

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.07.002

## 钙离子浓度对脂肪干细胞增殖和成肌分化的影响\*

陈 皓<sup>1#</sup> 柯 晨<sup>2#</sup> 张梓凯<sup>2</sup> 李力群<sup>2</sup> 林 明<sup>1Δ</sup>

(1 温州医科大学附属第二医院育英儿童医院 浙江 温州 325000; 2 温州医科大学附属第一医院 浙江 温州 325000)

**摘要 目的:** 本研究旨在探讨钙离子浓度对脂肪干细胞(ADSCs)增殖和成肌分化的影响。**方法:** 利用抽脂手术废弃脂肪提取脂肪干细胞,进行体外细胞培养和鉴定。设立正常细胞培养液为对照组,在培养液中添加不同浓度的钙离子(分别为 0.001 mol/mL、0.002 mol/mL、0.003 mol/mL、0.004 mol/mL、0.005 mol/mL 共 5 组)为实验组,测定在 48 h 和 96 h 条件下不同浓度钙离子( $\text{Ca}^{2+}$ )对 cck8 反应细胞增殖的影响。同时通过 TGF- $\beta$  诱导成肌分化,测定不同钙离子浓度下  $\text{Ca}^{2+}$  信号相关蛋白的表达,并通过 CCK-8 检测评价其分化水平。另外通过免疫荧光和 PCR 检测细胞表面特异性抗原( $\alpha$ -SMA, SMMHC)的表达水平。各组间比较应用独立样本 t 检验,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。**结果:** 显微镜下观察可见原代 ADSCs 细胞培养 0.5 天后贴壁生长,形态呈圆或椭圆形,而 TGF- $\beta$  诱导 ADSCs 成肌分化可见细胞呈梭形;实验组中,钙浓度  $< 0.002$  mmol/mL 时,脂肪干细胞增殖得到显著促进( $t=10.08$ ,  $df=10$ ,  $P < 0.05$ );钙浓度  $< 0.003$  mmol/mL 时,脂肪干细胞的成肌分化也显著增加,同时免疫荧光和 PCR 检测发现低浓度下  $\alpha$ -SMA, SMMHC 的表达均显著增加( $P < 0.05$ ),而高钙浓度下两者均受到抑制( $P < 0.05$ )。**结论:** 低钙浓度(钙浓度  $< 0.002$  mmol/mL)可显著促进脂肪干细胞增殖和成肌分化,而高钙浓度下两者均受到抑制。

**关键词:** 钙离子;脂肪干细胞;成肌分化;细胞增殖;表面特异性抗原

**中图分类号:** R-33; Q26; R711.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2022)07-1206-05

## Effects of Calcium Concentration on Proliferation and Myogenic Differentiation of Adipose Stem Cells\*

CHEN Hao<sup>1#</sup>, KE Chen<sup>2#</sup>, ZHANG Zi-ka<sup>2</sup>, LI Li-qun<sup>2</sup>, LIN Ming<sup>1Δ</sup>

(1 The Second Affiliated Hospital and Yuying Children's Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang, 325000, China;

2 The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang, 325000, China)

**ABSTRACT Objective:** The aim of this study was to investigate using myogenic differentiation of adipose stem cells for the treatment of female pelvic floor dysfunction (PFD) and aimed to investigate the effect of calcium concentration on the proliferation and myogenic differentiation of adipose stem cells. **Methods:** Human adipose stem cells were obtained from adipose tissue samples collected during plastic surgery and cultured. These were divided into six groups: one group was assigned as the blank control group, and the other five groups were added with different concentrations of calcium ions, respectively. Under the conditions of 48 and 96 hours, the proliferation of CCK8-reactive cells in different concentrations of Calcium ion ( $\text{Ca}^{2+}$ ) was measured. In the second part, under the induction of TGF- $\beta$  myogenic differentiation, different concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$  were added to evaluate the myogenic differentiation process of proteins involved in  $\text{Ca}^{2+}$  signal under experimental conditions and control groups, and these were measured by CCK-8, immunofluorescence and PCR to determine the expression level of the cell surface specific antigen ( $\alpha$ -SMA, SMMHC). **Results:** After 0.5 days of culture, microscopic observation showed that ADSCs cells adhered to the wall and grew in round or oval shape. After the inducement of TGF- $\beta$ , myogenic differentiation of ADSCs showed fusiform cells. In the experimental group, the proliferation of adipocytes was significantly promoted when calcium concentration was less than 0.002 mmol/mL ( $T=10.08$ ,  $DF=10$ ,  $P < 0.05$ ). When calcium concentration was less than 0.003 mmol/mL, the myogenic differentiation of adipocytes was also significantly increased, and the expression of  $\alpha$ -SMA and SMMHC were significantly increased at low calcium concentration ( $P < 0.05$ ), while they were inhibited at high calcium concentration ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Myogenic differentiation and proliferation of adipose stem cells were also significantly increased in low calcium concentration (calcium concentration  $< 0.003$  mmol/mL),  $P < 0.05$ , while both of them were inhibited in high calcium concentration.

