

[文章编号] 1007-3949(2009)17-03-0189-04

• 实验研究 •

体外培养成人脂肪间充质干细胞及向平滑肌细胞诱导分化

郭泽君¹, 边云飞², 薛君¹, 武卫东², 肖传实²

(山西医科大学 1. 第二临床医学院, 2. 第二医院心内科, 山西省太原市 030001)

[关键词] 人脂肪间充质干细胞; 转化生长因子 β ; 平滑肌细胞; 细胞分化

[摘要] 目的 体外培养成人脂肪间充质干细胞, 并应用转化生长因子 β 将脂肪间充质干细胞诱导分化为平滑肌细胞。方法 采用酶消化法和贴壁培养法分离培养脂肪间充质干细胞, 流式细胞仪对第 3 代和第 5 代细胞进行表面抗原检测, 对第 5 代细胞进行转化生长因子 β 诱导, 于诱导后第 10 天进行免疫化学鉴定。结果 体外培养的脂肪间充质干细胞呈扁平的长梭形, 细胞形态均一, 传代稳定。干细胞相关标志 CD29 和 CD44 表达阳性, 造血干细胞相关标志 CD34 随传代次数的增加由弱阳性逐渐转为阴性, 内皮细胞相关标志 CD31 表达阴性。流式细胞仪检测结果发现脂肪间充质干细胞中 G0/G1、S 和 G2/M 期的细胞分别占 90.14%、3.77% 和 6.09%。转化生长因子 β 定向诱导后倒置显微镜下观察细胞呈“峰”、“谷”样形态, 免疫荧光化学检测发现诱导组细胞 α -平滑肌肌动蛋白表达阳性。结论 成人脂肪组织中含有间充质干细胞, 且可在转化生长因子 β 诱导后分化为平滑肌细胞。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Biological Characteristics of Adult Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells and Their Differentiation into Smooth Muscle Cells in Vitro

GUO Ze-Jun¹, BIAN Yun-Fei², XUE Jun¹, WU Wei-Dong², and XIAO Chuan-Shi²

(1. The Second Clinical College of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001; 2. The Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

[KEY WORDS] Adult Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells; Transforming Growth Factor- β ; Smooth Muscle Cells; Cell Differentiation

[ABSTRACT] **Aim** To study the basic biological characteristics of adult adipose-derived mesenchymal stem cell (ADMSC) and the potential of differentiating into smooth muscle cells by chemical induction. **Methods** ADMSC were isolated and cultured from adult greater omentum adipose tissue in vitro. The morphological characteristics of cells were observed by the inverted microscope. The cell cycle and expression of CD29, CD31, CD34 and CD44 were detected by flow cytometry. The fifth passage cells were induced with 5 μ g/L transforming growth factor- β (TGF- β) to differentiate into smooth muscle cells. Then the immunohistochemistry method was used to identify smooth muscle cells. **Results**

The isolated and cultured ADMSC presented even fusiform shape and stably passaged during which ADMSC kept the same shape. ④ ADMSC expressed CD29 and CD44 but not CD34 or CD31 by flow cytometry. ④ The cell cycle studies revealed that there were 90.14% of the cells in G0/G1, 3.77% in S and 6.09% in G2/M. After 10 days induction by TGF- β , the cells assumed a spindle shape and a “hill-and-valley” growth pattern. The induced cells expressed characteristic α -smooth muscle actin (α -SMA) by immunohistochemistry. **Conclusion** Adult adipose tissues contain plenty of productive mesenchymal stem cells that can be easily isolated, cultured and differentiated into smooth muscle cells in vitro.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 性心脑血管疾病严重危害人类健康, 目前其发展呈逐年上升趋势。在我国因动脉粥样硬化引起的缺血性疾病如冠心病、脑缺血性疾病的发病率及死亡率已上升为首位, 成为危害人民健康的主要原因。血管内皮损伤后平滑肌细胞的迁移、增殖是动脉粥样硬化等增殖

性血管病变的病理基础。近来研究表明, 增生内膜的平滑肌细胞不仅来源于血管中膜, 也可来源于干细胞^[1], 而周围微环境被认为是影响干细胞分化的重要因素^[2,3]。因此, 研究干细胞动员、归巢及分化为血管平滑肌细胞的机制, 可为防治动脉粥样硬化等增殖性血管病变提供一种新的思路和方法。

