

## 脂肪间充质干细胞的研究进展

黄邓高<sup>#</sup>, 曹 卉, 高元慧, 郑琳麟, 张淑芳\* (中南大学湘雅医学院附属海口医院中心实验室, 海口 507208; \* 通讯作者, E-mail: haikuoyiyuan@163.com)

中图分类号: Q819 文献标志码: A 文章编号: 1007-6611(2018)08-0982-06 DOI: 10.13753/j.issn.1007-6611.2018.08.022

过去,脂肪只被看作是一种能量储存的组织而未引起研究者们重视。直到20世纪80年代中期,确定其参与性激素的新陈代谢后,脂肪组织变成一个参与人体新陈代谢和免疫应答重要的内分泌器官<sup>[1]</sup>。2001年Zuk等<sup>[2]</sup>首次报道一种新成体干细胞的来源,脂肪间充质干细胞(adipose-derived stem cells, ASCs)从脂肪组织分离获得,并于2004年达成共识称为“ASCs”<sup>[3]</sup>。此后,因其与骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived stem cells, BMSCs)一样具有高度增殖和自我更新能力,可在脂肪组织中分离获得大量的ASCs,且能多向分化成为中胚层和非中胚层细胞<sup>[4]</sup>,使其成为成体干细胞在再生医学应用研究的热点。应用于皮肤组织再生<sup>[5-6]</sup>、软骨和骨组织再生<sup>[7-10]</sup>、伤口愈合<sup>[11]</sup>、肝脏组织再生<sup>[12,13]</sup>、脑组织修复<sup>[14]</sup>、心肌梗死修复<sup>[15]</sup>、肌肉组织修复<sup>[16]</sup>、3D培养<sup>[17,18]</sup>以及整形美容<sup>[19]</sup>等,为许多疾病提供治疗方案,在修复、替换、维持或增强组织和器官的研究领域,凸显了强大的再生医学功能。

然而,从实验室研究到临床应用对ASCs的研究仍然存在争议,不同研究者的结果报道不一致。尤其在ASCs的分离培养、细胞表面标志物、增殖通路、诱导肿瘤发生、作用机制以及临床研究等方面。本文旨在对近年来ASCs研究进展进行综述。

### 1 ASCs的分离培养

研究表明,ASCs的产量受年龄、采集的部位和分离方法的影响。目前,ASCs具有最佳生物学功能且获取的细胞数量最多的分离方法尚未明确。Iyyanki等<sup>[20]</sup>研究报道从腹部直接切除且带有离心的Coleman's技术分离比从侧面或腋下获取更多的基质血管部分(stromal vascular fraction, SVF)细胞和

ASCs。Bian等<sup>[21]</sup>报道,直接切除术和吸脂术获得的ASCs在数量和成脂分化潜能之间没有显著性差异,但吸脂术获得ASCs的活细胞百分率明显高于通过直接切除术。捐赠者的年龄是影响ASCs产量的另一个重要因素,Wu等<sup>[22]</sup>研究显示所有年龄组(婴儿组、成人组和老人组)有相似的ASCs和成骨细胞的分泌活动。但从婴儿获得的ASCs血管生成和成骨能力比成年人和老年人高。Kornicka等<sup>[23]</sup>研究获得较一致的结果:年轻人( $\geq 20$ 岁)组和老年人(50-70岁)组收获ASCs在增殖活性、克隆-分化潜能和倍增方面有显著性差异。

