XXXX DOI:

# 基于酶解-组织块序贯法分离、培养与鉴定大鼠腹主动脉来源间充质干细胞

赖素玉,王奕畅,刘晨璇,蔡朝英,姜 芸,何颖华,王晓锋
(中国中医科学院广安门医院肛肠科,北京 100053)

【摘 要】**目的**:建立优化的"酶解-组织块序贯法",以实现大鼠腹主动脉来源间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)的高效分离、扩增与系统鉴定。**方法**:采用3月龄SD大鼠,无菌分离腹主动脉并剪碎,依次经0.1% Ⅰ型胶原酶有限消化及组织块迁移培养法进行原代细胞获取。采用倒置显微镜动态观察细胞形态与生长特性,采用流式细胞术检测第4代细胞表面标志物[分化抗原簇(cluster of differentiation,CD)73、CD44、CD29、CD34、CD45、CD11b/c]的表达,并通过成脂、成骨及成软骨三系诱导分化实验评估其多向分化潜能。**结果**:原代细胞在第3天即开始从组织块周围迁出,增殖旺盛,传代后呈典型的"漩涡样"生长。细胞高表达CD73(95.9±1.5)%、CD44(94.5±0.8)%与CD29(82.5±1.8)%;同时,低表达造血系统标志物CD45(13.0±3.2)%、CD34(1.65±0.5)%及CD11b/c(8.6±2.1)%。经定向诱导后,细胞可形成油红O染色阳性的脂滴、茜素红染色阳性的钙结节以及阿利新蓝染色阳性的蛋白聚糖,证实其具备完整的三系分化能力。与传统单纯组织块法或单纯酶解法相比,本序贯法在细胞迁出时间、原代融合效率方面具有优势。**结论**:"酶解-组织块序贯法"是一种高效、稳定的腹主动脉MSCs分离培养体系,所获细胞纯度高、干性维持良好、多向分化潜能完备,为血管相关疾病的研究与细胞治疗提供了优质的种子细胞来源。

【关键词】腹主动脉;间充质干细胞;酶解-组织块序贯法;流式细胞术;三系分化;细胞纯度;干性维持
【中图分类号】R-33 【文献标志码】A

# Isolation, culture, and identification of mesenchymal stem cells derived from rat abdominal aorta based on the enzymatic digestion-tissue explant sequential method

*Lai Suyu, Wang Yichang, Liu Chenxuan, Cai Chaoying, Jiang Yun, He Yinghua, Wang Xiaofeng*
(*Department of Coloproctology, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences*)

【**Abstract**】***Objective***: To establish an optimized enzymatic digestion-tissue explant sequential method, and to realize efficient isolation, expansion, and systematic identification of mesenchymal stem cells (MSCs) derived from rat abdominal aorta. ***Methods***: Sprague-Dawley rats, aged 3 months, were selected, and abdominal aortas were aseptically isolated and minced, followed by primary cell harvesting via sequential limited digestion with 0.1% type Ⅰ collagenase and explant migration culture. An inverted microscope was used for dynamic observation of cell morphology and growth; flow cytometry was used to measure the expression of surface markers (CD73, CD44, CD29, CD34, CD45, and CD11b/c) on passage 4 cells; adipogenic, osteogenic, and chondrogenic trilineage differentiation experiments were used to assess multidirectional differentiation potential. ***Results***: Primary cells began migrating from the tissue explants on day 3, exhibiting vigorous proliferation and forming a typical "whirlpool-like" growth pattern after passaging. The cells showed high expression levels of CD73[(95.9±1.5)%], CD44[(94.5±0.8)%], and CD29[(82.5±1.8)%] and low expression levels of the hematopoietic markers CD45[(13.0±3.2)%], CD34[(1.65±0.5)%], and CD11b/c[(8.6±2.1)%]. Upon directed induction, the cells formed lipid droplets positive for oil red O staining, calcium nodules positive for alizarin red staining, and proteoglycans positive for Alcian blue staining, which confirmed the complete trilineage differentiation capacity of MSCs. Compared with the traditional tissue explant method or the enzymatic digestion method alone, this sequential method showed advantages in initial cell migration time and primary confluence efficiency. ***Conclusion***: The enzymatic digestion-tissue explant sequential method is an efficient and stable system for isolating and culturing MSCs derived from the abdominal aorta, and the cells obtained have high purity, well-maintained stemness, and complete multilineage differentiation potential, which provides a high-quality seed cell source for research on vascular diseases and cell therapy.

**作者介绍**:赖素玉,Email:1205700208@qq.com,
研究方向:中西医结合治疗盆底疾病。
**通信作者**:王晓锋,Email:wangxiaofeng74@hotmail.com。
**基金项目**:国家自然科学基金资助项目(编号:81673980);中国中医科学院科技创新工程重大攻关项目(编号:CI2021A02109);中央高水平中医医院临床研究和成果转化能力提升项目(编号:HLCMHPP2023126)。

【Key words】abdominal aorta; mesenchymal stem cells; enzymatic digestion-tissue explant sequential method; flow cytometry; trilineage differentiation; cell purity; stemness maintenance

传统解剖学观点将主动脉视为被动的血液输送通道，其管壁结构认为主要发挥机械支撑作用[1]。然而，近年研究发现，主动脉等血管源性组织中存在具有多向分化潜能的间充质干细胞（mesenchymal stem cells，MSCs），在血管修复、免疫调节及重塑中起关键作用[2-3]。MSCs是一类具有多向分化潜能的成体干细胞，最早从骨髓中分离获得。随着研究深入，发现MSCs广泛存在于多种组织中，如骨髓、脂肪、脐带、胎盘等。因此，根据来源组织不同，分别命名为骨髓间充质干细胞、脂肪源性MSCs等。主动脉MSCs的命名也是基于其细胞来源的组织部位。此外，腹主动脉因其独特的血流动力学环境及血管壁结构，成为动脉粥样硬化好发部位，这使得针对腹主动脉来源MSCs研究具有重要的病理生理学意义[4-5]。目前，MSCs的分离主要采用组织块贴壁法或酶消化法。但前者存在细胞迁出效率低、周期长、易受成纤维细胞污染等局限，后者则常因酶浓度、作用时间控制不当而导致细胞活性下降及功能异质性丧失，严重限制其后续研究与应用[6-10]。

