文章编号：1000-5404(2008)13-1219-04

论著

脂肪来源干细胞体外成骨诱导和成脂诱导分化

黄　宏，朱方强，孙宏振，冯帅南，王正国，朱佩芳，张　波　（第三军医大学大坪医院野战外科研究所第四研究室，创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室，重庆 400042）

摘　要：目的　探讨脂肪组织来源的多能干细胞（adipose tissue-derived stromal cells，ADSCs）的多向分化潜能。**方法**　取小香猪腹部皮下脂肪组织，通过Ⅰ型胶原酶消化、离心等步骤分离培养 ADSCs，经过原代培养和传代培养。分别加入成骨诱导剂和成脂诱导培养。经过倒置显微镜观察诱导后细胞形态变化，并通过 Gomori 改良钙钴法、von Kossa 染色和油红 O 染色对其成骨细胞和脂肪细胞表型进行鉴定，进一步比较细胞的转化率。**结果**　ADSCs 呈成纤维细胞样贴壁生长，其经成骨、成脂诱导培养 2 周后形态、体积发生明显改变。Gomori 改良钙钴法染色显示其细胞质内富含碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，ALP）颗粒，诱导后 15 d 和 19 d，ALP 阳性细胞分别为（25.0 ± 7.5）% 和（49.7 ± 6.9）%，von Kossa 染色表明聚集的细胞团中央能形成钙化结节；倒置显微镜，成脂诱导 3、7、14 d 后脂肪细胞转化率分别为（22.3 ± 12.5）%、（49.6 ± 7.1）% 和（89.4 ± 9.3）%。油红 O 染色可见细胞质内出现橙红色脂滴，14 d 油红 O 染色阳性率高达（92.5 ± 9.1）%。**结论**　ADSCs 经体外诱导培养后可向成骨细胞和脂肪细胞分化，并具有明显的成骨和成脂表型，表明 ADSCs 具有多向分化潜能。

关键词：干细胞；脂肪组织；脂肪来源干细胞；脂肪细胞；成骨细胞；细胞分化
中图法分类号：R322.71；R329.21；R329.24　　**文献标识码：**A

Differentiation of swine adipose tissue-derived stromal cells into adipocytes and osteoblasts *in vitro*

HUANG Hong, ZHU Fang-qiang, SUN Hong-zhen, FENG Shuai-nan, WANG Zheng-guo, ZHU Pei-fang, ZHANG Bo (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 4, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective　To investigate the multilineage differentiation capacity of mesenchymal stem cells isolated and cultured from swine adipose tissue. Methods　Adipose tissue-derived stromal cells (ADSCs) were obtained from adipose tissue of swine abdominal wall. The cells presented fibroblast-like in the culture medium. Adipose tissue was minced and digested with collagenase type Ⅰ. The obtained cells were plated and expanded in DMEM/F12 medium. Then the cells were cultivated in osteoblast-inducing culture medium, and osteoblast phenotype was assayed with Gomori and von Kossa staining. The passage cells were cultured in adipogenisis medium and stained with Oil Red O for identification. The cells were observed with inverted microscope each day. Results　ADSCs grew as adherent cells and presented fibroblast-like *in vitro*, and could stably proliferate and be passed. Polygon-shaped cells were characterized by large size with a relatively large nucleus and plenty of cytoplasm after osteoblast-inducing. The cells changed from fibroblast-like into ellipse after adipogenisis-inducing cultivation. There were a lot of alkaline phosphatase (ALP) particles by Gomori staining. After induced for 15 and 19 d, positive cells for ALP were (25.0 ± 7.5)% and (49.7 ± 6.9)%, respectively. Von Kossa staining demonstrated the formation of mineralized nods in extracellular matrix. Under the inverted microscope, there existed significant lipid drops around the cell nucleus after adipogenisis-inducing cultivation for 2 d. The adipocytes rate on day 3, 7 and 14 was (22.3 ± 12.5)%, (49.6 ± 7.1)% and (89.4 ± 9.3)%, respectively. After 14 d of adipocyte inducing, about (92.5 ± 9.1)% cells displayed accumulation of lipid vacuoles, as detected by Red Oil O. Conclusion　ADSCs isolated and cultured from swine adipose tissue can be induced to be osteo-inducing and adipogenisis, suggesting that the cells have the multilineage differentiation.

