

# 成人腹部来源脂肪干细胞生物学特性研究

杨飞 谢卫国



作者简介:杨飞,男,医学硕士,毕业于武汉大学临床医学专业,现为武汉大学同仁医院暨武汉市第三医院烧伤科住院医师。主要临床工作:小儿烧伤及瘢痕整形的治疗;目前研究方向:干细胞治疗在创面修复及抗瘢痕领域的应用。

**【摘要】 目的** 体外分离、培养成人腹部来源脂肪干细胞(ASC),观察和分析其形态学特征、细胞表面标志物及细胞因子分泌情况。**方法** 应用胶原酶消化法从接受整形植皮手术的成人患者腹部脂肪组织中分离获取ASC,进行原代及传代培养,观察细胞形态,绘制生长曲线,评估细胞增殖能力。扫描电子显微镜观察ASC超微结构形态。流式细胞仪检测第4代ASC表面标志物CD29、CD34、CD49d、CD105、CD106表达情况。酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测培养1、3、6、24、72 h ASC培养上清液中转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$ )、血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、肝细胞生长因子(HGF)、基质细胞衍生因子1(SDF1)、白细胞介素8(IL-8)浓度。数据行单因素方差分析检验。**结果** 成功体外分离、培养ASC,呈扁平的梭形或纤维样细胞生长,且细胞形态均一,生长曲线呈S型,传代稳定。扫描电子显微镜下可见ASC呈长梭型,细胞表面可见丰富微绒毛。ASC表面CD29、CD49d、CD105呈阳性表达,表达率分别为99.6%、44.5%和99.5%,CD34和CD106呈阴性表达,表达率分别为0.6%和0.7%。ASC可分泌TGF- $\beta 1$ 、VEGF、bFGF、HGF、SDF1、IL-8,传代培养1 h上清液中对应的细胞因子浓度分别为 $(56.51 \pm 3.61)$ 、 $(129.54 \pm 4.08)$ 、 $(39.02 \pm 2.64)$ 、 $(73.46 \pm 11.75)$ 、 $(396.03 \pm 21.31)$ 、 $(149.37 \pm 5.48)$  pg/mL;且对应细胞因子浓度均随培养时间延长逐渐增多,差异均有统计学意义( $F = 47.32, 805.55, 254.89, 69.84, 197.73, 347.52$ ,  $P$ 值均小于0.05)。**结论** ASC取材方便,培养相对容易,增殖迅速,生长稳定,表达干细胞表面标志物,具有一定的旁分泌功能。

**【关键词】** 干细胞; 腹部; 细胞,培养的; 细胞结构; 生物学标记; 细胞因子类

**Study on the biological characteristics of adipose derived stem cell of adult abdomen** Yang Fei, Xie Weiguo. Department of Burns, Tongren Hospital of Wuhan University, Wuhan Third Hospital, Wuhan 430060, China

Corresponding author: Xie Weiguo, Email: wxie@hotmail.com

**【Abstract】 Objective** To isolate and cultivate human adipose derived stem cell (ASC) from adult abdomen *in vitro*. To observe and analyse the morphological features of ASC and to test cell surface markers and secretion of cytokines. **Methods** ASC was isolated from adult abdomen by collagenase digestion method, after that primary culture and subculture were performed. Cell morphology was observed, growth curve was drawn and cell proliferation was evaluated. Ultrastructural morphology of ASC was observed by scanning electron microscopy. Flow cytometry was used to detect the expressions of CD29, CD34, D49d, CD105 and CD106 on the fourth passage of ASC culture. After 1, 3, 6, 24, 72 h of culture, enzyme linked

DOI:10.3877/cma.j.issn.1673-9450.2017.06.005

基金项目:国家外专局国际科研项目(20104201018);武汉市卫生局临床医学科研项目(WX11A04);武汉市科技局重点攻关项目(20056007071)

作者单位:430060 武汉大学同仁医院暨武汉市第三医院烧伤科

通信作者:谢卫国, Email: wxie@hotmail.com

immunosorbant assay (ELISA) method was used to detect contents of transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), hepatocyte growth factor (HGF), stromal cell-derived factor 1 (SDF1) and interleukin-8 (IL-8) from supernatant of ASC culture. Data were processed with one-way analysis of variance. **Results** The culture of ASC was successfully isolated *in vitro*. ASC was stably cultured in a stable passage in vitro, in flat fusiform, fibroblast-like cells shape. ASC morphology was uniform and the growth curve was S-type. Under the scanning electron microscope, spindle shaped cells and rich microvilli on the cell surface were showed. The phenotypes of the fourth passage ASC were positive for CD29, CD49d, CD105, which the rates of expression approximated at 99.6%, 44.5% and 99.5% respectively, while negative for CD34 and CD105, which the rates of expression approximated at 0.6% and 0.7% respectively. TGF- $\beta$ 1, VEGF, bFGF, HGF, SDF1 and IL-8 were secreted, the contents of these cytokines were ( $56.51 \pm 3.61$ ), ( $129.54 \pm 4.08$ ), ( $39.02 \pm 2.64$ ), ( $73.46 \pm 11.75$ ), ( $396.03 \pm 21.31$ ), ( $149.37 \pm 5.48$ ) pg/mL at 1 h after subculture, respectively. And the cytokine contentration increased with culture time, there were significant differences among these ( $F = 47.32, 805.55, 254.89, 69.84, 197.73, 347.52$ ; with  $P$  values below 0.05).