针对上述技术瓶颈，本研究提出“酶解-组织块序贯法”策略，通过胶原酶有限消化与全层腹主动脉组织块体外迁移培养的时序性整合，在提高细胞获得率与纯度的同时，维持MSCs的干性及多向分化潜能。该研究不仅为腹主动脉来源MSCs的生物学功能研究提供优质细胞模型，深化对粥样硬化易感区微环境机制的认识，也为血管组织工程、动脉粥样硬化疾病建模及细胞治疗提供稳定可靠的种子细胞来源，具有重要的理论价值与临床转化前景。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

3月龄健康无特定病原体（specific pathogen free，SPF）级雄性SD大鼠（100±5）g 3只，由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供[SCXK（沪）2022-0004]。动物于SPF级环境中饲养，室温22~24 ℃，相对湿度50%~60%，12/12 h明暗循环。所有实验操作均在动物麻醉后进行。细胞分离后，采用过量麻醉法对大鼠实施安乐死。所有操作均严格遵循中国《实验动物福利伦理审查指南》及国际动物研究体内实验报告（Animal Research：Reporting of In Vivo Experiments，ARRIVE）指南以最大限度保障动物福利。本研究经中国中医科学院广安门医院动物伦理委员会批准（批准号：IACUC-GAMH-2025-060）。

### 1.2 主要试剂及仪器

杜氏改良伊格尔（Dulbecco’s modified eagle medium，DMEM）完全培养基（Gibco，美国，货号：11966-025）、胎牛血清（Gibco，美国，货号：10099141C）；Ⅰ型胶原酶（biosharp，中国，货号：BA163-100 mg）；油红O染色液、阿利新蓝染色液、茜素红染色液、D-Hanks平衡盐溶液、0.25%胰蛋白酶、4%多聚甲醛固定液、磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline，PBS）（索莱宝，中国）；间充质干细胞表面标志物抗体组合及相应同型对照抗体（赛叶生物，中国）；Class Ⅱ A2型超净工作台（安泰净化，中国）；高速冷冻离心机（Beckman Coulter，美国）；HERAcell 150i $CO_2$培养箱（力康，中国）；DMi8倒置相差显微镜（Leica，德国）；BD Accuri C6流式细胞仪（Becton Dickinson，美国，配置：488 nm激光器，FL1/FITC，FL2/PE通道）。

### 1.3 方法

1.3.1 大鼠腹主动脉来源MSCs的原代培养及扩增 大鼠经1%戊巴比妥钠（50 mg/kg）腹腔注射麻醉后，无菌操作下完整剥离腹主动脉，迅速转移至预冷的D-Hanks液中。仔细剔除血管外周脂肪，机械分离并保留主动脉组织，并将组织剪碎至约1 $mm^3$组织块。主动脉分离后，采用过量麻醉法（戊巴比妥钠，150 mg/kg，腹腔注射）对大鼠实施安乐死。首先使用0.1%Ⅰ型胶原酶在37 ℃下消化25 min，其间每10 min轻柔吹打1次。加入含10%胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）的完全培养基终止反应，1 000 r/min离心5 min收集细胞团块及未彻底消化的组织。将上述组织块接种于T25培养瓶，加入含10%FBS的DMEM完全培养基1.5 mL，轻轻摇晃使组织块均匀分布于瓶底并贴壁，置于37 ℃、5% $CO_2$培养箱中静置培养24 h后，补加培养基至总体积4 mL。原代培养24 h后首次全量换液，以去除未贴壁细胞及杂质；之后每2天更换培养液1次；待细胞融合至90%以上时，使用0.25%胰蛋白酶进行传代。将第1代细胞以$1\times10^5/cm^2$密度接种，30 min后弃去未贴壁细胞，保留贴壁细胞继续培养。为获得高纯度MSCs用于鉴定，将第4代细胞以相同密度接种，静置培养30 min后，弃去含有未贴壁细胞的上清，加入新鲜完全培养基继续培养，旨在进一步降低分化抗原簇（cluster of differentiation，CD）45阳性细胞比例。为评估本序贯法的优势，设置对照：单纯组织块组：组织块不经胶原酶消化直接贴壁；单纯酶解组：组织块用0.1%Ⅰ型胶原酶消化60 min，离心取细胞悬液接种；酶解-组织块序贯组：按上述方法操作。

1.3.2 倒置显微镜观察细胞生长情况 采用倒置相差显微镜每日观察原代及传代细胞的形态、贴壁情况及增殖动态，并采集图像以记录不同培养阶段的细胞状态。

1.3.3 流式细胞术检测细胞表面标志物CD分子 取第4代生长状态良好的细胞，参照赛叶生物提供的MSCs（大鼠）表面标记检测试剂盒说明书，制备单细胞悬液。分别加入针对特定表面抗原的一抗及对应荧光二抗，于避光条件下室温孵育30 min。采用PBS离心清洗2次，彻底去除未结合的抗体后，使用流式细胞仪检测表面标志物表达并进行数据分析。

