

• 临床研究 •

人脂肪间充质干细胞的分离及培养和鉴定*

张文瑾^{1,2} 孙建军^{1,2}

[摘要] 目的:建立体外分离培养人脂肪间充质干细胞(hADSCs)的方法,观察其形态及生物学特性,探讨其作为颞骨上皮组织工程种子细胞的可行性。方法:整形外科吸脂术获得女性腹部皮下脂肪,0.3% I 型胶原酶消化,贴壁培养 hADSCs,进行成脂、成骨诱导验证其多向分化潜能;流式细胞术检测细胞表面分子;MTT 法绘制细胞增殖曲线。结果:该实验获得形态均一的长梭形、成纤维细胞样生长的 hADSCs,具有成脂、成骨分化潜能;流式细胞术检测细胞高表达 CD105、CD29、CD90,低表达 CD34、CD45;细胞有明显的指数生长期。结论:该实验分离获得的细胞具有 hADSCs 特性,可作为颞骨上皮组织工程种子细胞。

[关键词] 脂肪间充质干细胞;分离;培养;鉴定

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2016.09.014

[中图分类号] R394.2 **[文献标志码]** A

Isolation, culture and identification of human adipose-derived mesenchymal stem cells

ZHANG Wenjin^{1,2} SUN Jianjun^{1,2}

(¹Graduate College of Anhui Medical University, Hefei, 230032, China; ²Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Navy General Hospital, PLA)

Corresponding author: SUN Jianjun, E-mail: jjsun85@sina.com

Abstract Objective: To establish isolation and culture methods of human adipose derived mesenchymal stem cells(hADSCs) in vitro and to investigate the basic biological characteristics of hADSCs as seed cells involved in repair of epithelium during temporal bone surgery. **Method:** Human adipose tissue was collected after liposuction surgery from the cosmetic and plastic surgery center, and then was digested with 0.3% collagenase I. hADSCs were isolated and adherent cultured. Multilineage differentiation potential of hADSCs were determined by differentiating cells into adipocytes and osteoblast. Phenotypes of cells were detected by flow cytometer, and cell growth curve was observed by MTT. **Result:** Obtained hADSCs were similar size, spindle-shaped fibroblasts-like cells and had differentiation potential to adipocytes and osteoblast. Flow cytometry showed that cells were highly positive for CD105, CD90, CD29 and weakly positive for CD34 and CD45. MTT exhibited that hADSCs had a exponential growth phase. **Conclusion:** Isolated stem cells from human adipose tissue show the typical characterization of hADSCs, and can be used as seed cells involved in repair of epithelium during temporal bone surgery.

Key words adipose-derived mesenchymal stem cells; isolation; cultivation; identification

国际脂肪治疗与科学联合会(IFATS)将用不同的方法从脂肪中分离贴壁的多能细胞群命名为脂肪间充质干细胞(adipose-derived mesenchymal stem cells, ADSCs)^[1]。随着肥胖在国内外发病率的增加,整形外科吸脂术获得大量脂肪组织,而这些材料常规被丢弃。ADSCs具有多向分化潜能和广泛的临床应用价值,可使这些材料变废为宝,并且给耳部术腔上皮的再生带来了希望。

我们采用胶原酶消化,贴壁培养优化获取人类ADSCs(human ADSCs, hADSCs),利用分子生物

学方法观察其基本生物学特性,以期建立高效的hADSCs培养方法,为耳部术腔颞骨创面上皮的缺损修复研究提供稳定的干细胞来源。

1 材料与方法

1.1 研究对象

纳入接受腹部吸脂手术者2例,均为女性,年龄23~30岁, BMI 22~24;健康状况良好,无系统性疾病。术前均签订知情同意书,并经医院伦理委员会审批通过。

1.2 主要试剂及仪器

α-MEM培养液、胰酶(2.5 g/L)、谷氨酰胺、青链霉素(Gibco);胎牛血清(四季青公司)、Anti-Human CD105 (Endoglin) FITC、Anti-Human CD29 (Integrin β₁) FITC、Anti-Human CD90 (Thy-

