

人脂肪间充质干细胞体外传代的遗传特性分析

李晓瑞^{1#}, 邓 银^{2#}, 陈思翔¹, 郑东明¹, 马 明¹, 刘 宇¹, 高雪华², 刘大成¹,
赵令卉², 岑双庆¹, 张 蓉^{3*}, 李 俊^{2*}

(1. 成都中创清科医学检验所; 2. 成都清科生物科技有限公司;
3. 四川大学 基础医学与法医学院 生物化学与分子生物学教研室, 四川 成都 610000)

摘要:目的 研究人脂肪间充质干细胞(ADSCs)在体外传代过程中生物学特性及遗传特性的变化,为脂肪间充质干细胞的基础研究及临床应用安全性提供理论依据和新的细胞来源。方法 利用无血清培养基培养 ADSCs,对 1、3、5、7、10、14 和 15 代体外培养细胞进行了形态观察,流式细胞术分析细胞周期及免疫表型,G 显带法分析染色体核型,实时荧光定量分析相关基因表达量,ELISA 定量分析细胞因子的表达量。结果 ADSCs 传代至第 7 代后,细胞增殖速度开始减慢,10 代后细胞增殖速度显著减慢。细胞形态为长梭形并保持稳定。处于 G₂ 期和 S 期细胞百分比基本保持稳定。染色体细胞核型没有明显易位和缺失等变化,相关基因表达量略有差异,培养基内分泌的细胞因子保持稳定。结论 利用无血清培养基培养的脂肪间充质干细胞在体外培养 5 代以内基本安全。

关键词: 脂肪间充质干细胞;体外培养;细胞因子;基因表达

中图分类号:R394.2 文献标志码:A

Analysis on genetic traits of human adipose derived mesenchymal stem cells *in vitro*

LI Xiao-rui^{1#}, DENG Yin^{2#}, CHEN Si-xiang¹, ZHENG Dong-ming¹, MA Ming¹, LIU Yu¹, GAO Xue-hua²
LIU Da-cheng^{1#}, ZHAO Ling-hui^{2#}, CEN Shuang-qing¹, ZHANG Rong^{3*}, LI Jun^{2*}

(1. Chengdu ZhongchuangQingke Medical Diagnosis Test Center;2. Chengdu Qingke Biotechnology Co, Ltd;
3. Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medicine and Forensic, Sichuan University, Chengdu 610000, China)

Abstract: Objective To investigate the biological characteristics and genetic features alteration of human adipose derived mesenchymal stem cells (ADSCs) cultured *in vitro* and to provide a new source of cells for the research on the safety of its clinical trials. **Methods** Observe the shape of the 1st, 3rd, 5th, 7th, 10th, 14th and 15th generation of the ADSCs cultured *in vitro* using the serum free culture medium. Analyze their cell cycle and cell surface markers by flow cytometry, karyotype was analyzed by the chromosome G-banding technology. Expression level of relevant gene and cytokine was Measured respectively by the Real-time fluorescence quantitative technique and ELISA. **Results** The growth of ADSCs began to slow down after the 7th generation, and after the 10th generation, it slowed down significantly. The shape of cell remained fusiform, no significant change. Cell

收稿日期:2015-05-27 修回日期:2015-07-23

基金项目:四川省科技支撑计划项目科学基金(2012ZZ0039)

* 通信作者 (corresponding author): zrl223@126.com;68363995@qq.com

对本文有相同贡献

cycle analysis revealed that the percentage of G₂ phase and S phase cells remained stable. There was no obvious missing, translocation or dislocation in terms of karyotype. Measured gene expression level had a little difference change, and the cytokine secreted in culture medium remained stable. **Conclusions** The adipose derived mesenchymal stem cells cultured *in vitro* using the serum free culture medium are safe before the 5th generation.

