

一种高效成脂分化的小鼠脂肪干细胞的制备方法

汤秋凯¹ 宋赛赛² 汤妍^{2Δ}

(¹浙江新安国际医院检验科 嘉兴 314031; ²复旦大学基础医学院生物化学与分子生物学系 上海 200032)

【摘要】 目的 建立一种拥有高效成脂分化能力的小鼠脂肪干细胞的制备方法。方法 获取野生型小鼠的皮下脂肪,通过严格控制胶原酶的消化时间,比较不同消化时间得到的脂肪干细胞数目和成脂分化能力,进一步通过流式检测技术明确不同消化时间间充质细胞和血管组分的差异。结果 使用胶原酶消化 40 min 得到的小鼠脂肪干细胞具有 90% 以上的体外成脂分化能力,消化 60 min 得到的脂肪干细胞只具有 20% 的成脂分化能力,主要原因是其中混有部分血管相关细胞。结论 通过控制脂肪组织的胶原酶消化时间,建立了一种高效成脂分化的脂肪干细胞的制备方法,获得的脂肪干细胞具有 90% 以上的体外成脂分化能力。

【关键词】 脂肪干细胞; 脂肪细胞; 分化; 血管基质成分

【中图分类号】 R34 **【文献标志码】** A **doi:** 10.3969/j.issn.1672-8467.2025.02.015

A method for preparing efficient adipogenic differentiation of mice adipose stem cells

TANG Qiu-kai¹, SONG Sai-sai², TANG Yan^{2Δ}

(¹Department of Clinical Laboratory, Zhejiang Sian International Hospital, Jiaxing 314031, Zhejiang Province, China;
²Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China)

【Abstract】 **Objective** To develop a simple method for producing mice adipose stem cells with highly efficient adipogenic differentiation capability. **Methods** Subcutaneous adipose tissue was extracted from wild-type mice. By strictly controlling the digestion time of collagenase, we compared the number of adipose stem cells and their adipogenic differentiation ability obtained for different digestion times. Further, flow cytometry was used to clarify the differences in mesenchymal cells and vascular components at different digestion times. **Results** The adipose stem cells obtained after 40 minutes of digestion by collagenase exhibited over 90% adipogenic differentiation ability *in vitro*, while those obtained after 60 minutes of digestion only showed 20% adipogenic differentiation ability. The main reason for this discrepancy was the presence of a portion of vascular-related cells in the latter. **Conclusion** By controlling the digestion time of collagenase in adipose tissue, we have established an efficient method for preparing adipose stem cells with high adipogenic differentiation potential. The obtained adipose stem cells exhibit over 90% adipogenic differentiation ability *in vitro*.

【Key words】 adipose stem cell; adipocyte; differentiation; stromal vascular fraction

* This work was supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81970754).

2023年研究报道1 580万中国成年人中超重人群(24<BMI<28 kg/m²)占34.8%,肥胖人群(BMI >28 kg/m²)占14.1%^[1]。随着肥胖人口数目的增加,肥胖相关代谢性疾病,如糖尿病、脂肪肝、动脉

国家自然科学基金面上项目(81970754)

^ΔCorresponding author E-mail: yantang@fudan.edu.cn

网络首发时间:2025-03-05 16:44:36 网络首发地址:https://link.cnki.net/urlid/31.1885.R.20250303.1637.006

粥样硬化及肿瘤的发生率也在逐年增加^[2]。肥胖是指人体脂肪的过量存储,表现为脂肪细胞体积增大和数目增多。其中脂肪细胞数目的增多主要存在于脂肪组织中的脂肪干细胞增殖分化为成熟的脂肪细胞^[3]。因此,脂肪干细胞分化机制研究以及分化后的成熟脂肪细胞功能研究成为生命科学研究的热点。

早期脂肪干细胞的研究多采用前脂肪细胞系3T3-L1,或者多潜能干细胞C3H10T1/2^[4]。随着研究工作的深入,统一的细胞系已不能满足对脂肪细胞生理病理功能的探索。2001年,Zuk等^[5]首次通过胶原酶消化离心的方法得到血管基质成分(stromal vascular fraction, SVF),并证明这群细胞具有多潜能性。随着流式技术以及单细胞测序方法的进步,科学家们发现脂肪组织除了含有成熟的脂肪细胞,还包含不同类型的脂肪干细胞、血管相关细胞以及免疫细胞^[6]。脂肪组织在应对营养过剩时,皮下脂肪细胞首先出现脂肪细胞体积增大,12周后才会出现新生的脂肪细胞^[7]。进一步的研究发现,DPP4+细胞是一种早期多潜能细胞,具有更高的增值和分化潜能;ICAM1+细胞是定向后的前脂肪细胞,更容易向成熟的脂肪细胞分化^[8]。通过流式分选可以获得相对单一的脂肪干细胞亚群,作为后期研究的细胞模型。但流式分选效率低、费用高、易污染,不便作为常规的细胞亚群获取方式,因此需要建立一种更简易的方式获得相对单一的脂肪干细胞亚群。