不同的实验所建立的分离培养方法及标准化存在差异。Raposio等<sup>[24]</sup>使用两种不同的方法:一种是基于机械+酶(ME)方法,另一种是专用机械法(MC),以确定哪一种更优越。结果显示,以相同的抽脂量,分离结果与MC(5%)相比,ME程序分离获得ASCs更多(25.9%)。Markarian等<sup>[25]</sup>比较9种使用红细胞裂解缓冲溶液、胰蛋白酶、胶原酶和离心的方法,分析了ASCs的分离速率、细胞活力、扩增速率、免疫表型和分化为脂肪和成骨细胞系的潜能,最后发现通过胰蛋白酶消化成功分离和培养的ASCs,细胞群呈现类似的免疫表型,可成脂分化和体外增殖,成骨分化能力比通过胶原酶分离的ASCs的高7倍。该替代方案比常用方法更有效且成本更低,可以作为用于获得组织工程的ASCs相对有希望的方案。总体来说,胶原酶与胰蛋白酶消化法获得的ASCs比较被大家认可。其他方法如以注射器为基础的收获方式、真空抽脂法和外科脂肪切除术等因具有一定的侵袭性和细胞受到一定的损伤而没有被广泛应用。

虽然对脂肪组织的收获程序有较一致意见,但

基金项目:海南省重大科技项目(ZDZX2013003);海南省重大科技项目(ZDKJ2017007);海南省卫生厅项目(琼卫科教[2014]51-自筹47,[2014]51-64)

作者简介:黄邓高,男,1985-04生,硕士,助理研究员,E-mail:hdg\_qx@163.com

收稿日期:2018-04-25

目前没有一个标准化的方案来分离 ASCs 用于临床应用,这导致了文献中的不确定性。因此,需要一种以临床应用为目的的标准化方法,以优化和统一整个组织操作的过程和分离程序。本课题组<sup>[26]</sup>运用微创技术获取 10-20 g 腹部脂肪,采用 I 型胶原酶法消化微量脂肪组织标本,成功培养出有效的人 ASCs。细胞表面标志物 CD90、CD105、CD73、CD44 均表达阳性,而 CD34、CD45、HLA-DR 和 IgG1 均表达阴性,与之前报道的文献<sup>[2,9,20]</sup>一致,连续培养 10 代以内细胞表型与细胞形态无明显变化。因此,随着技术的进步,将来 ASCs 可能通过微创等技术而大量获得,需要进一步探索。

## 2 ASCs 细胞表面标志物

ASCs 的一个显著特点是它们不是同质的群体。许多研究尝试通过细胞表面标志物进行流式细胞术分析 ASCs 的表型,但是唯一的单一标记尚未被鉴定。ASCs 阳性表达典型的间充质标志物如 CD13、CD29、CD44、CD63、CD73、CD90 和 CD105,ASCs 对于造血抗原如 CD14、CD31、CD45 和 CD144 表达是阴性的<sup>[27]</sup>。ASCs 在培养的第一代时具有 CD34 的阳性表达,但在传代后 CD34 表达降低<sup>[28]</sup>。ASCs 的表面标志物可以随着传代而改变,如造血标志物 CD11、CD14、CD34 和 CD45 的表达消失或丧失<sup>[29]</sup>。另一方面 CD29、CD73、CD90 和 CD166 的表达水平从 SVF 到第 2 代逐渐增加<sup>[27]</sup>。现有存在争论较多的是 CD105、CD146、CD166、CD140b、HLA-DR<sup>[30]</sup>。

直至目前,没有明确描述鉴别天然 ASCs 的标志物。分离培养的 ASCs 是由几个亚群的干细胞和前体细胞组成的非均匀细胞群。培养的 ASCs 的特征在于它们表达一组标志物,但它们的体外表型是动态的。一些标志物在培养过程中从头开始表达,随后部分标志物的表达会丧失。长期以来,CD34 表达于表征造血干细胞和造血祖细胞,但现在它是原代培养和短时间内鉴定 ASCs 亚群的潜在标志物。然而,长期培养的 ASCs 不表达 CD34,也可能是人造环境导致的结果。此外,ASCs(或其亚群体)的组成可能在不同的实验室和培养基之间发生变化。主要原因之一是缺乏 ASCs 的标准化分离和培养方案<sup>[28]</sup>。

