

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.23.007

[http://www.crter.org]

刘琳, 张亚, 周云, 翟景梅, 曹戊. 脂肪源干细胞向血管内皮细胞的分化[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(23):4224-4231.

## 脂肪源干细胞向血管内皮细胞的分化\*\*

刘琳, 张亚, 周云, 翟景梅, 曹戊

苏州大学儿科医学研究所, 江苏省苏州市 215003

### 文章亮点:

1 实验采用胶原酶消化分离获得兔脂肪干细胞, 体外培养至第3代后加入血管内皮细胞生长因子与碱性成纤维细胞生长因子联合诱导分化, 对诱导前后细胞进行形态学、生长曲线、免疫组织化学染色及表型检测。

2 结果显示, 诱导后21 d, 第3代兔脂肪干细胞显微镜下呈铺路石样形态, 血管内皮细胞第VIII因子相关抗原染色阳性, 透射电镜下可见W-P小体。说明兔脂肪干细胞在体外可诱导分化为血管内皮细胞, 能为组织工程血管提供理想的种子细胞。

3 现阶段脂肪干细胞向血管内皮细胞诱导分化的实验, 多为体外环境中的实验室研究, 对于体内复杂环境下的分化情况及其诱导分化机制尚不十分清楚, 且诱导后的细胞是否具有成熟血管内皮细胞的功能与稳定性, 仍需进一步探讨。

### 关键词:

干细胞; 脂肪干细胞; 血管内皮细胞; 组织工程血管; 流式细胞术; 内皮分化; 体外诱导; 鉴定; 家兔; 省级基金; 干细胞图片文章

### 摘要

**背景:** 脂肪来源干细胞在体内储备丰富, 体外增殖快速, 具有多向分化潜能, 是目前组织工程种子细胞的研究热点。近年来越来越多的研究表明脂肪干细胞在一定条件下可被诱导分化为内皮细胞, 促进血管生成。

**目的:** 观察兔脂肪干细胞体外分离培养及诱导分化为血管内皮细胞的生物学特性。

**方法:** 取兔附睾处脂肪, 采用胶原酶消化分离获得脂肪干细胞, 体外培养至第3代后加入血管内皮细胞生长因子与碱性成纤维细胞生长因子联合诱导分化, 对诱导前后细胞进行形态学观察、生长曲线测定、免疫组织化学染色及流式细胞仪表型检测。

**结果与结论:** 兔脂肪干细胞生长旺盛, 第3代兔脂肪干细胞呈成纤维细胞样, 生长曲线呈“S”型, 15代以内细胞形态未见明显变化。免疫荧光法检测Vimentin阳性, 流式细胞仪检测CD44表达阳性, CD31表达阴性; 诱导后细胞CD31表达阳性, CD44表达阴性。第3代兔脂肪干细胞向血管内皮细胞诱导分化21 d显微镜下呈铺路石样形态, 血管内皮细胞第VIII因子相关抗原染色细胞阳性, 透射电镜下可见W-P小体。提示脂肪干细胞在体外可诱导分化为血管内皮细胞, 可为组织工程血管提供理想的种子细胞。

刘琳, 女, 1984年生, 汉族, 江苏省苏州市人, 四川大学毕业, 实习研究员, 主要从事组织工程的基础研究。  
flykf@163.com

通讯作者: 张亚, 主任检验师, 硕士生导师, 苏州大学儿科医学研究所, 江苏省苏州市 215003  
zhangya62@yahoo.com.cn

中图分类号: R394.2  
文献标识码: A  
文章编号: 2095-4344  
(2013)23-04224-08

收稿日期: 2012-10-18  
修回日期: 2013-03-07  
(20120830004/G·Y)

Liu Lin, Research intern,  
Institute of Pediatric Medicine,  
Soochow University, Suzhou  
215003, Jiangsu Province,  
China  
flykf@163.com

Corresponding author: Zhang  
Ya, Chief examiner, Master's  
supervisor, Institute of Pediatric  
Medicine, Soochow University,  
Suzhou 215003, Jiangsu  
Province, China  
zhangya62@yahoo.com.cn

Supported by: Social  
Development Science and  
Technology Program of Suzhou  
City, No. SYS201244\*; Clinical  
Science and Technology  
Projects of Jiangsu Province,  
No. BL2012051\*

Received: 2012-10-18  
Accepted: 2013-03-07

## Adipose-derived stem cells differentiate into vascular endothelial cells

Liu Lin, Zhang Ya, Zhou Yun, Zhai Jing-mei, Cao Xu

Institute of Pediatric Medicine, Soochow University, Suzhou 215003, Jiangsu Province, China

### Abstract

**BACKGROUND:** Adipose-derived stem cells are regarded as the potential seed cells for tissue engineering due to abundance *in vivo*, rapid proliferation *in vitro*, and capacity of multi-directional differentiation. Accumulated evidence supports that adipose-derived stem cells can be induced to differentiate into endothelial cells and to promote angiogenesis.

