



脂肪干细胞成骨分化的研究进展

刘琴, 陈芳, 王丽平, 张宜*

(中国人民解放军武汉总医院医学实验科, 武汉 430070)

【摘要】 随着骨组织工程研究取得较好的发展, 涌现出各类种子细胞。脂肪干细胞, 来自脂肪组织, 具有诸多的优势, 成为骨组织工程研究的热点种子细胞之一。本文综述了脂肪干细胞成骨分化的诱导方法、过程、验证方法、影响成骨分化的供体因素和实验因素, 并对其未来研究方向进行了展望。

【关键词】 组织工程; 脂肪干细胞; 成骨分化

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2017) 05-0581-06

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2017.05.021

Research progress on osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells

LIU Qin, CHEN Fang, WANG Li-ping, ZHANG Yi*

(Department of Medical Experiments, Wuhan General Hospital of Chinese People's Liberation Army, Wuhan 430070, China)

【Abstract】 With the good progress of bone tissue engineering, various kinds of seed cells have emerged. Adipose derived stem cells (ASCs) have many advantages, and become one of the hot seed cells in bone tissue engineering. This review focused on their induction method, induction process and verification method, and the donor factors and experimental factors affecting the osteogenic differentiation were summarized. We also looked forward the future research interest of ASCs' osteogenic differentiation.

【Key words】 Tissue engineering; Adipose-derived stem cells; Osteogenic differentiation

Corresponding author: ZHANG Yi. E-mail: abcd1566@sina.com

1993年, Langer 和 Vacanti 首次提出了组织工程的基本含义^[1]。随后组织工程尤其是骨组织工程取得了飞速的发展。骨组织工程的进步为骨缺损修复提供了新的思路, 在一定程度上克服了传统骨缺损修复所存在的缺点, 如免疫排斥反应、二次损伤、可移植部位及数量有限等^[2]。骨组织工程的关键之一是选择合适的种子细胞。脂肪干细胞因其具有来源丰富、取材简便、多向分化能力等特点, 是骨组织工程理想的种子细胞之一^[3]。目前, 关于脂肪干细胞成骨分化的研究已比较多, 但是在很多方面仍缺乏系统的归纳与总结。故, 本文综述了脂肪干细胞成骨分化的诱导方法、过程、验证方法, 影响成

骨分化的供体因素和实验因素, 并对其未来研究方向进行了展望。

1 诱导脂肪干细胞成骨分化的方法

1.1 化学诱导法

化学诱导法是目前最常用的成骨分化方法。最早发现脂肪干细胞存在的研究者为 Zuk 等^[3], 他们将含有适宜浓度 β 甘油磷酸钠 (β -glycerophosphate, β -GP)、抗坏血酸 (vitamin C, VC)、维生素 D、地塞米松 (dexamethasone, Dex) 的培养液作为脂肪干细胞的成骨诱导液。随后研究者们将 Zuk 等采用的脂肪干细胞成骨诱导液组分作为经典的参考。

