, 共检测 7 d。上述细胞增殖实

验重复3次。

**1.9 定性分析碱性磷酸酶( alkaline phosphatase , ALP)及钙结节** 取第2代ADSCs,用含10% FBS的LG-DMEM培养基制备细胞悬液,调整细胞密度为 $5 \times 10^4/\text{ml}$ ,按每孔1种于24孔培养板内,培养24 h后,吸去培养基。将24孔板中细胞按EPC-CM浓度分为3组:对照组、50% EPC-CM组和100% EPC-CM组。每组加入0.5 ml成骨诱导培养基和0.5 ml不同浓度的EPC条件培养基。参考文献<sup>[5]</sup>方法 在培养第14天及第21天分别进行ALP及钙结节的定性检测。使用(BCIP/NBT)ALP显色试剂盒进行ALP染色,倒置显微镜下观察并采集图像。使用茜素红染料对钙结节进行染色,倒置显微镜下观察并采集图像。

**1.10 定量分析** ALP及钙离子含量按上述分组,每组选取24孔板中6孔进行定量分析。在培养第14天、21天进行钙离子定量分析,进行定量分析之前48 h换液,茜素红染色后,每组加入1%氯化十六烷基吡啶400 μl,室温反应10 min后,酶标仪检测560 nm波长处的A值,以A值表示各组中钙离子含量。最后以空白孔A值调零比色。实验重复3次。进行ALP定量检测前,首先PBS冲洗细胞2次,0.1% Triton-X100裂解细胞后收集裂解液,12 000 r/min离心10 min后取上清液按ALP检测试剂盒指示进一步行ALP定量检测。实验重复3次,ALP活性以U/L表示。二喹啉甲酸(BCA)法测定各组细胞总蛋白浓度作为参照。

**1.11 统计学处理** 采用SPSS 17.0软件进行分析。实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,组内比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 EPCs的培养和鉴定** EPCs约72 h后可见细胞贴壁,5 d后可见长梭形细胞集落形成,8~10 d可见细胞达到80%~90%融合,细胞集落呈典型“铺路石”状(图1A)。第二代EPCs免疫荧光鉴定结果显示:VEGER-2阳性(图1B、1C),CD133阳性(图1D)。在铺被基质胶的96孔板中可形成“管腔样”结构(图2A),且能够摄取乙酰化低密度脂蛋白(图2C)和荆豆凝集素-1(图2D),表明目的细胞为EPCs。

**2.2 ADSCs的培养和鉴定** ADSCs于48 h贴壁,原代细胞形态不均一,呈成纤维细胞样的长梭形

(图3A)。培养48 h后可见集落形成;培养约7 d时细胞铺满,经传代培养后形态逐渐均一呈“旋涡”(图3B)。CCK-8检测ADSCs增殖曲线与文献<sup>[6]</sup>报道的ADSCs生长趋势一致。第二代ADSCs免疫荧光鉴定显示:CD90阳性(图3C、3D)。经诱导分化培养后能向成骨、成脂及成软骨方向分化(图4)。表明目的细胞为ADSCs。

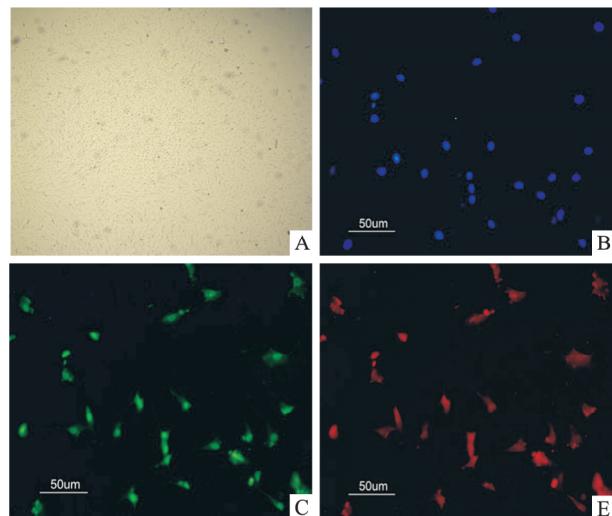


图1 EPCs形态学鉴定  $\times 100$

A: EPCs 原代培养 7 d; B: DAPI 细胞核染阳性; C: FITC 标记的 VEGFR-2 染色阳性; D: TRITC 标记的 CD133 染色阳性

