

人髌下脂肪垫来源脂肪间充质干细胞的分离、培养及鉴定

刘玉平¹, 刘涛¹, 王明明¹, 李明¹, 俞光荣²(¹滕州市中心人民医院创伤骨科, 山东省滕州市 277500; ²同济大学附属同济医院足踝外科, 上海市 200065)

文章亮点:

1 髌下脂肪垫在膝关节镜手术过程中经常为了术中视野清晰要部分切除, 文章通过收集手术过程中的髌下脂肪垫并提取其中的脂肪间充质干细胞, 以期为解决脂肪间充质干细胞的来源提供一条新的途径。

2 实验描述了髌下脂肪垫来源的脂肪间充质干细胞分离及提取等细胞培养过程, 并且通过诱导成骨及成软骨实验证明了该来源脂肪间充质干细胞的“干”性。表明了髌下脂肪垫来源的间充质干细胞的在基础实验中可以作为一种可靠来源。

关键词:

干细胞; 脂肪干细胞; 脂肪间充质干细胞; 细胞培养; 种子细胞; 表面抗原

主题词:

干细胞; 间质干细胞; 细胞培养技术; 抗原, 表面; 组织工程

摘要

背景: 髌下脂肪垫在膝关节手术中经常要部分切除, 其可以作为脂肪间充质干细胞的重要来源。

目的: 探讨自髌下脂肪垫中分离、培养脂肪间充质干细胞的策略及细胞分子表面标记情况。

方法: 髌下脂肪垫组织取自膝关节镜手术的患者, 以 I 型胶原酶消化消化脂肪组织获取干细胞, 用 10% 低糖 DMEM 培养基培养, 利用 MTT 法测定不同代细胞增殖情况并绘制生长曲线。检测第 5 代细胞表面 CD29 及 CD44 的表达。

结果与结论: 培养 24 h 后可见原代细胞贴壁, 1 周后细胞呈纺锤型并且增殖速度加快, 传代后的细胞贴壁及增殖细胞速度加快。生长曲线示第 2 及第 5 代的细胞增殖能力明显较第 8 代能力强。所取细胞能够分化为骨细胞和脂肪细胞。流式细胞仪检测结果显示第 5 代脂肪间充质干细胞重 96.8% 表达 CD29, 97.6% 表达 CD44。提示自髌下脂肪垫分离及提取脂肪干细胞简单易行, 所得细胞的纯度及增殖能力均符合组织工程种子细胞的基本条件。

刘玉平, 刘涛, 王明明, 李明, 俞光荣. 人髌下脂肪垫来源脂肪间充质干细胞的分离、培养及鉴定[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(41): 6566-6571.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.41.002

Human adipose-derived mesenchymal stem cells from the infrapatellar fat pad: isolation, culture and identification

Liu Yu-ping¹, Liu Tao¹, Wang Ming-ming¹, Li Ming¹, Yu Guang-rong² (¹Department of Traumatic Orthopedics, Tengzhou Central People's Hospital, Tengzhou 277500, Shandong Province, China; ²Department of Ankle Surgery, Tongji Hospital of Tongji University, Shanghai 200065, China)

Abstract

BACKGROUND: Infrapatellar fat pad is often partially resected in the knee surgery, which can be used as an important source of adipose-derived mesenchymal stem cells.

OBJECTIVE: To explore the strategies of isolation, culture, and identification of adipose-derived mesenchymal stem cells from the infrapatellar fat pad and to detect the expression of cell surface markers of human adipose-derived stem cells.

METHODS: Infrapatellar fat pad was obtained from patients undergoing knee arthroscopy surgery, and attached cells were obtained from adipose tissue by using collagenase I. Cells were cultured in 10% low-sugar DMEM. Stem cells proliferation was detected by means of MTT and then, cell growth curve was made. The obtained cells were induced and differentiated into adipocytes and osteocytes. Expressions of cell surface markers CD29 and CD44 were detected.

RESULTS AND CONCLUSION: A few of attached cells were observed after cultured 24 hours. Cells proliferated faster and exhibited spindle shape after 1 week. Cell adherence and proliferation were speeded up after subculture. Growth curve of cells exhibited that the passages 5 and 2 cells had higher reproductive activity than passage 8 cells. The obtained cells can be induced and differentiated into adipocytes and osteocytes. Results from flow cytometry showed that 96.8% passage 5 cells expressed CD29 and 97.6% expressed CD44. These findings indicate that high-purity adipose-derived mesenchymal stem cells with high reproductive ability are easy to be isolated from the infrapatellar fat pad, which may be a kind of ideal seed cells for cartilage tissue engineering.

