

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.06.012

# 重组腺病毒介导 HGF 修饰 ADSCs 对大鼠肝损伤模型的治疗作用 \*

李俊杰<sup>1</sup> 尹文<sup>1</sup> 洪楠<sup>2</sup> 赵威<sup>1△</sup>

(1 第四军医大学西京医院急救中心 陕西 西安 710032; 2 军事医学科学院卫生勤务与医学情报研究所 北京 100850)

**摘要 目的:** 建立重组腺病毒介导肝细胞生长因子 HGF 促 ADSCs 定向分化肝细胞的方法, 并对其参与肝损伤修复能力进行验证, 为作为治疗肝损伤细胞来源提供参考。**方法:** 采用消化培养的方法, 分离 SD 大鼠腹股沟脂肪组织 ADSCs 细胞, 连续传代 3 次对其进行纯化培养, 利用形态学鉴定、流式细胞术检测 ADSCs 表面标志物方法对其间充质干细胞样特征进行鉴定, 加入成脂肪细胞诱导液观察其分化成脂肪细胞的能力; 构建腺病毒表达 HGF 载体 Adeno-HGF-EGFP, 并转染 ADSCs 细胞, 利用免疫细胞化学染色方法检测肝细胞标志分子表达水平; 最后建立大鼠肝损伤动物模型, 观察 Adeno-HGF-EGFP 转染的 ADSCs 细胞参与肝损伤修复能力情况。**结果:** 分离的 ADSCs 细胞形态较为一致, 绝大多数呈梭形, 排列不规则。流式细胞术结果显示, 该细胞表达 CD29、CD90、CD106 等间充质干细胞细胞表面标记物, 低表达造血干细胞细胞表面标记物 CD34、CD45, 同时, 分离的 ADSCs 细胞具有诱导分化成脂肪细胞能力; Adeno-HGF-EGFP 转染 ADSCs 后, AFP、ALB、CK18 等肝细胞特异性分子表达水平升高; 经尾静脉注射 ADSCs 细胞后, 肝损伤大鼠的 AST、ALT、TBIL 等分子表达水平恢复正常。**结论:** 建立了重组腺病毒介导肝细胞生长因子 HGF 促 ADSCs 定向分化肝细胞的方法, 并且表达 HGF 的 ADSCs 细胞具有修复大鼠肝损伤模型能力, 这为通过细胞治疗肝损伤提供了新的细胞来源。

**关键词:** 脂肪源性干细胞; 肝细胞生长因子; 肝损伤; 细胞治疗

**中图分类号:** Q95-3, R657.3, Q813 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)06-1043-05

## The Cellular Therapeutic Effect of Adipose-derived Stem Cell-expressed HGF Transplantation on Rat Liver Injury Model\*

LI Jun-jie<sup>1</sup>, YIN Wen<sup>1</sup>, HONG Nan<sup>2</sup>, ZHAO Wei<sup>1△</sup>

(1 Department of Emergency Medicine, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Institute of Health Service &amp; Medical Information, Academy of Military Medical Sciences, Beijing, 100850, China)

**ABSTRACT Objective:** A method was established to identify the hepatogenic transdifferentiation of adipose tissue-derived stem cells (ADSCs) by recombinant adenovirus-mediated expression of hepatocyte growth factor (HGF) *in vitro* and the differentiated ADSCs' cellular therapeutic effect was verified on rat liver injury model. **Methods:** SD rat inguinal adipose tissue was harvested by enzyme digestion. And the third passage of cells were collected to detect the markers of the mesenchymal stem-like cells by flow cytometry. The third passage of isolated cells was treated with adipogenic nutrient media to verify their ability of differentiation into adipocytes. Recombinant adenovirus Adeno-HGF-EGFP was constructed, and characterized ADSCs were transfected by recombinant adenovirus, then hepatocyte-specific markers were detected by immunocytochemical staining. Finally animal models of liver injury were used to verify the ability of the liver to repair after damage by tail vein injection of transfected ADSCs. **Results:** After being subcultured, the sizes of isolated cells were highly homogeneous, and the majority of them were spindle-shaped with disorderly arrangement. The flow cytometry results showed that the isolated cells expressed CD29, CD90 and CD106, but not CD34 and CD45. After being cultured in inducing media, the isolated cells could differentiate into adipocytes; the expression of the hepatic markers, AFP, ALB and CK18 increased in differentiated ADSCs; also, levels of AST, ALT and TBIL in sera collected from the acute liver injury rats became normal after ADSCs transplantation. **Conclusions:** Recombinant adenovirus-expressed hepatocyte growth factor could induce ADSCs directly differentiate into hepatocytes, and differentiated ADSCs transplantation could be a new strategy of cell therapy to liver injury.

