

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00123

· 论 著 ·

人骨髓间质干细胞向脂肪细胞诱导分化过程中端粒酶活性的变化

汤立旦¹, 余建², 王冲², 来晓瑜²

1. 浙江医学高等专科学校医学二系, 杭州 310053

2. 浙江大学医学院附属第一医院血液科, 杭州 310003

[摘要] **目的** 观察体外培养人骨髓间质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)成脂分化过程中端粒酶活性的变化规律,并探讨其可能的机制。**方法** 通过贴壁培养法从人骨髓中分离 MSCs,利用造血干细胞相关表面抗体对 MSCs 进行表型鉴定,利用相应诱导分化剂,诱导 MSCs 向成骨细胞、脂肪细胞和神经元样细胞分化,分析其多向分化潜能。以端粒重复序列扩增法(TRAP)检测 MSCs 及 MSCs 诱导成脂分化过程中端粒酶活性;以 Western 印迹法检测 MSCs 及 MSCs 诱导成脂分化过程中端粒酶反转录酶(hTERT)及端粒相关蛋白[端粒重复序列结合因子 1(TRF1)、端锚聚合酶 1(Tankyrase 1)]的表达水平。**结果** TRAP 法检测传代培养的 MSCs 端粒酶呈阴性表达,而 MSCs 诱导成脂分化过程中,端粒酶活性明显升高,以第 7 天最高($P<0.05$),其后呈下降趋势;Western 印迹法检测显示,hTERT 在 MSCs 中有微弱表达,在 MSCs 诱导成脂分化过程中,hTERT 和 Tankyrase 1 表达水平升高,以第 7 天最高,此后逐渐下降,而 TRF1 表达水平保持不变。**结论** 体外培养的 MSCs 端粒酶呈微弱表达,MSCs 在成脂诱导分化过程中,端粒酶活性先升高,其后逐渐下降,而 Tankyrase 1 可能在其中发挥重要作用。

[关键词] 间质干细胞;细胞分化;脂肪细胞;端粒酶

[中图分类号] Q 813 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)02-0123-05

Changes of telomerase activity during differentiation of human mesenchymal stem cells into adipocytes

TANG Li-dan¹, YU Jian², WANG Chong², LAI Xiao-yu²

1. Department of Medicine II, Zhejiang Medical College, Hangzhou 310053, Zhejiang, China

2. Department of Hematology, the First Affiliated Hospital, Zhejiang University Medical School, Hangzhou 310003, Zhejiang, China

[Abstract] **Objective** To study the telomerase activity changes during the differentiation of human mesenchymal stem cells (MSCs) into adipocytes and the related mechanism. **Methods** Human MSCs were isolated from human bone marrow by plastic adhesion and were characterized by immune phenotyping. The multilineage differentiation potential of MSCs was confirmed by inducing MSCs to differentiate into osteoblasts and neuron-like cells by corresponding agents. Telomeric repeat amplification protocol (TRAP) assay was performed to examine telomerase activity in MSCs during adipogenic differentiation of MSCs; Western blotting analysis was used to examine the protein expression levels of hTERT, TRF1, and Tankyrase 1. **Results** TRAP showed that telomerase was negative in MSCs, but greatly up-regulated during the adipogenic differentiation process, peaked on the 7th day after adipogenic differentiation of MSCs ($P<0.05$), and then decreased thereafter. Western blotting analysis showed slight hTERT expression in MSCs, and the expression of hTERT and Tankyrase 1 increased during the adipogenic differentiation process, peaked on the 7th day, and gradually decreased thereafter. The expression of TRF1 remained unchanged. **Conclusion** Telomerase is weakly expressed in MSCs; the expression is increased during the adipogenic differentiation process of MSCs and then gradually decreases; and Tankyrase 1 may play an important role during the process.