ASCs 从消化脂肪组织的 SVF 获得,是一群包含 ASCs、血管内皮和壁细胞、平滑肌细胞、周细胞、成纤维细胞和循环细胞的不均匀混合物。本课题

组<sup>[26]</sup>的实验进行流式细胞术分析显示,ASCs 的表面标志物与 BMSCs 相似,这些细胞不表达 CD45,但表达 CD73、CD105 和间充质干细胞标志物 CD90。尽管已经有几个公布的报告建立了 ASCs 表型的标志物,但在这个异质群体中如何鉴定 ASCs 仍然缺乏共识。因此,脂肪组织 SVF 的均质亚群分离仍然是一个具有研究价值的课题。

## 3 ERK 与 MAPK 增殖通路

众所周知,细胞外信号相关激酶(extracellular signal-related kinase, ERK) 信号通路的激活是调节 ASCs 增殖和分化的机制之一。外部刺激诸如激素、分子因子、物理刺激和环境变化等作用于 ASCs 的靶受体激活 ERK。激活磷酸化的 ERK 随后启动了 ASCs 的生物学行为,特别是分化特性相关下游事件的级联反应。Liu 等<sup>[31]</sup>报道了由特异性 ERK 抑制剂 PD98059 诱导的 ERK 阻断磷酸化水平以剂量依赖的方式降低了 ASCs 的成骨分化,说明 ERK 信号通路参与 ASCs 成骨分化。Kim 等<sup>[32]</sup>报道,丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路也参与 TGF- $\beta$ 1 信号通路诱导 ASCs 的软骨形成分化。此外, TGF- $\beta$ 1 信号激活的 SMAD 转录因子与 ASCs 的软骨形成活性增加有关。虽然 ERK 信号通路可能有利于诱导 ASCs 的成骨分化,但 ERK 信号通路在其他细胞系的分化和 ASCs 的自我更新能力中的作用尚不清楚。另外,据报道,MAPK 信号通路可以控制癌症的发展和肿瘤发生<sup>[33]</sup>。总之,在 ASCs 增殖和分化过程中调节的 ERK 和 MAPK 信号通路仍存在争议与不明确性。本课题组<sup>[26]</sup>在探讨体外有效扩增人 ASCs 的研究显示低强度脉冲场超声的物理刺激可促进 ASCs 增殖,其增殖机制可能与热传递和代谢有关,具体机制仍在探索中。通过物理方法刺激实现干细胞增殖,保持干细胞原有的特性,不受细胞因子等外来因素的影响,对 ASCs 的研究及临床应用具有重要意义。

## 4 ASCs 再生性能

现有报道,ASCs 的再生潜能及调节机制可能有如下几种:第一种机制是 ASCs 可能通过向特定细胞类型的分化,在体内可更换有缺陷的细胞群。然而,随后有研究者对动物模型进行的研究,在体内跟踪 ASCs 的作用机制显示该机制尚未被证实<sup>[34]</sup>。ASCs 除了向脂肪细胞、成骨细胞、软骨细胞的分化

外,没有确切的研究证实间充质干细胞的分化功能,分化细胞表型仅通过特异性标记的表达验证<sup>[35]</sup>。虽然已经报道其体外分化为多种表型,但体内转化机制仍未明确。有报道,ASCs可在缺血组织中存活,但成熟脂肪细胞在缺血条件下容易死亡,ASCs被注射或移植到缺血组织后细胞存活率差<sup>[36]</sup>,又有报道称ASCs在缺氧条件下诱导血管生成因子分泌增强<sup>[37]</sup>。说明了植入后的环境对于细胞存活非常关键。对于特定的环境,ASCs移植需要适合的支持细胞附着、增殖和分化的生物材料支架。理想的支架可为细胞提供适合细胞存活的环境,应根据其多孔特性,如孔隙度、生物活性、机械完整性、生物降解性和低免疫原性等来选择支架<sup>[38]</sup>。而ASCs的体内分化机制仍需进一步探讨。

第二种机制是间充质干细胞(MSCs)分化可能出现“多种表型的中间细胞”,这些细胞没有显示出特定细胞和基质共同表达的标记物,而是ASCs处于一个特定的分化阶段只会表达需要分化方向的细胞标记物,没有展示他们所有的功能。且细胞的转分化是否是融合的结果,尚未完全明确<sup>[16,39]</sup>。研究显示ASCs植入后没有检测到细胞融合、分化为肝细胞与宿主肝细胞的证据<sup>[40]</sup>。