Key words: adipose derived mesenchymal stem cells; *in vitro* culture; cytokine; gene expression

脂肪间充质干细胞(adipose derived mesenchymal stem cells, ADSCs)是一类存在于脂肪组织中具有多向分化潜能的干细胞。与骨髓间充质干细胞有很多相似的特征,它们均是来自中胚层的成体间充质干细胞,在特定条件下均有分化组织的能力,且诱导分化的体系相似^[1]。骨髓间充质干细胞虽然较早被认知的成体干细胞,但由于 ADSCs 的细胞来源更加丰富、取材更为方便。而且其免疫原性很低,体外扩增也较骨髓间充质干细胞更加容易,这些优点使其在组织工程、创面修复和基因治疗等方面具有了更加良好的应用前景^[2-5]。

近年来,ADSCs 除了在组织工程方面的应用外,还能与基因转染技术相结合来实现外源基因在体内高效、长期的表达^[6]。然而在干细胞的应用中存在很多安全问题尚未阐明,比如使用基因载体进入人体或者使用基因载体转染干细胞后是否对人体和干细胞本身产生不良影响以及一些潜在的致癌性,是否能够持续不断的释放需要的有益因子等问题。干细胞在体外分裂的次数越多,安全性则越低^[7],本研究对 ADSCs 体外传代过程中选取了 1、3、5、7、8 和 10 代进行了形态学观察,免疫表型分析,染色体核型分析,相关基因表达及多种细胞因子定量分析,拟为脂肪间充质干细胞的临床应用安全性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

脂肪组织来自 2 例腹部脂肪抽吸术的健康成年女性患者,无传染病和内分泌疾病,经家属签字同意捐献所得,并得到成都中创清科医学检验所伦理委员会批准。bFGF、NGF、EGF、HGF、LIF 和 VEGF165 细胞因子检测试剂盒(欣博盛生物科技有限公司);CD19-FITC、CD34-FITC、CD11b-PE、CD35-PE、CD45-PE、CD73-PE、CD90-PE、CD105-PE 和 HLA-DR-PE (Beckman Coulter 公司);Fast SYBR Green Master

mix(Applied Biosystem 公司);秋水仙素、甲醇、冰乙酸均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 ADSCs 的分离培养:取成人吸脂术后的脂肪组织, PBS 反复浸泡冲洗 3 次去除血液,加入等体积 0.1% I 型胶原酶,37℃ 水浴振荡消化 1 h,低糖 DMEM 终止消化,800 × g 离心 5 min,弃上清,低糖 DMEM 重悬沉淀,200 目滤网过滤,沉淀加入 3 mL 低糖 DMEM,吹打均匀后移入培养瓶,37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下在恒温培养箱内培养 24 h 后首次换液,去除残余的红细胞及未贴壁细胞。消化后在细胞瓶内接种 1 × 10⁶ 个细胞,利用无血清培养基培养,以后每隔 3 ~ 4 d 换液 1 次。

1.2.2 细胞形态观察和免疫表型分析:待细胞增殖到汇合度为 80% 左右时,对细胞形态进行观察并拍照。PBS 冲洗 2 次后,利用 0.25% 胰蛋白酶消化 3 min,离心,弃上清液后,利用 PBS 将细胞调整到 1 × 10⁶/mL,分别加入 CD19-FITC、CD34-FITC、CD11b-PE、CD35-PE、CD45-PE、CD73-PE、CD90-PE、CD105-PE 和 HLA-DR-PE,25℃ 避光孵育 30 min, PBS 冲洗 3 次后,利用流式细胞仪检测。

1.2.3 染色体核型分析:细胞处于对数增殖期时,在瓶内滴加秋水仙素至终浓度为 0.04 mg/L,继续在恒温培养箱中培养 3.5 h,胰蛋白酶消化,收集所有细胞。PBS 冲洗 3 次后,加入 5 mL 浓度为 0.075% 的 KCl 低渗液,37℃ 水浴 15 min,1 500 r/min 离心 8 min 后,弃上清。在细胞中滴加 2 mL 固定液,37℃ 水浴 3 min,离心弃上清,重复 1 次,第二次固定用 8 mL 固定液固定 30 min。重悬细胞后,在每块玻片上滴加细胞悬液,自然风干后用吉姆萨染液染色 10 min,用电子显微镜观察分析。