[Key words] mesenchymal stem cells; cell differentiation; adipocytes; telomerase

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(2):123-127]

间质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)条件下可以分化成脂肪细胞、成骨细胞、神经元细胞具有自我更新、高度增殖及多向分化的能力,在特定等^[1-2]。由于该类细胞来源充足,取材方便,能在体

[收稿日期] 2010-11-15

[接受日期] 2010-12-24

[基金项目] 浙江省教育厅基金(20061017)。Supported by Fund of Zhejiang Provincial Education Department (20061017)。

[作者简介] 汤立旦, 硕士, 副教授。E-mail: wwwtld@zjmc.net.cn

外大规模扩增的同时保持多向分化能力,且在异体移植中排斥反应小,被认为是组织工程和基因工程的理想种子细胞,但其安全性和衰老等问题还有待于深入研究。端粒是存在于染色体末端的特殊结构,随着细胞有丝分裂而缩短,当端粒缩短至一定长度时,细胞就会出现衰老和死亡^[3],而端粒酶能合成端粒 DNA 并加到染色体末端,使端粒延长,从而延长细胞的寿命甚至使其永生^[4],故端粒酶活性间接反映干细胞增殖能力和移植的安全性(无致瘤性)。

目前有关 MSCs 及分化过程中的端粒酶活性尚不明确,我们早期研究^[5]发现, MSCs 端粒酶呈阴性表达,而分化成脂肪细胞的 MSCs 端粒酶呈阳性表达,但具体机制有待进一步研究。本研究拟在前期工作基础上,采用 TRAP 法,动态观察 MSCs 诱导成脂分化过程中端粒酶表达变化情况,并通过检测 MSCs 诱导成脂分化过程中 hTERT 及其端粒相关蛋白 TRF1、Tankyrase 1 的表达变化情况,探讨 MSCs 成脂分化过程中端粒调控机制,为 MSCs 的临床应用提供实验数据及理论依据。

1 材料和方法

1.1 人骨髓间质干细胞的分离、培养及鉴定

无菌条件下采集健康骨髓供者骨髓 10 ml,肝素化骨髓液与等量含 2% (V/V) 胎牛血清 (Gibco 公司) 的 PBS 液混匀,置等量 Ficoll-Paque 分离液上,2 000 r/min (600×g),离心 20 min,收集单个核细胞层,用含 2% (V/V) 胎牛血清的 PBS 液洗涤 2 次,1 000 r/min (200×g),离心 10 min。再用含 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养液 (Gibco 公司) 重悬细胞并计数,以 2.0×10^6 个细胞/ml 密度接种于 T-25 cm² 培养瓶中,每瓶 5 ml,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱孵育,24 h 后更换培养基,去除非贴壁细胞,然后每 3 d 换液 1 次。原代培养细胞贴壁融合达 80%~90% 时,用 0.25% 胰蛋白酶-1 mmol EDTA (Gibco 公司) 消化,按 1:3 比例传代培养。

取第 1、3、5 代细胞,用 0.25% 胰蛋白酶-1 mmol EDTA 消化收获细胞,制成单个细胞悬液。再以含 2% (V/V) 牛血清白蛋白和 0.1% 偶氮钠盐的 PBS 液 (流式缓冲液) 冲洗细胞,与 CD14-FITC、CD45-FITC、CD44-FITC、HLA-DR-FITC、CD34-PE、CD29-PE 和 CD166-PE 单克隆抗体 (Beckman Coulter 公司) 室温下孵育 15 min,再以 3 ml 流式缓冲液冲洗细胞,离心后重悬细胞于 0.5 ml 的流式缓冲液中,使用同型对照单克隆抗体确定背景标记,流式细胞仪分析 5 000 个细胞,检测阳性率。实验重复

3 次。

1.2 MSCs 多向诱导分化及检测

1.2.1 MSCs 诱导向脂肪细胞分化

当第 3 代 MSCs 接近 70%~80% 融合后,更换培养液,加入脂肪细胞诱导分化培养基 (Stem Cell 公司),每周更换 2 次培养液,收集诱导分化第 7、14、21 天细胞,相差显微镜观察细胞形态,油红 O 染色观察细胞内脂肪形成。

1.2.2 MSCs 诱导向成骨细胞分化

当第 3 代 MSCs 接近 70%~80% 融合后,更换培养液,加入成骨培养基 (含 10^{-8} mol/L 地塞米松、10 mmol/L β-磷酸甘油、0.25 mmol/L 抗坏血酸及 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养液),每周更换 2 次培养液,收集诱导分化第 21 天细胞, Von Kossa 染色鉴定细胞外钙盐沉积。

1.2.3 MSCs 诱导向神经元样细胞分化

当第 3 代 MSCs 接近 70%~80% 融合后,用含 1 mmol/L 硫代甘油、10% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养液预诱导 24 h,更换培养液,再加入含 5 mmol/L 硫代甘油的无血清 DMEM 诱导 5 h 后,收集细胞,免疫组化 nestin 染色鉴定神经元样细胞。