**Key words:** ADSCs; HGF; Liver injury; Cell therapy

**Chinese Library Classification(CLC):** Q95-3, R657.3, Q813 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2014)06-1043-05

### 前言

细胞疗法是治疗肝损伤的新途径<sup>[1]</sup>。临床上选择干细胞替

代治疗或者刺激体内肝脏细胞再生是细胞治疗的主要目标。虽然卵圆细胞是肝脏修复过程中的重要效应细胞。但是当损伤程度超过肝脏自身修复能力时, 卵圆细胞的来源就成为制约其应

\* 基金项目: 陕西省社会发展攻关项目(2011K12-48)

作者简介: 李俊杰(1980-), 男, 博士, 主治医师, 主要研究方向: 肝损伤治疗, E-mail: dcotorljj@126.com

△ 通讯作者: 赵威, E-mail: zhaoweifmmu@126.com

(收稿日期: 2013-06-30 接受日期: 2013-07-24)

用的主要瓶颈<sup>[2]</sup>。当前选择其他非肝来源的间充质干细胞,如骨髓、脐带血、胎盘干细胞诱导其向肝细胞分化是解决肝细胞来源的主要手段<sup>[2,3]</sup>。尽管如此,还存在获取来源限制及细胞数目少等问题。近年有研究发现,脂肪来源的干细胞具有多向分化潜能,可在 FGF、HGF 等细胞因子的刺激下分化为肝细胞<sup>[4]</sup>。并且脂肪来源的干细胞具有与骨髓来源的间充质干细胞相似的特征<sup>[5]</sup>。事实上,脂肪来源的干细胞可在体外条件下分化成多种类型细胞<sup>[6]</sup>。由于脂肪组织易于获取,选择脂肪源性干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)诱导分化成为肝细胞已成为肝损伤修复治疗的新途径<sup>[7-9]</sup>。但是由于 ADSCs 缺乏特异的表面标志物,分化为类肝细胞的纯度低且分离较困难难以付诸应用。针对 ADSCs 应用的巨大潜力,本研究通过腺病毒介导肝细胞生长因子 HGF 转染 ADSCs 使其向肝细胞定向分化,并通过细胞治疗的方法研究分化的 ADSCs 对大鼠肝损伤模型的治疗效果。结果表明,ADSCs 可成功诱导为肝细胞,并具有治疗肝损伤效果,其可作为肝脏疾病的细胞、基因治疗以及生物人工肝的新的细胞来源,其应用前景广阔。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

雄性 SPF 级 SD 大鼠 70 只,220-250 g,第四军医大学实验动物中心提供,SPF 级鼠料饲喂,自由饮水。其中 30 只用于体内细胞治疗实验,分为正常对照组、空载体对照组和细胞治疗组,其余 40 只用于分离 ADSCs。

### 1.2 主要试剂来源

胶原酶、胰蛋白酶、地塞米松、吡啶美辛、异丁基甲基黄嘌呤(IBMx)购自美国 Sigma 公司,DMEM 培养基购自美国 HyClone 公司;胎牛血清(FBS)购自杭州四季青生物工程有限公司。CD29 兔单抗、CD90 小鼠单抗、CD106 大鼠单抗、CD34 兔单抗及 CD45 大鼠单抗及对应同型对照购自美国 Novus 公司。DAB 法免疫细胞化学检测试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

