

人皮下脂肪来源脂肪干细胞的分离培养及鉴定

张迅轶, 仵敏娟, 刘厚奇*
(第二军医大学基础部组织胚胎学教研室, 发育生物学研究所, 上海 200433)

[摘要] **目的:**建立从切除得到的人皮下脂肪组织分离及培养脂肪干细胞(ADSC)的方法。**方法:**以人皮下脂肪组织为材料来源,分离、培养、扩增 ADSC,并应用针对相对特异性分子的免疫组化、流式细胞术及多向诱导分化等方法鉴定干细胞特性。**结果:**本实验培养的 ADSC 具有干细胞生长特性并表达相对特异分子,有多向分化的潜能,并且具有遗传稳定性。**结论:**从切取的人皮下脂肪组织可成功分离得到 ADSC,为组织工程提供了新的来源丰富、提取方便的种子细胞。
[关键词] 脂肪组织;间质干细胞;细胞分离;组织工程
[中图分类号] R 329.21 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)08-0813-04

Isolation, culture and identification of adipose derived stem cells from human subcutaneous adipose tissues

ZHANG Xun-yi, WU Min-juan, LIU Hou-qi* (Department of Histology and Embryology, Institute of Developmental Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To establish a method for isolating adipose derived stem cells (ADSCs) from resected human subcutaneous adipose tissues. **Methods:** ADSCs were isolated, cultured, and expanded from human subcutaneous adipose tissues. Immuno-fluorescent staining of specific molecules, FACS and multi-lineage differentiation induction were used to characterize the obtained ADSCs. **Results:** ADSCs obtained in this study had the characteristics of stem cells and expressed specific molecules; they also possessed a multi-lineage differentiation potential, which was genetically stable. **Conclusion:** ADSCs can be isolated from human subcutaneous adipose tissues, which provides a novel and abundant seeding cells for tissue engineering.
[KEY WORDS] adipose tissue; mesenchymal stem cells; cell separation; tissue engineering

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(8): 813-816]

脂肪干细胞(adipose derived stem cell, ADSC)是一种存在于脂肪组织中的间充质干细胞,在皮下白色脂肪组织中约占细胞总量的 10%~20%,其具有一般干细胞的特点,在鉴定、分离、扩增和分化的方法上也与一般成体干细胞类似。Zuk 等^[1]在抽脂术组织中成功分离培养 ADSC,并诱导分化成脂肪、成软骨、成骨、成神经细胞,最近更有人将其定向诱导成为心肌细胞^[2]。然而吸脂术对皮下脂肪有加热液化的操作过程,给细胞的存活和培养带来不利影响。本课题组取得开腹手术时切除、分离得到的皮下脂肪进行干细胞的提取培养实验,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 脂肪组织来源 皮下脂肪来源于 2006 年 4 月至 2007 年 3 月于第二军医大学长海医院进行腹部外科手术的患者。患者必须排除恶性肿瘤,严重心、肝、肾功能不全,各种急性感染性疾病、内分泌疾病,自身免疫疾病或先天性疾病等。须手术的应为良性病变,且手术疾病未影响体内基本的正常代谢,查体(血压、心率等)及各项临床常规检查(血常规、尿常规、粪常规、血生化、肝肾功能、血脂等)正常。共 7

例患者符合上述条件,其中男 2 例,女 5 例,年龄 32~62 岁,体质指数(BMI)为 22.3~25.1,患子宫肌瘤 5 例,胆囊结石 1 例,慢性胆囊炎 1 例。术前均征得患者本人同意,填写知情同意书,于手术时无菌采集皮下脂肪组织约 5 cm³。

1.2 细胞培养环境、培养液及培养用材料 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液置于 5% CO₂ 孵箱,胎牛血清、DMEM、磷酸盐缓冲液(PBS)、胰酶、胶原酶 I、DMSO 等试剂均购自美国 Gibco 公司,各种培养皿购自美国 Falcon 公司。细胞培养各步骤严格无菌操作。

1.3 ADSC 原代培养、传代、冻存及复苏 脂肪组织剪成 0.3 cm×0.3 cm×0.3 cm 大小,0.1 mmol/L PBS 冲洗后移入青霉素小瓶中,0.1% 胶原酶 I 消化,反复剪碎至糊状后置 37℃ 摇床,170 r/min 30 min,