1.3 端粒重复序列扩增法 (TRAP) 检测 MSCs 及 MSCs 诱导成脂分化过程中端粒酶活性

按端粒酶活性检测试剂盒 (Roche 公司) 说明书进行。(1) 细胞裂解液的制备:将裂解液加入待测 MSCs,4℃ 孵育 2 h,然后 4℃、14 000 r/min (12 000×g) 离心 15 min,收集细胞上清液,用标准考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度,冻存储用。(2) PCR:将 5 μg 样品总蛋白加入 PCR 反应体系,在 PCR 扩增仪中扩增:25℃ 延伸 30 min,94℃ 灭活 5 min,然后 94℃ 30 s,50℃ 30 s,72℃ 90 s,循环 30 次;72℃ 延伸 10 min。(3) ELISA:取 PCR 产物 5 μl 加入变性液 20 μl,混匀,室温放置 10 min,加入 225 μl 杂交液 (含地高辛标记的探针),混匀,取 100 μl,加入到包被于抗生物素的酶标板中,37℃ 摇床振荡 2 h,加入过氧化物酶并且与 TMB 底物显色 30 min,酶标仪测定 450 nm/690 nm 波长光密度 (D) 值。(4) 对照:以 α-interferon 作为阴性对照,人胚肾细胞 293 细胞株细胞 (293T) 作为阳性对照。(5) 结果判断标准:光密度差值 $\Delta D = D_{450} - D_{690}$, ΔD 代表细胞端粒酶活性。阳性对照 ΔD 应 > 1.5,阴性对照 $\Delta D < 0.25$,待测标本 ΔD 值减阴性对照 $\Delta D > 0.2$ 者为阳性。为了方便计算,用 (待测样本的 ΔD 值/293T 的 ΔD 值) × 100% 为待测样本端粒酶活性的相对数 (relative telomerase activity, RTA)。

1.4 Western 印迹法检测 MSCs 及 MSCs 诱导成

脂分化过程中端粒酶反转录酶(hTERT)及端粒相关蛋白表达水平 收集细胞,每份细胞以5倍体积的预冷蛋白质提取液重悬,剧烈振动混匀,100℃煮沸10 min,14 000 r/min(12 000×g)离心15 min,取上清,以小牛血清(BSA)作为蛋白定量标准,紫外吸收法测蛋白质含量,冻存储用。取100 μg的样品总蛋白质,经10%SDS-PAGE电泳(100 V)、转膜(100 V,1 h),以含5%脱脂奶的TBST封闭缓冲液室温封闭1 h后,与相应一抗(鼠抗hTERT单克隆抗体ab5181、兔抗TRF1单克隆抗体ab1423、鼠抗Tankyrase 1单克隆抗体ab13587;Abcam公司;鼠抗α-tubulin单克隆抗体DM1A、T6199;Sigma-Aldrich公司)4℃孵育过夜,TBST缓冲液洗膜后与相应的HRP偶联的抗鼠或抗兔的二抗(Jackson Immunoresearch公司)在室温孵育1 h,TBST缓冲液洗膜后,ECL(Pierce Chemical公司)温浴1 min,X光胶片感光20~60 s,经显影定影显现信号。

1.5 统计学处理 采用SPSS 11.0 for Windows统计处理软件分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组资料均数间比较采用 t 检验,多组资料均数间比较采用单因素方差分析,检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 MSCs表型鉴定 流式细胞检测结果表明:人骨髓间质干细胞表面黏附分子CD29(85.2%)、

CD44(91.7%)、CD166(98.9%)表达阳性,造血细胞分化抗原CD14(1.85%)、CD34(1.47%)、CD45(3.97%)、HLA-DR(1.90%)表达阴性,提示本实验培养扩增的MSCs是均一的细胞群,不含造血细胞。

2.2 MSCs多向诱导分化及检测

2.2.1 MSCs成脂分化 成脂诱导培养1周后,MSCs细胞形态开始变成圆形或多角性,相差显微镜下可观察到细胞胞质中出现高折光性的小脂滴,主要集中在细胞核周围,随着诱导时间的延长逐渐聚集成大的脂泡,细胞逐渐增大,细胞核被脂肪滴挤于细胞一侧,油红O染色,脂滴为橙红色(图1A)。分别取诱导分化第7、14、21天MSCs,油红O染色显示诱导分化为脂肪细胞比例分别约为15%、35%、80%。