【作者简介】 刘琴(1986-), 女, 技师, 硕士, 从事细胞生物学和分子生物学方面的研究。E-mail: liuqin_0629@163.com

【通讯作者】 张宜(1965-), 男, 硕士, 主任药师, 从事药理学信息研究。E-mail: abcd1566@sina.com

大部分研究者所用的成骨诱导液成分大致相同,但组分的浓度存在很大差异,不同种属脂肪干细胞成骨诱导液组分浓度不同,即使是同一种属分离出来的脂肪干细胞成骨诱导液组分浓度也存在区别。 β -GP 在使用浓度上存在的差异不大,大部分研究者使用 10 mmol/L β -GP,仅少数采用 2 mmol/L。维生素 D 不是成骨诱导液配方的主流。VC 的浓度存在较大差异,50 ng/mL、50 μ g/mL、100 μ g/mL、50 mg/mL 均有。Dex 浓度为 1、10、100 nmol/L,特别的是有些研究者并未使用地塞米松。王伟等^[5]分别用含 0、1 nmol/L、10 nmol/L、100 nmol/L、1 μ mol/L、10 μ mol/L Dex 的成骨诱导培养液进行脂肪干细胞成骨诱导,发现随着 Dex 浓度的增加,细胞的增殖活性下降,10 μ mol/L 组细胞均死亡;成骨特异性基因骨钙素和核心结合因子 α 1 (core binding factor α 1, Cbfa1) 又称 Runx2 也受到相应的影响,认为 10 nmol/L Dex 组成的成骨诱导液在使细胞增殖活性受到较小抑制的同时取得更好的成骨诱导效果。王伟等的实验同时也证实 Dex 不是脂肪干细胞向成骨细胞分化的必备条件。Kyllönen 等^[6]比较了人脂肪干细胞在 10 mmol/L β -GP + 50 μ mol/L VC + 100 nmol/L Dex、10 mmol/L β -GP + 150 μ mol/L VC + 10 nmol/L Dex、10 mmol/L β -GP + 250 μ mol/L VC + 5 nmol/L Dex 三种成骨诱导培养液条件下的成骨能力,发现在 10 mmol/L β -GP + 250 μ mol/L VC + 5 nmol/L Dex 条件下成骨能力最强,在 10 mmol/L β -GP + 50 μ mol/L VC + 100 nmol/L Dex 条件下成骨能力最弱,表明成骨诱导液中各组分浓度的不同影响脂肪干细胞的成骨能力。

1.2 细胞共培养法

细胞共培养技术是将两种或两种以上的细胞共培养于同一种环境中,此法的优点在于能够更好地反映体内微环境中细胞间的相互作用关系。Correia 等^[7]将大鼠脂肪干细胞与血管内皮细胞装入由多聚 L-赖氨酸、海藻酸钠、壳聚糖逐层组装成的半透膜胶囊内,再将此胶囊培养于不含成骨诱导因子的内皮细胞培养液内,发现脂肪干细胞能够分化为成骨细胞,可能的机制为此胶囊在成骨分化中起着血管内皮生长因子和骨形成蛋白-2 (bone morphogenetic protein 2, BMP-2) 的作用。Liu 等^[8]将兔脂肪干细胞与成骨细胞共培养于含 5% 或 10% 胎牛血清的培养液中,发现诱导后第 7 天部分兔脂肪干细胞变圆,第 14 天茜素红染色阳性、碱性磷酸酶染色阳性。

1.3 自发成骨法

自发成骨法即在不添加成骨诱导相关因子的前提下,脂肪干细胞能够分化为成骨细胞,茜素红染色为阳性并表达成骨细胞相关的基因。Liu 等^[9]取传代至第 12 代大鼠脂肪干细胞以正常密度接种,或者取第 3 代大鼠脂肪干细胞以低密度接种,在不加任何成骨诱导因子的前提下,均能够自发成骨,表明连续传代一定时间后或者以低密度接种的大鼠脂肪干细胞具有自发成骨的能力。

1.4 其他方法

Carbone 等^[10]首先把骨髓干细胞分化为成骨细胞,收集分化过程中的上清液,再将此上清液来培养人脂肪干细胞,人脂肪干细胞能够向成骨细胞分化。Oliveira 等^[11]在脂肪干细胞基础培养液中加入甲基丙烯酸酯结冷胶水凝胶或者含有不同浓度 I 型胶原蛋白的甲基丙烯酸酯结冷胶水凝胶,人脂肪干细胞能够分化为成骨细胞,可能的机制是依赖于肌球蛋白-肌球蛋白收缩通路的力传导现象。Shiraishi 等^[12]在培养液中添加 300 ~ 500 ng/mL BMP-2 而不添加成骨诱导因子,脂肪干细胞分化为成骨细胞。Ren 等^[13]将 pcDNA3.1-hBMP-7 转染兔脂肪干细胞,兔脂肪干细胞可以分化为成骨样细胞。