1.3.4 第4代细胞成脂/成骨/成软骨分化功能检测 收集第4代生长状态良好、融合度达90%的细胞，分别进行成脂、成骨及成软骨定向诱导分化，以评估其多向分化潜能。三系诱导分化液分别为：成脂诱导分化液（含100 mL/L胎牛血清的高糖型DMEM、1 mg/100 mL胰岛素、11.1 mg/100 mL 3-异丁甲基黄嘌呤、3.5 mg/100 mL吲哚美辛、0.05 mg/100 mL地塞米松），成骨诱导分化液（含100 mL/L胎牛血清高糖型DMEM、10 mmol/L β-磷酸甘油、5 mg/100 mL维生素C、0.05 mg/100 mL地塞米松），成软骨诱导分化液[含100 mL/L胎牛血清的高糖型DMEM、5 mg/100 mL维生素C、0.1 mg/100 mL地塞米松、10 ng/mL转化生长因子-β1（transforming growth factor-β1，TGF-β1）]。同时，设立以完全培养基（不含诱导成分）培养的细胞作为阴性对照。首次全量更换为3 mL相应诱导培养基后，每3天半量换液1次。成脂诱导14 d后行油红O染色观察脂滴形成（细胞用4%多聚甲醛固定10 min，油红O工作液染色30 min）；成骨诱导21 d后采用茜素红染色鉴定钙结节（细胞用70%乙醇固定1 h，茜素红溶液染色10 min）；成软骨诱导21 d后采用阿利新蓝染色评估蛋白聚糖沉积（细胞用4%多聚甲醛固定10 min，阿利新蓝溶液染色30 min）。

1.4 统计学方法

流式细胞术及三系分化定量数据源自3次独立实验，采用GraphPad Prism 9.0软件进行统计分析，符合正态分布的计量资料以均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，多组间比较采用单因素方差分析；方差齐时，组间两两比较采用Fisher's LSD检验，检验水准$\alpha$=0.05。

## 2 结 果

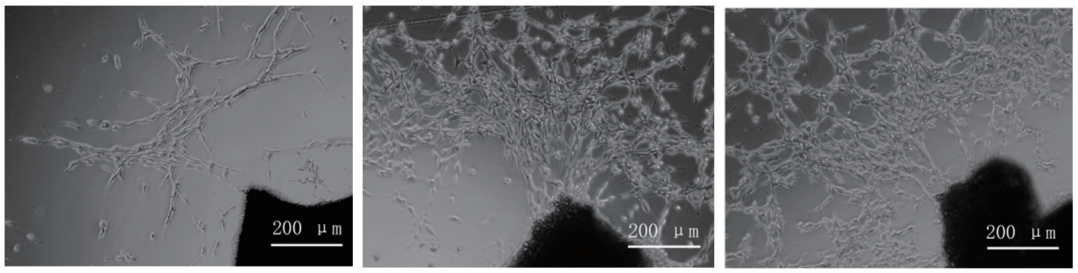
2.1 原代细胞生长情况观察

解剖分离大鼠腹主动脉，获得结构完整的血管组织片段。经胶原酶有限消化后，将组织块接种于培养瓶中进行原代静置培养。在培养的第3天，即可见少量纺锤形或短梭形的细胞开始从主动脉组织块的边缘"出芽式"迁出（图1A）；第4天后形成"细胞团晕"集落，呈放射状向外延伸扩大（图1B、1C）；第5天，细胞呈活跃的游走状态，折光性强，以组织块为中心形成"岛屿状"结构（图1D）；第6天，细胞迁出数量与速度增加。原有的细胞团晕迅速扩增，外围出现大量形态均一的长梭形细胞，形成典型的成纤维细胞样集落（图1E）；第7~10天，细胞集落相互融合，形成以组织块为中心的放射状单层细胞层，细胞呈长梭形，排列紧密（图1F）。

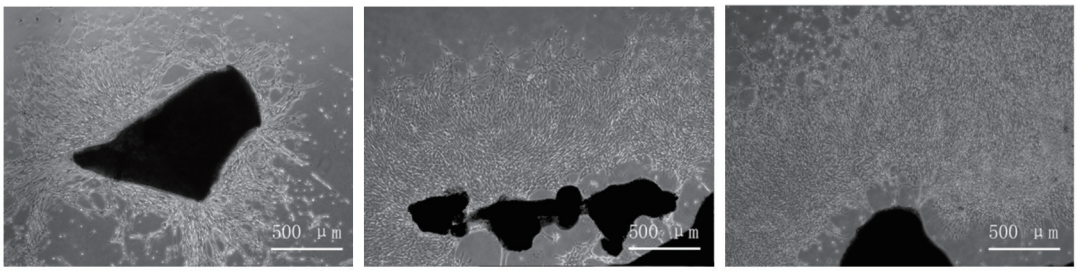
为评估本序贯法的效率优势，本研究设立了单纯组织块组、单纯酶解组及酶解-组织块序贯组（$n$=3），系统比较了细胞迁出与融合效率。组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用Fisher's LSD检验。结果显示，酶解-组织块序贯组（2.8±0.4）d与单纯酶解组（2.0±1.3）d均明显早于单纯组织块组[（5.2±0.8）d，$t$=3.226，$P$=0.018；$t$=4.302，$P$=0.005]，但前两者间差异无统计学意义（图2A）。酶解-组织块序贯组原代融合时间（7.0±0.8）d不仅极明显短于单纯组织块组[（15.3±2.1）d，$t$=6.911，$P$=0.001]，也明显短于单纯酶解组[（11.2±1.2）d，$t$=3.497，$P$=0.013]；同时，单纯酶解组的融合时间也短于单纯组织块组（$t$=3.414，$P$=0.014）（图2B）。

