

· 论 著 ·

脂肪源性干细胞无酶分离培养方法的研究*

刘 苹^{1,2}, 史春梦^{1,2△}, 胡玲莉³, 张 波², 王正国²

(1. 第三军医大学军事预防医学学院复合伤研究所/创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,

重庆 400038; 2. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所四室, 重庆 400042;

3. 湖北省孝感市 95829 部队后勤部门门诊部, 湖北孝感 432000)

摘要:目的 探索适合临床治疗应用的脂肪源性干细胞(ADSCs)分离培养方法。方法 分别采用无酶分离法和胶原酶消化法从脂肪抽吸术抽吸的人脂肪组织中分离培养细胞,对比分析分离的间充质干细胞特性。结果 无酶分离法所需时间仅为胶原酶消化法的 1/3,分离的细胞在细胞形态学、增殖能力、免疫表型、分化潜能等特性与胶原酶消化法分离培养的细胞一致。结论 无酶分离法能够从脂肪抽吸术抽吸的人脂肪组织中分离培养出 ADSCs,是一种安全可靠、适合临床应用的 ADSCs 分离培养方法。

关键词:脂肪源性干细胞;分离方法;无酶;胶原酶消化法;细胞,培养的;脂肪组织

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.10.001

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)10-1153-04

Study on non-enzymatic separation and culture method of adipose -derived stem cells*

Liu Ping^{1,2}, Shi Chunmeng^{1,2△}, Hu Lingli³, Zhang Bo², Wang Zhengguo²

(1. Research Institute of Combined Injuries, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University,

State Key Lab of Trauma, Burns and Combined Injury, Chongqing 400038, China; 2. Fourth Room,

Research Institute of Field Surgery, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China;

3. Outpatient Department of Logistics, Unit 95829, Xiaogan, Hubei 432000, China)

Abstract: Objective To explore a separation and culture method of human adipose-derived stem cells(ADSCs) suitable for the clinical application. Methods The non-enzymatic method and the collagenase digestion method were adopted to isolate and culture the cells from the human adipose tissue in the individuals with liposuction. The characteristics of isolated mesenchymal stem cells were comparatively analyzed. Results The required time in the non-enzymatic method was one third of that in the collagenase digestion method and the cellular morphology, reproductive capacity, immunophenotype and differentiation potential of the isolated cells were consistent to those isolated by the collagenase digestion method. Conclusion The no-enzymatic method may isolate and culture ADSCs from the adipose tissue in the individual with liposuction, which is a safety and reliable isolation and culture method of human adipose tissue-derived stem cells suitable for clinical application.

Key words: adipose derived stem cells; separation method; no-enzymatic; collagenase digestion method; cells, cultured; adipose tissue



王正国

脂肪源性干细胞(adipose derived stem cells, ADSCs)是一种存在于脂肪组织中的间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs),在皮下白色脂肪组织中占细胞总量的 10%~20%。自 Zuk 等^[1]从人抽吸的脂肪组织中成功分离出 ADSCs 以来,采用胶原酶、分散酶、胰蛋白酶、透明质酸酶等酶类消化,已经建立了多种 ADSCs 的分离培养方法,但不同实验室采用不同的分离培养方法获得的干细胞数量、免疫表型、功能等存在一定的差异^[2],难以有效地多中心对照研究 ADSCs 的治疗潜能;分

离用的酶类价格昂贵,且多来源于动物或细菌,易对临床应用造成病毒污染或免疫反应;而且这些分离方法耗费时间^[3-4]。故建立高效、稳定可靠的、适合临床应用的 ADSCs 分离培养方法,将推动 ADSCs 的深入研究和临床治疗的广泛应用^[5-7]。因此,本研究在以往分离培养 ADSCs 方法的基础上,探索无酶分离方法从脂肪抽吸术抽吸的人脂肪组织中分离培养 ADSCs,并鉴定分析分离培养细胞的形态、增殖能力、免疫表型、分化潜能等方面指标,为下一步研究与临床应用奠定基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料 人脂肪组织来源于临床进行脂肪抽吸术的患者腹部皮下组织,共 14 例,其中男 3 例,女 11 例,年龄(44.0±11.6)岁,均签署知情同意书。本实验经中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 ADSCs 的分离培养方法 (1)将收集的人脂肪组织

