

人脂肪干细胞的分离培养与生物学特性**

田霖, 孙筱放, 刘海波, 骆玉梅, 陈欣洁, 黄东健

Isolation, culture and biological characteristics of human adipose-derived stem cells *in vitro*

Tian Lin, Sun Xiao-Fang, Liu Hai-Bo, Luo Yu-Mei, Chen Xin-Jie, Huang Dong-Jian

Third Affiliated
Hospital, Guangzhou
Medical University,
Guangzhou
510150, Guangdong
Province, China

Tian Lin★, Studying
for master's degree,
Third Affiliated
Hospital, Guangzhou
Medical University,
Guangzhou
510150, Guangdong
Province, China
doctor_tian118@
yahoo.cn

Corresponding
author: Chen Xin-jie,
M.D., Chief
technician, Master's
supervisor, Third
Affiliated Hospital,
Guangzhou Medical
University,
Guangzhou
510150, Guangdong
Province, China

Co-corresponding
author: Huang
Dong-jian, M.D.,
Chief physician,
Master's supervisor,
Third Affiliated
Hospital, Guangzhou
Medical University,
Guangzhou
510150, Guangdong
Province, China

Supported by: the
Major Program of
Science and
Technology of
Guangdong Province
in 2011, No.
2011A08030002*

doi:10.3969/j.issn.
2095-4344.2012.32.
011

Received: 2012-03-05
Accepted: 2012-04-27

文章亮点:

通过胶原酶消化法可在人脂肪组织中高效、稳定地获得大量较高纯度的人脂肪干细胞, 具有较强的增殖能力, 培养过程中未出现染色体核型的改变, 且在一定诱导条件下, 能够向脂肪细胞和成骨细胞分化。

Abstract

BACKGROUND: Human adipose-derived stem cells are widely used as seed cells in tissue engineering and regenerative medicine. Therefore, harvesting a large number of high-purity human adipose-derived stem cells is important for above-mentioned studies.

OBJECTIVE: To explore the suitable culture condition of human adipose-derived stem cells *in vitro*, and to enhance the proliferative ability of human adipose-derived stem cells.

METHODS: Collagenase I was used to digest and isolate human adipose-derived stem cells from intact fat of human abdomen. Human adipose-derived stem cells were purified using attachment method, cultured with low-glucose medium and passaged *in vitro*. Morphology was observed after Giemsa staining; the growth curve was drawn and cell cycle was analyzed. The karyotype of the passaged human adipose-derived stem cells was analyzed. Cells at the third passage were subjected to flow cytometry analysis, EdU incorporation and colony forming experiments.

RESULTS AND CONCLUSION: The morphology of primary cultured human adipose-derived stem cells was not the same, passaged human adipose-derived stem cells were spindle-shaped and arranged tightly in a vortex-like appearance. The growth curve was "S" shaped. Cell cycle analysis and EdU incorporation results showed that human adipose-derived stem cells cultured *in vitro* could maintain strong proliferative ability. Karyotype mapping showed that *in vitro* culture could not cause chromosome abnormalities of adipose-derived stem cells. Flow cytometry analysis showed that passage 3 adipose-derived stem cells were positive for CD29, CD44, CD90 and CD105, but they were negative for CD34 and CD45, with a clone formation rate of 8.8%. Under certain induction condition, adipose-derived stem cells could differentiate into adipocytes and osteoblasts. Human adipose-derived stem cells were successfully isolated by collagenase digestion method, cultured *in vitro* and showed strong proliferative ability.

Tian L, Sun XF, Liu HB, Luo YM, Chen XJ, Huang DJ. Isolation, culture and biological characteristics of human adipose-derived stem cells *in vitro*. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(32): 5946-5952. [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

摘要

背景: 高效、稳定地获得大量较高纯度的人脂肪干细胞, 是其在组织工程学及再生医学中广泛应用的基础和前提。

目的: 探索体外培养脂肪干细胞的适宜条件, 从而提高其增殖能力。

方法: 采用胶原酶消化的方法, 从人腹部皮下块状脂肪中分离出脂肪干细胞, 经贴壁筛选法纯化细胞、低糖培养基体外培养扩增。Giesam 染色后观察细胞形态; 绘制细胞生长曲线并进行细胞周期分析, 观察分析传代后染色体核型改变; 选取第 3 代脂肪干细胞做流式细胞鉴定、EdU 细胞增殖能力检测以及克隆形成实验。