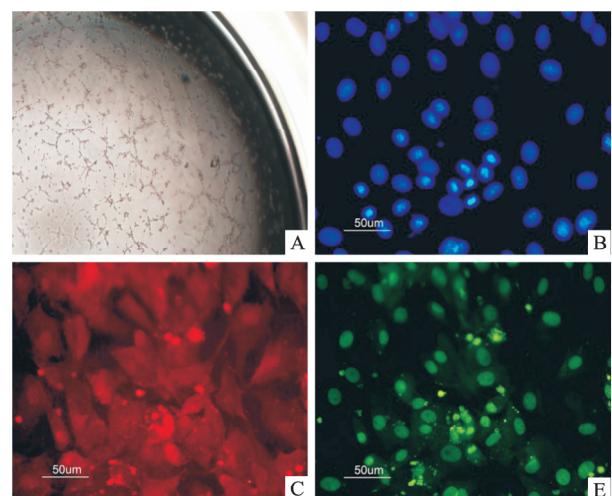
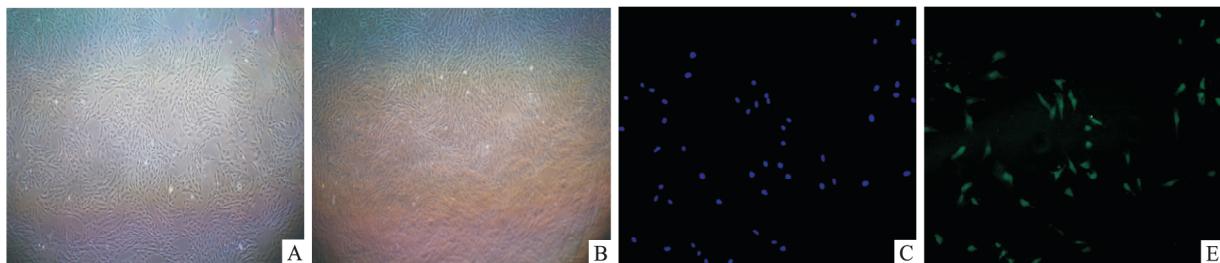


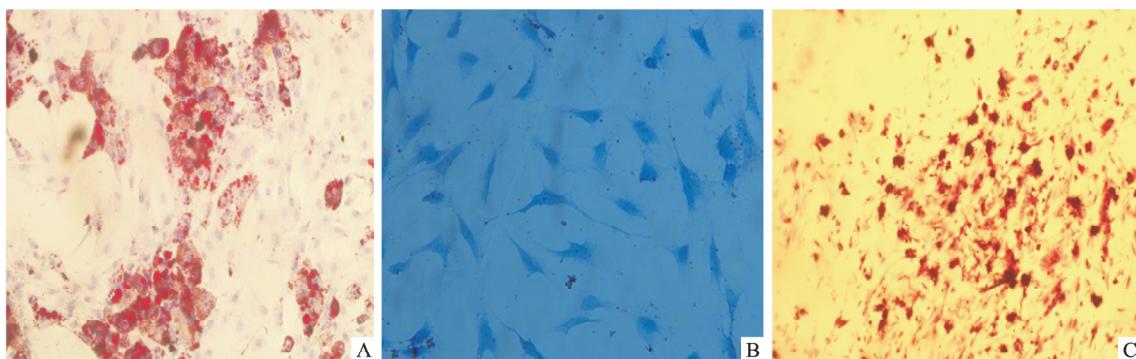
图2 EPCs的功能鉴定

A: EPCs 具有成血管能力  $\times 100$ ; B: DAPI 细胞核染阳性  $\times 200$ ; C: 摄取乙酰化低密度脂蛋白能力( 阳性 )  $\times 200$ ; D: 结合 FITC-UEA-I 能力( 阳性 )  $\times 200$