**Conclusions** ASC is readily available, grown rapidly and stably with a stable culture and passage. ASC certainly possesses paracrine function and expresses the stem characteristic markers.

**【Key words】** Stem cells; Abdomen; Cells, cultured; Cellular structures; Biological markers; Cytokines

脂肪干细胞(adipose derived stem cell, ASC)由Zuk等<sup>[1]</sup>2001年首先报道,是从胶原酶消化脂肪组织的间质血管碎片得到的黏附性间充质细胞。ASC具有很强的自我更新能力和多向分化潜能。研究显示,ASC能够分泌诸如血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)、角质细胞生长因子(keratinocyte growth factor, KGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、转化生长因子 $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)、转化生长因子 $\beta$ 2(TGF- $\beta$ 2)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等多种生长因子,作用于自身或邻近组织细胞<sup>[2-3]</sup>。本文通过酶消化法从成人腹部皮下脂肪组织获取ASC,鉴定细胞表面标志物表达,观察形态学特性及细胞因子分泌情况,以期为ASC临床应用提供必要的理论及实验基础。现将结果报道如下。

## 材料与方法

### 一、标本来源

经医院伦理委员会批准,征得患者知情同意后,获取2011年12月至2012年1月武汉大学同仁医院暨武汉市第三医院烧伤科5例整形植皮手术患者腹部供皮区废弃皮下脂肪组织。其中,男2例,女3例,年龄为16~25岁,均身体健康,无慢性疾病或遗传病。

### 二、主要试剂与仪器来源

胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、DMEM培养基、0.05%胰蛋白酶-乙二胺四乙酸、I型胶原酶

均购自美国Gibco公司;0.5%噻唑蓝溶液购自北京索宝生物科技有限公司;人CD29抗体、人CD34抗体、人CD49d抗体、人CD105抗体、人CD106抗体及鼠抗人IgG1 PE抗体购自美国eBioscience公司;TGF- $\beta$ 1、VEGF、FGF2、HGF、基质细胞衍生因子1(stromal cell-derived factor 1, SDF1)、白细胞介素8(interleukin-8, IL-8)、酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司;Multiskan FC酶标仪购自美国Thermo Electron公司;FC50流式细胞仪购自美国Beckman Coulter公司;JSM-6510扫描电子显微镜购自日本电子株式会社;TD4-WS离心机购自湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;CK40倒置相差显微镜购自日本Olympus公司。

### 三、细胞分离培养与形态观察

经医院伦理委员会批准,征得患者知情同意后,取16~25岁整形植皮手术患者腹部供皮区废弃皮下脂肪组织15 mL,去除肉眼可见的微血管及包膜,剪成乳糜状;脂肪组织加入0.5% I型胶原酶5 mL,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)调整混悬液至25 mL,37℃水浴30~60 min,待混悬液中细小脂肪颗粒基本消失为止;50 mL FBS + 450 mL DMEM培养基配置成体积分数10% FBS-DMEM培养基,混悬液加10% FBS-DMEM培养基中止消化,经400×g离心5 min,沉淀用PBS重悬,悬液分别经100目筛网及70 μm滤膜过滤,滤液经400×g离心5 min,弃上清液,沉淀物加入体积分数10% FBS-DMEM培养基,PBS重悬后细胞悬液接种

于  $25\text{ cm}^2$  细胞培养瓶,  $37\text{ }^\circ\text{C}$  培养、过夜后换液;  $37\text{ }^\circ\text{C}$  恒温培养, 每 3 d 换液 1 次; 原代培养 2 周左右, 80% ~ 90% 细胞可融合, 经 0.05% 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸消化传代。接种 24 h 起, 每日在倒置相差显微镜下观察细胞形态, 予以记录并照相。

#### 四、绘制细胞生长曲线

细胞悬液采用等比稀释法得到  $2.00 \times 10^6$ 、 $1.00 \times 10^6$ 、 $5.00 \times 10^5$ 、 $2.50 \times 10^5$ 、 $1.25 \times 10^5$  个/mL 共 5 种浓度, 接种于 96 孔细胞培养板, 每种浓度各 5 孔, 接种后 2 h 测量每孔吸光度值, 每种浓度细胞悬液对应的吸光度值取平均值, 绘制噻唑蓝标准曲线, 显示吸光度值与细胞数量之间的关系。