第三种机制是ASCs的调节作用。首先,可能通过刺激内源性干细胞,将其招募到受损区域,然后贡献于适当的细胞系。其次,在组织损伤的部位ASCs可能是一种抗氧化剂,自由基清除剂和伴侣/热休克蛋白的来源。由于它们的作用,有毒物质被分离、去除,使存活的细胞可以恢复它们的功能。许多研究者认为,ASCs促进组织和器官的细胞再生,主要是通过细胞因子和生长因子的释放<sup>[34]</sup>。

近年来,干细胞在治疗方面已经越来越深入,从遗传疾病到现代生活方式的疾病,从神经到内脏再到皮肤,无论男女老少还是轻重缓急,干细胞都发挥着其重要的再生性能。因此,进一步深入探讨ASCs的再生性能将有助于其临床应用。

## 5 致癌潜能

尽管ASCs对组织工程和再生医学发挥积极作用,但许多研究显示ASCs具有致癌潜能。体外和动物研究认为,ASCs可与肿瘤细胞相互作用并诱导肿瘤发生<sup>[41]</sup>。Chandler等<sup>[42]</sup>进行了ASCs与肿瘤细胞之间相互作用可能机制的研究,他们发现乳腺肿瘤分泌的可溶性因子抑制脂肪分化,但增加了

ASCs的增殖、促血管生成因子分泌和肌成纤维细胞分化。这种ASCs的行为类似于乳腺肿瘤的特征,通过正交异性小鼠实验进一步证实了这一结果。Eterno等<sup>[43]</sup>研究表明,ASCs可能通过HGF/c-Met/ $\beta$ -catenin轴激活支持乳腺癌细胞的增殖,这对脂肪移植后增加乳腺癌复发率非常重要。Schweizer等<sup>[44]</sup>和Ohuchi等<sup>[45]</sup>研究却发现ASCs诱导乳腺癌的复发、转移或通过微环境诱导乳腺癌恶化。相反,Cousin等<sup>[46]</sup>报道ASCs可以抑制肿瘤的活力和增殖,具有ASCs条件培养基和胰腺肿瘤细胞的共培养系统能够在体内和体外促进胰腺肿瘤细胞的死亡。在肝、前列腺和结肠癌中也发现由ASCs介导的这种抑制作用。Zhang等<sup>[47]</sup>发现ASCs在体内体外都可以分化为泌尿系统细胞,揭示ASCs可作为治疗泌尿膀胱上皮癌的潜在工具。总之,ASCs移植的致癌潜力仍不清楚,报道的结果不一致。

ASCs除了在组织修复中起作用,还可以影响各种免疫细胞并抑制这些细胞的活化和增殖,这些特征使ASCs对炎症性疾病的应用具有吸引力。ASCs除了同MSCs一样具有自我更新能力和多能性外,还有免疫抑制特性和低免疫原性等免疫调节能力。因此,使用ASCs的临床试验应结合患者的病史仔细考虑,特别是对于以前被诊断患有任何癌症的患者。

## 6 临床研究与应用

在临床研究上,ASCs的第一次临床应用是在2004年。近年来,ASCs在组织修复和再生研究方面,每年显著增加。研究者们最关注的是在修复和再生中使用ASCs的数量、临床试验评价疗效和安全性。根据美国临床试验(ClinicalTrials.gov database 2015)报道,有121项研究注册使用ASCs,这些研究包括治疗糖尿病、肝硬化、癩、心血管疾病、肢体缺血、肌萎缩侧索硬化、脂肪代谢障碍、移植物抗宿主病、克罗恩病、动脉硬化、软组织填充和骨组织缺损等,其中内分泌系统37例,缺血系统17例,软硬组织34例,其他33例。大多数涉及胃肠道和泌尿生殖道疾病、软骨和骨变性和移植物抗宿主病等疾病。基于合法性,ASCs用于韩国和日本的整形美容的临床治疗不受限制。但所有进行的研究大多处于早期阶段:0-I级43例、I/II级58例、III级5例、IV级2例、未确定13例,研究数量不超过100人。所有志愿者中32例为非招募志愿者,60例为