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No:81170904)

¹ 安徽医科大学研究生学院(合肥,230032)

² 海军总医院全军耳鼻咽喉-头颈外科中心

通信作者:孙建军, E-mail: jjsun85@sina.com

1)PE(eBioscience),PE anti-human CD34、PE anti-human CD45 (Biolegend); Epoch 酶标仪 (Bio- tech),CO₂ 细胞培养箱 (Thermo),倒置显微镜、流式细胞仪(BD公司)。

1.3 方法

1.3.1 hADSCs 的分离与培养 无菌条件下,将获得脂肪用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液反复冲洗后,去除麻醉药品及血细胞,获得纯度较高的脂肪颗粒。用 0.3% I 型胶原酶 37℃ 恒温摇床震荡消化 1 h。过滤去除未消化组织,800 r/min 离心 10 min (离心半径 15 cm),以 8 ml α -MEM 培养液 (含 10% FBS) 悬浮细胞,接种于培养瓶中,5% CO₂、37℃ 标准环境下培养。3 d 后首次换液,除去未贴壁细胞,随后每 2~3 d 换液 1 次,当细胞接近 80% 融合时,及时进行传代。

1.3.2 hADSCs 的成脂诱导实验 将多克隆来源的细胞悬液以 5×10^4 /ml 的密度接种于 6 孔板中,用 α -MEM(10%FBS)培养至 2~3 d,待细胞伸展至 80% 汇合后,换成脂诱导液 (含 1 mol/L DEC、0.5 mmol/L IBMX、10 mg/L BPE、100 mmol/L In-domethacin、100 ml/L FBS 的 α -MEM 培养液)诱导 14 d,每隔 3 d 换液,4% 甲醛固定,油红染色。

1.3.3 hADSCs 的成骨诱导实验 将多克隆来源的细胞悬液以 5×10^4 /ml 的密度接种于 6 孔板中,用 α -MEM(10%FBS)培养 2~3 d,待细胞伸展至 60% 汇合后,换成骨诱导液 (含 10 mmol/L β -甘油磷酸钠、50 μ g/ml 维生素 C、 1×10^{-8} mol/L 地塞米松、100 ml/L FBS 的 α -MEM 培养液)连续培养 30 d,弃原培养液,去离子水反复漂洗,4% 甲醛液固定 40 min,用茜素红染色。

1.3.4 hADSCs 的鉴定 取第 5 代 hADSCs 在胰

蛋白酶消化后制成单细胞悬液,将 1×10^6 个细胞分别加入抗人 CD105FITC、CD29FITC、CD90PE、CD34PE、CD45PE 单抗各 2 μ l,PE-IgG1、FITC-IgG1 为阴性对照。4℃ 避光孵育 30 min,流式细胞仪检测。

1.3.5 hADSCs 的增殖 将 hADSCs 以 1 500 个孔接种于 96 孔板,第 2 天起,每孔加入 20 μ l MTT 溶液,继续培养 4 h,终止培养,小心吸去孔内培养液,每孔加入 150 μ l 二甲基亚砷,震荡 10 min,在酶联免疫检测仪测量各孔的吸收度值(A_{490}),绘制细胞增殖曲线。

2 结果

2.1 hADSCs 的分离培养和形态学观察

传代 hADSCs 接种于培养瓶后,6 h 开始贴壁,24 h 去除非贴壁细胞,2~3 d 后镜下可见分离得到的 hADSCs 表现为典型成纤维细胞样生长,形态均一,呈长梭形,有伪足,旋涡样生长(图 1)。

2.2 多分化潜能的测定

成脂诱导分化: hADSCs 在成脂诱导剂的作用下,3 d 后光镜下可观察到细胞质内有透亮的脂滴出现,随时间延长,逐渐增多;14 d 诱导结束时,大部分细胞质充满脂滴,油红染色成鲜红色(图 2a)。