取第 3 代细胞, 经 0.05% 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸消化,  $400 \times g$  离心 5 min, 获取细胞沉淀, 调整细胞浓度至  $2.00 \times 10^5$  个/mL, 以 100  $\mu\text{L}$ /孔接种于 10 个 96 孔细胞培养板, 每板接种 5 孔; 接种后每隔 24 h 取 1 个 96 孔细胞培养板, 每孔加入 20  $\mu\text{L}$  5% 噻唑蓝溶液,  $37\text{ }^\circ\text{C}$  培养 4 h, 弃孔内培养液, 加入 150  $\mu\text{L}$  二甲基亚砜, 低速振荡 10 min, 酶标仪测量波长 490 nm 处各孔的吸光度值, 计算平均值并绘制 ASC 生长曲线。

#### 五、细胞超微结构分析

消化收集  $10^7$  个第 3 代细胞, PBS 洗两遍, 以  $400 \times g$  离心 10 min, 使细胞形成致密微团, 先 4% 戊二醛固定,  $4\text{ }^\circ\text{C}$  培养、过夜, 后 1% 锇酸  $4\text{ }^\circ\text{C}$  下固定 1 h, 梯度丙酮脱水, 干燥后真空喷镀, 扫描电子显微镜下观察、拍照。

#### 六、流式细胞仪检测 ASC 表面标志物

流式细胞仪检测 ASC 表面标志物 CD29、CD34、CD49d、CD105、CD106 的表达, 检测流程相同, 区别在于添加的人表面标志物抗体不同, 故仅以 CD49d 检测为例: 取第 4 代 70% ~ 80% 融合细胞; 0.05% 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸消化收集细胞, 加入 PBS, 制成细胞悬液, 调整细胞浓度为  $10^7$  个/mL; 取 0.5 mL 细胞悬液, 用 PBS 洗涤, 以  $300 \times g$  离心 3 min, 反复 3 次, 弃上清液, 沉淀加 PBS 400  $\mu\text{L}$ , 吹打重悬; 移取 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液至 EP 管中, 向 EP 管中加入人 CD49d 抗体孵育液 0.25  $\mu\text{g}$ , 常温孵育 30 min 后用 PBS 洗涤, 以  $300 \times g$  离心 3 min, 反复 3 次, 弃上清液, 沉淀加入 PBS 100  $\mu\text{L}$ , 吹打重悬; 向 EP 管中加入鼠抗人 IgG1 PE 抗体 0.25  $\mu\text{g}$ , 于  $4\text{ }^\circ\text{C}$  避光孵育 30 min, 用 PBS 洗涤, 经  $300 \times g$  离心 3 min, 反复 2 次, 弃上清液, 加入 300  $\mu\text{L}$  PBS 重悬; 用流式细胞仪分析细胞悬液, 记录阳性细胞表达率及阳性细胞平均相对荧光强度。

#### 七、ELISA 法检测细胞因子浓度

第 4 代细胞传代接种后, 共设计 1、3、6、24、72 h 5 个时相点, 每个时相点取 3 份 ASC 上清液各 100  $\mu\text{L}$ , 分别应用 ELISA 试剂盒测定 TGF- $\beta$ 1、VEGF、bFGF、HGF、SDF1、IL-8 含量。设空白孔、标准孔、待测样品孔, 分别加 PBS、标准品及对应的 ASC 上清液各 100  $\mu\text{L}$ 。给酶标板覆膜,  $37\text{ }^\circ\text{C}$  孵育 90 min; 弃孔内液体, 每个孔中加入生物素化抗体工作液 100  $\mu\text{L}$  (来源于 ELISA 试剂盒), 酶标板加上覆膜,  $37\text{ }^\circ\text{C}$  培育 1 h; 弃孔内液体, 酶标板洗板 3 次; 每孔加酶结合物工作液 100  $\mu\text{L}$ , 加上覆膜,  $37\text{ }^\circ\text{C}$  培育 30 min; 弃孔内液体, 酶标板洗板 5 次; 每孔加四甲基联苯胺底物溶液 100  $\mu\text{L}$  (来源于 ELISA 试剂盒), 酶标板加上覆膜,  $37\text{ }^\circ\text{C}$  避光孵育 15 min; 每孔加硫酸终止液 50  $\mu\text{L}$ , 终止反应, 此时蓝色立转黄色; 立即用酶标仪在 450 nm 波长测量各孔的吸光度值。根据结果绘制标准曲线, 明确浓度与吸光度值关系, 再通过样品吸光度值计算细胞因子浓度。