结果与结论: 分离培养的原代脂肪干细胞形态不一, 经传代后的细胞形态趋于长梭形, 排列紧密呈漩涡状生长。细胞生长曲线呈 S 形, 细胞周期分析及 EdU 掺入法结果显示体外培养的脂肪干细胞具有较强的增殖能力。经染色体核型分析结果提示, 体外培养不会引起脂肪干细胞的核型改变。第 3 代脂肪干细胞经流式细胞仪检测 CD29, CD44, CD90, CD105 均呈阳性表达, 而 CD34 和 CD45 呈阴性; 克隆形成率为 8.8%; 在一定的诱导条件下, 脂肪干细胞能够向脂肪细胞及成骨细胞分化。结果说明采用胶原酶消化法可成功分离培养人脂肪干细胞, 且具有较强的增殖能力。

关键词: 人脂肪干细胞; 分离; 体外扩增培养; 鉴定; 染色体核型; 生物学特性

田霖, 孙筱放, 刘海波, 骆玉梅, 陈欣洁, 黄东健. 人脂肪干细胞的分离培养与生物学特性[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(32):5946-5952. [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

0 引言

间充质干细胞是存在于体内多种组织中的一种具有自我更新和多向分化潜能的多能干细胞。由于具有容易分离扩增、自我更新、多向分化和低免疫原性等特性^[1],而成为了目前组织工程和再生医学中理想的种子细胞^[2-3],为一些传统药物治疗困难的疾病带来新希望^[4]。目前在基础研究及临床应用中大多以骨髓来源的间充质干细胞作为研究对象^[5-7]。但是在实际应用中骨髓间充质干细胞存在的不足之处在于:来源有限,获取的过程需要进行有创操作,体外培养期间骨髓间充质干细胞的绝对数量和细胞增殖分化的能力会随着供者年龄的增长而下降,所以研究人员不断在寻找一种新的更具有优势的替代细胞。

2001年,Zuk等^[8]从抽脂术废弃的脂肪组织中,分离脂肪干细胞。实验研究发现与骨髓间充质干细胞相比而言,脂肪干细胞具有来源充足,取材方便,对人体造成的创伤也较小,可反复取材,容易分离,获取细胞量大,脂肪组织中所含干细胞的数量不会随着患者年龄的增加而减少,体外增殖迅速,生物学性状稳定等特性,因此,脂肪干细胞相对于骨髓间充质干细胞具有很大的优势,很有可能成为新的组织工程种子细胞来源。

本实验旨在探索提取高纯度的人脂肪干细胞的分离方法,选择适合的扩增培养条件,初步对其生物学特性及遗传稳定性进行分析,为将来干细胞移植的研究提供实验依据。

1 材料和方法

设计: 体外细胞学观察实验。

时间及地点: 实验于2011-07/12在广州医学院第三附属医院广东省产科重大疾病重点实验室完成。

材料:

脂肪组织: 广州医学院第三附属医院产科剖腹产产妇皮下脂肪组织,产妇年龄26~34岁,平均年龄29.6岁,均无其他基础疾病,未经过特殊药物治疗,取材前均获得产妇知情同意。

主要试剂与仪器:

试剂及仪器	来源
0.25%胰蛋白酶, I型胶原酶, 胎牛血清, 低糖 DMEM 培养基	Gibco 公司
FITC-anti-human CD105	Biolegend 公司
PE-anti-human CD90, PE-anti-human CD29	BD Pharmingen 公司
PE-anti-human CD45	Beckman Coulter 公司
FITC-anti-human CD44, EdU 细胞增殖检测试剂盒(Click-it® EdU Imaging Kits)	Invitrogen 公司
70 μm 细胞筛网	Falcon 公司
荧光倒置相差显微镜	Nikon 公司
流式细胞仪	BD, FACSCalibur, USA

实验方法:

分离提取人脂肪干细胞和体外扩增培养: 分离提取脂肪干细胞的步骤参照Zuk等^[8-9]的研究,并稍作修改。产科手术中,无菌条件下取健康剖宫产女性腹部皮下脂肪约5 g,用含有500 U/mL双抗的PBS充分漂洗3遍,剔除肉眼可见的血管及结缔组织,用眼科剪将其充分剪碎,再用PBS反复冲洗,尽量除去红细胞。加入2倍体积的0.2% I型胶原酶,振荡混匀后,于37 °C的恒温水浴箱消化60 min,加入等体积的含有体积分数为10%胎牛血清的低糖DMEM终止消化,1 800 r/min离心10 min,离心后分为3层,上层为油脂及未消化完全的脂肪组织,中层为上清液,下层为脂肪干细胞和红细胞等混合细胞的沉淀。弃上层和上层,加入完全培养基(低糖DMEM+体积分数为10%胎牛血清+100 U/mL青霉素+100 U/mL链霉素)重悬细胞沉淀,70 μm细胞筛网过滤,将过滤后的滤液调整细胞浓度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 接种至60 mm培养皿中,于37 °C,体积分数5%CO₂,饱和湿度的条件下培养。24 h后半量换液,48 h后全量换液,以后每2 d换液1次。原代培养7~9 d可生长融合达到90%,用0.25%胰酶(含有0.2%EDTA)常规消化后,1:3传代接种到新的培养皿中持续体外扩增培养。