1.2.4 基因表达分析:利用 Primer premier 5.0 软件设计 P16、P21、P53、TERT、K-ras、CCNE 和 Nanog 7 个基因的相对荧光定量引物(表 1),交由上海英俊公司合成。将细胞培养至汇合度为 80% 左右,胰

蛋白酶消化收集细胞。PBS 冲洗 3 次后,Trizol 处理提取 RNA,RT-PCR 合成 cDNA 第一条链。以其为模板进行 PCR 扩增。扩增反应总体积为 20 μL 体系,其中包括 Fast SYBR Green Master mix 10 μL,

上、下游引物各 1 μL,cDNA 模板 2 μL,加入灭菌双蒸水至总体积为 20 μL。反应条件:95 ℃ 5 min,95 ℃ 15 s,60 ℃ 60 s 进行 40 个循环,72℃ 1 min。实验结束后对实验结果进行分析。

1.2.5 细胞因子检测:胰蛋白酶消化后,5 000 r/min 离心 5 min,收集细胞培养上清液。按照 ELISA 检测试剂盒说明书指示,进行细胞因子的定量检测。

2 结果

2.1 ADSCs 传代后生长状态

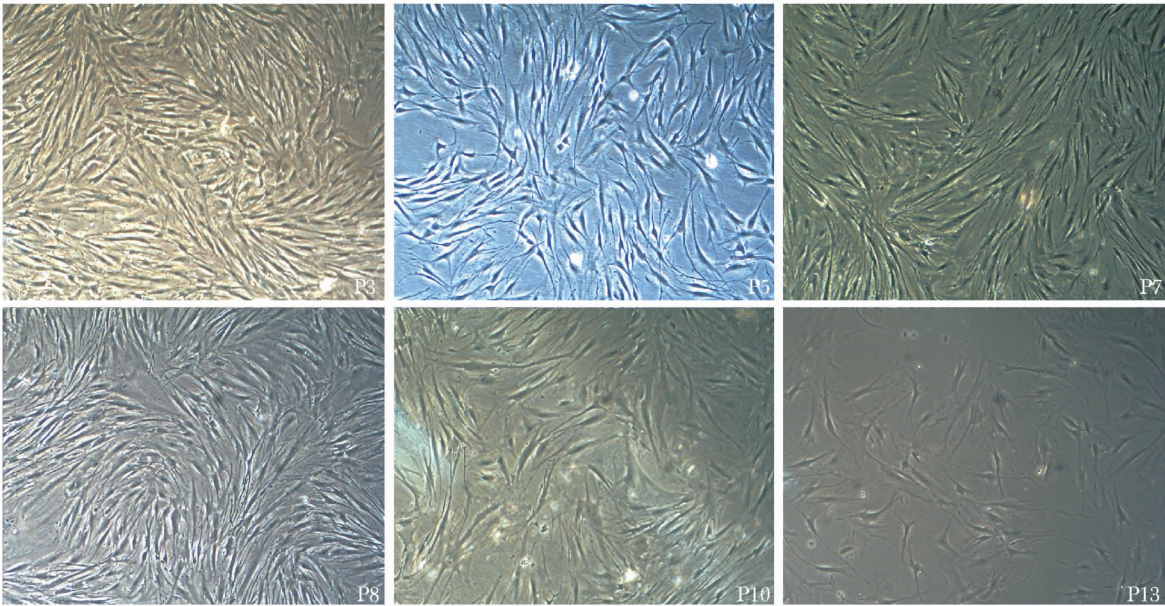
接种原代细胞 24 h 后,大部分细胞已经贴壁,传代至第 7 代后,细胞增殖速度开始明显减慢,10 代以后增殖很慢,导致细胞数量不足。细胞形态为长梭形,细胞成漩涡状或放射状排列(图 1)。

2.2 ADSCs 免疫表型分析

原代细胞表面标志物 CD11b、CD19、CD34 和 CD45 含量在 1% 以下为低表达,HLA-DR 为阴性。1、3、5、7、10、13、14 和 15 代细胞,CD73、CD90 和 CD105 表达量为 99% 以上,为高表达,代次之间表达量基本没有变化(图 2)。在传代过程中,G₂ 期和 S 期细胞百分比基本保持稳定,所占比较小,表明 ADCSs 体外增殖能力正常(图 3)。

