

大鼠脂肪间充质干细胞体外分离 培养及 CM-DiI 标记后的传代示踪

周虹¹ 郭杏¹ 李丹¹ 高小春¹ 熊爱兵¹ 谭美云²

摘要 目的 建立大鼠脂肪间充质干细胞(ADSCs)体外分离培养和细胞标记的方法,探讨 CM-DiI 标记 ADSCs 在体外传代示踪的可行性。方法 无菌切取 SD 大鼠腹股沟脂肪组织,运用酶原消化并差速贴壁的方法获取原代细胞并进行传代培养。观察细胞形态,对第 3 代 ADSCs 进行细胞表型鉴定和成骨成脂分化能力鉴定。采用 CM-DiI 标记第 3 代 ADSCs 并进行传代培养,荧光显微镜和激光扫描共聚焦显微镜观察荧光标记情况,流式细胞仪检测标记率。结果 ADSCs 呈长梭形、漩涡样生长,传代后细胞生长增殖速度加快。流式细胞仪检测结果显示 CD29、CD90 阳性表达,CD34、CD45、CD31 阴性表达。茜素红和油红 O 染色显示 ADSCs 具有成骨成脂分化潜能。CM-DiI 标记的红色荧光存在于细胞膜和细胞质,不存在于细胞核,传代培养后荧光有所衰减,第 3、6、9 代的荧光标记率分别为 97.09%、66.21% 和 37.86%。结论 大鼠 ADSCs 的生长增殖能力强,具有多向分化潜能,采用 CM-DiI 标记 ADSCs 简单易行且示踪效果良好,可为后期体内实验提供依据。

关键词 脂肪间充质干细胞; 细胞培养; CM-DiI; 细胞标记

中图分类号 Q 813.1+1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)11-1590-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.11.008

脂肪间充质干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)在 2001 年首先由 Zuk et al^[1] 从人脂肪组织中发现,其类似于骨髓间充质干细胞,能够稳定增殖及自我更新,具有多向分化潜能。与其他干细胞相比,ADSCs 具有来源广泛、取材容易且获取率高、体外扩增快、细胞老化率低、免疫原性低等优点^[2],其本身也具有血管原性和抗炎活性,能促进组织新生

血管形成^[3],这些优点使得 ADSCs 成为优势细胞而备受关注。CM-DiI 是一种亲脂性荧光染料,不溶于水,容易嵌进生物膜内并作定向扩散运动标记整个胞膜,也能通过活体细胞胞饮作用进入胞质从而标记整个胞质^[4],并且其无细胞毒性,不影响细胞生长和增殖,标记时间长,易于操作,适合标记和示踪细胞^[5]。该研究以 CM-DiI 标记 ADSCs 并传代示踪,用流式细胞仪检测传代后的荧光标记率,为后期进行体内实验提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 DMEM/F12 培养基、胰蛋白酶(美国 HyClone 公司);胎牛血清(杭州四季青公司);I 型胶原酶(美国 Sigma 公司);成脂成骨诱导液(广州赛业公司);CD29、CD90、CD34、CD45、CD31 抗体及大鼠相应的同型对照抗体、流式细胞仪(美国 BD 公司);CM-DiI(美国 Molecular Probe 公司,编号 c7000);生物安全柜(西班牙 Telstar 公司, Telstar Bio II A);CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司);倒置相差显微镜、倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司);激光扫描共聚焦显微镜(德国 Leica 公司)。

1.2 实验动物 6 周龄雄性 SPF 级 SD 大鼠 2 只,150~180 g,由西南医科大学实验动物中心提供。实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准。

1.3 实验方法

1.3.1 ADSCs 分离、培养、传代 用 2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠后将其脱颈处死,在 75% 酒精中浸泡消毒 10 min,无菌切取两侧腹股沟处皮下脂肪组织,放于 PBS 中反复冲洗 3 次,尽可能完全剔除血管和筋膜,再用眼科剪将其剪碎至糊状,装入无菌的 50 ml 离心管中,加入 2~3 倍体积的 0.1% I 型胶原酶,置于 37℃ 恒温水浴中震荡消化 60 min(期间反复震荡混匀至少 3 次),直至脂肪组织呈乳糜状,加入等量完全培养基终止消化,70 μm 滤网过滤后再加入完全培养基 1 500 r/min 离心 10 min,弃上清液和上层脂肪液,加入 PBS 吹打混匀后 1 000

