



微量碎片人脂肪组织的周细胞含量和分泌活性高于酶源性基质血管组分

比安卡维扎尼^a, 艾萨克肖^a, hanna lesme^a, 李咏^a, nusrat khan^a,
Carlo TrMOLDA^b, 布鲁诺P Eault^{a,c}

关键词脂肪干细胞•间充质干细胞•细胞因子•周细胞•分泌组织

^a英国爱丁堡爱丁堡大学再生医学MRC中心, ^b意大利米兰图像研究所, ^c大学的David Geffen医学院骨科医院研究中心和广泛干细胞研究中心加利福尼亚, 洛杉矶, 加利福尼亚, 美国

通讯: 加州大学洛杉矶分校 David Geffen医学院骨科医院研究中心和广泛干细胞研究中心BrunoPéault博士 90095-7358, 美国, 中心心血管科学, MRC再生医学中心, 爱丁堡EH16 4UU, 英国; 电子邮件: bpeault@mednet.ucla. 教育部

2018年3月7日收到; 修订
2018年6月28日; 接受
2018年7月19日出版。

<http://dx.doi.org/10.1002/SCTM.18-051>

这是一份根据条款开放获取的文章创作的 共享署名许可证, 允许在任何介质中使用, 分发和复制, 前提是原始作品被正确引用。

摘要

自体脂肪组织用作组织充盈和/或再生, 作为完整的脂肪抽吸物或酶促衍生的基质血管组分 (SVF), 其可以首先培养到间充质干细胞 (MSC) 中。或者, 最近在不同的治疗适应症中显示出机械碎裂成亚毫米簇的自体脂肪组织的移植。为了记录微碎片化脂肪组织再生潜力的生物学基础, 我们首先分析了脂质组织处理的脂肪组织中血管周围假定MSCs的分布, 与等基因相比, 观察周细胞的显著富集, 以外膜细胞为代价。酶处理的脂肪抽吸物。已经描述了由于特定因子的分泌, MSC作为营养和免疫调节细胞的重要性。因此, 我们使用分泌蛋白质阵列研究了培养的脂肪组织簇或酶促衍生的SVF的蛋白质分泌。在培养中, 与同基因SVF相比, 微碎片化脂肪组织释放更多参与组织修复和再生的生长因子和细胞因子, 通过血管生成显著。因此, 我们建议在微碎片脂肪组织移植后观察到有效的组织修复/再生是由于完整的血管周围生态位的分泌能力。干细胞转化医学2018

介绍

在十九世纪末开创性的面部和乳房重建, 脂肪组织 (AT) 嫁接后来遭到怀疑, 并且大多数人都失宠了, 直到20世纪80年代新的成功尝试重新激活了这种手术方法 [1, 2]。首先使用完整或最低限度加工作为组织轮廓和增强的填充物, AT成为真正的细胞治疗产品, 证明其含有作为间充质干细胞 (MSC) 的多系祖细胞 [3]。用于治疗目的的脂肪抽吸物 (LPA) 的常规处理包括酶促解离成单细胞悬浮液, 随后通过离心消除脂肪细胞, 以及收集剩余的基质血管部分 (SVF), 其可以立即使用或在体外细胞扩增后使用。后一种涉及长期SVF培养的方案允许从真实的MSCs中分离AT, 也称为脂肪来源的干细胞, 其在形态上, 抗原性和发育上类似于骨髓衍生的对应物 (在 [4] 中综述), 并且同样可以很好地控制

通过其免疫抑制特性进行移植物抗宿主反应 [5]。通过酶消化分离MSC, 并通过特定标准定义: 培养后的塑料粘附; 表达标志物CD73, CD90, CD105, 以及在适当的培养刺激下体外分化为骨细胞, 脂肪细胞和软骨细胞的能力 [6]。骨髓和AT也不例外, 因为MSCs可以在酶解和培养选择后从多个其他器官中获得, 如骨髓 [7], 肺 [8], 骨骼肌 [9] 和子宫内膜 [10], 引用但是有几个。

血管化组织通常具有在培养物中产生MSC的能力, 以及合适的周围内皮细胞, 即包围毛细血管和微血管的周细胞 [11-17], 以及围绕较大动脉和静脉的外膜基质细胞 [18-22], 被鉴定为培养的MSC的体内祖细胞。这种观点得到以下事实的支持: 周细胞和外膜细胞在体内表达MSC标志物并且在培养时具有中胚层分化能力 [13, 23-27]。此外, MSC和周细胞之间基因表达谱的相似性

最近有报道[28]。从人AT中纯化的单个血管周细胞中的转录组分析证实了这种祖细胞状态，并揭示了一种分层组织，其中外膜基质细胞在发育上比周细胞更原始[29]。

然而，重要的是要注意尽管居民身份细胞可以补充体内不同的细胞谱系，如脂肪细胞[30]，骨髓[31, 32]，卫星细胞和肌纤维[33]，滤泡树突细胞[34]，肌成纤维细胞[35-38]和产生MSCs文化，他们作为真正的MSCs（即，具有骨，软骨，脂肪，脂肪和肌源性发育潜能的免疫抑制和分泌细胞）的原位的行为尚未被记录。此外，根据来源组织和使用的分离技术，可以在分离的MSC中观察到区分特性[26, 27]，从而表明在大多数成体器官中存在异质的祖细胞群[39-42]。因此，根据目前的知识，尽管已经证明纯化的周细胞和外膜细胞在培养物中产生MSC，但是它们是否具有原位相同的确切潜力尚不清楚。

总之，AT在治疗上用于治疗不同的病症，作为完整组织或酶促衍生的SVF，立即使用或培养到MSC中。或者，未经解离的AT移植补充MSC注射以获得更高的治疗效率（综述见[43]）。

最近的一项创新是使用机械破碎的AT，从而避免任何酶处理，用于治疗各种医学病症。机械分离AT的最常用方法之一是Lipogems技术。Lipogems是一种用于将手动LPA加工成微碎片脂肪组织（MAT）簇的装置，通过使用一系列筛子和钢弹珠进行温和的机械尺寸减小。它是一个完全浸入式封闭系统，可直接在手术室中使用，减少组织暴露和/或扩展处理方法导致的污染风险。生成的AT簇直径为几百微米，没有血液和游离脂质。自体移植这种MAT已成功用于多种适应症，涵盖化妆品，整形外科，直肠科和妇科[44-54]。

为了进一步研究MAT的再生潜力与酶促衍生的SVF相比，我们表征了Lipogems处理的人AT与异基因胶原酶消化的LPA的血管周围细胞分布和体外蛋白分泌。我们展示了LPA的机械碎裂如何改变组织的所得血管周细胞含量，另外酶促解离在体外对生长因子和细胞因子分泌产生负面影响。

材料和方法

人体组织

在经过化妆品吸脂术或腹部整形术的健康女性患者（26-71岁）的事先书面知情同意下收集AT。从东南苏格兰研究伦理委员会获得了在研究中使用人体组织的伦理批准（参考：10 / S1103 / 45）。

皮下腹部脂肪收集

使用一次性组织浸润套管（17Gx185mm-VG17 / 18），从腹部整形术样品的皮下AT注射50至100ml的0.9%NaCl溶液，在37℃升温。使用连接到一次性吸脂插管（LGI 13Gx185mm-AR 13/18）的10-cc鲁尔锁定注射器或使用标准真空泵辅助吸脂技术手动获得LPA。手动脂肪抽吸程序中使用的所有器械均在Lipo-gems Surgical Kit (Lipogems, Milan, Italy) 中提供。

脂肪组织的微碎片化

每次使用Lipogems 60装置按照制造商的说明处理总共60ml手动脂肪抽吸物。简而言之，该系统连接到0.9%NaCl溶液供应，直到圆筒完全充满并且系统中不存在空气。首先，将30ml手动脂肪抽吸物通过蓝色尺寸减小过滤器入口推入圆筒中。摇动该圆筒1分钟以乳化油。在整个过程中，通过盐水流动除去血液成分和乳化油残留物。当圆筒内的溶液看起来清澈时，漂浮的MAT通过灰色尺寸减小过滤器出口从圆筒中排出到连接到装置的10ml注射器中。重复该过程，直至完全加工60ml脂肪抽吸物，得到20至30ml MAT。

