

· 技术与方法 ·

雌雄昆明小鼠脂肪间充质基质细胞分离培养、鉴定及差异性

刘钰轩 李静阳 董恒源 夏明洋 张莉*

(河南中医药大学, 药学院, 郑州 450046)

摘要 该研究探究昆明小鼠脂肪间充质基质细胞(adipose-derived mesenchymal stromal cells, AD-MSCs)的分离、培养、鉴定方法及不同性别的生物学特性差异。该研究采用酶消化法在无菌条件下获取昆明小鼠AD-MSCs进行原代培养, 观察细胞形态, 检测P4、P8、P12、P16细胞生长曲线, 采用免疫荧光与流式细胞术检测细胞表面标志物(CD29、CD31、CD34、CD44、CD45、CD90)的表达情况, 进行成脂、成骨和成软骨诱导检测多向分化能力同时量化诱导阳性率, 并检测衰老情况。该研究成功分离获得呈梭形、纺锤形或多角形贴壁生长的AD-MSCs, 细胞生长曲线呈典型的“S”型; P4、P8、P16雌性昆明小鼠脂肪间充质基质细胞(adipose-derived mesenchymal stromal cells from female Kunming mice, AD-MSCs-F)、雄性昆明小鼠脂肪间充质基质细胞(adipose-derived mesenchymal stromal cells from male Kunming mice, AD-MSCs-M) CD29、CD44、CD90均呈阳性表达, 而CD31、CD45基本不表达, CD34表达存在性别差异, 表现在: AD-MSCs-F的CD34表达量随代数增加而增加至53.6%, 而AD-MSCs-M维持阴性; P12前AD-MSCs-F较AD-MSCs-M增殖速度较快, P12后增殖速度较慢, 衰老期出现较早, 且在P16衰老现象更严重; 在成脂成骨诱导下, AD-MSCs-F的油红O、茜素红阳性面积率均高于AD-MSCs-M, 在成软骨诱导下阿利新蓝阳性面积率无明显差异。该研究成功建立了适合昆明小鼠AD-MSCs的体外培养体系和鉴定方法, 成功获取了昆明小鼠AD-MSCs并完成了鉴定。雌雄小鼠AD-MSCs在形态和基本细胞特性上相似, 但在增殖能力、分化能力、衰老程度及CD34表达上存在一定的性别差异, 为AD-MSCs在基础研究、组织工程和再生医学等研究提供了差异化的实验依据和技术支持。

关键词 小鼠; 性别差异; 脂肪间充质基质细胞; 原代培养; 细胞鉴定; 表面标志物; 干细胞分化

Isolation, Culture, Characterization, and Differences of Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells from Male and Female Kunming Mice

LIU Yuxuan, LI Jingyang, DONG Hengyuan, XIA Mingyang, ZHANG Li*

(School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

Abstract This study investigates the methods for isolating, culturing, and characterizing AD-MSCs (adipose-derived mesenchymal stromal cells) from Kunming mice, as well as differences in their biological char-

收稿日期: 2026-03-15

接受日期: 2026-09-18

*通信作者。Tel: 18538102802, E-mail: sonny.fairy.love@163.com

Received: March 15, 2026

Accepted: September 18, 2026

*Corresponding author. Tel: +86-18538102802, E-mail: sonny.fairy.love@163.com

acteristics between male and female mice. In this study, AD-MSCs from Kunming mice were isolated using an enzymatic digestion method under sterile conditions for primary culture. Cell morphology was observed, and P4, P8, P12, P16 cell growth curves were analyzed. Immunofluorescence and flow cytometry were employed to detect the expression of cell surface markers (CD29, CD31, CD34, CD44, CD45, CD90), assessed their multipotent differentiation capacity through adipocytes, osteocytes, and chondrocytes induction, while simultaneously quantifying the induction positivity rate, and evaluated cellular senescence. This study successfully isolated AD-MSCs exhibiting spindle-shaped, fusiform, or polygonal morphology during adherent growth, cell growth curves displaying a typical “S” shape; AD-MSCs-F (adipose-derived mesenchymal stromal cells from female Kunming mice) and AD-MSCs-M (adipose-derived mesenchymal stromal cells from male Kunming mice) at P4, P8, and P16 all exhibited positive expression of CD29, CD44, and CD90, while CD31 and CD45 were largely undetectable, the expression of CD34 varied by sex, as follows: CD34 expression in AD-MSCs-F increased with passage number to 53.6%, while AD-MSCs-M remained negative; prior to P12, AD-MSCs-F proliferated more rapidly than AD-MSCs-M; after P12, their proliferation slowed, and senescence set in earlier, with more severe senescence observed at P16. Under adipogenic and osteogenic induction, the percentage of oil red O and alizarin red-positive areas was higher in AD-MSCs-F than in AD-MSCs-M. There was no significant difference in the percentage of alcian blue-positive area under chondrogenic induction. This study successfully established an *in vitro* culture system and characterization method suitable for Kunming mouse AD-MSCs, successfully isolated and characterized Kunming mouse AD-MSCs. Female and male mouse AD-MSCs are similar in morphology and basic cell characteristics, however, there are certain gender differences in proliferative capacity, differentiation capacity, aging, and CD34 expression. This provides differentiated experimental evidence and technical support for AD-MSCs research in basic science, tissue engineering, and regenerative medicine.

Keywords mice; sex differences; adipose-derived mesenchymal stromal cells; primary culture; cell characterization; surface markers; stem cell differentiation

干细胞是一类具有自我更新和分化能力的、存在于胚胎不同阶段以及成体不同组织中的未分化细胞,是组织和器官的生长基础,在组织器官修复和再生等方面具有重要作用^[1-2]。间充质基质细胞(mesenchymal stromal cells, MSCs)是一类具有多向分化潜能及免疫调节等生物学特性的基质细胞群,来源包括骨髓、脂肪、外周血、脐带血、牙髓等组织^[3-4],易于分离、培养、纯化,具有自我更新和多向分化能力,在体内及体外的特定条件下可以分化为脂肪、骨、软骨、心肌、肌肉、神经等多种组织细胞,并具有低免疫原性和免疫调节能力,在体外多次传代后仍能保持其细胞特性^[5-6]。研究证明, MSCs具有调节细胞凋亡、抗菌^[6-7]、抗炎和改善氧化应激以及调节免疫^[8]等作用,是当今医学研究领域最前沿、最热门的方向之一,已被研究用于心血管疾病^[9-10]、神经系统疾病^[11]、自身免疫疾病^[12]、骨组织工程^[13]、呼吸系统疾病^[14]等多种疾病的治疗,未来发展潜力巨大。相较于其他来源间充质基质细胞,脂肪间充质基质细

胞来源丰富,易于获取且增殖能力和持久性更好,是较常用的细胞种子^[15]。昆明小鼠是我国生产量、使用量最大的远交群小鼠,具有繁殖能力强、遗传背景清晰和适应性强等特点,在我国生物医学动物实验中约为小鼠总用量的70%^[16]。本研究以4周龄昆明小鼠为材料提取AD-MSCs进行原代培养及鉴定,建立AD-MSCs细胞系及其分离纯化方法,初步探究雌、雄AD-MSCs生物学特性差异,为AD-MSCs在组织工程与再生医学中的研究提供理论依据和技术参考,同时也为进一步探讨性别因素在MSCs研究及潜在临床应用中的作用提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

4周龄左右昆明小鼠,雌雄各3只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。动物质量合格证号分别为20250305Abzz0600000086(雄鼠合格证号)、20250305Abzz0600000087(雌鼠合格证号)。

