

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.04.007

2 型糖尿病患者脂肪间充质干细胞成脂肪分化能力的实验研究

李素燕¹, 陈倩雅², 邱友燕¹, 蒋 婵¹

(广东省广州市增城区人民医院:1. 内分泌科;2. 肿瘤内科 511300)

[摘要] **目的** 探讨 2 型糖尿病(T2DM)患者与健康者脂肪间充质干细胞(ADSCs)成脂肪分化能力。**方法** 取 T2DM 患者与健康者脂肪组织,分离培养出 ADSCs。取第 3 代细胞接种,比较两组细胞细胞表型及生长速度的差异。加入成脂肪诱导液,观察两组细胞成脂肪分化情况,于第 14 天加入油红 O 对细胞进行染色并观察,用异丙醇对油红 O 进行萃取并比较两组细胞吸光度值,通过实时荧光定量(PCR)法比较两组细胞成脂肪分化 14 d 时 PPAR- γ 、C/EBP- α 和 C/EBP- β 的表达水平。**结果** T2DM 患者和健康者 ADSCs 在细胞表型及生长速度方面比较差异无统计学意义($P>0.05$),成脂肪诱导分化 14 d 时 T2DM 患者 ADSCs 油红 O 吸光度值明显高于健康者 ADSCs,T2DM 患者 ADSCs PPAR- γ 、C/EBP- α 、C/EBP- β 表达水平明显高于健康者 ADSCs。**结论** T2DM 患者 ADSCs 成脂肪分化能力明显高于健康者,其可能是 T2DM 患者容易并发肥胖的原因之一。

[关键词] 糖尿病,2 型;脂肪间充质干细胞;成脂肪分化**[中图分类号]** R587.1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)04-0456-04

Experimental research of adipogenic differentiative ability of adipose tissue-derived stromal cells in patients with type 2 diabetes mellitus

LI Suyan¹, CHEN Qianya², QIU Youyan¹, JIANG Chan¹

(1. Department of Endocrinology; 2. Department of Oncology, Zengcheng District

People's Hospital, Guangzhou, Guangdong 511300, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the adipogenic differentiative ability of adipose tissue-derived stromal cells(ADSCs) between the patients with type 2 diabetes mellitus(T2DM) and healthy persons. **Methods** The adipose tissues were taken from the adipose tissue in T2DM patients and healthy persons for separating and culturing ADSCs. The cells of third generation were taken for inoculation. The difference in cellular phenotype and growth speed were compared between the two groups. Adding adipogenesis inducing fluid, the adipogenic differentiative situation was observed in the two groups. The oil red O was added on 14 d for conducting the cell staining and observation. The oil red O was extracted by isopropanol, and the cellular absorbances were compared between two groups. Meanwhile, the expression of PPAR- γ , C/EBP- α and C/EBP- β on 14 d of adipogenic differentiation were compared between two groups by using qPCR method. **Results** The cellular phenotype and growth speed of ADSCs had no statistical difference between T2DM patients and healthy persons. On 14 d of adipogenic differentiation, the oil red O absorbance value of ADSCs in T2DM patients was significantly higher than that in the healthy persons, and the expression of PPAR- γ , C/EBP- α and C/EBP- β were significantly higher than those in the healthy persons. **Conclusion** The adipogenic differentiative ability of ADSCs in T2DM patients is obviously higher than that in healthy persons, which may be one of causes easy to be obese in T2DM patients.

[Key words] diabetes mellitus, type-2; adipose tissue-derived stromal cells; adipogenic differentiation

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是指由多种病因引起的以慢性高血糖为特征的代谢紊乱性疾病,其中 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)以胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞功能障碍为特征。肥胖是 T2DM 的独立危险因素,有研究表明,中国 T2DM 患者的肥胖发病率明显升高^[1],且 T2DM 患者肥胖发病率与总体人群相比明显提高^[2]。然而,目前 T2DM 患者肥胖发病率升高的病因尚未明确。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是指来源于中胚层的具有多向分化潜能的一类多能干细胞,是干细胞家族的重要成员之一。脂肪 MSDs(adipose-derived MSCs, ADSCs)是指存在于脂肪组织的多能干细胞,具有向成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞等分化的多向分化能力,在临床和组织工程学中得到了广泛的研究^[3-4]。然而,作为人体脂肪组织的主要来源细胞,ADSCs 在 T2DM 患者中

