

脂肪干细胞体外培养特性及成脂成软骨分化研究

章立群, 刘 学, 任英华, 陈 沐

[摘要] **目的:**分析脂肪干细胞体外培养的特性和体外向成脂细胞和成软骨细胞分化的情况。**方法:**采集成年兔腹部脂肪组织, 体外分离培养脂肪干细胞, 并进行成脂细胞和成软骨细胞的体外诱导分化, 采用油红 O 染色证明成脂细胞分化, II 型胶原免疫组织化学染色和 Alcian Blue 染色证明成软骨细胞分化。**结果:**脂肪干细胞形态为菱形, 细胞可稳定传代, 各代次间无形态上的差异。经油红 O 染色发现, 脂肪干细胞可形成阳性脂滴, 表明具有成脂分化能力。经 II 型胶原免疫组织化学染色和 Alcian Blue 染色后发现, 脂肪干细胞可形成 II 型胶原和硫酸蛋白聚糖, 表明具有成软骨分化能力。**结论:**脂肪干细胞具有成脂成软骨分化能力, 可成为脂肪和软骨组织工程研究的种子细胞。

[关键词] 脂肪干细胞; 成脂分化; 成软骨分化

[中图分类号] R 314 **[文献标志码]** A **DOI:** 10. 13898/j. cnki. issn. 1000-2200. 2018. 01. 001

Study on the properties, adipogenic and chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells *in vitro*

ZHANG Li-qun, LIU Xue, REN Ying-hua, CHEN Mu

(Department of Stomatology, The Nanshan Hospital Affiliated to Guangdong Medical University, Shenzhen Guangdong 518052, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the properties, adipogenic and chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells *in vitro*.

Methods: The abdominal adipose tissue of rabbit was harvested. The adipose-derived stem cells were isolated and cultured, and induced to adipogenic cells and cartilage cells *in vitro*. The adipogenic and chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells were identified using the oil red O staining, and type II collagen immunohistochemical staining and Alcian Blue staining, respectively.

Results: The adipose-derived stem cell was prismatic cells, and could stably passage. There was not the morphology difference in each generation cells. The results of oil red O staining found that the adipose-derived stem cells could form the positive lipid droplets, which demonstrated that the cells had adipogenic differentiation ability. The type II collagen immunohistochemical staining and Alcian Blue staining showed that the adipose-derived stem cells could secrete the type II collagen and sulfated proteoglycans, which demonstrated that the cells had the chondrogenic differentiation ability. **Conclusions:** The adipose-derived stem cells have the adipogenic and chondrogenic differentiation abilities which can become the seed cell of fat and cartilage tissue engineering.

[Key words] adipose derived stem cells; adipogenic differentiation; chondrogenic differentiation

目前, 在研究间充质干细胞的领域里, 主要的对象还是骨髓间充质干细胞, 并已初步形成了分离和培养的方法, 但是大量培养骨髓间充质干细胞受到了一定的限制。尤其是在软骨组织工程研究中, 因骨髓间充质干细胞的分离和培养难度, 限制了其成为良好的组织工程种子细胞来源^[1]。所以, 最近人们将研究转向脂肪来源的干细胞 (adipose derived stem cells, ADSCs) 的研究中, 发现该细胞具有很强的增殖和分化能力, 也较容易分离与培养^[2-4]。在临床研究中, ADSCs 在细胞移植及组织工程等方面也有着广泛的应用前景^[5-9]。本研究对成年兔脂肪

组织来源的 ADSCs 进行培养并对其生物学特性及成脂成软骨分化进行了分析。现作报道。

1 材料与方法

1.1 实验动物 成年新西兰白兔体重 (3.0 ± 0.4) kg, 购自广东省实验动物中心。

1.2 实验材料 DMEM 培养基及 FBS 胎牛血清购自 Hyclone 公司, I 型胶原酶购自 Worthington 公司, 培养基诱导成分均购自 Sigma 公司, MTS 液购自 Promega 公司, 兔抗人 II 型胶原多克隆抗体及即用型 SABC 免疫组织化学染色试剂盒均购自 TIANGEN 公司。