1.2 主要试剂及仪器

DMEM低糖培养基、MEM非必需氨基酸(MEM non-essential amino acid, MEM NEAA)、GlutaMAX™-I、TrypLE™ Express、CD29、CD31、CD34、CD44、CD45(货号: 31600-034、11140050、35050061、12604-021、11029180、11031181、11034182、11044181、11045181)购自美国ThermoFisher Scientific公司; 胎牛血清(货号: S711-001S)购自双迦生物科技有限公司; 氨苄青霉素钠、硫酸链霉素、胶原酶II、DAPI(货号: A8180、S8290、C8150、C0065)购自索莱宝生物科技有限公司; CD90(货号: 105305)购自美国BioLegend公司; 成脂诱导分化试剂盒、成骨诱导分化试剂盒(货号: MUXMD-90031、MUXMD-90021)购自赛业生物科技有限公司; 小鼠脂肪间充质干细胞成软骨诱导分化培养基(货号: PD-026)购自普诺赛生命科技有限公司; 细胞衰老检测试剂盒(β -半乳糖苷酶法, 货号: KTA3030)购自亚科因生物技术有限公司; 其余试剂为国产或进口市售品色谱纯或化学纯级别试剂。

NIKON ECLIPSE TS100倒置显微镜购自日本Nikon公司; EVOS™ M5000细胞成像系统购自美国ThermoFisher Scientific公司; AB204-N型万分之一精密分析天平购自瑞士METTLER TOLEDO公司; Opera Phenix高内涵成像购自美国PerkinElmer公司; BD FACSAria III流式细胞仪、Aria电脑工作站购自美国Becton公司。

1.3 脂肪间充质基质细胞分离与培养

本动物实验方案经过河南中医药大学实验动物福利伦理委员会审核(批准号: IACUC-202503001)。采用颈椎脱臼法将小鼠处死, 于75%乙醇中浸泡5 min消毒后, 将其移入超净台。用剪刀在小鼠背部中间剪口, 两手撕开皮肤, 用镊子撕取腹股沟脂肪, 将其置于装有磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)的皿中进行清洗, 并用镊子去除筋膜组织等。将清洗好的脂肪组织置于装有少量PBS的皿中, 用剪刀剪碎后将其转移至装有适量0.1%的胶原酶II离心管中, 37℃水浴锅中消化1 h(可根据消化程度适当调整消化时间)。消化结束后加入等量完全培养基(以下简称“完培”)终止消化, 2 000 r/min室温离心10 min后弃去上层脂肪及上清液, 将沉淀用完培重悬并过40 μ m细胞筛, 将过滤后的液体1 500 r/min室温离心

10 min, 沉淀用完培重悬后再次1 500 r/min离心10 min, 获得的沉淀用完培重悬后于皿中进行培养, 6 h后换液。AD-MSCs细胞培养于含低糖DMEM基础培养基+10%胎牛血清+1% GlutaMAX™+1% MEM NEAA+1%双抗的完培中, 于5% CO₂、37℃恒温培养箱中培养, 每2~3 d更换1次培养基。细胞密度在80%~90%时进行传代, 加入1 mL TrypLE™ Express 37℃消化1~5 min后加入完培, 按1:2~1:3传代。

1.4 细胞形态学观察

采用EVOS™ M5000细胞成像系统观察接种在完培中AD-MSCs的生长状态以及其传代后的形态变化和贴壁情况, 并拍照保存。

1.5 生长曲线绘制

分别取P4、P8、P12、P16(第4、8、12、16代)的AD-MSCs-F、AD-MSCs-M以 2×10^4 /mL接种于24孔板中, 每孔500 μ L。每天随机选取3个孔计数细胞, 以每天计数平均值绘制生长曲线, 并采用双因素重复测量方差分析比较同代次不同性别AD-MSCs的增殖能力差异。

1.6 表面标记物细胞免疫荧光分析

分别取P4、P8、P16的AD-MSCs-F、AD-MSCs-M消化计数, 以 4×10^4 /mL接种于96孔板中, 每孔200 μ L。24 h后, 每孔加入200 μ L PBS, 清洗5 min, 重复3次, 接着每孔加入4%多聚甲醛200 μ L室温固定20 min, 固定结束后每孔加入200 μ L PBS, 清洗5 min, 重复2次后加入200 μ L 0.1% Triton-X 100透化10 min, 接着每孔加入150 μ L封闭液(500 μ L山羊血清+9 500 μ L PBS)室温封闭30 min, 加入相应一抗CD29(1:25)、CD31(1:25)、CD34(1:25)、CD44(1:50)、CD45(1:50)、CD90(1:50), 避光孵育30 min(其中CD34、CD90分别避光孵育90、60 min), 孵育结束后每孔加入200 μ L PBS清洗5 min, 重复3次后每孔加入50 μ L DAPI染色5 min, 染色结束后每孔加入200 μ L PBS清洗5 min, 重复3次后每孔加入50 μ L PBS, 将培养板置于高内涵成像系统进行图像采集。

1.7 表面标记物流式细胞术鉴定

分别取P4、P8、P16的AD-MSCs-F、AD-MSCs-M, 加入适量PBS洗涤细胞, 每皿加入1 mL TrypLE™ Express, 在37℃培养箱中消化5 min, 加入完培终止消化, 细胞悬液1 000 r/min室温离心5 min, 沉淀用2 mL PBS重悬, 1 000 r/min室温离心

5 min, 沉淀用适量PBS重悬, 在流式管中每管加入100 μ L细胞悬液, 按推荐用量分别加入CD29(1:25)、CD31(1:25)、CD34(1:25)、CD44(1:50)、CD45(1:50)、CD90(1:50), 冰箱避光4 $^{\circ}$ C孵育30 min(CD34、CD90分别冰箱避光4 $^{\circ}$ C孵育90、60 min)。孵育结束后, 每管加入2 mL PBS, 1 500 r/min室温离心5 min, 所得沉淀用2 mL PBS重悬, 1 500 r/min室温离心5 min, 沉淀用适量PBS重悬, 流式细胞仪上机检测。

1.8 多向分化能力鉴定

1.8.1 成脂分化 分别取P4、P16的AD-MSCs-F、AD-MSCs-M消化计数, 以 1×10^5 /mL接种于12孔板中, 每孔1 mL。当细胞密度达100%时, 按试剂盒说明书进行诱导, 观察到细胞内出现明显脂滴时, PBS清洗3次; 每孔加入4%多聚甲醛溶液室温固定30 min, 固定后PBS清洗3次。随后加入油红O染色液进行染色, PBS清洗3次洗去染色液; 加入PBS后采用EVOSTM M5000细胞成像系统采集图像。利用ImageJ软件对油红O阳性染色面积进行定量分析, 以阳性面积占总面积百分比表示成脂分化能力。

1.8.2 成骨分化 分别取P4、P16的AD-MSCs-F、AD-MSCs-M消化计数, 以 7×10^4 /mL接种于12孔板中, 每孔1 mL。当细胞密度达70%时, 按试剂盒说明书进行诱导, 观察到细胞层出现不透光沉积时, PBS清洗3次, 每孔加入4%多聚甲醛溶液室温固定30 min, 固定后PBS清洗3次。随后加入茜素红工作液染色, PBS清洗3次洗去染色液, 加入PBS后采用EVOSTM M5000细胞成像系统拍摄。利用ImageJ软件对茜素红阳性钙结节面积进行定量分析, 以阳性面积占总面积百分比表示成骨分化能力。