**Key words:** Calcium ion; Adipose stem cells; Myogenic differentiation; Proliferation; Surface specific antigen

**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; Q26; R711.5 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2022)07-1206-05

\* 基金项目:温州市科技局市级基础性科研项目(Y20190017)

# 为共同第一作者

作者简介:陈皓(1991-),男,硕士,主要研究方向:脂肪干细胞;

柯晨(1998-),女,学士,主要研究方向:脂肪干细胞, E-mail: kechen0724@qq.com

Δ 通讯作者:林明,女,硕士,副主任医师,主要研究方向:妇科整形,脂肪干细胞, E-mail: dr.lm@163.com

(收稿日期:2021-11-28 接受日期:2021-12-23)

## 前言

女性盆底功能障碍性疾病(pelvic floor dysfunction, PFD)是一类由盆底支持结构缺陷、损伤及功能障碍所造成的疾病<sup>[1]</sup>,包括盆腔器官脱垂、尿失禁、粪便失禁以及性功能障碍等,是中老年妇女群体中的常见病。近年来,随着人口老龄化,女性盆底功能障碍发病率逐年上升<sup>[2]</sup>。该病的主要发生因素包括多胞胎妊娠、年龄和体重增加,以及体内缺乏相关激素。目前对该病的治疗已成为一项紧迫的任务<sup>[3]</sup>。

脂肪干细胞(ADSCs)最早是由 Zuk<sup>[4]</sup>等研究者,从脂肪抽吸术<sup>[5,6]</sup>获得的皮下脂肪组织中分离得到的多能干细胞。Kaisaier Aji 的研究表明 TGF- $\beta$ 1 和 BMP4 能使 ADSCs 向平滑肌细胞分化<sup>[7]</sup>。而细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  信号在成肌分化过程中非常重要<sup>[8-10]</sup>,钙通道存在于质膜上, $\text{Ca}^{2+}$  通过 SOCE (store-operated Calcium entry, store-operation Calcium entry)途径进入细胞影响肌细胞的形成和再生<sup>[11]</sup>。当肌肉组织受损时,干细胞被激活。这些细胞通过增殖和分化来修复肌肉损伤。目前钙离子对人脂肪干细胞成肌分化的影响还尚未有明确研究。本研究旨在观察不同浓度的钙离子对脂肪干细胞增殖以及成肌分化的影响,为后续通过成肌分化治疗女性盆底肌功能障碍提供技术和理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验中应用的人 ADSCs 来源于温州医科大学附属第一医院 2 例脂肪移植患者废弃的脂肪组织,均为女性,年龄 41~50 岁,经患者知情同意及温州医科大学附属第一医院伦理委员会批准后进行细胞培养及细胞分化相关实验。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 脂肪干细胞的分离** 将 2 例患者抽取的中间层的脂肪组织转移至 50 mL 离心管中,加入等体积的 I 型胶原酶,吹打,放入恒温振荡箱(37℃,275 rpm 的转速)振荡 45 分钟,消化结束后加入等体积高糖 DMEM 终止消化,混合液分别通过 100 目、200 目筛网过滤杂质,将过滤液分装到 15 mL 的离心管,离心,弃上清,用 3 mL cyagen 培养基重悬。

**1.2.2 干细胞的培养及分化** 每 3 天更换一次 cyagen 细胞培养基,当 80%~90%的细胞覆盖在培养瓶表面时,可进行传代培养。弃掉培养基,加入 3 mL 的 PBS,去除多余的培养基和非贴壁细胞,轻轻吹。弃掉 PBS,加入含 EDTA 的胰蛋白酶溶液 3 mL,吹匀,37℃培养箱静置 2 分钟,加入等量含血清的培养基,离心。取上清液,重新悬浮培养基。把它装在培养瓶里。第三代干细胞培养后,加入 TGF- $\beta$ 1 在 37℃二氧化碳培养箱中培养 7 天(浓度为 0.05  $\mu\text{g/mL}$ )诱导成肌分化。

