

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000255

Transwell 小室环境下人脂肪干细胞对不同年龄成纤维细胞功能的影响

杜云鹏, 沈为民, 申 霄

(重庆医科大学附属第一医院整形美容科, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究在 Transwell 小室环境条件下,脂肪干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)分别对青年人来源和老年人来源成纤维细胞功能的影响及其差异。**方法:**从人脂肪组织中分离、培养 ADSCs,从青年人和老年人皮肤组织中分离、培养青年人来源成纤维细胞和老年人来源成纤维细胞,用 Transwell 小室建立共培养模型,细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒检测共培养后成纤维细胞增殖情况,RT-PCR 检测共培养后成纤维细胞 I 型胶原、基质金属蛋白酶-1(matrix metalloproteinase -1, MMP-1)、 β -半乳糖苷酶 mRNA 表达。**结果:**(1)共培养后老年人和青年人实验组成纤维细胞增殖分别高于老年人和青年人对照组成纤维细胞($P=0.000$),且青年人实验组增殖高于老年人实验组($P=0.000$)。(2)共培养后老年人和青年人实验组成纤维细胞的 I 型胶原和 β -半乳糖苷酶 mRNA 表达分别高于老年人和青年人对照组成纤维细胞($P=0.000$),且青年人实验组的 I 型胶原和 β -半乳糖苷酶 mRNA 表达均高于老年人实验组($P=0.002$ 、 $P=0.000$)。(3)共培养后老年人和青年人实验组成纤维细胞的 MMP-1 mRNA 表达分别低于老年人和青年人对照组成纤维细胞($P=0.000$),青年人实验组的 MMP-1 mRNA 表达低于青年人实验组($P=0.055$),差异无统计学意义,此结果的产生可能与共培养后青年人成纤维细胞和老年人成纤维细胞增殖均较活跃,产生的 MMP-1 均较少有关。**结论:**ADSCs 与成纤维细胞共培养,能促进不同年龄成纤维细胞的增殖能力和胶原蛋白的分泌能力。

【关键词】人脂肪干细胞;人成纤维细胞;Transwell 小室;共培养

【中图分类号】R62

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-09-28

Effect of human adipose-derived stem cells on function of human fibroblasts of different ages in Transwell system

Du Yunpeng, Shen Weimin, Shen Xiao

(Department of Plastic Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of adipose-derived stem cells (ADSCs) on young and elderly derived fibroblasts in Transwell system. **Methods:** ADSCs were isolated from human adipose tissues and were cultured. Fibroblasts derived from young people and old people were isolated from human skin tissue and were cultured. ADSCs and fibroblasts were co-cultured in Transwell chamber. Fibroblasts proliferation was evaluated by cell proliferation and cytotoxicity assay kit. Expression of fibroblasts collagen type I and matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and β -galactosidase mRNA were evaluated by RT-PCR. **Results:** (1) The proliferation of youth experimental group and elderly experimental group were obviously higher than that of young control group and elderly control group ($P=0.000$), and the proliferation of youth experimental group is higher than that of elderly experimental group ($P=0.000$). (2) The expression of collagen type I and β -galactosidase mRNA of youth experimental group and elderly experimental group was obviously higher than that of youth control group and elderly control group ($P=0.000$), and the expression of collagen type I and β -galactosidase mRNA of youth experimental group was higher than that of elderly experimental group ($P=0.002$, $P=0.000$). (3) The expression of MMP-1 mRNA of youth experimental group and elderly experimental group was obviously lower than that of youth control group and elderly control group ($P=0.000$), but the expression of MMP-1 mRNA of youth experimental group was lower than that of elderly experimental group ($P=0.055$); the results may relate with the proliferation of fibroblasts and decreased production of MMP-1 in the elderly and the

young after the co-culture. **Conclusion:** Fibroblasts cultured with ADSCs can promote fibroblasts proliferation and collagen secretion.