**2.3 ADSCs的增殖活性** CCK-8法检测ADSCs增殖能力:生长培养基培养ADSCs可见ADSCs增殖曲线与文献报道一致(图5A)。随着EPCs条件培养

图3 ADSCs 形态学鉴定  $\times 100$ 

A: ADSCs 原代培养 5 d; B: 第二代 ADSCs; C: DAPI 细胞核染色阳性; D: FITC 标记的 CD90 染色阳性

图4 ADSCs 的功能鉴定  $\times 100$ 

A: ADSCs 成脂诱导分化后油红 O 染色阳性; B: ADSCs 成软骨诱导分化后甲苯胺蓝染色阳性; C: ADSCs 成骨诱导分化后茜素红染色阳性

表1 3组中ADSCs 1~7 d 的吸光度值与统计学检验 F 值( $n=3 \bar{x} \pm s$ )

时间 (d)	A <sub>450</sub>			F 值		
	对照组	50% EPC-CM 组	100% EPC-CM 组	对照组/50% EPC-CM 组	对照组/100% EPC-CM 组	50% EPC-CM 组/ 100% EPC-CM 组
1	0.249 $\pm$ 0.054	0.269 $\pm$ 0.004	0.282 $\pm$ 0.016			
2	0.691 $\pm$ 0.012	0.660 $\pm$ 0.010	0.483 $\pm$ 0.020	199.125	245.820	12.113
3	0.734 $\pm$ 0.062	0.708 $\pm$ 0.017	0.550 $\pm$ 0.020	111.530	24.265	0.501
4	0.859 $\pm$ 0.023	0.783 $\pm$ 0.015	0.707 $\pm$ 0.017	22.800	87.116	33.723
5	0.894 $\pm$ 0.013	0.834 $\pm$ 0.005	0.768 $\pm$ 0.007	182.344	212.253	53.686
6	1.000 $\pm$ 0.018	0.944 $\pm$ 0.012	0.857 $\pm$ 0.026	62.235	20.203	28.697
7	1.126 $\pm$ 0.007	1.093 $\pm$ 0.006	0.999 $\pm$ 0.011	174.778	259.992	45.455

基浓度的增加,ADSCs 的增殖活性逐渐增加。ADSCs 培养 7 d 时间内可见 3 组 ADSCs 增殖趋势相一致(图 5B)。50% EPC-CM 组和 100% EPC-CM 组的 ADSCs 在各个时间点的增殖活性均高于对照组,差异有统计学意义(表 1)。且除外第 3 天,100% EPC-CM 组的 ADSC 在各时间点的增殖活性高于 50% EPC-CM 组,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 5C、表 1。

**2.4 ALP 和钙离子的定性检测** ADSCs 培养 14 d 及 21 d 后,ALP 染色可见细胞内蓝黑色颗粒物,且随着时间及 EPC-CM 浓度的增加,各组中染色均可见蓝紫色颗粒物,见图 6。随着诱导培养时间的延长,各组中茜素红染色均可见红染的钙结节,见图 7。

**2.5 ALP 和钙离子的定量检测** ALP 活性检测:ADSCs 诱导培养 14 d 后,50% EPC-CM 组中 ALP 活性与对照组相比,差异无统计学意义,而 100% EPC-CM 组中 ALP 活性显著高于对照组和 50% EPC-CM 组,差异有统计学意义( $F = 42.085, 56.400, P < 0.01$ )。诱导培养 21 d 后,50% EPC-CM 组与 100% EPC-CM 组 ALP 活性均高于对照组,差异有统计学意义( $F = 11.211, 18.304, P < 0.01$ ),且 100% EPC-CM 组 ALP 活性高于 50% EPC-CM 组,差异有统计学意义( $F = 5.981, P < 0.05$ ),见图 8。钙离子定量检测( $A_{560}$  检测):诱导培养 14 d 时,50% EPC-CM 组和 100% EPC-CM 组的钙离子含量均高于对照组,差异有统计学意义( $F = 420.346, 3685.101, P <$

