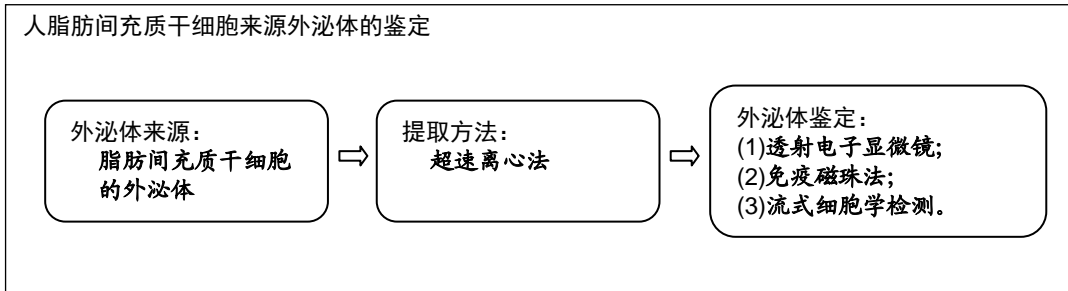


# 分离与鉴定人脂肪间充质干细胞来源的外泌体

王静<sup>1</sup>, 蔡霞<sup>2</sup>, 王志国<sup>2</sup>, 徐全臣<sup>3</sup>, 李坤<sup>4</sup>, 华骋<sup>5</sup> (1青岛大学医学部, 山东省青岛市 266021; 2青岛大学附属医院烧伤整形外科, 山东省青岛市 266021; 3青岛大学附属医院口腔科, 山东省青岛市 266021; 4青岛市第八人民医院手足外科, 山东省青岛市 266021; 5檀国大学, 韩国京畿道安养市)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1715 ORCID: 0000-0001-8503-3693(王静)

文章快速阅读:



王静, 女, 四川省广汉市人, 汉族, 硕士, 医师。

通讯作者: 蔡霞, 青岛大学附属医院烧伤整形外科, 山东省青岛市 266021

通讯作者: 王志国, 青岛大学附属医院烧伤整形外科, 山东省青岛市 266021

文献标识码:A  
稿件接受: 2019-02-25

文题释义:

外泌体: 外泌体是由多种细胞分泌的, 存在于几乎所有体液中的, 具有膜结构的囊泡。外泌体外形呈杯状, 直径为 30-100 nm, 密度为 1.13-1.19 g/mL。外泌体具有分泌细胞的特性, 其储存简单, 能在 4 °C 条件下保存较长时间。

摘要

背景: 脂肪间充质干细胞是重要的种子细胞之一, 可通过较简单的方法大量提取, 但其储存条件较苛刻, 运输不便, 临床应用较困难。外泌体可由脂肪间充质干细胞分泌, 其结构稳定, 不易分解, 为脂肪间充质干细胞在临床应用提供了新的可能性。

目的: 提取人脂肪间充质干细胞, 鉴定脂肪间充质干细胞, 诱导脂肪间充质干细胞多向分化, 提取脂肪间充质干细胞来源的外泌体, 鉴定脂肪间充质干细胞来源的外泌体。

方法: 收集青岛大学附属医院医学美容中心的正常成年女性行吸脂术后腹部浅层皮下脂肪组织, 用酶消化法分离提取脂肪间充质干细胞进行原代培养, 用细胞贴壁法纯化, 胰酶消化传代。选取第 3 代细胞分别行流式细胞学鉴定, 成脂肪细胞诱导与鉴定; 成骨细胞诱导与鉴定。取第 3-6 代脂肪间充质干细胞, 收集细胞上清液, 差速离心法提取外泌体, BCA 法测定蛋白浓度, 透射电镜观察外泌体形态, 粒度仪测外泌体直径分布, 免疫磁珠法和流式细胞学鉴定。

结果与结论: ①脂肪间充质干细胞形态为长梭形, 形似成纤维细胞, 排列紧密时呈巢状; ②流式细胞学检测显示 CD29, CD44, CD90 及 CD105 均为阳性表达, CD34 和 CD45 为阴性表达; ③成骨细胞诱导至第 9 天碱性磷酸酶染色为蓝紫色, 诱导至 21 d 时, 茜素红 S 染色可见细胞外基质内出现红色钙结节; ④成脂肪细胞诱导 14 d 后油红 O 染色呈橘红色; ⑤透射电镜显示外泌体结构为杯状, 直径为(81.225±22.226) nm, 有膜结构。蛋白浓度约为 1.5 g/L, 直径分布集中于 70-100 nm, 外泌体流式细胞学显示 CD9, CD29, CD44, CD63, CD90 和 CD105 为阳性表达, CD34 和 CD45 为阴性表达; ⑥结果证实, 人脂肪间充质干细胞来源的外泌体能够通过超速离心法顺利提取, 并通过透射电子显微镜、免疫磁珠法和流式细胞学检测相结合的方法成功鉴定。

关键词:

脂肪间充质干细胞; 外泌体; 成脂诱导; 成骨诱导; 细胞鉴定; 免疫磁珠法; 流式细胞学检测

中图分类号: R459.9; R364

基金资助:

山东省自然科学基金(XR2017MH083), 项目负责人: 王志国; 山东省重点研发计划基金(2018GSF118150), 项目负责人: 徐全臣

## Isolation and identification of exosomes from human adipose-derived mesenchymal stem cells

Wang Jing<sup>1</sup>, Cai Xia<sup>2</sup>, Wang Zhiguo<sup>2</sup>, Xu Quanchen<sup>3</sup>, Li Kun<sup>4</sup>, Hua Cheng<sup>5</sup> (1School of Medicine, Qingdao University, Qingdao 266021, Shandong Province, China; 2Department of Burn and Plastic Surgery, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266021, Shandong Province, China; 3Department of Stomatology, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266021, Shandong Province, China; 4Department of Hand and Foot Surgery, Qingdao Eighth People's Hospital, Qingdao 266021, Shandong Province, China; 5Dankook University, Anyang, Gyeonggi, Republic of Korea)

Wang Jing, Master, Physician, School of Medicine, Qingdao University, Qingdao 266021, Shandong Province, China

Corresponding author: Cai Xia, Department of Burn and Plastic Surgery, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266021, Shandong Province, China

Corresponding author: Wang Zhiguo, Department of Burn and Plastic Surgery, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266021, Shandong Province, China



## Abstract

**BACKGROUND:** Adipose-derived mesenchymal stem cells as one of the important seed cells can be extracted in large quantities by simple methods. However, clinical application of the cells is limited by rigorous storage conditions and inconvenient transportation. Exosomes can be secreted by adipose-derived mesenchymal stem cells, whose structure is stable and difficult to decompose, providing new possibilities for clinical application of adipose-derived mesenchymal stem cells.