刘玉平, 男, 1975 年生, 山东省临沂市人, 博士, 主治医师, 讲师, 主要从事软骨组织工程以及人工关节无菌性松动的机制研究。

通讯作者: 俞光荣, 教授, 博士生导师, 上海同济大学附属同济医院足踝外科, 上海市 200065

中图分类号: R394.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-4344

(2015)41-06566-06

稿件接受: 2015-09-06

http://www.crter.org

Liu Yu-ping, M.D., Attending physician, Lecturer, Department of Traumatic Orthopedics, Tengzhou Central People's Hospital, Tengzhou 277500, Shandong Province, China

Corresponding author: Yu Guang-rong, Professor, Doctoral supervisor, Department of Ankle Surgery, Tongji Hospital of Tongji University, Shanghai 200065, China

Accepted: 2015-09-06

Subject headings: Stem Cells; Mesenchymal Stem Cells; Cell Culture Techniques; Antigens, Surface; Tissue Engineering

Liu YP, Liu T, Wang MM, Li M, Yu GR. Human adipose-derived mesenchymal stem cells from the infrapatellar fat pad: isolation, culture and identification. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2015;19(41): 6566-6571.

0 引言 Introduction

临床上由于创伤、退变等原因导致的软骨损伤非常常见, 如何使损伤软骨修复并从而进一步改善关节功能是目前骨科研究的重点^[1]。

目前有多种方法被科研人员用作治疗软骨损伤或缺损的修复, 例如关节灌洗和清理术、射频软骨成形术、软骨下骨钻孔术以及微骨折术: 其目的是动员骨髓或其他组织与软骨细胞联系。但是这些技术往往受软骨损伤程度的影响, 往往导致软骨组织进一步损害。实验证明, 自体软骨细胞移植治疗软骨缺损的一项确切的技术但是由于体内软骨以及软骨细胞的来源较少, 而且容易发生供区的损伤导致新的软骨损伤发生, 因此自体软骨的移植在临床应用非常受限。异体软骨或软骨细胞较易获得, 但是容易导致传染性疾

组织工程学的发展为损伤或缺损的的软骨修复提供了新的途径。修复受损软骨的组织工程学的研究被广泛开展。种子细胞是软骨组织工程的三大要素之一。自脂肪间充质干细胞被发现以来, 因其增殖能力强, 供区损伤小, 而且容易获取以及来源广泛的特点使其成为组织工程软骨种子细胞研究的热点。

在临床过程中发现在行关节镜过程中切削的髌下脂肪垫可以获得质量较好的脂肪组织, 而且对于患者身体没有特殊的损害。髌下脂肪垫的获取简易且可行, 实验自人髌下脂肪垫提取脂肪间充质干细胞, 探讨其培养方法, 观察其生长特性, 鉴定细胞分子表面标记并诱导分化。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学观察实验。

1.2 时间及地点 于2008年12月至2010年12月在同济大学医学院干细胞实验室完成。

1.3 材料

人髌下脂肪垫来源脂肪干细胞培养实验所用的仪器与材料:

仪器与材料	来源
倒置相差显微镜	AMG公司
恒温二氧化碳培养箱	Thermo公司
流式细胞仪	Becton Dickenson公司
DMEM低糖培养基	Hyclone公司
PBS	Gibco公司
MTT细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒	武汉博士德生物工程公司
鼠抗人CD29, CD44单克隆抗体	BI00公司
固红染料、油红染料	Sigma公司

本实验脂肪组织来自于上海同济大学附属同济医院行膝关节镜手术的男性患者的髌下脂肪垫, 共8例, 年龄19~53岁, 均告知实验方案并签署知情同意书。既往有类风湿性关节炎、骨关节炎以及其他膝关节退变性或者炎性病变的患者均排除。该研究已获得同济大学附属同济医院医学伦理委员会批准。

1.4 实验方法

脂肪间充质干细胞的分离与培养: 自行膝关节镜手术的患者获取约10 g的脂肪组织, 去除血管和致密结缔组织, 短时间内剪碎至糊状, 0.075% I 型胶原酶约3倍体积加入, 经2 h消化后, 等量的低糖DMEM培养基(含体积分数10%新生牛血清)终止消化, 未消化完全脂肪组织及结缔组织用100目滤网过滤, 将滤过液离心后弃上清, 用裂解液裂解10 min, 低糖DMEM(含100 mg/L的体积分数10%的新生牛血清, 链霉素为50 mg/L)重悬沉淀细胞移入培养瓶, 置于细胞培养箱中培养, 隔两至三天换液1次, 倒置相差显微镜下观察细胞的形态及增殖情况。

