

## 研究论文

## 大鼠脂肪间充质干细胞的分离鉴定与生物学特性研究

岳永莉 张 祥 张丽春 于海泉\*

(内蒙古大学哺乳动物生殖生物学及生物技术教育部重点实验室, 呼和浩特 010021)

**摘要** 脂肪间充质干细胞(adipose-derived mesenchymal stem cells, ADSCs)是一类具有多向分化潜能的成体干细胞, 在组织器官修复方面具有潜在应用前景。体外培养条件下脂肪间充质干细胞增殖活性和分化潜能的维持对其应用研究具有重要意义。该研究通过大鼠腹股沟部脂肪组织分离获得了脂肪间充质干细胞, 并对其细胞生长曲线、细胞群体倍增时间、细胞克隆形成等进行了检测, 从而筛选出细胞生长最适的血清及浓度; 再进一步对筛选条件下培养的大鼠脂肪间充质干细胞进行了免疫荧光检测、流式细胞术分析和诱导分化能力鉴定。结果显示, 大鼠脂肪间充质干细胞在20%血清浓度下生长状态最好, 增殖较快, 细胞群体倍增时间较短, 细胞克隆形成率可达(27.33±0.58)%。分离的大鼠脂肪间充质干细胞中CD44、CD90、CD106的阳性率分别为99.12%、99.59%、65.81%, CD34分子呈阴性。诱导后, 细胞经油红O、碱性磷酸酶、阿新兰染色, 结果表明, 细胞具有向脂肪、骨、软骨方向分化的潜能。以上结果表明, 成功建立了大鼠脂肪间充质干细胞系。

**关键词** 脂肪间充质干细胞; 血清; 生物学特性

## Study in the Isolation, Identification and Biological Characteristics of Adipose-Derived Stem Cells in Rat

Yue Yongli, Zhang Xiang, Zhang Lichun, Yu Haiquan\*

(Key Laboratory of Ministry of Education of China for Mammal Reproductive Biology and Biotechnology, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China)

**Abstract** As a class of adult stem cells, adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) have multipotent differentiation potential and promising prospect in tissue repair. To maintain the proliferation and differentiation potential *in vitro* is important for the medical application of ADSCs. ADSCs were isolated from rat inguinal fat pads and assessed the biological feature including growth curve, population doubling time and colony formation assay. The optimal medium formulation was confirmed on the ADSCs behavior by different fetal bovine serum (FBS) with different concentration. The rat ADSCs were also detected by immunofluorescent staining, flow cytometry and induction by specific medium. The results showed that the most rapid proliferation and population doubling time occurred in 20% FBS in which the rate of the cell colony formation was (27.33±0.58)% of rat ADSCs. The ratios of CD44, CD90 and CD106 positive cells in rat ADSCs were 99.12%, 99.59% and 65.81%, respectively, while CD34 was negative. The results of histochemical staining of Oil Red O, alkaline phosphatase and Alcian Blue staining demonstrated that rat ADSCs were capable to differentiate

收稿日期: 2016-04-20 接受日期: 2016-09-23

内蒙古自然科学基金(批准号: 2012MS0515)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0471-3679879, E-mail: haiquan\_yu@163.com

Received: April 20, 2016 Accepted: September 23, 2016

This work was supported by the Natural Science Foundation of Inner Mongolia (Grant No.2012MS0515)

\*Corresponding author. Tel: +86-471-3679879, E-mail: haiquan\_yu@163.com

网络出版时间: 2016-11-15 10:13:25

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20161115.1013.002.html>

towards adipocyte, bone and cartilage. The results above showed that rat ADSCs were established successfully.

**Keywords** adipose-derived mesenchymal stem cells; serum; biological characteristics

成体干细胞是指各种组织或器官内具有自我更新和分化潜能的、特定的多能或专能细胞,存在于各种组织和器官中,如骨髓、脂肪、肌肉、血液、肝脏、皮肤等。近几年,成体干细胞被越来越多地应用于白血病、老年性痴呆、帕金森病、糖尿病、脊柱损伤以及退变性功能紊乱等疾病的治疗,其帮助恢复组织器官功能的辅助治疗作用也越来越受到重视。成体干细胞作为细胞载体将在基因治疗以及细胞治疗领域发挥重要作用。

成体干细胞中脂肪来源的间充质干细胞(adipose-derived mesenchymal stem cells, ADSCs)的应用尤其受到关注。首先,它与骨髓干细胞相比具有来源丰富、操作简便、容易获得、分化能力强的特点。目前已知脂肪间充质干细胞的分化范围涵盖了3个胚层,包括中胚层细胞如脂肪、骨、软骨和肌肉<sup>[1]</sup>,以及内、外胚层的细胞如肝源性细胞、胰岛细胞、血管内皮细胞、造血细胞、神经元等<sup>[2]</sup>,研究人员还在不断地挖掘它的分化潜能,如分化为角膜细胞等<sup>[3]</sup>。脂肪间充质干细胞还具有一个突出的特点,即免疫抑制作用,脂肪间充质干细胞与其他细胞共移植后可有效降低受体的免疫排斥反应,从而显著提高移植物的存活周期。脂肪间充质干细胞的免疫抑制作用不仅适用于同种异体移植,对异种间的移植也具有同样的效果。文献报道了将人的脂肪间充质干细胞移植到小鼠、大鼠、兔子、狗等多个物种的模型,均有显著的疗效<sup>[4]</sup>。最新的生物3D打印技术更是为脂肪间充质干细胞的应用打开了新局面,我国研究人员利用该技术成功将脂肪间充质干细胞应用到裸鼠体内的异位成骨,初步证明了体内成骨的3D打印技术路线的可行性<sup>[5]</sup>。

