

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.25.020

小鼠脂肪干细胞分离培养方法*

蒋婷¹, 杨泽龙², 白倩¹, 张兰芳¹, 雷英¹, 周广东³, 刘伟³

(1. 川北医学院第二临床学院/南充市中心医院烧伤整形美容外科, 四川南充 637000; 2. 川北医学院第二临床学院/南充市中心医院骨科, 四川南充 637000; 3. 上海交通大学医学院附属第九人民医院整形外科/上海市组织工程重点实验室 200011)

摘要:目的 建立一种简单高效的小鼠脂肪干细胞分离培养方法, 为小鼠模型中间充质干细胞研究提供充足的细胞来源。
方法 体外分离小鼠腹股沟皮下脂肪组织, 应用 0.1% 胶原酶 NB4 消化, 含 10% FBS 的低糖 DMEM 培养基贴壁培养小鼠脂肪干细胞, 并对其细胞形态、体外增殖能力、多向分化潜能及表面标记进行分析研究。**结果** 体外分离培养的小鼠脂肪干细胞具有良好的细胞形态、极强的增殖能力, 体外经三向诱导, 具有成脂、骨及软骨分化潜能, 表面标记 CD34、CD105 阳性, Sca-1 高表达, 不表达 CD45 及 SSEA-1。**结论** 利用该实验方法, 能培养出高纯度、具有良好干性及极强增殖能力的小鼠脂肪干细胞。

关键词: 小鼠; 脂肪干细胞; 分化潜能; 表面标记

中图分类号: Q813.1

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)25-3322-03

Isolation and culture methods of mouse adipose-derived stem cells*

Jiang Ting¹, Yang Zelong², Bai Qian¹, Zhang Lanfang¹, Lei Ying¹, Zhou Guangdong³, Liu Wei³

(1. Department of Burn and Plastic Surgery, Nanchong Municipal Central Hospital/Second Clinical College of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China; 2. Department of Orthopedics, Nanchong Municipal Central Hospital/Second Clinical College of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China; 3. Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, School of Medicine Shanghai Jiaotong University/Shanghai Key Laboratory of Tissue Engineering, Shanghai 200011, China)

Abstract: Objective To establish a simple and effective method for isolation and culture of mouse adipose-derived stem cells (mASCs) in vitro, in order to provide the sufficient sources of seed cells for the research of mesenchymal stem cells. **Methods** The mouse inguinal fat tissues were isolated in vitro and performed a digestion with 0.1% collagenase type NB4, then adipose-derived stem cells (ASCs) were seeded and adhered to the culture dishes in low glucose DMEM containing 10% fetal calf serum. The cellular morphology, in vitro proliferation capacity, multidifferentiation potential and immunophenotype were assessed. **Results** The mASCs showed good cell morphology, extremely strong proliferation capacity and potential of adipogenesis, osteogenesis and chondrogenesis via in vitro three-dimensional induction. The cellular surface antigen phenotype was consistent with that reported by literature, and the expression of CD34 and CD105 was positive, Sca-1 was highly expressed, CD45 and SSEA-1 were not expressed.

Conclusion Using the experimental methods in this research can culture the high purity of mASCs with the excellent stem cell properties and extremely strong proliferative ability.

Key words: mouse; adipose-derived stem cells; differentiation potential; immunophenotype

成体干细胞因其分布广、增殖力强且具有多分化潜能而成为当前组织工程种子细胞研究的重点。成体干细胞可来源于骨髓、脂肪、皮肤、肌肉、角膜等各类组织。其中以骨髓间充质干细胞(bone marrow stem cells, BMSCs)研究最多, 应用最广。随着研究的不断深入, 脂肪干细胞(adipose-derived stem cells, ASCs)逐渐被人们发现并广泛研究。1994年, Kaplan等^[1]报道了患者皮下脂肪组织存在异位成骨的现象, 提出脂肪前体细胞具有成骨细胞分化的潜能。Zuk等^[2]于2001年从脂肪抽吸物的上层脂肪组织中成功分离培养出具有骨、软骨、脂肪、肌肉等多向分化潜能的细胞。同年, Gronthos等^[3]对脂肪抽吸物培养细胞的表面标记进行了系统的研究, 结果表明这些脂肪细胞具有与骨髓间充质干细胞相似的表面抗原表达, CD29、

