

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxb.002682

大鼠肛提肌卫星细胞的分离纯化及鉴定

黄明清¹, 李江², 杨昭庆³, 孙浩³, 方克伟¹(1. 昆明医科大学第二附属医院泌尿外科, 昆明 650101; 2. 曲靖市第一人民医院泌尿外科, 曲靖 655000;
3. 中国医学科学院昆明生物医学研究所遗传室, 昆明 650102)

【摘要】目的: 探讨大鼠肛提肌卫星细胞分离和纯化方法, 观察肛提肌卫星细胞的体外增殖和成肌特性。方法: 采用改进的胰蛋白酶和 I 型胶原酶来消化分离大鼠的肛提肌卫星细胞, 结合差速贴壁法进行纯化, 从而获得高纯度的大鼠肛提肌卫星细胞。运用显微镜观察细胞的形态和生长状况; CCK-8 检测体外培养的肛提肌卫星细胞生长情况并绘制生长曲线; 免疫荧光法对不同时期的卫星细胞进行鉴定。结果: 显微镜下观察发现, 分离出的大鼠肛提肌卫星细胞生长较好。CCK-8 检测结果显示, 体外培养的前 1、2 d 细胞生长缓慢, 3 d 以后细胞呈倍数扩增, 第 10 天细胞生长速度下降, 部分细胞出现分化。免疫荧光和 DAPI 染色显示不同时期的肌卫星细胞, 其特征性基因表达有差异。结论: 本方法成功从大鼠肛提肌组织中分离出了具有增殖、分化能力的肛提肌卫星细胞, 为应用肛提肌卫星细胞探讨肌肉的损伤、修复机制奠定了前期基础。

【关键词】大鼠; 肛提肌; 卫星细胞; 分离; 纯化; 鉴定**【中图分类号】**Q813.11**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2020-06-17

Separation, purification and identification of satellite cells from rat levator ani muscle

Huang Mingqing¹, Li Jiang², Yang Zhaoqing³, Sun Hao³, Fang Kewei¹

(1. Department of Urology, The Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University; 2. Department of Urology, Qujing First People's Hospital; 3. Institute of Medical Biology Chinese Academy of Medical Sciences)

【Abstract】**Objective:** To explore a method for separation and purification of satellite cells (SCs) from rats levator ani muscle (LAM), and to observe the proliferation and myogenic characteristics of SCs *in vitro*. **Methods:** The SCs from rat LAM were separated by enzyme digestion with collagenase type 1 and trypsin, and purified by differential wall adhesion method. From that, we obtained highly purified SCs from rat LAM. The morphology and growth of primary and passage cells were observed by inverted microscope. CCK-8 method was used to detect the growth of LAM SCs (cultured *in vitro*) and draw the growth curve. Immunofluorescence was used to identify SCs in different stages. **Results:** Microscopically, it was observed that SCs separated from rat LAM grew well. In CCK-8 test, the SCs grew slowly in the first to second days of *in vitro* culture, after 3 days, the SCs augmented multiply. On the 10th day, the cell growth rate decreased and some cells began to differentiate. Immunofluorescence and DAPI staining showed that the characteristic gene expression of protein was observed different in different stages of SCs. **Conclusion:** In this study, SCs were successfully separated from rat LAM tissue with good proliferation and differentiation ability *in vitro*, laying a preliminary foundation for exploring the mechanism of muscle injury and repair by LAM SCs.

【Key words】rat; levator ani muscle; satellite cell; separation; purification; identification

作者介绍: 黄明清, Email: 2609488847@qq.com,

研究方向: 女性盆底疾病及尿控。

通信作者: 方克伟, Email: 2482099228@qq.com。

基金项目: 云南省科技厅-昆医联合专项重点资助项目(编号:

2015FA007); 云南省中青年学术和技术带头人后备人才培养资助项目(编号: 2017HB038); 云南省卫计委医学学科带头人培养资助项目(编号: D-201615); 云南省高校女性盆底疾病诊疗工程研究中心资助项目; 昆明医科大学研究生创新基金资助项目(编号: 2020S179)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20201104.1714.006.html>

(2020-11-05)