应用成体干细胞通常需要经过分离纯化以后的体外培养来富集细胞,再以原位注射、静脉注射或者三维塑型后移植的方式进行细胞治疗。体外培养过程中培养液的组成对于维持细胞形态、生长速度以及分化能力有重要的影响<sup>[6]</sup>。血清作为培养液中重要的营养物质对细胞生物学特性有不可忽视的影响。为了在本实验室建立大鼠脂肪间充质干细胞的体外培养体系,本研究对不同的血

清及血清浓度对于细胞生长特性的影响进行了摸索,为体外长期培养大鼠脂肪间充质干细胞提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

清洁级Wistar大鼠由内蒙古大学实验动物研究中心提供。DMEM购自Hyclone公司。TBD标准胎牛血清(TBD-FBS)购自天津灏洋生物制品科技有限公司。TransSerum HQ胎牛血清(Trans-FBS)购自北京全式金生物技术有限公司。间充质干细胞专用胎牛血清(BI-MSC FBS)购自以色列Biological Industries公司。兔抗小鼠CD34、CD90、CD106及小鼠抗人CD44等抗体购自武汉博士德生物工程有限公司。羊抗兔Alexa Fluor<sup>®</sup> 568抗体购自Thermo公司。羊抗小鼠Dylight 549抗体购自Jackson公司。胶原酶I、胰岛素、地塞米松、IBMX、吡哆美辛、抗坏血酸、 $\beta$ -甘油磷酸钠、油红O、阿新兰均购自Sigma公司。碱性磷酸酶试剂盒购自普洛麦格(北京)生物技术有限公司。CCK-8细胞活性检测试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司。

### 1.2 细胞的分离与培养

手术取出成年大鼠双侧腹股沟脂肪,PBS中清洗,去除血污并剪成糜状,0.1%胶原酶I 37℃震荡消化1 h后,加入2倍体积DMEM+10% TBD-FBS培养液终止消化。经过150  $\mu$ m细胞筛网过滤,2 000 r/min离心5 min收集滤液,弃上清,收集细胞沉淀,加入DMEM+10% TBD-FBS培养液重悬后,接种于培养皿上,37℃、5% CO<sub>2</sub>及饱和湿度培养24 h后,更换培养液,待细胞汇合,使用胰蛋白酶1:3进行常规消化和传代。以下所有实验均选择第5代脂肪间充质干细胞进行。

### 1.3 不同血清条件下细胞的生长特性测定

为筛选大鼠脂肪间充质干细胞体外培养合适的血清及血清浓度,将TBD-FBS、Trans-FBS、BI-MSC FBS这三种血清分别分为10%、15%、20%不同浓度组,分别进行如下实验。

**1.3.1 细胞生长曲线测定** 将大鼠脂肪间充质干细胞以 $1 \times 10^3$ /孔的密度接种到96孔板中,每隔24 h按

照试剂盒说明加入CCK-8孵育2 h。酶标仪检测吸光度( $D$ )值。每组试验4个复孔,同时设2孔只加培养液不加细胞的空白对照,连续检测7 d,制成细胞生长曲线。

**1.3.2 细胞倍增时间测定** 将大鼠脂肪间充质干细胞以 $1 \times 10^4$ /孔的密度接种到24孔板中,每隔24 h进行细胞计数,每组试验做3个复孔,连续培养4 d。根据公式( $DT=t \times [\lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)]$ )计算出细胞群体倍增的时间,其中 $t$ 为培养时间, $N_0$ 为接种细胞后2 d的细胞数, $N_t$ 为接种细胞后的4 d的细胞数。

**1.3.3 细胞克隆形成率检测** 将大鼠脂肪间充质干细胞经胰酶消化后制成单细胞悬液,调整细胞浓度以每板100个细胞的密度接种到60 mm规格的培养皿中,每组试验3次重复。连续培养7 d后,4%多聚甲醛固定5 min,0.1%结晶紫染色15 min,ddH<sub>2</sub>O洗去染液,照相后统计克隆个数,克隆形成率=克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$ 。

