



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20220177

长白猪骨髓和脂肪间充质干细胞复制性衰老过程中 生物学特性和抗氧化损伤能力的比较

车丽娜, 李凤娇, 赵崇杰, 黄磊, 许慧, 王楠
(天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 为研究对比长白猪骨髓间充质干细胞(bone marrow derived mesenchymal stem cells, BMSCs)和脂肪间充质干细胞(adipose derived mesenchymal stem cells, AMSCs)在体外衰老过程中的生物学特性和抗氧化损伤能力,分别利用贴壁筛选法、I 型胶原酶消化法分离获得 BMSCs 和 AMSCs,利用流式细胞术鉴定细胞,EdU 检测细胞增殖能力,实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测基因表达, β -半乳糖苷酶(β -galactosidase, β -gal)染色检测细胞衰老情况,油红 O 和茜素红染色检测细胞的成脂和成骨分化能力,TUNEL 检测细胞的凋亡情况.分离的 BMSCs 和 AMSCs 均高表达 CD44 和 CD90,不表达 CD45 和 CD34.与 AMSCs 相比,P8 代 BMSCs 增殖能力强,OCT4 和 Ki67 表达高, β -gal 阳性细胞数少,成骨分化能力高.但在成脂分化能力方面,AMSCs 强于 BMSCs.进一步发现 H_2O_2 处理 P8 代细胞时,AMSCs 比 BMSCs 对氧化损伤更敏感,细胞凋亡率显著增加,究其原因可能与抗氧化损伤基因表达的显著降低有关.

关键词: 骨髓间充质干细胞; 脂肪间充质干细胞; 增殖; 衰老; 抗氧化损伤; 生物学特性

中图分类号: S828.9⁺1

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2023)02-0001-10

Comparative Study of Biological Characteristics and Anti Oxidative Damage Ability of Porcine Bone Marrow and Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells During the Replicative Senescence

CHE Lina, LI Fengjiao, ZHAO Chongjie, HUANG Lei, XU Hui, WANG Nan
(College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: In order to study and compare the biological characteristics and antioxidant capacity of bone marrow derived mesenchymal stem cells (BMSCs) and adipose derived mesenchymal stem cells (AMSCs) from Landrace pigs during aging in vitro, BMSCs and AMSCs were isolated by adherent screening method and type I collagenase digestion method respectively. MSCs were identified by using flow cytometry and its proliferation capacity was detected with EdU. The expression of gene was detected by RT-qPCR, cell senescence was detected by β -galactosidase (β -gal) staining, the abilities of adipogenic and osteogenic differentiation of these cells were identified by oil red O staining and alizarin red staining, respectively. The apoptosis of cells was detected by TUNEL method. Both the isolated BMSCs and AMSCs highly expressed CD44 and CD90, but not CD45 and CD34. Compared with AMSCs, BMSCs at P8 had strong proliferative ability, increased expression of OCT4 and Ki67, lower numbers of β -gal positive cells, and higher osteogenic differentiation ability. However, adipogenic differentiation ability of AMSCs were stronger than that of BMSCs. Moreover, when P8 cells were treated with H_2O_2 , AMSCs were more sensitive to oxidative damage than BMSCs, and the apoptosis rate increased significantly. This may be due to the significant reduction of antioxidant gene expression.

Key words: bone marrow mesenchymal stem cells; adipose mesenchymal stem cells; proliferation; senescence; antioxidative damage; biological characteristics

收稿日期: 2022-07-15; 修回日期: 2022-10-12

基金项目: 国家重点研发计划项目(2021YFC2101403)

作者简介: 车丽娜(1996—),女,山东菏泽人,硕士研究生;通信作者: 王楠,教授,wn929@tust.edu.cn

基于对可持续发展、环境负担和动物福利的关注,越来越多的人认为传统肉类需要替代品。细胞培养肉是在健康环保、节能减排等方面均较传统养殖肉类有显著优势的一项变革创新性肉类生产技术^[1]。培养肉的概念由英国前首相丘吉尔于1931年首次提出^[2],经过多年的探索和研究才逐渐变成现实。南京农业大学周光宏教授团队使用第六代长白猪肌肉干细胞经过20d左右的培养,研发生产出我国第一块肌肉干细胞培养肉^[2]。细胞培养肉的生产过程包括种子细胞获取、干性维持、扩大培养和大规模分化等^[2]。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)最早发现于骨髓,具有较强的增殖能力和分化为成骨细胞、脂肪细胞、成肌细胞和软骨细胞等潜能^[3-6]。MSCs具有向肌肉细胞分化的能力,但分化效率较低^[7],尚需研究提高其向肌源性定向分化效率的方法。MSCs也可以作为脂肪组织的种子细胞,用来开发含有脂肪细胞的培养肉组织^[2]。然而,间充质干细胞在体外短期培养后会迅速失去黏附、增殖和分化的能力,这严重限制了细胞培养肉的规模化生产。目前关于间充质干细胞的研究多集中于人类和啮齿类动物,对于畜禽MSCs的生物学特性的研究有限,且已经报道的长白猪间充质干细胞的研究大多集中在适用于生物医学和组织工程的小型长白猪^[8-9],而对于长白猪的间充质干细胞特性及复制性衰老研究较少。因此,研究对比长白猪脂肪间充质干细胞(adipose derived mesenchymal stem cells, AMSCs)和骨髓间充质干细胞(bone marrow derived mesenchymal stem cells, BMSCs)在体外衰老过程中的生物学特性和抗氧化损伤能力,对筛选具有相对优势的种子细胞具有重要的意义。

现有研究^[9-10]表明,间充质干细胞高表达阳性表面标志物CD44和CD90,而不表达阴性表面标志物CD34和CD45。研究^[11]发现细胞的生物学特性由多种因素决定,组织来源是其中较为重要的影响因素之一。由于组织来源的不同,间充质干细胞的增殖能力、细胞活性、干性和多向分化潜能等生物学特性差异较大^[12-16]。近年来,研究人员已经可以从骨髓^[17]、脂肪组织^[18]、皮肤^[19]和脐血^[20]等多种组织中分离获得长白猪的MSCs。关于AMSCs与BMSCs的生长特性也存在争议。He等^[21]证实大鼠BMSCs比AMSCs具有更强的增殖和集落形成能力。与之相反,也有研究^[22]表明AMSCs可能具有更强的增殖潜能。目前针对不同组织来源的长白猪MSCs,尤其是长白猪

