

人脂肪间充质干细胞的分离培养及其鉴定***

殷莉波^{1,2}, 赵文秀², 尹震宇², 杨中萌^{1,2}, 张琼³, 王效民²

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

Yin Li-bo^{1,2}, Zhao Wen-xiu², Yin Zhen-yu², Yang Zhong-meng^{1,2}, Zhang Qiong³, Wang Xiao-min²

Abstract

BACKGROUND: Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (hADSCs) can differentiate toward mesoblast cell lineage under certain conditions, such as the osteogenic, chondrogenic, myogenic and hepatic lineages, and also can differentiate toward epiblastic and endoblastic layers. Those studies demonstrated that the hADSCs have the capacity of multidifferentiation.

OBJECTIVE: To study isolation and identification of hADSCs.

METHODS: Human adipose tissue was collected after liposuction surgery from the cosmetic and plastic surgery center, digested with 0.075% collagenase I. Adherent culture could obtain hADSCs. Cell proliferation curve was drawn, and flow cytometry, cell cycle test and immunofluorescence test were conducted to verify whether hADSCs have multiple functional differentiation potential.

RESULTS AND CONCLUSION: hADSCs exhibited fibroblast-like morphology, well proliferation, with obvious exponential growth phase, and could survive *in vitro* for a long time and maintain an undifferentiated state.

Flow cytometry has shown that cells were highly positive for CD90, CD105, and weakly positive for CD34 and CD45, almost 80% cells stayed in resting state (G_0/G_1). Cells could differentiate into osteogenic and adipogenic direction. Results have indicated that isolated stem cells show the typical characterization of hADSCs, which is a basis for further studying hADSCs.

¹Clinical Department, Medical College of Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian Province, China; ²Department of Hepatobiliary Surgery, Zhongshan Hospital, Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China; ³School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian Province, China

Yin LB, Zhao WX, Yin ZY, Yang ZM, Zhang Q, Wang XM. Isolation, culture and identification of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(32): 5997-6000. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 人脂肪间充质干细胞在不同的条件下被成功诱导分化为成骨细胞、软骨细胞、骨骼肌细胞、肝脏细胞等中胚层细胞, 同时也可以向其他胚层分化, 证明脂肪间充质干细胞是多分化潜能干细胞。

目的: 探讨人脂肪间充质干细胞的分离、鉴定方法。

方法: 整形外科吸脂术获得腹部皮下脂肪, 0.075% I型胶原酶消化, 贴壁培养获得人脂肪间充质干细胞, 绘制细胞增殖曲线, 进行流式细胞、细胞周期、免疫荧光等检测, 并验证其是否具有多功能分化潜能。

结果与结论: 获得形态较均一的长梭形的人脂肪间充质干细胞, 细胞增殖良好, 有明显的指数生长期, 体外能长期培养存活, 并保持不分化状态; 流式检测细胞高表达 CD105、CD90, 低表达 CD34、CD45; 多数细胞周期检测 G_0/G_1 期占 80% 以上。能向成脂、成骨诱导分化。结果表明, 实验分离获得的细胞是具有脂肪间充质干细胞特性的细胞, 为深入研究人脂肪间充质干细胞打下基础。

关键词: 脂肪间充质干细胞; 干细胞; 分离; 培养; 鉴定
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.32.023

Yin Li-bo★, Studying for master's degree, Clinical Department, Medical College of Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian Province, China; Department of Hepatobiliary Surgery, Zhongshan Hospital, Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China

Correspondence to: Wang Xiao-min, Doctor, Chief physician, Department of Hepatobiliary Surgery, Zhongshan Hospital, Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China
wxm@xmzsh.com

殷莉波, 赵文秀, 尹震宇, 杨中萌, 张琼, 王效民. 人脂肪间充质干细胞的分离培养及其鉴定[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(32):5997-6000. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

Supported by: the Natural Foundation of Fujian Province, No. 2006J0122; the National Natural Science Foundation of China, No. 30872484