**OBJECTIVE:** To isolate and identify human adipose-derived mesenchymal stem cells and induce multidirectional differentiation of the cells as well as to isolate and identify the exosomes from adipose-derived mesenchymal stem cells.

**METHODS:** Adipose-derived mesenchymal stem cells were isolated from superficial abdominal subcutaneous adipose tissue of normal adult women after liposuction. The cells were purified by cell adherence method. The cells were digested and passaged by trypsin. The third generation cells were identified by flow cytometry, followed by adipocyte induction and identification as well as osteoblast induction and identification. Adipose-derived mesenchymal stem cells of the 3<sup>rd</sup> to 6<sup>th</sup> generations were collected. The exosomes were extracted from cell supernatant by differential centrifugation. The protein concentration was measured by BCA. The morphology of the exosomes was observed by transmission electron microscopy. The diameter distribution of the exosomes was measured by particle size analyzer. The exosomes were identified by immunomagnetic beads and flow cytometry.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Adipose-derived mesenchymal stem cells were long spindle-shaped, fibroblasts-like, when arranged tightly. Flow cytometry showed that adipose-derived mesenchymal stem cells were positive for CD29, CD44, CD90 and CD105, but negative for CD34 and CD45. Alkaline phosphatase staining was blue-purple on the 9<sup>th</sup> day after induction of osteoblasts. Alizarin red S staining showed red calcium nodules in the extracellular matrix on the 21<sup>st</sup> day after induction. Oil red O staining was orange on the 14<sup>th</sup> day after induction of adipocytes. Under the transmission electron microscope the exosome was cup-shaped with a diameter of (81.225±22.226) nm and had a membrane structure. The protein concentration was about 1.5 g/L and the diameter distribution was concentrated in 70–100 nm. Flow cytometry showed that the exosomes were positive for CD9, CD29, CD44, CD63, CD90 and CD105, but negative for CD34 and CD45. To conclude, the exosomes derived from adipose-derived mesenchymal stem cells can be successfully extracted by ultracentrifugation and identified by transmission electron microscopy, immunomagnetic beads and flow cytometry.

**Key words:** adipose-derived mesenchymal stem cells; exosomes; adipogenic induction; osteogenic induction; cell identification; immunomagnetic beads; flow cytometry

**Funding:** the Natural Science Foundation of Shandong Province, No. XR2017MH083 (to WZG); the Shandong Provincial Key Research and Development Foundation, No. 2018GSF118150 (to XQC)

## 0 引言 Introduction

间充质干细胞是一种具自我更新和多向分化潜能的细胞<sup>[1-2]</sup>, 其遗传信息稳定, 是常用的种子细胞。常见的间充质干细胞有脂肪间充质干细胞、骨髓间充质干细胞、脐带间充质干细胞、牙龈间充质干细胞等。与其他间充质干细胞的来源相比, 脂肪组织是来源丰富、可消耗且容易获得的组织<sup>[3]</sup>, 因此, 脂肪间充质干细胞逐渐成为干细胞研究的新宠, 对脂肪间充质干细胞的研究也越来越多。脂肪间充质干细胞储存条件苛刻, 运输不便, 移植至生物体内存活率较低, 临床应用困难。外泌体是由多种细胞分泌的<sup>[4]</sup>, 存在于几乎所有体液中<sup>[5]</sup>, 具有膜结构的囊泡。外泌体外形呈杯状, 直径为30–100 nm<sup>[6]</sup>, 密度为1.13–1.19 g/mL<sup>[6]</sup>。外泌体具有分泌细胞的特性, 其储存简单, 能在4 °C条件下保存较长时间, 运输方便, 免疫原性较脂肪间充质干细胞低, 为脂肪间充质干细胞在临床的应用提供了新的方向。

因此, 实验进行人脂肪间充质干细胞来源的外泌体的提取与鉴定, 为后续外泌体在临床上的应用提供实验基础。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学实验。

1.2 时间及地点 于2017年11月至2018年12月在青岛大学附属医院中心实验室完成。

1.3 材料

**人脂肪组织:** 实验所用脂肪组织取自青岛大学附属医院医学美容中心5位行吸脂术的患者, 女性, 年龄18–45岁, 无基础疾病, 无烟酒不良嗜好, 无传染病, 无影响脂

肪代谢药物服用史。

### 1.4 实验方法

#### 1.4.1 人脂肪间充质干细胞的培养及鉴定

##### 人脂肪间充质干细胞的培养及鉴定

**细胞来源:** 青岛大学附属医院医学美容中心5例行吸脂术的患者

**细胞培养基:** DMEM/F12 和低糖 DMEM 培养基

**添加材料:** 体积分数 10%胎牛血清

**细胞传代:** 每隔两三天换液, 细胞浓度融合生长至 80%–90%时, 用体积分数 0.25%胰蛋白酶消化后按 1:2 传代培养

**细胞鉴定:** 流式细胞学检测鉴定脂肪间充质干细胞

取吸脂术后脂肪25 mL, 用含青霉素-链霉素双抗的PBS冲洗3遍, 去除肉眼可见的筋膜及红细胞后, 加入等体积0.075% I型胶原酶<sup>[7-11]</sup>, 在37 °C、150 r/min的条件下消化30–45 min, 加入等体积含体积分数10%胎牛血清的DMEM/F12培养基终止消化, 15 000 r/min离心10 min<sup>[12]</sup>, 去除上层油脂及中层清液, 用5 mL红细胞裂解液重悬, 室温静置5 min, 1 000 r/min离心5 min<sup>[13-14]</sup>, 去除上清液, 用含体积分数15%胎牛血清的低糖DMEM培养基重悬, 70 μm细胞筛网过滤后, 移入培养皿行原代培养, 每隔两三天换液, 细胞浓度融合生长至80%–90%时, 用体积分数0.25%胰蛋白酶消化后按1:2传代培养。

