

脂肪干细胞培养研究进展

刘 琴, 陈 芳, 朱以良综述, 张 宜审校

【摘要】 脂肪干细胞因其诸多优势被广泛应用到再生医学中, 高质量的脂肪干细胞是其应用到再生医学上的前提。而培养条件和增殖分化相关的分子调控是得到高质量脂肪干细胞的关键。文章主要对培养条件如培养方式、培养液的种类、血清、氧浓度、细胞接种密度、细胞代数等以及增殖分化相关分子调控如生长因子、MicroRNAs、Wnt/Notch 信号通路等方面对脂肪干细胞生物学特性的影响进行综述。

【关键词】 脂肪干细胞; 培养; 影响因素

【中图分类号】 R392.33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-271X(2019)01-0069-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1672-271X.2019.01.016

Cultivation of adipose-derived stem cells: research progress

LIU Qin, CHEN Fang, ZHU Yi-liang reviewing, ZHANG Yi checking

(Department of Medical Experiments, Central Theater General Hospital of Chinese People's Liberation Army, Wuhan 430070, Hubei, China)

【Abstract】 Adipose-derived stem cells(ASCs) as potential seeded cells have been widely used in regenerative medicine because of their many advantages. High-quality ASCs is an important premise for their application in regenerative medicine. However, culture conditions and molecular regulation of proliferation and differentiation are the key to obtaining high-quality ASCs. In this review, the effects of culture conditions such as culture mode, culture medium type, serum, oxygen concentration, cell inoculation density, cell passages, and molecular regulation of proliferation and differentiation such as growth factor, microRNAs, Wnt/Notch signaling pathway on the biological characteristics of ASCs were reviewed in order to provide theoretical basis for obtaining high-quality ASCs.

【Key words】 adipose-derived stem cells; cultivation; factors

0 引 言

再生医学需要合适的种子细胞, 目前的种子细胞有脐带血间充质干细胞、骨髓间充质干细胞、脂肪干细胞(adipose-derived stem cells, ASCs)等。ASCs 与其他种子细胞相比, 具有来源充足、取材方便、对自体损伤小、免疫原性低等诸多优势, 且具有向成骨/软骨细胞、脂肪细胞、心肌细胞、神经元样细胞、内皮细胞、角质细胞等多种细胞方向分化的潜能, 被应用于骨组织工程、乳房重建、自身免疫性疾病、修复梗死的心肌组织等^[1]。然而, 培养出高质量的 ASCs 是其在再生医学上发挥作用的前提。至今为止, 关于 ASCs 培养的研究已比较多, 但仍缺

乏 ASCs 培养相关的系统综述。本文从培养方式、培养液的种类、血清、氧浓度、细胞接种密度、细胞代数、增殖分化相关的分子调控等角度综述了 ASCs 培养的相关进展, 并对其未来研究方向进行了展望。

1 培养方式

干细胞的培养方式有 2D、3D 两种。以培养瓶/皿、细胞板为介质的 2D 平面培养是干细胞主要的培养方式, 此方法操作简单、价格理想, 缺点是无法模拟生物体内干细胞所存在的 3D 微环境、繁殖效率较低。3D 培养方式的生物微环境与体内细胞生长环境有着较高的相似度, 可更直观地观察干细胞的生物学特性^[2]。对于 3D 干细胞培养, 其先决条件是构架适宜的 3D 支架。现有支架材料有天然材料如胶原、透明质酸、壳聚糖、纤维蛋白等, 合成材料如聚乳酸、聚己酸内酯、聚乙烯对苯二甲酸酯等, 新型复合材料如丝素蛋白/壳聚糖、胶原/纤维

基金项目:湖北省卫生和计划生育委员会科研项目(WJ2017H0054)

作者单位:430070 武汉, 中部战区总医院医学实验科(刘 琴、陈 芳、朱以良、张 宜)

