

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.05.003

脂肪来源干细胞体外成骨和成脂及成神经的诱导分化研究

黄子龙 柳大烈[△] 黄佳诚 南 华 李 丹

(南方医科大学珠江医院整形美容外科 广东 广州 510282)

摘要 目的:探讨脂肪来源干细胞体外成骨和成脂及成神经的诱导分化情况。**方法:**选取 10 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,将其不同部位的脂肪组织取出,分别采用不同方法对其向成骨、成脂及成神经等方向进行诱导分化并对其结果进行鉴定。**结果:**ADSC 表达中,CD29 占(99.11±0.13)%,CD44 占(95.94±0.71)%,CD45 占(0.12±0.09)%。经 4 周的成骨诱导后,茜素红 S 染色在细胞团中央发现红色钙化结节存在,碱性磷酸酶染色在细胞的胞质内观察到紫红色颗粒,经 7d 成脂诱导后,油红 "O" 染色在细胞质内观察到橙红色脂滴;经过 6d 的神经干培养基诱导后,通过免疫荧光染色证明诱导的 Nestin 细胞、神经丝蛋白 -200 以及 GFAP 等均出现阳性表达。**结论:**ADSC 具备向脂肪、成骨及神经元等细胞进行多向分化的潜能,具有来源广、易于操作、体外增殖快速等优越性,并且不存在免疫排斥及医学伦理学问题,发展前景广阔。

关键词:脂肪来源干细胞;诱导分化

中图分类号:Q95-3, Q813, R68 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)05-811-03

Adipose-Derived Stem Cells in Vitro and Osteogenic and Adipogenic Induction of Differentiation Into Neurons

HUANG Zi-long, LIU Da-lie[△], HUANG Jia-cheng, NAN Hua, LI Dan

(Department of Plastic and Cosmetic Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, 510282, China)

ABSTRACT Objective: To investigate adipose derived stem cells in vitro and osteogenic and adipogenic differentiation into neural induction. **Methods:** 10 SPF male SD rats to different parts of the fat tissue removed, different methods were used for its osteogenic, adipogenic and direction into nerve induced differentiation and the results were identified. **Results:** ADSC expression, CD29 accounted for (99.11±0.13)%, CD44 accounted for (95.94±0.71)%, CD45 share (0.12±0.09)%. After four weeks of osteogenic induction, Alizarin red S staining in red cell mass of the central calcified nodules found there, alkaline phosphatase staining was observed in the cytoplasm of cells to purple granules, after 7d adipogenic induction, oil red "O" staining was observed in the cytoplasm orange-red lipid droplets; through 6d after induction of neural stem medium, proved by immunofluorescence staining cells induced Nestin, GFAP and neurofilament protein -200 etc appear positive. **Conclusion:** ADSC have to fat, bone and neuronal cells such as multiple differentiations potential. Has a wide source, easy to operate, fast proliferation and other advantages, and there is no immune rejection and medical ethics issues and broad development prospects.

Key words: Adipose-derived stem cells; Induced differentiation

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, Q813, R68 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)05-811-03

前言

干细胞已经成为新世纪生命科学领域研究的焦点^[1,2]。相比于骨髓间质干细胞,脂肪干细胞(adipose stem cell, ADSC)具有来源广、分离方便、产生数量多的重要特点^[3-5],并且不存在伦理道德问题以及移植排斥现象,增殖能力明显增强,具有多向分化的潜能^[6,7]。我院通过酶消化法对 ADSC 进行分离、培养以及纯化,对第 3 代细胞表面表型的表达进行检测,并体外诱导使其分化成为脂肪、成骨以及神经元等细胞,旨在为组织工程、临床细胞以及基因治疗的深入研究提供一定的依据。现将结果报道如下。

作者简介:黄子龙(1987),男,博士,主要从事脂肪干细胞诱导分化及临床应用研究, E-mail: myseige@126.com

[△]通讯作者:柳大烈(1955-),男,教授,博士,主要从事颅颌面整形与组织工程研究

(收稿日期:2013-07-13 接受日期:2013-08-04)