形态学观察: 倒置显微镜下观察脂肪干细胞的形态学特点。并用Giemsa染色方法观察脂肪干细胞的形态,取第3代生长中期的脂肪干细胞,弃培养基,用PBS洗2遍,加入体积分数为95%乙醇固定5 min,弃固定液,室温下自然风干,将培养皿浸置于Giemsa工作液(1份Giemsa原液:9份PBS)15~20 min,取出培养皿,在清

广州医学院第三附属医院,广东省广州市 510150

田霖★,女,1984年生,湖北省宜昌市人,汉族,广州医学院在读硕士,主要从事干细胞与神经系统疾病研究。
doctor_tian118@yahoo.cn

通讯作者:陈欣洁,博士,主任技师,硕士生导师,广州医学院第三附属医院,广东省广州市 510150

并列通讯作者:黄东健,博士,主任医师,硕士生导师,广州医学院第三附属医院,广东省广州市 510150

中图分类号:R394.2
文献标识码:A
文章编号:2095-4344
(2012)32-05946-07

收稿日期:2012-03-05
修回日期:2012-04-27
(20120305012M·S)

水中反复冲洗, 室温下晾干后, 于倒置显微镜下观察细胞形态。

流式细胞术检测细胞免疫表型: 取第3代脂肪干细胞, 吸去培养基, 0.25%胰酶常规消化, 制成 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 的细胞悬液, 分别取抗人CD44-FITC、CD105-FITC、CD45-PE、CD29-PE、CD90-PE单克隆抗体各5 μL , 加入细胞悬液100 μL , 室温下避光孵育20 min, 同时设立空白同型对照, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 用PBS洗涤2遍, 用200 μL PBS重悬后上机检测, cell Quest软件分析。

染色体核型分析: 分别取生长状态良好第3代和第9代的脂肪干细胞, 观察镜下形态, 待细胞融合达到70%~80%时, 加入0.1 mg/L的秋水仙素, 于培养箱内孵育4 h后。弃培养液, PBS冲洗1遍, 用0.25%胰酶常规消化离心, 加入1%枸橼酸钠溶液重悬制成单细胞悬液, 置于37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴箱孵育5 min, 加入固定液混匀, 1 000 r/min离心5 min, 去上清后再加入固定液(甲醇与冰醋酸按3:1混合), 室温下固定40 min, 1 000 r/min离心5 min, 去上清后加入固定液混匀, 室温下固定20 min, 滴片后置于65 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱过夜, 0.25%胰酶消化后G带显色, Giemsa染色干燥后, 高倍镜下分析20~40个分裂中期细胞染色体核型, 采用Leica染色体分析软件观察结果。

EdU检测细胞增殖能力: 取生长中期的第3代脂肪干细胞, 弃原有培养基, 加入含有10 $\mu\text{mol/L}$ EdU的培养基, 置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为5% CO_2 、饱和湿度的培养箱中孵育4 h。弃培养基, 用PBS漂洗3遍, 加入40 g/L多聚甲醛固定5 min, 加入0.5%Triton X-100透化20 min, 用3%BSA漂洗2遍, 加入按EdU试剂盒(Invitrogen, Click-it® EdU Imaging Kits C10337)配制EdU Click-iT反应体系, 避光孵育30 min, 弃EdU Click-iT反应体系混合液, 用3%BSA漂洗1遍, 加入5 mg/L Hoechst33342染核, 避光孵育30 min。荧光显微镜下观察。

生长曲线绘制及细胞周期分析: 分别选择第3, 6, 9代脂肪干细胞, 制备浓度为 $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的单细胞悬液后, 平均接种于24孔板内, 每孔0.4 mL, 即理论上每孔4 000个细胞, 共36孔。每24 h取3孔细胞, 每孔加入0.25%胰酶常规消化, 制成单细胞悬液, 加入锥虫蓝试剂, 用红细胞计数板进行活细胞计数, 计算3个孔的活细胞平均值, 以时间为横坐标, 活细胞个数为纵坐标绘制脂肪干细胞生长曲线。用公式 $Dt = \Delta t \times \text{Lg}2 / (\text{Lg}N_t - \text{Lg}N_0)$ 计算第3, 6, 9代脂肪干细胞倍增时间(Δt : 细胞在对数生长期的一段时间, N_t : 对数生长期任一点的细胞数观察值, N_0 : 对数生长期细胞数初始值)。

