

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.24.002

脂肪干细胞的诱导分化及其来源的研究*

王三虎 满荣勇 高细强 杨长顺 邓欢 朱琳 郑小飞 周细国[△]

(怀化市第一人民医院 湖南 怀化 418000)

摘要 目的:通过组织块培养法得到脂肪干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs),探讨其诱导分化潜能,并初步研究 ADSCs 的来源。**方法:**用脂肪组织块培养法培养原代人 ADSCs。第三代 ADSCs 进行成脂和成骨诱导分化,分别用油红 O 和茜素红 S 染色进行鉴定。脂肪组织块培养七天后取脂肪组织进行 Hematoxylin-eosin Staining(HE)染色观察 ADSCs 组织分布。**结果:**用脂肪组织块培养法成功培养出原代人 ADSCs。ADSCs 传代到第 8 代,依然保持着良好的增殖能力和细胞形态。ADSCs 能成功诱导成脂肪细胞和骨细胞。通过对培养七天后的脂肪组织块进行 HE 染色,发现 ADSCs 主要分布在脂肪组织的间质血管和结缔组织周围。**结论:**用脂肪组织块培养出来的 ADSCs 具有成脂和成骨分化的潜能。ADSCs 主要定位于间质血管和结缔组织周围。

关键词:脂肪干细胞;脂肪组织;成骨分化;成脂分化;脂肪干细胞的起源

中图分类号:R-33;R329.21 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)24-4606-04

Research on the Induced Differentiation of Adipose Derived Stem Cells and Its Origin*

WANG San-hu, MAN Rong-yong, GAO Xi-qiang, YANG Chang-shun, DENG Huan, ZHU Lin, ZHENG Xiao-fei, ZHOU Xi-guo[△]

(The First People's Hospital of Huaihua, Huaihua, Hunan, 418000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the induction and differentiation potential of ADSCs by tissue culture method, and to preliminary study on the origin of ADSCs. **Methods:** Using adipose tissue culture method to culture human ADSCs. The third generation of ADSCs for the adipogenic and osteogenesis differentiation, and staining by oil red O and alizarin red S. HE staining was performed after the seventh day culture of adipose tissue. **Results:** The primary human ADSCs were successfully cultured with adipose tissue culture method. ADSCs cultured to the eighth generation, still maintained a good proliferation ability and cell morphology. ADSCs can be successfully induced into adipose cells and bone cells. ADSCs were mainly distributed around the mesenchymal vascular and connective tissue, by HE staining of adipose tissue after seven days of culture. **Conclusion:** The cells that were cultured with adipose tissue have the potential to adipogenic and osteogenesis differentiation. The ADSCs were mainly distributed around the mesenchymal vascular and connective tissue.

Key words: Adipose-derived stem cells; Adipose tissue; Adipogenesis differentiation; Osteogenesis differentiation; Origin of adipose-derived stem cells

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R329.21 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)24-4606-04

前言

2001 年 Zuk 等从人脂肪组织中分离出了纤维母细胞样的细胞,将其命名为 processed lipoaspirate (PLA)。在特定的诱导因子作用下 PLA 可以被诱导分化为脂肪细胞、软骨细胞、骨细胞和肌细胞^[1]。之后的研究中,Zuk 等还发现 PLA 与 MSCs 存在相似的免疫表型,具备相似的分化潜能^[2]。Zuk 等通过对 PLA 克隆形成能力的研究和多谱系分化能力的鉴定,发现 PLA 具有干细胞的特性,并首次把分离得到的细胞命名为脂肪干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)。

ADSCs 基本形态与成纤维细胞类似,细胞在支持物表面呈梭形或不规则三角形生长,细胞中央有卵圆形核,胞质向外

伸出长短不同的突起,细胞生长汇集成片时成漩涡状生长。原代培养的 ADSCs 主要表达的阳性表面标志物有 CD13/CD44/CD73/CD90/CD105/CD140b,阴性表面标志物主要有 CD31/CD34/CD45/CD106^[2,3-5]。原代培养的 ADSCs 除了表面标志物鉴定还需要进行诱导分化能力鉴定。ADSCs 被公认的谱系特异性的分化方向是成脂、成骨和成软骨方向的分化^[6-8]。

