

• 基础研究 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2024.07.003
网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20240118.1448.003\(2024-01-19\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20240118.1448.003(2024-01-19))

脂肪组织保存条件对体外分离培养人脂肪间充质干细胞的影响*

梁坤荣¹,王 慧¹,顾恩妍¹,吴振奇²,石 峰²,靳丽艳¹,张 蕊¹,于婷婷¹,王艳超¹,薛冰华^{1△}

(1.北京吉源生物科技有限公司技术部,北京 101300;2.北京翰洁吉源医院有限公司外科,北京 101300)

[摘要] **目的** 探讨抗生素、脂肪组织保存时间及温度和培养基对体外分离培养人脂肪间充质干细胞(ADMSC)的影响。**方法** 将吸脂术采集的腹部浅层皮下脂肪组织于 2~8℃、室温(22℃)、37℃保存 0、1、2、3、5、7 d 后,采用酶消化法分离提取细胞进行原代培养,用细胞贴壁法纯化,胰酶消化传代;传至第 5 代 ADMSC 时用流式细胞术检测表型,并分别在成脂、成骨诱导液中诱导分化,并采用油红 O 染色、茜素红染色进行鉴定。**结果** 不加庆大霉素比加庆大霉素的脂肪组织分离的原代 ADMSC 早 3 d 传代。保存 0、1、2、3、5 d 的脂肪组织分离的原代 ADMSC 初次传代时间分别为接种后 5、6、6、7、9 d,而保存 7 d 的脂肪组织分离的原代 ADMSC 无法正常扩增。2~8℃、室温、37℃保存的脂肪组织分离的原代 ADMSC 6 d 传代时细胞收获量分别为 $(7.7\sim 8.4)\times 10^4$ 、 $(6.9\sim 7.4)\times 10^4$ 、 $(4.8\sim 5.2)\times 10^4/\text{cm}^2$ 。含核苷比不含核苷培养基早 2 d 传代。成脂诱导后,诱导细胞分别表现出脂肪细胞和成骨细胞特性,对照细胞均为阴性。**结论** 抗生素、长时间、高温保存抑制 ADMSC 增殖,而核苷可促进其增殖。

[关键词] 脂肪间充质干细胞;体外分离培养;保存温度;保存时间;抗生素;培养基

[中图法分类号] R329.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2024)07-0972-07

Effect of adipose tissue storage conditions on in vitro isolation and culture of human adipose mesenchymal stem cells*

LIANG Kunrong¹,WANG Hui¹,GU Enyan¹,WU Zhenqi²,SHI Feng²,JIN Liyan¹,
ZHANG Rui¹,YU Tingting¹,WANG Yanchao¹,XUE Binghua^{1△}

(1. Department of Technology, Beijing Jiyuan Biotechnology Co., Ltd., Beijing 101300, China;

2. Department of Surgery, Beijing Hanjie Jiyuan Hospital Co., Ltd., Beijing 101300, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of antibiotics, adipose tissue preservation time and temperature, culture medium on in vitro isolation and primary culture of human adipose mesenchymal stem cells (ADMSC). **Methods** The superficial abdominal subcutaneous adipose tissues collected by liposuction were stored at 2—8℃, room temperature (22℃), 37℃ for 0, 1, 2, 3, 5, 7 d. After that, the cells were extracted by the enzyme digestion method for conducting the primary culture, purified by the cell adherent method, digested and passed by the pancreatic enzyme. Phenotypes were detected by flow cytometry in P5 generation ADMSC. The P5 generation ADMSC were induced to differentiate in adipogenic and osteogenic induction solution, and identified by Oil Red O staining and alizarin red staining. **Results** The primary ADMSC isolated from adipose tissue without gentamicin passed 3 d earlier than those isolated from adipose tissue with gentamicin. The first passage day of primary ADMSC isolated from adipose tissue stored for 0, 1, 2, 3, 5 d was 5, 6, 6, 7, 9 d, respectively, and the primary ADMSC isolated from adipose tissue stored for 7 d could not be amplified normally. The average cell yield of primary cells isolated from adipose tissue stored at 2—8℃, room temperature and 37℃ on 6 d was $(7.7\sim 8.4)\times 10^4/\text{cm}^2$, $(6.9\sim 7.4)\times 10^4/\text{cm}^2$, $(4.8\sim 5.2)\times 10^4/\text{cm}^2$, respectively. Fat in the medium containing nucleoside was transited 2 d earlier than fat in the medium without nucleoside. After induction of adipogenesis, the induced cells exhibited the characteristics of adipocytes and osteoblasts, respectively, and which in the control group was all negative. **Conclusion** Antibiotics, long-term, high temperature

* 基金项目:国家重点研发计划项目(2020YFA0112803);北京市顺义区重大科技研发项目(2022)。△ 通信作者, E-mail: xuebinghua@jiyuanbio.com.cn。

storage inhibit ADMSC proliferation, while nucleosides could promote its proliferation.

