

糖尿病患者脂肪干细胞(ADSCs)向内皮细胞分化能力的研究

朱 琳 刘志飞 张 星 王晓军

摘 要 **目的** 研究糖尿病患者脂肪干细胞(ADSCs)诱导分化为内皮细胞的能力,以指导糖尿病患者的自身 ADSCs 移植治疗。**方法** 取健康患者和糖尿病患者脂肪组织,进行 ADSCs 的分离、培养和传代,分别取 P3 代 ADSCs,使用内皮细胞诱导培养基于 24 孔板内进行两组细胞向内皮细胞的诱导分化,对比观察诱导过程中两组细胞的形态变化,并取诱导 6、9、12 天的两组细胞进行 CD31 的免疫细胞化学染色,观察诱导结果。**结果** 糖尿病患者脂肪组织采取和健康人 ADSCs 类似的分离培养流程可以获得呈典型形态的 ADSCs;两组细胞向内皮细胞诱导后,6 天细胞形态均逐渐发生改变,9 天出现 CD31 免疫细胞化学染色阳性的细胞,12 天可观察到典型内皮细胞形态,并且 CD31 染色阳性细胞增加。**结论** 糖尿病患者 ADSCs 在体外存在诱导剂情况下能够分化为内皮细胞。

关键词 糖尿病 脂肪干细胞 内皮细胞 分化

[中图分类号] R3 [文献标识码] A

Culture of DM - derived Adipose Stem Cells and the Differentiation into Endothelial Cells in vitro. Zhu Lin, Liu Zhifei, Zhang Xing, et al. Plastic Surgery Department, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100032, China

Abstract Objective To study the capacity of DM - derived ADSCs differentiating into endothelial cell, providing theory evidence for autologous DM - derived ADSCs transplantation. **Methods** Adipose tissue was taken from healthy person and DM patient, and cells for two group were isolated and cultured by the process of normal ADSCs. P3 generation ADSCs were taken and induced to differentiate into endothelial cells in 24 well plates by using ES - inducing medium. The morphological change of two group cells were observed and compared during the inducing period, and 6day, 9day, 12day's cells were taken after inducing to process immunocytochemistry staining of CD31. **Results** The two group cells both changed modality after being induced six days and appeared to CD31(+) by immunocytochemistry staining after being induced nine days. After twelve days, the typical modality of endothelial cells could be observed. **Conclusion** DM - derived ADSCs has the capacity to differentiation into endothelial cells.

Key words Diabetes mellitus; Adipose - derived stem cells; Endothelial cells; Differentiation

糖尿病患者血管病变是造成预后不良的重要原因,多种因素导致了这一病变,而内皮细胞功能异常更是主要原因及始发因素。内皮细胞在调节血管张力、管壁渗透性、参与血管形成和重塑、参与细胞内激素的下游信号传递功能等方面发挥了重要作用。脂肪干细胞(ADSCs)作为成体干细胞之一,目前研究已经证实了在适当的诱导剂存在下,其具有向血管内皮细胞分化,表达相关内皮细胞标志的能力。对于血管内皮细胞功能严重异常的糖尿病患者,其自身来源 ADSCs 是否仍然具有向内皮细胞诱导分化的能力,与正常人 ADSCs 相比是否存在差异,显得尤为重要。

结合之前的实验,在已经证明了其具有与正常 ADSCs 类似的分子标记和自我复制更新能力后,本实验目的在于研究糖尿病患者 ADSCs 的内皮细胞分化能力,为其进一步临床应用提供初步的实验室证据。

资料与方法

1. 实验试剂:高糖 DMEM 培养基、胎牛血清(美国 GIBCO 公司);I 型胶原酶、胰酶(美国 Sigma 公司);CD29、CD44、CD105 荧光标记抗体(美国 BD Bioscience 公司);血管内皮细胞诱导培养基(DMEM - HG, 2% FBS, 2% 马血清, 50ng/ml VEGF, 10ng/ml bFGF, BSA 2g/L, 鸟氨酸 0.1g/L, 脯氨酸 0.03g/L, 谷氨酰胺 0.73g/L, 葡萄糖 1g/L 及适量微量元素)^[1]。

2. 脂肪组织:糖尿病患者脂肪组织来源于北京协和医院基本外科合并糖尿病的手术患者的腹壁脂肪。健康人脂肪组织来源于北京协和医院整形外科吸脂手术患者。征得供者本人同意并填写知情同意后收集脂肪组织标本。