1.3 方法

1.3.1 脂肪干细胞体外培养 3% 戊巴比妥钠按 1 mL/kg 全麻无菌条件下从兔一侧腹股沟取出约 8 mL 脂肪组织置于无菌培养皿中。首先, 用 PBS 清洗脂肪组织, 反复清洗 5 遍, 将脂肪组织剪成细小碎

[收稿日期] 2017-01-19 [修回日期] 2017-08-09

[基金项目] 广东省深圳市科技研发资金 (JCYJ20150402152130186)

[作者单位] 广东医学院附属南山人民医院 口腔科, 广东 深圳 518052

[作者简介] 章立群 (1980-), 女, 副主任医师。

块,然后用 0.075% 的 I 型胶原酶消化脂肪组织,37 °C 温箱里放置消化 1 h。随后,用含 10% FBS 的 DMEM 稀释并中和消化酶活性,用筛网过滤掉未消化组织,然后将过滤液离心,2 000 r/min,10 min,弃掉上清液,用 PBS 重悬沉淀,再用 PBS 清洗 3 遍,最后用含有双抗的 10% FBS DMEM 重悬后,接种到细胞培养皿中。在 37 °C 温箱中培养,期间每 2 d 换培养液一次,待细胞生长到 85% 时进行传代培养。

1.3.2 细胞生长曲线 分别收集第 2、4、8 代的细胞,以 5×10^3 个/孔的密度将细胞接种于 96 孔板中,24 h 后按固定时间每天取 3 个孔并加入 MTS 检测液 20 μ L,在 37 °C 温箱中孵育 2 h 后,用酶标仪在 490 nm 处测量吸光度值。以吸光度值为纵坐标,时间为横坐标,绘制细胞的生长曲线。

1.3.3 成脂诱导分化 分离培养脂肪干细胞后,将第一代细胞消化并将 5×10^4 个细胞接种于细胞培养皿中,在 37 °C 温箱中培养,24 h 后将培养液换成成脂诱导培养液,期间每 3 d 换培养液一次,设置空白对照组,继续用普通培养液培养,同样每 3 d 换一次培养液。第 2 周开始,每周收集细胞采用油红 O 染色来证明有无脂滴形成。油红 O 染色具体步骤:用甲醛-钙溶液室温固定待测细胞 1 h,用 70% 乙醇洗 1 遍,用 2% 油红 O 染液室温染色 15 min,用 70% 乙醇分色,蒸馏水洗,最后伊红对比染色^[10]。

1.3.4 成软骨诱导分化 分离培养脂肪干细胞后,将第一代细胞消化并将 5×10^4 个细胞接种于 96 孔板中,在 37 °C 温箱中培养,24 h 后将培养液换成成软骨诱导培养液,期间每 3 d 换培养液一次,设置空白对照组,继续用普通培养液培养,同样每 3 天换一次培养液。第 3 周进行 II 型胶原免疫组织化学染色和 Alcian Blue 染色来证明脂肪干细胞向成软骨细胞分化,并分泌 II 型胶原和硫酸蛋白聚糖。Alcian Blue 染色步骤:首先进行细胞固定,然后用 1% Alcian Blue 染液孵育 30 min,最后用 0.1 mol/L HCL (pH 1.0) 洗净^[11]。II 型胶原免疫组织化学染色步骤:首先进行细胞固定,蒸馏水洗,在 37 °C 温箱中用软骨素酶 ABC 孵育 60 min,加 3% H₂O₂ 甲醇去除内源性过氧化氢酶的作用,蒸馏水洗 3 遍,加 BSA 室温作用 30 min,加 1:100 稀释的兔抗人 II 型胶原多克隆抗体,4 °C 过夜,然后按试剂盒说明依次加入二抗、SABC 和 DAB 显色,苏木精对比染色^[11]。