### 1.3 ADSCs 细胞的分离培养和鉴定

参照 Lin 等的方法分离 ADSCs<sup>[10]</sup>。严格无菌条件下,取出腹股沟处的脂肪组织,将其用 PBS 冲洗数遍,然后以胶原酶(1 mg/mL)37℃消化 1 h。消化后的组织加入等量的含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中,室温孵育 10 min。此时溶液分为两层,取下层溶液以 400×g 的速度离心 10 min。弃上清后,将沉淀再次悬浮于 160 mmol/L NH<sub>4</sub>Cl 溶液,裂解残存的红细胞。再次离心后加入含有 15%胎牛血清的 DMEM 低糖培养基中,接种于细胞培养瓶,于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 孵箱中培养,每周换液 2 次。连续传代 3 次后制成单细胞悬液并计数,至少 10<sup>4</sup>/管行流式细胞术检测。待鉴定完成后,选择具有间充质细胞样表面分子特征的传代细胞进行诱导成脂肪细胞实验。将细胞接种于预先置有盖玻片的 6 孔板,待细胞生长至约 80%汇聚时,加入成脂肪细胞诱导液(含 1 μmol/L 的地塞米松、200 μmol/L 的吡啶美辛、0.5 mmol/L 的 IBMx 及 10 mg/L 的胰岛素),每 3 d 换 1 次液。诱导 21 d 时吸去培养液,4%多聚甲醛固定后,油红 O 染色。

### 1.4 重组腺病毒 Adeno-HGF-EGFP 的制备

用 ApaI 和 NotI 从重组质粒 pCMV-HGF-IRES-EGFP (本室保存)中切下 HGF-IRES-EGFP 片段。电泳回收后,克隆入经同样双酶切处理的穿梭质粒 pShuttle 中。pShuttle-HGF 转化至 DH5α 感受态菌中,抗性筛选后,进行 PCR 及酶切鉴定。阳性重组质粒 pShuttle-HGF-IRES-EGFP 经 I-CeuI、PI-SceI 及 ClaI 酶切后,回收带有 CMV 启动子-HGF 基因及 BGH PolyA 的大片段(两端分别带有 I-CeuI、PI-SceI 酶切位点),插入 E1 缺失、含同样酶切位点的 Adeno-X 病毒 DNA 中,转化 DH5α 并用酶切鉴定。将阳性克隆(命名为 Adeno-HGF-EGFP)在 DH5α 中大量扩增,用试剂盒抽提 Adeno-HGF-EGFP DNA。Adeno-HGF-EGFP DNA 用 PacI 酶切使其线性化。以线性的 Adeno-HGF-EGFP DNA 经脂质体转染 HEK293 细胞,培养 1 w 后,出现细胞病变效应(CPE)的细胞,可认定被重组腺病毒感染,收集其培养上清进行扩增及鉴定。K<sub>2</sub>rber 法计算病毒的滴度<sup>[11]</sup>。

### 1.5 Adeno-HGF-EGFP 感染 ADSCs

Adeno-HGF-EGFP 感染对数生长期的 ADSCs 细胞(MOI=100:1),并设置空白对照组细胞和空载体感染组细胞。取感染 48 h 的细胞和其他两组细胞,用 4%多聚甲醛固定 10 min,PBS 洗涤 3 次后,免疫细胞化学染色检测 ALB、AFP、CK18 的表达(按照试剂盒操作说明书进行)。

### 1.6 分化的 ADSCs 治疗大鼠肝损伤模型

按照陈小伍等的方法建立大鼠肝损伤模型<sup>[12]</sup>。将空白载体细胞和基因转染细胞分别通过尾静脉注入肝损伤大鼠体内,3 天后,各组 SD 大鼠颈椎脱臼法处死,取损伤肝叶常规固定脱水后冰冻切片行激光共聚焦检测荧光蛋白 GFP 的表达。收集外周血标本,采用自动生化仪进行肝功能检测(ALB、AST、ALT、TBIL),明确各实验组动物的肝功情况。

## 2 结果

### 2.1 ADSCs 的分离及鉴定

在形态方面,原代 ADSCs 呈短梭形、梭形及多角形,传代 3 次后呈均一长梭形,长短不一,排列不规则,具有典型的间充质干细胞形态特征(数据未展示)。流式细胞术结果显示 ADSCs 表达 CD29、CD90 和 CD106 等间充质干细胞表面抗原,表达率分别为 98.6%、99.7%、51.0%(图 1),但不表达造血干细胞表面分子 CD34 和 CD45,表达率分别为 1.8%和 5.0%(图 2),符合间充质干细胞样细胞表面分子标志特征。

同时通过加入成脂肪细胞诱导液体外诱导 ADSCs 向脂肪细胞分化,结果可见诱导 ADSCs 分化 21 d 后,细胞体积变大,呈椭圆形,胞内正常结构消失,呈现空泡结构和大量脂肪油滴,部分相互融合,油红 O 染色可见脂肪滴形成(图 3)。以上结果表明我们从脂肪组织分离的 ADSCs 具有典型的间充质干细胞特征,且具有诱导成脂肪细胞分化能力。