#### 1.4 免疫荧光染色及流式细胞术分析

大鼠脂肪间充质干细胞经胰酶以 $2 \times 10^4$ /孔的密度接种于24孔板,1 d后加入4%多聚甲醛固定1 h,通透液(PBS+2% BSA+0.1% Triton X-100)室温处理1 h,封闭液(PBS+2% BSA+2%山羊血清+2%脱脂奶粉+0.15 mol/L甘氨酸)室温封闭2 h,一抗4 °C过夜,二抗室温孵育1 h后漂洗,DAPI复染,镜检。流式细胞操作步骤基本与免疫荧光染色相同,1 500 r/min离心5 min进行漂洗,所有操作在冰上进行,在Beckman Coulter上进行流式检测。

#### 1.5 细胞诱导分化

待大鼠脂肪间充质干细胞长满培养皿,依据文献[7]加入诱导培养基(成脂诱导培养基:DMEM+10% BI-MSC FBS+10  $\mu$ mol/L胰岛素+1  $\mu$ mol/L地塞米松

+0.5 mmol/L IBMX+0.2 mmol/L吡啶美辛;成骨诱导培养基:DMEM+10% BI-MSC FBS+0.1 mmol/L地塞米松+50 mmol/L抗坏血酸+10 mmol/L $\beta$ -甘油磷酸钠;成软骨诱导培养基:DMEM-L+10% BI-MSC FBS+6.25 mg/mL胰岛素+10 ng/mL TGF- $\beta$ 1+50 nmol/L抗坏血酸),每3 d换液,连续诱导14 d后,分别对诱导后细胞进行以下组化染色:成脂诱导细胞进行油红O染色,成骨诱导细胞进行碱性磷酸酶染色,成软骨诱导细胞进行阿新兰染色。

#### 1.6 统计学分析

数据采用SPSS 16.0软件进行统计学分析,数据结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

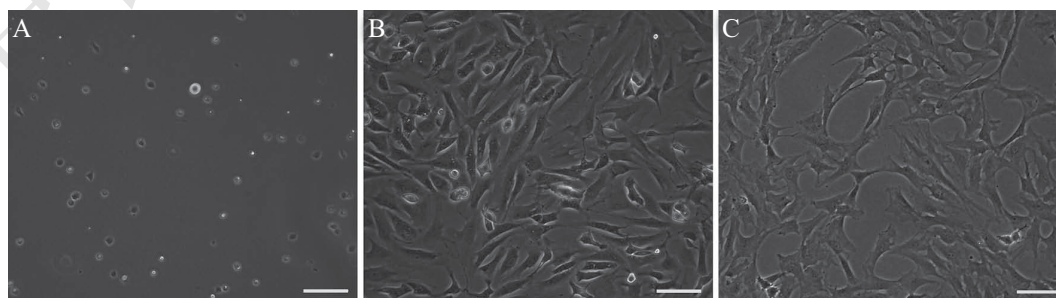
## 2 结果

### 2.1 细胞的分离、培养

大鼠的腹股沟脂肪经胶原酶消化、过滤、离心后,将获得的脂肪间充质干细胞的沉淀,经DMEM+10% TBD-FBS培养液重悬后,接种于细胞培养皿上,6 h后可见有细胞开始贴壁,形状呈不规则圆形,然后逐渐变成多角形或梭形,约1周后细胞达到汇合。大鼠脂肪间充质干细胞的生长速度较快,接种后3~4 d即可按照1:3的比例进行常规传代,传代后细胞呈典型成纤维细胞状并逐渐呈漩涡式生长(图1)。

### 2.2 不同血清条件下细胞生长特性检测

**2.2.1 细胞生长曲线测定** 从图2可以看出,大鼠脂肪间充质干细胞增殖快,潜伏期很短,接种后呈现出4 d内快速生长然后放缓的态势。TBD-FBS血清的不同浓度对大鼠脂肪间充质干细胞生长曲线影响的差异较大。不同血清浓度对Trans-FBS血清、BI-MSC FBS血清中的大鼠脂肪间充质干细胞生长曲线



A: 接种后6 h的大鼠脂肪间充质干细胞; B: 接种后7 d的大鼠脂肪间充质干细胞; C: 第4代大鼠脂肪间充质干细胞。标尺=100  $\mu$ m。

A: rat ADSCs cultured for 6 h; B: rat ADSCs cultured for 7 d; C: rat ADSCs of passage 4. Scale bars=100  $\mu$ m.