取第3代细胞, 使用PBS冲洗3次后, 体积分数0.25%胰蛋白酶消化后, 用700 μL的PBS配置成细胞浓度为1×10<sup>6</sup> L<sup>-1</sup>的细胞悬液, 分别向7支1 mL离心管内加入100 μL细胞悬液, 依次加入PE-anti-human CD29, FITC-anti-

human CD34, 488-anti-human CD44, PE-anti-human CD45, PE-anti-human CD90, 488-anti-human CD105和PBS各5  $\mu\text{L}$ , 室温避光孵化30 min, 1 000 r/min离心5 min, 去除上清液, 200  $\mu\text{L}$ 的PBS重悬, 1000 r/min离心5 min, 去除上清液, 洗涤3次后, 200  $\mu\text{L}$ 的PBS重悬, 等待上机检测。数据用FlowJo Software 7.6.1软件分析。

**1.4.2 成骨细胞诱导** 取第3代细胞, 细胞融合生长至80%–90%时, 更换成骨细胞诱导培养基, 以仅用完全培养基培养的细胞为空白对照, 分别于第0, 1, 4, 7, 14, 21天观察细胞形态。诱导至第9天行碱性磷酸酶染色<sup>[15]</sup>, 诱导至第21天行茜素红S染色<sup>[16]</sup>, 显微镜观察并记录。

**1.4.3 成脂肪细胞诱导** 取第3代细胞, 细胞融合生长至80%–90%时, 更换成脂肪细胞诱导培养基, 每隔3 d换液, 以仅用完全培养基培养的细胞为空白对照, 分别于第0, 1, 4, 7, 14天观察细胞形态。诱导至第14天油红O染色<sup>[17]</sup>, 显微镜观察并记录。

**1.4.4 外泌体的收集** 取3–6代细胞, 细胞融合生长至80%–90%时, 换无血清培养基培养24–48 h, 收集细胞上清液。收集的细胞上清液保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱等待超速离心。

**1.4.5 外泌体的提取** 将收集的上清液, 300 $\times g$ 离心10 min, 去除死细胞和大的细胞碎片, 2 000 $\times g$ 离心10 min<sup>[18]</sup>, 去除死细胞和细胞碎片, 10 000 $\times g$  /min离心30 min去除细胞碎片较大的囊泡, 0.22  $\mu\text{m}$ 针头过滤器过滤<sup>[19]</sup>, 去除微泡及可能存在的凋亡小体。用20 mL空针将上清液转移至超速离心管中, 10<sup>6</sup> $\times g$ 离心70 min, 去除上清液, 收集沉淀, 得到粗提取的外泌体, 10<sup>6</sup> $\times g$ 离心70 min, 去除上清液, 用100  $\mu\text{L}$  PBS溶解沉淀, 得到较纯的外泌体。一共超速离心750 mL上清液, 以上操作均在4  $^{\circ}\text{C}$ , 无菌条件下进行。

**1.4.6 外泌体浓度测定及形态学观察** 取5  $\mu\text{L}$ 外泌体溶液, 用BCA法测外泌体的蛋白浓度<sup>[18]</sup>; 取1滴外泌体滴于铜网上, 体积分数1%磷钨酸负染<sup>[20]</sup>, 室温干燥后, 用透射电子显微镜观察外泌体外形及检测外泌体直径<sup>[21]</sup>; 取20  $\mu\text{L}$ 外泌体溶液, 用PBS稀释至200  $\mu\text{L}$ , 用粒度仪检测直径分布。

**1.4.7 外泌体的流式细胞学检测** 旋涡30 s重悬CD81标记的磁珠, 取40  $\mu\text{L}$ 磁珠到1 mL离心管中, 加入400  $\mu\text{L}$  PBS清洗磁珠, 混合均匀, 将离心管放在磁力架上1 min, 弃去上清液; 用60  $\mu\text{L}$ 的PBS重悬磁珠, 加入40  $\mu\text{L}$ 外泌体溶液(一共100  $\mu\text{L}$ ), 在2–8  $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育过夜(18–22 h); 第2天, 将离心管离心3–5 s, 收集管底沉淀; 加入300  $\mu\text{L}$  PBS清洗磁珠结合的外泌体, 混合均匀, 将离心管放在磁力架上1 min, 弃去上清液; 重复清洗磁珠结合的外泌体1次, 800  $\mu\text{L}$  PBS重悬; 分别向8支1 mL离心管加入100  $\mu\text{L}$ 悬液, 依次加入PE-anti-human CD9, PE-anti-human CD29, FITC-anti-human CD34, 488-anti-human CD44,

PE-anti-human CD45, PE-anti-human CD63, PE-anti-human CD90, 488-anti-human CD105和PBS各10  $\mu\text{L}$ , 室温避光孵化40 min后, 将离心管放在磁力架上1 min, 弃去上清液; 加入400  $\mu\text{L}$  PBS清洗磁珠结合的外泌体2次, 用100  $\mu\text{L}$  PBS重悬, 等待上机检测。数据用FlowJo Software 7.6.1软件分析。

**1.5 主要观察指标** 人脂肪间充质干细胞的形态、表面标志物、多向分化的能力、电子显微镜下外泌体的形态和直径、外泌体的直径分布、外泌体特异性标志物。

## 2 结果 Results

**2.1 脂肪间充质干细胞的形态学观察** 脂肪间充质干细胞培养24–48 h后贴壁, 待5–7 d融合生长至80%–90%, 原代细胞形态呈梭形、圆形、多边形, 大小不一。传代至第5代细胞形态变为长梭形, 形似成纤维细胞, 单层贴壁, 排列紧密时呈巢状生长。见图1。

**2.2 脂肪间充质干细胞的流式细胞学检测** CD29, CD44, CD90及CD105均为阳性表达, 阳性率分别为99.7%, 88.9%, 96.1%及83.4%, CD34及CD45为阴性表达, 阴性率分别为98.7%和92.5%, 见图2。

**2.3 成骨诱导细胞形态** 成骨细胞诱导至4天时细胞开始变大, 形态变为立方形。诱导至第9天, 碱性磷酸酶染色为蓝紫色, 见图3。诱导至第21天, 细胞呈复层生长, 结构不清, 茜素红S染色可见细胞外基质内出现红色钙结节, 见图4。

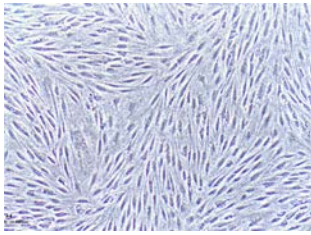
**2.4 成脂诱导细胞形态** 成脂肪细胞诱导4天细胞胞浆内开始出现透光性良好的小空泡, 随着诱导时间的延长而增加, 诱导至14天时出现大量透光性良好的大小不等的空泡, 油红O染色为橘红色, 见图5。