1.8.3 成软骨分化 分别取P4、P16的AD-MSCs-F、AD-MSCs-M消化计数, 以 7×10^4 /mL接种于12孔板中, 每孔1 mL。当细胞密度达70%时, 按试剂盒说明书进行诱导, 诱导21 d后, PBS清洗3次, 每孔加入4%多聚甲醛溶液室温固定30 min, 固定后PBS清洗3次。随后加入阿利新蓝工作液染色, PBS清洗3次洗去染色液, 加入PBS后采用EVOSTM M5000细胞成像系统拍摄。利用ImageJ软件对阿利新蓝阳性面积进行定量分析, 以阳性面积占总面积百分比表示成软骨分化能力。

1.9 细胞衰老检测

取P16的AD-MSCs-F、AD-MSCs-M采用PBS洗

涤后, 每皿加入6 mL $1 \times$ 固定缓冲液(fixation buffer), 室温固定15 min, 吸除细胞固定液, 用PBS洗涤细胞, 吸除PBS, 按照试剂盒说明书配制含X-gal溶液的染色工作液(staining working solution), 调节pH为6.0, 每孔加入1 mL染色工作液。于37 $^{\circ}$ C烘箱中孵育过夜, 衰老特异性的 β -半乳糖苷酶催化X-gal会生成深蓝色产物, 当细胞染上蓝色时, 进行拍照。

1.10 统计分析

使用SPSS 27.0软件进行统计分析, 并使用GraphPad Prism 8.0进行数据可视化。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各项实验均进行3次独立重复实验, 具体样本量(n)见相应图注。对于脂肪间充质基质细胞生长曲线, 采用双因素方差分析, 分析时间和性别因素及其交互作用, 两组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, ns表示差异无统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态学观察

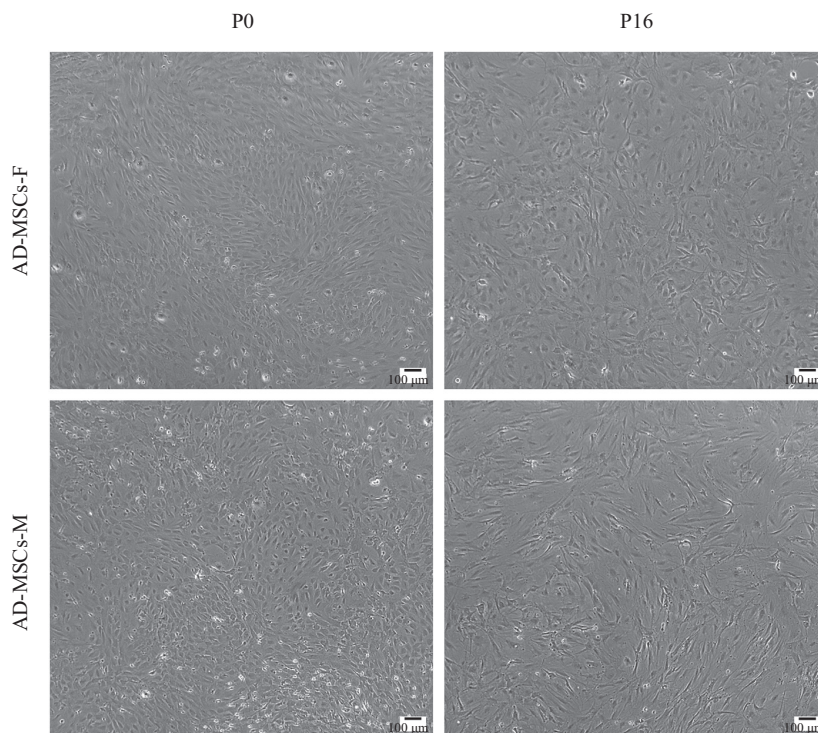
分别将AD-MSCs-F、AD-MSCs-M悬液重悬到培养皿中进行培养, 将贴壁并扩增的细胞记为P0, 在显微镜下两种不同性别来源的细胞均呈梭形、纺锤形或多角形贴壁生长, 传代至P16时, 细胞出现衰老特征: 细胞核变大、细胞宽大扁平, 两种不同性别来源的AD-MSCs形态和生长状态无明显差异, 结果如图1所示。

2.2 生长曲线绘制

由图2可知, P4、P8、P12、P16的AD-MSCs-F、AD-MSCs-M细胞生长曲线均呈“S”型, 包括潜伏期、对数生长期和平台期。双因素方差分析结果表明, 各代细胞的增殖均受到培养时间、性别及二者交互作用的影响。

P4代AD-MSCs双因素方差分析显示, 培养时间($P < 0.01$)、性别($P < 0.01$)及二者交互作用($P < 0.05$)均具有统计学意义。AD-MSCs-F整体平均增殖水平高于AD-MSCs-M。进一步多重比较分析显示, 两组在培养前期未见显著差异, 而在培养终末时间点AD-MSCs-F增殖水平显著高于AD-MSCs-M($P < 0.01$)。

P8代AD-MSCs双因素方差分析结果显示, 培养时间、性别及二者交互作用均具有显著影响(均 $P < 0.01$)。AD-MSCs-F整体平均增殖水平显著高于AD-MSCs-M。多重比较分析显示, 两组于培养前期差异无统计学意义, 而于培养中后期(第3至6天)AD-MSCs-F增殖水



AD-MSCs-F: 雌性昆明小鼠脂肪间充质基质细胞; AD-MSCs-M: 雄性昆明小鼠脂肪间充质基质细胞。

AD-MSCs-F: adipose-derived mesenchymal stromal cells from female Kunming mice; AD-MSCs-M: adipose-derived mesenchymal stromal cells from male Kunming mice.

图1 昆明小鼠脂肪间充质基质细胞的形态

Fig.1 Morphology of adipose-derived mesenchymal stromal cells from Kunming mice

平均显著高于AD-MSCs-M($P<0.01$); 然而第7天, AD-MSCs-M增殖水平高于AD-MSCs-F($P<0.05$)。

P12代AD-MSCs双因素方差分析显示, 培养时间、性别及二者交互作用均具有显著影响(均 $P<0.01$)。P12代AD-MSCs-M整体平均增殖水平高于AD-MSCs-F。多重比较分析结果显示, 两组于培养中后期差异逐渐增大, 其中第4、6、7天AD-MSCs-M增殖水平显著高于AD-MSCs-F(均 $P<0.01$)。

P16代AD-MSCs双因素方差分析显示, 培养时间、性别及二者交互作用均具有显著影响(均 $P<0.01$)。AD-MSCs-M整体平均增殖水平显著高于AD-MSCs-F。多重比较分析结果显示, 培养前期两组未见显著差异, 而培养后期(第4至7天)AD-MSCs-M增殖水平显著高于AD-MSCs-F(均 $P<0.01$)。

2.3 表面标记物细胞免疫荧光分析

分别取P4、P8、P16的AD-MSCs-F、AD-MSCs-M进行免疫荧光检测, 结果如图3所示, P4、P8、P16的AD-MSCs-F、AD-MSCs-M间充质基质细胞特异性标记抗原CD29、CD44、CD90均呈阳性表达, 血管标记物CD31、造血干细胞表面标记物

