

两种培养基诱导人和大鼠脂肪干细胞 向脂肪细胞分化的比较

曹蕊, 吕涛, 严笠, 孙雪健, 肖苒

(中国医学科学院整形外科医院研究中心, 北京 100144)

【摘要】目的 比较两种培养基诱导人和大鼠脂肪干细胞(adipose-derived stem cell, ADSC)的成脂分化能力,探寻更为适宜的 ADSC 成脂诱导方案。**方法** 提取 3 例临床患者的脂肪干细胞(hADSCs)及出生 6 周大鼠的脂肪干细胞(rADSCs),将 hADSCs、rADSCs 分别接种于六孔板,分为未诱导组、成脂诱导 I 组和 II 组,分别使用普通培养基、成脂诱导培养基 I 和 II,培养 10 d 后以油红 O 染色,镜下观察及检测 490 nm 吸光度值(A490),比较脂滴形成情况。**结果** 未诱导的 hADSCs 和 rADSCs 均呈成纤维细胞样生长,成脂诱导培养 3 d 后出现脂滴;油红 O 染色显示,成脂诱导组脂滴呈橘红色,hADSCs 和 rADSCs 的成脂诱导 II 组形成的脂滴均明显大于诱导 I 组,统计学分析显示 hADSCs 的成脂诱导 II 组测得的 A490 明显高于诱导 I 组($P < 0.01$);而两组的 rADSCs 的 A490 无明显差异($P > 0.05$)。**结论** hADSCs 和 rADSCs 在两种诱导培养基中均可成脂分化,但成脂诱导 II 组优于成脂诱导 I 组。

【关键词】 人脂肪干细胞;大鼠脂肪干细胞;成脂诱导

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 02-0018-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.002.005

Comparison of adipogenic differentiation ability of adipose stem cells derived from humans and rats using two kinds of adipogenic culture media

CAO Rui, LV Tao, YAN Li, SUN Xue-Jian, XIAO Ran

(Research Center of Plastic Surgery Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100144, China)

【Abstract】 Objective To find a more appropriate method of adipogenic induction for adipose stem cells derived from humans and rats by comparing their adipogenic differentiation ability using two kinds of adipogenic culture media. **Methods** The human adipose stem cells (hADSCs) were extracted from lipoaspirates of 3 donors in the clinic, and the rat adipose stem cells (rADSCs) were obtained from adipose tissues of 6-week old rats. The cells were plated into two 6-well plates, and were divided into 3 groups: the negative control group, adipogenic induction group I and group II, respectively, two wells in each group. The control medium, adipogenic induction medium I and medium II were added into the cells of different groups, respectively. After induction for 10 days, the adipogenic differentiation ability of cells was assessed under microscope with oil red O staining and detecting the optical density value of 490 nm (A 490 nm) to compare the lipid droplet formation in the cells. **Results** The hADSCs and rADSCs showed a fibroblast-like growth. Positive oil

[基金项目] 国家自然科学基金(编号:81171817 / 30871433)。

[作者简介] 曹蕊(1966-),女,主管技师,研究方向:细胞生物学。E-mail: caorui660428@sina.com。

[通讯作者] 肖苒(1971-),女,教授,研究方向:干细胞与组织工程基础及应用研究 E-mail: rxiao163@163.com。

red O staining cells showed orange lipid in the cells of adipogenic induction group from the third day of culture. The amount of lipid in cells induced by adipogenic induction medium II was higher than that in cells induced by adipogenic induction medium I, the A490 nm optical density of hADSCs induced by adipogenic induction medium II was significantly higher than that induced by adipogenic induction medium I ($P < 0.01$), but there was no significant difference between the rADSCs induced by adipogenic induction medium I and II ($P > 0.05$). **Conclusions** Both hADSCs and rADSCs can be induced to adipogenic differentiation using the two kinds of induction media, however, the induction of adipogenic differentiation ability of the adipogenic induction medium II is stronger than that of the adipogenic induction medium I.

【Key words】 Adipose derived stem cells, human; Adipose derived stem cells, rat; Adipogenic differentiation; Cell culture

脂肪干细胞 (adipose-derived stem cells, ADSCs) 是来源于脂肪组织的间充质干细胞, 多项研究已证实 ADSCs 有很强的自我复制和多向分化的潜能, 能被诱导分化为骨、软骨、脂肪等多种细胞, 并且取材方便, 能在体外大量扩增, 与骨髓间充质干细胞 (bone marrow stem cells, BMSCs) 相比, ADSCs 更易获得足够的细胞数量且对患者损伤小, 是更理想的间充质干细胞源, 在组织工程和临床治疗中具有很大的应用潜能^[1]。本实验通过对 hADSCs 和 rADSCs 在两种成脂诱导培养基中成脂分化能力进行比较, 为脂肪干细胞成脂诱导提供更理想的诱导方法。