**1.2.3 设立对照组** 将胰酶消化后的细胞重新悬浮在培养基上,并将悬浮细胞调整至 20000 个/mL。接种在 96 孔板上,形成六个水平孔和六个纵向孔。24 h 后,设 1 个空白组(不含钙离子的 cyagen 细胞培养基)和 5 个实验组(含钙离子的 cyagen 细胞培养基)。cyagen 培养液溶液中的钙离子浓度分别为 0.001 mol/mL、0.002 mol/mL、0.003 mol/mL、0.004 mol/mL、0.005 mol/mL。每组有 3 个辅助孔。分成两组。分别在 48 和 96 小时测定

CCK-8 的吸光度。

**1.2.4 CCK8 测数** 建立 1 个空白组(不含钙离子成肌分化液)和 5 个实验组(含钙离子成肌分化液)后,加入 TGF- $\beta$  诱导成肌分化。钙离子浓度分别为 0.001 mol/mL、0.002 mol/mL、0.03 mol/mL、0.004 mol/mL、0.005 mol/mL,钙离子浓度分别为 0.001 mol/mL、0.002 mol/mL、0.003 mol/mL、0.004 mol/mL、0.005 mol/mL。每组有 3 个辅助孔。分成两组。每三天换一次培养液。分别在第 1 周和第 2 周测定 CCK-8 的吸光度。

**1.2.5 免疫荧光** 免疫荧光检测分别于 1 周和 2 周进行。将培养皿中的细胞用 4%多聚甲醛固定 15 分钟。PBS 洗涤后,用 0.5% Triton X-100 打孔 20 分钟。PBS 洗涤 3 次后,室温下用山羊血清封闭细胞 30 分钟。第二天,用 PBST 冲洗爬玻片后,加入稀释的荧光二抗。然后用 DAPI (1:1000, Boster, 武汉, 中国)对细胞进行反染色,并使用荧光显微镜(Olympus 公司, 东京, 日本)检查。从每口井中随机选取 5 个油田进行成像( $n=3$ )。

**1.2.6 Real-time PCR** 使用 Trizol 试剂(Takara, Cat# 9109, 中国大连)从每组细胞中分离总 RNA,按照厂家说明。用分光光度计(NanoDrop 2000, Peqlab, Erlangen, Germany)对 RNA 进行定量。利用反转录系统(Promega, Madison, WI, USA)从 1  $\mu\text{g}$  总 RNA 中制备互补 dna (cdna)。所有样本,包括管家基因 GAPDH,采用 SYBR 预混 Ex Taq (Takara),使用 LightCycler 480(罗氏,巴塞尔,瑞士)进行分析。本研究使用的引物:SMA (FP:5'-TCGTGCTGGACTCTGGAGATGG-3', RP:5'-CCACGC TCAGTCAGGATCTTCATG-3'), MHCII (FP:5'-GTTTGATGC TCCAAGCCCTCTCC-3', RP:5'-CCCAATAATGATGCCACC AGACC-3'), GAPDH (FP:5'-CCAAGGAGTAAGACCCCTG G-3', RP:5'-TGGTTGAGCACAGGGTACTT-3') 反应条件为:95℃,10 min;95℃ 15 s,58℃ 30 s,72℃ 30 s 共 40 个循环;最后在 72℃下延长 10 分钟。测量信号的特异性被识别为熔化曲线中的单峰。采用 GAPDH 作为内部控制。 $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法用于定量。结果显示为与 GAPDH 的比值。

### 1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0 软件(美国 GraphPad 公司)进行统计分析,组间比较采用独立样本 t 检验, $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ADSCs 体外培养与分化

显微镜下观察到原代 ADSCs 细胞培养 0.5 d 后贴壁生长,呈圆或椭圆形,见图 1(a);TGF- $\beta$  诱导 ADSCs 成肌分化可见细胞呈梭形图 1(d);ADSCs 细胞具有多能分化能力,可成脂分化和成骨分化,见图 1(e)、(f)。

### 2.2 不同钙离子浓度对 ADSCs 增殖的影响

对比实验组与对照组可以发现,0.001~0.002 mol/mL 的钙离子浓度促进脂肪干细胞增殖,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ ),而超过 0.003 mol/mL 的钙离子浓度对增殖有显著的抑制作用(图 2),差异均具有统计学意义( $P<0.05$ )。

