



唐小洪, 叶亚琼, 李道通, 等. 鸡脂肪源间充质干细胞的分离与鉴定[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(5): 1-7.

鸡脂肪源间充质干细胞的分离与鉴定

唐小洪, 叶亚琼, 李道通, 马浩然, 欧阳丹, 陈健, 马勇江, 张媛, 李玉谷
(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】建立鸡脂肪源间充质干细胞的分离与鉴定方法.【方法】用 I 型胶原酶消化法分离天露黄鸡脂肪间充质细胞(AMSCs), CCK-8 检测细胞生长活力, RT-PCR 鉴定其特异性标记物, 化学法对其进行成脂和成骨分化诱导.【结果和结论】原代及传代的细胞呈成纤维细胞样形态, 并能传代至 10 代, 其活力无明显变化; 细胞生长曲线呈 S 型; RT-PCR 检测显示 AMSCs 的特异性标志物 *CD71*、*CD44* 和 *CD29* 表达呈阳性, 而属于造血干细胞的特异性标志物 *CD34* 和 *CD45* 呈阴性; AMSCs 通过不同诱导液被成功诱导分化为成骨细胞和脂肪细胞, 在成脂分化过程中有脂滴形成, 油红 O 染色呈阳性, 过氧化物酶体增殖物激活受体基因 γ (*PPAR γ*) 和脂肪酸基因(*FAS*)的 mRNA 表达量升高; 在成骨分化过程中有钙结节形成, 茜素红染色呈阳性, 碱性磷酸酶(ALP) 活性检测对照组与诱导组比较差异显著($P < 0.05$), *ALP* 基因和骨形态发生蛋白基因(*BMP2*)的 mRNA 表达量升高. 研究表明, 鸡 AMSCs 具有分化为多种细胞的潜能.

关键词:鸡; 间充质干细胞; 分离; 鉴定; 分化诱导
中图分类号:S831.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2014)05-0001-07

Isolation and identification of chicken adipose-derived mesenchymal stem cells

TANG Xiaohong, YE Yaqiong, LI Daotong, MA Haoran, OUYANG Dan, CHEN Jian,
MA Yongjiang, ZHANG Yuan, LI Yugu
(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract:【Objective】A method for isolation and identification of chicken adipose-derived mesenchymal stem cells(AMSCs) was established. 【Method】AMSCs from Tianlu yellow chickens were obtained by type I collagenase digestion. CCK-8 was used to detect cell activities. RT-PCR was used to examine their specific marker. Whereas their adipogenic and osteogenic differentiations were chemically induced. 【Result and conclusion】The primary cultured and subcultured cells showed fibroblast-like morphology, and primary AMSCs were subcultured to passage 10 without any change in activities. The growth curves were typically sigmoidal. RT-PCR assays showed that the specific markers of AMSCs, *CD29*, *CD44* and *CD71*, were positive, but *CD34* and *CD45* characterized by hematopoietic stem cells were negative. In addition, AMSCs can successfully differentiated into osteoblasts and adipocytes in different media. Lipid droplets formation was recorded during adipogenic induction, with the cells being positive for oil red O staining, and mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ (*PPAR γ*) and fatty acid (*FAS*) was increased. During osteogenic induction, alizarin red staining showed that the calcium nodus was positive, and there was significant difference in alkaline phosphatase (ALP) activities between the

test and control group ($P < 0.05$), mRNA expression of ALP and bone morphogenetic protein-2 (BMP2) also increased. This research suggests that the mesenchymal stem cells isolated from chicken adipose tissues are multi-potential and may provide the possibility for future clinical application.

