

脂肪来源的间充质干细胞分离方法的改进

李冬艳, 宇 丽, 李发涛, 刘 红, 罗京资

(暨南大学医学院生物化学教研室, 广东 广州 510632)

[摘 要] 目的:从供体年龄、取材部位、提取方法3方面来研究稳定的脂肪间充质干细胞(ADMSCs)分离提取方法。方法:从兔颈背部皮下、肌间以及腹股沟皮下的脂肪组织取材,分别采用一次消化收集法和多次消化收集法分离提取 ADMSCs,单层传代培养。分别比较不同提取方法,老年兔、壮年兔与幼年兔,同一供体不同部位的脂肪组织,所分离的 ADMSCs 产量和生物学特性。结果:运用多次消化收集法能从脂肪组织中稳定分离出生长旺盛的 ADMSCs,与一次消化收集法相比能显著提高所获取的的细胞产量。从老年兔、壮年兔、幼年兔以及同一供体的不同部位脂肪组织中所提取的 ADMSCs 生长增殖活性无明显差异,但从单位体积脂肪组织提取得到的 ADMSCs 产量显著不同。结论:多次消化收集法能显著提高分离获得的 ADMSCs 产量,是对传统的一次消化收集法的改进。选择不同供体年龄和取材部位提取 ADMSCs,对细胞的生物学活性影响不大,但对细胞产量有明显影响。

[关键词] 脂肪间充质干细胞; 原代细胞; 细胞分离提取; 组织工程

[中图分类号] R331.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1000-9965(2007)06-0585-05

The improvement of the extraction method for adipose tissue derived mesenchymal stem cells

Li Dong-yan, YU Li, LI Fa-tao, LIU Hong, LUO Jing-zi

(Department of Biochemistry, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[Abstract] **Aim:** In order to establish a stable extraction method for adipose tissue derived mesenchymal stem cells (ADMSCs), the research was carried out on three respects: donor age, location of fat obtained and extraction way. **Methods:** Adipose tissue from rabbit was drawn under scruff fur, among muscles, and in groin. ADMSCs were extracted with the single-digestion-separate method or the multi-digestion-separate method. The yield of extracted ADMSCs and the biological activity of cultured cells were compared among the groups with different extraction methods, from different locations and ages. **Results:** The eugonic ADMSCs could be stably extracted from adipose tissue with the multi-digestion-separate method, and the yield from it was obviously better than that from the group with the single-digestion-separate method. The proliferation activity of extracted ADMSCs was similar among the rabbits from different ages and locations, but the ADMSCs yield from adipose tissue of unit volume was different significantly. **Conclusion:** The multi-digestion-separate-method can significantly raise the yield of extracted ADMSCs, which is better than traditional single-digestion-separate-method. The age of rabbit and location of adipose tissue

[收稿日期] 2007-09-10

[基金项目] 教育部科学技术研究重点基金项目(02910);广东省自然科学基金项目(31875);广州市科委科技攻关重大项目(2002Z1-E0032)

[作者简介] 李冬艳(1981-),女,硕士研究生,研究方向:软骨组织工程。通讯联系人:宇 丽, Tel:020-85220256, E-mail: doctoryuli@yahoo.com.cn

had little effect on the biological activity of extracted ADMSCs, but have obvious effect on the cell yield.

[Key words] adipose tissue derived mesenchymal stem cell; primary cell; cell extraction; tissue engineering

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有自我更新及多向分化潜能,是一种具有潜力的组织工程种子细胞。目前研究得比较多的是骨髓来源的 MSCs,但骨髓中的间充质干细胞数量很少(约占细胞总数的 $1/10^5$),且存在取材困难等问题。MSCs 广泛分布于其他组织中,包括肌肉、血管、肝脏、胰腺和脂肪等。其中脂肪来源的 MSCs 由于来源广泛,取材方便,日益受到研究者的重视。而且近年来,国外研究^[1-4]表明,脂肪来源的间充质干细胞(adipose tissue derived mesenchymal stem cells, ADMSCs)在体外适当的诱导培养条件下能分化为多种细胞,如:脂肪细胞、软骨细胞、成骨细胞、成肌细胞和心肌细胞等,因此在细胞治疗和组织工程中具有广泛的应用前景。