图1 体外培养的大鼠脂肪间充质干细胞

Fig.1 Photomicrograph of rat ADSCs cultured *in vitro*

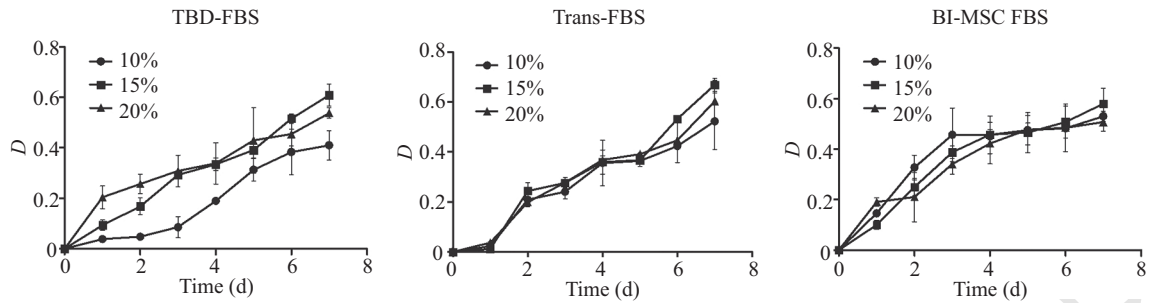
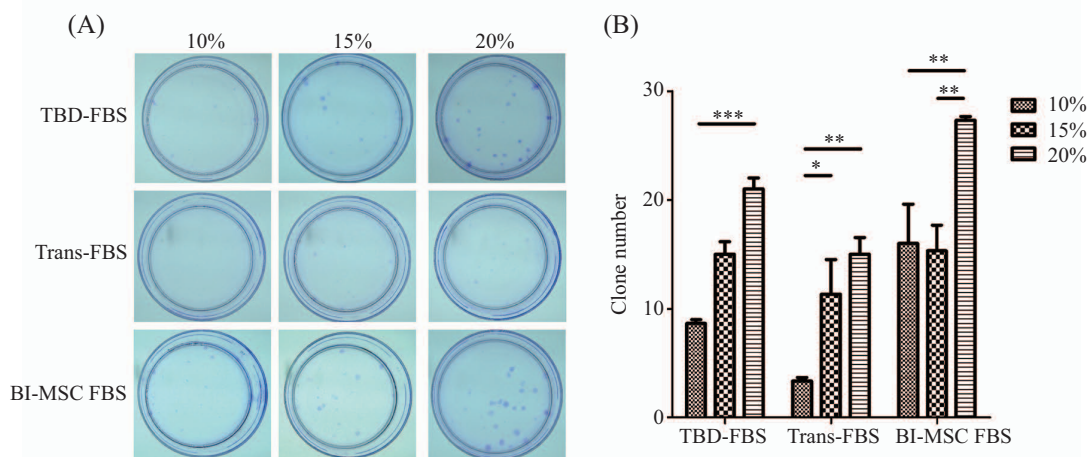


图2 细胞生长曲线  
Fig.2 Cell growth curve

表1 细胞倍增时间测定

Table 1 Analysis of cell population doubling time

| 血清浓度<br>Concentration of serum | 细胞倍增时间<br>Cell population doubling time |              |              |
|--------------------------------|-----------------------------------------|--------------|--------------|
|                                | 10%                                     | 15%          | 20%          |
| TBD-FBS                        | 21.69±3.72 h                            | 19.84±2.15 h | 18.79±0.91 h |
| Trans-FBS                      | 20.16±5.47 h                            | 18.34±3.30 h | 15.37±1.62 h |
| BI-MSC FBS                     | 18.30±0.46 h                            | 16.75±1.52 h | 14.90±2.62 h |



A: 细胞克隆形成实验图片; B: 细胞克隆形成率统计结果。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ 。

A: representative photomicrograph of colony formation assay; B: statistics of colony formation efficiency. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ 。

图3 大鼠脂肪间充质干细胞的细胞克隆形成实验

Fig.3 Colony formation assay of rat ADSCs

几乎无影响。接种后第4~5 d细胞进入平台期, 此时的CCK-8读数在BI-MSC FBS血清中显著高于TBD-FBS、Trans-FBS血清( $P<0.05$ )。

**2.2.2 细胞倍增时间测定** 大鼠脂肪间充质干细胞的群体倍增时间在20%浓度下时间最短, 如表1所示, 其中BI-MSC FBS血清下所有浓度的细胞群体倍增时间均低于TBD-FBS、Trans-FBS组相同浓度下的细胞倍增时间, 大鼠脂肪间充质干细胞最短的细胞群体倍增时间为BI-MSC FBS血清20%浓度条件下的14.90±2.62 h( $P>0.05$ )。

**2.2.3 细胞克隆形成率检测** 细胞克隆形成实验的结果显示, TBD-FBS、BI-MSC FBS血清中的大鼠脂肪间充质干细胞克隆着色较为明显, 克隆面积较大, Trans-FBS血清中的细胞克隆着色较浅, 克隆面积也较小(图3A)。统计细胞克隆形成率结果表明, 血清浓度越高细胞克隆形成个数越多, 其中Trans-FBS组细胞克隆形成率相对最低, BI-MSC FBS组细胞克隆形成率相对最高, 大鼠脂肪间充质干细胞的克隆形成率最高为BI-MSC FBS血清20%浓度组的(27.33±0.58)%(图3B)。

