

分离与培养人脂肪组织间充质干细胞的研究

王乐禹 姜 平 高建华

(广东省广州市南方医科大学附属南方医院整形外科 广州 510515)

摘要目的:探索人脂肪组织源性间充质干细胞(ASCs)的分离、体外培养,为其广泛应用提供实验依据。**方法:**无菌条件下获取腹部手术病人皮下脂肪组织,酶消化法分离、培养ASCs,观察细胞形态并绘制细胞生长曲线,计算细胞群体倍增时间;对第2代细胞进行免疫组织化学染色,鉴定其表面分子CD44表达;取2-4代细胞用含体积分数为10%胎牛血清、1%青链霉素原液、 $1\mu\text{mol/L}$ 地塞米松、 $10\mu\text{mol/L}$ 胰岛素、 0.5mmol/L LIBMX的高糖DMEM培养基中诱导培养一周,观察细胞形态变化,并用油红“O”染色定性。**结果:**人脂肪组织中含有大量间充质干细胞,呈成纤维细胞样贴壁生长,细胞群体倍增时间为55h左右;免疫化学染色鉴定CD44阳性;成脂诱导分化一周,可见细胞内有大量脂滴,油红“O”染色可见胞浆内有大量红染颗粒。**结论:**建立了一种自人体脂肪组织分离、培养ASCs经济简便的方法,为其能够作为组织工程理想的种子细胞及广泛应用于临床提供实验依据。

关键词:干细胞;脂肪组织;培养

Isolation, culture mesenchymal stem cells from human adipose tissue

WANG Le-yu, JIANG Ping, GAO Jian-hua

Department of plastic surgery, southern hospital of southern medical university, guangzhou, 510515, china

ABSTRACT Objective: To find a method which can be used for isolation and cultivation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro. **Methods:** The adipose tissue was obtained from subcutaneous adipose tissue of abdominal surgery patients under aseptic condition, cultured with collagenase digestion. The cells were observed under inverted microscope each day and cell growth was studied with cell counting. Calculate the population doubling time of the cells; Immunocytochemistry was used to determine the surface molecule CD44; the cells was in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% ABAM, $1\mu\text{mol/L}$ dexamethasone, $10\mu\text{mol/L}$ insulin, 0.5mmol/L LIBMX for 1 week as adipogenic-inducing culture. **Results:** There was a large amount of mesenchymal stem cells in human adipose tissue, The population doubling time of the cells was about 55 hours; Immunocytochemical staining showed that most of the cultured cells were CD44 positive; and they could differentiate into mature adipocytes. **Conclusion:** A simple and convenient method to isolate and culture the adipose tissue-derived mesenchymal stem cells was successfully established, providing the foundation for the extensive use of ASCs in the field of tissue engineering and clinic.

Key words: Stem cells; Adipose tissue; Culture

前言

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)由于其体外高增殖率及多向分化潜能,已经成为重要的组织工程种子细胞^[1]。在过去的25年中骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BSCs)一直是研究的主角,现已成功获取骨髓干细胞,其能够向多种细胞分化的能力已初步运用于临床,但骨髓的抽取往往给患者造成痛苦,且来源有限,而且还存在伦理问题,所以其广泛应用受到限制^[2]。近几年,国外有学者研究显示脂肪组织中也含有大量具有多向分化潜能的间充质干细胞(adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, ASCs),脂肪组织抽取后残留于供区的脂肪组织仍可扩增,且肥胖人群也越来越多,许多人主动要求切除或抽吸脂肪,所以容易大量获得,对供区的损伤也小,这就使其自然成为干细胞生物工程研究的理想来源^[3]。但到目前为止,对ASCs的研究中仍然存