### 2.3 不同钙离子浓度对 ADSCs 成肌分化的影响

通过测量诱导成肌分化后 7 天的吸光度(图 3)比较可以看出,在钙离子浓度为 0.001~0.003 mmol/mL 时,实验组的

成肌分化能力强于空白组;而当钙离子浓度大于 0.004 mmol/mL 时,实验组的成肌分化能力则受到抑制,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ )。

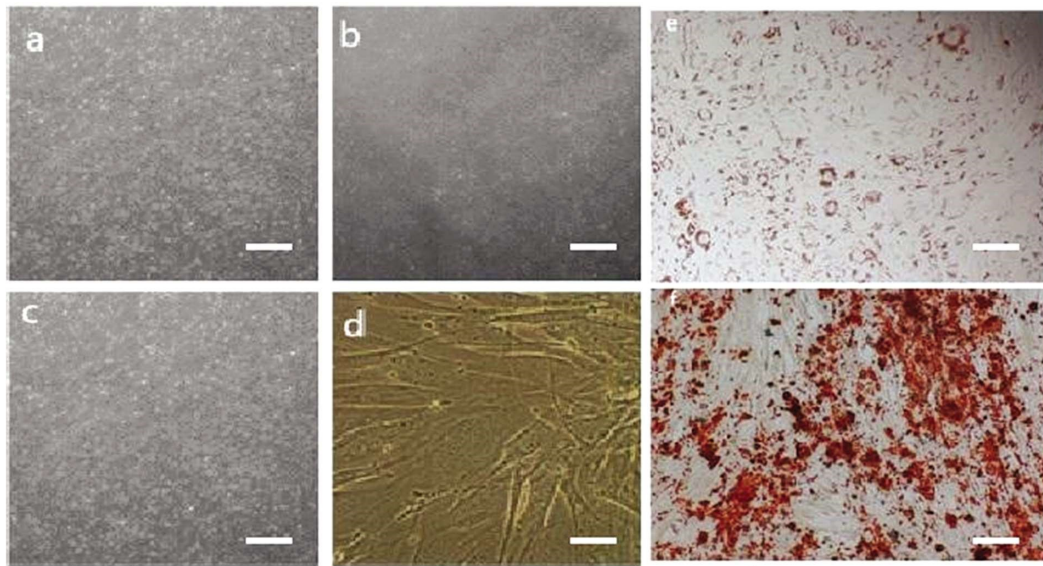


图 1 (a)脂肪原代干细胞;(b)第二代脂肪干细胞;(c)第三代脂肪干细胞;(d)脂肪干细胞成肌分化 7 天;(e)油红 O 染色结果显示,正常培养的 ADSCs-GFP 细胞可产生大量脂质;(f)茜素红染色显示正常培养的 ADSCs-GFP 细胞可形成大量骨细胞。

Fig.1 (a) Adipose primary stem cells; (b) The second generation adipose stem cells; (c) The third generation adipose stem cells; (d) Myogenic differentiation of adipose stem cells for seven days; (e) The results of oil red O staining showed that ADSCs-GFP cells could produce a large amount of lipid under normal culture; (f) Alizarin red staining showed that ADSCs-GFP cells could form a large number of bone under normal culture.

