

Beagle 犬上皮细胞原代培养鉴定及脂肪干细胞诱导成肌的实验研究

刘杰 傅强

【摘要】 目的 探讨犬脂肪干细胞(ADSCs)诱导成肌细胞及犬表皮细胞的原代培养方法的可行性。**方法** 取雌性 Beagle 犬腹股沟处皮下脂肪组织和犬口腔黏膜上皮组织,使用酶消化法行 ADSCs 和表皮细胞原代培养,并对所培养的细胞表面标志进行相关鉴定;取第 1 代培养至对数生长期细胞分为实验组 A 和对照组 B 两组,诱导剂为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-氮杂胞苷(5-aza),每日倒置显微镜下观察细胞形态变化,并在诱导的第 7、14、21、28 天行细胞免疫荧光和流式细胞仪检测其成肌细胞特异性抗原 desmin 和 myosin 的表达情况。**结果** 成功从犬腹股沟部皮下脂肪组织和犬口腔黏膜上皮组织中分离、培养出 ADSCs 和表皮细胞。上皮细胞生长较缓慢,原代需培养 20 d 方能达到 100 mm 培养皿的 80% 左右,传代后生长速度明显加快,一般 10 d 就能达到 100 mm 培养皿的 80%;细胞鉴定采用国际上上皮类组织比较常用的 AE1/AE3 来鉴定,荧光及流式结果让人满意。在倒置显微镜下观察细胞形态变化显示:诱导组细胞诱导 3 周呈现成肌细胞特有的漩涡样生长形态,在诱导的第 4 周单个细胞表现出多核化;免疫荧光和流式细胞仪检测显示:desmin 和 myosin 的表达率在诱导 28 d 时达最高,分别为 59.4% 和 56.1%,而诱导前和对照组细胞均呈阴性表达。**结论** 总之,由于经济及技术方面存在诸多问题,以至于国内使用犬作为实验动物的很少,且从犬取材获取相应细胞的实验国内少见。本实验通过诱导培养获得成肌细胞,通过原代培养获得上皮细胞,可用做组织工程化尿道修复的种子细胞。

【关键词】 动物,实验; 成肌细胞; Beagle 犬; 脂肪干细胞

The experimental study of primary culture of beagle dogs' epidermal cells and beagle dogs' adipose-derived stem cells differentiation induction into myoblasts LIU Jie, FU Qiang. Graduate Department of Soochow University, Suzhou 215006, China

Corresponding author: FU Qiang, Email: jamesqfu@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To explore the method of culture of beagle dogs adipose-derived stem cells (ADSCs) and differentiation induction into myoblasts and epidermal cells' primary culture. **Methods** Adipose and oral epithelial tissues were obtained from beagle dogs, and were isolated by enzyme digestion and cultured into ADSCs and epidermal cells. Cell growth slowly to about 80% of culture dish passaged line treatment; observed changes in cell morphology under inverted microscope daily; immunofluorescence and flowcytometry were utilized to detect the expression of marker proteins AE 1/AE3. The expression of surface antigen CD90, CD105 and CD34 was detected by immunofluorescence and flow cytometry. ADSCs of the second passage with logarithmic growth were obtained, and culture media containing 5-azacytidine (5-aza) and basic culture media were employed for cells in induction group and control group, respectively. The induction lasted for 7 d, 14 d, 21 d and 28 d, respectively. Cell growth and cell morphology were observed by inverted phase contrast microscope, and immunofluorescence and flowcytometry were utilized to detect the expression of myoblast specific antigens desmin and myosin. **Results** ADSCs and epidermal cells were successfully isolated and cultured, and were identified to be stem cells. Epidermal cells grow slowly. On the 20th day of primary culture, the cell can achieve about 80% of the

100 mm culture dish. After passage growth is significantly faster, it needs 10 day to achieve the same area. It was revealed by immunofluorescence and flowcytometry that the result of epidermal cell's specific antigens-AE1/AE3 is satisfactory. On the 21th day of induction, cells in induction group displayed "swirl" morphology, and in the 4th week of induction, multinucleation was observed. It was revealed by immunofluorescence and flowcytometry that the highest expression rates of desmin and myosin were 59.4% and 56.1%, respectively on the 28th day of induction, while there was no expression before induction and in control group.

Conclusions In short, because there are many problems of economic and technical aspects, so that dogs in domestic laboratory are not common. Beagle dogs ADSCs can differentiate induction into myoblasts, epidermal cells' expression of marker proteins is in accordance with pertinent literature.