CD105、CD106、CD166等干细胞相关表面抗原均有一定的阳性率, 并明确指出脂肪干细胞的确存在, 脂肪干细胞的概念由此正式提出。此后人们对脂肪干细胞作了大量的研究^[4-6], 但主要集中于人来源的ASCs, 对小鼠脂肪组织来源的ASCs研究相对较少。小鼠是医学研究领域常用的实验动物之一, 本实验室以小鼠为动物模型进行了大量的研究, 应用脂肪干细胞进行多种组织工程化组织构建, 需要大量优质的种子细胞。本研究以小鼠作为试验动物模型, 拟建立一种简单高效的体外分离培养小鼠脂肪干细胞(mouse adipose-derived stem cells, mASCs)的方法, 对其表面标志和多向分化潜能进行鉴定, 为进一步分析小鼠脂肪干细胞的生物学特性提供实验依据, 现报道如下。

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81301568)。 作者简介: 蒋婷(1976—), 博士, 副主任医师, 主要从事整形外科临床及基础研究。

1 材料与方 法

1.1 动物与试剂 6~8 周龄 C57BL/6 雌雄小鼠(上海斯莱克实验动物有限责任公司)。胶原酶 NB4 (Serva 公司), DMEM(HyClone 公司), 胎牛血清(SAFC Bioscience 公司), TGF- β 3、BMP6 及 IGF1(R&D 公司), II 型胶原抗体(NeoMarkers 公司), 流式抗体(eBioscience 公司)。

1.2 mASCs 体外分离与培养 实验小鼠断颈处死后浸泡于 75%乙醇中 15 min, 无菌条件下切取收集双侧腹股沟脂肪组织。将收集的脂肪组织剪碎后置于 50 mL 的离心管内, 加入适量的氯霉素浸泡 15 min(以没过脂肪组织为宜)后 2~3 倍体积的 PBS 冲洗 3 次。选择离心半径 11.5 cm, 速度为 1 500 r/min 离心 5 min 后弃上清液, 再加入 5 倍体积的 0.1%胶原酶 NB4, 将离心管置于 37 °C 恒温汽浴摇床内消化 1.5~2.0 h, 150 目无菌网筛滤去未被消化的残余组织。选择离心半径 11.5 cm、速度为 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 细胞沉淀用 PBS 洗涤 2 次, 以同前参数再次离心弃上清液, 收集所获得的细胞计数并按 1×10^5 个/cm² 的密度, 将其种植于培养皿内, 加入低糖 DMEM 培养液(含 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素)。置于培养箱中培养, 每 3 天换液, 待细胞生长达到 90%融合时消化传代。用 0.25%胰蛋白酶消化后接种于新的培养皿, 传代接种的细胞密度为 $(0.5 \sim 1.0) \times 10^4$ 个/cm²。当再次达到 90%融合时, 继续传代培养。

1.3 生长曲线 分别取第 2、8 代 mASCs, 消化, 制备成浓度为 1×10^4 个/mL 单细胞悬液。将细胞悬液按每孔 1 mL 的量接种于 24 孔培养板内, 并将其分为 8 组, 每组 3 孔。接种培养后第 1 天用 0.25%胰蛋白酶消化第 1 组, 制成细胞悬液 1 mL, 加入 PBS 液 19 mL 稀释成 20 mL 的细胞悬液, 对其进行计数并取平均值。此后每天消化一组并按同样的方法计数取平均值, 至第 8 天结束。将所获得的数据绘制生长曲线, 并计算群体倍增时间。

1.4 表面标记流式分析 用流式细胞仪对第二代细胞的表面特异性抗原进行检查。0.1%胰蛋白酶消化待检细胞, 收集细胞, 离心 5 min(1 500 r/min), 弃培养液, PBS 重悬, 过单细胞滤网, 将其制成单细胞悬液, 血细胞计数仪计数, 调整细胞浓度为 $(0.5 \sim 1.0) \times 10^6$ 个/mL, 吸取 1 mL 细胞悬液加入 1.5 mL eppendorf 管中, 离心, 将沉淀细胞用 100 μ L 1%BSA 重悬, 加入 0.5 μ L 待检抗体, 4 °C 孵育 30 min, 离心, PBS 冲洗。最后细胞用 4%多聚甲醛固定, 样品用流式细胞仪分析鉴定。分别设实验组、同型对照组、空白对照组。每组标本 3 例, 取平均值。