1 资料与方法

1.1 实验动物及材料

由南方医科大学实验动物中心供给的体质量为(200.32±10.84)g 的 10 只 SPF 级雄性 SD 大鼠;worthington 公司提供的 I 型胶原酶;Sigma 胰蛋白酶;低糖 DM EM 培养基以及 B27 (Gibco)培养基;DM EM/F12 培养基;特级胎牛血清(fetal bovine serum, FBS);碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF),Peprotechinc 表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF);Nestin 兔抗大鼠,多克隆抗体兔抗人胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、神经丝蛋白 -200;山羊抗兔抗体;通过 PE 进行标记的 CD44 及 CD29 抗体,Biolegend 公司提供的采用异硫氰酸荧光素进行标记的抗体 CD45;L- 维生素 C、β- 磷酸甘油钠以及地塞米松注射液等药物、上海阳光试剂有限公司提供的茜素红 S、生化试剂 4- 羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)、华瑞制药有限公司提供的 L- 谷氨酰胺(SIGMA)、由南京建成生物公司提供

的碱性磷酸酶试剂盒; 二步法免疫组化试剂盒及 DAB 显色试剂盒、由磷酸二氢钠和磷酸氢二钠配置的磷酸盐缓冲液(PBS); CO₂ 培养箱, Leica 公司提供的型号为 DM I4000B 的倒置相差荧光显微镜, 美国 Beckman 公司提供的流式细胞仪, Jouan 公司提供的型号为 BR4i 的离心机。

1.2 方法

1.2.1 ADSC 的分离、培养以及传代纯化 给予 0.75mL/100g 氯胺酮复合剂对 SD 大鼠通过腹腔注射进行麻醉, 在无菌操作的前提下将腹股沟处、附睾垫以及腹膜后的脂肪取出, 将软组织及小血管剔除, 采用 PBS 反复冲洗 3 次, 用眼科剪将其剪碎, 变成糊状后, 在 37℃ 水浴环境下采用用 0.1% 型的胶原酶对其进行震荡消化, 待 0.5h 后变成溶胶状时, 用含 10% 磷酸盐缓冲液的 DM EM 培养基对其进行等体积中和, 采用 2600r/min 速率离心 10min 后, 将上清及悬浮的脂肪组织弃去, 采用 DM EM 培养基将细胞及沉淀的组织块重悬后接种到面积为 25cm² 的培养瓶中。放置于 5%CO₂ 培养箱中进行培养, 保持 37℃ 的温度及饱和湿度 48h。然后换液将未贴壁的细胞去除。此后定期换液, 1 次 /72h, 当细胞融合至 80%~90% 时, 给予 0.25% 的胰酶进行消化, 按照 (4~6) × 10³/cm² 的标准进行传代。

1.2.2 脂肪干细胞的生物学特性 第 3 代细胞表面 CD29、CD44 和 CD45 通过流式细胞仪对其表达情况进行分析。

1.2.3 诱导第 3 代细胞分化

1.2.3.1 成骨、成脂的诱导方案 依据 (1~2) × 10³/cm² 的密度将消化后的第 3 代细胞进行在 6 孔板中进行接种, 用 DM EM 培养液进行培养, 24h 后将其更换成包括 DM EM 培养基、10% 磷酸盐缓冲液、浓度为 1mol/L 的地塞米松注射液以及浓度为 200mol/L 的吡啶美辛、3- 异丁基 -1- 甲基黄嘌呤 (IBMX) 0.5 mmol/L 以及胰岛素 10g/ml 等成分的成脂诱导培养液或者包含 DM EM、10% FBS、β- 甘油 磷酸钠 50mmol/L、维生素 C50mg/L 等成分的成骨诱导培养液, 并定期更换, 1 次 /3d。

1.2.3.2 诱导后的鉴定 通过脂肪诱导 7d, 采用 4% 多聚甲醛固定细胞爬片, 10min 后采用油红“O”工作液^[9]进行密闭染, 15min 后用 60% 的乙醇进行分色, 然后给予苏木素进行再次染色, 并通过显微镜进行仔细观察。成骨诱导时间为 28d, 之后进行茜素红 S 染色, 并遵照试剂盒的操作规范进行碱性磷酸酶染色。