立了多种 ADSCs 的分离培养方法,但不同实验室采用不同的分离培养方法获得的干细胞数量、免疫表型、功能等存在一定的差异^[2],难以有效地多中心对照研究 ADSCs 的治疗潜能;分

* 基金项目:国家重点基础研究发展计划(973)专项课题资助项目(2011CB964701);重庆市科技攻关(重点)资助项目(cstc2012GGB10003)。作者简介:刘苹(1971—),高级实验师,硕士研究生,主要从事再生医学和分子生物学研究。△ 通讯作者, Tel: 13708396812; E-mail: shicm1010@aliyun.com。

100~300 mL 置于 500 mL 的玻璃瓶,加入 50 mL 磷酸盐缓冲液(PBS),拧紧瓶盖,用手剧烈震荡 2~4 min;室温静置约 5 min 使液体与脂肪组织分离,收集瓶底的液体至 50 mL 于离心管内;将漂浮的脂肪组织重复以上步骤漂洗 2~4 次,收集下层的液体,1 200 r/min 室温离心 10 min,收集沉淀。(2)加入 2 mL 氯化铵红细胞裂解液于沉淀组织中,轻轻吹打混匀,裂解 1~2 min,加入 15~20 mL PBS 混匀,2 000 r/min 离心 5 min,弃红色上清液。(3)细胞沉淀用 PBS 洗涤 2 次,按 5.0×10^4 个/cm² 的密度接种于 50 mL 培养瓶中,加入含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM/F12 培养基,置于 37 ℃、饱和湿度的 5% CO₂ 培养箱内培养。(4)培养 24 h 后全量换液,弃未贴壁细胞,以后根据细胞生长情况,每 3 天换液 1 次,待细胞达到 80% 融合时用 0.025% 胰酶/乙二胺四乙酸消化传代,隔天换液;倒置相差显微镜观察记录培养细胞生长情况。同时利用 0.1% 胶原酶消化法分离培养 ADSCs 作为对照,按照以往研究的 ADSCs 分离方法进行的操作。

1.2.2 ADSCs 生物学特性检测 (1)增殖能力:将第 3 代 ADSCs,以细胞计数法绘制细胞的生长曲线。根据公式计算细胞倍增时间: $Td = t \times [\lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)]$,其中 Td 代表细胞倍增时间,t 代表培养时间,N₀、N_t 分别代表接种后及培养 t 小时后的细胞数,计算平均值得到细胞倍增时间。(2)免疫表型特征:取第 4 代脂肪组织分离细胞,利用流式细胞分析仪(FCM)检测细胞 CD90、CD73、CD14、CD105、CD45 等的表达。(3)分离细胞胚层来源:将分离培养的细胞用 α-平滑肌动蛋白(α-SMA)抗体和波形蛋白(VIM)抗体进行免疫荧光染色,采用共聚焦激光扫描显微镜(confocal laser scanning microscope, CLSM)观察。

1.2.3 ADSCs 的多向分化潜能鉴定

1.2.3.1 向脂肪细胞诱导分化 (1)以 5.00×10^4 个/mL 密度将第 3 代 ADSCs 接种于预先置有盖玻片的 6 孔板内以制备细胞爬片。(2)细胞达到 80% 融合后,加入成脂条件培养基(含 1 μmol/L 地塞米松、10 mg/L 胰岛素、0.50 mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、10% FBS 的高糖 DMEM 培养基)2 mL,置培养箱中培养。(3)隔天换液 1 次,共诱导 28 d,对照组加入含 10% FBS 的低糖 DMEM 培养液培养。(4)诱导 28 d 后应用油红 O 染色法检测脂滴形成。

1.2.3.2 向成骨细胞诱导分化 (1)方法同 1.2.3.1 中的(1)。(2)细胞达到 80% 融合后,加入成骨条件培养基(含 1 μmol/L 地塞米松、50 μg/mL 维生素 C、10 mmol/L β-甘油磷酸钠的高糖 DMEM 培养基)2 mL,置培养箱中培养。(3)方法同 1.2.3.1 中的(3)。(4)诱导 28 d 后应用茜素红染色法检测钙沉积。