**2.5 外泌体的形态学观察** 外泌体外形为杯状, 有膜结构, 直径为(81.225 $\pm$ 22.226) nm, 见图6, BCA蛋白浓度测定结果为1.5 g/L, 粒度仪鉴定其直径集中分布在70–100 nm, 见图7。

**2.6 外泌体的流式细胞学鉴定** CD9, CD29, CD44, CD63, CD90及CD105均为阳性表达, 阳性率分别为99.5%, 100%, 99.8%, 95.6%, 100%及99.9%, CD34及CD45为阴性表达, 阴性率分别为97.6%和82.5%。见图8。

## 3 讨论 Discussion

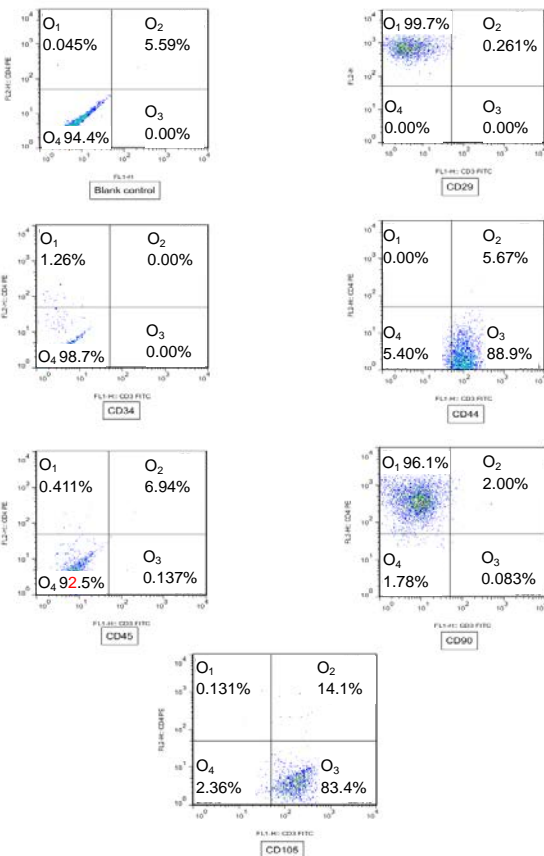
人间充质干细胞的特征在于其黏附性生长<sup>[22]</sup>, 自有研究从吸脂后脂肪组织内成功分离出脂肪组织提取细胞, 并证明其具有间充质干细胞的特性后<sup>[7, 23]</sup>, 因脂肪间充质干细胞相较于其他间充质干细胞具有来源广泛、取材简易、创伤较小等优点逐渐成为干细胞研究的重点。人体内含有的丰富的脂肪组织, 可以为干细胞研究提供充足的实验原料。脂肪组织能提供的干细胞数量也比其他组织更高, 1 g



图注: 细胞形态变为长梭形, 形似成纤维细胞, 单层贴壁, 排列紧密时呈巢状。

图 1 第 5 代人脂肪间充质干细胞的形态(x40)

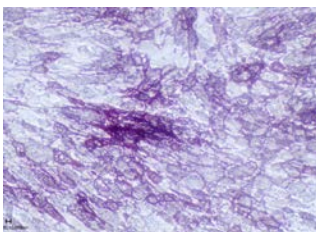
Figure 1 Morphology of the fifth generation human adipose-derived mesenchymal stem cells (x40)



图注: 图中 CD29, CD44, CD90 及 CD105 均为阳性表达, CD34 及 CD45 为阴性表达。

图 2 人脂肪间充质干细胞流式细胞学鉴定结果

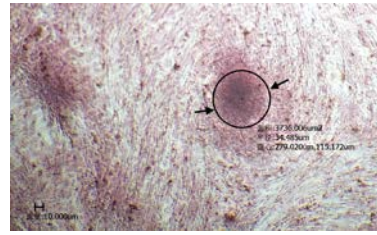
Figure 2 Flow cytometry identification of human adipose-derived mesenchymal stem cells



图注: 人脂肪间充质干细胞成骨诱导 9 d, 碱性磷酸酶染色呈蓝紫色。

图 3 人脂肪间充质干细胞碱性磷酸酶染色形态(x200)

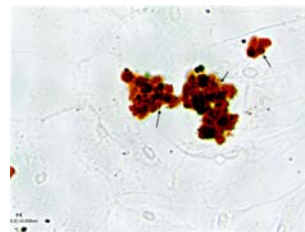
Figure 3 Alkaline phosphatase staining of human adipose-derived mesenchymal stem cells (x200)



图注: 人脂肪间充质干细胞成骨诱导至第 21 天, 可见细胞外基质内出现红色钙结节, 箭头所示, 结节直径约为 34.485 μm。

图 4 人脂肪间充质干细胞茜素红 S 染色形态(x100)

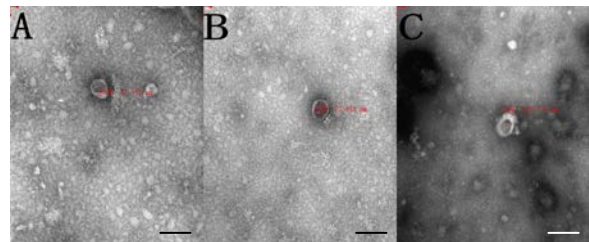
Figure 4 Alizarin red staining of human adipose-derived mesenchymal stem cells (x100)



图注: 成脂诱导 14 d, 脂肪空泡被油红 O 染色为橘红色, 如箭头所示。

图 5 第 3 代人脂肪间充质干细胞油红 O 染色形态(x200)