2.2.2 MSCs成骨分化 成骨诱导培养3~4 d,大约30%细胞形态发生变化,由纺锤型变为立方型或多角型,1周后出现钙化斑点,约2~3周细胞形成广泛均一的矿化结节样结构。培养21 d后,Von Kossa法染色,可见棕黑色的细胞外基质钙盐沉积(图1B)。

2.2.3 MSCs向神经元样细胞分化 诱导1 h后,细胞形态开始出现变化,诱导3~5 h后,大多数MSCs变为典型的神经元样细胞,细胞有较多的长突起,多个神经元样细胞突起可相互延伸并形成网状,免疫组化染色显示,nestin呈强阳性棕黄色表达(图1C)。

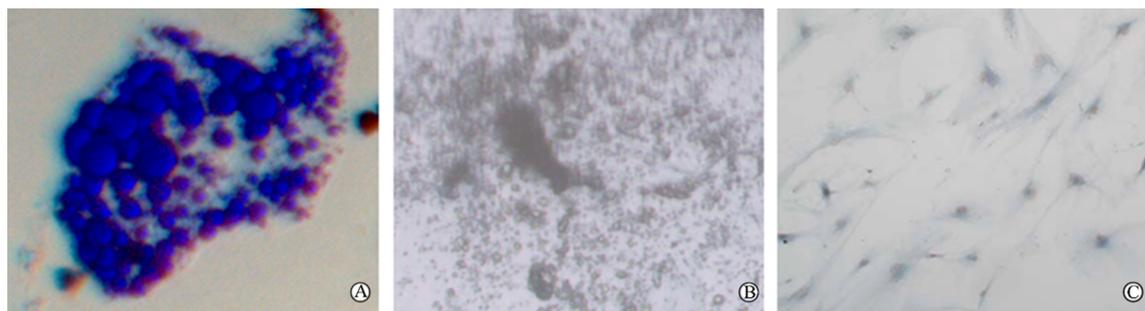


图1 MSCs多向诱导分化及鉴定

Fig 1 Multilineage differentiation of MSCs

A: Adipogenic differentiation capacity of MSCs (Oil Red O staining); B: Osteogenic differentiation capacity of MSCs (Von Kossa staining); C: Neuronal differentiation capacity of MSCs (nestin staining). Original magnification: ×200

2.3 MSCs及MSCs诱导成脂分化过程中端粒酶活性的检测 早期研究发现MSCs端粒酶活性呈阴性,而分化成为脂肪细胞的MSCs端粒酶呈阳性表达。本研究进一步动态观察MSCs诱导成脂分化过程中端粒酶的表达情况,结果(图2)显示:MSCs诱导成脂分化过程中,端粒酶活性在第7天明显升高($P < 0.05$),其后端粒酶水平呈下降趋势,但仍呈阳

性表达($P < 0.05$)。

2.4 MSCs及MSCs诱导成脂分化过程中hTERT蛋白质水平的检测 Western印迹检测显示,hTERT在MSCs中有微弱表达,而MSCs诱导成脂分化过程中,hTERT表达升高,以第7天最高,此后逐渐下降,但仍持续表达(图3)。

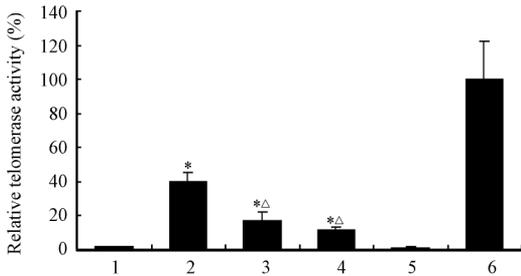


图2 TRAP法检测MSCs成脂分化过程中端粒酶活性

Fig 2 Telomerase activity during differentiation of MSCs into adipocytes as detected by TRAP

1: MSCs; 2: 7 days after adipogenic differentiation of MSCs; 3: 14 days after adipogenic differentiation of MSCs; 4: 21 days after adipogenic differentiation of MSCs; 5: Negative control (α -interferon); 6: Positive control (293 T cell). * $P < 0.05$ vs MSCs, $\Delta P < 0.05$ vs 7 days; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