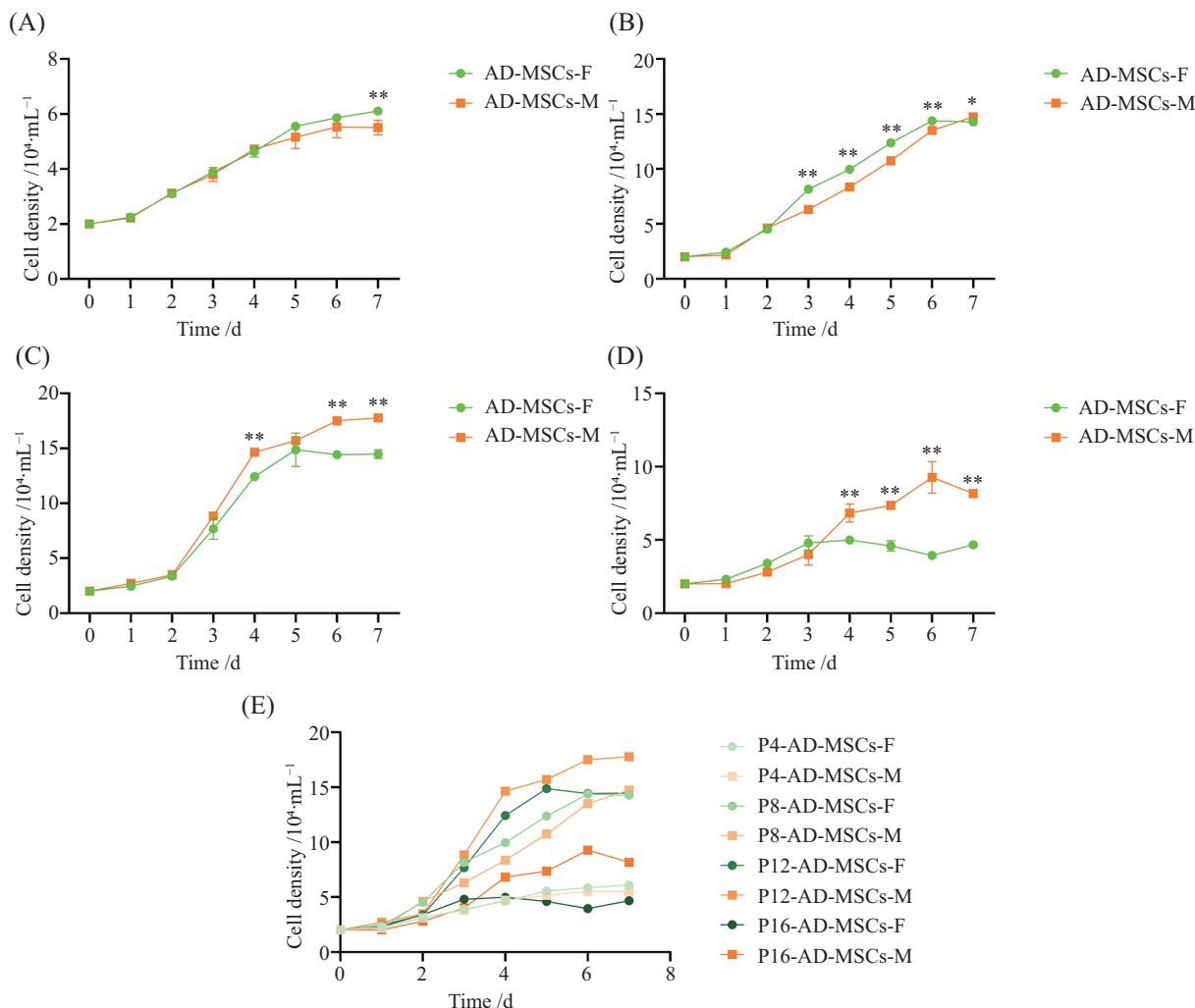
CD45呈阴性表达, CD34存在阳性表达, 符合间充质基质细胞特性。

2.4 表面标记物流式细胞术鉴定

本实验采用流式细胞仪测定P4、P8、P16的AD-MSCs-F、AD-MSCs-M细胞表面标志物表达量。结果如图4所示, 两组细胞均高表达间充质基质细胞相关标志物CD29、CD44和CD90, 造血及内皮细胞相关标志物CD31、CD34和CD45表达水平较低。随着代数增加, AD-MSCs-F的CD34表达量持续增加至53.6%。

2.5 成脂分化

分别取P4、P16的AD-MSCs-F、AD-MSCs-M进行成脂分化诱导。结果如图5所示, 经诱导后, 细胞由梭形转变为卵圆形或多角形, 细胞内产生脂滴, 经油红O染为红色, P4、P16的AD-MSCs-F、AD-MSCs-M均具有成脂分化能力, 符合间充质基质细胞特性。与AD-MSCs-M相比, 相同代数的AD-MSCs-F油红O阳性率较高($P<0.01$), 且随着代数的增加AD-MSCs-F油红O阳性率升高, AD-MSCs-M油红O阳性率降低。



A~E: P4、P8、P12、P16和总体的AD-MSCs-F、AD-MSCs-M生长曲线。 $\bar{x} \pm s$, $n=3$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与同时时间点AD-MSCs-M组比较。

A-E: the growth curves of AD-MSCs-F and AD-MSCs-M at P4, P8, P12, P16, and the overall comparison, respectively. $\bar{x} \pm s$, $n=3$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with AD-MSCs-M at the corresponding time point.

图2 不同代数(P4、P8、P12、P16)昆明雌性和雄性小鼠脂肪间充质基质细胞的生长曲线

Fig.2 Growth curves of adipose-derived mesenchymal stromal cells from female and male Kunming mice at different passages (P4, P8, P12, and P16)

2.6 成骨分化

分别取P4、P16的AD-MSCs-F、AD-MSCs-M进行成骨分化诱导。结果如图6所示,经诱导,细胞表面钙盐沉积形成钙结节,经茜素红染料染为深红色,P4、P16的AD-MSCs-F、AD-MSCs-M均具有成骨分化能力,符合间充质基质细胞特性。与AD-MSCs-M相比,P4的AD-MSCs-F茜素红阳性率较高($P<0.01$),且随着代数的增加AD-MSCs-F茜素红阳性率降低,AD-MSCs-M茜素红阳性率略微升高。