肌卫星细胞(satellite cell)是一种肌源性干细胞, 一般处于静息状态, 受刺激后激活, 发生增殖、分化, 最终细胞融合形成肌纤维^[1]。肌卫星细胞在肌肉生长发育、功能维持及损伤修复等过程中起非常重要的作用^[2]。目前已成功从很多动物的骨骼肌中分离出卫星细胞, 并对其进行体外培养^[3-4], 但从肛提肌组织中分离肌卫星细胞却少有报道。目前多采用分步酶消化法分离肌卫星细胞, 利用差速贴壁法进行

纯化^[5]。本实验稍做改进,延长了胶原酶的作用时间,最终成功分离出大鼠的肛提肌卫星细胞,之后采用多次差速贴壁进行纯化并用荧光染色进行鉴定,最终获得较纯的肌卫星细胞。这为肌肉的损伤修复等相关研究、体外扩增肛提肌卫星细胞治疗相关疾病奠定了前期基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 SPF 级 SD 大鼠 10 只,2 周龄,体质量 (20 ± 5) g, 购自昆明医科大学实验动物部。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清、胶原酶、2.5% 胰蛋白酶+EDTA (hyclone, USA); CCK-8 试剂盒(碧云天, 中国); 封闭用羊血清、10% 水合氯醛、PBS 液、二甲基亚砜、Triton 试剂(索莱宝, 中国)等。一抗: 兔抗鼠 MyoD(M-318); sc-760(Santa Cruz, USA); 兔抗鼠 Desmin Antibody (Abcam, USA); 小鼠抗大鼠 Anti-Pax7 antibody (pax7497) (Abcam, USA); 兔抗鼠 Anti-Sarcomeric Alpha Actinin antibody (Abcam, USA); 二抗: 羊抗小鼠 DylightTM549-Labeled Antibody To Mouse IgG(H+L)(KPL, USA); 羊抗兔 DylightTM488-Labeled Antibody To Rabbit IgG(H+L)(KPL, USA)。

1.1.3 主要仪器设备 精细剪、手术镊(上海医疗器械公司); T25 细胞培养瓶、离心管、细胞培养板(Nest); 超净工作台(博科生物); 不锈钢滤网(北京世纪银丰科技); 二氧化碳培养箱(Thermo Fisher Scientific); 荧光显微镜(美国 Semrock 公司); 酶标仪(TECAN)等。

1.2 实验方法

1.2.1 大鼠肛提肌卫星细胞的分离 运用改进的两步酶消化法分离大鼠肛提肌卫星细胞。将麻醉后的大鼠放于紫外线灯下照射消毒,之后颈椎脱臼处死,无菌操作下取肛提肌组织置于平皿中,用含 1% 双抗的磷酸盐缓冲液冲洗。将冲洗后的肌组织转移至新的平皿中,剪至泥状,之后将其转移至离心管 A 中,加入胶原酶,放入 37°C 恒温箱内消化,每隔 2 min 晃动 1 次,直到肌组织颜色变白、质地疏松呈棉絮状时吸除胶原酶终止消化。用 PBS 冲洗 2 次后加入胰蛋白酶和胶原酶混合液,于 37°C 消化 5 min。吸取 A 管中的消化液至离心管 B 中,并加入完全培养基以终止消化酶的作用。肌组织中再加 2 mL PBS 吹打,静置后吸取上清至离心管 B 中,重复上一步骤直至肌组织完全消化完,及时收集消化液并终止消化。最后将离心管 B 中的消化液依次使用 100 目、200 目、400 目的不锈钢细胞筛网过滤。滤液于 400g 下低速离心 7 min 后去上清,沉淀用完全培养基吹打均匀后接种于培养瓶内并记为 PP1。

1.2.2 大鼠肛提肌卫星细胞的纯化及传代培养 利用不同细胞的贴壁能力不同对肌卫星细胞进行纯化。将 PP1 中的细胞

悬液于培养箱中培养 1 h, 显微镜下可见部分贴壁能力较强的细胞已贴壁;之后将 PP1 中未贴壁的细胞悬液转至新的培养瓶中, 标记为 PP2, 培养 1 h; 再将 PP2 中的细胞悬液转到标记为 PP3 的瓶中, 培养过夜; 将 PP3 中上层细胞悬液转移到新的培养瓶中培养, 标记为 PP4, 以 PP4 细胞用于后续实验。将各培养瓶放入培养箱中培养, 每天观察细胞状况。