1.2.3.3 向成软骨诱导分化 (1)将消化下来的 ADSCs 用非完全成软骨诱导培养基 2 000 r/min 离心 5 min,漂洗 1 次,吸弃上清液。(2)用非完全成软骨诱导培养基按照 7.50×10^5 个/mL 重悬,用 2 000 r/min 离心 5 min,漂洗 1 次,吸弃上清液。(3)将转化生长因子(transforming growth factor, TGF)-β3 解冻,加至非完全成软骨诱导培养基,成为完全成软骨诱导培养基(每次使用前现配)。(4)将细胞按照 5×10^5 个/mL 用完全成软骨诱导培养基重悬,按照每份 0.50 mL (2.50×10^5) 分装至诱导培养用的离心管内,用 2 000 r/min 离心 5 min,共做 6 份。(5)拧松盖子,置细胞培养箱培养;每 2~3 天用 0.50 mL 完全成软骨诱导培养基换液(避免将细胞吹起)。(6)共诱导 14~21 d 后,用甲醛固定,切片,阿辛蓝染色。

1.2.3.4 油红 O 染色 (1)取成脂诱导 28 d 的细胞爬片,用 PBS 清洗 2 次,每次 5 min。(2)用 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 漂洗 2 次,每次 5 min。(3)用 60% 异丙醇漂洗爬片 1 次。(4)将油红 O 染液配制成 2% 浓度,使用前用滤纸过滤后,滴至细胞爬片上染色 15 min。(5)吸弃染料,蒸馏水冲洗,镜下观察脂肪细胞形态及染色情况。

1.2.3.5 茜素红染色 (1)取成骨诱导 28 d 的细胞用 4% 多聚甲醛固定 15 min。(2)蒸馏水冲洗 3 次,加入 0.1% 茜素红 Tris-HCl 染液(pH 8.3),37 ℃ 下染色 3~5 min。(3)蒸馏水冲洗,干燥,镜下观察成骨细胞形态及染色情况。

1.2.3.6 阿辛蓝染色 (1)将固定的成软骨诱导的细胞球形体切片脱蜡至水。(2)根据需要应用不同 pH 的阿辛蓝染色浸染切片 10~60 min。(3)流水冲洗 5 min 左右。(4)脱水,透明并封片,显微镜下观察。

1.2.4 细胞免疫荧光染色 (1)取细胞爬片, PBS 漂洗 2 次,用无水甲醇-10 ℃ 固定 10 min。(2)用 PBS 充分漂洗 3 次,加含 0.1% Triton-X 100 的 PBS 破膜 20 min。(3)用 PBS 充分漂洗 3 次,加入含 10% 二抗血清的封闭液封闭 30 min。(4)滴加稀释适度的一抗(α-SMA 抗体 1:400, VIM 抗体 1:200 稀释),4 ℃ 冰箱孵育过夜。(5)用 PBS 充分漂洗 5 次,滴加荧光标记的二抗,在湿盒内 37 ℃ 避光孵育 45 min。(6)用 PBS 充分漂洗 5 次,滴加 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色 5~10 min。(7)滴加甘油封片剂封片,采用 CLSM 观察。

2 结 果

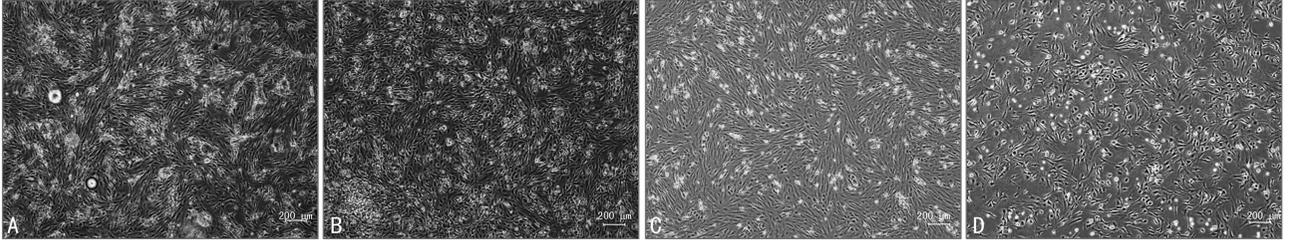
2.1 ADSCs 的细胞形态与增殖 利用无酶分离法可从脂肪组织分离出 $1.10 \times 10^4 \sim 8.50 \times 10^4$ 个/mL 的活性细胞,需要耗费时间 50 min 左右,而胶原酶消化分离法至少需要 150 min 以上。在 DMEM/F12 培养基内培养 3 d 左右可增殖形成集落样,第 6 天细胞能生长至 80%~90% 的融合,大部分细胞形态为梭形或三角形的成纤维细胞样细胞(图 1A),有少量组织碎片;传代第 2 或 3 代后细胞形态更单一呈梭形、旋涡状生长,增殖迅速,细胞 3~5 d 可传代,分离培养的细胞可传近 8 代,而未见细胞形态明显变化(图 1B、C),传至 10 代以上的 ADSCs 的细胞质变得扁平,增殖速度稍有下降(图 1D),但也有部分细胞能够传 10 代后仍可保持稳定的形态和增殖速度。与胶原酶分离培养的 ADSCs 未见明显差异。采用细胞计数法绘制的细胞生长曲线显示,无酶法培养条件下第 3 代的 ADSCs 有较强的增殖能力,第 4、5 天细胞能够长满培养板底部,7 d 内至少可增殖近 8 倍,生长曲线有明显的增殖期和平台期,计算第 3 代 ADSCs 的细胞倍增时间为 (61.30 ± 7.30) h,与胶原酶法分离的细胞相似。α-SMA 和 VIM 的表达是中胚层来源组织细胞的重要标志。培养至第 3 代的 ADSCs 免疫荧光染色显示,绝大部分细胞均表达 α-SMA 和 VIM(图 2),表明从脂肪组织分离获得的细胞来源于中胚层。