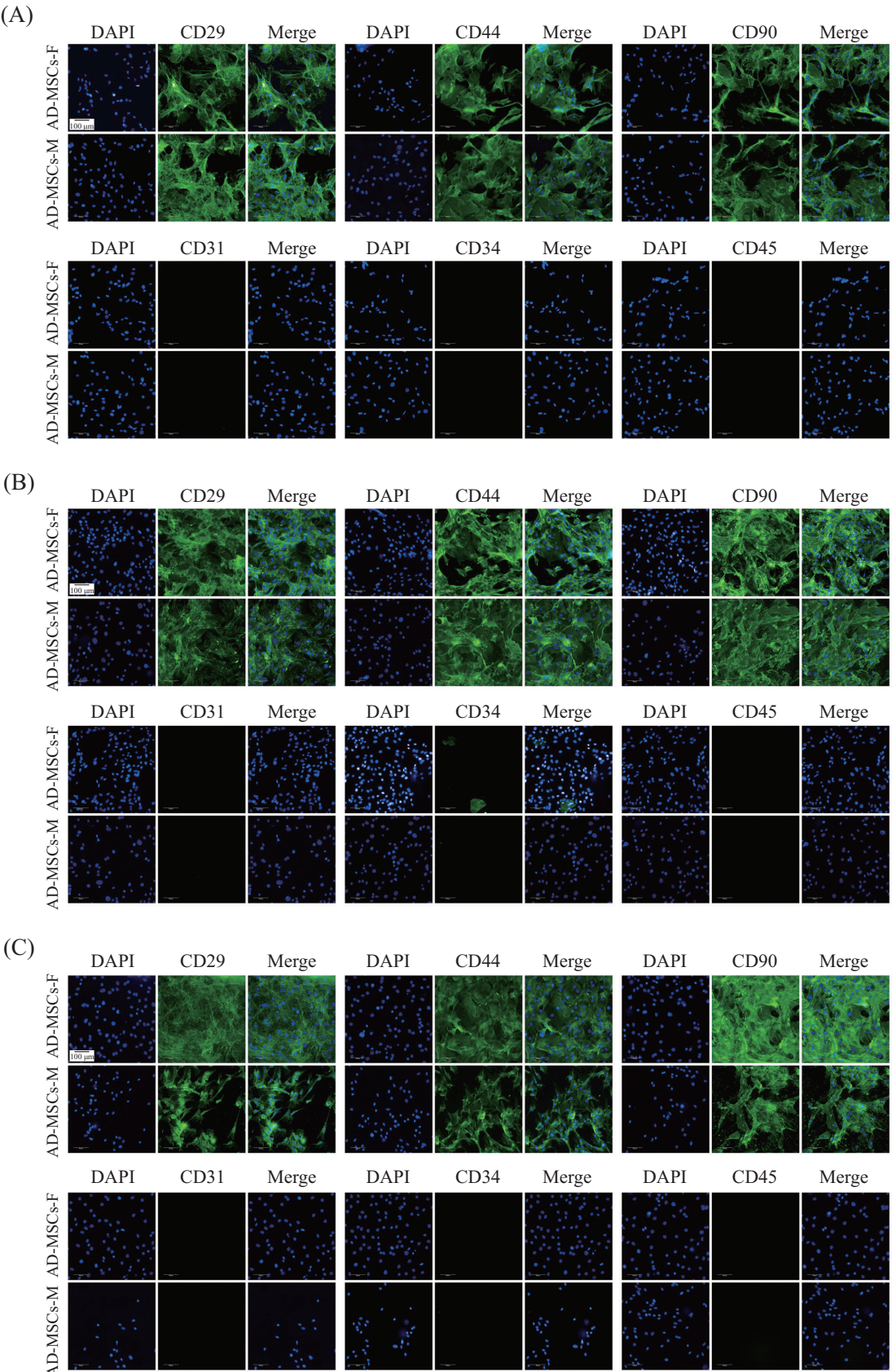
2.7 成软骨分化

分别取P4、P16的AD-MSCs-F、AD-MSCs-M进行成软骨分化诱导。结果如图7所示,细胞诱导

后经阿利新蓝染为蓝色,P4、P16的AD-MSCs-F、AD-MSCs-M均具有成软骨分化能力,符合间充质基质细胞特性。与AD-MSCs-M相比,相同代数的AD-MSCs-F阿利新蓝阳性率略微降低,但差异无显著性意义,且随着代数的增加,阿利新蓝阳性率均降低。

2.8 细胞衰老检测

分别取P16的AD-MSCs-F、AD-MSCs-M进行 β -半乳糖苷酶染色,结果如图8所示,P16的AD-MSCs-F、AD-MSCs-M细胞几乎全部出现衰老现象。与AD-MSCs-M相比,AD-MSCs-F细胞呈现更明显的衰老表型。

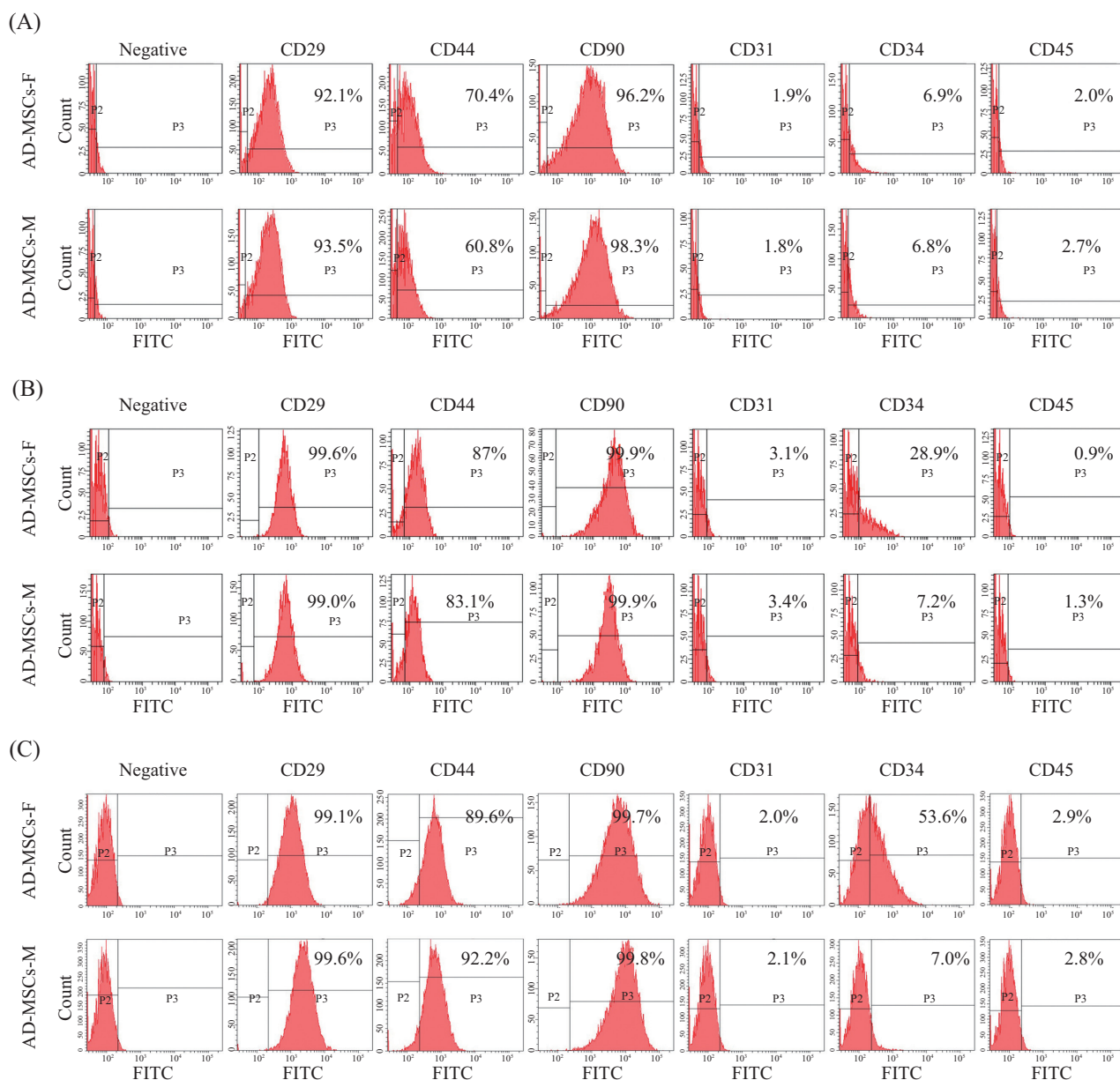


A~C: P4、P8、P16的AD-MSCs-F、AD-MSCs-M表面标志物免疫荧光检测图。

A~C: immunofluorescence detection of surface markers in AD-MSCs-F and AD-MSCs-M at passages P4, P8, and P16, respectively.

图3 免疫荧光检测昆明小鼠脂肪间充质基质细胞表面标志物

Fig.3 Immunofluorescence detection of surface markers on adipose-derived mesenchymal stromal cells from Kunming mice



A~C: P4、P8、P16的AD-MSCs-F和AD-MSCs-M细胞表面标志物表达量流式细胞术检测图。阳性标志物: CD29、CD44、CD90; 阴性标志物: CD31、CD34、CD45。

A~C: flow cytometric analysis of stem cell surface marker expression in AD-MSCs-F and AD-MSCs-M at passages P4, P8, and P16. Positive markers included CD29, CD44, and CD90, while negative markers included CD31, CD34, and CD45.

