

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.45.012

[http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

黎洪棉, 柳大烈, 赵培冉, 梁双武. 脂肪干细胞与自体富血小板血浆载体复合物体内构建血管化组织工程脂肪[J].
中国组织工程研究, 2012, 16(45):8424-8429.

脂肪干细胞与自体富血小板血浆载体复合物体内构建血管化组织工程脂肪***

黎洪棉^{1, 2}, 柳大烈³, 赵培冉⁴, 梁双武⁴

¹ 中山大学附属中山医院博士后科研工作站, 整形美容外科, 广东省中山市 528403;
² 南方医科大学博士后科研流动站, 广东省广州市 510515;
³ 南方医科大学珠江医院整形外科, 广东省广州市 510282;
⁴ 南方医科大学组织工程研究中心, 广东省广州市 510515

黎洪棉☆, 男, 1971年生, 广西壮族, 2008年毕业于南方医科大学, 博士后, 副主任医师, 硕士生导师, 主要从事整形美容外科和干细胞、组织工程与再生医学的研究。
binrong2112@163.com

通讯作者: 柳大烈, 教授, 主任医师, 博士(后)导师, 南方医科大学珠江医院整形外科, 广东省广州市 510282
Liudalie@hotmail.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344
(2012)45-08424-06

收稿日期: 2012-01-02
修回日期: 2012-01-09
(20111117004/WL·S)

文章亮点: 实验观察脂肪干细胞与自体富血小板血浆和纤维蛋白胶载体复合物在体内构建血管化组织工程脂肪的可行性, 结果提示脂肪干细胞与富血小板血浆能够促进组织工程脂肪组织形成, 并促进血管形成。

关键词: 人脂肪干细胞; 自体富血小板血浆; 组织工程; 脂肪形成; 血管发生; 干细胞

摘要

背景: 血运重建机制是组织工程化脂肪组织成功构建的决定性因素。

目的: 观察脂肪干细胞与自体富血小板血浆和纤维蛋白胶载体复合物在体内构建血管化组织工程脂肪的可行性。

方法: 从健康成年人吸脂术后的脂肪组织中分离脂肪干细胞并行原代及传代培养, 将第3代经 BrdU 标记的脂肪干细胞向脂肪细胞定向诱导 2 周后, 制成浓度为 $5 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ 细胞悬液。由 0.5 mL 细胞悬液、100 μL 富血小板血浆工作液或 DMEM 培养基与 0.5 mL 纤维蛋白胶组成实验组和对照组移植, 分别植入裸鼠背部皮下。

结果与结论: 植入后 8 周取材: ①实验组可见血管明显增生并长入材料, 呈轻度纤维包裹; 对照组有少量血管长入材料中, 也有轻度纤维包裹现象。实验组新生组织湿质量大于对照组 ($P < 0.01$)。②苏木精-伊红染色均可见移植植物中有新生脂肪组织形成和不同程度的微血管长入; 实验组微血管数多于对照组 ($P < 0.01$)。③新生组织免疫荧光染色示, 两组新生脂肪细胞的胞核及部分微血管内皮细胞的胞核呈现绿色荧光。说明脂肪干细胞与自体富血小板血浆和纤维蛋白胶载体复合物在体内可构建血管化组织工程脂肪, 脂肪干细胞与自体富血小板血浆共同参与新生脂肪组织的血管化过程, 自体富血小板血浆能促进组织工程构建物的血运重建, 保证更多种子细胞的成活。

Construction of vascularized adipose using adipose-derived stem cells and autogenic platelet-rich plasma carrier complex *in vivo* by tissue engineering

Li Hong-mian^{1, 2}, Liu Da-lie³, Zhao Pei-ran⁴, Liang Shuang-wu⁴

Abstract

BACKGROUND: Revascularization mechanism is a determinantal factor of successful construction of adipose tissue by tissue engineering.

OBJECTIVE: To investigate the feasibility of construction of vascularized adipose using adipose-derived stem cells and autogenic platelet-rich plasma carrier complex *in vivo* by tissue engineering.

