

李杰, 谢燕燕, 王馨, 等. 人凝血因子 IX 基因在小鼠脂肪干细胞中的稳定表达[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 532-538.

Li J, Xie YY, Wang X, et al. Stable expression of human coagulation factor IX in mouse adipose-derived stem cells[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 532-538.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.04.014

人凝血因子 IX 基因在小鼠脂肪干细胞中的稳定表达

李杰[#], 谢燕燕[#], 王馨, 王霖虹, 和红霞, 孙庆云, 晏亚辉, 闫振宇^{*}

(华北理工大学附属医院血液科, 河北 唐山 063000)

【摘要】 目的 将携带人凝血因子 IX(hFIX) 基因(F9)的重组腺病毒转染 C57BL/6 小鼠脂肪间充质干细胞(adipose-derived stem cell, ADSC), 经过传代培养后, 观察 F9 是否在 ADSC 中稳定表达, 探索 ADSC 是否可作为血友病基因治疗的载体细胞。**方法** 取 C57BL/6 小鼠腹股沟区脂肪, 依据组织块悬浮法分离培养小鼠 ADSC 并进行传代培养, 应用携带 hFIX 基因并含 GFP 荧光标记的重组腺病毒转染第 3 代 ADSC, 转染后再次进行传代培养至第 4、5 代细胞。荧光显微镜下观察细胞携带荧光数量, RT-PCR 检测 F9 基因表达, ELISA 法检测细胞上清液及 Western Blot 检测细胞内携带目的基因表达蛋白情况。**结果** (1) 重组腺病毒转染后荧光显微镜下可见荧光表达, 细胞传代后仍具有荧光。(2) RT-PCR 结果显示: 四组 ADSC 均可表达内参 GAPDH 基因片段, A、B、C 组可检测到目的基因 F9 的表达, D 组未检测到 F9 的表达。(3) ELISA 法检测凝血因子 IX 抗原(hFIX: Ag)结果显示: A 组(81.62 ± 8.82) ng/mL、B 组(52.50 ± 3.25) ng/mL、C 组(47.41 ± 4.00) ng/mL 明显高于 D 组检测值(0.76 ± 0.44) ng/mL, 差异具有显著性($P < 0.05$)。(4) Western Blot 法检测四组细胞内 hFIX 蛋白表达情况, 结果显示 A 组蛋白表达灰度值(0.68 ± 0.10)、B 组(0.49 ± 0.15)、C 组(0.18 ± 0.05)明显高于 D 组蛋白表达灰度值(0.02 ± 0.01), 差异具有显著性($P < 0.05$)。**结论** 重组腺病毒转染 ADSC 后, 经过传代后培养, 仍可表达较高的 hFIX 活性, 可以作为血友病基因治疗的载体细胞。

【关键词】 目的基因; 重组腺病毒; 脂肪间充质干细胞

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 04-0532-07

Stable expression of human coagulation factor IX in mouse adipose-derived stem cells

LI Jie[#], XIE Yanyan[#], WANG Xin, WANG Linhong, HE Hongxia, SUN Qingyun, YAN Yahui, YAN Zhenyu^{*}

(Department of Hematology, Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China)

Corresponding author: YAN Zhenyu. E-mail: hbyzy2011@163.com

【Abstract】 Objective To observe whether hFIX is stably expressed in adipose-derived stem cells (ADSCs) and to explore whether ADSCs can be used as a vector cell line for hemophilia gene therapy following transformation by recombinant adenoviruses carrying human coagulation factor IX (hFIX) gene, F9. **Methods** ADSCs were isolated from C57BL/6 mice and cultured by tissue mass suspension. The third generation of ADSCs was transfected by recombinant adenovirus carrying F9 and GFP fluorescence marker. After transfection, the cells were subcultured again to the 4th and 5th passages. The level of fluorescence expressed by the cells was observed by fluorescence microscopy, the expression of F9 was detected by RT-PCR, and the protein expression of hFIX was detected by ELISA and western blotting. **Results**

[基金项目] 2016 年河北省政府临床医学优秀人才基础与培养项目(361036)。

Funded by Clinical Medicine Talent Foundation and Training Project of Hebei Provincial Government in 2016(361036)。

[作者简介] 李杰(1993—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 血液病学。Email: hbljj2017@163.com;