成骨诱导分化: 细胞成骨 21 d,光镜下可观察到细胞复层生长并出现类似钙结节的圆形晶状体,30 d 后茜素红染色可见周围有明显的钙沉积(图 2b)。

2.3 hADSCs 的鉴定

第 5 代 hADSCs 流式细胞学检查示:CD105 为 98.8%,CD29 为 100.0%,CD90 为 100.0%,CD34 为 2.3%,CD45 为 1.2%(图 3)。

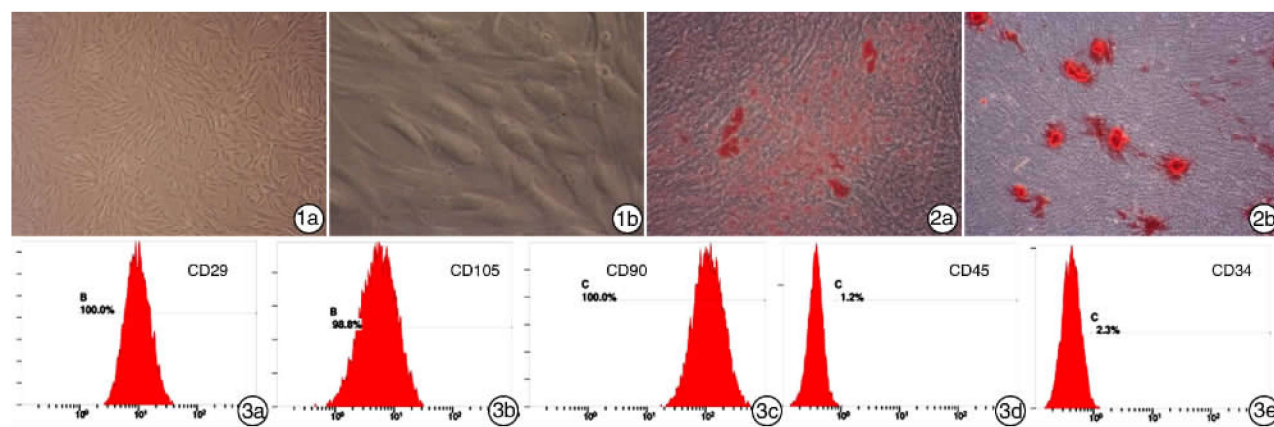


图1 第5代 hADSCs 1a:×40;1b:×200; 图2 多分化潜能的鉴定 2a:成脂诱导 14 d 染色 油红染色 ×200;2b:成骨诱导 30 d 染色 茜素红染色 ×400; 图3 hADSCs 的鉴定 3a:CD29 的表达;3b:CD105 的表达;3c:CD90 的表达;3d:CD45 的表达;3e:CD34 的表达。