脂肪组织中存在丰富的血管,用来提供氧气和营养物质;同时存在脂肪干细胞,用于分化为成熟的脂肪细胞^[9]。Tran等^[10]用免疫电镜等技术从形态上发现白色脂肪细胞和棕色脂肪细胞可能来源于内皮外的一群周细胞,进一步用VE-cadherin启动子追踪发现,这些阳性细胞可以发育分化为前脂肪细胞、成熟的脂肪细胞。2020年,通过谱系示踪的方法,发现血管周PDGFR β +的干细胞可以发育分化为成熟的脂肪细胞,但在体内却发挥着抑制脂肪分化的功能^[11]。本团队前期研究工作发现,在用胶原酶进行消化脂肪组织的过程中,可以得到毛细血管样结构,并证明这些成分包含血管内皮结构^[12]。但是随着消化时间的延长,血管样结构逐渐减少,这在国内外的文献里都未有报道。因此,本研究工作将系统性分析脂肪组织在胶原酶不同消化时间后

得到的干细胞的形态、基因表达以及成脂分化能力的差异。

材料和方法

仪器设备 二氧化碳培养箱(BB150)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;离心机(5427R)购自德国 Eppendorf AG 公司;Western blot 电泳槽(1658004, 1658039, 1658041)及相关设备购自美国 Bio-Rad 公司;倒置荧光显微镜(BX53F)购自日本 Olympus 公司;超净工作台(isocide)购自新加坡 ESCO 公司。

材料和试剂 VIII型胶原酶、生物素、青霉素、链霉素、地塞米松、3-异丁基-1 甲基黄嘌呤、胰岛素、油红购自美国 Sigma-Aldrich 公司;F12/DMEM 培养基、胎牛血清 FBS、胰酶购自美国 Gibco BRL 公司;蛋白预染 Marker 购自美国 Bio-Rad 公司;ECL 显影液购自上海圣尔生物科技有限公司 PPAR γ 和 CD31 购于美国 CST 公司, Ap2, actin 和 HSP90 购于美国 Proteintech 公司;三氯甲烷、异丙醇、75% 乙醇、无水乙醇购自国药集团化学有限公司。

实验动物 C57 雄鼠 6~8 周龄,购于江苏集萃药康生物科技股份有限公司,置于 SPF 级动物房饲养,维持 12 h/12 h 光/暗循环。动物实验均遵循复旦大学实验动物伦理委员会相关规定(批准号:20190221-040)。

脂肪干细胞的分离和成脂分化方案 (1) 无菌获取 3 只 6~8 周的雄性小鼠腹股沟脂肪组织;(2) 使用 PBS 洗涤脂肪组织后,加入 1 mL PBS,剪成 1 mm³ 大小;(3) 加入 0.1% 胶原酶消化液 3 mL,消化脂肪组织颗粒;(4) 10~60 min 后,分别转移出全部组织消化混合液,2 000 \times g 离心 5 min,去除上层脂质和消化液,保留下层沉淀;(5) 在沉淀中分别加入 2 mL 红细胞裂解液,打散细胞,室温放置 1 min 后过 100 μ m 的无菌滤网;(6) 2 000 \times g 离心 5 min,去除上清,剩余沉淀加入培养基混匀,转移至 6 cm 培养皿中进行原代 P1 培养;(7) 当细胞生长至皿表面积的 80% 时,按照 1:4 的比例消化传代至 2 个 10 cm 培养皿中扩增为 P2;(7) 当细胞再次生长至皿表面积的 80% 时,消化成 P3 并接种于 6 孔板内进行培养;(8) 细胞接触抑制后 2 天,定义为 day 0,加入 0.5 mmol/L 的诱导剂 Mix(1 μ mol/L 的 Dex,5 μ g/mL

的Insulin、1 μmol/L的Rosi);(9)2天后(定义为day 2),更换诱导液为Insulin(5 μg/mL)及Rosi(1 μmol/L);(10)2天后(定义为day 4),更换不含诱导液的培养液;(11)2天后(定义为day 6),更换培养液为DMEM+10%FBS;(12)2天后(定义为day 8),收取细胞进行相关实验。

间充质细胞和血管相关细胞的分离培养 (1)无菌获取2只6~8周的雄性小鼠腹股沟脂肪组织;(2)使用PBS洗涤脂肪组织后,加入2 mL PBS,剪碎成1 mm³大小;(3)加入0.1%胶原酶消化液6 mL,消化步骤(2)中的脂肪组织颗粒;(4)40 min后,2 000×g离心5 min,去除上层脂质和消化液,保留下层沉淀;(5)在沉淀中加入2 mL红细胞裂解液,打散细胞,室温放置10 s后,吸取下层毛细血管样结构转移至新管,即血管相关细胞,上层悬液2 000×g离心5 min后得到间充质细胞;(6)间充质细胞直接贴壁培养;(7)血管相关细胞以2 000×g离心5 min后用100 μL培养基混匀,用微滴法以10 μL/孔加在培养皿上,2 h后缓慢加入培养基进行培养扩增。

Western blot 30 μg蛋白经10%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,电转移至PVDF膜,5%脱脂奶粉(TTBS配制)室温封闭1 h,一抗用3%BSA稀释,4℃孵育12 h;TTBS洗涤3次,每次10 min,二抗(5%脱脂奶粉稀释)室温孵育1 h,TTBS洗涤3次,每次15 min。ECL显影液孵育2 min,显影拍照。