【Key words】 human adipose-derived stem cells; dermal fibroblast; Transwell chamber; co-culture

作者介绍: 杜云鹏, Email: 598506027@qq.com,

研究方向: 伤口愈合。

通信作者: 沈为民, Email: 358547026@qq.com。

基金项目: 2012 年中华医学会-欧莱雅中国人健康皮肤/毛发研究项目
(编号: S2012091001)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000255.html>

皮肤衰老是机体衰老的一个重要组成部分,不仅有益于容貌,而且与许多皮肤病的发生有着密切的关系^[1]。因此,预防和延缓衰老已成为生命科学研究的热点之一^[2]。脂肪干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)目前被认为是具有极大应用价值的成体干细胞来源。ADSCs 取材方便,并且存活率高,在低血糖、低谷氨酰胺、低氧浓度下仍可保持活性^[3]。有文献报道,ADSCs 培养液能刺激创伤创面的成纤维细胞的增殖以及促进创面的愈合,这为研究 ADSCs 对正常人真皮成纤维细胞的作用提供了依据^[4]。本实验通过 Transwell 小室模拟人体皮下 ADSCs 和真皮成纤维细胞所处的内环境状态,观察 ADSCs 对不同年龄来源成纤维细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本 脂肪标本来自重庆医科大学附属第一医院整形美容科吸脂术后脂肪组织(供者为 20 岁健康女性,脂肪标本取其腹部脂肪组织),约 20 ml;青年人(平均年龄<25 岁)和老年人(平均年龄>60 岁)皮肤标本来自重庆医科大学附属第一医院整形美容科局麻手术后切下健康的、丢弃的皮肤组织(所有标本均征得患者同意并签署知情同意书)。标本的收集以及实验均征得重庆医科大学附属第一医院伦理委员会的同意。

1.1.2 主要试剂 DMEM(F12)培养基购自 Gibco 公司,胎牛血清购自 HyClone 公司,Transwell 小室购自 Corning 公司,胶原酶和胰蛋白酶购自 Sigma 公司,CD90 鼠抗人一抗购自 BD 公司,CD34、CD44 鼠抗人一抗购自 Millipore 公司,异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的流式细胞检测羊抗鼠二抗来自四正柏公司,MTT 试剂盒购自凯基公司,Rever Tre Ace-a-逆转录试剂盒购自 TOYOBO 公司。

1.1.3 主要仪器 无菌操作台(中国苏净集团),高速离心机(Sigma 公司),超低温冰箱(美国 NBS),恒温水浴箱(中国江苏金坛荣华),细胞培养箱(美国赛默飞公司),倒置显微镜(OLYMPUS 公司),PCR 仪(Bio-Rad 公司),酶标仪,(BioTek 公司),流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 人 ADSCs 的培养 将脂肪组织悬液分装于离心管内,离心 5 min,弃下层液体,再用含双抗的 PBS 反复冲洗组织 3 次,加入 0.1% I 型胶原酶,于 37 °C 水浴锅内振荡消化 30 min;离心后去上清,加入含 10% 血清的 DMEM(F12)培养基终止消化后,用孔径 75 μ m 的细胞筛过滤,再次离心去上清,用含 10% 血清的 DMEM(F12)培养基重悬接种于培养瓶中,置于 37 °C、5% 的 CO₂ 培养箱中常规培养,2 d 后首次换液,细胞长满 90% 融合后进行传代。取 3 代生长良好的 ADSCs 进行流

式细胞表面抗原鉴定。

1.2.2 青年人和老年人的真皮成纤维细胞的培养 将皮肤组织用含双抗的 PBS 反复冲洗 3 次,用眼科剪剪去皮下结缔组织,将皮肤组织放入含 0.25% 胰酶 10 ml 无血清的 DMEM(F12)培养基中,37 °C、5% 的 CO₂ 培养箱中孵育 30 min。用眼科剪将孵育后的皮肤组织尽量剪碎,再将皮肤组织放入含 0.25% 胰酶 10 ml 无血清的 DMEM(F12)培养基中,37 °C、5% 的 CO₂ 培养箱中孵育 3 h。用 75 μ m 的细胞筛过滤,离心去上清,用含 10% 血清的 DMEM(F12)培养基重悬接种于培养瓶中,置于 37 °C、5% 的 CO₂ 培养箱中常规培养,2 d 后首次换液,细胞长满 90% 融合后进行传代。

