

李珂雅,石桂英,高舒平,等. 小鼠、大鼠、食蟹猴与人的脂肪干细胞分离培养方法和生物学特性的比较分析[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(6): 14 - 21.

Li KY, Shi GY, Gao SP, et al. Comparative analysis of adipose-derived stem cells from commonly used laboratory animals and human [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(6): 14 - 21.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2019.06.003

# 小鼠、大鼠、食蟹猴与人的脂肪干细胞分离培养方法和生物学特性的比较分析

李珂雅,石桂英,高舒平,白琳\*,秦川\*

(中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室,国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室,北京 100021)

**【摘要】** 目的 比较分析实验动物脂肪间充质干细胞(adipose-derived mesenchymal stem cells, ADSCs)与人脂肪间充质干细胞的分离培养方法和生物学特性的差异,为自体脂肪干细胞移植治疗人类疾病的临床前研究提供临床前的实验数据和方法。**方法** 将临床患者、食蟹猴、C57小鼠和SD大鼠的皮下脂肪组织进行分离培养后得到人脂肪间充质干细胞(hADSCs)、食蟹猴脂肪间充质干细胞(cynomolgus monkey adipose-derived mesenchymal stem cells, cADSCs)、小鼠脂肪间充质干细胞(mouse adipose-derived mesenchymal stem cells, mADSCs)和大鼠脂肪间充质干细胞(rat adipose-derived mesenchymal stem cells, rADSCs);采用流式细胞术鉴定ADSCs表面标记物;细胞成脂、成骨诱导分化,于诱导后21 d和28 d固定染色,鉴定ADSCs的成脂成骨分化能力。**结果** hADSCs、cADSCs、mADSCs和rADSCs的分离培养方法类似,贴壁培养后均呈成纤维细胞样生长;流式检测显示,不同物种ADSCs间充质干细胞表面标记物CD90、CD29为阳性,少量表达造血干细胞标记物CD34,血管内皮细胞标记物CD31为阴性。成脂和成骨分化能力检测显示,hADSCs、cADSCs、mADSCs和rADSCs均具有成脂成骨分化能力,但其成脂成骨分化的时间略有差异。**结论** 实验动物ADSCs与hADSCs采用相同的分离培养方法,有类似的表面标记物表达及成脂成骨分化潜能,生物学特性具有一致性,是自体脂肪干细胞移植临床前研究的良好模型。

**【关键词】** 脂肪干细胞;人;食蟹猴;C57小鼠;SD大鼠

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019)06-0014-08

## Comparative analysis of adipose-derived stem cells from commonly used laboratory animals and human

LI Keya, SHI Guiying, GAO Shuping, BAI Lin\*, QIN Chuan\*

(Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS); Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC); Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, National Health Commission of the People's Republic of China; Key Laboratory of Human Disease Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China)

**【基金项目】**国家重点研发计划(2017YFA0105202);北京市自然科学基金重点项目(5171001)。

**【作者简介】**李珂雅(1993—),女,硕士研究生,专业:病理学与病理生理学。E-mail: li-keya@hotmail.com

**【通信作者】**白琳(1984—),女,硕士生导师,研究方向:干细胞临床转化。E-mail: bailin49@163.com。

秦川(1959—),女,博士生导师,E-mail: qinchuan@cnilas.org。\*共同通信作者

**【Abstract】 Objective** To provide experimental data for preclinical studies on the treatment of human diseases by autologous fat stem cell transplantation, including isolation and culture methods and the biological characteristics of laboratory animals including C57 mice, SD rats, and cynomolgus monkey adipose-derived stem cells (ADSCs), which were compared with those of humans. **Methods** hADSCs, mouse adipose derived mesenchymal stem cells (mADSCs), rat adipose derived mesenchymal stem cells (rADSCs) and cynomolgus monkey adipose derived mesenchymal stem cells (cADSCs) were identified via surface markers using flow cytometry, and adipogenic and osteogenic differentiation was induced. **Results** All the hADSCs, mADSCs, rADSCs and cADSCs showed fibroblast-like morphology. Flow cytometry showed that mesenchymal stem cell surface markers CD90 and CD29 in ADSCs of each species were positive, while the vascular endothelial cell marker CD31 was negative. Oil red O and alizarin red staining showed that hADSCs, mADSCs, rADSCs and cADSCs differentiated into fat cells and bone cells. **Conclusions** Laboratory animal ADSCs and hADSCs can be cultured using the same method and they all had similar surface marker expression, as well as adipogenic and osteogenic differentiation potential, indicating their usefulness for the pre-clinical study of autologous ADSC transplantation.