**OBJECTIVE:** To study the biological characteristics of vascular endothelial cells differentiated from rabbit adipose-derived stem cells cultured *in vitro*.

**METHODS:** Adipose tissues were obtained from the epididymal fat pads of the rabbits. And adipose-derived stem cells were isolated from adipose tissues by collagenase digestion and cultured *in vitro* to passage 3. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor within endothelial cell growth medium were used to induce adipose-derived stem cells differentiation into endothelial-like cells. Cell morphology was observed and growth curves were drawn before and after induction. Flow cytometry and immunohistochemistry were used to analyze the morphology and type of adipose-derived stem cells and the differentiated cells.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Rabbit adipose-derived stem cells grew well, and passage 3 adipose-derived stem cells presented fibroblast-like growth. The growth curve was like "S" shape. No significant change in cell morphology was detected within passage 15. Vimentin was positive on passage 3 adipose-derived stem cells by indirect immunofluorescence methods. The positive CD44 expression and negative CD32 expression were detected in passage 3 adipose-derived stem cells by flow cytometric analysis. After induction, CD31 became positive while CD44 was negative. Paving stone-like cell appearance was seen under inverted microscope 21 days after induction. The differentiated cells were Factor VIII-related antigen positively stained with immunohistological method, and Weibel-Palade body was observed under a transmission electron microscope. Experimental findings indicate that, adipose-derived stem cells can be induced to differentiate into vascular endothelial cells *in vitro*, and it can offer the ideal seed cells for tissue engineered blood vessels.

**Key Words:** stem cells; adipose-derived stem cells; vascular endothelial cells; tissue engineered blood vessels; flow cytometry; endothelial differentiation; induction *in vitro*; identification; rabbits; provincial grants-supported paper; stem cell photographs-containing paper

Liu L, Zhang Y, Zhou Y, Zhai JM, Cao X. Adipose-derived stem cells differentiate into vascular endothelial cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(23):4224-4231.

## 0 引言

组织工程血管是用组成血管壁的种子细胞与相关细胞外基质复合以构建从形态到功能都接近活体的血管替代物, 具有生物相容性, 耐久性和可塑性, 无免疫原性, 不易发生血栓等优点, 为血管移植提供了新机遇。随着对组织工程血管构建研究的深入, 什么细胞作为种子细胞近年来也成为研究的重要内容。目前, 已分离和鉴定出与血管发生相关的干细胞有内皮祖细胞、胚胎干细胞、造血干细胞、骨髓间充质干细胞等, 尽管这些细胞已被证实可通过分化成内皮细胞或分泌血管内皮细胞生长因子体外成功构建组织工程血管<sup>[1-4]</sup>, 但它们在成人组织中含量较低、体外培养困难和取材不便并可能涉及伦理学问题等原因导致它们不能满足构建组织工程血管所需。Zuk等<sup>[5-6]</sup>于10年前首次从脂肪中获取具有间充质干细胞表型的细胞并命名为脂肪来源干细胞, 脂肪干细胞取材方便、来源广泛、快速增殖、无免疫原性、可供自体移植, 在特定的诱导条件下, 能分化为同胚层来源的成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞, 跨胚层分化为外胚层来源的神经细胞、心肌细胞、表皮细胞; 内胚层来源的肝细胞、分泌胰岛素的 $\beta$ 样细胞等优势, 成为倍受关注的种子细胞<sup>[7-16]</sup>。

文章拟通过体外培养的方法将脂肪干细胞从兔脂肪组织中分离出来加以培养, 并进一步观察体外定向诱导分化情况, 从而探讨其为组织工程血管构建提供种子细胞的可能性。

## 1 材料和方法

**设计:** 单一样本观察, 细胞学体外实验。

**时间及地点:** 于2011年5月至2012年6月在苏州大学儿科医学研究所完成。

**材料:**

**实验动物:** 新西兰大耳雄性白兔10只, 体质量2.0-3.0 kg, 12-24月龄, 由苏州大学实验动物中心提供, 动物许可证号: SCXK(苏)2007-0007。

实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部2006年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准<sup>[17]</sup>。

**兔脂肪来源干细胞分离培养及向血管内皮细胞分化实验的主要仪器:**

Main experimental instruments:

仪器	来源
超净工作台、CO <sub>2</sub> 培养箱	Thermo Scientific
倒置显微镜	Leica
透射电镜	Hitachi(苏州大学电镜室)
流式细胞仪	Beckman Coulter

**兔脂肪来源干细胞分离培养及向血管内皮细胞分化实验的主要试剂:**

Main experimental reagents:

试剂	来源
L-DMEM、M199 培养液	Gibco
I 型胶原酶、血管内皮细胞生长因子、碱性成纤维细胞生长因子	Sigma
CD44 单克隆抗体	Abcam
CD31 单克隆抗体	BDBioscienc
第VIII因子相关抗原单克隆抗体	博奥森

**实验方法:**

**兔脂肪干细胞的分离及体外扩增培养:** 10%水合氯醛4.0-5.0 mL/kg 腹腔注射麻醉新西兰大耳白兔, 备皮, 消毒, 无菌取附睾处脂肪组织, 清除组织中肉眼可见的小血管和筋膜, D-Hanks 洗涤3次, 充分剪碎组织, 两倍体积的0.15% I 型胶原酶振荡消化, 37 °C, 50 min, 等量 L-DMEM(含体积分数10%胎牛血清)中和酶活性后

1 200 r/min 离心 15 min, 去杂质及上清液, D-Hanks 洗 2 次, L-DMEM 打匀沉淀, 200 目尼龙细胞筛将未消化的基质过滤去除, 1 200 r/min 离心 15 min, 沉淀接种于含 8 mL L-DMEM 的 50 mL 培养瓶内, 置 37 °C, 体积分数 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中, 48 h 首次全量换液, 以后每两三天全量换液, 待贴壁细胞长满瓶底, 用 0.25%胰酶加 0.02%EDTA 液消化, 吸管吸取培养液, 反复轻柔吹打培养瓶底壁, 使已消化的细胞脱离瓶壁, 1 200 r/min 离心 15 min, 弃上清, 以 1 : 2 比例传代培养。

**兔脂肪干细胞生物学特性鉴定:** 定期在倒置显微镜下, 观察原代及子代细胞形态学改变情况。取第 3 代生长良好的兔脂肪干细胞, 消化离心后, 制备单个细胞悬液, 调整细胞浓度为  $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ , 接种于 24 孔培养板, 每孔 200  $\mu\text{L}$ , 常规培养。每天取 3 孔, 胰蛋白酶消化。计数细胞数取均值, 连续测 10 d, 以时间为横轴、细胞密度为纵轴绘制生长曲线, 分析细胞生长规律。免疫荧光染色法检测 Vimentin 表达, 方法同文献<sup>[18]</sup>。

**兔脂肪干细胞向血管内皮细胞诱导分化:** 实验分诱导组和对照组, 诱导组取第 3 代生长良好的兔脂肪干细胞, 按每孔  $5 \times 10^4$  的细胞量种入 24 孔培养板, 加入由 M199 培养液、50  $\mu\text{g/L}$  血管内皮细胞生长因子、10  $\mu\text{g/L}$  碱性成纤维细胞生长因子与体积分数 10%胎牛血清配成的血管内皮细胞诱导液, 两三天换液 1 次; 对照组亦取第 3 代生长良好的兔脂肪干细胞用扩增培养液培养, 2 组连续培养 21 d。

**流式细胞术鉴定表面标志:** 取对照组第 3 代生长良好的兔脂肪干细胞和诱导组诱导 21 d 的细胞, 流式细胞仪检测 CD31, CD44 的表达, 方法同文献<sup>[19]</sup>。

**透射电镜观察:** 取诱导组诱导 21 d 细胞, 0.25%胰酶消化, 离心后加 D-Hanks 吹打成单细胞悬液, 计数细胞达  $1 \times 10^6$  以上, 在尖底离心管中以 1 200 r/min 离心 15 min, D-Hanks 洗 2 遍, 使细胞形成致密微团, 4%戊二醛前固定, 4 °C 过夜, 1%锇酸固定于 4 °C 1 h, 梯度丙酮脱水, 环氧丙烷置换, 树脂包埋, 聚合后超薄切片, 醋酸双氧铀及枸橼酸铅双染色, 透射电镜下观察超微结构。

**免疫组织化学染色:** 取对照组第 3 代生长良好的兔脂肪干细胞和诱导组诱导 21 d 细胞, 以  $1 \times 10^6$  的细胞量接种于含盖玻片的 6 孔板中, 用 40 g/L 的多聚甲醛固定 30 min, D-Hanks 洗 2 遍, 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-甲醇室温孵育 10 min, 牛血清封闭 10 min, 加 1 : 50 稀释的第 VIII 因子相关抗原单克隆抗体 37 °C 孵育 1 h, 加生物素标记

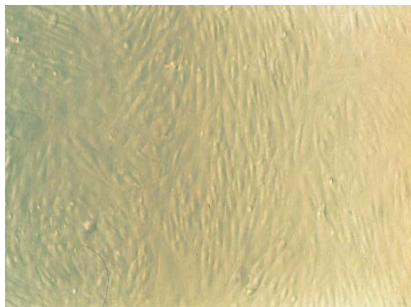
二抗 20 min, 加链霉菌抗生物-过氧化物酶室温 20 min, DAB 显色, 苏木精复染, 乙醇脱水干燥, 中性树胶封固, 以不加一抗作阴性对照。