的成脂肪分化能力尚少有相关报道。本研究探讨 T2DM 患者来源的 ADSCs 成脂肪分化能力,可为 T2DM 患者肥胖发病率的升高提供理论依据和研究基础。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂 胎牛血清(FBS)、0.25%胰酶细胞消化液、DMEM 培养基、青霉素链霉素溶液(Gibco 公司,美国);抗人 CD105、CD14、CD29、CD34、CD44、CD45、CD90、人类白细胞抗原 DR(HLA-DR)抗体(Becton Dickinson 公司,美国);PBS(上海博谷生物科技有限公司);油红 O、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)、重组人胰岛素、地塞米松、吡嗪美辛(Sigma 公司,美国);I 型胶原酶(MP Biomedicals 公司,美国);Cell Counting Kit-8 试剂盒(CCK-8,日本);异丙醇、75%乙醇(广州化学试剂厂);Trizol 裂解液、荧光定量 PCR 管(Invitrogen 公

司,美国);qPCR 引物(上海英潍捷基贸易有限公司);SYBR Premix Ex Taq、逆转录试剂盒(Takara 公司,日本);培养瓶、离心管、6 孔培养板、移液器枪头、EP 管、PCR 管(上海樊克公司);移液枪(Brand 公司,德国);CO₂ 细胞培养箱、离心机、酶标仪、PCR 仪(Thermo Fisher 公司,美国);倒置相差显微镜(Olympus 公司,日本);流式细胞仪(Becton Dickinson 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 ADSCs 的分离和培养 脂肪组织标本取自广州市增城区人民医院普外科 9 例非糖尿病患者(视为健康者作为对照组)和 9 例 T2DM 患者(T2DM 组)腹部手术腹部皮下脂肪组织,患者年龄 40~60 岁,无感染,未患恶性肿瘤、其他内分泌及全身代谢性疾病。本研究已获得医院医学伦理委员会批准,患者已签署知情同意书。无菌条件下取出脂肪组织 20 mL 后,用 PBS 冲洗 3 次,去除表面结缔组织及血管,用眼科剪将其剪碎。加入等体积含 10%FBS,0.1% I 型胶原酶 DMEM 培养基在 37 °C、5%CO₂ 培养箱中消化 12 h。消化结束后 100 目筛网过滤,250 g 离心 5 min,除去上清液,用完全培养基(含 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素)重悬细胞,接种于 25 cm² 培养瓶中,置于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养,每 3 天换液 1 次,当细胞达到 90%融合以上进行传代,取第 3 代细胞进行后续实验。

1.2.2 观察细胞形态及生长曲线 光镜下观察两组细胞从原代至第 3 代生长形态。用 0.25%胰酶将第 3 代 ADSCs 消化离心后以 5×10³ 个/孔密度接种于 96 孔培养板中,24 h 贴壁后于第 1~10 天加入 10 μL CCK-8 溶液,4 h 后测量其在 450 nm 的吸光度(OD)值。以培养时间为横坐标,OD 值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.2.3 检测细胞表型 用胰酶将生长良好的两组细胞消化后,250 g 离心 5 min,除去上清液,用 PBS 重悬成 100 μL 浓度为 1×10⁶/L 的细胞悬液并装入流式管中。每管分别加入 3 μL 抗人 CD105、CD14、CD29、CD34、CD44、CD45、CD90、HLA-DR 抗体,常温下避光孵育 30 min 后,用 PBS 冲洗,250 g 离心 5 min 后用 200 μL 的 PBS 重悬,流式细胞仪检测细胞相应表型的表达情况。