Received:2010-03-12
Accepted:2010-05-19

0 引言

干细胞是一类具有无限自我更新能力的细胞, 干细胞可进行多次、连续的自我更新式的细胞分裂。起源于单一干细胞的子细胞可以分化出超过一种以上的细胞类型, 并能够在生物体内重建原来组织的功能^[1]。Zuk等^[2]2001年在人脂肪组织中成功分离获得脂肪间充质干细胞, 并命名为人脂肪间充质干细胞(human adipose derived stem/stromal cells, hADSCs) 其他文献也有称为(adipose-derived adherent stromal cells/adipose-derived adult stem

cells, ADASs)、(adipose tissue-derived stromal cells, ATSCs)、(adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, AT-MSCs)等^[2-7]。

人脂肪间充质干细胞在不同的条件下被成功诱导分化为: 成骨细胞、软骨细胞、骨骼肌细胞、肝脏细胞等中胚层细胞, 同时也可以向其他胚层分化, 证明脂肪间充质干细胞是多分化潜能干细胞^[8]。利用分子生物学方法分析脂肪间充质干细胞表面分子及特征与其他组织来源的间充质干细胞相似^[9], 本实验采用胶原酶消化贴壁培养优化获取hADSCs, 并对其生物学特性进行研究, 为后续研究提供稳定的干细胞来源。

¹ 厦门大学医学院临床医学系, 福建省厦门市 361005; ² 厦门大学附属中山医院肝胆外科, 福建省厦门市 361004; ³ 厦门大学生命科学学院, 福建省厦门市 361005

殷莉波★, 男, 1982年生, 江苏省江阴市人, 汉族, 厦门大学医学院外科学在读硕士, 主要从事干细胞基础方面的研究。
yinlibo001@163.com

通讯作者: 王效民, 博士, 主任医师, 厦门大学附属厦门中山医院肝胆外科 福建厦门市 361004
wxm@xmzsh.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225(2010)32-05997-04

收稿日期: 2010-03-12
修回日期: 2010-05-19
(20100312001/D-Q)

1 材料和方法

设计: 细胞形态学观察实验。

时间及地点: 实验于2009-06/2010-03在厦门大学附属中山医院整形美容中心完成。

对象: 纳入接受腹部吸脂手术者5例, 均为女性, 年龄23~45岁, 体质量指数22~24 kg/m², 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通过。

主要试剂:

主要试剂	来源
I型胶原酶	美国 Sigma 公司
DMEM 高糖	美国 Hyclone 公司
胎牛血清	美国 GIBCO 公司
鼠抗人 CD34-PECD45-FITC、CD90-FITC、CD105-PE、(eBioscience), CD73-PE	美国 BD Biosciences

这些单抗均为 IgG1 型、FITC-IgG1 型和 PE-IgG1 型作为同型对照

实验方法

hADSCs提取和培养: 实验用脂肪取自女性腹部吸脂手术者。无菌条件下, 获得脂肪生理盐水混合物50 mL, 离心、PBS清洗两遍去除麻醉药品及血细胞, 获得纯度较高的脂肪颗粒。0.075% I型胶原酶37℃恒温摇床消化60 min, 1 500 r/min, 离心10 min, 去上层未消化的脂肪组织及油脂, 沉淀重悬200目筛网过滤, 再次离心, 红细胞裂解液裂解红细胞5 min、磷酸盐缓冲液洗涤两遍, 10%胎牛血清高糖DMEM重新悬, 以(1~5)×10⁴/cm²接种至10 cm²培养板中。以第1次接种的细胞为0代, 记作P0, 细胞90%融合后0.25%胰酶消化, 1:3传代接种, 取第3~5代细胞进行实验。

细胞周期分析: 取生长良好的第3代及第10代对数期生长细胞, 体积分数为70%冰乙醇固定, PI染色等处理后, 采用流式细胞仪直接荧光法, 检测细胞周期。

细胞表面分子标志检测: 第3~5代的hADSCs 胰蛋白酶消化后制成单细胞悬液。1×10⁶细胞分别加入抗人 CD34PE、CD73PE、CD90FITC、CD105PE、CD45FITC 单抗各1 μL, PE-IgG1、FITC-IgG1为阴性对照。4℃避光孵育30 min, 流式细胞仪检测。