在许多令人质疑的地方。如脂肪组织中是否真正存在一类干细胞,这类干细胞是否是周围血中MSCs透过血液向脂肪组织中的渗透。分化后的细胞是否来源于ASCs,以及ASCs的免疫性如何都是人们值得探讨的地方。本研究对人脂肪MSCs进行分离培养、初步的免疫细胞化学检测和成脂诱导,为其能够作为组织工程理想的种子细胞及广泛应用于临床提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 组织来源

选取于本科室行切疤植皮术的正常体重患者,年龄8-20,无其他急慢性疾病,切取腹部正常皮肤下脂肪组织。

1.2 试剂

高糖DMEM培养基、青链霉素原液、I型胶原酶、PBS、胰蛋白酶、地塞米松、IBMX均购自Gibco BRL公司,胎牛血清购自PAA公司、胰岛素购自Genview公司、油红“O”购自Amresco公司,细胞培养瓶、培养板、培养皿均购自CORNING公司,抗CD44单克隆抗体、细胞免疫化学SP Kit检测试剂盒均购自Zymed公司。

1.3 方法

1.3.1 ASCs的分离与原代培养:术中切取皮下脂肪组织,约

作者简介:王乐禹,(1979-),女,硕士在读,住院医师

主要研究方向:脂肪组织工程,

通讯作者:高建华,广州市南方医科大学附属南方医院整形外科

(收稿日期:2006-04-10 接受日期:2006-04-30)

20g 浸于 DMEM 基础培养基中,于术后 2h 内在超净工作台 中用磷酸缓冲盐(PBS)洗涤,去除脂肪组织中肉眼可见的纤维及血管成分,剪切约 20 分钟,加入 1% 胶原酶(体积约为脂肪组织的 2 倍),在 37℃ 下消化 40min,并不断震荡或搅拌,含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基终止消化。200 目滤网过滤,1300r/min 离心 5 min,弃去上层漂浮的脂肪细胞和培养液,沉积的细胞用少量 DMEM 基础培养基制成细胞悬液,吹打均匀,接种于 1-2 瓶 50ml 培养瓶内。培养瓶内加入适量含 10% 胎牛血清,1% 青、链霉素原液的高糖 DMEM 培养基,混合均匀,置于 37℃,5% CO₂ 培养箱内孵育。每天观察,24h 后首次换液,去除悬浮细胞。随后每 2-3 天换液,约 1 周后细胞达 70%~80% 融合时即可进行传代。

1.3.2 细胞传代:以 0.25% 胰蛋白酶+0.03% EDTA 进行消化,于室温下消化约 1min,在倒置显微镜下观察见胞质回缩、细胞间隙增大,立即吸出消化液,加入适量基础培养基终止消化,用吸管将细胞吹打下来,800 r/min 离心 5 min,含 10% 胎牛血清,1% 青、链霉素原液的高糖 DMEM 培养基重悬沉积细胞,按 1 传 2 的比例进行传代。当传代细胞生长接近单层汇合 70% 时,可继续传代。

1.3.3 细胞生长曲线的绘制:将细胞悬液混匀,计数,调整细胞浓度为 2×10^4 个/ml,接种于 96 孔细胞培养板,每孔 100 μ L。从第二天起每日随机取 3 孔,胰蛋白酶消化细胞,分别用血球计数板在倒置显微镜下计数,取其均数,以时间(d)为横坐标,细胞数量为纵坐标,绘制生长曲线。根据 Patterson 公式 $Td = T \times \lg 2 / \lg(Nt/N0)$ 计算出细胞群体倍增时间。

1.3.4 免疫细胞化学检测:取第二代细胞爬片用于免疫细胞化学检测。室温下,0.01mol/L PBS 液洗去培养基,丙酮固定 10min,PBS 液漂洗 3 次,每次 5min。加入 3% H₂O₂,37℃ 作用 10min,PBS 冲洗。加入 3% TritonX-100,37℃ 作用 30min,PBS 冲洗。血清封闭液 37℃ 封闭 15min,按 1:200 用 PBS 稀释的 CD44 一抗湿盒中 4℃ 过夜。次晨,0.01mol/L PBS 液冲洗,滴加生物素标记二抗,37℃ 作用 60min,PBS 冲洗。加入 HRP 标记生物素抗体,37℃ 60min,PBS 冲洗,DAB 显色,冲洗,脱水,明胶甘油封片。荧光显微镜下观察。