**主要观察指标:** ①诱导前后兔脂肪干细胞形态学变化。②诱导前后兔脂肪干细胞的表面标志变化。③兔脂肪干细胞免疫荧光染色结果。④兔脂肪干细胞免疫组织化学染色结果。

## 2 结果

**2.1 兔脂肪干细胞生物学特性** 分离出的原代兔脂肪干细胞接种6 h开始有少量细胞散在贴壁; 24 h后大部分细胞以群落或散在的方式贴壁生长, 细胞呈小圆形、短梭形或多角形; 培养48 h首次全量换液, 除去未贴壁细胞后, 大部分贴壁细胞呈宽大扁平的长梭形或多角形。

细胞在最初3-5 d, 生长较缓慢, 过后进入指数增殖期; 9-10 d长满瓶底, 消化后按1:2传代培养。传代细胞增长速度较原代细胞明显增快, 两三天传1代, 第3代兔脂肪干细胞呈均一扁平的长梭形, 细胞高密度生长时呈漩涡状或放射状生长排列, 见图1。



注: 第3代兔脂肪干细胞呈均一扁平的长梭形, 细胞高密度生长时呈漩涡状或放射状生长排列。

图1 体外培养第3代兔脂肪干细胞的形态学变化(倒置相差显微镜, ×100)

Figure 1 Morphology of rabbit adipose-derived stem cells at passage 3 (Inverted phase contrast microscope, ×100)

兔脂肪干细胞生长曲线呈S形, 接种后第一至二天为潜伏期, 3 d后细胞增殖加速并进入指数增殖期, 8 d达到高峰, 以后细胞生长速度减慢, 进入生长平台期, 其生长规律符合干细胞生长特征。

第3代兔脂肪干细胞免疫荧光法检测Vimentin为阳性。体外培养至15代细胞的增殖速度无明显减慢, 细胞

形态无明显变化。

**2.2 兔脂肪干细胞向血管内皮细胞诱导分化的形态学观察结果** 诱导3 d, 大部分诱导组细胞由长梭形逐渐变短, 变粗, 成为多角形; 诱导21 d后, 细胞呈典型内皮样细胞形态特点即三角形或多边形, 总体形态呈致密铺路石样, 见图2。

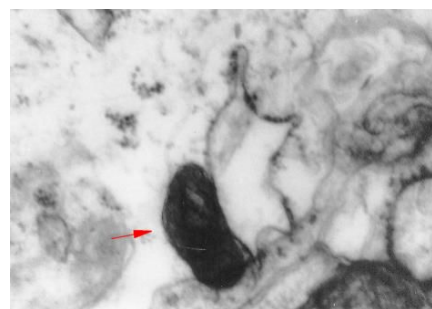


注: 诱导21 d, 兔脂肪干细胞呈典型内皮样细胞形态特点即三角形或多边形, 总体形态呈致密铺路石样。

图2 第3代兔脂肪干细胞向血管内皮细胞诱导分化21 d的形态学变化(倒置相差显微镜, ×100)

Figure 2 Morphology of rabbit adipose-derived stem cells at passage 3 after induction for 21 d (Inverted phase contrast microscope, ×100)

透射电镜下, 内皮样细胞形态不规则, 细胞核扁平, 核仁明显, 胞浆内有较多的线粒体、高尔基体和粗面内质网, 部分细胞内可见血管内皮细胞特有的细胞器, 即W-P小体(Weibel-Palade body), 见图3。对照组光镜下观察细胞形态无改变。



注: 透射电镜下, 内皮样细胞形态不规则, 核仁明显, 部分细胞内可见血管内皮细胞特有的W-P小体, 如箭头所示, 提示细胞诱导分化为血管内皮细胞。

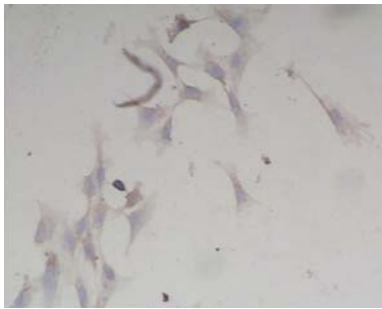
图3 第3代兔脂肪干细胞向血管内皮细胞诱导分化21 d的透射电镜观察结果(×35 000)

Figure 3 Morphology of rabbit adipose-derived stem cells at passage 3 after induction for 21 d (Transmission electron microscope, ×35 000)