1.2.3 实验分组 实验分为 4 组:A 组,老年人成纤维细胞组;B 组,老年人成纤维细胞+ADSCs 共培养组;C 组,青年人成纤维细胞组;D 组,青年人成纤维细胞+ADSCs 共培养组。每组设 3 个副孔,A 组和 C 组分别为老年人对照组和青年人对照组,B 组和 D 组分别老年人实验组和青年人实验组。各组共培养时间均为 3 d。

1.2.4 细胞共培养体系建立 利用微孔直径为 0.4 μ m Transwell 小室建立非接触的细胞共培养系统。选取 3 代生长状态良好的青年人和老年人皮肤成纤维细胞,用胰酶消化制成单细胞悬液,密度均为 2×10^5 /ml,接种于 12 孔板,青年和老年皮肤成纤维细胞各 6 孔,每孔 1 ml。再取 3 代生长状态良好的 ADSCs,用胰酶消化制成单细胞悬液,密度为 1×10^5 /ml,接种于 Transwell 内底面,将小室置于接种有成纤维细胞的孔板中。A 组和 C 组不置入 Transwell 小室。

1.2.5 细胞形态观察 倒置相差显微镜下观察各组成纤维细胞形态变化。

1.2.6 MTT 法测定细胞增殖 移去共培养小室,每孔加入 MTT 反应液 500 μ l,在细胞培养箱中孵育 4 h,吸出液体后每孔加入二甲基亚砷溶液 1 ml,振荡溶解 10 min,将液体移入 96 孔板,每孔重复 3 次,在酶标仪上选择 490 nm 波长,检测各孔吸光度(absorbance, A)值。

1.2.7 RT-PCR 检测各组成纤维细胞的 I 型胶原,基质金属激酶-1(Matrix metalloproteinase -1, MMP-1), β -半乳糖苷酶 mRNA 表达 由南京金斯瑞公司科技有限公司设计并合成引物。I 型胶原上游引物序列为 5'-GCACGAAACACACT-GGGAATG-3',下游引物序列为 5'-GGCCAACGTCCACAC-CAAATTC-3',产物长度为 262 bp;MMP-1 上游引物序列为 5'-CCCCAAAAGCGTGTGACAGTAAG-3',下游引物序列为 5'-GAAGGGATTGTGCGCATGTAGA-3',产物长度为 200 bp; β -半乳糖苷酶上游引物序列为 5'-GTGCATTGGCCAT-ACCCTTAGG-3',下游引物序列为 5'-CACACGGTCAGCA-TGCATAAATA-3',产物长度为 259 bp。内参照 β -actin 上游序列 5'-ACCCCGTGCTGTGACCGAG-3',下游序列 5'-TCCCGCCAGCCAGGTCCA-3',产物长度 249 bp。提取各组成纤维细胞 RNA,紫外分光光度计测定 260/280 nm 波长下 A 值,计算 RNA 浓度,按试剂盒说明进行反转录操作。上荧光

定量 PCR 仪,扩增条件为:94 ℃,5 min;94 ℃ 30 s,57 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,共 45 个循环;72 ℃,10 min。

1.3 统计学方法

所有数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,数据均为计量资料,用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据采用单因素方差分析,总体差异有统计学意义情况下,两组之间比较再采用 LSD-*t* 法进行组间较。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 共培养后成纤维细胞形态观察