细胞分离

将新鲜AT样品（LPA和MAT）酶促解离以获得SVF。简而言之，样品用II型胶原酶（DMEM中的1mg / ml胶原酶，来自Gibco, Thermofisher Scientific, Waltham, MA）在37℃在振荡水浴中消化45分钟。然后用2%FCS / PBS（Sigma Aldrich, St Louis, MO）洗涤样品，并依次通过100和70- μ m细胞过滤器（BD Falcon, Corning, NY）过滤。离心后，将沉淀重悬于红细胞裂解缓冲液（155mM NH₄Cl, 170mM Tris, pH 7.65, 均来自Sigma-Aldrich），室温下15分钟。用2%FCS / PBS再次洗涤细胞，并通过40- μ m细胞过滤器（BD Falcon）过滤以获得单细胞悬浮液。在台盼蓝染色（BioRad, Hercules, CA）上在血细胞计数器上计数活细胞。

流式细胞术分析

SVF用以下抗体染色：CD31-V450（1: 400）或CD144-PerCP Cy5.5（1: 100），CD34-PE（1: 100），CD45-V450（1: 400）或CD45-APC Cy7（1: 100）和CD146-BV711（1: 100）（均来自加利福尼亚州圣何塞市的BD Biosciences）。将细胞在4℃下在黑暗中染色30分钟，然后用2%FCS / PBS洗涤。使用Diva软件（v. 6.0, BD Biosciences）在BD LSR Fortessa 5激光流式细胞仪（BD Biosciences）上进行分析。单染色珠用作补偿对照。使用FlowJo（v. 10.0, FlowJo, Ashland, OR）分析数据。前向散射区域（FSC-A）与侧向散射区域（SSC-A）门用于识别细胞，然后是FSC-A与前向散射高度（FSC-H）以选择单个细胞。将活细胞门控为4^q，6-二脒基-2-苯基吲哚（DAPI, Life Technologies, Carlsbad, CA）染色阴性。通过门控CD31和CD45阴性细胞排除造血细胞和内皮细胞。

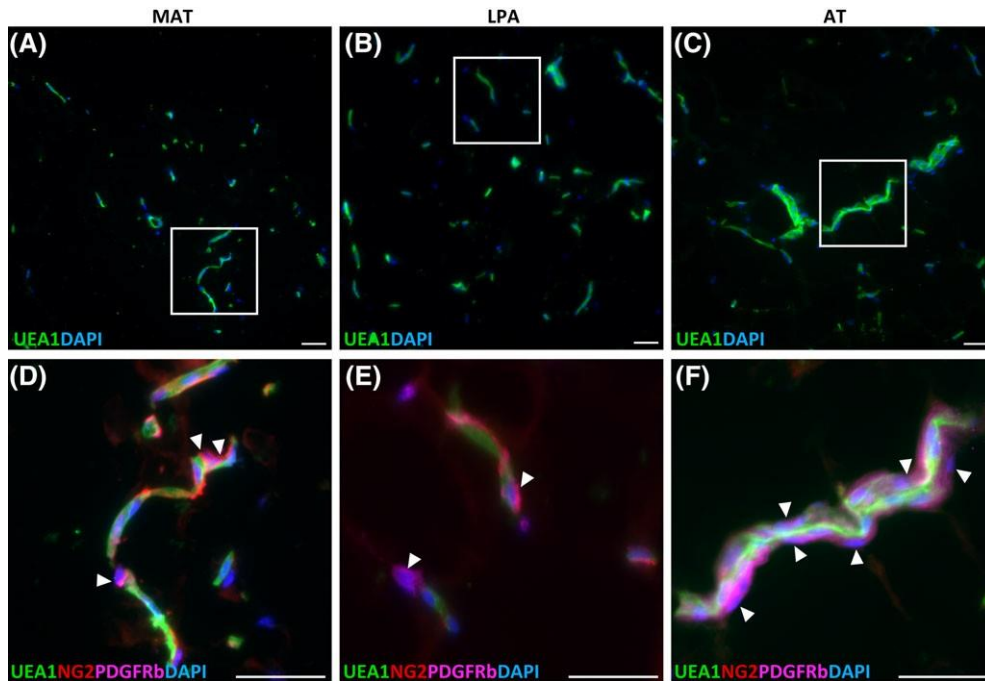


图1. 未加工和微碎片脂肪组织中的血管系统。(A, B, C) : 用UEA-1染色内皮细胞。从左到右: 微碎片脂肪组织 (MAT), 脂肪抽吸物 (LPA), 脂肪组织 (AT)。仅在LPA和AT中观察到较大的血管。(D, E, F) : A, B, C中的盒装区域分别以D, E, F放大显示。箭头指示周细胞, 其已经使用针对PDGFR β 和NG2的抗体染色。比例尺: 50 μ m。

血管周细胞被鉴定为周细胞 (CD146⁺ CD34⁻) 或外膜细胞 (CD146⁻ CD34⁺)。

荧光免疫组织化学

将AT样品 (未加工的AT, LPA和MAT) 在4 $^{\circ}$ C下在4%缓冲的多聚甲醛 (PFA) 中固定过夜。将样品在含15%蔗糖的PBS (w / w) 中浸泡24小时, 然后包埋在PBS中的15%蔗糖和7%明胶中。后

在37 $^{\circ}$ C下4小时, 将样品转移至4 $^{\circ}$ C。24小时后, 将样品在干冰上冷冻。将嵌入的样品储存在-80 $^{\circ}$ C并冷冻切片, 厚度为8-10 μ m。在染色之前将切片固定在4%PFA中。用PBS中的10%山羊血清 (Sigma-Aldrich) 在室温下封闭非特异性抗体结合1小时。使用以下未偶联的一抗: 小鼠抗人NG2 (1: 100; 参考文献554275, BD Biosciences), 兔抗人PDGFR β (1: 100; 参考文献32570, Abcam, Cambridge, UK)。所有一抗均在抗体稀释液中稀释 (Life Technologies, 加利福尼亚州卡尔斯巴德) 并在4 $^{\circ}$ C温育过夜。用PBS洗涤后, 将切片在室温下与1: 300稀释的物种特异性第二抗体一起温育1小时。使用以下荧光染料缀合的第二抗体: 抗小鼠-Alexa 555 IgG, 抗兔-Alexa 647 IgG和链霉抗生物素蛋白缀合的488 (均来自Life Technologies)。将直接生物素化的Ulex europaeus凝集素 (UEA-1) 用作长期培养细胞的内皮细胞标记物 (1: 200; Vector-B1065, Vector Laboratories, Burlingame, CA)。在室温下用DAPI (Life Technologies) 对细胞核染色10分钟。使用Fluoramount G (SouthernBiotech, Birmingham, AL) 安装载玻片, 并使用荧光显微镜 (Zeiss Observer, Zeiss, Oberkochen, Germany; Olympus BX61,

奥林巴斯, 东京, 日本)。使用斐济软件 [55] 或ZEN Blue lite版 (Zeiss) 处理图像。

组织培养和培养基收集

源自MAT或LPA的SVF细胞以6,000个细胞/ cm^2 的密度接种, 并在基础培养基中培养, 所述基础培养基由补充有100 μ g/ml链霉素 (Sigma-Aldrich), 100U / ml的DMEM Glutamax (Gibco) 组成。青霉素 (Sigma-Aldrich) 和20%热灭活的胎牛血清 (Sigma-Aldrich)。将200mg (相当于200 μ l的MAL) 接种在6孔板的各孔中, 在基础培养基中培养。在标准条件下培养8天后 (37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂) 收集来自SVF和MAT的培养基并储存在-20 $^{\circ}$ C。

Secretome阵列

使用Proteome Profiler Human XL Cytokine Array试剂盒 (ARY022b) 和人血管生成阵列试剂盒 (ARY007) 按照制造商的说明书 (R&D Systems, Minneapolis, MN) 分析分泌组。将从培养的SVF和MAT收集的条件培养基在室温下以500g离心5分钟以除去碎片, 通过70- μ m细胞过滤器过滤以除去脂肪细胞/小的MAT残基, 并与两个阵列一起孵育。使用LiCOR Odyssey Fc装置 (LICOR, Lincoln, NE) 检测信号, 暴露阵列膜10分钟。使用Image Studio Lite软件 (LICOR) 对膜上的阳性信号进行定量。对应于每种蛋白质的重复斑点的平均信号 (像素密度) 在阴性对照上的成对斑点的平均信号上归一化。然后将每种蛋白质的标准化信号用于比较分析。