Key words: chicken; mesenchymal stem cell; isolation; identification; differentiation induction

间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)属于成体干细胞,是一种具有自我更新能力和多向分化潜能的细胞,具有低免疫原性^[1-3]和定向迁移能力^[4-6]等特点,从而受到生物学领域和生物医学界的青睐。MSCs最初由Friedenstein等^[7]在人骨髓中发现,并证明其在体外可以分化为成骨细胞和脂肪细胞。MSCs不仅存在于骨髓,还广泛分布于其他组织中,脂肪组织已经被证明是一种重要的MSCs来源,国际脂肪应用技术协会在2004年将这种MSCs称为脂肪间充质基质细胞(Adipose mesenchymal stromal cells, AMSCs)。目前大部分的研究集中在人以及鼠、兔等哺乳动物,而有关禽类AMSCs的报道甚少。本试验选取天露黄鸡内脏表面脂肪中的MSCs为研究对象,对其进行分离培养、增殖能力检测及分化能力鉴定,为家禽干细胞的研究和临床应用提供基础材料。

1 材料与方法

1.1 材料

40日龄天露黄鸡由华南农业大学家禽实验基地(广州)提供。

1.2 主要试剂

DMEM、胎牛血清为美国Gibco公司产品, I型胶原酶、地塞米松、抗坏血酸、 β -甘油磷酸钠、吡哆美辛、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、胰岛素为美国Sigma公司产品, Trizol Reagent为美国Invitrogen公司产品, Tag酶、反转录试剂盒为TaKaRa公司产品, 引物由上海杰瑞基因公司合成, CCK-8试剂盒、碱性磷酸酶(ALP)检测试剂盒为碧云天生物技术研究产品。

1.3 鸡AMSCs的分离和培养

40日龄健康天露黄鸡,喉部放血处死,无菌条件下取其内脏表面脂肪,去除肉眼可见的纤维成分和血管,在含1 000 U双抗的DMEM中浸泡10 min, DMEM液漂洗3次,充分剪碎,加入1 g/L I型胶原酶于37℃恒温箱中消化2 h,期间每10 min充分摇匀1次,加入等量含体积分数为10%的胎牛血清的高糖DMEM培养基,200目滤网过滤,1 500 r/min离

心10 min,去除上层未消化的脂肪组织及油脂,沉淀重悬,DMEM洗3次。用含体积分数为10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素的高糖DMEM重悬,以 $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 细胞密度接种至六孔板中。放入37℃、体积分数为5% CO_2 培养箱中培养,24 h后首次半量换液,之后每3 d换液。细胞达80%融合后,用0.25%胰酶消化,1:3传代接种。

1.4 鸡AMSCs的生长曲线测定

以第3代细胞为标本,制备单细胞悬液,调整密度为 $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$,接种于96孔板,每孔100 μL 。24 h后,每天固定时间取5孔加入CCK-8溶液10 μL ,置37℃培养箱孵育2 h。用酶联免疫检测仪以450 nm波长检测各孔光密度值($D_{450 \text{ nm}}$)。

1.5 鸡AMSCs特异性标记物的RT-PCR鉴定

选择生长良好的第3代细胞接种于六孔板,待细胞融合达80%后,使用Trizol法提取总RNA,反转录成cDNA,用于PCR扩增。从NCBI中查询CD29、CD44、CD71、CD34、CD45基因序列进行片段扩增。引物由杰瑞生物技术有限公司合成。引物序列、产物大小见表1。

PCR反应体系20 μL : 10×PCR Buffer 2.5 μL , Taq酶0.1 μL , dNTP mix 2 μL , ddH₂O 10.9 μL , 上、下游引物各1 μL , cDNA 2.5 μL 。PCR反应程序:95℃预变性5 min;95℃变性30 s,最佳退火温度57~62℃45 s,72℃延伸45 s,30个循环;72℃延伸1 min,产物4℃保存。取PCR产物5 μL 和1 μL Loading Buffer混匀,用质量浓度为20 g/L的琼脂糖凝胶进行电泳,用紫外透射仪检测目的基因的表达情况。

1.6 鸡AMSCs向脂肪细胞和成骨细胞的诱导及鉴定

1.6.1 成脂分化诱导 取第3代鸡AMSCs接种于24孔板,待细胞融合达80%后,改用成脂分化诱导培养基(含高糖DMEM,体积分数为10%胎牛血清,1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松,0.1 mmol/L吡哆美辛,0.5 mmol/L异丁基甲基黄嘌呤,10 $\mu\text{g/mL}$ 胰岛素,100 U/mL青霉素,100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素)诱导3周,每3 d换液1次,对照组加普通培养液。镜下观察细胞形态变化,3周后吸出诱导培养基,PBS清洗2次,用体积分数为4%的多聚甲醛固定10 min,油红O染色30 min,镜

检、拍照.