1.2.4 观察细胞成脂分化情况 将生长良好的两组细胞消化离心并以 1×10⁵ 个/孔细胞数量接种于 6 孔板中,24 h 贴壁后加入成脂肪诱导 DMEM 培养基(含 0.5 mmol/L IBMX、10 μg/mL 重组人胰岛素、1 μmol/L 地塞米松、200 μmol/L 吡哆美辛、10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素),在 37 °C、5%CO₂ 的培养箱中培养,每 3 天进行半量换液。第 7 天开始细胞在光镜下可见有脂肪液泡形成,第 14 天镜下可见明显脂肪液泡形成,弃去培养基,用 0.4%多聚甲醛对细胞进行固定后,用油红 O 染色并在光镜下观察细胞染色情况。PBS 洗涤 3 次后加入异丙醇,充分震荡至染色脂滴全部脱落,转移至 96 孔板后在 490 nm 波长下测定其 OD 值,异丙醇标定。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 检测 对两组细胞进行成脂肪诱导 14 d 后,用 Trizol 裂解液裂解细胞并提取总 RNA,测定 RNA 纯度及浓度,取 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.8~2.0 的 RNA 进行进一步实验。参考逆转录试剂盒说明书将 RNA 逆转录成 cD-

NA。采用 20 μL 反应体系,其中 SYBR Premix Ex Taq 10 μL、去离子水 8.5 μL、cDNA 0.5 μL 及上下游引物(引物上下游序列见表 1)各 0.5 μL。PCR 扩增条件:起始 95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 20 s,72 °C 延伸 20 s,共 40 个循环。扩增完毕得到的 Ct 值通过扩增动力学曲线方程计算 2^{-ΔΔCt},得到相对表达量。

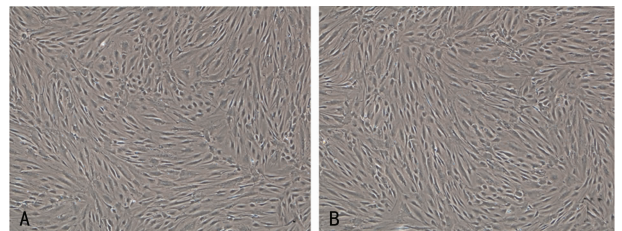
1.3 统计学处理 采用 SPSS21.0 统计软件进行分析,实验重复 3 次取平均值,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用非配对 t 检验,检验水准取双侧 $\alpha=0.05$,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

表 1 qPCR 引物上下游序列(5'-3')

基因	引物序列
PPAR-γ	GATGCCAGCGACTTTGACTC(F)
	ACCCACGTTCATCTTCAGGGA(R)
C/EBP-α	GCGGGAACGCAACAACATC(F)
	GTCACTGGTCAACTCCAGCAC(R)
C/EBP-β	CTTCAGCCCGTACCTGGAG(F)
	GGAGAGGAAGTCGTGGTGC(R)

2 结果

2.1 两组 ADSCs 细胞形态及生长曲线比较 原代细胞培养 24 h 后开始贴壁,最初贴壁细胞呈椭圆形,后贴壁细胞逐渐增多,细胞从椭圆形逐渐变成梭形。随着细胞分裂增殖,约 10 d 后原代细胞可长满 25 cm² 培养瓶。传代后细胞增殖速度加快,两组第 3 代 ADSCs 为均一的成纤维细胞样形态,光镜下未见明显区别(图 1)。第 3 代 ADSCs 生长曲线均呈 S 形,生长潜伏期为 1~2 d,对数增殖期为 3~6 d,第 7 天开始生长速度减慢,进入增殖平台期。两组 ADSCs 1~10 d OD 值比较,差异无统计学意义(P>0.05),见图 2。



A: 对照组; B: T2DM 组

图 1 第 3 代 ADSCs 光镜下形态(×40)

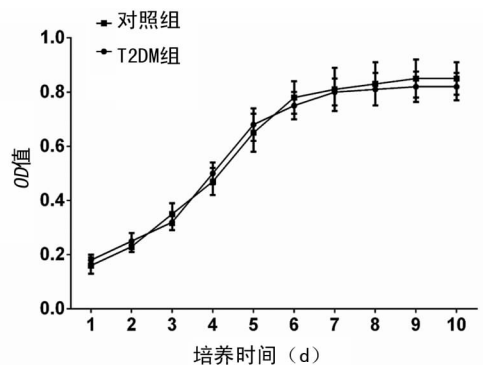


图 2 两组第 3 代 ADSCs 生长曲线比较

表 2 两组 ADSCs 表型表达率比较($\bar{x} \pm s, n=9, \%$)

