

# 人类的代谢组学变化 非酶法微加工后脂肪组织衍生产品

m. 加西亚 • 孔特雷拉斯<sup>1,2</sup>, f. messaggio<sup>1,2</sup>, aj mendez<sup>1</sup>和 c. ricordi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>美国佛罗里达州迈阿密市米勒医学院迈阿密大学糖尿病研究所

<sup>2</sup>意大利巴勒莫地中海基金会

**抽象。**—目的：在这项研究中，我们评估了冷冻保存的脂蛋白<sup>®</sup>组织产品和微粉碎之前的初始脂肪抽吸物的代谢组学谱，以确定可能由非酶处理或冷冻保存方法引起的代谢产物改变。

**材料与方**：人体锂

将 poaspirate 样品 (n = 10) 分为两等份，其中一个未处理，另一个通过 Lipogems<sup>®</sup>设备处理。未处理的脂肪抽吸物和脂蛋白<sup>®</sup>处理的组织存储在 -80° C 新鲜冷冻 (每组 N = 3) 或存在 0.5 M 二甲基亚砜 (DMSO) (每组 N = 7) 的情况下。对这些样品进行了全局非靶向代谢分析。

**结果**：在碳水化合物和核苷酸代谢方面观察到差异。这些改变翻译成长链和多不饱和脂肪酸水平以及氨基酸代谢产物，显示出不同的趋势。当脂蛋白<sup>®</sup>和脂类阿司匹林组织产品用 DMSO 冷冻保存时，脂蛋白<sup>®</sup>产物中的氨基酸倾向于增加。然而，在不存在 DMSO 氨基酸及其分解代谢物的情况下，脂肪组织<sup>®</sup>脂肪组织产品的含量趋于下降。

**结论**：与最初的脂肪抽吸组织材料相比，微破裂的人类脂肪组织已被证明可以提供更有效的成人基质细胞来源。根据我们的发现，这些可能是由于脂肪抽吸组织产品的代谢谱变化所致。

**关键词**

脂肪组织，脂溶性，非酶分离，代谢组学。

## 介绍

已知人类脂肪组织是人类脂肪来源的间充质基质细胞 (hADSCs)<sup>1</sup> 的重要储存库。人 ADSC

具有较强的旁分泌潜能<sup>2-4</sup>，有利于天然组织的再生和修复，使其成为基于细胞再生的疗法<sup>5,6,7</sup>的合适选择。

在间充质基质细胞来源中，脂肪抽吸的脂肪组织是一种理想的来源，因为与其他来源相比，其相对丰富且易于获取<sup>8</sup>。脂肪组织也可以储存起来，然后在将来用于临床应用<sup>8,9</sup>。冷冻保存可以添加或不添加冷冻保护剂，例如二甲基亚砜 (DMSO)<sup>10</sup>。为了避免与酶处理的脂肪组织产品及其离体扩增的 hADSC 相关的某些监管复杂性和成本，已经开发了新型的最小限度操作的脂肪组织产品<sup>11,12</sup>。机械方法为使用脂肪组织加工酶提供了低成本，快速和简单的替代方法。用 Lipogems<sup>®</sup>系统制备的微片段脂肪抽吸物富含 hADSCs 和周细胞<sup>13,14</sup>，并已在临床上成功用于多种再生医学应用<sup>15-18</sup>。

在本研究中，我们研究了从脂肪抽吸物中微粉碎脂肪组织的效果以及在冷冻保存程序中使用 DMSO 的作用对各个代谢组学谱的影响。

## 材料和方法

### 道德声明

这项研究得到了迈阿密大学的机构审查委员会 (IRB) 的批准。在事先知情同意书签名的情况下，将受试者纳入 Top Body Sculpting Rejuvenation Center (美国佛罗里达州韦斯顿)。所有标本均对 HIV (人类免疫缺陷病毒 1 和 2)，HCV (丙型肝炎病毒)，HBV (乙型肝炎病毒) 和巨细胞病毒呈阴性。

通讯作者：卡米洛 • 里科迪 (MD) 电子邮件：怪兽

3249

### 样品采集与处理

在局部麻醉下通过选择性抽脂程序获得了 10 个人体脂肪组织样品 (表 I)。脂肪油制剂分为两等份, 其中一种未经处理, 另一种由 Lipogems<sup>12</sup> 系统通过 Lipogems<sup>®</sup> 系统处理, 如前所述<sup>12</sup>, 这是一种非酶处理方法, 分为两步组织簇减少, 包括乳化步骤以减少油和血残留。未经处理的脂肪抽吸物和脂蛋白<sup>®</sup>处理的组织存储在 -80°C 新鲜冷冻 (每组 N = 3) 或存在于 alpha-MEM 中的 0.5 M 二甲基亚砜 (DMSO) (每组 N = 7) 中补充有 10% 的胎牛血清 (FBS)。

## 代谢组学分析

### 代谢物分析

根据公开的方法<sup>19,20</sup>, 由 Metabolon (Durham, NC, USA) 对存储在 0.5M DMSO 缺失或新鲜冷冻组织中的脂肪抽吸物和脂蛋白<sup>®</sup>组织进行非靶向代谢组学分析。

### 样品制备

样品仅解冻一次, 并使用汉密尔顿公司 (美国内华达州里诺) 的自动 MicroLab STAR<sup>®</sup> 系统进行制备。为了质量控制 (QC) 的目的, 在提取过程的第一步之前添加了几种回收标准。为了去除蛋白质, 将与蛋白质结合的小分子解离或截留在沉淀的蛋白质基质中, 并回收化学上多样化的代谢物, 在剧烈振荡下用甲醇沉淀蛋白质 2 分钟 (Glen Mills GenoGrinder 2000, OPS Diagnostics, NJ,

表 I. 主题信息。

样品	年龄	性别	高度 (英尺, 英寸)	重量 (磅)
捐助者 1	26	女	5'3"	148
捐助者 2	26	女	5'3"	145
捐助者 3	29	女	5'1"	132
捐助者 4	33	女	5'0"	151.6
捐助者 5	53	女	5'5"	234
捐助者 6	33	女	5'7"	156.2
捐助者 7	42	女	5'5"	251
捐助者 8	25	女	4'1"	130.2
捐助者 9	30	女	5'4"	120
供体 10	21	女	5'4"	120

美国), 然后离心。将得到的提取样品干燥, 然后在与以下每种方法兼容的溶剂中重构。样品分为五部分: 两部分分别通过正离子模式电喷雾电离 (ESI) 的两种独立的反相 (RP) / UPLC-MS / MS 方法进行分析, 另一部分用于负离子模式的 RP / UPLC-MS / MS 分析 ESI, 一种用于通过带有负离子模式 ESI 的 HILIC / UPLC-MS / MS 分析, 另一种样品保留用于备份。将样品短暂放置在 TurboVap<sup>®</sup> (Zymark) 上去除有机溶剂。在准备进行分析之前, 将样品提取物在氮气下保存过夜。