1.6.2 成骨分化诱导 取第3代鸡 AMSCs 接种于24孔板,待细胞融合达80%后,改用成骨分化诱导培养基(含高糖 DMEM,体积分数为10% 胎牛血清,0.1 μmol /L 地塞米松,300 μmol /L 抗坏血酸,10 mmol /L β-甘油磷酸钠)诱导4周,每3 d 换液1次,对照组加普通培养液. 镜下观察细胞形态变化,4周后吸出诱导培养基,PBS 清洗2次,用体积分数为4%的多聚甲醛固定30 min,茜素红 S 染色10 min,镜检、拍照.

表1 RT-PCR 检测引物

Tab.1 Primer sequences used in RT-PCR

基因	引物序列(5'→3')	片段大小/bp	退火温度/℃
CD29	F:AATCGTAAGATAGGTGCTG	154	60
	R:GATAATAAAGCTCAATGGGG		
CD44	F:CATGTGGAGAAAAATGCTCG	178	60
	R:ATGGATTGATTCTGTGGGATA		
CD71	F:AAGCAGCTCTCAGGCTGACC	116	60
	R:CTCCCGCACTTCCTTAATGT		
CD34	F:GAAAAGTTCGGAATCAAATCCCTCG	185	59
	R:TAGTGGTCTTCATCCAGCCTCTGTC		
CD45	F:ATTCTTGTTCTTCTTGATTGTTG	175	58
	R:CAGTTTCTCTGAAGGTATTGGCT		
PPARγ	F:CCACAAGCGGAGAAGGAGAAG	128	57
	R:AGCGGGAAGGACTTTATGTATGAG		
FAS	F:GACCCACCACGTCCCTGACATTG	193	60
	R:GGTTTCGTAGGCTCCTCCCATCC		
ALP	F:GTGAAAGCACCTGTAACAAAGAT	153	60
	R:ATTGCAGTCAGAGCACACAAAAC		
BMP2	F:CGCTTACGCTGTTTGTGTTTCG	192	62
	R:GGTGGAGGTGGTTCACTTGGA		

1.6.3 碱性磷酸酶活性检测 取第3代细胞,以每孔1×10⁴的密度接种于六孔板中,分别成骨分化诱导3、5、7、9、14 d后,按碱性磷酸酶活性检测试剂盒要求进行检测.

1.6.4 RT-PCR 检测过氧化物酶体增植物激活受体基因 γ(*PPARγ*)、脂肪酸基因(*FAS*)、碱性磷酸酶基因(*ALP*)和骨形态发生蛋白基因(*BMP2*) mRNA 的表达 取第3代细胞,以每孔1×10⁴的密度接种于六孔板中,分别成骨、成脂分化诱导1、2、4周后,利用RT-PCR方法检测脂肪细胞、成骨细胞特异性基因的表达情况,即成脂分化诱导过程中试验组与对照组 *PPARγ* 和 *FAS* mRNA 的表达情况,成骨分化诱导过程中试验组与对照组 *ALP*、*BMP2* mRNA 的表达情况. 从NCBI中查询 *PPARγ*、*FAS*、*ALP*、*BMP2* 基因序列进行片段扩增. 引物由杰瑞生物技术有限公司合成. 引物序列、产物大小见表1.

1.6.5 统计学分析 试验数据采用SPSS 18.0软件进行单因素方差分析和Duncan's法进行各组间组

内多重比较,以 $P < 0.05$ 作为差异性显著判断标准.