[基金项目] 全军“十一五”科技攻关项目(06G62)。Supported by the 11th “Five-Year-Plan” Scientific and Technological Project of PLA (06G62).
[作者简介] 张迅轶,硕士生。E-mail: zzymeng@yahoo.com.cn
* Corresponding author. E-mail: houqiliu@126.com

1 000 r/min离心去上清,沉淀重悬于 0.075 mmol/L 氯化钾,静置 10 min 后离心去上清,沉淀重悬于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液中,移入培养皿中。隔天更换培养液。达到对数生长期后,用 0.25%胰酶 37℃消化,按 1:3 的比例进行传代^[3]。消化所得细胞除用于延续培养和进行相关实验外,其余均按照传统方法冻存:4℃ 10 min → -20℃ 30 min → -80℃ 过夜 → 液氮,长期储存。冻存后 6 个月,37℃水浴快速复苏细胞,接种于培养皿中继续传代扩增,进行相应的生物学特性检测。

1.4 ADSC 生物学特性检测 (1)利用倒置相差显微镜观察各代 ADSC 的活细胞形态特征及生长特性。(2)利用常规免疫荧光方法检测 ADSC 相对特异分子 E-cadherin、CD44、OCT-4 等。(3)流式细胞术检测 ADSC 相对特异分子 E-cadherin、CD44、OCT-4 等。(4)流式细胞术检测细胞周期,计算处于 G₀/G₁ 期的细胞比例。(5)分别取 P1、P5、P10、P15 代 ADSC 接种于数个小皿内,每天消化不同代的细胞,绘制各代生长曲线。(6)常规染色体核型制片分析,检测 ADSC 细胞遗传学稳定性。

1.5 ADSC 多向分化能力鉴定 按以下配方配制条件诱导培养基。诱导分化成脂肪细胞:10%FBS DMEM+1 mmol/L 地塞米松+10 μmol/L 胰岛素+0.5 mmol/L IBMX(3-异丁基-1-甲基黄嘌呤);诱导分化成骨细胞:10%FBS DMEM+0.1 μmol/L 地塞米松+50 μmol/L 抗坏血酸+10 mmol/L β-磷酸甘油;诱导分化成软骨细胞:10%FBS DMEM+6.25 μg/ml 胰岛素+50 μmol/L 抗坏血酸+10 ng/ml TGF;诱导分化成神经细胞:DMEM+10 μmol/L

β-巯基乙醇。P3 代 ADSC 传代后第 1 日开始加入诱导培养基,3 d 换液,14 d 后观察诱导结果,并进行各类细胞特殊染色及特异性分子免疫组化和 RT-PCR 鉴定诱导效果^[4-6]。(1)采用油红 O 染色鉴定脂肪细胞;RT-PCR 产物为 ap2(364 bp),正向引物 5'-GGA GTA GAA GCC AAA AGG-3',反向引物 5'-TAC GAA AAC AGT CTG TCA AT-3'。(2)采用 I 型胶原免疫组化法鉴定骨细胞;RT-PCR 产物为 osteopontin(415 bp),正向引物 5'-CTG TGC CAT ACC AGT TAA-3',反向引物 5'-GAT GTC AGG TCT GCG AAA-3'。(3)采用 II 型胶原免疫组化法鉴定软骨细胞;RT-PCR 产物为 II 型胶原(651 bp),正向引物 5'-CTT GGA CGC CAT GAA GGT-3',反向引物 5'-TCA GGT CAG GTC AGC CAT T-3'。(4)采用神经元特异烯醇化酶(NSE)免疫组化法鉴定神经细胞;RT-PCR 产物为 neurofilament(801 bp),正向引物 5'-TGA TAA AGG TGC CAA GGG-3',反向引物 5'-TGT GCA TGT CAA CGA GGT-3'。β-actin (228 bp),正向引物 5'-GGA CTT CGA GCA AGA GAT GG-3',反向引物 5'-AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG-3'。

2 结 果

2.1 ADSC 培养 种植入培养皿 48 h 后有大量梭形细胞贴壁,细胞形态不一,有短突起,细胞核居中。5 d 后,细胞达到对数生长期,细胞成长梭形融合聚集,紧密排列有一定方向性,呈螺旋状,传代 5 次左右后得到纯度很高的干细胞系。P1 代至 P10 代细胞间无明显形态变化。见图 1。