MSCs在体外的扩增情况和生物学特性等方面的差异尚未得到充分证明。

随着传代次数的增多, MSCs的生物学特性发生显著改变:一方面,细胞增殖能力显著下降,出现复制性衰老^[23],子代细胞数量锐减,导致干细胞应用效率下降;另一方面,细胞多向分化潜能、DNA损伤修复能力^[24]、抗氧化损伤能力^[24]、免疫调节能力^[25]均下降,细胞内基因表达的变化和氧化损伤的积累,导致细胞质量降低。这些生物学特性的改变将极大影响MSCs作为培养肉种子细胞的安全性。在长期体外培养过程中,长白猪MSCs的抗氧化损伤能力及抗氧化损伤相关基因表达情况也仍不清楚。因此,本研究分别以长白猪BMSCs和AMSCs为研究对象,分离获得并长期培养BMSCs和AMSCs,比较两者在增殖和分化能力方面的特征差异,同时研究其抗氧化损伤能力及抗氧化损伤相关基因的表达情况,探讨其生物学特性与细胞组织来源之间的关系;筛选出在增殖能力、分化能力和抗氧化损伤能力等方面具有相对优势的种子细胞,旨在为细胞培养肉的体外大规模培养提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

1周龄长白猪购自天津市福圣源畜禽养殖场。

1.1.2 主要试剂

DMEM/F12培养基, Gibco公司;胎牛血清, AusGeneX公司; I型胶原酶、油红O、茜素红、地塞米松、抗坏血酸和胰岛素, 北京索莱宝科技有限公司;胰酶, 杭州浦泰生物科技公司;青霉素、链霉素, 上海纪宁实业公司; β -甘油磷酸钠, 北京酷来搏科技有限公司; 吡啶美辛, MCE公司; 抗CD44-APC、CD90-FITC和CD34-PE抗体, BioLegend公司; 抗CD45-PerCP抗体, BD公司; Trizol, Invitrogen公司; M-MLV逆转录酶, Promega公司; Bestar SYBR Green qPCR Master Mix, 上海星汉生物科技有限公司; EdU细胞增殖检测试剂盒, Meilunbio公司; TUNEL细胞凋亡检测试剂盒和细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色试剂盒, 上海碧云天生物技术有限公司; 所用引物由金唯智生物科技(北京)有限公司根据设计合成。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞的分离、纯化和培养

(1) BMSCs 的分离、纯化和培养

取 1 周龄新生小长白猪, 用 3% 戊巴比妥钠麻醉致死, 在后肢与躯干部位连接处周围切开一个切口, 在髌关节处将躯干与后肢分离. 在脚踝处切断踝关节去掉脚掌, 沿骨干刮去骨骼末端结缔组织. 将胫骨和肱骨保存在添加了 5% 青霉素/链霉素的冷 PBS 中. 在无菌环境下剪掉股骨和胫骨末端, 用完全培养基(含有 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基)从切口处冲刷骨髓填充物, 收集 BMSCs. 用 200 目筛网过滤细胞悬浮物, 去除骨髓针状物、肌肉和细胞块. 将稀释至 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 的细胞悬液接种在 100 mm^2 培养皿中, 在 37°C 、5% CO_2 细胞培养箱中培养 24 h 后, 先用 PBS 冲洗贴壁细胞 2~3 次, 更换新鲜的完全培养基, 随后每隔 3~4 d 更换新鲜培养基. 当细胞含量达到 90% 左右时, 用 0.25% 胰酶消化并传代培养. 当细胞传至 P3 代时可获得纯化的 BMSCs.

(2) AMSCs 的分离、纯化和培养

将提取的 1 周龄新生小长白猪的脂肪组织用含有 3% 双抗的 PBS 冲洗 2~3 次, 用干净手术剪将其剪成大小约 1 mm^3 的组织块. 将组织块(约 10 g)移入 50 mL 离心管并加入 8 mL 预冷的 0.1% I 型胶原酶, 用无菌胶布密封离心管口, 37°C 、180 r/min 恒温振荡消化 1 h. 取出离心管, 800 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 加入 8 mL 完全培养基并将细胞吹悬. 将上述细胞悬液用定制的 100 目不锈钢筛网过滤, 用移液枪移入培养皿中, 将稀释至 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 的细胞悬液接种在 100 mm^2 培养皿中培养 24 h 后, 先用 PBS 冲洗细胞 2~3 次, 更换新鲜的完全培养基, 随后每隔 3~4 d 更换新鲜培养基. 当细胞含量达到 90% 左右时传代培养. 当细胞传至 P3 代时可获得纯化的 AMSCs.

1.2.2 流式细胞术鉴定 BMSCs 和 AMSCs

将 P3 代的长白猪 BMSCs 和 AMSCs 以 $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 的细胞密度接种到 6 孔板中, 过夜培养, 胰酶消化后收集到 15 mL 离心管中, 800 r/min 离心 5 min. 用 400 μL PBS 吹悬并将细胞悬液转移至流式管中. 在流式管中分别加入阳性表面标志物 CD44-APC 和 CD90-FITC 抗体以及阴性表面标志物 CD34-PE 和 CD45-PerCP 抗体后充分振荡, 4°C 避光孵育 30 min, 800 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 重复 2 次后, 每管加入 400 μL PBS, 制成细胞悬液. 用流式细胞仪检测后采用 FlowJo-V10.7 软件对结果进行定量

分析.

1.2.3 检测 BMSCs 和 AMSCs 的生长情况

取 P4 代和 P8 代长白猪 BMSCs 和 AMSCs, 以 1×10^4 个/孔的密度分别接种于 24 孔板中. 每天取 3 孔细胞, 0.25% 胰酶消化后用血球计数板计算每孔细胞数, 取 3 孔细胞数的平均值, 连续计数 7 d, 以培养时间为 x 轴, 细胞数为 y 轴, 使用 GraphPad Prism 6.0 统计软件分析并绘制 P4 代和 P8 代长白猪 BMSCs 和 AMSCs 细胞生长曲线.

1.2.4 EdU 染色检测 BMSCs 和 AMSCs 的增殖能力

取 P4 代和 P8 代长白猪 BMSCs 和 AMSCs 细胞, 分别接种于 24 孔板中, 待细胞含量达到 60% 后, 根据 EdU 试剂盒说明书进行后续实验. 在荧光显微镜下观察细胞并拍照. 用 Image J 软件计算增殖细胞数(红色)和总细胞数(蓝色), 其中*表示差异显著($P < 0.05$), **表示差异极显著($P < 0.01$), ***表示差异极其显著($P < 0.001$).

$$r_p = \frac{N_p}{N_t} \times 100\% \quad (1)$$

式中: r_p 为增殖率, N_p 为增殖细胞数, N_t 为总细胞数.

1.2.5 β -半乳糖苷酶染色检测 BMSCs 和 AMSCs 的衰老情况

取 P4 代和 P8 代长白猪 BMSCs 和 AMSCs 细胞, 分别接种于 6 孔板中, 待细胞生长融合度约为 80% 时, 根据 β -gal 染色试剂盒说明书检测细胞衰老情况, 并在倒置显微镜下观察细胞并拍照. 用 Image J 软件进行定量分析.