2 结果

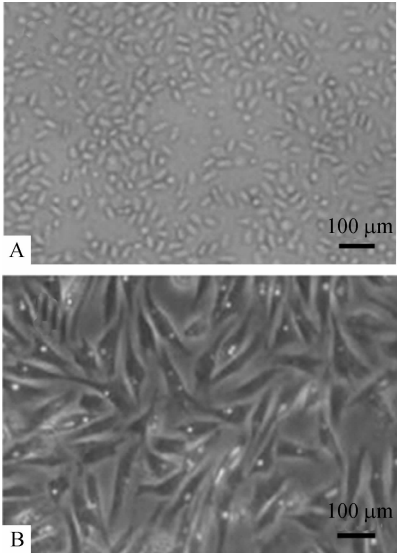
2.1 形态学观察

倒置显微镜下,刚接种的原代细胞呈椭圆形(图1A)悬浮于培养基中,24 h后可见少量贴壁细胞,细胞多为单个,形态呈三角形、梭形,此时第1次换液,换液后2~3 d,可见数个大小不等的细胞克隆,长梭形外观,7~9 d细胞集落相互融合超过80%(图1B)、呈漩涡状或放射状. 第7天可第1次传代,经胰酶消化后的AMSCs呈圆形,传代6 h内完全贴壁伸展,呈成纤维细胞样形态.

2.2 鸡 AMSCs 的生长曲线

鸡 AMSCs 生长曲线形态呈“S”形. 由生长曲线可见鸡 AMSCs 增殖过程经历了潜伏期、对数期以及平台期,在22~34 h进入快速增殖期,约60 h进入对数生长期,第6天之后细胞生长速度减缓,进入平台期. 表明体外培养的鸡 AMSCs 能够进行自我更新

和增殖,易于进行体外扩增培养(图 2).



A:刚分离的原代细胞;B: 培养 7 d 的原代细胞
图 1 培养不同时间的鸡脂肪源间充质干细胞

Fig. 1 Chicken adipose-derived mesenchymal stem cells cultured for different periods

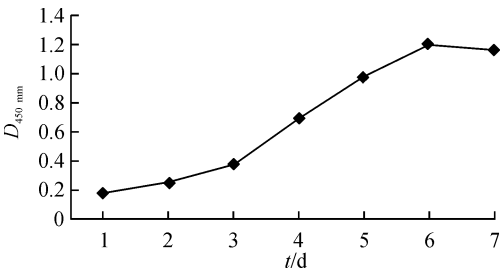


图 2 鸡脂肪源间充质干细胞的生长曲线
Fig. 2 Growth curve of chicken adipose-derived mesenchymal stem cells

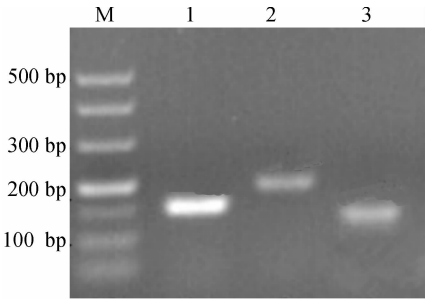
2.3 鸡 AMSCs 特异性标记物的 RT-PCR 鉴定

参考目前文献^[8]报道的间充质干细胞普遍表达的基因,从 NCBI 收录的信息中查询到了 3 种已提交的鸡的基因序列 *CD29*、*CD44* 和 *CD71*. 利用这 3 条基因序列设计了特异性引物进行 RT-PCR 扩增. 试验结果(图 3)表明分离培养的 AMSCs 均表达有上述 3 种基因.

2.4 鸡 AMSCs 的成骨分化诱导

在成骨诱导过程中对照组细胞形态无明显改

变,未见钙沉积. 试验组成骨分化时细胞形态明显改变,7 d 后可见部分细胞由长梭形逐渐变为多角形,细胞聚集,细胞汇合后呈多层重叠生长,细胞局部堆积成灶状,14 d 后可以观察到类似钙结节的物质出现,随着诱导时间的延长,钙盐沉积增加,21 d 后进行茜素红 S 染色可见红色钙结节(图 4). ALP 活性检测显示对照组与试验组差异显著($P < 0.05$),试验组的 ALP 活性随时间的变化明显增高,而对照组细胞的 ALP 活性变化不明显(表 2). RT-PCR 结果显示,与对照组相比,成骨诱导 14 和 28 d 后,ALP mRNA 和 *BMP2* mRNA 表达量均增高($P < 0.05$)(图 5 A、5B);相较于诱导 14 d 时,诱导 28 d 时 ALP mRNA 与 *BMP2* mRNA 水平亦明显增加($P < 0.05$).