【Key words】 Animals, laboratory; Myoblasts; Beagle dogs; Adipose-derived stem cell

尿道重建仍然是泌尿外科临床治疗中的一个难题。目前对复杂性尿道狭窄患者的治疗往往需要通过游离组织来进行替代修复重建。以往文献中口腔颊黏膜、舌黏膜乃至结肠黏膜等均已有过成功治疗报道^[1-3]。组织工程的出现为这些问题的解决提供了一种可行的方法。组织工程主要由种子细胞、支架材料和细胞因子三部分组成。国际上常用的修复方法无外乎两种,即单纯支架材料修复缺损和复合种子细胞的支架材料修复缺损,后者在修复面积较大,深度较深的缺损方面具有明显优势。种子细胞选择是组织工程化尿道修复的关键所在。目前国内应用脂肪组织分离培养干细胞及使用口腔黏膜上皮细胞分离培养上皮细胞有相关报道^[4],但以犬为实验动物的鲜有报道。本实验对 Beagle 犬脂肪干细胞(ADSCs)进行了分离和体外培养,并实现了向肌细胞方向诱导分化;以及对 Beagle 犬表皮细胞进行了原代培养及鉴定,旨在为使用犬进行组织工程化尿道修复提供可靠的种子细胞。

材料与方 法

一、材料

1. 实验动物:饲养2年的雄性 Beagle 犬,体重 10.2 kg,由上海交通大学附属第六人民医院动物实验中心提供,实验动物机构许可证号 SYKK(沪)2009-0025。动物级别:Ⅱ级。以上动物均以正常饲料喂养。

2. 实验试剂:5-氮杂胞苷(5-aza)(Sigma,美国)、I型胶原酶(Sigma,美国);低糖 DMEM 培养液(含 10% 胎牛血清、50 mg/L 维生素 C、394 mg/L 谷氨酰胺、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素);胎牛血清、山羊血清、马血清及 0.25% 胰蛋白酶+0.05 mmol/L EDTA(GIBCO 公司);无钙镁离子的磷酸缓冲液(PBS)(自行配制);I型胶原酶(Worthington 公司);dispase-II(Worthington 公司);K-SFM 无血清培养基(GIBCO 公司);Triton X-100。

3. 抗体:小鼠抗犬 CD90、CD105、CD34 单克隆抗体;FITC 标记的小鼠抗犬 desmin 和 myosin 单克隆抗体(Abcom,英国);小鼠抗犬 AE1/AE3 单克隆抗体(Abcom,英国);FITC 标记的小鼠抗犬 AE1/AE3 单克隆抗体(Abcom,英国);FITC 标记的兔抗小鼠 IgG 二抗(Abcom,英国)。

4. 实验仪器:CO₂ 培养箱(USA);超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);TDL-40B 低速离心机(上海安亭科学仪器厂);精密天平(Switzerland);倒置相差显微镜(Olympus,日本);水浴箱(Shellab,USA);试管振荡仪(Kika,马来西亚);LSN2510 激光共聚焦显微镜(Zeiss,德国);eclipse TS100 倒置相差显微镜(Nikon,日本)。

二、实验方法

1. ADSCs 诱导成肌:(1)取材:静脉全麻 Beagle 犬,消毒腹股沟部皮肤 3 遍。无菌条件下切取腹股沟处皮下少量脂肪组织。撑开犬上下颌,消毒口腔黏膜,无菌条件下切取 2 cm×2 cm 口腔黏膜组织。取好的组织立即放入冷的加双抗的 PBS 中,然后放入 4℃ 冰箱备用。

(2)ADSCs 的原代培养:取先前取好的脂肪组织块,0.25% 氯霉素溶液漂洗数次,PBS 冲洗 3 次;转移至无菌培养皿中,眼科剪剪碎;转移至 50 ml 离心管中,加入等体积 0.1% I 型胶原酶,37℃、130 r/min 振荡消化 60 min,1500 r/min(离心机半径 15.2 cm)离心 10 min;去除上层组织,加入 PBS 制成悬液;100 目不锈钢

滤网滤除组织碎片;取滤液 1500 r/min(离心机半径 15.2 cm)离心 5 min,重悬细胞,并以 1500 r/min(离心机半径 15.2 cm)再次离心 5 min;弃上清液,沉淀以含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液重悬,以 1×10^5 /ml 细胞浓度接种于 100 mm 培养皿中,CO₂ 孵育箱中培养;48 h 见细胞贴壁后首次换液,每 3 d 换液 1 次。

(3) ADSCs 细胞分组培养:细胞传代按 1:2 接种至 100 mm 培养皿,并分为实验组(A 组)即诱导组和对照组(B 组)即空白组;两组细胞分别培养,其中 A 组培养基中加入 5-aza + 5% 的马血清 + 5% 的胎牛血清,5-aza 的浓度为 10 μ mol/L;B 组培养基使用 10% 胎牛血清,其他培养条件一致,并在同一时间行传代及鉴定等。

(4) ADSCs 的流式细胞仪鉴定:取 ADSCs 培养至第 1 代处于对数生长期细胞,消化后调整细胞浓度为 1×10^6 /ml,制备细胞悬液行流式细胞仪检测 ADSCs 相关抗原 CD90、CD105 以及 CD34,排除造血干细胞的污染。