1.2.6 成骨和成脂分化诱导及鉴定

成骨分化诱导及鉴定: 将 P4 代和 P8 代长白猪 BMSCs 和 AMSCs 细胞接种于 6 孔板中, 当细胞含量达到 90% 后用成骨诱导培养基($10 \mu\text{mol/L}$ β -甘油磷酸钠 + $0.1 \mu\text{mol/L}$ 地塞米松 + $50 \mu\text{mol/L}$ 抗坏血酸 + 1% 双抗 + 10% FBS + DMEM/F12 培养基)培养 21 d, 每 3 d 更换一次新鲜成骨诱导培养基, 用茜素红对诱导细胞进行染色. 在倒置显微镜下观察染色结果. 采用 Image J 软件进行定量分析.

成脂分化诱导及鉴定: 将 P4 代和 P8 代长白猪 BMSCs 和 AMSCs 细胞接种于 6 孔板中, 当细胞培养至融合度约为 80% 时进行成脂诱导分化. 首先用成脂诱导培养基($10 \mu\text{mol/L}$ 胰岛素 + $200 \mu\text{mol/L}$ 吡啶美辛 + $10 \mu\text{mol/L}$ 地塞米松 + 1% 双抗 + 10% FBS + DMEM/F12 培养基)诱导 3 d, 之后改用成脂维持培

养基 (2 nmol/L 胰岛素 + 1% 双抗 + 10% FBS + DMEM/F12 培养基) 维持 3 d; 然后每隔 3 d 交替更换新鲜成脂诱导培养基和维持培养基. 培养 21 d 后利用油红 O 染色鉴定细胞成脂分化能力. 在倒置显微镜下观察染色结果. 采用 Image J 软件进行定量分析.

1.2.7 TUNEL 染色检测 BMSCs 和 AMSCs 的凋亡情况

取 P4 代和 P8 代长白猪 BMSCs 和 AMSCs 细胞, 接种于 24 孔板中, 待细胞含量达到 70% 后, 用含有 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 的完全培养基培养 4 h. 后续实验步骤根据 TUNEL 细胞凋亡试剂盒说明书进行. 荧光显微镜下观察细胞并拍照. 用 Image J 软件计算凋亡细胞数 (红色) 和总细胞数 (蓝色).

$$r_a = (N_a / N_t) \times 100\% \quad (2)$$

式中: r_a 为凋亡率, N_a 为凋亡细胞数, N_t 为总细胞数.

1.2.8 RNA 提取及相关基因的实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-qPCR) 检测

使用 Trizol 试剂从细胞中提取总 RNA, 每管 RNA 样品中加入 200 μL 氯仿进行抽提, 提取结束后加入 20 μL DEPC 水进行溶解并定量. 使用 M-MLV 逆转录酶对 RNA 样品 (4 μg) 进行逆转录, 最后以 cDNA 为模板, 采用 Bestar Sybr Green qPCR Master Mix 进行扩增和检测. 引物序列见表 1. 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环. GAPDH 为内参照, 结果采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行相对定量分析.

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequence

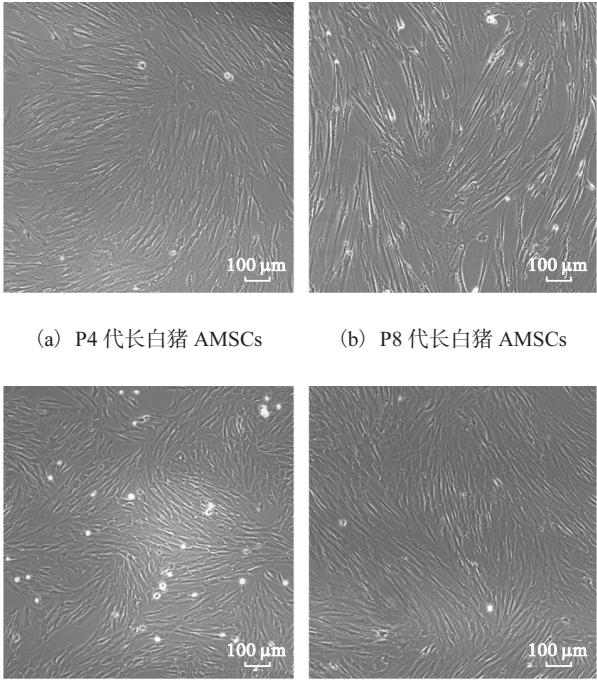
名称	序列
GAPDH	上游 5'-TGAAGGTCGGAGTGAACG-3' 下游 5'-CGTGGGTGGAATCATACTGG-3'
OCT4	上游 5'-GTCGCCAGAAGGGCAAAC-3' 下游 5'-CAGGGTGGTGAAGTGAGGG-3'
Ki67	上游 5'-ACCTGGTCTTAGTCCGTTGA-3' 下游 5'-TGGTTGGCGTTTCTCCTC-3'
SOD-1	上游 5'-GGTCCTCACTTCAATCCTG-3' 下游 5'-CTTCATTTCACCTCTGC-3'
CAT	上游 5'-CCCAGCCCTGACAAGATG-3' 下游 5'-CTGTTCGGGAGCACTAAA-3'
GSR	上游 5'-TGCGTGAATGTCGGATGT-3' 下游 TGGATGATTCTATGTGGG-3'
NQO-1	上游 5'-CCCCTCATCTCCAGAAAG-3' 下游 5'-CAGGGACTCCAAACCACT-3'

2 结果与分析

2.1 长白猪 BMSCs 和 AMSCs 的细胞形态观察

在倒置相差显微镜下观察 BMSCs 和 AMSCs,

P4 代和 P8 代长白猪骨髓和脂肪间充质干细胞的细胞形态如图 1 所示. 最初的单个贴壁细胞呈长梭状. 3 ~ 5 d 后细胞开始融合, 1 周内细胞融合率达 65% ~ 70%. P4 代的 BMSCs 和 AMSCs 细胞形态均呈长梭形. 与 P4 代的 BMSCs 相比, P8 代的 BMSCs 细胞形态仍呈长梭形, 细胞形态并未发生太大变化. 而与 P4 代的 AMSCs 和 P8 代的 BMSCs 比较, P8 代 AMSCs 细胞呈现胞体扁平、肥大等不规则形态和折光性弱的特点, 细胞基本失去增殖能力呈现出衰老的趋势. 8 代以内的 BMSCs 均在 3 d 内即可传代, 而 AMSCs 在 8 代后其传代时间逐渐延长, 需 5 ~ 6 d 才可传代.



(a) P4 代长白猪 AMSCs (b) P8 代长白猪 AMSCs

(c) P4 代长白猪 BMSCs (d) P8 代长白猪 BMSCs

图 1 长白猪骨髓和脂肪间充质干细胞的细胞形态
Fig. 1 Morphology of porcine BMSCs and AMSCs

2.2 长白猪 BMSCs 和 AMSCs 的表型鉴定

流式细胞仪检测结果显示, P3 代长白猪 BMSCs 和 AMSCs 均高表达阳性表面标志物 CD44 和 CD90 (>97%), 而不表达阴性表面标志物 CD34 和 CD45 (<0.5%) (表 2).