[Key words] adipose mesenchymal stem cells; isolation and culture in vitro; storage temperature; storage time; antibiotics; culture medium

1966 年, FRIEDENSTEIN 等从骨髓中发现了一类具有自我更新、增殖和多向分化潜能的细胞称之为间充质干细胞^[1], 可来源于除骨髓外的多种组织^[2]。脂肪间充质干细胞(adipose derived mesenchymal stem cells, ADMSC)来源于脂肪组织, 具有来源部位多、取材容易、扩增能力强、细胞因子分泌种类多等优势^[3-6]。ADMSC 的优势使其在整形医学^[7-10]、临床医学^[11-14]、再生医学^[15-18]等方面均受到了研究者的青睐, 同时也成为一种主要的细胞治疗药物的种子细胞^[19-20]。ADMSC 有多种提取方法^[21-23], 包括酶消化法、组织块贴壁法、酶消化法结合组织块贴壁法、悬浮培养法及机械分离方法(涡旋离心法、吸附柱法、超声处理法)等。本研究采用酶消化法进行脂肪组织分离纯化, 旨在探讨抗生素、脂肪组织保存时间和保存温度、培养基等对体外分离培养人 ADMSC 的影响, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞

腹部皮下脂肪组织由北京翰洁吉源医院在征得志愿者同意并签署知情同意书的情况下采集, 所有志愿者健康状况良好, 无系统性疾病和传染性疾病, 每次采集约 100 cm³。本研究已通过北京翰洁吉源医院伦理委员会, 审查意见号: (2021)临伦审第(235)号。采集的脂肪组织仅用于科学研究, 全部实验人员始终保持严谨、实事求是的科学态度。

1.1.2 试剂与仪器

α-MEM 基础培养基(C3060-0500, 上海龙田生物技术有限公司), α-MEM 基础培养基(C12571500BT, 美国 Gibco 公司), 5% 血小板裂解液(PL-NH-500, 美国 Sexton 公司), 庆大霉素(宜昌人福药业有限责任公司), Tryple(12604-021, 美国 Gibco 公司), 胰蛋白酶(0458-25G, 北京经科宏达生物技术有限公司), I 型胶原酶(V900891-1G, 美国 Sigma 公司), CD73-PE(550257, 美国 BD 公司), CD90-异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC, 5555985, 美国 eBioscience 公司), CD105-PE(560839, 美国 eBioscience 公司), CD34-PerCP(29103, 美国 BD 公司), CD45-ECD(A07785, 美国 BD 公司), 人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)-DR-APC(2350758, 美国 eBioscience 公司), CD14-FITC(555397, 美国 BD 公司), CD79a-APC(551134, 美国 BD 公司), 3-利福

定-1-1 甲基黄嘌呤(3-Isobuty-1-1-Methylxanthine, IBMX), 地塞米松, 吡哆美辛, 各种细胞培养皿和孔板, 流式细胞仪(AFC2, 美国 Thermo 公司), 恒温培养振荡器(ZWY-100H, 上海智城分析仪器制造有限公司), 细胞计数仪(Countess II, 美国 Invitrogen 公司), 倒置显微镜[AE2000, 麦克奥迪(厦门)医疗诊断系统有限公司]。干细胞无血清培养基: 含 95% α-MEM 和 5% 血小板裂解物。脂肪组织消化液: 含 80% 胰蛋白酶(储存浓度 0.25%)和 20% I 型胶原酶(储存浓度 1%)。

1.2 方法

1.2.1 ADMSC 分离培养及传代

原代 ADMSC 分离培养: 取不同实验条件的脂肪组织, 在超净工作台中将脂肪组织与 0.9% 生理盐水按照 1: 4 的体积比混合并置于适宜容器内颠倒混匀, 充分清洗含有膨胀液和血水的脂肪组织, 500 × g 离心 5 min, 重复 2 次。脂肪组织转移至新的离心管中, 加入脂肪组织消化液(脂肪组织: 脂肪组织消化液体积比为 1: 1), 充分混匀后置于 37 °C、230 r/min 的恒温摇床振荡消化 30 min。加入上一步消化液总体积 3 倍的干细胞无血清培养基终止消化, 500 × g 离心 8 min。弃上清液, 收集底部细胞, 将细胞转移至新的离心管中, 加生理盐水补足最大离心体积, 500 × g 离心 5 min, 此步骤重复 1 次, 去除油脂。弃上清液, 加入干细胞无血清培养基重悬, 将脂肪原液按 0.18 mL/cm² 的密度接种于培养皿中, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中进行培养。

原代 ADMSC 换液培养: 分离得到的原代 ADMSC 培养 24 h 后细胞开始贴壁, 观察细胞状态, 3~4 d 后全量吸弃原代 ADMSC 培养液, 加入等量新鲜干细胞无血清培养基, 去除红细胞, 在倒置显微镜下对不同实验条件下的细胞进行拍照。