### 超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS / MS)

所有方法均使用沃特世 ACQUITY 超高效液相色谱 (UPLC) 和 Thermo Scientific Q-Exactive 高分辨率/精确质谱仪, 并与加热的电喷雾电离 (HESI-II) 源和以 35,000 质量分辨率运行的 Orbitrap 质量分析仪连接。将样品提取物干燥, 然后在与四种方法均兼容的溶剂中重构。每种重构溶剂均包含一系列固定浓度的标准品, 以确保进样和色谱图的一致性。使用酸性正离子条件对一份等分试样进行分析, 对色谱图进行了色谱优化, 以得到更具亲水性的化合物。在该方法中, 使用水和甲醇 (含 0.05% 的全氟戊酸 (PFPA) 和 0.1% 的甲酸 (FA)) 从 C18 柱 (Waters UPLC BEH C18-2.1x100 mm, 1.7 μm) 中梯度洗脱。还使用酸性正离子条件分析了另一份等分试样; 但是, 它已针对更多疏水性化合物进行了色谱优化。在该方法中, 使用甲醇, 乙腈, 水, 0.05% PFPA 和 0.01% FA 从相同的上述 C18 色谱柱中对洗脱液进行梯度洗脱, 并以较高的有机含量运行。使用基本的负离子优化条件, 使用单独的专用 C18 色谱柱分析另一等分试样。使用甲醇和水, 但使用 pH 值为 8.5 的 6.5 mM 碳酸氢铵, 从色谱柱中梯度洗脱基本提取物。从 HILIC 色谱柱上洗脱后, 通过负电离分析第四等分试样 (Waters UPLC BEH Amide 2.1x150 mm, 1.7 μm)。使用由水和乙腈组成的梯度

用 10 mM 甲酸铵, pH 10.8。MS 分析使用动态排除在 MS 和依赖数据的 MS<sub>n</sub> 扫描之间进行交替。两种方法的扫描范围略有不同, 但覆盖范围为 70–1000 m/z。原始数据文件按如下所述进行归档和提取。

### 数据提取和化合物鉴定

使用 Metabolon 的硬件和软件提取原始数据, 进行峰鉴定和质量控制。这些系统建立在利用 Microsoft NET 技术的 Web 服务平台上, 该平台在高性能应用服务器和群集中的光纤通道存储阵列上运行, 以提供主动的故障转移和负载平衡。通过与纯化标准品或经常性未知实体的文库条目进行比较来鉴定化合物。Metabolon 会根据经过认证的标准物维护一个文库, 该标准品包含文库中存在的所有分子的保留时间/指数 (RI), 质荷比 (m/z) 和色谱数据 (包括 MS / MS 光谱数据)。此外, 生化鉴定基于以下三个标准: 拟议鉴定的狭窄 RI 窗口内的保留指数, 与文库的精确质量匹配  $\pm 10$  ppm, 以及实验数据与真实标准品之间的 MS / MS 正反评分。MS / MS 分数基于实验光谱中存在的离子与库光谱中存在的离子的比较。使用曲线下面积量化峰。对于跨越多天的研究, 执行了数据归一化步骤以校正由仪器日间调整差异引起的变化。本质上, 通过将中位数注册为等于 - (1.00) 并按比例归一化每个数据点, 可以在运行日区块中对每种化合物进行校正。

### 数据分析

使用 Breiman<sup>21</sup> 开发的随机森林 (RF) 分析来详细说明数据。对于给定的决策树, 选择具有标识真实类别信息的数据的随机子集来构建树 (“引导样本” 或 “训练集”), 然后选择其余数据 “袋外” (OOB) 变量沿树向下传递以获得每个样本的类别预测。通过计算整个森林中 OOB 变量的类别预测频率 (“投票”), 可以确定每个样本的最终分类。确定哪些变量

(生物化学制品) 对分类的贡献最大, 将计算 “可变重要性” 度量。我们使用 “平均降低准确性” (MDA) 作为该指标。通过随机排列变量, 在树中运行观察值, 然后重新评估预测精度来确定 MDA。

对 409 个对数转换的代谢物进行了主成分分析 (PCA), 以提供数据集中变化的高级概览。通过使用标准化评分系数来计算组件分数。

为了可视化重要代谢物的相互作用网络和生物学途径, 我们使用了 Cytoscape (<http://cytoscape.org>), 一个开源软件平台<sup>22</sup>。

### 统计分析

使用 “R” 版本 2.14 (<http://cran.r-project.org/>) 进行对日志转换数据的统计分析, 该版本是免费提供的开源软件包。

在对数转换和估算缺失值 (如果有) 的情况下, 使用每种化合物的最小观察值, 将韦尔奇的两个样本 ttest 用于鉴定实验组之间存在显著差异的生化试剂。通过使用 q 值估计错误发现率 (FDR) 进行多次比较。当 p 值  $\leq 0.05$  时, 生化试剂被认为具有统计学显著性; 当接近 0.05  $< p$  值  $< 0.10$  时, 被认为具有趋势变化。

## 结果

### 代谢数据概述

根据数据采集和管理, 鉴定了 409 种化合物 (称为生化试剂)。在对数变换和低于检测水平 (如果有) 的情况下, 以每种化合物的最小观察值进行插补后, 使用韦尔奇的两样本 t 检验来鉴定在没有 DMSO 和 DMSO 组之间存在显著差异的生化试剂。在没有 DMSO 的 Lipoaspirate 与没有 DMSO 的 Lipoaspirate 中, 无 DMSO 组和 DMSO 组之间的 201 种生化试剂水平显著不同 (p 值  $< 0.05$ ), 增加了 173 种生化试剂, 减少了 28 种。脂蛋白\*中无 DMSO 和脂蛋白\*DMSO 242 生化试剂在无 DMSO 组和 DMSO 组之间有显著差异 (p  $< 0.05$ ), 增加了 209 种生化试剂

表二。汇总了 409 种已命名的生物化学物质, 这些生物由脂肪微破裂诱导的生物化学变化的摘要。

统计比较		
韦尔奇的两样本 t 检验	没有 DMSO Lipogems®与 DMSO 脂蛋白®	没有 DMSO 利普沙特 vs. DMSO 脂质体
总生化试剂 $p < 0.05$ 生化产品 (↑↓)	242	201
总生化物质 $0.05 < p < 0.10$ 生化产品 (↑↓)	33   209 29	28   173 40
配对 t 检验	DMSO Lipogems®与 DMSO Lipoaspirate	没有 DMSO Lipogems®与没有 DMSO Lipoaspirate
总生化试剂 $p < 0.05$ 生化产品 (↑↓)	246	112
总生化物质 $0.05 < p < 0.10$ 生化产品 (↑↓)	95   151 34	1   111 25
	18   16	2   23