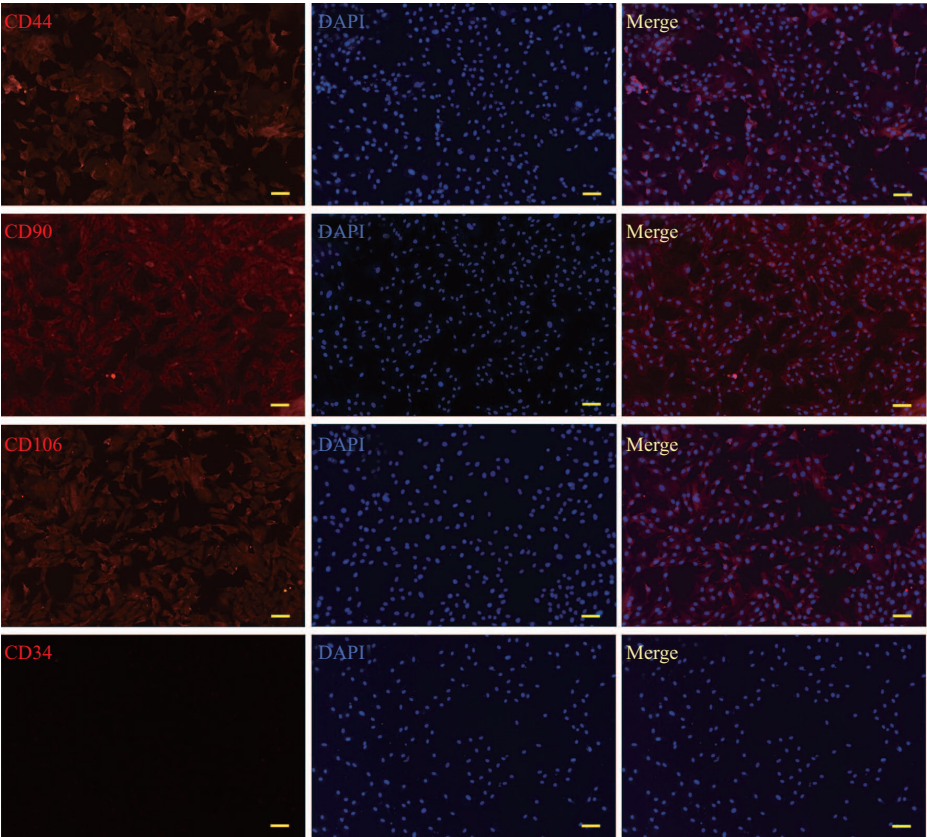


图4 大鼠脂肪间充质干细胞的免疫荧光染色(标尺=100 μm)  
Fig.4 Immunofluorescent staining of rat ADSCs (scale bars=100 μm)

2.3 细胞免疫荧光染色及流式细胞术分析

通过免疫荧光染色观察DMEM+20% BI-MSC FBS的培养基中的大鼠脂肪间充质干细胞表面CD34、CD44、CD90、CD106分子的分布情况。结果显示, 培养的大鼠脂肪间充质干细胞CD44、CD90、CD106染色呈阳性, CD34分子染色呈阴性(图4)。流式细胞术分析结果与免疫应该染色结果基本一致, 99%以上的大鼠脂肪间充质干细胞呈CD44、CD90阳性, CD106阳性细胞比例为65.81%, 无CD34阳性细胞(图5)。

2.4 细胞诱导分化

大鼠脂肪间充质干细胞在成脂诱导的第3 d, 细胞中开始出现高折光度的小脂滴, 之后脂滴逐渐融合。诱导14 d后贴壁细胞经油红O染色可见有明显着色, 表明大鼠脂肪间充质干细胞成功分化为脂肪细胞(图6A)。成骨诱导14 d后, 碱性磷酸酶染色可见细胞有明显着色, 表明大鼠脂肪间充质干细胞具有骨细胞碱性磷酸酶染色呈阳性的特点(图6B)。成软骨诱导14 d后, 阿新兰染色可见细胞有明显着色, 表明大鼠脂肪间充质干细胞可以向软骨细胞方向分化(图6C)。

3 讨论

脂肪间充质干细胞因具有无免疫排斥反应、跨胚层分化潜能的优点, 近几年来涌现了大量以脂肪间充质干细胞为组织修复材料的研究报道, 热点集中在局部缺血后的骨头/软骨修复、血管再生、心脑血管组织再生、尿路系统重建等方面<sup>[8]</sup>。如芬兰的研究者将患者自身的脂肪间充质干细胞经过生物材料塑形后植入其腹部转分化为骨和微血管后, 再移植回面部从而修复上颌骨的缺失<sup>[9]</sup>。脂肪间充质干细胞还具有分泌细胞因子如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的能力, 移植后具有促进周围微血管系统生成的作用, 因此作为细胞治疗载体或者辅助治疗手段应用时, 比其他成体干细胞的效果要好, 如脂肪间充质干细胞移植可以增强扩张皮肤的再生<sup>[10]</sup>、配合胰岛细胞移植治疗糖尿病<sup>[11]</sup>以及配合胰岛素治疗改善糖尿病雄性大鼠的勃起功能障碍<sup>[12]</sup>。由于脂肪间充质干细胞不表达主要组织相容性复合物II(major histocompatibility complex II, MHCII), 并通过前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2)等因子对移植后的混合淋巴细胞反应加以