表 1 相对荧光定量引物列表
Table 1 List of relative fluorescence quantitative PCR primers

name	sequence	product length/bp
P16-F	5'-GCAGCATGGAGCCTTCGG-3'	197
P16-R	5'-CCGTAACATATTCGGTGCCT-3'	
P21-F	5'-TGTCCGTCAGAACCCATG-3'	219
P21-R	5'-GTGGGAAGGTAGAGCTTGG-3'	
P53-F	5'-AGGGATGTTTGGGAGATGTAAG-3'	179
P53-R	5'-TGTGAGGTAGGTGCAATGC-3'	
TERT-F	5'-CTACGGCGACATGGAGAACAAG-3'	150
TERT-R	5'-CCATACTCAGGGACACCTCG-3'	
K-ras-F	5'-TTGATTTGTCAGCAGGACCA-3'	149
K-ras-R	5'-GAGAGTTTCACAGCATGGACTG-3'	
Nanog-F	5'-ATGCCTGCTGAACCCGAC-3'	292
Nanog-R	5'-AGGACTGGATGTTCTGGGT-3'	
CCNE-F	5'-AAGGTTTCAGGGTATCAGTGGTG-3'	185
CCNE-R	5'-TTTGCTCGGGCTTTGTCC-3'	
β-actin-F	5'-CACGAACTACCTTCAACTCC-3'	265
β-actin-R	5'-CATACTCCTGCTTGCTGATC-3'	



note:The “P” means cell generation

图 1 细胞形态观察

Fig 1 Cell morphology (×40)