油红染色 取出培养的细胞,弃培养基,PBS洗3次。4%多聚甲醛固定20 min,PBS洗3次,加

入1 mL油红工作液(油红贮存液与去离子水按3:2体积比混合,过滤除杂),室温孵育2 h,弃油红,去离子水洗3次,置于显微镜下观察。配置油红贮存液:称取0.5 g油红,加入100 mL异丙醇,充分震荡混匀,避光保存。

RNA抽提及Real Time PCR反应 (1)单层贴壁细胞培养预定时间后,弃培养液。用PBS洗涤单层细胞(35 mm培养皿),加入1 mL Trizol Reagent,立即用移液器吹打,使其彻底混匀。细胞脱壁后,将裂解液移入离心管中,室温静置5 min。加0.2 mL氯仿,充分混匀后室温静置15 min,4℃条件下,12 000×g离心10 min。小心吸取上清,加入等体积异丙醇,混匀后室温静置10 min,4℃条件,12 000×g离心10 min。弃上清,沉淀用75%乙醇洗涤1次,室温自然干燥。用50 μL无RNA酶水溶解,-80℃冻存。(2)逆转录反应:将1 μg模板RNA、1 μL random primer和适当体积DEPC水混合,置于PCR仪器中65℃下5 min,冰浴2 min。PCR仪器中37℃反应60 min,cDNA -20℃贮存备用。(3)Real-time PCR反应:以逆转录产物为模板,用上、下游引物PCR扩增目的片段。引物由上海生工生物工程有限公司合成,引物序列如下:

统计学分析 本研究数据均用GraphPad Prism 5.0和ImagePro Plus 5.0分析处理。统计分析采用Student's *t*检验,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表1 用于本文qPCR的引物序列
Tab 1 Primers for qPCR used in this study

cDNA	F primer (5'-3')	R primer (5'-3')
PDGFR α	GAGGAAGCCGAGATACCCC	TGCTGTGGATCTGACTTCGAG
PDGFR β	AGGACAACCGTACCTTGGGTGACT	CAGTTCTGACACGTACCGGGTCTC
DPP4	ACCGTGGAAGTTCTTCTGG	CACAAAGAGTAGGACTTGACCC
CD142	AACCCACCAACTATACCTACACT	GTCTGTGAGGTCGCACTCG
ICAM1	TGCCCTCTGAAGCTCGGATATAC	TCTGTGCAACTCCTCAGTCAC
Pref1	AGTGCGAAACCTGGGTGTC	GCCTCCTTGTTGAAAGTGGTCA
18s	CGCCGCTAGAGGTGAAAATTCT	CATTCTTGGCAAATGCTTTTCG
CD31	ACGCTGGTGCTCTATGCAAG	TCAGTTGCTGCCCATTCATCA
SM22	CAACAAGGGTCCATCCTACGG	ATCTGGGCGGCCTACATCA