METHODS: Adipose-derived stem cells were isolated from the subcutaneous adipose tissue of healthy adult after liposuction, and primary culture and subculture of adipose-derived stem cells were conducted. After being induced towards adipocytes for 2 weeks, $5 \times 10^{10}/\text{L}$ passage 3 cell suspension labeled by BrdU was prepared. Two groups were included: experimental group, in which 0.5 mL cell suspension, 100 μL platelet-rich plasma and 0.5 mL fibrin glue were implanted into the subcutaneous fascia of nude mice; control group in which 0.5 mL cell suspension, 100 μL DMEM and 0.5 mL fibrin glue were implanted into the subcutaneous fascia of nude mice.

RESULTS AND CONCLUSION: At 8 weeks after surgery, neogenetic vessels grew into the scaffolds and mild fiber encapsulation was observed in the experimental group, while few vessels grew into the scaffolds and mild fiber encapsulation was also observed in the control group. The wet weight of cambium in the experimental group was higher than that in the control group ($P < 0.01$). Hematoxylin-eosin staining showed the formation of neogenetic adipose tissues and the growth of microvessels in the implant. The number of microvessels in the experimental group was greater than that in the control group ($P < 0.01$). The immunofluorescence staining of cambium showed that the cell nucleus of regenerated adipocytes and partial capillary endothelium in both groups presented green fluorescence. It is feasible to prepare vascularized adipose using adipose-derived stem cells and autogenic platelet-rich plasma carrier complex *in vivo* by tissue engineering. Adipose-derived stem cells and autogenic platelet-rich plasma participate in

neovascularization of neogenetic adipose tissue. The autogeneic platelet-rich plasma can promote revascularization of tissue-engineered complex and ensure survival of more seed cells.

Li HM, Liu DL, Zhao PR, Liang SW. Construction of vascularized adipose using adipose-derived stem cells and autogeneic platelet-rich plasma carrier complex in vivo by tissue engineering. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(45):8424-8429.

¹Postdoctoral Research Center, Department of Plastic and Aesthetic Surgery, the Affiliated Zhongshan Hospital of Sun Yat-Sen University, Zhongshan 528403, Guangdong Province, China; ²Postdoctoral Research Center, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China; ³Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 501282, Guangdong Province, China; ⁴Research Center for Tissue Engineering, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Li Hong-mian ☆, Doctor, Associate chief physician, Master's supervisor, Postdoctoral Research Center, Department of Plastic and Aesthetic Surgery, the Affiliated Zhongshan Hospital of Sun Yat-Sen University, Zhongshan 528403, Guangdong Province, China binrong2112@163.com

Corresponding author: Liu Da-lie, Professor, Chief physician, Doctoral supervisor, Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 501282, Guangdong Province, China Liudalie@hotmail.com

Supported by: China Postdoctoral Science Research Foundation, No. 20090450910*; Medical Scientific Research Foundation of Guangdong Province, No. A2011739*; Science and Technology Development Program of Zhongshan, No. 20113A008*

Received: 2012-01-02
Accepted: 2012-01-09

0 引言

组织工程化构建物植入体内后血运重建机制的研究是目前组织工程学研究领域中的重点和难点, 是关系到工程化组织是否能成功应用于临床的决定性因素^[1-3]。

本实验是在前期实验证实外源性血管内皮生长因子与脂肪干细胞载体复合物体内成功构建血管化组织工程脂肪的基础上^[4], 进一步探讨自体富血小板血浆与脂肪干细胞载体复合物在体内构建血管化组织工程脂肪的可行性, 为脂肪干细胞的高效移植以及寻找组织工程构建物血运重建的理想方法提供实验依据和理论基础。

1 材料和方法

设计: 细胞观察与组织构建实验。

时间及地点: 实验于2010年3月至5月在南方医科大学组织工程研究中心完成。

材料: 裸鼠20只, 平均体质量20 g, 雌雄不拘, 由南方医科大学实验动物中心提供, 机构许可证号: SYXK(粤)2005-0052, 所有动物用标准饲料进行饲养。