1 材料和方法

1.1 实验对象

人脂肪干细胞来源于 3 例女性临床吸脂患者, 平均年龄 35 岁。大鼠脂肪干细胞来源于出生 6 周的 SD 大鼠, 本实验用 SD 大鼠来自中国人民解放军军事医学科学院动物中心, 许可证号 SCXK-(军) 2012-0004。

1.2 主要试剂及仪器

DMEM 高糖培养基 (Gibco)、胎牛血清 (Gibco)、青链霉素 (Hyclone)、I 型胶原酶 (Sigma)、胰蛋白酶 (Hyclone)、罗格列酮 (Sigma)、生物素 (Sigma)、泛酸 (Sigma)、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX) (Sigma)、胰岛素 (Sigma)、吡啶美辛 (Sigma)、地塞米松 (Sigma)。主要仪器: 二氧化碳孵箱、倒置显微镜、酶标仪。

1.3 培养基配方

普通完全培养基: DMEM 高糖、10% 胎牛血清、1% 青链霉素。成脂诱导培养基 I (100 mL)^[1]: DMEM 高糖、10% 胎牛血清、1% 青链霉素、IBMX 0.5 mmol/L、胰岛素 10 μ mol/L、吡啶美辛 200 μ M、地塞米松 10 nmol/L。成脂诱导培养基 II (100

mL)^[7]: DMEM 高糖、10% 胎牛血清、1% 青链霉素、胰岛素 1 μ mol/L、IBMX 0.5 mmol/L、地塞米松 20 nmol/L、罗格列酮 5 μ mol/L、生物素 33 μ mol/L、泛酸 17 μ mol/L。

1.4 实验方法

1.4.1 大鼠 ADSCs 体外分离培养: 取出生 6 周的 SPF 级 SD 大鼠数只, 颈椎脱臼处死后, 浸于 75% 酒精消毒 10 min, 解剖切取双侧腹股沟皮下脂肪垫, 放入含有 1% 青-链霉素的 PBS 中, 剔除小血管及筋膜, 再将脂肪组织剪成 1 mm³ 小块, 用 PBS 洗 3 遍后, 加入等体积 0.1% I 型胶原酶溶液, 在摇床上 37℃ 消化 (30 ~ 40) min, 加入含 10% FBS 低糖 DMEM 终止消化, 轻轻吹打数次混匀, 以 1 000 r/min 离心 5 min, 弃去上层油脂及上清液, 加入适量 PBS 吹打离心管中的沉淀物, 再以 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 以含 10% FBS 的低糖 DMEM 培养基重悬细胞后, 接种于培养皿中, 于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, (24 ~ 48) h 首次换液, 以后每 3 d 换液 1 次并在倒置显微镜下观察细胞状态及生长情况。

1.4.2 人 ADSCs 体外分离培养: 将人脂肪抽吸组织用无菌的 PBS 冲洗 3 遍, 洗去血液和麻药, 记录剩余组织的体积, 在其中加入终浓度为 0.75 g/L 的 I 型胶原酶, 37℃ 消化 30 min, 加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 中和胶原酶的消化作用, 1 000 rpm/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入培养基重悬细胞, 将细胞悬液分装入培养皿, 37℃、5% 的 CO₂ 条件下培养。24 h 后全量换液, 去除未贴壁的细胞, 以后每 3 d 换液 1 次, 倒置显微镜下观察细胞生长情况和形态。

1.4.3 成脂诱导及检测: 将第 3 代的 hADSCs、rADSCs 分别以 5×10^4 /孔各接种一个六孔板, 孵育 24 h 后将每块六孔板分 3 组 (2 孔一组), 分别为未诱导组、成脂诱导 I 组和成脂诱导 II 组, 待细胞长到

70% 时,分别换成普通培养基、成脂诱导培养基 I 和成脂诱导培养基 II,3 d 换液 1 次。培养 10 d 后进行油红 O 染色并采用分光光度计检测 490 nm 时的吸光度值,对 hADSCs、rADSCs 用两种不同诱导方法进行成脂诱导后分化能力进行比较。

1.4.4 油红 O 染色具体步骤:在成脂诱导 10 d 后将培养皿中培养基吸出,用 PBS 洗两遍后,加入 4% 多聚甲醛室温固定 30 min,吸出固定液后加入油红 O 染液,室温孵育 20 min,用 60% 异丙醇快速洗 1 遍,然后再用蒸馏水洗 2 遍。显微镜下观察细胞成脂分化情况。以异丙醇溶解染色后的成脂细胞,摇床振荡 10 min,490 nm 测吸光度。

1.4.5 统计学方法:采用 SPSS (Version 17.0) 软件,用独立样本 *t* 检验 (Independent-Samples *t* test) 对检测结果进行统计学分析,当 $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。数据以均数 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ s) 表示。