1.2.3.3 神经干细胞及神经元的诱导、鉴定 采用 1500r/min 的速率将已消化的第 3 代细胞进行离心并收集, 按照 10⁵ 个 /mL 的标准在包含有 DMEM/F12、2%B27、EGF20ng/mL、碱性成纤维生长因子 20ng/mL 等成分的神经干细胞培养基^[9]中进行诱导分化, 定期按半量更换液体, 1 次 /72h, 在诱导期间, 细胞的形态学变化通过倒置显微镜进行仔细观察。待形成细胞球并且免疫荧光染色后, 对神经干细胞依据介巢蛋白 Nestin 抗原表达进行鉴定。将细胞球在 DM EM 培养基中进行接种, 1~2d 出现贴壁后, 通过采用免疫荧光染色的细胞表达神经丝蛋白 -200 以及 GFAP, 对细胞球分化形成的多神经元及神经胶质细胞进行鉴定。用磷酸盐缓冲液反复冲洗经 4% 多聚甲醛进行固定的培养的细胞, 加入 1:200 的一抗介巢蛋白 Nestin、1:200 的神经丝蛋白 -200、1:200 的 GFAP 后, 在 4℃ 的温度下过夜, 再用 PBS 进行冲洗, 2 遍后避光环境下加入经过荧光素化的二抗, 在 37℃ 的环境下进行反应, 0.5h 后放于荧光显微镜上进行仔细观察并

对图像进行收集。

2 结果

2.1 ADS 的培养及传代纯化情况分析

在 25cm² 培养瓶中将脂肪单个核细胞进行接种 24~48h 后, 发生贴壁现象。细胞生长主要呈现出均匀分布的梭形、小角形和椭圆形等形状, 部分生长呈现集落状。之后, 梭形细胞占据优势地位, 5~8d 后将瓶底全部铺满。细胞的生长速度在传代之后出现明显增快, 并呈现出均匀单一的长梭形生长, 细胞在原代之后生长 3~5d 后便能够出现 80%~100% 的融合。并且每代细胞在形态学方面相比, 未发现明显的差异。

2.2 ADSC 的表面表型情况

通过流式细胞仪对第 3 代 ADSC 细胞的表型进行分析发现, CD29 占 (99.11 ± 0.13)%, CD44 占 (95.94 ± 0.71)%, CD45 占 (0.12 ± 0.09)%。

2.3 诱导细胞出现的变化及鉴定结果

2.3.1 成骨诱导情况 进行 1 周左右的诱导培养后, 长梭形细胞的形状转化为多角形、立方或不规则状, 并且体积出现明显增大。诱导培养 28d 后, 通过 ALP 染色能够在细胞质中见到颗粒呈紫红色; 通过茜素红 S 染色, 可以见到红色的典型矿化钙结节。

2.3.2 成脂诱导情况 进行 48~72h 的成脂诱导后, 细胞形态逐渐由长梭形转变为类圆形及多边形等, 并可以在不少细胞质内发现透亮的小脂滴, 且折光性相对较好, 随着时间的推移, 可以出现脂滴增加及多个脂滴融合的现象, 7d 之后进行油红“O”染色可以发现较多的红色脂质沉积存在。

2.3.3 诱导神经元情况分析 在神经干细胞培养基中将通过胰酶消化、离心后的第 3 代的脂肪干细胞进行接种 24h, 可发现细胞开始出现聚集, 48h 后多数表现出聚集状, 并悬浮生长, 72h 后可见到形成的颜色透亮、饱满的细胞球, 胞质内可以见到粗大的颗粒。6d 后通过鉴定确定增多、增大的细胞球对神经干细胞特异性标记物介巢蛋白 Nestin 进行表达。在 DM EM/F12 培养液中将细胞球进行接种 24~48h, 细胞球出现贴壁、向周围生长并相互延伸、连接的现象, 通过鉴定确定观察到的呈神经细胞样形态的有突起的细胞能够对神经丝蛋白 -200 或 GFAP 抗原进行表达。

3 讨论

近年来, 不少学者经过大量研究, 已经能够分离和鉴定来自于人或动物多部位的成体干细胞^[10-14]。相比之下, 脂肪干细胞具有易于取材, 增殖稳定、快速的重要特点, 并且通过特定的方法进行诱导, 脂肪干细胞能够分化成具备脂肪、成骨、软骨、肌肉、神经元及肝脏等细胞谱系特征的细胞, 因而已经成为广泛关注的焦点。