本研究以新西兰白兔为供体,从年龄、取材部位、细胞提取方法 3 方面来研究稳定的 ADMSCs 分离提取方法,为后期利用 ADMSCs 进行相关的组织工程研究工作打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

分别选取体质量为 (3.0 ± 0.2) kg、 (2.0 ± 0.2) kg、 (1.0 ± 0.2) kg 的老年、壮年与幼年新西兰白兔为研究对象,雌雄不限(广东省实验动物中心提供);I 型胶原酶(Sigma);胰酶(Sigma);高糖 DMEM 细胞培养基干粉(Gibco);标准胎牛血清(杭州四季青公司);青霉素(华北制药公司);链霉素(华北制药公司);RNA 酶(Takara);碘化丙啶(PI)染液(Sigma);CD44、CD105 多克隆抗体(武汉博士德公司);Cy3 免疫荧光试剂盒(武汉博士德公司)。

1.2 脂肪干细胞分离提取方法

新西兰白兔以耳缘静脉注射空气法处死,工业硫酸钡脱去切口部位周围的兔毛后,用体积分数 75% 酒精浸泡兔体 10 min,移入超净工作台内,用碘伏及酒精棉球消毒切口及周围区,取颈后部正中切口或腹股沟直切口,无菌切取皮下脂肪,暂时浸泡于含有双抗的 D-Hanks 液中。用眼科镊仔仔细剥离脂肪组织中肉眼可见的小血管,尽量去除外包膜和明显的结缔组织,并在无菌木板上用手术刀切碎至均一的糊状,转移至 50 mL 塑料离心管,加入 2 倍体积的 I 型胶原酶液,盖紧盖子后用力摇匀,37 °C 温箱内震荡消化。分别采用 3 种分离提取方法:①一次消化收集法;②一次消化多次收集法;③多次消化收集法。3 种方法均采用质量分数 0.1% 的 I 型胶原酶液,消化的总时间均为 1 h。

多次消化收集法在消化 20 min 后取出离心管,1 000 g 离心 10 min,管内混合物分为 3 层,从上至下依次为脂肪层、

液体层和细胞沉淀,用一细口长吸管穿过上面两层直接插入至管底吸取收集细胞沉淀,转移至另一离心管并加入含有体积分数 10% 的 FBS 的 DMEM,然后盖紧第 1 支离心管的盖子用力摇匀。重复以上消化、收集步骤共 3 次,总消化时间 1 h。将 3 次吸取的细胞收集至同一离心管中。轻轻吹匀,离心去除上清,加入 160 mmol/L NH_4Cl 裂解红细胞 10 min,离心弃上清,加入高糖 DMEM 培养基,清洗 2 次,先后用 100 和 200 目的筛网分别过滤,去除杂质和结缔组织,然后直接接种至 50 mL 培养瓶,并加入血清和双抗。

一次消化多次收集法即连续消化 1 h 后取出离心管,重复上述离心收集细胞的过程 3 次,然后将 3 次吸取的细胞收集至同一离心管中,然后依同法进行红细胞裂解、清洗、过滤和接种。

一次消化收集法即在连续消化 1 h 后取出离心管,离心收集细胞 1 次,然后依同法进行红细胞裂解、清洗、过滤和接种。

1.3 培养方法

培养基成分为:高糖 DMEM,体积分数 10% 的 FBS,100 IU/mL 青霉素,100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素。培养条件:37 °C,饱和湿度,体积分数 5% CO_2 培养箱内单层培养。原代培养在接种 48 h 后首次换液,除去未贴壁细胞。此后细胞生长至 80% 融合状态时传代,质量分数 0.25% 的胰酶 37 °C 消化 5 min,轻轻吹打,使细胞脱离瓶壁,将细胞悬液离心弃上清,细胞稀释 2~3 倍接种至培养瓶,每 3 d 规律更换培养基。

