

前脂肪细胞在小肠黏膜下层的生长与增殖*☆

兰海^{1,2}, 黄富国¹, 杨志明¹, 罗静聪¹, 李秀群¹

Growth and proliferation of preadipocyte seeded on small intestinal submucosa

Lan Hai^{1,2}, Huang Fu-guo¹, Yang Zhi-ming¹, Luo Jing-cong¹, Li Xiu-qun¹

Abstract

BACKGROUND: The preadipocytes could differentiate into adipocytes with strong proliferation capacity. Small intestinal submucosa (SIS) has good biocompatibility, could be suitable scaffold for tissue engineering.

OBJECTIVE: To culture preadipocytes *in vitro* on SIS, and to study the growth and proliferation of preadipocytes on SIS.

METHODS: The preadipocytes cultured were respectively seeded on SIS and pore plates, serving as material group and control group. Cell number in different periods was determined by MTT, and the growth curve was rendered. The proliferation capacity of the preadipocytes was observed under different culture conditions. Flow cytometry was used to detect the proliferation and apoptosis of preadipocytes seeded on SIS and pore plates. Preadipocytes on SIS were also observed for the growth and proliferation at different time points.

RESULTS AND CONCLUSION: The growth curve showed that, the preadipocytes on SIS grew rapidly and the cell number was higher than that in pore plates on day 13 ($P < 0.05$), suggesting a strong proliferation capacity. Cells on SIS exhibited stronger proliferative capacity than those in pore plate ($P < 0.05$). Apoptotic rates were low in two groups without statistical difference. The preadipocytes are shown to well adhere and grow on SIS. SIS is very biocompatible with preadipocytes.

Lan H, Huang FG, Yang ZM, Luo JC, Li XQ. Growth and proliferation of preadipocyte seeded on small intestinal submucosa. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(25):4599-4602.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 研究表明前脂肪细胞能定向分化为脂肪细胞, 具有很强的增殖能力。小肠黏膜下层具有良好的生物相容性, 是理想的组织工程支架材料。

目的: 将体外培养的前脂肪细胞与小肠黏膜下层复合, 观察前脂肪细胞在小肠黏膜下层上的生长和增殖情况。

方法: 将体外培养的前脂肪细胞接种在小肠黏膜下层上作为材料组, 设置在孔板内培养的细胞作为对照组, 在不同时间用 MTT 法检测前脂肪细胞的相对数量并绘制生长曲线, 观察前脂肪细胞在不同培养条件下的增殖能力。流式细胞仪检查两组前脂肪细胞的增殖和凋亡情况, 并观察不同时间点前脂肪细胞生长和黏附情况。

结果与结论: 从生长曲线可以看出, 接种 13 d 后小肠黏膜下层上的前脂肪细胞数高于孔板内培养的前脂肪细胞数($P < 0.05$), 具有良好的增殖能力。小肠黏膜下层上的细胞比孔板培养的细胞有更强的增殖能力($P < 0.05$), 两组前脂肪细胞均无明显凋亡。由此可知, 前脂肪细胞在小肠黏膜下层具有良好黏附和生长的能力。小肠黏膜下层与前脂肪细胞有良好的生物相容性。

关键词: 前脂肪细胞; 小肠黏膜下层; 细胞增殖; 生长; 黏附; 组织工程; 生物相容性

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.25.010

兰海, 黄富国, 杨志明, 罗静聪, 李秀群. 前脂肪细胞在小肠黏膜下层的生长与增殖[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(25):4599-4602. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

脂肪组织缺损的传统治疗方法的疗效均不理想^[1]。前脂肪细胞位于成熟的脂肪组织之中, 能定向分化为脂肪细胞, 具有很强的增殖能力, 可在体外大量扩增, 并能够于体外培养环境中诱导分化为成熟的脂肪细胞^[2-3]。小肠黏膜下层作为一种生物衍生材料具有良好的生物相容性, 很多细胞如成纤维细胞、人微血管内皮细胞等在小肠黏膜下层上均能生长增殖, 同时有较强的促进血管生成的能力, 是理想的组织工程支架材料^[4-5], 由于其来源广泛, 制作成本低, 因而具有很高的实用价值。在脂肪组织工程中应用小肠黏膜下层作为支架材料文献中尚未见