相比于对表面标志进行鉴定联合多向诱导分化的方法目前仍不能对具备某些特异性的表面标志物进行证明^[15-16]。我院从大鼠的脂肪组织中采用胶原酶进行消化分离的方案成功地将脂肪干细胞进行分离培养并稳定传代。一般而言, 间质干细胞 CD29 及 CD44 表达阳性, CD45 阴性作为泛白细胞的标志抗原已经被广大医家所认可^[17-20]。在本研究中, 对第 3 代的脂肪干细胞表面抗原通过流式细胞仪进行检测发现, CD29 及

CD44 呈现出高表达的状态,CD45 呈现出低表达的情形,由此进一步提示本研究所得到的 ADSC 并非源自于造血系统而是源自于间质干细胞。

在本研究中,选用成骨诱导培养液进行 4 周的诱导分化。能够分泌钙盐被认为是成骨细胞的重要特征,采用茜素红 S 染色方法对成骨诱导后的脂肪干细胞染色后出现阳性,提示不能产生钙盐的脂肪干细胞分化已经能够转向成骨细胞进行。除此之外,成骨细胞的碱性磷酸酶染色亦出现阳性,更加说明 ADSC 能够向成骨细胞的方向进行分化。

在本研究中,经成脂培养基进行诱导 48~72h 的 ADSC 出现细胞体积明显增大,并且,通过显微镜可以见到胞质内比较透亮的小脂滴,且折光性相对较好,随着时间的推移,可以出现脂滴增加及多个脂滴融合的现象,7d 之后进行油红“O”染色可以发现较多的红色脂质沉积存在。说明 ADSC 已经能够向脂肪细胞的方向进行分化。

将细胞置于神经干细胞培养基中进行悬浮诱导,72h 后可见到形成的颜色透亮、饱满的细胞球,胞质内可以见到粗大的颗粒。6d 后通过鉴定确定增多、增大的细胞球对神经干细胞特异性标记物介巢蛋白 Nestin 进行表达。在 DM EM/F12 培养液中将细胞球进行接种 24~48h,细胞球出现贴壁、向周围生长并相互延伸、连接的现象,通过鉴定确定观察到的呈神经细胞样形态的有突起的细胞能够对神经丝蛋白 -200 或 GFAP 抗原进行表达。提示 ADSC 已具备成功向神经干细胞及神经元进行诱导分化的能力。

综上所述,脂肪干细胞具备向脂肪、成骨及神经元等细胞进行多向分化的潜在能力。具有易于取材、增殖快速稳定的优越性,并且不存在免疫排斥反应及医学伦理学问题,发展前景广阔。

参考文献(References)