原代 ADMSC 传代: 当原代 ADMSC 融合度至 90% 时, 进行细胞传代, 生理盐水清洗两遍, 加入 0.01 mL/cm² 稀释后的 Tryple(生理盐水: Tryple 体积比为 1: 1), 并使之均匀浸润全部细胞, 1 min 后显微镜下观察细胞, 加入 3 倍消化液体积的生理盐水终止消化, 收集细胞至离心管内, 充分混匀后取 100 μL 到 EP 管中计数并计算活率(细胞悬液: 台盼蓝体积比为 1: 1), 其余细胞 500 × g 离心 5 min, 弃上清液, 加入干细胞无血清培养基重悬, 按 1 × 10⁴/cm² 进行传代。

1.2.2 脂肪组织添加抗生素对体外分离培养人

ADMSC 的影响

因脂肪组织在采集和运输过程中很难做到完全无菌状态,故抗生素的加入有利于抑制细菌的增殖,这为后续无菌培养奠定基础,但抗生素的添加又可能影响细胞的活性。因此本实验对比抽脂时膨胀液中加入庆大霉素(8 万单位/1 L 膨胀液)和不加庆大霉素对脂肪组织分离 ADMSC 的影响,具体操作同上。

1.2.3 脂肪组织保存时间对体外分离培养人 ADMSC 的影响

将志愿者脂肪组织标本平均分成 6 份,分别保存 0、1、2、3、5、7 d 进行分离培养,记录传代时间及细胞收获量。

1.2.4 脂肪组织保存温度对体外分离培养人 ADMSC 的影响

将志愿者脂肪组织标本平均分成 3 份,分别于 2~8 ℃、室温(22 ℃)、37 ℃ 保存,分离培养,记录传代时间及细胞收获量。

1.2.5 培养基对体外分离培养人 ADMSC 的影响

分离后的脂肪,分别用不含核苷和含核苷的培养基进行培养,记录传代时间及细胞收获量。

1.2.6 流式细胞术分析细胞表型

收集第 5 代 ADMSC,利用流式细胞术^[24-25]检测 ADMSC 表面标志物 CD73⁺、CD90⁺、CD105⁺、CD34⁻、CD45⁻、HLA-DR⁻、CD14⁻、CD79a⁻。流程如下:取待测单细胞悬液,离心后用磷酸盐缓冲液调整密度为 1×10⁶/100 μL;将标记抗体加入试管底部,充分混匀;室温避光孵育 20 min。向管中加入 1 mL 生理盐水,混匀后 300×g 离心 5 min,弃上清液,重复洗涤 2 次。弃上清液,用 500 μL 生理盐水重悬细胞,混匀后上机分析。

1.2.7 定向诱导成脂分化

将生长状态良好的第 5 代 ADMSC 消化、重悬,调整细胞浓度,将 1.5×10⁵/孔细胞接入 6 孔板,融合度长至 70%~80%时,换 ADMSC 成脂诱导培养基(DMEM+10%胎牛血清+IBMX 0.5 mmol/L+地塞米松 1 μmol/L+吡啶美辛 200 μmol/L+胰岛素 10 μg/mL),2~3 d 换液,对照组用干细胞无血清培养基进行培养,当诱导组培养至镜下可以看到脂滴,吸除培养基,用磷酸盐缓冲液清洗 2 次,4%多聚甲醛固定 30 min,油红 O 染色 10 min,磷酸盐缓冲液洗去多余染料,拍照。

1.2.8 定向诱导成骨分化

将生长状态良好的第 5 代 ADMSC 消化、重悬,调整细胞浓度,将 1.5×10⁵/孔细胞接入 6 孔板,融合度长至 70%~80%时,换 ADMSC 成骨诱导培养基^[26],2~3 d 换液,对照组用干细胞无血清培养基进

行培养,当诱导组培养至镜下可以看到结节,吸除培养基,用磷酸盐缓冲液清洗 2 次,4%多聚甲醛固定 30 min,茜素红染色 10 min,磷酸盐缓冲液洗去多余染料,拍照。

2 结 果

2.1 ADMSC 形态

原代 ADMSC 接种 24 h 后,镜下可见少数贴壁细胞为大而扁平的单层细胞,有的细胞细长,似成纤维细胞。48 h 后大多数细胞贴壁,并开始伸展、分裂,呈梭形且有粗大突起,见图 1。接种 ADMSC 后培养 5~9 d,细胞逐渐分裂、汇合成单层,成簇分布,传代后细胞呈梭形,见图 2。

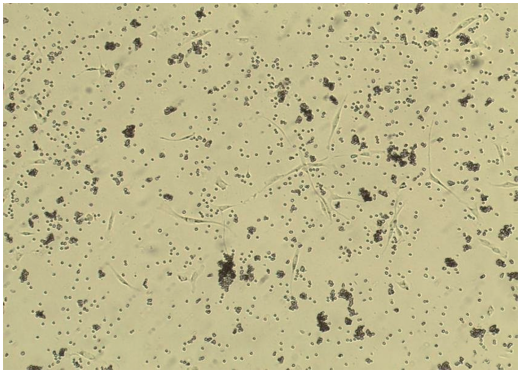


图 1 原代 ADMSC 培养 48 h 贴壁状态(40×)