Key words: stem cells; adipose tissue; adipocytes; osteoblasts; differentiation

---

基金项目：国家重点基础研究发展规划项目（"973"项目）（2005CB522603）
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, 2005CB522603)
作者简介：黄　宏，女，重庆市人，博士，副研究员，主要从事创伤修复的基础与临床方面的研究，发表论文 30 余篇。电话：(023)68757460，E-mail：huanghongcq@163.com
通信作者：张　波，E-mail：zhangbo@hotmail.com
收稿日期：2007-07-11　**修回日期：**2007-10-26

种子细胞是体外构建工程组织、器官最为重要的因素。理想的种子细胞需满足3个基本前提：①具有特定的分化表型或定向分化潜能；②可靠的细胞来源；③不引发移植排斥反应。脂肪来源干细胞是近年来从脂肪组织中分离得到的一群多能干细胞(adipose tissue-derived stromal cells，ADSCs)，不仅来源丰富，对患者损伤较小，且易于从自身获取，满足种子细胞应具备的3个前提。目前研究已证实：ADSCs与骨髓基质的间充质干细胞(marrow mesenchymal stem cells，MSCs)具有相同的表面黏附因子和受体分子及多向种分化潜能。同样也能分化为脂肪细胞、软骨细胞、成骨细胞和成肌细胞[1,2]。这种细胞有可能替代MSCs，成为组织工程种子细胞新的重要来源[3,4]。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Ⅰ型胶原酶、异丁基甲基黄嘌呤、胰岛素、地塞米松、L-抗坏血酸和β-甘油磷酸钠等试剂购自美国Sigma公司；胎牛血清(FBS)和DMEM/F12培养基购自美国HyClone公司，胰酶购自美国Gibco公司。

1.2 ADSCs的分离及原代培养

成年雄性小香猪体质量18 kg(第三军医大学实验动物中心提供)，用速眠新0.1 ml/kg麻醉后，备皮、消毒，取腹部正中切口长约5 cm，无菌切取皮下脂肪。用消毒三蒸水将脂肪组织块洗涤3次，以洗去表面多量的红细胞，再用生理盐水洗涤3次。剪碎，加入3倍体积的0.075% Ⅰ型胶原酶，37 ℃消化60 min并不断振动或搅拌。消化完全的脂肪组织呈粘糊状态，加入等体积含有10%胎牛血清的培养基，中和多余的胶原酶；用50目的滤网过滤，滤液加入10 ml离心管中，800×g离心10 min弃上清。用DMEM/F12培养基(含10%胎牛血清，100 U/ml青霉素，100 μg/ml链霉素)重悬细胞，细胞种植密度约为8 000/cm^2，接种于25 cm^2塑料培养瓶中，置37 ℃、5% CO_2的饱和湿度的细胞培养箱中，24 h换液1次，基本上完全清除红细胞，以后每3～4天换液。原代细胞培养7～10 d即可融合，待贴壁细胞达到80%～90%汇合后，用含0.25%胰蛋白酶和1 mmol/L乙二胺四乙酸(EDTA)消化，以1∶3的比例传代。用第4～7代ADSCs进行实验。

1.3 脂肪ADSCs的成骨诱导培养

取第3代细胞，当细胞贴壁生长达80%融合时，用含体积分数10% FBS及10^{-7} mol/L地塞米松，10 mmol/L β-甘油磷酸钠和50 mg/L左旋抗坏血酸的DMEM/F12培养基中进行成骨诱导培养。另设置一组对照，不加入成骨诱导试剂。用倒置显微镜分别观察各孔中细胞的形态学变化及鉴定相应的成骨诱导表型。倒置显微镜下观察、照相，随机选取10个非重叠视野(×200)，计算脂肪细胞占总细胞数的比例。