组别	CD105	CD90	CD45	CD29	CD14	CD34	CD44	HLA-DR
对照组	96.71±1.38	97.33±0.81	96.74±2.55	95.83±2.15	0.16±0.11	0.28±0.22	0.19±0.21	0.41±0.27
T2DM 组	97.18±2.12	98.15±1.45	97.11±2.65	96.01±2.39	0.23±0.12	0.34±0.37	0.24±0.32	0.38±0.32

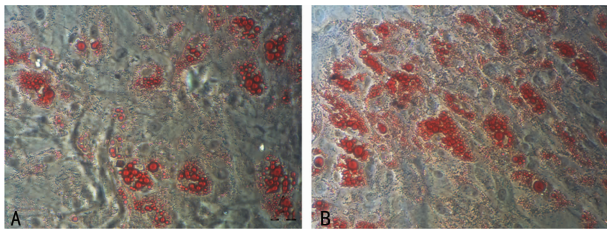
表 3 两组 ADSCs PPAR- γ 、C/EBP- α 、C/EBP- β mRNA 表达水平比较

组别	PPAR- γ mRNA		C/EBP- α mRNA		C/EBP- β mRNA	
	诱导前	诱导 14 d 后	诱导前	诱导 14 d 后	诱导前	诱导 14 d 后
对照组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
T2DM 组	1.05±0.12	5.56±0.71 ^a	0.95±0.11	3.29±0.33 ^a	1.03±0.08	3.16±0.43 ^a

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较

2.2 两组 ADSCs 表型鉴定 两组细胞均阳性表达 CD105、CD90、CD45、CD29, 阴性表达 CD14、CD34、CD44、HLA-DR, 两组比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 见表 2。

2.3 两组 ADSCs 成脂肪分化比较 成脂肪分化诱导第 7 天开始在光镜下可见 ADSCs 有脂肪液泡形成, 第 14 天镜下脂肪液泡形成明显增多, 油红 O 染色后可见脂肪液泡被染成红色, 且 T2DM 组脂肪液泡数量明显多于对照组(图 3)。用油红 O 染色提取法对两组 ADSCs 成脂肪分化进行定量分析, 发现 14 d 时对照组 OD 值为 0.721±0.112, T2DM 组 OD 值为 1.135±0.158, 两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。



A: 对照组; B: T2DM 组

图 3 两组 ADSCs 光镜下表现($\times 100$)

2.4 两组对象 ADSCs PPAR- γ 、C/EBP- α 、C/EBP- β mRNA 表达水平比较 成脂肪诱导前两组 PPAR- γ 、C/EBP- α 、C/EBP- β mRNA 表达水平比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。与对照组比较, 成脂肪诱导 14 d 后 T2DM 组 PPAR- γ 、C/EBP- α 、C/EBP- β mRNA 表达水平明显升高, 两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表 3。

3 讨论

随着我国经济的发展和人们生活方式的转变, 近年来我国 DM 发病率明显升高。2010 年中国国家疾病控制中心和中华医学会内分泌学分会调查了我国 DM 的患病情况发现, 18 岁以上人群 DM 患病率为 11.6%, 我国可能已成为世界上 DM 患病人数最多的国家^[5], DM 及其并发症给患者及社会带来了沉重的健康和经济负担。其中, T2DM 患者占 DM 患者的 60% 以上, 主要由胰岛素抵抗和胰岛素分泌不足引起^[6]。T2DM 患者肥胖发病率明显增高, 且随着体质量的增加, T2DM 并发症发生风险也会增加^[7]。但是, T2DM 患者肥胖发病率升高的病因尚未明确。