M: DNA marker DL 500;1: *CD29*, 154 bp;2: *CD44*, 178 bp;3: *CD71*, 116 bp.
图 3 鸡脂肪源间充质干细胞特异性标记物的 RT-PCR 检测
Fig. 3 Specific markers of chicken adipose-derived mesenchymal stem cells by RT-PCR detection

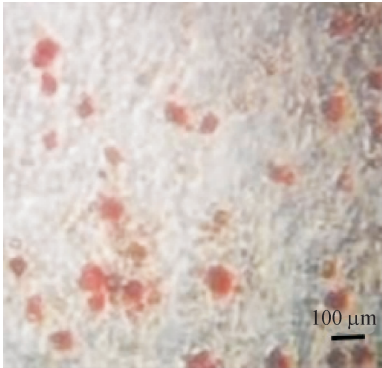


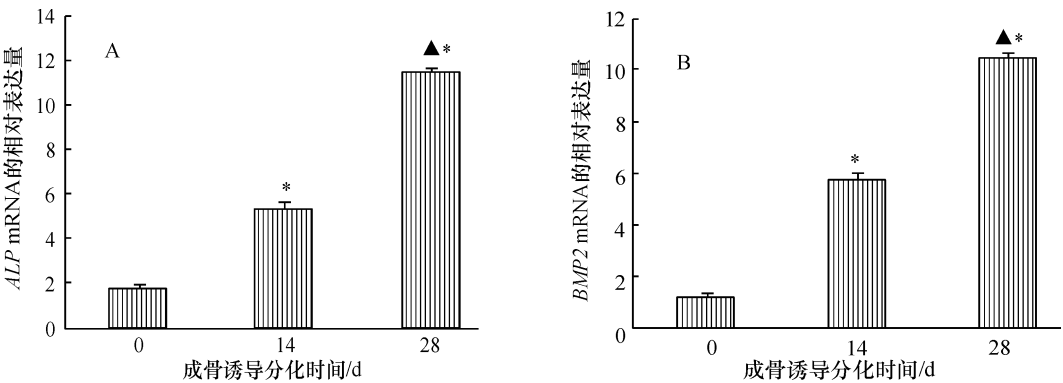
图 4 鸡脂肪源间充质干细胞的成骨诱导
Fig. 4 Osteogenic inductions of chicken adipose-derived mesenchymal stem cells

表 2 鸡脂肪源间充质干细胞成骨分化过程中的 ALP 活性¹⁾

Tab. 2 ALP activities during osteogenic differentiation of chicken adipose-derived mesenchymal stem cells

组别	成骨诱导分化时间/d				
	0	3	5	7	9
对照组	785.4 ± 211.3	825.2 ± 198.1	885.7 ± 310.4	905.6 ± 301.9	845.3 ± 257.5
试验组	814.3 ± 270.1	1 446.2 ± 420.5 *	1 735.8 ± 435.8 *	2 207.9 ± 527.7 *	2 991.2 ± 735.4 *

1) $n = 4$,表中数据为 $\bar{x} \pm SD$, *: 与对照组比较差异显著($P < 0.05$, Duncan's 法).



* :与对照组相比差异显著($P < 0.05$, Duncan's 法);▲:与诱导中期相比差异显著($P < 0.05$, Duncan's 法).
A: ALP mRNA 的相对表达量;B:BMP2 mRNA 的相对表达量.

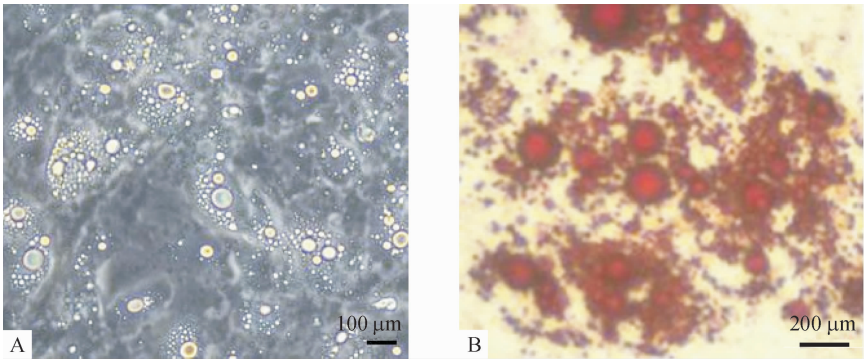
图5 鸡脂肪源间充质干细胞成骨分化过程中基因表达的变化(通过条带灰度值比较)