相关报道。实验重点研究体外培养的前脂肪细胞在小肠黏膜下层上的生长和增殖情况, 并探讨其生物相容性。

1 材料和方法

设计: 细胞学体外实验。

时间及地点: 于2006-01/2007-01在四川大学组织工程实验室完成。

材料:

细胞来源: 均为腰椎创伤前路术中采集的健康成年女性腹部皮下脂肪组织, 无传染病、慢性病及肿瘤病史, 血常规、生化、输血等检查均正常。

患者均签署知情同意书, 实验经医院医学伦理委员会批准。

¹Department of Orthopaedics, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China; ²Department of Orthopaedics, Chengdu Railway Center Hospital, Chengdu 610081, Sichuan Province, China

Lan Hai☆, Doctor, Department of Orthopaedics, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China; Department of Orthopaedics, Chengdu Railway Center Hospital, Chengdu 610081, Sichuan Province, China
sealan2000@163.com

Correspondence to: Huang Fu-guo, Master, Professor, Department of Orthopaedics, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
hfg2009@163.com

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30270398*

Received: 2010-04-15
Accepted: 2010-05-06

¹ 四川大学华西医院骨科, 四川省成都市 610041;
² 成都铁路中心医院骨科, 四川省成都市 610081

兰海, 男, 1975年生, 汉族, 2008年四川大学毕业, 博士, 主要从事骨科创伤修复与功能重建工作。
sealan2000@163.com

通讯作者: 黄富国, 硕士, 教授, 四川大学华西医院骨科, 四川省成都市 610041
hfg2009@163.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)25-04599-04

收稿日期: 2010-04-15
修回日期: 2010-05-06
(20100415005/WJ · Y)

小肠黏膜下层材料来源: 新鲜猪大肠购自成都市生猪屠宰中心, 交由四川大学华西医院组织工程实验室制备。

试剂与仪器:

试剂与仪器	来源
I 型胶原酶	美国 GIBCO 公司
流式细胞仪	美国 BD 公司
扫描电镜, 光学显微镜	日本 Olympus 公司

实验方法:

前脂肪细胞的分离培养: 采用酶消化法获得前脂肪细胞^[6], 原代细胞单层汇合后采用胰酶消化法进行传代^[7], 用完全培养基(体积分数10%胎牛血清+DMEM培养基)进行培养, 浸泡小肠黏膜下层材料2 h后吸去液体, 37℃, 体积分数5%的CO₂孵箱中培养10 min。

前脂肪细胞与小肠黏膜下层的体外复合: 取第3代前脂肪细胞按照所需细胞接种密度制成细胞悬液。按所需的接种密度浓缩后每个材料表面均匀滴入20 μL细胞悬液, 将接种有细胞的材料放入培养箱中, 2 h后加入体积分数10%的胎牛血清+DMEM 2 mL/孔, 在37℃, 体积分数5% CO₂培养箱持续培养。

MTT检测: 用MTT法检测材料上细胞数量随时间的变化情况^[8]。实验分材料组和对照组, 材料组用沉淀法将前脂肪细胞以 $2.5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的密度接种于小肠黏膜下层材料上。对照组设孔板内培养的前脂肪细胞作为对照。两组分别于培养1, 3, 5, 7, 9, 11和13 d取材检测细胞数量, 每次检测3个/组, 加MTT 10 μL/孔, 孵育4 h后加DMSO 500 μL, 取200 μL转入新96孔板中, 用分光光度计在570 nm波长条件下检测吸光度值(A), 取其平均值绘制生长曲线^[4]。

细胞增殖指数和凋亡率检测: 材料组: 将小肠黏膜下层材料剪为孔板大小, 置入6孔板内, 共设6个孔。对照组: 以6个孔仅为完全培养基, 细胞接种密度为 $1 \times 10^5/\text{cm}^2$, 1周后用胰酶消化收集细胞, 体积分数75%乙醇固定, 每组收集2孔细胞作为1个检查标本, 每组共收集3个标本。用流式细胞仪检查细胞增殖指数及凋亡率^[9]。