取第3代脂肪干细胞, 制备浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 的单细胞悬液, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 用PBS清洗1遍, 加入2 mL预冷的体积分数为70%乙醇混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜, 1 000 r/min离心5 min, 弃固定液, 用PBS清洗1遍, 加入2 mL PBS重悬细胞, 加入RNA酶50 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h, 加入450 μL PI染液, 避光染色30 min, 上机检测, 用Multicycle软件分析细胞周期。

克隆形成实验: 选取第3代生长良好的脂肪干细胞, 弃去培养液后, 常规胰酶消化, 培养液中和、离心、重悬制成单细胞悬液, 用红细胞计数板进行细胞计数, 加入完全培养基(低糖DMEM+体积分数为10%胎牛血清+1%双抗)进行连续倍数稀释至极低密度: 20个细胞/mL。然后接种在28 cm^2 的培养皿中, 平均每个皿有100个细胞, 每5~7 d换液1次。接种后观察14 d, 直至有克隆形成后, 做Giemsa染色, 肉眼计数克隆个数。

多向分化潜能:

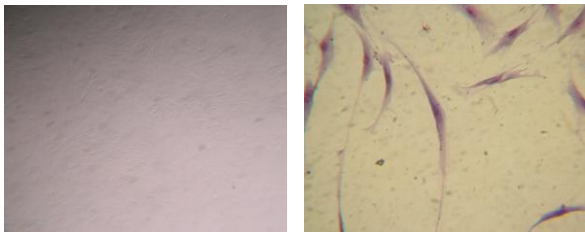
向脂肪细胞诱导分化及鉴定: 取生长状态良好的第3~5代脂肪干细胞, 用0.25%胰酶(含1 mmol EDTA)消化后, 以 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 的浓度接种于6孔板中, 当细胞融合达80%时, 加入成脂诱导培养基(含有低糖DMEM、体积分数为10%胎牛血清、10 mg/L胰岛素、1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松、100 $\mu\text{mol/L}$ 吡啶美辛、500 $\mu\text{mol/L}$ IBMX), 每3 d换液1次, 以未加诱导培养基(仅用完全培养基)的细胞培养孔作为空白对照, 共诱导培养14 d。诱导期间每天用倒置显微镜观察细胞形态的变化并拍照记录。成脂诱导14 d后做油红O染色鉴定, 显微镜下观察并拍照。

向成骨细胞诱导分化及鉴定: 取生长状态良好的第3~5代脂肪干细胞, 用0.25%胰酶(含1 mmol EDTA)消化后, 以 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 的浓度接种于6孔板中, 用完全培养基培养24 h后, 更换为成骨诱导培养基(含有低糖DMEM、体积分数为10%胎牛血清、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松、50 $\mu\text{mol/L}$ 抗坏血酸、10 mmol/L β -甘油磷酸), 每3 d换液1次, 以未加诱导培养基(仅用完全培养基)的细胞培养孔作为空白对照, 共诱导培养28 d。诱导期间每天用倒置显微镜观察细胞形态的变化并拍照记录。取经成骨诱导培养基诱导14, 28 d后的细胞, 进行碱性磷酸酶、茜素红染色, 显微镜下观察染色结果并拍照。

2 结果

2.1 细胞形态学观察 原代接种24 h首次半量换液, 可见细胞贴壁, 呈圆形、多角形或者短梭形, 大小不一, 四五天后细胞进入增殖期, 细胞逐渐伸展呈长梭形, 排

列紧密呈漩涡状生长。原代细胞体外培养至八九天可达到90%融合。0.25%胰酶消化1:2或者1:3传代至15代, 传代后细胞生长速度较原代细胞快, 一般在3~5 d即可达到80%~100%的融合, 细胞形态趋于长梭形, 大小均一, 多角形及圆形细胞少见, 每代细胞之间形态学和增殖速度无明显改变, 见图1a。Giemsa染色可见长梭形的脂肪干细胞形态类似成纤维细胞, 核呈椭圆形、较大, 内含一两个核仁, 核仁深染, 见图1b。



a: Passage 3 hADSCs (x40) b: Passage 3 hADSCs (x100)

Figure 1 Morphology of passage 3 human adipose-derived stem cells (hADSCs)
图1 人脂肪干细胞的细胞形态

2.2 脂肪干细胞的表型特征 流式细胞仪检测第3代脂肪干细胞的免疫表型 CD29(97.76%)、CD44(99.64%)、CD90(99.94%)、CD105(99.83%)均呈阳性表达, 而造血细胞系分子标记物CD45(0.92%)呈阴性表达, 见图2。