2.2 传代细胞的生长情况观察

在第1~3代期间，细胞呈典型的快速增殖形态。第1代细胞融合后呈均一长梭形，呈"漩涡样"紧密排列，细胞边界清晰，形态规整（图3A）。第2、3代细胞胞体饱满，未出现铺展过度的"蝉翼样变"或细胞两极的细长"针尖样"拉丝等衰老迹象（图3B、3C），表明早期代次细胞状态良好。传代至第6代，细胞形态发生适应性变化，逐渐向更为细长的"成纤维样"转变（图3D）。即使培养到第7、8代细胞折光性强，排列仍保持有序，未见大量漂浮死亡细胞（图3E、3F）。基于上述传代过程中的形态学稳定性观察，提示本培养体系能有效支持细胞在多次传代过程中的适应性生长。

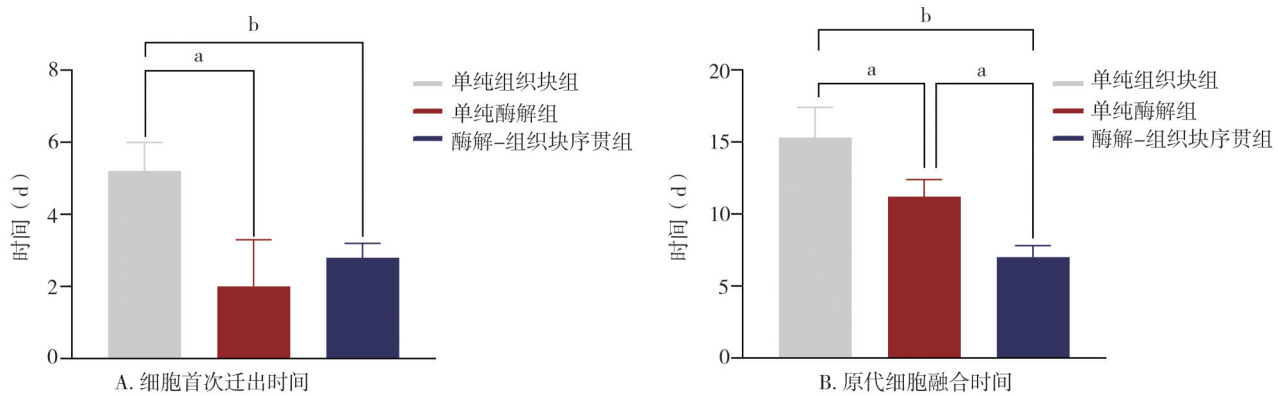



A. 第3天，组织块边缘细胞迁出（标尺=200 μm）　B. 第4天，形成的"细胞团晕"集落（标尺=200 μm）　C. 第4天，细胞放射状向外延伸扩大（标尺=200 μm）




D. 第5天，形成的"岛屿状"细胞结构（标尺=500 μm）　E. 第6天，出现大量长梭形成纤维样细胞（标尺=500 μm）　F. 第7~10天，细胞呈放射状紧密排列（标尺=500 μm）

**图1 原代细胞生长情况观察**




注：a，$P<0.05$；b，$P<0.01$；$n=3$，$\bar{x} \pm s$

**图2　不同分离方法对细胞迁出及原代融合时间的影响**

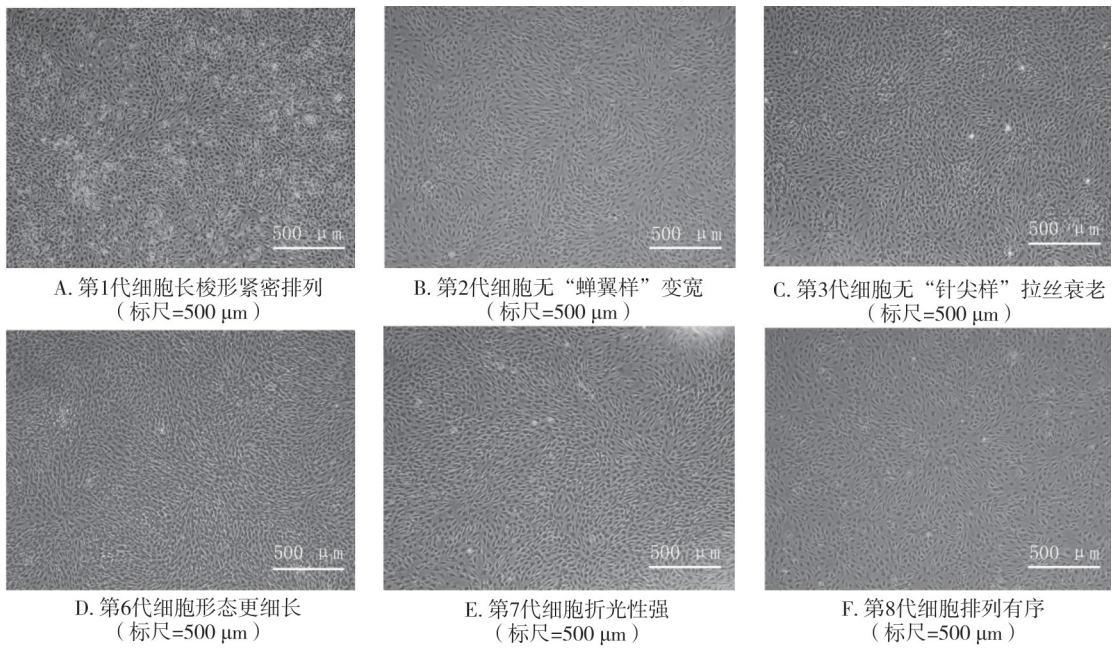



**图3　第1~3代细胞及第6~8代细胞的生长情况观察**

### 2.3　细胞表面标志物CD分子检测

采用流式细胞术对第4代细胞的表面标志物进行分析。如图4所示，流式细胞术检测结果显示，细胞群体分群清晰，高表达CD73、CD44与CD29，同时低表达CD45、CD34与CD11b/c。