组织学观察:

光学显微镜观察: 按 $2.5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的密度接种细胞于小肠黏膜下层材料上, 用完全培养基培养, 每日取出1个标本(吸出培养基用磷酸盐缓冲液漂洗3次), 经苏木精染色后, 光学显微镜下(200倍视野)观察。

扫描电镜观察: 接种方法同上, 分别于接

种后4 h, 2 d和2周, 取出标本, PBS冲洗后, 用体积分数0.5%的戊二醛固定。用醋酸异戊酯固定后在扫描电镜(1 000倍视野)下观察。

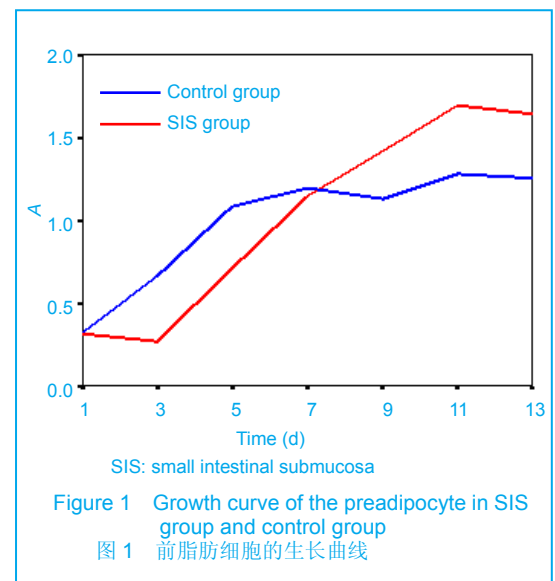
设计、实施、评估者: 设计为第一、二、三作者, 实施为第一作者, 评估为第四、五作者, 均经过系统培训, 未使用盲法评估。

主要观察指标: 前脂肪细胞的增殖能力, 增殖指数, 凋亡率和组织学变化。

统计学分析: 实验计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用SPSS 11.0统计学软件进行统计学分析, 组间均数的比较采用两样本t检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

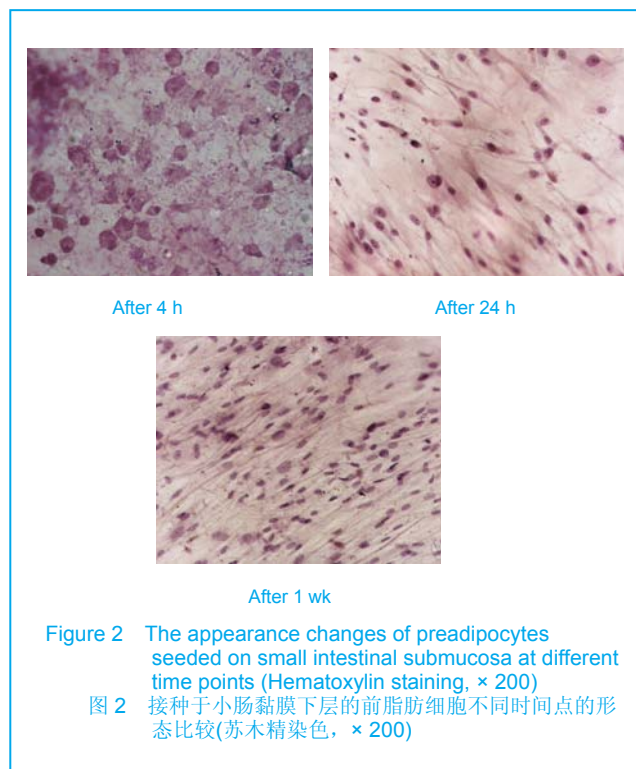
2.1 前脂肪细胞的增殖能力 对照组细胞接种1 d后即进入快速增殖期, 而材料组无诱导剂接种后经过3 d潜伏期后快速增殖, 两者增殖速度接近。对照组在5 d时即进入平台期细胞增殖缓慢, 而材料组在11 d才进入平台期, 见图1。接种13 d后小肠黏膜下层上的前脂肪细胞数高于孔板内培养的前脂肪细胞数($P < 0.05$)。