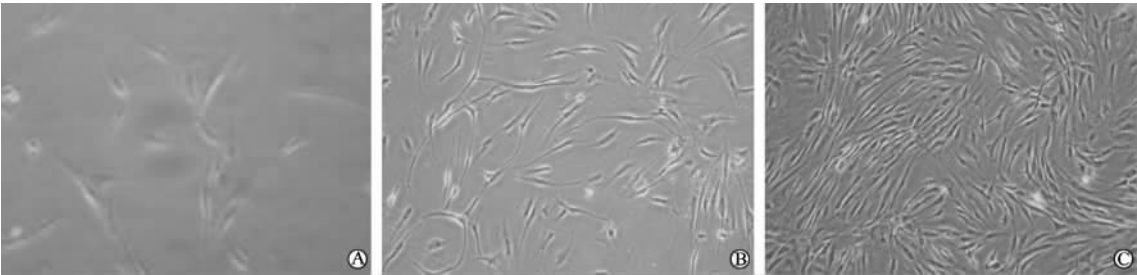


图 1 ADSC 原代培养
Fig 1 Primary culture of ADSCs(×200)

A:Primary culture day 3;B:Primary culture day 5;C:Primary culture day 10

2.2 ADSC 生物学特性鉴定 (1)免疫荧光结果显示 ADSC 表达相对特异性分子 CD44、OCT-4、E-cadherin(图 2A)。(2)流式细胞术检测结果同样显示 ADSC 表达上述标志分子(图 2B)。(3)流式细胞术检

测细胞周期,测得处于 G₀/G₁ 期的细胞比例达到 88.5%,说明绝大多数细胞是处于静止期的干细胞。(4)绘制 P1、P5、P10、P15 代 ADSC 生长曲线,显示各代细胞增殖无明显差异,细胞传代后生长迅速,第 4~