统计

使用 Microsoft Excel 或 GraphPad Prism5 软件使用 Student's t 检验进行统计学分析。结果表示为平均值 \pm SEM。p 值小于 .05 被认为具有统计学意义。

结果

微血管脂肪中保留血管周围生态位

在 MAT, LPA 和 AT 的切片上检测内皮细胞标记物 Ulex europaeus 凝集素 1 (UEA-1) 受体说明 AT 中存在的血管网络, 微血管位于脂肪细胞之间。主要在未加工的 AT 和 LPA 中观察到较大的血管, 而 MAT 主要表现为存在小的毛细血管样血管 (图 1A-1C)。

对周细胞标记物的染色显示, 在 AT 机械片段化后, 表达 NG2 或 PDGFR β 的周细胞正常分布, 仍然在微血管中包裹内皮细胞 (图 1D)。在 AT 和 LPA 样品中观察到相同, 表明微碎片化不影响微血管中的血管周细胞室 (图 1E, 1F)。

与脂肪抽吸物相比, 在周细胞中富含 MAT

使用胶原酶消化 AT 样品 (MAT 和 LPA) 并通过流式细胞术分析。SVF 中有核细胞的平均产量为每毫升 MAT ($n = 7$) 27×10^3 15×10^3 细胞和每毫升 LPA 69×10^3 56×10^3 细胞 ($n = 7$)。选择活细胞, 不包括碎片, 死细胞和双峰。分别使用 CD31 和 CD45 从分析中排除内皮细胞和白细胞。周细胞被鉴定为 CD146⁺CD34⁻, 外膜细胞被鉴定为 CD34⁺CD146⁻ 细胞 [56]。与 LPA 相比, 观察到 MAT 富含周细胞。在等基因标本分析中, LPA 中的周细胞和外膜细胞分别占细胞的 8.39% 和 51.5%, 与先前观察到的值一致 [13, 18, 56] (图 2B)。在 MAT 对应物中, 周细胞和外膜细胞分别占 33.5% 和 5.46% (图 2A)。关于周细胞和外膜细胞数量的 LPA 和 MAT 之间的这种差异被观察到是显著的 ($p < .05$, $n = 10$; 图 2C)。

培养的微碎片脂肪分泌物比同基因 SVF 具有更高数量和更高数量的蛋白质

已知 MSC 分泌生长因子和细胞因子, 游离或通过微泡货物参与组织修复和再生 [57, 58]。假设存在于 AT 中的天然血管周细胞, MS 的体内祖细胞负责其再生潜力, 我们的目的是将 MAT 的分泌蛋白组与酶促衍生的 SVF 的分泌蛋白组进行比较。从四种不同供体分离的同基因 MAT 和 SVF 在基础培养基中培养 8 天 (图 3A)。然后使用蛋白质组分析仪商业测定法分析条件培养基中是否存在一系列细胞因子和生长因子。四项独立实验显示, MAT 比 SVF 分泌更多数量的细胞因子和血管生成生长因子 (图 3B 和 4A)。此外,

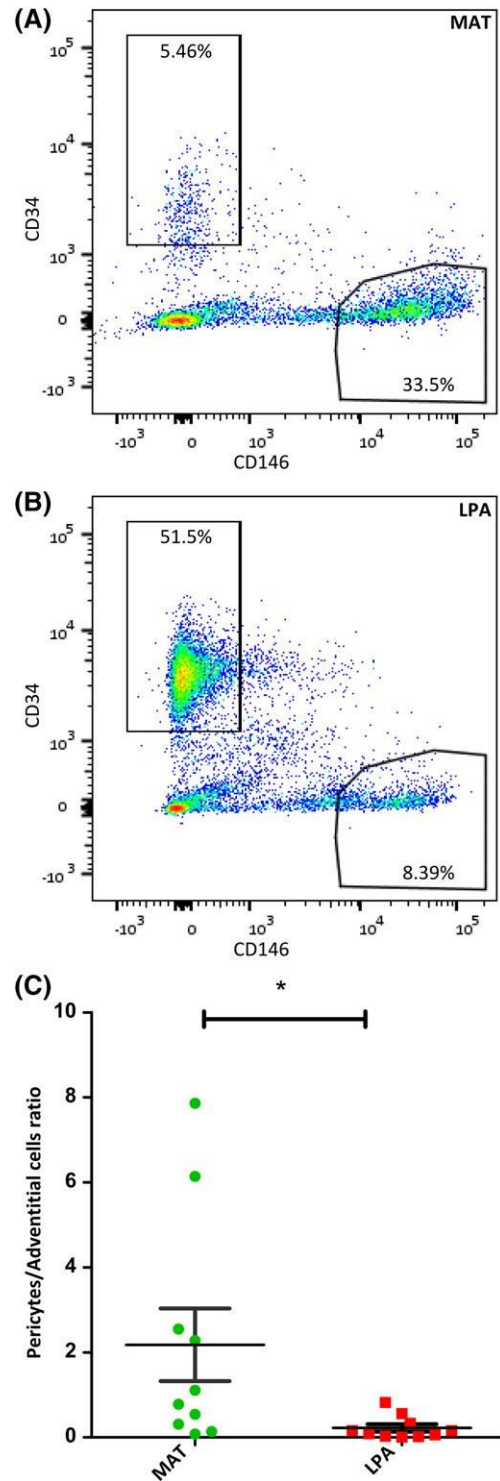


图 2. MAT 和 LPA 中血管周围外膜细胞和周细胞的相应丰度。(A, B): 点图显示来自相同供体的 MAT 中的外膜细胞 (CD34⁺CD146⁻) 和周细胞 (CD146⁺CD34⁻) 群体。(C): LPA 和 MAT 中周细胞和外膜细胞的定量分布, $n = 10$, * $p < .05$ 。

对来自对四种不同生物样品进行的独立实验得到的数据的比较分析表明, MAT 和 SVF 分泌的大多数细胞因子和血管生成因子在前者的上清液中更丰富 (图 5 和 6)。这些结果表明