2 脂肪干细胞成骨分化的过程

脂肪干细胞分化为成熟的骨组织需要经历两个阶段,第一阶段大致为脂肪干细胞先后经历成骨干细胞、成骨前体细胞、过渡性成骨细胞 3 个过程直到成骨细胞成熟,第二阶段为成熟的成骨细胞增殖,分泌骨基质,骨基质钙化,即钙结节的出现,钙结节的生成是脂肪干细胞能够分化为成骨细胞的有力证据^[14]。脂肪干细胞在向成骨细胞分化的过程中细胞形态也发生了相应的变化,体外诱导 5 d 左右,少量细胞的形态由长梭形变为多角形、类圆形或者不规则形;而后随着诱导时间的增加,可见细胞呈明显的簇状生长;14 d 左右细胞行茜素红染色,即可见到深红色的矿化钙结节^[15]。

3 验证脂肪干细胞分化成骨的方法

脂肪干细胞在向成骨细胞分化的过程中会产生特异性的蛋白、受体、因子等,如碱性磷酸酶 (ALP)、矿化结节、成骨细胞相关基因与蛋白等。

3.1 碱性磷酸酶检测

碱性磷酸酶是成骨分化早期的特异性标志酶,

在诱导 3~4 d 左右出现,1~2 周时表达量处于较高水平,随后下降,故大多数研究者在脂肪干细胞成骨诱导后 1 周或 2 周时进行碱性磷酸酶的检测。此酶的检测有 2 种方法,一是染色法进行定性检测,如 Gomori 钙钴法、偶氮偶联法又称偶联法;二是用碱性磷酸酶染色试剂盒进行定量检测。

3.2 钙结节染色法

钙结节是脂肪干细胞向成骨细胞诱导分化最后阶段形成的细胞外基质,大多数研究者在成骨诱导后 2 周或 3 周时进行钙结节染色。钙结节染色方法有 2 种:茜素红染色法、von Kossa's 染色法。

3.3 相关基因或蛋白检测

脂肪干细胞在成骨诱导分化下,可表达一系列成骨细胞相关的基因和蛋白,如 Runx2、碱性磷酸酶、I 型胶原、骨钙蛋白(osteocalcin, OCN)、骨钙素(osteocalcin, OC)、骨粘连蛋白、骨唾液蛋白(bone sialoprotein, BSP)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、BMP-2、BMP-4、BMP-6、BMP-7、BMP-8、BMP-9 等^[14]。

3.4 其他验证方法

葛雯姝等^[16]把含有 OC 基因启动子的荧光素酶报告载体 pLVX-OC_{pro}-Luc-Puro 进行慢病毒包装后感染人脂肪干细胞,嘌呤霉素筛选得到稳定整合 OC_{pro}-Luc-Puro 的细胞株,将此细胞株进行成骨诱导,在诱导的第 7 天和第 14 天进行相关检测,发现荧光素酶表达的趋势与茜素红染色定量及成骨相关基因表达水平一致。该荧光素酶报告系统可以实时评价人脂肪干细胞成骨分化情况,为成骨检测提供了一种新的方法,并且借助此系统可以高通量筛选影响人脂肪干细胞成骨分化的重要因子。

4 影响脂肪干细胞成骨分化的供体因素和实验因素

4.1 供体因素

4.1.1 供体种属

目前已从人、鼠、马、兔、猪等分离培养出脂肪干细胞,但是从不同种属分离出来的脂肪干细胞其成骨能力存在着不同。Ni 等^[17]比较了人、大鼠、兔皮下脂肪来源脂肪干细胞成骨能力的差异,与人、大鼠相比,兔脂肪干细胞成骨分化能力较差。李江璇等^[18]研究也发现与人脂肪干细胞相比,兔脂肪干细胞成骨能力较弱,认为在进行成骨分化研究时不作为首选细胞。

