

· 脂肪源性干细胞与组织工程专题论著 ·

人乳腺上皮细胞抽提物重编程人脂肪来源干细胞的实验研究

杨艳清¹ 江昌艳¹ 张洁¹ 许其军¹ 王海燕²

【摘要】 目的 观察人乳腺上皮细胞抽提物重编程人脂肪来源干细胞(hADSCs),使其向上皮细胞转化的可行性。**方法** 采用胶原酶消化法分离并获得脂肪来源干细胞;将超声乳化人乳腺上皮细胞离心后获得抽提物冻存备用;培养第3代hADSCs,链球菌溶血素O(SLO)处理后,实验组6例加入乳腺上皮细胞抽提液,对照组6例不加乳腺上皮细胞抽提液。细胞培养过程中观察hADSCs的形态学变化,采用蛋白质印迹法检测卵透明带蛋白1(ZO1)和细胞角蛋白18(CK18)表达的变化。**结果** 流式细胞仪检测结果显示,人脂肪组织分离培养的干细胞表达CD13、CD29、CD44、CD90和CD105呈阳性表达,而不表达CD45。实验组细胞重编程后第16天,细胞形态开始转变为上皮样的圆形;第18天蛋白印迹法检测上皮细胞抗原标志物ZO1和CK18表达增加,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 人乳腺上皮细胞抽提物可以重编程脂肪来源干细胞,使其向上皮细胞转化。

【关键词】 乳腺上皮细胞;脂肪来源干细胞;重编程;细胞抽提物

Experimental research of reprogramming of adipose-derived stem cells using human mammary epithelial cell extracts

YANG Yan-qing, JIANG Chang-yan, ZHANG Jie, XU Qi-jun, WANG Hai-Yan. [Department of Plastic Surgery, Tongren Hospital Affiliated to Wuhan University (The Third Hospital of Wuhan), Wuhan 430060, China]

Corresponding author: WANG Hai-Yan, Email:892254067@qq.com

【Abstract】 Objective To explore the feasibility of human mammary epithelial cell extracts in the reprogramming and conversion of human adipose-derived stem cells (hADSCs) to epithelial cells. **Methods** The ADSCs were isolated by the collagenase digestion method and cultured. The human mammary epithelial cells were obtained by ultrasonic emulsification. The extracts were acquired through high speed centrifugation and frozen for further use. The third generation of hADSCs were cultured and treated with streptolysin O (SLO). The mammary epithelial cell extracts were added into the 6 cases in the experimental group, but not added into the 6 cases in the control group. The morphological changes of ADSCs were observed during the cell culture process. The changes in zona occludens protein 1 (ZO1) and cytokeratin 18 (CK18) expression in each group were detected by Western blot. **Results** Flow cytometry showed that the expression of CD13, CD29, CD44, CD90, and CD105 were positive and the expression of CD45 was negative. At 16 days after ADSCs reprogramming in the experimental group, the cell morphology began to turn into an epithelial-like circle shape. Western blot results demonstrated that the expression of ZO1 and CK18 in the experimental group increased more significantly than that in the control group at the 18th day ($P < 0.05$). **Conclusion** Human mammary epithelial cell extracts can reprogram ADSCs and cause them to transform into epithelial cells.

【Key words】 Mammary epithelial cell; Adipose-derived stem cells; Reprogramming; Cell extracts

乳腺癌和其他乳腺切除术后病变不仅造成患者乳房外形的改变,而且对其身心健康也造成了严重影响,因此,乳房缺损修复重建成为许多患者的必然选择。目前最常见的乳房缺损修复方法为利用各种皮瓣再造乳房^[1-2]。这些皮瓣虽然是乳房再造的完美材料,然而,由于供区不足以及外科并发症限制了

其使用^[3],因此,组织工程技术成为人们探索乳房缺损修复重建的新思路^[4]。武汉市第三医院整形外科采用细胞重编程技术研究其促使脂肪来源干细胞(human adipose-derived stem cells, hADSCs)重编程为乳腺上皮细胞的可行性,探讨能否通过hADSCs来获得组织工程技术重建乳房所需的乳腺上皮细胞。

1 对象与方法

1.1 对象 收集自2015年6月至2016年11月就诊的12例行腹部脂肪抽吸术女性患者的脂肪组织标本,将获取的标本分为实验组和对照组,每组各6例。患者年龄21~38岁,平均28岁。标本的获取