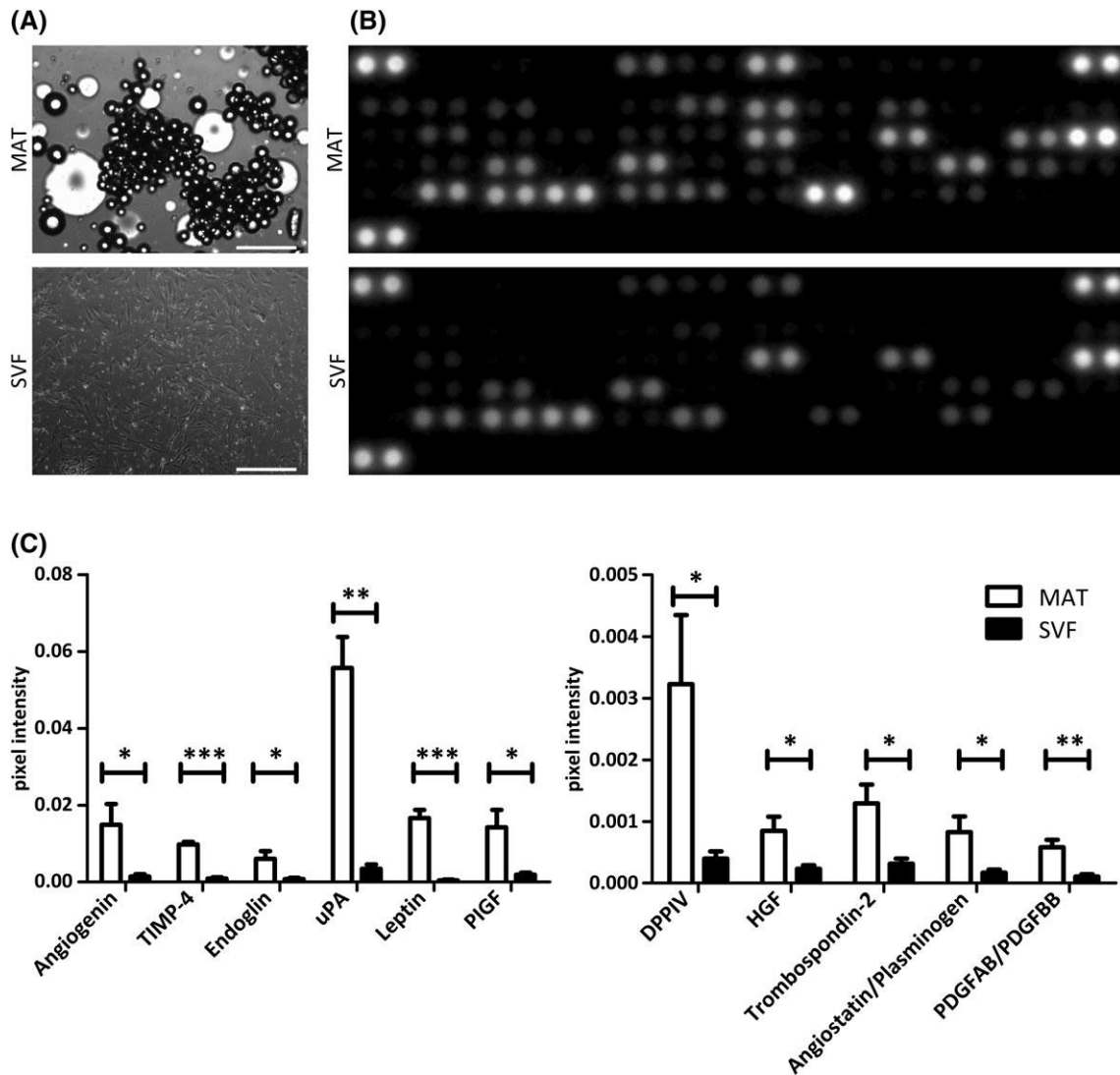


图3. 通过培养的MAT和同基因SVF分泌血管生成蛋白。(A)：在基础培养基中培养的MAT和SVF。比例尺：500 μ m。(B)：血管生成蛋白质组阵列显示培养8天后来自MAT和SVF的分泌蛋白。捕获抗体一式两份被发现，每个双点代表检测到的蛋白质。(C)：不同血管生成蛋白的分泌水平，测量为双峰的像素强度的平均值，并归一化为阴性对照。对在四个独立供体中检测到的合并分泌值进行统计分析。* p < 0.05;** p < 0.01;*** p < 0.001。

胶原酶消化降低了AT基质血管细胞的分泌活性，无论是定性还是定量。为了直接测试该假设，用胶原酶消化MAT，并将衍生的SVF置于培养物中。完整和酶促解离的MAT在基础培养基中平行培养8天，并如上所述分析所得的条件培养基。微碎片脂肪的酶促处理显著降低了分泌活性，这与从常规SVF观察到的相当 (图3B, 4A, 7A和7B)。

在分析血管生成生长因子的详细分析中，我们发现血管生成素，血管抑制素/纤溶酶原，DPPIV，内皮糖蛋白，肝细胞生长因子 (HGF)，瘦素，PDGFAB / BB，胎盘生长因子 (PlGF)，血小板反应蛋白2，TIMP4的MAT分泌更高。和uPA (图3C)。

关于细胞因子分泌，脂联素，CD14，CD31，CD40配体 (CD154)，几丁质酶3样1，补体因子D，EMMPRIN (CD147, basigin)，GDF-15，IGFBP-2，IL1RA，IP-10，M-

脑脊液，MIF，MIG (CXCL9)，MIP-3 β (CCL19)，PDGFAA，RANTES

与SVF相比，MAT上清液中 (CCL5)，RBP-4，松弛素-2，ST2，TNF- α 和uPAR (CD87) 显著更丰富 (图4B)。在细胞因子阵列中，与在血管生成阵列中观察到的SVF相比，通过MAT增加的内皮糖蛋白，HGF，瘦蛋白和DPPIV的分泌被复制 (图4B)。

讨论

AT长期以来一直在临床上用作普通的未加工的组织移植植物。采用酶促产生的无脂肪细胞SVF被认为是一项重大改进，甚至更多，因为AT衍生的SVF可以在培养基中生长成治疗有效的MSCs [59]。然而，在再生医学中应用的解离的AT衍生的SVF (用于培养或不培养) 用于再生医学仍然是经验性的，因为这些细胞的确切作用模式仍然模糊，具有祖细胞潜能，营养，分泌和

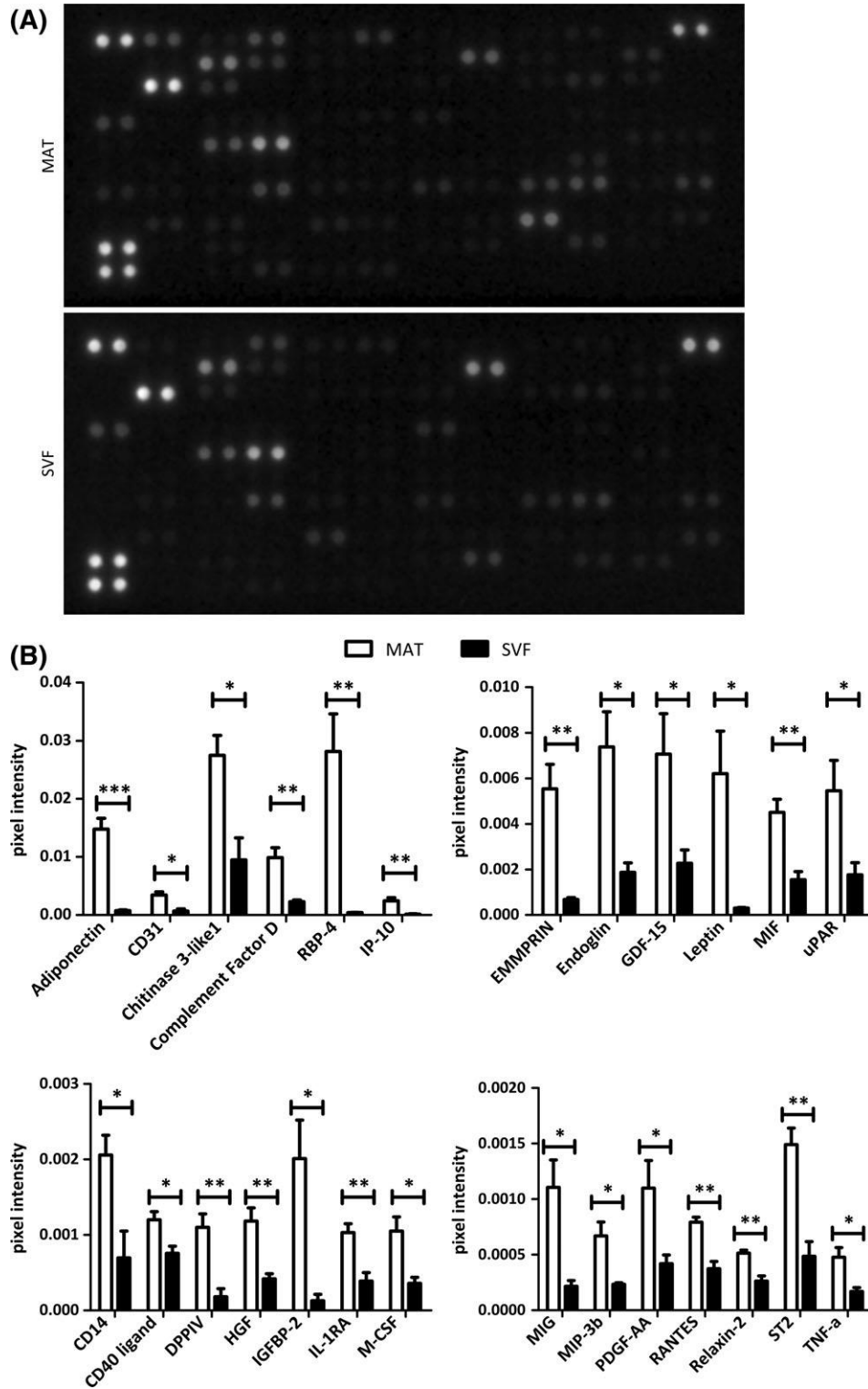


图4. 培养的MAT和同基因SVF的细胞因子分泌。(A)：细胞因子蛋白质组学阵列显示培养8天后来自MAT和SVF的分泌蛋白质。捕获抗体一式两份被发现，每个双点代表检测到的蛋白质。(B)：测量不同细胞因子的分泌水平作为双峰的像素强度的平均值并在阴性对照上归一化。对在四个独立供体中检测到的合并分泌值进行统计分析。* $p < .05$; ** $p < .01$; *** $p < .001$ 。