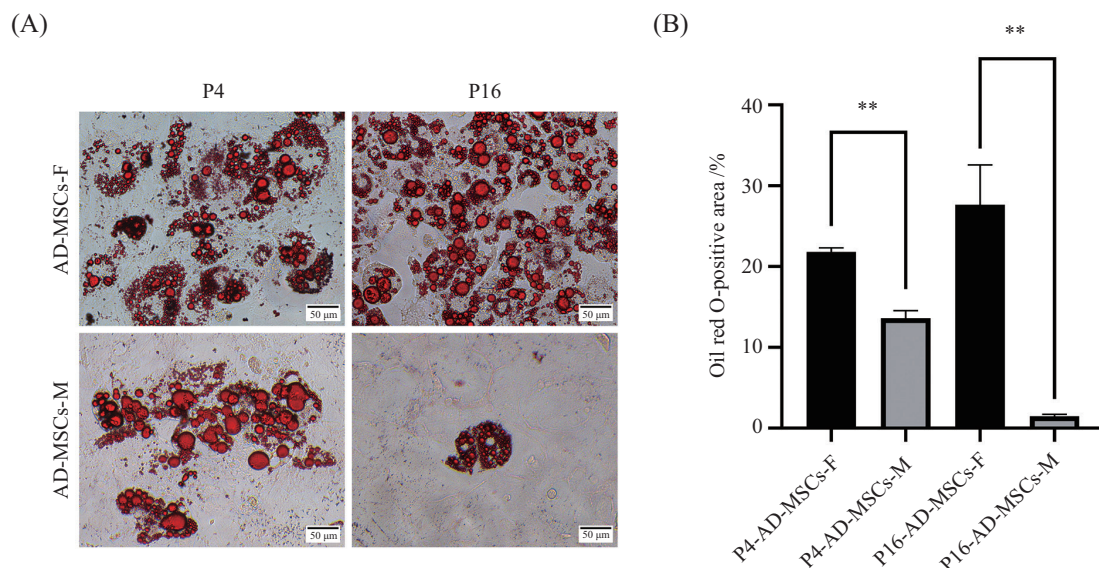
图4 流式细胞术检测昆明小鼠脂肪间充质基质细胞表面标志物表达量

Fig.4 Detection of surface marker expression in adipose-derived mesenchymal stromal cells from Kunming mice by flow cytometry

3 讨论

间充质基质细胞是一类存在于骨髓、脂肪、外周血、脐带血、牙髓等组织,具有一定的多向分化能力和多重生物学活性的基质细胞群。1968年Friedenstein等^[17]观察到鼠骨髓中含有可贴壁生长、经体外诱导可分化为骨细胞的成纤维细胞样细胞克隆,1991年Caplan^[18]正式将这种来自骨髓的细胞命

名为间充质干细胞。1999年,Pittenger等^[19]在*Science*杂志上发表文章,首次证明该类细胞具有多向分化能力,可分化为脂肪细胞、成骨细胞、软骨细胞。2005年,国际细胞与基因治疗协会(International Society for Cell & Gene Therapy, ISCT)宣布推荐将骨髓和其他组织来源的具有干细胞特征的贴壁细胞称为间充质干细胞^[20]。但随着对该类细胞生物学特性和

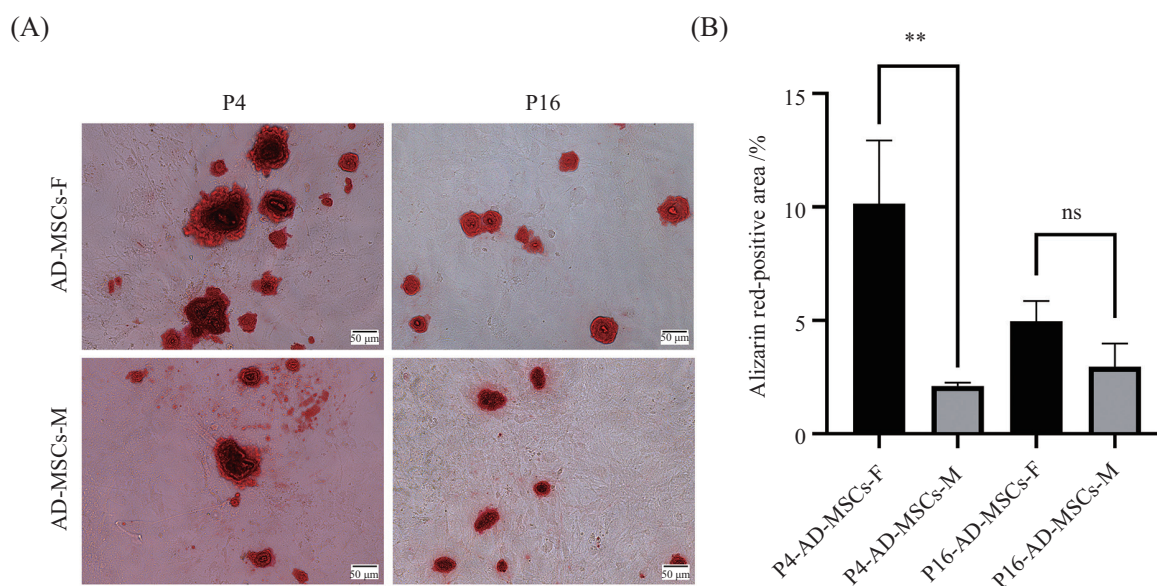


A: 成脂分化形态观察; B: 油红O阳性面积率。 $\bar{x} \pm s$, $n=3$; ** $P<0.01$ 。

A: morphological observation of adipogenic differentiation; B: quantitative analysis of oil red O-positive area. $\bar{x} \pm s$, $n=3$; ** $P<0.01$ 。

图5 昆明小鼠脂肪间充质基质细胞成脂诱导及定量分析

Fig.5 Adipogenic differentiation and quantitative analysis of adipose-derived mesenchymal stromal cells from Kunming mice



A: 成骨分化形态观察; B: 茜素红阳性面积率。 $\bar{x} \pm s$, $n=3$; ** $P<0.01$; ns: $P>0.05$ 。

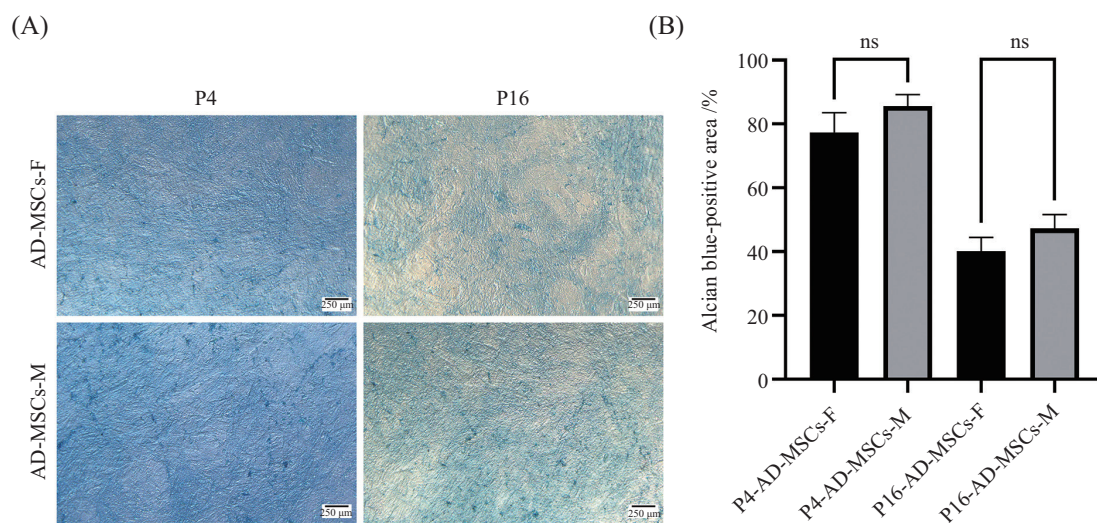
A: morphological observation of osteogenic differentiation; B: quantitative analysis of alizarin red-positive area. $\bar{x} \pm s$, $n=3$; ** $P<0.01$; ns: $P>0.05$ 。