为定量评估表型的稳定性和重复性，本研究进行了3次独立实验，结果显示细胞持续高表达MSCs阳性标志物CD73（95.9 ± 1.5）%、CD44（94.5 ± 0.8）%与CD29（82.5 ± 1.8）%。同时，造血系统标志物CD34（1.65 ± 0.5）%与CD11b/c（8.6 ± 2.1）%，以及CD45表达（13.0 ± 3.2）%呈稳定的低表达（图5）。3次重复数据点较为集中，表明该表达水平稳定且可控。

### 2.4　第4代细胞诱导成骨分化潜能检测

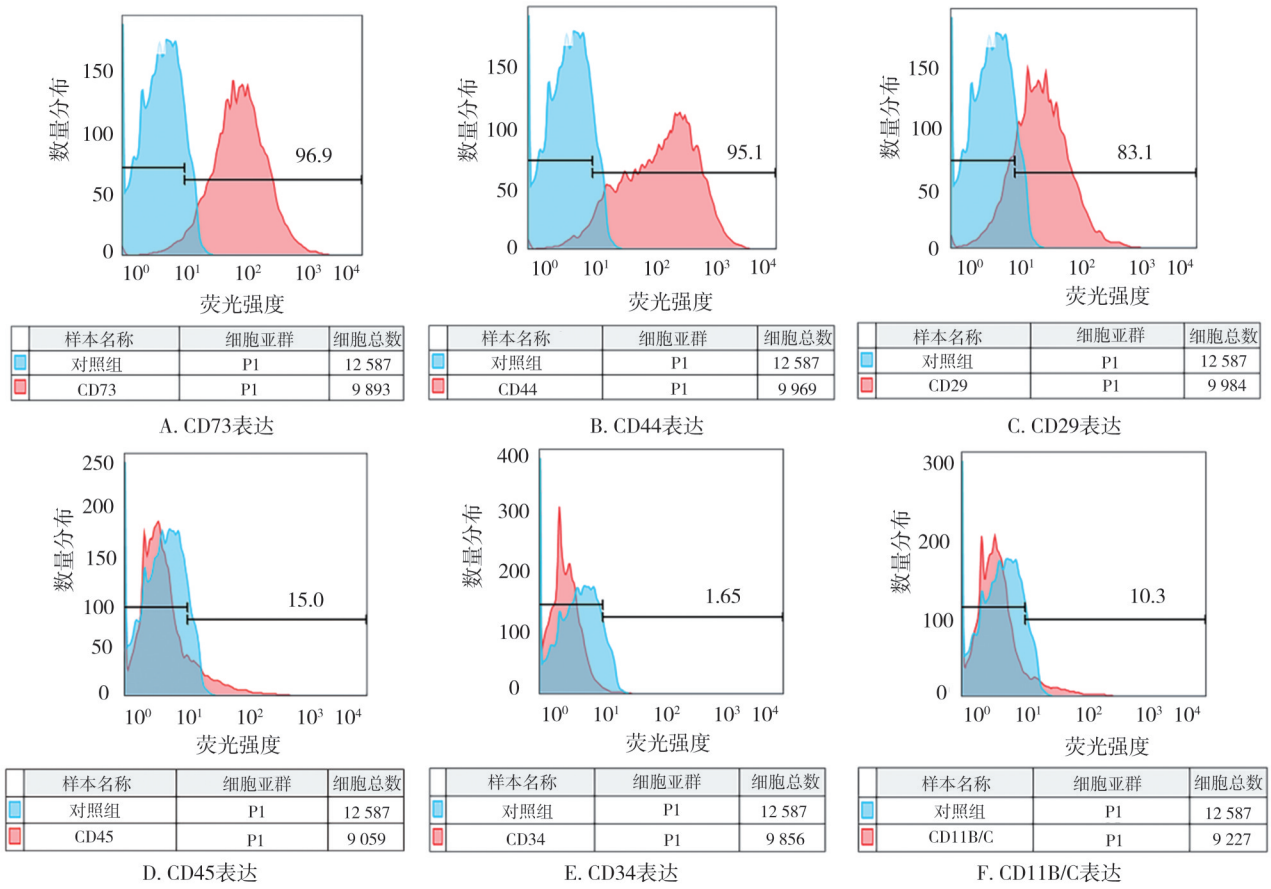
取第4代细胞进行成骨诱导以评估其成骨分化潜能。成骨诱导组诱导21 d后，细胞形态发生明显改变，局部区域可见细胞密集堆积形成的“结节状”结构（图6A）。经茜素红染色，这些结节呈现“蘑菇样”散落分布且大小不等的鲜红色钙化结节沉积（图6B）。相比之下，在完全培养基中培养的阴性对照组细胞，则始终保持均一的长梭形及单层贴壁生长状态，未见结节形成（图6C）。

### 2.5　第4代细胞诱导成脂分化潜能检测

取第4代细胞进行成脂诱导以评估其成脂分化潜能。成脂诱导组诱导14 d后，镜下可见细胞内积聚大量透亮的圆形脂滴，形态呈“桑葚样”或“水泡样”（图7A）。经油红O特异性染色，这些脂滴呈鲜红色，呈现典型的“戒环样”或单房“水泡样”结构，部分大型脂滴将细胞核挤向边缘（图7B）。相比之下，在完全培养基中培养的阴性对照组细胞，形态均一，呈长梭形，未见脂滴形成（图7C）。