目前为止,ADSCs 的培养方法主要有两种。一种是常规的用 II 型胶原酶消化脂肪组织的方法来分离提取脂肪干细胞^[1,2],另一种是脂肪组织块培养法,来分离培养 ADSCs^[9]。常规的消化法的优点是能一次性获得大量的细胞基数,能在较短的时间内得到大量的细胞,适合于脂肪干细胞的临床应用。组织块培养法的优点是可以在尽量不破坏脂肪组织结构的情况下,分离

* 基金项目:怀化市科技局项目(S2015F102P010)

作者简介:王三虎(1986-),硕士研究生,检验师,主要研究方向:生物化学与分子生物学, E-mail: wangsanhu2006@126.com

[△] 通讯作者:周细国(1975-),硕士研究生,主任医师,主要研究方向:临床诊断学, E-mail: zxg8220@163.com, 电话: 13973088427

(收稿日期:2016-12-11 接受日期:2016-12-30)

培养脂肪干细胞,适合于对脂肪干细胞进行实验室研究。在本研究中我们采用组织块培养法来培养 ADSCs,研究 ADSCs 的成脂和成骨诱导分化潜能。通过对体外培养的脂肪组织进行 HE 染色,初步观察 ADSCs 在脂肪组织中的分布。

1 材料与方法

1.1 标本取材

实验用脂肪组织来源 白色脂肪组织来源于怀化市第一人民医院进行腹部外科手术的患者。医生于无菌条件下行剖腹产手术取 20-35 周岁的妇女(健康育龄妇女,无传染疾病如 HBV, HIV, HCV 等)的腹部白色脂肪 5-6 mL, 无菌封装,立即送至实验室在超净台中进行脂肪干细胞分离培养操作,并与病人签订知情同意书。

1.2 主要试剂

DMEM 和 DMEM/F12 液体培养基、胎牛血清、D-PBS、胰酶;STEMPRO Adipogenesis Differentiation Kit 和 STEMPRO Osteogenesis Differentiation Kit 均购自 GIBCO。离心管购自 BD FALCON, 培养瓶和培养皿购自 Corning。油红 O、茜素红 S 和 4%的多聚甲醛购自 Sigma。

1.3 "天花板"组织块培养法(简称组织块培养法)

手术取约 5-6 mL 脂肪组织,用 D-PBS 清洗干净组织表面,直至洗净肉眼可见的血细胞。洗干净的脂肪组织置于无菌的 10 cm² 的培养皿中,加入含有双抗(青霉素的浓度 600 U/mL,链霉素的浓度 300 μg/mL)的 D-PBS 20 mL 放置 5-10 min。

重新用 D-PBS 冲洗脂肪组织,把脂肪组织转移到另外一个 10 cm² 的玻璃培养皿中,用手术剪把脂肪组织剪成 1-3 mm³ 的小块,去除肉眼可见的血管和结缔组织。把得到的脂肪组织块用 D-PBS 再洗一遍,洗完了加入 1-2 mL 的 FBS。剪好的脂肪块,立刻用无菌塑料滴管转移到 25 cm² 的培养瓶中,把脂肪块按 0.5 cm 左右的距离排列好,把培养瓶翻转过来,让脂肪组织块紧贴培养瓶壁,于 5% CO₂, 37℃ 饱和湿度培养大约 4 h,待脂肪组织块有一点点干,此时把培养瓶重新正面放置,加入 2 mL FBS,让组织块在 FBS 的滋养下培养约 48 h。第三天的时候,点状的细胞出现在脂肪组织周围,此时用 DMEM+10%FBS 培养基代替 FBS,并继续培养。到第七天的时候,可以去掉多余的脂肪组织块,并继续培养贴壁细胞,待细胞长到 80%-90%融合度的时候进行传代。

1.4 脂肪干细胞的成脂成骨诱导分化

观察 ADSCs 在 DMEM/F12+10%的 FBS 标准培养基中的

生长状态,确定细胞处于对数生长期融合度为 60%-70%。加 D-PBS 漂洗 2 遍,去掉 D-PBS 和漂浮的细胞。加入成脂诱导培养基稀释液(标准培养基:成脂诱导培养基=3:1)。三天后换液加入稀释比例为 1:1 的成脂诱导培养基。以后每三天换液一次,加入成脂诱导培养基,诱导分化 14 天左右可以进行诱导分化后的检测。可以用油红 O 染色观察脂滴形成情况。成骨诱导分化类似,只是把成脂诱导培养基换成了成骨诱导培养基,诱导时间为 21 天,染色用茜素红 S。