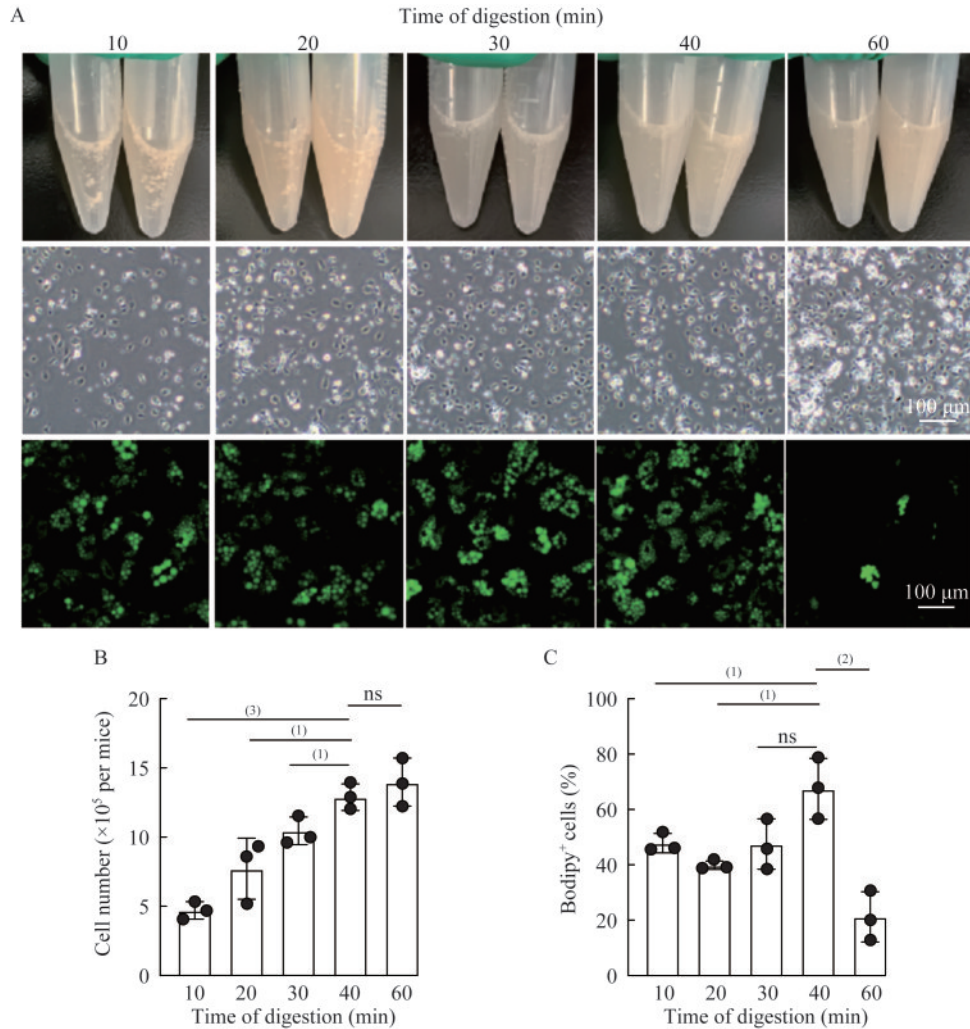
结 果

脂肪干细胞的分离及表达谱 小鼠腹股沟皮

下脂肪垫经胶原酶消化法处理,10~20 min后还留有较多颗粒物,30~60 min后组织悬液未见颗粒物(图1A)。不同消化时间后离心得到的脂肪干细胞贴壁培养后,通过显微镜观察和细胞计数,均发现

消化 10~40 min 的细胞数目在逐渐增多,与消化 40~60 min 后细胞数目无显著差异(图 1A、1B)。原代分离得到的脂肪干细胞贴壁培养后细胞形态相似,呈长梭形(图 1A)。采用成脂分化诱导剂刺激 8

天后,发现消化 10~40 min 的细胞成脂分化能力逐渐增强,但消化 60 min 后的细胞成脂分化能力大幅度下降(图 1A、1C)。



A: Illustrates the condition of adipose tissue obtained at different digestion durations (top), the morphology of adherent adipose-derived stem cells (ADSCs) cultured under different digestion times (middle), bodipy staining showing adipogenesis under different digestion times (bottom); B: Quantification of cell number under different digestion time; C: Quantification of adipogenic differentiation from A. Data were expressed as $\bar{x} \pm s$, ⁽¹⁾ $P < 0.05$, ⁽²⁾ $P < 0.01$, ⁽³⁾ $P < 0.001$; ns: Not significant.

图 1 小鼠皮下脂肪分离的脂肪干细胞经过不同消化时间处理后的特点

Fig 1 Characteristics of adipose-derived stem cells from subcutaneous fat of mice treated with different digestion times

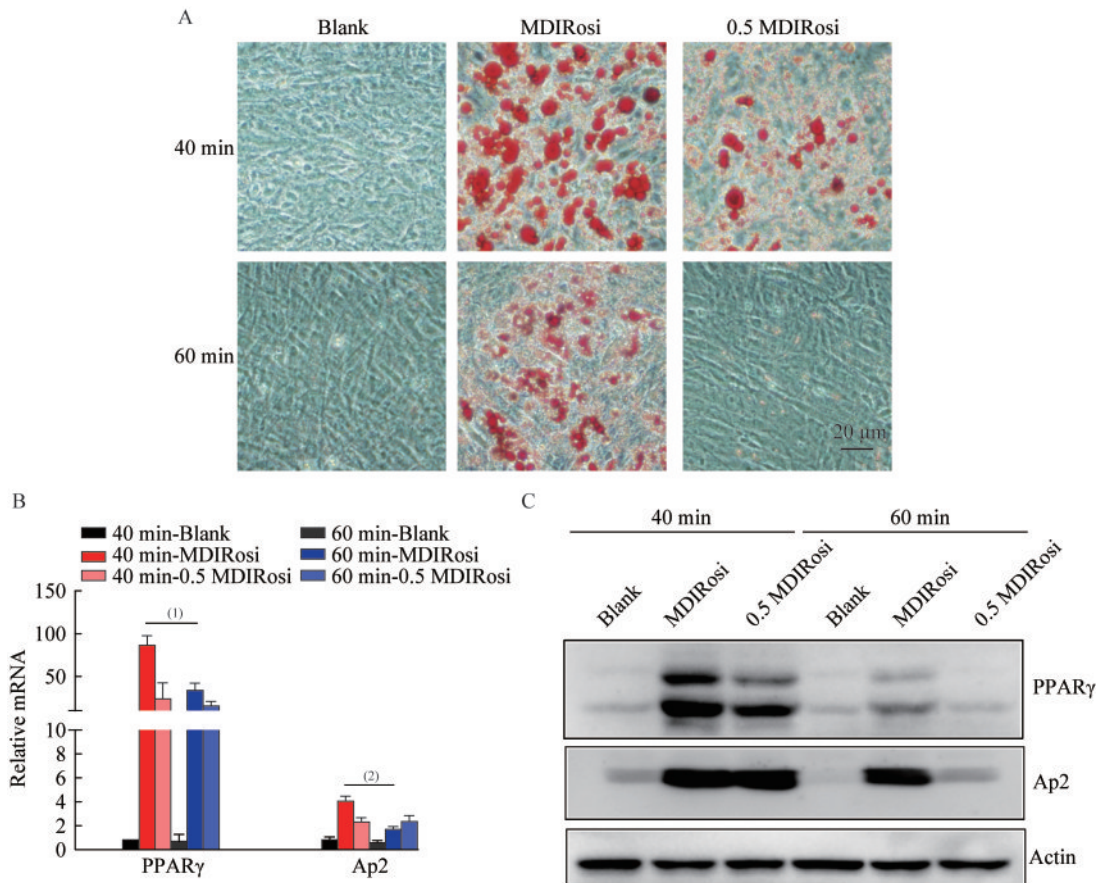
短时间消化成脂分化能力更强 将消化 40 min 和消化 60 min 的 SVF 进行成脂诱导分化实验,分别用 MDIRosi 和 0.5 MDIRosi 进行诱导分化。油红染色结果显示,消化 40 min 的 SVF 在 MDIRosi 和 0.5 MDIRosi 的诱导下,均能够进行成脂分化,MDIRosi 的诱导分化效率高于 0.5 MDIRosi 的诱导分化效率。消化 60 min 的 SVF 在 MDIRosi 诱导下