谢燕燕(1989—), 女, 主治医师, 硕士, 研究方向: 血液病学。Email: 15081920603@163.com。

[#]共同第一作者

[通信作者] 闫振宇(1974—), 男, 主任医师, 教授, 博士, 研究方向: 血液病学。Email: hbyzy2011@163.com

Fluorescence was observed after recombinant adenoviral transfer, and was still identified after cell passaging. RT-PCR revealed that all four groups of ADSCs could express internal reference *GAPDH*, but there was no expression of the target gene *F9* in group A, and the expression of *F9* could be detected in group D. Detection of hFIX:Ag by ELISA showed that the detection values of groups A (81.62 ± 8.82) ng/mL, B (52.50 ± 3.25) ng/mL, and C (47.41 ± 4.00) ng/mL were significantly higher than that of group D (0.76 ± 0.44) ng/mL, and there was a significant difference between the two groups ($P < 0.05$). hFIX expression in the four groups of ADSCs was detected by western blotting. The result showed that the gray value of histone expression in groups A (0.68 ± 0.10), B (0.49 ± 0.15) and C was significantly higher than that in group D (0.02 ± 0.01), and the difference was statistically significant ($P < 0.05$), while the gray value of histone expression in group A was significantly higher than that in group D ($P < 0.05$). **Conclusions** The recombinant adenoviruses were transformed into ADSCs and cultured after passaging, and could still express high hFIX activity, thus demonstrating their potential as vector cells for hemophilia gene therapy.

【Keywords】 target gene; recombinant adenovirus; adipose-derived stem cell (ADSC)

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

血友病 B (hemophilia B) 是一种 X 染色体相关的隐性遗传性疾病,其发病机制为编码凝血因子 IX 的基因突变导致凝血功能障碍,目前尚无治愈方法^[1]。其作为一种单基因型疾病,基因治疗为该疾病的治愈提供了可能。间接体内法 (*ex vivo*) 为基因治疗的间接途径,其实质是指通过将携带目的基因的病毒或非病毒载体转染实验动物或患者体内的组织或细胞,该组织或细胞作为靶细胞再次回输入体内,产生所需蛋白的表达。本实验组前期已经探讨了携带 *hFIX* 的重组腺病毒可以转染小鼠脂肪间充质干细胞 (adipose-derived stem cell, ADSC), 并得到目的蛋白的表达,但未探讨腺病毒转染后,ADSC 的干性有无变化,也未进行转染后细胞是否可以稳定表达的实验研究。本实验就此问题进行初步研究,探讨 ADSC 转染携带目的基因的腺病毒后,干性有无改变及蛋白是否稳定表达,为 ADSC 作为血友病基因治疗的靶细胞动物实验奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级近交系雄性 C57BL/6 小鼠 4 只,3 ~ 4 周龄,体重 20 ~ 30 g,购自北京华阜康动物有限公司【SCXK(京)2019-0008】,饲养于华北理工大学医学中心实验室【SYXK(冀)2015-0038】。自由进食水,室温温度控制在 (18 ~ 26) °C,相对湿度 40% ~ 70%,12 h 昼夜交替,每次 8 ~ 12 h 通风换气。本实验通过华北理工大学实验动物伦理委员会审查,符合动物伦理要求,按照 3R 原则给予人道关怀。

1.1.2 实验细胞

实验细胞为近交系 C57BL/6 小鼠脂肪间充质干细胞 (ADSC),为本实验组进行分离培养。

1.1.3 试剂与仪器

胎牛血清 (PAN, P30-2600); DMEN/F12 培养基 (Corning, 10-092-CVR); Pen/Strep 青链霉素双抗 100X (Corning, 30-002-CI); PBS 缓冲液 (Hyclone, 02-024-1ACS); 含 0.05% EDTA 胰蛋白酶 (Hyclone, 03-050-1B)。重组腺病毒 Ad-F9-GFP 及 Ad-GFP (上海汉恒生物科技有限公司)。碱性磷酸酶染色剂 (BASO, BA4117); 茜素红染色剂 (Lengene, 美国); 逆转录试剂盒 (TaKaRa, RR037 A); 2 × Utaq PCR MasterMix (含染料) (ZOMANBIO, ZT201 A-2); DNA Marker I (ZOMANBIO, zm101-2); Protease Inhibitor Cocktail (EDTA-Free, 100X in DMSO) (APEXBIO, K1007); F9 Polyclonal Antibody (ABclonal, A1578); ACTB (ABclonal, AC026); 超敏 ExPlus ECL 化学发光检测试剂盒 (ZOMANBIO, ZD310 A-1); 人凝血因子 IX (FIX) ELISA Kit (Andy gene, Human1954)。