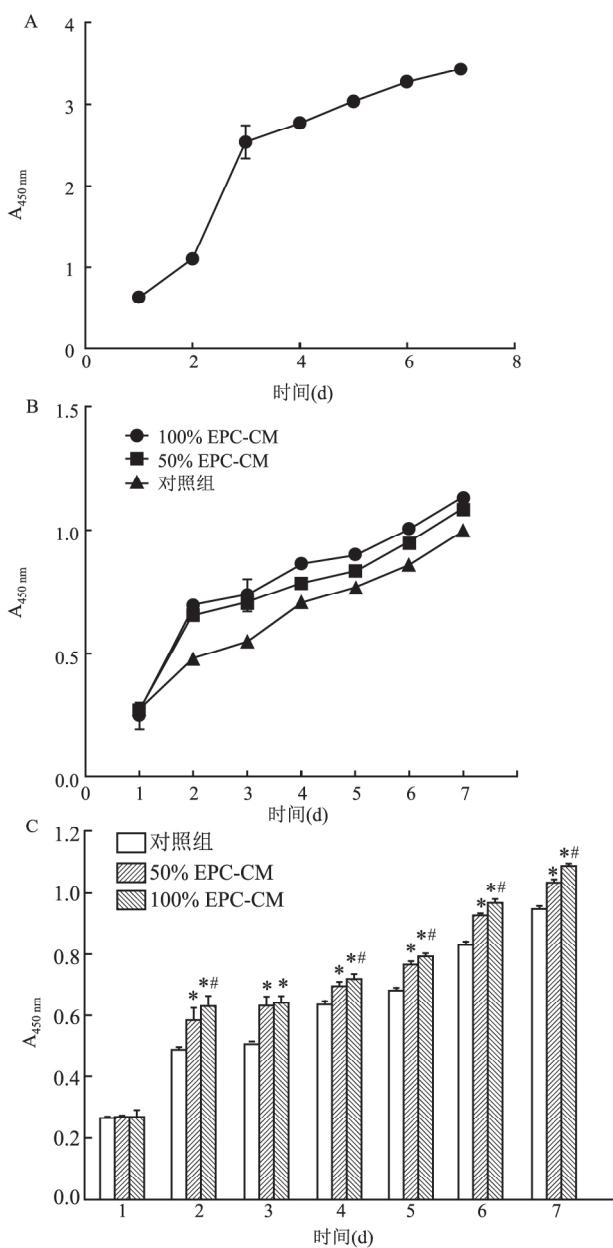


图 5 ADSCs 增殖曲线

A: ADSCs 在生长培养基中增殖曲线; B: 三组 ADSCs 生长曲线; C: 三组 ADSCs 增殖速率柱状图; 与对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 50% EPC-CM 组比较: # $P < 0.05$

0.01); 诱导培养 21 d 时 50% EPC-CM 组和 100% EPC-CM 组的钙离子含量均高于对照组, 差异有统计学意义 ( $F = 91.933, 174.840 P < 0.01$ )。见图 9。

### 3 讨论

髓芯减压和间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 移植对于早期股骨头坏死的治疗是可选的方案。但部分患者术后未能达到理想效果<sup>[7]</sup>。影响手术成败的因素包括股骨头坏死灶的大小, 坏死的病因, 以及移植所用的 MSCs 的活性<sup>[7-8]</sup>。有

研究<sup>[9]</sup>表明激素性股骨头坏死和酒精性股骨头坏死的患者, 其骨髓间充质干细胞 (bone marrow derived mesenchymal stem cells, BMSCs) 的成骨活性大大降低, 这可能是导致手术失败的原因之一。为了应对手术失败的风险, 寻找其他来源的 MSCs 就显得非常重要。Wyles et al<sup>[1]</sup>已经证实, 人来源的 ADSCs 在体外的增殖活性和成骨能力均高于 BMSCs。Strioga et al<sup>[6]</sup>报道这可能是因为 ADSCs 来源于脂肪, 在人体中更类似于生理缓冲区, BMSCs 则需要不断适应身体动态环境的刺激。且相比较与 BMSCs, ADSCs 具有多向分化能力, 而且只需要极小的创口下即可在人体的脂肪组织中获取, 其体外扩增速度远高于 BMSCs, 是组织工程可以选用的优良种子细胞。