(5) 免疫荧光检测实验各组细胞成肌细胞特异性抗原表达情况:分别取 ADSCs 诱导前、对照组及诱导后细胞,0.25% 胰蛋白酶消化后制成细胞悬液,制备细胞爬片;待细胞达 80% 融合后,取出玻片,PBS 洗涤 3 次;4% 多聚甲醛固定 15 min;Triton X-100 行破膜处理 10 min;PBS 洗涤 3 次;用含 10% 羊血清的 BSA 封闭,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min;加入小鼠抗犬 desmin 和 myosin 单克隆抗体,4 $^{\circ}$ C 冰箱避光过夜;PBS 洗涤多次(一般 \geq 20 min);加入 FITC 标记的兔抗鼠 IgG 二抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 ~ 60 min;PBS 洗涤多次(一般 \geq 20 min);碘化丙啶避光衬核 30 ~ 60 s;PBS 洗涤 3 次;暗光下荧光显微镜下检测。检测过程中以犬腓肠肌来源的肌细胞作为阳性对照,皮肤成纤维细胞作为阴性对照;分别取实验各组第 7、14、21、28 天的细胞行肌细胞特异性抗原 desmin 和 myosin 的免疫荧光检测。

(6) 流式细胞仪检测实验各组细胞成肌细胞特异性抗原表达率:分别取 ADSCs 诱导前以及对照组和诱导组不同诱导时间的细胞约 2×10^6 个,行 desmin 和 myosin 的流式细胞仪检测。胰蛋白酶消化后制备细胞悬液,1500 r/min(离心机半径 15.2 cm)离心 5 min,去上清液;PBS 重悬细胞,1500 r/min(离心机半径 15.2 cm)离心 5 min;4% 多聚甲醛室温固定细胞 45 min,1500 r/min(离心机半径 15.2 cm)离心 5 min;PBS 重悬细胞,1500 r/min(离心机半径 15.2 cm)离心 5 min;用含 0.1% Triton X-100 的 PBS 重悬细胞,常温放置 15 min,1500 r/min(离心机半径 15.2 cm)离心 5 min;分别向两个离心管中加入 FITC 标记的小鼠抗犬 desmin 和 myosin 单克隆抗体,室温孵育 1 h,加 PBS 至 1 ml,并 1500 r/min(离心机半径 15.2 cm)离心 5 min,弃上清;1 ml PBS 重悬,上机检测。

2. 上皮细胞原代培养:(1) i3T3 滋养层细胞的制备:在已形成单层 3T3 细胞的培养皿中加入 10 mg/ml 的丝裂霉素溶液 5 ml,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度细胞培养箱 4 h,使 3T3 细胞丧失分裂增殖能力(i3T3),即可作为口腔黏膜细胞的滋养层细胞使用。

(2) 上皮细胞原代培养:取先前取好的上皮组织,0.25% 氯霉素溶液漂洗数次约 20 min,PBS 冲洗 3 次;使用眼科剪剔除皮下组织,然后剪成 1 cm \times 2 mm 的方条状组织,转移至盛有 10 ml dispase- II 离心管中,4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜消化或 CO₂ 培养箱 37 $^{\circ}$ C 消化 2 h。次日取处理好的组织 PBS 冲洗 3 遍,使用两把纤维镊子撕取上皮组织,弃去上皮下组织。将黏膜上皮剪碎放入胰酶溶液,在 37 $^{\circ}$ C 下振荡消化 15 min,加入含胎牛血清的 DMEM,终止胰酶作用;滤出细胞悬液。以 1500 r/min(离心机半径 15.2 cm)离心 5 min,去除上清液,加 PBS 6 ml,摇匀,再以相同转速离心 1 次,去上清液,分别接种于含被丝裂霉素抑制后的 3T3 细胞(i3T3)的培养皿中。并加入 KSF 培养液和含 10% 胎牛血清的 DMEM 各 4 ~ 5 ml。放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度细胞培养箱。接种后第 4 天换培养液,以后每 2 d 换液 1 次。

(3) 免疫荧光检测表皮细胞特异性标志蛋白表达:取第一代细胞行上皮细胞特异性抗原免疫荧光检测。使用前述的 ADSCs 细胞免疫荧光方法检测 AE1/AE3 的表达情况。使用 Hoechst 33342 衬核,并在暗光下荧光显微镜下检测。

(4) 流式细胞仪检测表皮细胞特异性抗原表达率:取第一代细胞约 $(2 \sim 4) \times 10^6$ 个,行 AE1/AE3 单克隆抗体的流式细胞仪检测。方法如前所述。

结 果

一、ADSCs 诱导成肌结果

1. 光镜下细胞形态记录:ADSCs 原代培养 48 h 后可观察到少量贴壁细胞,72 h 可见更多细胞贴壁并呈现“集落样生长”(图 1)。诱导前及空白组培养 1 周的 ADSCs 细胞光镜观察可见细胞呈短梭形,高倍光镜下可见细胞分布均匀、形态较一致(图 2,3)。诱导 3 周的 A 组细胞观察,可见“成肌细胞”在第 3 周时较前增多,细胞初步呈现漩涡状生长(图 4),同时期 B 组细胞变化不大(图 5);诱导 4 周的 A 组细胞观察可见光镜下细胞漩涡状生长更明显,并呈现成肌细胞的“多核化现象”(图 6)。