2.2 ADSCs 的免疫表型特征 无酶法分离细胞的 FCM 分析结果可见,传至第 4 代的 ADSCs 的干细胞或间质细胞标志 CD90、CD73、CD105 均为阳性,阳性率均在 98.00% 以上,而造血细胞相关标志 CD45 和 CD14 为阴性;CD105⁺CD45⁻ 的细胞在 95.00% 以上,CD73⁺CD14⁻ 的细胞达 98.30%,见图 3。表明分离培养获得的细胞是来源于间质的纯度较高的干细胞,并排除造血细胞的污染。

2.3 ADSCs 的多向分化潜能 无酶分离法分离细胞经过 28 d 的成脂诱导培养后,倒置相差显微镜下可见大部分细胞变成

圆形、椭圆形或短梭形,细胞质内有较多明亮的脂滴;未经诱导的细胞为长梭形,细胞质内未见脂滴,油红 O 染色可见成脂诱导后的细胞内有较多橙红色的脂滴(图 4A),而未诱导的 AD-SCs 的细胞质内未见脂滴出现。成骨诱导培养后,倒置相差显微镜下可见大部分细胞变成多角形或短梭形,可见沙样颗粒沉积,对照组细胞无特殊变化,茜素红染色可见成骨诱导后的细胞有较多红色矿化基质沉积(图 4B),而未诱导的 ADSCs 未见

红色沉积物。进行成软骨诱导的 ADSCs 第 2 天可肉眼发现锥形管底部形成白色颗粒,显微镜下为细胞聚集的球形。在 21 d 的诱导过程中,ADSCs 的细胞球形体体积未见明显变化;将 21 d 成软骨诱导分化的细胞进行阿辛蓝染色,可见大多数细胞均显示蓝色(图 4C),提示诱导后细胞表达软骨细胞特异性的 II 型胶原蛋白。



A: 培养 6 d 的原代 ADSCs; B: 培养 4 d 的第 2 代 ADSCs; C: 培养 3 d 的第 3 代 ADSCs; D: 培养 4 d 的第 10 代 ADSCs。

图 1 倒置相差显微镜下观察分离培养的 ADSCs 细胞形态(×40)