### 2.2 Adeno-HGF-EGFP 转染 ADSCs,成功诱导其向肝细胞分化

Adeno-HGF-EGFP 转染 ADSCs 48 h 后,免疫细胞化学染色结果显示,胞浆内有棕黄色颗粒,AFP、ALB、CK18 等分子表达水平显著升高(图 4A、B 和 C)。

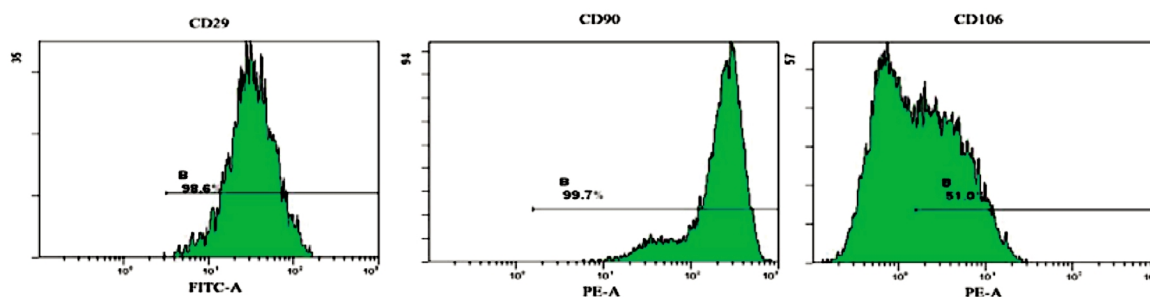


图1 ADSCs 表达间充质干细胞表面抗原 CD29、CD90 和 CD106 分子

Fig.1 ADSCs expressed mesenchymal stem cell surface antigens CD29, CD90 and CD106

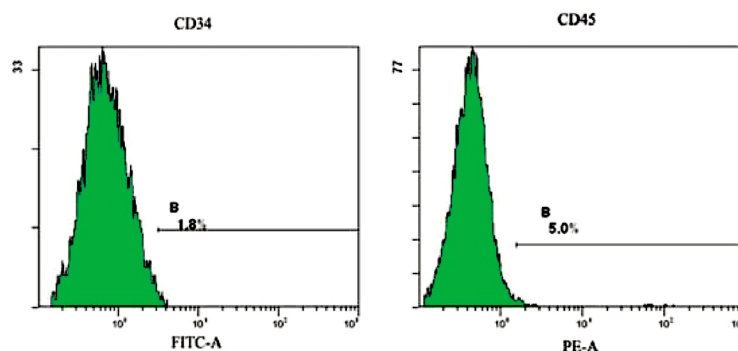


图2 ADSCs 不表达造血干细胞表面抗原 CD34 和 CD45 分子

Fig.2 ADSCs did not express the hematopoietic stem cell surface antigens CD34 and CD45

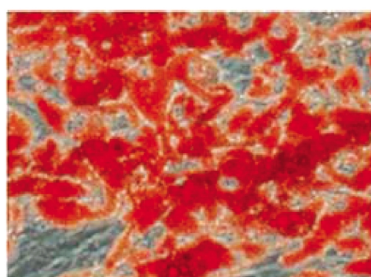


图3 ADSCs 具有成脂肪细胞分化能力(100× )

Fig.3 ADSCs could differentiate into adipocytes after adipogenic induction (100× )

### 2.3 转染 Adeno-HGF-EGFP 的 ADSCs 具有治疗肝损伤效果

大鼠肝损伤模型经尾静脉注射转染 Adeno-HGF-EGFP 的 ADSCs 3 d 后,肝脏表达 HGF(图 5)。与正常对照组及空白载体对照组相比,反应肝脏功能的 AST ( $P<0.05$ )、ALT( $P<0.05$ )、TBIL( $p<0.05$ )等分子表达水平恢复至正常水平,但 Alb 水平变化不明显( $p>0.05$ ),转染 Adeno-HGF-EGFP 的 ADSCs 治疗大鼠肝损伤效果明显(表 1)。

