

· 脂肪源性干细胞与组织工程论著 ·

人脂肪细胞外基质的制备及评价

舒军¹ 马超¹ 温艳玲² 李金龙³ 马恬¹ 张萌萌¹ 姜珊¹ 韩为东⁴ 韩岩¹

【摘要】 目的 探寻细胞体外生长理想的三维支架结构的。方法 人脂肪细胞外基质的制备:通过物理、化学、酶处理联合的方法进行脂肪组织脱细胞处理,获得人脂肪细胞外基质成分,制备成基质材料;并对人脂肪细胞外基质材料进行评价。采用 CCK-8 法检测基质材料的细胞毒性,观察基质材料的体外黏附情况;采用 Ki67 染色来观察 hADSC-gfp 在基质材料的增殖情况,观察脂肪间充质干细胞的分化功能。结果 (1)脂肪组织经脱细胞处理可制备不同形状的基质材料。(2)基质材料脱细胞彻底。(3)基质材料中含丰富的胶原蛋白、层黏连蛋白等有效成分。(4)基质材料无细胞毒性;细胞在基质材料上的黏附及增殖能力强;接种基质材料上的脂肪来源干细胞可诱导向表皮细胞分化。结论 人脂肪细胞外基质制作方法简单,脱细胞较彻底,有效成分保留较好,无细胞毒性,易于细胞黏附、增殖及分化。

【关键词】 脂肪细胞外基质;脱细胞基质;脂肪组织;脂肪来源干细胞;支架材料

Preparation and characterization of the extracellular matrix of human adipose tissue

SHU Jun, MA Chao, WEN Yan-ling, LI Jin-long, MA Tian, ZHANG Meng-meng, JIANG Shan, HAN Wei-dong, HAN Yan. (Department of Plastic Surgery, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China)

Corresponding author: HAN Yan, Email:13720086335@163.com; HAN Wei-dong, Email:304555414@qq.com

【Abstract】 Objective To explore the ideal three-dimensional scaffold structure for cell growth in vitro. Methods Preparation of human adipose extracellular matrix: adipose tissue decellularization is performed by a combination of physical, chemical, and enzyme treatments. The human adipose extracellular matrix was obtained and lyophilized to prepare matrix material with different shapes. The human adipose extracellular matrix material was evaluated. The cytotoxicity of matrix material was detected by the CCK-8 method. The adhesion of matrix material in vitro was observed. The proliferation of hADSC-gfp in matrix material by Ki67 staining and the differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells was also observed. Results (1) The adipose tissue was treated with different shapes of matrix materials by decellularization, (2) matrix material was thoroughly acellular, (3) matrix material was rich in collagen, laminin, and other active ingredients, (4) matrix material was without cytotoxicity. The adhesion and proliferation abilities of cells on the matrix materials were strong. The adipose-derived stem cells inoculated on the matrix material could be induced to the epidermal cells. Conclusion The preparation method of the extracellular matrix of human adipose tissue is simple: the cells are more completely decellularized and the effective components are well-preserved. This method yields cells that are low in density, high in porosity, with good water absorption, no cytotoxicity, and ease of cell adhesion, proliferation, and differentiation.

【Key words】 Adipose extracellular matrix; Acellular matrix; Adipose tissue; Human adipose stem cells; Scaffold material

因外伤、感染、先天性畸形、肿瘤切除等引起的软组织损伤呈逐年增加^[1],理想的软组织损伤治疗方案是完全重建缺损组织的结构和功能,并通过自体或异体组织移植来代替缺损的组织。工程材料修复是治疗软组织损伤的理想方法之一,即具有体外扩增相关细胞的功能,将扩增的细胞接种于支架材料中,经体外复合培养后移植到需要修复部位,重建缺损的组织器官。自 2016 年初以来,笔者采用物理、化学及酶消化处理的方法从吸脂术后废弃的人

脂肪组织中获取脂肪细胞外基质成分,冻干制备成基质材料,并对基质材料的脱细胞程度、部分有效成分保留情况、材料的表征及细胞相容性等方面进行评价,从而探寻脂肪细胞外基质材料理想的制备及评价方法,便于后期临床应用。

1 对象与方法

1.1 实验对象

脂肪组织来源于解放军总医院整形修复科收治吸脂术的成年健康女性(5 例)。年龄 20~50 岁, BMI<30,无糖尿病及高血压病,无重大全身代谢性疾病和脂质紊乱,血红蛋白>10 g/L。均获患者知情同意。