招募志愿者,完成25例,中断5例。大多数评估干细胞疗效的临床试验都是在病人招募的早期阶段进行,只有20%完成了5项研究被终止,这些研究被中断是由于缺乏治疗效果<sup>[48]</sup>。

在临床应用上仍然需要克服较多的困难,如首先是移植的供体与受体的免疫反应,其次是与植入合成材料之间的相互作用等问题。但是人们试图通过工程化的ASCs来解决此问题。有研究者通过组织工程在人和裸鼠体内将透明质酸基支架植入具有ASCs和对照组的脐带区域进行研究发现,与裸鼠不同的是人类基于透明质酸的支架不支持ASCs存活,无法诱导形成脂肪组织<sup>[49,50]</sup>。Yoshimura等<sup>[51]</sup>招募了15例患者,移除人造乳房植入物后,移植含有脂肪抽吸的SVF,并随访12个月,其结论是脂肪组织的体积增加可能不是由于ASCs分化而是通过血管生成和脂肪形成因子的分泌致使组织的旁分泌支持。所以,ASCs的临床研究与应用仍然存在巨大的挑战,需要大量的临床试验进一步证实其功能性。

目前正在进行的脂肪干细胞再生潜能评价的临床试验大多处于研究的早期阶段,主要目标是评估干细胞治疗在小范围内患者的安全性及其副作用。大量的研究只包含病例的描述,而不是随机试验,对照组结果不显著。但是研究者们正在为干细胞的临床应用攻坚克难,在抗抑制宿主病、糖尿病、卵巢早衰、肺病患者、皮肤再造、中风以及创口愈合等取得重大突破。干细胞技术攻克传统医学不能及的重大疾病的全新医疗技术,在治疗疾病与健康保健方面将有重大的作为。

## 7 总结

组织工程、再生医学和细胞疗法的发展必将预防目前许多无法治愈的疾病。ASCs在组织再生中具有突出的贡献,因为它们脂肪组织中具有高的细胞产量、分化成多个细胞系的潜能、分泌各种细胞因子的能力和免疫调节作用<sup>[3,4]</sup>。ASCs在塑造和重建手术中是组织修复和再生的良好候选者,但脂肪组织工程ASCs离“现成”的产品相差甚远。虽然生物材料是生物相容性的,在体内可以随着时间而降解,但大多数是源于动物来源的制剂,具有长期诱导免疫反应的可能性,也可能是引起严重免疫反应的宿主抗体<sup>[52]</sup>。因此组织工程化的ASCs应用需要攻破更大更艰巨的难关,未来研究我们可能需要更加关注以下内容:

第一,进一步优化分离培养流程,明确ASCs的作用机制。目前,使用ASCs治疗的临床试验已经有部分正在进行中。然而,很少有Ⅲ期临床研究报道。ASCs是再生医学有希望的细胞来源,但需要更多的研究来证实ASCs的安全性和使用组织工程ASCs的能效。将ASCs转化为临床实践之前,必须解决一些问题。①建立工业化异种不含动物衍生试剂的培养基,充分认识外来介质的安全性和效率,在体内进行进一步的研究。②建立长期保持ASCs性质的保存方法,以确保ASCs在组织工程和再生医学中应用的有效性。③明确干细胞向靶细胞的自发分化,或者细胞迁移和归巢机制的问题。④进一步深入研究ASCs中生物分子生长因子和生物制造支架之间相互作用的机制。⑤增加组织工程化的ASCs临床试验的研究,制定ASCs可作为再生医学治疗的标准,保证其治疗的长期安全性。