**2.3 诱导前后细胞的表面标志变化** 流式细胞仪检测诱导组诱导21 d的细胞结果显示CD31阳性表达, CD44阴性表达; 检测对照组第3代兔脂肪干细胞结果显示CD44阳性表达, CD31阴性表达。

**2.4 第VIII因子相关抗原免疫组织化学染色结果** 诱导组核膜周围染成棕褐色, 细胞核呈淡蓝色, 为阳性, 见图4。



注: 诱导 21 d, 细胞核膜周围染成棕褐色, 细胞核呈淡蓝色, 为第VIII因子相关抗原染色阳性, 提示细胞诱导分化为血管内皮细胞。

图4 第3代兔脂肪干细胞向血管内皮细胞诱导分化21 d第VIII因子相关抗原染色结果(倒置相差显微镜, ×200)

Figure 4 Morphology of rabbit adipose-derived stem cells at passage 3 after induction for 21 d by Factor VIII-related antigen immunohistological staining (Inverted phase contrast microscope, ×200)

未加一抗的阴性对照与对照组细胞胞浆和核膜未有染色, 仅细胞核呈淡蓝色。

### 3 讨论

早在多年前国外专家就有统计全世界每年大约要施行85万例血管重建手术<sup>[20]</sup>, 自体血管由于其良好的组织相容性及血液相容性一向被认为是天然理想的血管桥材料, 因此, 大多数手术都使用自体血管作为替代品。但自体血管存在材料来源有限、取材易受自身血管条件限制等诸多不适, 若血管材料性能不佳, 术后极易造成桥血管的狭窄、闭塞, 从而严重影响手术疗效, 此外, 因取材而附加的各种手术操作还会增加对患者的创伤, 因此开发出适合血管旁路或置换手术的人工血管以替代自体血管进行血管重建手术有着十分重要的意义。

目前, 大口径人工血管(如涤纶、膨化聚四氟乙烯及

真丝)治疗效果可靠, 远期通畅率已得到肯定<sup>[21-22]</sup>, 临床应用广泛。然而对于小口径人造血管(内径<6 mm), 由于其直径小, 张力高, 阻力大, 血流速度缓慢, 易引发血小板聚集、血栓形成或新生内膜增厚, 从而导致人工血管阻塞, 中远期通畅率不理想<sup>[23-24]</sup>。因而, 组织工程血管的出现有望解决这个问题。

组织工程血管研究的核心是种子细胞选取。种子细胞的来源主要有4种: 自体细胞、同种异体细胞、异种细胞与干细胞。自体细胞需要有创性操作, 来源有限, 在体外难以大量扩增且可能存在细胞不健康、功能不完善、易衰老以及去分化现象等缺点, 使其应用受到限制, 同种异体细胞也存在来源不足以及配型的问题。异种细胞进行体内移植容易引起病原体体内传播、免疫排斥等, 因此显著降低了研究人员开展相关研究的积极性。而干细胞, 它在整个生命周期中可以自我增殖且能分化为不同细胞, 扩增快速、分裂能力强、细胞功能旺盛且易获取符合构建组织工程血管的种子细胞应具备的优势。

在干细胞的研究方面由于胚胎组织涉及伦理道德问题, 人们对胚胎干细胞的研究十分谨慎, 进展缓慢, 甚至许多国家禁止其用于研究。骨髓组织来源有限, 抽取时给供者造成巨大痛苦, 而脂肪组织与骨髓组织一样均在胚胎发育过程中源自中胚层, 是一个高度血管化的组织, 脂肪组织发生伴随着活跃的血管生成。

从脂肪组织中分离的脂肪干细胞具有多向分化的能力<sup>[11-16]</sup>, 近年来越来越多的研究表明脂肪干细胞在一定条件下可被诱导分化为内皮细胞, 促进血管生成。Miranville等<sup>[25]</sup>在低血清浓度的培养基中诱导脂肪干细胞分化为内皮样细胞, 形成网状结构, 表达内皮细胞特异标记物CD31和第VIII因子相关抗原, 将CD34<sup>+</sup>CD31<sup>-</sup>的脂肪干细胞移植到后肢缺血的小鼠模型, 观察到局部血流、毛细血管密度和血管内皮细胞的整合性均有增加; 曹莹等<sup>[26]</sup>从成人脂肪组织分离了脂肪干细胞, 在血管内皮细胞生长因子与碱性成纤维细胞生长因子诱导下, 能分化成有功能的内皮细胞, 改善了缺血状况。另外脂肪干细胞可通过旁分泌机制释放细胞因子如肝细胞生长因子、基质衍生因子1、血管内皮细胞生长因子等促进血管形成<sup>[27-28]</sup>。由此可见脂肪干细胞与血管之间存在密切联系, 作者以兔脂肪干细胞为观察对象, 探讨其在体外向血管内皮细胞的定向分化及相关的分化后鉴定。