2016-06-27 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号:31271049);四川省卫生厅科研课题(编号:090228);泸州市科学技术局指导性科技计划项目(编号:2010-6)

作者单位: 西南医科大学附属医院¹ 整形烧伤科、² 骨关节外科,泸州 646000

作者简介: 周虹,女,硕士研究生;

郭杏,女,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者,

E-mail: gx412@126.com

r/min 离心 5 min, 弃上清液, 最后加入完全培养基重悬吹打混匀, 以 5×10^5 /ml 细胞数接种, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。24 h 后, 全量换液。根据细胞生长情况 2~3 d 换液 1 次, 倒置相差显微镜下观察细胞形态变化。待细胞达 80%~90% 融合时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。

1.3.2 流式细胞仪鉴定 ADSCs 将第 3 代细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化后分装入 10 个 EP 管中, 制备 100 μ l 细胞密度为 1×10^6 /ml 的单细胞悬液。前 5 管为阴性对照, 加入等量相应的同型对照抗体。其余 5 管分别加入 CD29-APC、CD90-PE-Cy7、CD34-PE、CD45-PerCP、CD31-PE 各 1 μ l, 室温避光孵育 15~20 min, 400 μ l PBS 重悬后, 上流式细胞仪检测。

1.3.3 ADSCs 的成骨成脂分化潜能 以每孔 2×10^5 个细胞的密度将第 3 代 ADSCs 接种到 6 孔板中, 待细胞融合度达到 80%~90% 时分别更换成骨和成脂分化诱导培养基进行诱导培养, 更换等量的完全培养基作为阴性对照。成骨诱导 3 周后采用茜素红染色观察细胞的成骨分化效果。成脂分化诱导 2 周后采用油红 O 染色观察细胞的成脂分化效果。阴性对照组也进行相应染色。

1.3.4 CM-DiI 荧光标记 ADSCs 取出一支 CM-DiI 室温避光溶解后向管中加入 50 μ l DMSO 混匀, 以 4 μ l CM-DiI 与 1 ml PBS 配成浓度为 4 g/L 的工作液。将 1×10^6 个细胞重悬于 1 ml CM-DiI 工作液中, 先将其置于 37℃ 避光孵育 20 min, 再置于 4℃ 避光孵育 15 min。1 000 r/min 离心 5 min, 将细胞分为 3 部分, 一部分用于流式细胞仪检测 CM-DiI 的标记率, 另一部分用于荧光显微镜和激光扫描共聚焦显微镜照相, 最后一部分用于传代培养。

2 结果

2.1 ADSCs 的形态学观察 在倒置相差显微镜下观察, 刚接种到培养瓶的原代细胞比较杂, 有大量呈圆形的细胞和少数脂滴漂浮, 见图 1A。约 4 h 时, 细胞开始贴壁, 24 h 换液时见部分细胞呈梭形、三角形, 但仍有少量脂滴, 见图 1B。此后的 2~4 d, 细胞大部分伸展、体积变大, 在 4 d 再次换液时已可见细胞呈集落或团簇样生长, 呈鱼群和旋涡状, 见图 1C。细胞在 7~8 d 已有 80%~90% 融合, 随即消化传代。消化传代后的细胞生长增殖速度明显较原代细胞快, 细胞逐渐变纯, 已无脂滴漂浮, 见图 1D。到

第 3 代后的细胞越发纯化, 约不到 1 h 时即贴壁, 生长增殖迅速, 形态均一, 呈现明显的鱼群和旋涡状生长, 见图 1E。连续传至 11 代时, 细胞形态无明显变化, 见图 1F。