生物安全柜 (海尔集团有限公司, HR60-IIA2, 中国); 超净工作台 (Forma Scientific, 美国); CO₂ 细胞培养箱 (Forma 公司, SL-JC-2323, 美国); 倒置相差显微镜 (Olympus, CX-24, 日本); 荧光电子显微镜 (Nikon 公司, TI-U, 日本); 普通 PCR 仪 (伯乐生物技术有限公司, 美国); 电泳仪 (伯乐生物技术有限公司, 美国); 酶标仪 (Biotek 公司, ELX800, 美国); 凝胶成像系统 AI600 (GE, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

本实验分为 4 组, A 组: 重组腺病毒 Ad-F9-GFP 转染首次转染细胞; B 组: 重组腺病毒 Ad-F9-GFP

转染后细胞传代后 1 代; C 组: 重组腺病毒 Ad-F9-GFP 转染后细胞传代后 2 代; D 组: 正常 ADSC。

1.2.2 ADSC 复苏

将冻存 ADSC 从液氮中取出, 迅速置于 37℃ 水浴锅中复溶, “8” 字形滑动, 注意期间冻存瓶盖及封口膜位置不可接触水浴锅中温水, 避免污染。待细胞溶解, 约 1 min 后将细胞快速置入含有 0.5 mL 预热培养基的培养瓶中, 后逐渐加入培养基至 3 ~ 4 mL。滴管混匀后, 置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养, 24 h 后换液处理。

1.2.3 ADSC 的消化及传代

将细胞培养瓶中原有细胞培养液弃去, 加入 3 ~ 5 mL 生理盐水清洗 2 次后弃去液体, 注意将瓶中剩余生理盐水应用移液器去除, 后加入 600 μL 含 0.05% EDTA 的胰蛋白酶, 放入 37℃ 细胞培养箱, 2 min 后显微镜下观察, 细胞完全消化后加入 2 mL 完全培养基终止, 转移至 15 mL 离心管中, 1000 rpm 离心 5 min 后弃去上清液, 加入 4 mL 10% FBS 将细胞吹匀后移至 2 个细胞瓶中, 每瓶放置 2 mL 培养基, 最后在每瓶细胞瓶中补充 2 mL 10% FBS 培养基, 放置于含有 5% CO₂ 的 37℃ 孵育箱中培养, 3 d 后再次换液。

1.2.4 重组腺病毒 Ad-F9-GFP 体外转染 ADSC

取第 3 代 ADSC, 计数 2.5×10^5 个细胞接种于 12.5 cm² 细胞瓶中, 观察细胞生长状态, 当细胞生长汇合率至 70% ~ 80%, 更换新的完全培养基, 取重组腺病毒 Ad-F9-GFP 按照 MOI = 300 转染细胞 (MOI = 病毒载量 × 体积 / 细胞数量, 本研究 MOI = 300 为前期实验结果显示最佳转染 MOI)。24 h 后进行换液处理。荧光显微镜观察荧光表达情况。

1.2.5 转染后 ADSC 传代培养

首次转染后 ADSC 留取足够数量细胞, 其余细胞进行传代培养, 至转染后第 1、2 代细胞, 荧光显微镜下观察荧光表达情况, 传代方法同 1.2.3。

1.2.6 转染后 ADSC 的成骨诱导检测

取重组腺病毒转染后 ADSC, 观察细胞生长状态, 待汇合率为 60% ~ 70% 时, 依据相关文献^[2-3]进行成骨诱导, 并于诱导培养第 7 天后进行 ALP 染色, 第 30 天后茜素红染色。观察转染后 ADSC 的分化能力, 初步探讨重组腺病毒转染后 ADSC 的干性有无改变。

