

脂肪源性间充质干细胞研究新进展

齐冠鸣 综述, 杨庭树 审校

[摘要] 作为一种多能干细胞,脂肪来源间充质干细胞与骨髓源性间充质干细胞具有相似的形态学及生物学特性,在一定诱导条件作用下可以定向分化为中胚层及内、外胚层组织;并且,脂肪源性间充质干细胞具有易获得、创伤小等特点,在细胞治疗及组织工程方面具有广泛应用前景。

[关键词] 脂肪;间充质干细胞;多向分化;基因治疗;综述

Progression of the Study of Adipose derived Mesenchymal Stem Cell (review) QI Guan-ming, YANG Ting-shu. The Department of Cardiovascular Disease, the General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

Abstract: As a multipotential stem cell, adipose-derived mesenchymal cell presents similar characters with bone marrow-derived mesenchymal stem cell in morphology and biology, and has the ability of directional differentiation to the all three germ layers. The adipose-derived mesenchymal stem cell could be harvested conveniently with slighter wound, and has a broad prospect in cell therapy and tissue engineering.

Key words: adipose; mesenchymal stem cell; multi-directional differentiation; gene therapy; review

[中图分类号] R329.2 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2007)12-1141-03

[本文著录格式] 齐冠鸣,杨庭树. 脂肪源性间充质干细胞研究新进展[J]. 中国康复理论与实践, 2007, 13(12): 1141-1143.

1976 年, Friedenstein 等最先发现间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSCs), 证明其于体外培养可以分化为成骨细胞和脂肪细胞。而后, 其他研究人员发现骨髓来源的 MSCs 还可以分化为内胚层及外胚层来源的组织^[1]。MSCs 在人体内分布很广, 包括骨髓、脂肪、肌肉、血管、肝脏和胰腺等组织。多年来, 相关研究多集中于骨髓源性 MSCs (bone marrow-derived mesenchymal stem cell, BDMSCs); 最近, 几个研究小组先后从脂肪组织中分离得到脂肪源性间充质干细胞 (adipose-derived mesenchymal stem cells, ADMSCs)^[2-7]。在体外培养条件下, ADMSCs 表现出与 BDMSCs 相类似的分化能力^[8], 并且 ADMSCs 具有易获得、创伤小、可迅速扩增及多向分化潜能等特点, 显示出其在细胞治疗及组织工程中广泛的应用前景。

1 ADMSCs 的生物学性质

1.1 ADMSCs 的形态 接种 12~24 h 后, 细胞可完全贴壁。刚贴壁的 ADMSCs 呈圆形、纺锤形或梭形, 细胞核居中, 可出现双核或多核。传代后圆球形细胞减少, 大部分为纺锤形或梭形。有学者认为, 形态较小的细胞有较强的增殖能力, 可出现较高的克隆率。随着传代次数增加, 细胞形态、排列趋于一致。ADMSCs 和 BDMSCs 外型很相似, 从形态学上很难区分。

1.2 ADMSCs 的表面标记及鉴定 ADMSCs 与 BDMSCs 具有相似的表面黏附分子和受体蛋白。用于鉴定 MSCs 的表面标志主要有 CD13(+)、CD29(+)、CD44(+)、CD59(+)、CD105(+) 和 CD166(+), 同时需要排除其他细胞, 如排除骨髓造血干细胞: CD14(-)、CD34(-)、CD38(-)、CD45(-)、CD117

(-); 排除成纤维细胞: HLA-DR(-)。本实验室王燕等选取 MSCs 特异性的 CD13(+)、CD44(+) 及成纤维细胞特异性的 HLA-DR(-) 进行检测, 结果所分离的细胞 90% 表达 CD13+ 及 CD44+ 抗原, 获得了纯度较高的 MSCs^[9]。