免疫荧光: 1×10⁵细胞接种于放有多聚赖氨酸处理玻片的六孔板, 细胞培养箱孵育12 h

以上, 待细胞贴壁后, 40 g/L多聚甲醛4℃固定30 min; 5%牛血清白蛋白(BSA)室温封闭半小时; 细胞首先与相应的一抗(鼠抗人CD90/CD105)37℃温育3 h或者4℃过夜, 然后加入带有荧光染料的二抗(兔抗鼠FITC以及兔抗鼠PE)37℃温育3 h; 磷酸盐缓冲液-Triton室温通透10 min, DAPI室温染5 min, 磷酸盐缓冲液清洗2遍, 最后荧光显微镜观察、拍照。

多项分化潜能: 根据广州赛业公司提供的诱导方案进行实验, 成脂诱导结束后进行油红染色, 核苏木素复染; 成骨诱导结束后von kossa染色, 核中性红复染。

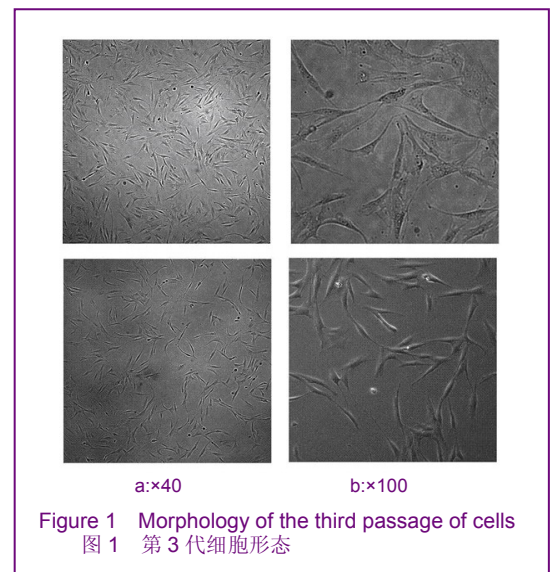
主要观察指标: ①细胞的贴壁情况、何时开始变形。②细胞的形态, 融合后的状态。③细胞生长速度。

设计、实施、评估者: 实验由通讯作者设计, 第一作者负责实施, 评估由第二作者完成, 所有参与者均熟悉细胞培养流程, 未采用盲法评估。

统计学分析: 第三作者负责统计学分析, 采用SPSS 13.0统计软件进行处理, 计量资料用表示统计软件来源于厦门大学医学院统计学教研室。

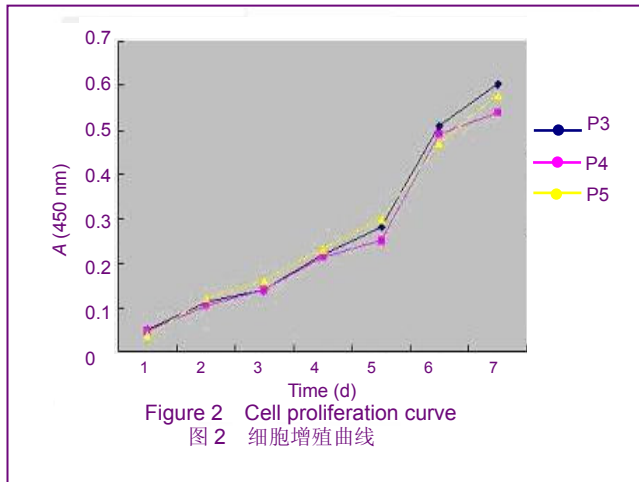
2 结果

2.1 hADSCs 分离培养 hADSCs 接种于培养瓶后, 24 h 之后贴壁细胞, 换液去除非贴壁细胞; 两三天可见细胞形态改变, 较均一, 基本无其他杂质细胞, 成纤维细胞样生长, 见图1。