## 3 讨论

再生医学具有巨大的应用前景,但是内皮细胞源性细胞群

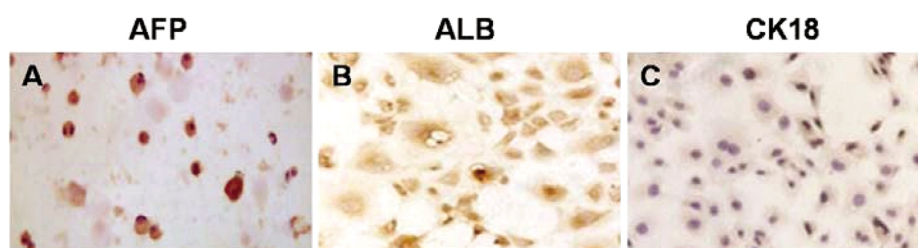


图4 Adeno-HGF-EGFP 转染 ADSCs 后,ADSCs 表达 AFP、ALB、CK18(100× )(A:AFP;B:ALB;C:CK18)

Fig.4 ADSCs expressed AFP, ALB and CK18 after Adeno-HGF-EGFP transfection(100× )

的严重不足限制了原代前体细胞的应用。据报道,体外扩增健康志愿者的内皮前体细胞,每 100 毫升外周血约产生  $5.0 \times 10^6$  个细胞,事实上,每个病人大约需要 500 毫升自体骨髓血才能达到治疗效果<sup>[3]</sup>。这就意味着内皮细胞源性前体细胞的实际应用受到限制,如果需要提取足够数目的细胞,这样体内的血容量就显得明显不足。我们应用 ADSCs 的好处是能够从病人身上方便获取,最小的创伤且易于培养,每只小鼠可提取大约  $10^5$

个细胞,对于病人来说只需抽脂 20 毫升就已足够。培养的 ADSCs 能够快速扩增,大约每周能够增殖 10 倍,并且多次传代后可长期培养,且保持间充质的多潜能性<sup>[4]</sup>。ADSCs 来源丰富,取材方便、安全,且有长期存活及多向分化潜能,使其在细胞治疗、组织工程与基因治疗等方面成为具有巨大的研究潜力和广阔的应用前景的种子细胞源。

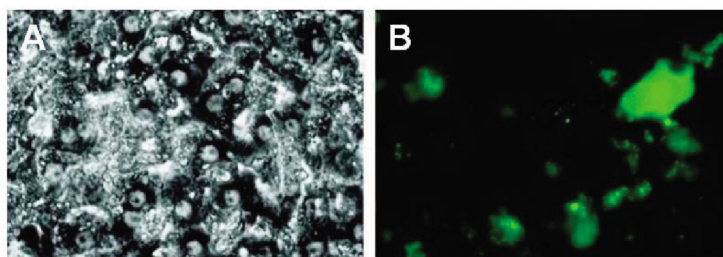


图5 尾静脉注射表达 Adeno-HGF-EGFP 的 ADSCs 7d 后,肝脏表达 GFP

A: 空白载体对照组(100× );B:尾静脉注射 ADSCs 组(100× )

Fig.5 Confocal results showed that expression of GFP in liver of rat model

A: Vector control group (100× );B: ADSCs group (100× )

表1 尾静脉注射 Adeno-HGF-EGFP 具有治疗 SD 大鼠肝损伤效果

Table 1 The tail vein injection of Adeno-HGF-EGFP improves postoperative liver function in SD rats

| Group                 | AST(IU/L)                     | ALT(IU/L)                     | TBIL( $\mu$ mol/L)           | Alb(g/L)                      |
|-----------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Vector control        | 27.55 $\pm$ 2.11 <sup>a</sup> | 64.91 $\pm$ 7.48 <sup>a</sup> | 3.37 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup> | 24.13 $\pm$ 1.53 <sup>b</sup> |
| Normal control        | 34.72 $\pm$ 4.18 <sup>a</sup> | 73.52 $\pm$ 8.93 <sup>a</sup> | 2.99 $\pm$ 0.61 <sup>a</sup> | 21.27 $\pm$ 0.97 <sup>a</sup> |
| Intravenous injection | 13.63 $\pm$ 3.49              | 57.66 $\pm$ 9.41              | 2.49 $\pm$ 0.35              | 24.85 $\pm$ 2.99              |

注:a:  $P < 0.05$ , 与静脉注射组对比; b:  $p > 0.05$ , 与静脉注射组对比。

Note: a:  $P < 0.05$ , compared to Intravenous injection group; b:  $P > 0.05$ , compared to Intravenous injection group.