尽管 MSCs 和 EPCs 之间的直接和间接相互作用机制仍未能完全阐述清楚, 但是 Kim et al<sup>[10]</sup>已经证实了骨髓来源的细胞能够表达和分泌血管内皮生长因子 (VEGF) 等数种细胞因子, 而 VEGF 能够促进间充质干细胞的增殖和成骨分化能力<sup>[11]</sup>。ALP 是一种细胞成骨的早期标志物, Zhao et al<sup>[12]</sup>已经证实 EPCs 和 MSCs 直接共培养的情况下 ALP 活力会出现明显增加, 但难以确定这种作用是否只存在于两种细胞直接接触的情况下, 以及细胞分泌的 VEGF 等细胞因子对这种促进作用是否具有影响。体外环境与体内环境不同, 体外环境在可控范围内可以避免大部分的其他细胞和分泌蛋白的干扰, 体外环境也更容易控制, 能够真实地反映实验因素产生的影响, 所以本实验采用在体外分离培养两种细胞, 通过制作 EPCs 的条件培养基培养 MSCs, 以研究 EPCs 分泌的细胞因子对于 MSCs 的增殖与分化是否仍存在影响。

在骨的发育、修复、重构等过程中, 快速的血管化可以供应给骨质内部细胞足够的营养、氧气并帮助其运输出代谢废物。同时在组织工程中血管还可以帮助运送降解的支架, 促进新骨的形成。Kraigler et al<sup>[13]</sup>将内皮细胞分别培养于 3 种不同的培养基中, 包括单一的生长培养基、加入了 VEGF 的生长培养基和加入了 BMSCs 条件培养基的生长培养基。其中后两种培养基中培养的内皮细胞其血管生发速度大大提升。这个实验证实了将成血管细胞与组织工程的种子细胞一起移植, 能够大大的促进移植材料的血管化速度。