脂肪间充质干细胞的传代培养: 镜下观察待细胞铺满80%瓶底时, 吸除培养液后用PBS洗涤2次, 用适量0.25%胰蛋白酶浸润, 镜下见细胞间出现间隙时且胞质回缩, 加入含低糖DMEM终止消化, 以吸管轻轻吹打瓶底, 确认细胞自瓶底完全脱落后, 按1:2进行传代, 置于细胞培养箱中培养, 一般3 d换液1次, 镜下观察细胞形态及增殖状况。

脂肪间充质干细胞生长曲线绘制: 取第2, 5, 8代脂肪间充质干细胞, 用低糖DMEM重悬, 细胞计数板计数, 以每孔200 μ L, 以约 $6 \times 10^6 \text{ L}^{-1}$ 细胞浓度接种于96孔板内, 置于37 $^{\circ}\text{C}$, 体积分数5%CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中培养。于每日定时随机抽取6孔并加入5%MTT 20 μ L/孔, 进行4 h培养后, 培养板液体吸出, 加150 μ L DMSO/孔, 10 min震荡后, 测定490 nm处的吸光度(A), 取6孔A的均值, 以A为纵坐标, 时间(d)为横坐标绘制生长曲线。

脂肪间充质干细胞成脂肪细胞诱导: 取第3代脂肪间充质干细胞, DMEM培养液培养3 d, 待细胞爬片贴服50%后, 加入成脂肪细胞诱导液。成分为1 μ mol/L地塞米松、10 μ mol/L胰岛素、200 μ mol/L吡啶美辛及0.5 mmol/L IBMX加入DMEM基础培养液。成脂诱导10 d, 镜下观察细胞形态。

油红O染色: 成脂诱导10 d的脂肪间充质干细胞用100 g/L多聚甲醛在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下固定1 h, 70%异丙醇进行清洗, 室温下加入2%油红染色5~10 min, 然后洗去多余染料并用PBS冲洗, 镜下观察细胞内是否脂滴形成。

脂肪间充质干细胞成骨诱导: 取第3代脂肪间充质干细胞, DMEM培养液培养3 d, 待细胞爬片贴服50%后, 用成骨诱导液诱导, 成分为10 nmol/L VitD₃、37.5 mg/L VitC

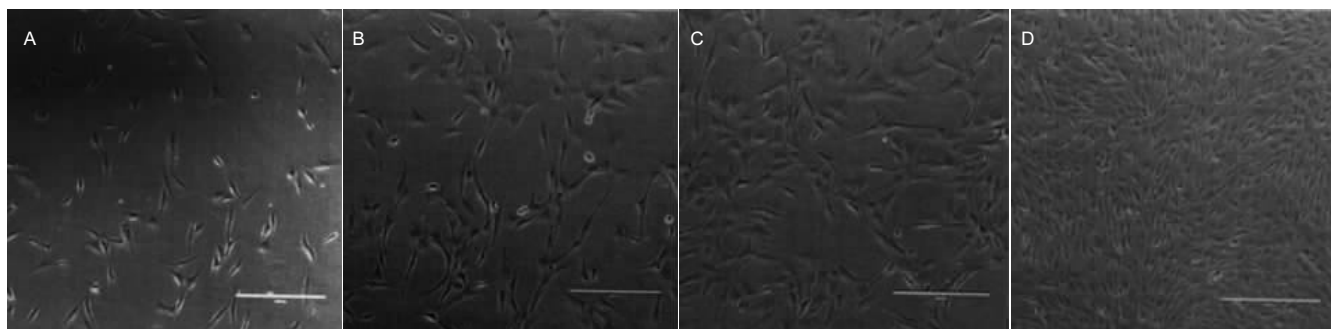


图1 人脂肪间充质干细胞的形态及生长特征

Figure 1 Morphology and growth characteristics of human adipose-derived mesenchymal stem cells

图注: 图A为原代脂肪间充质干细胞培养48 h后的细胞形态($\times 400$); B为原代脂肪间充质干细胞培养1周后的细胞形态($\times 400$); C为传代脂肪间充质干细胞培养5 d后的形态($\times 400$); D为传代脂肪间充质干细胞培养10 d后的形态($\times 100$)。传代后的脂肪间充质干细胞增殖较原代生长迅速。