免疫调节活性被不同地建议用于介导组织再生和修复。

作为完整AT和单细胞悬浮液之间的中间路径，将AT机械解离成微团簇

(例如Lipogems系统)已经产生了具有高治疗价值的产品。在本研究中，我们使用免疫组织化学来描述MAT簇，并将它们与来自相同供体的SVF并排比较。

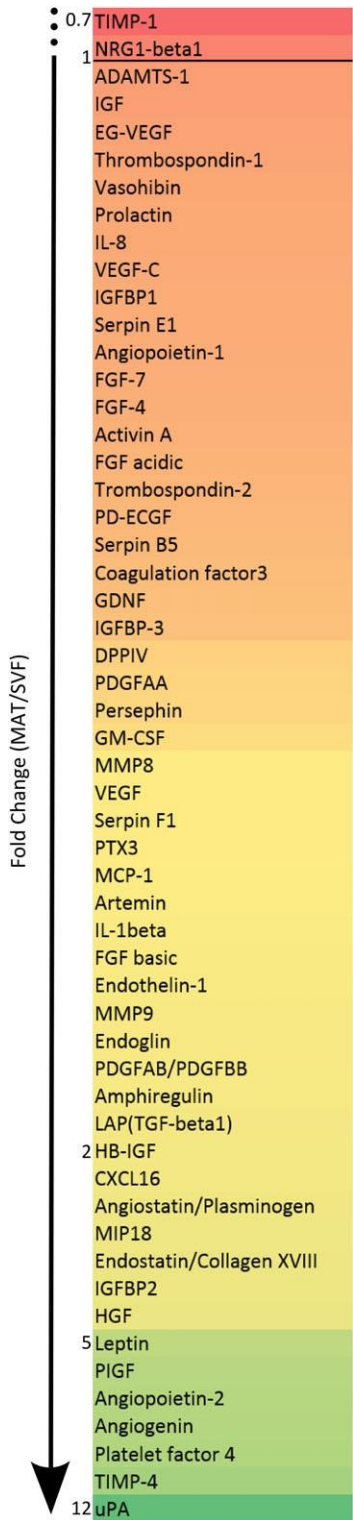


图5. 与SVF相比MAT的血管生成蛋白分泌水平。使用血管生成蛋白质组阵列检测的血管生成因子的分泌水平，表示为MAT和SVF值之间的倍数变化。这些值表示在四个独立的供体中检测到的归一化像素强度。列表侧面的数字表示折叠变化。

血管周围假定MSC含量和培养中的分泌活性。正如预期的那样，MAT的显微解剖学基本上类似于完整的AT，毛细血管和毛细血管

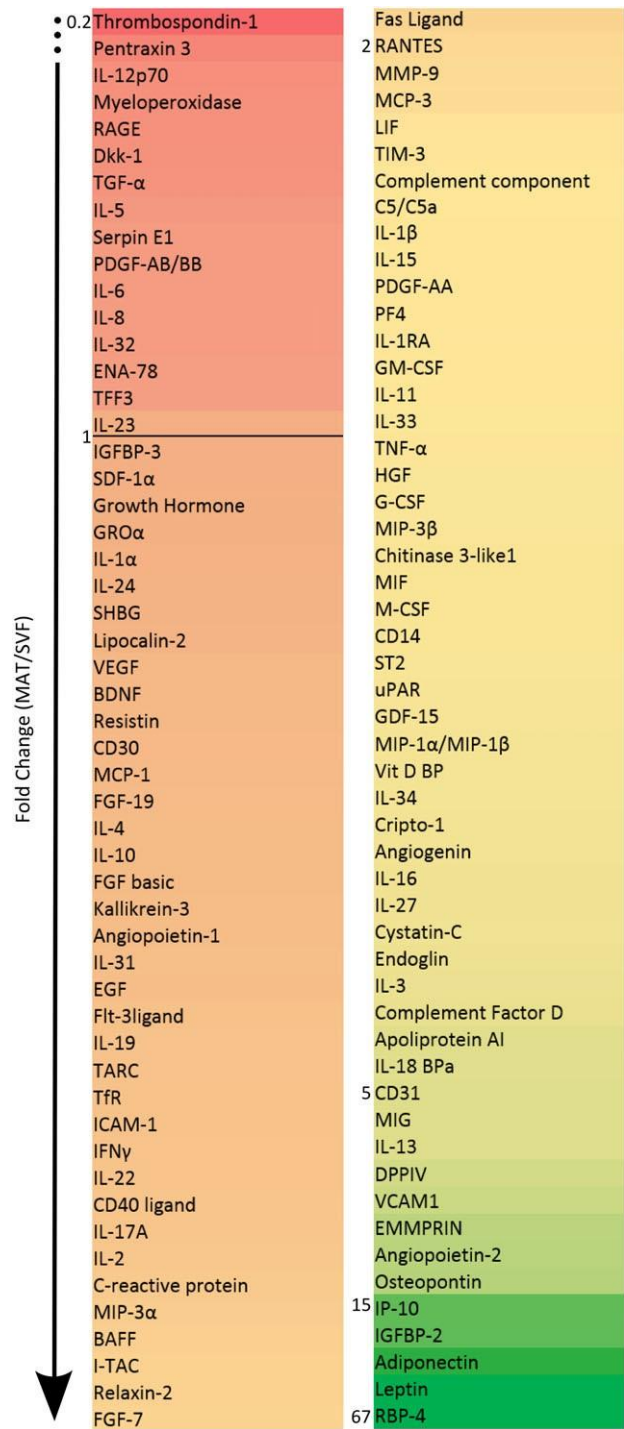


图6. 与SVF相比MAT的细胞因子分泌水平。使用细胞因子蛋白质组阵列检测的细胞因子的分泌水平，表示为MAT和SVF值之间的倍数变化。这些值表示在四个独立的供体中检测到的归一化像素强度。列表侧面的数字表示折叠变化。

微血管在脂肪细胞和内皮细胞周围包裹的周细胞之间组织和分布。然而，通过流式细胞术对周细胞和外膜基质细胞进行定量分析表明，在MAT中比在LPA和衍生的SVF中以更高的频率遇到周细胞，证实了先前的观察[44, 60]。相反，LPA包含

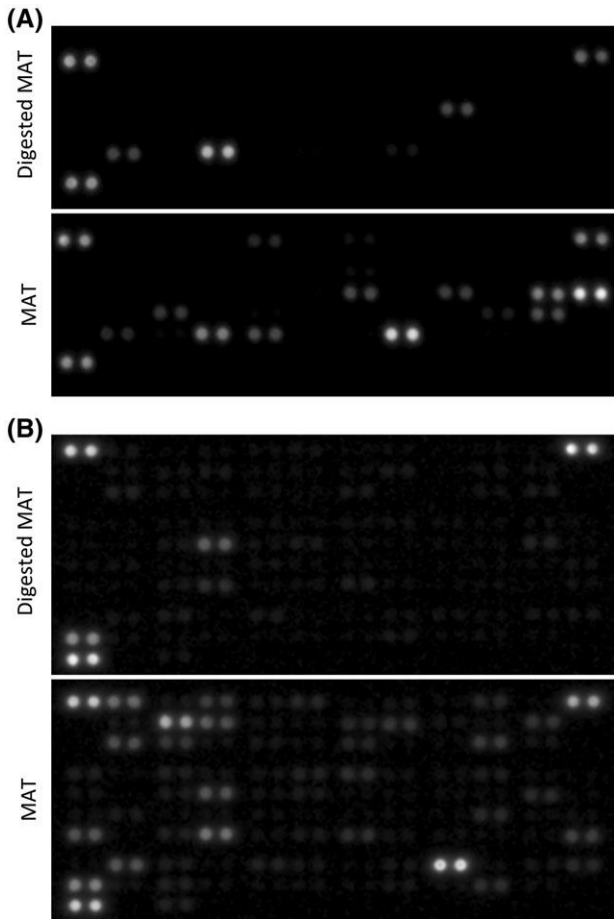


图7. 酶消化的MAT和未消化的MAT的蛋白质分泌。(A)：血管生成蛋白质组阵列和(B)细胞因子蛋白质组阵列显示在基础培养基中培养8天后来自酶促消化的MAT和未消化的MAT的分泌蛋白质。捕获抗体一式两份被发现，每个双点代表检测到的蛋白质。