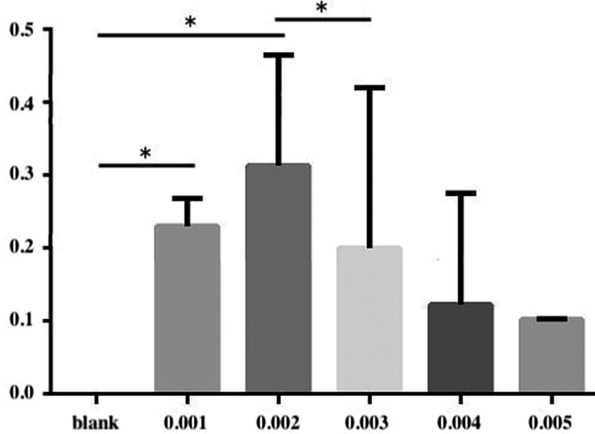


图 2 ADSCs 细胞增殖 CCK-8 吸光度

Fig. 2 n=3; comparison of absorbance of CCK-8

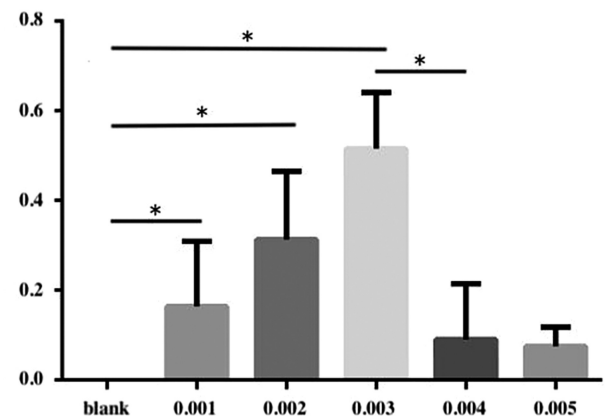


图 3 ADSCs 成肌分化时 CCK-8 吸光度

Fig.3 n=3; comparison of absorbance of CCK-8

## 2.4 PCR

通过 PCR 实验检测各组细胞表面特异性抗原 (aSMA 和 MHCII) 基因的表达情况发现 (图 4), 当钙离子浓度为 0.003 mmol/mL 时, 钙离子对脂肪干细胞成肌分化具有一定的增益效应。当浓度大于 0.003 mmol/mL 时, 钙离子对脂肪干细胞成肌分化具有明显的抑制作用。

## 2.5 免疫荧光表达

在 0.001 ~ 0.003 mmol/mL 钙离子浓度下, aSMA 和 MHCII 的表达随着钙离子浓度的增加而显著增加, 在 0.003 mmol/mL 浓度下达到峰值, 此时见 DAPI 核染色数量多,  $\alpha$ SMA 及 SMMHC 显色较为明显。(图 5 和图 6)。

## 3 讨论

据资料显示, 超过 20% 的女性有不同程度的女性盆底功能

障碍<sup>[12-14]</sup>。目前, 现有的治疗手段尚有不足, 以物理疗法和外科手术为主, 而物理治疗疗效无法保证, 手术治疗风险大、费用高, 尚未找到经济且有保障的治疗手段<sup>[15]</sup>。先前的研究已经表明脂肪干细胞可从脂肪组织中分离, 并且具有肌分化的能力<sup>[16-19]</sup>。在本研究中, 我们提供了一种简单有效的提高脂肪干细胞成肌分化的方案<sup>[20]</sup>。在前期实验中, 我们将培养基由生长培养基改为成肌培养基后, 分化迅速, 并在 7 d 后实现融合程度最大, 在细胞分选后可获得大约 60% 的人成肌细胞。这些细胞可保持多达 6 代 (约 30 倍) 的培养, 并保持其分化能力<sup>[21-23]</sup>。

钙信号调节肌肉的发育、动态平衡和再生。钙通道存在于质膜上, 通过 SOCE (store-operated Calcium entry, store-operation Calcium entry) 途径进入细胞, 对肌肉的形成和再生非常重要<sup>[24]</sup>。在实验组和对照组的比较中发现 0.001~0.002 mmol/mL 对脂肪干细胞增殖有很大的影响, 而大于 0.003 mmol/mL 对增殖有

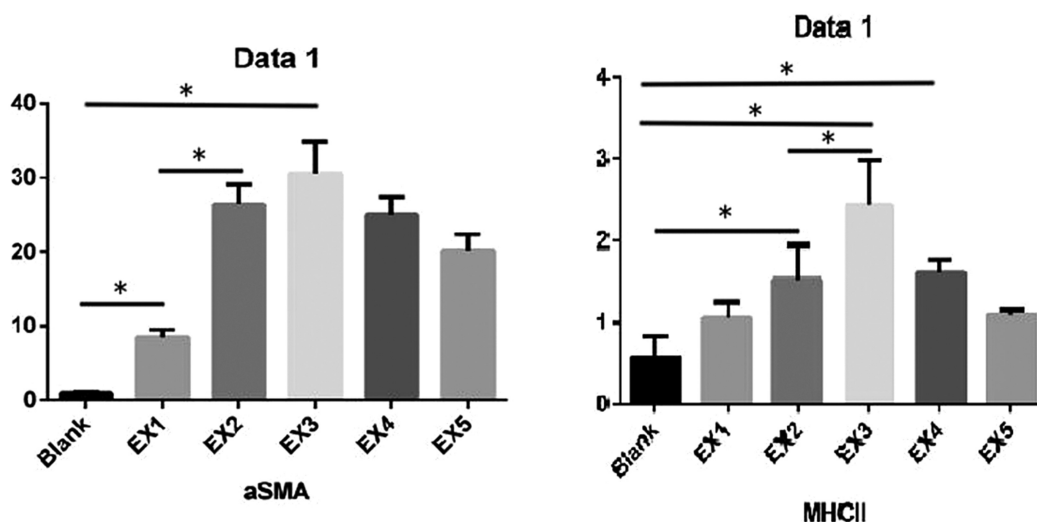


图 4 采用 qRT-PCR 检测各组细胞表面特异性抗原(aSMA 和 MHCII)基因的表达情况

Fig. 4 The expression of the cell surface specific antigen (aSMA and MHCII) genes in each group were detected by the qRT-PCR analysis