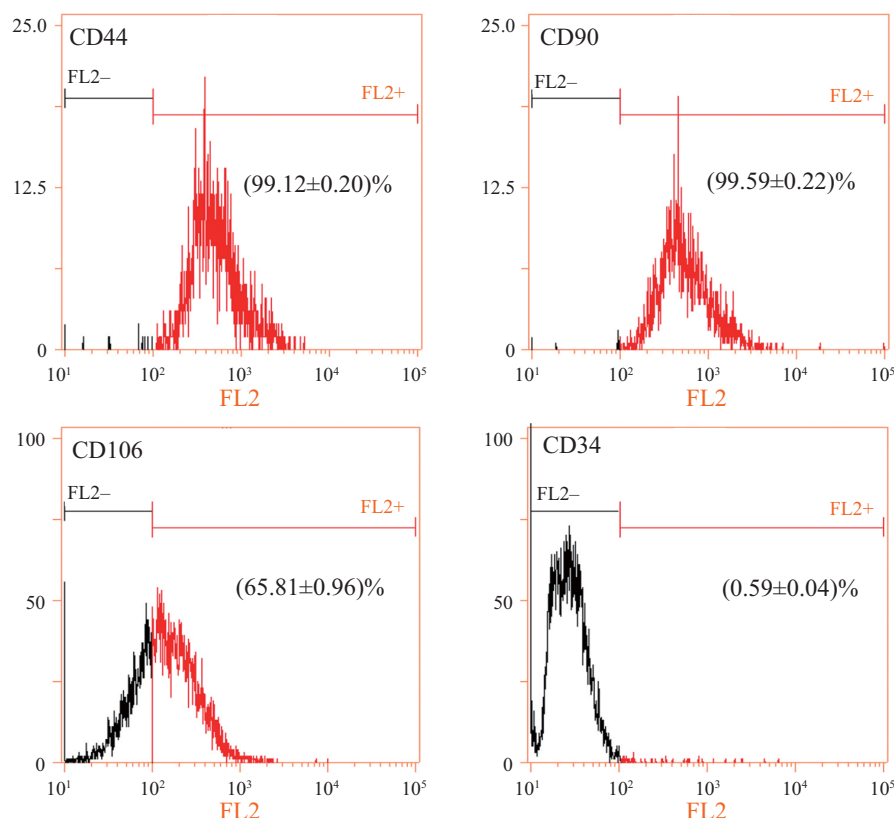
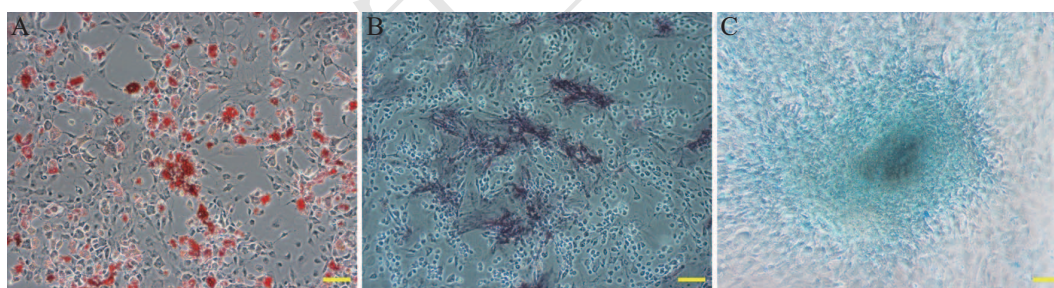


图5 大鼠脂肪间充质干细胞的流式细胞检测

Fig.5 Flow cytometry analysis of rat ADSCs



A: 成脂诱导细胞的油红O染色; B: 成骨诱导细胞的碱性磷酸酶染色; C: 成软骨诱导细胞的阿新兰染色。标尺=100 μm。

A: Oil Red O staining of adipogenic induction; B: alkaline phosphatase staining of osteogenic induction; C: Alcian Blue staining of chondrogenic induction. Scale bars=100 μm.

图6 大鼠脂肪间充质干细胞诱导后的组化染色

Fig.6 Histochemical staining of induced rat ADSCs

控制, 因此对移植物抗宿主(graft-versus-host)引起的急性反应有很好的抑制效果, 利用脂肪间充质干细胞作为免疫调节治疗(immunomodulatory therapy)手段获得了显著的疗效<sup>[4]</sup>。以上特点促使脂肪间充质干细胞成为了修复组织器官的理想种子细胞, 在临床应用方面将成为继骨髓干细胞之后的重要备选细胞。

胎牛血清是一般细胞培养中常用的血清类型,

但是其中的蛋白质组分等对于细胞的形态、生长、黏附、迁移等特性均有影响, 同时培养液的血清浓度也是影响细胞的生长状态和基因表达的重要因素<sup>[13]</sup>, 因此选择一种既能保持细胞旺盛的增殖状态与生物学特性又经济实惠的血清对于培养细胞是首要解决的问题。脂肪间充质干细胞的体外分离培养时, 通常采用10%的胎牛血清浓度可保证细胞的快速增殖, 对细胞诱导分化时则一般采用低浓度的