DOI: 10.3969/j.issn.1673-7040.2017.12.002

基金项目:湖北省卫生计生科研项目(WJ2015MB145)

作者单位:1.武汉大学附属同仁医院(武汉市第三医院)整形外科,湖北 武汉 430060;2.武汉市医学会,湖北 武汉 430000

通信作者:王海燕, Email:892254067@qq.com

均征得患者的知情同意。正常乳腺上皮细胞株为 HBL-100(中国科学院上海细胞库)。

1.2 hADSCs 的分离和培养 无菌条件下获取 12 例人脂肪组织标本,通过胶原酶消化法分离并获得 hADSCs,然后对分离得到的 hADSCs 进行传代培养。取生长良好的第 3 代 hADSCs,利用流式细胞仪(FCM)检测细胞表面抗原(CD13-FITC、CD29-FITC、CD44-FITC、CD45-FITC、CD90-FITC 和 CD105-FITC)的表达情况。

1.3 人乳腺上皮细胞的培养和抽提物的制备 解冻冻存的人正常乳腺上皮细胞株(HBL-100),运用乳腺上皮细胞生长培养液(DMEM/F12 100 ml + 氢化可的松 100 μ l + 胰岛素 0.2 ml + 表皮生长因子 10 μ l + 牛血清白蛋白 1 ml)培养乳腺上皮细胞株。当细胞生长达到 70%~80%的亚融合状态时,离心收集乳腺上皮细胞,加入预冷的细胞裂解液,细胞悬液用脉冲超声匀浆化。于 4℃下 15 000 r/min 离心 15 min,提取上清蛋白质溶液,分装于冻存管中,迅速于液氮中冷冻 1 min,然后放入 -80℃冰箱中保存备用,制备出乳腺上皮细胞抽提物。

1.4 乳腺上皮细胞抽提物重编程 hADSCs 收集第 3 代 hADSCs,于冰冷的 PBS 中洗涤 2 遍后,分装于 1.5 ml EP 管中,于 4℃下 1500 r/min 离心 5 min,弃去上清液,加入浓度为 230 ng/ml 的链球菌溶血素 O 溶液。每 100 μ l 链球菌溶血素 O 溶液中平均 1×10^5 个细胞。将细胞置于 37℃水浴中 60 min,每隔 15 min 重悬 1 次;60 min 后,离心收集细胞。实验组每 1×10^5 个 hADSCs 中加入 100 μ l 乳腺上皮细胞抽提物和 ATP 生成体系(1 mmol ATP, 10 mmol 磷酸肌酸,25 μ g/ml 肌酸激酶及 ATP、CTP、GTP、UTP 各 1 mmol/L)。37℃水浴箱中孵育 1 h,每 20 min 重悬 1 次。此过程中,抽提液中成分进入 hADSCs 内。孵育结束后,加入含 10%FBS 的 DMEM(含有 2 mmol 的 CaCl_2),放置于 37℃水浴中 2 h,以封闭胞膜孔道。离心后换成乳腺上皮细胞生长培养液重悬,接种于培养瓶中进行培养。24 h 换液,以后每 3 d 换液 1 次。对照组为渗透化处理的 hADSCs 不加乳腺上皮细胞抽提物。每日通过倒置相差显微镜观察细胞形态的变化,细胞培养后第 18 天 Western blot 检测上皮细胞表面标志物卵透明带蛋白 1(zona occludens protein 1, ZO1)和 CK18 的表达。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,组间比较采用两样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流式细胞仪检测细胞表面抗原的表达 从人脂肪组织分离培养的干细胞表达间充质细胞表面标记物 CD13、CD29、CD44、CD90 和 CD105,而不表达造血细胞和内皮细胞表面标记物 CD45。

2.2 抽提物重编程后 hADSCs 形态的变化 乳腺上皮细胞抽提物重编程前实验组和对照组 hADSCs 在体外正常生长和增殖,呈典型的成纤维细胞形态。实验组重编程 16 d 后,hADSCs 外形开始转变为上皮样的圆形,且细胞单层生长(图 1a)。而对照组未分化的 hADSCs 仍保持细长的“纤维”型,且细胞界限不清,出现老化现象(图 1b)。

2.3 蛋白印迹法检测细胞 ZO1 和 CK18 的表达 乳腺上皮细胞抽提物重编程 18 d 后即细胞形态变圆后第 2 天,蛋白印迹法检测证实实验组上皮细胞抗原标志物 ZO1 和 CK18 表达增加(图 2),实验组与对照组 ZO1 和 CK18 蛋白的相对表达量比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图 3)