### 2.6　第4代细胞诱导成软骨分化潜能检测

取第4代细胞进行成软骨诱导以评估其成软骨分化潜能。成软骨诱导组诱导21 d后，诱导组细胞形态发生改变，基质分泌增多，与阴性对照组形成鲜明对比（图8A）。经阿利新蓝染色，诱导组细胞呈现蓝色阳性着色，提示合成了软骨特征性成分酸性糖胺聚糖（图8B）。相比之下，阴性对照组细胞，阿利新蓝染色呈阴性，未见蓝色着色（图8C）。




| 样本名称 | 细胞亚群 | 细胞总数 |
|---|---|---|
| 对照组 | P1 | 12 587 |
| CD73 | P1 | 9 893 |

A. CD73表达

| 样本名称 | 细胞亚群 | 细胞总数 |
|---|---|---|
| 对照组 | P1 | 12 587 |
| CD44 | P1 | 9 969 |

B. CD44表达

| 样本名称 | 细胞亚群 | 细胞总数 |
|---|---|---|
| 对照组 | P1 | 12 587 |
| CD29 | P1 | 9 984 |

C. CD29表达

| 样本名称 | 细胞亚群 | 细胞总数 |
|---|---|---|
| 对照组 | P1 | 12 587 |
| CD45 | P1 | 9 059 |

D. CD45表达

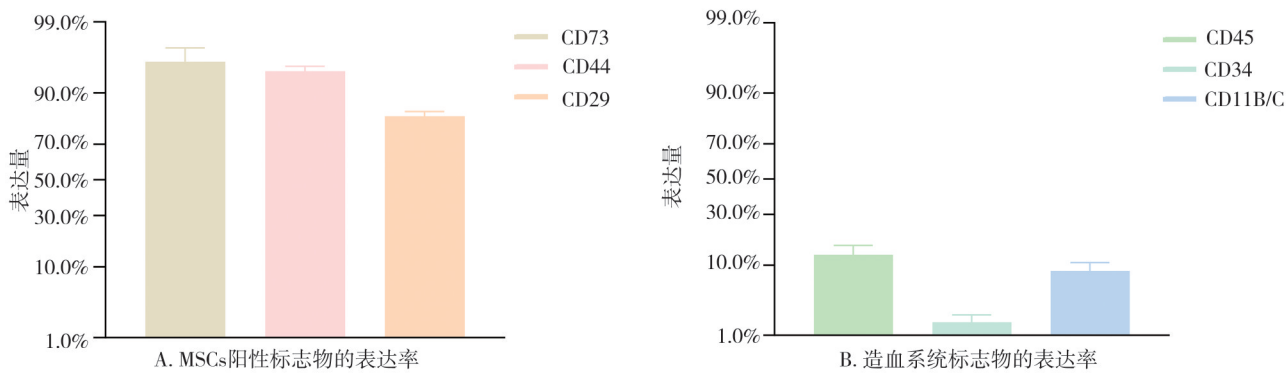
| 样本名称 | 细胞亚群 | 细胞总数 |
|---|---|---|
| 对照组 | P1 | 12 587 |
| CD34 | P1 | 9 856 |

E. CD34表达

| 样本名称 | 细胞亚群 | 细胞总数 |
|---|---|---|
| 对照组 | P1 | 12 587 |
| CD11B/C | P1 | 9 227 |