第二,进一步深入研究ASCs作为治疗工具可能存在的两面性。未来研究,我们需要考虑更多的问题:是哪些因素给予和支持ASCs最好的治疗效果,移植的干细胞在长期治疗的基础上是否能维持其未分化状态或是行使其分化功能,其不良分化的可能性和其与肿瘤细胞之间的相互作用;从基因组学、转录组学和代谢组学等多角度对治疗效果进行研究与观察,运用CRISPR-Cas9等先进的基因编辑技术改善组织工程ASCs的功能,不断探索ASCs不同时期细胞周期的调节,再通过新一代高通量测序等技术进行对改造后的细胞或治疗后的模型动物的基因进行筛选,不断优化组织工程化ASCs。将其作为一种药物来研究与开发,而不是一种工具。

总而言之,尽管现有ASCs的研究面临各种挑战,但由于其丰富的来源,相对简单的分离获取过程以及多向分化潜能将会被日益重视,优化其治疗前分离培养免疫特异性和同质性的干细胞群,提高分化为靶细胞的效率,建立最佳的移植阶段,提高移植后再生率,不断克服与完善现有的各种问题。ASCs在再生医学中仍然是一个非常具有前景的方法。在不久的将来,脂肪组织工程可能会成为各种疾病的制剂产品,使更多的患者受益,不断为人类带来更美好的未来。

参考文献:

- [1] Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament [J]. *Lancet*, 2004, 364(9429): 149-155.