与供者签订知情同意书后, 取健康成年人吸脂后的脂肪组织及全血10 mL用于实验。

主要试剂:

试剂	来源
胎牛血清、DMEM 高糖培养基	HyClone 公司, 美国
地塞米松、胰岛素、异丁基甲基黄嘌呤、吡啶美辛、胰蛋白酶、抗坏血酸、β-磷酸甘油钠、BrdU、转化生长因子β1、转铁蛋白、维生素C磷酸酯、油红O、茜素红及阿利辛蓝, 鼠抗人抗BrdU, 羊抗鼠IgG-FITC	Sigma 公司
外科用冻干人纤维蛋白原及溶解液、外科用冻干人凝血酶	华兰生物工程股份有限公司

主要仪器:

仪器	来源
倒置相差显微镜	Olympus, Japan
荧光显微镜	Nikon, Japan
CO ₂ 细胞培养箱, 高速离心机	Heraeus
超净工作台	Nuair
微量电子天平	Startorius BP-190S

实验方法:

脂肪干细胞分离培养、传代培养及鉴定^[5]: 取健康成年人吸脂术后的脂肪组织5 mL, PBS反复冲洗后, 用I型胶原酶消化进行原代细胞分离和接种培养。24 h后换液1次, 以后每3 d换液1次。6-8 d细胞生长融合达80%-90%后, 经0.25%胰蛋白酶消化, 按1:3进行传代培养。选取生长良好的第3代细胞(免疫荧光染色CD29、CD44均为高表达, 另文发表)做多向分化及体内实验。倒置相差显微镜下观察原代及传代脂肪干细胞形态及生长状况。

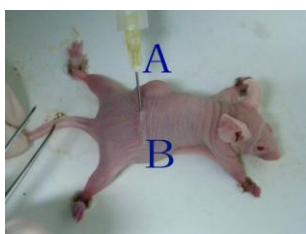
富血小板血浆的提取: 抽取同一吸脂术人的全血10 mL(预先加入10%枸橼酸钠抗凝剂), 采用改良的Appel法^[6], 1 000 r/min离心15 min, 吸取上层血浆及血小板, 3 000 r/min离心8 min, 弃上层血浆, 将剩余液体与激活剂(凝血酶与10%CaCl₂的混合物)以9:1比例混合, 振荡, 4℃冰箱过夜, 血凝块充分收缩后1 000 r/min再离心10 min, 吸取全部上清液, 此上清液即富血小板血浆, 约0.5 mL, 同时进行全血及富血小板血浆血小板计数, 以确保富血小板血浆中血小板的数量是全血的3-5倍为宜, 最后配制成体积分数1%的富血小板血浆保存备用。

脂肪干细胞的多向分化鉴定及移植前标记: 取第3代脂肪干细胞进行接种培养, 参照文献^[5]的方法, 待脂肪干细胞生长至瓶底70%-80%面积时, 更换含BrdU(10 mg/L)的培养液培养48 h对细胞进行标记, 行免疫荧光染色, 一抗为鼠抗人抗BrdU, 二抗为羊抗鼠IgG-FITC, 荧光

显微镜下观察细胞标记情况, 同时设立不加BrdU的细胞为对照组。然后改用向脂肪细胞分化的诱导培养基(含体积分数为10%胎牛血清, 1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松, 10 $\mu\text{mol/L}$ 胰岛素, 200 $\mu\text{mol/L}$ 吡哆美辛, 0.5 mmol/L异丁基甲基黄嘌呤)定向诱导, 2周后行油红O染色定性观察诱导结果。取第3代BrdU标记的脂肪干细胞接种培养, 生长至瓶底70%–80%面积时, 改用向成骨细胞分化的诱导培养基(含体积分数为10%胎牛血清, 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松, 50 $\mu\text{mol/L}$ 抗坏血酸和10 mmol/L的 β -磷酸甘油)定向诱导, 3周后行茜素红染色定性观察诱导结果。取第3代BrdU标记的脂肪干细胞接种培养, 生长至瓶底100%面积时, 改用向软骨细胞分化的诱导培养基(含体积分数为10%胎牛血清, 10 $\mu\text{g/L}$ 转化生长因子 β 1, 6.25 mg/L胰岛素, 6.25 mg/L转铁蛋白以及50 $\mu\text{mol/L}$ 维生素C磷酸酯)定向诱导, 2周后行阿利辛蓝染色定性观察诱导结果。