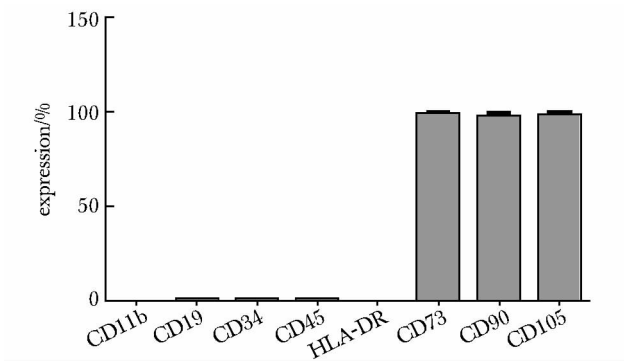


图2 细胞免疫表型表达量

Fig 2 Expression of cell Immunophenotype

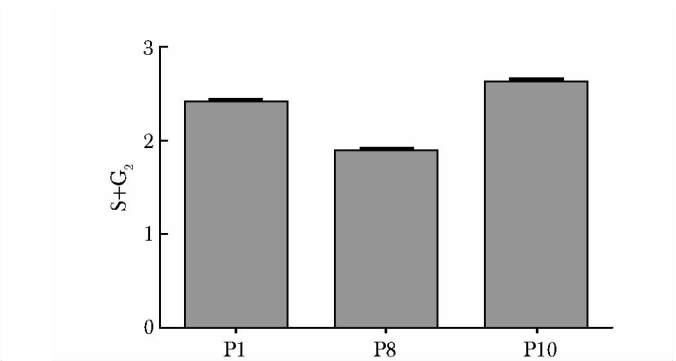


图3 细胞周期

Fig 3 Cell cycle

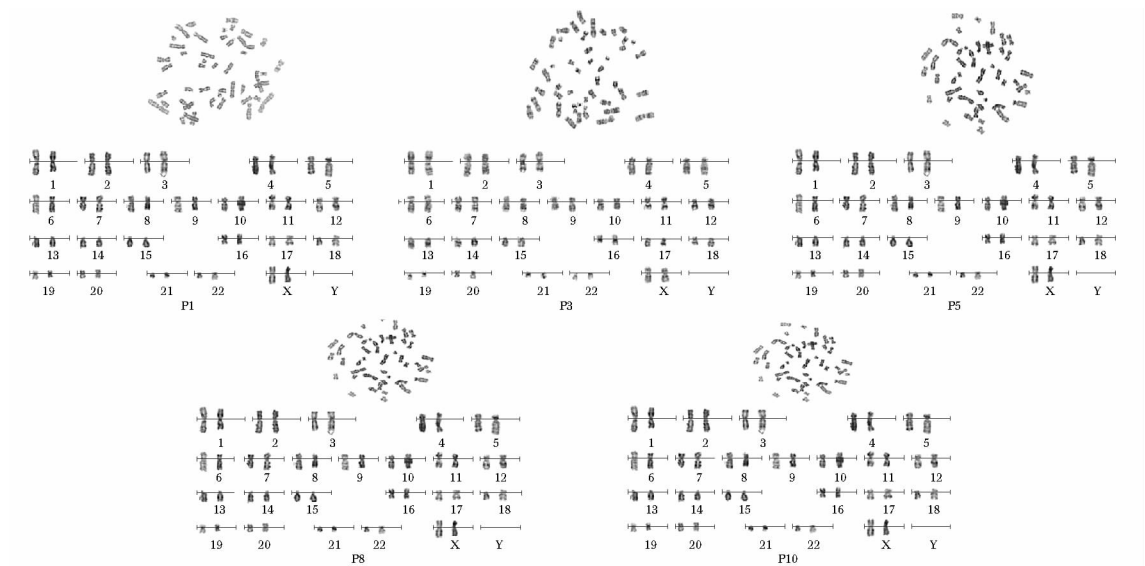


图4 脂肪间充质干细胞核型分析图

Fig 4 Chromosome nuclear type analysis of ADSCs

2.3 ADSCs 核型分析结果

细胞在传代至 1、3、5、8 和 10 代时细胞核型没有明显缺失、易位和倒位等变化(图 4)。

2.4 ADSCs 相关基因表达结果分析

以原代细胞表达量为单位 1,在 1、3、5、7、8 和 10 代细胞的 *P53*、*Nanog*、*TERT* 和 *CCNE* 表达量相对稳定。*P16* 和 *P21* 两个基因在 10 代内有递增趋势,*K-ras* 呈下降趋势(图 5)。

2.5 ADSCs 细胞因子检测结果

以原代细胞表达量为标准,所测细胞因子表达量基本保持稳定(图 6)。

3 讨论

本研究对 ADSCs 应用的安全性做了比较全面

的分析和评估,从体外培养的 ADSCs 中抽取了 1、3、5、7、8 和 10 代进行了生物学特性分析,包括细胞形态学、染色体核型、细胞周期及免疫表型分析,相关蛋白因子,相关基因表达等进行了全面分析。结果显示,传代过程中细胞形态为长梭形,处于 G_2 期和 S 期的细胞百分比基本保持稳定,ADSCs 体外增殖能力正常。ADSCs 的 CD11b、CD19、CD34 和 CD45 为低表达,HLA-DR 为阴性。CD73、CD90 和 CD105 为高表达,代次之间表达量基本没有变化。此结果完全符合关于间充质干细胞的判定标准^[8]。传代至 10 代之内,细胞染色体核型、结构和数目均未见异常,核型稳定。