脂肪来自腹部、大腿,采用肿胀麻醉,肿胀液配制 0.9%生理盐水 1000 ml+2%利多卡因 10 ml+

DOI: 10.3969/j.issn.1673-7040.2017.12.004

作者单位:解放军总医院(1.整形修复科;3.病理科;4.分子免疫室),北京 100853;2.大连医科大学,辽宁 大连 116044

通信作者:韩岩,Email:13720086335@163.com;

韩为东,Email:304555414@qq.com

0.1%肾上腺素 1 ml,负压吸脂装置在相同压力下抽吸脂肪,吸脂针直径 3 mm;将获取的脂肪组织在无菌条件下分装于 50 ml 离心管中,洗涤后 -80℃冻存。

1.2 主要试剂与仪器

试剂胰酶/EDTA(中国医学科学院生物医学工程研究所);异丙醇(北京化工厂);Benzonase 核酸酶(深圳海基生物科技有限公司);PBS、L-DMEM(美国 Hyclone 公司);兔抗人 Ki67 抗体(美国 Sigma 公司);兔抗人 CK19 抗体、RITC-羊抗兔 IgG 二抗、PMSF(美国博士德生物公司)。

仪器:光学显微镜、倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司);细胞培养孵箱、冰冻切片机(美国 Thermo 公司)。

1.3 人脂肪来源干细胞的分离与培养

人脂肪来源干细胞(human adipose-derived stem cells, hADSC)均取自同一患者,采用酶消化法分离获取。步骤如下:将 0.1 M PBS 充分洗涤脂肪颗粒组织,去除肿胀液、血液及细胞碎片;充分剪碎脂肪颗粒,加入含 0.1% I 型胶原酶的 L-DMEM,于 37℃、120 r/min 摇床消化 40 min;加入同体积含 10%FBS 的 L-DMEM 终止消化;静置分层,200 目筛网过滤;收集过滤液,1500 r/min 离心 10 min,弃上清,保留沉淀细胞成分;加入含 10%FBS 的 L-DMEM 重悬,混匀计数,接种于 10 cm 培养皿中;于 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱中常规培养,24 h 后首次更换培养基;每 2~3 d 更换 1 次培养基,待脂肪来源干细胞生长至融合度达 80%左右,进行细胞传代。

1.4 慢病毒转染 hADSC

慢病毒购自上海合元生物有限公司。病毒转染步骤:取第 1 代 hADSC,以 1×10^5 /孔接种于 24 孔板,置入 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 24 h;弃培养基,每孔加入含 6 μg/ml 聚胺及 10%FBS 的 L-DMEM 2 ml;每孔加入 10 μl 病毒液(GFP 病毒滴度 7×10^8 /ml, MOI=40),充分混匀,置于培养箱培养 24 h;弃培养基,0.1 mmol/L PBS 洗涤 1 次,加入含 10%FBS 的 L-DMEM 2 ml,置于培养箱中继续培养;转染后 48~72 h,荧光显微镜观察细胞荧光表达情况。

1.5 人脂肪细胞外基质材料的制备

所有的消化及萃取过程均在 37℃、120 r 培养箱中,脱细胞液中均加入 1%的青霉素/链霉素和 PMSF。步骤:(1)将获取的脂肪组织 20 ml 置入 50 ml 离心管中。(2)0.1 mmol/L PBS 洗涤 3 次,去除血液和肿胀液成分。(3)-80℃冻存 1 h,37℃复温 40 min,3 个冻融循环。(4)7000 r/min 离心 3 min,弃上层油脂、下

层液体及沉淀物。(5)加入 0.25%胰酶/0.1%EDTA,37℃、120 r/min 消化过夜。(6)0.1 mmol/L PBS 洗涤 3 次,30 min/次。(7)99.9%异丙醇萃取 36 h,每 12 h 更换异丙醇,以除去脂质。(8)0.1 mmol/L PBS 洗涤 3 次,30 min/次。(9)0.25%胰酶/0.1%EDTA 消化 4 h。(10)0.1 mmol/L PBS 洗涤 3 次,30 min/次。(11)1000 U 核酸酶消化过夜。(12)0.1 mmol/L PBS 洗涤 3 次,30 min/次。(13)99.9%异丙醇萃取 6 h。(14)0.1 mmol PBS 洗涤 3 次,30 min/次。(15)将获得的脂肪细胞外基质置入孔板中,-20℃冷冻。(16)真空冻干机 24 h 冻干备用。

1.6 人脂肪细胞外基质材料的评价

1.6.1 脱细胞评价 取冻干后基质材料,经 4%多聚甲醛固定 24 h,石蜡包埋,6 μm 连续切片,行 HE、DPAI、油红 O 染色,观察基质材料中细胞成分、核酸、脂质成分残留情况。将冻干的脂肪细胞外基质材料,进行扫描电子显微镜观察。