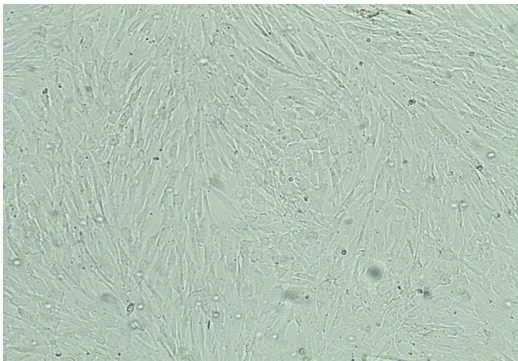


图 2 ADMSC 传代后培养 72 h 贴壁状态(40×)

2.2 脂肪组织添加抗生素对体外分离培养人 ADMSC 的影响

通过对 10 个志愿者的数据进行统计,抽脂时膨胀液中不添加庆大霉素,分离得到的原代 ADMSC 初次传代时间为接种后 5~6 d;添加庆大霉素后,原代 ADMSC 增殖明显缓慢,无典型间充质干细胞形态,初次传代时间为接种后 9~10 d,见表 1、图 3。因此,后续实验脂肪组织膨胀液中不再添加庆大霉素。

表 1 抗生素对体外分离培养人 ADMSC 的影响

抗生素	细胞接种量 (/cm ²)	初次传代时间 (接种后,d)	细胞收获量 (/cm ²)
否	1×10 ⁴	5~6	(7.7~8.2)×10 ⁴
是	1×10 ⁴	9~10	(2.7~3.4)×10 ⁴

2.3 脂肪组织保存时间对体外分离培养人 ADMSC 的影响

通过对 10 个志愿者的数据进行统计,保存 0 d 的脂肪组织分离得到的原代 ADMSC 呈梭形,初次传代时间为 5 d。保存 1~2 d 的脂肪组织分离得到的原代 ADMSC 呈梭形,初次传代时间为 6 d。保存 3 d 的脂肪组织分离得到的原代 ADMSC 不规则形态细胞变多,生长缓慢,初次传代时间为接种后 7 d。保存 5 d 的脂肪组织分离得到的原代 ADMSC 数量明显减少,初次传代时间为接种后 9 d。保存 7 d 的脂肪组织无

法分离得到原代 ADMSC,见表 2、图 4。

表 2 保存时间对体外分离培养人 ADMSC 的影响			
保存时间 (d)	细胞接种量 (/cm ²)	初次传代时间 (接种后,d)	细胞收获量 (/cm ²)
0	1×10 ⁴	5	(7.8~8.2)×10 ⁴
1~2	1×10 ⁴	6	(6.7~7.2)×10 ⁴
3	1×10 ⁴	7	(4.9~5.3)×10 ⁴
5	1×10 ⁴	9	(1.7~2.2)×10 ⁴
7	1×10 ⁴		

