茜素红染色

1 实验目的

通过茜素红染色判定细胞成骨诱导效果。

2 材料与仪器

2.1 实验材料

新西兰大白兔（来源）。

表 2.1.1 主要试剂

名称	厂家
DMEM/F12 培养液	Hyclone
胎牛血清	Wisent
Ⅰ型胶原酶	Invitrogen
地塞米松	Amersco
β-甘油磷酸钠	Amersco
Vitamin C	Amersco
茜素红检测试剂盒	西安赫特生物科技有限公司

2.2 实验仪器

表 2.2.1 主要仪器

名称	厂家
CO_2 细胞培养箱	Thermo Scientific
倒置拍照显微镜	Leica
低速离心机	上海卢湘仪

3 实验方法

3.1 ADSCs 的分离

新西兰大白兔，无菌状态下切取兔腹股沟皮下脂肪组织，用无钙镁磷酸盐缓冲液（含双抗）反复冲洗两三次，再用眼科剪和眼科镊除去脂肪组织膜和血管。PBS 缓冲液冲洗 3 次，脂肪球置于平皿内，眼科剪刀剪碎至糊状，移入 25 cm^2 培养瓶，加入 2 倍体积的 0.1% Ⅰ型胶原酶。在 37.5℃预热的振荡培养箱内，190 rad/min 消化 30~35 min。消化内容物移入离心管，用等量的含有 10%FBS 的 DMEM/F12 培养基终止消化 1500 rad/min 离心 10 min 后弃去上清。沉淀物用 14 mL 含 10%FBS 的 DMEM/F12 培养基重新悬浮，接种于 2 个 75 cm^2 培养瓶，置于 37℃ 5%CO_2 饱和湿度的培养箱中培养。

3.2 ADSCs 的培养和传代

接种 72 h 后，观察记录细胞生长情况，将瓶中未贴壁细胞、脂肪组织小块和培养基移入新瓶并吹打，原瓶换液，新瓶半量加液。新瓶接种 48 h 后，根据细胞生长情况，可再次

将瓶中未贴壁细胞移出接种。贴壁生长的细胞，隔 2 天换液，除去非贴壁细胞。原代细胞培养 14~16 天生长接近汇合时进行传代培养。先倾倒培养皿中的培养基，用 PBS 液冲洗两次后，加入少量 0.25%胰蛋白酶润洗倾倒。加入适量 0.25%胰蛋白酶，倒置显微镜下观察，见贴壁细胞变成圆形，加入 10%FBS 的 DMEM/F12 培养基终止消化，以 1:2 进行传代培养。

3.3 成骨诱导

选取第 3 代 ADSCs 细胞，以每孔 1×10^5 个细胞接种到置有盖玻片的 6 孔板中，37℃孵育 24 h。待细胞贴壁后，加入成骨诱导培养基（含有 10%FBS、10^{-6}M 地塞米松、10^{-2}M β-甘油磷酸、50 μg/mL 抗坏血酸的高糖-DMEM 培养基），每周换液 2 次，并设立只加入对照培养基的孔为对照组。

3.4 茜素红染色

1) 细胞成骨诱导后培养 21 d，PBS 洗涤 2 次。每孔分别加入 1 mL 4%多聚甲醛溶液，4℃孵育 15min；

2) 弃上清，PBS 洗涤 3 次后，每孔加入 500 μL 茜素红染液，室温孵育 30min；

3) 使用倒置显微镜观察钙结节形成。

4 结果与分析

图 4.1 是两组细胞茜素红染色，Control 组不加成骨诱导液，Osteoinduction 组加成骨诱导液。从图 4.1 可以看出，与 Control 组比较，Osteoinduction 组有明显钙结节现象。这表明成骨诱导成功。

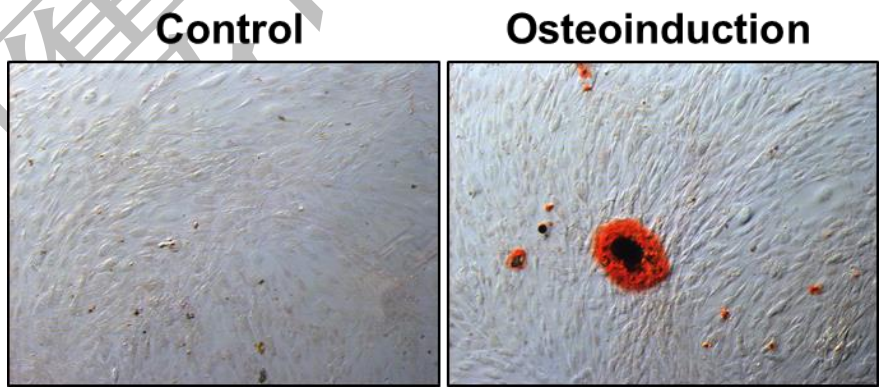

图 4.1 茜素红染色。第 3 代 ADSCs 细胞成骨诱导后培养 21 d，进行茜素红染色，显微镜观察。Control 组为 ADSCs 细胞空白对照组；Osteoinduction 组为 ADSCs 细胞成骨诱导处理组。