表 2 P3 代长白猪 BMSCs 和 AMSCs 的表型鉴定 (n = 3)

Tab. 2 Phenotype identification of porcine BMSCs and AMSCs at P3 (n = 3)

组别	CD44	CD90	CD34	CD45
BMSCs	98.17 ± 0.03	99.97 ± 0.03	0.09 ± 0.12	0.08 ± 0.04
AMSCs	97.63 ± 0.23	100 ± 0	0.21 ± 0.13	0.34 ± 0.13

2.3 长白猪 BMSCs 和 AMSCs 体外多次传代后的增殖能力

P4 代和 P8 代 BMSCs 和 AMSCs 的生长曲线如图 2 所示, P4 代 BMSCs 和 AMSCs 培养的 1~2 d 为潜伏生长期, 增殖较慢; 2~4 d 为对数生长期, 此期细胞生长活跃, 增殖较快; 此后由于细胞密度增大, 细胞间发生接触抑制, 增殖速率逐渐减慢, 进入平台期. 与 P4 代的细胞相比, P8 代的 AMSCs 和 BMSCs 增殖速率均减慢. 相较于 P8 代 BMSCs, P8 代 AMSCs 的对数生长期延长, 增殖能力显著下降.

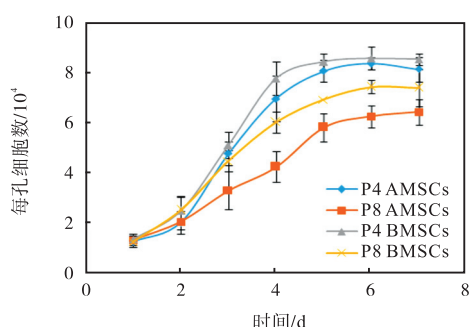
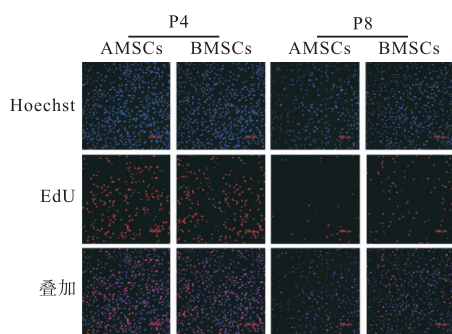
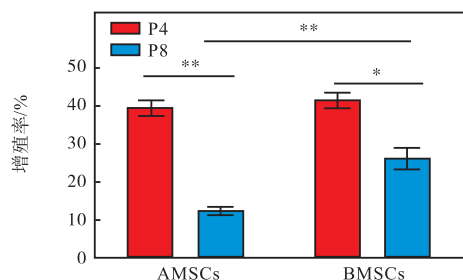


图 2 长白猪骨髓和脂肪间充质干细胞的生长曲线
Fig. 2 Growth curve of porcine BMSCs and AMSCs

利用 EdU 染色检测长白猪 BMSCs 和 AMSCs 的增殖能力, 实验结果如图 3 所示.



(a) EdU 染色检测



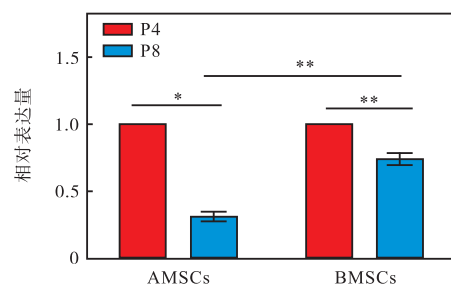
(b) 定量分析

图 3 长白猪骨髓和脂肪间充质干细胞的增殖能力
Fig. 3 Proliferation of porcine BMSCs and AMSCs

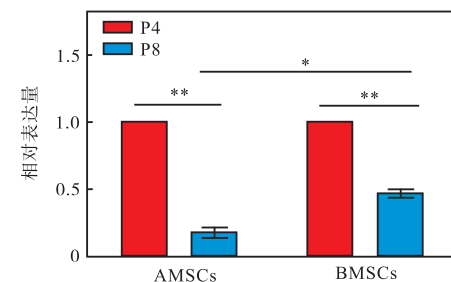
P4 代的 BMSCs 和 AMSCs 的增殖率分别为

(41.36 ± 3.35)% 和 (39.22 ± 3.31)%, 不存在显著性差异. 随着传代次数的增加, 与 P4 代的细胞相比, P8 代的 BMSCs ($P < 0.05$) 和 AMSCs ($P < 0.01$) 的增殖率均呈现显著下降的趋势. 细胞传至 P8 代时, BMSCs 的增殖率 [(26.11 ± 4.92)%] 显著高于 AMSCs [(12.37 ± 1.86)%] ($P < 0.01$).

进一步利用 RT-qPCR 检测干性标志基因 OCT4 和增殖标志基因 Ki67 的 mRNA 水平, 实验结果如图 4 所示. 由图 4 可知: 增殖基因 OCT4 和 Ki67 在 P4 代和 P8 代的 BMSCs 和 AMSCs 中均有不同程度表达; 细胞传代过程中 BMSCs 和 AMSCs 内 OCT4 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) 和 Ki67 ($P < 0.01$) 的 mRNA 水平均呈现下降趋势. 传至 P8 代后, BMSCs 的 OCT4 ($P < 0.01$) 和 Ki67 ($P < 0.05$) 的 mRNA 水平均显著高于 AMSCs.



(a) OCT4



(b) Ki67

图 4 长白猪骨髓和脂肪间充质干细胞 OCT4 和 Ki67 的 mRNA 水平

Fig. 4 mRNA levels of OCT4 and Ki67 in porcine BMSCs and AMSCs

以上结果证实: 随着体外传代次数的增加, 长白猪 BMSCs 和 AMSCs 的增殖能力均显著下降, 其中多次传代后的 BMSCs 的增殖能力显著高于 AMSCs.

2.4 长白猪 BMSCs 和 AMSCs 体外多次传代后的衰老情况

采用 β -半乳糖苷酶染色方法对衰老细胞进行染色, 实验结果如图 5 所示, P4 代的 BMSCs 和

AMSCs 中 β -半乳糖苷酶阳性细胞较少, 无显著性差异. 随着细胞传代次数的增加, 阳性细胞比例增大, P8 代的 BMSCs 和 AMSCs 阳性细胞率均大于 P4 代细胞, 有显著性差异 ($P < 0.01$). 在第 8 代时, BMSCs 的阳性细胞率 $[(62.34 \pm 8.34)\%]$ 小于 AMSCs 的阳性细胞率 $[(87.33 \pm 7.34)\%]$, 有显著性差异 ($P < 0.05$). 这些结果证实, 随着体外传代次数的增加, 长白猪 BMSCs 和 AMSCs 均出现衰老情况, 与 BMSCs 相比, AMSCs 在体外传代过程中更易衰老.