1.6.2 部分相关成分检测 取冻干后的人脂肪细胞外基质材料,经 4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,6 μm 连续切片,行天狼星红染色观察总胶原蛋白成分保留情况,行 EVG 染色观察弹力纤维保留情况。

1.6.3 细胞相容性评价 (1)细胞毒性。将灭菌后的人脂肪细胞外基质置于含 10%胎牛血清的 L-DMEM 中,于 37℃、5%CO₂ 孵箱中浸泡 24 h,弃浸泡液;再次用含 10%胎牛血清的 L-DMEM 浸泡 24 h,获取浸泡液;将培养到第 5 代的 hADSC,按 1000 个/孔的细胞密度接种于 96 孔板中,每组设置 6 个复孔,培养基培养 24 h 后,弃培养基,分别加入 200 μl 含 100%、75%、50%、25%、0%浸泡液的培养基,每天更换培养基;培养 1、3、5 d 时,每孔加入 10 μl CCK-8,温箱孵育 2.5 h,酶标仪(490 nm)检测吸光度值。(2)体外黏附实验。将冻干的人脂肪细胞外基质置入含 10%胎牛血清的 L-DMEM 的 6 孔板中,37℃、5%CO₂ 孵箱过夜。弃培养基后,第 5 代 hADSCs-gfp 以 1×10^6 /cm²(约 50 μl)均匀接种至人脂肪脱细胞基质表面,置入 37℃、5%CO₂ 孵箱中,4 h 后加入培养基。用倒置荧光显微镜观察接种后 0、2、4、24 h 及 3 d 时细胞的状态及其与基质材料的黏附情况。(3)细胞增殖情况。将第 5 代的 hADSCs-gfp 接种到人脂肪细胞外基质材料中,用含 10%胎牛血清的 L-DMEM 培养,每 2 d 更换 1 次培养基,培养至第 7 天时取材,用多聚甲醛固定,蔗糖沉淀,OCT 包埋,冰冻切片,厚度为 6 μm,行 Ki67、DAPI 染色。(4)诱导分化情况。将第 3 代的 hADSCs-gfp 接种到

人脂肪细胞外基质材料中,用含 10%胎牛血清的 L-DMEM 培养。培养 2 d 后,将接种脂肪来源干细胞的基质材料在无菌条件下转移至 transwell 小室内,加入适量培养基至微孔滤膜水平,使基质材料暴露于气液面上。每天更换培养基,荧光显微镜观察细胞成活情况;培养至第 7 天时取材,多聚甲醛固定,蔗糖沉淀,OCT 包埋,冰冻切片,厚度为 6 μm ,行 CK19、DAPI 染色。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 17.0 分析软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 人脂肪细胞外基质材料制备

吸脂术获得的脂肪组织颗粒经多次冻融、胰酶/EDTA 消化、异丙醇萃取、核酸酶处理,可获得乳白色凝胶样絮状材料。经真空冻干机冻干可制备不同形状、厚度及可用于注射的基质材料。将冻干的基质材料于 PBS 中浸泡 24 h,光学显微镜可见基质材料呈现孔径大小不一的多孔状结构。

2.2 人脂肪细胞外基质材料评价

2.2.1 脱细胞评价 HE 染色可见冻干后的基质材料中无细胞结构,仅可见红染的细胞外基质成分,其内可见网格状支架微结构。DAPI 染色显示基质材料中无蓝色荧光细胞核成分,仅可见蓝色折光的基质材料。油红 O 染色仅可见基质材料的支架结构,未见红染脂滴及蓝染的细胞核成分。SEM 检查可见人脂肪细胞外基质材料中无细胞结构,呈现出孔径不一的多孔状结构。见图 1。

2.2.2 部分有效成分检测 人脂肪细胞外基质天狼星红染色可见基质材料中胶原蛋白呈红染,排列致密。人脂肪细胞外基质弹性蛋白 EVG 染色可见基质材料中弹性蛋白成分被染成紫红色。

2.2.3 细胞相容性评价 (1)细胞毒性。细胞外基质材料浸泡液用于 hADSC 培养,可见脂肪来源干细胞生长良好,不同浓度的浸泡液间细胞增殖率无明显差异($P > 0.05$),这说明提取的细胞外基质材料无细