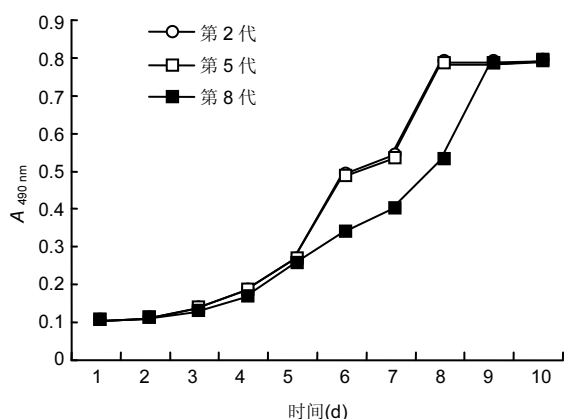
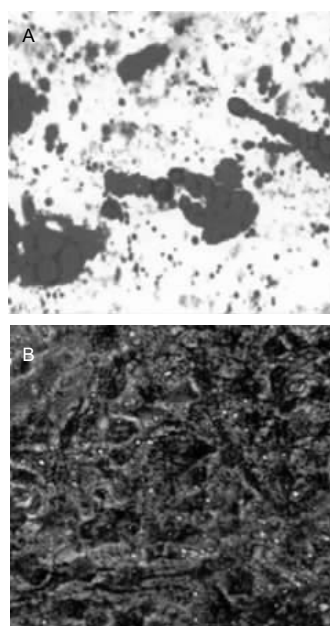


图2 脂肪间充质干细胞的生长动力学曲线

Figure 2 Growth curves of adipose-derived mesenchymal stem cells

图注: 第2代与第5代脂肪间充质干细胞增殖能力差别不大, 一般有2 d左右的潜伏期, 六至七天后进入平台期。第8代细胞的增殖能力较前代降低, 需4 d左右的潜伏期后才进入对数生长期, 一般在八至九天进入平台期。

图3 人脂肪间充质干细胞诱导成脂及成骨分化($\times 400$)Figure 3 Human adipose-derived mesenchymal stem cells were induced to differentiate into adipocytes and osteoblasts ($\times 400$)

图注: 图A为油红O染色证实脂肪干细胞诱导分化成脂肪细胞; B为碱性磷酸酶染色证实脂肪干细胞诱导成骨分化。

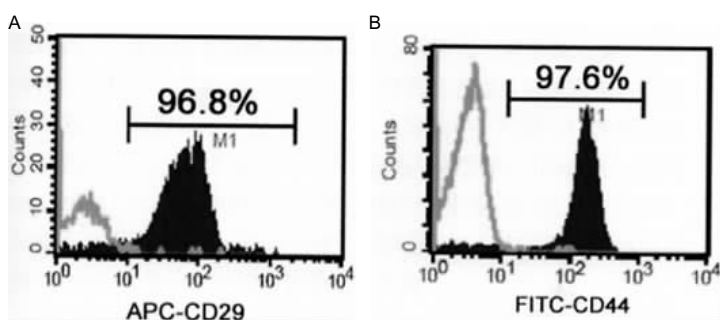


图4 人脂肪间充质干细胞表面抗原的表达

Figure 4 Surface antigen expression of human adipose-derived mesenchymal stem cells

图注: 流式细胞仪示96.8%的脂肪干细胞表达CD29(图A), 97.6%的脂肪干细胞表达CD44(图B)。

和2.16 g/L β -磷酸甘油加入到DMEM基础培养液。成骨诱导14 d, 镜下观察细胞形态并检测。

碱性磷酸酶染色: 首先配置碱性磷酸酶染色液, 用固红25 mg, α -磷酸萘酚钠5 mg, 10%氯化镁0.3 mL, 硼砂盐酸缓冲液5 mL。去离子水44.6 mL配液50 mL。注意一定要现用现配。取成骨诱导14 d的脂肪间充质干细胞, 蒸馏水冲洗, 体积分数10%甲醇甲醛固定液固定30 s, 蒸馏水冲洗30-60 s, 后加入配置的碱性磷酸酶染色液37 $^{\circ}\text{C}$ 温育10 min, 蒸馏水冲洗2 min。加苏木精染色液复染5-8 min,

蒸馏水冲洗, 中性树胶封固, 倒置相差显微镜镜下观察。

流式细胞仪检测细胞表面抗原: 获取第5代细胞, 离心10 min(1 000 r/min)将细胞重悬, 将细胞浓度调整至 $1 \times 10^6 \text{ L}^{-1}$, 进行分装并滴加饱和浓度的抗CD29, CD44鼠抗人单克隆抗体, 在室温下反应30 min, 进行2次洗涤, 滴加FITC标记及APC标记二抗并反应30 min, 再次重悬细胞, 最后行流式细胞仪分析。