[收稿日期] 2008-10-08

[修回日期] 2009-03-02

[作者简介] 郭泽君, 硕士研究生, 医师, 研究方向为冠心病临床诊断与治疗, E-mail 为 guozejun19820128@163.com。通讯作者肖传实, 主任医师, 研究方向为冠心病临床诊断与治疗, E-mail 为 ganxibaoshongxi@sina.com。边云飞, 博士, 主任医师, 研究方向为冠心病临床诊断与治疗。

1 材料与方法

1.1 主要材料

新鲜脂肪组织取自山西医科大学第二医院手术室, DMEM/F12 培养基 (hyclone), iv 型胶原酶 (sig-

ma), 胎牛血清 (hyclone), 胰蛋白酶和 PBS (sigma), 鼠抗人 CD29、CD31、CD34 和 CD44 (ebioscience), 人转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) (Peprotech), 兔抗人 α 平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 和 FITC 标记羊抗兔二抗 (博奥森), 5% CO₂ 恒温培养箱 (HERA), 倒置显微镜 (Nikon TS100), 荧光倒置显微镜 (Olympus IX50), 流式细胞仪 (FACSCalibur 美国 BD 公司)。

1.2 脂肪间充质干细胞的分离扩增

手术室无菌取大鼠网膜脂肪组织约 100 g 迅速移入超净台, 在超净台内去除包膜及血管组织, PBS 冲洗后剪碎至 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小, 加等体积的 0.1% iv 型胶原酶消化 1 h, 弃上层脂肪层, 100 目细胞筛过滤, 1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加培养基重悬底层细胞, 移至 25 mm² 塑料培养瓶中培养, 48 h 后首次换液, 后每 3 天换液一次, 细胞生长至 90% 汇合时消化, 按 1:3 比例进行传代。倒置显微镜于细胞接种日后逐日观察细胞形态学, 选取连续传代已纯化的第 3 代和第 5 代细胞进行下列实验。

1.3 脂肪间充质干细胞表面抗原检测

收集 90% 汇合的第 3 代和第 5 代脂肪间充质干细胞 (adipose-derived mesenchymal stem cell ADMSC), 用 0.25% 的胰蛋白酶和 EDTA 消化, 室温下 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入 PBS 5 mL 轻轻吹打混匀, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加 PBS 制备成单细胞悬液, 分别加入 FITC 和 PE 标记的鼠抗人抗体 CD29-PE、CD31-FITC、CD34-PE 和 CD44-FITC, 设立阴性对照, 流式细胞仪检测。

1.4 细胞周期测定

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 0.75 预冷乙醇固定后 4℃ 冰箱过夜, RNAseA 处理 30 min, PI 染色 10 min, 于流式细胞仪上 Cell-Quest 软件获得 11 000 个细胞, 用 ModFIT 软件分析细胞 DNA 含量。

1.5 诱导分化

取生长良好, 50% ~ 60% 汇合的第 5 代人 ADMSC, 在人 ADMSC 常规培养液 (DMEM/F12 培养基, 10% 胎牛血清) 中加入 TGF- β , 使 3 mL 培养液中 TGF- β 的终浓度为 5 μ g/L, 诱导 ADMSC 向平滑肌细胞分化, 持续 10 天。诱导期间, 每 3 天换液一次 (培养瓶内 TGF- β 终浓度保持不变)。对照组的 ADMSC 继续用干细胞常规培养液培养, 不加 TGF- β 处理。

1.6 细胞免疫荧光染色

取诱导第 10 天的细胞进行细胞爬片, 镜下观察

细胞长满玻片后即可取出进行实验。取出玻片后置入湿盒中, PBS 冲洗, 2 min × 3 次; 4% 多聚甲醛室温固定 30 min (或丙酮固定 5 min), PBS 冲洗, 2 min × 3 次; 1% TritonX-100 透膜 2 min, PBS 冲洗, 2 min × 3 次; 加兔抗人 α -SMA IgG 一抗, 4℃ 过夜, PBS 冲洗, 2 min × 3 次; 非特异性结合阻断剂阻断 30 min, PBS 冲洗, 2 min × 3 次; 加 FITC 羊抗兔 IgG 荧光二抗, 室温下避光 2 h, PBS 冲洗, 5 min × 4 次; 甘油封片, 指甲油封片周。即刻在荧光显微镜下观察。