3. ADSCs 提取培养:糖尿病患者 3 例,年龄分别为 58、55、60 岁, BMI 分别为 28.5、31.3、34.2kg/m²。因标本取自外科

基金项目:北京协和医院院内基金资助项目

作者单位:100032 中国医学科学院北京协和医院整形外科(朱琳、刘志飞、王晓军);510060 广州,中山大学附属肿瘤防治中心头颈外科(张星)

通讯作者:王晓军,电子信箱:xjwang100@hotmail.com

腹部手术患者,患者血糖均控制在正常范围,患者均无皮肤溃疡表现。分别取糖尿病患者腹壁脂肪组织 30ml,充分剔除血管、结缔组织,加入 PBS,将脂肪组织充分剪碎为大小约 1mm × 1mm × 1mm 小块。将两瓶脂肪组织悬液转入离心管内,加入 PBS,1300r/2min 离心后吸出下层洗涤液。加入两倍体积的 0.10% I 型胶原酶、2ml 0.2% BSA,根据终体积按1: 200比例加入双抗,置入 37℃ 恒温水浴箱振荡消化 60min 并过滤备用。细胞悬液以 1100r/5min 离心,小心吸去上层油脂和上清液,每管沉淀加入 PBS 10ml 吹洗后离心,1100r/min,移出上层液体。每管沉淀加入 DMEM - HG + 10% FBS 5ml 吹匀细胞,种植于一个 T - 25 培养瓶内。于 48h 首次换液,之后每 72h 换液 1 次,达 80% 细胞融合时传代。取健康人吸脂所得脂肪组织 30ml,1300r/2min 离心后吸出下层吸脂麻醉药,PBS 洗涤后再次离心,吸出下层洗涤液。根据脂肪组织量加入 0.075% I 型胶原酶、0.2% BSA 2ml,双抗按1: 200比例加入,置入 37℃ 恒温水浴箱震荡消化 60min。其余步骤同上。

4. ADSCs 向内皮细胞诱导分化:分为以下两组:A 组(对照组)P3 代健康人 ADSCs;B 组(实验组): P3 代糖尿病患者。以下流程两组完全一致。取 P3 代 ADSCs,常规胰酶消化,计数。细胞悬液调整浓度为(1 ~ 3) × 10⁴/ml,按 500 微升/孔接种入 24 孔培养板,置于二氧化碳培养箱内。24h 后更换为内皮细胞诱导培养基,每孔加入 500μl,平均每 2 天更换培养液 1 次。分别取诱导第 6 天后、第 9 天后、第 12 天后的细胞爬片,进行免疫细胞化学观察。

结 果

1. ADSCs 向内皮细胞诱导后形态观察:每日观察细胞形态,选择 24h、3、6、9、12 天 5 个时间点,结果见表 1。ADSCs 诱导后 3、9 天细胞形态见图 1、图 2。

表 1 糖尿病患者 ADSCs 和正常人 ADSCs 向内皮细胞诱导分化的对比观察		
观察时间	对照组	实验组
24h	细胞贴壁完成,较多细胞开始变形,基本无杂质	细胞基本贴壁,但多数细胞尚未完成变形,无明显杂质
3 天	细胞生长较快,密度略高,形态多为短梭形或者卵圆形	细胞生长略慢,排列较松散,密度较对照组低,余无明显差别
6 天	细胞多数为一致的短梭形,密度较高,排列有序,部分可见漩涡状排列,但可见少数变形细胞,呈现椭圆形	细胞形态一致,均为类成纤维细胞的短梭形,密度较高,基本未见变形细胞
9 天	细胞形态开始大量变化,出现星形,多边形	与对照组无明显差别
12 天	细胞密度高,部分地区出现“铺路石”样排列细胞	与对照组无明显差别