1.4 观察指标

(1)倒置显微镜动态观察细胞形态;台盼蓝染色观察细胞活性;细胞计数法检测细胞生长动力学参数:分别取 P3、P5、P10 代 ADMSCs,以 $2 \times 10^4/\text{mL}$ 的细胞密度接种于 24 孔培养板中,每孔培养液均为 1 mL,从培养的次日起连续计数 9 d,每天定时消化 3 孔计数,绘制生长曲线,未计数细胞常规 3 d 换液,直至贴壁细胞铺满整个培养孔的底部。

(2)细胞周期测定:ADMSCs 单层传代培养至第三代达到融合,胰酶消化、离心收集约 1×10^7 个培养细胞,磷酸盐缓冲液洗涤 2 次,体积分数为 75% 预冷乙醇固定后 4 °C 冰箱过夜,RNA 酶 37 °C 处理 30 min,PI 染色 30 min,上流式细胞仪检测,软件分析细胞 DNA 含量。

(3)细胞表面抗原鉴定:取第三代 ADMSCs 接种于预置盖玻片的 6 孔培养板中,培养至融合,0.01 mol/L PBS 洗去培养液,体积分数 4% 的多聚甲醛固定过夜。再用 0.01 mol/L PBS 冲洗 3 次,每次 2 min,然后用含体积分数 10% 山羊血清的 PBS 室温下孵育 30 min。用 CD44 和 CD105 的一抗室温作用 2 h,然后用 0.01 mol/L PBS 冲洗 3 次,每次 2 min。生

物素化二抗室温作用 30 min, 然后用 0.01 mol/L PBS 冲洗 3 次, 每次 2 min。SABC-Cy3 染料避光孵育 30 min, 然后用 0.01 mol/L PBS 冲洗 4 次, 每次 3 min。水溶性封片剂封片, 荧光显微镜下观察拍照。

(4) 不同提取方法的 ADMSCs 分离产量和生物学活性比较: 分别采用 3 种分离提取方法(见 1.2)从 10 mL 同部位白色脂肪组织中分离提取 AMDSCs, 并分别接种在 50 mL 培养瓶内, 观察细胞生长情况和融合时间。

(5) 不同供体年龄的 ADMSCs 分离产量和生物学活性比较: 以老年、壮年与幼年新西兰白兔为研究对象, 各取脂肪 10 mL, 采用方法(3)分别提取 ADMSCs 并单层传代培养, 并分别接种在 50 mL 培养瓶内, 观察细胞生长情况和融合时间。

(6) 不同取材部位的 ADMSCs 分离产量和生物学活性比较: 以壮年兔为研究对象, 切取兔背部皮下、肌间隙、腹股沟 3 个部位的脂肪组织各 5 mL, 采用方法(3)分离提取 ADMSCs, 并分别接种至 6 孔板之 1 孔, 观察细胞生长情况和融合时间。

2 结果

2.1 细胞形态和生长特性

原代接种初期, ADMSCs 为透亮的小圆形, 其中还含有一些残留的红细胞和少量的脂肪滴、巨噬细胞、淋巴细胞、结缔组织碎片等, 随着培养时间的延长, 换液次数的增加, 不贴壁的杂细胞和杂质基本被清除, 背景逐渐变干净。接种 24 h 后, 镜下可见少数细胞开始贴壁, 多呈短梭形或类圆形。48 h 后多数细胞已贴壁, 并开始伸展, 分裂, 呈梭形或多角形, 并出现由单个细胞分裂形成的集落。5~7 d 后, 细胞逐渐增殖, 成簇分布, 集落之间的空隙逐渐缩小, 细胞排列开始具有一定方向性(见图 1)。7~10 d 细胞密集融合成单层。



原代接种 7 d 后, 细胞排列开始具有一定方向性, 并逐渐密集融合成单层

图 1 原代细胞培养(200×)

传代后细胞呈长梭形, 形态比较均一, 呈平行或漩涡状排列(见图 2), 稀释 3 倍后接种可在 3~4 d 内再次达到融合。本研究将 ADMSCs 体外单层培养传代 20 次, 各代细胞

形态无明显变化, 细胞形态仍然非常均一, 贴壁牢靠, 活力在 90% 以上, 取 P3、P5、P10 代 ADMSCs 计数, 绘制生长曲线, 结果显示随代次增加细胞增殖速度未见减慢(见图 3)。