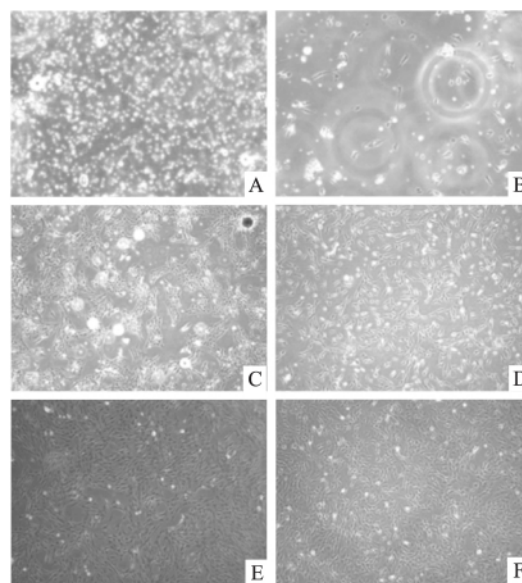


图 1 倒置相差显微镜下大鼠 ADSCs 形态观察

A: 刚接种的原代细胞形态 $\times 40$; B: 接种 24 h 时的细胞形态 $\times 100$; C: 接种 4 d 时的细胞形态 $\times 40$; D: 第 1 代细胞形态 $\times 40$; E: 第 3 代细胞形态 $\times 40$; F: 第 11 代细胞形态 $\times 40$

2.2 流式细胞仪鉴定细胞表型 第 3 代 ADSCs 的表面标志物 CD29、CD90 阳性表达, 表达率分别为 95.04%、99.65%; 而 CD34、CD45、CD31 阴性表达, 表达率分别为 0.17%、0.20%、0.14%。见图 2。

2.3 ADSCs 的体外诱导成骨成脂分化 成骨诱导 3 周时, 见部分细胞形态较模糊, 部分呈椭圆形、多形性, 细胞间形成钙质沉积, 茜素红染色呈阳性, 见图 3A; 成脂诱导 4 d 时, 可见部分细胞由长梭形变为肥大增宽的多形性细胞, 细胞质内开始出现小脂滴, 随着诱导时间延长, 脂滴开始增多、变大, 2 周时可见大多数细胞胞质内出现大小不一的脂滴, 油红 O 染色呈阳性, 见图 3B; 对照组染色呈阴性结果, 见图 3C、3D。

2.4 ADSCs 的 CM-DiI 体外标记结果 第 3 代 ADSCs 标记好后荧光显微镜观察, 几乎全部细胞标记为红色荧光, 见图 4A。贴壁后激光扫描共聚焦显微镜观察显示 CM-DiI 标记细胞膜和细胞质, 不标记细胞核, 见图 4B。传代培养后, 荧光有所衰减。传第 6 代时, 红色荧光仍较强, 但较前减弱, 见图 4C; 传第 9 代时, 荧光强度明显减弱, 但未消失, 见图 4D。