**【Keywords】** adipose-derived mesenchymal stem cells; human; cynomolgus monkey; C57 mouse; SD rat

干细胞治疗为核心的再生医学,在神经、血液、心血管、生殖等系统和肝、肾、胰等器官的重大疾病治疗方面发挥作用<sup>[1]</sup>。ADSCs 具有来源充足、分离方法简单、体外扩增能力强、能跨胚层分化等特性,可以通过抽脂术从皮下脂肪组织的血管周围区域大量分离出来<sup>[2-5]</sup>,ADSCs 相关的干细胞治疗在过去的 10 年有了飞速的发展<sup>[1]</sup>。ADSCs 表达包括 CD10、CD13、CD29、CD44、CD71、CD73、CD90、CD105、CD166 和 CD271 在内的间充质干细胞的表面标记物,而造血干细胞特异性标记物 CD34、血管内皮细胞标记物 CD31 和成熟白细胞标记物 CD45 为阴性<sup>[6]</sup>。ADSCs 是处于不同成熟和分化阶段的异质性细胞群,具有广泛的可塑性和多向分化潜能<sup>[7-10]</sup>,在特定诱导培养条件下,ADSCs 能分化为肌上皮细胞<sup>[11]</sup>、心肌细胞<sup>[12]</sup>、成骨细胞<sup>[13]</sup>、软骨细胞<sup>[14]</sup>、多巴胺能神经元和乙酰胆碱能神经元<sup>[6]</sup>等。此外,ADSCs 具有免疫调节作用,能够分泌多种细胞因子以及抗凋亡、抗氧化、抗炎症能力。

ADSCs 在细胞替代治疗中,有其独特优势,它不引起伦理道德问题也不存在免疫排斥反应及致瘤性,可用于自体治疗<sup>[1]</sup>。目前,自体脂肪干细胞移植已经用于多种疾病的治疗以及改善预后,包括肌肉系统疾病<sup>[15]</sup>、肝切除术后的肝脏再生<sup>[16]</sup>、改善急性心梗的心肌灌注<sup>[17]</sup>,而这些疾病的治疗目前仍处于临床前实验阶段。本实验通过从食蟹猴、C57 小鼠及 SD 大鼠的皮下取得脂肪组织,进行分离培养鉴定,比较实验动物的 ADSCs 与 hADSCs 在分离培养方法和生物学特性之间的差异,为自体脂肪干细胞移植的临床前应用提供实验数据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验对象

人脂肪组织取自例女性临床吸脂患者,平均年龄 35 岁,均于术前签署知情同意书。小鼠脂肪组织来源于雌雄各半的 6 只 SPF 级 6 周龄 C57 小鼠,大鼠脂肪组织来源于雌雄各半的 6 只 SPF 级 6~8 周龄 SD 大鼠,食蟹猴脂肪组织来源于 3 只 3~5 周岁的雄性食蟹猴。本实验用 C57 小鼠和 SD 大鼠从北京华卓康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2014-0009]购得。饲养于中国医学科学院医学实验动物研究所屏障环境动物房[SYXK(京)2015-0035]。食蟹猴从北京协尔鑫生物资源研究所有限责任公司[SCXK(京)2015-0011]购得。饲养于中国医学科学院医学实验动物研究所北方资源中心普通环境[SYXK(京)2014-0036]。实验方案通过中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物管理和使用委员会(IACUC)审批,IACUC 号为:BL18004、BL17001、BL17002。实验动物饲养繁育和实验过程中,在不影响实验要求和实验结果的基础上,严格按实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。

### 1.2 主要试剂和仪器

DMEM 完全培养基(Gibco, 美国);C57 小鼠、SD 大鼠、人、食蟹猴脂肪干细胞成骨、成脂诱导分化培养基(Cyagen, 美国);青/链霉素混合液(Gibco, 美国);胎牛血清(Gibco, 美国);b-FGF(Novus, 美国);倒置相差显微镜(Nikon, 日本);活细胞工作站(Leica, 德国);直热式 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(Thermo, 美国);25 cm<sup>2</sup> 培养瓶、75 cm<sup>2</sup> 培养瓶、6 孔板、一次性移液管(Costar, 美国);生物安全柜(上海力康);低速离心机(安徽中科中佳);全自动细胞计数仪及配套细胞计数板(Invitrogen, 美国);流式细胞仪(BD, 美国);所用流式抗体见表 1。

表 1 流式细胞术所需抗体  
Table 1 The antibodies used in flowcytometer

序号 Numbers	抗体名 Antibodies	公司 Company	反应物种 Reaction Species
1	CD90-FITC	eBioscience, USA	人 Human
2	CD29-PerCP Cy5.5	BD Biosciences, USA	人 Human
3	CD34-APC Cy7	BioLegend, USA	人 Human
4	CD31-PE Cy7	eBioscience, USA	人 Human
5	CD90-FITC	abcam, USA	小鼠 Mouse
6	CD29-PE	eBioscience, USA	小鼠 Mouse
7	CD34-PerCP Cy5.5	eBioscience, USA	小鼠 Mouse
8	CD31-APC Cy7	eBioscience, USA	小鼠 Mouse
9	CD90-PE	BioLegend, USA	大鼠 Rat
10	CD29-PE Cy7	eBioscience, USA	大鼠 Rat
11	CD34-APC	eBioscience, USA	大鼠 Rat
12	CD31-BV421	BD Biosciences, USA	大鼠 Rat