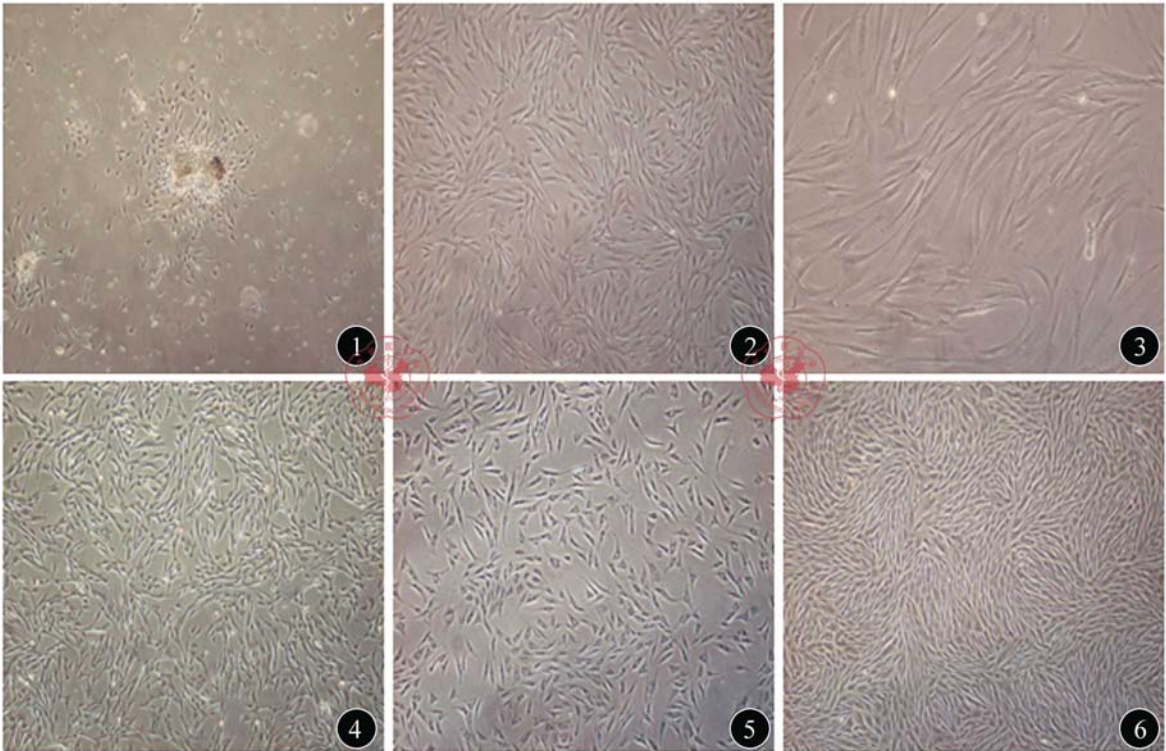


图1 原代培养48 h的ADSCs细胞($\times 40$) 图2 第一代培养7 d的ADSCs细胞($\times 100$) 图3 第一代培养7 d的ADSCs细胞($\times 200$) 图4 A组培养3周的ADSCs细胞($\times 100$) 图5 B组培养3周ADSCs细胞($\times 100$) 图6 A组培养4周的ADSCs细胞($\times 100$)

2. 流式细胞仪 ADSCs 细胞鉴定:取培养至第 1 代处于对数生长期细胞行干细胞相关指标 CD90 鉴定,行 CD34 鉴定排除造血干细胞污染,结果显示:高表达 CD90 和 CD105,表达率为 94.2% 和 90.7%;CD34 表达率为 0.6%,可认为无表达此标志,该结果与文献符合^[5](图 7~9)。

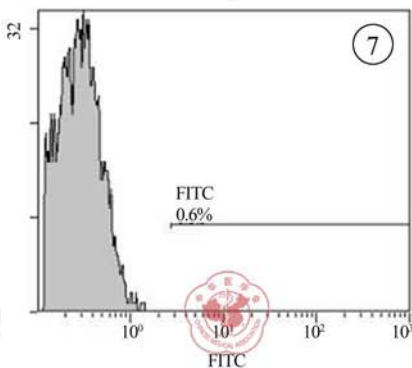


图7 第1代ADSCs的CD34流式表达率

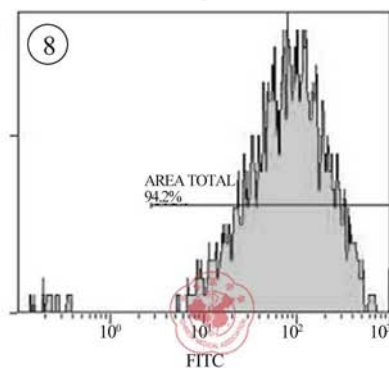


图8 第1代ADSCs的CD90流式表达率

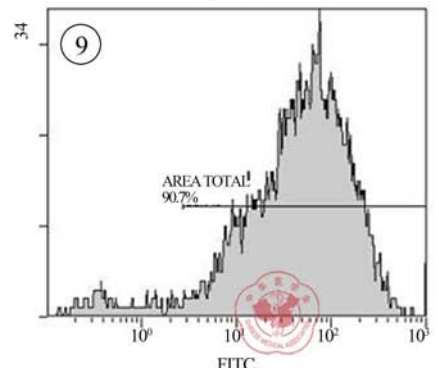


图9 第1代ADSCs的CD105流式表达率

3. 免疫荧光检测实验各组 ADSCs 细胞成肌细胞特异性抗原表达结果:培养 28 d 的 B 组,成肌细胞特异性抗原 desmin 和 myosin 均呈阴性表达,与阴性对照成纤维细胞类似(图 10,11);诱导组 A 组细胞可在第 14 天可检测到 desmin 和 myosin 的荧光表达,在第 21 天 desmin 和 myosin 的荧光表达率和荧光感光度明显增强(图 12,13),第 4 周时达到峰值(图 14,15);B 组则是在第 14 天及更长的培养时间均未检测到 desmin 和 myosin 的荧光表达(图 16,胞核因 PI 染色呈红色荧光)。