1.2.7 RT-PCR 检测转染后 ADSC 传代后目的基因表达

依据实验分组, A 组细胞转染后 72 h, B、C、D 组待细胞长满细胞瓶, 应用 TRIzol 法提取细胞总 RNA。RNA 提取后, 测定 RNA 纯度及浓度测定。样品合格后, 取 1 μg 提取 RNA 根据试剂盒说明书进行逆转录合成。依据 TaKaRa 逆转录试剂说明书, 逆转录条件为 37℃ 15 min, 85℃ 5 s, 4℃ forever。以逆转录产物行 PCR, 根据小鼠 GAPDH (179 bp) 为内参, F9 (118 bp) 的基因序列设计引物 (表 1), 引物送至英潍捷基 (上海) 贸易有限公司 Invitrogen 合成。再行 PCR 扩增特异序列, PCR 反应条件: 94℃ 3 min, 94℃ 30 s, 60℃ 45 s, 72℃ 1 min, 72℃ 5 min, 30 个循环。PCR 产物行琼脂糖凝胶电泳鉴定。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因 Gene	前引物 (5' 端到 3' 端) Forward primer (5' to 3')	后引物 (5' 端到 3' 端) Reverse primer (5' to 3')
GAPDH	ACTCTTCCACCTTCGGCC	TCTTGCTCAGTGTCTTGCT
hFIX	GCGGCAGTTGCAAGGATGAC	AACTGCTCGCATCTGCCATT

1.2.8 ELISA 检测转染后细胞及传代后 hFIX: Ag 表达

依据实验分组, A 组细胞转染后 72 h, B、C、D 组待细胞长满细胞瓶, 提取细胞上清液, 依据 ELISA 试剂说明书, 检测上清液中 hFIX: Ag 表达情况。

1.2.9 Western Blot 检测转染后细胞及传代后目的蛋白表达

依据实验分组, A 组细胞转染后 72 h, B、C、D 组待细胞长满细胞瓶, 提取细胞蛋白。BCA 蛋白浓度测定后, 行 Western Blot 检测蛋白表达。

1.3 统计学分析

实验所得数据采用 SPSS 17.0 和 GraphPad Prism 5 软件处理统计分析软件进行分析, 计量资料以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间数据进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 C57BL/6 小鼠 ADSC 复苏后状态观察

如图 1 所示, 冻存 ADSC 在细胞复苏后, 大致外观与冻存前 ADSC 未见明显改变, 细胞呈均匀长梭型生长。

2.2 重组腺病毒 Ad-F9-GFP 转染小鼠 ADSC 及转染后传代荧光图

重组腺病毒 Ad-F9-GFP 转染 ADSC 24 h 后, 荧光显微镜下可见荧光表达。随时间延长荧光逐渐

增强,72 h 后可见荧光亮度强于 24 h。待细胞长满细胞瓶,传代后仍可见荧光表达(图 2)。

2.3 转染后 ADSC 的成骨诱导检测

如图 3 所示,A、B 两图为重组腺病毒转染细胞后成骨诱导,图 C、图 D 分别为第 7 天、第 30 天进行 ALP 染色,图 C 为应用偶氮偶联法,图中显示大量红色颗粒为细胞核,散在可见部分蓝色颗粒。图 D 为第 30 天行茜素红染色,细胞间可见大小不一的棕褐色块状沉淀,即矿化结节。

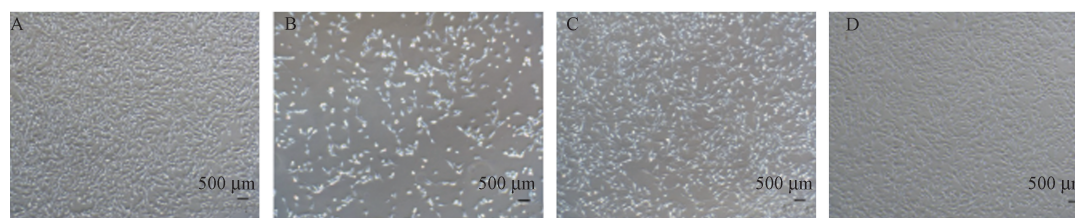
2.4 RT-PCR 检测转染后 ADSC 传代后目的基因表达

如图 4 所示,四组细胞均可见到内参基因 *GAPDH* 的表达,在 *F9* 基因表达上,A、B、C 组可见

到符合 118 bp 基因表达片段,而 D 组未见到表达情况。根据图像,进行灰度值分析,A、B、C 三组明显高于 D 组表达,差异具有显著性。

2.5 ELISA 检测转染后细胞及传代后 hFIX:Ag 表达

结果分析显示四组细胞中,A 组、B 组及 C 组 ELISA 法检测抗原水平,均可见 hFIX:Ag 的表达,分析四组间数据,差异具有显著性。A 组中 hFIX:Ag (81.62 ± 8.82) ng/mL 水平明显高于其它三组,B 组 (52.50 ± 3.25) ng/mL、C 组 (47.41 ± 4.00) ng/mL hFIX:Ag 水平高于 D 组正常 ADSC (0.76 ± 0.44) ng/mL,提示 ADSC 在转染重组腺病毒 Ad-F9-GFP 后传代 2 次仍可稳定表达目的蛋白(图 5)。