本实验虽证实了 EPCs 条件培养基可促进 ADSCs 的增殖和分化, 且随着条件培养基浓度的增加,

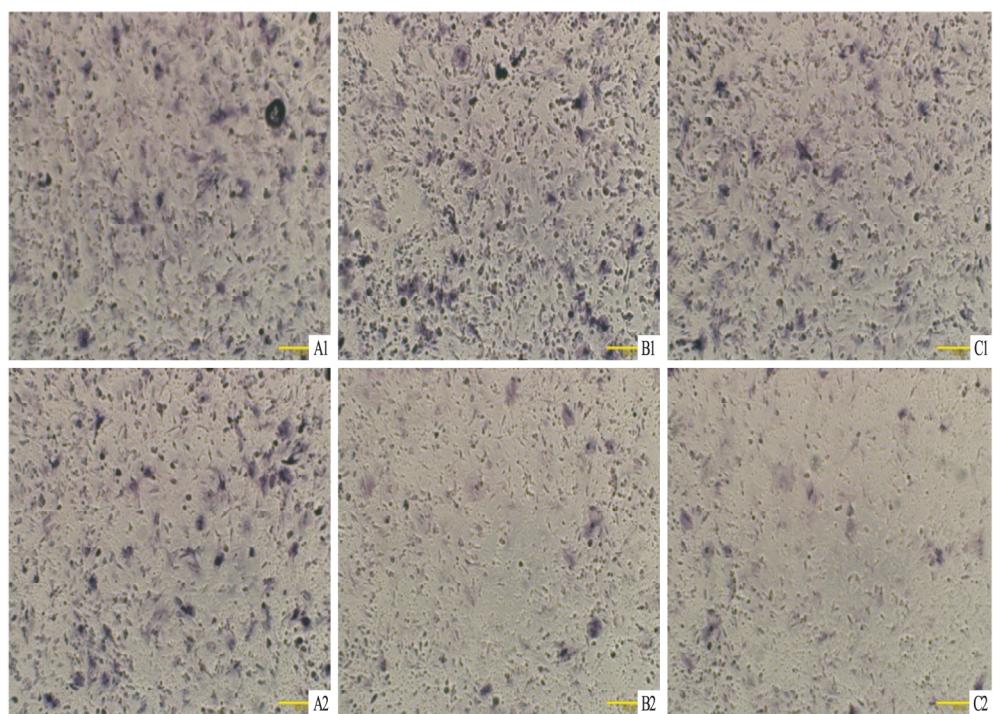


图6 ALP定性鉴定 ALP染色 $\times 100$

A: 100% EPC-CM组; B: 50% EPC-CM组; C: 对照组; 1: 诱导培养3周后; 2: 诱导培养2周后

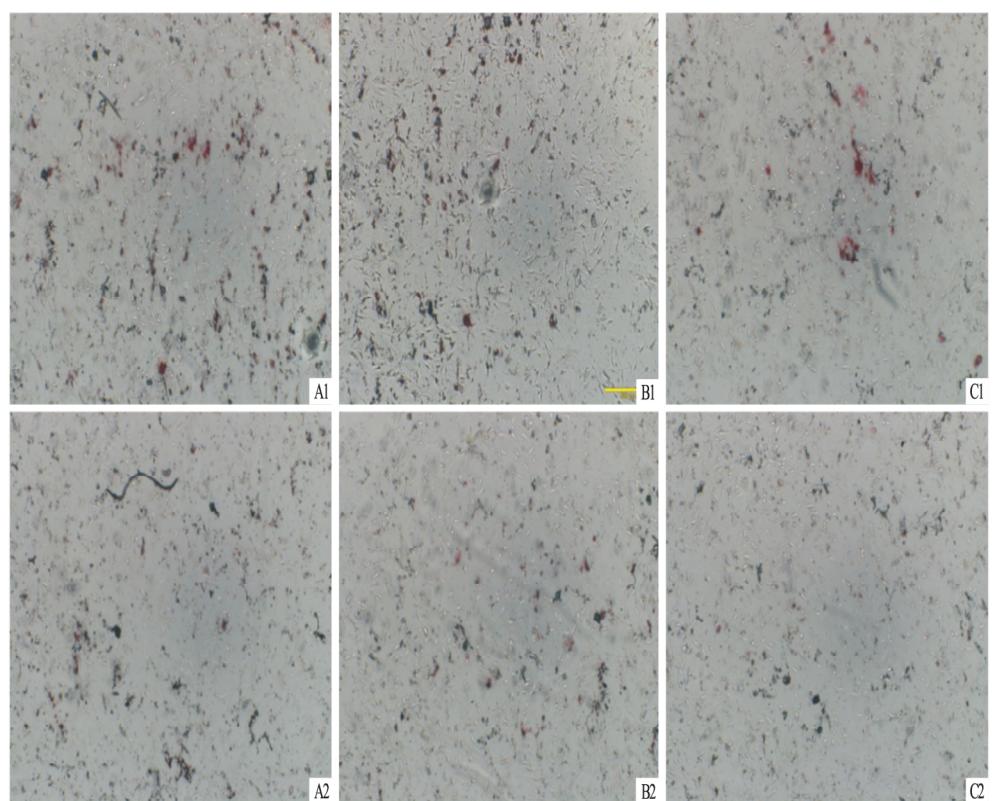


图7 钙结节定性鉴定 茜素红染色 $\times 100$

A: 100% EPC-CM组; B: 50% EPC-CM组; C: 对照组; 1: 诱导培养3周后; 2: 诱导培养2周后

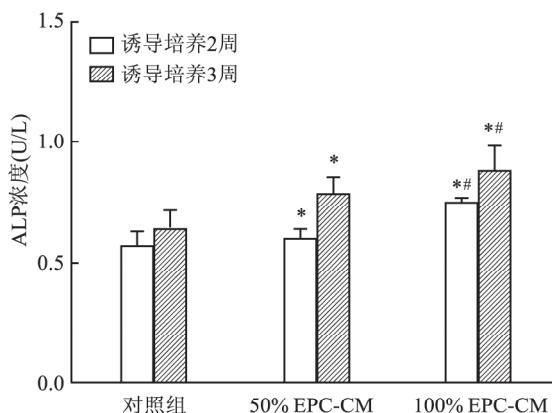


图8 ADSCs 经诱导培养后 ALP 定量检测

与对照组相比: \* P &lt; 0.05; 与 50% EPC-CM 组相比: \*\* P &lt; 0.01

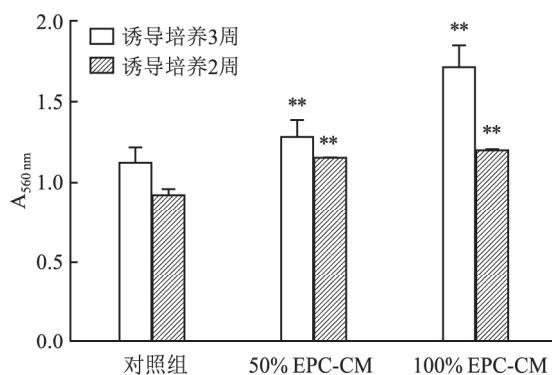


图9 钙离子含量定量检测

与对照组相比: \*\* P &lt; 0.01

这种影响也逐渐增强,但并未完全阐明条件培养基中何种细胞因子通过何种方式发挥作用,且未能尽述其中的细胞因子是否具有协同作用或拮抗作用。且体内环境与体外环境存在较大差异,两种细胞在活体内的相互作用方式及相互影响的作用机制仍有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] Wyles C C , Houdek M T , Crespo Diaz R J , et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells are phenotypically superior for regeneration in the setting of osteonecrosis of the femoral head [J]. Clin Orthop Relat Res , 2015 , 473( 10) : 3080 - 90.

- [2] Zuk P A , Zhu M , Mizuno H , et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies [J]. Tissue Eng , 2001 , 7: 211 - 28.
- [3] Larrivee B , Karsan A. Involvement of marrow-derived endothelial cells in vascularization [J]. Handb Exp Pharmacol , 2007 ( 180) : 89 - 114.
- [4] Asahara T , Murohara T , Sullivan A , et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis [J]. Science , 1997 , 275 ( 5302) : 964 - 7.
- [5] Li Q , Wang Z. Influence of mesenchymal stem cells with endothelial progenitor cells in co-culture on osteogenesis and angiogenesis: an *in vitro* study [J]. Arch Med Res , 2013 , 44( 7) : 504 - 13.
- [6] 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.
- [7] Martin J R , Houdek M T , Sierra R J. Use of concentrated bone marrow aspirate and platelet rich plasma during minimally invasive decompression of the femoral head in the treatment of osteonecrosis [J]. Croat Med J 2013 , 54: 219 - 24.