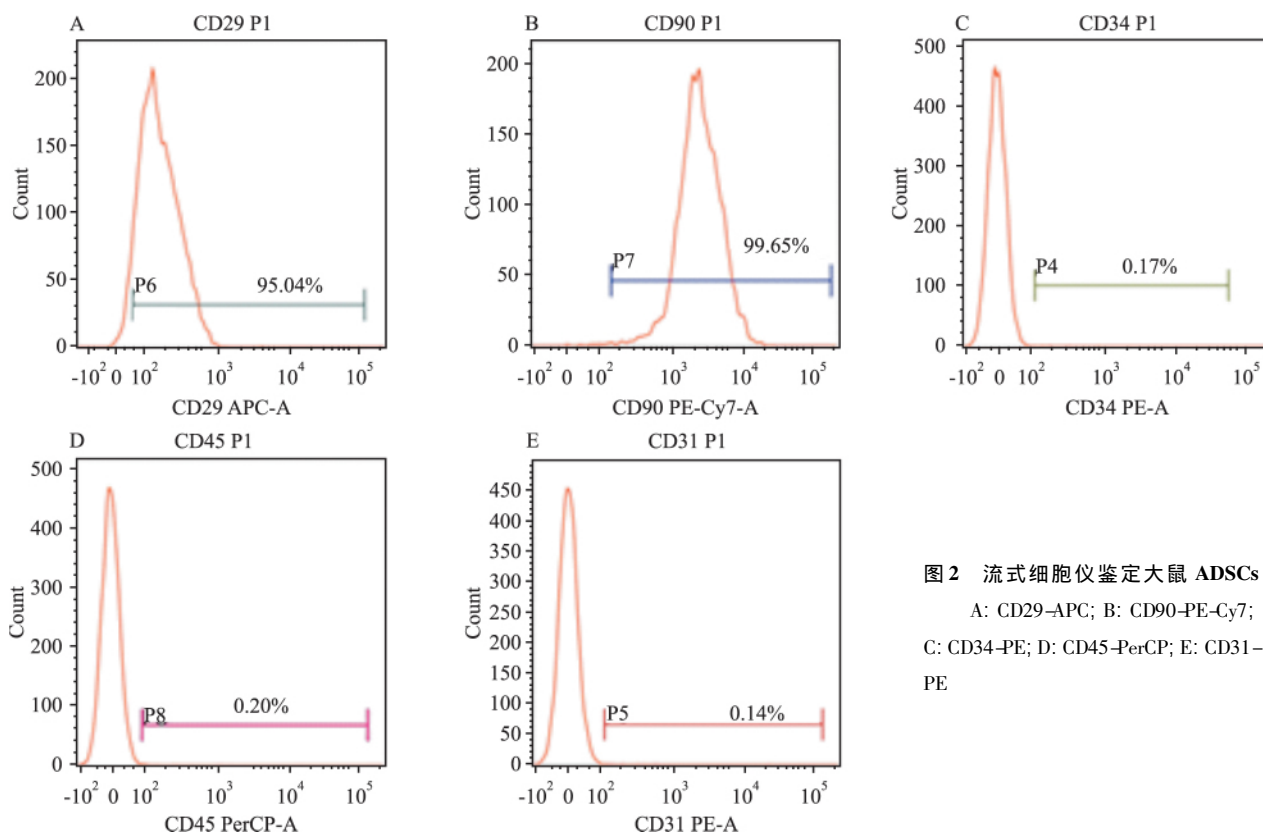


图2 流式细胞仪鉴定大鼠 ADSCs

A: CD29-APC; B: CD90-PE-Cy7;
C: CD34-PE; D: CD45-PerCP; E: CD31-PE

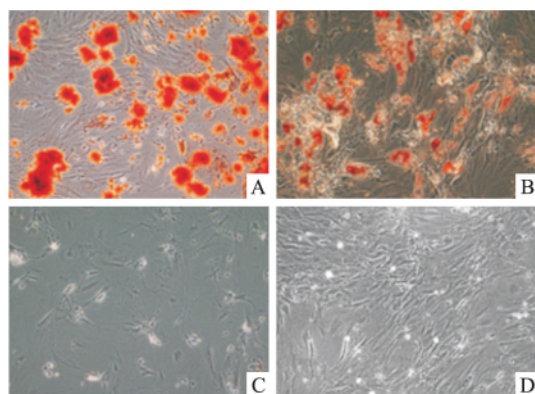


图3 大鼠 ADSCs 成骨成脂分化

A: 成骨实验组茜素红染色 $\times 100$; B: 成脂实验组油红 O 染色 $\times 200$; C: 成骨对照组茜素红染色 $\times 100$; D: 成脂对照组油红 O 染色 $\times 100$

第3、6、9代 ADSCs 的 CM-DiI 荧光标记率分别为 97.09%、66.21% 和 37.86% ,见图5。

3 讨论

研究^[6]显示,ADSCs 与骨髓间充质干细胞有着相似的生物学性状、细胞表型和分化潜能,但其有来源丰富、增殖率高、自体移植不产生排异反应等优点而广泛应用于再生医药和组织工程领域中。本实验采用酶原消化并差速贴壁的方法分离培养 ADSCs ,