细胞载体复合物(移植体)的制备与体内植入: 取第3代经BrdU标记的脂肪干细胞向脂肪细胞定向诱导2周后, 制成 $5 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ 细胞悬液, 同时将富血小板血浆配成体积分数1%工作液, 将0.5 mL细胞悬液、100 μL 富血小板血浆工作液或DMEM培养基与0.5 mL纤维蛋白胶制备成细胞载体复合物。

干预分组: 实验分为2组, 实验组移植体由0.5 mL细胞悬液、100 μL 富血小板血浆工作液与0.5 mL纤维蛋白胶组成; 对照组由0.5 mL细胞悬液、100 μL DMEM培养基与0.5 mL纤维蛋白胶组成, 分别植入裸鼠背部皮下, 见图1。植入后8周取出移植体, 经苏木精-伊红染色鉴定新生组织性质, 测定两组新生组织的湿质量和微血管数, 并采用免疫荧光染色鉴定新生组织及微血管内皮的来源。



A: Experimental group: cell carrier complex of adipose-derived stem cells (ADSMs), autogeneic platelet-rich plasma combined with fibrin glue were implanted into the subcutaneous fascia; B: control group: cell carrier complex of ADSMs, DMEM combined with fibrin glue were implanted

Figure 1 Implantation of cell carrier complex into the subcutaneous fascia of nude mice
图1 细胞载体复合物植入裸鼠背部皮下筋膜层

主要观察指标: ①新生组织大体观察。移植体植入后

8周, 将裸鼠全部处死取材, 观察移植区域内有无新生组织形成, 大体观察新生组织的形态及胶原支架残留情况; 小心将新生组织剥离下来, 立即用电子天平称出新生物的湿质量, 然后将组织块用40 g/L多聚甲醛固定、乙醇脱水, 石蜡包埋, 蜡块分别作标记, 用于做苏木精-伊红染色及免疫荧光染色。②组织学检测。石蜡标本切片行常规苏木精-伊红染色观察新生组织的性质, 并于200倍光镜下, 在切片上随机选择10个非重叠视野计算微血管数, 取平均值。③免疫荧光染色观察BrdU鉴定新生组织及微血管内皮的来源。石蜡切片行BrdU免疫荧光标记染色。

统计学分析: 由第一作者采用SPSS 11.5软件完成统计处理, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 脂肪干细胞形态学观察 原代细胞培养6 h后开始有少量成纤维细胞样细胞散在贴壁, 大部分未贴壁细胞为球形或圆形; 24 h后大部分贴壁细胞呈宽大扁平的成纤维细胞样细胞, 少量为三角形、多边形细胞; 随培养时间延长, 贴壁细胞呈大小不一的集落状生长, 细胞呈典型的长梭形。传代后细胞形态主要为梭形, 其生长速度较原代细胞明显增快; 连续传代培养至15代, 细胞未出现明显衰老现象, 见图2。

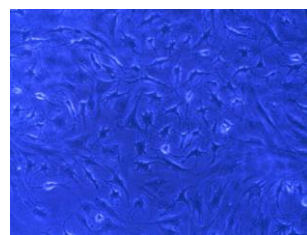


Figure 2 Passage 3 adipose-derived stem cells exhibited a shuttle-shaped appearance as observed by inverted phase contrast microscope ($\times 100$)
图2 倒置相差显微镜观察第3代脂肪干细胞生长呈梭形 ($\times 100$)

2.2 免疫荧光染色观察细胞标记情况 脂肪干细胞经BrdU标记后行免疫荧光染色, 荧光显微镜下观察示BrdU标记为阳性的脂肪干细胞胞核呈绿色荧光, 脂肪干细胞的阳性标记率 $>90\%$, 见图3。