1.5 体外分化潜能检测 第 2 代 mASCs, 按 1×10^4 个/孔的密度接种于 24 孔板, 进行成脂、成骨及成软骨诱导。成脂诱导液配制参考文献[7], mASCs 经诱导 2 周后进行油红染色; 成骨诱导液及成软骨诱导液配制参考文献[7], mASCs 分别诱导 4 周后进行茜素红染色以观察钙盐沉积情况; 行 II 型胶原免疫组化染色观察 II 型胶原的分泌情况。

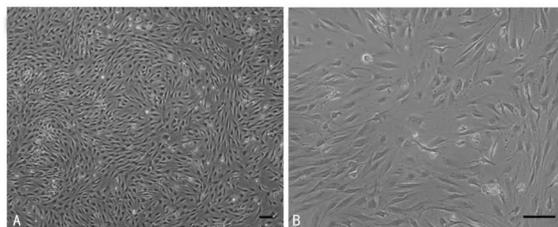
1.6 特殊染色及免疫组化染色 油红染色: 细胞经 4%甲醛 4 °C 固定 1 h, 蒸馏水冲洗, 加入 60%异丙醇, 室温放置 1 min, 吸尽后加入 2%油红试剂(wt/vol), 室温放置 5~10 min, 60%异丙醇洗去多于染液, 蒸馏水冲洗后观察。

Alizarin Red 染色: 细胞经 70%冷乙醇 4 °C 固定 1 h, 蒸馏水冲洗 3 遍, 茜素红染液室温作用 10 min, 蒸馏水冲洗多余染液, 倒置相差显微镜观察拍照。

II 型胶原免疫组化染色: 细胞经 4%多聚甲醛 4 °C 固定 10~15 min, PBS 冲洗 3 min, (0.25% Triton-100, 5% DMSO-PBS) 穿膜处理 10 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 非特异性抗原封闭, 加入 II 型胶原抗体 4 °C 过夜, 抗小鼠二抗 37 °C 孵育 30 min, PBS 冲洗 3 min, DAB 显色, 封片, 镜检拍照。

2 结 果

2.1 倒置相差显微镜下观察细胞的生长及形态学特点 原代分离的小鼠脂肪干细胞呈体积较小的圆球形, 1~2 h 开始贴壁生长, 6 h 左右细胞伸展开来, 呈短梭形, 胞体可形成具有较强折光性的细胞外基质, 高倍镜下细胞轮廓清晰(图 1)。5 d 左右达到 90%以上汇合状态时传代, 传代接种的细胞密度为 $(0.5 \sim 1.0) \times 10^4$ 个/cm², 传代后细胞增殖迅速, 常于传代后 3 d 再次接近汇合状态。传代到第 10 代仍有很强的增殖能力。



A: $\times 40$; B: $\times 100$; 标尺: 100 μ m。

图 1 倒置相差显微镜下观察 mASCs 的原代细胞形态

2.2 生长曲线 生长曲线显示培养的第 2、8 代细胞均具有很强的分裂增殖能力, 均存在 24 h 停滞生长期, 第 3~4 天体外扩增速度相似, 为对数增殖期。而在第 6 天时第 2、8 代细胞生长均处于停止状态。该研究结果表明, mASCs 第 2、8 代细胞传代接种后的潜伏期、对数生长期、平台期无显著差异(图 2), 群体倍增时间大约为 48 h, 传 10 代后细胞无明显的衰老征象。

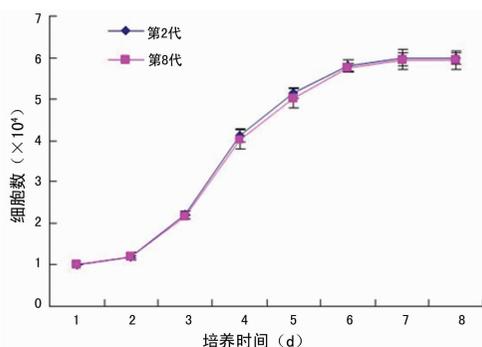


图 2 生长曲线

2.3 流式细胞仪检测结果 第 2 代小鼠脂肪干细胞表达 CD34(10.97 ± 2.03)%、CD105(11.78 ± 1.56)%、CD133(1.63 ± 0.38)%, 高表达 Sca-1(80.57 ± 5.71)%, 几乎不表达 CD45(0.07 ± 0.03)%、SSEA-1(0.02 ± 0.01)%。