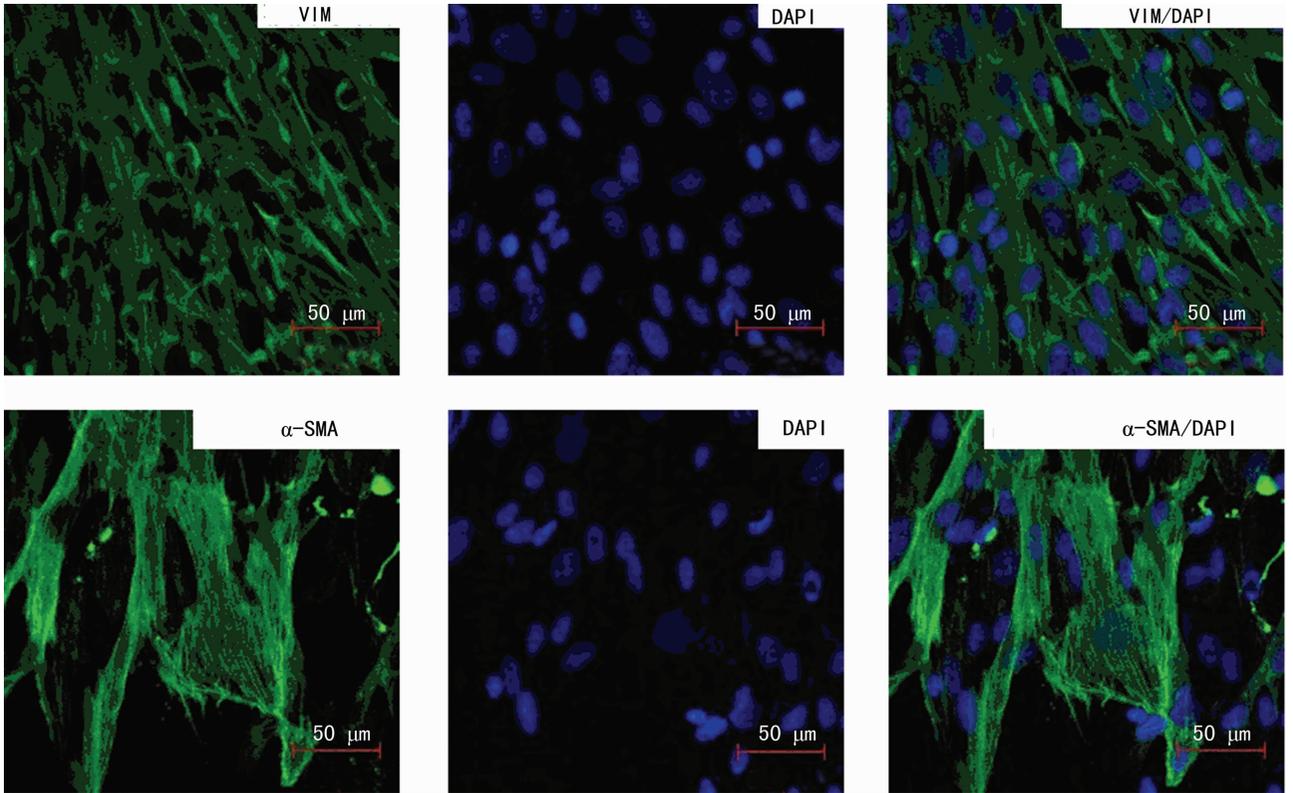


图 2 CLSM 下观察分离 ADSCs 的组织来源免疫组织化学染色鉴定图(×40)

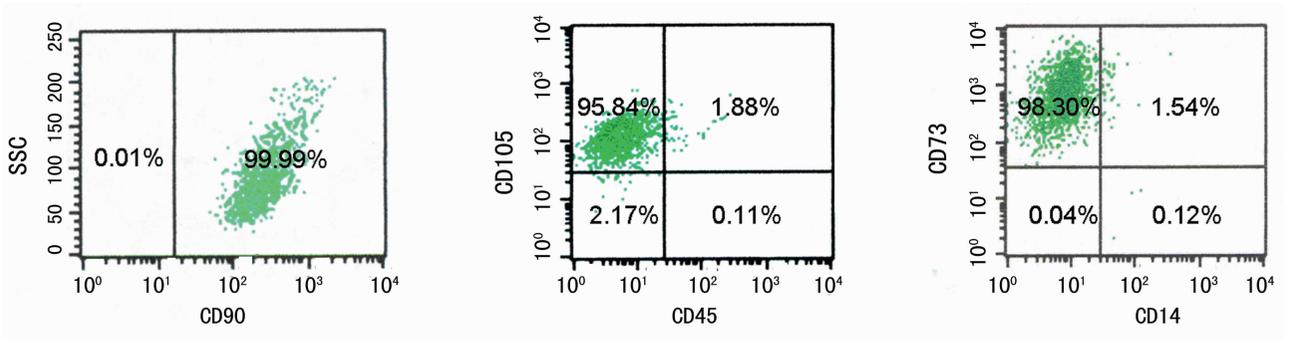
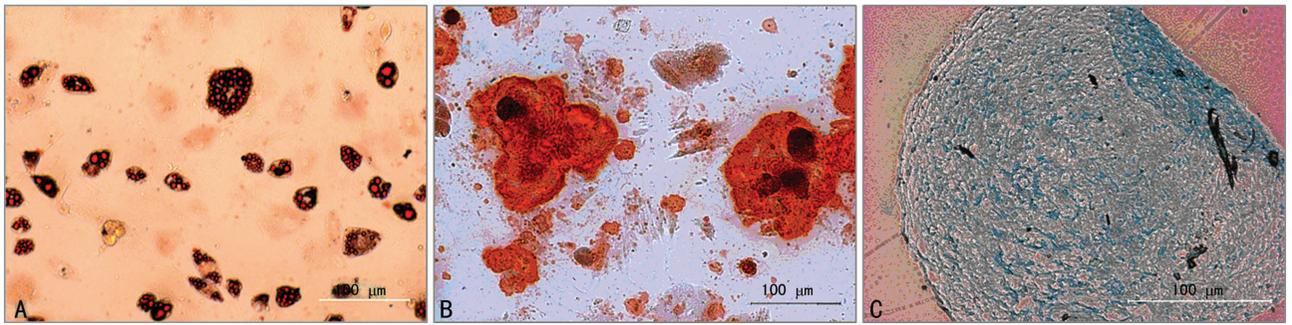