2.3 脂肪干细胞的多向分化鉴定 第3代脂肪干细胞经成脂诱导2周, 可见细胞内有透亮的脂滴形成, 油红O染色可见脂滴被染成红色, 见图4a; 成骨诱导3周, 可见钙化结节样改变, 茜素红染色结节呈红色, 见图4b; 成软骨诱导2周后, 可见高度聚集生长的细胞团, 呈斑

片状或结节状, 周围细胞呈放射状, 阿利辛蓝染色提示结节及周围聚集的细胞呈蓝色, 见图4c。

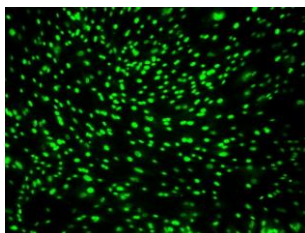
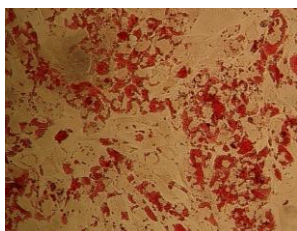
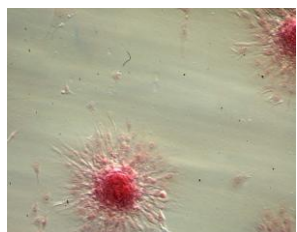


Figure 3 Immunofluorescence staining observation of adipose-derived stem cells labeled by BrdU and cell nucleus showed green fluorescence (fluorescent microscope, $\times 100$)

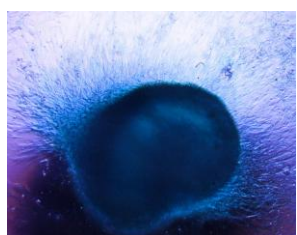
图3 荧光显微镜观察脂肪干细胞经 BrdU 标记后, 胞核呈绿色荧光(免疫荧光染色, $\times 100$)



a: ADSCs positive for oil red O staining 2 wk after adipocyte induction



b: ADSCs positive for alizarin red staining 3 wk after osteoblast induction

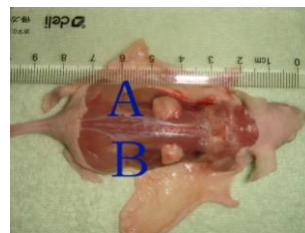


c: ADSCs positive for alcian blue staining 2 wk after osteoblast induction

Figure 4 Identification of multi-differentiation of adipose-derived stem cells (ADSCs) ($\times 100$)

图4 脂肪干细胞的多向分化鉴定($\times 100$)

2.4 新生组织的大体观察 植入后动物生长状况良好。植入后8周取材过程中, 实验组血管增生并长入材料, 可见轻度纤维包裹现象; 对照组有少量血管长入材料中, 也有轻度纤维包裹现象, 见图5。实验组和对照组新生组织湿质量分别为(0.152 ± 0.014 1) g和(0.085 ± 0.010 5) g, 两组相比, 差异有显著性意义($P < 0.01$)。

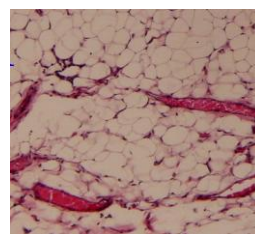


A: Experimental group; **B:** Control group

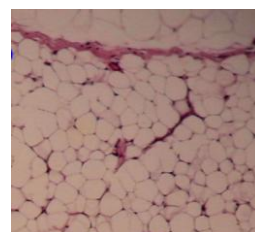
Figure 5 Gross observation of cambium

图5 两组新生组织大体观察

2.5 新生组织的组织学观察 两组移植与皮下筋膜间界面清晰, 充满细胞成分, 苏木精-伊红染色均可见移植中有新生脂肪组织形成和不同程度的微血管长入新生组织中, 绝大部分支架材料已被降解吸收, 见图6。实验组和对照组微血管数分别为(45.8 ± 5.3)和(18.3 ± 3.6), 两组相比, 差异有显著性意义($P < 0.01$)。



a: Experimental group

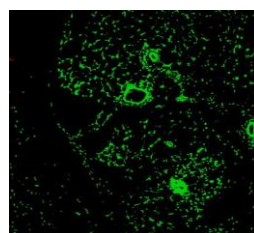


b: Control group

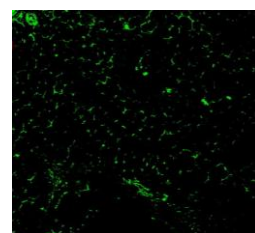
Figure 6 Hematoxylin-eosin staining of cambium ($\times 200$)