比MAT制剂更多的外膜基质细胞。这表明微血管通过微碎片保留，并保存在MAT中，而由外膜包围的较大的动脉和静脉在机械解离后部分丧失。虽然纯化的周细胞和外膜基质细胞均在体外产生MSCs [13, 18]，但它们各自对长期常规MSC培养的贡献尚不清楚。然而，单个细胞中基因表达的描述表明，外膜基质细胞在发育上比周细胞更原始[29]，尽管我们和其他研究者之前已经证实了从AT纯化的周细胞的再生潜力[20, 24, 61-64]。因此，如果Lipogems的治疗价值与周细胞富集有关，那么这些细胞可能通过生长因子分泌而不是作为祖细胞更间接地发挥其再生作用。通过MAT制剂和从相同AT样品获得的SVF在培养物中产生的生长因子和细胞因子的定性，定性和定量表征该假设。总体结论是，与酶促解离的SVF相比，Lipogems衍生的MAT产生更多量的许多测试的生长因子和细胞因子。作为主要区别

在MAT和SVF之间，只有前者含有脂肪细胞；因此，正如预期的那样，MAT而不是SVF培养上清液含有脂肪细胞分泌的因子：脂联素，它调节几种代谢级联反应[65]；补体因子D [66]；RBP-4，一种视黄醇结合蛋白[67]；抗炎症I1-1RA [68]；和leptin，调节脂肪因子的饱腹感[69]。已知在MAT上清液中未检测到其他分子由脂肪细胞分泌。有趣的是，MAT上清液中存在较高量的几种因子刺激血管生成，因此可间接支持组织再生：血管生成素[70]，内皮糖蛋白[71]，VEGF家族成员PlGF [72]，多功能HGF [73]，以及PDGF [74]。胰岛素样生长因子结合蛋白IGFBP2在MAT上清液中更为丰富，也可通过调节VEGF表达来调节血管生成[75]，TNF α 在MAT培养中分泌上调，可促进新血管形成[76]。这些数据支持并扩展了先前研究的结果，其中观察到Lipogems衍生的MAT培养物上清液在体外刺激内皮细胞（HUVEC）增殖和管形成；因此，与AT衍生的MSC的培养物上清液相比，在这些MAT上清液中检测到更高量的血管生成素-1和-2 [64]。在本实验中，在MAT上清液中也检测到三种血管生成抑制剂，尽管含量非常少：IP-10 (CXCL10) [77]，血管抑制素[78]和血小板反应蛋白2 [79]。

值得注意的是，与SVF培养物相比，在MAT上清液中检测到更多量的免疫炎症，白细胞募集和迁移的多种介质：GDF-15，一种炎症调节因子和不同病理学中的生物标志物 [80]；MIF，控制炎症和先天免疫[81]；MIG (CXCL9)，一种T细胞化学引诱物[82]；MIP3 β (CCL19) 参与免疫细胞迁移 [83]；RANTES (CCL5)，一种用于多种白细胞的趋化因子趋化因子[84]；和CD40配体 (CD154)，它与抗原呈递细胞上的CD40结合[85]。众所周知，脂肪组织可以支持实质性的炎症[86]，因此存在于这些免疫炎症反应的许多参与者的培养物上清液中。然而，这些因素如何影响自体移植后的组织再生是未知的，并且由于许多这些分子可以发挥多种不同的作用，因此解释变得复杂。例如，在炎症部位募集白细胞的CCL5趋化因子也可以促进血管生成[87]。除了在炎症，血管生成和组织重塑中发挥主要作用外，在MAT上清液中显着过表达的几丁质酶3样-1可以刺激肿瘤中的血管形成[88]。

为什么MAT比在相同条件下培养的SVF分泌更多的生长因子和细胞因子？除脂肪细胞外，脂肪组织内的分泌细胞包括造血细胞，其负责产生参与免疫炎症反应调节的大多数因子，内皮细胞和血管周细胞，包括周细胞，以及松散地称为基质或“间充质”的其他细胞区室。间充质干/基质细胞血管周围来源的证据支持了一种模型的发展，在这种模型中，周细胞和其他血管周围细胞可以在不利的病理条件下与血管壁失去联系，从血管中迁移出来并成为

重编程为再生细胞[89], 发挥组织祖细胞的作用[13, 18], 谱系特异性干细胞的生态细胞[24], 产生营养因子的“药内分泌细胞”[57], 以及瘢痕形成促纤维化细胞[35-38]。本结果表明AT驻留再生细胞在维持在完整的血管周围环境(例如Lipogems机械碎裂系统提供的环境)时比在消化和培养后更有效地执行这些功能。值得注意的是, 众所周知, 组织酶促解离可以引起基因表达[90]和外来体含量[91]的变化, 并且该研究揭示了当还原成单细胞悬浮液时AT居住的天然MSC有多严重。总之, 这些数据揭示了与SVF相比, 物理碎片化AT的差异, 这为构建对前者治疗优势的解释提供了基础。需要进一步研究, 不仅在培养中, 还包括在动物中进行实验, 以确认酶解离对天然MSC的影响, 从而更深入地了解MAT的治疗效果。

确认

我们感谢Barbara Krutchkoff的有益讨论。这项工作得到了英国心脏的资助

Foundation和Lipogems, 提供脂肪组织处理套件。

作者的贡献

B.X.: 概念和设计, 数据收集和组装, 数据分析和解释, 稿件写作; IS: 概念和设计, 数据的收集和组装; HL: 数据的收集和组装; LY: 提供学习材料; NK: 收集和汇编数据; CT: 概念和设计, 提供学习材料; BP: 概念和设计, 数据分析和解释, 稿件撰写, 稿件的最终批准。

披露潜在的利益冲突

B.Y. 与爱丁堡皇家外科医学院Small Pump Priming Grant宣布研究经费。CT宣布就业, 专利持有人和股票所有权。BP宣布了咨询和研究员资金。所有其他作者表示没有潜在的利益冲突。

免责声明

CT是Lipogems的创始人。

引用

1 强AL, Cederna PS, Rubin P等。目前的脂肪移植状态: 收获, 加工和注射技术的回顾。P持续 R康斯特 S马尔格 2015; 136 (4): 897-912。

2 Tremolada C, Palmieri G, Ricordi C. 脂肪细胞移植和干细胞: 整形手术符合再生医学。C埃尔 T兰科植物 2010; 19: 1217-1223。

3 Zuk PA, Zhu M, Mizuno H et al. 来自人类脂肪组织的多系细胞: 对基于细胞的治疗法的影响。T问题 E天然气 2001; 7 (2): 211-228。

4 Schäffler A, Büchler C. 简明回顾: 脂肪组织来源的基质细胞 - 新型细胞疗法的基本和临床意义。S透射电镜 C埃尔 2007; 25 (4): 818-827。

5 Yañez R, Lamana ML, García-Castro J等。脂肪组织来源的间充质干细胞具有适用于控制移植物 - 宿主疾病的体内免疫抑制性质。S透射电镜 C埃尔 2006; 24 (11): 2582-2591。

6 Dominici M, Le Blanc K, Mueller I等。定义多能间充质基质细胞的最小标准。国际细胞疗法协会立场声明。C优秀疗法 2006; 8: 315-317。

7 Gronthos S, Mankani M, Brahimi J等。出生后人牙髓干细胞(DPSCs)在体外和体内。P新 N语言 A计算机辅助设计 S海 USA 2000; 97 (25): 13625-13630。

8 Lama VN, Smith L, Badri L等。移植同种异体移植物研究中人类成人肺组织间充质干细胞的证据。JC林 I尼维斯 2007; 117 (4): 989-996。

9 郑B, 曹B, Crisan M等。前瞻性鉴定人骨骼肌中的肌源性内皮细胞。N在 B磷替诺 2007; 25 (9): 1025-1034。

10 Gargett CE, Schwab KE, Zillwood RM等。人子宫内膜上皮祖细胞和间充质干细胞的分离培养。B人工鼻状体 R埃普罗德 2009; 80 (6): 1136-1145。

11 Shi S, Gronthos S. 人骨髓和牙髓中出生后间充质干细胞的血管周围生态位。JB- M颌能研究所 R颌 2003; 18: 694-704。

12 Schwab KE, Gargett CE. 两个血管周细胞标记物的共表达分离来自人子宫内膜的间充质干细胞样细胞。H颌 R埃普罗德 2007; 22 (11): 2903-2911。

13 Crisan M, Yap S, Casteilla L等。多种人体器官中间充质干细胞的血管周围起源。C埃尔 S透射电镜 C埃尔 2008; 3: 301-313。

14 da Silva ML, Caplan AI, Nardi NB. 寻找间充质干细胞的体内同一性。S透射电镜 C埃尔 2008; 26: 2287-2299。