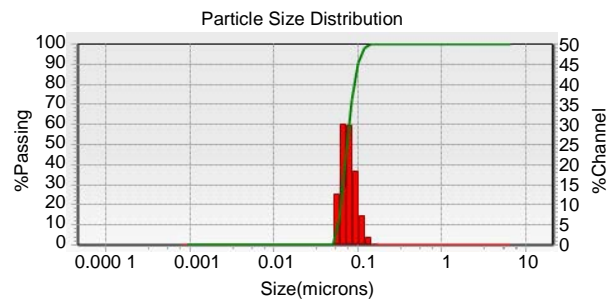
Figure 5 Oil red O staining of the third generation human adipose-derived mesenchymal stem cells (x200)



图注: 箭头所示为外泌体, 磷钨酸负染, 呈杯状, 可见膜结构包被。图 A, B 为外泌体被放大至 100 nm, 直径分别为 53.573 nm 及 73.849 nm, C 为外泌体被放大至 200 nm, 直径为 103.770 nm。

图 6 人脂肪间充质干细胞外泌体超微结构(透射电镜, 标尺=100 nm)

Figure 6 Ultrastructure of the exosomes from human adipose-derived mesenchymal stem cells under transmission electron microscope (scale bar=100 nm)

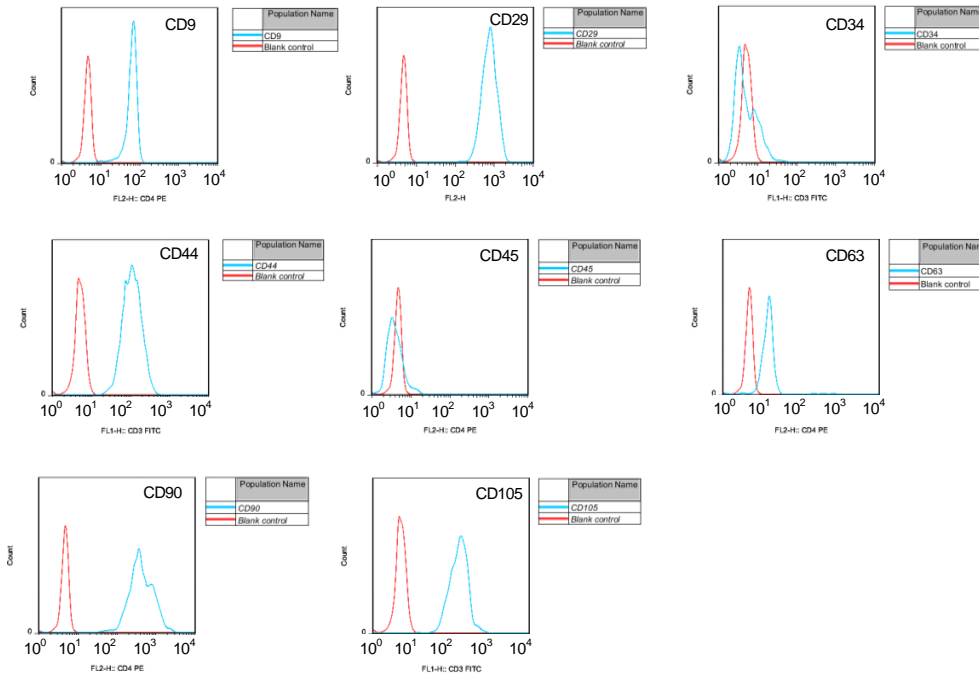


图注: 将 20 μL 外泌体溶液稀释至 200 μL, 粒度仪检测外泌体直径, 显示直径集中于 70-100 nm。

图 7 人脂肪间充质干细胞外泌体粒度仪检测结果

Figure 7 Particle size of the exosomes from human adipose-derived mesenchymal stem cells





图注：CD9, CD29, CD44, CD63, CD90 及 CD105 均为阳性表达, CD34 及 CD45 为阴性表达。

图 8 人脂肪间充质干细胞外泌体流式细胞学检测鉴定结果

Figure 8 Identification of the exosomes from human adipose-derived mesenchymal stem cells by flow cytometry

脂肪组织能提供的干细胞数量是1 g骨能提供的大约500倍<sup>[24-25]</sup>。另有报道证明脂肪间充质干细胞具有较强的自我增殖能力,每隔14 d传代,传至第25代仍保持较强的增殖能力,维持其表型,且具有较强的多分化潜能<sup>[26]</sup>。因此实验选择人脂肪间充质干细胞为实验对象。

多种方法均可获得脂肪组织,其中吸脂术能获取大量的脂肪组织<sup>[27]</sup>, McIntosh等<sup>[28]</sup>表明每毫升吸脂术后的组织中可在单次传代中产生 $2.5 \times 10^5$ 个有核细胞,有研究亦证实每毫升吸脂术后组织经分离提取纯化培养后能获得大量脂肪间充质干细胞<sup>[29]</sup>。不同部位、不同层次的脂肪组织所含脂肪间充质干细胞量不同,更多的脂肪间充质干细胞存在于皮下脂肪中<sup>[30]</sup>。不同脂肪组织分离出的脂肪间充质干细胞活性也存在差异<sup>[31]</sup>,据报道及预实验结果,实验选用腹部浅层皮下吸脂术后脂肪。脂肪间充质干细胞的分离提取方法多种多样,常见的有酶消化法和组织块贴壁法<sup>[32]</sup>。成熟的脂肪细胞含有大量的胶原<sup>[33]</sup>,使用I型胶原酶消化脂肪组织易于分离成熟的脂肪细胞与脂肪间充质干细胞,可获取较大量的脂肪间充质干细胞。

使用酶消化法提取的细胞为许多细胞类型的群体,包括血细胞、前脂肪细胞、成纤维细胞、血管平滑肌细胞、内皮细胞、滞留的单核细胞/巨噬细胞、淋巴细胞和脂肪间充质干细胞等<sup>[11]</sup>,需对脂肪间充质干细胞进行鉴定。据目前研究表明脂肪间充质干细胞无单一-特定的表面标志物,其与骨髓间充质干细胞表面标志物相似<sup>[34]</sup>,需通过对多种相对特异的表面标志物进行检测来对其进行鉴定。常用的检测方法为流式细胞技术和免疫组织化学技术。CD29存在于红细胞外几乎所有细胞及组织内<sup>[35]</sup>,其阳性高表达可排除红细胞污染。CD44在人间充质干细胞群体的几乎所有细胞中均有表达<sup>[36]</sup>; CD90在各代间充质干细