老年人成纤维细胞体积较大,形状不规则,多呈多突起的扁平星状,细胞质中有较多的颗粒状物质沉积(图 1)。共培养后的老年人成纤维细胞,逐渐转变为长梭型,细胞质中颗粒状物质消失(图 2)。青年人成纤维细胞形状规则,多呈长梭型(图 3)。共培养后的青年人成纤维细胞形状无明显改变,但细胞整体分布呈漩涡状(图 4)。

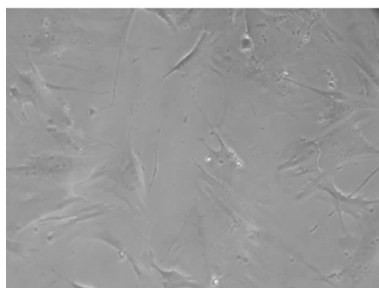


图 1 老年人成纤维细胞 (200 ×)

Fig.1 Fibroblasts of the elderly (200 ×)

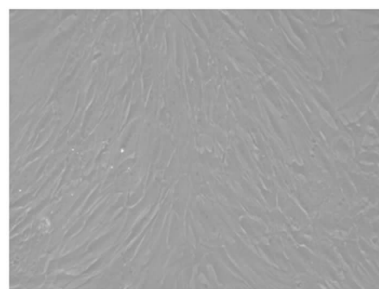


图 2 老年人成纤维细胞共培养后 (200 ×)

Fig.2 Fibroblasts cultured with ADSCs of the elderly (200 ×)

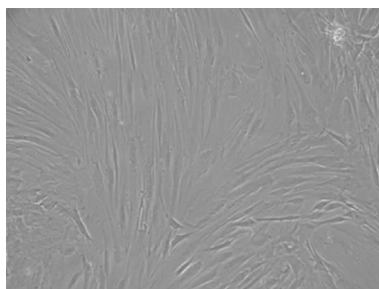


图 3 青年人成纤维细胞 (200 ×)

Fig.3 Fibroblasts of the young (200 ×)

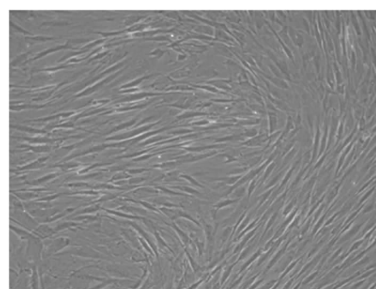


图 4 青年人成纤维细胞共培养后 (200 ×)

Fig.4 Fibroblasts cultured with ADSCs of the young (200 ×)