传代后细胞呈长梭形, 形态比较均一, 呈平行或漩涡状排列

图 2 传代后细胞培养(200×)

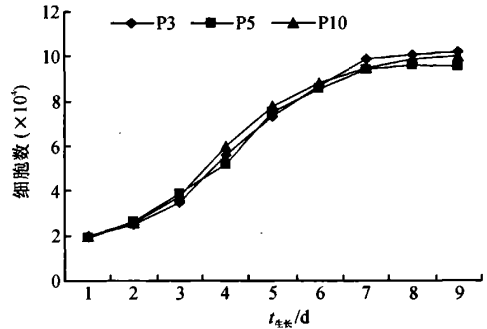


图 3 细胞生长曲线

2.2 细胞周期检测结果

结果显示在达到融合状态的第三代 ADMSCs 中 G_0/G_1 、 S 、 G_2/M 的细胞分别占 87.8%、3.7%、8.5%, 提示在上述培养条件下只有少部分细胞处于对数增殖期, 而大多数细胞处于静止期。

2.3 细胞表面抗原鉴定结果

第三代 ADMSCs 的荧光染色结果表明: 绝大多数的 ADMSCs 都表现为 CD44 和 CD105 阳性。证实了提取获得的绝大多数细胞具有间充质干细胞的特性, 细胞纯度较好。(见图 4,5)

2.4 不同分离提取方法的比较

从 10 mL 同部位白色脂肪组织中分离提取 AMDSCs, 方法①离心后收集到约 0.2 cm³ 沉淀; 而方法②在 3 次离心中的第 2 次离心后, 离心管底仍有大量细胞沉淀, 体积仅略小于第 1 次离心的, 第 3 次时细胞沉淀才明显减少, 总共收集到约 0.5 cm³ 沉淀; 方法③获得沉淀的情况与方法②相近。将获得的细胞沉淀经过红细胞裂解、清洗、过滤后, 接种在 50 mL 培养瓶内, 方法②、③在 7~9 d 即可达到融合, 而方法①则需要 10~14 d 达到融合。得出: 方法②与方法③所提

取的 ADMSCs 产量相近,并明显高于方法①。



图4 CD44 荧光染色结果(400×)

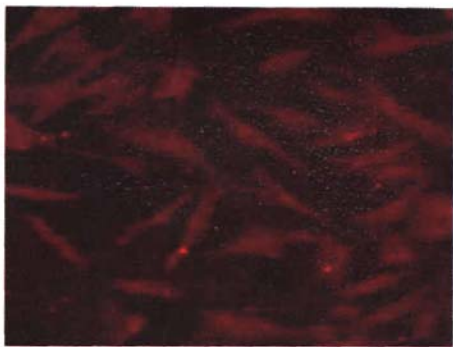


图5 CD105 荧光染色结果(400×)

2.5 不同年龄供体的比较

由老年兔、壮年兔与幼年兔提取的细胞在生长速度和细胞形态方面没有明显差别。但老年兔脂肪主要是黄色脂肪,幼年兔常见棕色脂肪,而壮年兔是白色脂肪,按1.4(4)分别提取 ADMSCs 并接种,白色脂肪在7~9 d即可达到融合,黄色脂肪在14~21 d内可达到融合,棕色脂肪在21 d后仍仅见散在的细胞团,不能达到融合。得出:单位体积的黄色脂肪与棕色脂肪所提取获得的 ADMSCs 产量均少于白色脂肪。

2.6 同一供体不同取材部位的比较

研究选取的3个部位的脂肪组织所分离提取的 ADMSCs 在生长速度和细胞形态方面没有明显差别。按1.4(5)分别提取 ADMSCs 并接种,肌间隙或腹股沟部位在7~9 d即可达到融合,而背部皮下脂肪需要14~21 d甚至更久才可达融合。得出:肌间隙、腹股沟部位的脂肪组织提取所得 ADMSCs 细胞产量高于背部皮下。