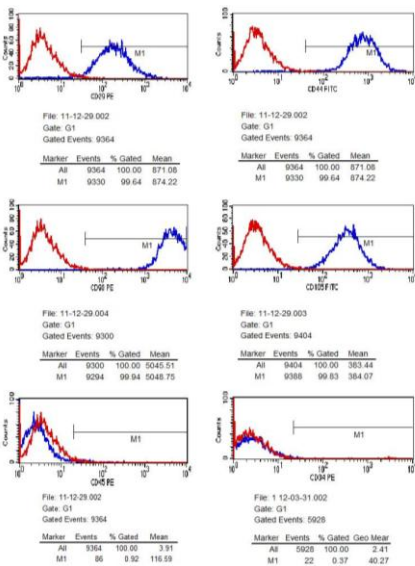


Figure 2 Detection of immunophenotype of passage 3 human adipose-derived stem cells by flow cytometry
图2 流式细胞仪检测第3代人脂肪干细胞的免疫表型

2.3 染色体核型分析 体外分离培养第3代和第20代脂肪干细胞进行染色体核型检测, 其染色体的形态、结

构和数目均未见异常, 均表现为正常女性二倍体染色体结构(46, xx), 见图3。人脂肪干细胞在体外扩增培养至第20代的过程中, 没有出现染色体核型的改变。

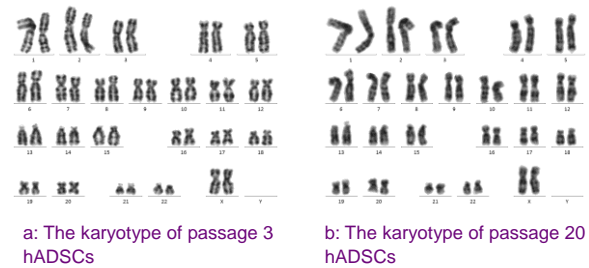
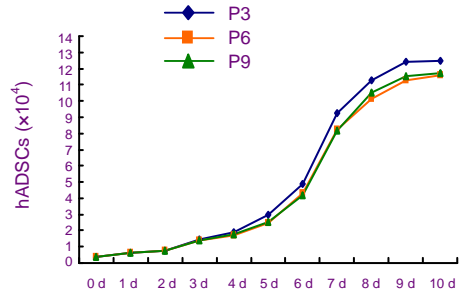
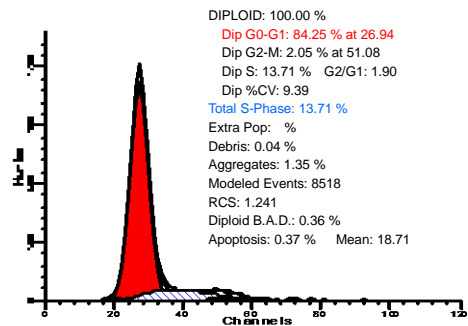


Figure 3 Karyotype analysis of human adipose-derived stem cells (hADSCs)
图3 人脂肪干细胞染色体核型分析

2.4 脂肪干细胞的增殖能力 通过锥虫蓝排除法对第3, 6, 9代脂肪干细胞进行计数, 并绘制生长曲线图, 见图4, 各个代次的生长曲线整体均呈“s”形, 不同代次的生长曲线在最初的3 d生长速度均比较慢, 在第4~8天处于指数生长期, 细胞增殖速度明显增快, 细胞数目增多, 到9或10 d生长进入平台期, 细胞增殖速度下降, 细胞数目无明显增加。第3代脂肪干细胞的倍增时间为37.2 h, 第6代为37.2 h, 第9代为37.2 h。细胞周期检测分析结果表明, 有84.25%的细胞处于G₀/G₁期(静止期), 15.76%细胞处于S+G₂/M期(增殖期), 见图4。



a: Growth curve of passage (P) 3, 6, 9 hADSCs



b: Cell cycle of P3 hADSCs

Figure 4 Growth curves and cell cycle of human adipose-derived stem cells (hADSCs)
图4 人脂肪干细胞的生长曲线及细胞周期

2.5 EdU检测脂肪干细胞增殖活性 第3代脂肪干细胞与EdU Click-iT反应体系共孵育后, 用荧光显微镜观察, EdU掺入正在合成的DNA, 以此来检测脂肪干细胞的增殖活性。在荧光倒置显微镜下可观察到大量的绿色荧光信号, 见图5, 提示有大量新的DNA合成, 同时说明第3代人脂肪干细胞具有较强的增殖活性。

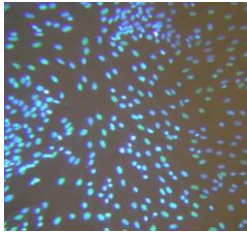
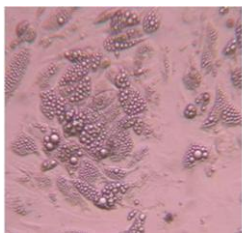