4.1.2 供体年龄

研究者们对供体年龄是否影响脂肪干细胞成骨分化的能力未达成共识。Shi 等^[19]、Ding 等^[20]认为年龄与人脂肪干细胞成骨能力无关。而 Kornicka 等^[21]的研究发现随着供体年龄的增加,人脂肪干细胞成骨能力下降,成脂能力增加。Ye 等^[22]比较了不同年龄阶段的人下眼睑突出脂肪垫的脂肪干细胞,发现年龄影响脂肪干细胞的成骨能力。

4.1.3 供体性别

Aksu 等^[23]认为男性来源的脂肪干细胞成骨分化能力优于女性来源的脂肪干细胞,说明供体性别影响着脂肪干细胞成骨分化的能力。

4.1.4 供体健康状态

目前对供体健康状态对脂肪干细胞成骨分化能力的影响报道不一致。Eterno 等^[24]认为正常人和从乳腺癌患者提取的脂肪干细胞的成骨分化能力无明显区别。Marycz 等^[25]从患有代谢综合征马尾处获得的脂肪干细胞的成骨能力与健康马脂肪干细胞相比,前者的成骨能力下降,其机制是通过破坏线粒体的结构从而降低 BMP-2 和 I 型胶原的表达。Strong 等^[26]、De Girolamo 等^[27]比较了来源于消瘦者和肥胖者的脂肪干细胞的成骨能力,发现肥胖抑制脂肪干细胞的成骨能力。Cheng 等^[28]研究认为来源于糖尿病人与健康人的脂肪干细胞的成骨能力无区别。报道存在差异的原因可能是供体种属和所患病症不同。

4.1.5 脂肪取材部位

脂肪获取部位对脂肪干细胞成骨分化能力的影响仍未达成共识。Jurgens 等^[29]认为取材部位不影响人脂肪干细胞成骨分化的能力。De Girolamo 等^[27]认为来源于皮下和内脏的人脂肪干细胞有着不同的成骨能力。Russo 等^[30]比较了来源于人皮下、大网膜、胸廓内的脂肪干细胞成骨能力,发现来源于大网膜的人脂肪干细胞成骨能力最强。Di Taranto 等^[31]认为来源于浅层脂肪组织的人脂肪干细胞的成骨能力优于来源于深层脂肪组织的人脂肪干细胞的成骨能力。Requicha 等^[32]认为来源于皮下和大网膜的犬脂肪干细胞的成骨分化能力有着不同。另有研究者比较了来源于兔腹股沟、腹膜后、颈背部三种脂肪干细胞的成骨能力,发现在成骨诱导中以腹股沟部脂肪干细胞形成的结节最大,腹股沟部脂肪干细胞的碱性磷酸酶活性高于腹膜后及颈背部^[33]。Ardeshiryajimi 等^[34]研究发现来源于驼峰的

脂肪干细胞的成骨能力比来源于腹部的脂肪干细胞的成骨能力强。

4.2 实验因素

4.2.1 取材方法

Duscher 等^[35]、Barzelay 等^[36]、Panetta 等^[37]认为由抽脂术或组织切除术获得的人脂肪干细胞的成骨能力无区别。然而, Gnanasegaran 等^[38]认为由抽脂术获得的人脂肪干细胞的成骨能力强于由组织切除术获得的人脂肪干细胞的成骨能力。

4.2.2 分离方法

不同分离方法对脂肪干细胞的成骨能力有着不同的影响。Markarian 等^[39]比较了 0.1% I 型胶原酶消化 30 min、12.5 μg/mL 胰酶消化 30 min 或 60 min、25 μg/mL 胰酶消化 30 min 或 60 min、37.5 μg/mL 胰酶消化 30 min 几种分离方法所得人脂肪干细胞的成骨能力,发现由 12.5 μg/mL 胰酶消化 60 min、25 μg/mL 胰酶消化 60 min 获得的脂肪干细胞的成骨能力优于其他几种方法。