胎牛血清<sup>[6]</sup>。文献中通常采取观察细胞形态、增殖率、干细胞基因的表达、表面标记分子的比例与分化潜能等作为筛选血清的标准<sup>[14]</sup>,本研究在初次分离培养大鼠脂肪间充质干细胞时,选择了细胞增殖、细胞倍增时间测定、细胞克隆形成实验对三种血清进行了比较。从大鼠脂肪间充质干细胞生长曲线可以看出,BI-MSC FBS血清中的细胞接种第4 d的生长态势相对较好,表明该血清对细胞生长的促进作用优于TBD-FBS、Trans-FBS血清。大鼠脂肪间充质干细胞倍增时间因血清浓度不同而有所差异,20%浓度条件下的细胞倍增时间最短,倍增时间范围与Koellensperger等<sup>[15]</sup>的结果接近。克隆形成率可以反映细胞群体依赖性和增殖能力这两个重要性状,本研究发现,大鼠脂肪间充质干细胞随着血清浓度的增加,细胞贴壁生长形成克隆的比例越高,克隆的形态也越好,其中BI-MSC FBS血清的克隆形成率与克隆的形态明显好于其他两组,与文献报道结果相近<sup>[16-17]</sup>。本研究最终选择DMEM+20% BI-MSC FBS作为大鼠脂肪间充质干细胞的体外培养条件。但也有文章指出,高浓度血清下细胞更容易分化<sup>[18-20]</sup>,关于不同血清和浓度对于大鼠脂肪间充质干细胞分化潜能是否有影响还有待进一步的研究。

目前,脂肪间充质干细胞的分离方法绝大多数都是参考文献<sup>[7]</sup>中的酶消化法,这种方法获得的原代细胞虽然容易混杂有其他细胞,但随着传代细胞逐渐纯化。本研究中分离的大鼠脂肪间充质干细胞也表现出从原代到第3代都很容易自发地形成脂滴,但4代以后分化现象消失的情况。有研究显示,随着细胞传代CD分子的表达谱将发生变化,其中CD34阳性比例大幅下降,而CD44、CD90、CD105阳性比例逐渐升高<sup>[21]</sup>。因此,进行下一步实验前通常需要对细胞表面分子标记以及分化潜能等方面进行鉴定<sup>[22-23]</sup>,本研究中CD44和CD90阳性细胞的比例均达到99%以上,证明该培养体系可以保证大鼠脂肪间充质干细胞的纯度。而CD106分子在间充质干细胞中的表达差异较大,本研究的CD106阳性率与李东飞等<sup>[24]</sup>的结果相近。

大鼠脂肪间充质干细胞的热门研究方向集中于开发新的培养介质或者刺激因子,提高细胞被诱导分化的比例,促进细胞移植后的成活率及功能性发挥,或者是开发细胞的分化潜能,扩大其应用范

围;制作动物模型,研究细胞移植后对缺血性的脑梗/心梗、肝硬化、糖尿病、压力性尿失禁等一系列疾病的治疗效果,为临床应用奠定基础;尝试用不同方法对细胞进行标记,实时监测细胞进入受体后的迁移路径,检测标记方法的有效性和安全性;通过转基因,研究基因产物功能等;对脂肪间充质干细胞生物学特性的深入研究同样是研究的焦点之一。本研究结果表明,大鼠脂肪间充质干细胞能够成功地向脂肪、骨、软骨方向分化。

综上所述,本研究初步建立了从大鼠腹股沟部位分离获得脂肪间充质干细胞的培养体系,该体系能保持培养的脂肪间充质干细胞快速生长的能力,同时维持了细胞贴壁生长形成克隆和向脂肪、骨、软骨分化的潜能。

## 参考文献 (References)

- 1 Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13(12): 4279-95.
- 2 Gentile P, Orlandi A, Scioli MG, Di Pasquali C, Bocchini I, Cervelli V. Concise review: Adipose-derived stromal vascular fraction cells and platelet-rich plasma: Basic and clinical implications for tissue engineering therapies in regenerative surgery. *Stem Cells Transl Med* 2012; 1(3): 230-6.
- 3 Du Y, Roh DS, Funderburgh ML, Mann MM, Marra KG, Rubin JP, *et al.* Adipose-derived stem cells differentiate to keratocytes *in vitro*. *Mol Vis* 2010; 16: 2680-9.
- 4 Lin CS, Lin G, Lue TF. Allogeneic and xenogeneic transplantation of adipose-derived stem cells in immunocompetent recipients without immunosuppressants. *Stem Cells Dev* 2012; 21(15): 2770-8.
- 5 宋 杨, 王晓飞, 王宇光, 孙玉春, 吕培军. 人脂肪间充质干细胞与生物材料共混物三维打印体的体内成骨. *北京大学学报(医学版)*[Song Yang, Wang Xiaofei, Wang Yuguang, Sun Yuchun, Lü Peijun. Osteogenesis of human adipose-derived mesenchymal stem cells-biomaterial mixture *in vivo* after 3D bio-printing. *Journal of Peking University (Health Sciences)*] 2016; 48(1): 45-50.
- 6 Roxburgh J, Metcalfe AD, Martin YH. The effect of medium selection on adipose-derived stem cell expansion and differentiation: Implications for application in regenerative medicine. *Cytotechnology* 2015; 68(4): 957-67.
- 7 Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; 7(2): 211-28.
- 8 Zuk PA. The adipose-derived stem cell: Looking back and looking ahead. *Mol Biol Cell* 2010; 21(11): 1783-7.
- 9 Mesimaki K, Lindroos B, Tornwall J, Mauno J, Lindqvist C, Kontio R, *et al.* Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2009; 38(3): 201-9.