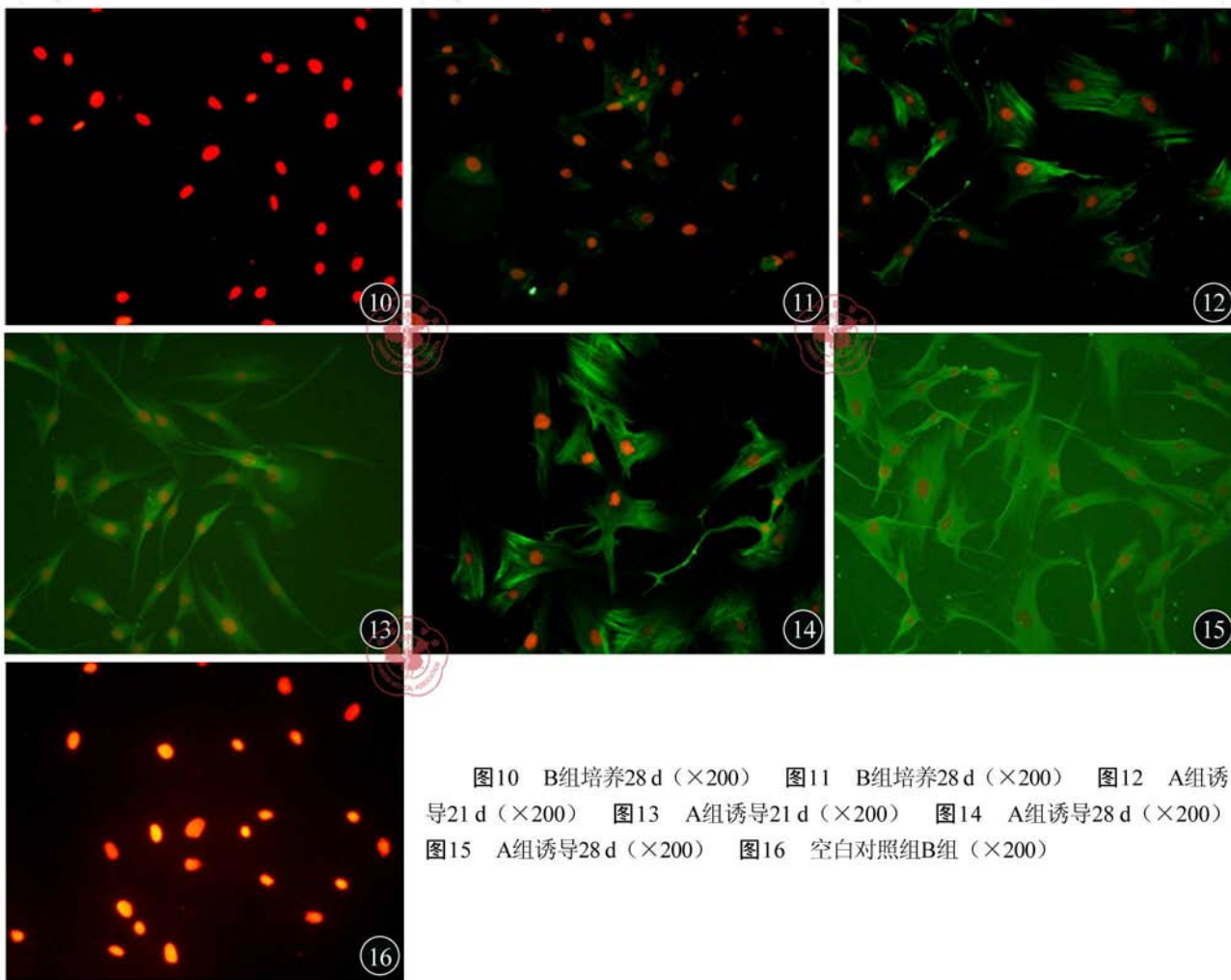


图10 B组培养28d(×200) 图11 B组培养28d(×200) 图12 A组诱导21d(×200) 图13 A组诱导21d(×200) 图14 A组诱导28d(×200) 图15 A组诱导28d(×200) 图16 空白对照组B组(×200)

4. 流式细胞仪检测实验各组 ADSCs 细胞成肌细胞特异性抗原表达率:诱导前细胞 desmin 和 myosin 的阳性表达率分别为 1.8% 和 1.2% (图 17);A 组在诱导的 21 d 时 desmin 和 myosin 达到 40.2% 和 45.4% (图 18);在诱导的 28 d 时 desmin 和 myosin 达到峰值为 59.4% 和 56.1% (图 19);B 组在培养 7 d 以及更长的时间时 desmin 和 myosin 表达率一直维持在 1.8% 和 1.2% 左右。