和 33 减少。此外, 在这些分析中, 有相似数量的生化试剂显示出显著的趋势 ( $0.05 < p$  值  $< 0.10$ ) (表 II)。配对 t 检验用于鉴定脂类阿司匹林和脂蛋白®组之间的显著差异。利培沙酮 DMSO 与利培木®DMSO 相比, 利培沙酮和利培木®组之间 246 种生化试剂的水平有所不同 ( $p$  值  $< 0.05$ ), 增加了 95 种生化试剂, 减少了 151 种。利培阿匹特组和利莫昔单抗®组中, DMSO 和 DM 中没有 DMSO 112 的生化试剂有显著差异 ( $p$  值  $< 0.05$ ), 增加 1 个生化和 111 个下降。另外, 有相似数量的生化试剂, 在这些分析中达到了显著的趋势值 ( $0.05 < p$ -值  $< 0.10$ ) (表 II)。

在主成分分析 (PCA) 中 (该值赋予每种生化试剂一个值, 以显示对成分评分的贡献) (图 1

A) 组件 1 与 DMSO 的存在与否相关, 表明这是数据集中变化的最大来源。组分 2 在 Lipoaspirate 和 Lipogems®之间分离, 这可能反映了由于微压裂过程而引起的差异。在评估样品相似性的层次聚类分析 (HCA) 中 (图 1 C), 样品趋向于很好地聚类, 树状图中的顶级拆分将 DMSO 和新鲜冷冻样品之间分开。PCA 上样图 (图 1B) 将 PCA 中的生化试剂分离基团分开。脂质倾向于

在装填区中向北移动, 这可能表明脂肪抽吸物样品富集。血管生态位 (和相关的间充质干细胞) 的富集可能导致样品中脂肪细胞的丢失, 这可能与脂质代谢产物的下降相一致。但是, 脂质倾向于在组分 1 中向右移动, 这可能反映了 DMSO 作为去污剂的功能。几种异种生物和核苷酸代谢产物 (腺嘌呤和尿苷) 也显示出与加工相关的变化; 还观察到碳水化合物代谢物 (例如 3-磷酸甘油酸酯) 的变化。

### 碳水化合物代谢

葡萄糖可用于支持多种生理过程, 包括能量产生, 脂肪酸合成, 蛋白质糖基化和核苷酸生物发生。在没有 DMSO 的新鲜冷冻脂蛋白®vs 中揭示了代谢组学谱。脂肪油酸酯, 葡萄糖和相关产品 (例如 3-磷酸甘油酸酯, 磷酸烯醇丙酮酸) 的含量下降, 这可能意味着使用需求量很大。然而, 糖酵解终产物丙酮酸和乳酸没有显著变化, 但确实显示出非显著下降。在 DMSO 样品 Lipogems®vs 中也观察到类似的表型。脂质体然而, 还发现随着丙酮酸和乳酸的增加, 葡萄糖可利用性增加 (葡萄糖, 果糖和甘露醇/山梨醇的等压线增加) 的迹象, 这可能表明能量需求发生了变化。NAD<sup>+</sup>和相关代谢物 (例如 1-甲基烟酰胺,



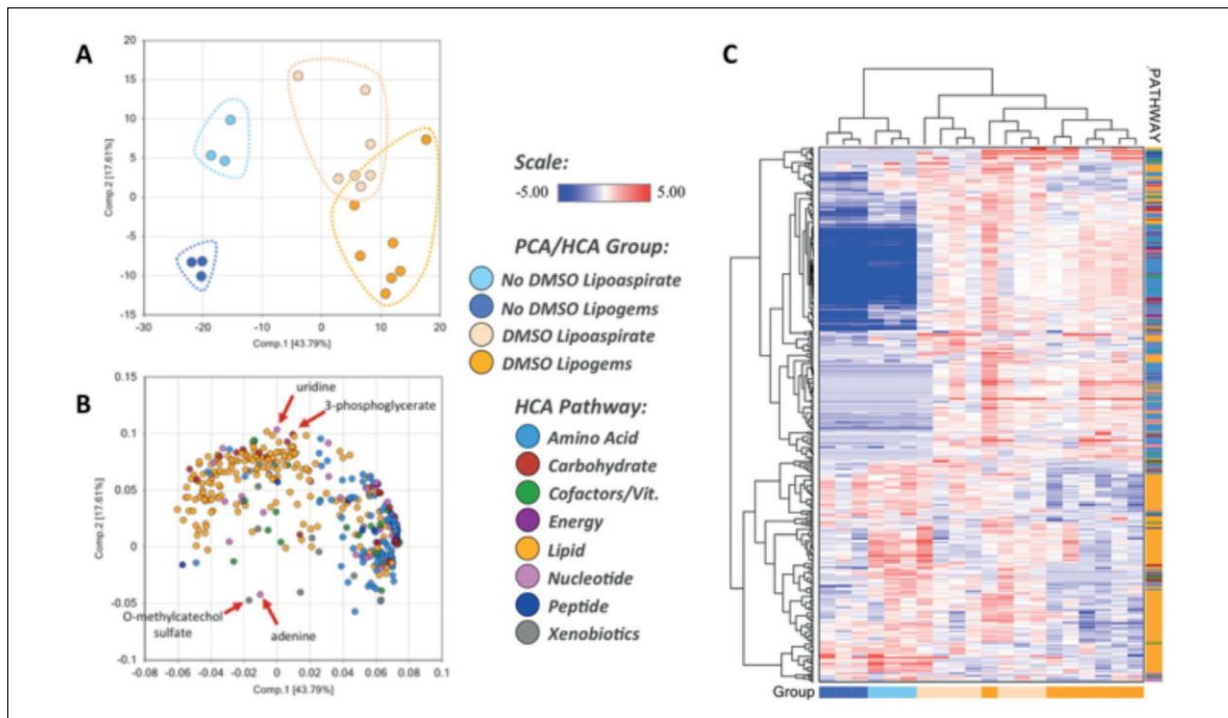


图 1. 代谢组学结果的统计分析，分离了脂肪阿司匹林和脂蛋白<sup>®</sup>以及 DMSO 和未经 DMSO 处理的样品。(A) 主成分分析 (PCA) 在针对前两个主成分进行绘图时将样品分离。(B) PCA 载荷图将 PCA 中的组分分开 (C) 层次聚类分析 (HCA) 将 DMSO 和未经 DMSO 处理的样品之间的样品分开。

N1-甲基-2-吡啶基-5-羧酰胺) 在 DMSO 中降低，而在 DMSO 中则没有，Lipogems<sup>®</sup>vs. 脂肪油酸酯的比较，与糖酵解使用的增加一致 (图 2)。