细胞生长至 70%~80% 汇合时传代。去除旧培养基, 用磷酸盐缓冲液洗涤细胞 2 次后加入 2 mL 的 1.25% 胰蛋白酶, 于显微镜下观察, 待细胞质回缩变圆, 有数个细胞漂浮时立即加入新的生长培养基终止消化, 并用枪头小心吹打细胞使其分散均匀。将含细胞的培养液转入离心管中, 于 400g 下低速离心 7 min。倒掉上清, 细胞沉淀用生长培养基吹打均匀后按 1:3 分至新培养瓶中培养, 并标记好细胞代数。

1.2.3 CKK-8 绘制生长曲线 细胞消化离心后重悬, 取重悬液进行计数, 根据计数结果将细胞悬液稀释至 1×10^5 个/mL, 将细胞按每孔 20 000 个接种于 96 孔板, 并缓慢晃动培养板使细胞均匀分布。培养 4 h 后于酶标仪下测光密度(optical density, OD)值, 并将其作为零点。培养板每天测量前 2 h 换液, 之后向当天测量的孔内加入 20 μ L CKK-8, 轻晃混匀, 待颜色变为橙色后置于酶标仪下测量, 其测量波长设为 450 nm, 参比波长设为 650 nm。以后每天按以上方法取 6 孔进行测量, 测量 3 次取平均值, 连续测 16 d。最后以每天测量的 OD 值的平均值绘制细胞的生长曲线。

1.2.4 细胞鉴定 运用 DAPI 分别对纯化后的肛提肌卫星细胞和用分化培养基诱导分化的卫星细胞染色, 对静止期、活化期、分化期、终末分化期的卫星细胞进行鉴定。细胞经磷酸盐缓冲液漂洗 2 次后加入 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 清洗 3 次; 含 0.5% Tritonx-100 的 PBS 透膜 20 min, PBS 清洗 3 次; 5% 山羊血清封闭 30 min; 吸除山羊血清, 不用清洗, 之后分别加入稀释好的 Pax-7(1:50)、MyoD(1:50)、Desmin(1:50)、a-SCA(1:100)一抗放于 4°C 下孵育过夜, PBS 漂洗 3 次; 加入相应 DylightTM488-Labeled Antibody To Rabbit IgG(H+L)、DylightTM549-Labeled Antibody To Mouse IgG(H+L)、DylightTM488-Labeled Antibody To Rabbit IgG(H+L)、DylightTM488-Labeled Antibody To Rabbit IgG(H+L) 标记二抗(1:500), 放于孵育盒内避光孵育 1 h, PBS 充分漂洗 4 次, 最后加入 DAPI 染色剂, 反应 30 min, 使用 PBS 清洗 4 次后于荧光显微镜下观察。

2 结 果

2.1 大鼠肛提肌组织的分离

肛提肌为一对四边形薄扁肌, 起源于双侧耻骨联合盆面、肛提肌腱弓和坐骨棘盆面, 肌纤维行向内下, 于中线处汇合止于会阴中心腱、直肠壁、肛尾韧带和尾骨尖, 左右联合成漏斗状。每侧肛提肌又分为 3 部分: 耻骨直肠肌、耻尾肌和髂

尾肌。其中耻骨直肠肌起自耻骨盆面,后行绕过直肠肛管交界处两侧和后方,与对侧肌纤维交织,构成“U”形带。利用肛提肌的解剖位置关系对大鼠进行解剖,成功将大鼠的直肠阴道分离出来(图 1A),并在镜下用精细剪成功游离出了耻骨直肠肌组织(肛提肌中较肥厚的部分)(图 1B)。