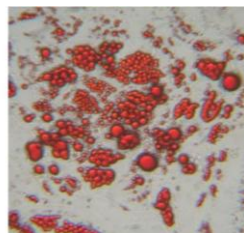
Figure 5 EdU incorporation into passage 3 human adipose-derived stem cells under fluorescent microscope
图5 EdU 掺入第3代人脂肪干细胞后荧光显微镜显像

2.6 克隆形成实验 人脂肪干细胞在极低密度条件下培养, 初始生长缓慢, 生存率明显下降, 48 h后可见细胞贴壁, 呈单细胞分散在培养皿内, 5~7 d换液1次, 第10天时逐渐形成较为明显的克隆, 继续培养, 克隆增大, 培养至第14天, 弃去培养基, 做Giemsa染色观察克隆形态。实验接种了5个6 cm的培养皿, 理论上单细胞个数为500个, 实际上共形成44个克隆, 克隆形成率为8.8%。

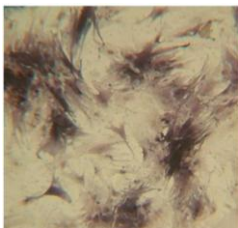
2.7 成脂和成骨诱导分化及鉴定 见图6。



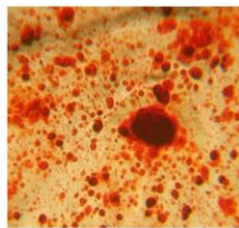
a: Adipogenic induction (x40)



b: Oil red O staining (x100)



c: Alkaline phosphatase staining (x100)



d: Alizarin red staining (x40)

Figure 6 Induced differentiation of human adipose-derived stem cells (hADSCs) into adipocytes and osteoblasts
图6 人脂肪干细胞向脂肪细胞和成骨细胞诱导分化

人脂肪干细胞经成脂诱导培养 4 d时, 可见部分细胞的细胞质中出现透亮的、折光性好的细小颗粒, 颗粒的数量和体积随着成脂诱导时间的延长而增加, 并且互相融合。诱导10 d后, 镜下观察大量的细胞由长梭形变成类圆形及多边形, 细胞浆内有大量透亮的、折光性好的脂滴, 经油红O染色后, 呈现红色, 见图6a, b。

人脂肪干细胞经成骨诱导培养5~7 d时, 可见细胞形态变为多角形或立方形, 细胞呈多层重叠生长。成骨诱导14 d, 碱性磷酸酶染色阳性, 镜下可见细胞胞浆被染成蓝黑色; 继续诱导至28 d时, 做茜素红染色, 可见桔红色钙结节形成, 见图6c, d。

3 讨论

目前, 细胞替代治疗已经成为研究的热点, 如何获得理想的种子细胞来源更是研究的重中之重。近年来许多研究证实了脂肪干细胞与骨髓干细胞的免疫表型及生物学特性均极为相似^[9-11], 但是相较于骨髓干细胞而言, 来源于脂肪组织的人脂肪干细胞具有来源充足, 取材方便, 含量丰富的优势, 从人脂肪组织中分离和培养出的脂肪干细胞, 具有自我更新能力及多向分化潜能, 包括向脂肪细胞、软骨细胞、成骨细胞、心肌细胞、内皮细胞、胰腺细胞、神经细胞、上皮细胞等方向分化的潜能^[12-20]。Yoshimura等^[21]研究表明行抽脂术所获取的脂肪中至少有10%是人脂肪干细胞, 并且其具有与骨髓干细胞相似的干细胞特性, 是继骨髓干细胞后在成体干细胞中具有重大发展潜力的一类干细胞。因此, 随着研究的深入, 作为人体组织工程潜在的最大的成体干细胞库——人脂肪干细胞将成为细胞治疗中理想的细胞来源。

本实验采用 I 型胶原酶消化法从人腹部皮下脂肪组织中成功分离出人脂肪干细胞, 分离获得的人脂肪干细胞贴壁生长, 细胞形态呈长梭形, 类似成纤维细胞, 排列紧密呈漩涡状生长。由于红细胞不贴壁生长的特性, 实验中通过更换培养液逐步去除红细胞, 从而避免了使用NH₄Cl对脂肪干细胞的损伤。Stolzing等^[22]和Kim等^[23]研究表明低浓度葡萄糖能减少干细胞凋亡, 促进干细胞增殖; 而高浓度葡萄糖培养基会加快干细胞的衰老, 抑制其增殖和分化的能力。本实验采用低糖培养基培养人脂肪干细胞, 并进行体外扩增传代纯化, 结果表明人脂肪干细胞在体外培养具有较强的增殖能力, 连续传代10代, 无明显老化现象。通过比较第3, 6, 9代人脂肪干细胞的生长曲线及倍增时间, 发现随着传代次数