2 结果

2.1 脂肪干细胞体外培养特性

离培养的脂肪干细胞为透明圆球形,均匀漂浮于培养液中,细胞间隙存在红细胞,但会随着后来的多次换液逐步清除。基本上 48 h 细胞均能贴壁完全,细胞形态为菱形或多角形。细胞增殖速度一般,直到 1 周后生长到培养皿底壁的 85% 左右,细胞形态大部分为菱形,细胞聚集部位还具有一定的方向性(见图 1)。随后的实验发现,细胞可稳定传代,各代次之间无形状上的差异。本研究利用绘制生长曲线对细胞增殖活性进行检测。各代次细胞之间生长曲线趋势相似,未出现明显的差异,细胞从第 2 天开始快速生长,直到第 6 天达到生长顶峰,随后进入平稳生长阶段(见图 2)。

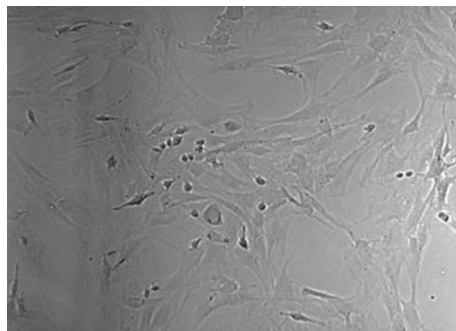


图1 初代ADSes形态

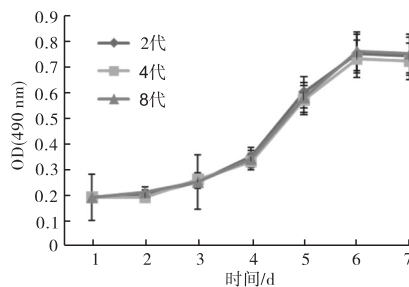


图2 脂肪干细胞生长曲线

2.2 脂肪干细胞体外成脂分化结果 经油红 O 染色后发现,脂肪干细胞经过诱导后会逐渐停止增殖,细胞会逐渐变成圆形,直到第 4 天会出现脂滴,在第 2 周达到最高峰,整个细胞的 90% 会被脂滴占据,细胞核逐渐变小到消失。第 4 周后细胞开始脱落漂浮在培养液中,而对照组细胞均无上述现象发生。

2.3 脂肪干细胞体外成软骨分化结果 经 II 型胶原免疫组织化学染色和 Alcian Blue 染色后发现,脂肪干细胞经过成软骨诱导后会逐渐形成聚集的细胞团块,苏木精对比染色发现,细胞团块中央是密集的被染成蓝色的细胞核,细胞团块周围是一群放射状排列生长的细胞,经 2 种染色证明,团块中央还具有 II 型胶原和硫酸蛋白聚糖,而对照组细胞均无上述现象发生。

3 讨论

脂肪作为机体中储量最多的组织,其获取途径较为简便,给受试对象带来的痛苦较少,不会带来明显的不良反应。ZUK 等^[12]在首次分离获得脂肪干细胞后发现,该细胞不需要在培养液中加入特殊的血清来维持培养,而目前使用最为广泛的骨髓干细胞则需要加入特殊血清培养;同时,脂肪干细胞的增殖和分化能力较强,在不同的诱导培养基下会分化成多种不同细胞,这给今后组织工程研究领域带来了强力的细胞种子来源^[13-15]。本研究根据最近报道的分离与培养脂肪干细胞的方法,在经过优化的基础上,成功地从成年兔的腹部脂肪组织分离出了脂肪干细胞,并在体外进行传代和诱导分化研究。