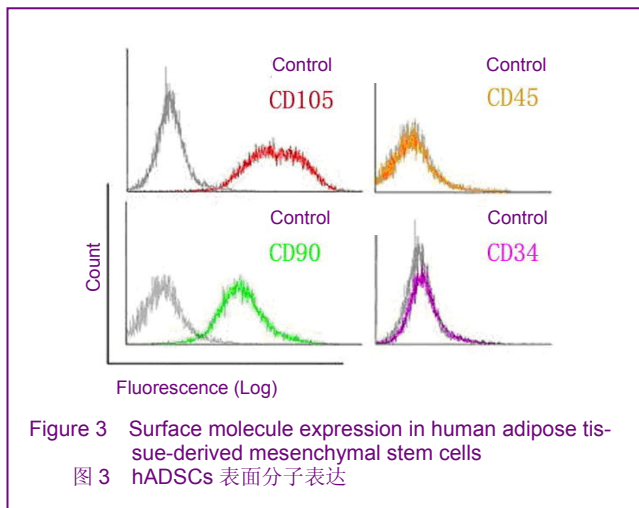


细胞生长有极性, 融合后成螺旋状, 第1次7~10 d可以传代。1:3传代, 5~7 d可融合。

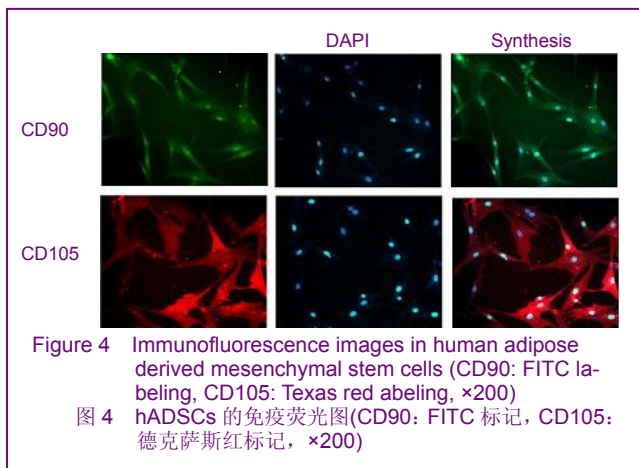
hADSCs以 10^4 个细胞每孔接种于96孔板在五六天时可以达到一个生长高峰, 见图2, 培养10代以内细胞的增殖速度无明显减慢。



2.2 细胞表型 流式细胞检测hADSCs高表达CD105、CD90; 低表达CD34、CD45造血系分子表型, 见图3。



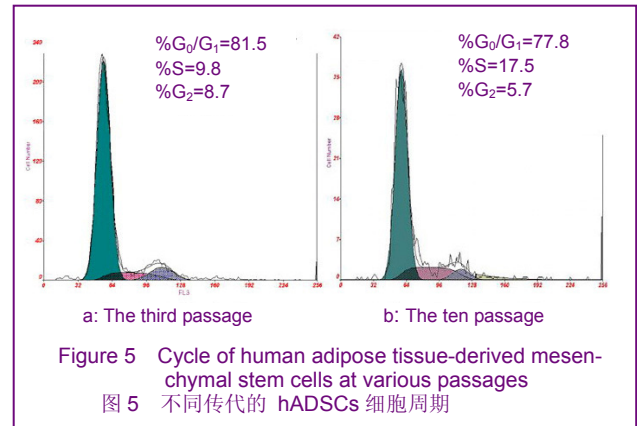
这与实验免疫荧光的结果是一致的, 几乎所有的梭形细胞表达 CD105, CD90, 见图 4。