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 人 ADSCs 体外分离培养

将人脂肪抽吸组织用无菌 PBS 冲洗 3 遍,洗去血液和麻醉药,记录剩余组织体积,以 1:2 的比例加入 0.075% 的 I 型胶原蛋白酶,放入 37℃ 恒温摇床以 80 r/min 的速度消化 30 min。加入与胶原酶等量的含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,以 1500 r/min 的速度离心 11 min,弃上清,按 1:3 的比例向细胞沉淀中加入红细胞裂解液,轻轻吹打混匀,室温孵育 5 min,加入 PBS,经过 70 μm 的细胞筛过滤至新的 50 mL 离心管,以 1500 r/min 的速度离心 5 min,弃上清,用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素链霉素的 DMEM 完全培养基重悬接种于 T-25 瓶,在培养瓶上标记细胞类型、代数、时间等,放入 37℃,5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱培养。第二天更换新鲜培养基。以后每 3 d 换液 1 次。待细胞贴壁达 80% 后,以 1:2 的比例传代,完成脂肪干细胞的纯化,取第 3 代(P3)细胞用于实验。

#### 1.3.2 小鼠、大鼠、食蟹猴 ADSCs 体外分离培养

脱颈处死小鼠或大鼠后备皮,采用高压灭菌过的器械,于腹部做十字切口,皮下游离至腹股沟,取得皮下脂肪组织 1~2 g。食蟹猴术前禁食不禁饮 12 h,皮下给予硫酸阿托品 0.1 mg/kg 用于抑制腺体分泌,15 min 后肌肉注射 7 mg/kg 的舒泰予以麻醉。进行备皮消毒铺巾后,于脐下 1 cm 处腹中线的位置开长约 2 cm 的刀口,取得皮下脂肪组织 1~2 g。放入已加入无菌 PBS 的 50 mL 离心管,转移至细胞培养间。将手术取得的脂肪在超净台中用 PBS 冲洗 2 遍,再用双抗冲洗 1 遍,剪碎后分装入 50 mL 离心管,以 1:2 的比例加入 0.075% 的 I 型胶原蛋白酶,放入 37℃ 恒温摇床

以 80 r/min 的速度消化 1 h。后续步骤与人脂肪干细胞分离相同,取 P3 细胞用于实验。

#### 1.3.3 不同物种 ADSCs 分子表型的鉴定

分别取 hADSCs、mADSCs、rADSCs、cADSCs 第 3 代的细胞,PBS 洗 2 次后培养瓶中加入 0.25% Trpsin-0.04% EDTA,37℃ 下反应 5 min,吸管反复吹打,镜下确认细胞完全漂浮和分离,加入等量的细胞培养液中和胰蛋白酶,进行计数,将 1×10<sup>6</sup> 的细胞分装于 1.5 mL 离心管,离心后弃上清。各物种染色情况如表 2;hADSCs 和 cADSCs 分别每管加入 40 μL PBS + 5 μL CD90 (FITC)、5 μL CD29 (PerCP-Cy5)、5 μL CD34 (APC-Cy7)、5 μL CD31 (PE-Cy7) 人单克隆抗体,mADSCs 每管加入 40 μL PBS + 5 μL CD90 (FITC)、5 μL CD29 (PE)、5 μL CD45 (PerCP-Cy5)、5 μL CD31 (APC-Cy7) 小鼠单克隆抗体,rADSCs 每管加入 40 μL PBS + 5 μL CD90 (PE)、CD29 (PE-Cy7)、CD34 (APC)、CD31 (BV421) 大鼠单克隆抗体,4℃ 避光孵育 30 min,PBS 洗 3 次,1500 r/min 离心 5 min,20 μL PBS 重悬,并用同型对照单克隆抗体确定背景标记后,流式细胞仪分析染色细胞,FlowJo 软件计算细胞表面抗原阳性表达率(单位用百分比表示)。

表 2 不同物种 ADSCs 流式染色情况  
Table 2 The staining results of different species' ADSCs

脂肪干细胞种类 ADSCs from different species	染色所用抗体 (对应表 1 序号) The antibody used in table1
hADSCs	1. 2. 3. 4.
cADSCs	1. 2. 3. 4.
mADSCs	5. 6. 7. 8.
rADSCs	9. 10. 11. 12.

### 1.3.4 不同物种 ADSCs 分化能力比较

#### (一) 不同物种 ADSCs 成脂分化

分别取 P3 hADSCs 和 cADSCs、mADSCs、rADSCs,以  $3 \times 10^5$  个细胞数接种于 6 孔板,置于  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\%$   $\text{CO}_2$  培养箱中培养,每 3 d 半量换液,待细胞达到 100% 或者过汇合,小心吸走完全培养基,向 6 孔板中加入 2 mL ADSCs 成脂诱导分化培养基 A 液,诱导 3 d 后,吸走 6 孔板中的 A 液,加入 2 mL ADSCs 成脂诱导分化培养基 B 液,24 h 后,吸走 B 液,换回 A 液进行诱导。

诱导 21 d,用  $1 \times \text{PBS}$  冲洗 2 次,每孔加入 2 mL 4% 多聚甲醛,固定 30 min。吸走甲醛溶液,用  $1 \times \text{PBS}$  冲洗 2 次,每孔中加入 1 mL 油红 O 染料工作液染色 30 min,吸走油红 O 染液,用  $1 \times \text{PBS}$  冲洗 3 次,于镜下观察成脂染色效果。