二、上皮细胞原代培养及鉴定结果

1. 黏膜上皮细胞原代培养 72 h 后可观察到少量贴壁(图 20)。取培养 10 d 的黏膜上皮细胞光镜观察可见细胞呈圆形或类圆形,i3T3 细胞被上皮细胞挤到周围,40 倍光镜下可见细胞分布均匀、形态较一致,呈铺路石样,高倍镜下见细胞呈类圆形、单核(图 21);培养 20 d 能达到全皿 80% 左右。

2. 上皮细胞的细胞免疫荧光鉴定:通过免疫荧光染色并利用激光扫描共聚焦显微镜观察 AE1/AE3 表达,结果可见获得的细胞表达 AE1/AE3 阳性,细胞质见绿色荧光(胞核因 Hoechst 33342 染色呈蓝色荧光)(图 22~25)。

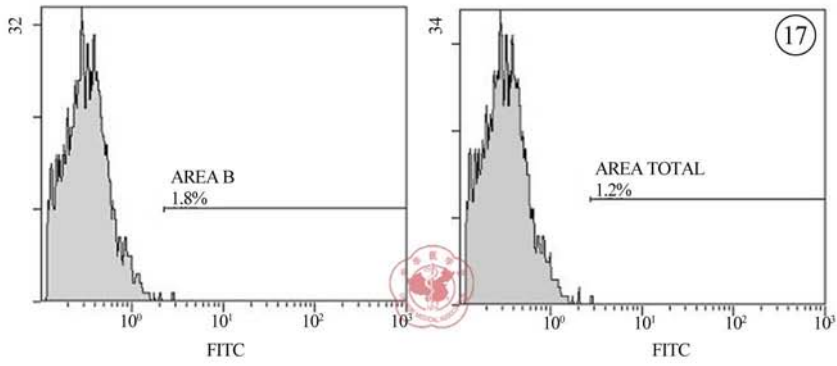


图17 诱导前细胞的desmin和myosin的阳性表达率

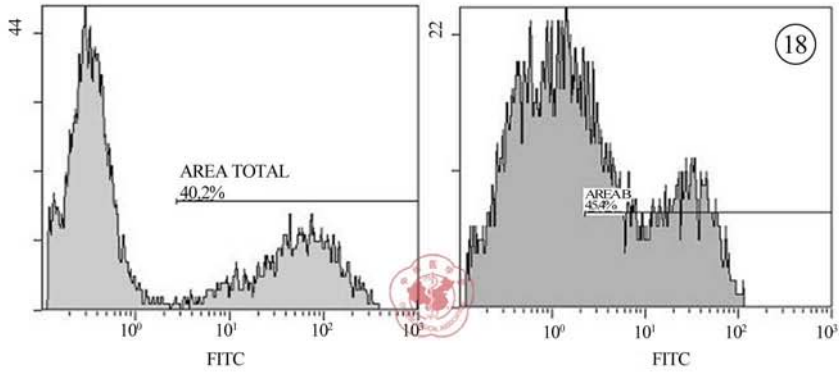


图18 A组诱导第21天的desmin和myosin的阳性表达率

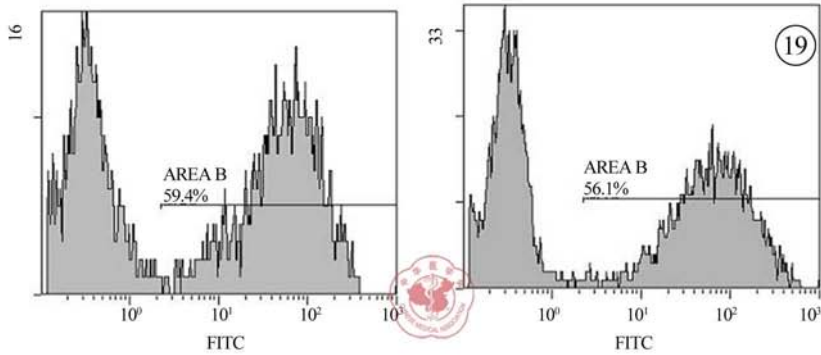


图19 A组诱导第28天的desmin和myosin的阳性表达率

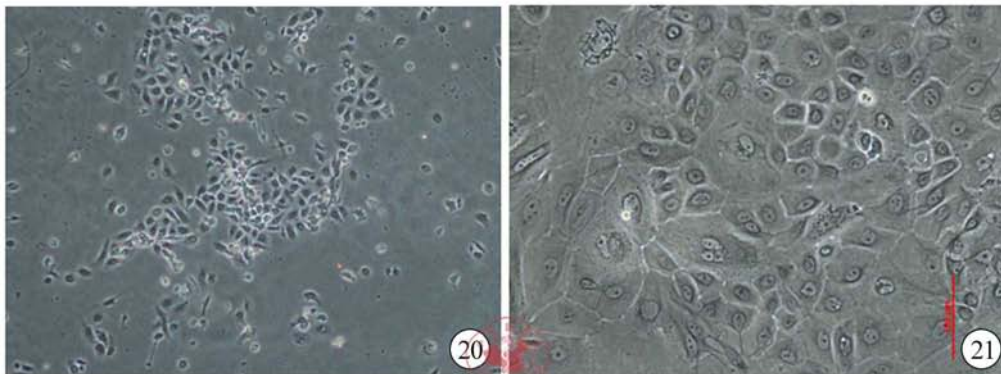


图20 培养72 h的原代上皮细胞 ($\times 40$)