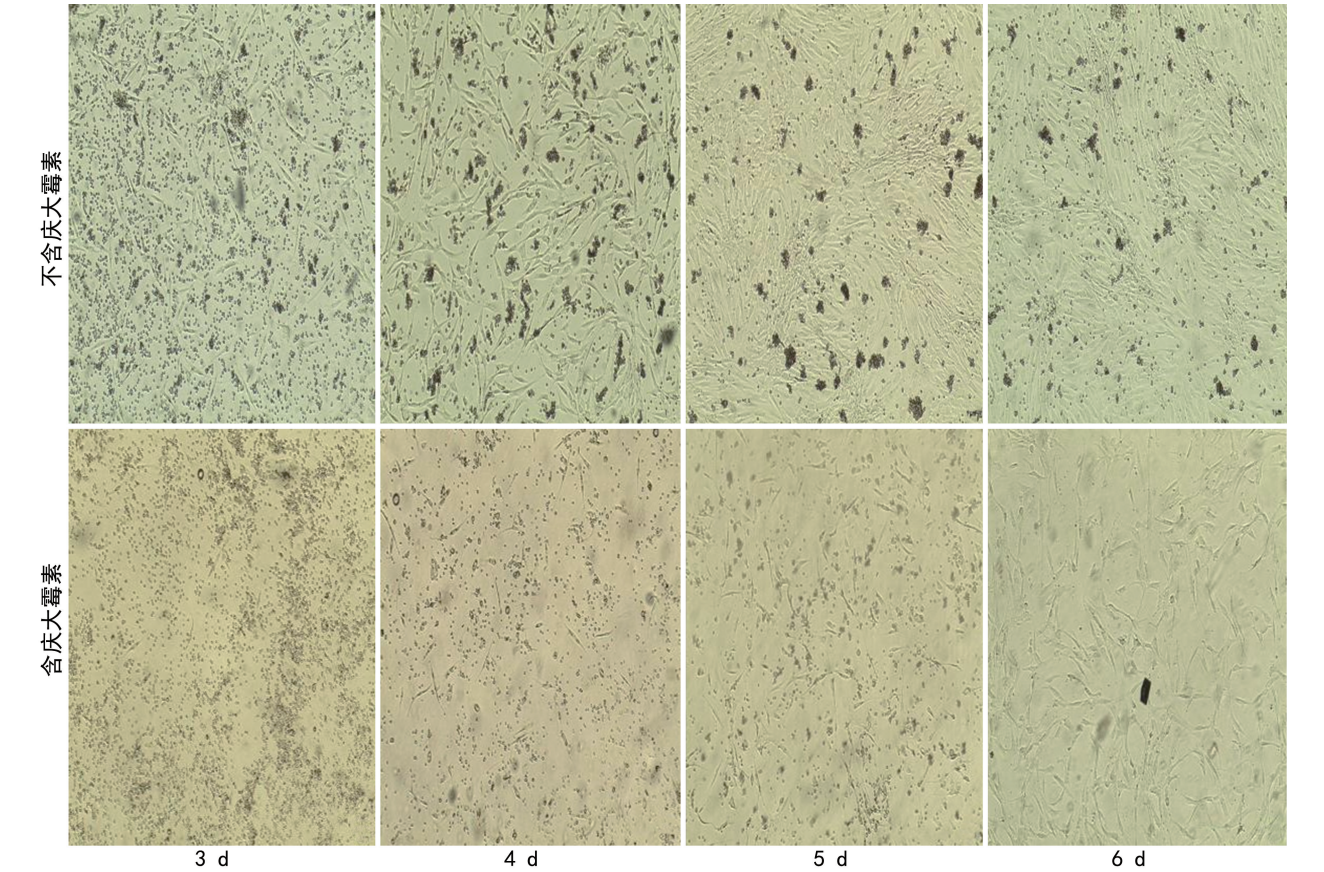


图 3 抗生素对体外分离培养人 ADMSC 的影响(40×)

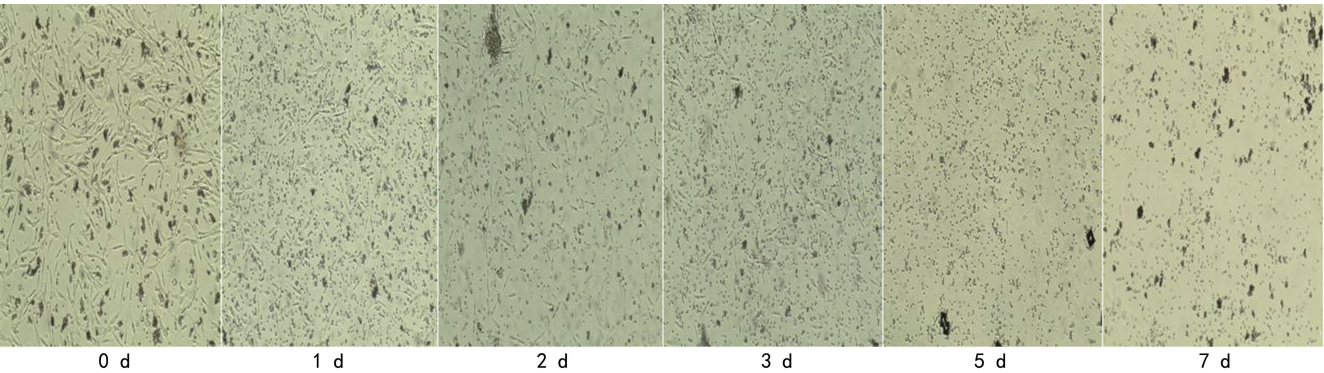


图 4 脂肪组织不同保存时间分离的 ADMSC 培养 3 d 的生长状态(40×)

2.4 脂肪组织保存温度对体外分离培养人 ADMSC 的影响

通过对 10 个志愿者的数据进行统计,在 2~8℃、室温、37℃保存下的 ADMSC 均培养到 6 d 进

行传代,结果显示,2~8℃保存下的 ADMSC 生长状态最佳,融合度约 95%,室温保存下的 ADMSC 融合度约 90%,37℃保存下的 ADMSC 融合度约 85%,见表 3、图 5。

表 3 保存温度对体外分离培养人 ADMSC 的影响			
保存温度	细胞接种量 (/cm ²)	初次传代时间 (接种后,d)	细胞收获量 (/cm ²)
2~8℃	1×10 ⁴	6	(7.7~8.4)×10 ⁴
室温	1×10 ⁴	6	(6.9~7.4)×10 ⁴
37℃	1×10 ⁴	6	(4.8~5.2)×10 ⁴

2.5 培养基对体外分离培养人 ADMSC 的影响

通过对 6 个志愿者的数据进行统计,在原始 ADMSC 分离培养时,用含核苷的 α-MEM 培养基,培养 3 d 有少量梭形细胞爬出,培养 5 d 可以进行传代。用不含核苷的 α-MEM 培养基,培养 4 d 有少量梭形细胞爬出,培养 7 d 可以进行传代,见表 4。