能进行成脂分化形成脂滴,但是其分化效率低于消化 40 min 的 SVF 在 MDIRosi 诱导下的分化效率。并且,消化 60 min 的 SVF 其在 0.5 MDIRosi 的诱导下不能被诱导分化成脂滴(图 2A)。消化 40 min 的 SVF 分化后,其脂肪相关标志物 PPAR γ 和 Ap2 的表达比消化 60 min 的 SVF 的表达高(图 2B),蛋白水平检测的结果一致(图 2C)。比较这 2 组脂肪干

细胞诱导分化后的油红染色结果、RNA水平和蛋白水平发现,消化40 min后得到的脂肪干细胞更易向成熟的脂肪细胞分化。

间充质细胞和血管组分的差异比较 为了进一步明确消化40 min和60 min造成的脂肪干细胞的差异性,通过流式检测血管内皮相关的蛋白CD31,发现消化60 min的细胞中CD31阳性细胞远高于消化40 min细胞组(图3A)。通过流式方法检测脂肪干细胞的特异性蛋白CD34、DPP4及ICAM1的阳性细胞比例,发现消化60 min组中干细胞的比例并没有下降,ICAM1也是一种血管相关蛋白,在消化60 min组的比例高于消化40 min组,进一步说明了消化60 min组混入了大量血管相关细胞,并且这种细胞可以抑制成脂分化(图3B)。通过对消化后的SVF组分进行观察发现,消化后的SVF主要有2种成分,血管组分血管细胞和非血管组分

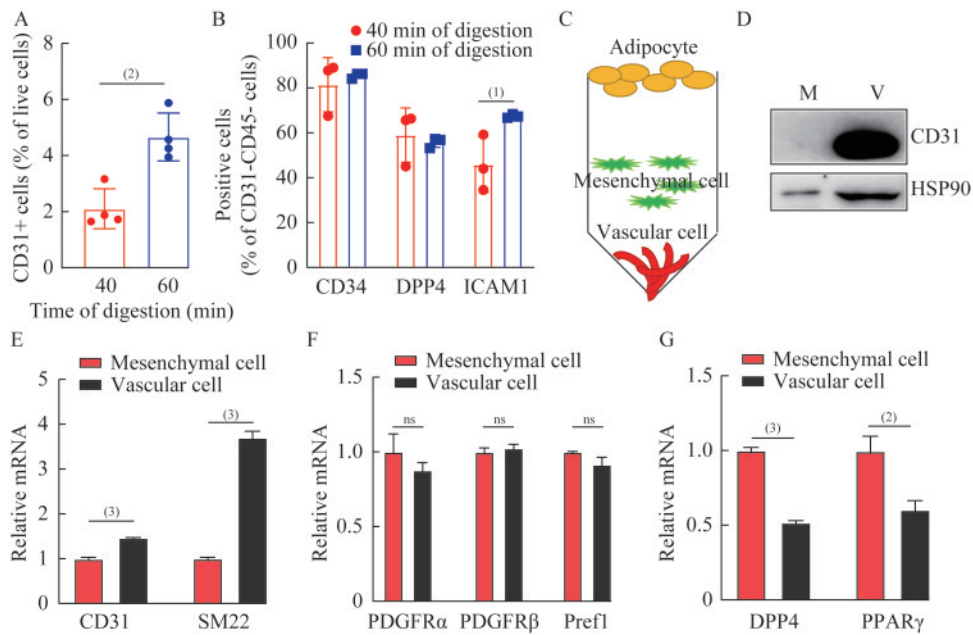
间充质细胞(图3C)。在消化过程中,首先被解离成单个细胞的是非血管组分,血管组分在后期被解离成单个细胞。由此推测,因为这两种组分的成脂能力不同,导致了不同消化时间下SVF成脂能力的差异。为了验证这一假设,检测了两种组分成脂诱导分化前的血管相关标志物CD31和SM22。结果显示,通过我们的分离方法,得到的血管相关细胞高表达这两种基因和蛋白(图3D、3E)。这些结果说明分离出来的血管组分血管细胞和非血管组分间充质细胞的准确性。在两种组分贴壁培养前,检测了两种组分的前脂肪细胞标志物PDGFR α 、PDGFR β 、Pref1及DPP4,以及脂肪细胞相关标志物PPAR γ 。RNA检测结果发现,非血管组分间充质细胞的前脂肪细胞标志物DPP4和脂肪细胞标志物PPAR γ 的表达均明显高于血管组分vas的表达(图3F、3G),提示间充质细胞的成脂分化能力更强。