作者前期的研究发现,骨髓间充质干细胞在血管内皮细胞生长因子与碱性成纤维细胞生长因子联合诱导下,体外可分化为血管内皮细胞<sup>[29]</sup>。但是骨髓组织获取操作相对繁琐,采集骨髓需要多个部位进行骨髓穿刺,而动物体内都含有大量脂肪远超骨髓含量。采集脂肪只需通过简单的吸脂术即可。另外骨髓间充质干细胞容易受到动物年龄,生理和病理状态等影响,有实验表明老年动物甚至难以从骨髓中获取足够的干细胞<sup>[30]</sup>,而脂肪干细胞受此影响要小得多。因此脂肪干细胞相对于骨髓间充质干细胞更易采集,来源充足,还有研究表明脂肪干细胞培养对营养要求不高,在低血清或无血清的条件下仍能正常生长<sup>[31]</sup>。

实验结果也显示,兔脂肪干细胞体外培养增殖速度比作者前期研究的骨髓间充质干细胞快<sup>[29]</sup>,培养过程中无需任何细胞因子参与,原代细胞贴壁后呈集落状生长,集落中细胞形态为典型梭形细胞呈漩涡样生长。细胞形态单一,不受传代影响,而实验将兔脂肪干细胞传代15代,细胞形态仍然非常单一,而且增长非常迅速,细胞贴壁牢固。而国外文献报道骨髓间充质干细胞经过多次传代后可能恶性转化为癌细胞<sup>[32]</sup>。因此脂肪干细胞可以更好的满足组织工程血管对种子细胞量的需求。

目前体外诱导干细胞向血管内皮细胞分化的实验多采用添加细胞因子的方法,如血管内皮细胞生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、胰岛素样生长因子与肿瘤坏死因子等。实验采用的是血管内皮细胞生长因子与碱性成纤维细胞生长因子联合诱导,主要考虑有研究表明血管内皮细胞生长因子较其他生成因子,在血管的生长中起着更为重要的作用<sup>[33]</sup>,它选择性作用于血管内皮细胞膜上的2种III型酪氨酸激酶受体高度特异地促进血管内皮细胞有丝分裂和血管形成。而碱性成纤维细胞生长因子是脂肪干细胞向血管内皮细胞分化的较强的诱导因子<sup>[34]</sup>,能对血管内皮细胞生长因子具有非特异性促增殖作用,并与血管内皮细胞生长因子产生协同效应还能促进脂肪干细胞生长<sup>[35]</sup>。

另外,对于诱导时机的选择问题,国内外研究人员做了许多相关实验,尚无明确的最佳诱导时机。由于脂肪干细胞缺乏特异性标志,不能在原代得到纯化的干细胞。细胞纯化需要一个过程,所以实验选取的是第3代细胞进行诱导。随着对脂肪干细胞研究的深入,如果能

在脂肪干细胞的分离纯化上取得新的进展,将有益于选择最佳时机对其进行诱导。

国外多项研究报道,脂肪干细胞与骨髓间充质干细胞具有相似的细胞表面标志<sup>[34, 36]</sup>,目前对脂肪干细胞表面特异性标志的认定还存在一定争议,一般认为间充质干细胞表达多种表面标记物,包括细胞外基质成分、细胞因子和生长因子及其受体等,但不表达血细胞和血管内皮细胞的抗原,因此通常采用阴性标记和阳性标记相结合的方法进行排除鉴定。

实验采用流式细胞术对诱导前后细胞选做了CD31、CD44的测定。CD44是间充质干细胞重要表面标志<sup>[37]</sup>,对照组表达CD44阳性表明实验从兔附睾处脂肪组织中分离培养的兔脂肪干细胞具有间充质干细胞的特征。CD31又称血小板内皮细胞黏附分子21,存在于多个种属的内皮细胞标记物,常用于计数肿瘤样本中的微血管,被认为是血管内皮细胞最可靠的标志物,用来区别血管内皮细胞和其他细胞<sup>[38]</sup>,实验中对照组表达CD31阴性表明培养的兔脂肪干细胞未被血管内皮细胞污染,而诱导组表达CD31阳性表明通过诱导兔脂肪干细胞可向血管内皮细胞分化,是诱导为血管内皮细胞的有力证明。

早在1974年Gimbrone等<sup>[39]</sup>已发现血管内皮细胞有W-P小体和第VIII因子相关抗原2个特点。W-P小体,又名细管小体,由Weibel和Palade于1964年发现,长为1-6  $\mu\text{m}$ <sup>[40]</sup>,是血管内皮细胞一种特殊的分泌性杆状细胞器,含有多种生物活性分子,受到刺激后可以非常迅速的释放这些内容物,参与止血、炎症和血管生成等生理功能。W-P小体仅见于血管内皮细胞,被认为是鉴定血管内皮细胞的最好形态学指标,但其出现的概率小于30%<sup>[41]</sup>;第VIII因子相关抗原是血管内皮细胞特有的抗原,位于血管内皮细胞胞浆。除见于血管内皮细胞外,还见于巨核细胞和血小板内。因此鉴定是否为血管内皮细胞的最好办法是测定细胞的一系列特征后作出综合评定。