### 脂质代谢

脂肪酸是线粒体氧化和细胞 ATP 产生的重要能源 (除了是磷脂和储存脂质的前体)。脂肪<sup>®</sup>中的长链脂肪酸 (如棕榈酸酯，棕榈油酸酯，玛格丽酸酯) 和多不饱和脂肪酸 (如亚油酸酯，亚麻酸) 倾向于下降，而脂脂质体 (DMSO 和非 DMSO 新鲜冷冻组织) 则有所下降。用于支持能量 (或生物合成需求)。长链脂肪酸必须与肉碱结合才能有效地穿过线粒体膜。酰基肉碱也趋于减少，尽管并非所有观察到的变化都达到了显著水平，这可能表明脂质氧化的变化。但是，酮体 3-羟基丁酸酯 (BHBA) 并未发生显著变化-奇怪的是，未经过 DMSO 处理的样品中未观察到酮体，这可能表明 DMSO 的使用有所改变 (或

摄取/生成) 酮体。复杂的脂质 (例如 1,2-二棕榈酰-GPC)，缩醛磷脂 (例如 1-(1-烯基-棕榈酰)-2-油酰基-GPE)，鞘脂 (例如，N-棕榈酰-鞘氨醇) 和神经酰胺也倾向于减少 DMSO (后期处理前)。No DMSO (Lipogems<sup>®</sup>vs. Lipoaspirate) 中的许多此类类别的细微下降均未达到显著水平 (与 DMSO 处理的比较相比，这可能反映了这些比较中的功效降低) (图 3)。

### TCA 周期

碳可以从多种来源进入 TCA 循环，包括碳水化合物和脂质 (通过将乙酰辅酶 A 转化为柠檬酸盐)，谷氨酰胺 (以  $\alpha$ -酮戊二酸形式输入) 和支链氨基酸 (以柠檬酸和琥珀酰形式输入)。CoA)。没有 DMSO 的新鲜冷冻食品 (Lipogems<sup>®</sup>与 Lipoaspirate) 中柠檬酸的下降可能与乙酰 CoA 需求增加 (或可能限制了糖酵解的投入) 相一致，苹果酸也下降。DMSO (Lipogems<sup>®</sup>vs. Lipoaspirate) 没有显示出类似的趋势；然而，乌头酸 [顺式或反式] 的增加可能与能量需求的下降相一致 (这也反映在糖酵解代谢产物中) (图 4)。

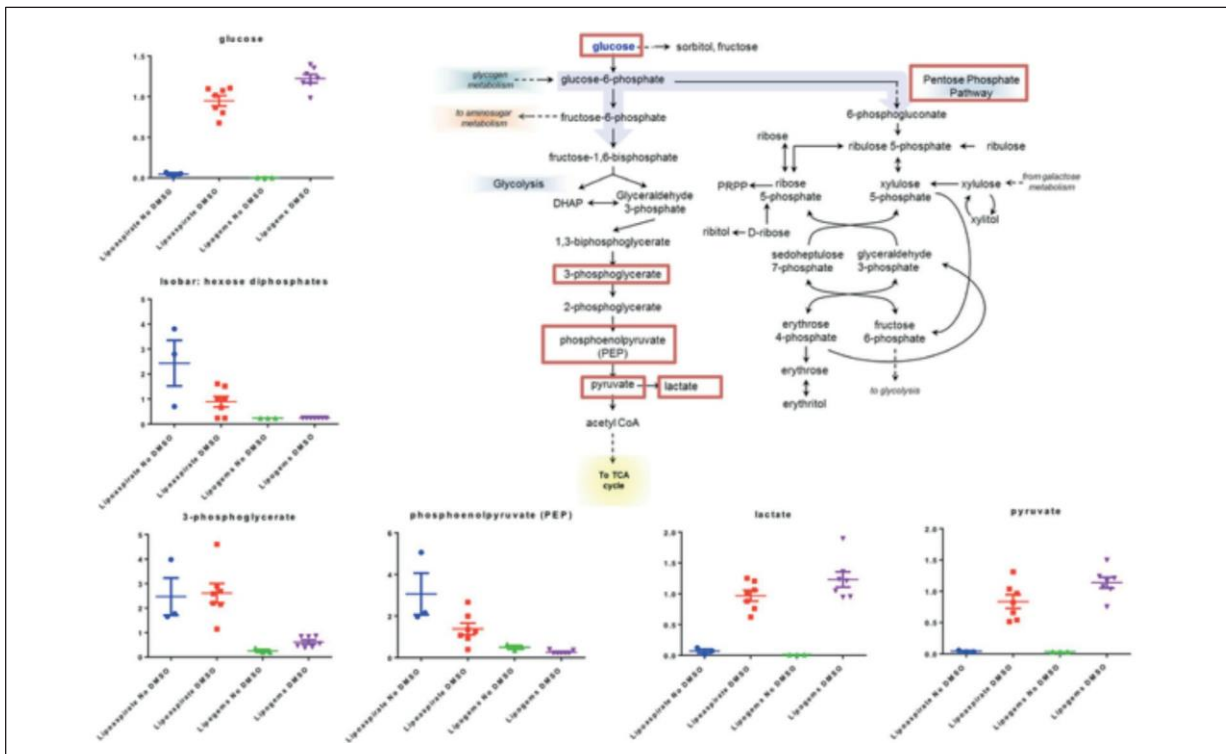


图 2. 碳水化合物代谢。与非微裂脂肪酯脂肪组织相比，微裂脂肪组织脂蛋白®样品中糖酵解的使用增加。葡萄糖的 y 轴以对数刻度绘制，以更好地在方框图中显示种群分布。