#### 八、统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理, 细胞因子浓度为计量资料, 数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 不同时相点的浓度差异比较采用单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 结 果

#### 一、ASC 形态学观察

接种当天观察可见大量悬浮红细胞, 无聚集倾向, 细胞体较小、中央较透明, 呈面窝状, 未见明显贴壁细胞; 接种后 1 d 换液, 红细胞数量较前减少, 培养瓶壁上可见部分贴壁细胞, 细胞体大小与红细胞类似, 呈圆形, 细胞质均匀, 可见细胞核; 接种后 2 d 仍有少量悬浮红细胞, 瓶壁上贴壁细胞较前增多, 部分细胞体不规则, 细胞直径增大; 接种后 3 d 悬浮红细胞基本消失, 贴壁细胞直径较前增大, 细胞体逐渐伸展为多边形或三角形 (图 1A); 接种后 7 d 贴壁细胞完全伸展, 形态较前均一, 大部分呈长梭形, 少部分呈三角形或多角形; 接种后 12 d 贴壁细胞 80% 融合, 呈集落样分布, 鱼群样排列, 偶有细胞体内可见脂滴 (图 1B)。原代培养 2 周后拟传代, 此时视野中细胞分布均匀, 贴壁良好, 大部分细胞呈长梭样, 细胞核居中, 部分细胞可见核分裂像; 传代后, 大部分细胞迅速贴附培养瓶底部, 形态较均一, 异形性细胞较少, 每周传代 1 ~ 2 次, 随着代数的增加, 细胞形态逐渐均一, 培养至第 3 代时绝大部分细胞呈长梭样, 排列呈集落样、旋涡样或鱼群样 (图 2A), 细胞核位于细胞体中央, 可见分裂期细胞 (图 2B)。培养至



第15代细胞,细胞形态未见明显改变,传至第20代细胞,细胞较前有所缩小,细胞体边缘透亮度增加,传代周期延长至1~2周。

## 二、ASC 生长曲线

测量不同浓度细胞悬液吸光度值后发现浓度越高,吸光度值越大,浓度越低,吸光度值越小,确认细胞浓度与吸光度值呈线性关系,故根据测得吸光度值绘制 ASC 生长曲线,结果显示生长曲线呈 S 型,接种前 3 d 为滞留期,生长较缓慢,接种后 3 d 细胞增殖速率明显加快,进入对数生长期,接种后 8 d 细胞增殖速度降低,曲线进入平台期(图 3)。

## 三、ASC 超微结构

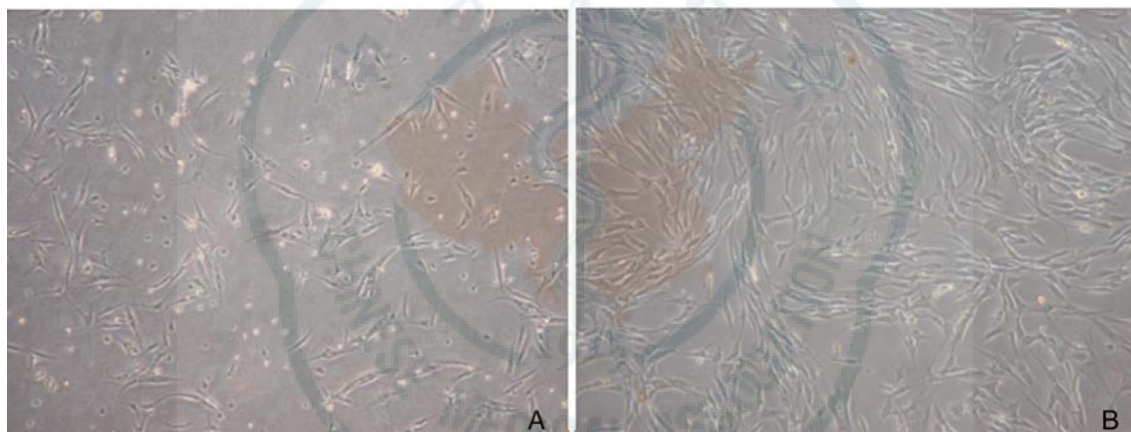
扫描电子显微镜观察可见 ASC 细胞体较大,呈长梭型,细胞表面微绒毛丰富(图 4)。

## 四、ASC 表面标志物

相对荧光强度大于  $10^0$  为阳性细胞,检测结果显示 CD29、CD49d、CD105 呈阳性表达,表达率分别为 99.6%、44.5% 和 99.5%;CD34 与 CD106 呈阴性表达,表达率分别为 0.6% 与 0.7%。ASC 表面 CD29、CD34、CD49d、CD105 和 CD106 的阳性表达细胞平均相对荧光强度分别为 13.20、1.62、1.88、10.40 和 1.48(图 5)。