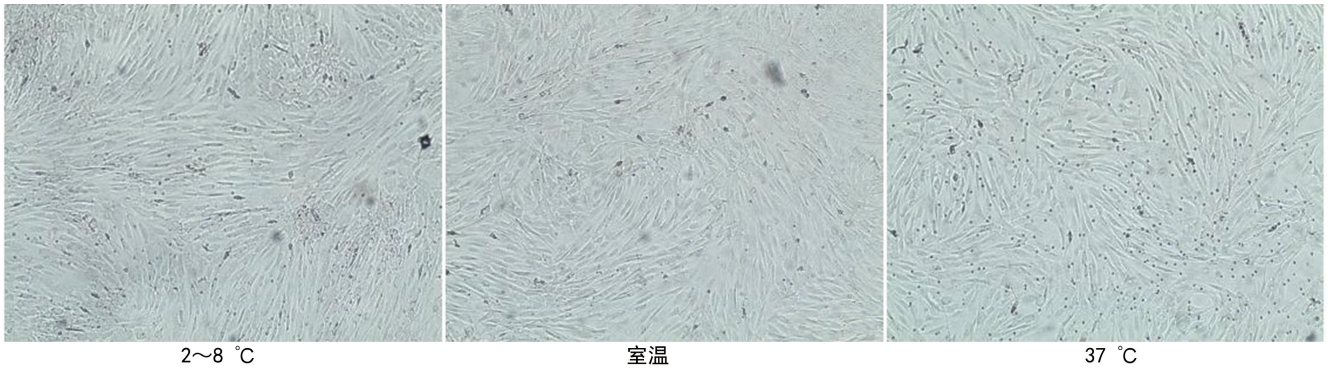


图 5 不同温度下保存的 ADMSC 传代时的融合度(40×)