图21 培养10 d的原代上皮细胞 ($\times 200$)

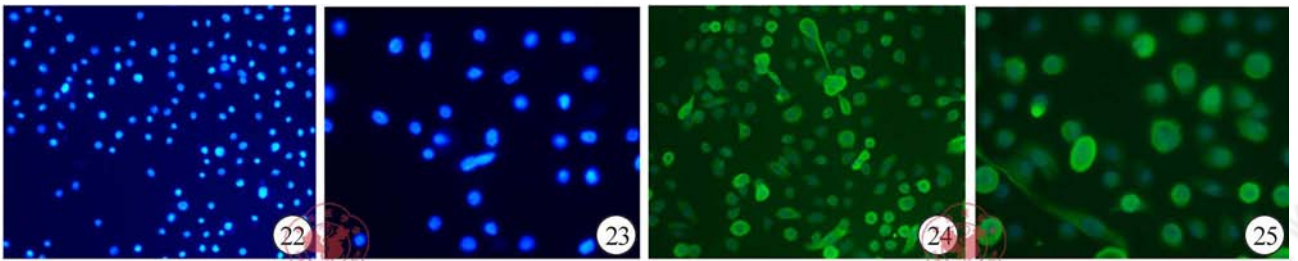


图22 上皮细胞AE1/AE3的免疫荧光表达情况(×100) 图23 上皮细胞AE1/AE3的免疫荧光表达情况(×200)
图24 空白对照组免疫荧光图(×100) 图25 空白对照组免疫荧光图(×200)

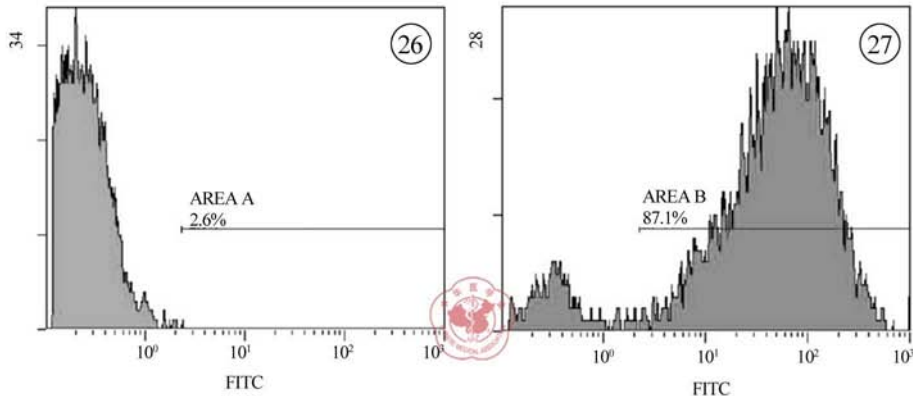


图26 空白对照组AE1/AE3的流式表达情况 图27 实验组AE1/AE3的流式表达情况

3. 上皮细胞的流式细胞仪鉴定:取培养至第1代处于对数生长期细胞行细胞相关指标 AE1/AE3 鉴定,以不加一抗的细胞做空白对照组,结果显示:前者高表达 AE1/AE3,表达率为 87.1%;而后者表达率较低,仅为 2.6%;该结果与文献符合^[6](图 26,27)。

讨 论

在组织工程和细胞治疗研究领域,胚胎干细胞(ESC)由于来源有限而且受伦理道德问题困扰,目前不具有临床应用的可行性^[6-7]。在临床应用性较好的成体干细胞中,骨髓干细胞(BMSC)是研究的热点,已经应用于多种疾病的治疗中^[7-8]。自从2001年Zuk等^[9]首次报道在成体脂肪中发现干细胞以来,ADSCs就开始成为另一个希望所在。研究发现ADSCs具有和BMSC相似的形态、生长特性、分子表型和多向分化能力,且脂肪组织与骨髓均来自于胚胎中胚层,并且都含有支持成熟组织的基质成分。ADSCs还具有免疫抑制的特性,这使其没有免疫排斥风险,可以用于自体移植、同种异体移植和异种移植^[10]。从取材来源说,BMSC来源有限,每个成人只能抽取10~20 ml骨髓,抽取骨髓创伤大,给患者造成痛苦,其广泛应用受到限制;而常规抽脂术获取的每250~500 ml脂肪中含有已超过 1×10^9 个干细胞^[11]。国外多项研究已证实:脂肪来源的干细胞具备向多种细胞分化的潜能,已经通过实验证明其具有向成骨、神经、软骨和肌细胞转化的能力^[12]。这也是本课题选用该细胞作为种子细胞的原因。