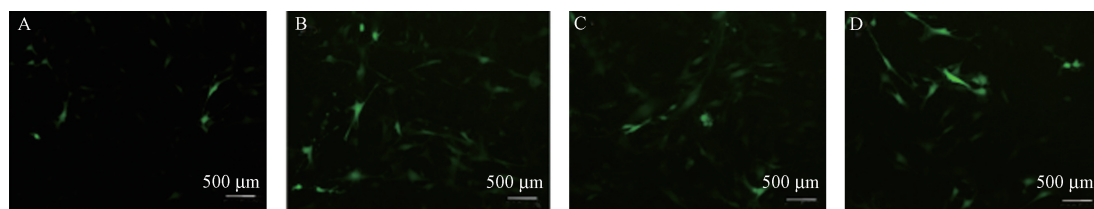


注:A:冻存前 24 h;B:复苏后 24 h;C:复苏后 48 h;D:复苏后 72 h。

图 1 复苏后 ADSC 细胞生长情况

Note. A, 24 hours before cryopreservation. B, 24 hours after recovery. C, 48 hours after recovery. D, 72 hours after recovery.

Figure 1 Growth of ADSC cells after recovery

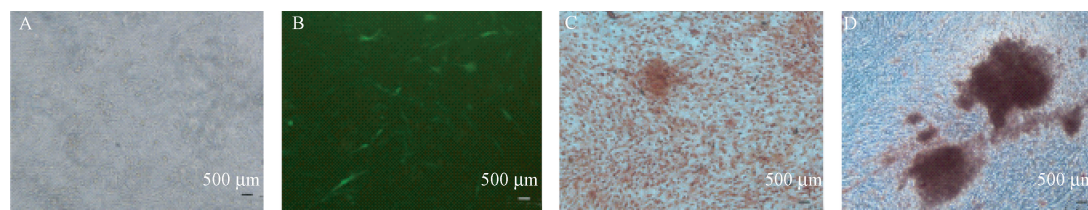


注:A:转染 24 h 后;B:转染 72 h 后;C:转染后传代 1 次;D:转染后传代 2 次。

图 2 Ad-F9-GFP 转染细胞及传代后荧光表达

Note. A, 24 hours after transfection. B, 72 hours after transfer. C, The first passage after transfer. D, The second passage after transfer.

Figure 2 Fluorescent expression of Ad-F9-GFP transfected cells and subcultured cells

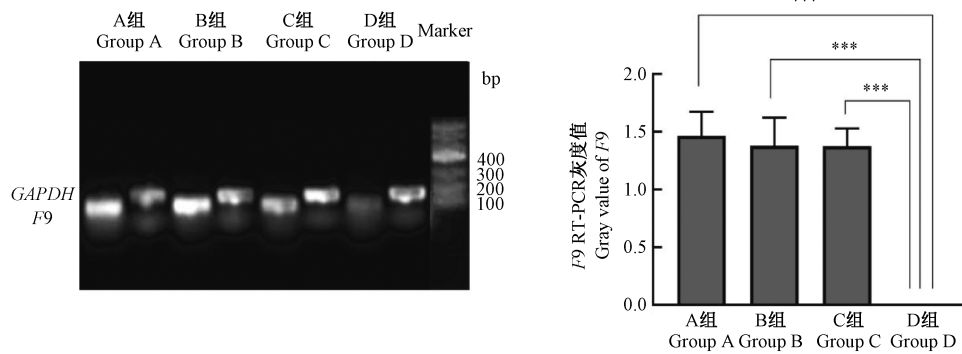


注:A:重组腺病毒转染后成骨诱导;B:重组腺病毒转染后成骨诱导荧光图;C:成骨诱导后碱性磷酸酶染色;D:成骨诱导后茜素红染色。

图 3 重组腺病毒转染 ADSC 成骨诱导图

Note. A, Osteogenic induction after recombinant adenoviral transfer. B, Osteogenic induction fluorescence map after recombinant adenoviral transfer. C, Alkaline phosphatase staining after osteogenic induction. D, Alizarin red staining after osteogenic induction.