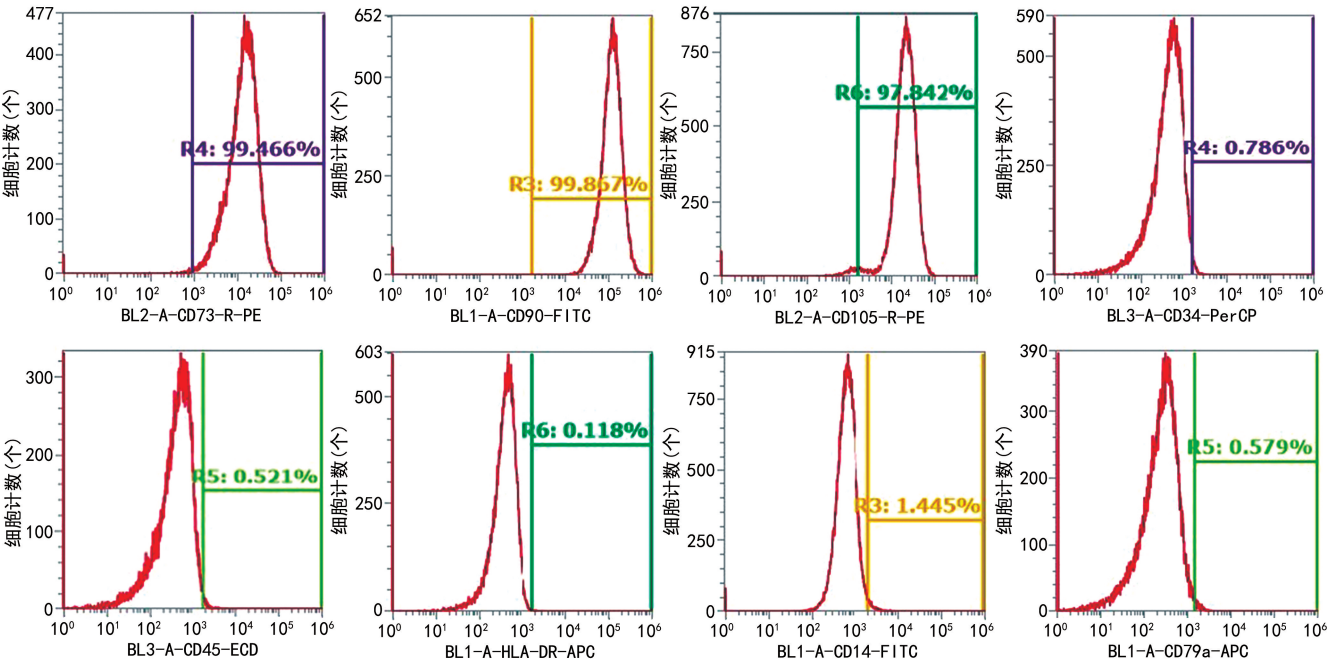


图 6 流式细胞术分析细胞表型结果

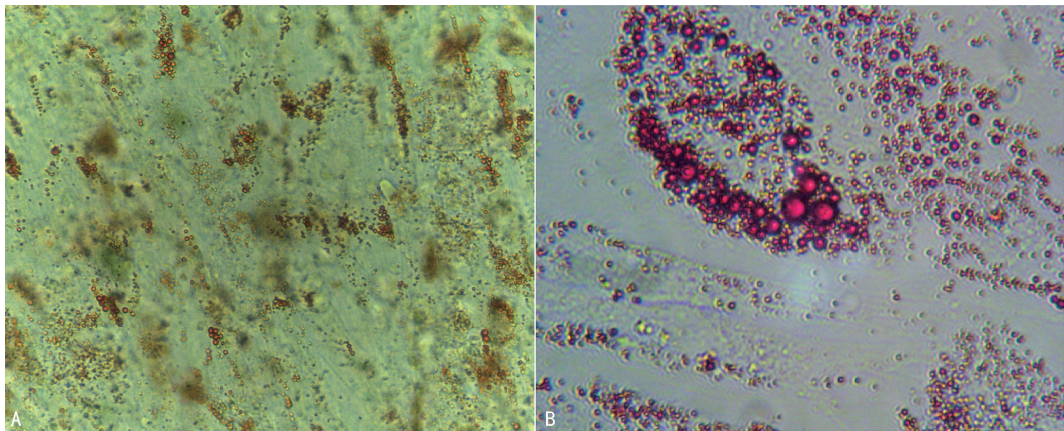
2.6 流式细胞术分析细胞表型

通过对 10 个志愿者的数据进行统计,流式细胞术检测 ADMSC 表面标志物,高表达 CD73[(99.5±0.1)%]、CD90[(99.7±0.2)%]、CD105[(97.8±0.3)%],低表达 CD34[(0.8±0.2)%]、CD45[(0.6±0.2)%]、HLA-DR[(0.12±0.02)%]、CD14[(1.4±0.2)%]、CD79a[(0.6±0.2)%],见图 6。

2.7 成骨、成脂诱导分化

成脂诱导:油红 O 染色阳性,细胞质内可见大量脂滴被染成橘红色,而对照呈阴性结果,见图 7。成骨诱导:茜素红染色阳性,提示钙结节形成,而对照呈阴性结果,见图 8。

表 4 不同培养基对体外分离培养人 ADMSC 的影响			
培养基	细胞接种量 (/cm ²)	初次传代时间 (接种后,d)	细胞收获量 (/cm ²)
含核苷	1×10 ⁴	5	(7.7~8.2)×10 ⁴
不含核苷	1×10 ⁴	7	(5.6~6.7)×10 ⁴



A:40×;B:100×。

图 7 ADMSC 成脂诱导油红 O 染色

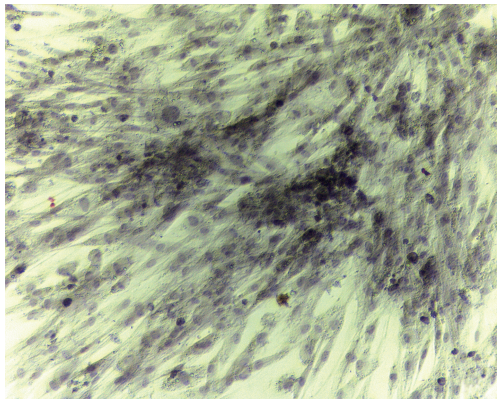


图 8 ADMSC 成骨诱导茜素红染色(40×)

3 讨 论

张云巍等^[27]通过实验发现,人 ADMSC 在脂肪组织中的含量与年龄的增长并无严格的相关性,且其体外扩增培养的形态学特征、生长周期也无明显差异。因此本实验对其他影响因素进行探究。

脂肪采集手术过程中向每升膨胀液中加入 8 万单位庆大霉素,虽然可在一定程度上防止标本污染,但脂肪组织在后期生长中,细胞贴壁时间过长且状态较差,影响细胞增殖。庆大霉素是氨基糖苷类抗生素,主要通过抑制细菌蛋白质的合成而起到抗菌作用,可能也会抑制 ADMSC 蛋白质合成,虽然能够在一定程度上避免污染,但会严重影响脂肪组织活性从而导致培养、增殖的速度变慢,细胞存活率降低。

本研究保存温度实验结果显示,温度升高,细胞的生长速度就减慢。从两个方面来考虑温度对脂肪活性的影响,一个是油脂的氧化速度逐渐升高,另一个是油脂中溶解的氧气含量降低,所以 2~8℃ 下细胞贴壁、增殖、存活率更趋于稳定。保存时间延长,脂肪组织氧化的程度就加重,所以脂肪保存时间不宜超过 72 h。

核苷具有提供能量,促进细胞生长、增强细胞活性,同时也参与 DNA 和 RNA 的合成,构成细胞基因

组,所以核苷在 ADMSC 的原代分离、传代培养中起到重要作用。脂肪组织活性是 ADMSC 分离培养过程中最为关注的问题,而脂肪组织的保存时间、保存温度是影响脂肪组织活性的主要因素。

综上所述,使用抗生素、长时间、高温保存会抑制 ADMSC 增殖,而核苷可促进其增殖,本实验为今后以 ADMSC 为目标的细胞治疗药学研究奠定了基础。

参考文献

[1] 赵雅丽,李瑞方,熊丽娇,等. 悬浮法及酶消化法分离培养脂肪干细胞[J]. 赣南医学院学报, 2021,41(10):984-987.

[2] MUSHAHARY D,SPITTLER A,KASPER C, et al. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells[J]. Cytometry A,2018,93(1):19-31.

[3] 赵璞,丁幸坡. 人脂肪干细胞的分离培养与鉴定[J]. 生物医学工程与临床,2017,21(4):339-344.