1.5 主要观察指标 倒置显微镜观察脂肪间充质干细胞的形态、增殖情况并绘制出生长曲线, 通过诱导成骨及成

脂来证实其多能性, 并通过检测其细胞分子表面标记来进一步证实。

2 结果 Results

2.1 人脂肪间充质干细胞的形态及生长特征 原代脂肪间充质干细胞刚接种于培养瓶后可见较多悬浮的脂滴及类圆形细胞, 贴壁细胞在24 h候可见少量, 较多的短梭形或多角形的贴壁细胞在48 h后可见, 少量细胞呈长梭形 (图1A); 1周后细胞增殖迅速, 细胞形态多呈长梭形或者棒形类似成纤维细胞样(图1B); 约14 d后细胞能铺满瓶底。传代后4 h左右即可见少量细胞贴壁, 细胞生长速度较原代明显增快, 培养5 d后即开始聚集成簇(图1C), 增殖细胞形态呈长梭形, 一般在10 d左右即可铺满培养瓶底(图1D)。一般传到第4代的时候后细胞大多呈长梭形, 呈具有一定方向的呈漩涡状生长。自8代以后细胞增殖减缓, 经常会发现脱落的悬浮细胞。

2.2 脂肪间充质干细胞的生长动力学分析 根据生长曲线图可见, 第2代与第5代脂肪间充质干细胞增殖能力差别不大, 一般有2 d左右的潜伏期, 随即进入对数生长期, 六至七天后进入平台期。第8代细胞的增殖能力较前代降低, 需4 d左右的潜伏期后才进入对数生长期, 一般在八至九天进入平台期(图2)。

2.3 脂肪间充质干细胞成脂诱导分化 经成脂诱导后细胞增殖明显减慢或停止增殖, 细胞形态由长梭形扁圆形或椭圆形, 倒置相差显微镜观察可见, 诱导五至六天后细胞内出现圆形脂滴并逐渐增多增大, 经大约12 d诱导后, 脂滴可在大多数细胞内发现。油红O染色可证实(图3A)。

2.4 脂肪间充质干细胞成骨诱导分化 经成骨诱导四至五天后, 倒置相差显微镜观察。细胞的形态由梭形向椭圆形发展, 长轴缩短, 细胞体积增加, 细胞核增大变圆, 细胞膜周围伪足伸展有时呈多个, 钙盐沉积及钙结节在细胞胞质内被发现。钙盐沉积随诱导时间延长而增加。倒置相差显微镜观察, 成骨诱导12 d, 碱性磷酸酶染色图片中提示细胞内有大量紫黑色颗粒(图3B)。

2.5 人脂肪间充质干细胞表面抗原的表达 流式细胞仪检测第5代脂肪间充质干细胞, 发现CD29及CD44均有超过95%的细胞表达(图4), 表明分离培养的第5代脂肪间充质干细胞表型较为均一, 符合间充质干细胞的表型特点。

3 讨论 Discussion

关节软骨损伤或缺损的修复因为软骨的自我修复能力较差一直是困扰着医学界, 从而成为目前骨科基础研究的重点方向。组织工程学为完全修复受损软骨提供了一条新的出路。种子细胞是目前组织工程学的三大要素之一, 如何取得合适的种子细胞是当前软骨组织工程的一个重点研究方向。

自从2001年Zuk等^[9]报道从脂肪组织获得脂肪间充质干细胞以来, 脂肪间充质干细胞已经被证实在可以诱导分化成多种细胞表型^[4-6]。自体脂肪组织具有来源广泛、取材

方便、供区损伤小、免疫原性低、增殖迅速, 且长期传代后细胞表型比较稳定等优点。上述特点使得脂肪间充质干细胞可被用作软组织工程细胞。同Zuk等实验采用的液态脂肪不同, 本实验中采用的是髌下脂肪垫, 作者发现通过手工剪碎的脂肪组织 I 型胶原酶的消化时间要比Zuk等研究的30 min要长的多, 一般在1 h左右。并且用滤网过滤, 否则将不能获得贴壁的间充质干细胞。作者认为主要原因是在抽脂过程中, 脂肪细胞比固体皮下脂肪组织要碎的多, 消化起来比较容易, 而且抽脂里面的脂肪组织中间的纤维结缔组织也被很好的粉碎。因为作者培养脂肪间充质干细胞用的是贴壁培养方法, 同时发现在离心过程中, 纤维结缔组织也和脂肪干细胞一样在离心管底沉淀。I 型胶原酶并不能完整消化脂肪中的纤维结缔组织, 所以用100目的滤网过滤出纤维结缔组织, 可以减少纤维结缔组织附着于培养瓶底, 使脂肪间充质干细胞贴服于培养瓶底而获得较多的数量的脂肪间充质干细胞。同Zuk的研究相似, 作者在实验中也发现脂肪间充质干细胞具有强大的自我更新能力及增殖能力, 通过第5代脂肪间充质干细胞的生长曲线图发现, 一般有2 d左右的潜伏期, 随即进入对数生长期, 六至七天后进入平台期。而第8代细胞的增殖能力较前代降低, 需4 d左右的潜伏期后才进入对数生长期, 一般在八至九天进入平台期。对于脂肪间充质干细胞的培养过程中是否使用氯化铵细胞裂解液的问题, 研究者对这个问题没有达成一致, 主要原因是红细胞裂解液对脂肪间充质干细胞的损伤以及红细胞是否会影响脂肪间充质干细胞贴壁的问题。作者认为是否应用细胞裂解液主要应该看脂肪来源的问题, 如果脂肪组织来源处的血管较多, 例如腹部的大网膜组织, 即使仔细的剔除了血管组织, 离心沉淀并加入培养基以后, 培养基中也会有大量的红细胞, 这些红细胞会沉积在培养皿底部, 势必会影响将来脂肪间充质干细胞的贴壁生长, 从而减少脂肪间充质干细胞的数量。作者认为, 在细胞培养过程中, 在间充质干细胞离心沉淀前, 可以加少量红细胞裂解液对胶原酶消化后的脂肪组织进行红细胞裂解, 但是时间可以减短些。进行干细胞培养的过程中, 不必一至两天就提前换液, 可以延长至3 d, 从而增加干细胞贴壁的数量。