1.5 油红 O 染色

称取 0.5g 油红干粉,溶于 100 mL 异丙醇中,配成 0.5%油红储存液,棕色瓶保存。除去培养基并用 D-PBS 漂洗 1 遍。加 4%多聚甲醛固定 30 min。稀释油红储存液,油红:去离子水=3:2,滤纸过滤,室温放置 10 min。加入适量的油红 O 染液(加的体积覆盖住细胞层即可)染色 10 min。用 D-PBS 漂洗 2-3 次,除去多余的染料,显微镜下观察并拍照记录。

1.6 茜素红 S 染色

茜素红 S 染液(2%, pH4.3)用 0.1 mol/L Tris-base 溶液配制。除去成骨诱导培养基,并用 D-PBS 冲洗 2-3 遍。用 4%的多聚甲醛固定 30 min,然后用 D-PBS 冲洗 2 遍。加入浓度为 2%的茜素红 S 染液(pH=4.3)染色 5 min。用灭菌双蒸水漂洗 3 次,除去未结合的染料。除去多余的双蒸水,倒置显微镜观察,并拍照记录结果。

1.7 培养后的脂肪组织 HE 染色

脂肪组织块培养七天后取脂肪组织块,进行 HE 染色。主要步骤是脂肪组织块的石蜡切片 5 μm 脱蜡后染色,苏木素染色 2 min,水洗,0.5%盐酸酒精分化 30 s,水洗,伊红染色 1 min,再水洗,快速过梯度酒精脱水,晾干后中性树胶封片。

2 结果

2.1 ADSCs 的原代培养与形态学观察

本研究采用组织块培养法培养原代人 ADSCs,在相衬显微镜下观察细胞的生长状态和形态并拍照记录。脂肪组织块贴紧培养瓶壁后在 100%FBS 条件下培养三天即可以观察到有很多梭形细胞从脂肪组织向四周生长(见图 1 A)。原代培养第五天 ADSCs 已经开始向培养瓶中的空地贴壁生长(见图 1 B)。原代培养 14 天后 ADSCs 呈旋涡状生长,此时细胞的融合度达到 90%左右,可以进行原代细胞的传代培养(见图 1 C)。原代细胞传代至第 8 代细胞形态未见明显的改变,增殖能力比较好(见图 1 D)。

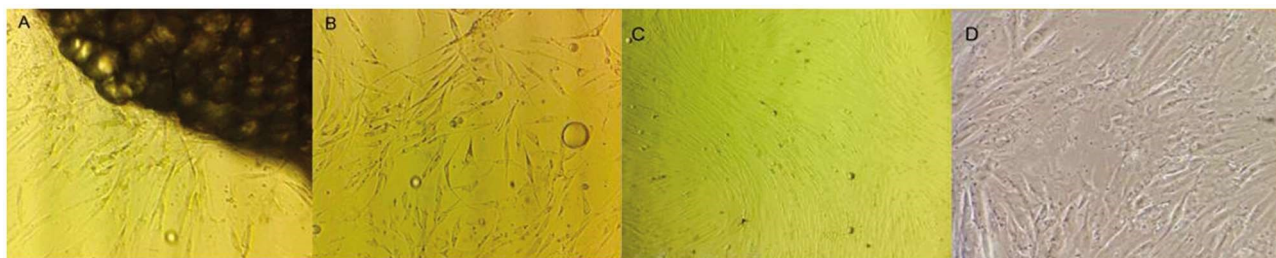


图 1 ADSCs 的原代培养与形态学观察

Fig.1 Primary culture and morphological observation of ADSCs.

A: Primary culture for 3 days($\times 200$). B: Primary culture for 5 days($\times 200$). C: Primary culture for 14 days($\times 100$). D: The 8 generation of ADSCs($\times 200$).

2.2 ADSCs 的成脂诱导分化

第三代 ADSCs 在成脂诱导培养基中诱导分化 14 天, 相衬显微镜下可看到生成明显的脂滴(图 2A)。第三代 ADSCs 在成脂诱导培养基中诱导分化 14 天后, 用油红 O 染色, 相衬显微镜下可以看到被染成橘红色的脂滴(图 2B)。第三代 ADSCs 成

脂诱导分化 14 天, 相衬显微镜高倍镜下可以看到明显的脂滴生成, 脂滴大小不一, 分布于整个细胞中(图 2C)。第三代 ADSCs 在成脂诱导培养基中诱导分化 14 天后, 用油红 O 染色, 相衬显微镜高倍镜下可以看到明显的橘红到红色的脂滴生成, 脂滴大小不一, 形态清晰可见, 并分布于整个细胞中(图 2D)。