通信作者:张 宜, E-mail: abcd1566@sina.com

蛋白、聚己内酯/壳聚糖等^[3]。

相对于传统的 2D 培养, ASCs 在 3D 培养方式中表现出更加优异的生物学特性。如人 ASCs 在 3D 培养方式下成脂成骨能力增强, 细胞基质成分、血管生成因子、抗凋亡因子、抗氧化因子、抗炎性蛋白的表达量更高, 培养液对肝细胞损伤和凋亡的保护作用更强, 对小鼠肝纤维化、小鼠后肢缺血、缺血再灌注急性肾损伤大鼠的治疗效果更好^[4-6]。大鼠 ASCs 在 3D 培养方式下对人肝癌细胞株和人肝母细胞瘤细胞系 HepG2 生长的抑制作用增强, 其原理是下调上皮间质转化信号^[7]。

2 培养液

培养液中基础培养基的种类、血清种类、血清浓度影响着 ASCs 的生物学特性。

2.1 基础培养基的种类 用于 ASCs 基础培养基的种类有很多, 如 DMEM-F12、RPMI-1640、 α -MEM、DMEM-L、DMEM-H 等。人 ASCs 在 DMEM-F12/DMEM-H/DMEM-L/IMDM:HAM'sF12 1:1+10%FBS、M199+10%FBS+2 ng/mL 酸性成纤维细胞生长因子+5 ng/mL 肝素 5 种培养液中均增殖, 细胞形态均为成纤维样, 但其在上述最后 1 种培养液中群体倍增、生长速度最慢, 在上述第 2 种培养液中葡萄糖转运体 4 的表达量最高, 在上述第 4 种培养液中成软骨标志因子 SOX9 的表达量最高, 在上述第 1、2、4 种培养液中成骨分化能力最强^[8]。另有研究认为人 ASCs 在 α -MEM 中的增殖速率优于 DMEM 培养液^[9]。

培养基中葡萄糖浓度不同会影响 ASCs 的生物学特性。ASCs 常用培养基如 DMEM-L、DMEM-F12、DMEM-H 等, 其葡萄糖浓度分别为 1.0 g/L、3.1 g/L、4.5 g/L, 人 ASCs 培养在 4.5 g/L 高糖条件下, 与 1.0 g/L 低糖条件相比, 增殖能力、迁移能力降低, 细胞衰老增加; 成脂成骨分化能力无明显区别, 但是相关干性基因 Sox2、Oct4、Nanog 的表达量更高, 氧化反应水平高, 神经源性分化潜能更强^[10]。兔 ASCs 在 0.8 g/L、3.8 g/L 两种糖浓度下, 高糖浓度下增殖能力更强、细胞死亡率低^[11]。

2.2 血清 研究中使用最普遍的是动物血清, 动物血清的种类有 FBS、小牛血清等, 动物血清的使用浓度也存在差异, 在基础实验研究中使用比较普遍的是 10%FBS。但异种血清的使用可能会引起病原传播和免疫反应等, 在临床试验中急需找到合适的替代品。近年来, 出现了一些动物血清的替代物, 如人血清 (human serum, HS)、人血小板裂解液

(human platelet lysate, HPL)、人血浆 (human plasma, Hplasma) 等。

HS 的种类有很多, 如自体血清 (autologous serum, AS)、同种异体血清 (human allogeneic serum, HAS)、来源于贫血小板血浆的血清 (human serum from platelet-poor plasma, SPPP)、来源于富血小板血浆的血清 (human serum from platelet-rich plasma, SPRP), HS 种类的不同对 ASCs 生物学特性的影响也有所区别。10% AS / HAS 培养人 ASCs, 与 10%FBS 相比, 增殖速率大小依次是 AS>HAS>FBS, 细胞表型标记物 CD44、CD90、CD105 的表达量无明显区别, 但是人 ASCs 在 HAS 条件下成骨能力增强, 并且在 AS、HAS 条件下的细胞形态与 FBS 有所不同^[12]。HPL、Hplasma、HPL + Hplasma 3 种培养体系培养人 ASCs, 与 10%FBS 相比, HPL、HPL + Hplasma 能够加快人 ASCs 的生长速率, Hplasma 对人 ASCs 生长速率的影响不大; 人 ASCs 在上述 3 种新培养体系中的克隆形成能力增强, 细胞衰老减少, 保持典型的细胞表型, 具有成脂分化的能力且成骨能力更强^[13]。