2.4 hADSCs 的增殖曲线

以 1 500 个/孔接种于 96 孔板中,在 5~6 d 时可以达到一个生长高峰期,且第 5 代细胞较第 3 代细胞增殖更快(图 4)。

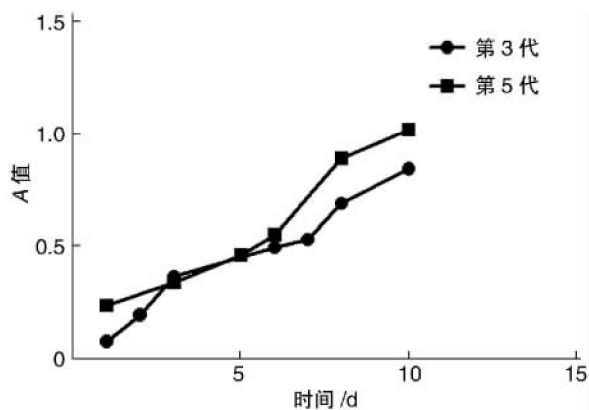


图 4 hADSCs 的增殖曲线

3 讨论

颞骨手术可造成乳突腔大范围的未上皮化,引起术腔反复感染和局部瘢痕形成。目前,临床上常用于修复乳突腔上皮的材料仍是自体骨膜瓣、骨粉、颞骨筋膜或者脂肪组织等,也有部分同种异体或异种移植物。Premachandra 等^[2-3]和 Somers 等^[4-5]分别使用角质细胞膜片、口腔黏膜非角化细胞膜片和冻干的角质细胞裂解液修复创面,并且取得了一定的疗效。但是培养出的上皮膜片较脆、薄,且操作困难;移植创面后成功率不高以及使用因子的不可控等原因,限制了组织工程技术在颞骨创面上皮再生治疗中的进展。自 Zuk 等(2002)从脂肪组织悬液内最先分离出多能干细胞以来,hADSCs 日益成为组织工程学和再生医学领域中最有前景的种子细胞之一。

ADSCs 在再生医学领域应用中得到广泛关注的主要原因:①与其他来源的间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSCs)相比,ADSCs 同样具有强大的增殖和分化潜能^[6-7];ADSCs 甚至可以直接应用到预定的组织再生部位分化为合适的终末细胞类型^[8];②从人类脂肪组织细胞中可以得到约 1% 的 hADSCs,而从骨髓中仅能获得 0.001%~0.002% 的骨髓间充质干细胞^[9],初步解决了成体干细胞来源受限的问题;③ADSCs 可以经微创手术(抽吸皮下脂肪)中获得,避免了临床应用中的伦理学问题;④ADSCs 由于缺乏 II 型主要组织相容性复合体(MHC-2)和细胞表面共刺激分子表达,植入异体宿主时仅可发生较轻的免疫排斥反应^[7,10];这一细胞特性尤其适用于异体组织移

植,并可缩短治疗时间;⑤ADSCs 可以分泌一系列可溶性因子(包括血管因子、抗凋亡因子和造血因子等),通过旁分泌机制及炎症调节直接促进伤口区域组织的再生^[6,11-12]。

Zoqrafiou 等^[13]将培养的自体 ADSCs 悬液注射入糖尿病小鼠缺损面的筋膜层,发现 ADSCs 可以显著提高毛细血管密度、胶原密度、VEGF 和 TGF- β 3 的表达。Lin 等^[14]将培养出的 ADSCs 膜片分别以单层和三层膜片覆盖全层皮肤缺损,术后第 7、10、14 天分别进行观察,发现膜片组皮肤缺损面积明显小于对照组(空白组),三层膜片组皮肤缺损面积明显小于单层膜片组,且实验组的血管密度高于对照组。

本实验通过用适当浓度的胶原酶消化及贴壁筛选获得 hADSCs,其形态特征与其他来源的 MSCs 非常相似,且能向脂肪细胞和骨细胞稳定分化,同时它们高表达 CD105、CD90、CD29,低表达 CD34、CD45。这些结果符合国际细胞治疗协会(2005)为间充质细胞的生物学特性提出的标准^[15],从而证明本实验分离获得的是 ADSCs。结果显示,只要没有脂肪组织筋膜和较大的血管,无需溶解红细胞也可通过差速贴壁去除造血细胞和内皮细胞等杂质细胞,逐渐获得高纯度的目的细胞。本实验使用 FBS 诱导分化培养液可以得到较为满意的分化结果。但有实验证明,在体外,MSCs 在人血清或无血清的培养条件下比在 FBS 培养条件下有更强大的脂肪分化能力。相比之下,成骨分化则更易受 FBS 培养液的影响^[16-17]。本文结果提示,培养液配方选择以及培养过程的质量控制可直接影响细胞分化潜能。

hADSCs 在体外培养的时间相对较长,能多次传代,有研究证明 hADSCs 在体外传 10 代以上而无明显的衰老迹象^[18]。本实验比较了第 3 代和第 5 代 hADSCs,发现细胞具有指数增长期特点,且第 5 代细胞有更高的增殖率,表明体外培养的 hADSCs 具有强大的增殖能力和良好的稳定性。