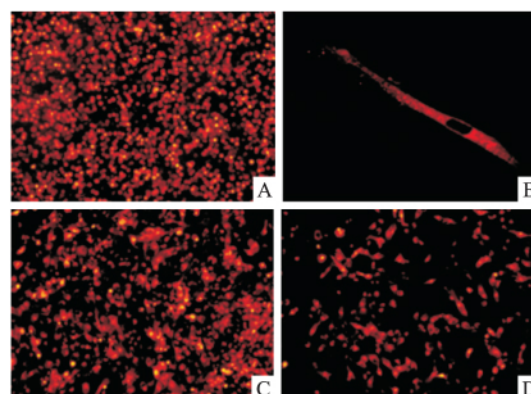


图4 CM-DiI 标记大鼠 ADSCs

A: 荧光显微镜下 CM-DiI 标记的第3代悬浮状态的 ADSCs $\times 100$; B: 激光扫描共聚焦显微镜下 CM-DiI 标记的贴壁状态的 ADSCs $\times 400$; C: 荧光显微镜下 CM-DiI 标记的第6代贴壁状态的 ADSCs $\times 100$; D: 荧光显微镜下 CM-DiI 标记的第9代贴壁状态的 ADSCs $\times 100$

酶的浓度和消化时间是原代细胞提取成功的关键因素,实验中采用 0.1% 的 I 型胶原酶消化 60 min ,多次预实验证明这是一个比较好的浓度和时间。对于取材部位,近年来先后有文献^[7-8]报道取材于背部、颈部、附睾、肠系膜、腹腔的 ADSCs。但在之前的预实验中发现附睾、腹腔等处的脂肪组织都较少,难以满足实验对细胞量的需求,所以本实验在取材时选

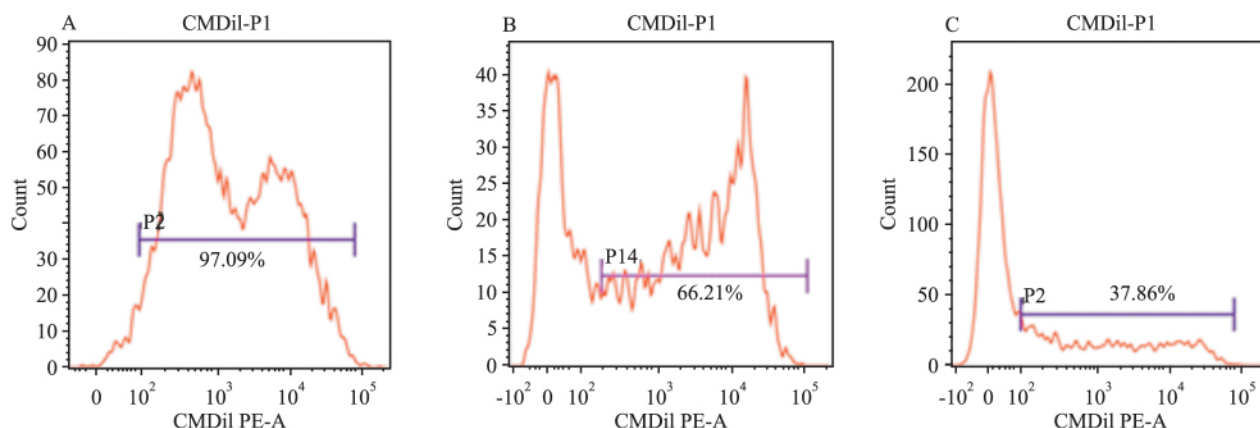


图5 流式细胞仪检测第3、6、9代ADSCs的CM-DiI荧光标记率
A: 第3代ADSCs; B: 第6代ADSCs; C: 第9代ADSCs

取SD大鼠腹股沟处皮下脂肪组织,此处脂肪组织最为丰富,便于尽可能多的分离ADSCs,只要尽可能剔除其中的血管和筋膜,避免过多的杂细胞混入就能提取出较纯的ADSCs。在消化脂肪组织的过程中未使用任何裂解液来裂解混杂的红细胞,因红细胞有不贴壁的特性,待ADSCs贴壁后便可以通过换液去除,这样也可以避免裂解液对ADSCs的损伤和影响作用^[9]。同时通过换液和消化传代可以去除漂浮的脂滴和杂细胞,使细胞得以纯化。在培养过程中,见ADSCs呈长梭形、多角形、鱼群样、漩涡样生长,传代后细胞生长增殖速度快,连续传至11代细胞形态无明显变化,证明其生长增殖能力强。