2.2 ADSCs 细胞表面抗原鉴定

流式结果显示所选取的第 3 代 ADSCs 细胞表面抗原 CD34、CD44、CD90 分别表达为 6.28%、95.72%、98.92%,分别见图 5~7。

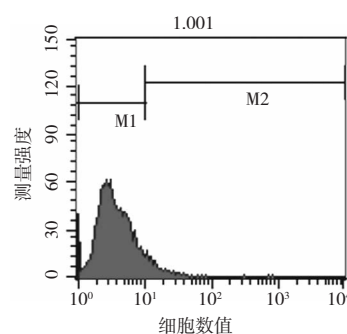


图 5 ADSCs 表面抗原 CD34 表达

Fig.5 CD34 expression in ADSCs surface antigen

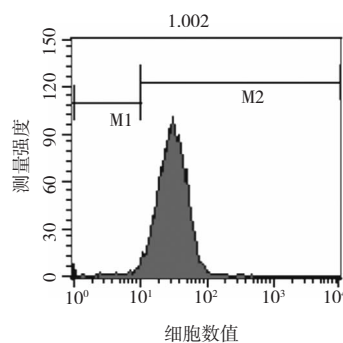


图 6 ADSCs 表面抗原 CD44 表达

Fig.6 CD44 expression in ADSCs surface antigen

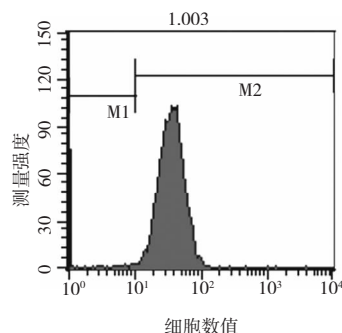
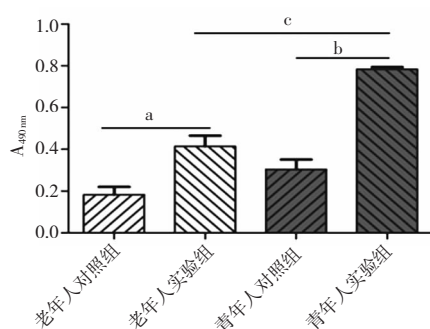


图 7 ADSCs 表面抗原 CD90 表达

Fig.7 CD90 expression in ADSCs surface antigen

2.3 MTT 法测定成纤维细胞增殖结果

应用 MTT 法检测共培养 3 d 后各组成纤维细胞的增殖情况,结果显示:老年人对照组,老年人实验组,青年人对照组和青年人实验组的 A 值分别为 0.183 ± 0.037 、 0.414 ± 0.051 、 0.303 ± 0.048 和 0.784 ± 0.011 ($F=423.838$, $P=0.000$),其中老年人实验组 A 值高于老年人对照组 A 值 ($t=12.956$, $P=0.000$);青年人实验组 A 值高于青年人对照组 A 值 ($t=26.955$, $P=0.000$);青年人实验组 A 值高于老年人实验组 A 值 ($t=20.735$, $P=0.000$),差异均有统计学意义,见图 8。



a, 老年人实验组和老年人对照组比较, $P=0.000$; b, 青年人实验组和青年人对照组比较, $P=0.000$; c, 青年人实验组和老年人实验组比较, $P=0.000$

图 8 MTT 检测各组成纤维细胞增殖结果

Fig.8 Fibroblasts proliferation in different groups evaluated by MTT

2.4 RT-PCR 检测各组成纤维细胞 I 型胶原, MMP-1, β -半乳糖苷酶 mRNA 表达结果

用 RT-PCR 检测共培养 3 d 后各组成纤维细胞的 I 型胶原, MMP-1, β -半乳糖苷酶 mRNA 表达结果,其中在 I 型胶原和 β -半乳糖苷酶 mRNA 的表达中:老年人实验组的 CT 值高于老年人对照组的 CT 值 ($P=0.000$),青年人实验组的 CT 值高于青年人对照组的 CT 值 ($P=0.000$),其中 I 型胶原青年人实验组的 CT 值高于老年人实验组的 CT 值 ($P=0.002$), β -半乳糖苷酶青年人实验组的 CT 值高于老年人实验组的 CT 值 ($P=0.000$),差异均有统计学意义。而在 MMP-1 mRNA 的表达中:老年人对照组的 CT 值高于老年人实验组原的 CT 值

($P=0.000$),青年人对照组的 CT 值高于青年人实验组的 CT 值 ($P=0.000$),差异有统计学意义;老年人实验组的 CT 值高于青年人实验组的 CT 值 ($P=0.055$),差异无统计学意义,此结果的产生可能与共培养后青年人成纤维细胞和老年人成纤维细胞增殖均较活跃,产生的 MMP-1 均较少有关,见表 1。

3 讨论

人体衰老主要表现为随时间的推移包括皮肤组织形态的退行性改变以及皮肤生理功能的减退,最明显的特征就是组织量的减少和成分的改变。皮肤组织量的减少同时包括成纤维细胞、肥大细胞、巨噬细胞在内的细胞数量的减少和细胞外基质的减少;而细胞外基质的减少的原因除了皮肤内细胞数量外,还包括合成功能的减退以及基质降解酶的增加以及胶原净含量降低^[9]。有文献报道,在动物研究中发现 ADSCs 以及其培养液能刺激伤口中的成纤维细胞的移行和胶原合成^[6]。另有文献报道,ADSCs 能分泌多种细胞因子,如:VEGF, TGF- β , IGF 等^[8]。有人研究发现,研究者从自愿者自体脂肪组织中提取 ADSCs 后注射到志愿者光老化的皮肤中,发现局部皱纹得到改善^[7]。