1.7 统计学分析

数据采用 SPSS 11.0 软件进行统计学处理。进行完全随机设计的方差分析, 比较各处理因素之间的异同。

2 结果

2.1 脂肪间充质干细胞形态学观察

倒置显微镜观察细胞接种后呈大小不一的圆形悬浮于培养液中, 24 h 后出现少量贴壁细胞, 此时培养基中混有大量悬浮红细胞, 随培养时间的延长, 这些红细胞经数次换液而被清除。接种后 2 d 内, 体积较大的细胞已贴壁, 并开始伸展, 多呈成纤维样生长, 核居中, 有一、二个核仁。7~8 d 细胞汇合成单层生长, 部分贴壁细胞呈扁平状, 胞体较大, 形态不规则, 并有伪足伸出, 亦有少量细胞呈不规则三角形 (图 1A), 提示细胞成分并不纯; 连续传代 3 代后细胞得以纯化, 排列出现方向性, 呈“旋涡状”生长 (图 1B)。



图 1 原代培养的人脂肪间充质干细胞 (左) 和已纯化的第 3 代人脂肪间充质干细胞 (右, ×100)

2.2 脂肪间充质干细胞表面抗原检测

第 3 代和第 5 代 ADMSC 均高表达 CD29 和 CD44 而不表达 CD31、CD34 在第 3 代 ADMSC 中呈弱阳性表达, 第 5 代时转为阴性 (图 2)。

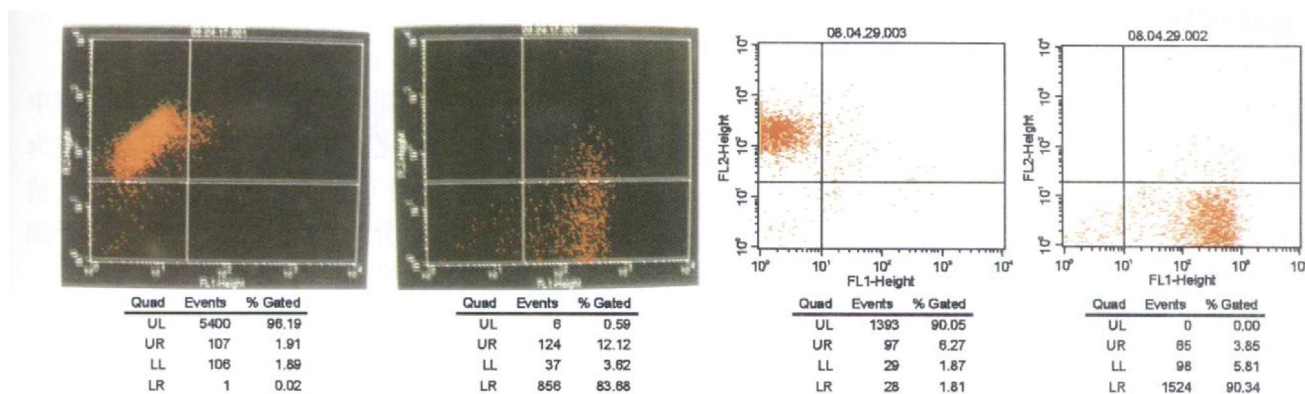


图 2 流式细胞仪检测第 3 代和第 5 代人脂肪间充质干细胞表面抗原 从左到右分别为第 3 代 CD29-PE 和 CD31-FITC 表达、第 3 代 CD34-PE 和 CD44-FITC 表达、第 5 代 CD29-PE 和 CD31-FITC 表达、第 5 代 CD34-PE 和 CD44-FITC 表达。

2.3 细胞周期

ADMSC 中 G0/G1、S 和 G2/M 期的细胞分别占 90.14%、3.77% 和 6.09%，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 (图 3)。