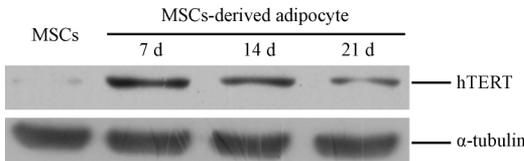


图3 Western印迹检测MSCs诱导成脂分化过程中hTERT蛋白表达水平

Fig 3 Expression of hTERT protein during differentiation of MSCs into adipocytes as detected by Western blotting analysis

2.5 MSCs及MSCs诱导成脂分化过程中端粒相关蛋白表达水平的检测 我们进一步研究MSCs诱导成脂分化过程中端粒相关蛋白的表达情况,结果(图4)显示:MSCs诱导成脂分化前后TRF1表达水平一致,无明显改变;而Tankyrase 1蛋白水平在MSCs诱导成脂分化第7天明显升高,其后呈下降趋势,但仍高于成脂分化前。

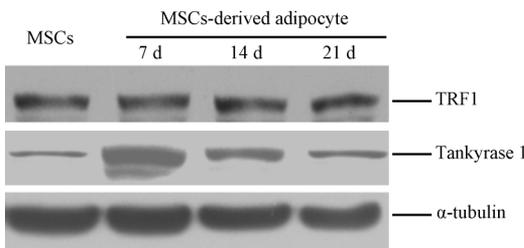


图4 Western印迹检测MSCs诱导成脂分化过程中TRF1和Tankyrase 1蛋白质表达水平

Fig 4 Expression of TRF1 and Tankyrase 1 protein during differentiation of MSCs into adipocytes as detected by Western blotting analysis

3 讨论

端粒酶是一种核糖核蛋白复合体,由端粒酶反转录酶催化亚单位(TERT)、端粒酶RNA模板(TR)和端粒酶相关蛋白等部分组成^[6-8],其中TERT是端粒酶的活性亚基,在体内的表达水平与端粒酶全酶活性基本一致。已经明确多种成体干细胞如造血干细胞、胃肠干细胞、皮肤干细胞等能表达低水平的端粒酶活性,从而维持增殖能力,而在诱导分化过程中,干细胞端粒酶活性逐渐下降^[9]。MSCs作为一种间质来源的成体干细胞,目前有关其端粒酶活性的研究结果并不一致。本研究用TRAP法检测体外培养的MSCs,发现其端粒酶表达阴性,而应用hTERT单克隆抗体则可以检测到微量hTERT的表达。进一步我们用TRAP法检测MSCs成脂分化过程中端粒酶表达情况,结果显示MSCs在诱导成脂分化过程中,端粒酶活性在第7天明显升高,其后端粒酶水平呈下降趋势,应用hTERT抗体,我们观察到相似的结果。上述结果说明MSCs带有的hTERT基因在体外培养增殖的过程中处于静止状态,呈低于TRAP法检测水平的低表达,而在成脂分化过程中,原来静止的hTERT基因被激活而表达端粒酶,其原因可能是MSCs分化过程需要端粒酶的表达^[10]。其后端粒酶水平的降低可能与大部分MSCs经分化后形成无分裂能力的脂肪细胞有关,具体机制还有待进一步研究。

MSCs作为组织工程和基因工程的理想种子细胞,在其应用到临床之前还必须对其安全性进行深入研究。目前认为端粒酶活性间接反映干细胞增殖能力和移植的安全性(无致瘤性),其异常激活和肿瘤发生密切相关^[11-12]。而Masutomi等^[13]的研究显示,即使是在正常的细胞中,也存在有端粒酶的动态表达,提示端粒酶对正常细胞的增殖也是必要的。因此,正常细胞与肿瘤细胞的差异不在于是否表达了端粒酶,而在于其表达模式,如表达的水平与时相等。我们的实验显示在MSCs在体外成脂诱导分化早期,端粒酶的表达一度升高,但随后呈下降趋势,同时MSCs在成脂分化过程中端粒酶表达水平也明显低于肿瘤细胞(293T细胞),提示MSCs作为种子细胞可能是安全的,但其安全性还有待于进一步的体内实验加以证实。