实验结果表明,倒置显微镜下观察诱导组诱导21 d的细胞可见明显的“铺路石”样排列,较作者前期实验观察诱导14 d的细胞排列更为紧密<sup>[19]</sup>;透射电镜下观察诱导组细胞超微结构可见W-P小体,呈杆状,外包有膜,长约3  $\mu\text{m}$ ;免疫组织化学检测结果证实诱导组细胞FVIII

第VIII因子相关抗原染色阳性; 加上流式细胞术检测诱导组细胞表达CD31阳性, 以上4方面的检测结果可证实实验所诱导的细胞是血管内皮细胞来源。

文章实验结果显示, 体外培养的兔脂肪干细胞在血管内皮细胞生长因子和碱性成纤维细胞生长因子的联合诱导下可向血管内皮细胞分化, 现阶段对于脂肪干细胞向血管内皮细胞诱导分化所做的各项研究, 多为体外环境中的实验室研究, 对于体内复杂环境下的分化情况, 及其诱导分化机制尚不十分清楚, 且诱导后的血管内皮细胞是否具有成熟血管内皮细胞的功能与稳定性, 仍需进一步探索研究。

**基金资助:** 苏州市社会发展科技项目(SYS201244); 江苏省临床医学科技专项资助项目(BL2012051)。

**作者贡献:** 第一、二、三作者负责实验设计, 实施者为第一、二、四作者, 评估者为第五作者, 资料收集为全部作者, 第一、二、三作者组织整理成文, 通讯作者进行审校, 第一、二、三作者对文章负责。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理要求:** 实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部2006年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

**作者声明:** 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

#### 4 参考文献

- [1] Krenning G, van Luyn MJ, Harmsen MC, et al. Endothelial progenitor cell-based neovascularization: implications for therapy. *Trends Mol Med.* 2009;15(4):180-189.
- [2] Oikawa A, Katare R, Herman A, et al. Importance of mouse hematopoietic stem cells in neovascularisation. *Cardiovasc Res.* 2012;93(1): S92-S127.
- [3] Nourse MB, Halpin DE, Scatena M, et al. VEGF induces differentiation of functional endothelium from human embryonic stem cells: implications for tissue engineering. *Am Heart Assoc.* 2010; 30: 80-89.
- [4] Duffy GP, Ahsan T, O'Brien T, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote angiogenic processes in a time- and dose-dependent manner in vitro. *Tissue Eng Part A.* 2009;15(9): 2459-2470.
- [5] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7(2): 211-228.
- [6] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002;13(12): 4279-4295.
- [7] Hong SJ, Traktev DO, March KL. Therapeutic potential of adipose-derived stem cells in vascular growth and tissue repair. *Curr Opin Organ Transplant.* 2010;15(1):86-91.
- [8] Levi B, James AW, Nelson ER, et al. Human adipose-derived stromal cells stimulate autogenous skeletal repair via paracrine Hedgehog signaling with calvarial osteoblasts. *Stem Cells Dev.* 2011;20(2):243-257.
- [9] Zhu M, Zhou Z, Chen Y, et al. Supplementation of fat grafts with adipose-derived regenerative cells improves long-term graft retention. *Ann Plast Surg.* 2010;64 (2):222-228.
- [10] Gimble JM, Bunnell BA, Chiu ES, et al. Concise review: adipose-derived stromal vascular fraction cells and stem cells: let's not get lost in translation. *Stem Cell.* 2011;29 (5):749-754.
- [11] Behr B, Tang C, Germann G, et al. Locally applied VEGFA increases the osteogenic healing capacity of human adipose derived stem cells by promoting osteogenic and endothelial differentiation. *Stem Cells.* 2011;29(2):286-296.
- [12] Aluigi MG, Coradeghini R, Guida C, et al. Pre-adipocytes commitment to neurogenesis 1: preliminary localisation of cholinergic molecules. *Cell Biol Int.* 2009;33(5):594-601.
- [13] Choi YS, Dusting GJ, Stubbs S, et al. Differentiation of human adipose-derived stem cells into beating cardiomyocytes. *J Cell Mol Med.* 2010;14(4): 878-889.
- [14] Jeong JH. Adipose stem cells and skin repair. *Curr Stem Cell Ther.* 2010;5(2):137-140.
- [15] Banas A. Purification of adipose tissue mesenchymal stem cells and differentiation toward hepatic-like cells. *Methods Mol Biol.* 2012;826: 61-72.
- [16] Lin G, Wang G, Liu G, et al. Treatment of type 1 diabetes with adipose tissue-derived stem cells expressing pancreatic duodenal homeobox 1. *Stem Cells Dev.* 2009;18(10): 1399-1406.
- [17] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance suggestion of caring laboratory animals. 2006-09-30.  
中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [18] Zhang Y, Zhou Y, Jia LS. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15 (47):8777-8781.  
张亚, 周云, 贾立山. 多孔丝素复合脂肪间充质干细胞支架修复兔尿道缺损能促进血管的形成[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15 (47):8777-8781.
- [19] Zhang Y, Zhou Y, Jia LS, et al. Zhonghua Xiaowai Zazhi. 2011;32(5):380-383.  
张亚, 周云, 贾立山, 等. 脂肪间充质干细胞的体外诱导和成血管作用[J]. 中华小儿外科杂志, 2011, 32(5):380-383.
- [20] Jeschke MG, Hermanutz V, Wolf SE, et al. Polyurethane vascular prostheses decrease neointimal formation compared with expanded polytetrafluoroethylene. *J Vasc Surg.* 1999;29 (1):168-176.
- [21] Tang GH, Pinney SP, Broumand SR, et al. Excellent outcomes with use of synthetic vascular grafts for treatment of mycotic aortic pseudoaneurysms after heart transplantation. *Ann Thorac Surg.* 2011;92(6):2112-2116.
- [22] Peter A, Schneider, Harry F, et al. Thromboembolic potential of synthetic vascular grafts in baboons. *J Vasc Surg.* 1989;10(1): 75-82.