1.4 脂肪ADSCs的成脂诱导培养

取第3代细胞，细胞生长达100%汇合后进行诱导。加入成脂诱导剂用含体积分数10% FBS及1 μmol/L地塞米松，10 μmol/L胰岛素(0.01 mg/ml)，200 μmol/L吲哚美辛和0.5 mmol/L异丁基甲基黄嘌呤(IBMX)的DMEM/F12培养基诱导培养3 d，再用维持脂肪细胞生长的培养基(含10% FBS，0.01 mg/ml胰岛素的H-DMEM)培养2 d。如此诱导3个循环后，在维持细胞生长的培养基中继续培养5 d。对照组仅用维持培养基。

1.5 脂肪ADSCs诱导培养后成骨、成脂细胞表型鉴定

取成骨诱导15、19 d的细胞，后将细胞爬片取出，PBS简单清洗后用纯丙酮固定15 min，Gomori改良钙钴法染碱性磷酸酶(alkaline phosphatase，ALP)，用Von Kossa法染细胞团内的钙化结节[5]。

成脂诱导14 d后细胞爬片用PBS洗涤3次，10%甲醛-钙固定10～15 min，60%异丙醇媒染，油红O染色30 min，60%异丙醇分色洗去多余染液，蒸馏水洗，淡苏木精(常用液1∶5稀释)复染核，流水充分漂洗10 min，甘油明胶封片。显微镜下观察、照相，光镜观察随机数字表法取10个非重叠视野(×200)，计算脂肪细胞占总细胞数的比例。

2 结果

2.1 原代脂肪ADSCs的一般形态观察

细胞接种时，培养物中混有多量红细胞，随培养时间的延长，这些红细胞随换液次数的增多而被清除。接种后24 h内，部分细胞已贴壁，细胞体积小，开始伸展。72 h后，细胞已完全伸展，细胞主要有2种形态：一种为成纤维样细胞或梭形，通常两端有较长的突足，部分细胞有3～4个突起；另一种细胞呈扁平不规则形态或多角形，突起较粗大。核居中，有1～2个核仁。贴壁细胞开始分裂增殖，增殖细胞圆形，折光性增强。1周后，细胞汇合成单层，排列出现方向性。传代后细胞呈克隆性生长，随传代次数的增加以梭形细胞为主。

2.2 脂肪ADSCs成骨诱导培养的形态观察

ADSCs经成骨诱导培养2 d后，细胞呈多中心、放射状排列，位于中心的细胞体积增大，而周围细胞仍呈长梭形状。诱导后第3～7天，倒置显微镜下观察其形态由梭形转变为卵圆形或多角形，细胞形态均一，体积明显增大(较原型增大2～3倍)，细胞质丰富，细胞器发达，细胞核增大，核仁增多。诱导7 d，细胞体积增大更明显，扁平突起变短，细胞增殖明显，细胞质内颗粒状物质增多，有些细胞团的中央可见棕色物质。对照组细胞形态变化不大，仍为梭形。

2.3 脂肪ADSCs成骨诱导培养后成脂培养的形态观察

ADSCs经成脂诱导3 d，倒置显微镜观察细胞由梭形变为变成圆形或多角形，体积增大，最为特征的改变是细胞呈多极突起，且突起细长，非常类似神经细胞形态，小部分细胞质内开始出现很小的折光性很强的脂滴，主要位于核周。诱导后7 d，部分细胞脂滴增多，有的脂滴聚集成较大的脂泡，脂肪细胞呈灶状分布。诱导后14 d，绝大部分细胞已变成脂肪细胞，细胞多呈圆形或椭圆形，细胞质内可见大量脂滴(图1)。对照组中也可见到个别细胞质内出现脂滴。倒置显微镜下观察，成脂诱导3 d的脂肪细胞转化率为(22.3±12.5)%，第7天为(49.6