端粒酶活性受到多种蛋白质的调控, 这些蛋白质通过蛋白质相互作用影响了端粒酶全酶的组装和去组装从而使其空间构象发生改变, 或使其与端粒序列的结合能力改变而影响端粒酶的功能, 或直接抑制端粒酶活性^[14]。TRF1 和 Tankyrase 1 是近年来发现的一对重要的端粒酶调控蛋白。研究发现 TRF1 通过与端粒双链 DNA 结合阻断端粒酶结合位点从而使端粒酶不能发挥作用, 起到端粒负调控作用^[15], 而 Tankyrase 1 具有聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(PARP)催化活性结构域, 能催化 TRF1 发生多聚腺苷核糖化, 并从端粒结合部位解离, 暴露端粒酶结合位点从而起到促进端粒酶活性的作用^[16]。本研究发现 MSCs 在成脂分化过程中, TRF1 蛋白量不变, 而 Tankyrase 1 蛋白量和端粒酶活性相似, 在 MSCs 诱导成脂分化第 7 天明显升高, 其后呈下降趋势。我们的实验提示 Tankyrase 1 在 MSCs 成脂分化过程中端粒酶的激活发挥作用, 其具体机制可能是 Tankyrase 1 通过催化 TRF1 发生多聚腺苷核糖化从端粒结合部位解离, 暴露端粒酶结合位点, 促进端粒酶活性作用; 而 TRF1 量在 MSCs 成脂分化过程中保持不变, 可能是因为 Tankyrase 1 通过调节结合在端粒 DNA 上的 TRF1 量从而发挥调控端粒酶活性的作用, 其并没有对 TRF1 总量产生影响, 但具体机制究竟如何, 有待深入研究。

本研究表明, 体外培养的 MSCs 端粒酶呈微弱表达, MSCs 在成脂诱导分化过程中, 端粒酶活性先升高, 其后逐渐下降, 而 Tankyrase 1 可能在其中发挥重要作用。这为进一步研究 MSCs 的端粒生物学特性及临床应用的安全性提供实验数据及理论依据。

[参考文献]

- [1] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, Jaiswal R K, Douglas R, Mosca J D, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*, 1999, 284: 143-147.
- [2] Augello A, De Bari C. The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells[J]. *Hum Gene Ther*, 2010, 21: 1226-1238.
- [3] Oeseburg H, de Boer R A, van Gilst W H, van der Harst P. Telomere biology in healthy aging and disease[J]. *Pflugers Arch*, 2010, 459: 259-268.
- [4] Morin G B. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats[J]. *Cell*, 1989, 59: 521-529.
- [5] Zhao Y M, Li J Y, Lan J P, Lai X Y, Luo Y, Sun J, et al. Cell cycle dependent telomere regulation by telomerase in human bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 369: 1114-1119.
- [6] Collins K. Physiological assembly and activity of human telomerase complexes[J]. *Mech Ageing Dev*, 2008, 129(1-2): 91-98.
- [7] Autexier C, Lue N F. The structure and function of telomerase reverse transcriptase[J]. *Annu Rev Biochem*, 2006, 75: 493-517.
- [8] Cairney C J, Keith W N. Telomerase redefined: integrated regulation of hTR and hTERT for telomere maintenance and telomerase activity[J]. *Biochimie*, 2008, 90: 13-23.
- [9] Forsyth N R, Wright W E, Shay J W. Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again[J]. *Differentiation*, 2002, 69(4-5): 188-197.
- [10] Liu L, DiGirolamo C M, Navarro P A, Blasco M A, Keefe D L. Telomerase deficiency impairs differentiation of mesenchymal stem cells[J]. *Exp Cell Res*, 2004, 294: 1-8.
- [11] Artandi S E, DePinho R A. Telomeres and telomerase in cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31: 9-18.
- [12] Deng Y, Chang S. Role of telomeres and telomerase in genomic instability, senescence and cancer[J]. *Lab Invest*, 2007, 87: 1071-1076.
- [13] Masutomi K, Yu E Y, Khurts S, Ben-Porath I, Currier J L, Metz G B, et al. Telomerase maintains telomere structure in normal human cells[J]. *Cell*, 2003, 114: 241-253.
- [14] Smogorzewska A, de Lange T. Regulation of telomerase by telomeric proteins[J]. *Annu Rev Biochem*, 2004, 73: 177-208.
- [15] van Steensel B, de Lange T. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1[J]. *Nature*, 1997, 385: 740-743.
- [16] Smith S, de Lange T. Tankyrase promotes telomere elongation in human cells[J]. *Curr Biol*, 2000, 10: 1299-1302.

[本文编辑] 贾泽军