ADSCs 的 *P53*、*CCNE*、*Nanog* 和 *TERT* 等基因表达量基本保持稳定。*K-ras* 基因表达有所下降。*P16*

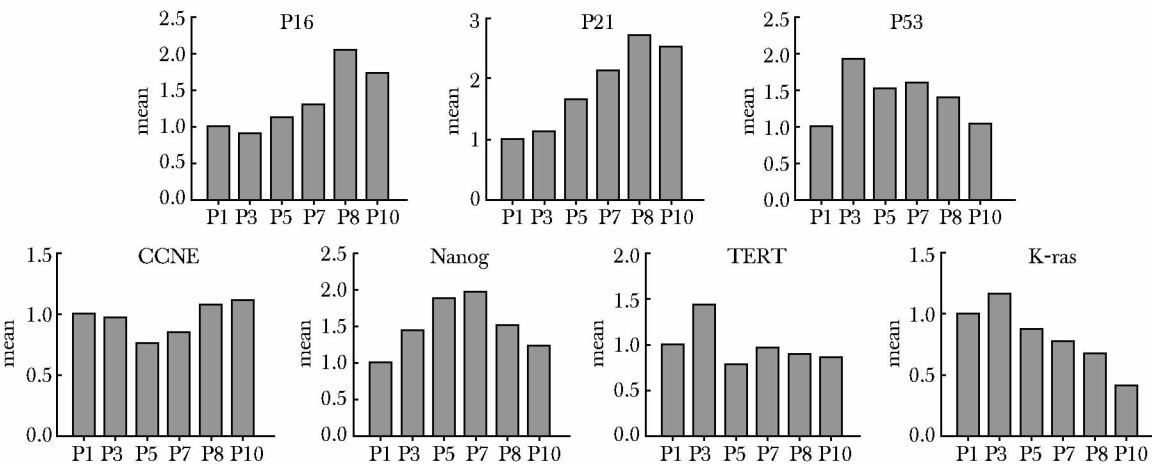


图5 基因表达量分析
Fig 5 Gene expression analysis

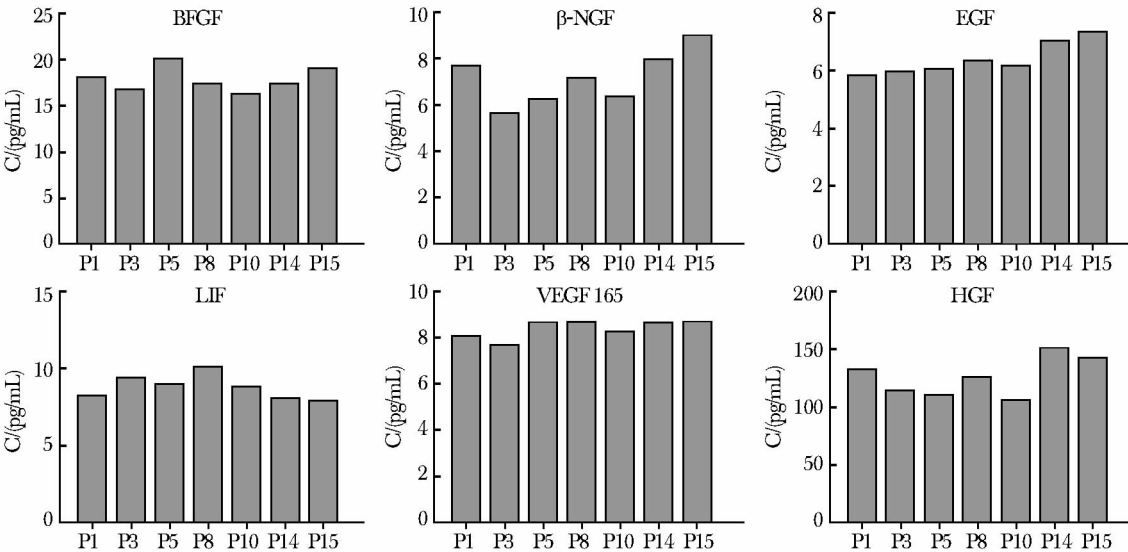


图6 细胞因子定量分析
Fig 6 Quantitative analysis of cytokines

和 *P21* 基因的表达随细胞传代次数增加有上调趋势。众所周知,*P16* 基因和 *P21* 基因均为抑癌基因,是细胞周期调节的重要基因,对细胞增殖周期起负性调节作用。有不少研究者发现随年龄增长 *P16* 基因的表达逐渐上调。*P16* 基因随年龄增长其表达逐渐上调^[9],老龄大鼠早代 ADSCs 向神经细胞的定向分化能力显著低于青年大鼠 ADSCs,且增殖能力亦明显减弱^[10];因此推测,随着细胞传代次数增加,细胞衰老程度的增加,ADSCs 的自我更新能力及修复分化潜能可能下降,*P16* 基因表达增加。这些不仅说明 *P16* 基因与衰老密切相关,也提示体外培养的高代次 ADSCs 和老龄个体的 ADSCs 自体移植需