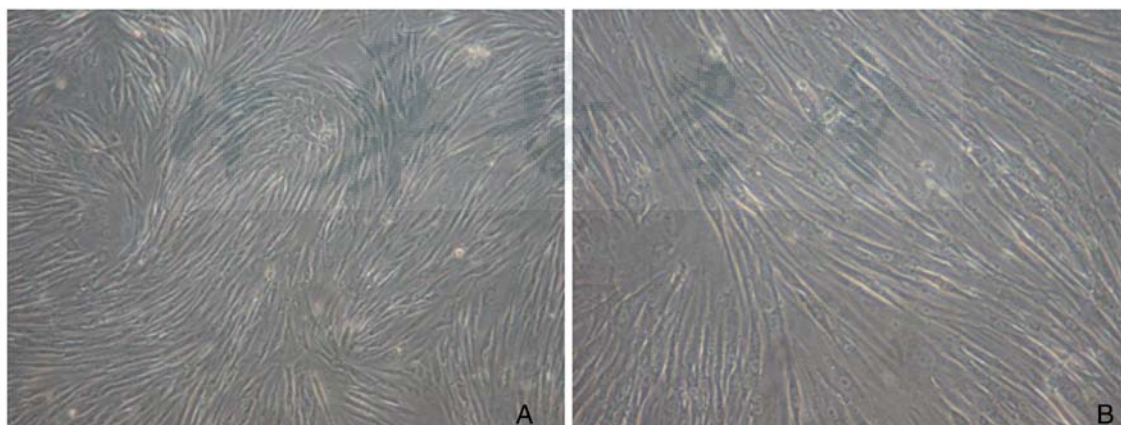
## 五、ASC 细胞因子表达情况

ELISA 法检测 ASC 培养上清液中 TGF- $\beta$ 1、VEGF、bFGF、HGF、SDF1 及 IL-8 含量。ASC 中此 6 类细胞因子均有表达,经单因素方差分析,细胞因子浓度随培养时间延长逐渐增多,差异均有统计学意义( $P$  值均小于 0.05),见表 1。



注:A:接种后 3 d 细胞逐渐增大,细胞体逐渐伸展为多边形或三角形;B:接种后 12 d 贴壁细胞 80% 融合,鱼群样排列;ASC:脂肪干细胞

图 1 倒置相差显微镜下观察原代培养 ASC 形态( $\times 40$ )



注:A:第 3 代细胞形态均一,呈长梭样逐渐增大,细胞体伸展( $\times 40$ );B:第 3 代细胞细胞核位于中央,可见分裂期细胞( $\times 100$ );ASC:脂肪干细胞