图6 两组新生组织苏木精-伊红染色观察($\times 200$)

2.6 新生组织免疫荧光染色观察 两组新生组织行BrdU免疫荧光标记染色, 荧光显微镜下可见所有脂肪细胞的胞核及部分血管内皮细胞呈绿色荧光, 见图7。



a: Experimental group



b: Control group

Figure 7 Immunofluorescence double-labeling staining of cambium ($\times 200$)

图7 两组新生脂肪组织 BrdU 免疫荧光双标染色观察($\times 200$)

3 讨论

组织工程构建物是干细胞与支架材料的复合物植入体内后分化为成熟终末组织的过程, 细胞载体复合物本身无营养来源, 体积小的组织可通过周围组织液渗透获得营养, 使其逐渐与周围组织建立血液循环获得营养; 而构建体积较大的组织工程组织时, 细胞仅靠渗透作用来建立血运的能力极为有限^[7-8], 因此, 在建立血循环之前, 复合在支架材料上的细胞已死亡。实验是在前期实验证实外源性血管内皮生长因子与脂肪干细胞载体复合物体内成功构建血管化组织工程脂肪的基础上^[4], 对自体富血小板血浆与脂肪干细胞载体复合物在体内构建血管化组织工程脂肪的可行性作了进一步的探讨。

从脂肪组织中分离培养出来的细胞, 经诱导后能向脂肪细胞、成骨细胞及软骨细胞分化, 说明这种来源于脂肪的间质细胞具有多向分化潜能, 本实验进一步证实分离培养的细胞为间充质干细胞。研究表明, 在体外经成脂诱导的脂肪干细胞与支架复合植入体内后可分化为成熟的脂肪细胞^[9-10]。因脂肪干细胞与骨髓间充质干细胞存在相似的生物学特性^[11-13], 且具有取材方便、供区创伤小、扩增速度快、在体外长期培养过程中能保持稳定的遗传信息以及低水平衰老等优点, 使脂肪干细胞从众多种子细胞中脱颖而出, 有望成为今后理想的组织工程种子细胞来源^[14-17]。

自体富血小板血浆是通过离心分离自体全血而得到的血小板浓缩物。由于富血小板血浆来源于自体, 无免疫排斥, 制作简单, 并发症少, 近年来研究证实, 富血小板血浆能促进牙周组织再生、骨或关节软骨以及皮肤软组织的修复与重建^[18-19], 富血小板血浆还具有诱导和促进间充质干细胞的增殖与分化作用^[20-21]。富血小板血浆不仅含有高浓度的血小板, 还含有所有的凝血因子。已证实富血小板血浆内含有多种能促进组织修复和再生的生长因子, 目前检测到的有: 血小板源性生长因子、血管内皮生长因子、胰岛素样生长因子 I 和 II、转化生长因子 $\beta 1$ 和 $\beta 2$ 、表皮生长因子等。血小板源性生长因子和转化生长因子 $\beta 1$ 制成凝胶状后, 可用于修补组织缺损, 并在局部能较长时间保持较高的生长因子浓度。作者认为, 经过纤维蛋白凝胶作为携带载体后的富血小板血浆有如下优点: ①富血小板血浆是自源性的, 不会出现外源性生长因子的免疫排斥反应, 也不会有异体移植中存在的传播疾病的危险。②富血小板血浆中有多种高浓度的生长因子, 各种生长因子的比例与体内正常比