要解决增龄性的细胞功能衰退问题。

间充质干细胞可分泌多种细胞因子和生长因子,这些细胞因子分别对相关组织细胞的增殖分化具有调节作用,以及创伤组织的愈合,组织修复和再生作用密切相关,而且还具有调节免疫,促进周围细胞的增殖,抑制凋亡以及促血管生成作用,并与肿瘤细胞的分裂增殖以及肿瘤转移和浸润相关。本研究对 β-NGF、bFGF、EGF、LIF、VEGF 和 HGF 等 6 种重要的细胞因子进行了定量检测。结果发现细胞因子在传代过程中均保持稳定,且与原代细胞分泌量一致。说明 ADSCs 细胞在 10 代传代过程中,相关调控因子基本稳定,免疫信号、抗原刺激等基本稳定。

综上所述,脂肪间充质干细胞在传代至 5 代的过程中,生物学特性及遗传特性基本稳定,没有明显

变化。作者认为脂肪间充质干细胞体外传代至第 5 代以内可以安全使用。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] Lu F, Mizuno H, Uysal CA, *et al.* Improved viability of random pattern skin flaps through the use of adipose-derived stem cells[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2008, 121:50-58.
- [3] 赵春华. 干细胞原理、技术、与临床[M]. 北京:化学工业出版社,2006: 17-19.
- [4] 刘晓玉, 王瑞, 张涛, 等. 人脂肪间充质干细胞对皮肤创伤修复的作用[J]. *基础医学与临床*, 2013, 33: 1377-1381.
- [5] 王棕, 刘国强, 徐敏, 等. 人脂肪间充质干细胞对再生障碍性贫血 T 淋巴细胞的免疫调节作用[J]. *基础医学与临床*, 2014, 34: 104-108.
- [6] Morizono K, De Ugarte DA, Zhu M, *et al.* Multilineage cells from adipose tissue as gene delivery vehicles [J]. *Hum Gene Ther*. 2003, 14: 59-66.
- [7] Rubio D, Garcia-castro J, Martin Mc, *et al.* Spontaneous human adult stem cell transformation [J]. *Cancer Res*, 2005, 65:3035-3039.
- [8] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. *Cytotherapy*, 2006, 8:315-317.
- [9] Lee J, Lee CG, Lee KW, *et al.* Cross-talk between BubR1 expression and the commitment to differentiate in adipose-derived mesenchymal stem cells [J]. *Exp Mol Med*, 2009, 41: 873-879.
- [10] 许靖. 脂肪间充质干细胞增殖和定向分化能力与 p16ink4a 基因表达的关系[D]. 湖南: 湘雅医学院, 2013: 6-9.

新闻点击

男性精子量低与新生儿出现先天缺陷无关连

据美国国家科学院院报(PNAS)网站(2014/05/26)报道,过去研究认为男性不育接受医疗协助与生下的新生儿先天性缺陷几率会比较高,两者间可能有关连,但日前一项于第 109 届美国泌尿科医学会(AUA)发表的新研究却反驳这样的论点,发现男性精子量过低跟新生儿先天性异常并无关。

在美国,约有 15% 的夫妻或伴侣有受孕困难的问题,其中的 40% 为男性不育,而男性不育的原因包括没有精子或精子太少、以及精子活动力低。研究为了了解当男性使用人工协助生殖技术时,精子的质量太差是否真正会影响新生儿发生先天性缺陷,因此分析贝勒大学医学院的精子数据库与德州先天性缺陷登录系统的数据。

研究结果显示,在 1 382 位不育男性的资料中,他们的后代共有 109 个宝宝有先天性缺陷、其余 2 115 位都是健康的宝宝,研究团队发现这些男性的不育与宝宝的先天性缺陷之间的关系并没有任何统计上的意义。研究认为这些不育男性无须过度担心接受人工生殖技术会对宝宝造成伤害。

该研究刊载于最新一期美国泌尿科医学会(AUA,American Urological Association)。