2.4 体外分化潜能检测 成脂诱导 7 d 左右, 镜下观察有脂滴出现, 随着诱导时间的延长, 脂滴逐渐增多, 变大, 2 周时停止诱导, 油红染色显示脂滴呈桔红色(图 3A); 对照组无脂滴出现, 油红染色呈阴性(图 3B)。成骨诱导 4 周行茜素红染色, 诱导组有钙结节形成, 染色呈红色(图 3C); 对照组染色呈阴性

(图 3D)。成软骨诱导 6 d 左右,诱导组有部分细胞聚集成小球状,非诱导组则无,诱导 4 周时 II 型胶原免疫组化染色诱导

组表达软骨特异基质 II 型胶原,染色呈棕色(图 3E),对照组无阳性染色出现(图 3F)。

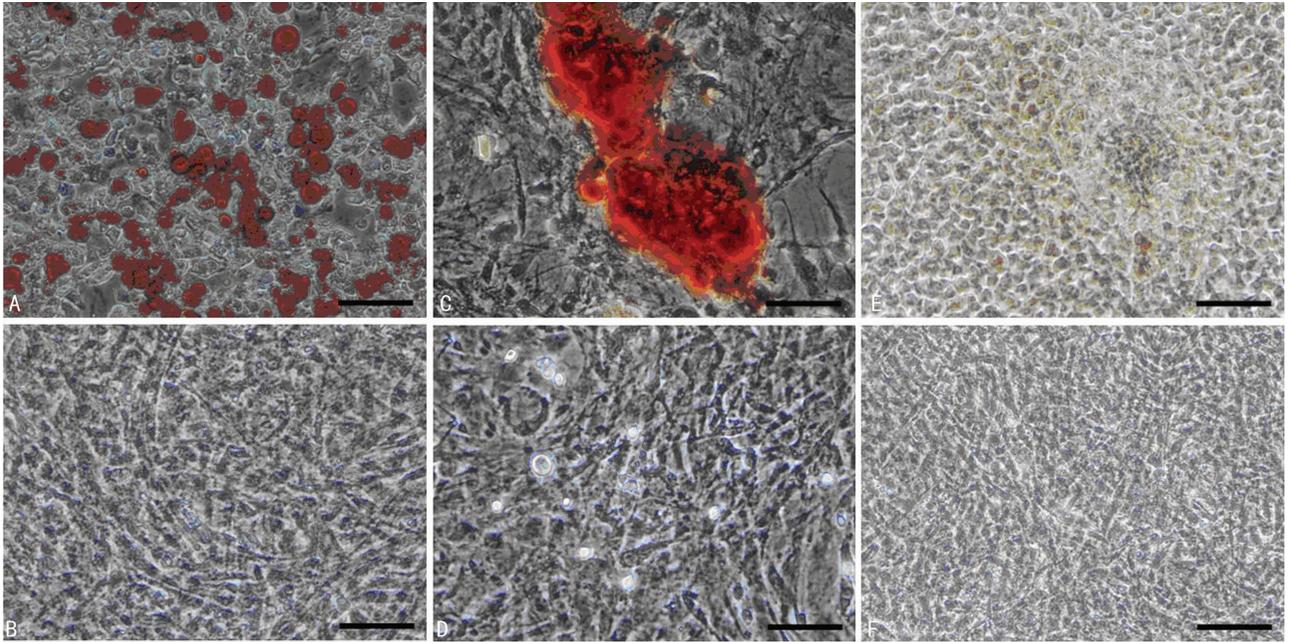


图 3 mASCs 体外分化潜能检测(×100)
A:油红染色诱导组;B:油红染色非诱导组;C:茜素红染色诱导组;D:茜素红染色非诱导组;E:II型胶原染色诱导组;F:II型胶原染色非诱导组;标尺:100 μm。

图 3 mASCs 体外分化潜能检测(×100)