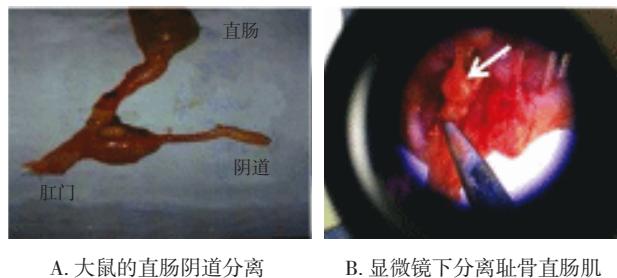


图 1 肛提肌组织的分离

2.2 体外培养及形态学观察

经过分离纯化后的肛提肌卫星细胞在显微镜下观察为透亮的球状体,轻晃培养瓶可见细胞浮动,瓶底可见部分过滤的肌纤维(图 2A)。在培养箱中培养半小时后观察,部分细胞已贴壁,不随培养液浮动。培养 1 h 后,观察到贴壁细胞变为扁平状,伸出细小的伪足,之后使用差速贴壁法分离 PP1 内的贴壁细胞及未贴壁细胞(图 2B)。PP1、PP2 培养瓶的细胞呈扁平状,色泽较浅,有较多突出部分,形态不规则,为成纤维细胞。PP3 培养瓶中的细胞为梭形,形态较规则,细胞体积较成纤维细胞小,细胞的折光性强。随着细胞密度增加,卫星细胞呈现出细长梭形,并成放射状排列(图 3A)。随着传代次数增加,卫星细胞的形态出现不规则,细胞生长减慢且折

光性减弱(图 3B)。

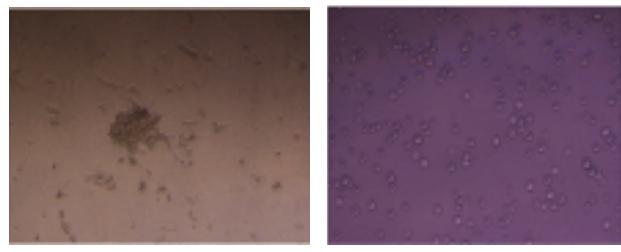


图 2 原代细胞培养差速贴壁前后对比图(100×)

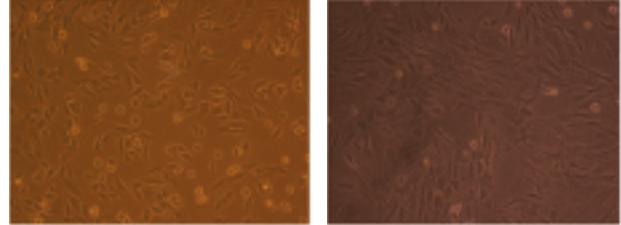


图 3 原代细胞传代过程细胞状态对比图(100×)

2.3 CCK-8 绘制生长曲线

细胞接种于 96 孔板,每天取 6 孔,加入 CCK-8 后放于酶标仪下测量光密度并将它作为评价细胞密度的指标。CCK-8 的测量时间经过预实验摸索得出,光密度在 2 h 以前上升较快,之后上升减慢,故选取 2 h 作为测量的时间节点(图 4)。CCK-8 结果显示,肌卫星细胞在接种后的前 1~2 d 为潜伏期(密度依赖),细胞生长速度较慢,光密度增加不明显。3 d 后细胞呈倍数扩增,至第 10 天由于细胞过于密集,生长速度下降,部分细胞出现分化(图 5)。