如何保持脂肪间充质干细胞的所谓“干性”, 也即脂肪间充质干细胞在经多次传代后细胞的增殖速度不减慢, 并且保持定向分化能力也是目前干细胞研究的一个热点方向。Lin等^[7]通过应用低钙干细胞培养基中加入N-乙酰-L-半胱氨酸以及维生素C后发现, 在这种培养基生长的脂肪间充质干细胞增殖速度明显加快而且脂肪肝细胞的生长周期也明显加强, 而且更容易诱导分化。大量的研究证实表皮细胞生长因子和碱性成纤维细胞生长因子在脂肪间充质干细胞诱导分化以及增殖方面发挥着重要作用^[8-10], 表皮细胞生长因子能够保持骨髓干细胞的增殖和迁徙能力同时还能保证干细胞的分化潜能。另外碱性成纤维细胞生长因子被发现认为是细胞分裂以及外和研究发现脂肪间充质干细

胞可以自分泌成纤维细胞生长因子2, 并认为其作为有丝分裂素以及化学诱导物能够显著提高脂肪间充质干细胞的成血管、迁徙以及脂肪细胞发育分化^[11-13]。研究通过抑制碱性成纤维细胞生长因子受体信号通路发现并证实了脂肪间充质干细胞可以自分泌碱性成纤维细胞生长因子。这被认为是脂肪间充质干细胞保持强烈自我更新能力的原因之一。另外Rider等^[14]还发现抑制内源性的碱性成纤维细胞生长因子能够降低脂肪间充质干细胞的分化率。另外实验证实, 在缺乏碱性成纤维细胞生长因子的成骨诱导培养基能抑制鼠类脂肪间充质干细胞细胞外基质的矿化以及碱性磷酸酶的活性^[15], 因此, 碱性成纤维细胞生长因子在细胞的自我更新以及增殖性能以及维持脂肪间充质干细胞的多向分化分化潜能中是很重要的。另外研究者发现外源性的端粒酶基因导入脂肪间充质干细胞可使转染细胞增殖能力加强并长时间维持这种能力^[16]。

目前学者们认为间充质干细胞必须具备4个条件才能称为干细胞^[17]: 第一, 间充质干细胞在标准培养条件下应该具有黏附贴壁性以及形态可变性; 第二, 间充质干细胞必须能够向成脂肪, 成软骨以及成骨分化; 第三, 间充质干细胞不能够表达造血细胞系的分子表面标记 c-kit, CD14, CD11b, CD34, CD45, CD19, CD79和人白细胞抗原(HLA)-DR, 此用以区别造血干细胞和间充质干细胞; 第四, 间充质干细胞必须能够表达相关表面标记CD29, CD44, CD73, CD90和CD105。但是截止目前的研究尚未发现脂肪间充质干细胞有特异性的表面标志。研究表明脂肪间充质干细胞和骨髓间充质干细胞表达表面标志相似, 但也各有不同的表面标志表达。但是由于研究者提取脂肪间充质干细胞或者骨髓间充质干细胞的部位不同, 而且比较的传代细胞是有差异的, 所以出现了研究者的结果不一致。Schaffler等^[18]综述分析了2007年以前的关于脂肪间充质干细胞分子表面标记的文章后发现, 脂肪间充质干细胞表面标记阳性表达CD9, CD10等15种细胞表面标志。De Ugarte等^[19]使用流式细胞仪检测比骨髓间充质干细胞和来源于胸骨等处脂肪的脂肪间充质干细胞, 发现这两种细胞均表达CD13, CD29, CD44, CD90, CD105, SH-3 and STRO-1, 脂肪间充质干细胞能表达CD49, 而骨髓间充质干细胞不表达。Lee等^[20]利用流式细胞仪检测脂肪间充质干细胞和骨髓间充质干细胞细胞表面分子标记时发现, 二者均表达CD29, CD44, CD90, CD105而不表达HLA-DR。其实在脂肪间充质干细胞和骨髓间充质干细胞分子表面标记中争议最大的是CD34这一被描述存在于造血干细胞细胞表面的分子标记物, 目前认为脂肪间充质干细胞包含CD34阳性细胞的文献比较多^[21-27], 但是更多的文献则是认为脂肪间充质干细胞表面不应该存在CD34。其中包括脂肪间充质干细胞的发现者Zuk^[28]。Hoogduijn等^[29]研究发现脂肪间充质干细胞和骨髓间充质干细胞一样表达CD90、CD105和CD166。但是不表达CD34及CD45。