Fig.5 Changes of gene expression during osteogenic differentiation of chicken adipose-derived mesenchymal stem cells

2.5 鸡 AMSCs 的成脂分化诱导

在成脂分化诱导过程中对照组细胞形态无明显变化,油红 O 染色未见胞质有明显着色. 试验组细胞在脂肪细胞诱导液加入 5 d 后,细胞体积增大,此后胞质中有小的圆形透亮的脂滴出现,随着诱导时间的延长,脂滴逐渐增多,互相融合,体积增大,折光性增强. 第 7 天见较多脂滴且环状排列(图 6 A),第 20

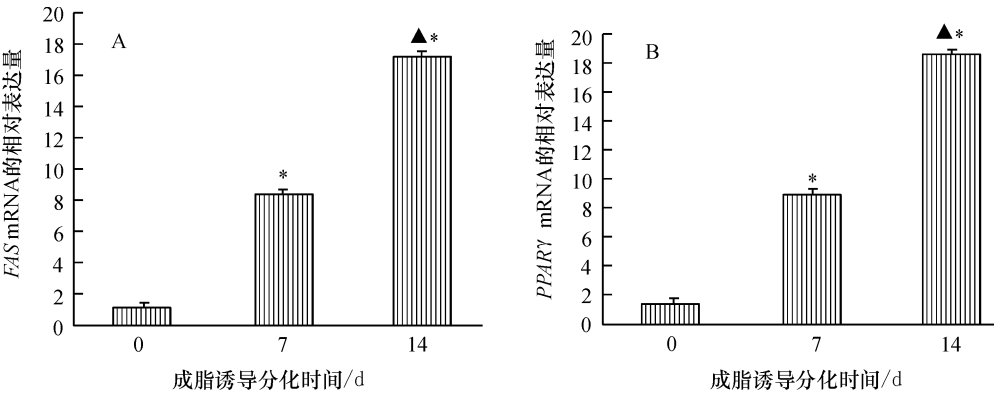
天油红 O 染色呈阳性(图 6 B);RT-PCR 结果显示,鸡 AMSCs 成脂诱导 7 d 和 14 d 后与对照组相比,PPARγ 和 FAS 的 mRNA 表达量均明显升高($P < 0.05$)(图 7),与诱导 7 d 时相比,诱导 14 d 时 PPARγ 和 FAS 的 mRNA 水平亦明显增加($P < 0.05$). 说明 AMSCs 在成脂诱导体系下向脂肪细胞分化.



A:成脂分化诱导 7 d 的细胞形态;B:成脂分化诱导 20 d 油红 O 染色的细胞形态.

图6 鸡脂肪源间充质干细胞的成脂诱导

Fig.6 Adipogenic inductions of chicken adipose-derived mesenchymal stem cells



* :与对照组相比差异显著($P < 0.05$, Duncan's 法);▲:与诱导中期相比差异显著($P < 0.05$, Duncan's 法).
A: FAS mRNA 的相对表达量;B:PPARγ mRNA 的相对表达量

图7 鸡脂肪源间充质干细胞成脂分化过程中基因表达的变化(通过条带灰度值比较)

Fig.7 Changes of gene expression during adipogenic differentiation of chicken adipose-derived mesenchymal stem cells

3 讨论

鸡是一种重要的模式动物,是全基因组测序的家禽之一,可用于胚胎学、免疫学、肿瘤学、细胞生物学、病毒学、基因调控等研究.随着干细胞的广泛应用,继胚胎干细胞之后,脐带血来源的间充质干细胞、骨髓间充质干细胞等成体干细胞已成为创伤医学、遗传医学、再生医学、组织工程学等多种学科的研究热点.2001年Zuk等^[9]分离获得了AMSCs.此后,许多试验证明AMSCs体外定向诱导可以向心肌细胞、成骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞和神经细胞等方向分化^[10-12],以及具有低免疫原性和低移植排斥性^[3,13].AMSCs所具备的这些优点使其成为干细胞研究的热点和多种学科的一个种子细胞.虽然目前的研究已经比较深入,但对鸡AMSCs的研究甚少.因此,高效分离培养及鉴定鸡AMSCs方法的建立显得十分有价值.