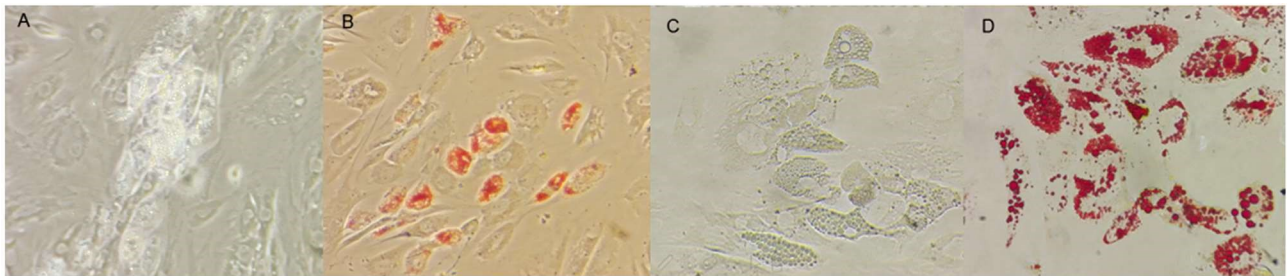


图 2 ADSCs 的成脂诱导分化

Fig.2 Adipogenesis differentiation

A, C: adipogenic differentiation for 14 days ($\times 200$, $\times 400$) B, D: adipogenic differentiation for 14 days, oil red O staining($\times 200$, $\times 400$)

2.3 ADSCs 的成骨诱导分化

第 3 代 ADSCs 在基础培养基中培养 21 天, 茜素红 S 染色后在相衬显微镜观察不到染成红色的钙结节(阴性对照)(图 3A)。第 3 代 ADSCs 在成骨诱导培养基中培养 21 天, 茜素红 S

染色, 不同放大倍数的相衬显微镜下可以看到被染成红色的钙化结节(放大倍数 $100\times$, 图 3B 放大倍数 $200\times$, 图 3C 放大倍数 $400\times$, 图 3D)。

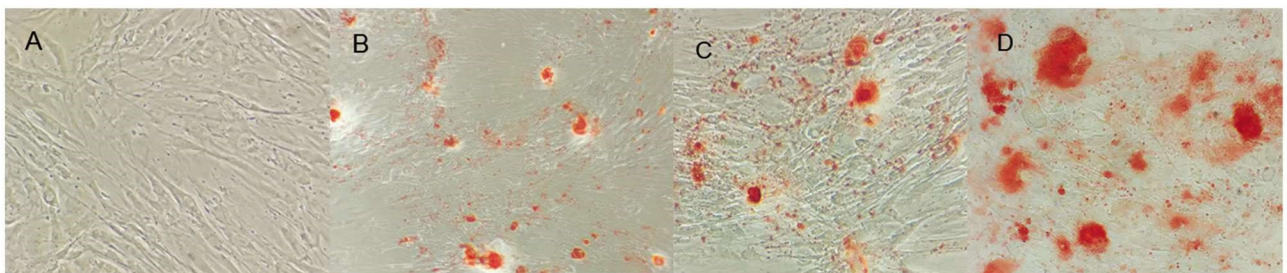


图 3 ADSCs 的成骨诱导分化

Fig.3 Osteogenesis Differentiation

A: ADSCs in basic culture medium for 21 days, after Alizarin Red S staining (negative control). B, C, D: osteogenic differentiation for 21 days after Alizarin Red S staining ($\times 100$, $\times 200$, $\times 400$).

2.4 ADSCs 在脂肪组织中的分布情况

正常的脂肪组织直接 HE 染色效果较差因脂肪组织中的细胞基质少, 质地软, 脱水时组织细胞变形, 石蜡包埋后细胞也会有较大的变形性。但是在体外培养后, 脂肪组织块质地变硬, 细胞基质变多, 制作的石蜡切片行 HE 染色形态较为规则。脂

肪组织块培养法培养第七天, 取脂肪组织块行 HE 染色。可观察到血管附近出现较多的 ADSCs。(放大倍数 $200\times$ 见图 4A 放大倍数 $400\times$ 见图 4B)脂肪组织块培养法培养第七天, 取脂肪组织块做 HE 染色, 可观察到结缔组织中也出现较多的 ADSCs(放大倍数 $400\times$, 见图 4C, 4D)。