4.2.3 培养液

培养液的种类、血清浓度、糖浓度都可在一定程度上影响脂肪干细胞成骨分化的能力。①基础培养液:在目前已报到的成骨诱导液组成成分中,基础培养液的种类很多,基础培养液种类的不同可能影响脂肪干细胞成骨分化的能力。Roxburgh 等^[40]比较了 DMEM-H + 10% FBS、DMEM-L + 10% FBS、M199 + 10% FBS + 5 ng/mL 肝素 + 2 ng/mL FGF、DMEM-F12 + 10% FBS、advanced DMEM; F12 + 2% FBS、IMDM; HAM's F12 1:1 + 10% FBS 几种培养条件下人脂肪干细胞的成骨能力,认为其在 DMEM-H + 10% FBS、DMEM-L + 10% FBS、IMDM; HAM's F12 1:1 + 10% FBS 三种条件下的成骨能力比较好。②血清:血清的种类、浓度也在一定程度上影响着脂肪干细胞的成骨分化。大多数研究者采用的血清体积分数为 10%,过低或过高都不利于脂肪干细胞成骨分化。Kyllönen 等^[6]比较了人脂肪干细胞在含人血清、无血清、胎牛血清 3 种成骨诱导培养液条件下的成骨能力,发现其在含胎牛血清成骨诱导培养液中的成骨能力最弱。Sato 等^[41]用无血清培养体系培养人脂肪干细胞,与含血清体系培养人脂肪干细胞相比,前者体内体外的成骨能力都更强。③糖浓度:Cheng 等^[28]将来源于健康供体的人脂肪干细胞分别培养于含高糖(4.5 g/L)和低糖(1.0 g/L)的成骨诱导液中,发现人脂肪干细胞在两种条件的成骨能

力无区别,只是在高糖条件下人脂肪干细胞的细胞迁移力降低、衰老增加,并且氧化反应水平高。

4.2.4 细胞代数

对于细胞代数对脂肪干细胞成骨能力的影响还存在一定的争议。Liu 等^[9]比较了第 3 ~ 12 代大鼠脂肪干细胞的成骨能力,发现随着传代次数的增加大鼠脂肪干细胞成骨能力增强,有趣的是成脂能力反而下降。El Atat 等^[42]比较了第 1 ~ 4 代人脂肪干细胞的成骨能力,发现细胞代数并不影响人脂肪干细胞的成骨能力。Yu 等^[43]认为随着细胞代数增加人脂肪干细胞成骨能力下降,第 10 代是人脂肪干细胞各项功能的临界点。

4.2.5 冻存

目前关于冻存对脂肪干细胞成骨能力影响的报道不统一。López 等^[44]认为冻存人脂肪干细胞复苏后其成骨能力与冻存前相比没有变化。Shah 等^[45]认为冻存降低人脂肪干细胞的成骨能力。James 等^[46]通过体内体外实验发现冻存影响人脂肪干细胞的成骨能力。

4.2.6 细胞融合度

张彬等^[47]将初始密度相同的大鼠脂肪干细胞接种到培养皿,分别在细胞接种时、50% ~ 60% 融合时、85% ~ 95% 融合时加入成骨诱导培养液,发现在 85% ~ 95% 融合时加入成骨诱导培养液大鼠脂肪干细胞的成骨能力最强。

4.2.7 细胞倍增次数

细胞倍增次数在一定程度上影响着脂肪干细胞的成骨能力。Plastini 等^[48]的研究发现脂肪干细胞细胞倍增次数在 6.1 ~ 6.2 区间时,不影响其成骨能力;而长期培养后细胞倍增次数达 10.1 时,其成骨能力下降。

5 总结与展望

脂肪干细胞是骨组织工程热门的种子细胞之一,最主要的原因是脂肪干细胞具有取材方便、低免疫原性、成骨分化的能力等特性。脂肪干细胞成骨分化的方法有化学诱导法、细胞共培养法、自发成骨法等,化学诱导法仍是主流的方法,但是目前关于成骨诱导培养液中各组分的浓度存在很大的差异,已有研究者证实各组分的差异会导致成骨能力存在不同。验证成骨分化是否成功需结合碱性磷酸酶、钙结节、相关成骨基因的几个方面进行检测。