图 2 倒置相差显微镜下观察第 3 代 ASC 形态

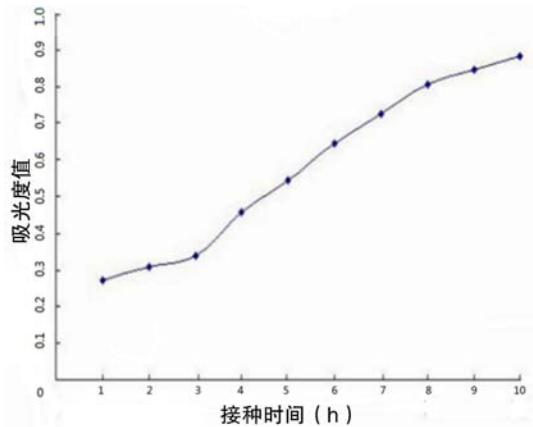


图3 ASC 生长曲线,细胞增殖曲线呈 S 型,接种后 3~8 d 增殖速度最快; ASC:脂肪干细胞

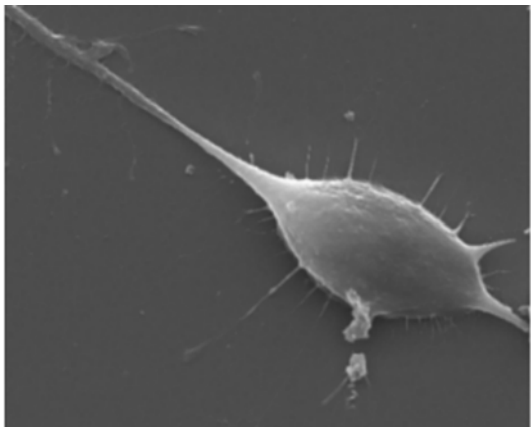
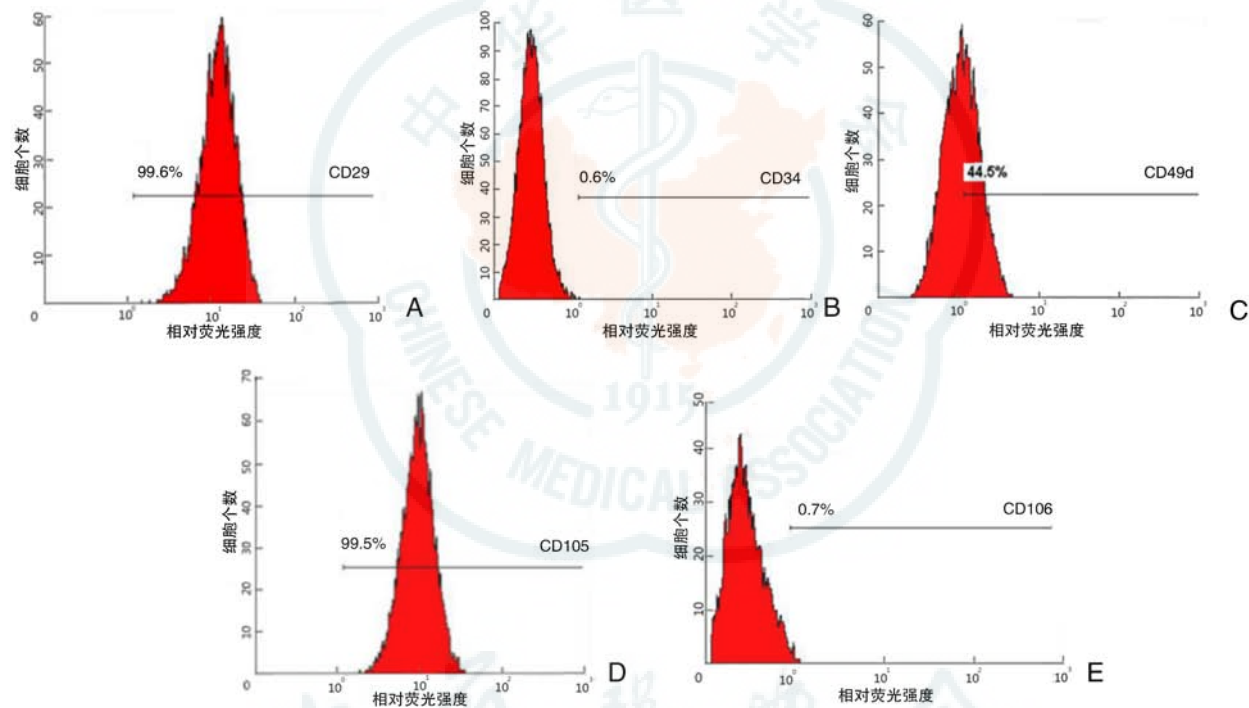


图4 ASC 扫描电子显微镜下形态,呈长梭型,表面有丰富微绒毛(×1000); ASC:脂肪干细胞



注:A:CD29;B:CD34;C:CD49d;D:CD105;E:CD106

图5 ASC 表面阳性表达细胞的相对荧光强度; ASC:脂肪干细胞

表 1 ASC 上清液中各细胞因子浓度随时间变化情况 (pg/mL,  $\bar{x} \pm s$ )

| 细胞因子           | 样本数 | 细胞因子浓度             |                    |                    |                    |                    | F 值    | P 值   |
|----------------|-----|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------|-------|
|                |     | 培养 1 h             | 培养 3 h             | 培养 6 h             | 培养 24 h            | 培养 72 h            |        |       |
| TGF- $\beta$ 1 | 3   | 56.51 $\pm$ 3.61   | 62.96 $\pm$ 6.00   | 76.36 $\pm$ 5.21   | 105.35 $\pm$ 5.33  | 119.52 $\pm$ 10.89 | 47.32  | <0.05 |
| VEGF           | 3   | 129.54 $\pm$ 4.08  | 164.43 $\pm$ 4.95  | 207.06 $\pm$ 3.37  | 293.73 $\pm$ 5.69  | 318.02 $\pm$ 6.19  | 805.55 | <0.05 |
| bFGF           | 3   | 39.02 $\pm$ 2.64   | 52.26 $\pm$ 3.01   | 71.32 $\pm$ 2.82   | 94.04 $\pm$ 3.35   | 106.71 $\pm$ 3.38  | 254.89 | <0.05 |
| HGF            | 3   | 73.46 $\pm$ 11.75  | 109.33 $\pm$ 14.93 | 134.23 $\pm$ 19.64 | 224.47 $\pm$ 19.64 | 265.65 $\pm$ 16.29 | 69.84  | <0.05 |
| SDF1           | 3   | 396.03 $\pm$ 21.31 | 460.08 $\pm$ 40.64 | 522.02 $\pm$ 19.64 | 736.04 $\pm$ 21.46 | 745.09 $\pm$ 23.48 | 197.73 | <0.05 |
| IL-8           | 3   | 149.37 $\pm$ 5.48  | 164.98 $\pm$ 4.21  | 192.59 $\pm$ 4.60  | 257.92 $\pm$ 5.85  | 286.93 $\pm$ 7.11  | 347.52 | <0.05 |