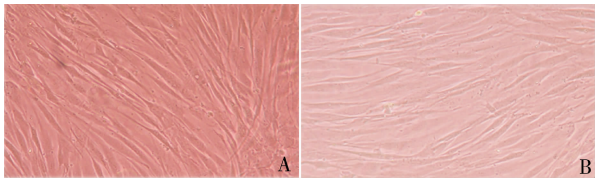


图 1 ADSCs 诱导后 3 天细胞形态
A. 细胞生长较快,密度略高,形态多为短梭形或者卵圆形;B. 细胞生长略慢,排列较松散,密度较对照组低,余无明显差别

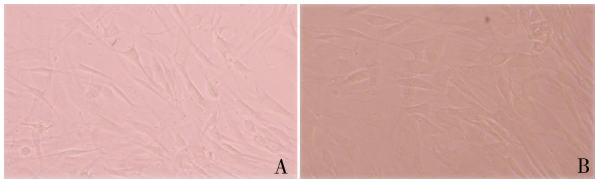


图 2 ADSCs 诱导后 9 天细胞形态
A. 细胞形态开始大量变化,出现星形,多边形;B. 与对照组无明显差别

2. 免疫细胞化学观察:分别取诱导后 6、9、12 天的细胞爬片,进行 CD31 的免疫细胞化学染色,9 天后正常人细胞和糖尿病患者细胞均出现 CD31 染色阳性。12 天后两者染色阳性细胞明显增加,可见整个视野(图 3、图 4、表 2)。

表 2 糖尿病患者 ADSCs 和正常 ADSCs 向内皮细胞诱导后 CD31 免疫细胞化学染色观察结果		
诱导时间	对照组	实验组
6 天	阴性	阴性
9 天	弱阳性	弱阳性
12 天	强阳性	强阳性

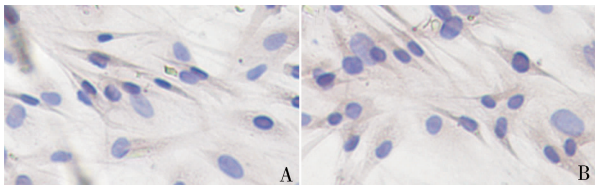


图 3 ADSCs 向内皮诱导 6 天后 CD31 的免疫组化染色
A. 阴性;B. 阴性

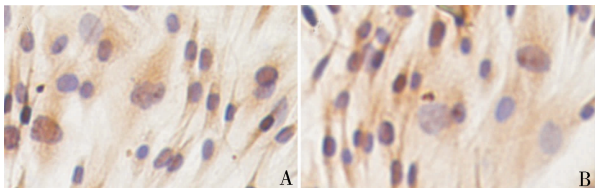


图 4 ADSCs 向内皮诱导 12 天后 CD31 的免疫组化染色
A. 阳性;B. 阳性

讨 论

糖尿病是困扰人类健康的全球性难题,其慢性并发症,如足部溃疡等一旦发生则不易愈合,常难免截肢,具有很强的致残致死率。最初的药物治疗对于已经形成糖尿病慢性并发症者效果极其有限,近年来血管搭桥,特别是介入技术的迅速发展为糖尿病血管并发症患者提供了新的治疗方法,但是,手术治疗存在诸多禁忌证,适应证范围有限,很多患者仍然无法避免诸如截肢等严重后果,研发新的治疗方法仍然刻不容缓。

20 世纪 90 年代以来,血管内皮细胞功能紊乱逐渐被认为在糖尿病血管病变起着重要作用^[2,3]。在糖尿病条件下,高血糖、高血脂、血液流变学及血流动力学改变、组织抗氧化能力减弱,均导致内皮细胞损伤,引起以下病理生理改变:一氧化氮产生和分泌减少,内皮素产生增加,促进血管平滑肌细胞增生,影响受损内皮的修复能力,继发上皮细胞的通透性和功能改变;蛋白激酶 C 激活后促进血管平滑肌细胞增生,以及 DNA、生长因子和基质蛋白的合成;增生的血管平滑肌细胞产生自由基,后者可使内皮细胞合成的 NO 迅速被灭活,从而削弱其抑制血管重构的作用^[4]。