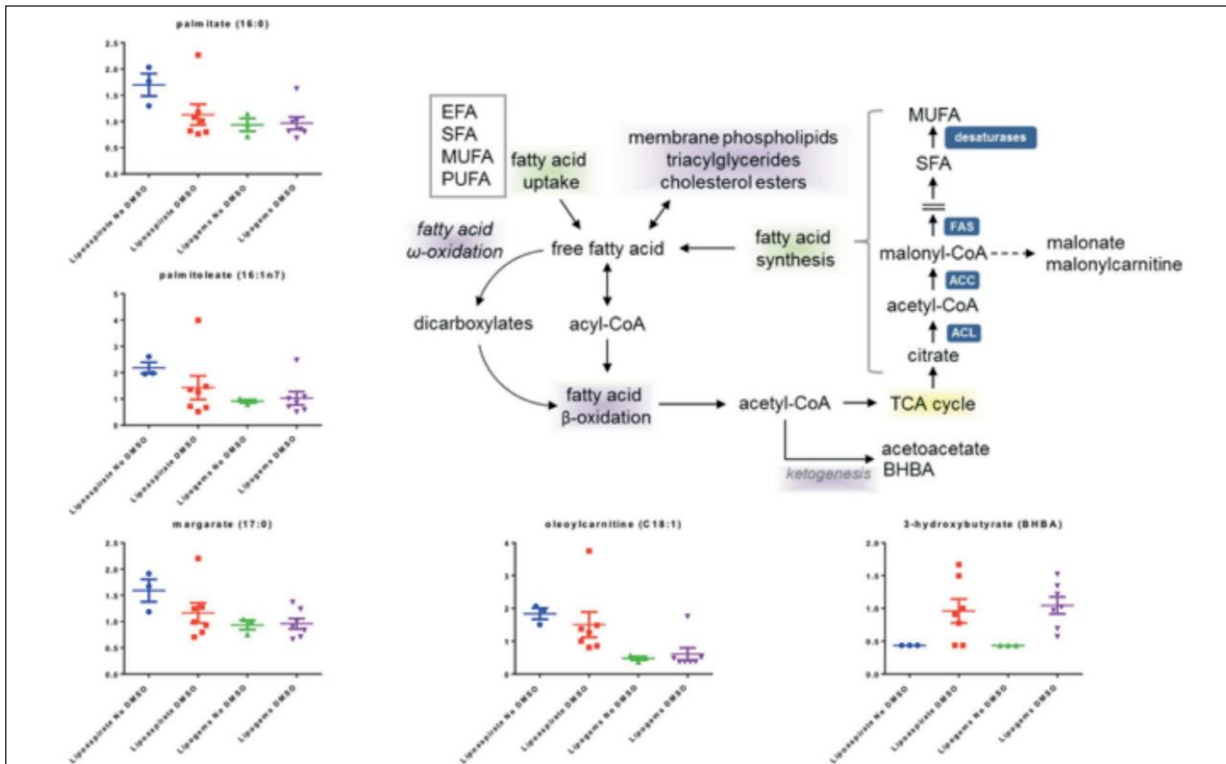


图 3. 脂质代谢。与非微裂脂类脂肪组织相比，微裂脂类组织脂类样品中的脂肪酸含量下降。

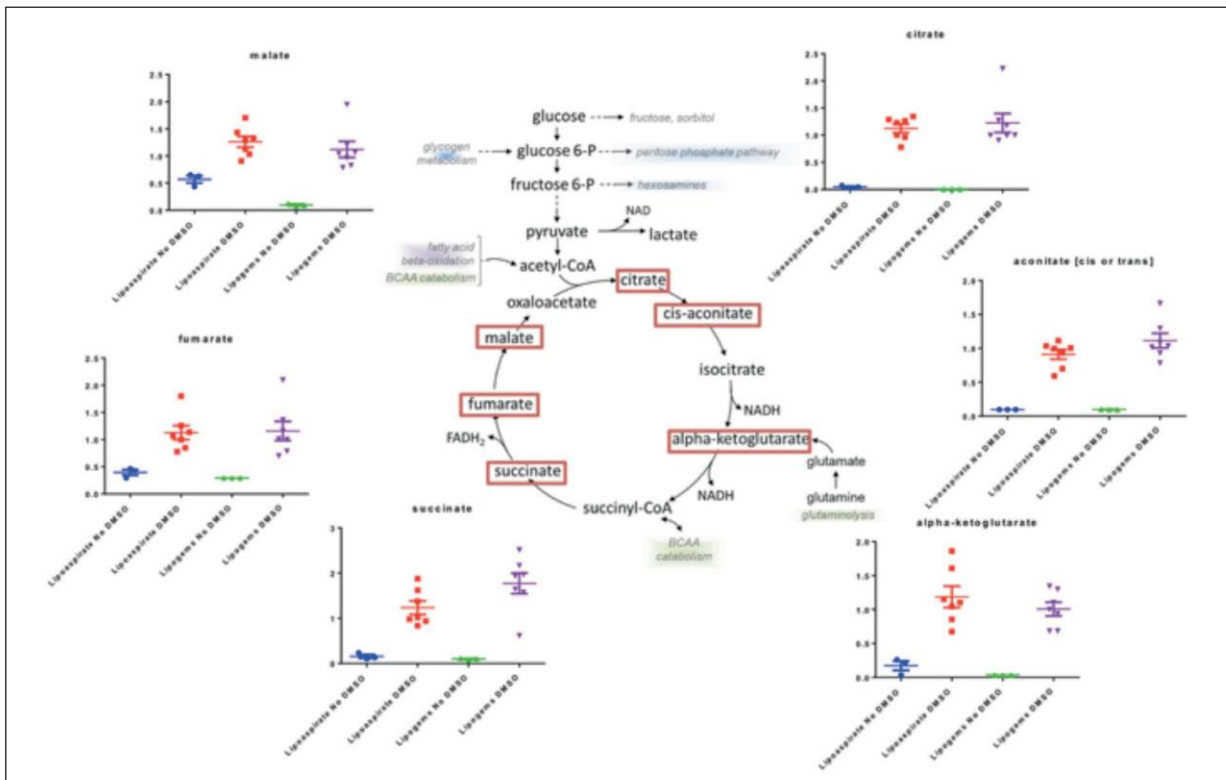


图 4. TCA 周期。将柠檬酸盐的 y 轴与对数刻度作图，以更好地显示人口分布。

### 氨基酸代谢/利用率的变化

在 DMSO 处理和非 DMSO 新鲜冷冻比较中，氨基酸代谢物趋于显示出不同的趋势。在用 DMSO 处理的比较中 (DMSO, Lipogems® 与 Lipoaspirate)，氨基酸 (例如 Gly, Ser, Ala, Glu, Gln, His) 及其分解代谢物趋于增加。但是，在非 DMSO 新鲜冷冻比较中 (没有 DMSO, Lipogems® 与 Lipoaspirate 的比较)，氨基酸及其分解代谢物趋于下降。一起考虑时，氨基酸代谢产物的变化可以反映生物合成需求的差异，以及与上述能量需求下降相关的模式 (表 III)。

### 胆汁酸

一级和二级胆汁酸倾向于在 DMSO 中增加 (Lipogems® 与 Lipoaspirate)；有趣的是，这些生化试剂低于非 DMSO 新鲜冷冻样品的检测阈值。已显示 DMSO 可增加膜通透性，从而有助于胆汁酸的转运 (或可能在加工过程中增强从细胞中的提取)。

### 核苷酸代谢

嘌呤分解代谢产物 (例如次黄嘌呤, 黄嘌呤) 的下降可能表明核苷酸需求发生变化 (无 DMSO, Lipogems® 与 Lipoaspirate)；腺嘌呤也升高, 腺苷无显著增加 (而 AMP 则有细微, 无显著下降), 与需求增加相一致。嘧啶代谢产物显示出相似的变化, 其中奥罗替丁, 尿苷和尿嘧啶的下降与需求增加相一致。核苷酸可用性的下降可能反映了转录用途的增加 (例如, 应激反应途径的激活) 或增殖需求。