注:ASC:脂肪干细胞;TGF- $\beta$ 1:转化生长因子  $\beta$ 1;VEGF:血管内皮生长因子;bFGF:碱性成纤维细胞生长因子;HGF:肝细胞生长因子;SDF1:基质细胞衍生因子 1;IL-8:白细胞介素 8

## 讨 论

ASC 与骨髓干细胞属于间充质干细胞,均有多向分化潜能、造血支持和促进干细胞植入、免疫调控和自我复制的特点<sup>[4]</sup>。国内有研究比较兔骨髓干细胞和 ASC 时发现,ASC 有更短的倍增时间和更快的增殖速度<sup>[5]</sup>。ASC 有跨胚层分化的潜能<sup>[6]</sup>,可以在体外与支架材料构建成目标组织后,再植入体内;也可以在体内促使其构建目标组织。ASC 可以作为组织工程种子细胞,其在缺血心肌血运重建术、心血管组织再生、骨/软骨的修复、尿路重建等方面均有价值,并已在乳房再造、除皱、凹陷、畸形矫正中扮演重要角色。ASC 在烧伤领域的作用也受到人们的重视,影响组织修复过程的各种条件中,再生细胞的缺乏,再血管化困难,和促进愈合的各种因子分泌的相对不足占有重要的地位。ASC 研究是细胞生物学和医学研究中逐渐兴起的课题之一,全面、系统地了解 ASC 的生物学特性,是其临床应用的先决条件。

不同部位的脂肪细胞在脂肪小叶的构造、血管神经的分布、血流速度、酶及受体的活性等诸多方面存在差异,其 ASC 的含量,获取难易程度也不尽相同。有研究表明,不同部位来源 ASC 细胞表面标志物表达及分化潜能尚有差异<sup>[7-8]</sup>。由于临床获取方便,对人体损伤相对较小,局部脂肪含量巨大,且能兼顾美观,使得腹部来源 ASC 有着不可替代的优势。本实验选取了 5 例 16~25 岁整形植皮手术患者腹部供皮区皮下脂肪组织,明确该特定来源 ASC 的生物学特性,以期腹部来源 ASC 的临床应用提供有价值的参考。

ASC 表型一般认为与骨髓干细胞表型相似,表达间充质干细胞特异性表面标志物,如 CD9、CD10、CD13、CD29、CD44、CD49d、CD54、CD55、CD71、CD90、CD91、CD105、CD146,而不表达 CD45、人类白细胞抗原-DR 等免疫原性细胞的表面标志物及 CD14、CD34、CD38、CD117 等造血细胞的分化抗原<sup>[9-10]</sup>。Pachón-PeñaP 等<sup>[11]</sup>研究认为,ASC 低表达 CD29 及 CD106。也有报道称 CD13、CD16、CD29、CD44、CD63、CD73、CD90 等表面标志物随着 ASC 的传代,表达显著上升<sup>[12]</sup>。本实验中阳性表面标志物选取了 CD29、CD49d 及 CD105,阴性指标选取了 CD34 与 CD106,流式细胞仪检测结果与文献描述基本相符<sup>[9-11]</sup>,但 CD49d 阳性率仅有 44.5%,具体原因尚需进一步探究。

ASC 可作为种子细胞应用于组织工程皮肤,也有关于直接或间接地参与组织修复的报道,其在伤口愈合、骨骼重建、肝脏再生、心脏修复、神经再生等

领域的应用也均已有了相关研究<sup>[13]</sup>。Kuo 等<sup>[14]</sup>在糖尿病大鼠背侧皮肤缺损边缘注射 ASC 后,其愈合时间较对照组显著缩短,炎症反应明显减少,EGF、VEGF 水平升高。Kim 等<sup>[15]</sup>报道,通过于 ASC 条件培养基(ASC 培养 72 h 后的无血清培养基)中培养成纤维细胞,认为 ASC 能分泌因子,可以上调成纤维细胞 I 型、II 型胶原、纤维结合蛋白的表达,还下调基质金属蛋白酶-1,甚至刺激成纤维细胞向创面迁移。有学者认为,ASC 外基质可以通过减少炎症反应,诱导血管生成和促进成纤维细胞、角质细胞生长来促进慢性伤口的愈合<sup>[16]</sup>。已有报道称 ASC 条件培养基可能通过影响角质细胞活性促进骨膜穿孔的修复<sup>[17]</sup>,而在烧伤领域中,研究表明 ASC 移植可以促进酸烧伤创面的愈合<sup>[18]</sup>。现在推测 ASC 的分泌功能可能有促血管化、造血支持、抗凋亡、趋化、免疫调节等多种作用,本实验选取各种作用中具有代表性的细胞因子,明确 ASC 分泌情况,以期在后续研究中探寻其生物学功能及作用机制。