A: Microscopic imaging after oil red O staining of adipocyte with different induction conditions; B: mRNA expression levels of mature adipocyte-related genes *PPAR γ* and *Ap2*; C: Expression levels of mature adipocyte-related proteins *PPAR γ* and *Ap2* via Western blot analysis. Data were expressed as $\bar{x} \pm s$, ⁽¹⁾ $P < 0.01$, ⁽²⁾ $P < 0.001$.

图2 小鼠皮下脂肪分离的脂肪干细胞经过不同消化时间处理后的成脂分化情况

Fig 2 Adipogenic differentiation of adipose-derived stem cells from subcutaneous fat of mice treated with different digestion times



A: Quantification of CD34+ population abundance in SVF from mice; B: Quantification of population abundance in CD31-CD45-cells; C: Schematic representation of adipose tissue composition, including mature adipocytes, mesenchymal cells and vascular cells; D: Expression levels of vascular-related proteins CD31 and SM22 in mesenchymal cells and vascular cells; E: Detection of expression levels of vascular-related protein CD31 in mesenchymal cells and vascular cells via Western blot; F: Similar expression levels of preadipocyte-related genes *PDGFR* and *Pref1* in mesenchymal cells and vascular cells; G: Differential expression of preadipocyte-related genes *DPP4* and *PPAR γ* in mesenchymal cells and vascular cells. Data were expressed as $\bar{x} \pm s$, ⁽¹⁾ $P < 0.05$, ⁽²⁾ $P < 0.01$, ⁽³⁾ $P < 0.0001$; ns: Not significant.

图3 小鼠皮下脂肪组织中血管基质成分包含的两类细胞

Fig 3 Vascular stromal component in mouse subcutaneous adipose tissue

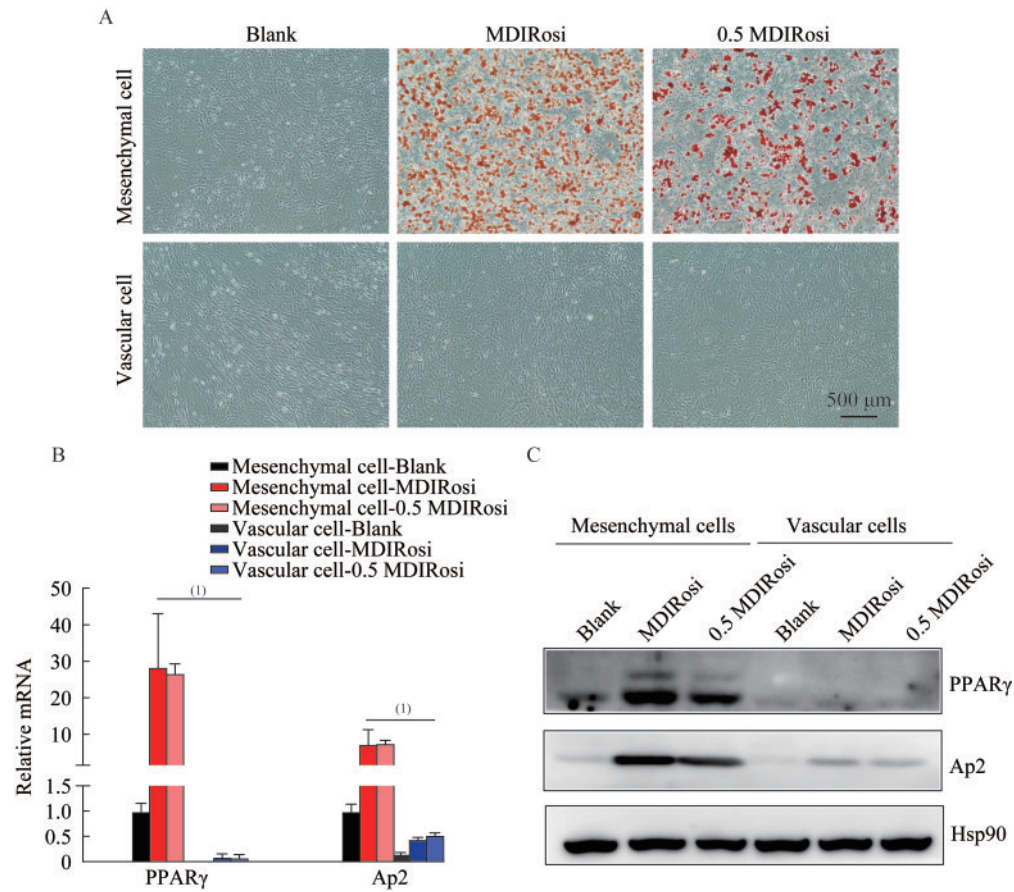
血管组分细胞的体外成脂能力较差 为了进一步明确间充质细胞和血管相关组分的体外成脂分化能力,分别对两种细胞组分进行贴壁培养后,进行MDIRosi和0.5MDIRosi成脂诱导分化实验。油红染色结果显示,非血管组分non-vas能够被MDIRosi和0.5MDIRosi诱导成脂,且其在MDIRosi诱导下的分化效率高于0.5MDIRosi诱导下的分化效率。而血管组分vas不能被MDIRosi和0.5MDIRosi诱导成脂(图4A)。对诱导成脂后的细胞进行RNA检测和蛋白表达,结果显示,非血管组分non-vas的成脂相关标志物PPAR γ 和Ap2的表达均明显高于血管组分vas,蛋白检测结果与RNA检测结果一致(图4B、4C),进一步说明消化40min后得到的间充质细胞向脂肪细胞分化的能力更强。