- [2] Zuk PA , Zhu M , Ashjian P , *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells [J]. *Mol Biol Cell* ,2002 ,13: 4279 – 4295.
- [3] Tsuji W , Rubin JP , Marra KG. Adipose-derived stem cells: Implications in tissue regeneration [J]. *World J Stem Cells* ,2014 6 ( 3) : 312 – 321.
- [4] Bajek A , Gurtowska N , Olkowska J , *et al.* Adipose-derived stem cells as a tool in cell-Based therapies [J]. *Arch Immunol Ther Exp* ,2016; 64:443 – 454.
- [5] Klar AS , Zimoch J , Biedermann T. Skin tissue engineering: application of adipose-derived stem cells [J]. *Biomed Res Int* , 2017 2017: 9747010.
- [6] Muhammad G , Xu J , Bulte JWM , *et al.* Transplanted adipose-derived stem cells can be short-lived yet accelerate healing of acid-burn skin wounds: a multimodal imaging study [J]. *Sci Rep* 2017 7: 4644.
- [7] Kasir R , Vermekar VN , Laurencin CT. Regenerative engineering of cartilage using adipose-Derived stem cells [J]. *Regen Eng Transl Med* 2015 1( 1) : 42 – 49.
- [8] Garimella MG , Kour S , Piprode V , *et al.* Adipose-derived mesenchymal stem cells prevent systemic bone loss in collagen-induced arthritis [J]. *J Immunol* ,2015 ,195( 11) : 5136 – 5148.
- [9] Arrighi N , Moratal C , Clément N , *et al.* Characterization of adipocytes derived from fibro/adipogenic progenitors resident in human skeletal muscle [J]. *Cell Death Dis* ,2015 ,6( 4) : e1733.
- [10] Wallner C , Abraham S , Wagner JM , *et al.* Local application of isogenic adipose-derived stem cells restores bone healing capacity in a type 2 diabetes model [J]. *Stem Cells Transl Med* ,2016 ,5 ( 6) : 836 – 844.
- [11] Bertozzi N , Simonacci F , Grieco MP , *et al.* The biological and clinical basis for the use of adipose-derived stem cells in the field of wound healing [J]. *Ann Med Surg ( Lond)* ,2017 ,20: 41 – 48.
- [12] Lee SC , Jeong HJ , Lee SK , *et al.* Hypoxic conditioned medium from human adipose-derived stem cells promotes mouse liver regeneration through JAK/STAT3 signaling [J]. *Stem Cells Transl Med* ,2016 ,5( 6) : 816 – 825.
- [13] Chen GF , Jin YP , Shi XJ , *et al.* Adipose-derived stem cell-based treatment for acute liver failure [J]. *Stem Cell Res Ther* , 2015 ,6( 1) : 40.
- [14] Hsueh YY , Chang YJ , Huang CW , *et al.* Synergy of endothelial and neural progenitor cells from adipose-derived stem cells to preserve neurovascular structures in rat hypoxic-ischemic brain injury [J]. *Sci Rep* ,2015 ,5: 14985.
- [15] Davy PM , Lye KD , Mathews J , *et al.* Human adipose stem cell and ASC-derived cardiac progenitor cellular therapy improves outcomes in a murine model of myocardial infarction [J]. *Stem Cells Cloning* ,2015 ,8: 135 – 148.
- [16] Forcales SV. Potential of adipose-derived stem cells in muscular regenerative therapies [J]. *Front Aging Neurosci* ,2015 ,7: 123.
- [17] Ghanavati Z , Orazizadeh M , Bayati V , *et al.* Characterization of a three-dimensional organotypic co-culture skin model for epidermal differentiation of rat adipose-derived stem cells [J]. *Cell J* , 2016 ,18( 3) : 289 – 301.
- [18] Chan EC , Kuo SM , Kong AM , *et al.* Three dimensional collagen scaffold promotes intrinsic vascularisation for tissue engineering applications [J]. *PLoS One* ,2016 ,11( 2) : e0149799.
- [19] Banyard DA , Salibian AA , Widgerow AD. Implications for human adipose-derived stem cells in plastic surgery [J]. *J Cell Mol Med* ,2015 ,19( 1) : 21 – 30.
- [20] Iyyanki T , Hubenak J , Liu J , *et al.* Harvesting technique affects adipose-derived stem cell yield [J]. *Aesth Surg J* , 2015 ,35 ( 4) : 467 – 476.
- [21] Bian YQ , Chen D , Li WZ , *et al.* A comparative study on the biological characteristics of human adipose-derived stem cells from lipectomy and liposuction [J]. *PLoS One* , 2016 ,11 ( 9) : e0162343.
- [22] Wu W , Niklason L , Steinbacher DM. The effect of age on human adipose-derived stem cells [J]. *Plast Reconstr Surg* ,2013 ,131 ( 1) : 27 – 37.
- [23] 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.
- [24] Rapisio E , Simonacci F , Perrotta RE. Adipose-derived stem cells: comparison between two methods of isolation for clinical applications [J]. *Ann Med Surg* ,2017 ,20: 87 – 91.
- [25] Markarian CF , Frey GZ , Silveira MD , *et al.* Isolation of adipose-derived stem cells: a comparison among different methods [J]. *Biotechnol Lett* ,2014 ,36: 693 – 702.
- [26] Huang DG , Gao YH , Wang SL , *et al.* A new method for efficient amplification of human adipose-derived mesenchymal stem cells in vitro [J]. *Hainan Med J* ,2017 ,28( 10) : 1617 – 1620.
- [27] Riis S , Nielsen FM , Pennisi CP , *et al.* Comparative analysis of media and supplements on initiation and expansion of adipose-derived stem cells [J]. *Stem Cells Transl Med* 2016 5( 3) : 314 – 324.
- [28] Baer PC. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: an update on their phenotype in vivo and in vitro [J]. *World J Stem Cells* ,2014 ,6( 3) : 256 – 265.
- [29] Johal KS , Lees VC , Reid AJ , *et al.* Adipose-derived stem cells: selecting for translational success [J]. *Regen Med* ,2015 ,10 ( 1) : 79 – 96.
- [30] Zuk P. Adipose-derived stem cells in tissue regeneration: a review [J]. *ISRN Stem Cells* ,2013 2013: 713959
- [31] Liu Q , Cen L , Zhou H , *et al.* The role of the extracellular signal-related kinase signaling pathway in osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells and in adipogenic transition initiated by dexamethasone [J]. *Tissue Eng Part A* , 2009 ,15 ( 11) : 3487 – 3497.
- [32] Kim BS , Kang KS , Kang SK. Soluble factors from ASCs effec-