ADSCs 卓越的分化性能目前已经在很多方面得到了证实,其中向内皮细胞的分化更是一个研究的热点,因为这个领域研究的进展基本上可以为所有缺血性疾病的治疗带来曙光^[5]。一般认为在缺血性疾病的血管生成有两种方式:angiogenesis 和 vasculogenesis,前者指通过、内皮细胞迁移和增殖,在原有血管上以出芽的方式形成新的血管,而后者指在没有血管系统的前提下,通过血管内皮祖细胞和造血干细胞产生全新的血管,无论哪一种方式,内皮细胞都非常重要^[6]。但内皮细胞本身并不能大量获取,大量扩增,于是寻找一种合适的种子细胞就成为血管组织工程的热点。ADSCs 正是一种近乎于完美的种子细胞。目前对 ADSCs 向内皮细胞的诱导分化的体外实验中,多数研究者认为血管内皮细胞生长因子(VEGF)是关键所在。Planat - Benard 等^[7]将 ADSCs 置于添加甲基纤维素的半固体培养基中培养,并添加 VEGF,最终可以在光镜下观察到细胞生成分支状的管腔结构,同时利用免疫组化法,可以鉴定到内皮细胞特异性的表面标志——CD31 和 vW 因子表达。薛君等^[8]研究了不同 VEGF 浓度对 ADSCs 向内皮细胞分化的影响,认为该种分化对 VEGF 浓度有很大依赖

性,50ng/ml 诱导效果良好。曹莹等^[9]从脂肪组织提取的细胞中分选 CD31、CD34 阴性的细胞,并培养在含有 VEGF 与 bFGF 等生长因子的培养液中,最终可以发现管样结构形成,同时检测内皮细胞特异性抗体表达阳性,并具有典型的内皮细胞吞噬功能。但是,关于糖尿病患者 ADSCs 向内皮细胞分化的研究很少,而他们恰恰面临着血管病变严重,预后很差,迫切需要干细胞移植治疗的现状。

在本实验中,研究了来自糖尿病患者 ADSCs 向内皮细胞诱导分化情况,诱导培养基主要添加了 50ng/ml 的 VEGF 和 10ng/ml 的 bFGF,并使用正常人 ADSCs 作为阳性对照。从细胞形态看,糖尿病患者 ADSCs 接种 24h 后完成贴壁,诱导 6 天未观察到明显变化,仍为类似成纤维细胞的梭形,9 天后细胞形态出现明显变化,为星形、多边形等,12 天后变形细胞大量增加,出现“铺路石样”细胞排列。部分文章报道可形成管腔样结构或网状结构,但笔者始终未能观察到。从免疫细胞化学结果看,诱导 12 天后 CD31 染色阳性的细胞大量出现,说明糖尿病患者 ADSCs 经向内皮细胞诱导后可以分化为内皮细胞并表达内皮细胞特异性分子标志物。

对比于阳性对照组,本组初步观察糖尿病患者 ADSCs 和健康人 ADSCs 在诱导分化后无论形态观察或者免疫细胞化学染色均未表现出明显差异。但该实验最终的鉴定方法选择了免疫细胞化学这个定性的方法,虽具有一定说服力,但对于正常 ADSCs 与糖尿病人 ADSCs 的比较是不能具有统计学意义的。如果在充足的标本来源情况和实验预算情况下,应尽可能采用定量的方法(如流式细胞仪)分析尽可能多的数据,从而从统计学上说明两组细胞有无存在差异,这样的结果更加具有说服力。最后,CD31 的检测其实仅仅说明了内皮细胞的性质,却未涉及内皮细胞的功能检测,事实上,内皮细胞的功能正常对于移植治疗更加重要,如果能够证实诱导后内皮细胞具有同生理状态下一致的功能,实验结果会更加完美。

该实验初步证实糖尿病患者来源的 ADSCs 在体外诱导条件下,可以分化为内皮细胞,为糖尿病患者自体 ADSCs 移植治疗缺血性疾病提供了理论依据。

参考文献

- 1 Gimble JM. Adipose tissue - derived therapeutics[J]. Expert Opin Biol Ther, 2003, 3(5): 705 - 713
- 2 Makino H, Ogihara T, Morishita R. Gene therapy for peripheral arterial diseases in diabetes mellitus[J]. Nihon Rinsho, 2002, 60 (Suppl 10): 449 - 456

- 3 Kotlinowski J, Dulak J, Józkowicz A. Type 2 diabetes mellitus impairs endothelial progenitor cells functions[J]. Postepy Biochem, 2013, 59 (3): 257 - 266
- 4 Tousoulis D, Papageorgiou N, Androulakis E, et al. Diabetes mellitus - associated vascular impairment: novel circulating biomarkers and therapeutic approaches[J]. J Am Coll Cardiol, 2013, 62 (8): 667 - 676
- 5 Raval Z, Losordo DW. Cell therapy of peripheral arterial disease: from experimental findings to clinical trials[J]. Circ Res, 2013, 112 (9): 1288 - 1302
- 6 Velazquez OC. Angiogenesis and vasculogenesis: inducing the growth of new blood vessels and wound healing by stimulation of bone marrow