例相符, 使生长因子之间有最佳的协同作用^[22]。这在一定程度上弥补了单一生长因子使组织修复与再生结果不佳的缺点。③富血小板血浆可用凝血酶凝固成胶冻状, 不仅可以黏合组织缺损处, 还可以防止血小板的流失, 使血小板在局部长时间分泌生长因子, 保持较高的生长因子浓度, 避免了目前广泛应用于临床的液态重组生长因子试剂在伤口及移植区易流失易蒸发的缺点。④富血小板血浆含有大量纤维蛋白, 为修复细胞和组织再生提供良好的支架, 还可以收缩创面具有促凝血的作用, 可刺激软组织再生, 促进伤口早期闭合和防止感染^[23]。⑤由于白细胞和单核细胞与血小板在血液中的沉降系数相近, 所以经离心法制作的富血小板血浆中还含有较多的白细胞和单核细胞, 这可以更好地起到防止感染的作用。⑥对患者的损伤小且制作简单, 能有效降低医疗成本, 减轻患者经济负担。

本实验中, 移植 8 周后取出, 组织学检测发现实验组和对照组均见不同程度的新生脂肪组织形成, 实验组的平均湿质量和新生微血管数明显大于对照组, 由于富血小板血浆中含有血小板源性生长因子和血管内皮生长因子, 这两种生长因子对移植早期的血管发生与血运重建有着极为重要的作用, 同时富血小板血浆中的表皮生长因子能够提高脂肪干细胞的成脂分化能力, 可见自体富血小板血浆能促进移植种子细胞的存活及血管化过程, 因而可构建出体积较大的组织工程脂肪, 但其具体的分子机制尚不清楚。从免疫荧光染色结果表明, 胞核呈绿色的脂肪细胞和部分新生血管内皮细胞是由外源性植入的脂肪干细胞分化而来; 表明外源性植入的脂肪干细胞和内源性的血管内皮共同参与了新生脂肪组织的血管化过程; 这种内源性的内皮细胞最有可能来自皮下组织的毛细血管网。由此可见, 自体富血小板血浆能够更好地促进移植种子细胞的血管化过程, 加速移植血运重建的速度, 从而保证更多的种子细胞成活。这种血管化的组织工程脂肪在移植时比非血管化的组织工程脂肪移植更易于成活, 提示运用组织工程技术预构血管化的组织工程脂肪对临床工作具有重要意义^[24], 其进一步的分子机制以及如何构建更大体积的组织工程化脂肪是今后的研究方向。

4 参考文献

- [1] Traktuev DO, Prater DN, Merfeld-Clauss S, et al. Robust functional vascular network formation in vivo by cooperation of adipose progenitor and endothelial cells. *Circ Res.* 2009; 104(12):1410-1420.