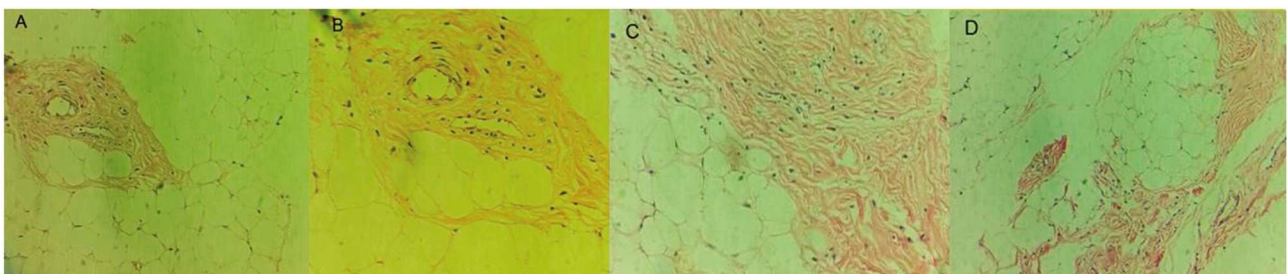


图 4 培养后的脂肪组织 HE 染色结果

Fig.4 Results of HE staining in cultured adipose tissue

A, B: ADSCs distribute in perivascular stain by HE staining ($\times 200$, $\times 400$) C, D: ADSCs distribute in Connective tissue($\times 400$, $\times 200$).

3 讨论

由于很少有文献报道 ADSCs 在脂肪组织中的定位。我们

希望从对 MSCs 在体内的定位研究找到可以借鉴的方法。MSCs 在生物体内的确切性质和定位研究的也不多; 但是, 越来越多的证据表明其与周细胞有关^[10,11]。目前为止, 研究 MSCs

分布的方法主要有两种。一种是用已知在体外培养的 MSCs 中表达阳性的标志物来寻找在体内表达阳性的 MSCs^[12,13]。另一种方法是把引入了外源性标记的细胞重新注入体内来分析它的组织分布情况^[14]。第一种方法虽然敏感,但是特异性不够,因为绝大多数的细胞标记物只是在特定的组织中才有特异性。第二种方法可能不能精确的研究 MSC 在体内的自然分布,因为重新注入的细胞有可能非特异性的移植到不同的位置。还有一种方法就是用氘胸腺嘧啶、溴脱氧尿苷(BrdU)或 5- 乙炔基 -2'- 脱氧尿苷(EdU)来标记细胞的研究已经在一些动物中实施,并尝试以此来鉴定干 / 祖细胞在组织中的定位^[15-17]。

脂肪细胞的发育是基础生物学问题,是人类健康和疾病的重要分支^[18,19]。脂肪细胞在脉管系统的参与和协调下形成,但关于白色脂肪祖细胞的鉴定和定位仍然知之甚少。研究表明脂肪祖细胞可能存在于脂肪间质血管周围^[18,20]。通过基因敲入的方法构建小鼠体内的 PPAR γ 报告系统,标记脂肪形成的关键调控因子 PPAR γ 表达的细胞,研究脂肪组织中脂肪祖细胞的定位,表明脂肪组织块里面的周细胞区域含有一定量的白色脂肪祖细胞,这些祖细胞具有不同的分化潜能,如形成脂肪。脂肪块中的血管周围形成一个祖细胞微环境,可能提供信号调节脂肪细胞发育^[21]。

我们把脂肪组织块看成一个含有 ADSCs 壁龛的微环境。脂肪干细胞就定居在这些脂肪间质的壁龛中。由于脂肪干细胞在脂肪组织中的数量较少,也没有特异性的表面标志物,这样一来就不能直接通过免疫组化的方法,来分析脂肪干细胞在脂肪组织中的分布。但是我们设计的方法,可以巧妙的解决这个问题。首先,我们设计预实验在体外培养脂肪组织块,让 ADSCs 在脂肪组织中进行增殖。培养一段时间后取培养后的脂肪组织块进行 HE 染色,可以初步观察到 ADSCs 主要在那些部位开始增殖。我们观察到的结果显示,ADSCs 主要分布在间质血管周围和结缔组织中。ADSCs 分布于间质血管周围与大多数的研究相符,而在结缔组织中的分布有可能是因为 ADSCs 在培养的过程中更多的从结缔组织中穿过而向四周生长。同时也能说明脂肪中的结缔组织对维持 ADSCs 生长的微环境至关重要。