胞毒性成分释放。(2)细胞黏附性。荧光显微镜下可见刚接种于基质材料中的 hADSC-gfp 呈圆形,接种后 2 h 可见大部分细胞伸出触角黏附于基质材料中;接种后 4 h 可见 hADSC-gfp 沿基质材料支架结构表面黏附排列,呈现干细胞的长梭形细胞形态特征;接种 24 h 后可见成活的脂肪来源干细胞完全黏附于材料中。接种后连续观察可见脂肪来源干细胞沿支架材料生长,且细胞数量较接种前明显增多。(3)细胞增殖性。取接种 hASCs-gfp 7 d 后的基质材料行 Ki-67 染色,可见处于增殖期的细胞核发红色荧光,与 DAPI 复染的呈蓝色荧光的细胞核重合,增殖率为 75%~85%,表明脂肪来源干细胞在脂肪细胞外基质材料上增殖良好。(4)hADSCs-gfp 于基质中向表皮细胞分化情况。可见 hADSCs-gfp 于基质材料中成活良好,荧光显微镜观察可见绿色荧光逐渐增强。DAPI 染色可见红色、绿色荧光中存在蓝色荧光,提示细胞核存在。CK19 染色阳性,表明接种在脂肪细胞外基质材料中的 hADSCs 向表皮细胞分化。但鉴于培养时间较短,且干细胞诱导条件较弱,hADSCs 向表皮细胞分化率较低。

3 讨论

组织经脱细胞处理后可制备细胞外基质材料。细胞外基质主要是由机体细胞合成并分泌到细胞外,分布在细胞表面及细胞间的一种多功能的蛋白质和多糖的复合物,主要成分包括胶原蛋白、纤黏连蛋白、层黏连蛋白、蛋白聚糖、氨基聚糖及生长因子成分等^[2-3]。这些蛋白及多糖分子在刺激细胞的增殖和分化、引导细胞迁移、调节细胞反应等方面起着关键作用^[4]。目前已成功提取的细胞外基质材料包括:膀胱^[5]、皮肤^[6]、血管^[7]、神经^[8]、软骨^[9]、肺^[10]等,但这些生物材料大多来源于异种或异体组织,脱细胞过程复杂且细胞成分难彻底脱除。

人脂肪细胞外基质因其来源丰富、可源于自体,易于获得及制备,并且具备独特的三维空间结构及良好的细胞相容性等优点,可作为组织修复的理想材料之一,目前仍处于临床前研究阶段。脂肪细胞外基质的制备方法 & 评价标准仍存在许多争

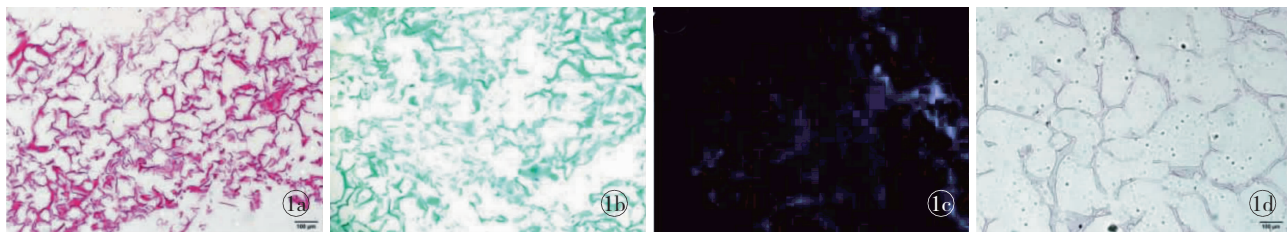


图 1 脂肪细胞外基质材料病理学染色($\times 100$) a. HE 染色 b. Masson 三色染色 c. DAPI 染色 d. 油红 O 染色

议,不同的提取方法所获得的脂肪细胞外基质的有效成分、细胞毒性及组织相容性差异较大^[11-12]。

我们通过反复冻融、胰酶/EDTA 消化、异丙醇萃取及核酸酶处理获得的脂肪细胞外基质,缩短了基质材料的制备时间,制备过程简单,无剧毒外源性毒性物质污染,仅需简单灭菌即可使用,如钴-60 照射,甚至乙醇浸泡过夜,即可用于细胞培养,且材料无需交联,在乙醇、PBS、生理盐水及 SD 鼠体内均可保持冻干后形态。脂肪细胞外基质材料具有很好的可塑性,可制备成片状、管状,且可注射粉末状等不同的形态,并可根据冻存温度不同调节基质材料孔径大小^[13-14]。不足之处在于材料本身强度较弱,支撑力较差,不经处理很难作为较高强度的支撑材料。基质支架材料脱细胞评价,显示脂肪组织脱细胞比较彻底,基本无细胞成分、脂质及核酸残留。成分评价显示,部分有效成分保留好,促进细胞黏附和增殖的胶原蛋白成分含量丰富。我们制备的脂肪细胞外基质材料无细胞毒性,细胞接种后短时间内即可黏附其上,并保持很高的增殖活性。将接种 hADSCs 的基质材料于气液平面培养,模拟人表皮环境,可见 hADSCs 向表皮细胞分化。这些均提示其细胞相容性好。