图 3 第 3 代 ADSCs 免疫表型的 FCM 分析鉴定图



A:成脂肪细胞诱导分化(油红 O 染色);B:成骨细胞诱导分化(茜素红染色);C:成软骨诱导分化(阿辛蓝染色)。

图 4 培养 ADSCs 的多向分化潜能鉴定($\times 40$)

3 讨 论

MSCs 是中胚层来源的一类具有多向分化能力的干细胞,目前,MSCs 并无特异性的表面标志物,其鉴定主要是根据细胞形态学、生长特征、多种免疫表型及多向分化潜能来综合判断^[8]。细胞治疗国际协会认为评判分离的细胞是否为 MSCs 的最低标准是^[9]:(1)分离的细胞在标准培养条件贴壁生长,细胞形态呈成纤维细胞样细胞;(2)细胞免疫表型的 CD105、CD73、CD90、CD166、CD44 等分子表达必须大于 95%,而 CD45、CD34、CD14 或 CD11b、CD79 或 CD19、人白细胞 DR 抗原(HLA-DR)等分子表达小于 2%;(3)多向分化潜能,细胞在体外特定的诱导培养条件下必须能够分化成骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞等中胚层来源细胞。因此,本研究分别从细胞形态、增殖能力、免疫表型、胚层来源、分化潜能等 5 个方面鉴定采用无酶分离法从脂肪组织分离培养的细胞。

本研究结果显示,从人脂肪组织中分离培养的细胞能够在培养瓶贴壁生长,呈较为均一的成纤维细胞样细胞,与骨髓来源 MSCs 的细胞形态相似;细胞能传代培养近 10 代,并保持细胞形态与增殖能力无明显变化;第 3 代的 ADSCs 细胞生长曲线显示分离培养的细胞增殖迅速,计算细胞倍增时间为 (61.30 ± 7.30) h,与其他人分离培养 ADSCs 的研究报道基本一致,与成人骨髓、脐带血、脐带组织等来源 MSCs 的倍增时间(60 h)无明显差异^[10-12]。FCM 分析结果可见分离培养细胞的干细胞或间质细胞标志物 CD73、CD90、CD105 均为高表达,阳性率均超过 95.00%,而造血干细胞抗原标志物 CD45 和 CD14 为阴性,提示分离的细胞群具有间充质干细胞的抗原标志而不是造血干细胞,抗体双标 FCM 分析显示 CD105⁺CD45⁻和 CD73⁺CD14⁻的细胞占 95.00%以上,进一步确认从脂肪组织分离获得纯度较高的 MSCs,与其他组织来源 MSCs 的免疫表型一致^[13]。 α -SMA 和 VIM 的表达是中胚层来源组织的重要标志。分离培养的细胞免疫荧光染色结果显示分离培养的绝大部分细胞表达 α -SMA 和 VIM,提示从脂肪组织分离培养的 ADSCs 来源于中胚层组织。多向分化潜能是 MSCs 的重要特性^[9],向脂肪细胞、成骨细胞、成软骨细胞等中胚层来源细胞分化是鉴定 MSCs 的必备条件。本研究结果显示,从脂肪组织分离培养的细胞经成脂肪细胞诱导分化后,大部分细胞的油红 O 染色阳性,经成骨细胞诱导分化后的细胞形成茜素红染色阳性的钙结节,经成软骨细胞诱导分化的大部分细胞经阿辛蓝染色为阳性,提示本研究分离培养的细胞在特定的诱导培养条件下具备向脂肪细胞、成骨细胞和成软骨细胞分化等多向分化潜能。以上结果表明从脂肪组织分离的基质细胞在细胞形态与增殖能力、免疫表型和多向分化潜能上均与广泛接受的 MSCs 鉴定标准相符合,故无酶分离法从脂肪抽吸术抽吸的