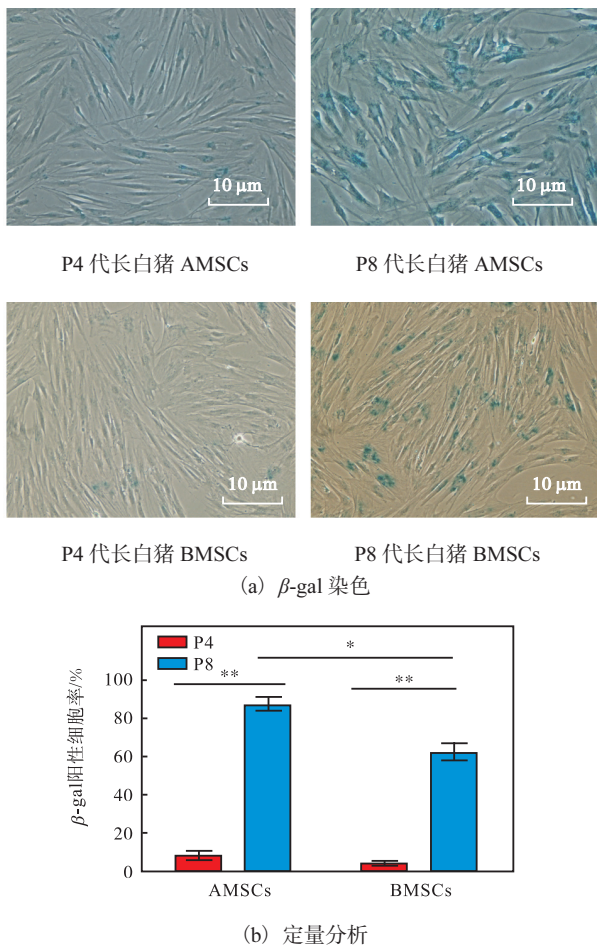


图 5 长白猪骨髓和脂肪间充质干细胞的衰老情况
Fig. 5 Senescence of porcine BMSCs and AMSCs

2.5 长白猪 BMSCs 和 AMSCs 体外多次传代后的成骨和成脂分化能力

成骨诱导后用茜素红染色, 显微镜下可见形成不同程度的红色钙化结节, 说明部分间充质干细胞已分化为成骨细胞, 红色钙化结节的形成率即为成骨分化率. 长白猪骨髓和脂肪间充质干细胞的成骨分化能力如图 6 所示. 由图 6 可知: P4 代 BMSCs 和 AMSCs 钙结节形成率并无显著性差异; P4 代 BMSCs 和 AMSCs 钙结节形成率均大于 P8 代细胞,

有显著性差异 ($P < 0.01$); P8 代 BMSCs 钙结节形成率为 $(35.35 \pm 5.23)\%$, 显著高于 AMSCs $[(11.83 \pm 1.34)\%]$ ($P < 0.05$).

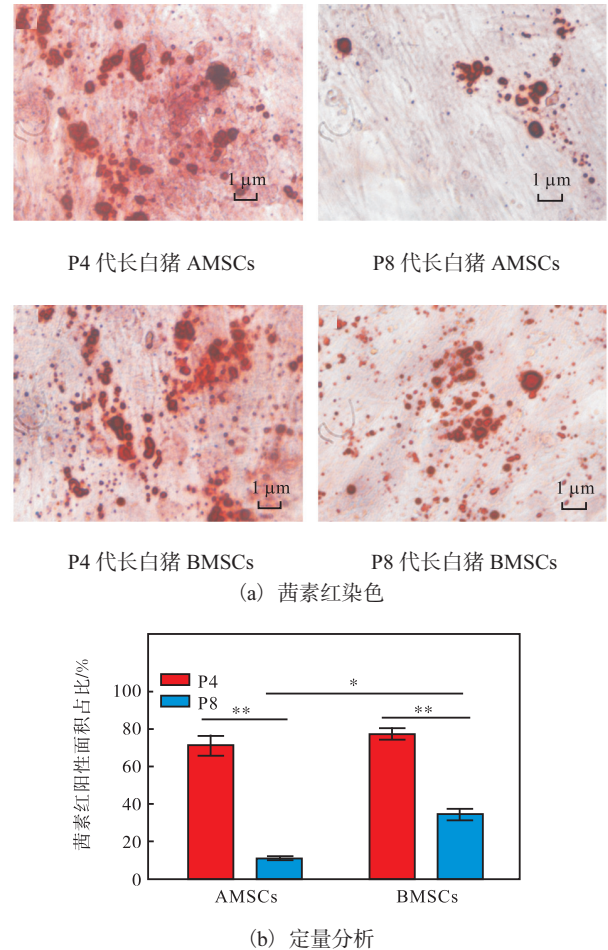


图 6 长白猪骨髓和脂肪间充质干细胞的成骨分化能力
Fig. 6 Osteogenic differentiation potential of porcine BMSCs and AMSCs

油红 O 染色后在显微镜下可见细胞内形成红色脂滴, 说明部分间充质干细胞已分化为脂肪细胞, 脂滴形成率即为成脂分化率. 长白猪骨髓和脂肪间充质干细胞的成脂分化能力如图 7 所示.

由图 7 可知: P4 代 BMSCs 和 AMSCs 的红色脂滴形成率并无显著性差异; P4 代 BMSCs 和 AMSCs 的红色脂滴形成率均大于 P8 代细胞, 有显著性差异 ($P < 0.01$); P8 代 AMSCs 脂滴形成百分率 $[(12.68 \pm 1.35)\%]$ 显著高于 BMSCs $[(6.88 \pm 1.55)\%]$ ($P < 0.05$).

以上结果证实: 随着体外传代次数的增加, 长白猪 BMSCs 和 AMSCs 的成骨和成脂分化能力均下降, 在多次传代后 AMSCs 的成骨分化能力弱于 BMSCs 的, 而成脂分化能力高于 BMSCs 的.