±7.1)%,第 14 天为(89.4±9.3)%。

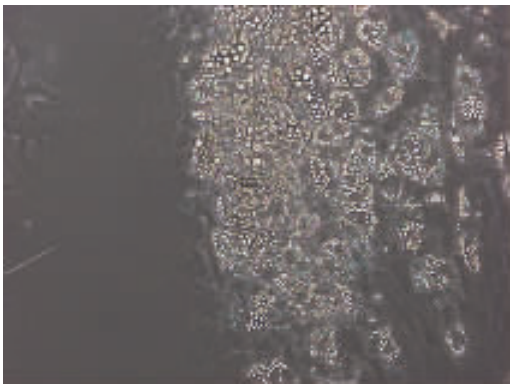


图 1　成脂诱导 14 d 后的 ADSCs 形态观察　(倒置显微镜×200)

2.4　ADSCs 成骨诱导培养后成骨、成脂表型鉴定

连续成骨诱导培养的 ADSCs,经 Gomori 改良钙钴法染色显示其细胞质内富含碱性磷酸酶(ALP)颗粒,ALP 颗粒为黑色,主要分布于细胞质内(图 2)。碱性磷酸酶阳性细胞的比例为:诱导后 15 d 为(25.0±7.5)%,19 d 为(49.7±6.9)%,对照组 Gomori 改良钙钴法染色阴性;von Kossa 染色阳性表明聚集的细胞中央能形成钙化结节(图 3)。而对照组 von Kossa 染色阴性。

油红 O 染色鉴定脂肪细胞中含大小不等的脂肪滴,脂滴被染成橙红色,细胞核为蓝色(图 4)。经诱导 14 d 后,大多数 ADSCs 转化为脂肪细胞,脂肪细胞为(92.5±9.1)%。对照组光镜下观察和油红 O 染色见个别细胞质内有脂滴。



图 2　成骨诱导 19 d 的 ADSCs 染色结果　(Gomori ×200)

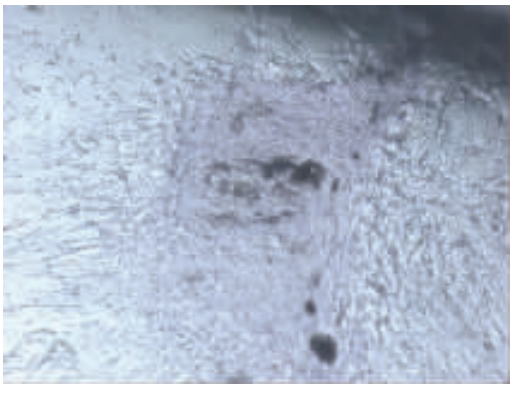


图 3　成骨诱导 19 d 的钙结节染色结果　(von Kossa ×200)

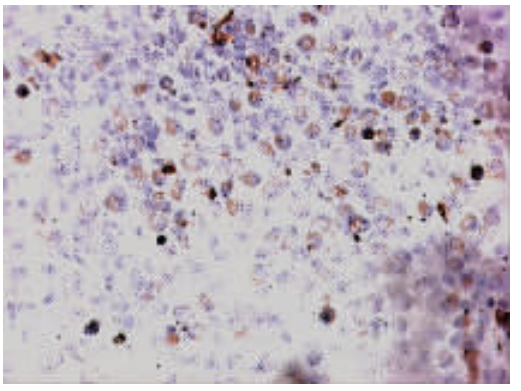


图 4　成脂诱导 14 d 后 ADSCs 细胞质内的脂滴染色结果(油红 O 染色×200)