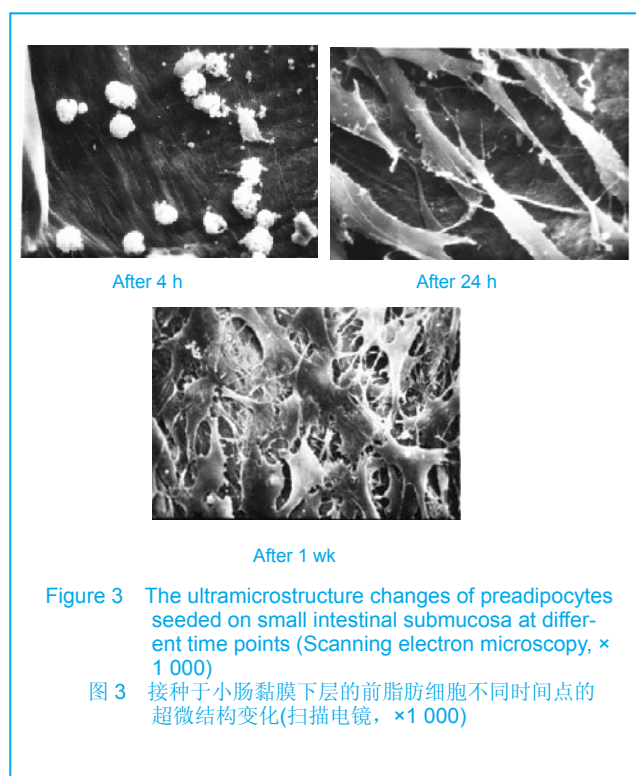
2.2 前脂肪细胞的增殖及凋亡 流式细胞仪分析结果表明, 接种7 d以后材料组增殖指数高于对照组(29.3 ± 3.6 , 10.7 ± 0.9 , $P < 0.05$)。材料组(0.86 ± 0.25)和对照组(1.23 ± 1.23)仅有少量凋亡细胞。

2.3 前脂肪细胞组织学变化 接种4 h后光学显微镜下前脂肪细胞呈圆形并附着于小肠黏膜下层材料表面, 24 h后可见细胞在材料表面生长有突起长出呈梭形, 1周后小肠黏膜下层上见大量细胞生长。细胞呈铺开状, 位于不同的平面,

彼此形成细胞间连接, 见图2。



扫描电镜观察小肠黏膜下层材料表面可见的三维网格样结构, 接种4 h小肠黏膜下层上附着的细胞呈球形与材料间无紧密连接, 24 h后可见细胞呈梭形附着于材料表面。1周后细胞大量增殖, 形成多个突起, 细胞与细胞间, 细胞与材料间均形成连接。材料孔隙也可见细胞生长, 见图3。



3 讨论

前脂肪细胞具有很强的增殖能力, 能在体外扩增, 具有定向分化为脂肪细胞的能力, 是脂肪组织工程理想的种子细胞^[10-13]。脂肪组织工程的支架材料应满足3个条件: 与前脂肪细胞具有良好的生物相容性, 在生物体内可降解并可促进血管生成。目前脂肪组织常用的支架材料包括胶原、乳酸、乙醇酸共聚物、透明质酸和聚四氟乙烯等等^[6, 14-15], 这些材料虽然能提供细胞生长的空间, 但不具备促进细胞生长分化的功能, 单独应用难以形成成熟的脂肪组织, 往往需要复合多种细胞因子, 技术难度大, 费用高难以实现临床大规模的应用。

小肠黏膜下层成分主要是细胞外基质, 具有三维空间结构, 能为细胞提供合适的生长环境, 并用于许多组织缺损的修复重建, 显示出良好的组织相容性^[16-18]。小肠黏膜下层存在纤维连接蛋白对细胞黏附有很好的促进作用。小肠黏膜下层还含有许多生长因子, 即使经过制备过程处理后这些生长因子仍然具有活性, 包括碱性成纤维细胞生长因子和内皮细胞生长因子等^[19-20]。有研究显示纤维细胞生长因子具有促进前脂肪细胞增殖的作用, 肥胖人群脂肪组织中的成纤维细胞生长因子mRNA的表达量远高于偏瘦的个体^[21], 内皮细胞生长因子能抑制前脂肪细胞成熟分化, 从而使前脂肪细胞保持增殖活性。Serrero等^[22]研究证实内皮细胞生长因子对成熟脂肪组织的形成有很强的抑制作用, 并发现注射了内皮细胞生长因子的大鼠的腹股沟脂肪组织中前脂肪细胞数量均增高。