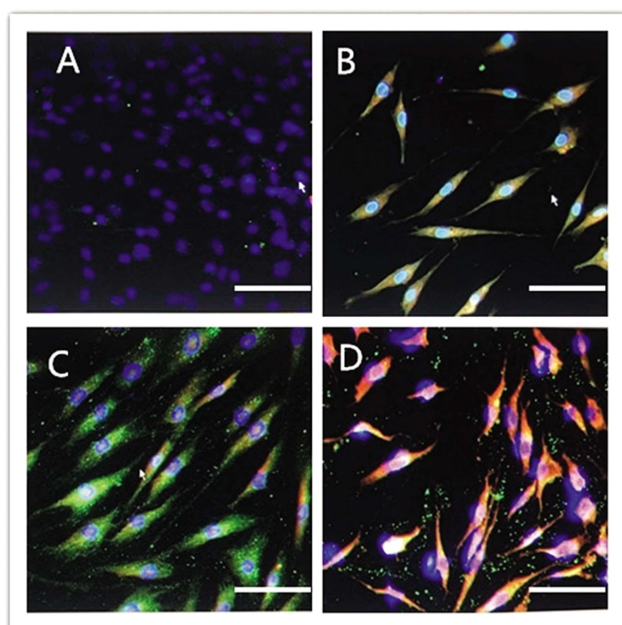


图 5 (a)将人成肌细胞融合单层暴露于 DM 7 天,固定,并用抗 $\alpha$ -SMA (红色)、SMMHC(绿色)和 DAPI(蓝色)抗体染色以识别细胞核。标尺 = 50  $\mu$ m。A 为空白组;(b)浓度为 0.001 mmol/mL 的钙离子;(c)钙离子浓度为 0.002 mmol/mL; (d)钙离子浓度在 0.003 mmol/mL。

Fig. 5 (a) The confluent monolayer of human myoblasts was exposed to DM for seven days, fixed, and stained with antibodies against  $\alpha$ -SMA (red), SMMHC (green), and DAPI (blue) to identify the nuclei. Scale bar = 50  $\mu$ m. A for blank group; (b) The calcium ion at a concentration of 0.001 mmol/ml; (c) The calcium ion concentration at 0.002 mmol/mL; (d) The calcium ion concentration at 0.003 mmol/mL.

显著的抑制作用。这可能是由于在低浓度钙时,钙通道的打开,进入细胞的钙离子增多;而随着钙浓度的升高,肌细胞逐渐出现核失衡,胞质逐渐萎缩,细胞完全破裂,出现凋亡<sup>[25, 26]</sup>。

TGF- $\beta$  诱导成肌分化后,当钙离子浓度为 0.001~0.003 mmol/mL 时,分化 7 天后,可以发现相对对照组,实验组 CCK8 测量的分化细胞数量以及  $\alpha$  SMA、MHCII 的表达均有增强<sup>[27, 28]</sup>,且呈剂量依赖性。而当钙离子浓度大于 0.003 mmol/mL

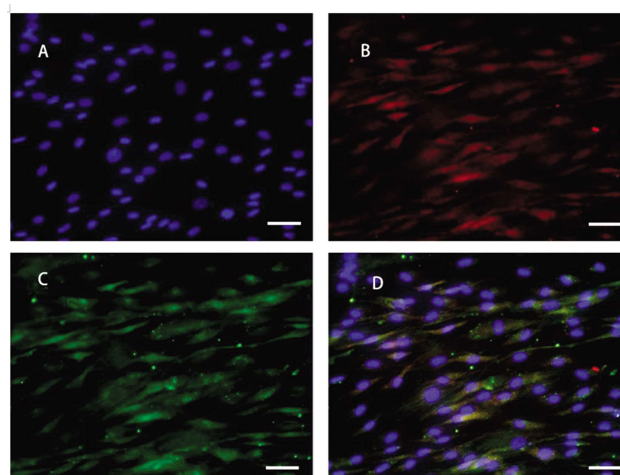


图 6:0.003mmol/mL 钙离子浓度下,A 为 DAPI(蓝色)鉴定细胞核的肌源性分化。

B、C 和 D 为抗 $\alpha$ -SMA(红色)抗体染色的细胞,SMMHC(绿色)。

Fig. 6 This is myogenic differentiation at 0.003mmol/ml calcium, A for DAPI (blue) to identify the nuclei. B, C and D for cell stained with antibodies against  $\alpha$ -SMA (red), SMMHC (green).