3　讨论

种子细胞、支架材料和细胞与材料的相互作用是组织工程学研究的重点。其中种子细胞是组织工程研究中最基本也是首要的环节。目前研究认为:骨髓基质间充质干细胞(marrow mesenchymal stem cells,MSCs)是组织工程种子细胞的重要来源,它具有高度增殖能力及多向分化潜能,可定向分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肌肉细胞和神经细胞等[4],为此越来越引起人们的关注。临床上已经有应用 MSCs 来进行疾病治疗的相关报道[5-7]。新近研究提示:在脂肪组织中也存在一种有类似 MSCs 的多能干细胞 ADSCs,不仅具有自我更新和多向分化潜能,而且与 MSCs 具有相同的表面黏附因子和受体分子[2,4,8]。由于脂肪组织容易大量获得,来源充足,患者易接受,自体移植无免疫排斥反应,不涉及医学伦理学问题。因此,ADSCs 有可能替代 MSCs,成为组织工程新的种子细胞的重要来源[4]。有望为创伤修复和整形外科提供一条新的途径。

到目前为止,尚没有发现 ADSCs 的特异性标志,对其进行鉴定比较困难。本实验成功地诱导 ADSCs 分化为成骨细胞和脂肪细胞,可以作为 ADSCs 鉴定的一条间接途径,同时,也进一步验证 ADSCs 的多向组织分化潜能。

经成骨诱导剂(地塞米松、β-甘油磷酸钠和左旋抗坏血酸)培养基诱导分化 19 d,约有 50% 的细胞碱性磷酸酶呈阳性表达,碱性磷酸酶是成骨细胞的特异性标志物;同时,von Kossa 染色表明呈克隆性生长的细胞中央有钙结节(主要含磷酸钙、碳酸钙)形成。实验结果表明经过体外成骨诱导培养的 ADSCs 具有成骨细胞的生物学特性,由此进一步证明 ADSCs 具有向成骨细胞分化的能力。这与文献[1,9]报道是一致的。因此,ADSCs 有可能取代 MSCs 成为组织工程骨

理想的种子细胞。

本研究经成脂诱导剂(地塞米松、胰岛素、吲哚美辛和IBMX)培养基诱导培养2 d后,倒置显微镜下就可见少部分细胞核周有细小的脂肪滴出现,随着诱导时间的延长,脂滴逐渐增多增大而具有折光性。同时,油红O染色也证实了脂滴的存在,诱导14 d后,大多数ADSCs转化为脂肪细胞,脂肪细胞占90%以上。实验结果表明:在不同的诱导条件下,ADSCs不仅能够向成骨细胞分化,而且,还能向脂肪细胞分化,ADSCs具有多向分化潜能。据文献[9]报道ADSCs使传至第15代仍具较强向脂肪细胞定向分化的能力,而骨髓来源的MSC在传代3次后其定向脂肪细胞分化的能力即大大减弱,提示ADSCs细胞在脂肪细胞定向分化方面较MSCs有更好的潜能,可能是整形外科组织工程生物填充材料首选的种子细胞。

此外,在我们的实验过程中还发现2个现象:在ADSCs传代培养至5~6代时,在传代细胞中出现一种与神经细胞形态极为相似的细胞,而非梭形,该细胞占1%~2%,细胞体积较ADSCs小,突起多、细而长,有2级或多极分枝突起。并且发现这种细胞随传代次数的增加有分裂增多的趋势;另外,ADSCs在蛋白浓度低的培养基中,可以自发地向脂肪细胞转化,不经诱导而细胞质内出现脂滴,脂滴逐渐增多、增大。这些现象提示我们:ADSCs可能是各种干细胞的混合细胞群,也就是说ADSCs的这种多向分化能力可能是组成ADSCs的细胞中存在多种具有分化潜能的前体细胞,这些前体细胞包括如前脂肪细胞、前成骨细胞、前成软骨细胞和前神经细胞等。切除的脂肪组织经消化后离心形成的ADSCs细胞中不仅含有前脂肪细胞,还含有前成骨细胞、前成软骨细胞和前神经细胞等,在特定诱导条件下,这些细胞发生增殖、分化,而不是多能干细胞向脂肪细胞、成骨细胞分化的结果。这些前体细胞在体外环境下培养,某些因素如培养基的某些成分、胰酶、EDTA和生物力学改变等因素都可能成为诱导因子,诱导并启动与细胞表型相关的特异性基因表达,因此,这些前体细胞各自朝着自己终末细胞方向分化,这可能是我们实验中观察到在没有诱导剂作用的情况下,传代的ADSCs中也出现神经形态样细胞和脂肪细胞的原因。也有报道不同的组织/器官中存在着各种干细胞的混合群体[10-12]。另外,文献[13]报道:传代培养的ADSCs能在体外分化为神经元,表达神经细胞相关的标志物巢蛋白(nestin)、神经微丝(GFAP)和神经元特异性烯醇化酶(NSE),nestin是目前较常应用的神经干细胞的标志物,NSE是神经元的标志物,这两种标志物的表达证明ADSCs中的某些细胞可以表达神经细胞的表型,对治疗中枢神经系统疾病具有潜在的应用价值。