MSCs 具有多向分化及免疫抑制等特性, MSCs 的异常可

能与 DM 的发生、发展相关。多项实验和临床研究发现, MSCs 可提高患者胰岛素及 C 肽水平^[8], 有效降低糖化血红蛋白水平^[9], 甚至可有效促进 T2DM 患者慢性溃疡的愈合^[10]。上述研究不仅提示 MSCs 有望成为 T2DM 的治疗手段之一, 也从另一方面说明了 T2DM 患者体内 MSCs 水平存在异常, 可能参与到 T2DM 患者的疾病发生、发展中。有研究发现 T2DM 患者 ADSCs 免疫抑制能力下降, 可能与 T2DM 患者体内炎症水平的上升有关^[11]。同时, ADSCs 作为 MSCs 家族成员之一, 与人体脂肪形成密切相关。那么 ADSCs 是否参与到 T2DM 疾病发展过程中从而促进 T2DM 患者肥胖的发生呢? 于是作者提取并分离 T2DM 患者和健康者 ADSCs, 并对其生物学特性和成脂肪分化能力进行探讨。

拾莉等^[12]采用酶胶原消化法从 T2DM 患者的脂肪组织中分离出 ADSCs, 并成功对其免疫表型进行了鉴定, 成功将其诱导成脂肪细胞; 但该研究并未将 T2DM 患者 ADSCs 与健康者 ADSCs 进行比较。本研究对 T2DM 患者与健康者 ADSCs 进行比较, 发现 T2DM 患者与健康者 ADSCs 在细胞形态及生长速度方面无明显差异($P > 0.05$), 均阳性表达 MSCs 表型 CD105、CD90、CD45、CD29, 阴性表达造血干细胞表型 CD14、CD34、CD44、HLA-DR, 说明两组细胞均符合 MSCs 的鉴定标准^[13]。从第 7 天开始两组 ADSCs 开始向脂肪细胞分化, 通过油红 O 染色提取法发现第 14 天 T2DM 患者 ADSCs OD 值明显高于对照组($P < 0.05$), 说明第 14 天 T2DM 患者 ADSCs 成脂肪分化能力明显高于健康者。PPAR- γ 、C/EBP- α 、C/EBP- β 是脂肪细胞的重要标志基因^[14], 成脂肪诱导 14 d 后 T2DM 患者 ADSCs 上述基因表达水平明显高于健康者, 进一步说明了 T2DM 患者 ADSCs 成脂肪分化能力明显高于健康者 ADSCs。

T2DM 的发病部分是由于机体低水平慢性炎症反应导致^[15]。相关流行病学研究已经报道炎症因子如 C 反应蛋白, 肿瘤坏死因子- α , 白细胞介素-6, 白细胞介素-1 β 等表达水平在 T2DM 患者中明显提高^[16-19], 而且这些炎症因子的水平越高, 患者胰岛素抵抗程度越高, 从而导致机体对胰岛素敏感性越低, 最终发展成糖代谢异常^[20-21]。相关研究已表明炎症因子可明显提高 ADSCs 的成脂肪分化能力^[22]。所以, 本研究认为 T2DM 患者体内的低水平慢性炎症可能会通过提高机体内 ADSCs 的成脂肪分化能力, 从而促进更多的 ADSCs 向脂肪细胞分化, 最终加快肥胖的发生、发展。

综上所述,本研究成功从健康者和 T2DM 患者脂肪组织中提纯、培养及鉴定了 ADSCs,并进一步证明了 T2DM 患者 ADSCs 成脂肪分化能力明显高于健康者 ADSCs。下一步将通过体内实验及进一步的分子生物学研究来探讨 T2DM 患者 ADSCs 成脂肪分化能力明显高于健康者 ADSCs 的相关分子机制。