本文还从供体因素和实验因素两个角度总结了

影响脂肪干细胞成骨分化的部分因素。不同供体种属来源的脂肪干细胞成骨能力存在差异,从已发表的研究来看,兔脂肪干细胞成骨能力比人脂肪干细胞成骨能力差,有的研究者甚至建议进行成骨分化研究时不考虑将兔脂肪干细胞作为首选细胞。供体性别对脂肪干细胞成骨分化影响的研究较少。供体年龄、健康状态、脂肪取材部位是否对脂肪干细胞成骨分化造成影响还有待进一步研究。脂肪组织取材方法、分离方法、培养液、细胞代数、冻存、细胞融合度、细胞倍增次数都在一定程度上影响脂肪干细胞成骨能力,但是对于取材方法、细胞代数和冻存是否对脂肪干细胞成骨能力造成影响还有一定的争议。从已有研究来看,进行脂肪干细胞成骨研究时,研究者推荐采用的培养液有 DMEM-L + 10% FBS、IMDM; HAM's F12 1:1 + 10% FBS,新鲜未冻存不超过第 10 代的脂肪干细胞进行成骨诱导分化研究。

鉴于脂肪干细胞在骨组织工程中的重要性,有以下两个方面是亟需解决的:①找到不同种属脂肪干细胞成骨诱导培养液各组分最佳浓度的统一不同种属脂肪干细胞成骨诱导培养液组分的浓度;②弄清楚上述对脂肪干细胞成骨分化影响存在争议的事项,包括供体年龄、供体健康状态、脂肪取材部位、细胞代数和冻存。