然而, ADMSCs 与 BDMSCs 的表面标记并不完全相同, 通过免疫荧光和流式细胞仪检测方法发现, CD49d 和 CD106 (即血管细胞黏附分子—vascular cell adhesion molecule, VCAM) 是区分两者的主要抗原标志, ADMSCs 表达 CD49d, 而不表达 CD106; BDMSCs 则相反^[2]。研究发现, 细胞存在的微环境及细胞具体功能会影响其免疫表型的表达, 如 CD106 在 BDMSCs 和造血干细胞 (haemopoietic stem cell, HSC) 相互作用中 (即 HSC 的归巢和动员过程中) 起重要作用^[10], 而 ADMSCs 中 CD106 的阴性表达则与其处于非造血组织的特点相一致。

1.3 ADMSCs 的可塑性 2001 年, Zuk 等从抽脂术中抽取的脂肪组织悬液中分离培养出一类细胞, 并证实为多能干细胞, 在适当条件诱导下可以定向分化为脂肪细胞、软骨细胞、成骨细胞、肌细胞, 甚至神经组织和心肌组织, 证明脂肪组织可以作为人干细胞库的重要来源^[2]。

1.3.1 分化为心肌组织 Rangappa 等以 RPMI 为基础培养基, 加 5-氮杂胞苷诱导培养, 3 周后细胞出现自发性搏动, 2 个月免疫组化染色证明肌球蛋白重链、肌动蛋白 (α-actin) 和肌钙蛋白-I (troponin-I) 阳性, 由此证实 ADMSCs 可向心肌分化^[11]。夏菁等也报道体外培养成人 ADMSCs 经 5-氮杂胞苷诱导分化为心肌样细胞^[12]。Planat-Benard V 等也曾报道过 ADMSCs 的心肌分化现象^[13];

1.3.2 分化为内皮细胞 本实验室张瑞珍、盖鲁粤等采用培养基 Iscove 改良的 Dulbecco 培养基培养不同代次的 ADMSCs, 结果显示其可分化为内皮细胞, 分化率几乎达到 100%^[14]。

1.3.3 分化为脂肪细胞 Zuk 等用地塞米松、胰岛素、异丁基-甲氧基黄嘌呤、吡啶类辛诱导人 ADMSCs 向脂肪细胞分化, 油红

基金项目: 军队“十五”重大科研课题专项项目 (No. 01 Z036)

作者单位: 解放军总医院心血管内科, 北京市 100853。作者简介: 齐冠鸣 (1981-), 男, 河北保定市人, 住院医师, 硕士研究生, 主要研究方向: 冠心病及心力衰竭的治疗。通讯作者: 杨庭树 (1953-), 男, 四川富顺县人, 教授, 主任医师, 主要研究方向: 冠心病、心力衰竭的诊断及防治。

O 染色和 RT-PCR 检测脂蛋白脂酶的表达,结果证明 ADMSCs 可分化为成熟脂肪细胞^[15]。

1.3.4 向造血系统分化 Cousin 等使用来源于 C57 雄性小鼠的 ADMSCs,经尾静脉输注给经致死量(10 Gy)照射的 C57 雌性小鼠,结果受体小鼠造血系统完全恢复,使用 PCR 检测 Y 染色体 sry 基因发现受体小鼠骨髓、脾脏及外周血均可检测出供体来源细胞,并且阳性的 PCR 结果可以持续 10 周以上,但应用流式细胞仪检测供体脂肪细胞显示表面标记 CD45 为 $(14.2 \pm 6.2)\%$, CD34 为 $(3.5 \pm 1)\%$ ^[16]。所以, Cousin 等使用的供体细胞中不能排除混杂循环造血干细胞(或祖细胞)的可能。

1.3.5 分化为成骨细胞 Zuk 等通过实验发现, ADMSCs 经体外诱导培养后可向成骨细胞方向分化^[2]。诱导培养后第 7 天,这些细胞开始分泌出岛状的细胞外基质;2 周后内源性碱性磷酸酶染色阳性并形成矿化结节;第 2~4 周,培养孔中钙化的细胞外基质的量明显增加。ADMSCs 向成骨细胞分化的能力可以维持相当长时间,其表达碱性磷酸酶的活性可达培养后的第 175 天。