本试验通过酶消化法分离、提取AMSCs.经过体外培养、贴壁筛选及纯化,建立了一种简单高效的分离培养鸡AMSCs的方法.结果显示,适当提高胶原酶浓度及延长消化时间有助于纤维结缔组织与脂肪组织的分离,能增加原代细胞的收获数量.此外,原代培养鸡AMSCs的脂肪来源十分重要,与皮下脂肪相比内脏脂肪分离获得鸡AMSCs的数量更多、纯度更高.分离纯化的鸡AMSCs贴壁生长,形态上表现为成纤维细胞样.第1次传代后4~5d可进行再次传代,以后每3d按1:3传代1次,可连续传代10次,细胞增殖速度及表型无明显变化.据报道,来源于鸡真皮的MSCs可连续传代15次^[14],而来源于鸡脐带的MSCs可连续传代30次^[15],与本试验结果有差异,可能是由于组织来源和年龄的不同,而造成传代能力不一样.从生长曲线可以看出,鸡AMSCs有着较快的增殖速度,活性比较高.RT-PCR检测细胞特异性标记物,其中CD29、CD44及CD71的表达呈阳性,而造血干细胞表面标志CD45、CD34的表达呈阴性,与文献报道的AMSCs表型相符^[8,15].从这些结果可判断该细胞为间充质干细胞,排除了造血干细胞来源的可能.

大量研究表明AMSCs在体外经过化学诱导后,能分化为具有大量脂滴的脂肪细胞.PPAR γ 基因特异性表达于脂肪细胞中,且随着脂肪细胞的分化其表达量上调,是脂肪细胞分化过程中的决定性因子^[16].在3T3-L1和MEFs细胞基因敲除试验中,PPAR γ 基因被敲除可导致其成脂分化能力的丧

失^[17].Michalik等^[18]研究表明,PPAR γ 是脂肪细胞分化的相关基因,可以促进脂滴的聚集.FAS在脂肪细胞分化的后期高表达,参与脂肪细胞中脂滴的生成,同样是脂肪细胞分化过程中的决定性因子^[19].在本试验中,从鸡脂肪组织中获得的MSCs,经胰岛素、吡哆美辛、地塞米松和3-异丁基-1-甲基黄嘌呤诱导后分化为脂肪细胞,细胞内有脂滴形成,RT-PCR结果显示PPAR γ 基因和FAS基因的mRNA表达量升高.以上结果说明,本试验中分离获得的鸡AMSCs具有诱导分化为脂肪细胞的潜能.ALP的活性与成骨细胞的分化相关,活性增高表明细胞处于高分化状态,因此可将ALP活性的增高作为体外试验中成骨细胞分化的指标^[20-21].BMP2是特异性的骨生长因子,可以增加细胞内ALP活性及ALP mRNA的量,使其定向分化为成骨细胞^[22].在本试验中,从鸡脂肪组织中获得的MSCs,经抗坏血酸、 β -甘油磷酸钠和地塞米松诱导后,ALP活性增加,细胞基质发生钙化,同时BMP2和ALP的mRNA表达升高,且随着时间的延长其表达量增加,促使AMSCs向成骨细胞分化.以上结果说明,本试验中分离获得的鸡AMSCs具有诱导分化为成骨细胞的潜能.

总之,我们建立了一种体外分离、培养鸡AMSCs的方法,并对该细胞进行了比较全面的鉴定,为鸡AMSCs的进一步研究奠定了基础.