已有研究^[5,10-11]表明,ADSCs能够表达CD13、CD44、CD29、CD73、CD90、CD59、CD105、CD166、STRO-1等,而不表达CD3、CD4、CD31、CD34、CD45、CD56、CD106等。该研究选取CD29、CD90、CD34、CD45、CD31作为检测的表面标志物,结果显示CD29、CD90阳性表达,表达率分别为95.04%、99.65%;CD34、CD45、CD31阴性表达,表达率分别为0.17%、0.20%、0.14%,可以初步证明本实验分离培养所得细胞为ADSCs,且细胞纯度较高。要进一步证实其为ADSCs还必须对其进行分化诱导检测,该研究对第3代实验组细胞行成骨成脂诱导分化,在诱导3周时对其进行茜素红染色,可见钙结节沉积,在诱导2周时对其行油红O染色,可见细胞质内有大小不一的脂滴形成,而对照组细胞无上述表现,证明所分离培养细胞具有成骨成脂分化潜能,为ADSCs。

近年来,用于细胞标记示踪的方法主要有荧光

染料标记法(DiI、DAPI、PKH26、Hoechst33342/33258等)、GFP标记法、核酸标记法(同位素标记、5-BrdU标记等)及Y染色体标记法等^[12],都各有其特点。但是上述方法或多或少有操作繁琐、标记时间短且标记率不高、对细胞有一定毒性等缺点而限制了其应用。而CM-DiI为一种羰花青亲脂性荧光染料,其荧光激发波长为553 nm,发射波长为570 nm,能够与细胞质和细胞膜结合发出强大的红色荧光,并且对细胞无毒性作用,适于标记和示踪细胞^[13]。我国也有研究者用CM-DiI标记骨髓间充质干细胞、人脐带间充质干细胞和兔外周血平滑肌祖细胞^[14-15],均证明CM-DiI标记细胞简单易行、染色速度快、对细胞无毒性,具有良好的应用前景。该研究用CM-DiI标记SD大鼠ADSCs,由于ADSCs为贴壁细胞,标记时可采用以下两种方法:一是将贴壁细胞消化后离心成细胞沉淀,再直接用CM-DiI工作液重悬,先将其置于37℃避光孵育20 min,再置于4℃避光孵育15 min;二是将贴壁细胞用PBS清洗2~3遍后,直接用CM-DiI工作液标记,保证染液恰好覆盖全层细胞即可,先将其置于37℃避光孵育20 min,再置于4℃避光孵育15 min。该研究采用第一种方法标记第3代SD大鼠ADSCs,荧光显微镜下观察几乎全部细胞标记为红色荧光,流式细胞仪测标记率为97.09%,传代至第6代时荧光仍较强,标记率为66.21%,传代至第9代时荧光减弱较快,但仍未消失,标记率为37.86%,证明CM-DiI标记后的ADSCs可稳定传代,维持荧光存在。传代后标记率减低、荧光强度逐渐减弱的原因可能是:①实验过程中细胞换液、传代未能完全避光;②细胞增殖分裂

导致染料相对减少; ③ CM-DiI 自发出现荧光淬灭;
④ 显微镜观察拍照时间过久导致荧光减少。

综上所述, 运用酶原消化并差速贴壁的方法可获取纯度高、生长增殖能力强和具有多向分化潜能的 ADSCs, CM-DiI 标记细胞简单易行, 标记率高, 具有标记细胞后传代示踪的可行性, 可作为标记和示踪 SD 大鼠脂肪间充质干细胞的良好荧光染料。