1.3.6 向软骨方向诱导 Huang 等应用组织学和分子生物学的方法证实,在高密度的培养条件下,培养基中加入肿瘤生长因子- β (tumor growth factor- β , TGF- β)、胰岛素、干扰素和抗坏血酸,48 h 内可诱导 ADMSCs 形成明显的软骨结节并表达软骨特异性标记 II 型胶原、硫酸软骨素-4 和硫酸角质素,而且逆转录多聚酶链反应分析也显示 II 型胶原和软骨特异性蛋白聚糖的表达,因此认为这种多能干细胞确实具有向软骨方向转化的能力^[17]。

1.3.7 分化为骨骼肌细胞 Zuk 等^[14]和 Mizuno 等^[18]以改良最低必须介质(improved minimum essential medium, IMDM)为基础培养基,加入 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、5% 马血清(horse serum, HS)和 $50 \mu\text{mol/L}$ 氢化考的松诱导 ADMSCs 向骨骼肌方向分化,在第 6 周用免疫组化方法检测肌细胞特异性抗体 MyoD 和骨骼肌肌球蛋白重链(myosin heavy chain)抗体均为阳性,RT-PCR 检测验证诱导后的细胞有 MyoD 和骨骼肌肌球蛋白重链基因表达,从而证明脂肪来源的 MSCs 可以分化为骨骼肌细胞。

1.3.8 ADMSCs 的跨胚层分化 美国杜克大学的 Safford 等发现,大鼠 ADMSCs 在诱导剂作用下能分化出类似神经元和神经胶质细胞,而且这些新的细胞具有类似神经细胞的功能^[19]。由于神经细胞来自外胚层,因此提示 ADMSCs 可向外胚层细胞分化。最近的研究证实,ADMSCs 在全反式维甲酸的诱导下,可向上皮细胞分化^[20],在肝细胞生长因子的诱导下,形态上可变得与肝样细胞相似,能分泌白蛋白和 α -球蛋白^[21]。而上皮细胞、肝细胞都来源于内胚层。以上实验结果说明,在一定诱导条件下,ADMSCs 可向内、外胚层细胞分化。

需要注意的是,不同个体来源的 ADMSCs 分化能力不同,相同个体不同部位来源的 ADMSCs 分化能力也不尽相同。另外,有学者认为 ADMSCs 是一群混杂的细胞,所以才能在适当的体外培养条件下显示出多向分化表型。那么单一克隆的 ADMSCs 是否有多向分化潜能呢?有文献报道,81% 的 ADMSCs 克隆至少向一个谱系分化;52% 的 ADMSCs 克隆向 2 个或更多的谱系分化,这与 ADMSCs 是一种多能成体干细胞而不是混杂的专能干细胞的假说相符合^[22]。

1.4 比较两种不同的 MSCs 将同一个样本获得的 BDMSCs 和 ADMSCs 进行比较。

1.4.1 细胞的采集、分离及培养 平均采集的标本量骨髓为 7 g,脂肪组织为 17 g。研究发现,每 g 脂肪组织中大约有 5 000 个 MSCs 集落单位(CFU-F),而每 ml 骨髓中估计只有 100~1 000 个 MSCs 集落单位。一般 40 ml 骨髓中含 1.2×10^9 个有核细胞,其中大约含 2.4×10^4 个 MSCs;相比而言,在局部麻醉下,可很容易地获得 200 ml 脂肪组织,每 100 ml 脂肪抽取物中约含 2×10^8 个有核细胞,因此 200 ml 脂肪抽取物中可以得到约 1×10^6 个 MSCs。在体外培养时,ADMSCs 在相对较低的细胞密度下(约 1000 个细胞/ cm^2)能快速生长,这与 BDMSCs 的培养不同。

1.4.2 体外分化 ADMSCs 和 BDMSCs 在向脂肪组织和成骨细胞分化上未观察到明显差异。ADMSCs 能够成功形成阿利新蓝染色阳性的微量结节,但 BDMSCs 在同样的培养条件下则不能形成。迄今,尚未见比较两者体外心肌分化能力的报道。