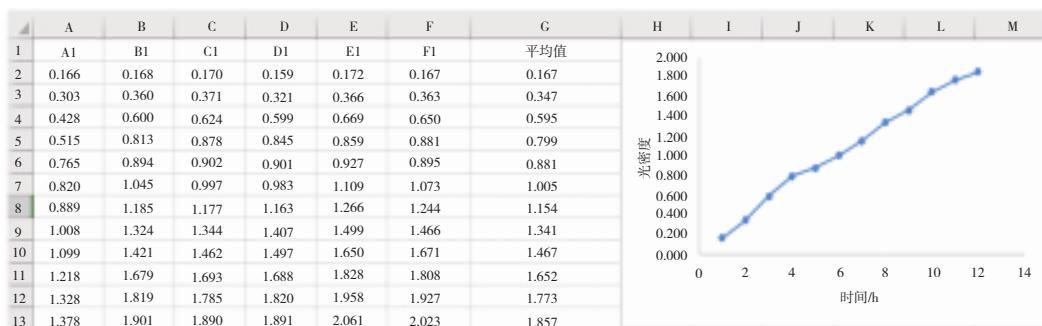


图 4 添加 CCK-8 后各时间点的光密度

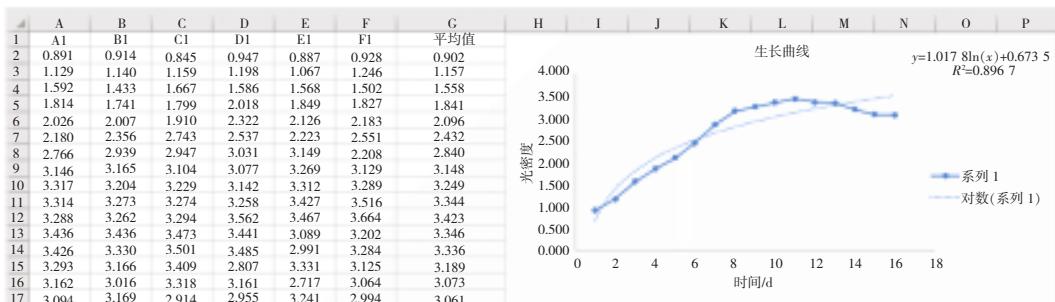


图 5 细胞生长曲线

2.4 细胞鉴定

荧光染色结果显示, Pax-7 和 MyoD 在细胞静止期和增殖期呈现高表达, 细胞呈阳性反应(图 6A、B、C、D), 胞核着色。细胞经分化培养基处理后, 免疫荧光染色结果显示 Desmin 呈高表达, 细胞核着色, 呈阳性反应(图 6E、F)。随着分化因子的持续作用, 肌管开始形成, 细胞的分化进入终末期, 此时荧光显微镜下观察到 a-SCA 在细胞中呈高表达(图 6G、H)。