图6 昆明小鼠脂肪间充质基质细胞成骨诱导及定量分析

Fig.6 Osteogenic differentiation and quantitative analysis of adipose-derived mesenchymal stromal cells from Kunming mice

作用机制的不断深入, ISCT近年提出了对MSCs的重要指南规范, 由于其在体内的治疗效果主要与其旁分泌作用相关而非其干性特性等, 确定MSCs为正式用语^[3-4]。不同来源的间充质基质细胞自我更新能力和克隆形态、基因表达谱等各异^[21], 在不同组织中的占比从0.001%到0.01%不等^[19]。AD-MSCs拥有

MSCs多向分化、低免疫原性、抗炎、免疫调节等特性, 与骨髓等其他来源相比, AD-MSCs易于获取、对供体损伤小、增殖能力与持久性更好、含量高出百倍, 在再生医学和组织工程领域具有广阔的应用前景^[15]。近年来研究表明, 不同性别来源的MSCs在增殖能力、分化潜能以及细胞因子分泌等方面可能



A: 成软骨分化形态观察; B: 阿利新蓝阳性面积率。 $\bar{x} \pm s$, $n=3$; ns: $P>0.05$ 。

A: morphological observation of chondrogenic differentiation; B: quantitative analysis of alcian blue-positive area. $\bar{x} \pm s$, $n=3$; ns: $P>0.05$.

图7 昆明小鼠脂肪间充质基质细胞成软骨诱导及定量分析

Fig.7 Chondrogenic differentiation and quantitative analysis of adipose-derived mesenchymal stromal cells from Kunming mice

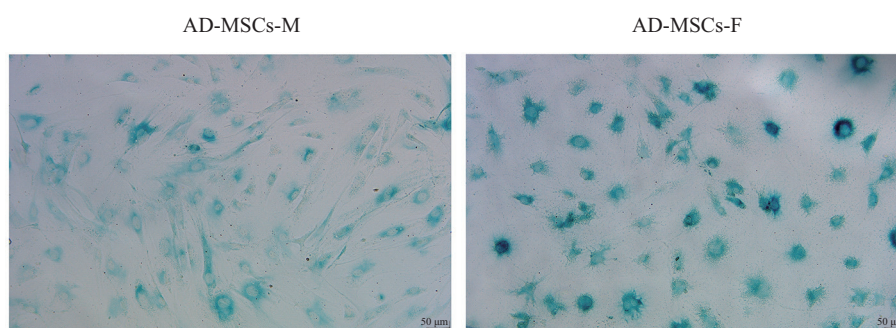


图8 P16昆明小鼠脂肪间充质基质细胞衰老情况检测

Fig.8 Assessment of aging in P16 adipose-derived mesenchymal stromal cells from Kunming mice

存在一定差异, 因此对不同性别来源AD-MSCs生物学特性的比较具有重要研究意义。本研究对昆明小鼠进行了AD-MSCs提取、原代培养及鉴定, 并对不同性别来源AD-MSCs的生物学特性进行了比对, 建立并优化了昆明小鼠AD-MSCs提取鉴定系统, 初步探究了性别对间充质基质细胞生物学特性的影响, 为间充质基质细胞的研究与应用提供了参考。

2006年, ISCT规范了人类间充质基质细胞的定义, 需同时符合以下三个标准: ①贴壁生长; ②细胞表面必须表达CD105、CD73和CD90, 并且缺乏CD45、CD31、CD34、HLA-DR等表面分子表达; ③具有向脂肪细胞、成骨细胞、软骨细胞分化的能力^[22]。本研究提取得到的AD-MSCs-F、AD-MSCs-M呈梭形、纺锤形或多角形, 漩涡状排列贴壁生长, 符合间充质基质细胞生长特性; 不同组织

来源的间充质基质细胞具有显著不同的转录组表达谱, 而脂肪来源的间充质基质细胞可表达高水平的CD34分子^[23], 本研究采用免疫荧光实验与流式细胞术检测AD-MSCs表面标记物CD29、CD44、CD90、CD31、CD34、CD45的表达情况, 结果显示CD29、CD44、CD90呈阳性表达, CD31、CD45呈阴性表达, CD34存在阳性表达, 整体表型特征符合间充质基质细胞的特性; 对于多向分化潜能, 本研究进行了成脂、成骨和成软骨分化诱导, 结果显示P4、P16的AD-MSCs-F、AD-MSCs-M均具备向脂肪细胞、成骨细胞和纤维软骨分化的能力, 符合间充质基质细胞多向分化能力; 综上所述, 结合形态、表面标记物检测联合分化潜能鉴定确认所提细胞为AD-MSCs。

本研究采用酶消化法获取AD-MSCs, 培养6 h后换液, 去除未贴壁细胞, 提高细胞纯度。AD-MSCs

培养体系为低糖DMEM基础培养基+10%胎牛血清+1% GlutaMAX™+1% MEM NEAA+1%双抗,细胞传代采用作用温和的非动物源性重组酶 TrypLE™ Express, 酶消化时间随代数增加可适当缩短。在体外培养过程中发现,细胞增殖能力呈先降低再增加的趋势,P4细胞增殖能力出现最低点,而在P12往后细胞出现脱落并伴有增殖能力降低、细胞铺展老化情况。在P12之前,AD-MSCs-F的增殖速度较AD-MSCs-M快,P12之后增殖速度出现反转,AD-MSCs-M的增殖速度较AD-MSCs-F快,并且都在P16出现明显的衰老。流式细胞术检测表面标记物结果显示,CD44表达量随细胞代数增加逐渐增加,且不同性别来源AD-MSCs在CD34表达方面存在一定差异:AD-MSCs-M中CD34呈阴性表达,而AD-MSCs-F中CD34表达量随细胞代数增加逐渐增加,在第16代时表达量可达53.6%。在成脂、成骨和成软骨诱导培养条件下,两组AD-MSCs均可诱导成功,但AD-MSCs-F的成脂和成骨分化能力具有一定的优势,成软骨分化能力无明显差异,且随着传代次数的增加,两种性别来源的MSCs的两种分化能力呈现不同程度的上升和下降。上述结果提示,不同性别来源AD-MSCs在体外培养过程中可能存在一定的增殖特性、分化能力和表面标记物表达差异。AD-MSCs-F表现出相对较强的分化能力,提示其在成脂、成骨分化潜能方面可能具有一定优势。已有研究表明,新鲜分离的AD-MSCs可表达CD34,但其表达水平通常随体外扩增代数增加逐渐降低^[24-25],近年来体内间充质基质细胞也表达CD34的观点被逐渐接受^[26],且为了避免CD34表达丧失并维持细胞生理表型,有研究正在开发替代培养方法,旨在探究这种变化是否为生理成熟,而非人为培养造成的表型漂移^[27]。本研究中AD-MSCs-F在高传代阶段CD34表达水平升高,而雄性AD-MSCs持续保持阴性表达,提示AD-MSCs在长期培养过程中,由于培养方式和环境的不同,存在性别相关的表型变化,长期培养可导致间充质基质细胞出现表型漂移及细胞亚群选择性富集。AD-MSCs-F还可能存在血管相关分化潜能^[28],其具体机制仍有待进一步研究。