- [8] Houdek M T , Wyles C C , Sierra R J. Osteonecrosis of the femoral head: treatment with ancillary growth factors [J]. Curr Rev Musculoskelet Med 2015 , 8( 3) : 233 - 9.
- [9] Gangji V , De Maertelaer V , Hauzeur J P. Autologous bone marrow cell implantation in the treatment of non-traumatic osteonecrosis of the femoral head: five year follow-up of a prospective controlled study [J]. Bone 2011 , 49( 5) : 1005 - 9.
- [10] Kim J Y , Song S H , Kim K L , et al. Human cord blood-derived endothelial progenitor cells and their conditioned media exhibit therapeutic equivalence for diabetic wound healing [J]. Cell Transplantation 2010 , 19( 12) : 1635 - 44.
- [11] Xu W L , Ong H S , Zhu Y , et al. In situ release of VEGF enhances osteogenesis in 3D porous scaffolds engineered with osterix-modified adipose-derived stem cells [J]. Tissue Eng Part A 2017 , 23( 9 - 10) : 445 - 57.
- [12] Zhao X , Liu L , Wang F K , et al. Coculture of vascular endothelial cells and adipose-derived stem cells as a source for bone engineering [J]. Ann Plast Surg , 2012 , 69( 1) : 91 - 8.
- [13] Kaigler D , Krebsbach P H , Polverini P J , et al. Role of vascular endothelial growth factor in bone marrow stromal cell modulation of endothelial cells [J]. Tissue Eng , 2003 , 9( 1) : 95 - 103.

## Effects of endothelial progenitor cells conditioned medium on osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells

Cao Le , Fang Xiao , Ding Zhenfei , et al

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

**Abstract** **Objective** To explore the influence of the SD rat bone marrow -derived endothelial progenitor cells

网络出版时间: 2018-4-27 9:40 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180426.1411.015.html>