本实验通过 Transwell 来模拟人体皮下 ADSCs 和真皮成纤维细胞所处的内环境状态^[9]。Transwell 膜为聚碳脂膜,膜上有孔,孔径为 $0.4 \mu\text{m}$,能让生物大分子自由通过膜的微孔,而不能让细胞通过微孔,这样上下小室的细胞便不能直接接触^[10]。实验中将 ADSCs 种于上室,成纤维细胞种于下室,上下两室的培养液都能通过聚碳脂膜相互交换,从而观察在非接触状态下 ADSCs 对成纤维细胞的影响。另外,本实验不仅选用老年人成纤维细胞之间进行实验对照,而且还选择青年人成纤维细胞和老年人成纤

表 1 RT-PCR 检测各组成纤维细胞 I 型胶原, MMP-1, β -半乳糖苷酶 mRNA 表达结果

Tab.1 Expression of collagen type I, MMP-1 and β -galactosidase mRNA evaluated by RT-PCR

组别	I 型胶原	β -半乳糖苷酶	MMP-1
老年人对照组	1.006 ± 0.152	1.002 ± 0.048	1.002 ± 0.101
老年人实验组	5.166 ± 0.125	3.983 ± 0.235	0.267 ± 0.029
青年人对照组	2.527 ± 0.359	2.396 ± 0.287	0.632 ± 0.050
青年人实验组	6.972 ± 0.895	6.510 ± 0.603	0.160 ± 0.011
F 值, P 值	87.941, 0.000	133.101, 0.000	127.978, 0.000
老年人两组比较 LSD-t 值, P 值	10.354, 0.000	10.293, 0.000	15.378, 0.000
青年人两组比较 LSD-t 值, P 值	11.06, 0.000	14.204, 0.000	9.876, 0.000
老年人和青年人实验组比较 LSD-t 值, P 值	4.931, 0.002	8.724, 0.000	2.241, 0.055

纤维细胞进行实验对照,这就能更直观的反映 ADSCs 作用于成纤维细胞后,成纤维细胞增殖及胶原蛋白分泌增加的程度。

比较图 1~4 可以看出,通过与 ADSCs 共培养,老年人成纤维细胞的形态由不规则的突起的扁平星形逐渐转变为梭形,细胞质内颗粒物质逐渐消失,细胞增殖能力明显增强。细胞衰老的形态学特征表现为:细胞体积增大,细胞质内色素沉积,细胞器碎裂,细胞核增大颜色加深等,但通过与 ADSCs 培养后,老年人成纤维细胞的形态逐渐向青年人成纤维细胞形态转变,这说明 ADSCs 能在一定程度上促进老年人成纤维细胞年轻化。

本实验研究结果显示,Ⅰ型胶原在老年人实验组和青年人实验组的成纤维细胞中 mRNA 表达明显增高,且青年人实验组高于老年人实验组。Ⅰ型胶原主要分布在人体在皮肤组织,随着年龄增长,在成纤维细胞含量逐渐下降^[11]。这说明了通过与 ADSCs 共培养,老年人和青年人成纤维细胞合成胶原蛋白的能力增强。MMP-1 在老年人实验组和青年人实验组成纤维细胞中的 mRNA 表达明显降低,且老年人实验组高于青年人实验组。MMP-1 是Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型胶原主要降解的关键酶,在正常增殖旺盛的成纤维细胞中表达量很低^[12],这表明了通过与 ADSCs 共培养,老年人和青年人成纤维细胞不仅增殖能增强,而且胶原蛋白分泌也得到积累。 β -半乳糖苷酶在老年人实验组和青年人实验组的成纤维细胞中 mRNA 表达明显增加,且青年人实验组高于老年人实验组。 β -半乳糖苷酶是 1995 年发现的细胞衰老的一个特征,随着年龄增长,人体成纤维细胞中的 β -半乳糖苷酶会逐渐积累^[13]。ADSCs 在促进成纤维细胞增殖的同时,可能也导致了 β -半乳糖苷酶在成纤维细胞内的积累,由于共培养后青年人成纤维细胞增殖较快,导致 β -半乳糖苷酶在其细胞内积累较多。另外,实验结果显示,ADSCs 对青年人成纤维细胞的增殖和胶原蛋白分泌的促进作用明显强于老年人成纤维细胞,这说明青年人成纤维细胞可能存在快速增殖潜能以及大量胶原蛋白分泌潜能。