我们发现这种只做 HE 染色的方法特异性不够。我们下一步实验应该通过免疫荧光或免疫组化的方法定位血管,这样我们就能了解到 ADSCs 在脂肪组织中的定位与分布情况。研究脂肪干细胞的组织定位,有助于了解 ADSCs 的来源这些基本的问题,也为 ADSCs 的临床应用奠定坚实的理论基础。

致谢:细胞培养,脂肪干细胞的诱导分化等相关工作在湖南医药学院生物医学研究中心完成。

参 考 文 献(References)

- [1] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies[J]. *Tissue Engineering*, 2001, 7(2): 211-228
- [2] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells[J]. *Mol Biol Cell*, 2002, 13(12): 4279-4295
- [3] Mendel TA, Clabough EB, Kao DS, et al. Pericytes derived from adipose-derived stem cells protect against retinal vasculopathy [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e65691
- [4] Rajashekhar G, Ramadan A, Abburi C, et al. Regenerative therapeutic potential of adipose stromal cells in early stage diabetic retinopathy [J]. *PLoSOne*, 2014, 9(1): e84671
- [5] Zhou L, Xia J, Qiu X, et al. In vitro evaluation of endothelial progenitor cells from adipose tissue as potential angiogenic cell sources for bladder angiogenesis[J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0117644
- [6] Iwen KA, Priewe AC, Winnefeld M, et al. Gluteal and abdominal subcutaneous adipose tissue depots as stroma cell source: gluteal cells display increased adipogenic and osteogenic differentiation potentials [J]. *Exp Dermatol*, 2014, 23(6): 395-400
- [7] Ferroni L, Tocco I, De Pieri A, et al. Pulsed magnetic therapy increases osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells only if they are pre-committed[J]. *Life Sci*, 2016, 152: 44-51
- [8] Lee HM, Joo BS, Lee CH, et al. Effect of Glucagon-like Peptide-1 on the Differentiation of Adipose-derived Stem Cells into Osteoblasts and Adipocytes[J]. *J Menopausal Med*, 2015, 21(2): 93-103
- [9] Zeng G, Lai K, Li J, et al. A rapid and efficient method for primary culture of human adipose-derived stem cells[J]. *Organogenesis*, 2013, 9(4): 287-295
- [10] Doherty MJ, Ashton BA, Walsh S, et al. V ascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo [J]. *J Bone Miner Res*, 1998, 13(5): 828-838
- [11] Farrington-Rock C, Crofts NJ, Doherty MJ, et al. Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes [J]. *Circulation*, 2004, 110(15): 2226-2232
- [12] Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, et al. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications[J]. *Stem Cells*, 2001, 19(3): 180-192
- [13] Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp [J]. *J Bone Miner*, 2003, 18(4): 696-704
- [14] Anjos-Afonso F, Siapati EK, Bonnet D. In vivo contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions[J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt 23): 5655-5664
- [15] Ohlsson C, Nilsson A, Isaksson O, et al. Growth hormone induces multiplication of the slowly cycling germinal cells of the rat tibial growth plate[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(20): 9826-9830
- [16] Karlsson C, Thornemo M, Henriksson HB, et al. Identification of a stem cell niche in the zone of Ranvier within the knee joint[J]. *J Anat*, 2009, 215(3): 355-363
- [17] Candela ME, Yasuhara R, Iwamoto M, et al. Motomi Enomoto-Iwamoto Resident mesenchymal progenitors of articular cartilage[J]. *Matrix Biol*, 2014, 39C: 44-49
- [18] Ailhaud GI, Grimaldi P, Nègre R. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development[J]. *Annu Rev Nutr*, 1992, 12: 207-233
- [19] Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source[J]. *Cell*, 2007, 131(2): 242-256
- [20] Klaus S, Cassard-Doulcier AM, Ricquier D. Development of Phodopus sungorus brown preadipocytes in primary cell culture: effect of an atypical beta-adrenergic agonist, insulin, and triiodothyronine on differentiation, mitochondrial development, and expression of the uncoupling protein UCP[J]. *J Cell Biol*, 1991, 115(6): 1783-1790
- [21] Tang W, Zeve D, Suh JM, et al. White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature[J]. *Science*, 2008, 322(5901): 583-586