F. CD11B/C表达

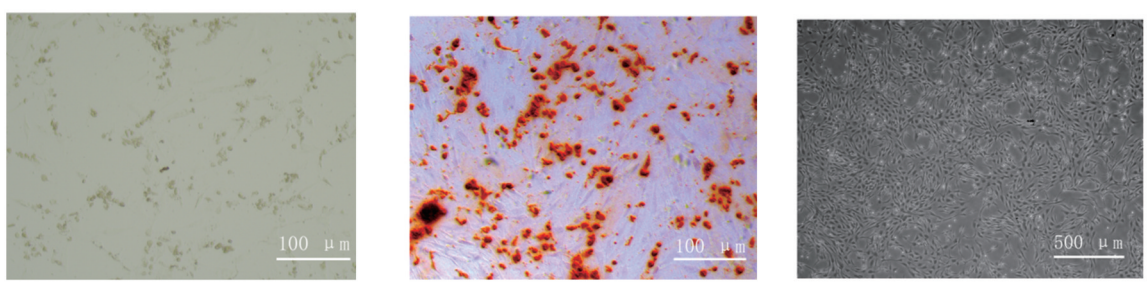
**图4　第4代细胞表面标志物流式检测代表性直方图**




A. MSCs阳性标志物的表达率

B. 造血系统标志物的表达率

**图5　第4代细胞表面标志物3次独立实验的表达分析（$n$=3，$\bar{x} \pm s$）**

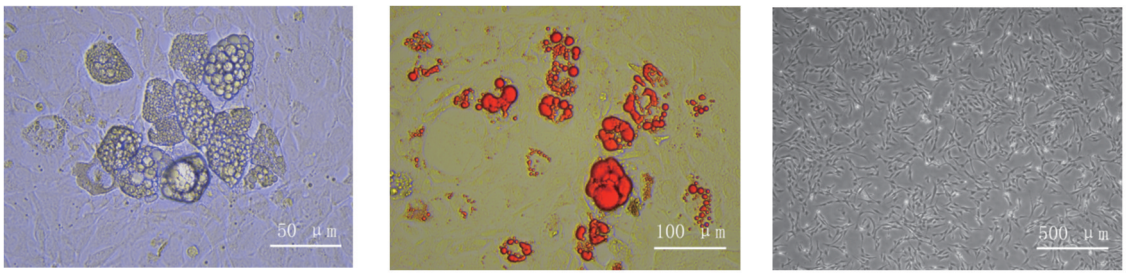



A. 成骨诱导21 d后未染色形态（标尺=100 μm）

B. 茜素红染色后见深红色钙化结节（标尺=100 μm）

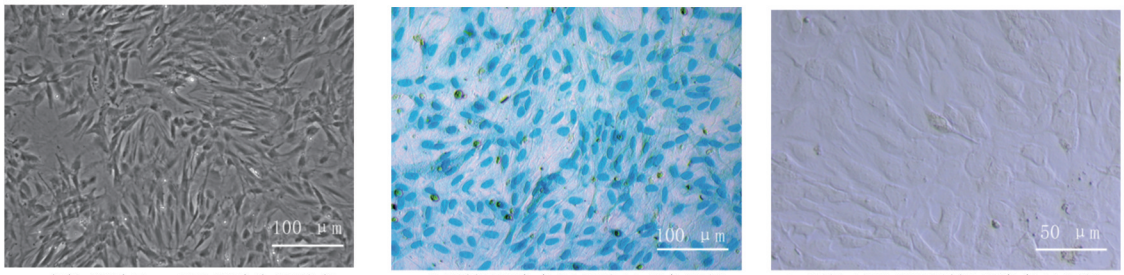
C. 阴性对照组未见矿化结节形成（标尺=500 μm）

**图6　第4代细胞成骨诱导分化鉴定**




A. 成脂诱导14 d后细胞胞内见透亮脂滴（标尺=50 μm）　B. 油红O染色后，脂滴呈鲜红色（标尺=100 μm）　C. 阴性对照组未见脂滴形成（标尺=500 μm）

**图 7　第4代细胞成脂诱导分化鉴定**




A. 成软骨诱导21 d后基质分泌增多（标尺=100 μm）　B. 阿利新蓝染色后细胞呈蓝色阳性（标尺=100 μm）　C. 阴性对照组阿利新蓝染色呈阴性（标尺=50 μm）

**图 8　第4代细胞成软骨诱导分化鉴定**

## 3　讨　论

本研究采用“酶解-组织块序贯法”，与马华根等[3]报道的“主动脉血管干细胞”（仅进行成脂、成骨双系鉴定）相比，本研究严格遵循国际细胞治疗学会标准[11]，完成了成脂、成骨、成软骨三系分化鉴定，从而将所得细胞明确鉴定为“间充质干细胞”，在细胞属性认定上更为精准和规范。此外，本研究通过设置单纯组织块法和单纯酶解法对照组，量化比较了细胞迁出时间、融合效率等指标，直接证实了本序贯法在提高效率和维持细胞功能方面的优势。

本研究针对传统方法缺陷进行了优化。通过有限酶解再组织块培养的序贯设计，辅以原代换液和第4代差速贴壁纯化，有效提高了细胞获取效率和纯度。MSCs具有自我更新与多向分化潜能，已在全球逾千项临床试验中展现出对多种组织损伤的修复作用，为心血管、代谢性、神经系统等疾病提供了药物与手术外的第3种治疗途径，被视为新医学革命的核心推动力[12-17]。传统酶解法常因过度消化损伤细胞膜蛋白，而本方法采用单一胶原酶有限消化，旨在减少这种损伤，从而最大限度地保障细胞表面受体与功能完整性，这可能是第4代细胞CD73、CD44高表达率的原因之一[7,18-19]。传代细胞形态学观察显示，细胞在传代至第8代时仍保持良好增殖活力，且干性标志物表达稳定，证实了本培养体系维持细胞干性的能力。与纯组织块法相比，本方法通过有限酶消化将原代培养时间从约14~21 d缩短至8~10 d[20]；与纯酶解法相比，本方法避免了胰酶对CD73、CD44等膜标志物的降解，流式分析显示表达率>90%[21-22]。该序贯法整合两者优点，在效率与纯度间取得平衡。

本研究亦存在一定局限性，需要在未来工作中加以完善。①本研究仅采用雄性SD大鼠，未能探讨性别差异对腹主动脉MSCs生物学特性的潜在影响。②尽管CD29总体阳性率达（82.5 ± 1.8）%，但其表达水平相较于CD73和CD44略低，提示分离的细胞群体可能存在一定的异质性。未来可借助单细胞核糖核酸（ribonucleic acid，RNA）测序技术，深入解析该群体中的亚群组成及其功能倾向。③本研究主要聚焦于细胞分离、扩增和体外多能性鉴定阶段，其治疗潜力尚需在心肌梗死、肢体缺血或血管钙化等动物疾病模型中进行体内验证。④流式结果显示CD45阳性率（13.0 ± 3.2）%仍高于MSCs的常规标准，尽管通过差速贴壁已明显降低，未来仍需探索更高效的纯化方法（如磁珠分选）以获得更高纯度的MSCs。

综上，本研究建立的“酶解-组织块序贯法”兼具效率与质量优势，所获得的腹主动脉MSCs纯度

高、多能性完整、干性稳定。该方法不仅为血管生物学基础研究提供了可靠的细胞工具，深化了对血管壁驻留干细胞的认识，也为基于MSCs的血管再生医学研究与未来细胞治疗产品开发提供了有潜力的种子细胞来源和可借鉴的标准化分离方案。

**利益冲突** 所有作者声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 赖素玉：实验操作与论文撰写；王奕畅、刘晨璇：实验数据收集与整理；蔡朝英、姜芸：分析数据、论文修订；何颖华、王晓锋：研究设计与文章审阅

## 参 考 文 献

[1] 陆安伟，周 莉. 腹主动脉旁淋巴结切除术中应注意的解剖学问题[J]. 中国实用妇科与产科杂志，2025，41(1)：40-42.
Lu AW，Zhou L. Anatomical issues that should be noted in para-aortic lymphadenectomy[J]. Chin J Pract Gynecol Obstet，2025，41(1)：40-42.

[2] Tao JP，Cao XJ，Yu BQ，et al. Vascular stem/progenitor cells in vessel injury and repair[J]. Front Cardiovasc Med，2022，9：845070.