3 讨 论

组织工程技术是目前最有前景的生理性修复技术。然而,种子细胞来源不足、功能老化等问题严重限制了其发展与应用。脂肪干细胞因其体内分布广,取材创伤小,细胞获得量大且扩增能力强等优点,已成为一种有希望的种子细胞。研究表明,脂肪间充质干细胞在体外特定条件下可分化为多种细胞类型及表达间充质干细胞相关抗原^[8-11]。小鼠动物模型取材方便,可重复性强,便于有关基础研究的实施等优点目前应用广泛。小鼠脂肪干细胞分离培养方法主要参照人脂肪干细胞,目前通常采用 I 型胶原酶进行消化^[12-14]。脂肪组织主要是由大量脂肪细胞集聚而成,疏松结缔组织将成群的脂肪细胞分隔成许多脂肪小叶。疏松结缔组织中含有除 I 型胶原外的多种胶原纤维及蛋白多糖和糖蛋白等,本研究应用胶原酶 NB4(包含 I 型胶原酶,II 型胶原酶和中性蛋白酶)消化小鼠腹股沟皮下脂肪组织,组织消化更完全,细胞获得量更大。小鼠脂肪干细胞培养基通常为 DMEM/F12 加胎牛血清(5%或 10%)^[15-16],本法采用低糖 DMEM 加 10%胎牛血清,贴壁培养,细胞增殖迅速,体外多次传代仍保持较强的增殖能力。原代分离的小鼠脂肪干细胞呈集落状生长,传代后的细胞生长速度较原代细胞明显增快,体外多次传代后仍保持较强的增殖能力。通过测定小鼠脂肪干细胞的生长曲线,证实其体外培养时分裂增殖能力强,潜伏期较短。本研究进一步鉴定该分离培养方法所获得的细胞表面标记及多向分化潜能,以证实其干细胞特性。对小鼠脂肪干细胞进行成脂诱导后,油红染色胞质中脂滴呈桔红色,成骨诱导后有钙结节形成,成软骨诱导后表达软骨特异基质 II 型胶原,表明其具有向脂肪、骨及软骨分化潜能。经流式细胞

仪鉴定,CD34、CD105 阳性,Sca-1 高表达,不表达 CD45 及 SSEA-1,其具有与文献报道相似的表面标记^[15]。在人脂肪干细胞中,CD105 与软骨分化潜能具有高度相关性^[17],本法获得的小鼠脂肪干细胞第 2 代 CD105 表达量为(11.78±1.56)%,其与软骨潜能相关性有待进一步证实。结果表明,本研究从小鼠脂肪组织中分离到的间充质干细胞具有多向分化潜能,及与文献报道相一致的表面标记。本分离培养方法操作简单、易于推广、细胞获得量大、质量优良,能很好地满足组织构建对种子细胞量大质优的需求。

参考文献:

- [1] Kaplan FS, Hahn GV, Zasloff MA. Heterotopic ossification: two rare forms and what they can teach us[J]. J Am Acad Orthop Surg, 1994, 2(5): 288-296.
- [2] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies [J]. Tissue Eng, 2001, 7(2): 211-228.
- [3] Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, et al. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells[J]. J Cell Physiol, 2001, 189(1): 54-63.
- [4] Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, et al. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates[J]. J Cell Physiol, 2006, 208(1): 64-76.
- [5] Mcintosh K, Zvonice S, Garrett S, et al. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal(下转第 3328 页)

异常,无法依据 1 次检查结果诊断为高血压、糖尿病。

综上所述,该校教师眼睛健康状况不乐观,眼科普查应被重视;健康危险因素较多,以代谢综合征危险因素为主,应针对该人群,特别是男性教职工开展超体质量、血脂异常、血糖异常、血压升高的健康知识教育,同时倡导健康的生活方式,加强体育锻炼等主动预防措施。

参考文献:

- [1] 张虎祥,田宇,杨建文. 高校教师心理健康与体育锻炼的相关研究[J]. 中国健康心理学杂志,2008,16(10):1081-1083.
- [2] 曹蔚. 对高校教师健康体检的实证分析[J]. 现代预防医学,2012,39(5):1193-1195.
- [3] 武留信,强东昌,师绿江. 人体健康测量与指标体系[J]. 中华健康管理学杂志,2010,4(6):326-329.
- [4] 卫生部. 健康体检项目目录[EB/OL]. (2010-06-20) [2013-10-12]. <http://www.hdwj.gov.cn/Health/201111251059231580.html>.
- [5] 卫生部. 健康体检管理暂行规定[EB/OL]. (2010-02-22) [2013-10-12]. <http://www.sdwsjd.gov.cn/ind-ex.html>.
- [6] 董景五. 疾病和有关健康问题的国际统计分类 ICD10 [M]. 北京:人民卫生出版社,2008:346-1351.
- [7] 葛坚. 眼科学[M]. 北京:人民卫生出版社:2000:84,123,223,280.
- [8] 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 酒精性肝病诊断标准[J]. 中华肝脏病杂志,2003,11(2):

72.