我们的实验结果表明,通过消化培养法分离的 ADSCs 细胞形态较为一致,绝大多数呈梭形,排列不规则,表达 CD29、CD90、CD106 等间充质干细胞细胞表面标记物,低表达造血干细胞细胞表面标记物 CD34、CD45,通过加入诱导培养基可使分离的 ADSCs 细胞分化为脂肪细胞。因此,我们所分离的 ADSCs 具有间充质干细胞的基本特征;Adeno-HGF-EGFP 转染 ADSCs 后,AFP、ALB、CK18 等肝细胞特异性分子表达水平升高,说明在 HGF 的刺激下,ADSCs 可向肝细胞分化,具有分化为肝细胞的潜能;进一步利用大鼠肝损伤模型来验证经体外转染的 ADSCs 是否具有在体治疗作用。我们发现,转染的 ADSCs 经尾静脉注射后,肝损伤大鼠模型反映肝功指标的 AST、ALT、TBIL 等分子表达水平恢复正常,具有治疗肝损伤效果。在我们的研究中,我们应用表达 HGF 的腺病毒感染 ADSCs 可诱导其发生定向分化,避免了其分化为未知细胞,并且分泌 HGF 使其产生细胞因子治疗效果,这也验证了此前的报道结果<sup>[19]</sup>;另外,通过尾静脉注射 ADSCs 可以在大鼠肝损伤部位检测到 ADSCs 的存在,这与 Kim 报道的结果是一致的<sup>[10]</sup>。与对照组相比,ADSCs 介导的细胞治疗具有显著地治疗肝损伤作用。这就意味着 ADSCs 可作为肝损伤治疗的一个新的细胞来源用于细胞治疗。

本实验我们首先在体外分离、纯化和扩增 ADSCs,然后通过表达 HGF 的腺病毒体外感染 ADSCs,最后将表达 HGF 的 ADSCs 移植到大鼠体内。由于腺病毒基因不能整合到大鼠细胞 DNA 中,目的基因表达的时间短,病毒的基因及有关蛋白可在一定时间内被机体清除,因而造成的免疫反应也相对较小。我们所培养的 ADSCs 可应用流式细胞术分析获取,并且对于自体细胞治疗来说更方便提供,这将为其下一步基于干细胞的功能性细胞治疗提供指导。

随着对 ADSCs 更加深入的了解和研究,脂肪组织可能成为人体潜在的、最大的成体干细胞库。由于 ADSCs 避开了胚胎干细胞的伦理学问题及 BMSCs 的来源问题,以其特有的生物学特性成为干细胞研究领域的热点。同时,越来越多的研究强调了 ADSCs 的应用前景<sup>[17-19]</sup>。在应用 ADSCs 治疗肝损伤方面,有研究显示脂肪组织来源的间充质干细胞移植能够促进大鼠肝脏缺血再灌注和肝切除后的肝再生<sup>[20]</sup>。我们的结果提示,移植表达 HGF 的 ADSCs 可修复肝损伤,具有治疗肝损伤作用,其可作为肝脏疾病的细胞、基因治疗以及生物人工肝的新的细胞来源,其应用前景广阔。

#### 参考文献(References)

- [1] 刘晓琰,李波. 干细胞移植用于肝再生治疗的相关研究进展 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2007, 21(2): 184-187  
Liu Xiao-long, Li Bo. Development of liver stem cell transplantation for liver regenerative treatment[J]. Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery, 2007, 21(2): 184-187
- [2] Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells [J]. Science, 1999, 284(5417): 1168-1170
- [3] Kuo TK, Hung SP, Chuang CH, et al. Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success of using bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Gastroenterology, 2008, 134 (7): 2111-2121
- [4] Kamada Y, Yoshida Y, Saji Y, et al. Transplantation of basic fibroblast growth factor-pretreated adipose tissue-derived stromal cells enhances regression of liver fibrosis in mice [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009, 296(2): G157-167
- [5] De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow[J].