5 日开始进入对数生长期(图 2C)。(5)随机挑选来源标本,对细胞进行常规染色体核型制片,显示 ADSC

经传代并没有染色体核型改变(46,XY),说明 ADSC 遗传具有稳定性,一般不具成瘤危险性(图 2D)。

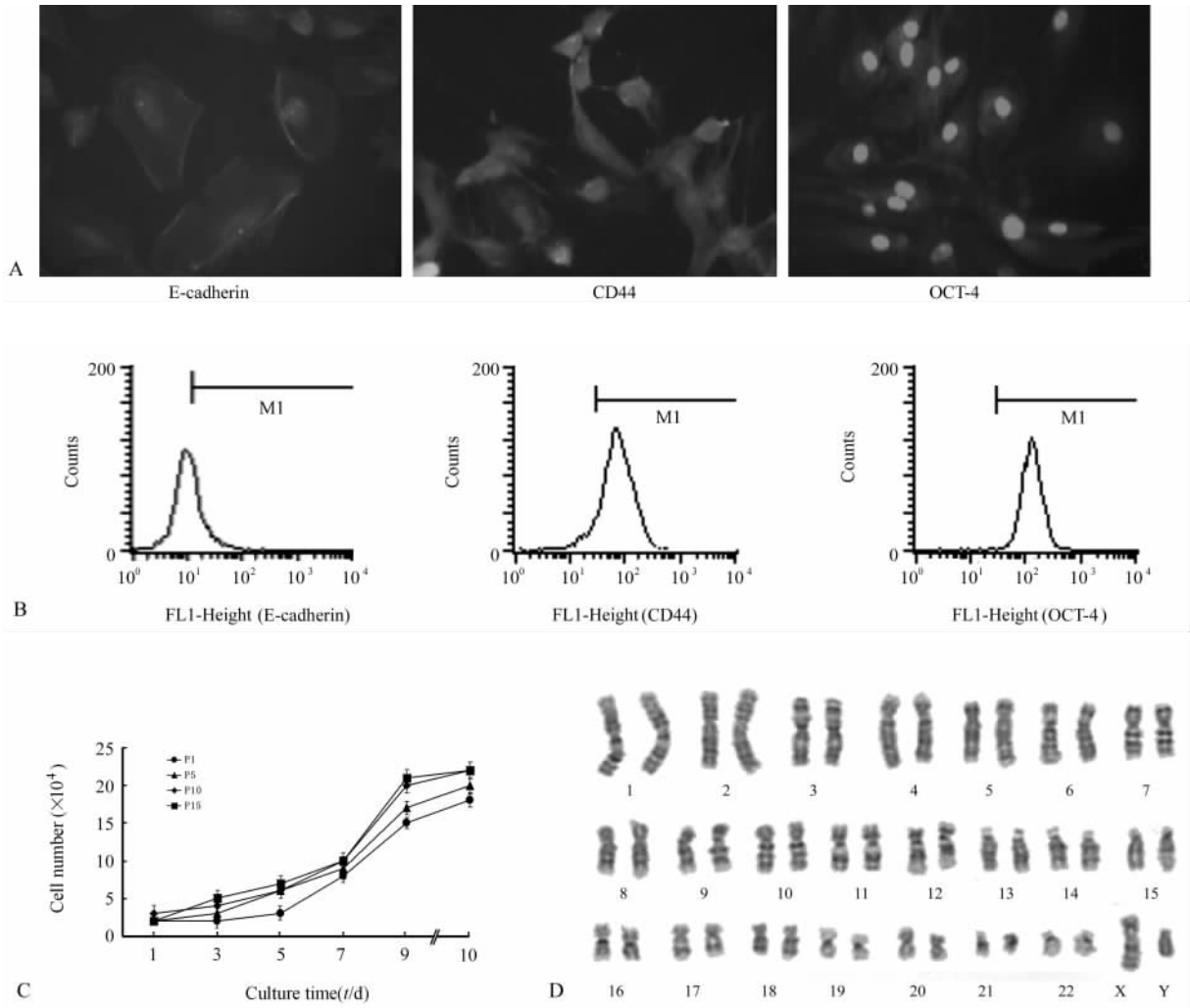


图 2 ADSC 的鉴定

Fig 2 Identification of ADSCs

A: Immunofluorescence observation of ADSCs (×400); B: FCM of ADSCs; C: Growth curves of ADSCs (Passage 1, 5, 10, 15); D: Karyotypically normal and stable (46,XY)

2.3 ADSC 多向分化能力鉴定 成脂肪细胞诱导分化第 3 日起可见细胞内有大小不一的脂滴形成,油红 O 染色示细胞内脂滴呈红色(图 3A)。成骨细胞诱导后,呈不规则形状的细胞数量增多,体积变大,胞质出现丝状或颗粒状物质,免疫组化显示细胞开始表达 I 型胶原(图 3B)。成软骨细胞诱导后,多数细胞体积变大变圆,胞质丰富,II 型胶原酶免疫组化检测可见胞质棕色的阳性细胞(图 3C)。成神经细胞诱导后,细胞质浓缩,并出现类似突起结构,NSE 免疫组化可见阳性信号(图 3D)。

ADSC 各诱导分化方向的特异性表达产物 RT-PCR 检测结果也与预期一致(图 4)。

3 讨论

目前对 ADSC 的研究大都集中于脂肪含量较多的动物,尤其是对兔和大鼠皮下脂肪的分离培养及诱导鉴定做了大量卓有成效的工作。人体 ADSC 研究材料主要来源于吸脂术得到的液化脂肪,然而吸脂术对皮下脂肪组织有加热液化的过程,不利于细胞的分离培养。本实验经过患者同意取得开腹手术切下的皮下脂肪,立即送至实验室进行细胞培养,避免了理化因素的影响;通过原代培养,稳定地传代培养及对一些成体干细胞相对特异的分子进行检测,成功得到了脂肪干细胞。诱导分化后特异产物的免

疫组化和 RT-PCR 结果还证实了其具有向外胚层来源的神经细胞和向中胚层来源的骨及软骨细胞分化的潜能。干细胞体外培养具有成瘤的危险,成为

临床应用的一大障碍,本实验培养的 ADSC通过染色体核型分析证明具有遗传稳定性。

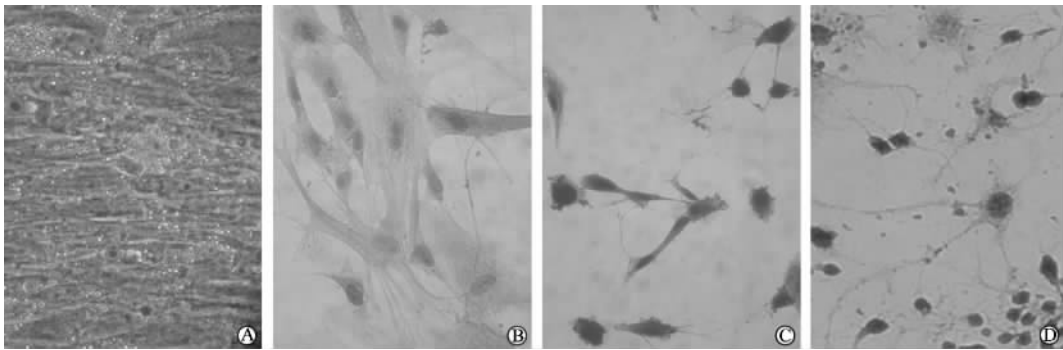


图 3 ADSC 细胞系经诱导分化后油红 O 染色及免疫组化结果

Fig 3 Oil O red staining and immunohistochemical study of lineage-specific differentiation of ADSCs(×400)