1.3.5 向成熟脂肪细胞诱导分化:取传代培养的 2-4 代细胞,胰酶消化细胞,用成脂细胞培养基重悬细胞,接种于 60mm 培养皿中,成脂细胞培养基为:高糖 DMEM 培养基中含体积分数为 10% 胎牛血清,1% 青、链霉素原液,1mmol/L 地塞米松,10 μ mol/L 胰岛素,0.5mmol/L IBMX(异丁基甲基黄嘌呤)。37℃,5% CO₂ 孵箱中培养,诱导分化一周后在相差显微镜下观察,并用油红“O”染色。油红“O”染色方法为:弃去原培养液,用 PBS 洗涤,加入 10% 甲醛固定 2 小时,流水冲洗,37℃ 干燥,加入油红“O”工作溶液适量,置于室温,染色时间大于 2 小时。

2 结果

2.1 细胞形态学观察

接种后细胞在 24h 内贴壁,初为小圆形,细胞大小不等,核/浆比例较大,细胞核几乎充满胞浆。2-4 天可见细胞伸展,大多数细胞为长梭形,核椭圆形,较大。期间也可见形态、体积不一的多种细胞成分。此后细胞增殖旺盛,原代培养的

细胞 7-10 天即达 70%~80% 融合(图 1)。可进行常规传代培养,传代后细胞形态无大变化,2-4 天左右可达到单层汇合约 80%,可再次进行传代。体外培养 10 代以后,细胞的增殖速度无明显减慢。

2.2 细胞生长曲线(图 2)

细胞数量逐渐增多,第 3 天左右进入指数增长期,第 7 天左右到达高峰。细胞群体倍增时间约为 55h 左右。

2.3 细胞免疫化学鉴定

约 70% 的培养细胞胞浆内有大量黄褐色颗粒,显示对 CD44 抗原呈阳性反应(图 3)。

2.4 成脂诱导观察

加入成脂诱导培养基诱导培养 2-4 天后,培养皿中就出现含有脂滴的脂肪细胞,1 周后达到高峰,同时细胞中小脂滴逐渐融合,形成大的脂滴,并开始向外界分泌。此时油红“O”染色后细胞内出现大量红染颗粒(图 4),证明镜下所见细胞内颗粒确为脂滴。

3 讨论

自从 2001 年 Zuk 等^[3]首次发现从病人臀部和大腿处抽取的脂肪中含有大量类似于干细胞的细胞,此后,又有一些学者证实脂肪来源的干细胞可以向软骨细胞、骨细胞、脂肪细胞^[4]、心肌细胞^[5]以及神经元细胞^[6]方向分化。本实验亦证实了在成人脂肪组织中含有大量间充质干细胞,这些细胞在培养过程中具有稳定的群体倍增率,群体倍增时间为 55h,且传至 10 代以上增殖速度无大变化,同时还可冻存和复苏。这类细胞如果作为种子细胞运用于组织工程,将有利于在体外的大量扩增及反复实验。

随着对于 ASCs 的研究不断深入,皮下脂肪组织来源的间充质干细胞分离和培养技术也逐渐得以完善,国外报道的培养方法一般为经酶消化脂肪组织后,加入 NH₄CL 以裂解组织中的红细胞,但裂解液不仅可以裂解红细胞,同时会对干细胞造成一定的损伤^[2]。本实验在酶消化脂肪组织后,未加红细胞裂解液,而是通过频繁换液的方法去除细胞悬液中悬浮的红细胞成分,同样获得了较高浓度的干细胞成分。