3 讨论

女性乳房由腺体、脂肪和结缔组织构成,目前乳房组织工程的主要环节集中在脂肪组织的生成^[5],对乳腺组织的再生关注较少。利用组织工程实现乳腺组织再生,首先想到的是乳腺干细胞。Gudjonsson 等^[6]从缩乳术患者标本中分离和建立了乳腺干细胞系,并证明其有分化成乳腺各种上皮细胞和形成乳腺腺体结构的能力。但是,乳腺干细胞的提取和分离过程十分困难,成功率低。因此,我们希望利用来源广泛的 hADSCs 来分化为乳腺上皮细胞。细胞重编程技术是近年来研究的热点,重编程可使细胞表型转化为目的细胞表型,其中利用细胞提取物介导是重编程的方法之一,它是指用供体细胞抽提物(包含细胞质及细胞核的可溶解成分)作用于受体细胞后,使受体细胞表达供体细胞的特异性基因^[7]。目前,国内外有较多利用细胞提取物进行重编程 hADSCs 的研究报道,如 Gaustad 等^[8]采用大鼠心肌细胞抽提物使部分 hADSCs 变成多核细胞;唐新杰等^[9]利用人表皮细胞抽提液重编程 hADSCs,使其向表皮细胞发生了转化。本研究利用人乳腺上皮细胞抽提物重编程 ADSCs,观察其能否向乳腺上皮样细胞转化。

利用人乳腺上皮细胞抽提物重编程 hADSCs,必须首先分离和培养 hADSCs。我们采用胶原酶消化法成功分离出 hADSCs,由于 hADSCs 尚无特异性的表面标志物,主要通过组织来源、细胞形态、细胞表型和其多向分化潜能等来进行综合判断。本研究分离的细胞来自于人体脂肪组织,培养的细

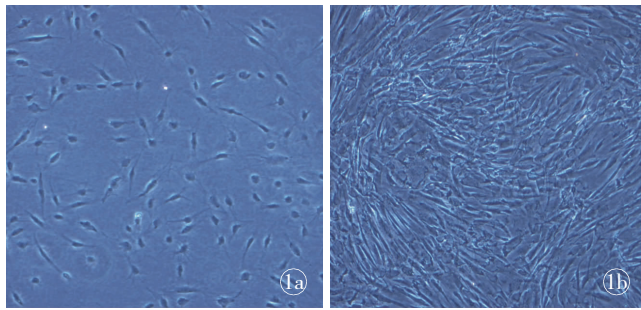
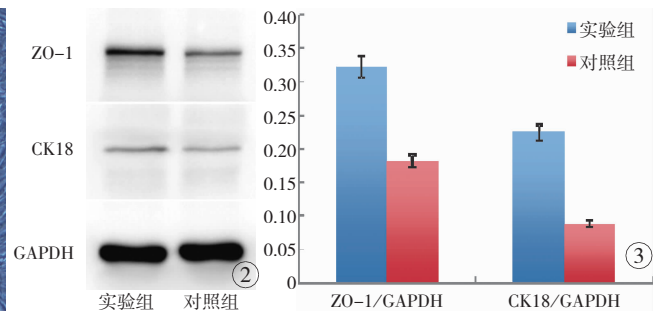


图 1 抽提物重编程 16 d 后 hADSCs 形态的变化 a. 实验组 b. 对照组 图 2 Western blot 检测实验组和对照组 ZO1 和 CK18 的表达 图 3 ZO1 和 CK18 在实验组和对照组相对表达量的比较



胞呈长而宽的梭形，为典型的成纤维细胞样形态。有研究^[10]表明，hADSCs 的细胞表型与间充质干细胞非常相似，均阳性表达 CD9、CD13、CD29、CD44、CD59、CD90、CD105、CD146 和 CD166 等，不表达造血系的标志物 CD31、CD34 和 CD45。我们分离培养的细胞通过流式细胞仪检测，细胞表面出现间充质干细胞特异性标志物 CD13、CD29、CD44、CD90 和 CD105，而不表达造血系的表面标志物 CD45，符合间充质干细胞的鉴定标准，且非造血系细胞分化而来。