- [1] Duiveman-de Boer Tjitske, Massuger Leon, Torensma Ruurd, et al. Expression Compilation of Several Putative Cancer Stem Cell Markers by Primary Ovarian Carcinoma [J]. Journal of Cancer Therapy, 2010, 01(04):165-173
- [2] Gary E,Wise, Shaomian Yao, et al. Hypoxia promotes growth of stem cells in dental follicle cell populations[J].Journal of Biomedical Science and Engineering, 2011, 4(6): 454-461
- [3] Luciana Machado, Arnaldo Rodrigues Santos Jr. Stem cells and cell therapy: From basic sciences to clinical perspectives[J]. Journal of Biomedical Science and Engineering, 2013, 6(6):683-692
- [4] 汪玉海,金丽娟,高俊,等. 脂肪干细胞复合 PLGA 对骨质疏松骨折愈合后生物力学的影响[J]. 宁夏医科大学学报, 2013, 35(3):244-247
- [5] Wang Yu-hai, Jin Li-juan, Gao Jun, et al. Effect of Adipose Derived Stem Cells in PLGA on Biomechanics after Osteoporotic Fracture-healing[J]. Journal of Ningxia Medical University, 2013, 35(3):244-247
- [6] 邢红艳,刘彦普,周密,等. 应用微重力旋转生物反应器培养小鼠脂肪干细胞的初步实验研究[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(8):1459-1463
- [7] Hao Hong-yan, Liu Yan-pu, Zhou Mi, et al. Proliferation and Differentiation of Mouse Adipose Stem Cells in Rotary Cell Culture System[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2013, 13(8):1459-1463
- [8] Jean-Louis deSousa, Sheraz Daya, Raman Malhotra. Adnexal Surgery in Patients Undergoing Ocular Surface Stem Cell Transplantation [J]. Ophthalmology, 2009, 116 (2): 235-242
- [9] 王之发,翁雁鸣,刘彦普,等. 兔骨髓干细胞和脂肪干细胞增殖和分化能力的比较[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(11):2026-2030
- [10] Wang Zhi-fa, Weng Yan-ming, Liu Yan-pu, et al. Comparison of Proliferation and Differentiation Capacity of Rabbits' Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow and Adipose Tissue [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2013, 13(11):2026-2030
- [11] Oleg Verlinsky, Svetlana Rechitsky, Anver Kuliev, et al. Human embryonic stem cell lines with ccr5-del32 allele conferring resistance to HIV[J]. Stem Cell Discovery, 2011, 1(3):67-70
- [12] John Anderson, Nathan Jeppesen, Myron Hansen, et al. First Metatarsophalangeal Joint Arthrodesis: Comparison of Mesenchymal Stem Cell Allograft versus Autogenous Bone Graft Fusion Rates[J]. Surgical Science, 2013, 04(05):263-267
- [13] Rosario Isasi, Bartha M. Knoppers, Su-Chun Zhang, et al. From Banking to International Governance: Fostering Innovation in Stem Cell Research[J]. Stem Cells International, 2011, 04(09):27-35
- [14] Ju-Won Kim, Jong-Hwan Lee, Young S, et al. The effects of topical mesenchymal stem cell transplantation in canine experimental cutaneous wounds[J]. Vet Dermatol, 2013, 24(2):49-52
- [15] 吴元桢,欧阳轶强,黄玲,等. 新生树鼯海马神经干细胞的体外培养与鉴定[J]. 广西医学, 2012, 34(3):257-260
- [16] Wu Yuan-zhen, Ouyang Yi-qiang, Huang Ling, et al. Culture in Vitro and Identification of Neural Stem Cells From Hippocampus of Neonatal Tree Shrew[J]. Guangxi Medical Journal, 2012, 34(3):257-260
- [17] David C. Dorn, August Dorn. Structural characterization and primary in vitro cell culture of locust male germline stem cells and their niche [J]. Stem Cell Research, 2010, 6(2):112-128
- [18] 耘涛,秦书俭,王超,等. 年龄因素对大鼠脂肪干细胞成骨诱导分化能力的影响[J]. 辽宁医学院学报, 2009, 30(1):1-3, 95
- [19] Tan Tao, Qin Shu-jian, Wang Chao, et al. Influence of Age on Osteogenic Differentiation of Rat Adipose-derived Stem Cells [J]. Journal of Liaoning Medical University, 2009, 30(1):1-3, 95
- [20] Sachin Chaugule, Pravin Potdar. Establishment and molecular characterization of breast cancer mesenchymal stem cell line derived from human non-metastasis breast cancer tumor [J]. Stem Cell Discovery, 2011, 1(2):21-28
- [21] Fahd Al-Mulla, Hamad Ali. Defining umbilical cord blood stem cells [J]. Stem Cell Discovery, 2011, 2(1):15-23
- [22] Shigeo Fuji, Takehiko Mori, Vincent Lee, et al. A Multi-Center International Survey Related to the Nutritional Support after Hematopoietic Stem Cell Transplantation Endorsed by the ASIA Pacific Blood and Marrow Transplantation (APBMT)[J]. Food and Nutrition Sciences, 2012, 3(3):417-421
- [23] Sarabjeet Singh, Mohammad Kashif, Neil Bhambi, et al. New directions in cardiac stem cell therapy: An update for clinicians[J]. World Journal of Cardiovascular Diseases, 2012, 2(3): 193-200
- [24] Yoichi Robertus Fujii. The xenotropic microRNA gene information for stem cell researches and clinical applications [J]. Stem Cell Discovery, 2013, 3(1):32-36
- [25] Jinyang Yu, Yanqiu Yu. On the road: Clinical trials with stem cell extended to non-hematologic disease[J]. Advances in Bioscience and Biotechnology, 2013, 4(2):222-226