通过实验发现,从吸脂术后废弃的脂肪颗粒中提取人脂肪细胞外基质成分制备的基质材料,脱细胞彻底,具有很好的生物材料特征,易于细胞黏附、增殖,无细胞毒性,有望成为修复软组织损伤,填充皮下软组织缺陷,诱导干细胞分化的理想材料之一。

参考文献:

- [1] Gee AO, Baker BM, Silverstein AM, et al. Fabrication and evaluation of biomimetic-synthetic nanofibrous composites for soft tissue regeneration[J]. Cell Tissue Res, 2012,347(3):803-813.
- [2] Badylak SF. The extracellular matrix as a biologic scaffold material[J]. Biomaterials, 2007,28(25):3587-2593.
- [3] Brown BN, Freund JM, Han L, et al. Comparison of three methods for the derivation of a biologic scaffold composed of adipose tissue extracellular matrix[J]. Tissue Eng Part C Methods, 2011,17(4):

411-421.

- [4] Friedl P, Zanker KS, Brocker EB. Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: differences in morphology, cell matrix interactions, and integrin function[J]. Microsc Res Tech, 1998,43(5):369-378.
- [5] Yuan H, Zhuang Y, Xiong J, et al. Human umbilical mesenchymal stem cells-seeded bladder acellular matrix grafts for reconstruction of bladder defects in a canine model[J]. PLoS One, 2013,8(11):e80959.
- [6] Wainwright D, Madden M, Luterma A, et al. Clinical evaluation of an acellular allograft dermal matrix in full-thickness burns[J]. J Burn Care Rehabil, 1996,17(2):124-136.
- [7] Gao Y, Liu F, Zhang L, et al. Acellular blood vessels combined human hair follicle mesenchymal stem cells for engineering of functional arterial grafts[J]. Ann Biomed Eng, 2014,42(10):2177-2189.
- [8] Liu J, Chen J, Liu B, et al. Acellular spinal cord scaffold seeded with mesenchymal stem cells promotes long-distance axon regeneration and functional recovery in spinal cord injured rats[J]. J Neurol Sci, 2013,325(1-2):127-136.
- [9] Yang Q, Peng J, Guo Q, et al. A cartilage ECM-derived 3-D porous acellular matrix scaffold for in vivo cartilage tissue engineering with PKH26-labeled chondrogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. Biomaterials, 2008,29(15):2378-2387.
- [10] Doryab A, Heydarian M, Amoabediny G, et al. Recellularization on acellular lung tissue scaffold using perfusion-based bioreactor: an online monitoring strategy[J]. Journal of Medical and Biological Engineering, 2017,37(1):1-10.
- [11] Choi JS, Choi YC, Kim JD, et al. Adipose tissue: a valuable resource of biomaterials for soft tissue engineering[J]. Macromolecular Research, 2014,22(9):932-947.
- [12] Banyard DA, Borad V, Amezcua E, et al. Preparation, characterization, and clinical implications of human decellularized adipose tissue extracellular matrix(hDAM): a comprehensive review[J]. Aesthet Surg J, 2016,36(3):349-357.
- [13] Choi JS, Yang HJ, Kim BS, et al. Fabrication of porous extracellular matrix scaffolds from human adipose tissue[J]. Tissue Eng Part C Methods, 2010,16(3):387-396.
- [14] Choi JS, Yang HJ, Kim BS, et al. Human extracellular matrix (ECM) powders for injectable cell delivery and adipose tissue engineering[J]. J Control Release, 2009,139(1):2-7.

(收稿日期:2017-10-10)

本文引用格式:舒军,马超,温艳玲,等.人脂肪细胞外基质的制备及评价[J].中国美容整形外科杂志,2017,28(12):716-719.DOI:10.3969/j.issn.1673-7040.2017.12.004.

读者·作者·编者

关于缩略语使用的要求

中文摘要及正文中首次出现缩略语时应先写出其中文全称,在括号中注出其英文全称及缩略语,两者间以逗号隔开。英文摘要中的缩略语应于首次使用时将其英文全称注出。缩略语的使用需规范、准确,避免出现与缩略语相同的词语。公知公用的缩略语可不写出其全称。缩略语不得移行。