Musina等^[30]利用流式细胞仪检测了脂肪间充质干细胞发现CD13, CD44, CD90和CD105持续阳性表达, 而CD34及CD45不表达。Moon等^[31]的研究用流式细胞仪检测刚从脂肪组织分离获得的细胞以及培养到第3代到第5代脂肪间充质干细胞分子表面CD34、CD45和CD13阴性, 而CD29, CD44, CD90以及CD105阳性。并发现在培养过程中, 脂肪间充质干细胞CD34的表达在下调。由此可提示由此可提示来源于脂肪组织干细胞或许是数种细胞的混合, 多次换液传代后, 贴壁细胞的绝大部分被增殖能力强大的脂肪间充质干细胞占据, 致使细胞组成更加均一。最近的研究表明新提取的原代脂肪间充质干细胞阳性表达CD34, 但是传到第3代的时候, CD34表达消失^[32]。而CD29和CD44一直持续阳性表达。作者认为脂肪间充质干细胞的CD34分子表面标记一旦被证实或者被确定存在, 将会给研究者对脂肪间充质干细胞的进一步研究提供新的方向。因为CD34分子的表面标记阳性的脂肪间充质干细胞更容易受基质细胞衍生因子1的影响, 比CD34阴性的脂肪间充质干细胞具有更强的组织工程支架黏附性以及有更强的迁徙与归巢能力, 将会在循环系统疾病以及组织工程中有更大的应用。作者猜想如果脂肪间充质干细胞真的具有CD34分子标记的话, 由于髌腱损伤后局部的基质细胞衍生因子1基因增加, 那么可以诱导髌下脂肪垫的CD34阳性脂肪间充质干细胞迁徙至髌腱损伤部位而形成髌韧带损伤后的生物学修复。这或将会改变我们对正常髌下脂肪垫对髌腱只是起缓冲或者应力保护的作用的印象, 或许髌下脂肪垫具有髌韧带修复功能。本实验采用流式细胞仪检测了取自髌下脂肪垫的第5代脂肪间充质干细胞细胞发现有96.8%细胞表达CD29, 97.6%细胞表达CD44, 可以基本确定培养细胞为脂肪间充质干细胞。

结论: 自髌下脂肪垫分离及提取脂肪干细胞简单容易, 所得细胞的纯度较高及增殖能力较强, 具备软骨组织工程种子细胞的基本条件。脂肪间充质干细胞在体外换液传代后, 细胞的增殖能力有所下降, 如何长时间维持其自我更新能力尚有待进一步研究。

致谢: 感谢上海同济大学附属同济医院骨科以及上海同济大学医学院刘小青教授的帮助。

作者贡献: 实验设计为刘玉平、俞光荣, 实验实施为刘玉平、刘涛, 实验评估为俞光荣, 资料收集为刘玉平、王明明、李明。刘玉平成文, 俞光荣审校。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 患者对标本的实验方案知情同意, 并得到医院伦理委员会批准。

学术术语: 基质细胞衍生因子 1 的定义? 即趋化因子 CXCL12, 属于趋化因子蛋白家族。基质细胞衍生因子 1 对淋巴细胞以及 CD34⁺的基质干细胞有强烈的趋化作用并在发育中起重要作用。在胚胎发育中基质细胞衍生因子 1 引导造血干细胞从胎儿肝脏到骨髓的迁徙。