1.4.3 病毒转染及对 ADMSCs 的影响 ADMSCs 和 BDMSCs 都能成功转染腺病毒、慢病毒和逆转录病毒。BDMSCs 于腺病毒转染的效率高于 ADMSCs,且具有统计学差异;而对于慢病毒和逆转录病毒,两者的转染效率相似。近来有研究者提出,腺病毒对 ADMSCs 的生物学活性影响较大。国内有报道,腺病毒 Ad-hBMP-2 使 ADMSCs 细胞生长停滞期及倍增时间均延长,细胞凋亡加快^[23]。本实验室秦宇红等研究证实,重组腺病毒-肝细胞生长因子(adenovirus-hepatocyte growth factor, Ad-HGF)与 ADMSCs 共同培养可使 ADMSCs 凋亡加快,旁分泌功能减弱;而 Ad-HGF 与 BDMSCs 联合培养则可明显增加后者 HGF 的分泌功能(待发表)。

2 ADMSCs 的临床应用及研究前景

2.1 基因治疗 ADMSCs 在体外条件下导入外源基因,可用于基因治疗。Dragoo 等发现,转染骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)基因的人 ADMSCs 更易分化形成成骨细胞,并可更快启动细胞外基质的钙化^[24]。Kang 等发现,转染有外源性脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)的 ADMSCs 可在脑卒中大鼠脑组织中存活和迁移,并且改善脑卒中大鼠运动功能的作用更加明显^[25]。

导入基因的方式很多,可以使用非生物法,如物理电穿孔法或化学方法(以短期疗效为目的);也可以通过腺病毒、逆转录病毒和痘状病毒等病毒载体达到基因长期表达的目的。最近有研究显示,腺-逆转录嵌和病毒也可用于长期表达的目的^[26]。

目前,病毒载体应用最广。Morizono 等分别在体外试验腺病毒、逆转录病毒和痘状病毒对 ADMSCs 转染并对其分化后获得的基因表达情况进行分析,结果显示被痘状病毒转染的 ADMSCs 基因表达最为稳定,而慢病毒转染效率最高,并且当用慢病毒载体将体外基因转入 ADMSCs 后,即使 ADMSCs 已分化为脂肪细胞和成骨细胞,仍可有外源基因的表达^[27]。

2.2 组织工程的种子细胞 同其他成体干细胞相比,ADMSCs 取材容易,取材量大,可反复取材,损伤较小,细胞增殖快速,可成为优秀的自体组织工程的种子细胞之一,配合相适应的三维生物材料,在骨组织工程、脂肪组织工程、软骨和肌肉的损伤修复等方面的研究和治疗上有广泛应用前景。

2.3 细胞移植 自体同源细胞的移植可大大降低免疫排斥风险。自体 ADMSCs 因易获取、易扩增、多向分化的特点而成为理想的移植细胞,可辅助或替代 BDMSCs,应用在神经系统损伤、心血管疾病等方面。

ADMSCs 分泌的细胞因子与造血和免疫反应有关。当该细胞与造血干细胞共同培养时,ADMSCs 可参与构成造血微环境,直接或间接影响造血过程。将来可采用 ADMSCs 与造血干细胞联合移植,为白血病、再生障碍性贫血等重症血液病治疗带来新的希望。

3 ADMSCs 研究中存在的问题

与其他类型组织干细胞相比,ADMSCs 的研究时间较短,尚存在一些问题。目前,几个研究小组采用不同类型胶原酶和消化时间消化不同部位的脂肪组织均可获得 ADMSCs。这些方法分离得到的是混合细胞群,主要组分为 ADMSCs,同时还有低水平的造血细胞、内皮细胞、平滑肌细胞和周细胞(pericyte)^[2]。随着 ADMSCs 的研究与应用不断深入,找寻其特异性分子标记,制定标准的分离、培养和纯化方法势在必行。

ADMSCs 主要应用前景之一是作为组织再生工程的种子细胞,而应用的关键在于其诱导分化产生的细胞类型、纯度与功能等。目前,应用细胞因子、化学试剂或中草药提取物等诱导分化 ADMSCs 的效率不高,诱导分化技术仍不成熟。在国内,ADMSCs 向神经细胞的分化率一般在 60%~80%,而向成骨细胞、心肌细胞的分化一般只作定性分析研究。ADMSCs 诱导分化的试剂筛选、分化细胞功能的评价及分化细胞鉴定体系的完善将成为 ADMSCs 应用研究的热点。