胞中均高表达<sup>[37]</sup>; CD105与CD44相似,也几乎表达于所有人间充质干细胞内<sup>[36]</sup>,此3者均高表达可认定为间充质干细胞。CD34和CD45为造血系统源细胞细胞表面标志物<sup>[25, 38]</sup>,其阴性高表达表达,可排除造血干细胞污染。实验使用流式细胞仪检测结果显示CD29, CD44, CD90及CD105均为阳性表达, CD34, CD45为阴性表达。与以往研究报道相符<sup>[8, 34]</sup>,可以在很大程度上认为所提取的细胞为脂肪间充质干细胞。

由于缺乏明确分子、CD和基因标记物来识别成体干细胞<sup>[39]</sup>,脂肪间充质干细胞具有多向分化的潜力,可在体外经诱导后分化为脂肪细胞、成骨细胞、软骨细胞及神经样细胞等<sup>[40]</sup>,因此可诱导多向分化来鉴定脂肪间充质干细胞。在体外诱导成骨细胞分化中,碱性磷酸酶是早期分化为未成熟成骨细胞的特征,诱导后4 d开始出现,12 d达到峰值<sup>[15]</sup>,随后开始下降,经碱性磷酸酶染色后可呈蓝紫色;成熟成骨细胞细胞外基质分泌丰富的I型胶原,在细胞分化的后期钙化<sup>[41]</sup>,诱导后21 d茜素红S染色阳性<sup>[42]</sup>。实验结果为成骨诱导至9 d碱性磷酸酶染色为蓝紫色,诱导至21 d茜素红S染色可见细胞外基质内出现红色钙结节,可认为成骨细胞诱导成功。在体外诱导成脂肪细胞分化中,诱导7-10 d后,细胞内充满含有中性脂质的空泡<sup>[43]</sup>,能被油红O检测。实验结果为成脂诱导至14 d时出现大量透光性良好的大小不等的空泡,油红O染色为橘红色<sup>[44]</sup>,可认为成脂肪细胞诱导成功。经实验结果表明所鉴定细胞具有多向分化的潜能。结合流式细胞学鉴定结果可认为实验所培养细胞为脂肪间充质干细胞。

外泌体首次被提出是在1980年,在网织红细胞成熟过程中被分离出来的<sup>[45-47]</sup>,随后外泌体逐渐从其他细胞中被分离出来,在血清<sup>[48-49]</sup>、母乳<sup>[50-51]</sup>、尿液<sup>[52-53]</sup>、唾液等

体液中也能分离出外泌体<sup>[54-55]</sup>, 外泌体几乎存在于所有体液中。大多数细胞均能释放外泌体, 如B细胞、T细胞、上皮细胞、内皮细胞、间充质干细胞及少突胶质细胞等<sup>[56-58]</sup>。外泌体是最小的细胞外囊泡<sup>[59]</sup>, 呈杯状, 直径30-100 nm<sup>[5]</sup>, 具有膜结构, 密度1.13-1.19 g/mL<sup>[6]</sup>。形成外泌体的常规途径是从质膜向内萌发进入多囊泡体, 在这些多囊泡体中, 外泌体可以通过向内出芽形成, 随后可以通过多囊泡体与质膜的融合而释放出来, 这些小泡还携带标记物, 如CD63和CD81<sup>[58, 60]</sup>。外泌体是细胞间通讯的基本媒介, 因为多种miRNAs、蛋白质、细胞因子都存在于外泌体中<sup>[61-63]</sup>, 因此外泌体可以通过运输受体与配体或者相关的遗传物质<sup>[5]</sup>, 在长距离或短距离的细胞信号和物质传递中均起重要作用<sup>[64]</sup>。干细胞来源的外泌体还具有稳定性高、无免疫排斥、归巢效应、剂量和浓度易于控制等优点<sup>[62, 65]</sup>。

获得外泌体的方法有很多, 其中差速离心法是收集外泌体的基础<sup>[66]</sup>, 能获取较大量的外泌体, 与外泌体提取和相比, 差速离心法也可避免使用透射电子显微镜观察时PEG的影响。细胞上清液内存在多种物质, 包括死细胞、细胞碎片、微泡、外泌体、凋亡小体等, 其中死细胞和较大的细胞碎片可通过低速离心分离, 较小的细胞碎片和较大的囊泡可以通过中速离心分离, 微泡可以通过(10 000-20 000)×g离心力分离<sup>[67]</sup>, 凋亡小体直径在1-5 μm<sup>[5]</sup>, 可通过0.22 μm的滤器将其分离, 外泌体直径较小, 可通过(100 000-200 000)×g分离, 因此实验选择差速离心法和0.22 μm滤器分离提取外泌体。

细胞来源的囊泡外形均呈杯状, 杯状形态是区分细胞来源囊泡和大小相似的颗粒有用的特征<sup>[5]</sup>, 区分微泡、凋亡小体和外泌体主要在于直径大小, 外泌体直径30-100 nm, 透射电子显微镜是鉴定外泌体的金标准, 是唯一可以同时测定囊泡大小和观察囊泡形态的方法<sup>[68]</sup>。粒度仪可以检测悬浮颗粒的直径分布<sup>[69]</sup>。实验透射电子显微镜鉴定的颗粒形态呈杯状, 有膜结构, 直径(81.225±22.226) nm, 结合粒度仪测定的颗粒直径范围集中于70-100 nm可以初步认为实验使用差速离心法提取的为外泌体。

外泌体具有膜结构, 其膜与质膜不同<sup>[70]</sup>, 外泌体膜具有较多的脂筏和蛋白质<sup>[4-5]</sup>, 有其特定的表面标志物, 如膜结合蛋白CD9, CD63, CD81及MHC I类分子等<sup>[58, 71]</sup>, 可以用流式细胞学和Western blot法鉴定<sup>[67, 72-73]</sup>, 实验选择使用流式细胞学鉴定。外泌体的直径很小, 一般的流式细胞仪无法检测, 根据外泌体膜具有特定的表面标志物, 实验选择使用免疫磁珠法和流式细胞学相结合的方法鉴定外泌体<sup>[74]</sup>, CD81是外泌体膜的特定标志物, 所以实验选择CD81标记的磁珠富集外泌体, 增加外泌体的直径, 让流式细胞仪容易检测。外泌体具有分泌细胞的特性, 可以通过检测特定的表面蛋白来反映其组织或细胞的来源<sup>[4]</sup>, 实验流式细胞学鉴定结果显示CD9, CD29, CD44,