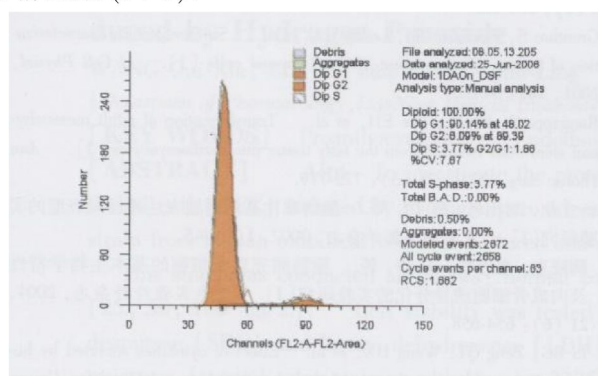


图 3 成人脂肪间充质干细胞细胞周期测定结果

2.4 诱导分化后光镜下细胞的变化

TGF- β 诱导组细胞在诱导后 1 周左右出现变化，细胞变得更狭长，由成纤维细胞状变为长梭状，胞膜清晰，无空泡，可重叠生长，汇合后细胞形成“峰”和“谷”状，呈良好的去分化状态 (图 4)。

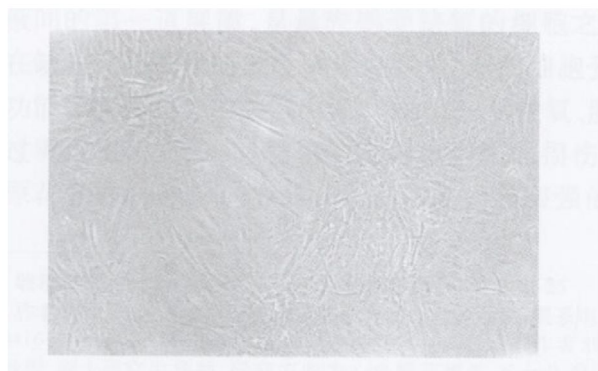


图 4 诱导组细胞汇合后形成“峰”和“谷”状 ($\times 100$)

2.5 免疫细胞化学

ADMSC 经 TGF- β 诱导后，免疫细胞化学检测诱导组中部分细胞 α -SMA 表达阳性，而未经诱导的对照组未发现 α -SMA 表达阳性细胞 (图 5)。

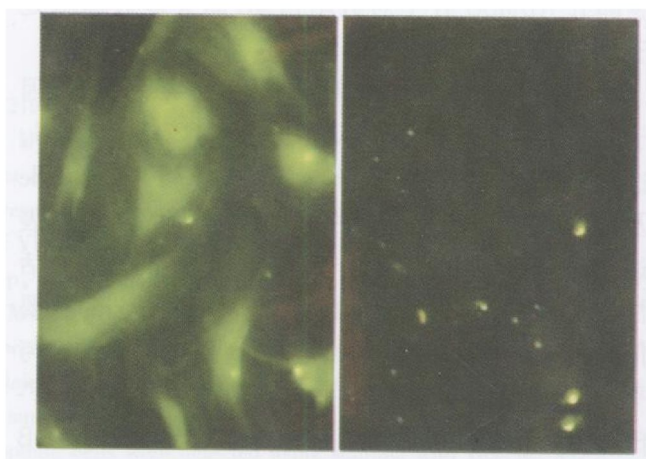


图 5 免疫细胞化学检测脂肪间充质干细胞 α 平滑肌肌蛋白表达 ($\times 200$) 左为诱导组，右为对照组。

3 讨论

间充质干细胞广泛存在于骨髓、上皮、肌肉、软骨等众多中胚层来源的组织器官中，在体外特定的诱导条件下可分化为骨、软骨、脂肪、肌肉、神经、肌腱和韧带等多种组织^[4-5]。由于其避免了胚胎干细胞移植所带来的伦理问题及免疫排斥反应，越来越受到人们的关注。2001 年，Zuk 等^[6]首次从脂肪抽吸物中成功分离培养出具有多向分化潜能的细胞。随后，Gronthos 等^[7]进一步证实脂肪来源细胞中的确存在具有间充质干细胞特性的细胞。自此以后，人们对 ADMSC 作了大量研究^[8-10]，ADMSC 逐渐成为 21 世纪世界医学研究的热点。