MSCs 无特异性表面标志是公认的,目前用于鉴定 MSC 的表面标志主要有:CD29(+),CD44(+),CD59(+),CD105(+),CD166(+)^[7]。结果发现,绝大多数培养细胞 CD44 阳性,其间还可见其他细胞成分,这与文献报道中脂肪基质细胞除含有间充质干细胞外,还存在一些结缔组织和血管组织等其他成分^[3]是一致的。在成脂诱导方面,鉴于本实验室曾用含有胰岛素、地塞米松及异丁基甲基黄嘌呤的培养基成功诱导前脂肪细胞分化成为成熟的脂肪细胞。本实验也用此三种物质诱导脂肪间充质干细胞向成熟脂肪细胞分化,而省去了文献报道中另外需要加入的生物素、泛酸盐、吡哆美辛等物质。诱导分化一周,几乎所有的被诱导细胞经油红“O”染色后胞浆内有大量红染颗粒,说明效果明显,且此法比较经济、易行。

已证实脂肪组织中含有大量干细胞,但分离培养时成分并不单一。如能进一步纯化此类细胞,确定其表面分子表达,并证明其在分化前后都有低免疫原性,则脂肪来源的间充质干细胞将成为组织工程最理想的种子细胞。

(下转第 47 页)

(图 1-4 请见封 3)

3 讨论

MEK-6318K 属于三分类血细胞自动分析仪, 在我们国家应用非常广泛。检测原理采用细胞的体积阻抗法进行计数。所以, 细胞的计数只按细胞体积大小而产生脉冲强弱来计数的。并不能通过对细胞里的具体物质进行识别而判别细胞来计数。本文中由于小红细胞的存在而被误计数到血小板计数里, 引起血小板计数偏高^[2]。

肺结核患者大多数伴有营养不良, 结核病和营养之间是存在着双向的关系^[3]。结核病患者由于胃肠功能紊乱、食欲减退导致营养物质摄入减少, 造成合成代谢降低; 同时结核杆菌利用机体蛋白用于自身代谢, 菌体物质引起机体反复发生低热、盗汗、消瘦等消耗性改变^[4, 5]。这种病理生理改变容易引起造血系统功能障碍, 慢慢发展为贫血, 主要是缺铁性贫血, 即小细胞低色素性贫血。在诊断贫血各项指标没有低于参考值时, 尤其, MCV 几乎不降低, 医生可能看一眼结果就算了。其实, 这时的红细胞计数和血红蛋白量已经呈现出非一致性, 即红细胞计数相对升高, 呈现小红细胞少量逐渐增多阶段^[6]。这时少量的小红细胞被血细胞分析仪计数到血小板计数里, 引起血小板计数偏高, 但是偏高的不是很高。一般不超过 $400 \times 109/L$ 。

肺结核病近几年呈现出不典型性, 这给诊断带来很大麻烦, 要想获得“金指标”来诊断也非常困难, 本文统计及分析肺结核患者血小板计数有 23% 升高, 这在诊断上应该有很大意

义了。但是, 临床医生在对肺结核病诊断时很少注意到此项指标。所以, 应该打破传统分析思路, 全面分析结果, 对肺结核病的诊断将有很大意义。

现在临床治疗肺结核患者在采用药物化疗的同时, 特别注重患者的营养疗法^[9]。从本文对 400 例即将出院患者的血细胞统计结果看, 患者通过系统的治疗在好转治愈过程中, 血小板计数不在升高而恢复到正常参考值内。所以, 血小板计数在肺结核患者中的变化, 对肺结核患者观察预后也相当有意义。