3 讨论

在组织工程研究的问题中,种子细胞始终是一个至关重要的问题。自身成体细胞存在数量有限,供区病变,增殖速度缓慢,体外培养传代去分化,以及随年龄增长细胞数量和活性下降等问题,因此,干细胞成为组织工程种子细胞研究方面的热点。而脂肪干细胞具有取材容易,取材量大,能反

复取材,损伤较小,细胞增殖快速等优于胚胎干细胞和骨髓间充质干细胞的优点,因此有望成为优秀的自体来源的组织工程的种子细胞^[5-6]。

2003年,刘相名等的研究证实,从大鼠的脂肪组织中能够分离出可被诱导向脂肪细胞和成骨细胞表型分化的多能干细胞^[7]。2004年余方圆等的研究证实,从兔的颈后部及腹股沟处的脂肪组织中能分离出快速、长期增殖的细胞,并能被诱导向软骨细胞表型分化^[8]。近两年来,脂肪干细胞的有关研究在国内逐渐成为新的热点^[9-11]。以脂肪干细胞定向诱导分化为成骨细胞、软骨细胞、表皮细胞、神经细胞等方向的研究纷纷取得一定成果。因此,建立一种高效、稳定的脂肪干细胞提取方法将会对深入研究起到推动作用。研究表明,ADMSCs 表面有 CD29、CD44、CD71、CD90、CD105/SH-2、SH-3、STRO-1 等多种抗原标志^[12],我们选取了间充质细胞的表面标志物 CD44、CD105 进行免疫鉴定,绝大多数细胞具有阳性表达,证实了所提取获得的细胞纯度较好。

在保证酶的浓度、消化的总时间和温度均一致的前提下,实验中采用了3种不同的提取方法。同等条件下,传统的一次消化收集法,获得的细胞沉淀量最小,说明不能达到充分的分离效果,导致了大量细胞流失,降低了分离产量。一次消化多次收集法,通过重复离心,弥补了分离不充分的缺点,明显提高了细胞产量。而采用多次消化收集法,通过间隔收集,既能保证细胞收集比较充分,又可以避免先消化下来的单细胞长时间受到酶的作用,影响细胞活性。实验发现,重复离心收集可明显增加细胞沉淀的量。这是由于脂肪组织十分粘稠,离心的时候细胞下沉受到的阻力很大,所以通过重复离心,延长有效分离时间,可以达到充分分离细胞和脂肪的目的。考虑到离心后获得的细胞沉淀中尚含有大量的结缔组织碎屑,所以仅以体积判断细胞产量并不准确。在筛网过滤去除组织碎屑后获得的细胞中,除了 ADMSCs 还含有许多红细胞、巨噬细胞、淋巴细胞、造血细胞、成纤维细胞等杂细胞,而原代获得的 ADMSCs 在初接种时细胞小而圆,没有明显的形态特征,不易与杂细胞、微小碎屑等杂质辨别,故未能做原代细胞计数。本实验通过融合时间来判断提取获得的 ADMSCs 产量。从结果得出方法②与方法③所获得 ADMSCs 产量差别不大,但明显高于方法①。由于方法③更能保护细胞活性,在此后的实验中均采用方法③提取细胞。

在不同年龄供体和不同取材部位的比较中,结果显示,壮年兔脂肪组织分离所获得的 ADMSCs 数量明显高于老年兔和幼年兔,单位体积兔肌间隙和腹股沟脂肪组织分离所获得的 ADMSCs 数量明显高于背部皮下。实验中发现,兔背部皮下脂肪,筋膜包裹厚而致密,去除筋膜比较困难,而肌间隙、腹股沟部位的脂肪组织筋膜较少且疏松,容易分离。结合实验结果分析得出,筋膜质地柔韧,在机械切割时较难切碎,如掺杂在脂肪组织中会在离心时阻碍细胞下沉影响分离效果,在过滤时堵住筛孔,黏着细胞,导致细胞的丢失,影响

提取产量,甚至会造成所提取的细胞中成纤维细胞的掺杂。因此在取材、分离提取过程中务必避免筋膜掺杂。由于不同年龄的供体以及同一供体不同取材部位所获得的脂肪组织中所提取的 ADMSCs 的生物化学性质无差别,实验中应尽可能选择壮年兔、以及脂肪组织丰富、成分单一的肌间隙、腹股沟部位取材,将会大大的提高提取效率。