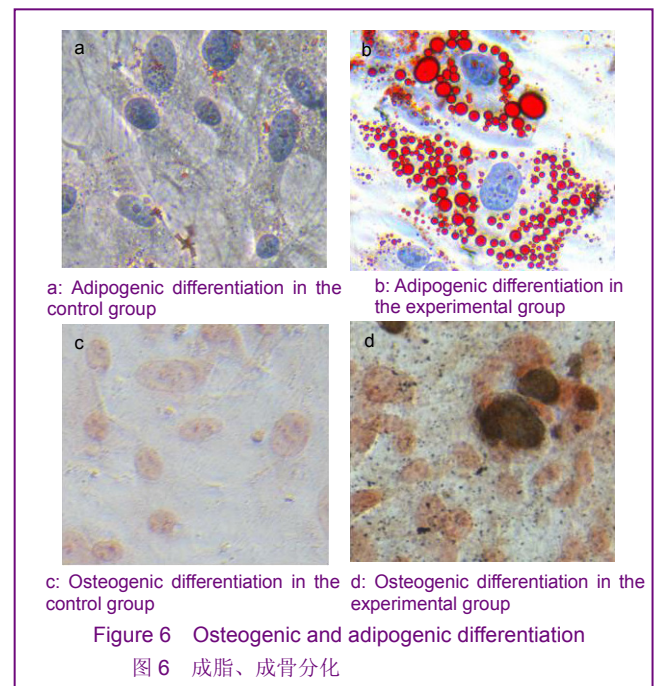
检测显示 CD34 比例变异较大, 其余标志表达比较

恒定, 经检测 CD105 表达率(95 \pm 5)%, CD90 表达率(94 \pm 3)%, CD34 表达率(5 \pm 6)%, CD45 表达率(3.4 \pm 5.0)%。

2.3 细胞周期测定 第3代81.5%的细胞处于G₀~G₁期(图5a)第10代细胞仍有77.8%的细胞处于G₀~G₁期(图5b), 表明体外培养hADSCs具有强大的分化增殖能力, 并可维持细胞性状稳定。第10代以后细胞开始老化.变形、生长减慢, 扩增时间延长, 出现衰老迹象, 一般体外培养可维持到10~15代。



2.4 多分化潜能的测定 成脂诱导分化: 对照组细胞形态无明显变化, 油红染色未见胞浆有明显着色(图6a), 实验组细胞在成脂诱导剂的作用下, 3 d 后光镜下观察发现在细胞浆内有透亮的脂滴出现, 逐渐增多, 14 d 结束诱导时, 几乎所有细胞胞浆都充满脂滴, 油红染色脂滴呈鲜红色(图6b); 成骨诱导分化: 对照组细胞形态无明显改变, 诱导过程中未见显著钙沉积(图6c), 实验组成骨分化时细胞形态改变不明显 7 d 后可以观察到晶莹类似钙结节的物质出现, Von kossa 染色, 诱导后细胞周围有明显钙沉积(图6d)。



3 讨论

从脂肪分离得到的 hADSCs 形态和其他来源的间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)形态非常的相似,表现出相似的生物学特性,高表达 CD90、CD105,低表达 CD34、CD45 等造血系分子,这和文献报道相符^[10],其他干细胞标志诸如: ABCG2、C-kit, CD133, 脂肪间充质细胞亦不表达,亦不能作为 MSC 的特征标志或分选标志;利用 CD105, CD271 分选 MSC^[8, 11],但是直到目前为止还未发现一种特异的分选 MSC 的标志, MSC 特异性标志还有待于更深入的研究,而这并不妨碍间充质干细胞在临床治疗领域的广泛应用。

2003年 Gimble^[12]提出干细胞要应用于临床必须遵守五项规则: ①足够的细胞(百万到数十亿个)。②最小的创伤。③能通过常规可重复的方式向多系细胞分化。④安全有效的自体移植或异体移植。⑤产业化生产。

hADSCs正好符合了这些特征: hADSCs避免了伦理及法律上的问题;获得来源是从患者皮下脂肪,创伤较小并且来源较易^[13-14];与已分化细胞相比, hADSCs在体外扩增能获得相对较高的细胞浓度并易培养,经过计算1 g脂肪能得到 $(1.0\sim 2.0)\times 10^6$ 的hADSCs^[15],因个体差异活力、数量、生长情况而各不相同;脂肪来源间充质干细胞比骨髓来源的间充质干细胞相比具有更长的培养期以及更高的增殖能力^[2-3];实验表明,脂肪间充质干细胞具有低免疫原性,体内不会引发淋巴细胞毒性反应^[16],是一种理想的种子细胞。

hADSCs在体外培养相对时间较长,能多次传代,但是随着培养时间的增加,多数细胞10代以后开始表现出衰老迹象,细胞逐渐增大、变形,最后皱缩、成团,最后停止增长,直至死亡,如何维持hADSCs在体外长期培养而不分化亦将成为干细胞研究的重点。

4 参考文献

[1] Anderson DJ, Gage FH, Weissman IL, et al. Can stem cells cross lineage boundaries. *Nat Med*. 2001;7(4):393-395.
 [2] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7(2):211-228.
 [3] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002;12(13):4279-4295.
 [4] Katz AJ, Tholpady A, Tholpady SS, et al. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal(hADAS) cells. *Stem Cells*. 2005;23(3):412-423.
 [5] Brzoska M, Geiger H, Gauer S, et al. Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;330(1):142-150.
 [6] Guilak F, Lott KE, Awad HA, et al. Clonal analysis of the differentiation potential of human adipocyte-derived adult stem cells. *Cell Physiol*. 2006;206(1):229-237.