讨 论

本文通过比较不同消化时间得到的脂肪干细胞的细胞形态、基因表达以及成脂分化能力,发现

消化时间较短(40min)得到的脂肪干细胞成脂分化能力更强。进一步对细胞成分进行分析,发现长时间消化(60min)使血管成分也被解离成单细胞,导致脂肪干细胞的成脂分化能力下降。因此在SVF的分离消化过程中,消化40min对非血管组分non-vas的消化效率较高,而血管组分vas在此时的消化效率还不高。之后继续进行胶原酶的消化,不仅增加了混合组分中不能成脂的血管组分vas的含量,同时会对非血管组分non-vas产生过消化的效果,造成消化后的混合组份整体成脂诱导分化的效率降低。因此,在SVF的诱导分化过程中,胶原酶消化40min更为合适,这为优化SVF的培养和分化方案提供了新思路,有助于改善现有的SVF培养和分化方案。

脂肪组织不仅可以用来存储多余的能量,还是重要的内分泌器官,参与机体的代谢平衡。脂肪细胞是脂肪组织最主要的组成细胞,可以由脂肪干细胞发育分化而来。正常成年个体的脂肪细胞每年有10%的更新,用于维持脂肪细胞的正常功能^[13]。当脂肪干细胞发生功能障碍,不能发育分化为成熟



A: Microscopic images post Oil Red O staining of mesenchymal cell and vascular cell; B: Expression levels of mature adipocyte-related genes PPAR γ and Ap2; C: Expression levels of mature adipocyte-related protein PPAR γ and Ap2 via Western blot analysis. ⁽¹⁾ P<0.000 1.

图4 小鼠皮下脂肪分离的间质细胞和血管相关细胞在体外成脂分化情况

Fig 4 Adipogenic differentiation of stromal cells and vascular-related cells isolated from mouse subcutaneous adipose tissue *in vitro*

的脂肪细胞时,就会出现严重的脂营养不良^[14]。因此利用原代脂肪干细胞来研究脂肪细胞的发育分化功能比细胞系更符合人体的生理病理情况。原代脂肪干细胞的分化效率达到90%以上是重要的基础工作。有研究通过流式分选CD34+Sca1+的细胞,从而使脂肪干细胞的成脂分化能力增强^[15]。这种方法耗时耗力、操作步骤多,不便于大规模使用和推广。而本研究发现通过优化消化时间,可以使脂肪干细胞的成脂分化能力控制在90%以上,从而保证实验的可重复性。

脂肪组织含有脂肪细胞和结缔组织。结缔组织中含有丰富的细胞和血管,被称为SVF^[16]。SVF中包括脂肪干细胞,它们是产生成熟脂肪细胞的细胞类型之一,同时还有免疫细胞和血管,从而保证整个组织的稳态。经过贴壁培养后的SVF去除了不能贴壁的免疫细胞,主要包括脂肪干细胞和一部分血管相关成分。早期研究发现血管周围存在

PDGFR β 阳性的脂肪干细胞,可以发育分化为成熟的脂肪干细胞^[17]。进一步通过PDGFR β -GFP示踪小鼠发现,只有少部分PDGFR β 阳性细胞可以发育分化为成熟的脂肪细胞,并且这群细胞需要丢失PDGFR β 才能向成熟的脂肪细胞分化^[11]。这些结果提示血管周围存在的一群干细胞具有最原始的干性,正常情况下是不能向成熟的脂肪细胞分化的,并且还具有抑制脂肪细胞分化的功能。本研究也发现当用胶原酶消化时间过长时,血管相关细胞更多,就会抑制SVF的成脂分化能力。采用较短的消化时间可以获得更多的前脂肪细胞,则更容易向成熟的脂肪细胞分化。

脂肪干细胞本身就是一种多样的细胞群体,长期以来该领域的一个挑战是解决脂肪干细胞内的细胞层次结构。脂肪干细胞中的一部分必须处于脂肪生成的起始阶段,是“真正”的脂肪干细胞,而其他脂肪干细胞则可能已经在向成熟脂肪细胞的