#### (二) 不同物种 ADSCs 成骨分化

分别取 P3 hADSCs、mADSCs、rADSCs 和 cADSCs,以  $3 \times 10^5$  个细胞数接种于提前包被 0.1%

明胶的 6 孔板中,置于  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\%$   $\text{CO}_2$  培养箱中培养,每 3 d 半量换液,当细胞汇合度达到 60%~70% 时,小心将孔内完全培养基吸走,向 6 孔板中加入 2 mL 脂肪干细胞成骨诱导分化完全培养基,每隔 3 d 换用新鲜成骨培养基。

诱导 28 d,用  $1 \times \text{PBS}$  冲洗 2 次,每孔加入 2 mL 4% 多聚甲醛,固定 30 min。吸走甲醛溶液,用  $1 \times \text{PBS}$  冲洗 2 次,每孔加入茜素红染色 5 min。吸走茜素红染液,用  $1 \times \text{PBS}$  冲洗 3 次,于显微镜下观察成骨染色效果。

## 2 结果

### 2.1 常用实验动物 ADSCs 和 hADSCs 的形态学观察比较

ADSCs 分离培养 8 h 后开始有少量细胞贴壁生长,24 h 后可见多量细胞贴壁,细胞贴壁初期,形态为小圆形,随着培养时间的增加,逐渐呈梭形。24 h 后第一次换液,以后每 3 d 换液一次,培