参考文献:

- [1] LE BLANC K, TAMMIK C, ROSENDAHL K, et al. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells[J]. Exp Hematol, 2003, 31(10): 890-896.
- [2] TSE W, PENDLETON J, BEYER W, et al. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: Implications in transplantation[J]. Transplantation, 2003, 75(3): 389-397.
- [3] GIMBLE J, KATZ A, BUNNELL B. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine[J]. Circ Res, 2007, 100(9): 1249-1260.
- [4] LIN Chingshwun, XIN Zhongcheng, DENG Chunhua, et al. Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture[J]. Histol Histopathol, 2010, 25(6): 807-815.
- [5] SENGES C, MIRANVILLE A, MAUMUS M, et al. Chemotaxis and differentiation of human adipose tissue CD34/CD31 progenitor cells: Role of stromal derived factor-1 released by adipose tissue capillary endothelial cells[J]. Stem Cells, 2007, 25(9): 2269-2276.

- [6] SEO M, SUH S, BAE Y, et al. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage *in vitro* and *in vivo* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 328 (1): 258-264.
- [7] FRIEDENSTEIN A, CHAILAKHJAN R, LALYKINA K. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells[J]. *Cell Tissue Kinet*, 1970, 3(4):393-403.
- [8] PHILIPPE B, BRUCE A, BUNNELL, 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.
- [9] ZUK P A, ZHU Min, MIZUNO H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell based therapies[J]. *Tissue Eng*, 2001, 7 (2):211-228.
- [10] MICHAEL P, PATRICK C, LYNNE W, et al. Isolating adipose-derived mesenchymal stem cells from lipoaspirate blood and saline fraction [J]. *Organogenesis*, 2010, 6 (1):11-14.
- [11] PRUNET M, COUSIN B, CATON D, et al. From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: Site specific differences[J]. *Exp Cell Res*, 2006, 312(6): 727-736.
- [12] GRONTHOS S, FRANKLIN D, LEDDY H, et al. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells[J]. *Cell Physiol*, 2001, 189(1):54-63.
- [13] CROP M, BAAN C, KOREVAAR S, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells induce explosive T-cell proliferation [J]. *Stem Cell Dev*, 2010, 19 (12):1843-1853.
- [14] GAO Yuhua, BAI Chunyu, XIONG Hui, et al. Isolation and characterization of chicken dermis-derived mesenchymal stem/progenitor cells [J/OL]. *Biomed Res Int*, 2013, [2013-12-27]. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/626258>.
- [15] BAI Chunyu, LI Xiangcheng, HOU Lingling, et al. Biological characterization of chicken mesenchymal stem/progenitor cells from umbilical cord Wharton's jelly[J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 376(1/2):95-102.
- [16] REN Delin, COLLINGWOOD T N, REBAR E J, et al. PPAR gamma knockdown by engineered transcription factors: Exogenous PPAR gamma 2 but not PPAR gamma 1 reactivates adipogenesis[J]. *Genes Dev*, 2002, 16(1): 27-32.
- [17] BRUN R P, SPIEGELMAN B M. PPAR gamma and the molecular control of adipogenesis [J]. *J Endocrinol*, 1997, 155(2):217-218.
- [18] MICHALIK L, AUWERX J, BERGER J P, et al. International union of pharmacology: LXI: peroxisome proliferator-activated receptors [J]. *Pharmacol Rev*, 2006, 58 (4):726-741.
- [19] 卢环宇, 韦梦影, 张更, 等. 脂肪酸合酶与脂肪酸代谢及细胞因子的关系[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2012, 28(11):1126-1128.
- [20] MALAVAL L, MODROWSKI D, GUPTA A K. Cellular expression of bone-related proteins during *in vitro* osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures[J]. *Cell Physiol*, 1994, 158(3):555-572.
- [21] GORI F, THOMAS T, HICOK K C, et al. Differentiation of human marrow stromal precursor cells: Bone morphogenetic protein-2 increases OSF2/CBFA1, enhances osteoblast commitment, and inhibits late adipocyte maturation [J]. *J Bone Miner Res*, 1999, 14(9):1522-1535.
- [22] LIU P, OYAJOB I B O, RUSSELL R G G. Regulation of osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells: Interaction between transforming growth factor- β and 1,25 (OH)₂ vitamin D₃ *in vitro* [J]. *Calcif Tissue Int*, 1999, 65(2):173-180.

【责任编辑 柴 焰】