参考文献

- [1] XU Y, WANG L M, HE J, et al. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults[J]. *JAMA*, 2013, 310(9): 948-958.
- [2] HOU X H, LU J M, WENG J P, et al. Impact of waist circumference and body mass index on risk of cardiometabolic disorder and cardiovascular disease in Chinese adults: a national diabetes and metabolic disorders survey [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e57319.
- [3] 刘苹, 史春梦, 胡玲莉, 等. 脂肪源性干细胞无酶分离培养方法的研究[J]. *重庆医学*, 2014, 43(10): 1153-1156.
- [4] 廖怀伟, 韩超, 刘丽忠, 等. 富血小板血浆凝胶对脂肪干细胞修复皮肤软组织缺损创面的影响[J]. *重庆医学*, 2013, 42(32): 3859-3862.
- [5] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2013 年版)[J/CD]. *中国医学前沿杂志(电子版)*, 2015, 38(3): 26-89.
- [6] COLDITZ G A, WILLETT W C, ROTNITZKY A, et al. Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women[J]. *Ann Intern Med*, 1995, 122(7): 481-486.
- [7] 李启富. 2 型糖尿病的流行现状[J]. *重庆医学*, 2009, 38(18): 2265, 2268.
- [8] JIANG R H, HAN Z B, ZHUO G S, et al. Transplantation of placenta-derived mesenchymal stem cells in type 2 diabetes: a pilot study[J]. *Front Med*, 2011, 5(1): 94-100.
- [9] SKYLER J S, FONSECA V A, SEGAL K R, et al. Allogeneic mesenchymal precursor cells in type 2 diabetes: a randomized, Placebo-Controlled, Dose-Escalation safety and tolerability pilot study[J]. *Diabetes Care*, 2015, 38(9): 1742-1749.
- [10] BENITEZ-ARVIZU G, PALMA-LARA I, VAZQUEZ-CAMPOS R, et al. Autologous mesenchymal stem cells and cutaneous autograft as a treatment for chronic ulcer secondary to diabetes mellitus 2[J]. *Cir Cir*, 2015, 83(6): 532-536.
- [11] MANCINI O K, SHUM-TIM D, STOCHAJ U A, et al. Age, atherosclerosis and type 2 diabetes reduce human mesenchymal stromal cell-mediated T-cell suppression [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6(1): 140-140.
- [12] 拾莉, 张德明, 任思坡, 等. 糖尿病患者脂肪间充质干细胞的分离培养与鉴定[J]. *山东医药*, 2014, 54(42): 17-19.
- [13] YANG R, OUYANG Y, LI W P, et al. Autophagy plays a protective role in tumor necrosis factor- α -induced apoptosis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cells Dev*, 2016, 25(10): 788-797.
- [14] LI R G, LIANG L, DOU Y G, et al. Mechanical stretch inhibits mesenchymal stem cell adipogenic differentiation through TGF β 1/Smad2 signaling[J]. *J Biomech*, 2015, 48(13): 3665-3671.
- [15] SARANGI R, PADHI S, MOHAPATRA S, et al. Serum high sensitivity C-reactive protein, nitric oxide metabolites, plasma fibrinogen, and lipid parameters in Indian type 2 diabetic males[J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2012, 6(1): 9-14.
- [16] WEISBERG S P, MCCANN D, DESAI M, et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue[J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(12): 1796-1808.
- [17] XU H Y, BARNES G T, YANG Q, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance[J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(12): 1821-1830.
- [18] PEREGO L, PIZZOCRI P, CORRADI D, et al. Circulating leptin correlates with left ventricular mass in morbid (grade III) obesity before and after weight loss induced by bariatric surgery: a potential role for leptin in mediating human left ventricular hypertrophy[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(7): 4087-4093.
- [19] GUHA M, BAI W, NADLER J L, et al. Molecular mechanisms of tumor necrosis factor alpha gene expression in monocytic cells via hyperglycemia-induced oxidant stress-dependent and -independent pathways[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(23): 17728-17739.
- [20] CALLE M C, FERNANDEZ M L. Inflammation and type 2 diabetes[J]. *Diabetes Metab*, 2012, 38(3): 183-191.
- [21] KING G L. The role of inflammatory cytokines in diabetes And Its Complications[J]. *J Periodontol*, 2008, 79(8): 1527-1534.
- [22] POURGHOLAMINEJAD A, AGHDAMI N, BAHARVAND H, et al. The effect of pro-inflammatory cytokines on immunophenotype, differentiation capacity and immunomodulatory functions of human mesenchymal stem cells [J]. *Cytokine*, 2016, 85(1): 51-60.

(收稿日期: 2017-07-01 修回日期: 2017-09-06)