## MeCP2 增加 LPS 诱导小鼠肺泡巨噬细胞的炎症因子分泌

郑 松<sup>1 2</sup>, 王殿超<sup>1 2</sup>, 张 磊<sup>3</sup>

**摘要** 目的 探讨甲基化 CpG 结合蛋白( MeCP2) 对小鼠肺泡巨噬细胞 MH-S 分泌炎症因子的作用。方法 采用 MeCP2-siRNA 抑制 MeCP2 表达, 使用 Q-PCR、ELISA 和 Western blot 方法检测 MeCP2、白介素( IL)-1β、IL-6、肿瘤坏死因子( TNF)-α、p-p65 和 p-IκBα 的表达情况。结果 Q-PCR 和 ELISA 结果显示脂多糖( LPS) 能够诱导 MH-S 分泌炎症因子 IL-1β、IL-6 和 TNF-α, 并且 MeCP2 表达也随之显著升高( $P < 0.01$ )。使用 MeCP2-siRNA 抑制 MeCP2 表达后, 炎症因子 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 表达明显降低, 同时 p-p65 和 p-IκBα 表达也显著下调( $P < 0.01$ )。结论 抑制 MeCP2 表达能够抑制 LPS 刺激 MH-S 细胞分泌炎症因子, 可能是通过抑制 NF-κB 的活化, 但具体机制尚需进一步研究。

2018-01-31 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金( 编号: 81100302)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽省胸科医院, 合肥 230022

<sup>2</sup> 安徽医科大学胸科临床学院, 合肥 230022

<sup>3</sup> 安徽医科大学药学院, 安徽省天然药物活性研究重点实验室, 合肥 230032

作者简介: 郑 松 男 本科 主治医师;

张 磊 女 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: amuleizhang@163.com

**关键词** MeCP2; MH-S; 炎症因子; NF-κB

**中图分类号** R 34; R 562.1; R 563

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2018)05-0734-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.05.015

甲基化 CpG 结合蛋白( methyl-CpG-binding protein 2, MeCP2) 是一种甲基化调控蛋白, 能够特异性与甲基化 DNA 结合, 形成复合物来抑制目的蛋白转录。众多文献<sup>[1-2]</sup> 报道, MeCP2 能够通过调控甲基化水平参与细胞的增殖、迁移、凋亡等多种生理病理过程。研究<sup>[3]</sup> 表明 MeCP2 可以通过 PTCH1/GLIS1 通路调控人急性单核细胞白血病单核细胞株分泌白介素( interleukin, IL)-6 和肿瘤坏死因子( tumour necrosis factor, TNF)-α 的表达, 但是 MeCP2 在炎症性肺病中的作用未见报道。该研究通过 siRNA 沉默等技术抑制 MeCP2 的表达, 探讨其对小鼠肺泡巨噬细胞小鼠肺泡巨噬细胞( MH-S) 分泌炎症因子 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的作用, 为炎症性肺病提供基础研究。

conditioned medium ( EPC-CM) on the proliferation and osteoblastic differentiation ability of adipose-derived mesenchymal stem cells ( ADSCs) . **Methods** *In vitro*, isolation, culture and identified adipose mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells( EPCs) . EPC-CM was divided into three different concentrations: the control group ( cultured with LG-DMEM) , 50% EPC-CM group ( cultured with 50% EPC-CM and 50% LG-DMEM) and 100% EPC-CM group ( cultured with 100% EPC-CM) . The proliferation activity of the ADSCs were tested by the CCK-8 method. Alizarin red staining and ALP staining was used to qualitative analysis ADSC osteogenic differentiation ability. Quantitative test of ALP and calcium ion was used to analyze ADSCs osteogenic differentiation ability between three groups. **Results** Immunofluorescence test showed that ADSCs had high expression of CD90, and could differentiate into osteoblasts and adipocytes and chondrocytes. The second generation of EPCs had high expression of CD133 and VEGFR2. In a 96-well culture plate coated with matrix can form a tube-like structure, and it can specificity intake Dil-acLDL and FITC-UEA-1. The proliferation activity of 50% EPC-CM group and 100% EPC-CM group were significantly increased compared with control group, and associated with the concentration of EPC-CM( $P < 0.05$ ) . Quantitative test of ALP after cultured 14 d and 21 d, the ALP activity of ADSCs in 50% EPC-CM group and 100% EPC-CM group were higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ) . In the 14th day and 21th day, calcium ions content in 50% EPC-CM group and 100% EPC-CM group were higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ) . **Conclusion** EPC-CM can promote the proliferation and osteogenesis differentiation ability of ADSCs, which partly illustrates the mechanism of vascularization cells influence on bone formation.

**Key words** adipose-derived mesenchymal stem cells; endothelial progenitor cells; osteoblastic differentiation