### 讨论区

间充质基质细胞 (MSC) 具有体外分化为多种细胞类型的能力, 并具有旁分泌特性, 可协助组织再生和修复, 这使其成为再生医学应用的极大兴趣<sup>1,5</sup>。

表 III。氨基酸显示出不同的趋势。红色和绿色阴影单元格表示  $p \leq 0.05$  (红色表示该比较的平均值明显较高; 绿色值明显较低)。浅红色和浅绿色阴影单元格表示  $0.05 < p < 0.10$  (浅红色表示该比较的平均值较高; 浅绿色表示较低的趋势)。

通路	生化名称	二甲基亚砜 脂蛋白 二甲基亚砜 脂质体	没有 DMSO 脂蛋白无 DMSO 脂质体	没有 DMSO 脂肪酸酯 DMSO 脂质体	没有 DMSO 脂类 DMSO 脂蛋白
甘氨酸, 丝氨酸 和苏氨酸 代谢	G 甘氨酸		0.34	0.17	
	N-乙酰甘氨酸	1.70	0.93	0.68	0.42
	二甲基甘氨酸		1.00		
	甜菜碱		0.36	0.16	
	丝氨酸		0.37		
	N-乙酰丝氨酸	0.97	0.45	0.82	
	苏氨酸	1.34	0.30		
	N-乙酰苏氨酸	1.49	0.69	0.27	
丙氨酸和 天冬氨酸 代谢	丙氨酸	1.28	0.28		
	N-乙酰丙氨酸	0.99	0.82	0.49	0.40
	天冬氨酸	1.26	0.53		
	N-乙酰天门冬氨酸 (NAA)	1.39	0.56	0.70	0.51
	天冬酰胺	1.29	0.24		0.03
	N-乙酰天冬酰胺	1.42	1.00	0.69	0.51
谷氨酸 代谢	谷氨酸		0.22		
	谷氨酰胺	1.38	0.15	0.03	0.00
	N-乙酰谷氨酸	0.62	0.80	1.02	1.11
	N-乙酰谷氨酰胺	1.59	1.00	0.53	
	4-羟基谷氨酸	1.49	1.00	0.75	0.53
	谷氨酸, $\gamma$ -甲基酯	1.06	1.00	0.58	
	焦谷氨酰胺*	1.36	0.22	0.57	
	$\beta$ -瓜氨酸谷氨酸	0.43	0.32	0.66	
组氨酸 代谢	组氨酸	1.46	0.19	0.11	
	1-甲基组氨酸		1.00	0.52	0.3
	3-甲基组氨酸	1.51	1.00		
	N-乙酰组氨酸	1.41	1.00	0.79	
	乙内酰脲 5-丙酸	1.51	1.00		
	反尿酸盐	1.23	0.84	0.36	
	丙酸咪唑	1.32	1.00		
	乳酸咪唑	1.42	0.83	0.85	
	肌肽	1.54	1.00		
	组胺	0.56	0.91	0.40	0.58
	1-甲基咪唑乙酸酯	0.77	0.32	0.51	
	4-咪唑乙酸酯	0.44	0.16	0.66	0.24
赖氨酸代谢	赖氨酸	1.32	0.38		
	N6, N6, N6-三甲基赖氨酸	1.61	0.84	0.04	0.02
	5-羟赖氨酸		1.00		
	5-(半乳糖基羟基)-L-赖氨酸	1.18	0.92		
	2-氨基己二酸酯	1.27	0.57		
	戊二酸 (戊二酸)	1.30	1.16		
	哌考特	1.06	0.66	0.64	
	6-氧哌啶-2-羧酸盐	1.45	1.00	0.58	0.42
苯丙氨酸和 酪氨酸 代谢	苯丙氨酸		0.34		
	N-乙酰基苯丙氨酸	1.48		0.78	0.54
	酪氨酸		0.34		
	N-乙酰酪氨酸	1.24	1.00		
	3-(4-羟苯基) 乳酸	1.35	1.00		
	硫酸苯酚	0.84	0.19	0.62	
	对甲酚硫酸盐	0.98	0.43	0.20	
	N-乙酰基苯丙氨酸	1.21	1.00		
	1.38	1.00	0.44		

继续



非酶法微分解后人类脂肪组织衍生生产物的代谢组学变化

表 III。氨基酸显示出不同的趋势。红色和绿色阴影单元格表示  $p \leq 0.05$  (红色表示该比较的平均值明显较高; 绿色值明显较低)。浅红色和浅绿色阴影单元格表示  $0.05 < p < 0.10$  (浅红色表示该比较的平均值较高; 浅绿色表示较低的趋势)。

通路	生化名称	二甲基亚砜 脂蛋白 二甲基亚砜 脂质体	没有 DMSO 脂蛋白无 DMSO 脂质体	没有 DMSO 脂肪油酸酯 DMSO 脂质体	没有 DMSO 脂类 DMSO 脂蛋白
色氨酸 代谢	色氨酸	1.36	0.23	0.14	
	3-硫酸吲哚酚	0.96	0.72	0.65	0.42
	淫荡的	1.57	1.00	0.48	
	犬尿氨酸	1.14	0.44	0.27	
	尿酸	1.41	1.00	0.75	
	5-羟基吲哚乙酸酯	1.66	1.00	0.68	
	C-糖基色氨酸		1.00		0.49
亮氨酸 和缬氨酸 代谢	亮氨酸		0.36	0.13	
	N-乙酰亮氨酸	1.82	1.00	0.96	0.54
	4-氧-2-戊酸 4-甲酯	0.77	0.83		
	异戊酰甘氨酸	1.60	1.00	0.25	
	异戊基肉碱 (C5)	0.31	0.15	0.67	0.52
	$\beta$ -羟基异戊酸酯	1.18	1.00		
	3-甲基谷氨酸		1.00	0.79	0.54
	异亮氨酸	1.36	0.40		
	N-乙酰异亮氨酸		1.00		
	3-氧-2-甲基戊酸酯	0.69	0.94		0.59
	$\alpha$ -羟基异戊酸酯	1.13	1.00		0.41
	2-甲基丁酰基肉碱 (C5)	0.98	1.00	0.78	0.84
	2-甲基丁酰甘氨酸	1.38	1.00		
	丙二酸乙酯	1.57	1.00	0.74	0.47
	琥珀酸甲酯		1.02		
缬氨酸	1.34	0.18			
异丁酰肉碱 (C4)		0.68			
3-羟基异丁酸酯	1.64	1.00	0.80	0.52	
蛋氨酸 半胱氨酸, SAM 和牛磺酸 代谢	蛋氨酸	1.28	0.54		
	N-乙酰蛋氨酸	0.65	0.63	0.69	0.69
	蛋氨酸砒		1.00		
	蛋氨酸亚砒	1.40	0.76		
	半胱氨酸		1.00		
	半胱氨酸		0.12		
	S-甲基半胱氨酸	0.94	0.85		
	硫酸半胱氨酸	1.81	1.00		
	胱氨酸	1.64	0.78		
	半胱氨酸亚磺酸	1.35	0.88		
	牛磺酸	0.94	0.68	0.53	
牛磺酸	0.28	0.20	2.15	1.53	
N-乙酰牛磺酸	1.43	1.00	0.06	0.04	
2-羟基丁酸酯/ 2-羟基异丁酸酯	1.20	0.70	0.50	0.31	
尿素循环: 精氨酸和 脯氨酸 代谢	精氨酸		0.44		
	尿素	1.24	0.50	0.30	0.11
	鸟氨酸		0.34		
	2-氧精氨酸*		1.00		
	瓜氨酸		0.29		
	高精氨酸		1.00		
	脯氨酸		0.22		
	二甲基精氨酸 (SDMA + ADMA)	1.15	0.89		
	N-乙酰精氨酸	1.66	1.00		
	N- $\delta$ -乙酰鸟氨酸	1.31	1.00		
	反式-4-羟脯氨酸		0.14		
	羟脯	1.45	1.00		
N-甲基脯氨酸	1.39	1.00	0.70		