动物血清的替代品大多数是来源于 HS、HPL、Hplasma 等, 然而上述替代品的来源有限, 限制了 ASCs 的大规模生产和应用。为解决此问题, 近年来, 出现了一些无血清培养体系, 如 Mesencult-XF 无血清培养体系、MSC-T4 无血清培养体系、Mosaic 无血清培养体系、StemPro 无血清培养体系等。Mesencult-XF 无血清培养体系培养人 ASCs, 与 10%FBS 相比, 无血清培养体系能够缩短人 ASCs 的群体倍增时间, 增强其增殖能力和成脂成骨分化能力^[14]。MSC-T4 无血清培养体系培养人 ASCs, 与 10%FBS 相比, 人 ASCs 在无血清培养体系中的群体倍增时间更短、增殖速率更快; 成脂成骨能力无明显区别, 但无血清培养体系能够增强其修复小鼠骨折的能力, 可能因为无血清培养体系中人 ASCs 趋化因子 CCL2、CCL5 和骨形态发生蛋白 2 的表达量提高^[15]。然而, 有研究者对无血清对人 ASCs 的影响提出了异议, 认为与 DMEM-F12+10%FBS 相比, 人 ASCs 在无血清条件下 (DMEM-F12) 的细胞密度、活力均下降, 细胞数目减少, 成脂能力下降, 成骨能力不变, 成软骨能力增强^[16]。甚至有研究指出, 犬 ASCs 在 StemPro 无血清培养体系中的增殖能力很差, 不能够得到足够数量的细胞用于实验研究^[17]。

3 氧浓度

氧是维持体内环境稳态和能量代谢的基础

条件,氧浓度发生变化将引起细胞生理功能出现相应的改变。生物体内各组织细胞生理环境的氧体积分数并不一致,氧分压往往较低,平均氧浓度仅 5%^[18]。其中,脂肪组织的氧浓度范围为 2%~8%^[19]。ASCs 居住在一个相对低氧的微环境中^[20]。然而,由于成本等各种原因,目前 ASCs 的体外培养大多是在常氧(21% O₂) 状态下进行。常氧状态下虽然能够快速扩增 ASCs,但是与其在体内的干细胞“龕”氧浓度有较大的差别,并不能客观地体现出 ASCs 在体内的真实生理特性。在常氧下进行 ASCs 相关的研究并不能客观地体现出细胞在体内移植后由于相对的缺氧缺血微环境而导致的增殖及转归等能力的变化。已有大量研究表明氧浓度可能影响 ASCs 的生物学特性。

不同种属即使是同一种属 ASCs 对低氧的反应程度也不相同。而且低氧对人 ASCs 生物学特性的影响还存在一些争议。不同原因可能是低氧处理的浓度、时间存在较大的差异,处理浓度 0.1%~5%,时间为 1 d、3 d、7 d 等,甚至更长^[19, 21]。大部分研究认为人 ASCs 在 1%~2% 低氧浓度下增殖能力增强,细胞表型标志物 CD73、CD90、CD105 表达水平保持不变,相关干性基因如 *Sox2*、*Nanog* 表达水平增加,可溶性因子如血管内皮生长因子、成纤维细胞生长因子的分泌量增多^[22-23]。少部分研究认为人 ASCs 在 1% 低氧浓度下增殖能力无明显变化,细胞表型标志物 CD105 的表达水平明显降低^[24]。人 ASCs 在 1%~3% 低氧条件下成脂成骨成软骨分化能力无明显变化^[21]。然而,有研究者认为 2% 低氧条件下人 ASCs 成脂诱导后油红 O 的染色面积虽无明显改变,但进一步从分子水平上进行比较发现低氧降低了过氧化物酶增殖物激活受体 γ 、脂肪酸结合蛋白 4 的表达量;成骨诱导后茜素红的染色面积无明显改变,但低氧明显降低了肝/骨/肾型碱性磷酸酶、骨钙素、RUNX2 的表达量;成软骨能力明显降低^[16]。或者 2% 低氧条件下人 ASCs 成脂成骨能力明显下降,成软骨能力增强^[19]。猪 ASCs 在 2% 低氧条件下的增殖能力明显增强,成骨能力明显下降,当需要大量猪 ASCs 时可在 2% 低氧条件下培养,当用于骨修复时可在常氧下培养^[25]。