Figure 3 Results of osteogenic induction of ADSC by recombinant adenovirus



注:与 D 组相比, *** $P < 0.001$ 。(下图同)

图 4 四组细胞 F9 基因 RT-PCR 结果及灰度值比较图

Note. Compared with group D, *** $P < 0.001$. (The same in the following Figures)

Figure 4 Comparison of RT-PCR results and gray value of F9 gene in the four groups

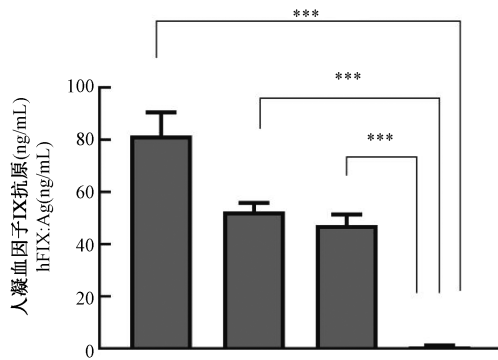


图 5 ELISA 检测细胞上清液 hFIX:Ag 表达水平

Figure 5 Expression of hFIX:Ag in cell culture medium by ELISA

2.6 Western Blot 检测转染后细胞及传代后 hFIX 表达

如图 6 所示, A 组蛋白表达灰度值 (0.68 ± 0.10)、B 组 (0.49 ± 0.15)、C 组 (0.18 ± 0.05) 明显高于 D 组蛋白表达灰度值 (0.02 ± 0.01), 差异具

有显著性。

3 讨论

血友病 B 为一种单基因隐性遗传性疾病, 男性多发病, 研究表明血友病发病率约为 $1/25\ 000$ ^[4], 目前的治疗方法主要以替代治疗为主^[5]。然而, 替代治疗具有一个非常常见的问题, 即 FIX 因子半衰期约为 24 h, 随着时间的延长, 药物浓度逐渐降低, 无法持久维持在有效血药浓度。并且随着给药频率的增加, 也将增加患者体内 FIX 抗体即抑制物的发生率。这种抑制物的产生则会之后的凝血因子输注达不到预期效果^[6]。作为一种单基因遗传性疾病, 基因治疗成为可能治愈手段成为可能。基因治疗则可以分为体内途径 (*in vivo*) 和体外途径 (*ex vivo*), *in vivo* 主要是指将携带有目的基因的各种载体直接注入体内, 从而产生一系列的蛋白表达, 达到研究者的预期结果。而 *ex vivo* 则主要表现在将

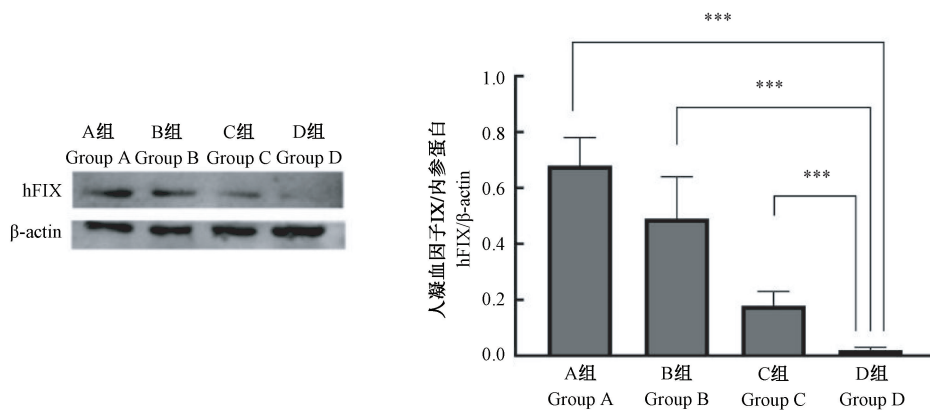


图 6 Western Blot 检测细胞 hFIX 蛋白水平

Figure 6 Western Blot was used to detect cellular hFIX protein expression

目的基因整合到从机体内分离提取的各种干细胞上,再通过将该细胞移植到宿主体内,达到预期效果^[7]。

在各种间充质干细胞中,脂肪间充质干细胞(ADSC)具有其自身的优势,易于提取^[8-10]。研究表明,ADSC 仍具有其他间充质干细胞的主要特征:具有向其它细胞分化的潜能^[11-19]。多项研究表明,ADSC 的应用范围非常广泛,得到了众多方面的应用^[20-29]。