目前看来,从脂肪组织中提取样品分离 ASC 是一种切实可行的方案。因其来源广泛、获取容易、细胞充足、具有横向分化能力、能稳定进行基因表达等特点,在组织工程、干细胞移植和基因治疗中展现了巨大的潜力,本实验将为今后 ASC 进一步的临床应用研究提供必要的理论及实验基础。

## 参 考 文 献

- 1 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.
- 2 Kim S, Piao J, Son Y, et al. Substance P enhances proliferation and paracrine potential of adipose-derived stem cells in vitro [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 485(1): 131-137.
- 3 Moon KM, Park YH, Lee JS, et al. The effect of secretory factors of adipose-derived stem cells on human keratinocytes [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(1): 1239-1257.
- 4 段红杰, 柴家科. 间充质干细胞在创面愈合中的作用 [J/CD]. *中华损伤与修复杂志(电子版)*, 2012, 7(6): 658-661.
- 5 王之发, 翁雁鸣, 刘彦普, 等. 兔骨髓干细胞和脂肪干细胞增殖和分化能力的比较 [J]. *现代生物医学进展*, 2013, 13(11): 2026-2030.
- 6 Debnath T, Ghosh S, Potlapuvu US, et al. Proliferation and differentiation potential of human adipose-derived stem cells grown on chitosan hydrogel [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0120803.
- 7 Ong WK, Tan CS, Chan KL, et al. Identification of specific cell-surface markers of adipose-derived stem cells from subcutaneous and visceral fat depots [J]. *Stem Cell Reports*, 2014, 2(2): 171-179.
- 8 Nagata H, Ii M, Kohbayashi E, et al. Cardiac Adipose-Derived Stem Cells Exhibit High Differentiation Potential to Cardiovascular Cells in C57BL/6 Mice [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2016, 5(2):



- 141-151.
- 9 Wankhade UD, Shen M, Kolhe R, et al. Advances in Adipose-Derived Stem Cells Isolation, Characterization, and Application in Regenerative Tissue Engineering[J]. Stem Cells Int, 2016, 2016; 3206807.
- 10 Dizaji Asl K, Shafaei H, Soleimani Rad J, et al. Comparison of Characteristics of Human Amniotic Membrane and Human Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells[J]. World J Plast Surg, 2017, 6(1): 33-39.
- 11 Pachón-Peña G, Serena C, Ejarque M, et al. Obesity Determines the Immunophenotypic Profile and Functional Characteristics of Human Mesenchymal Stem Cells From Adipose Tissue[J]. Stem Cells Transl Med, 2016, 5(4): 464-475.
- 12 Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers[J]. Stem Cells, 2006, 24(2): 376-385.
- 13 Frese L, Dijkman PE, Hoerstrup SP. Adipose Tissue-Derived Stem Cells in Regenerative Medicine [J]. Transfus Med Hemotherl, 2016, 43(4): 268-274.
- 14 Kuo YR, Wang CT, Cheng JT, et al. Adipose-Derived Stem Cells Accelerate Diabetic Wound Healing Through the Induction of Autocrine and Paracrine Effects [J]. Cell Transplant, 2016, 25(1): 71-81.
- 15 Kim WS, Park BS, Sung JH, et al. Wound healing effect of adipose-derived stem cells; a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts[J]. J Dermatol Sci, 2007, 48(1): 15-24.
- 16 Hyldig K, Riis S, Pennisi CP, et al. Implications of Extracellular Matrix Production by Adipose Tissue-Derived Stem Cells for Development of Wound Healing Therapies[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(6). pii: E1167.
- 17 Ong HT, Redmond SL, Marano RJ, et al. Paracrine Activity from Adipose-Derived Stem Cells on In Vitro Wound Healing in Human Tympanic Membrane Keratinocytes[J]. Stem Cells Dev, 2017, 26(6): 405-418.
- 18 Muhammad G, Xu J, Bulte JWM, et al. Transplanted adipose-derived stem cells can be short-lived yet accelerate healing of acid-burn skin wounds; a multimodal imaging study[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 4644.
- (收稿日期:2017-10-13)  
(本文编辑:蒋妍妍)

杨飞, 谢卫国. 成人腹部来源脂肪干细胞生物学特性研究[J/CD]. 中华损伤与修复杂志(电子版), 2017, 12(6): 425-431.