- Cells Tissues Organs, 2003, 174(3): 101-109
- [6] 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
- [7] Zhu Y, Liu T, Song K, et al. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC[J]. Cell Biochem Funct, 2008, 26(6): 664-675
- [8] Liang L, Ma T, Chen W, et al. Therapeutic potential and related signal pathway of adipose-derived stem cell transplantation for rat liver injury[J]. Hepatol Res, 2009, 39(8): 822-832
- [9] Wang Y, Lian F, Li J, et al. Adipose derived mesenchymal stem cells transplantation via portal vein improves microcirculation and ameliorates liver fibrosis induced by CCl4 in rats [J]. J Transl Med, 2012, 10: 133
- [10] Guiting Lin, Maurice Garcia, Hongxiu Ning, et al. Defining Stem and Progenitor Cells within Adipose Tissue [J]. Stem Cells Dev, 2008, 17(6): 1053-1063
- [11] Kärber G. Contribution to collective treatment of pharmacological serial tests[J]. Arch Exp Pathol Pharmacol, 1931, 162: 480-483
- [12] 陈小伍, 李利红, 朱达坚, 等. 大鼠肝损伤动物模型的建立[J]. 中华实验外科杂志, 2009, 26(12): 1723-1725  
Chen Xiaowu, Li Lihong, Zhu Dajian, et al. Establishment of the surgical hepatic lesions model in rats [J]. Chin J Exp Surg, 2009, 26(12): 1723-1725
- [13] Nakagami H, Maeda K, Morishita R, et al. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(12): 2542-2547
- [14] Nakagami H, Morishita R, Maeda K, et al. Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy [J]. J Atheroscler Thromb, 2006, 13(2): 77-81
- [15] Seo MJ, Suh SY, Bae YC, 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
- [16] Kim SJ, Park KC, Lee JU, et al. Therapeutic potential of adipose tissue-derived stem cells for liver failure according to the transplantation routes[J]. J Korean Surg Soc, 2011, 81(3): 176-186
- [17] Gentile P, Orlandi A, Scioli MG, et al. Concise review: adipose-derived stromal vascular fraction cells and platelet-rich plasma: basic and clinical implications for tissue engineering therapies in regenerative surgery [J]. Stem Cells Transl Med, 2012, 1(3): 230-236
- [18] Huang SJ, Fu RH, Shyu WC, et al. Adipose-Derived Stem Cells: Isolation, Characterization and Differentiation Potential [J]. Cell Transplant, 2013, 22(4): 701-709
- [19] Shi Z, Neoh KG, Kang ET, et al. Enhanced endothelial differentiation of adipose-derived stem cells by substrate nanotopography [J]. J Tissue Eng Regen Med, 2012, [Epub ahead of print]; DOI: 10.1002/term.1496
- [20] Seki T, Yokoyama Y, Nagasaki H, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell transplantation promotes hepatic regeneration after hepatic ischemia-reperfusion and subsequent hepatectomy in rats [J]. J Surg Res, 2012, 178(1): 63-70

(上接第 1035 页)

- [9] Chung MA, Luo Y, O'Donnell M, et al. Development and preclinical evaluation of a Bacillus Calmette-Guerin-MUC1-based novel breast cancer vaccine[J]. Cancer Res, 2003, 63: 1280-1287
- [10] Bankert RB, Egilmez NK, Hess SD. Human-SCID mouse chimeric models for the evaluation of anti-cancer therapies [J]. Trends Immunol, 2001, 22: 386-393
- [11] Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse [J]. Nature, 1983, 301: 527-530
- [12] Jackson DJ, Elson CJ, Kumpel BM. Reduction of human anti-tetanus toxoid antibody in hu-PBL-SCID mice by immunodominant peptides of tetanus toxoid[J]. Clin Exp Immunol, 2004, 137: 245-252
- [13] Feuerer M, Beckhove P, Bai L, et al. Therapy of human tumors in NOD/SCID mice with patient-derived reactivated memory T cells from bone marrow[J]. Nat Med, 2001, 7: 452-458
- [14] Hill LL, Perussia B, McCue PA, et al. Effect of human natural killer cells on the metastatic growth of human melanoma xenografts in mice with severe combined immunodeficiency [J]. Cancer Res, 1994, 54: 763-770
- [15] Gao H, Bian A, Zheng Y, et al. sBAFF mutants induce neutralizing antibodies against BAFF[J]. FEBS Lett, 2007, 581: 581-586
- [16] Waldron-Lynch F, Deng S, Preston-Hurlburt P, et al. Analysis of human biologics with a mouse skin transplant model in humanized mice[J]. Am J Transplant, 2012, 12: 2652-2662
- [17] Mas A, Cervello I, Gil-Sanchis C, et al. Identification and characterization of the human leiomyoma side population as putative tumor-initiating cells[J]. Fertil Steril, 2012, 98: 741-751