4 细胞接种密度

ASCs 不同的接种密度可影响其增殖速率、基因的表达、分化能力。人 ASCs 以 200/5000 个细胞/cm² 接种培养 7 d 后分别可达 50%、90% 融合,与低

密度接种相比,高密度接种可上调表达 177 个基因,如参与免疫抑制、迁移及受损组织重建相关的基因,免疫防御、细胞交流、信号转导、细胞运动等相关的基因,特别是相关干性基因 *Nanog*、*c-Myc*;低表达增殖相关的基因,增殖速率变慢^[26-27]。大鼠 ASCs 以 2000/4000/8000 个细胞/cm² 接种,其在 8000 个细胞/cm² 接种密度下向雪旺细胞分化的能力最强^[28]。

ASCs 不同的接种密度还可影响其旁分泌功能。人 ASCs 在 40 000 个细胞/cm² 高细胞密度条件下,与 5000 个细胞/cm² 低细胞密度相比,在 mRNA 水平上可检测到脑源性神经营养因子的表达,并可明显上调神经生长因子、干扰素 β 、干扰素 α 的表达水平;在蛋白水平上脑源性神经营养因子明显提高,而神经生长因子、干扰素 β 的表达量只是稍微上升,与 mRNA 水平存在一定差异^[29]。

5 细胞代数

人 ASCs 在 10 代内的生物学特性基本保持不变^[30-31]。长期传代达 15 代时,其成脂成骨能力保持不变;细胞因子白介素-10、肝细胞生长因子的分泌量明显下降;与外周血单个核细胞共培养后干扰素- γ 的分泌量明显增加,治疗腹膜炎小鼠产生的炎症水平越来越高,免疫调节能力明显降低^[32]。长期传代达 20 代时,其成骨能力明显下降^[33]。然而对于长期传代对人 ASCs 生物学特性的影响说法不一。Faghih 等^[34] 认为人 ASCs 传至第 3 代时其生物学特性就会发生一系列变化,ASCs 相关的细胞表型标志物、细胞周期抑制物的表达量下降;转化因子 β 、成纤维细胞生长因子 2 等干性基因的表达量增加,成纤维细胞生长因子 4、白细胞抑制因子等干性基因的表达量下降;血管生成基因、上皮质转变标志物的表达量增加;细胞抗氧化能力、抗低氧能力、抗缺血能力无明显差异。

6 ASCs 增殖分化相关的分子调控

6.1 生长因子 许多生长因子已被研究证实影响 ASCs 的增殖和分化。表皮生长因子能够促进人 ASCs 的增殖和成骨成软骨分化能力,但不影响其成脂能力^[35]。胶质生长因子、成纤维细胞生长因子、血小板衍生生长因子对人 ASCs 分化为血旺样细胞后维持其血旺样细胞形态缺一不可^[36]。成纤维细胞生长因子和血管内皮生长因子能够促进人 ASCs 的增殖能力、迁移能力、附着能力和内皮分化能力^[37]。骨形态发生蛋白 12 影响人 ASCs 的分泌特性,如增加血管

内皮生长因子、白介素-6、基质金属蛋白酶-1、M-期磷酸蛋白的分泌量,还能影响其免疫调节^[38]。

6.2 miRNAs miRNAs 对 ASCs 增殖分化影响的报道越来越多。如 miRNAs-1 可通过增加 Notch1 和降低 Hes1 的表达水平来促进人 ASCs 向心肌样细胞分化^[39]。miRNAs-145 可通过调节 Krüppel 样因子 4 来调控人 ASCs 向平滑肌细胞的分化^[40]。miRNAs-193b 可促进人 ASCs 向脂肪细胞分化^[41]。