[7] Lee RH, Kim B, Choi I, et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem*. 2004;14(4-6):311-324.
 [8] Agnieszka Banas, Takumi Teratani, Yusuke, et al. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells as a Source of Human Hepatocytes. *Hepatology*. 2007;46(1):219-228.
 [9] Kern S, Eichler H, Stoeve J, et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006;24(5):1294-1301.
 [10] 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. *Cytotherapy*. 2007;9(3):301-302.
 [11] Ning H, Liu G, Lin G, et al. Identification of an aberrant cell line among human adipose tissue-derived stem cell isolates. *Differentiation*. 2009;77(2):172-180.
 [12] Gimble JM. Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert Opin Biol Ther*. 2003;3(5):705-713. [12] Ning H, Liu G, Lin G, et al. Identification of an aberrant cell line among human adipose tissue-derived stem cell isolates. *Differentiation*. 2009;77(2):172-180.
 [13] Liu T M, Martina M, Hutmacher D W, et al. Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. *Stem Cells*. 2007;25(3):750-760.
 [14] Zhang WZ, Fan Y, Chen YQ, et al. Lanzhou Daxue Xuebao (Yixueban). 2008;50(02):11-16. 张卫泽, 樊艳, 陈永清, 等. 成人脂肪间充质干细胞冻存的实验研究[J]. 兰州大学学报(医学版). 2008,50(02):11-16.
 [15] Wang HW, He ZX, Wang ZH, et al. Fudan Xuebao(Yixueban). 2009;52(05):381-384. 汪浩文, 何志旭, 王志华, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞多向分化潜能的研究[J]. 复旦学报(医学版). 2009,52(05):381-384.
 [16] McIntosh K, Zvonic S, Garrett S. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells*. 2006;24(5):1246-1253.

来自本文课题的更多信息——

基金资助: 福建省自然科学基金(2006J0122) 课题名称: 肝干细胞的基础研究。国家自然科学基金(30872484)。课题名称: 骨髓间充质干细胞向肝脏星状细胞定向分化的构建及其在诱导同种异体胰岛细胞免疫耐受中的作用。

致谢: 感谢厦门大学生命科学院电镜室的无私帮助; 感谢厦门大学附属中山医院整形外科中心李峰主任的无私帮助。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题意义: 本课题利用人脂肪间充质干细胞, 胶原酶 I 消化法, 贴壁分选等方法获得长梭形细胞。经电镜、流式细胞仪、多项分化鉴定, 本文分离获得的细胞具有典型的间充质干细胞生物学特性, 为后续实验提供稳定的干细胞来源。

课题评估的“金标准”: 本文中用于评价间充质干细胞的表面分子检测, 如 CD34、CD45、CD90、CD105 等均为国际公认指标。

设计或课题的偏倚与不足: 本文重点在对分离培养的脂肪间充质干细胞进行了鉴定, 但是对于分离获得的细胞群体未有继续深入的研究, 比如 CD105 阳性, CD105 阴性细胞的区别, 差异等等。

提供临床借鉴的价值: 脂肪间充质干细胞分化为多种成体干细胞的研究和应用正不断取得新的突破。脂肪间充质干细胞作为一种来源广泛的自体干细胞一种具有许多不可比拟的优势, 诸如: 来源广泛, 低免疫原性, 增殖能力较强。相信随着研究的不断深入, 其有望被应用于各类临床治疗。被诱导成各类组织, 为疾病的细胞、基因治疗以及生物人工器官的开发寻找到了又一细胞来源, 应用前景广阔。