提取成功后,在接种和原代培养初期的一些不恰当的处理步骤容易造成 ADMSCs 的丢失,应当尽量避免。原代接种时 ADMSCs 中掺杂很多杂细胞,其中以红细胞较多,尽管通过定期换液可以逐渐除去不贴壁的红细胞及其他杂细胞,达到纯化 ADMSCs 的目的,但是如果红细胞过多则会沉积在培养瓶底壁黏结成膜,影响 ADMSCs 的贴壁,导致在换液时丢失,而且溶血时红细胞释放的物质也会对 ADMSCs 造成毒性。因此建议采用 NH_4Cl 液体裂解红细胞,可以将绝大部分的红细胞去除,避免不良影响。关于接种后首次换液的时间,国内外的研究者通常选在接种 12、24 或 48 h 后,但由于原代提取过程中受到机械作用和酶的化学作用,以及从活体内到体外培养的生长环境改变,细胞需要一个相对较长的适应阶段。因此我们认为首次换液时间不宜过早,否则容易造成尚未牢固贴壁的 ADMSCs 的脱落和丢失,在 48 h 后,细胞已经牢固贴壁,此时换液可避免造成 ADMSCs 丢失。

本研究采用多次消化收集法提取 ADMSCs,产量高、活性良好、效果稳定,是对传统的细胞提取实验方法的改进,为 ADMSCs 的进一步研究打下基础,并论证了供体年龄选择和组织取材部位选择所造成的差别。研究中采用的实验动物为新西兰白兔,基于兔的供体年龄选择和组织取材部位选择方面所存在的差别,我们推论在人的供体年龄选择和取材部位选择方面可能也会存在所提取的细胞产量和活性具有一定的差别,这需要在下一步的研究中去证实。

【参考文献】

- [1] ZUK P A, ZHU Min, MIZUNO H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies [J]. *Tissue Eng*, 2001, 7(2): 211 - 228.
- [2] DE UGARTE D A, MORIZONO K, ELBARBARY A, et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow [J]. *Cells Tissues Organs*, 2003, 174: 101 - 109.
- [3] WICKHAM M Q, ERICKSON G R, GIMBLE J M, et al. Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2003, 412: 196 - 212.
- [4] GAUSTAD K G, BOQUEST A C, ANDERSON B E, et al. Differentiation of human adipose tissue stem cells using extracts of rat cardiomyocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 314: 420 - 427.
- [5] KRISTINE M. Safford, neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 294: 371 - 379.
- [6] AUST L. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates [J]. *Cytotherapy*, 2004, 6(1): 7 - 14.
- [7] 刘相名, 杨立业, 苗宏生, 等. 脂肪组织来源的多能干细胞培养和外源基因的表达 [J]. *中华实验外科杂志*, 2002, 20(2): 162 - 163.
- [8] 余方圆, 卢世璧, 袁 枚, 等. 兔脂肪干细胞的分离培养及定向诱导为软骨细胞的实验观察 [J]. *中国临床康复*, 2004, 8(11): 2042 - 2043.
- [9] 周虎田, 徐如祥, 姜晓丹, 等. 脂肪干细胞向神经细胞分化的研究现状 [J]. *中华神经医学杂志*, 2005, 4(3): 309 - 311.
- [10] 杨惠林, 耿德春, 王骏骅, 等. 脂肪基质干细胞培养及其定向分化为成骨细胞、软骨细胞特性的研究 [J]. *中华骨科杂志*, 2006, 26(10): 690 - 694.
- [11] 董晓红, 雷永红, 付小兵, 等. 脂肪干细胞向表皮细胞表型分化的研究 [J]. *中华整形外科杂志*, 2007, 23(2): 151 - 153.
- [12] ZUK P A, ZHU Min, ASHJIAN P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells [J]. *Mol Biol Cell*, 2002, 13(12): 4279 - 4295.

【责任编辑:李 弘】