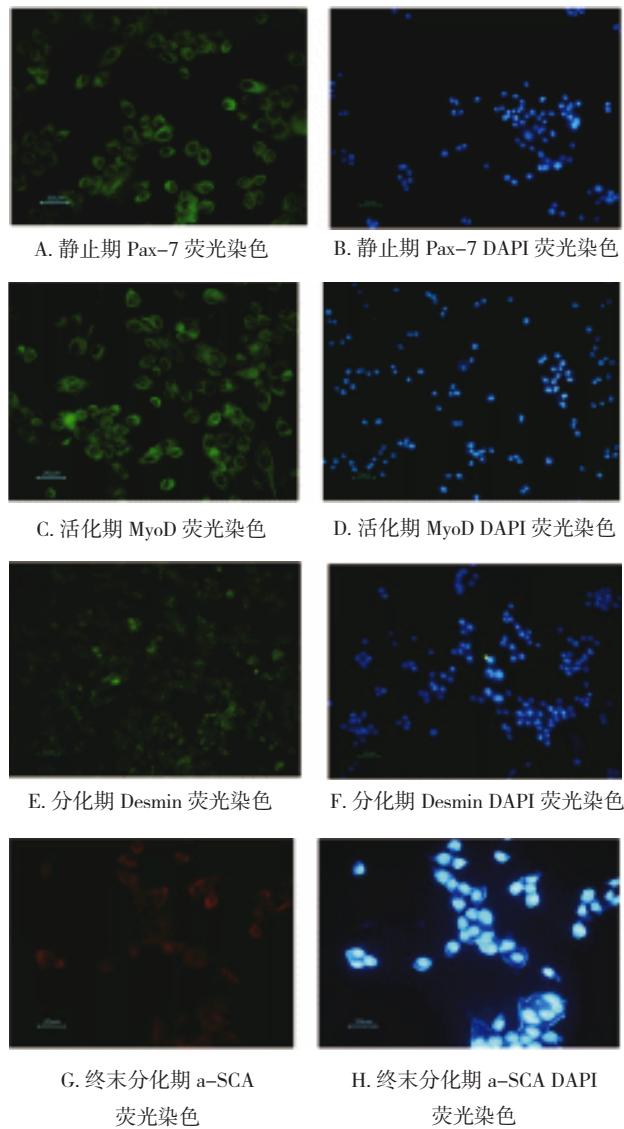


图 6 免疫荧光染色结果

3 讨 论

1961 年 Maur 首次在青蛙肌纤维表面上观察到形态为扁平小梭形的肌卫星细胞^[6]。它可以发生对称分裂和不对称分裂。当肌肉组织损伤时, 会被激

活呈不对称分裂并迁移至受损区域发生增殖和分化, 最终融合形成肌纤维来修复损伤; 而对称分裂主要是产生更多的卫星细胞并储存在卫星细胞池中, 以便应对下次应激^[7]。目前, 已成功从多种动物的骨骼肌组织中分离出卫星细胞, 并对其进行了体外培养, 而关于从肛提肌组织中分离肌卫星细胞却少有报道。肛提肌是盆底肌肉中最大、最重要的肌群, 对盆腔脏器的支撑起关键作用。它的损伤与女性盆底功能障碍 (pelvic floor dysfunction, PFD) 密切相关, 因此体外分离、培养肛提肌卫星细胞对相关疾病的研究及细胞疗法的探讨非常有意义。目前, 大多采用分步酶消化法从动物的肌肉组织中分离卫星细胞, 其缺点是会有其他类型的细胞掺杂其中, 导致肌卫星细胞的纯度不够。因此, 需要通过差速贴壁法来提高细胞纯度^[8]。本实验参照前人的分离方法并进行了少许改进。胶原酶主要用于细胞外基质且相对温和, 因此延长了胶原酶的作用时间。向培养皿中加入胶原酶并置于恒温箱中, 为了使消化液和肌肉组织充分接触, 每 3 min 晃动一下培养皿, 之后根据肌肉组织的形态变化来调整消化时间, 直至观察到肌纤维质地疏松、颜色变白, 此时停止胶原酶的消化作用, 换成胶原酶和胰蛋白酶的混合液继续消化。从肌肉组织中消化分离下来的肌卫星细胞会受多种理化损伤, 导致其活性和贴壁能力受影响, 因此为了提高细胞纯度需要进行多次差速贴壁。本实验对消化分离下来的细胞进行了 4 次差速贴壁, 最终获得了纯度较高的肛提肌卫星细胞 PP4。体外培养时, 由于细胞脱离了正常的生理环境, 其生长和功能会出现一些变化。本研究通过绘制细胞生长曲线, 发现细胞在体外环境中生长受到抑制。将前 2 d 的细胞接种于 96 孔板, 添加 CCK-8 后光密度值增加不明显, 细胞生长较慢; 3 d 后呈倍增趋势; 10 d 后由于细胞密度过大导致细胞无法生长并出现分化, 故光密度值下降。同时, 当细胞密度高于 80% 或培养基血清浓度低于 5% 时细胞容易出现分化和相互融合形成肌管。因此, 体外培养时, 应及时传代和调节培养条件, 避免由于血清浓度过低或细胞密度过大引起细胞过早分化^[9]。在传代培养过程中, 随着传代次数增多, 细胞容易出现老化现象。细胞传代至 8 代以后较容易出现老化, 细胞的“干性”减弱, 并且不同材料的培养板会对细胞的生长产生影响。

研究发现,将分离下来的肌卫星细胞培养在刚度近似肌肉的聚乙二醇水凝胶中,细胞可以更好地生存并表达出更高的 Pax-7 水平^[10-11]。不同时期的肌卫星细胞其转录水平和功能不同,Pax-7 主要在静止期卫星细胞中表达^[12-13];成肌决定因子是活化标志,表达于活化细胞^[14];Desmin 是成肌细胞分化的重要调节因子,成肌细胞活化后开始大量表达^[15];a-SCA 表达于分化的终末期,此时大量肌管形成^[16]。因此,在肌卫星细胞体外鉴定过程中,通常将以上分子作为细胞鉴定的依据。本研究采用免疫荧光染色来鉴定不同时期的肛提肌卫星细胞,结果显示 Pax-7 和成肌决定因子在静止期呈高表达,表明消化分离的细胞为肌卫星细胞;经分化培养基诱导分化后,检测结果显示 Desmin 和 a-SCA 呈阳性表达,表明细胞具有较好的分化、成肌能力。