参考文献

- [1] 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(2): 211–28.
- [2] Taha M F, Hedayati V. Isolation, identification and multipotential differentiation of mouse adipose tissue-derived stem cells [J]. Tissue Cell, 2010, 42(4): 211–6.
- [3] Zografou A, Papadopoulos O, Tsigris C, et al. Autologous transplantation of adipose-derived stem cells enhances skin graft survival and wound healing in diabetic rats [J]. Ann Plast Surg, 2013, 71(2): 225–32.
- [4] Wei H, Ooi T H, Tan G, et al. Cell delivery and tracking in post-myocardial infarction cardiac stem cell therapy: an introduction for clinical researchers [J]. Heart Fail Rev, 2010, 15(1): 1–14.
- [5] Dong Y, Hassan W U, Kennedy R, et al. Performance of an in situ formed bioactive hydrogel dressing from a peg-based hyperbranched multifunctional copolymer [J]. Acta Biomater, 2014, 10(5): 2076–85.
- [6] Wilson A, Butler P E, Seifalian A M. Adipose-derived stem cells for clinical applications: A review [J]. Cell Prolif, 2011, 44(1): 86–98.
- [7] Hsu L W, Goto S, Nakano T, et al. The effect of exogenous histone h1 on rat adipose-derived stem cell proliferation, migration, and osteogenic differentiation *in vitro* [J]. J Cell Physiol, 2012, 227(10): 3417–25.
- [8] 李玲慧, 丁道芳, 龚浩, 等. 大鼠腹腔脂肪干细胞的分离培养及诱导成骨 [J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(23): 4232–9.
- [9] Strem B M, Hicok K C, Zhu M, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells [J]. Keio J Med, 2005, 54(3): 132–41.
- [10] Hadad I, Johnstone B H, Brabham J G, et al. Development of a porcine delayed wound-healing model and its use in testing a novel cell-based therapy [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2010, 78(3): 888–96.
- [11] Huang S P, Huang C H, Shyu J F, et al. Promotion of wound healing using adipose-derived stem cells in radiation ulcer of a rat model [J]. J Biomed Sci, 2013, 20: 51.
- [12] Yang H N, Park J S, Na K, et al. The use of green fluorescence gene (gfp)-modified rabbit mesenchymal stem cells (rmscs) co-cultured with chondrocytes in hydrogel constructs to reveal the chondrogenesis of mscs [J]. Biomaterials, 2009, 30(31): 6374–85.
- [13] Li N, Yang H, Lu L, et al. Comparison of the labeling efficiency of brdu, dii and fish labeling techniques in bone marrow stromal cells [J]. Brain Res, 2008, 1215: 11–9.
- [14] 毛雨红, 莫碧文, 李芳冬, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞体外培养及 CM-DiI 标记的实验研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2013, 48(6): 607–11.
- [15] 周六化, 杨斌, 夏佳东, 等. CM-DiI 标记兔外周血平滑肌祖细胞可行性分析 [J]. 南京大学学报(自然科学版), 2014, 50(1): 1–8.

Isolation, culture of rat adipose-derived stem cells and passage tracing after CM-DiI labeling *in vitro*

Zhou Hong, Guo Xing, Li Dan, et al

(Dept of Burns and Plastic Surgery, The Affiliated Hospital of South Medical University, Luzhou 646000)

Abstract Objective To establish a method for isolation, culture and cell labeling of rat adipose-derived stem cells (ADSCs) and investigate the passage tracing feasibility of CM-DiI labeled ADSCs *in vitro*. **Methods** Adipose tissue was harvested from the inguinal fat pad of Sprague-Dawley rats under sterile conditions. By means of combining zymogen digestion with differential velocity adherence, the primary cells were isolated. They were used on serial subcultivation. The morphology of cells was observed by inverted phase contrast microscope. The molecular phenotype and differentiation potentiality of three passaged ADSCs were identified. Three passaged ADSCs were labeled by CM-DiI and they were used on serial subcultivation. Fluorescence labeling of cells were observed under the fluorescence inverted microscope and laser scanning confocal microscope. The labeling rate was detected by flow cytometry. **Results** ADSCs showed long spindle shape and vortex like growth. After passages, the growth and proliferation rate of cells were accelerated. The cells were identified positive for CD29 and CD90 makers, and they showed

网络出版时间: 2016-10-12 13:23:00 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20161012.1323.009.html>