参考文献

- [1] 谭守勇, 谢灿茂. 营养不良与结核病的发展和治 疗[J]. 中国防痨杂志, 2004, 26(2): 110~ 113
- [2] 严丽华, 邱方城, 郑卫东. 血细胞分析的影响因素探讨[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2005, 26(9): 660~ 661
- [3] 侯恕. 呼吸疾病的营养支持[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1996, 19(3): 133~ 135
- [4] 杨玲, 徐卫国. 合成代谢激素与 COPD 的营养学关系[J]. 国外医学呼吸分册, 2001, 21(4): 190~ 191
- [5] 翟文治, 马林凤, 杨忠侨等. 营养支持对老年难愈性肺结核的疗效影响[J]. 临床荟萃, 1995, 10(16): 733~ 734
- [6] Adeiga A A, Akinosho R O, Onyewche J. Evaluation of immune response in infants with different nutritional status: Vaccinated against tuberculosis, measles and poliomyelitis[J]. Journal of Tropical pediatrics, 1994, 40(12): 345~ 350

(上接第 36 页)

4 结论

本实验通过酶消化法从人腹部皮下组织中培养出较高浓度、增殖和分化旺盛的梭形细胞, 经 CD44 染色确定其为间充质干细胞成分, 并经绘制生长曲线和计算细胞群体倍增时间初步阐述了其生物学特性。证实了在成人脂肪组织中含有大量可为组织工程所用的种子细胞, 找到了一种经济简便的实验室分离培养 ASCs 的方法, 并用成脂培养成功诱导其分化为成熟脂肪细胞。为以后 ASCs 的大量扩增及更广阔的运用于组织工程领域奠定了实验基础。

参考文献

- [1] Pittenger MF, Machy AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411): 143~ 153
- [2] Brian M Strem, Kevin C Hickok, Min Zhu, et al. Multipotential differen-

tiation of adipose tissue- derived stem cells[J]. Keio J Med, 2005, 54(3): 132~ 141

- [3] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell based therapies[J]. Tissue Eng, 2001, 7: 211~ 228
- [4] Wickham MQ, Erickson GR, Gimble JM et al. Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee[J]. Clin Orthop, 2003, (412): 196~ 212
- [5] Rangappa S, Fen C, Lee EH et al. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes[J]. Ann Thorac Surg, 2003, 75: 775~ 779
- [6] Safford KM, Safford SD, Gimble JM et al. Characterization of neuronal/glial differentiation of murine adipose- derived adult stromal cells[J]. Exp Neurol, 2004, 187(2): 319~ 328
- [7] De Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA, et al. Differential expression of stem cell mobilization- associated molecules on multilineage cells from adipose tissue and bone marrow[J]. Immunol Lett, 2003, 89: 267~ 270

(正文请见第 8 页)

平菇转化叶黄素酯研究

彭 宏 师舞阳 李凤琦 杨 宇 陈龙胜

(中南大学资源加工与生物工程学院 湖南 长沙 410083 中南大学化学化工学院 湖南 长沙 410083)

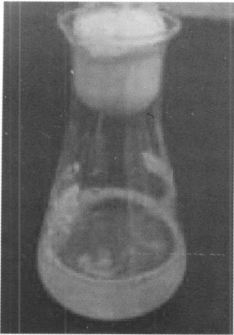


Fig.1 平菇在叶黄素酯液体培养基生长情况
Fig.1 Growth of *Pleurotus* in liquid lutein medium

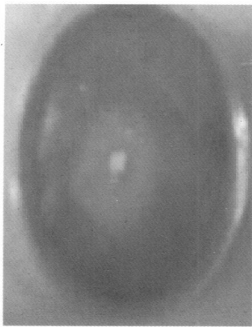


Fig.2 平菇菌丝体在叶黄素酯固体培养基生长情况
Fig.2 Growth of mycelium in solid lutein medium

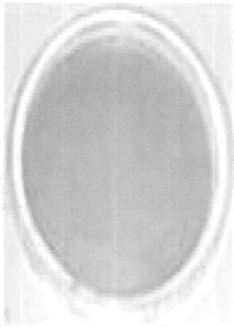


Fig.3 平菇孢子悬液在叶黄素酯固体培养基生长情况
Fig.3 Growth of spores in solid lutein medium