[3] 马华根，黄 燕，杨盈欣，等. 原代大鼠主动脉血管干细胞的体外培养扩增及鉴定[J]. 南方医科大学学报，2024，44(10)：1881-1886.
Ma HG，Huang Y，Yang YX，et al. Expansion and identification of primary rat aortic vascular stem cells *in vitro*[J]. J South Med Univ，2024，44(10)：1881-1886.

[4] 梁相龙，蒙冬生，黄兴杰，等. 血浆致动脉粥样硬化指数与腹主动脉钙化的关系[J]. 医学信息，2025，38(6)：100-105，112.
Liang XL，Meng DS，Huang XJ，et al. Relationship between atherogenic index of plasma and abdominal aortic calcification[J]. Med Inf，2025，38(6)：100-105，112.

[5] Grootaert MOJ，Bennett MR. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis：time for a re-assessment[J]. Cardiovasc Res，2021，117(11)：2326-2339.

[6] 陈思铭，胡加伟，李丽丽，等. 两种方法提取人脐带间充质干细胞三维培养生物学特性的比较[J]. 中国组织工程研究，2022，26(19)：2997-3003.
Chen SM，Hu JW，Li LL，et al. Comparison of biological characteristics of two kinds of primary isolated human umbilical cord mesenchymal stem cells under three-dimensional culture[J]. Chin J Tissue Eng Res，2022，26(19)：2997-3003.

[7] Mattei V，Santilli F，Pulcini F，et al. Validated methods for isolation and qualification of mesenchymal stromal/stem cells from different sources[J]. J Transl Med，2025，23(1)：975.

[8] Zheng SX，Gao YY，Chen K，et al. A robust and highly efficient approach for isolation of mesenchymal stem cells from Wharton's jelly for tissue repair[J]. Cell Transplant，2022，31：09636897221084354.

[9] Zhong LL，Yao LT，Qin L. A novel enzymatic digestion approach for isolation and culture of rodent bone marrow mesenchymal progenitors[J]. Methods Mol Biol，2021，2221：29-39.

[10] 袁 涛，刘文杰，王 蕾，等. 组织块法与酶消化法培养人脐带间充质干细胞的比较[J]. 生殖医学杂志，2021，30(6)：780-786.
Yuan T，Liu WJ，Wang L，et al. Tissue explant method versus enzymatic digestion method for culture of human umbilical cord mesenchymal cells[J]. J Reprod Med，2021，30(6)：780-786.

[11] Renesme L，Pierro M，Cobey KD，et al. Definition and characteristics of mesenchymal stromal cells in preclinical and clinical studies：a scoping review[J]. Stem Cells Transl Med，2022，11(1)：44-54.

[12] Scott SS，Yang XH，Robich M，et al. Differentiation capacity of human aortic perivascular adipose progenitor cells[J]. J Vis Exp，2019(145)：e59337.

[13] Maldonado VV，Patel NH，Smith EE，et al. Clinical utility of mesenchymal stem/stromal cells in regenerative medicine and cellular therapy[J]. J Biol Eng，2023，17(1)：44.

[14] 谢 丹，欧阳石. 茵陈蒿汤协同脐带间充质干细胞所释放的外泌体对急性肝衰竭及肝细胞焦亡的影响[J]. 实用医学杂志，2023，39(23)：3034-3042.
Xie D，Ouyang S. Effect of Yinchenhao Decoction combined with exosomes derived from umbilical cord mesenchymal stem cells on acute liver failure and hepatocyte pyroptosis[J]. J Pract Med，2023，39(23)：3034-3042.

[15] Zhu PC，Tan HT，Gao HB，et al. Potential mechanism and perspectives of mesenchymal stem cell therapy for ischemic stroke：a review[J]. Glob Med Genet，2024，11(4)：278-284.

[16] Rash BG，Ramdas KN，Agafonova N，et al. Allogeneic mesenchymal stem cell therapy with laromestrocel in mild Alzheimer's disease：a randomized controlled phase 2a trial[J]. Nat Med，2025，31(4)：1257-1266.

[17] Kurniawan M，Ramli Y，Putri ND，et al. Mesenchymal stem cells therapy for chronic ischemic stroke-a systematic review[J]. Asian Biomed，2024，18(5)：194-203.

[18] Stefańska K，Ożegowska K，Hutchings G，et al. Human Wharton's jelly-cellular specificity，stemness potency，animal models，and current application in human clinical trials[J]. J Clin Med，2020，9(4)：1102.

[19] Siginc HI，Batukan M，Sener S，et al. Effect of enzymatic and non-enzymatic isolation methods on the differentiation potential of endometrial mesenchymal stem cells[J]. Gene，2025，962：149569.

[20] Hori A，Takahashi A，Miharu Y，et al. Superior migration ability of umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells (MSCs) toward activated lymphocytes in comparison with those of bone marrow and adipose-derived MSCs[J]. Front Cell Dev Biol，2024，12：1329218.

[21] Abatay Sel F，Erol A，Suleymanoglu M，et al. Easy and rapid methods for human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells and human umbilical Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells[J]. Methods Mol Biol，2024，2736：77-84.

[22] Gao S，Jin YQ，Ma JL，et al. Preclinical study of human umbilical cord mesenchymal stem cell sheets for the recovery of ischemic heart tissue[J]. Stem Cell Res Ther，2022，13(1)：252.

**(收稿：2025-11-20；修回：2026-01-21；录用：2026-02-25)**

(责任编辑：曾 玲)

本文引用格式：

赖素玉，王奕畅，刘晨璇，等. 基于酶解-组织块序贯法分离、培养与鉴定大鼠腹主动脉来源间充质干细胞[J]. 重庆医科大学学报，XXXX，XX(XX)：1-7.