- tively direct control of chondrogenic fate[J]. *Cell Prolif*, 2010, 43(3): 249–261.
- [33] Ritter A, Frieme A, Fornoff F, *et al.* Characterization of adipose-derived stem cells from subcutaneous and visceral adipose tissues and their function in breast cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(33): 34475–34493.
- [34] Gimble JM, Bunnell BA, Guilak F. Human adipose-derived cells: an update on the transition to clinical translation [J]. *Regen Med*, 2012, 7: 225–235.
- [35] Gimble JM, Grayson W, Guilak F, *et al.* Adipose tissue as a stem cell source for musculoskeletal regeneration[J]. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2011, 3: 69–81.
- [36] Zhao L, Johnson T, Liu D. Therapeutic angiogenesis of adipose-derived stem cells for ischemic diseases[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8: 125.
- [37] Kakudo N, Morimoto N, Ogawa T, *et al.* Hypoxia enhances proliferation of human adipose-derived stem cells via HIF-1 $\alpha$  activation[J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0139890.
- [38] Tabata Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications[J]. *J R Soc Interface*, 2009, 6 Suppl 3: S311–S324.
- [39] Utsunomiya T, Shimada M, Imura S, *et al.* Human adipose-derived stem cells: potential clinical applications in surgery [J]. *Surg Today*, 2011, 41: 18–23.
- [40] Hu C, Li L. *In vitro* and *in vivo* hepatic differentiation of adult somatic stem cells and extra embryonic stem cells for treating end stage liver diseases[J]. *Stem Cells Int*, 2015, 2015: 871972.
- [41] Bielli A, Scioli MG, Gentile P, *et al.* Adult adipose-derived stem cells and breast cancer: a controversial relationship [J]. *Springer Plus*, 2014, 3(1): 345.
- [42] Chandler EM, Seo BR, Califano JP. Implanted adipose progenitor cells as physicochemical regulators of breast cancer[J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(25): 9786–9791.
- [43] 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: 613–633.
- [44] Schweizer R, Tsuji W, Gorantla VS, *et al.* The role of adipose-derived stem cells in breast cancer progression and metastasis [J]. *Stem Cells Int*, 2015, 2015: 120949.
- [45] Ohuchi N, Sasano H. Interaction with adipocyte stromal cells induces breast cancer malignancy via S100A7 upregulation in breast cancer microenvironment [J]. *Breast Cancer Res*, 2017, 19: 70.
- [46] Cousin B, Ravet E, Poglio S, *et al.* Adult stromal cells derived from human adipose tissue provoke pancreatic cancer cell death both *in vitro* and *in vivo* [J]. *PLoS One*, 2009, 4(7): e6278.
- [47] Zhang M, Xu MX, Zhang K, *et al.* Adipose derived stem cell differentiated towards urothelium phenotype both *in vivo* and *in vitro*: a potential use for bladder defect [J]. *Regeneration Transl Androl Urol*, 2014, 3(Suppl 1): AB19.
- [48] Kim YJ, Jeong JH. Clinical application of adipose stem cells in plastic surgery [J]. *J Korean Med Sci*, 2014, 29: 462–467.
- [49] Mineda K, Feng JW, Ishimine H, *et al.* Therapeutic potential of human adipose-derived stem/stromal cell microspheroids prepared by three-dimensional culture in non-cross-linked hyaluronic acid gel [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2015, 4(12): 1511–1522.
- [50] Huang SH, Lin YN, Lee SS. New adipose tissue formation by human adipose-derived stem cells with hyaluronic acid gel in immunodeficient mice [J]. *Int J Med Sci*, 2015, 12(2): 154–162.
- [51] Yoshimura K, Asano Y, Aoi N, *et al.* Progenitor-enriched adipose tissue transplantation as rescue for breast implant complications [J]. *Breast J*, 2010, 16: 169–175.
- [52] Zhang J, Huang X, Wang H, *et al.* The challenges and promises of allogeneic mesenchymal stem cells for use as a cell-based therapy [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6: 234.