在本研究前期工作中,对于 C57BL/6 小鼠 ADSC 的分离培养有所涉及,并对于该细胞进行了流式细胞术及成脂成骨诱导分化培养进行鉴定,证明 ADSC 的成功抽提。同时通过将腺病毒和 ADSC 相结合,对于血友病基因治疗的体外方法成功奠定基础。初步证明了携带 *hFIX* 基因的腺病毒能有效转染 ADSC,使其表达具有凝血活性的 hFIX 蛋白。基于上述实验研究结果,本实验通过对于携带 *hFIX* 基因的腺病毒转染后的 ADSC 传代培养,初步探讨携 *hFIX* 基因重组腺病毒转染后的 ADSC 是否稳定表达。

实验过程中,我们发现重组腺病毒转染 ADSC 后,经过传代后培养,仍可表达较高的 hFIX 活性。ELISA 检测细胞上清液中,携带 *F9* 基因转染的 ADSC 经过细胞传代培养仍可以分泌 hFIX 并分泌如细胞上清液。数据表明,三组实验组数据均明显高于空白对照组。Weston Blot 检测四组 ADSC 的细胞内蛋白表达,A、B、C 三组均可见到表达在 50kDa 左右的 hFIX 蛋白表达,而 D 组未见到该蛋白表达。在本实验中,应用 RT-PCR 检测四组 ADSC 中 *F9* 基因表达情况,结果显示:A、B、C 三组均可见到位于 118 bp 的基因表达条带而未见到 D 组表达。实验中,ELISA、Weston Blot 及 RT-PCR 结果中,A 组数值均为最高,考虑与腺病毒本身的特点,该病毒为非包膜双联 DNA,携带的遗传物质并不整合到宿主细胞基因组有关。但是该病毒包装量大,也避免了插入突变的风险^[30]。

综合上述实验结果,我们初步认为在携带 *hFIX* 基因的腺病毒转染后的 ADSC,其携带的 *hFIX* 基因并不受细胞传代的影响。ADSC 可以作为基因治疗的有效靶细胞。这也为后续血友病 *ex vivo* 基因治疗动物实验奠定了基础。

参 考 文 献(References)

[1] Srivastava A, Brewer AK, Mauser-bunschoten EP, et al.

Guidelines for the management of hemophilia[J]. Haemophilia, 2013, 19(1): e1-e47.

[2] 郭艳萍,陶常波,张爱君,等.成人脂肪间充质干细胞的定向成骨诱导[J].中国组织工程研究,2014,18(19):2987-2992.

Guo YP, Tao CB, Zhang AJ, et al. Osteogenic induction of human adipose-derived stem cells[J]. J Clin Rehabil Tis Eng Res, 2014, (19): 2987-2992.

[3] 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.

[4] 中华医学会血液学分会血栓与止血学组,中国血友病协作组.血友病诊断与治疗中国专家共识(2017年版)[J].中华血液学杂志,2017,38(5):364-370.

Thrombosis and hemostasis group, hematology society of chinese medical association. hemophilia treatment center collaborative network of china. Consensus of Chinese expert on the diagnosis and treatment of hemophilia (version 2017) [J]. Chin J Hematol, 2016, 37(5): 364-370.

[5] Santagostino E, Mancuso MS. Glycopegylated recombinant factor IX for hemophilia B in context[J]. Drug Des Devel Ther, 2018, 12: 2933-2943.

[6] Ohmori T, Mizukami H, Ozawa K, et al. New approaches to gene and cell therapy for hemophilia[J]. J Thromb Haemost, 2015, 13 Suppl 1: S133-S142.

[7] Mannucci PM, Tuddenham EG. The hemophilias--from royal genes to gene therapy[J]. N Engl J Med, 2001, 344(23): 1773-1779.

[8] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells[J]. Mol Biol Cell, 2002, 13(12): 4279-4295.

[9] 李银华,黄星原,徐之良.转染鼠脂肪干细胞用于血友病 A 基因治疗的可能性实验[J].中国临床康复,2005,9(19):76-79.

Li YH, Huang XY, Xu ZL. Possibility of the transfected adipose tissue-derived stromal cells in the gene therapy of hemophilia A [J]. J Clin Rehabil Tis Eng Res, 2005, 9(19): 76-79.