目前, ADMSC 分离方法多采用酶消化贴壁法, 主要通过脂肪抽吸术或皮下、大网膜等处的脂肪组织分离获得。本研究在 Zuk 等^[6]的分离方法上略加改进, iv 型胶原酶的浓度为 0.1%, 消化时间延长为 60 min, 获得较好的效果。研究中发现原代细胞混杂有少量圆形及卵圆形细胞, 考虑可能是来自于脂肪组织血管基质成分中的其它细胞, 但经 2~3 次传代后细胞在光镜下呈均一梭形生长。说明从脂肪组织分离的间充质干细胞成分并不纯, 但经传代后可在体外得以纯化。本研究通过对第 3 代和第 5 代细胞的表面抗原进行 ADMSC 鉴定, 发现 CD29 和 CD44 阳性, 证明细胞为干细胞, CD31 和 CD34 阴性排除了内皮细胞和造血干细胞的污染。而且流式细胞仪检测结果发现, CD29 和 CD44 的阳性率持续在 90% 以上, CD31 呈阴性表达, 随着传代次数的增加, CD34 逐渐由弱阳性转为阴性, 这与其它报道基本相符^[11], 说明本方法得到了较高纯度的干细胞。本研究还通过对 ADMSC 细胞周期的观察, 发现只有少部分 ADMSC 处于对数增殖期, 而大多数细胞处于静止期。

在平滑肌细胞体外培养过程中, 一系列生长因子对平滑肌特异的分子标志 α -SMA 具有调节作用, 这些生长因子包括肝素、Hexamethylene bisacetamide 及 TGF- β 等, 它们的存在可以维持 α -SMA 的高表达, 其中前两种因子的作用在于增强 TGF- β 的活性, 所以 TGF- β 是维持平滑肌细胞分化表型的重要信号分子。Grainger 等^[12]研究发现, TGF- β 浓度与平滑肌细胞 α -SMA 的表达量成正相关。同时, TGF- β 还能诱导非平滑肌细胞表达 α -SMA, 说明 TGF- β 在这些非平滑肌细胞向平滑肌细胞转化过程中起重要作用。本实验利用 TGF- β 的这一特性, 将其应用于人 ADMSC 的定向诱导分化, 成功将人 ADMSC 诱

导分化为平滑肌细胞, 并通过免疫荧光技术检测 α -SMA 对平滑肌细胞进行了鉴定。

综合以上实验结果, 我们认为成人脂肪组织中存在大量具有多向分化潜能的 ADMSC, 其取材较为简便, 体外易于分离并可进行迅速扩增。TGF- β 诱导后可向平滑肌细胞分化, 可望成为今后研究干细胞向平滑肌细胞分化机制的理想细胞来源。

[参考文献]

- [1] Sata M, Saito A, Kunisato A, et al. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Nat Med*, 2002, 8: 403-409.
- [2] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow [J]. *Nature*, 2002, 418 (6839): 41-49.
- [3] 冯学永, 马廉, 杨立业, 等. 丹参诱导人骨髓间充质细胞体外向神经细胞分化的研究 [J]. *医学研究生学报*, 2005, 18 (9): 862-862.
- [4] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cell [J]. *Science*, 1999, 284: 143-147.
- [5] Minguelli JJ, Erices A, Conget P, et al. Mesenchymal stem cell [J]. *Exp Med*, 2001, 226 (6): 507-520.
- [6] Zuk PA, Zhu M, Hedrick MH, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implication for cell-based therapies [J]. *Tissue Eng*, 2001, 7 (2): 211-228.
- [7] Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, et al. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells [J]. *J Cell Physiol*, 2001, 189: 54-63.
- [8] Rangappa S, Fen C, Lee EH, et al. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes [J]. *Ann Thorac Surg*, 2003, 75 (3): 775-779.
- [9] 杨立业, 刘相名, 孙兵, 等. 脂肪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.
- [10] 鞠晓东, 姜思权, 田华, 等. 脂肪间充质干细胞的基本生物学特性及向成骨细胞诱导分化的实验研究 [J]. *中华实验外科杂志*, 2004, 21 (6): 654-658.
- [11] Li BG, Zeng QT, Wang HX, et al. Effect of cytokines secreted by human adipose stromal cells on endothelial cells [J]. *J Huazhong Univ Sci Tech (Med Sci)*, 2006, 26 (4): 396-398.
- [12] Grainger DJ, Metcalfe JC, Grace AA, et al. Transforming growth factor- β dynamically regulates vascular smooth muscle differentiation in vivo [J]. *J Cell Sci*, 1998, 111 (19): 2977-988.

(此文编辑 许雪梅)