人脂肪组织中分离培养的细胞为 ADSCs。

本研究结果表明采用无酶分离法从脂肪组织中分离获得的细胞在细胞形态、生长特性、免疫表型、分化潜能等特性方面与文献报道胶原酶消化法分离的 ADSCs 未见明显差异^[14]。虽然无酶分离法分离 ADSCs 的细胞产量较胶原酶消化法获得的细胞产量明显减少,但耗费时间只有胶原酶消化法的 1/3,同时避免了酶消化对细胞的损伤和破坏作用。更重要的是无酶分离法可排除动物或细菌来源的异源性酶类对分离细胞的临床应用造成病毒污染或免疫反应,可望为临床提供适合治疗应用的干细胞。

综上所述,无酶分离法是一种能够从脂肪抽吸术抽吸的人脂肪组织中分离培养出 ADSCs 的、稳定可靠的、适合临床应用的 ADSCs 分离培养方法。脂肪抽吸术是一种可以获得大量脂肪组织的安全“微创技术”,通过美容及整形外科去除人体多余脂肪的常用手段,可获得大量的基质干细胞,使 ADSCs 有望替代骨髓 MSCs,而成为细胞治疗多种疾病的干细胞来源^[15]。

院士简介:王正国,中国工程院首批院士,美国宾夕法尼亚大学医学院教授会成员。我国野战外科学、冲击伤、创伤弹道学、交通医学研究的主要创始人,在国际上享有较高声誉。1999 作为首席科学家主持我国创伤医学研究领域和全军第一个“973”项目。2005 年在北京香山会议“再生医学”主题研讨会上首次提出了研究通用型干细胞的设想和目标。先后获得以国家科技进步一等奖为代表的各类奖项 20 余项。1996 年获军队专业技术重大贡献奖,1997 年获“何梁何利”奖,1998 年获美国“Michael DeBakey 国际军医奖”(该奖设立以来获此殊荣的惟一亚洲人),获重庆市首届争光贡献奖,2000 年获陈嘉庚奖和国际交通医学重大贡献奖,2002 年获第四届中国光华工程科技奖,2009 年获吴阶平奖。

参考文献:

- [1] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue; implications for cell-based therapies [J]. *Tissue Eng*, 2001, 7(2): 211-228.
- [2] Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells; a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT) [J]. *Cytherapy*, 2013, 15(6): 641-648.
- [3] Zeng G, Lai K, Li J, et al. A rapid and efficient method for primary culture of human adipose-derived (下转第 1160 页)

流行病学调查,为以后更为详尽的开展 PHC 的预防工作提供了一定的科学依据。积极防治乙型肝炎病毒感染、限酒戒烟、控烟、防治糖尿病等慢性疾病,特别是对具有饮酒史的乙型肝炎病毒感染者进行动态追踪及监控,推广 PHC 防治科普教育工作,加快经济建设发展步伐,努力改善人民群众的经济状况,是当前贵州省医务工作者的首要任务。

参考文献:

[1] 陈建国,陈万青,张思维,等. 中国 2003~2007 年肝癌发病率与死亡率分析[J]. 中华流行病学杂志,2012,33(6):547-553.

[2] Schütte K, Bornschein J, Malfertheiner P. Hepatocellular carcinoma-epidemiological trends and risk factors[J]. *Dig Dis*,2009,27(2):80-92.

[3] 杨秉辉,夏景林. 中国抗癌协会肝癌专业委员会关于修订“原发性肝癌的临床诊断与分期标准”的说明[J]. 实用癌症杂志,2001,16(6):672.

[4] 邹长林,陈哲京,金文扬,等. 温州地区原发性肝癌危险因素的病因分值及其交互效应[J]. 中华预防医学杂志,2003,37(5):355-357.

[5] Donato F, Tagger A, Gelatti U, et al. Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women[J]. *Am J Epidemiol*,2002,155(4):323-331.