本研究基本掌握了较为稳定的AD-MSCs分离、培养的方法,建立了适合昆明小鼠AD-MSCs的体外培养体系和鉴定方法。本研究通过酶消化法成功从昆明小鼠腹股沟脂肪中分离出AD-MSCs并完成相

关鉴定,分离获得的AD-MSCs在体外培养中表现出典型的MSCs生物学特性,包括贴壁生长、成脂、成骨和成软骨分化能力以及一定的体外增殖能力,其中P8和P12细胞表现出较高的增殖活性。此外不同性别来源的AD-MSCs在增殖、衰老、分化和表面标记物表达等方面存在一定的差异,AD-MSCs-F早期增殖速度与AD-MSCs-M相比较快,并在高传代阶段更易出现衰老表现,增殖速度变慢,且成脂、成骨分化能力和CD34的表达量也显著高于AD-MSCs-M,提示性别因素、培养条件可能影响AD-MSCs的生物学特性,这可能与特定的分子通路调控有关,后续将会进一步进行机制方面的研究。本研究结果为AD-MSCs在基础研究、临床应用和再生医学的研究提供了细胞生物学实验基础,同时为进一步探讨性别因素在MSCs研究及潜在临床应用中的作用提供了参考依据。

参考文献(References)

- [1] 游昌乔,刘爱龙,张红明,等.干细胞治疗肝衰竭研究进展[J].中国生物工程杂志,2024,44(12):91-99.
You C Q, Liu A L, Zhang H M, et al. Research progress of stem cell therapy for liver failure [J]. China Biotechnology, 2024, 44(12): 91-99.
- [2] 李佳璐,何斌,汤红明,等.全球干细胞临床研究现状与展望[J].海南医学,2024,35(7):1044-1049.
Li J L, He B, Tang H M, et al. Current status and prospects of global stem cell clinical research [J]. Hainan Medical Journal, 2024, 35(7): 1044-1049.
- [3] Ding D C, Shyu W C, Lin S Z. Mesenchymal stem cells [J]. Cell Transplant, 2011, 20(1): 5-14.
- [4] Renesme L, Cobey K D, Lalu M M, et al. Delphi-driven consensus definition for mesenchymal stromal cells and clinical reporting guidelines for mesenchymal stromal cell-based therapeutics [J]. Cytotherapy, 2025, 27(2): 146-168.
- [5] Ma M X, Cui G F, Liu Y W, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles, osteoimmunology and orthopedic diseases [J]. PeerJ, 2023, 11: e14677.
- [6] 高杨杰,赵静宇,丁俊丽,等.间充质干细胞治疗深部真菌感染性疾病的研究进展[J].中国真菌学杂志,2024,19(3):306-309.
Gao Y J, Zhao J Y, Ding J L, et al. Research progress of mesenchymal stem cells in the treatment of deep fungal infectious diseases [J]. Chinese Journal of Mycology, 2024, 19(3): 306-309.
- [7] Chen Z, Xia X W, Yao M W, et al. The dual role of mesenchymal stem cells in apoptosis regulation [J]. Cell Death & Disease, 2024, 15(4): 250.
- [8] Nair S, Rocha-Ferreira E, Fleiss B, et al. Neuroprotection offered by mesenchymal stem cells in perinatal brain injury: role of mitochondria, inflammation, and reactive oxygen species [J]. Journal of Neurochemistry, 2021, 158(1): 59-73.
- [9] Liao S Y, Zhang Y L, Ting S W, et al. Potent immunomodulation and angiogenic effects of mesenchymal stem cells versus cardio-

- myocytes derived from pluripotent stem cells for treatment of heart failure [J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2019, 10(1): 78.
- [10] Matsushita K. Heart failure and adipose mesenchymal stem cells [J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2020, 26(4): 369-379.
- [11] Aldali F, Deng C, Nie M, et al. Advances in therapies using mesenchymal stem cells and their exosomes for treatment of peripheral nerve injury: state of the art and future perspectives [J]. *Neural Regeneration Research*, 2025, 20(11): 3151-3171.
- [12] 徐婷, 赵建美. 间充质干细胞治疗自身免疫性疾病的研究进展 [J]. *南通大学学报(医学版)*, 2024, 44(4): 375-378.
- Xu T, Zhao J M. Research progress of mesenchymal stem cells in the treatment of autoimmune diseases [J]. *Journal of Nantong University (Medical Sciences)*, 2024, 44(4): 375-378.
- [13] Gao X, Ruzbarsky J J, Layne J E, et al. Stem cells and bone tissue engineering [J]. *Life*, 2024, 14(3): 287.
- [14] 陈红宇, 沈基, 刘威, 等. 间充质干细胞及其外泌体治疗急性呼吸窘迫综合征研究进展 [J]. *临床肺科杂志*, 2024, 29(11): 1770-1774, 1779.
- Chen H Y, Shen J, Liu W, et al. Research progress of mesenchymal stem cells and their exosomes in the treatment of acute respiratory distress syndrome [J]. *Journal of Clinical Pulmonary Medicine*, 2024, 29(11): 1770-1774, 1779.
- [15] Satilmis B, Cicek G S, Cicek E, et al. Adipose-derived stem cells in the treatment of hepatobiliary diseases and sepsis [J]. *World Journal of Clinical Cases*, 2022, 10(14): 4348-4356.
- [16] Yu S M, Yan X R, Liu H H, et al. Improved establishment of embryonic stem (ES) cell lines from the Chinese Kunming mice by hybridization with 129 mice [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(3): 3389-3402.
- [17] Friedenstein A J, Petrakova K V, Kurolesova A I, et al. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues [J]. *Transplantation*, 1968, 6(2): 230-247.
- [18] Caplan A I. Mesenchymal stem cells [J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 1991, 9(5): 641-650.
- [19] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143-147.
- [20] Horwitz E M, Le Blanc K, Dominici M, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: the International Society for Cellular Therapy position statement [J]. *Cytotherapy*, 2005, 7(5): 393-395.
- [21] Sacchetti B, Funari A, Remoli C, et al. No identical "mesenchymal stem cells" at different times and sites: human committed progenitors of distinct origin and differentiation potential are incorporated as adventitial cells in microvessels [J]. *Stem Cell Reports*, 2016, 6(6): 897-913.
- [22] 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(4): 315-317.
- [23] 卢加琪, 韦薇, 刘伯宁, 等. 间充质干细胞的研究进展与药理学评价 [J]. *药学报*, 2019, 54(7): 1317-1324.
- Lu J Q, Wei W, Liu B N, et al. Research progress and pharmaceutical evaluation of mesenchymal stem cells [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2019, 54(7): 1317-24.
- [24] Traktuev D O, Merfeld-Clauss S, Li J L, et al. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks [J]. *Circulation Research*, 2008, 102(1): 77-85.
- [25] Lin G T, Garcia M, Ning H X, et al. Defining stem and progenitor cells within adipose tissue [J]. *Stem Cells and Development*, 2008, 17(6): 1053-1063.
- [26] Lin G T, Xin Z C, Zhang H Y, et al. Identification of active and quiescent adipose vascular stromal cells [J]. *Cytotherapy*, 2012, 14(2): 240-246.
- [27] Scherberich A, Di Maggio N D, McNagny K M. A familiar stranger: CD34 expression and putative functions in SVF cells of adipose tissue [J]. *World J Stem Cells*, 2013, 5(1): 1-8.
- [28] Suga H, Matsumoto D, Eto H, et al. Functional implications of CD34 expression in human adipose-derived stem/progenitor cells [J]. *Stem Cells and Development*, 2009, 18(8): 1201-1210.