RACK1 突变体在哺乳动物细胞中的表达及定位研究

朱亮亮 韩 卢 王蓓华 耿慧武 潘林鑫 刘晓颖 范礼斌¹

摘要 目的 根据活化蛋白激酶 C 受体 1(RACK1) 的蛋白结构 构建其缺失突变体的真核表达质粒 研究 RACK1 缺失突变体在真核细胞内的表达及定位改变。方法 根据 RACK1 蛋白的结构域特点 以 pcDNA3.1-RACK1-FLAG 为模板 构建真核表达质粒 pcDNA3.1-RACK1(51-317)-FLAG、pcDNA3.1-RACK1(93-317)-FLAG、pcDNA3.1-RACK1(135-317)-FLAG、pcDNA3.1-RACK1(180-317)-FLAG、pcDNA3.1-RACK1(219-317)-FLAG; Western blot 检测上述重组质粒在 HEK 293T 细胞中的表达; 免疫荧光技术检测 RACK1 的各缺失突变体在 COS7 细胞中的定位情况。结果 成功构建了 RACK1 各缺失突变体的真核表达质粒; Western blot 结果表明 除 pcDNA3.1-RACK1(219-317)-FLAG 外 其余缺失突变体在 HEK 293T 细胞中均有效表达; 免疫荧光实验表明 RACK1 缺失突变体在 COS7 细胞中主要定位在胞质 细胞核中也有少量分布。结论 成功构建了 RACK1 缺失突变体真核表达质粒 并在 HEK 293T 和 COS7 细胞中成功表达; 在 COS7 细胞中不同缺失突变体的表达定位均有差异 与野生型的 RACK1 相比也有所不同 表明缺失不同的结构域后其在细胞中的定位表达也发生了改变。这为研究 RACK1 各结构域的功能提供了重要依据。

关键词 突变体; 质粒构建; 免疫荧光; Western blot; 结构域中图分类号 Q 28; R 392.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)11-1595-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.11.009

2016-07-07 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(编号: 81201368)

作者单位: 安徽医科大学生命科学院生物学系 合肥 230032

作者简介: 朱亮亮 男 硕士研究生;

刘晓颖 女 副教授 责任作者 E-mail: liuxiaoying@ahmu.edu.cn;

范礼斌 男 教授 硕士生导师 责任作者 E-mail: lfan@ahmu.edu.cn

活化蛋白激酶 C 受体 1(the receptor for activated C kinase 1, RACK1) 是由 7 个 WD40(Trp-Asp) 重复结构域组成的 36 ku 的细胞内支架蛋白 首先是作为锚定蛋白并激活胞内受体蛋白激酶 C(PKC) 被报道^[1] 且能与 PKC β II 相互作用^[2]。RACK1 也命名为鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 β 亚基类似物 1(GNB2L1) 确定为 WD40 结构域蛋白家族成员 在大分子复合物中广泛存在^[3]。RACK1 可以与不同的信号分子如 PER1、PKC ϵ 、Src 相互作用 并作为多种蛋白质与蛋白质相互作用的平台^[4-7]。对于许多激酶和受体来说 RACK1 作为一种支架蛋白 在许多生物反应中起着至关重要的作用 包括免疫应答、细胞生长、黏附、迁移和分化等^[8-10]。该研究根据 RACK1 的 7 个 WD40 重复结构域 对其进行逐个缺失 并构建重组质粒。了解各缺失突变体的表达及定位情况 比较各缺失突变体与野生型的差异 进一步探索各结构域的不同功能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系、菌株等 HEK 293T、COS7、感受态 *E. coli* TG1 细胞、真核表达载体 pcDNA3.1(+)、pcDNA3.1-RACK1-FLAG 均为安徽医科大学生物教研室保存。

1.1.2 主要试剂与仪器 Prime Star 酶购自日本 TaKaRa 公司; 限制性内切酶 Hind III、EcoR V、T4 DNA 连接酶及 Lambda DNA EcoR I + Hind III Marker 购自加拿大 Fermentas 公司; AxyPrep DNA Gel Extraction Kit 购自美国 Axygen 公司; Plasmid Mini Kit 购自美国 Omega Bio-TEK 公司; DMEM 高

the lack of CD34, CD45 and CD31 expressions. Alizarin red and oil red O staining showed ADSCs could be differentiated to osteoblasts and adipocytes. The red fluorescence of CM-DiI labeling existed in the cell membrane and cytoplasm, which did not exist in the cell nucleus. After passages, the fluorescence was attenuated, and the fluorescence labeling rates of the third, sixth and ninth passage were 97.09%, 66.21% and 37.86%, respectively. **Conclusion** Rat ADSCs can grow and proliferate rapidly, and they have multiple differentiation potential. CM-DiI can label ADSCs simply and effectively. These can provide the basis for the following experiment *in vivo*.

Key words adipose-derived stem cells; cell culture; CM-DiI; cell labeling