2 结果

2.1 原代及传代细胞镜下观察

细胞最初接种时呈圆形透亮的单个细胞悬浮于培养液中,24 h 后部分已贴壁,呈短梭形,(2~3) d 贴壁细胞逐渐增多,形成许多大小不等的集落,向四周扩散,细胞逐渐呈长梭形或多角形,(6~7) d 集落中细胞数量增加,集落之间互相融合,逐渐铺满瓶底后,可进行传代,传代细胞增殖迅速,(2~4) h 开始贴壁,24 h 完全贴壁,(3~5) d 可达 80% 汇合 (图 1,见文后彩插 4)。

2.2 hADSCs 成脂诱导分化结果

未诱导组无脂滴形成,两成脂诱导组细胞均有不同程度的橙红色脂滴形成,成脂诱导 II 组中细胞形成的脂滴明显多于成脂诱导 I 组,并且脂滴大且饱满,吸光度测试后统计学分析也表明成脂诱导液 I 和成脂诱导液 II 诱导细胞分化能力差异存在显著性 ($P < 0.01$),因此成脂诱导 II 组细胞分化能力明显优于成脂诱导 I 组 (图 2 见文后彩插 4,图 3)。

2.3 rADSCs 成脂诱导分化结果

细胞分别在普通培养基、成脂诱导培养基 I 和成脂诱导培养基 II 中培养 10 d 后进行油红 O 染色,镜下观察未诱导组无脂滴形成。两诱导组细胞均有脂滴形成,成脂诱导 II 组细胞形成的脂滴较成脂诱导 I 组的脂滴大且饱满;吸光度测试后统计学分析表明两种诱导液中 rADSCs 成脂分化差异无显著

性 ($P > 0.05$) (见图 2,图 3)。

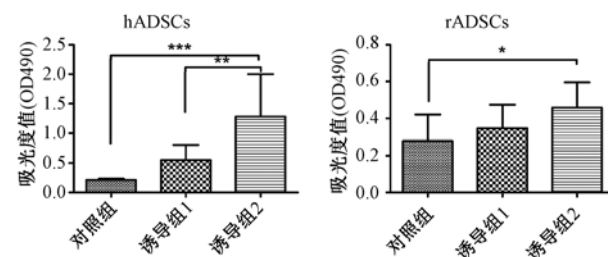


图 3 hADSCs、rADSCs 成脂诱导 10 d 后油红 O 染色吸光度值比较

Fig. 3 Comparison of the A490 nm optical density of hADSCs and rADSCs at 10 days after adipogenic induction. Oil red O staining

3 讨论

人和大鼠的脂肪组织均可分离脂肪干细胞,人脂肪组织通常来源于吸脂术,大鼠脂肪组织则取自腹股沟处的脂肪垫。有文献报道在从脂肪组织中分离出的原代基质细胞中,成纤维样细胞在数量上占有优势,但仍混有少量的造血细胞、内皮细胞和平滑肌细胞。通过传代,混杂细胞的比例迅速降低,传至第 3 代时可以得到较纯的脂肪干细胞 (ADSCs) [2]。在体外培养过程中,ADSCs 可以在很长时间内保持未分化状态,具有成纤维细胞样形态,胞内缺乏脂滴,但具有多向分化的潜能。体外培养 hADSCs、rADSCs 的过程中,随着传代培养,细胞形态由原代的不均一状态逐渐形成均一的梭形,贴壁生长的细胞保持较为稳定的生物性状,具有较强的增殖能力。经 3 代以上传代后,细胞成分均一,直至 12 代,纯度始终保持在 95% 以上,具有高度的同源性 [3],因此,本实验均采用第 3 代细胞进行下一步的成脂分化实验,这时的细胞生长旺盛,细胞状态好,形态均一。

本实验采用了两种成脂诱导培养基,诱导培养基 I 是比较经典的成脂诱导配方 [1],培养成分包括地塞米松、胰岛素、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (3-isobutyl-1-methylxanthine, IBMX)、吡啶美辛。研究显示胰岛素可以显著提高细胞中甘油三酯合成和聚集的速率 [4];地塞米松属于糖皮质激素,可以促进脂肪前体细胞的成脂分化 [5];IBMX 是 cAMP 的非特异性抑制剂,而吡啶美辛属于非甾体抗炎药,可以抑制前列腺素合成,二者可以启动成脂分化 [6]。本实验中又参考另一文献 [7] 提供的配方配