- [2] Jabbarzadeh E, Starnes T, Khan YM, et al. Induction of angiogenesis in tissue-engineered scaffolds designed for bone repair: a combined gene therapy-cell transplantation approach. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(32):11099-11104.
- [3] Chan LK. Current thoughts on angiogenesis. *J Wound Care*. 2009;18(1):12-16.
- [4] Li HM, Gao JH, Wu T, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2011;15(40):7480-7484. 黎洪棉, 高建华, 吴涛, 等. 脂肪干细胞与外源性血管内皮生长因子及纤维蛋白胶复合体内构建血管化组织工程脂肪[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(40):7480-7484.
- [5] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7(2):211-228.
- [6] Appel TR, Pösch B, Müller J, et al. Comparison of three different preparations of platelet concentrates for growth factor enrichment. *Clin Oral Implants Res*. 2002; 13(5): 522-528.
- [7] Colton CK. Implantable biohybrid artificial organs. *Cell Transplant*. 1995;4(4):415-436.
- [8] Cassell OC, Hofer SO, Morrison WA, et al. Vascularisation of tissue-engineered grafts: the regulation of angiogenesis in reconstructive surgery and in disease states. *Br J Plast Surg*. 2002;55(8):603-610.
- [9] Meliga E, Strem BM, Duckers HJ, et al. Adipose-derived cells. *Cell Transplant*. 2007;16(9):963-970.
- [10] Lin SD, Wang KH, Kao AP. Engineered adipose tissue of predefined shape and dimensions from human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2008;14(5):571-581.
- [11] Li HM, Gao JH, Lu F, et al. *Zhongguo XiuFu ChongJian Waiké Zazhi*. 2008;22(1):97-101. 黎洪棉, 高建华, 鲁峰, 等. BrdU标记家兔脂肪组织来源干细胞的体外研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2008, 22(1):97-101.
- [12] Zaminy A, Ragerdi Kashani I, Barbarestani M, et al. Osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells: melatonin as a differentiation factor. *Iran Biomed J*. 2008;12(3):133-141.
- [13] De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs*. 2003;174(3):101-109.
- [14] Moseley TA, Zhu M, Hedrick MH. Adipose-derived stem and progenitor cells as fillers in plastic and reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg*. 2006;118(3 Suppl):121S-128S.
- [15] Vallée M, Côté JF, Fradette J. Adipose-tissue engineering: taking advantage of the properties of human adipose-derived stem/stromal cells. *Pathol Biol (Paris)*. 2009;57(4):309-317.
- [16] Vermette M, Trottier V, Menard V, et al. Production of a new tissue-engineered adipose substitute from human adipose-derived stromal cells. *Biomaterials*. 2007;28(18):2850-2860.
- [17] Yang P, Yin S, Cui L, et al. *Zhongguo XiuFu ChongJian Waiké Zazhi*. 2008;22(4):481-486. 杨平, 尹烁, 崔磊, 等. 脂肪干细胞向血管平滑肌细胞诱导的实验研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2008, 22(4):481-486.
- [18] Lin MK, Chen XL, Zhao X, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2010;14(2):209-213. 林敏魁, 陈小玲, 赵欣, 等. 不同浓度凝血酶对富血小板血浆修复颅骨缺损的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(2): 209-213.
- [19] Hao TZ, Zhu JM, Hu WB. *Zhongguo XiuFu ChongJian Waiké Zazhi*. 2010;24(6):647-649. 郝天智, 朱敬民, 扈文博. 自体富血小板血浆凝胶联合脱细胞异种真皮基质治疗深II度烧烫伤[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2010, 24(6):647-649.
- [20] Cao W, Yao GH, Chen YH, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2010;14(45):8373-8376. 曹文, 姚光慧, 陈玉华, 等. 富血小板血浆体外培养骨髓间充质干细胞的增殖与胶原产生[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(45):8373-8376.
- [21] Ding CR, Yang XY, Han YQ, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2010;14(27): 4946-4950. 丁昌荣, 杨选影, 韩迎秋, 等. 富血小板血浆诱导骨髓间充质干细胞结合化学萃取去细胞神经修复坐骨神经缺损[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(27):4946-4950.
- [22] Rai B, Ho KH, Lei Y, et al. Polycaprolactone-20% tricalcium phosphate scaffolds in combination with platelet-rich plasma for the treatment of critical-sized defects of the mandible: a pilot study. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007;65(11):2195-2205.
- [23] Lee HW, Reddy MS, Geurs N, et al. Efficacy of platelet-rich plasma on wound healing in rabbits. *J Periodontol*. 2008; 79(4):691-696.
- [24] Stosich MS, Moiola EK, Wu JK, et al. Bioengineering strategies to generate vascularized soft tissue grafts with sustained shape. *Methods*. 2009;47(2):116-121.

来自本文课题的更多信息——

基金资助: 中国博士后科学基金(20090450910); 广东省医学科研基金项目(A2011739); 中山市科技计划项目(20113A008)。

作者贡献: 第一作者进行实验设计及实验实施, 实验评估为全部作者, 资料收集为第三、四作者, 第一作者成文, 通讯作者审校, 第一作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

成人脂肪组织取自吸脂手术患者, 与供者签订知情同意书。

研究的创新之处与不足: 应用自体富血小板血浆与脂肪干细胞植入体内构建组织工程化脂肪, 证实是可行的, 这是实验的创新点, 不足之处在于没有进一步作分子机制和蛋白质组学方面的研究, 这是今后的研究方向。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。