继续

表 III。氨基酸显示出不同的趋势。红色和绿色阴影单元格表示  $p \leq 0.05$  (红色表示该比较的平均值明显较高; 绿色值明显较低)。浅红色和浅绿色阴影单元格表示  $0.05 < p < 0.10$  (浅红色表示该比较的平均值较高; 浅绿色表示较低的趋势)。

通路	生化名称	二甲基亚砜 脂类 DMSO 脂质体	没有 DMSO 脂蛋白无 DMSO 脂质体	没有 DMSO 脂肪酸酯 DMSO 脂质体	没有 DMSO 脂类 DMSO 脂蛋白
肌酸 代谢	肌基乙酸酯	0.78	0.26	0.55	0.17
	肌酸	0.63	0.28	1.03	0.47
	肌酐	1.27	0.25	0.24	0.05
	磷酸肌酸	0.39	0.16	1.76	0.68
多胺 代谢	亚精胺	0.75	0.33	0.50	0.18
	精胺	1.25	1.00	0.44	0.37
	4-乙酰氨基丁酸	1.48	0.94	0.11	0.07
谷胱甘肽 代谢	还原型谷胱甘肽 (GSH)	1.00	1.23	2.39	2.33
	氧化型谷胱甘肽 (GSSG)	0.43	0.16	4.48	2.17
	半胱氨酸-谷胱甘肽二硫化	0.47	0.34	0.17	0.10
	5-氧脯氨酸	1.50	0.55	0.07	0.02
	邻苯二甲酸酯	0.85	0.55	1.64	1.00

尽管分离的方法涉及广泛的离体加工<sup>23</sup> (例如酶消化和扩增), 这可能影响分化潜能并限制多能性<sup>11</sup>, 但一些研究小组认为脂肪组织可能是 MSC 的理想来源。最近, Lipogems®International 引入了一种协议, 以获取具有完整的基质血管壁 (可以维持 hADSCs 多能性) 的微片段化脂肪组织产品。与脂蛋白抽出物<sup>13,14</sup> 相比, 脂蛋白的处理显著减少了污染的血液, 去除了因在脂抽吸物的收集过程中对组织的损害而导致的脂质和其他胞质成分, 并导致了干细胞和周细胞富集的微裂组织。这项研究评估了脂肪抽吸组织和脂蛋白®微破裂的脂肪组织, 这些组织暴露于 DMSO 中进行冷冻保存, 或者新鲜冷冻而不添加 DMSO, 目的是鉴定脂肪组织产品和冷冻保存方法之间可能的代谢组学差异。

脂肪中整体生化特性的比较 (无论是否暴露于 DMSO) 显示出几种代谢组学差异, 包括与氨基酸代谢和能量学相关的代谢物变化。在 DMSO 和非 DMSO 新鲜冷冻样品 (Lipogems®vs. 脂质体), 包括碳水化合物的变化和核苷酸代谢。糖酵解使用增加的迹象可能反映了富集

微裂脂肪组织脂质®样品<sup>24,25</sup> 中的间充质干细胞的分布, 其模式与核苷酸需求增加有关, 与这些细胞的高度增殖性相符<sup>26</sup>。

然而, 氨基酸代谢物在 DMSO 和非 DMSO 比较之间往往表现出不同的变化, 这可能反映了细胞吸收/运输的变化或 DMSO 储存溶液 (或两者的组合) 的贡献, 如先前报道的那样<sup>26,28</sup>。

## 结论

总的来说, 我们的发现表明 Lipogems 系统修饰了脂肪抽吸组织产品的代谢特性。将需要进一步的工作来确定参与与组织加工相关的代谢变化的具体机制。最后, 评估暴露于 DMSO 的细胞的“干性”的研究可能有助于确定冷冻保存方法对 hADSCs 分化潜能和靶组织旁分泌作用的可能影响。

## 致谢

这项工作由 Lipogems International SpA 资助

## 利益冲突

Camillo Ricordi 是 Lipogems International SpA 的创始科学家和科学顾问委员会成员。Armando J. Mendez 从 Lipogems 获得了研究资金。其他作者宣称他们没有财务竞争利益。