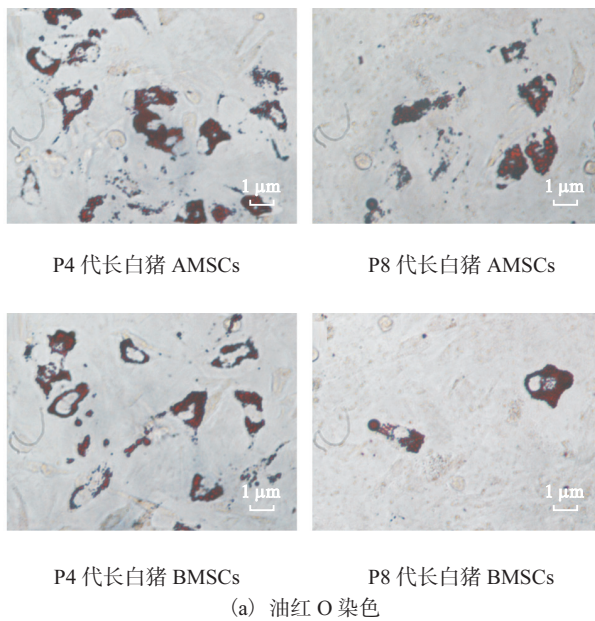


图 7 长白猪骨髓和脂肪间充质干细胞的成脂分化能力
Fig. 7 Adipogenic differentiation potential of porcine BMSCs and AMSCs

2.6 长白猪 BMSCs 和 AMSCs 体外多次传代后的抗氧化损伤能力

为了研究体外多次传代后的 BMSCs 和 AMSCs

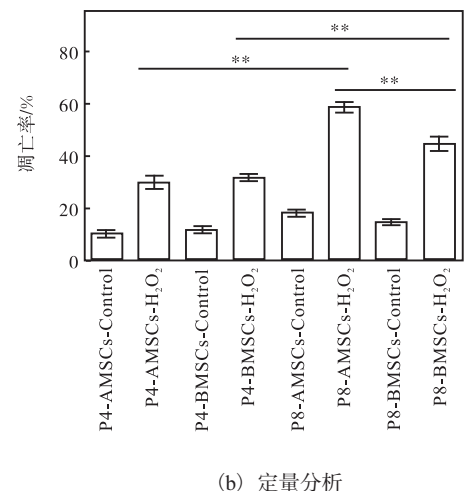
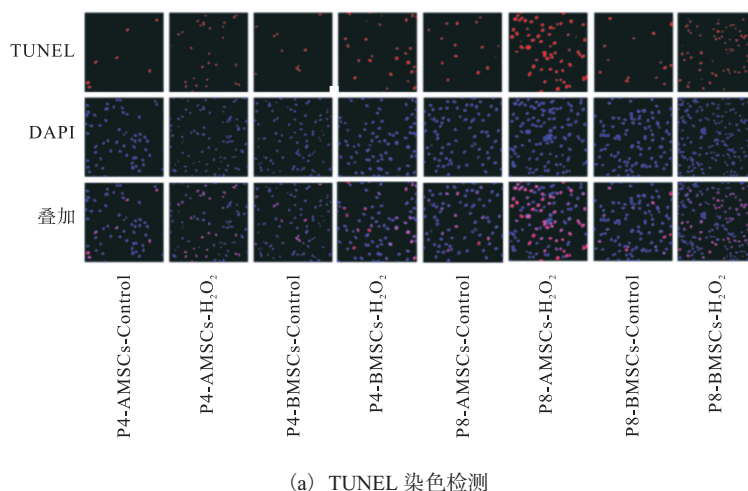


图 8 长白猪骨髓和脂肪间充质干细胞的抗氧化损伤能力
Fig. 8 Anti oxidative damage potential of porcine BMSCs and AMSCs

抗氧化损伤能力方面的差异, 利用 H₂O₂ 处理 BMSCs 和 AMSCs, TUNEL 染色检测细胞凋亡情况. P4 代和 P8 代长白猪骨髓和脂肪间充质干细胞对抗氧化损伤能力结果如图 8 所示, 与 P4 代的细胞相比, H₂O₂ 处理后, P8 代的 BMSCs 和 AMSCs 细胞凋亡均显著升高, 而相较于 P8 代的 BMSCs, P8 代 AMSCs 对氧化损伤更敏感, 凋亡率更高, 具有显著性差异. 这些结果说明, 衰老的细胞抗氧化损伤能力下降, 对氧化损伤更敏感, 长期传代后 AMSCs 的抗氧化损伤能力弱于 BMSCs.

2.7 长白猪 BMSCs 和 AMSCs 体外多次传代后抗氧化损伤基因的表达

为了进一步分析细胞衰老过程中抗氧化损伤能力减弱的原因, 检测了不同代数细胞中抗氧化损伤基因超氧化物歧化酶 1 (superoxide dismutase 1, SOD-1)、过氧化氢酶 (catalase, CAT)、谷胱甘肽还原酶 (glutathione reductase, GSR) 和醌氧化还原酶 1 (quinone oxidoreductase 1, NQO-1) 的 mRNA 水平, 结果如图 9 所示.

由图 9 可知: 在多次传代后, BMSCs 和 AMSCs 细胞内 SOD-1 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)、CAT ($P < 0.01$)、GSR ($P < 0.01$) 和 NQO-1 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) 的 mRNA 水平均呈现下降趋势. 传至 P8 代后, 与 BMSCs 相比, AMSCs 内 SOD-1 ($P < 0.01$)、CAT ($P < 0.05$)、GSR ($P < 0.05$) 和 NQO-1 ($P < 0.05$) 的 mRNA 水平均显著降低. 这些结果说明, 衰老的细胞抗氧化损伤能力下降的原因可能与抗氧化损伤基因表达水平的降低有关.