此外,ADMSCs 导入外源基因的效率还很低,移植 ADMSCs 后的致瘤性还有待评价,这些都制约着 ADMSCs 的基础研究和进一步应用。

[参考文献]

- [1] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. Nature, 2002, 418:414—419.
- [2] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multi-lineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies[J]. Tissue Eng, 2001, 7:211—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, 189:54—63.
- [4] Winter A, Breit S, Parsch D, et al. Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells[J]. Arthritis Rheum, 2003, 48:418—429.
- [5] Huang JI, Steven BS, Beanes R, et al. Rat extramedullary adipose tissue as a source of osteochondrogenic progenitor cells[J]. Plast Reconstr Surg, 2002, 109:1033—1041.
- [6] Rangappa S, Chen F, Lee EH, et al. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes[J]. Ann Thorac Surg, 2003, 75:775—779.
- [7] Aust L, Devlin B, Foster S, et al. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates[J]. Cytotherapy, 2004, 6(1):7—14.
- [8] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multipotential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284:143—147.
- [9] 王燕,陈光辉,邵建华,等. 大鼠脂肪组织源性间充质干细胞的分离

及向心肌细胞的诱导分化[J]. 山东大学学报(医学版), 2005, 43(7):578—581.

- [10] Levesque JB, Takamatsu Y, Hilsson SK, et al. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following haematopoietic cell mobilization by granulocyte colony stimulating factor[J]. Blood, 2001, 98:1289—1299.
- [11] 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, 75:775—779.
- [12] 夏菁,陈光辉,刘宏斌,等. 成人脂肪间充质干细胞体外诱导分化为心肌细胞的实验研究[J]. 中国康复理论与实践, 2006, 12(9):783—784.
- [13] Planat-Benard V, Menard C, Andre M, et al. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stromal cells[J]. Circ Res, 2004, 94:223—229.
- [14] 张端珍,盖鲁粤,刘宏伟,等. 脂肪干细胞体外分化为内皮细胞的可行性[J]. 中国临床康复, 2005, 9(36):14—17.
- [15] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multi-potent stem cells[J]. Mol Biol Cell, 2002, 13:4279—4295.
- [16] Cousin B, Andre M, Arnaud E, et al. Reconstitution of lethally irradiated mice by cells isolated from adipose tissue[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 301:1016—1022.
- [17] Huang JI, Zuk PA, Jones NF, et al. Chondrogenic potential of multi-potential cells from human adipose tissue[J]. Plast Reconstr Surg, 2004, 113:585—594.
- [18] Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, et al. Myogenic differentiation by human processed lipaspirate cells[J]. Plast Reconstr Surg, 1999, 109:199—209.
- [19] Safford KM, Safford SD, Gimble JM, et al. Characterization of neuronal/glial differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells[J]. Exp Neurol, 2004, 187(2):319—328.
- [20] Brzoska M, Geiger H, Gauer S, et al. Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 330(1):42—50.
- [21] Min S, Su S, Yong B, et al. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 328(1):258—266.
- [22] Guilak F, Lott KE, Awad HA, et al. Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells[J]. Cell Physiol, 2006, 206(1):229—237.
- [23] 郑培惠,魏奉才,晋国营,等. 腺病毒介导的骨形态发生蛋白-2 基因转染脂肪间充质干细胞的实验研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2006, 24(3):195—198.
- [24] Drago J, Choi JY, Lieberman JR, et al. Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat[J]. J Orthop Res, 2003, 21(4):622—629.
- [25] Kang SK, Lee DH, Bae YC, et al. Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats[J]. Exp Neurol, 2003, 183:355—366.
- [26] Zheng C, Baum BJ, Iadarola MJ, et al. Genomic integration and gene expression by a modified adenoviral vector[J]. Nat Biotechnol, 2000, 18:176—180.
- [27] Morizono K, de Ugarte DA, Zhu M, et al. Multilineage cells from adipose tissue as gene delivery vehicles[J]. Human Gene Therapy, 2003, 14(1):59—66.

(收稿日期:2007-05-23)