- [9] 陈春明,孔灵芝. 中国成人超重和肥胖症预防控制指南 [M]. 北京:人民卫生出版社,2006:1-3.
- [10] 中国高血压防治指南修订委员会. 中国高血压防治指南 2010[J]. 中华心血管病杂志,2011,39(7):581-585.
- [11] 耿兴桂. 现代电脑办公作业的人体疲劳因素研究[D]. 南京:南京林业大学,2004.
- [12] 孙华明,唐尉杰,向颖,等. 某军医大学 2007~2009 年校直干部体检结果分析[J]. 第三军医大学学报,2011,33(16):1777-1778.
- [13] 李清华. 重庆科技学院北校区教职工健康状况调查分析 [J]. 重庆医学,2006,35(7):667-668.
- [14] 王晓琼,王永红,刘正淑. 重庆市高校教工 3 669 人健康状况分析[J]. 重庆医学,2007,36(9):867-869.
- [15] 陆建平,唐洁仆,陶敏芳,等. 某高校职工健康体检 7 767 例结果分析[J]. 中国临床保健杂志,2011,14(2):154-156.
- [16] 李心芳,何晓东,周竹梅. 高校教职工健康现状分析与健康教育对策[J]. 中国校医,2003,17(3):229-230.
- [17] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2010 年版)[J/CD]. 中国医学前沿杂志:电子版,2011,3(6):93.
- [18] 罗蓉,王永红,王小林. 重庆市成人居民血脂异常的分布特点[J]. 重庆医科大学学报,2010,35(7):1086-1088.

(收稿日期:2014-04-08 修回日期:2014-05-07)

(上接第 3324 页)

- changes in vitro[J]. Stem Cells,2006,24(5):1246-1253.
- [6] Halvorsen YD, Franklin D, Bond AL, et al. Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells [J]. Tissue Eng,2001,7(6):729-741.
- [7] 蒋婷,张莹莹,刘伟,等. MesenPRO RS Medium 对人脂肪干细胞增殖与分化的影响[J]. 组织工程与重建外科杂志,2009,5(5):241-244.
- [8] Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, et al. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002,290(2):763-769.
- [9] Bacou F, el Andaloussi RB, Daussin PA, et al. Transplantation of adipose tissue-derived stromal cells increases mass and functional capacity of damaged skeletal muscle[J]. Cell Transplant,2004,13(2):103-111.
- [10] 李战梅,刘康,冯刚,等. 生长分化因子 5 促进脂肪干细胞成软骨分化的实验研究[J]. 西部医学,2010,22(8):1380-1384.
- [11] Mitchell JB, McIntosh K, Zvonice S, et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in

stromal-associated and stem cell-associated markers[J]. Stem Cells,2006,24(2):376-385.

- [12] 张自强,金岩,李裕强,等. 犬脂肪间充质干细胞体外分离培养及其多向分化潜能[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2007,11(42):8524-8527.
- [13] 郝丹,段显琳,毕晓娟,等. 小鼠脂肪源干细胞分离培养和成骨诱导前后造血调控因子的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2012,16(1):51-55.
- [14] Yu G, Wu X, Kilroy G, et al. Isolation of murine adipose-derived stem cells[J]. Methods Mol Biol,2011(702):29-36.
- [15] Yamamoto N, Akamatsu H, Hasegawa S, et al. Isolation of multipotent stem cells from mouse adipose tissue[J]. J Dermatol Sci,2007,48(1):43-52.
- [16] 刘寿生,雷俊霞,黎阳,等. 小鼠脂肪间充质干细胞的分离培养及生物学特性分析[J]. 中山大学学报:医学科学版, 2012,33(3):299-304.
- [17] Jiang T, Liu W, Lv X, et al. Potent in vitro chondrogenesis of CD105 enriched human adipose-derived stem cells [J]. Biomaterials,2010,31(13):3564-3571.

(收稿日期:2014-03-15 修回日期:2014-05-12)