本实验采用制备的人乳腺上皮细胞抽提物重编程 hADSCs 16 d 后，出现了细胞形态学的变化，由分层、细长的成纤维细胞形态转变为单层、圆形的上皮细胞形态。为了进一步证实重编程后的细胞为上皮细胞，我们在乳腺上皮细胞抽提物重编程 18 d 后即细胞形态变圆后第 2 天，利用 Western blot 检测上皮细胞抗原标志物 CK18 和 ZO1 的表达。细胞角蛋白 (cytokeratin, CK) 是在诱导分化过程中合成的第一个上皮细胞特异性结构蛋白之一 (cytokeratin18, CK18)^[11]。ZO1 是另外一个上皮细胞标志物^[12]。检测结果显示，实验组上皮细胞抗原标志物 ZO1 和 CK18 表达明显增加，实验组与对照组 ZO1 和 CK18 蛋白的相对表达量比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)，这进一步证实，重编程后出现形态改变的细胞为上皮细胞。结合细胞形态学的变化和细胞表面抗原标志物的表达变化，说明抽提物诱导 ADSCs 向上皮细胞发生了转化。该研究结果表明，通过 hADSCs 获得组织工程技术重建乳房所需的乳腺上皮细胞具有一定的可行性。

虽然我们重编程后的细胞经蛋白质印迹法检测细胞表面标志物 CK18 和 ZO1 出现阳性表达，这只能说明 hADSCs 向上皮细胞发生了转化。为了能够证实所转化的细胞为乳腺上皮细胞，我们下一步还要将重编程后的细胞进行体外三维培养，模拟人体内乳腺上皮细胞生长的微环境。如果在三维培养过程中能出现腺泡和导管样结构，而且还有高水平

的 Casein 蛋白表达，则可证实人乳腺上皮细胞抽提物可重编程 ADSCs 表达乳腺上皮细胞表型。

参考文献：

- [1] Petit JY, Rietjens M, Lohsiriwat V, et al. Update on breast reconstruction techniques and indications[J]. World J Surg, 2012,36(7): 1486-1497.
- [2] Chang EI, Chang EI, Soto-Miranda MA, et al. Comprehensive analysis of donor-site morbidity in abdominally based free flap breast reconstruction[J]. Plast Reconstr Surg, 2013,132(6):1383.
- [3] Findlay MW, Dolderer JH, Trost N, et al. Tissue-engineered breast reconstruction: bridging the gap toward large-volume tissue engineering in humans[J]. Plast Reconstr Surg, 2011,128(6):1206.
- [4] Golas AR, Hernandez KA, Spector JA. Tissue engineering for plastic surgeons: a primer[J]. Aesthetic Plast Surg, 2014,38(1):207-221.
- [5] 詹炜卿, 高建华, 鲁峰. 应用组织工程实现工程化乳房构建的研究进展[J]. 中华整形外科杂志, 2013,29(5):395-398.
- [6] Gudjonsson T, Villadsen R, Nielsen HL, et al. Isolation, immortalization, and characterization of a human breast epithelial cell line with stem cell properties[J]. Genes Dev, 2002,16(6):693-706.
- [7] 唐新杰, 谢峰, 张群. 细胞提取物重编程作用的研究进展[J]. 组织工程与重建外科杂志, 2011,7(1):48-50.
- [8] Gaustad KG, Boquest AC, Anderson BE, et al. Differentiation of human adipose tissue stem cells using extracts of rat cardiomyocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004,314(2):420-427.
- [9] 唐新杰, 谢峰, 宋楠, 等. 人表皮细胞抽提物重编程 ADSCs 的实验研究[J]. 组织工程与重建外科杂志, 2011,7(3):129-132.
- [10] De Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA, et al. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow[J]. Immunol Lett, 2003, 89(2-3):267-270.
- [11] Baer PC, Bereiter-Hahn J, Missler C, et al. Conditioned medium from renal tubular epithelial cells initiates differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. Cell Prolif, 2009,42(1):29-37.
- [12] Baer PC, Brzoska M, Geiger H. Epithelial differentiation of human adipose-derived stem cells[J]. Methods Mol Biol, 2011,702:289-298.

(收稿日期:2017-08-28)

本文引用格式:杨艳清, 江昌艳, 张洁, 等. 人乳腺上皮细胞抽提物重编程人脂肪来源于干细胞的实验研究[J]. 中国美容整形外科杂志, 2017,28(12):709-711.DOI:10.3969/j.issn.1673-7040.2017.12.002.