本实验取犬皮下(腹股沟处)脂肪组织,原代培养时采用宋小飞等^[5]的纯化培养,实验中剔除血管等其他组织,保证了原代培养的细胞杂质细胞较少。本实验选用了三种表面标志:CD105、CD90和CD34。众所周知,CD34为造血干细胞表面标志,CD90为国外文献报道的ADSCs表达较高的表面标志^[13]。实验结果显示CD34低表达,CD90高表达,结果与国外文献类似^[10]。

本实验参照Rangappa等^[14]的方法采用浓度为10 μmol/L的5-aza诱导培养4周后进行免疫细胞化学鉴定,结果表明:在第14天诱导组细胞可检测到肌细胞特异性蛋白desmin和myosin的荧光表达,在第21天desmin和myosin的荧光表达率和荧光感光度明显增强,第4周时达到峰值;空白对照组未检测到desmin和myosin的荧光表达。流式细胞仪的鉴定进一步证明了该结果。

上皮细胞培养方面经验介绍如下:本实验前期实验中多次使用犬包皮组织,发现犬包皮组织生长有透明细硬毛, dispase- II 4 ℃ 消化过夜处理后表皮组织呈絮状,按原代培养步骤最后未及细胞结构,故改用犬口腔黏膜上皮。表皮培养较其他细胞培养难,需注意以下几点:(1)整个上皮原代培养对无菌要求较高,各个步骤均应严格遵循无菌操作规则,这主要包括实验室以及使用的仪器设备的无菌和操作过程尽力避免细胞培养液中细菌浓度超标。(2)前期实验使用无饲养层的空皿培养,首先细胞贴壁困难,贴壁成功的实验细胞生长非常慢,生长至1个月时仍未达到100 mm 培养皿的50%,多次培养结果一致;后改用含i3T3 饲养层的培养皿培养,细胞生长繁殖能力明显增加;但较其他细胞(如成纤维细胞,ADSCs等)上皮细胞生长较缓慢,原代需培养20 d方能达到100 mm 培养皿的80%左右,传代后生长速度明显加快,一般10 d就能达到100 mm 培养皿的80%;一开始呈小集落样生长,后向周围生长扩散,最后长满全皿。(3)上皮细胞贴壁紧密,消化处理需时间较长。多次传代中需使用细胞刷等仪器辅助细胞脱壁。(4)培养基选择建议使用含有1:1的KSFM与DMEM培养基。细胞鉴定采用国际上上皮类组织比较常用的AE1/AE3来鉴定,荧光及流式结果让人满意。总之,本实验通过诱导培养获得成肌细胞,通过原代培养获得上皮细胞,可为组织工程化尿道修复提供可靠的种子细胞。

参 考 文 献

- [1] Xu YM, Qiao Y, Sa YL, et al. One-stage urethral reconstruction using colonic mucosa graft: an experimental and clinical study. *World J Gastroenterol*, 2003, 9:381-384.
- [2] Song LJ, Xu YM, Hu XY, et al. Urethral substitution using autologous lingual mucosal grafts: an experimental study. *BJU Int*, 2008, 101:739-743.
- [3] 徐月敏, 乔勇, 吴登龙, 等. 8cm以上复杂性尿道狭窄的外科治疗. *中华外科杂志*, 2006, 44:670-673.
- [4] Wickham MQ, Geoffrey RE, Jeffrey MG, et al. Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee. *Clin Orthop Res*, 2003, 412:196-212.
- [5] 宋小飞, 傅强, 徐月敏, 等. 脂肪干细胞原代培养及诱导成肌细胞的实验研究. *上海交通大学学报:医学版*, 2009, 5:521-526.
- [6] Tani H, Norris RJ, Kaur P. Enrichment for murine keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97:10960-10965.
- [7] 徐月敏, 傅强. 组织工程技术在下尿路疾病修复与重建中的应用. *临床泌尿外科杂志*, 2006, 21:881-885.
- [8] Ning H, Lin G, Lue TF, et al. Neuron-like differentiation of adipose tissue-derived stromal cells and vascular smooth muscle cells. *Differentiation*, 2006, 74:510-518.
- [9] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 2001, 7:211-228.
- [10] Schäffler A, Büchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells-basic and clinical implications for novel cell based therapies. *Stem Cells*, 2007, 25:818-827.
- [11] Suzuki T, Kobayashi K, Tada Y, et al. Regeneration of the trachea using a bioengineered scaffold with adipose-derived stem cells. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2008, 117:453-463.
- [12] Zvonic S, Lefevre M, Kilroy G, et al. Secretome of primary cultures of human adipose-derived stem cells: modulation of serpins by adipogenesis. *Mol Cell Proteomics*, 2007, 6:18-28.
- [13] Altman AM, Yan Y, Matthias N, et al. IFATS collection: Human adipose-derived stem cells seeded on a silk fibroin-chitosan scaffold enhance wound repair in a murine soft tissue injury model. *Stem Cells*, 2009, 27:250-258.
- [14] Rangappa S, Fen C, Lee EH, et al. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *Ann Thorac Surg*, 2003, 75:775-779.

(收稿日期:2011-03-23)

(本文编辑:戚红丹)