- 10 Sheng L, Yang M, Liang Y, Li Q. Adipose tissue-derived stem cells (ADSCs) transplantation promotes regeneration of expanded skin using a tissue expansion model. *Wound Repair Regen* 2013; 21(5): 746-54.
- 11 Bhang SH, Jung MJ, Shin JY, La WG, Hwang YH, Kim MJ, *et al.* Mutual effect of subcutaneously transplanted human adipose-derived stem cells and pancreatic islets within fibrin gel. *Biomaterials* 2013; 34(30): 7247-56.
- 12 Zhou F, Hui Y, Xu Y, Lei H, Yang B, Guan R, *et al.* Effects of adipose-derived stem cells plus insulin on erectile function in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int Urol Nephrol* 2016; 48(5): 657-69.
- 13 Kim SW, Kim SJ, Langley RR, Fidler IJ. Modulation of the cancer cell transcriptome by culture media formulations and cell density. *Int J Oncol* 2015; 46(5): 2067-75.
- 14 Juhl M, Tratwal J, Follin B, Sondergaard RH, Kirchhoff M, Ekblond A, *et al.* Comparison of clinical grade human platelet lysates for cultivation of mesenchymal stromal cells from bone marrow and adipose tissue. *Scand J Clin Lab Invest* 2016; 76(2): 93-104.
- 15 Koellensperger E, Bollinger N, Dexheimer V, Gramley F, Germann G, Leimer U. Choosing the right type of serum for different applications of human adipose tissue-derived stem cells: Influence on proliferation and differentiation abilities. *Cytotherapy* 2014; 16(6): 789-99.
- 16 Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res* 2007; 327(3): 449-62.
- 17 Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; 24(2): 462-71.
- 18 马 桢, 邹云增, 沈 雳, 牛玉宏, 龚 惠. 胎牛血清对脐血干细胞体外增殖和分化为内皮细胞的影响. *中国临床医学*(Ma Zhen, Zou Yunzeng, Shen Li, Niu Yuhong, Gong Hui. Effect of fetal bovine serum on proliferation and differentiation of human umbilical cord blood stem cell into endothelial cells *in vitro*. *Chinese Journal of Clinical Medicine*) 2008; 15(3): 281-4.
- 19 李 巍, 李成仁, 蔡文琴, 姚忠祥. 胎牛血清对人胚胎神经干细胞分化的影响. *第三军医大学学报*(Li Wei, Li Chengren, Cai Wenqin, Yao Zhongxiang. Effect of fetal bovine serum on differentiation of human fetal neural stem cells *in vitro*. *Journal of Third Military Medical University*) 2003; 25(1): 4-6.
- 20 暴丽华, 李振华, 孙晋浩, 丛 丽, 刘文静, 高英茂. 血清对联合培养神经上皮干细胞与Schwann细胞的影响. *山东大学学报(医学版)*[Bao Lihua, Li Zhenhua, Sun Jinhao, Cong Li, Liu Wenjing, Gao Yingmao. Influence of serum towards co-cultured neuroepithelial stem cells and Schwann cells. *Journal Of Shandong University (Health Sciences)*] 2007; 45(5): 437-40.
- 21 Baptista LS, do Amaral RJ, Carias RB, Aniceto M, Claudio-da-Silva C, Borojevic R. An alternative method for the isolation of mesenchymal stromal cells derived from lipoaspirate samples. *Cytotherapy* 2009; 11(6): 706-15.
- 22 Abdanipour A, Tiraihi T, Delshad A. Trans-differentiation of the adipose tissue-derived stem cells into neuron-like cells expressing neurotrophins by selegiline. *Iran Biomed J* 2011; 15(4): 113-21.
- 23 Nan H, Huang J, Li H, Li Q, Liu D. Assessment of biological characteristics of adipose tissue derived stem cells co-labeled with Molday ION Rhodamine B™ and green fluorescent protein *in vitro*. *Mol Med Rep* 2013; 8(5): 1446-52.
- 24 李东飞, 杨 春, 李 桢, 原玲玲, 戴景兴, 原 林. 大鼠大网膜和皮下脂肪间充质干细胞免疫表型的比较. *南方医科大学学报*(Li Dongfei, Yang Chun, Li Zhen, Yuan Lingling, Dai Jingxing, Yuan Lin. Immunophenotypic comparison of adipose-derived mesenchymal stem cells from the greater omentums and subcutaneous adipose tissues of rats. *Journal of Southern Medical University*) 2010; 30(10): 2256-8.