[4] ZHOU Y,ZHANG X L,LU S T,et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells-derived exosomes encapsulated in pluronic F127 hydrogel promote wound healing and regeneration[J]. Stem Cell Res Ther,2022,13(1):407.

[5] AL-GHADBAN S,BUNNELL B A. Adipose tissue-derived stem cells; immunomodulatory effects and therapeutic potential[J]. Physiology (Bethesda),2020,35(2):125-133.

[6] HEIDARI N,ABBASI-KENARSARI H,NAMAKI S, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cell-secreted exosome alleviates dextran sulfate sodium-induced acute colitis by Treg cell induction

- and inflammatory cytokine reduction[J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(8):5906-5920.
- [7] GENTILE P. Adipose-derived mesenchymal stem cells, cell-based therapies, and biomaterials as new regenerative strategies in plastic surgery[J]. *Biomedicines*, 2022, 10(8):1875.
- [8] SUROWIECKA A, STRUZYNA J. Adipose-derived stem cells for facial rejuvenation[J]. *J Pers Med*, 2022, 12(1):117.
- [9] GENTILE P, GARCOVICH S. Adipose-derived mesenchymal stem cells (AD-MSCs) against ultraviolet (UV) radiation effects and the skin photoaging[J]. *Biomedicines*, 2021, 9(5):532.
- [10] ZHOU L, WANG H, YAO S, et al. Efficacy of human adipose derived mesenchymal stem cells in promoting skin wound healing[J]. *J Healthc Eng*, 2022, 2022:6590025.
- [11] GONZÁLEZ-CUBERO E, GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ M L, GUTIÉRREZ-VELASCO L, et al. Isolation and characterization of exosomes from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells[J]. *J Anat*, 2021, 238(5):1203-1217.
- [12] BUNNELL B A. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells [J]. *Cells*, 2021, 10(12):3433.
- [13] SATILMIS B, CICEK G S, CICEK E, et al. Adipose-derived stem cells in the treatment of hepatobiliary diseases and sepsis[J]. *World J Clin Cases*, 2022, 10(14):4348-4356.
- [14] YILDIRIM S, OYLUMLU E, OZKAN A, et al. Zinc (Zn) and adipose-derived mesenchymal stem cells (AD-MSCs) on MPTP-induced Parkinson's disease model; a comparative evaluation of behavioral and immunohistochemical results[J]. *Neurotoxicology*, 2023, 97:1-11.
- [15] ONG W K, CHAKRABORTY S, SUGII S. Adipose tissue; understanding the heterogeneity of stem cells for regenerative medicine [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(7):918.
- [16] RHODE S C, BEIER J P, RUHL T. Adipose tissue stem cells in peripheral nerve regeneration-in vitro and in vivo[J]. *J Neurosci Res*, 2021, 99(2):545-560.
- [17] BANANI M A, RAHMATULLAH M, FARHAN N, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for breast tissue regeneration[J]. *Regen Med*, 2021, 16(1):47-70.
- [18] JO H, BRITO S, KWAK B M, et al. Applications of mesenchymal stem cells in skin regeneration and rejuvenation [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(5):2410.
- [19] MAZINI L, ROCHETTE L, ADMOU B, et al. Hopes and limits of adipose-derived stem cells (ADSCs) and mesenchymal stem cells (MSCs) in wound healing [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(4):1306.
- [20] KRAWCZENKO A, KLIMCZAK A. Adipose tissue-derived mesenchymal stem/stromal cells and their contribution to angiogenic processes in tissue regeneration[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(5):2425.
- [21] KHAZAEI S, KESHAVARZ G, BOZORGI A, et al. Adipose tissue-derived stem cells: a comparative review on isolation, culture, and differentiation methods[J]. *Cell Tissue Bank*, 2022, 23(1):1-16.
- [22] 刘琴, 王丽平, 陈芳, 等. 脂肪干细胞分离研究进展[J]. *华南国防医学杂志*, 2018, 32(4):281-285.
- [23] CAO J, SHEN Y, YANG Z, et al. Unique hypoxia-tolerant subpopulations of adipose-derived stem cells: ITGB3⁺ cells[J]. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2022, 75(9):3586-3594.
- [24] 李玉秋, 焦玉祥, 刘锐, 等. 脂肪干细胞的分离培养、分化及其应用[J]. *沈阳医学院学报*, 2019, 21(6):559-564.
- [25] ZHOU W, LIN J, ZHAO K, et al. Single-cell profiles and clinically useful properties of human mesenchymal stem cells of adipose and bone marrow origin [J]. *Am J Sports Med*, 2019, 47(7):1722-1733.
- [26] ZEDAN Z K, AL-AMERI S H A. In vitro study of primary isolation and culture of adipose-derived stem cells and induction of chondrogenic differentiation[J]. *Arch Razi Inst*, 2023, 78(1):125-133.
- [27] 张云巍, 徐丽娟, 王淑芳, 等. 人脂肪间充质干细胞体外诱导为肝脏样细胞的试验研究[J]. *首都医科大学学报*, 2014, 35(5):608-616.