## 参考文献

- Zuk PA, Zhu M, Ashji AN P, De ugArte DA, huang ji, MiZuno h, Alfonso ZC, fraser jk, BenhAiM P, hedrikk Mh. 人脂肪组织是多能干细胞的来源。MOL BIOL 细胞 2002; 13: 4279-4295.
- liAng X, 丁 Y, ZhAng Y, tse hf, liAn Q. 基于间充质干细胞的疗法的旁分泌机制: 现状和观点。细胞移植 2014; 23: 1045-1059.
- tans, yiny, leet, lairC, YeorW, ZhAng B, Choo A, liM sk. 治疗性 MSC 外泌体来自质膜中的脂筏微结构域。J Extracell 囊泡 2013 年 12 月 23 日; 2. doi: 10.3402 / jev.v2i0.22614. eCollection 2013.
- GarCía-ContrerAsM, MessAggio f. , jiMeneZ o, MenDeZ A. 通过非酶和酶方法处理的人脂肪组织的外泌体含量差异。CyrR4 2015; 3: e1423.
- Gimble JM, 邦内尔 BA, 吉尔 • 阿克 f. 人类脂肪来源的细胞: 向临床翻译过渡的更新。再生医学 2012; 7: 225-235.
- gArCía-ContrerAsM , VerA-Donoso CD , hernánDeZ-AnDreujM , gArCía-VerDugoJM , oltrA e. 癌症患者的人类脂肪干细胞 (ADSC) 的治疗潜力: 一项前瞻性研究。2014 年《公共科学评论》; 9: e113288.
- Puglisi MA, sAulnier n, PisCAGliA AC, tonDi P, Agnes s, gAsBARRini A. 脂肪组织来源的间充质干细胞与肝的分化: 旧概念和未来发展。Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2011;15 (4) : 355-64.
- Pu ll, Cui X, 芬克 Bf, gao D, VAsConeZ hC. 最佳冷冻保存后, 脂肪抽吸物可作为人类加工的脂肪抽吸物细胞的来源。2006 年 Plast Reconstr Surg; 117: 1845-1850.
- 乔德里女士, BAdoWski M, Muise A, PierCe j, 哈里斯 Dt. 冷冻保存整个脂肪组织, 以备将来用于再生医学中。2014 年《外科杂志》杂志; 187: 24-35.
- Cui XD, gao dy, fink Bf, VAsConeZ hC, Pu ll. 人体脂肪组织的冷冻保存。低温生物学 2007;55: 269-278.
- 阿罗诺维茨 (AronoWitZ JA), 当地人 (RA), 阿卡 (Akaki) CS. 机械分离和酶分离脂肪组织中基质血管部分细胞。SrpRePrPro 2015; 4: 713.
- 啤酒 e, steffenhgengen C, Wurzer C, gabriel C, relh h, WolBAnk s. 用于脂肪组织来源的细胞的酶促和非酶促分离系统: 当前技术水平。细胞再生 (Lond) 2015 年 9 月 30 日; 4: 7. DOI:101186/S13619-015-020-0. eCollection 2015.
- 卡雷利 (Carelli), 梅西 (MessAggio), 卡纳萨 (CANAZZA) A, heBDA DM, 卡莫利 (CareMoli), 阿托雷 (Atorre), griMolDi Mg, 科利 (Colli) M, BulfAMAnte g, treMol ADA C, 狄古里奥 (Di giulio) AM, 戈里奥 (gorio A)。来源于微片段化脂肪组织的间充质干细胞的特性。细胞移植 2015; 24: 1233-1252.
- BiAnChi f, MAioli M, leonArDi e, oliVi e, PAsQuinellig , VALente s , MenDeZ Aj , riCorDi C, rAffAini M, treM-ol ADA C, VenturAC. 一种新型非酶方法和装置, 可得到高度浓缩的脂肪组织衍生生物人脂抽吸物产生的轻微机械力作用于周细胞样元素中。细胞移植 2013; 22: 2063-2077.
- 良月德利 P, 梅农 A, 拉戈尼 V, 克里奥 P, 伯格安特 S, 朗德利 F, 德吉罗尔 AMO, 阿尔菲里 • 蒙特拉西奥, 班菲克, CABitZA P, tettAMAnti g, 阿那斯塔利 l. 脂蛋白产品处理可提高人腱干细胞的增殖速率, 而不会影响它们的干性和分化能力。干细胞诠释 2016;2016: 4373410.
- Bosetti M, Borrone A, follenZi A, MessAggio f, treMolADA C, CAnnAsM. 人脂肪抽吸物作为自体可注射活性支架, 可一步修复软骨缺损。细胞移植 2016;25: 1043-1056.
- BiAnChi f , olivi e , BAIDAssArre M , giAnnone fA , lAggettA M , VALente s , CAVAllini C , tAssinArir , CAnAider s , PAsQuinelli g , treMol ADA C , VenturA C. Lipogems, 增强了脂肪组织处理的新修复方式。在慢性后肢缺血中。CyrR4 2014; 2: e1289.
- giori A, treMol ADA C, VARTIA, NAVONE SE, MARGIA, CAP1 AN Ai. 注射微碎片化脂肪移植 (Lipogems®) 后肛门失禁的功能恢复: 对头 5 例进行了两年的随访。CyrR4 2015; 2: e1544.
- nAk A k, joMen Y, ishihArA k, kiM j, ishiMoto t, BAe ej, MohneYrP, stirDiVAnt sM, oshiMA h, oshiMA M, kiM DW, nak Akchi, tAkihArA Y, kato Y, ooshiMA A, kiM sj. 二肽物种调节 p38MAPK-Smad3 信号传导, 以维持慢性粒细胞性白血病干细胞。NAT 共 2015; 6: 8039.
- solini A, MAnCA MI, Penno g, Pugliese g, CoBB je, ferrAnnini e. 通过代谢组学预测 2 型糖尿病患者肾功能和蛋白尿下降。J 临床内分泌代谢 2016;101: 696-704.
- L. , B. , 随机森林。机器学习 2001; 45: 5-32.
- Shannon P, MArkiel A, oZier o, BALigA ns, Wang jt, RAMAge D, AMin n, sChWikoWski B, iDeker t. Cytoscape: 用于生物分子相互作用网络集成模型的软件环境。基因组 Res 2003; 13: 2498-5204.
- Raposio e, BertoZZi. 如何为临床应用分离现成的脂肪干细胞沉淀。Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2017; 21: 4252-4260.
- 计划 D, Janssen FW, Van Riijn LD, Fernandes h , Bloem RM , De Bruijn JD , Van DijkhuiZen-RADersMA

r. 生长, 新陈代谢和生长抑制剂  
加西亚·孔特雷拉斯 (M. Garcia-Contreras), 梅萨焦 (F.

---



- 间充质干细胞。组织工程 A 部分 2009; 15: 1877-1886。
- 25) MisChen Bt, FolMarke, MoYerke, Buehrer B, olBriCh kC, levinls, klitzZMA n B, erDMAnnD。组织工程中脂肪干细胞的代谢和功能表征。PrAST 重组 2008; 122: 725-738。
- 26) 伊达克苏达维持自我更新干细胞的代谢要求。NAT Rev mol 细胞 BIOL 2014; 15: 243-256。
- 27) AlMeiDA MM, CAires LC, Musso CM, CAMPos jM, MARANDUBA CM, MACeDo gC, MendonçAjP, GarCiA rM。无需从二甲基亚砷中冷冻保存并从脂肪组织中分离细胞核的协议。吉内特 • 莫尔雷斯 2014; 13: 10921-10933。
- 28) nAA1Dijk Y, 标准位 M, feDoroVA V, 填充 A。使用羟乙基淀粉和二甲基亚砷的组合冷冻保存大鼠间充质干细胞期间不同冷冻速率的影响。BMC 生物技术 2012; 12: 49。