A; Oil O red staining of adipose droplets in cells after cultured in adipogenic medium; B; Immunohistochemical staining of collagen I in cells after cultured in osteogenic medium; C; Immunohistochemical staining of collagen II in cells after cultured in chondrogenic medium; D; Immunohistochemical staining of neuron-specific enolase in cells after cultured in neurogenic medium

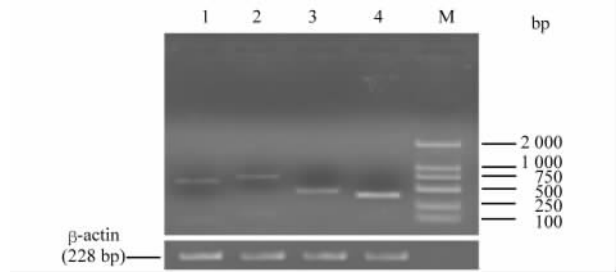


图 4 ADSC 经诱导分化后 RT-PCR 结果

Fig 4 RT-PCR product of

specific cell lineage induced from ADSC

M; Marker (DL2000); 1: RT-PCR result of collagen II (651 bp) in cells after cultured in chondrogenic medium; 2: RT-PCR result of neurofilament (801 bp) in cells after cultured in neurogenic medium; 3: RT-PCR result of osteopontin (415 bp) in cells after cultured in osteogenic medium; 4: RT-PCR result of ap2 (364 bp) in cells after cultured in adipogenic medium

近年来已有大量的关于 ADSC 在组织工程中的应用报道,不少学者已经利用 ADSC 作为种子细胞进行了临床组织工程的实际应用。例如在骨组织工程中,利用 ADSC 向骨组织的分化,达到局部创伤修复。还可利用 ADSC 存在于外周白色脂肪组织中的事实,寻找外源促成成熟的因子,促进 ADSC 的成熟分化来达到局部增脂的临床整形效果。然而目前对成体干细胞分化的潜能依然存在争议。有学者认为 ADSC 并不存在向 3 个胚层细胞分化的能力^[7]。尽管如此,由于 ADSC 较其他成体干细胞具有更容易获取,采集效率

更高,又不涉及伦理问题的特点,因此我们有理由相信 ADSC 在组织工程和临床整形美容及创伤修复应用中,将会是一种很有前途的种子细胞^[8-9]。

[参考文献]

[1] Zuk P A, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells[J]. Mol Biol Cell, 2002,13: 4279-4295.

[2] Rangappa S, Fen C, Lee E H, et al. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes[J]. Ann Thorac Surg, 2003,75: 775-779.

[3] 刘相名,杨立业,苗宏生,等. 脂肪组织来源的多能干细胞培养和外源基因的表达[J]. 中华实验外科杂志,2003,20:162-163.

[4] Erickson G R, Gimble J M, Franklin D M, et al. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells *in vitro* and *in vivo*[J]. Biochem Biophys Res Commun,2002,290:763-769.

[5] Safford K M, Hicok K C, Safford S D, et al. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells[J]. Biochem Biophys Res Commun,2002,7:371-379.

[6] 余方圆,卢世璧,袁 玫,等. 脂肪干细胞向软骨细胞方向诱导的初步研究[J]. 中国矫形外科杂志,2004,12:762-764.

[7] Gregoire F M. Adipocyte differentiation:from fibroblast to endocrine cell[J]. Exp Biol Med(Maywood),2001,226:997-1002.

[8] 胡铁霞,李祖兵. 新型骨组织工程种子细胞——脂肪干细胞的研究进展[J]. 国外医学·口腔医学分册,2005,32:13-15.

[9] Nakagami H, Morishita R, Maeda K, et al. Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy [J]. J Atheroscler Thromb, 2006,13: 77-81.

[收稿日期] 2007-04-17 [修回日期] 2007-07-22
[本文编辑] 曹 静