[6] Shimakawa Y, Yan HJ, Tsuchiya N, et al. Association of early age at establishment of chronic hepatitis B infection with persistent viral replication, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma: a systematic review[J]. *PLoS One*,2013,8(7):e69430.

[7] 王其军,边建超,张竹梅,等. 洛阳市饮酒人群与肝癌发生的相关性研究[J]. 实用肿瘤杂志,2003,18(1):62-65.

[8] Khan KN, Yatsuhashi H. Effect of alcohol consumption on the progression of hepatitis C virus infection and risk of hepatocellular carcinoma in Japanese patients[J]. *Alcohol Alcoholism*,2000,35(3):286-295.

[9] 张竹梅,边建超. 饮酒与肝癌研究进展[J]. 中华流行病学杂志,2002,23(6):477-479.

[10] Chuang SC, La Vecchia C, Boffetta P. Liver cancer: descriptive epidemiology and risk factors other than HBV and HCV infection[J]. *Cancer Lett*,2009,286(1):9-14.

[11] Corrao G, Arico S, Zambon A, et al. Is alcohol a risk factor for liver cirrhosis in HBsAg and anti-HCV negative subjects? [J]. *J Hepatol*,1997,27(3):470-476.

[12] Tanaka K, Sakai H, Hashizume M, et al. A long-term follow-up study on risk factors for hepatocellular carcinoma among Japanese patients with liver cirrhosis[J]. *Jpn J Cancer Res*,1998,89(12):1241-1250.

[13] 裴广军,付莉,崔亚玲,等. 中国人群饮酒与原发性肝癌关系的 Meta 分析[J]. 现代预防医学,2008,35(14):2626-2627.

[14] Tanaka K, Tsuji I, Wakai K, et al. Alcohol Drinking and Liver Cancer Risk: An Evaluation Based on a Systematic Review of Epidemiologic Evidence among the Japanese Population[J]. *Jpn J Clin Oncol*,2008,38(12):816-838.

[15] Voigt MD. Alcohol in hepatocellular cancer[J]. *Clin Liver Dis*,2005,9(1):151-169.

(收稿日期:2013-09-17 修回日期:2013-12-20)

(上接第 1156 页)

stem cells[J]. *Organogenesis*,2013,9(4):1-9.

[4] Mariani E, Facchini A. Clinical applications and biosafety of human adult mesenchymal stem cells[J]. *Curr Pharm Des*,2012,18(13):1821-1845.

[5] Kurita M, Matsumoto D, Shigeura T, et al. Influences of centrifugation on cells and tissues in liposuction aspirates: optimized centrifugation for lipotransfer and cell isolation[J]. *Plast Reconstr Surg*,2008,121(3):1033-1041.

[6] Shah FS, Wu X, Dietrich M, et al. A non-enzymatic method for isolating human adipose tissue-derived stromal stem cells[J]. *Cytotherapy*,2013,15(8):979-985.

[7] Wu CH, Lee FK, Suresh Kumar S, et al. The isolation and differentiation of human adipose-derived stem cells using membrane filtration[J]. *Biomaterials*,2012,33(33):8228-8239.

[8] Zimmerlin L, Donnenberg VS, Rubin JP, et al. Mesenchymal markers on human adipose stem/progenitor cells[J]. *Cytometry A*,2013,83(1):134-140.

[9] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position state-

ment[J]. *Cytotherapy*,2006,8(4):315-317.

[10] Lu LL, Liu YJ, Yang SG, et al. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials [J]. *Haematologica*,2006,91(8):1017-1026.

[11] Alhadlaq A, Mao JJ. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics[J]. *Stem Cells Dev*,2004,13(4):436-448.

[12] Roobrouck VD, Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM. Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells[J]. *Exp Cell Res*,2008,314(9):1937-1944.

[13] Vidal MA, Walker NJ, Napoli E, et al. Evaluation of senescence in mesenchymal stem cells isolated from equine bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue [J]. *Stem Cells Dev*,2012,21(2):273-283.

[14] Yu G, Floyd ZE, Wu X, et al. Isolation of human adipose-derived stem cells from lipoaspirates[J]. *Methods Mol Biol*,2011(702):17-27.

[15] Pikula M, Marek-Trzonkowska N, Wardowska A, et al. Adipose tissue-derived stem cells in clinical applications [J]. *Expert Opin Biol Ther*,2013,13(10):1357-1370.

(收稿日期:2013-10-08 修回日期:2013-12-19)