CD63, CD90及CD105均为阳性表达, CD34及CD45为阴性表达, 进一步证明实验提取出的颗粒为外泌体, 其来源为脂肪间充质干细胞。

综上所述, 脂肪组织的来源广泛, 可以通过较为简便的方法获取较大纯度较高的脂肪间充质干细胞。脂肪间充质干细胞遗传信息稳定, 具有自我更新和多向分化能力, 可多次传代, 是间充质干细胞研究领域的重要成员。但是其储存条件及免疫原性限制了其在临床上的应用。外泌体几乎存在于所有体液, 几乎所有细胞均能释放外泌体<sup>[74]</sup>, 是细胞形成腔内小体后由多囊泡体胞吐作用释放到细胞外的胞外囊泡<sup>[60]</sup>, 具有分泌细胞的特性。外泌体具有膜结构是相对稳定的结构, 其浓度不受降解过程的影响<sup>[58]</sup>。外泌体的特性为脂肪间充质干细胞应用于临床提供了新的途径。实验顺利分离并鉴定了脂肪间充质细胞来源的外泌体, 为后续脂肪间充质干细胞来源的外泌体的研究及其在临床上的应用提供了实验基础。

**致谢:** 感谢青岛大学附属医院烧伤整形外科全体工作人员对实验的技术支持。

**作者贡献:** 王志国和蔡霞负责实验设计; 王静负责实验实施和实验数据的收集; 徐权臣负责实验技术支持; 李坤和华骋负责实验材料的提供。

**经费支持:** 该文章接受“山东省自然科学基金(XR2017MH083)和山东省重点研发计划基金(2018GSF118150)”支持。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程, 没有因其岗位角色影响文章观点和对数据结果的报道, 不存在利益冲突。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合本刊发稿宗旨。

**作者声明:** 第一作者和通讯作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其他任何合法用途。

## 4 参考文献 References

- [1] Williams KJ, Picou AA, Kish SL, et al. Isolation and characterization of porcine adipose tissue-derived adult stem cells. *Cells Tissues Organs*. 2008;(3):251.
- [2] Liao HT, Chen CT. Osteogenic potential: comparison between bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*. 2014;6(3):288.
- [3] De Ugarte DA, Ashjian PH, Elbarbary A, et al. Future of fat as raw material for tissue regeneration. *Ann Plas Surg*. 2003; 50(2):215-219.

- [4] Zhang J, Li S, Li L, et al. Exosome and exosomal microrna: trafficking, sorting, and function. *Genom Proteom Bioinf*. 2015;13(1):17
- [5] van der Pol E, Boing AN, Harrison P, et al. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev*. 2012;64(3):676.
- [6] Richard JS, Hina K, Suresh M. ExoCarta as a resource for exosomal research. *J Extracell Vesicles*. 2012. doi: 10.3402/jev.v1i0.18374.
- [7] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P. human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13(12): 4279-4295.
- [8] 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(2-3):267.
- [9] Bunnell BA, Flaata M, Gagliardi C, et al. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*. 2008; 45(2):115.
- [10] Arrigoni E, Lopa S, de Girolamo L, et al. Isolation, characterization and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells: from small to large animal models. *Cell Tissue Res*. 2009;338(3):401
- [11] Palumbo P, Lombardi F, Siragusa G, et al. Methods of isolation, characterization and expansion of human adipose-derived stem cells (ASCs): an overview. *Int J Mol Sci*. 2018;19(7):1897.
- [12] Bliley JM, Argenta A, Satish L, et al. Administration of adipose-derived stem cells enhances vascularity, induces collagen deposition, and dermal adipogenesis in burn wounds. *Burns*. 2016;42(6):1212.
- [13] Liew L, Ong H, Dilley R. Isolation and culture of adipose-derived stromal cells from subcutaneous fat. *Methods Mol Biol*. 2017;1627:193.
- [14] Riis S. Critical steps in the isolation and expansion of adipose-derived stem cells for translational therapy. *Expert Rev Mol Med*. 2015;17:e11.
- [15] Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, et al. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem*. 1997; 64(2): 295.
- [16] Baglioni S, Francalanci M, Squecco R, et al. Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue. *FASEB J*. 2009;23(10): 3494.
- [17] Farshid G, Kristen EL, Hani AA, et al. Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. *J Cell Physiol*. 2006;206(1):229-237.
- [18] Jason W, Robert S, Mason MD, et al. Cancer exosomes trigger fibroblast to myofibroblast differentiation. *Cancer Res*. 2010;70(23):9621
- [19] 方硕.干细胞来源的外泌体对成纤维细胞向肌成纤维细胞分化的调控作用及其机制研究[D].上海:第二军医大学,2016.
- [20] 王伟伟.HiPSC-MSCs来源Exosome促进部分肝切除后肝再生修复作用的研究[D].苏州:苏州大学,2016.
- [21] 王娟.脂肪干细胞来源的外泌体促进皮肤创伤愈合的研究[D].武汉:华中科技大学,2016.
- [22] Ruenn Chai L, Fatih A, Soon Sim T, et al. Derivation and characterization of human fetal MSCs: an alternative cell source for large-scale production of cardioprotective microparticles. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;48(6):1215-1224.
- [23] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7(2):211-218.
- [24] Toyserkani NM, Christensen ML, Sheikh SP, et al. Adipose-derived stem cells: new treatment for wound healing? *Ann Plas Surg*. 2015;75(1):117-123.
- [25] John KF, Isabella W, Zeni A, et al. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol*. 2006;24(4):150-154.
- [26] Zhu Y, Liu T, Song K, et al. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Biochem Funct*. 2008;26(6):664.
- [27] Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, et al. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol*. 2006;208(1):64.
- [28] McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, et al. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells*. 2006;24(5):1246-1253.
- [29] Aust L, Devlin B, Foster SJ, et al. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy*. 2004;6(1):7.
- [30] Di Taranto G, Cicione C, Visconti G, et al. Qualitative and quantitative differences of adipose-derived stromal cells from superficial and deep subcutaneous lipoaspirates: a matter of fat. *Cytotherapy*. 2015;(8):1076
- [31] 毛曦媛,程辰,李华,等.不同部位脂肪组织来源干细胞的特性[J].中华整形外科杂志,2015,31(3):234.
- [32] Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2006;24(2):376-385.
- [33] 吴尉,梁芳,宋小琴,等.人脂肪干细胞的提取和鉴定[J].中国组织工程研究,2015,19(28):4498.
- [34] Lee RH, Kim B, Choi I, et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem*. 2004; 14(4-6):311-324.
- [35] 田霖,孙筱放,刘海波,等.人脂肪干细胞的分离培养与生物学特性[J].中国组织工程研究,2012,16(32):5946
- [36] Matthias S, Christoph P, Florian H, et al. Human mesenchymal stem cells at the single-cell level: simultaneous seven-colour immunofluorescence. *J Anat*. 2007;210(5):592-599.
- [37] Katia M, Ivana F, Deborah R, et al. Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow. *J Cell Biochem*. 2006;97(4):744-754.
- [38] Wankhade UD, Shen M, Kolhe R, et al. Advances in adipose-derived stem cells isolation, characterization, and application in regenerative tissue engineering. *Stem Cells Int*. 2016;2016:3206807.