- [23] Losi P, Lomhardi S, Briganti E, et al. Luminal surface microgeometry affects platelet adhesion in small-diameter synthetic grafts. *Biomaterials*. 2004;25 (18):4447-4455.
- [24] Bznz Y, Rieben R. Endothelial cell protection in xeno transplantation: looking after a key player in rejection. *Xenotransplantation*. 2006;13:19-30.
- [25] Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, et al. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation*. 2004; 110(3):349-355.
- [26] Cao Y, Meng Y, Zhao CH, et al. *Zhongguo Yixue Kexue Yuanbao*. 2005;27(6):678-682.  
曹莹, 孟艳, 赵春华, 等. 脂肪来源成体干细胞分化为内皮细胞的潜能[J]. *中国医学科学院学报*, 2005, 27(6):678-682.
- [27] Murohara T. Autologous adipose tissue as a new source of progenitor cells for therapeutic angiogenesis. *J Cardiol*. 2009; 53(2):155-163.
- [28] Zhu XY, Zhang XZ, Xu L, et al. Transplantation of adipose-derived stem cells overexpressing hHGF into cardiac tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;379(4):1084-1090.
- [29] Jia LS, Zhou Y, Zhang Y, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2009;13(19):3698-3702.  
贾立山, 周云, 张亚, 等. 体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞向血管内皮细胞的分化[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(19): 3698-3702.
- [30] Gurevitch O, Slavin S, Resnick I, et al. Mesenchymal progenitor cells in red and yellow bone marrow. *Folia Biol(Praha)*. 2009; 55(1):27-34.
- [31] Parker AM, Shang H, Khurgel M, et al. Low serum and serum-free culture of multipotential human adipose stem cells. *Cytotherapy*. 2007;9(7):637-646.
- [32] Matushansky I, Hemando E, Socci ND, et al. Derivation of sarcomas from mesenchymal stem cells via inactivation of the Wnt pathway. *Clin Invest*. 2007;117(11):3248-3257.
- [33] Dai J, Rabie AB. VEGF: an essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification. *J Dent Res*. 2007; 86(10):937-950.
- [34] Schäßler A, Büchler C. Concise review: Adipose tissue-derived stromal cells-basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*. 2007;25(4):818-827.
- [35] Chiou M, Xu Y, Longaker MT. Mitogenic and chondrogenic effects of fibroblast growth factor-2 in adipose-derived mesenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 343(2):644-652.
- [36] De Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA, et al. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol Lett*. 2003;89:267-270.
- [37] Götherström C, Ringdén O, Westgren M, et al. Immunomodulatory effects of human foetal liver-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplant*. 2003; 32(3): 265-272.
- [38] Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in Normal Human Tissues. *J Histochem Cytochem*. 2006;54(4):385-395.
- [39] Gimbrone MA, Cotran RS, Folkman J, et al. Human vascular endothelial cells in culture growth and DNA synthesis. *J Cell Biol*. 1974;60(3):673-684.
- [40] Weibel ER, Palade GE. New cytoplasmic components in arterial endothelia. *J Cell Biol*. 1964;23: 101-112.
- [41] Shi DB, Fu WG, He HB, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2008;12(20):3831-3836.  
施德兵, 符伟国, 何红兵, 等. 实验犬浅静脉内皮细胞原位获取及体外培养[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(20):3831-3836.