时,实验组则受到抑制。在低钙离子环境下,质膜上存在钙通道,并通过 store-operated calcium entry (SOCE)途径进入  $\text{Ca}^{2+}$ ,形成 / 再生肌肉但随着钙浓度的增加,由于细胞外浓度的增加,细胞内水分子向细胞外转移,肌细胞逐渐出现核失衡,当浓度达到 0.004 mmol/mL 时,胞质逐渐萎缩,细胞完全破裂,和细胞凋亡出现<sup>[29, 30]</sup>。在本研究中,我们认为 0.003 mmol/mL 的钙浓度是细胞增殖和分化的转折点。

本实验存在一些缺点。一方面由于肌肉细胞的快速形成,这些细胞也有自发收缩和从培养板上脱落的倾向,影响实验结果,因此有必要在培养板上应用细胞外基质来改善细胞粘附,减少肌管脱落引起的系统误差。另一方面本研究样本量小,实验材料仅限于门诊脂肪,因此对研究结果的评价可能存在一定的偏差。此外,细胞外钙离子与细胞外钙离子是否存在协同拮抗机制,以及是否存在其他影响实验结果的途径尚不清楚。在未来,我们可以通过扩大样本容量,均衡样本分布来进一步完

善实验研究。

#### 4 结论

低钙浓度(钙浓度 <0.002 mmol/mL)可显著促进脂肪干细胞增殖和成肌分化,而高钙浓度下两者均受到抑制。但在细胞水平上钙离子对 ADSCs 增殖分化相关基因表达及机制有待于进一步研究,深入阐明该机制将为女性盆底肌功能障碍的修复提供临床思路 and 理论依据。