15 Traktuev DO, Merfeld-Clauss S, Li J et al. 多能CD34阳性脂肪基质细胞群共享周围和间充质表面标志物, 位于外周血管位置, 并稳定内皮网络。Circ R颌 2008; 102: 77-85。

16 Stefanska A, Kenyon C, Christian HC等。人肾周细胞产生肾素。K伊德尼 I新台市 2016; 90: 1251-1261。

17 Guimarães-Camboa N, Cattaneo P, Sun Y et al. 多个器官的周细胞在体内不表现为间充质干细胞。C埃尔 S透射电镜 C埃尔 2017; 20: 345-359。

18 Corselli M, Chen CW, Sun B et al. 人动脉和静脉的外膜作为间充质干细胞的来源。S透射电镜 C埃尔 D电动汽车 2012; 21: 1299-1308。

19 de Souza LEB, de Malta TM, Kashima Haddad S et al. 间充质干细胞和周细胞: 它们的相关程度如何? S透射电镜 C埃尔 D电动汽车 2016; 25: 1843-1852。

20 James AW, Zara JN, Zhang X等。血管周围干细胞: 用于骨组织工程的前瞻性纯化的间充质干细胞群。S透射电镜 C埃尔 T兰斯尔 M预计起飞时间 2012; 1: 510-519。

21 Kramann R, Goettsch C, Wongboonsin J等。外膜MSC样细胞是血管平滑肌细胞的祖细胞, 并在慢性肾病中驱动血管钙化。C埃尔 S透射电镜 C埃尔 2016; 19 (5): 628-642。

22 Hindle P, Khan N, Biant L等。颌下脂肪垫作为血管周围干细胞的来源, 具有增加的再生医学的软骨形成潜力。S透射电镜 C埃尔 T兰斯尔 M预计起飞时间 2017; 6 (1): 77-87。

23 Crisan M, Corselli M, Chen WCW等。血管周围细胞用于再生医学。JC埃尔 M颌 M预计起飞时间 2012; 16: 2851-2860。

24 Corselli M, Chin C, Parekh C等。人造血干/祖细胞的血管周围支持。B1004的 2013; 121 (15): 2891至2901年。

25 Zimmerlin L, Donnenberg VS, Rubin JP等。人脂肪干/祖细胞上的间充质标记物。C测压法 2013; 83: 134-140。

26 Vezzani B, Pierantozzi E, Sorrentino V. 并非所有的周细胞都是平等的: 来自人类成人组织的周细胞不同

- 分化特性。S透射电镜 C尼尔 D电动汽车 2016;25: 1549-1558。
- 27 Vezzani B, Pierantozzi E, Sorrentino V. 间充质干细胞: 从血管周围环境到临床应用。H伊费尔 H伊斯替尼格 2018; 7: 11998。
- 28 da Silva ML, Maistro Malta T, Panepucci RA等。培养的人脂肪组织来源的周细胞和间充质基质细胞之间的转录组学比较。G_{Neo}的 D阿塔 2016; 7: 20-25。
- 29 Hardy WR, Moldovan NI, Moldovan L et al. 从人脂肪组织分选的单个血管周细胞中的转录网络揭示了间充质干细胞的层次结构。S透射电镜 C尼尔 2017; 35 (5): 1273-1289。
- 30 Tang W, Zeve D, Suh JM等。白色脂肪祖细胞存在于脂肪脉管系统中。S科学性 2008; 322 (5901): 583-586。
- 31 Feng J, Mantesso A, De Bari C et al. 间充质干细胞的双重起源促进器官生长和修复。P_{Sci} NATL语言 A计算机辅助设计 S_{USA} 2011; 108 (16): 6503-6508。
- 32 赵鹤, 冯杰, Seidel K等人。神经血管束生态位的shh分泌支持成年小鼠切牙中的间充质干细胞稳态。C_{尼尔} S透射电镜 C_{尼尔} 2014; 14 (2): 160-173。
- 33 Dellavalle A, Maroli G, Covarello D等。驻留在出生后骨骼肌中的周细胞分化成肌纤维并产生卫星细胞。N_在 C_{奥莱} 2011;2: 499。
- 34 Krautler NJ, Kana V, Kranich J等。卵泡树突细胞从普遍存在的血管周围前体中出现。C_{尼尔} 2012;150 (1): 194-206。
- 35 Göritz C, Dias DO, Tomilin N等。脊髓瘢痕组织的周细胞起源。S_{Sci} ENCE 2011; 333 (6039): 238-242。
- 36 Dulauroy S, Di Carlo SE, Langa F等。ADAM12 (+) 血管周细胞的谱系示踪和遗传消融确定了急性组织损伤期间促纤维化细胞的主要来源。N_在 M_{预计起飞时间} 2012; 18 (8): 1262-1270。
- 37 Kramann R, Schneider RK, DiRocco DP等。血管周围Gli1+祖细胞是损伤诱导的器官纤维化的关键因素。C_{尼尔} S透射电镜 C_{尼尔} 2015; 16 (1): 51-66。
- 38 Murray IR, Gonzalez ZN, Baily J等。间充质细胞上的 α v整合素严格调节骨骼肌和心肌纤维化。N_在 C_{奥莱} 2017; 8 (1): 1118。
- 39 Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. 来自人骨髓的克隆间充质祖细胞根据分层模型在体外分化。JC_{尼尔} S_{阿塔} 2000; 113 (Pt 7): 1161-1166。
- 40 Guilak F, Lott KE, Awad HA等。人脂肪来源成体干细胞分化潜能的克隆分析。JC_{尼尔} P_{海森} 2006; 206 (1): 229-237。
- 41 Russell KC, Phinney DG, Lacey MR等。用于量化间充质干细胞的三线谱系中的克隆异质性的体外高容量测定揭示了谱系定型的复杂层次结构。S透射电镜 C_{尼尔} 2010; 28 (4): 788-798。
- 42 Manini I, Gulino L, Gava B等。新鲜分离和培养的人间充质干细胞中的多能祖细胞: 脂肪和真皮组织之间的比较。C_{尼尔} T_{阿塔} R_{阿塔} 2011; 344 (1): 85-95。
- 43 Tabit CJ, Slack GC, Fan K等。脂肪移植与脂肪来源的干细胞疗法: 区分适应症, 技术和结果。A_{美国的} P_{阿塔} S_{阿塔} 2012; 36 (3): 704-713。
- 44 Bianchi F, Maioli M, Leonardi E等。一种新的非酶促方法和装置, 通过来自人类脂肪抽吸物的轻微机械力获得高度富含周细胞样元素的脂肪组织衍生物。C_{尼尔} T_{反式}-PLANT 2013; 2: 2063-2077。
- 45 Raffaini M, Tremolada C. 微裂缝和纯化的脂肪组织移植 (Lipogems[®]) 可以在美学和术后愈合中改善正颌手术的效果。C_{尼尔}R4 2014; 2 (4): e1118。
- 46 Cestaro G, De Rosa M, Massa S et al. 括约肌肛门脂肪填充与微碎片脂肪组织治疗大便失禁: 3名患者的初步结果。WIDECHIR INNE TECH MALOINWA-ZYJNE 2015; 10 (2): 337-341。
- 47 Fantasia J, Chen H, Santos Cortes JA. 微裂缝和纯化的脂肪组织 (Lipogems[™]系统) 注射剂用于治疗萎缩性阴道炎。JU_{罗勒} R_{阿塔} 2016; 3 (7): 1073-1075。
- 48 Saibene AM, Pipolo C, Lorusso R等。经鼻内镜微骨折脂肪注入声门功能不全。B-ENT 2015; 11 (3): 229-234。
- 49 Giori A, Tremolada C, Vailati R等。微碎片脂肪移植 (Lipogems[®]) 注射后肛门失禁的功能恢复: 前5例随访2年。C_{尼尔} R4 2015; 3 (2): e1544。
- 50 Tremolada C, Beltrami G, Magri A等。脂肪间充质干细胞和再生脂肪组织移植 (Lipogems[®]) 用于肌肉骨骼再生。E_{马尔} JM_{美国农业部}-LOSKELETAL D_是 2014; 3 (2): 57-67。
- 51 Striano RD, Chen H, Bilbool N等。在连续超声引导下自体微碎片脂肪组织治疗的无反应性膝关节疼痛伴骨关节炎和并发半月板疾病。C_{尼尔}R4 2015; 3 (5): e1690。
- 52 Randelli P, Menon A, Ragone V等。Lipogems产品处理增加人肌腱干细胞的增殖速率而不影响其干性和分化能力。S透射电镜 C_{尼尔} I_{新台币} 2016;2016年4373410。
- 53 Bianchi F, Olivi E, Baldassarre M等。Lipogems[®], 一种新的组织处理模式, 用于增强慢性下肢缺血中的组织修复。C_{尼尔} R4 2014; 2 (6): e1289。
- 54 Benzi R, Marfia G, Bosetti M等。微骨折脂肪抽吸物可能有助于口腔骨和软组织再生: 病例报告。C_{尼尔}R4 2015; 3 (3): e1583。
- 55 Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frize E等。斐济: 一个用于生物图像分析的开源平台。N_在 M_{编制方法} 2012;9 (7): 676-682。
- 56 West CC, Hardy WR, Murray IR等。从人类脂肪组织中前瞻性分离血管周围干细胞 (PSC): 跨越大量不同人口统计学的细胞群体指标。S透射电镜 C_{尼尔} R_{阿塔} T_{阿塔} 2016; 7:47。
- 57 Caplan AI. 间充质干细胞: 改变名称的时候了! S透射电镜 C_{尼尔} T_{兰斯尔} M_{预计起飞时间} 2017; 6 (6): 1445-1451。
- 58 Phinney DG, Pittenger MF. 简要回顾: MSC衍生的外泌体用于无细胞治疗。S透射电镜 C_{尼尔} 2017; 35 (4): 851-858。
- 59 Zimmerlin L, Donnenberg VS, Pfeifer ME等。成人脂肪组织中的基质血管祖细胞。C_{阿塔} A 2010; 77: 22-30。
- 60 Ceserani V, Ferri A, Berenzi A等。微碎片脂肪组织及其衍生的间充质基质细胞的血管生成和抗炎特性。V_{asc} C_{尼尔} 2016; 18: 8-3。
- 61 Mendel TA, Clabough EBD, Kao DS等。源自脂肪来源的干细胞的周细胞可预防视网膜血管病变。PL_{SO} 2013; 8 (5): e691。
- 62 König MA, Canepa DD, Cadosch D等。从脂肪组织直接移植天然周细胞: 一种新的视角来刺激关键尺寸骨缺损的愈合。C_{阿塔} 2016; 18 (1): 41-52。
- 63 West CC, Hardy WR, Murray IR等。前瞻性纯化来自人类脂肪组织的血管周围假定间充质干细胞: 跨大量不同人口统计学的过程优化和细胞群指标。S透射电镜 C_{尼尔} R_{阿塔} T_{阿塔} 2016; 7:47。
- 64 张杰, 杜C, 郭伟等用于软组织工程的脂肪组织衍生的周细胞。C_{马尔} S透射电镜 C_{尼尔} R_{阿塔} T_{阿塔} 2017;12 (6): 513-521。
- 65 Nigro E, Scudiero O, Monaco ML et al. 脂素素在肥胖和肥胖相关疾病中的作用的新见解。B_文 R_{阿塔} I_{新台币} 2014; 2014: 658913。
- 66 Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E. 脂肪组织的内分泌功能: 更新。C_林 E_{诺多林} (O_芳) 2006; 64 (4): 355-365。
- 67 Yang Q, Graham TE, Mody N et al. 血清视黄醇结合蛋白4有助于肥胖和2型糖尿病患者的胰岛素抵抗。N_{谱系} 2005; 436 (7049): 356-362。
- 68 Arend WJ. 疾病中IL-1和IL-1Ra之间的平衡。C_{伊托金} G_{罗恩} F_{演员} R_{电动汽车} 2003; 13 (4-5): 323-340。
- 69 Fasshauer M, Blüher M. Adipokines在健康和疾病方面。T_{阿塔} P_{阿塔} S_{阿塔} 2015;36 (7): 461-470。
- 70 盛杰, 徐..三十年血管生成素研究: 综述与展望。A_{cta} B_{伊希姆} B_{伊费尔} S_在 2016; 48 (5): 399-410。
- 71 Nassiri F, Cusimano MD, Scheithauer BW等。Endoglin (CD105): 回顾其在血管生成和肿瘤诊断, 进展和治疗中的作用。A_{游泳运动员} R_{阿塔} 2011; 31 (6): 2283-2290。
- 72 De Falco S, Gigante B, Persico GM. 胎盘生长因子的结构和功能。T_{阿塔} C_{心肌} M_{预计起飞时间} 2002; 12 (6): 241-246。
- 73 Bussolino F, Di Renzo MF, Ziche M et al. 肝细胞生长因子是一种有效的血管生成因子, 可刺激内皮细胞的运动和生长。JC_{尼尔} B_{人工晶体} 1992;119(3):629-641。
- 74 Liu ZJ, Battinelli E, Sparger KA, et al. 关于血小板血管生成生长因子对正常血管发育调节作用的新见解。论文发表于: ASH第59届年会和博览会, 亚特兰大, 2017年。