制了成脂诱导培养基 II, 配方中除有地塞米松、IBMX、胰岛素外还包括泛酸、生物素及罗格列酮, 其中的罗格列酮与 PPAR 受体结合增加脂肪细胞对胰岛素的敏感性。泛酸和生物素是维生素 B 族, 在脂肪合成过程中起重要作用^[8]。在既往研究中, 有研究者应用与成脂诱导培养基 II 成分类似的成脂诱导培养基诱导前脂肪细胞, 采用不同诱导时间和步骤, 导致不同的诱导效果^[9]; 也有研究者比较了与本实验中成脂诱导培养基成分不同的其它培养基诱导月经血干细胞的成脂分化能力^[10]。采用本实验中成脂诱导培养基 I 和 II 分别诱导 hADSCs 和 rADSCs 的比较研究尚未见报道。将 hADSCs 分别用这两种诱导培养基诱导分化, 培养 10 d 后油红 O 染色, 镜下观察和吸光度检测均证实成脂诱导培养基 II 诱导细胞成脂分化能力明显好于成脂诱导培养基 I, 因此 hADSCs 更适宜用成脂诱导培养基 II 诱导。rADSCs 分别在两种诱导培养基中培养后虽然针对其油红 O 染色的吸光度检测结果经统计学分析表明成脂分化能力没有明显差异, 但镜下观察细胞在成脂诱导培养基 II 中培养形成的脂滴较诱导培养基 I 中形成的脂滴更为饱满, 脂滴团较大, 比较而言 rADSCs 也适宜用成脂诱导培养基 II 诱导。因此, 通过比较成脂诱导培养基 II 优于成脂诱导培养基 I, 更适宜 hADSCs 和 rADSCs 成脂诱导。

参考文献:

- [1] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies [J]. *Tissue Eng*, 2001, 7: 211–228.

- [2] Nakajima I, Muroya S, Chikuni K. Growth arrest by octanoate is required for porcine preadipocyte differentiation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 309: 702–708.
- [3] 何旭, 杨旭芳, 张丽红, 等. 人脂肪干细胞的形态学特征 [J]. *生物医学工程学杂志*, 2011, 28: 337–341.
- [4] Green H, Kehinde O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion [J]. *Cell*, 1975, 5: 19–27.
- [5] Hauner H, Entenmann G, Wabitsch M, et al. Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium [J]. *J Clin Invest*, 1989, 84: 1663–1670.
- [6] Russell TR, Ho R. Conversion of 3T3 fibroblasts into adipose cells; triggering of differentiation by prostaglandin F2alpha and 1-methyl-3-isobutyl xanthine [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1976, 73: 4516–4520.
- [7] Lopez MJ, Spencer ND. In vitro adult rat adipose tissue-derived stromal cell isolation and differentiation [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 702: 37–46.
- [8] Crossno JT Jr, Majka SM, Grazia T, et al. Rosiglitazone promotes development of a novel adipocyte population from bone marrow-derived circulating progenitor cells [J]. *J Clin Invest*, 2006, 116: 3220–3228.
- [9] Lee MJ, Wu YY, Fried SK. A modified protocol to maximize differentiation of human preadipocytes and improve metabolic phenotype [J]. *Obesity*, 2012, 20: 2334–2340.
- [10] Khanmohammadi M, Khanjani S, Edalatkhah H, et al. Modified protocol for improvement of differentiation potential of menstrual blood-derived stem cells into adipogenic lineage [J]. *Cell Prolif*, 2014, 47(6): 615–623.

[修回日期]2014-11-03

(上接第 17 页)

此, 对野外引入的新种源必须隔离检疫, 开展针对性的药物驱虫, 才能有效地控制肠道寄生虫病的传播。

致谢: 衷心感谢云南省畜牧兽医研究院黄德生研究员在寄生虫鉴定方面给予的悉心指导!

参考文献:

- [1] 许凌, 范宇, 蒋学龙, 等. 树鼩进化分类地位的分子证据 [J]. *动物学研究*, 2013, 34(2): 70–76.
- [2] 张西臣, 李建华, 主编. 动物寄生虫病学 [M]. 北京: 科学出版社, 2010. 1.
- [3] 余森海, 许隆祺, 主编. 人体寄生虫学彩色图谱 [M]. 中国科

学技术出版社. 2009: 363–365.

- [4] 彭燕章, 叶智彰, 邹如金, 等. 树鼩生物学 [M]. 云南科技出版社, 1991, 154–155.
- [5] 田保平, 彭燕章, 侯意谔. 中国树鼩的寄生虫调查研究 [J]. *动物学研究*, 1989, 10: 90–91.
- [6] 吕龙宝, 马玉华, 邹丰才, 等. 驯养中缅树鼩的消化道寄生虫监测及寄生蠕虫驱虫效果 [J]. *中国实验动物学报*, 2011, 19(6): 522–524.
- [7] Malsawmtluangi C, Tandon V. Helminth parasite spectrum in rodent hosts from bamboo growing areas of Mizoram, North-east India [J]. *J Parasit Dis*. 2009, 33(1&2): 28–35.

[修回日期]2014-10-24