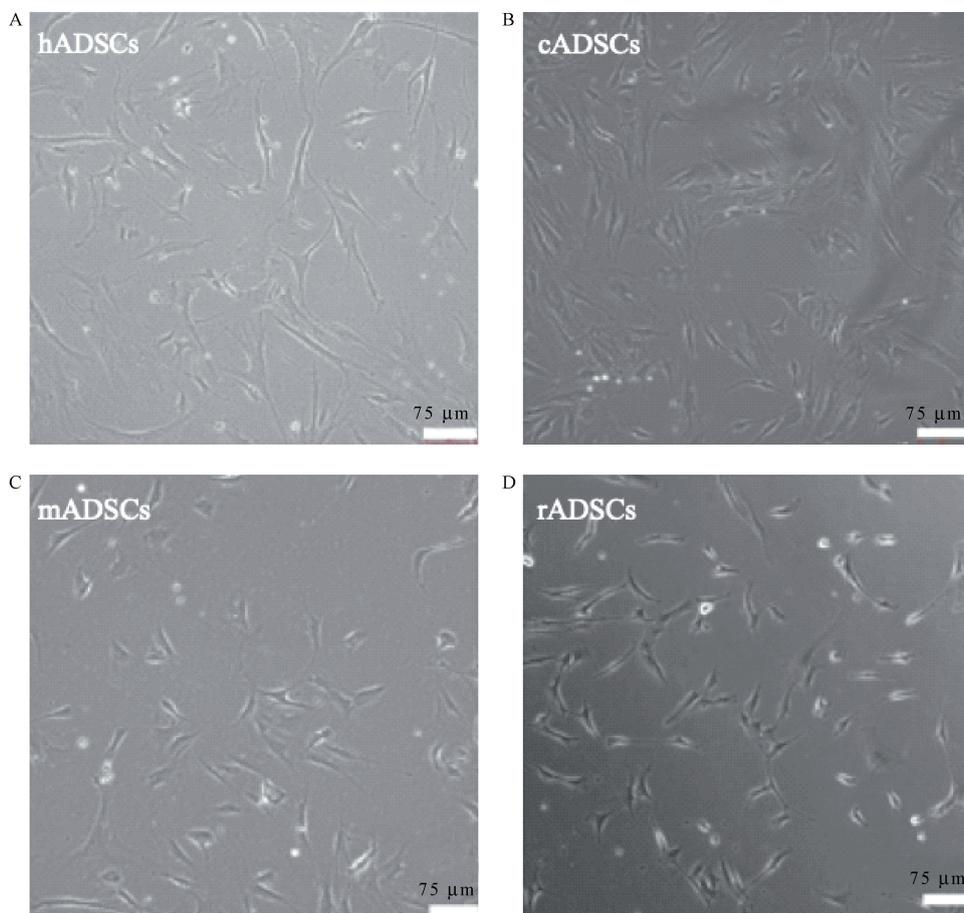


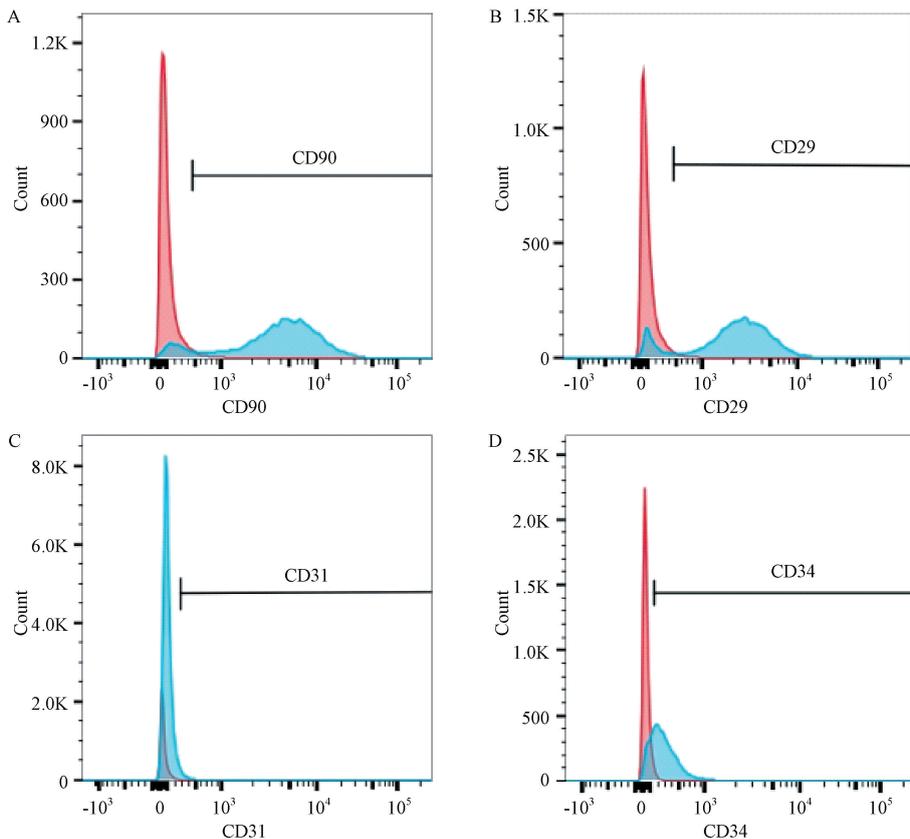
图 1 不同物种脂肪干细胞形态学( $\times 10$ )

Figure 1 Morphology of the hADSCs, cADSCs, mADSCs and rADSCs

养 3~4 d 时,细胞生长繁殖,数量增加,并可见细胞形成孤立小片(细胞岛)。7~10 d 细胞已基本铺满瓶壁形成致密单层。不同物种原代细胞起初形态不均一,有多角形、短梭形、长梭形等,经传代纯化后的 hADSCs 和 cADSCs 形态是成纤维细胞样,mADSCs 和 rADSCs 胞体较 hADSCs 更为短小,呈纺锤形(图 1)。

## 2.2 常用实验动物 ADSCs 与 hADSCs 的细胞表面标记物检测

为了进一步验证从各物种取得的脂肪组织中分离培养得到的细胞,采用流式细胞术检测 P3 细胞分子标记(图 2)。hADSCs 和常用实验动物 ADSCs 均表达间充质干细胞表面标记物 CD90、CD29,hADSCs、cADSCs 和 rADSCs 少量表达造血干细胞表面标记物 CD34,几乎不表达血管标记物 CD31,mADSCs 少量表达 CD34、CD31。各物种 ADSCs 表面分子标记物的流式检测结果见表 3。



注:A:流式细胞术检测 ADSCs 表面标记物 CD90;B:流式细胞术检测 ADSCs 表面标记物 CD29;C:流式细胞术检测 ADSCs 表面标记物 CD31;D:流式细胞术检测 ADSCs 表面标记物 CD34。

图 2 ADSCs 流式细胞术鉴定

Note. A, The flow cytometric analysis of CD90. B, The flow cytometric analysis of CD29. C, The flow cytometric analysis of CD31. D, The flow cytometric analysis of CD34.

Figure 2 Flow cytometric analysis of the hADSCs, mADSCs, rADSCs and cADSCs

表 3 不同物种 ADSCs 表面标记物表达情况

Table 3 Cell surface marker expression of the ADSCs from different species

细胞类别 ADSCs from different species	阳性表面标记物 Positive markers of ADSCs		阴性表面标记物 Negative markers of ADSCs	
	CD90(%)	CD29(%)	CD34(%)	CD31(%)
hADSCs	88.61±7.65	83.55±10.95	26.65±7.25	1.53±0.93
cADSCs	87.40±9.40	93.75±3.75	35.05±6.55	0.53±0.33
mADSCs	75.45±4.35	95.50±4.40	18.10±3.40	16.20±5.40
rADSCs	87.35±8.05	82.70±1.70	29.85±11.75	0.67±0.43

### 2.3 常用实验动物 ADSCs 与 hADSCs 成脂分化能力比较

不同物种的 ADSCs 均显示出成脂分化潜能,但在诱导时间和成脂成骨能力上存在差异。mADSCs 成脂诱导分化 7 d 后,即有大量小而圆脂滴形成,rADSCs 在成脂诱导分化 14 d 时能产生脂滴,cADSCs 在诱导分化 14 d 时有脂滴形成,但零散分布且不饱满,延长诱导分化时间至 21 d 有多量脂滴形成,hADSCs 所需诱导时间最长,21 d 产生脂滴,被油红 O 染成红色(图 3)。