本研究初步探讨了 hADSCs 的分离培养方法和生物学特性,为 hADSCs 最终应用于上皮组织的构建和创面上皮的缺损修复研究提供了有意义的实验依据。

参考文献

- [1] DAHER S R, JOHNSTONE B H, PHINNEY D G, et al. Adipose stromal/ stem cells; basic and translational advances: the IFATS collection [J]. Stem Cells, 2008, 26: 2664-2665.
- [2] PREMACHANDRA D J, WOODWARD B M, MILTON C M, et al. Treatment of postoperative otor-

- rhoea by grafting of mastoid cavities with cultured autologous epidermal cells [J]. *Lancet*, 1990, 335: 365—367.
- [3] PREMACHANDRA D J, WOODWARD B, MILTON C M, et al. Treatment of chronic mastoiditis by grafting of mastoid cavities with autologous epithelial layers generated by in vitro culture of buccal epithelium[J]. *J Laryngol Otol*, 1991, 105: 413—416.
- [4] SOMERS T, VERBEKEN G, VANHALLE S, et al. Treatment of chronic postoperative otorrhea with cultured keratinocyte sheets [J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 1997, 106: 15—21.
- [5] SOMERS T, DUINSLAEGER L, DELAEY B, et al. Stimulation of epithelial healing in chronic postoperative otorrhea using lyophilized cultured keratinocyte lysates[J]. *Am J Otol*, 1997, 18: 702—706.
- [6] BAER P C, GEIGER H. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity[J]. *Stem Cells Int*, 2012, 2012:812693—812693.
- [7] LINDROOS B, SUURONEN R, MIETTINEN S. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine [J]. *Stem Cell Rev*, 2011, 7:269—291.
- [8] GU J, LIU N, YANG X, et al. Adipose-derived stem cells seeded on PLCL/P123 electrospun nanofibrous scaffold enhance wound healing [J]. *Biomed Mater*, 2014, 9:035012—035012.
- [9] FRASER J K, WULUR I, ALFONSO Z, et al. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology [J]. *Trends Biotechnol*, 2006, 24: 150—154.
- [10] MCINTOSH K R, LOPEZ M J, BORNEMAN J N, et al. Immunogenicity of allogeneic adipose-derived stem cells in a rat spinal fusion model[J]. *Tissue Eng Part A*, 2009, 15:2677—2686.
- [11] KILROY G E, FOSTER S J, WU X, et al. Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic and pro-inflammatory factors[J]. *J Cell Physiol*, 2007, 212: 702—709.
- [12] SALGADO A J, REIS R L, SOUSA N J, et al. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine[J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2010, 5:103—110.
- [13] ZOQRAFOU A, PAPADOPOULOS O, TSIQRIS C, et al. Autologous transplantation of adipose-derived stem cells enhances skin graft survival and wound healing in diabetic rat[J]. *Ann Plast Surg*, 2013, 71: 225—232.
- [14] LIN Y C, GRAHOVAC T, OH S J, et al. Evaluation of a multi-layer adipose-derived stem cell sheet in a full-thickness wound healing model[J]. *Acta Biomater*, 2013, 9:5243—5250.
- [15] DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement[J]. *Cytotherapy*, 2006, 8: 315—317.
- [16] LINDROOS B, AHO K L, KUOKKANEN H, et al. Differential gene expression in adipose stem cells cultured in allogeneic human serum versus fetal bovine serum[J]. *Tissue Eng Part A*, 2010, 16:2281—2294.
- [17] LINDROOS B, BOUCHER S, CHASE L, et al. Serum-free, xeno-free culture media maintain the proliferation rate and multipotentiality of adipose stem cells in vitro[J]. *Cytotherapy*, 2009, 11:958—972.
- [18] 闵敏,张雪静,马红,等.人脂肪间充质干细胞的原代培养及体外成骨成脂诱导分化[J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2013, 23(3):185—190.

(收稿日期:2016-02-14)