方向发展。2018年,scRNA-seq首次用于解析小鼠脂肪基质血管组分的多样性,随即又进行了多次其他脂肪组织的scRNA-seq分析^[8,18-19]。总体而言,脂肪干细胞的scRNA-seq研究确定了3个细胞亚群,并支持一个沿脂肪生成轨迹对这些群体进行排序的分层关系。考虑每个脂肪干细胞亚群的报告的分子和功能特性后提出了一个共识命名:干细胞、前脂肪细胞和脂肪生成调节细胞。在多篇单细胞数据中,脂肪干细胞不仅表达与干细胞相关的蛋白,如Ly6a、Dpp4、Cd55和Wnt信号通路抑制剂Sfrp4,而且在体外高度增殖。从功能角度来看,脂肪干细胞具有成脂、成骨、成软骨多向分化潜能^[8]。而前脂肪细胞的特征是表达Icam1和Aoc3,也是胶原蛋白和细胞外基质重塑因子,其中几个涉及脂肪生成相关功能的因子(如Pparg、Fabp4、Lpl、Plin2、Cd36)显著上调^[19]。与脂肪干细胞相比,前脂肪细胞的增殖较低,但表现出较高的脂肪生成能力,说明此群是属于向脂肪更靠近的前体细胞。本研究发现消化40 min分离得到的脂肪干细胞拥有最佳成脂分化能力,而且高表达DPP4,因此认为该群细胞中包含脂肪干细胞和前脂肪细胞。

随着精准医疗的发展,针对脂肪相关的代谢性疾病的研究更趋向个性化方向。从细胞类型复杂的脂肪组织中分离得到相对一致的脂肪干细胞对功能研究至关重要。本研究所建立的方法能够利用简单操作得到相对一致的脂肪干细胞,不仅具有成脂分化潜能上的一致性,在后期脂肪干细胞作为一种多潜能干细胞治疗疾病时,也可以作为有力支持。

作者贡献声明 汤秋凯 研究实施,文献调研和整理,数据采集。宋赛赛 数据采集。汤妍 研究构思和设计,论文撰写和修订。

利益冲突声明 所有作者均声明不存在利益冲突。

参 考 文 献

- [1] CHEN K, SHEN Z, GU W, *et al.* Prevalence of obesity and associated complications in China: a cross-sectional, real-world study in 15.8 million adults[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2023, 25(11): 3390-3399.
- [2] SAKERS A, DE SIQUEIRA MK, SEALE P, *et al.* Adipose-tissue plasticity in health and disease [J]. *Cell*, 2022, 185(3): 419-446.
- [3] VISHVANATH L, GUPTA RK. Contribution of adipogenesis to healthy adipose tissue expansion in obesity [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(10): 4022-4031.
- [4] GUO L, LI X, TANG QQ. Transcriptional regulation of adipocyte differentiation: a central role for CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) beta [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(2): 755-761.
- [5] ZUK PA, ZHU M, MIZUNO H, *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies [J]. *Tissue Eng*, 2001, 7(2): 211-228.
- [6] NAHMGONG H, JEON YG, PARK ES, *et al.* Distinct properties of adipose stem cell subpopulations determine fat depot-specific characteristics [J]. *Cell Metab*, 2022, 34(3): 458-472.
- [7] WANG QA, TAO C, GUPTA RK, *et al.* Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration [J]. *Nat Med*, 2013, 19(10): 1338-1344.
- [8] MERRICK D, SAKERS A, IRGEBAY Z, *et al.* Identification of a mesenchymal progenitor cell hierarchy in adipose tissue [J]. *Science*, 2019, 364(6438): eaav2501.
- [9] ZWICK RK, GUERRERO-JUAREZ CF, HORSLEY V, *et al.* Anatomical, physiological, and functional diversity of adipose tissue [J]. *Cell Metab*, 2018, 27(1): 68-83.
- [10] TRAN KV, GEALEKMAN O, FRONTINI A, *et al.* The vascular endothelium of the adipose tissue gives rise to both white and brown fat cells [J]. *Cell Metab*, 2012, 15(2): 222-229.
- [11] SUN C, SAKASHITA H, KIM J, *et al.* Mosaic mutant analysis identifies PDGFRalpha/PDGFRbeta as negative regulators of adipogenesis [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 26(5): 707-721.
- [12] TANG Y, QIAN S, WU M, *et al.* BMP4 mediates the interplay between adipogenesis and angiogenesis during expansion of subcutaneous white adipose tissue [J]. *J Mol Cell Biol*, 2016, 8(4): 302-312.
- [13] CHAU YY, BANDIERA R, SERRELS A, *et al.* Visceral and subcutaneous fat have different origins and evidence supports a mesothelial source [J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(4): 367-375.
- [14] RODEHEFFER MS, BIRSOY K, FRIEDMAN JM. Identification of white adipocyte progenitor cells *in vivo* [J]. *Cell*, 2008, 135(2): 240-249.
- [15] BERRY R, RODEHEFFER M S. Characterization of the adipocyte cellular lineage *in vivo* [J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 15(3): 302-308.