- 75 Bruns AF, Smith J, Yuldasheva N 等。胰岛素样生长因子结合蛋白2 (igfbp2) : 血管生成的正调节因子? *BMJ H* 2017; 103: A121。
- 76 Bodnar RJ。趋化因子调节伤口愈合过程中的血管生成。 *Adv W* 2015; 4 (11) : 641-650。
- 77 Yates-Binder CC, Rodgers M, Jaynes J等。IP-10 (CXCL10) 衍生的肽抑制血管生成。 *PLoS* 2012; 7 (7) : e40812。
- 78 Cao Y, Ji RW, Davidson D et al。人血管抑制素的Kringle域。表征内皮细胞的抗增殖活性。 *JB* 1996; 271 (46) : 29461-29467。
- 79 Volpert OV, Tolsma SS, Pellerin S等。血小板反应蛋白-2抑制血管生成。 *B* 1995; 217 (1) : 326-332。
- 80 O' Rahilly S。GDF15-从生物标志物到抑制性激素。 *C* 2017; 26 (6) : 807-808。
- 81 Calandra T, Roger T。巨噬细胞迁移抑制因子: 先天免疫的调节因子。 *N* 2003; 3: 791-800。
- 82 Müller M, Carter S, Hofer MJ等。趋化因子受体CXCR3及其配体CXCL9, CXCL10和CXCL11在神经免疫中是一个冲突和难题的故事。 *NEUROPATHOL APPL NEUROBIOL* 2010; 36 (5) : 368-387。
- 83 Comerford I, Harata-Lee Y, Bunting MD等。自适应免疫系统中CCR7 / CCL19 / CCL21趋化因子轴的无数功能和复杂调节。 *C* 2013; 24 (3) : 269-283。
- 84 Appay V, Rowland-Jones SL。RANTES: 一种多功能且有争议的趋化因子。 *T* 2001; 22 (2) : 83-87。
- 85 Schonbeck U, Libby P。CD40 / CD154受体/配体dyad。 *C* 2001; 58 (1) : 4-43。
- 86 Crewe C, An YA, Scherer PE。脂肪组织功能障碍的不祥三联征: 炎症, 纤维化和血管生成受损。 *JC* 2017; 127 (1) : 74-82。
- 87 Suffee N, Richard B, Hlawaty H 等人。趋化因子RANTES / CCL5的血管生成特性。 *B* 2011; 39 (6) : 1649-1653。
- 88 Francescone R, Ngernyuan N, Yan W et al。肿瘤衍生的壁细胞样细胞与内皮细胞协调: YKL-40在壁细胞介导的血管生成中的作用。 *O* 2014; 33: 2110-2122。
- 89 Murray IR, Peault B。问答: 什么是间充质干细胞, 为什么它很重要? *BMC B* 2015; 13:99。
- 90 范登Brink Sc, Saig-F, V.ReTyy A 等。单细胞测序揭示了组织亚群中解离诱导的基因表达。 *N* 2017; 14: 935-936。
- 91 Garcia-Contreras M, Messaggio F, Jimenez O等。通过非酶和酶方法处理的人脂肪组织的外来体含量的差异。 *C* 2014; 3 (1) : e1423。