参 考 文 献

- [1] Langer R, Vacanti V. Tissue engineering [J]. Science, 1993, 260: 920 - 926.
- [2] 宋菊青,施雪涛,王进军. 骨膜组织工程的研究进展 [J]. 中国材料进展, 2016, 35(6): 461 - 465.
- [3] 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.
- [4] Valle YL, Almalki SG, Agrawal DK. Vitamin D machinery and metabolism in porcine adipose-derived mesenchymal stem cells [J]. Stem Cell Res Ther, 2016, 7(1): 118.
- [5] 王伟,陈磊杰,张晨,等. 不同浓度地塞米松诱导脂肪干细胞成骨分化的实验研究 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2011, 25(12): 1486 - 1492.
- [6] Kyllönen L, Haimi S, Mannerström B, et al. Effects of different serum conditions on osteogenic differentiation of human adipose stem cells in vitro [J]. Stem Cell Res Ther, 2013, 4(1): 17.
- [7] Correia CR, Pirraco RP, Cerqueira MT, et al. Semipermeable capsules wrapping a multifunctional and self-regulated co-culture microenvironment for osteogenic differentiation [J]. Sci Rep, 2016, 6: 21883.
- [8] Liu DC, Yang XN, Huang CZ, et al. Experimental study on co-culturing adipose-derived stem cells with osteoblasts under different conditions [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20(17): 3535 - 3543.
- [9] Liu Y, Zhang Z, Zhang C, et al. Adipose-derived stem cells undergo spontaneous osteogenic differentiation in vitro when passaged serially or seeded at low density [J]. Biotech Histochem, 2016, 91(5): 369 - 376.
- [10] Carbone A, Valente M, Annacontini L, et al. Adipose-derived mesenchymal stromal (stem) cells differentiate to osteoblast and chondroblast lineages upon incubation with conditioned media from dental pulp stem cell-derived osteoblasts and auricle cartilage chondrocytes [J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2016, 30(1): 111 - 122.
- [11] Oliveira MB, Custódio CA, Gasperini L, et al. Autonomous osteogenic differentiation of hASCs encapsulated in methacrylated gellan-gum hydrogels [J]. Acta Biomater, 2016, 41: 119 - 132.
- [12] Shiraishi T, Sumita Y, Wakamatsu Y, et al. Formation of engineered bone with adipose stromal cells from buccal fat pad [J]. J Dent Res, 2012, 91(6): 592 - 597.
- [13] Ren Y, Han C, Wang J, et al. hBMP-7 induces the differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into osteoblast-like cells [J]. Genet Mol Res, 2016, 15(3): gmr. 15038791.
- [14] 陈犹白,陈聪慧, Qixu Zhang, 等. 脂肪干细胞成骨分化的研究进展 [J]. 中华损伤与修复杂志(电子版), 2016, 11(2): 126 - 134.
- [15] 刘琴,王丽平,喻晶,等. 组织块贴壁法扩增兔脂肪干细胞 [J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(1): 88 - 93.
- [16] 葛雯妹,汤熳,张晓,等. 构建一种可评价脂肪间充质干细胞成骨向分化的荧光素酶报告系统 [J]. 北京大学学报, 2016, 48(1): 170 - 174.
- [17] 倪永伟,周永胜,刘云松,等. 人、兔、大鼠脂肪基质细胞的生物学性状对比 [J]. 北京大学学报医学版 2009, 41(1): 95 - 99.
- [18] 李江璇,肖丽玲,饶从强,等. 人与大鼠脂肪干细胞提取方法及生物学特性的比较研究 [J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2015, 36(4): 324 - 329.
- [19] Shi Y, Niedzinski JR, Samaniego A, et al. Adipose-derived stem cells combined with a demineralized cancellous bone substrate for bone regeneration [J]. Tissue Eng Part A, 2012, 18(13 - 14): 1313 - 1321.
- [20] Ding DC, Chou HL, Hung WT, et al. Human adipose-derived stem cells cultured in keratinocyte serum free medium: Donor's age does not affect the proliferation and differentiation capacities [J]. J Biomed Sci, 2013, 20: 59.
- [21] Kornicka K, Marycz K, Tomaszewski KA, et al. The effect of age on osteogenic and adipogenic differentiation potential of human adipose derived stromal stem cells (hASCs) and the impact of stress factors in the course of the differentiation process [J]. Oxid Med Cell Longev, 2015, 2015: 309169.
- [22] Ye X, Liao C, Liu G, et al. Age-related changes in the regenerative potential of adipose-derived stem cells isolated from the prominent fat pads in human lower eyelids [J]. PLoS One, 2016, 11(11): e0166590.