本实验初步证明了 ADSCs 的细胞因子对成纤维细胞的增殖及胶原蛋白的分泌有一定促进作用,但还需进一步研究以明确细胞因子的作用机制和

影响时间,并进行有关的动物实验,为最终的临床应用打下基础。

参 考 文 献

- [1] Farage MA, Miller KW, Elsner P, et al. Maibach characteristics of the aging skin[J]. *Advances in Wound Care*, 2013, 2(1): 5-10.
- [2] Zouboulis CC, Makrantonaki E. Clinical aspects and molecular diagnostics of skin aging[J]. *Clin Dermatol*, 2011, 29(1): 3-14.
- [3] Yue YL, Zhang PP, Liu D, et al. Hypoxia Preconditioning enhances the viability of ADSCs to increase the survival rate of ischemic skin flaps in rats[J]. *Aesthetic Plastic Surgery*, 2013, 37(1): 159-170.
- [4] 折涛, 胡大海, 张万福, 等. ADSCs 培养上清液对成纤维细胞的生物学影响[J]. *中国美容医学*, 2008, 17(12): 1766-1769.
- [5] Robert L, Labat-Robert J, Robert AM, et al. Physiology of skin aging[J]. *Pathologie Biologie*, 2009, 57(4): 336-341.
- [6] Park BS, Jang KA, Sung JH, et al. Adipose-derived stem cells and their secretory factors as a promising therapy for skin aging[J]. *Dermatol Surg*, 2008, 34(10): 1323-1326.
- [7] Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA, et al. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine[J]. *Circulation Research*, 2007, 100(9): 1249-1260.
- [8] Kim WS, Park BS, Park SH, et al. Antiwrinkle effect of adipose-derived stem cell: activation of dermal fibroblast by secretory factors[J]. *Journal of Dermatological Science*, 2009, 53(2): 96-102.
- [9] 王焕英, 赵 劫, 王 媛, 等. 与小鼠囊胚共培养后人子宫内腺癌细胞侵袭、粘附和运动性的变化[J]. *重庆医科大学学报*, 2005, 30(1): 9-11, 19.
- [10] Hatherell K, Couraud PO, Romero IA, et al. Development of a three-dimensional, all-human in vitro model of the blood-brain barrier using mono-, co-, and tri-cultivation Transwell models[J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 2011, 199(2): 223-229.
- [11] Fisher GJ, Quan T, Purohit T, et al. Collagen fragmentation promotes oxidative stress and elevates matrix metalloproteinase-1 in fibroblasts in aged human skin[J]. *American Journal of Pathology*, 2009, 174(1): 101-114.
- [12] Suganuma K, Nakajima H, Ohtsuki M, et al. Astaxanthin attenuates the UVA-induced up-regulation of matrix-metalloproteinase-1 and skin fibroblast elastase in human dermal fibroblasts[J]. *Journal of Dermatological Science*, 2010, 58(2): 136-142.
- [13] Ravelojaona V, Robert L. Expression of senescence-associated β -galactosidase (SA- β -Gal) by human skin fibroblasts, effect of advanced glycation end-products and fucose or rhamnose-rich polysaccharides[J]. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 2009, 48(2): 151-154.

(责任编辑:唐宗顺)