#### 参考文献(References)

- [1] Arnouk, A., E. De, A. Rehfuß, et al. Physical, Complementary, and Alternative Medicine in the Treatment of Pelvic Floor Disorders[J]. *Curr Urol Rep*, 2017, 18(6): 47
- [2] Jundt, K., U. Peschers, H. Kantenich. The investigation and treatment of female pelvic floor dysfunction [J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2015, 112 (33- 34): 564-574
- [3] 王萌影, 苑程颀, 王萌瑞, 等. 女性盆底功能障碍诊疗进展 [J]. *中国妇幼保健*, 2021, 36(05): 1213-1215
- [4] Zuk, P.A., M. Zhu, H. Mizuno, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies [J]. *Tissue Eng*, 2001, 7(2): 211-228
- [5] Yeh, Y.T., J. Wei, S. Thorossian, et al. MiR-145 mediates cell morphology-regulated mesenchymal stem cell differentiation to smooth muscle cells[J]. *Biomaterials*, 2019, 204: 59-69
- [6] Iso, Y., S. Usui, M. Toyoda, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells inhibit vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia after arterial injury in rats [J]. *Biochem Biophys Res*, 2018, 16: 79-87
- [7] Zhu Y, T Liu, K Song, et al. ADSCs differentiated into cardiomyocytes in cardiac microenvironment [J]. *Mol Cell Biochem*, 2009, 324(1-2): 117-129
- [8] Tidball, J.G. Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration[J]. *Compr Physiol*, 2011, 1(4): 2029-2062
- [9] McConkey, D.J., S. Orrenius. The role of calcium in the regulation of apoptosis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 239(2): 357- 366
- [10] Liu L, X Gao, X Li, et al. Calcium alendronate-coated composite scaffolds promote osteogenesis of ADSCs via integrin and FAK/ERK signalling pathways[J]. *J Mater Chem B*, 2020, 8(31): 6912-6924
- [11] Borowiec, A.S., G. Bidaux, N. Pigat, et al. Calcium channels, external calcium concentration and cell proliferation [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 739: 19-25
- [12] Easley, D.C., S.D. Abramowitch, P.A. Moalli, Female pelvic floor biomechanics: bridging the gap[J]. *Curr Opin Urol*, 2017, 27(3): 262-267
- [13] Nagle, A.S., M.A. Barker, S.D. Kleeman, et al. Passive biomechanical properties of human cadaveric levator ani muscle at low strains[J]. *J Biomech*, 2014, 47(2): 583-586
- [14] Bigot, A., W.J. Duddy, Z.G. Ouandaogo, et al. Age-Associated Methylation Suppresses SPRY1, Leading to a Failure of Re-quiescence and Loss of the Reserve Stem Cell Pool in Elderly Muscle[J]. *Cell Rep*, 2015, 13(6): 1172-1182
- [15] Wallace, S.L., L.D. Miller, K. Mishra. Pelvic floor physical therapy in the treatment of pelvic floor dysfunction in women [J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2019, 31(6): 485-493
- [16] Chen, D.C., L.Y. Chen, Q.D. Ling, et al. Purification of human adipose-derived stem cells from fat tissues using PLGA/silk screen hybrid membranes[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(14): 4278-4287
- [17] Wallner, C., J. Huber, M. Drysch, et al. Activin Receptor 2 Antagonization Impairs Adipogenic and Enhances Osteogenic Differentiation in Mouse Adipose-Derived Stem Cells and Mouse Bone Marrow-Derived Stem Cells In Vitro and In Vivo[J]. *Stem Cells Dev*, 2019, 28(6): 384-397
- [18] Mao, Y., J. Ma, Y. Xia, et al. The Overexpression of Epidermal Growth Factor (EGF) in HaCaT Cells Promotes the Proliferation, Migration, Invasion and Transdifferentiation to Epidermal Stem Cell Immunophenotyping of Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs)[J]. *Int J Stem Cells*, 2020, 13(1): 93-103
- [19] Li, Q., J. Wang, H. Liu, et al. Tissue-engineered mesh for pelvic floor reconstruction fabricated from silk fibroin scaffold with adipose-derived mesenchymal stem cells [J]. *Cell Tissue Res*, 2013, 354(2): 471-480
- [20] 朱亮, 林享玉, 何晶, 等. 脂肪干细胞在皮肤损伤再生及组织工程中的应用及进展[J]. *解剖学杂志*, 2021, 44(05): 433-437
- [21] Zhang, F., B. Deng, J. Wen, et al. PPAR $\gamma$  and MyoD are differentially regulated by myostatin in adipose-derived stem cells and muscle satellite cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 458(2): 375-380
- [22] Zhou, W., J. Lin, K. Zhao, et al. Single-Cell Profiles and Clinically Useful Properties of Human Mesenchymal Stem Cells of Adipose and Bone Marrow Origin[J]. *Am J Sports Med*, 2019, 47(7): 1722-1733
- [23] Feng, C., J. Hu, C. Liu, et al. Association of 17-beta Estradiol with Adipose-Derived Stem Cells: New Strategy to Produce Functional Myogenic Differentiated Cells with a Nano-Scaffold for Tissue Engineering[J]. *PLoS One*, 2016, 11(10): e0164918
- [24] Murphy, M.T., X. Qin, S. Kaul, et al. The polyphenol ellagic acid exerts anti-inflammatory actions via disruption of store-operated calcium entry (SOCE) pathway activators and coupling mediators[J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 875: 173036
- [25] Gu, S.S., X.W. Kang, J. Wang, et al. Effects of extracellular vesicles from mesenchymal stem cells on oxygen-glucose deprivation/reperfusion-induced neuronal injury [J]. *World J Emerg Med*, 2021, 12(1): 61-67
- [26] Goudarzi, F., H. Tayebinia, J. Karimi, et al. Calcium: A novel and efficient inducer of differentiation of adipose-derived stem cells into neuron-like cells[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(11): 8940-8951
- [27] Petschnik, A.E., B. Fell, C. Kruse, et al. The role of alpha-smooth muscle actin in myogenic differentiation of human glandular stem cells and their potential for smooth muscle cell replacement therapies [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2010, 10(6): 853-861
- [28] An, S.Y., Y.J. Jang, H.J. Lim, et al. Milk Fat Globule-EGF Factor 8, Secreted by Mesenchymal Stem Cells, Protects Against Liver Fibrosis in Mice[J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(5): 1174-1186
- [29] Barruet, E., S.M. Garcia, K. Striedinger, et al. Functionally heterogeneous human satellite cells identified by single cell RNA sequencing[J]. *Elife*, 2020, 9
- [30] Baechler, B.L., D. Bloemberg, J. Quadriatero, Mitophagy regulates mitochondrial network signaling, oxidative stress, and apoptosis during myoblast differentiation [J]. *Autophagy*, 2019, 15 (9): 1606-1619