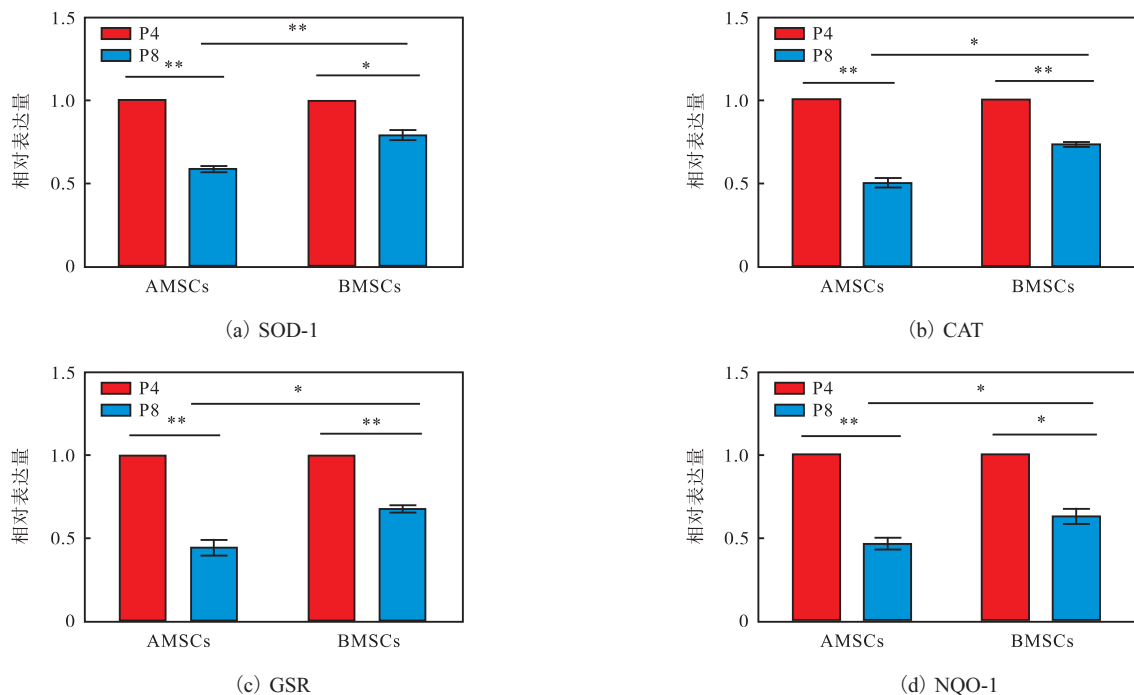


图9 长白猪骨髓和脂肪间充质干细胞 SOD-1、CAT、GSR 和 NQO-1 的 mRNA 水平
Fig. 9 mRNA levels of SOD-1, CAT, GSR and NQO-1 in porcine BMSCs and AMSCs

3 讨论

干细胞的获取和体外培养是培养肉大规模生产首先需要解决的关键性问题。研究^[22]表明,间充质干细胞除了有较强的自我更新和多向分化的能力,还具有获取简便和来源广泛等特点,因此作为培养肉种子细胞具有广阔的应用前景。间充质干细胞可以从多种不同组织来源中获得,不同组织来源的间充质干细胞在某些生物学特性方面呈现出差异。骨髓和脂肪组织都被认为是间充质干细胞的主要来源。因此,本文对长白猪的 AMSCs 和 BMSCs 的分离培养方法、细胞表型、细胞生长特性、多向分化能力和抗氧化损伤能力进行了研究。

与本研究的结果一致,多项研究也证实了随着 MSCs 传代次数的增加,增殖率和生长速率逐渐下降^[24, 26-27]。然而,在脂肪间充质干细胞和骨髓间充质干细胞的细胞增殖能力方面,目前研究结果并不一致。文献[28-29]证实人的脂肪间充质干细胞增殖能力高于骨髓间充质干细胞。而 He 等^[21]和 Jervis 等^[30]分离获得了来自大鼠和牛胎儿的 AMSCs 和 BMSCs,证实 BMSCs 比 AMSCs 具有更强的增殖和集落形成能力。本研究的结果证实,在体外培养早期,两种组织来源的 MSCs 的增殖能力没有明显区

别,而在长期传代后,BMSCs 比 AMSCs 具有更强的增殖能力。总之,这些研究结果的不同可能与物种、取材位置、初始细胞数量等条件的不同有关。

本研究发现相对于 BMSCs,长白猪 AMSCs 在体外长期培养后,仍呈现出较高的脂肪细胞分化能力,而 BMSCs 的成骨分化能力更强。与本研究结果相似, Lee 等^[9]分别分离获得来自白尤卡坦小型长白猪的脂肪、骨髓、耳朵皮肤、腹部皮肤和肺的 MSCs,证实在传至 P10 代时,只有来自脂肪的 MSCs 具有向脂肪细胞分化的能力,而其他组织来源的 MSCs 都丧失了向脂肪细胞分化的能力。卓丽丹等^[31]比较了大鼠的骨髓和脂肪间充质干细胞的成骨分化能力,发现骨髓间充质干细胞的成骨分化能力高于脂肪间充质干细胞的。因此这种分化能力的差异可能与其组织来源有关。

众所周知,在正常条件下细胞中会有活性氧(ROS)的产生,但细胞中也存在多种抗氧化损伤酶类,用来维持细胞的氧化还原环境的平衡。有研究证实,随着年龄的增长^[32]及体外传代次数的增加^[33],间充质干细胞产生的 ROS 逐渐增加,而过量 ROS 或外源性 H₂O₂ 均可损伤间充质干细胞的增殖分化能力,导致各种类型的 DNA 损伤,诱发细胞衰老。因此,间充质干细胞老化过程中 ROS 的累积可能是由于细胞的抗氧化损伤能力缺陷所致,而这些抗氧化损伤酶可

以对抗氧化损伤, 是防止细胞衰老的关键因素。然而, 目前关于长白猪的间充质干细胞在体外长期培养过程中抗氧化损伤能力的变化情况研究较少, 哪些抗氧化损伤基因在维持长白猪 MSCs 的抗氧化损伤能力方面比较重要尚不清楚。本研究发现衰老的 BMSCs 和 AMSCs 的抗氧化损伤能力均显著下降, 细胞凋亡增加。与 BMSCs 相比, 衰老的 AMSCs 对 H_2O_2 更敏感, 细胞凋亡率显著增加。与抗氧化损伤能力实验结果相一致, 本研究发现与长白猪 BMSCs 相比, AMSCs 的几个重要的抗氧化损伤基因 SOD-1、CAT、GSR 和 NQO-1 的表达水平显著降低。SOD-1、CAT、GSR 和 NQO-1 是生物体内抗氧化损伤体系的重要组成部分, 这些抗氧化损伤酶的 mRNA 水平可以间接反映细胞的氧化应激情况^[34-35]。因此, 抗氧化损伤基因表达的降低可能是间充质干细胞体外培养过程中抗氧化损伤能力下降和细胞衰老的重要因素, 而在细胞中添加具有抗氧化损伤活性的物质可能有利于抑制间充质干细胞的复制性衰老。

本实验成功分离长白猪骨髓和脂肪间充质干细胞, 通过流式细胞术对间充质干细胞的阳性和阴性标志基因进行了鉴定, 同时对比了长白猪骨髓和脂肪间充质干细胞在体外培养过程中增殖能力、多向分化潜能和抗氧化损伤能力的差异。结果发现, 在体外长期培养后, 长白猪骨髓间充质干细胞的增殖能力、成骨分化能力和抗氧化损伤能力强于脂肪来源的间充质干细胞, 而脂肪来源的间充质干细胞在脂肪分化能力方面表现更优。这些研究结果对基因工程和组织工程具有一定的科学意义, 也为后续实现间充质干细胞在细胞培养肉中的应用提供了理论支撑。

参考文献:

- [1] 张国强, 赵鑫锐, 李雪良, 等. 动物细胞培养技术在人造肉研究中的应用[J]. 生物工程学报, 2019, 35(8): 1374-1381.
- [2] 周光宏, 丁世杰, 徐幸莲. 培养肉的研究进展与挑战[J]. 中国食品学报, 2020, 20(5): 1-11.
- [3] CHEN H S, HSU C Y, CHANG Y C, et al. Benzyl butyl phthalate decreases myogenic differentiation of endometrial mesenchymal stem/stromal cells through miR-137-mediated regulation of PITX2[J]. Scientific reports, 2017, 7(1): 186.
- [4] ZAHEDI M, PARHAM A, DEGHANI H, et al. Equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells: optimization of cell density in primary culture[J]. Stem cell investigation, 2018, 5: 31.
- [5] ADHIKARI R, CHEN C X, WATERS E, et al. Isolation and differentiation of mesenchymal stem cells from broiler chicken compact bones[J]. Frontiers in physiology, 2018, 9: 1892.
- [6] RINK B E, AMILON K R, ESTEVES C L, et al. Isolation and characterization of equine endometrial mesenchymal stromal cells[J]. Stem cell research & therapy, 2017, 8(1): 166.
- [7] CHAN J, O'DONOGHUE K, GAVINA M, et al. Galectin-1 induces skeletal muscle differentiation in human fetal mesenchymal stem cells and increases muscle regeneration[J]. Stem cells, 2006, 24(8): 1879-1891.
- [8] BAI C Y, CHEN S M, GAO Y H, et al. Multi-lineage potential research of bone marrow mesenchymal stem cells from Bama miniature pig[J]. Journal of experimental zoology part B: molecular and developmental evolution, 2015, 324(8): 671-685.
- [9] LEE A Y, LEE J, KIM C L, et al. Comparative studies on proliferation, molecular markers and differentiation potential of mesenchymal stem cells from various tissues (adipose, bone marrow, ear skin, abdominal skin, and lung) and maintenance of multipotency during serial passages in miniature pig[J]. Research in veterinary science, 2015, 100: 115-124.
- [10] WANG J J, ZHANG W X, WANG K F, et al. Isolation and biological characteristics of multipotent mesenchymal stromal cells derived from chick embryo intestine[J]. British poultry science, 2018, 59(5): 521-530.
- [11] PURWANINGRUM M, JAMILAH N S, PURBANTORO S D, et al. Comparative characteristic study from bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. Journal of veterinary science, 2021, 22(6): e74.
- [12] EGUSA H, SONOYAMA W, NISHIMURA M, et al. Stem cells in dentistry. Part II: clinical applications[J]. Journal of prosthodontic research, 2012, 56(4): 229-248.
- [13] WANG W, YUAN C Y, LIU Z X, et al. Characteristic comparison between canine and human dental mesenchymal stem cells for periodontal regeneration research in preclinical animal studies[J]. Tissue and cell, 2020, 67: 101405.
- [14] EL-KEHDY H, POURCHER G, ZHANG W, et al. Hepatocytic differentiation potential of human fetal liver

- mesenchymal stem cells: in vitro and in vivo evaluation[J]. *Stem cells international*, 2016, 12: 6323486.
- [15] DE PAULA D R M, CAPUANO V, FILHO D M, et al. Biological properties of cardiac mesenchymal stem cells in rats with diabetic cardiomyopathy[J]. *Life sciences*, 2017, 188: 45–52.
- [16] CRISAN M, YAP S, CASTEILLA L, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs[J]. *Cell stem cell*, 2008, 3(3): 301–313.
- [17] NISHIMURA M, NGUYEN L, WATANABE N, et al. Development and characterization of novel clinical grade neonatal porcine bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. *Xenotransplantation*, 2019, 26(3): e12501.
- [18] ARAÑA M, MAZO M, ARANDA P, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, and characterization[J]. *Methods in molecular biology*, 2013, 1036: 47–61.
- [19] DYCE P W, ZHU H, CRAIG J, et al. Stem cells with multilineage potential derived from porcine skin[J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2004, 316(3): 651–658.
- [20] FENG Z, YANG Y L, LIU Z G, et al. Integrated analysis of DNA methylome and transcriptome reveals the differences in biological characteristics of porcine mesenchymal stem cells[J]. *BMC Genomic data*, 2021, 22(1): 56.
- [21] HE Q, YE Z Y, ZHOU Y, et al. Comparative study of mesenchymal stem cells from rat bone marrow and adipose tissue[J]. *Turkish journal of biology*, 2018, 42(6): 477–489.
- [22] PENG L Y, JIA Z Q, YIN X H, et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue[J]. *Stem cells and development*, 2008, 17(4): 761–773.
- [23] WAGNER W, HORN P, CASTOLDI M, et al. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process[J]. *PLOS ONE*, 2008, 3(5): e2213.
- [24] YU J, SHI J, ZHANG Y, et al. The replicative senescent mesenchymal stem/stromal cells defect in DNA damage response and anti-oxidative capacity[J]. *International journal of medical sciences*, 2018, 15(8): 771–781.
- [25] 常铖, 刘梦婷, 张权, 等. 长期传代培养人脐带间充质干细胞免疫调节功能的比较[J]. *中国细胞生物学学报*, 2020, 42(4): 609–619.
- [26] YANG Y K, OGANDO C R, WANG S C, et al. Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro[J]. *Stem cell research & therapy*, 2018, 9(1): 131.
- [27] BANFI A, MURAGLIA A, DOZIN B, et al. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: implications for their use in cell therapy[J]. *Experimental hematology*, 2000, 28(6): 707–715.
- [28] KERN S, EICHLER H, STOEVE J, et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue[J]. *Stem cells*, 2006, 24(5): 1294–1301.
- [29] 尹巧香, 王恒, 裴志勇, 等. 长白猪的骨髓和脂肪来源间充质干细胞培养特性比较[J]. *生物医学工程与临床*, 2013, 17(6): 523–527.
- [30] JERVIS M, HUAMAN O, CAHUASCANCO B, et al. Comparative analysis of in vitro proliferative, migratory and pro-angiogenic potentials of bovine fetal mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue[J]. *Veterinary research communications*, 2019, 43(3): 165–178.
- [31] 卓丽丹, 冯顶丽, 芦笛, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞和脂肪干细胞体外成骨能力的比较[J]. *实用口腔医学杂志*, 2018, 34(6): 730–735.
- [32] STOLZING A, JONES E, MCGONAGLE D, et al. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies[J]. *Mechanisms of ageing and development*, 2008, 129(3): 163–173.
- [33] LEE J S, LEE M O, MOON B H, et al. Senescent growth arrest in mesenchymal stem cells is bypassed by Wip1-mediated downregulation of intrinsic stress signaling pathways[J]. *Stem cells*, 2009, 27(8): 1963–1975.
- [34] 洪文旭, 杨细飞, 张兵, 等. 不同粒径二氧化硅对人永生表皮细胞抗氧化损伤酶基因 mRNA 表达水平的影响[J]. *中国工业医学杂志*, 2012, 25(3): 168–171.
- [35] 王权, 王心雪, 毛颖, 等. 鹿骨粉对去卵巢大鼠心脏组织抗氧化损伤因子 Sirt-3、SOD-2、HO-1 和 NQO-1 表达的影响[J]. *长春中医药大学学报*, 2015, 31(5): 890–892.

责任编辑: 郎婧