实验的组织学观察结果显示前脂肪细胞能很好黏附在小肠黏膜下层表面, 并扩展形成突起, 细胞与细胞, 细胞与材料间均形成连接, 小肠黏膜下层存在纤维连接蛋白在其中可能起到一定的作用, 使前脂肪细胞能与材料很好地黏附, 有利于其生长增殖。Hemmrich等^[23]的研究也显示生长在包被了纤维连接蛋白的培养皿上的前脂肪细胞具有很强的增殖和分化能力。从生长曲线可看出, 孔板内细胞接种1 d后即进入快速增长期, 早期接种于小肠黏膜下层的前脂肪细胞生长有3 d的潜伏期, 其原因可能为由于细胞外环境发生了改变, 细胞增殖需要一个黏附适应的过程。接种于小肠黏膜下层的前脂肪细胞3 d后进入快速增殖期, 增殖速度与孔板内细胞相当, 但快速增殖时相较孔板内细胞延长。培养期末小肠黏膜下层上细胞数量高于孔板内细胞数量。这是因为三维结构上生长的细胞具有更大的生长表面, 可以容纳更多的细胞生长。通过流式细胞仪检测细胞周期结果显示小肠黏膜下层上的细胞比孔板内的细胞有更高的增殖指数, 这可能与小肠黏膜下层所含的生长因子对细胞周期的调节发挥了一定的作用有关。

实验揭示了前脂肪细胞在小肠黏膜下层上有良好的生长增殖能力, 因而将两者进行体外复合培养, 并植入体内构建组织工程脂肪材料, 具有一定的可行性, 脂肪细胞与小肠黏膜下层有良好的生物相容性, 但小肠黏膜下层对前脂肪细胞的分化能力的影响, 以及材料与细胞的复合体在体内的具体生物学变化是下一步需要研究的课题之一。

4 参考文献

- [1] Gomillion CT, Karen JL. Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomaterials*. 2006;27(36):6052-6063.
- [2] Shahparaki A, Grunder L, Sorisky A. Comparison of human abdominal subcutaneous versus omental preadipocyte-differentiation in primary culture. *Metabolism*. 2002;51(9):1211-1215.
- [3] Li ZH, Carraro R, Gregerman RI, et al. Adipocyte differentiation factor (ADF): a protein secreted by mature fat cells that induces preadipocyte differentiation in culture. *Cell Biol Int*. 1998;22(4):253-270.
- [4] Gilbert TW, Stewart-Akers AM, Sydeski J, et al. Gene expression by fibroblasts seeded on small intestinal submucosa and subjected to cyclic stretching. *Tissue Eng*. 2007;13(6):1313-1323.
- [5] Ahn HH, Kim KS, Lee JH, et al. Porcine small intestinal submucosa sheets as a scaffold for human bone marrow stem cells. *Int J Biol Macromol*. 2007;41(5):590-596.
- [6] von Heimburg D, Kuberka M, Rendchen R, et al. Preadipocyte-loaded collagen scaffolds with enlarged pore size for improved soft tissue engineering. *Int J Artif Organs*. 2003;26(12):1064-1076.
- [7] Carraro R, Li ZH, Johnson JE, et al. Islets of preadipocytes highly committed to differentiation in culture of adherent rat adipocytes. *Cell Tiss Res*. 1991;264(2):243-251.
- [8] Ranty ML, Quintyn JC, Courville P, et al. The importance of flow cytometry and the cell proliferation index in choroidal melanoma. *J Fr Ophtalmol*. 2003;26(7):725-729.
- [9] Oka M, Maeda S, Koga N, et al. A modified colorimetric MTT assay adapted for primary cultured hepatocytes: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1992;56(9):1472-1473.
- [10] Stacey DH, Hanson SE, Lahvis G, et al. In vitro adipogenic differentiation of preadipocytes varies with differentiation stimulus, culture dimensionality, and scaffold composition. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(11):3389-3399.
- [11] Stillaert FB, Di Bartolo C, Hunt JA, et al. Human clinical experience with adipose precursor cells seeded on hyaluronic acid-based spongy scaffolds. *Biomaterials*. 2008;29(29):3953-3959.
- [12] Chung HJ, Park TG. Injectable cellular aggregates prepared from biodegradable porous microspheres for adipose tissue engineering. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(6):1391-1400.
- [13] Lai N, Jayaraman A, Lee K. Enhanced proliferation of human umbilical vein endothelial cells and differentiation of 3T3-L1 adipocytes in coculture. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(5):1053-1061.
- [14] Stillaert FB, Di Bartolo C, Hunt JA, et al. Human clinical experience with adipose precursor cells seeded on hyaluronic acid-based spongy scaffolds. *Biomaterials*. 2008;29(29):3953-3959.
- [15] Patrick CW Jr, Zheng B, Johnston C, et al. Long-term implantation of preadipocyte-seeded PLGA scaffolds. *Tissue Eng*. 2002; 8(2):283-293.