- [23] Aksu AE, Rubin JP, Dudas JR, et al. Role of gender and anatomical region on induction of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells [J]. *Ann Plast Surg*, 2008, 60(3): 306–322.
- [24] Eterno V, Zambelli A, Pavesi L, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs) may favour breast cancer recurrence via HGF/c-Met signaling [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(3): 613–633.
- [25] Marycz K, Kornicka K, Marędzia M, et al. Equine metabolic syndrome impairs adipose stem cells osteogenic differentiation by predominance of autophagy over selective mitophagy [J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(12): 2384–2404.
- [26] Strong AL, Hunter RS, Jones RB, et al. Obesity inhibits the osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells [J]. *J Transl Med*, 2016, 14: 27.
- [27] De Girolamo L, Stanco D, Salvatori L, et al. Stemness and osteogenic and adipogenic potential are differently impaired in subcutaneous and visceral adipose derived stem cells (ASCs) isolated from obese donors [J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2013, 26(Suppl 1): 11–21.
- [28] Cheng NC, Hsieh TY, Lai HS, et al. High glucose-induced reactive oxygen species generation promotes stemness in human adipose-derived stem cells [J]. *Cytotherapy*, 2016, 18(3): 371–383.
- [29] Jurgens WJ, Oedayrajsingh-Varma MJ, Helder MN, et al. Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies [J]. *Cell Tissue Res*, 2008, 332(3): 415–426.
- [30] Russo V, Yu C, Belliveau P, et al. Comparison of human adipose-derived stem cells isolated from subcutaneous, omental, and intrathoracic adipose tissue depots for regenerative applications [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2014, 3(2): 206–217.
- [31] Di Taranto G, Cicione C, Visconti G, et al. Qualitative and quantitative differences of adipose-derived stromal cells from superficial and deep subcutaneous lipospirates: a matter of fat [J]. *Cytotherapy*, 2015, 17(8): 1076–1089.
- [32] Requicha JF, Viegas CA, Albuquerque CM, et al. Effect of anatomical origin and cell passage number on the stemness and osteogenic differentiation potential of canine adipose-derived stem cells [J]. *Stem Cell Rev*, 2012, 8(4): 1211–22.
- [33] 尉志刚, 王东. 兔不同部位脂肪间充质干细胞成骨能力的差异 [J]. *中国医疗前沿*, 2012, 7(2): 19–20.
- [34] Ardashiryajimi A, Rafeie F, Zandi-Karimi A, et al. Fat harvesting site is an important determinant of proliferation and pluripotency of adipose-derived stem cells [J]. *Biologicals*, 2016, 44(1): 12–18.
- [35] Duscher D, Luan A, Rennert RC, et al. Suction assisted liposuction does not impair the regenerative potential of adipose derived stem cells [J]. *J Transl Med*, 2016, 14(1): 126.
- [36] Barzelay A, Levy R, Kohn, et al. Power-assisted liposuction versus tissue resection for the isolation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: phenotype, senescence, and multipotency at advanced passages [J]. *Aesthet Surg J*, 2015, 35(7): NP230–240.
- [37] Panetta NJ, Gupta DM, Kwan MD, et al. Tissue harvest by means of suction-assisted or third-generation ultrasound-assisted liposuction has no effect on osteogenic potential of human adipose-derived stromal cells [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2009, 124(1): 65–73.
- [38] Gnanasegaran N, Govindasamy V, Musa S, et al. Different isolation methods alter the gene expression profiling of adipose derived stem cells [J]. *Int J Med Sci*, 2014, 11(4): 391–403.
- [39] Markarian CF, Frey GZ, Silveira MD, et al. Isolation of adipose-derived stem cells: a comparison among different methods [J]. *Biotechnol Lett*, 2014, 36(4): 693–702.
- [40] Roxburgh J, Metcalfe AD, Martin YH, et al. The effect of medium selection on adipose-derived stem cell expansion and differentiation: implications for application in regenerative medicine [J]. *Cytotechnology*, 2016, 68(4): 957–967.
- [41] Sato K, Itoh T, Kato T, et al. Serum-free isolation and culture system to enhance the proliferation and bone regeneration of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2015, 51(5): 515–529.
- [42] 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.
- [43] Yu G, Wu X, Dietrich MA, et al. Yield and characterization of subcutaneous human adipose-derived stem cells by flow cytometric and adipogenic mRNA analyzes [J]. *Cytotherapy*, 2010, 12(4): 538–546.
- [44] López M, Bollag RJ, Yu JC, et al. Chemically defined and xenon-free cryopreservation of human adipose-derived stem cells [J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0152161.
- [45] Shah FS, Li J, Zanata F, et al. The relative functionality of freshly isolated and cryopreserved human adipose-derived stromal/stem cells [J]. *Cells Tissues Organs*, 2015–16, 201: 436–444.
- [46] James AW, Levi B, Nelson ER, et al. Deleterious effects of freezing on osteogenic differentiation of human adipose-derived stromal cells in vitro and in vivo [J]. *Stem Cells Dev*, 2011, 20(3): 427–439.
- [47] 张彬, 王东, 孙海钰, 等. 不同诱导时间下大鼠脂肪间充质干细胞成骨的差异 [J]. *中国医疗前沿*, 2011, 6(4): 38–43.
- [48] Plastini MA, Kappy N, Chang S, et al. Effect of population doublings on differentiation capacity of human adipose-derived stem cells: establishing standard guidelines for clinical translational applications [J]. *Int J Stem Cell Res Transplant*, 2016, S2: 001, 1–7.