的增加, 10代以内的人脂肪干细胞群体倍增时间并无明显延长改变。

人脂肪干细胞具有自我更新及多向分化的干细胞特性, 理论上是用于干细胞治疗理想的选择, 但是在实际的临床应用中人脂肪干细胞的安全性是至关重要的。在体外传代的过程中, 人脂肪干细胞能否保持稳定的二倍体结构, 国内外的许多学者对这一问题的研究得出不相同的结果。2004年Houghton等^[24]报道骨髓干细胞移植导致胃癌这一恶性肿瘤的发生。Bochkov等研究证明, 在人脂肪干细胞传代培养的过程中, 有部分染色体出现单体或者异位, 其发生率波动在1.50%~5.95%。张卫泽等^[25]研究发现人脂肪干细胞在连续传代至25代时会出现染色体断裂、畸变、呈现非二倍体核型。同时也有研究发现脂肪干细胞体外传代培养后并未出现染色体核型的改变, 证实了人脂肪干细胞的遗传稳定性^[26]。本实验同时取体外培养的第3代和第20代人脂肪干细胞做了染色体核型检测, 结果表明均为46, XX的正常女性染色体核型, 这与Yang等^[26]的研究结果是一致的, 证实了人脂肪干细胞在体外培养至第20代的过程中能够维持稳定的二倍体结构, 为后续的体内移植提供了安全保障。人脂肪干细胞在体外培养过程中能否保持稳定的二倍体结构, 这与细胞培养环境的稳定性有一定的关系, 但是目前尚未有相关研究报道, 今后可做进一步研究和深入探讨。

就现有的研究结果而言, 尚未发现人脂肪干细胞的特异性表面分子标记物, 目前通常采用多种相对特异的表面抗原联合检测来对其进行鉴定。本实验通过流式细胞术检测体外培养的第3代人脂肪干细胞, 结果显示: 高表达CD29, CD44, CD90, CD105, 几乎不表达CD34, CD45, 这与De Ugarte等^[27]的研究结果基本相同。CD29是识别整合素亚单位的蛋白, 广泛存在于除了红细胞外的各种组织及细胞中。CD44是目前所发现的成体干细胞最广泛表达的标志物, 分布于胞膜和胞浆^[28], CD44阳性表达可以进一步证明干细胞的身份。CD90和CD105为间充质干细胞的特异性表型。CD34和CD45是造血细胞系分子标志物。本实验经流式细胞术检测CD29⁺CD44⁺CD90⁺CD105⁺, 并且阳性率均高达97.5%以上, CD34⁻和CD45⁻, 其结果表明本实验分离培养所获得的细胞为人脂肪干细胞, 且细胞纯度较高。

干细胞与终末分化细胞的不同之处不仅在于细胞表面标志物表达情况的不同, 更重要的是干细胞具有多向分化的能力, 流式细胞仪检测细胞免疫表型的结果对确认人脂肪干细胞有辅助作用, 但是由于目前研究尚未

发现人脂肪干细胞的特异性表面标记物, 因此鉴定人脂肪干细胞还必须进行多向诱导分化及检测。本实验对第3~5代的人脂肪干细胞进行了成脂和成骨诱导分化。人脂肪干细胞在成脂诱导的过程中细胞形态由长梭形变成类圆形, 胞浆中出现透亮的脂滴, 经油红O染色可被染成红色, 证明了胞浆中有脂质沉积, 同时间接证明了人脂肪干细胞具有成脂分化的能力。在成骨诱导分化中, 碱性磷酸酶的形成是成骨分化的早期标志, 而钙沉积是成骨细胞具有分泌功能的指标, 可作为成骨细胞成熟的标志。本实验中人脂肪干细胞成骨诱导分化2周后, 碱性磷酸酶表达强阳性, 4周后, 茜素红染色可见明显钙结节形成, 证明了人脂肪干细胞在一定的条件下可诱导分化为成骨细胞。

综上所述, 通过简便的方法在人脂肪组织中高效、稳定地获得大量较高纯度的人脂肪干细胞, 对人脂肪干细胞的形态学特征及生物学特性进行系统研究, 为今后人脂肪干细胞的诱导分化及体内研究奠定基础。

致谢: 感谢广州医学院第三附属医院产科提供正常产妇产来源的腹壁皮下脂肪; 感谢广州医学院第三附属医院广东省产科重大疾病重点实验室提供实验条件的支持。

4 参考文献

- [1] Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005; 105(4):1815-1822.
- [2] Liao W, Zhong J, Yu J, et al. Therapeutic benefit of human umbilical cord derived mesenchymal stromal cells in intracerebral hemorrhage rat: implications of anti-inflammation and angiogenesis. *Cell Physiol Biochem*. 2009;24(3-4):307-316.
- [3] Wu KH, Zhou B, Yu CT, et al. Therapeutic potential of human umbilical cord derived stem cells in a rat myocardial infarction model. *Ann Thorac Surg*. 2007;83(4):1491-1498.
- [4] Singec I, Jandial R, Crain A, et al. The leading edge of stem cell therapeutics. *Annu Rev Med*. 2007;58:313-328.
- [5] Lu LL, Liu YJ, Yang SG, et al. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica*. 2006;91(8):1017-1026.
- [6] Gonzalez-Rey E, Anderson P, González MA, et al. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut*. 2009;58(7):929-939.
- [7] Lee JW, Gupta N, Serikov V, et al. Potential application of mesenchymal stem cells in acute lung injury. *Expert Opin Biol Ther*. 2009;9(10):1259-1270.
- [8] 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.