### 2.4 常用实验动物 ADSCs 与 hADSCs 成骨分化能力比较

成骨诱导分化培养 21 d,各物种 ADSCs 均能明显成骨。如图 4 所示, hADSCs 有大量片状钙盐沉积,钙盐相互融合,几乎未见空隙,cADSCs、mADSCs 和 rADSCs 成骨诱导分化后产生钙盐,被茜素红着色。

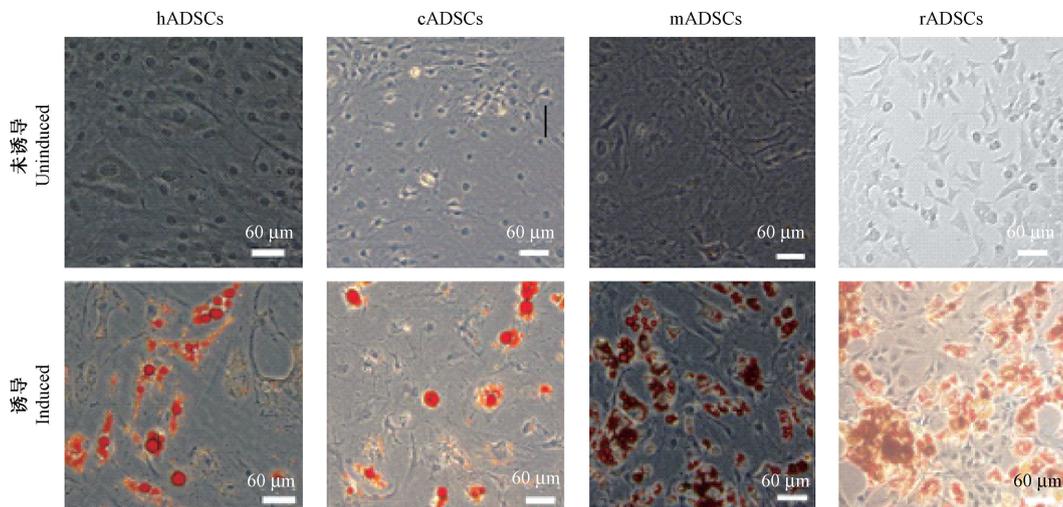
## 3 讨论

ADSCs 于 2001 年首次分离鉴定获得,经过广泛研究发现,它具有间充质干细胞特性,在再生医学方面颇具使用价值<sup>[18]</sup>。现如今,ADSCs 的应用并不局限于基础科学,它具有免疫调节作用,能分泌各种生长因子,同时具有抗凋亡和抗炎症的潜

能<sup>[1]</sup>。其储量丰富,可体外培养分化为多种细胞类型,再植入患者体内进行治疗。由于 ADSCs 具备这些特性,人们试图寻求基于 ADSCs 的有效方法用于治疗各类疾病,如糖尿病足溃疡、多发性硬化症、骨关节炎、危重肢体缺血、神经退行性疾病等。目前除少量自体脂肪干细胞治疗疾病有临床前期试验的报道,其余关于自体脂肪干细胞治疗的研究仍处于临床前阶段<sup>[19]</sup>。

ADSCs 以往的研究表明,皮下脂肪来源的 ADSCs 在增殖和分化能力方面均强于内脏脂肪来源的 ADSCs<sup>[20-22]</sup>,年轻人的 ADSCs 产量、增殖速度和分化能力均优于老年人<sup>[23]</sup>,且随着年龄的增长,ADSCs 的衰老基因表达增加,负责调节细胞周期、凋亡和分化的 miRNA 表达量和细胞维持内稳态的能力降低<sup>[24]</sup>。

本研究中,mADSCs 和 rADSC 的制备方法与 hADSCs 的制备方法相同,在相同条件下培养,具有相同的生物学特性:从年轻实验动物的皮下分离出的脂肪组织采用组织剪碎和胶原酶消化的方法,于 37℃ 条件下消化 1 h,由吸脂术获得的人脂肪组织胶原酶消化 30 min 后,用 DMEM 培养基培养 3~4 d,获得形态呈梭形的 ADSCs。镜下观察时发现 mADSCs 和 rADSCs 胞体较 hADSCs 和 cADSCs 的成纤维细胞样更为短小,呈纺锤形;流式细胞术检测



注:上行显示的是 hADSCs、cADSCs、mADSCs 和 rADSCs 未成脂诱导分化的油红 O 染色结果,下行显示的是对应物种 ADSCs 成脂分化的油红 O 染色结果。

图 3 不同物种脂肪干细胞成脂分化(油红 O 染色,×10)

Note. The upper line shows the results of the oil red O staining of hADSCs, cADSCs, mADSCs and rADSCs which are uninduced adipogenic differentiation. The next line shows the results of the oil red O staining of hADSCs, cADSCs, mADSCs and rADSCs after adipogenic differentiation.