6.3 其他信号通路 Wnt、Notch 等信号通路调控着 ASCs 的增殖和分化。如 WNT3a 在人 ASCs 成骨分化早期阶段起促进作用,但其既不能改善成骨分化的后期阶段,也不能抑制成脂分化^[42]。Notch3 不影响人 ASCs 的增殖能力,但 Notch3 负调控人 ASCs 的成脂分化^[43]。

7 结 语

ASCs 因其诸多优势是组织工程热门候选种子细胞之一。如何培养出高质量的 ASCs 是其在再生医学上发挥作用的关键。影响 ASCs 培养的因素有很多,如培养方式、基础培养液、血清、氧浓度、细胞接种密度、细胞代数等。目前 ASCs 培养方法有 2D、3D 两种,3D 条件下 ASCs 展现出更加优异的生物学特性,而且还能出现特异性蛋白的表达,但是得解决 3D 培养方式不能完全模拟生物体内天然环境、ASCs 在支架材料上分布不均匀、ASCs 与支架材料结合不稳定等问题。基础培养液的种类有很多,每种基础培养液对 ASCs 生物学特性的影响不同,基础培养液里所含的不同浓度的葡萄糖可能是贡献者之一。氧浓度对 ASCs 的影响还存在一些争议,原因可能与低氧浓度和处理时间的不一致有关。细胞接种密度不一致会影响 ASCs 生物学特性,仍需要继续探讨获得最佳 ASCs 时的细胞接种密度。长期传代或多或少都会造成 ASCs 生物学的改变,尽量选用早期代数的 ASCs 用于实验研究。众多影响因素中最关键的是使用动物血清带来的一系列问题,如异种血清的使用可能会引起病原传播和免疫反应等。近年来也出现了动物血清的替代品和无血清培养基,然而动物血清的替代品来源有限制,并且不同批次间存在一定的差异,使得大规模生产应用有一定的难度,无血清培养体系是 ASCs 培养未来发展的方向。此外,ASCs 增殖分化相关的分子调控比较复杂,还有待进一步探讨。

综上所述,3D、无血清、低氧下 ASCs 可能有更加优异的生物学特性,是探讨未来 ASCs 培养的

发展方向。

[参考文献]

- [1] Wang JM, Gu Y, Pan CJ, *et al.* Isolation, culture and identification of human adipose-derived stem cells[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(3):1039-1043.
- [2] 徐竹, 诸葛启钊, 黄李洁. 干细胞 3D 支架的研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2017, 37(9): 112-117.
- [3] Banihashemi M, Mohkam M, Safari A, *et al.* Optimization of three dimensional culturing of the HepG2 cell line in fibrin scaffold [J]. *Hepatitis Monthly*, 2015, 15(3): e22731.
- [4] Xu Y, Shi T, Xu A, *et al.* 3D spheroid culture enhances survival and therapeutic capacities of MSCs injected into ischemic kidney [J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(7):1203-1213.
- [5] Lee JH, Han YS, Lee SH. Long-Duration Three-Dimensional Spheroid Culture Promotes Angiogenic Activities of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells[J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2016, 24(3):260-267.
- [6] Miyamoto Y, Ikeuchi M, Noguchi H, *et al.* Enhanced Adipogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells in an In Vitro Microenvironment; The Preparation of Adipose-Like Microtissues Using a Three-Dimensional Culture [J]. *Cell Med*, 2016, 9(1-2): 35-44.
- [7] Xie H, Liao N, Lan F, *et al.* 3D-cultured adipose tissue-derived stem cells inhibit liver cancer cell migration and invasion through suppressing epithelial-mesenchymal transition [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(3):1385-1396.
- [8] Roxburgh J, Metcalfe AD, Martin YH, *et al.* The effect of medium selection on adipose-derived stem cell expansion and differentiation; implications for application in regenerative medicine[J]. *Cytotechnology*, 2016, 68(4): 957-967.
- [9] 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.
- [10] Cheng NC, Hsieh TY, Lai HS, *et al.* High glucose-induced reactive oxygen species generation promotes stemness in human adipose-derived stem cells [J]. *Cytotherapy*, 2016, 18(3): 371-383.
- [11] Follmar KE, Decroos FC, Prichard HL, *et al.* Effects of glutamine, glucose, and oxygen concentration on the metabolism and proliferation of rabbit adipose-derived stem cells[J]. *Tissue Eng*, 2006, 12(12):3525-3533.
- [12] Kyllönen L, Haimi S, Mannerström B, *et al.* Effects of different serum conditions on osteogenic differentiation of human adipose stem cells in vitro[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2013, 4(1):17.
- [13] Phetfong J, Tawonsawatruk T, Seenprachawong K, *et al.* Reusing blood products as an alternative supplement in the optimisation of clinical-grade adipose-derived mesenchymal stem cell culture[J]. *Bone Joint Res*, 2017, 6(7):414-422.
- [14] Al-Saqi SH, Saliem M, Asikainen S, *et al.* Defined serum-free media for *in vitro* expansion of adipose-derived mesenchymal stem cells[J]. *Cytotherapy*, 2014, 16(7): 915-926.
- [15] Sato K, Itoh T, Kato T, *et al.* Serum-free isolation and culture system to enhance the proliferation and bone regeneration of adi-