- [9] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13(12): 4279-4295.
- [10] Bunnell BA, Flaata M, Gagliardi C, et al. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*. 2008; 45(2):115-120.
- [11] Yang XF, He X, He J, et al. High efficient isolation and systematic identification of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci*. 2011;18:59.
- [12] Sen A, Lea-Currie YR, Sujkowska D, et al. Adipogenic potential of human adipose derived stromal cells from multiple donors is heterogeneous. *J Cell Biochem*. 2001;81(2): 312-319.
- [13] Huang JI, Zuk PA, Jones NF, et al. Chondrogenic potential of multipotential cells from human adipose tissue. *Plast Reconstr Surg*. 2004;113(2):585-594.
- [14] Awad HA, Wickham MQ, Leddy HA, et al. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials*. 2004;25(16): 3211-3222.
- [15] Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, et al. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol*. 2004;22(5):560-567.
- [16] Choi YS, Dusting GJ, Stubbs S, et al. Differentiation of human adipose-derived stem cells into beating cardiomyocytes. *J Cell Mol Med*. 2010;14(4):878-889.
- [17] Colazzo F, Chester AH, Taylor PM, et al. Induction of mesenchymal to endothelial transformation of adipose-derived stem cells. *J Heart Valve Dis*. 2010;19(6): 736-744.
- [18] Lee J, Han DJ, Kim SC. In vitro differentiation of human adipose tissue-derived stem cells into cells with pancreatic phenotype by regenerating pancreas extract. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;375(4):547-551.
- [19] Safford KM, Safford SD, Gimble JM, et al. Characterization of neuronal/glia differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells. *Exp Neurol*. 2004;187(2):319-328.
- [20] Long JL, Zuk P, Berke GS, et al. Epithelial differentiation of adipose-derived stem cells for laryngeal tissue engineering. *Laryngoscope*. 2010;120(1):125-131.
- [21] Yoshimura K, Suga H, Eto H. Adipose-derived stem/progenitor cells: roles in adipose tissue remodeling and potential use for soft tissue augmentation. *Regen Med*. 2009; 4(2):265-273.
- [22] Stolzing A, Coleman N, Scutt A. Glucose-induced replicative senescence in mesenchymal stem cells. *Rejuvenation Res*. 2006;9(1):31-35.
- [23] Kim YJ, Hwang SH, Lee SY, et al. miR-486-5p Induces Replicative Senescence of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells and Its Expression Is Controlled by High Glucose. *Stem Cells Dev*. 2011. [Epub ahead of print]
- [24] Houghton J, Stoicov C, Nomura S, et al. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science*. 2004; 306(5701):1568-1571.
- [25] Zhang WZ, Li GQ, Chen YQ, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2009;13(40): 7833-7837. 张卫泽, 李国庆, 陈永清, 等. 人脂肪间充质干细胞的分离培养及其遗传稳定性[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(40): 7833-7837.
- [26] Yang XF, He X, He J, et al. High efficient isolation and systematic identification of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci*. 2011;18:59.
- [27] De Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA, et al. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol Lett*. 2003;89(2-3):267-270.
- [28] Schieker M, Pautke C, Haasters F, et al. Human mesenchymal stem cells at the single-cell level: simultaneous seven-colour immunofluorescence. *J Anat*. 2007;210(5):592-599.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 2011年广东省重大科技专项“广东转化医学公共平台”, 项目编号: 2011A080300002.

作者贡献: 实验设计为第一、五作者, 实验实施为第一作者, 实验评估为全部作者, 资料收集为第一、五作者。第一作者成文, 第二作者校审, 第一、二作者对文章负责。

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。

伦理要求: 脂肪组织供者在充分了解实验方法的前提下自愿签署“知情同意书”, 本实验方法获广州医学院第三附属医院伦理委员会批准。

研究的创新之处: 实验中成功运用I型胶原酶消化法从正常产妇产腹壁皮下脂肪组织中高效、稳定地获得大量较高纯度的脂肪干细胞, 此分离及体外培养的方法克服了其他方法导致的细胞获取率不高、活力低下、易自发分化、细胞纯度低等缺点。