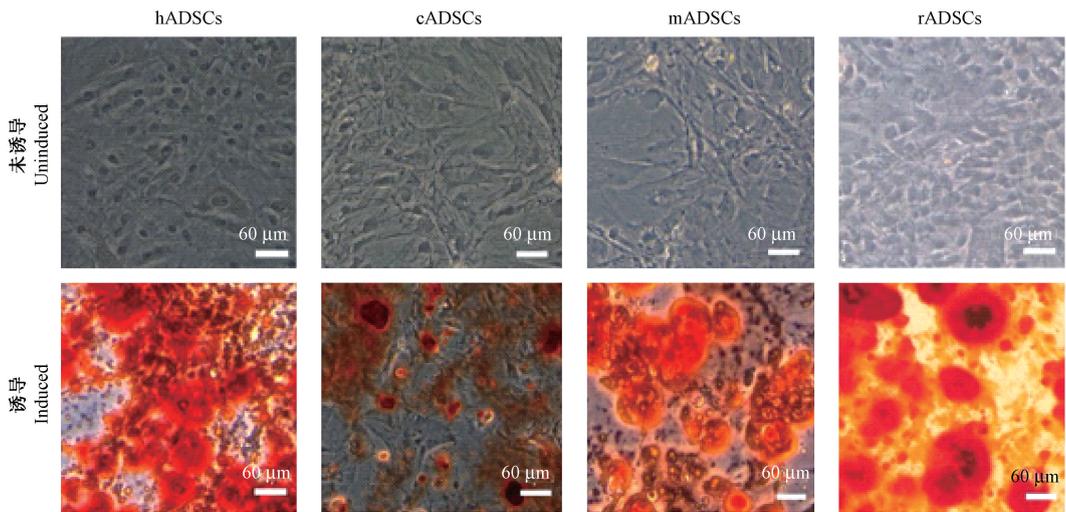
Figure 3 Adipogenic differentiation of the hADSCs, cADSCs, mADSCs and rADSCs (Oil red O staining)

结果显示各物种 ADSCs 表面标记物比例基本一致,其中 rADSCs 的表面标记物比例与 hADSCs 最为相似;各物种的 ADSCs 均具有成脂成骨分化潜能。在成脂诱导过程中,mADSCs 成脂时间最短,7 d 即能产生脂滴,而 hADSCs 成脂时间相对较长。结果归纳如表 4。

但各物种 ADSCs 在表型和功能上仍存在一些差异,可能与其表达的蛋白有关。Nahar<sup>[25]</sup>采用液质联用的方法检测 mADSCs 和 hADSCs 蛋白表达并进行 GO (Gene Ontology) 分析,92% 的蛋白类型一致,另 8% 的蛋白差异存在于细胞粘附

相关表面蛋白上。故本实验中 hADSCs、mADSCs 表现不同可能与细胞粘附相关蛋白表达差异有关。

利用包括小鼠、大鼠、食蟹猴在内的实验动物进行基础研究详细阐明 ADSCs 的特性和功能对确认 ADSCs 治疗人类疾病的安全性和有效性具有极其重要的研究意义。因此,本实验将实验动物 ADSCs 与 hADSCs 进行比较分析,结果表明,实验动物来源的 ADSCs 与 hADSCs 特性基本一致,可以很好得替代 hADSCs 进行自体脂肪干细胞移植的临床前有效性和安全性评价。



注:上行显示的是 hADSCs、cADSCs、mADSCs 和 rADSCs 未成骨诱导分化的茜素红染色结果,下行显示的是对应物种 ADSCs 成骨分化的茜素红染色结果。

图 4 不同物种脂肪干细胞成骨分化(茜素红染色,×10)

Note. The upper line shows the results of the alizarin red S staining of the hADSCs, cADSCs, mADSCs and rADSCs which are uninduced osteogenic differentiation. The next line shows the results of alizarin red S staining of hADSCs, cADSCs, mADSCs and rADSCs after osteogenic differentiation.

Figure 4 The osteogenic differentiation of the hADSCs, cADSCs, mADSCs and rADSCs. (Alizarin Red S staining)

表 4 本实验结果归纳

Table 4 Summary of the results of this research

细胞类别 Cell type	形态学 Morphology	细胞表面标记 Markers of ADSCs	成脂时间 Time of adipogenic differentiation	成骨时间 Time of osteogenic differentiation
hADSCs	长,梭形 Long spindle	CD29+/CD90+/CD31-	21 d	21 d
cADSCs	长,梭形 Long spindle	CD29+/CD90+/CD31-	14 d(少量) A little in 14 d	21 d
mADSCs	短,纺锤形 Short spindle	CD29+/CD90+/CD31-	7 d	21 d
rADSCs	短,纺锤形 Short spindle	CD29+/CD90+/CD31-	14 d(多量) A large number of lipid drops in 14 d	21 d