- pose tissue-derived mesenchymal stem cells[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2015, 51(5): 515-529.
- [16] Wan Safwani WK, Wong CW, Yong KW. The effects of hypoxia and serum-free conditions on the stemness properties of human adipose-derived stem cells[J]. *Cytotechnology*, 2016, 68(5): 1859-1872.
- [17] Kiefer KM, Pluhar GE, Conzemius MG, *et al.* The Influence of Culture Medium Type on Cellular Phenotype of Canine Adipose Derived Stem Cells[J]. *Open J Reg Med*, 2014, 3(1): 28-37.
- [18] Rylova JV, Andreeva E, Gogvadze VG, *et al.* Etoposide and hypoxia do not activate apoptosis of multipotent mesenchymal stromal cells in vitro[J]. *Bull Exp Biol Med*, 2012(154): 141-144.
- [19] Choi JR, Pingguan-Murphy B, Wan Abas WA, *et al.* Impact of low oxygen tension on stemness, proliferation and differentiation potential of human adipose-derived stem cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 448(2): 218-224.
- [20] Choi JR, Pingguan-Murphy B, Abas WABW, *et al.* In situ normoxia enhances survival and proliferation rate of human adipose tissue-derived stromal cells without increasing the risk of tumorigenesis[J]. *PLoS One*, 2015, 10(1): e0115034.
- [21] Fotia C, Massa A, Boriani F, *et al.* Hypoxia enhances proliferation and stemness of human adipose-derived mesenchymal stem cells[J]. *Cytotechnology*, 2015, 67(6): 1073-1084.
- [22] Schiller ZA, Schiele NR, Sims JK, *et al.* Adipogenesis of adipose-derived stem cells may be regulated via the cytoskeleton at physiological oxygen levels in vitro[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2013, 4(4): 79.
- [23] Linero I, Chaparro O. Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e107001.
- [24] Roemeling-van Rhijn M, Mensah FK, Korevaar SS, *et al.* Effects of Hypoxia on the Immunomodulatory Properties of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem cells[J]. *Front Immunol*, 2013, 4: 203.
- [25] Burian E, Probst F, Palla B, *et al.* Effect of hypoxia on the proliferation of porcine bone marrow-derived mesenchymal stem cells and adipose-derived mesenchymal stem cells in 2- and 3-dimensional culture[J]. *J Craniomaxillofac Surg*, 2017, 45(3): 414-419.
- [26] Shell K, Raabe O, Freitag C, *et al.* Comparison of Equine Adipose Tissue-Derived Stem Cell Behavior and Differentiation Potential Under the Influence of 3% and 21% Oxygen Tension[J]. *J Equine Veterinary Sci*, 2013, 33(2): 74-82.
- [27] Kim DS, Lee MW, Lee TH, *et al.* Cell culture density affects the stemness gene expression of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells[J]. *Biomed Rep*, 2017, 6(3): 300-306.
- [28] Najafabadi MM, Bayati V, Orazizadeh M, *et al.* Impact of Cell Density on Differentiation Efficiency of Rat Adipose-derived Stem Cells into Schwann-like Cells[J]. *Int J Stem Cells*, 2016, 9(2): 213-220.
- [29] Park JB, Jin SL, Cho BP, *et al.* Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells cultured at high cell density express brain-derived neurotrophic factor and exert neuroprotective effects in a 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease[J]. *Genes Genomics*, 2015, 37(2): 213-221.