- derived progenitor cell mobilization and homing[J]. J Vasc Surg, 2007, 45 (Suppl A): A39 - 47

- 7 Planat - Benard V, Silvestre JS, Cousin B, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives[J]. Circulation, 2004, 109 (5): 656 - 663
- 8 薛君, 边云飞, 郭泽. 体外诱导人脂肪干细胞向内皮细胞分化的研究[J]. 中国分子心脏病学杂志, 2009, 9 (1): 24 - 27
- 9 曹莹, 孟艳, 孙昭, 等. 脂肪来源成体干细胞分化为内皮细胞的潜能[J]. 中国医学科学院学报, 2005, 27 (6): 678 - 682

(收稿日期: 2014 - 02 - 18)

(修回日期: 2014 - 03 - 01)

晚期非小细胞肺癌患者化疗时应用护肝药物的临床意义分析

张 磊 王江峰 毛伟敏

摘 要 **目的** 研究预防性使用护肝药物在晚期非小细胞肺癌患者化疗过程中, 是否使肝功能损伤发生率降低。**方法** 回顾性分析在浙江省肿瘤医院就诊 138 例晚期非小细胞肺癌患者, 化疗前是否接受预防性使用护肝药物, 用卡方检验肝功能受损是否存在差异, 观测肝功能的损伤与哪些因素相关。**结果** 预防性使用护肝药物可使肝功能受损发生率降低 ($P=0.00$)。化疗周期数与肝功能损伤相关 ($P=0.01$)。**结论** 晚期非小细胞肺癌患者化疗过程中, 预防性使用护肝药物的患者可有效的降低肝功能损伤。

关键词 护肝药物 非小细胞肺癌 化疗

[中图分类号] R734 [文献标识码] A

Clinical Analysis of Application of Protecting Liver Drugs in Advanced Non - small Cell Lung Cancer Patients who Receiving Chemotherapy.

Zhang Lei, Wang Jiangfeng, Mao Weimin. The Sixth of People's Hospital of Shaoxing, Zhejiang 312000, China

Abstract Objective To study whether prophylactic use of the protection liver drugs can reduce the incidence of liver dysfunction in advanced non - small lung cancer patients when chemotherapy. **Methods** We retrospectively reviewed 138 cases advanced non - small cell lung cancer patients in Zhejiang Cancer Hospital. Whether prophylactic use of protection liver drugs before chemotherapy was studied. Chi - square test was used to analysis difference in liver dysfunction between whether the prophylactic use of protection liver drugs. What factors associated with liver injury were observed. **Results** Prophylactic use of liver drugs could reduce the incidence of impaired liver function ($P=0.00$, $P<0.05$). Chemotherapy cycles had a relationship with liver dysfunction ($P=0.01$, $P<0.05$). **Conclusion** Receiving protection liver drugs can effectively reduce incidence of impaired liver function in advanced non - small lung cancer patients when chemotherapy.

Key words Protection liver drugs; Non - small cell lung cancer; Chemotherapy

肺癌在全球的发生率和病死率均居恶性肿瘤首位^[1]。非小细胞肺癌 (NSCLC) 约占肺癌类型的

80%。表皮生长因子受体 (EGFR) 突变型的患者, 表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂 (EGFR - TKIs) 有效率可达 80%^[2]。但是对于 EGFR 基因野生型的患者, 晚期 NSCLC 一线含铂两药联合化疗有效率约为 35% ~ 45%^[3]。因此化疗仍是治疗晚期非小细胞肺癌的重要手段, 但是化疗药物在杀伤肿瘤细胞的同时, 对其他器官的正常细胞也不可避免的造成损伤,

基金项目: 浙江省中医药防治重大疾病攻关计划基金资助项目 (2011ZGG001)

作者单位: 312000 浙江省绍兴市第六人民医院 (张磊); 310022 杭州, 浙江省肿瘤医院 (王江峰、毛伟敏)

通讯作者: 毛伟敏, 电子信箱: mwmzjzlyy@163.com