- [39] Vishnubalaji, R., Al-Nbaheen, et al. Comparative investigation of the differentiation capability of bone-marrow- and adipose-derived mesenchymal stem cells by qualitative and quantitative analysis. *Cell Tissue Res.* 2012;(2):419.
- [40] Guilak F, Awad HA, Fermor B, et al. Adipose-derived adult stem cells for cartilage tissue engineering. *Biorheology.* 2004;(3/4):389.
- [41] Scott DM, Kent GN, Cohn DV. Collagen synthesis in cultured osteoblast-like cells. *Arch Biochem Biophys.* 1980;201(2):384-391.
- [42] Reger RL, Tucker AH, Wolfe MR. Differentiation and characterization of human MSCs. *Methods Mol Biol.* 2008;449:93.
- [43] Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy.* 2003;5(5):362-369.
- [44] 李洪超,金银鹏,王哲,等.人脂肪干细胞及其外泌体的分离与鉴定[J].中国组织工程研究,2018,22(13):2033-2038.
- [45] Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem.* 1987;262(19):9412.
- [46] Harding C, Heuser J, Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol.* 1983;97(2):329.
- [47] Pan BT, Teng K, Wu C, et al. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol.* 1985;101(3):942.
- [48] Huang X, Yuan T, Tschannen M, et al. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *Bmc Genomics.* 2013;14(1):319.
- [49] Huang C, Fisher KP, Hammer SS, et al. Plasma exosomes contribute to microvascular damage in diabetic retinopathy (DR) by activating classical complement pathway. *Diabetes.* 2018;67(8):1639-1649.
- [50] Qin W, Tsukasaki Y, Dasgupta S, et al. Exosomes in human breast milk promote EMT. *Clin Cancer Res.* 2016;22(17):4517.
- [51] Lukasiak A, Brzozowska I, Zielenkiewicz U, et al. Detection of plant miRNAs abundance in human breast milk. *Int J Mol Sci.* 2017;19(1):E37.
- [52] Street JM, Koritzinsky EH, Glispie DM, et al. Urine Exosome Isolation and Characterization. *Methods Mol Biol.* 2017;1641:413-423.
- [53] Gheinani AH, Vogeli M, Baumgartner U, et al. Improved isolation strategies to increase the yield and purity of human urinary exosomes for biomarker discovery. *Sci Rep.* 2018;8(1):3945.
- [54] Nonaka T, Wong DTW. Saliva-exosomics in cancer: molecular characterization of cancer-derived exosomes in saliva. *Enzymes.* 2017;42:125.
- [55] Sun Y, Huo C, Qiao Z, et al. Comparative proteomic analysis of exosomes and microvesicles in human saliva for lung cancer. *J Proteome Res.* 2018;17(3):1101.
- [56] Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 2013;200(4):373.
- [57] Boon RA, Vickers KC. Intercellular transport of MicroRNAs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(2):186.
- [58] A Aryani BD. Exosomes as a nanodelivery system: a key to the future of neuromedicine? *Mol Neurobiol.* 2016;53(2):818-834.
- [59] Otani K, Mai Y, Kodama T, et al. Plasma exosomes regulate systemic blood pressure in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;503(2):776-783.
- [60] Cocucci E, Meldolesi J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends Cell Biol.* 2015;25(6):364.
- [61] Anders WM, Gunnar R. Role of exosomes in myocardial remodeling. *Circ Res.* 2014;114(2):315.
- [62] Hu L, Wang J, Zhou X, et al. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts. *Sci Rep.* 2016;6:32993.
- [63] 郭子宽,张涤平,陈贤光,等.一种人脐带间充质干细胞源外泌体及其获取方法和应用[P].CN201710262727.0, 2017-04-20.
- [64] 纪成,费书琴,陈鸣,等.间充质干细胞来源外泌体在肾脏疾病中的研究进展[J].第二军医大学学报,2018,39(7):722-725.
- [65] Januszyk K, Lima CD. The eukaryotic RNA exosome. *Curr Opin Struct Biol.* 2014;24(1):132.
- [66] Gould SJ, Raposo G. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles.* 2013. doi: 10.3402/jev.v2i0.20389.
- [67] Crescitelli R, Lässer C, Szabó TG, et al. Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *J Extracell Vesicles.* 2013. doi: 10.3402/jev.v2i0.20677.
- [68] van der Pol E, Hoekstra AG, Sturk A, et al. Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *J Thromb Haemost.* 2010;8(12):2596.
- [69] 黄春煌,马媛媛,任林,等.脂肪间充质干细胞条件培养基及其外泌体促成骨作用的体外研究[J].中华口腔医学研究杂志(电子版), 2018,12(2):101.
- [70] Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, et al. Blymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med.* 1996;183(3):1161-1172.
- [71] Caby MP, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, et al. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol.* 2005;17(7):879-887.
- [72] 肖漓,黄海燕,毕丽丽,等.HLA-G在肾移植受体外周血外泌体中表达的初步研究[J].中华器官移植杂志,2015,36(9):515.
- [73] 杨向荣,丁娟,徐正阳,等.人脐带间充质干细胞来源外泌体的生物学特性研究[J].华中科技大学学报(医学版),2016,45(2):154
- [74] 李玉静,刁振宇,胡娅莉.胎盘外泌体的生物学功能及分离纯化的研究进展[J].中华围产医学杂志,2015,18(6):446.