- [16] Nishimura T, Ueno T, Nakatsu H, et al. In vivo motility evaluation of the grafted gastric wall with small intestinal submucosa. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(5):1761-1768.
- [17] Castro Marques AI, Hipwell F, Yool DA, et al. The use of porcine small-intestinal submucosa for abdominal wall reconstruction—a clinical case. *J Small Anim Pract*. 2009;50(11):619-623.
- [18] Crapo PM, Wang Y. Small intestinal submucosa gel as a potential scaffolding material for cardiac tissue engineering. *Acta Biomater*. 2010;6(6):2091-2096.
- [19] McDevitt CA, Wildey GM, Cutrone RM. Transforming growth factor-beta1 in a sterilized tissue derived from the pig small intestine submucosa. *J Biomed Mater Res*. 2003;67A(2):637-640.
- [20] Palmer EM, Beilfuss BA, Nagai T, et al. Human helper T cell activation and differentiation is suppressed by porcine small intestinal submucosa. *Tissue Eng*. 2002;8(5):893-900.
- [21] Torti FM, Torti SV, Larrick JW, et al. Modulation of adipocyte differentiation by tumor necrosis factor and transforming growth factor beta. *J Cell Biol*. 1989;108(3):1105-1113.
- [22] Serrero G. EGF inhibits the differentiation of adipocyte precursor primary cultures. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987;146(1):194-202.
- [23] Hemmrich K, von Heimburg D, Cierpka K, et al. Optimization of the differentiation of human preadipocytes in vitro. *Differentiation*. 2005;73(1):28-35.

来自本文课题的更多信息——

基金资助: 课题获国家自然科学基金(30270398)资助。

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。

课题的创新点: 常用的组织工程脂肪的支架材料包括胶原、透明质酸等, 这些材料来源有限, 且制作成本高, 其生物相容性还有待验证。实验以小肠黏膜下层作为支架材料, 属于天然的生物衍生材料, 具有来源广泛、制作简单、费用低廉等优点, 有利于大规模的生产应用。本课题将小肠黏膜下层材料应用于脂肪组织工程研究目前未见相关报道。

课题评估的“金标准”: 细胞数量的测定采用 MTT 法, 细胞增殖指数及凋亡率的检测采用流式细胞仪均为公认的金标准。

设计或课题的偏倚与不足: 实验仅检测了细胞的活性、生长增殖能力, 没有开展相关实验来证实前脂肪细胞的成脂能力。实验所用的小肠黏膜下层材料来源生猪, 未作细菌学和免疫学相关指标检测, 进一步的体内应用将受到限制。在体内生物环境中复合材料的降解和转归还待深入分析。

提供临床借鉴的价值: 本课题证实前脂肪细胞与小肠黏膜下层材料有良好的生物相容性, 为下一步体内研究及进一步临床应用奠定了基础。