总之,本研究成功从大鼠肛提肌中获得了后续实验所需的肌卫星细胞,细胞纯度较高,生长良好并且有很好的增殖、分化能力。同时本研究团队也掌握了一套相对成熟的肛提肌卫星细胞分离、纯化和体外培养方法,并掌握了其增殖、分化特征。本实验也具有一些局限性,如分离的肌卫星细胞产量较低、传代次数增加会使细胞性状发生改变、培养瓶底部经聚乙烯处理虽增加了细胞贴壁但也使培养时间增加最终导致细胞老化等,有待进一步研究解决。

参 考 文 献

- [1] Sacco A, Doyonnas R, Kraft P, et al. Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells[J]. *Nature*, 2008, 456(7221): 502-506.
- [2] 陈茂, 洪莉, 李素廷, 等. 肌卫星细胞与其微环境作用及其活化增殖相关通路的研究进展[J]. 武汉大学学报(医学版), 2019, 40(4): 683-688.
- [3] 郑琪, 瞻梦华, 朱龙, 等. 安淮山羊骨骼肌卫星细胞的分离培养与鉴定[J]. 安徽农业大学学报, 2017, 44(2): 198-202.
- [4] 代阳, 王铁敏, 刘新峰, 等. 小鼠骨骼肌卫星细胞的分离培养和鉴定[J]. 天津农学院学报, 2014, 21(1): 1-4.
- [5] Tabakov VY, Zinov'eva OE, Voskresenskaya ON, et al. Isolation and characterization of human myoblast culture *in vitro* for technologies of cell and gene therapy of skeletal muscle pathologies[J]. *Bull Exp Biol Med*, 2018, 164(4): 536-542.
- [6] Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers[J]. *J Biophys Biochem Cytol*, 1961, 9(2): 493-495.
- [7] Wang YX, Feige P, Brun CE, et al. EGFR-aurka signaling rescues polarity and regeneration defects in dystrophin-deficient muscle stem cells by increasing asymmetric divisions[J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 24(3): 419-432.e6.
- [8] Chen YP, Wang SY, Liu T, et al. Isolation, culture and identification of satellite cells in rat multifidus muscle[J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2018, 34(8): 714-717.
- [9] Vaughn MA, Phelps KJ, Gonzalez JM. *In vitro* supplementation with the porcine plasma product, betaGRO®, stimulates activity of porcine fetal myoblasts and neonatal satellite cells in a divergent manner[J]. *Animal*, 2018, 12(9): 1912-1920.
- [10] Gilbert PM, Havenstrite KL, Magnusson KE, et al. Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture[J]. *Science*, 2010, 329(5995): 1078-1081.
- [11] Rossi CA, Flaibani M, Blaauw B, et al. *In vivo* tissue engineering of functional skeletal muscle by freshly isolated satellite cells embedded in a photopolymerizable hydrogel[J]. *FASEB J*, 2011, 25(7): 2296-2304.
- [12] 李江, 方克伟. 骨骼肌卫星细胞成肌化机制研究进展[J]. 医学研究生学报, 2016, 29(9): 999-1003.
- [13] Günther S, Kim J, Kostin S, et al. Myf5-positive satellite cells contribute to Pax7-dependent long-term maintenance of adult muscle stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(5): 590-601.
- [14] Hwang J, Lee SJ, Yoo M, et al. Kazinol-P from *Broussonetia kazinoki* enhances skeletal muscle differentiation via p38MAPK and MyoD[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 456(1): 471-475.
- [15] Zhang D, Yan K, Zhou J, et al. Myogenic differentiation of human amniotic mesenchymal cells and its tissue repair capacity on volumetric muscle loss[J]. *J Tissue Eng*, 2019, 10: 2041731419887100.
- [16] Tang X, Su XH, Zhong ZH, et al. Molecular mechanisms involved in TGF-β1-induced muscle-derived stem cells differentiation to smooth muscle cells[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(8): 5150-5161.

(责任编辑:唐秋姗)