作者声明: 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

4 参考文献 References

- [1] Poole AR, Kojima T, Yasuda T, et al. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res*. 2001;(391 Suppl):S26-33.
- [2] Neumann AJ, Gardner OF, Williams R, et al. Human Articular Cartilage Progenitor Cells Are Responsive to Mechanical Stimulation and Adenoviral-Mediated Overexpression of Bone-Morphogenetic Protein 2. *PLoS One*. 2015;10:e0136229.
- [3] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7:211-228.
- [4] Bunnell BA, Estes BT, Guilak F, et al. Differentiation of adipose stem cells. *Methods Mol Biol*. 2008;456:155-171.
- [5] Colazzo F, Chester AH, Taylor PM, et al. Induction of mesenchymal to endothelial transformation of adipose-derived stem cells. *J Heart Valve Dis*. 2010;19:736-744.
- [6] Ronziere MC, Perrier E, Mallein-Gerin F, et al. Chondrogenic potential of bone marrow- and adipose tissue-derived adult human mesenchymal stem cells. *Biomed Mater Eng*. 2010;20:145-158.
- [7] Lin TM, Tsai JL, Lin SD, et al. Accelerated growth and prolonged lifespan of adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells in a medium using reduced calcium and antioxidants. *Stem Cells Dev*. 2005;14:92-102.
- [8] Hebert TL, Wu X, Yu G, et al. Culture effects of epidermal growth factor (EGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) on cryopreserved human adipose-derived stromal/stem cell proliferation and adipogenesis. *J Tissue Eng Regen Med*. 2009;3:553-561.
- [9] Tamama K, Fan VH, Griffith LG, et al. Epidermal growth factor as a candidate for ex vivo expansion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006;24:686-695.
- [10] Zaragosi LE, Ailhaud G, Dani C. Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells. *Stem Cells*. 2006;24:2412-2419.
- [11] Schmidt A, Ladage D, Schinkothe T, et al. Basic fibroblast growth factor controls migration in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006;24:1750-1758.
- [12] Vashi AV, Abberton KM, Thomas GP, et al. Adipose tissue engineering based on the controlled release of fibroblast growth factor-2 in a collagen matrix. *Tissue Eng*. 2006;12:3035-3043.
- [13] Nhung TH, Nam NH, Nguyen NT, et al. A comparison of the chemical and liver extract-induced hepatic differentiation of adipose derived stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2015.
- [14] Rider DA, Dombrowski C, Sawyer AA, et al. Autocrine fibroblast growth factor 2 increases the multipotentiality of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008;26:1598-1608.
- [15] Quarto N, Longaker MT. FGF-2 inhibits osteogenesis in mouse adipose tissue-derived stromal cells and sustains their proliferative and osteogenic potential state. *Tissue Eng*. 2006;12:1405-1418.
- [16] Kang MK, Park NH. Extension of cell life span using exogenous telomerase. *Methods Mol Biol*. 2007;371:151-165.
- [17] 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*. 2006;8:315-317.
- [18] Schaffler A, Buchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells—basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*. 2007;25:818-827.
- [19] 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;89:267-270.
- [20] 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;14:311-324.
- [21] Baptista LS, do Amaral RJ, Carias RB, et al. An alternative method for the isolation of mesenchymal stromal cells derived from lipoaspirate samples. *Cytotherapy*. 2009;11:706-715.
- [22] Lin CS, Xin ZC, Deng CH, et al. Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture. *Histol Histopathol*. 2010;25:807-815.
- [23] Yu G, Wu X, Dietrich MA, et al. Yield and characterization of subcutaneous human adipose-derived stem cells by flow cytometric and adipogenic mRNA analyzes. *Cytotherapy*. 2010;12:538-546.
- [24] Madonna R, Renna FV, Cellini C, et al. Age-dependent impairment of number and angiogenic potential of adipose tissue-derived progenitor cells. *Eur J Clin Invest*. 2011;41:126-133.
- [25] Maumus M, Peyrafitte JA, D'Angelo R, et al. Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype. *Int J Obes (Lond)*. 2011;35:1141-1153.
- [26] De Toni F, Poglio S, Youcef AB, et al. Human adipose-derived stromal cells efficiently support hematopoiesis in vitro and in vivo: a key step for therapeutic studies. *Stem Cells Dev*. 2011;20:2127-2138.
- [27] Cui Z, Shen L, Lin Y, et al. Inhibition of oxygen-glucose deprivation-induced apoptosis of human adipose-derived stem cells by genetic modification with antiapoptotic protein bcl-2. *Aesthetic Plast Surg*. 2014;38:779-787.
- [28] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13:4279-4295.
- [29] Hoogduijn MJ, Crop MJ, Peeters AM, et al. Human heart, spleen, and perirenal fat-derived mesenchymal stem cells have immunomodulatory capacities. *Stem Cells Dev*. 2007;16:597-604.
- [30] Musina RA, Bekchanova ES, Sukhikh GT. Comparison of mesenchymal stem cells obtained from different human tissues. *Bull Exp Biol Med*. 2005;139:504-509.
- [31] Moon MH, Kim SY, Kim YJ, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. *Cell Physiol Biochem*. 2006;17:279-290.
- [32] Taha MF, Hedayati V. Isolation, identification and multipotential differentiation of mouse adipose tissue-derived stem cells. *Tissue Cell*. 2010;42:211-216.