- [30] Oravcova L, Bohac M, Krajciová L, *et al.* Effect of Serial Passing on the Morphology and Biological Characteristics of Human Adipose Tissue-derived Stem Cells[J]. *Online J Biol Sci*, 2016, 16(4): 145-151.
- [31] Danisovic L, Oravcova L, Krajciová L, *et al.* Effect of long-term culture on the biological and morphological characteristics of human adipose tissue-derived stem Cells[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2017, 68(1): 149-158.
- [32] Wang X, Liu C, Li S, *et al.* Effects of continuous passage on immunomodulatory properties of human adipose-derived stem cells[J]. *Cell Tissue Bank*, 2015, 16(1): 143-150.
- [33] Safwani WK, Makpol S, Sathapan S, *et al.* Alteration of gene expression levels during osteogenic induction of human adipose derived stem cells in long-term culture[J]. *Cell Tissue Bank*, 2013, 14(2): 289-301.
- [34] Faghieh H, Javeri A, Taha MF. Impact of early subcultures on stemness, migration and angiogenic potential of adipose tissue-derived stem cells and their resistance to in vitro ischemic condition[J]. *Cytotechnology*, 2017, 69(6): 885-900.
- [35] Ai G, Shao X, Meng M, *et al.* Epidermal growth factor promotes proliferation and maintains multipotency of continuous cultured adipose stem cells via activating STAT signal pathway in vitro[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(30): e7607.
- [36] Mortimer AE, Faroni A, Kilic MA, *et al.* Maintenance of a Schwann-Like Phenotype in Differentiated Adipose-Derived Stem Cells Requires the Synergistic Action of Multiple Growth Factors[J]. *Stem Cells Int*, 2017, 2017: 1479137.
- [37] Khan S, Villalobos MA, Choron RL, *et al.* Fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor play a critical role in endotheliogenesis from human adipose-derived stem cells[J]. *J Vasc Surg*, 2017, 65(5): 1483-1492.
- [38] Zarychta-Wisniewska W, Burdzinska A, Kulesza A, *et al.* Bmp-12 activates tenogenic pathway in human adipose stem cells and affects their immunomodulatory and secretory properties[J]. *BMC Cell Biol*, 2017, 18(1): 13.
- [39] Chen C, Yan Q, Yan Y, *et al.* MicroRNA-1 Regulates the Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells into Cardiomyocyte-Like Cells[J]. *Stem Cells International*, 2018, 2018: 7494530.
- [40] Aji K, Zhang Y, Aimaity A, *et al.* MicroRNA-145 regulates the differentiation of human adipose-derived stem cells to smooth muscle cells via targeting Krüppel-like factor 4[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(6): 3787-3795.
- [41] Mazzu YZ, Hu Y, Soni RK, *et al.* miR-193b-Regulated Signaling Networks Serve as Tumor Suppressors in Liposarcoma and Promote Adipogenesis in Adipose-Derived Stem Cells[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(21): 5728-5740.
- [42] Morszczek C, Reck A, Reichert TE. WNT3A and the induction of the osteogenic differentiation in adipose tissue derived mesenchymal stem cells[J]. *Tissue Cell*, 2017, 49(4): 489-494.
- [43] Sandel DA, Liu M, Ogbonnaya N, *et al.* Notch3 is involved in adipogenesis of human adipose-derived stromal/stem cells[J]. *Biochimie*, 2018, 150: 31-36.

(收稿日期: 2018-03-28; 修回日期: 2018-06-27)

(责任编辑: 刘玉巧; 英文编辑: 吕鏊烽)