[10] Mizuno H, Tobita H, Uysal AC. Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine[J]. Stem Cells, 2012, 30(5): 804-810.

[11] Rangappa S, Fen C, Lee EH, et al. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes[J]. Ann Thorac Surg, 2003, 75(3): 775-779.

[12] Huang JI, Zuk PA, Jones NF, et al. Chondrogenic potential of multipotential cells from human adipose tissue[J]. Plast Reconstr Surg, 2004, 113(2): 585-594.

[13] Cao Y, Sun Z, Liao L, et al. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells *in vitro* and improve postnatal neovascularization in vivo[J]. Biochem Biophys Res

- Commun, 2005, 332(2): 370-379.
- [14] Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, et al. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects[J]. Nat Biotechnol, 2004, 22(5): 560-567.
- [15] Ning H, Lin G, Lue TF, et al. Neuron-like differentiation of adipose tissue-derived stromal cells and vascular smooth muscle cells[J]. Differentiation, 2006, 74(9-10): 510-518.
- [16] Corre J, Barreau C, Cousin B, et al. Human subcutaneous adipose cells support complete differentiation but not self-renewal of hematopoietic progenitors[J]. J Cell Physiol, 2006, 208(2): 282-288.
- [17] Hörl S, Ejaz A, Ernst S, et al. CD146 (MCAM) in human cs-DLK1⁻/cs-CD34⁺ adipose stromal/progenitor cells[J]. Stem Cell Res, 2017, 22: 1-12.
- [18] Ejaz A, Mitterberger MC, Lu Z, et al. Weight loss upregulates the small GTPase DIRAS3 in human white adipose progenitor cells, which negatively regulates adipogenesis and activates autophagy via Akt-mTOR inhibition[J]. EBioMedicine, 2016, 6: 149-161.
- [19] Minter D, Marra KG, Rubin JP. Adipose-derived mesenchymal stem cells: biology and potential applications[J]. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2013, 129: 59-71.
- [20] Minter DM, Marra KG, Rubin JP. Adipose stem cells: biology, safety, regulation, and regenerative potential[J]. Clin Plast Surg, 2015, 42(2): 169-179.
- [21] Tobita M, Mizuno H. Adipose-derived stem cells and periodontal tissue engineering[J]. Int J Oral Maxillofac Implants, 2013, 28(6): e487-e493.
- [22] Minter DM, Young MT, Lin YC, et al. Analysis of type II diabetes mellitus adipose-derived stem cells for tissue engineering applications[J]. J Tissue Eng, 2015, 6: 2041731415579215.
- [23] Tobita M, Mizuno H. Adipose-derived stem cells and platelet-rich plasma; the keys to functional periodontal tissue engineering[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2013, 8(5): 400-406.
- [24] Tobita M, Uysal CA, Guo X, et al. Periodontal tissue regeneration by combined implantation of adipose tissue-derived stem cells and platelet-rich plasma in a canine model[J]. Cytotherapy, 2013, 15(12): 1517-1526.
- [25] Orbay H, Tobita M, Mizuno H. Mesenchymal stem cells isolated from adipose and other tissues: basic biological properties and clinical applications[J]. Stem Cells Int, 2012, 2012: 461718.
- [26] Galeshi A, Ghasemi-kasman M, Feizi F, et al. Co-administration of aspirin and adipose-derived stem cell conditioned medium improves the functional recovery of the optic pathway in a lysolecithin-induced demyelination model[J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2019, 15: 2681-2694.
- [27] Mou S, Zhou M, Li Y, et al. Extracellular vesicles from human adipose-derived stem cells for the improvement of angiogenesis and fat-grafting application[J]. Plast Reconstr Surg, 2019, 144(4): 869-880.
- [28] Ryu S, Lee JM, Bae CA, et al. Therapeutic efficacy of neuregulin 1-expressing human adipose-derived mesenchymal stem cells for ischemic stroke[J]. PLoS One, 2019, 14(9): e0222587.
- [29] Freitag J. Adipose-derived mesenchymal stem cell therapy in the treatment of knee osteoarthritis-reply[J]. Ann Transl Med, 2019, 7(16): 400.
- [30] Benskey MJ, Sandoval IM, Miller K, et al. Basic concepts in viral vector-mediated gene therapy[J]. Methods Mol Biol, 2019, 1937: 3-26.

[收稿日期] 2020-02-08