ADSCs来源于中胚层,而体外研究证明ADSCs可以分化为神经元样细胞,神经细胞属于外胚层来源,从中胚层来源的细胞能够向外胚层分化,表明ADSCs有跨胚层分化的能力,或者更确切地说ADSCs含有多胚层干细胞,甚至内胚层干细胞,但这有待于进一步证实。容易获得、来源充足、体外增殖快速、无免疫排斥及无需永生化等优势已经预示了ADSCs具有广泛的应用前景。但对于ADSCs分化来的各种组织特异性细胞移植入体内后,是否能长时间存活?是能否分泌生物活性蛋白、发挥相应功能?尚需进一步探讨。

参考文献:

[1] Rodriguez A M, Elabd C, Amri E Z, *et al*. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells[J]. Biochimie, 2005, 87(1): 125-128.

[2] Nakagami H, Morishita R, Maeda K, *et al*. Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy[J]. J Atheroscler Thromb, 2006, 13(2): 77-81.

[3] Strem B M, Hicok K C, Zhu M, *et al*. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells[J]. Keio J Med, 2005, 54(3): 132-141.

[4] Lee R H, Kim B, Choi I, *et al*. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue [J]. Cell Physiol Biochem, 2004, 14(4-6): 311-324.

[5] Katz A J, Tholpady A, Tholpady S, *et al*. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells[J]. Stem Cells, 2005, 23(3): 412-423.

[6] Bruder S P, Kurth A A, Shea M, *et al*. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells [J]. J Orthop Res, 1998, 16(2): 155-162.

[7] Mahmood A, Lu D, Wang L, *et al*. Treatment of traumatic brain injury in female rats with intravenous administration of bone marrow stromal cells[J]. Neurosurgery, 2001, 49(5): 1196-1204.

[8] De-Ugarte D A, Morizono K, Elbarbary A, *et al*. Comparison of multilineage cells from human adipose tissue and bone marrow[J]. Cells Tissues Organs, 2003, 174(3): 101-109.

[9] Boquest A C, Shahdadfar A, Fronsdal K, *et al*. Isolation and transcription profiling of purified uncultured human stromal stem cells: alteration of gene expression after *in vitro* cell culture[J]. Mol Biol Cell, 2005, 16(3): 1131-1141.

[10] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, *et al*. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284 (5411): 143-147.

[11] Lemischka I. A few thoughts about the plasticity of stem cells[J]. Exp Hematol, 2002, 30(8): 848-852.

[12] Holden C, Vogel G. Stem cells. Plasticity: time for a reappraisal? [J]. Science, 2002, 296(5576): 2126-2129.

[13] 杨立业,刘相名,孙 兵,等. 脂肪组织源性基质细胞表达神经元表型的实验研究[J]. 中华神经医学杂志, 2002, 1(1): 45-48, 28.

(编辑 吴培红)