本研究结果显示,分离培养的脂肪干细胞具有稳定增殖的能力,可传代 10 代以上,且形态不发生变化,增殖速度不变。在分离细胞时,细胞间隙内残存着红细胞等杂质,但在随后的换液及传代过程中逐渐减少,最后几乎全部消失。本研究还对分离出的脂肪干细胞进行了成脂和成软骨细胞的诱导,结果发现,脂肪干细胞的诱导结果均令人满意,这表明,脂肪干细胞具有向多方向分化的能力。在关节炎发病机制的研究中可发现,骨组织再生与脂代谢有关^[16]。还有研究^[17]表明,纤维蛋白溶解酶激活剂及其抑制剂调节骨组织的形成,由此可以推测,在人体矿物化区域产生的三酰甘油类脂滴可能对纤维蛋白溶解酶活性有抑制作用,随后促进脂肪干细胞向成软骨细胞分化。

综上所述,脂肪干细胞具有较强的增殖能力及成脂成软骨分化能力,可成为脂肪和软骨组织工程研究的种子细胞。

[参 考 文 献]

- [1] 朱寅,徐卫袁,王文加,等. 人脂肪来源间充质干细胞成骨及成软骨的潜能[J]. 中国组织工程研究,2012,16(32):5953.
- [2] 黄朋,李立新,杨绿林,等. 脂肪干细胞分离培养鉴定及成软骨分化的实验研究[J]. 宁夏医学杂志,2016,38(8):12.

- [3] 徐巧瑜,伍津津. 人脂肪干细胞(ADSCs)体外培养的研究及应用进展[J]. 中国美容医学杂志,2012,21(7):1265.
- [4] 胡晓根,张文健,王在,等. 体外培养人脂肪干细胞生物学特性的初步探究[J]. 中日友好医院学报,2015,29(5):287.
- [5] 林立新,黄勇,王玉婷,等. 不同部位脂肪源性干细胞的生物学特性比较[J]. 中国组织工程研究,2013,17(27):4992.
- [6] 郭常敏,王达利,魏在荣,等. 人脂肪间充质干细胞体外培养鉴定与诱导分化的初步研究[J]. 遵义医学院学报,2013,36(1):32.
- [7] 孙惠敏,刘婷,马丽君,等. 人骨髓干细胞分离及其向神经细胞诱导分化的实验研究[J]. 宁夏医科大学学报,2013,35(5):502.
- [8] 房艳,李德华,倪伟民,等. 人脂肪源性干细胞多潜能分化特性[J]. 解剖科学进展,2013(3):15.
- [9] 安荣泽,赵俊延,王兆杰. 脂肪干细胞与骨髓间充质干细胞成软骨能力的比较[J]. 中国组织工程研究,2013,17(32):5793.
- [10] 肖建红,张阳春,张常然,等. 人皮下脂肪干细胞的成骨、成脂分化诱导及鉴定[J]. 中国组织工程研究,2015,19(32):5155.
- [11] 蔡颖,胡雁,刘秀明,等. 体外培养人脂肪来源干细胞增殖及成脂分化应用富血小板血浆的效果分析[J]. 医学信息,2014,28(14):17.
- [12] ZUK PA, ZHU M, MIZUNO H, *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies[J]. *Tissue Eng*,2001,7(2):211.
- [13] 李受珉,吴子征,王泽,等. 体外培养兔脂肪源性间充质干细胞的成骨成脂分化[J]. 中国组织工程研究,2014,18(37):6008.
- [14] 谢永辉,陈庄洪,蔡贤华,等. 兔脂肪间充质干细胞的生物学特性及其成骨诱导分化的研究[J]. 中华实验外科杂志,2013,30(2):358.
- [15] 王清富,陈庄洪,蔡贤华,等. 兔脂肪干细胞的多向诱导分化[J]. 中国组织工程研究,2012,16(49):9162.
- [16] SAFWANI WK, MAKPOL S, SATHAPAN S, *et al.* Alteration of gene expression levels during osteogenic induction of human adipose derived stem cells in long term culture[J]. *Cell Tissue Bank*,2013,14(2):289.
- [17] 王威,孙丽君. 人脂肪间充质干细胞与软骨细胞接触式共培养的实验研究[J]. 北京医学,2012,34(10):31.

(本文编辑 刘璐)

欢 迎 订 阅

欢 迎 投 稿