## 参考文献:

- [ 1 ] Tabatabaei Qomi R, Sheykhhasan M. Adipose-derived stromal cell in regenerative medicine: A review [ J ]. World J Stem Cells, 2017,9(8): 107-117.
- [ 2 ] 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):211-28.
- [ 3 ] El Atat O, Antonios D, Hilal G, et al. An evaluation of the stemness, paracrine, and tumorigenic characteristics of highly expanded, minimally passaged adipose-derived stem cells [ J ]. PLoS One, 2016,11(9): e0162332.
- [ 4 ] Tang W, Zeve D, Suh JM, et al. White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature [ J ]. Science, 2008, 322(5901):583-586.
- [ 5 ] Housman TS, Lawrence N, Mellen BG, et al. The safety of liposuction; results of a national survey [ J ]. Dermatol Surg, 2002,28(11):971-978.
- [ 6 ] Marei HES, EL-Gamal A, Althani A, et al. Cholinergic and dopaminergic neuronal differentiation of human adipose tissue derived mesenchymal stem cells [ J ]. J Cell Physiol, 2018, 233(2):936-945.
- [ 7 ] Zhang L, Su P, Xu C, et al. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells; a comparison between micromass and pellet culture systems [ J ]. Biotechnol Lett, 2010,32(9): 1339-1346.
- [ 8 ] Cardozo AJ, Gomez DE, Argibay PF. Neurogenic differentiation of human adipose-derived stem cells; relevance of different signaling molecules, transcription factors, and key marker genes [ J ]. Gene, 2012,511(2):427-436.
- [ 9 ] Ning H, Lei HE, Xu YD, et al. Conversion of adipose-derived stem cells into natural killer-like cells with anti-tumor activities in nude mice [ J ]. PLoS One, 2014,9(8): e106246.
- [ 10 ] Gwak SJ, Bhang SH, Yang HS, et al. In vitro cardiomyogenic differentiation of adipose-derived stromal cells using transforming growth factor-beta1 [ J ]. Cell Biochem Funct, 2009, 27(3): 148-154.
- [ 11 ] Garcia-Honduvilla N, Cifuentes A, Ortega MA, et al. High sensitivity of human adipose stem cells to differentiate into myofibroblasts in the presence of *C. aspersa* egg extract [ J ]. Stem Cells Int, 2017,2017:9142493
- [ 12 ] Wystrychowski W, Patolla B, Zhuge Y, et al. Multipotency and cardiomyogenic potential of human adipose-derived stem cells from epicardium, pericardium, and omentum [ J ]. Stem Cell Res Ther, 2016, 7(1):84.
- [ 13 ] Fang Z, Yang Q, Xiong W, et al. Effect of CGRP-adenoviral vector transduction on the osteoblastic differentiation of rat adipose-derived stem cells [ J ]. PLoS One, 2013, 8(8): e72738.
- [ 14 ] Kasir R., Vernekar VN, Laurencin CT. Regenerative engineering of cartilage using adipose-derived stem cells [ J ]. Regen Eng Transl Med, 2015, 1(1): 42-49.
- [ 15 ] Gorecka A, Salemi S, Haralampieva D, et al. Autologous transplantation of adipose-derived stem cells improves functional recovery of skeletal muscle without direct participation in new myofiber formation [ J ]. Stem Cell Res Ther, 2018,9(1): 195.
- [ 16 ] Liu T, Mu H, Shen Z, et al. Autologous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are involved in rat liver regeneration following repeat partial hepatectomy [ J ]. Mol Med Rep, 2016, 13(3): 2053-2059.
- [ 17 ] Lynch K, Pei M. Age associated communication between cells and matrix: a potential impact on stem cell-based tissue regeneration strategies [ J ]. Organogenesis, 2014, 10(3): 289-298.
- [ 18 ] Gimble JM, Bunnell BA, Frazier T, et al. Adipose-derived stromal/stem cells; a prime [ J ]. Organogenesis, 2013, 9(1):3-10.
- [ 19 ] Bora P, Majumdar AS. Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine; a brief review on biology and translation [ J ]. Stem Cell Res Ther, 2017, 8(1):145
- [ 20 ] van Harmelen V, Skurk T, Röhrig K, et al. Effect of BMI and age on adipose tissue cellularity and differentiation capacity in women [ J ]. Int J Obes Relat Metab Disord, 2003, 27(8):889-895.
- [ 21 ] Macotela Y, Boucher J, Tran TT, et al. Sex and depot differences in adipocyte insulin sensitivity and glucose metabolism [ J ]. Diabetes, 2009, 58(4): 803-812.
- [ 22 ] Hauner H, Entenmann G. Regional variation of adipose differentiation in cultured stromal-vascular cells from the abdominal and femoral adipose tissue of obese women [ J ]. Int J Obes, 1991, 15(2): 121-126.
- [ 23 ] Schipper BM, Marra KG, Zhang W, et al. Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells [ J ]. Ann Plast Surg, 2008, 60(5):538-544.
- [ 24 ] Alt EU, Senst C, Murthy SN, et al. Aging alters tissue resident mesenchymal stem cell properties [ J ]. Stem Cell Res, 2012, 8(2):215-225.
- [ 25 ] Nahar S, Nakashima Y, Miyagi-Shiohira C, et al. A comparison of proteins expressed between human and mouse adipose-derived mesenchymal stem cells by a proteome analysis through liquid chromatography with tandem mass spectrometry [ J ]. Int J Mol Sci, 2018, 19(11): pii: E3497.