

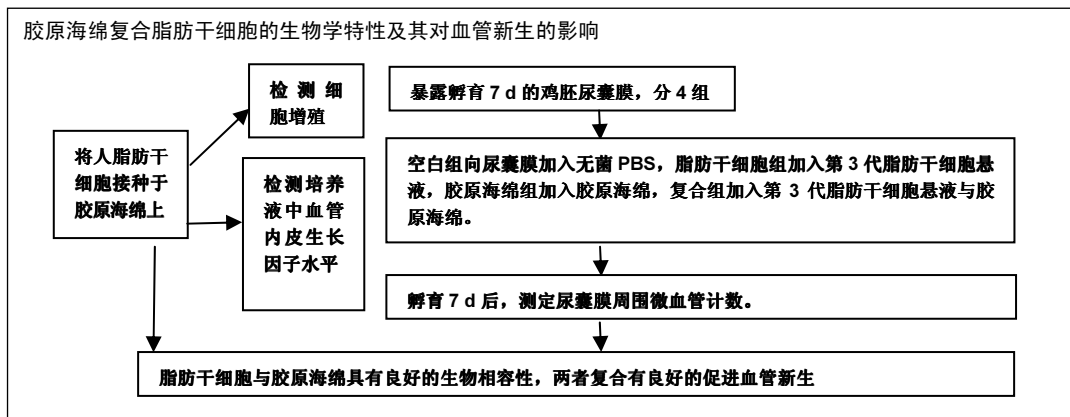
# 胶原海绵复合人脂肪干细胞促血管新生

薛静娴<sup>1</sup>, 陈 绪<sup>1</sup>, 许岩磊<sup>1</sup>, 任伟业<sup>2</sup>, 李 燕<sup>2</sup>, 张宇轩<sup>1</sup>, 姚 昶<sup>1</sup> (1南京中医药大学附属医院, 江苏省南京市 210029; 2无锡贝迪生物工程有限公司, 江苏省无锡市 214902)

引用本文: 薛静娴, 陈绪, 许岩磊, 任伟业, 李燕, 张宇轩, 姚昶. 胶原海绵复合人脂肪干细胞促血管新生[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(22): 3531-3535.

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2017.22.015 ORCID: 0000-0002-7264-1478(薛静娴)

文章快速阅读:



薛静娴, 女, 1990 年生, 江苏省盐城市人, 汉族, 南京中医药大学在读博士, 主要从事中医乳腺疾病研究。

通讯作者: 姚昶, 主任中医师, 博士生导师, 南京中医药大学附属医院, 江苏省南京市 210029

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2017)22-03531-05

稿件接受: 2017-03-13

文题释义:

**鸡胚绒毛尿囊膜:** 是研究促血管生成与抗血管生成的理想体内模型。生理情况下, 血管形成主要发生在胚胎发育和女性月经周期内膜修复过程。另外, 在很多病理情况下, 血管生成都起着重要作用, 如损伤修复、炎症、恶性肿瘤、风湿性关节炎、糖尿病视网膜膜病变、银屑病、创伤愈合等也常伴随发生血管新生, 特别是肿瘤生长和转移与血管新生密切相关, 实体瘤必须依赖血管生成才能生长、侵袭和转移。因为鸡胚绒毛尿囊膜是天然免疫缺陷宿主, 而且可耐受一定的温度变化, 有利于检测某些对温度敏感的肿瘤细胞的生物学行为。所以, 鸡胚绒毛尿囊膜模型常作为移植性肿瘤的实验模型之一, 也可作为肿瘤新生血管形成、肿瘤侵袭和远处脏器转移潜能, 以及抗肿瘤药物作用机制探讨等方面研究的体内实验模型。

摘要

**背景:** 研究发现, 脂肪干细胞胶原复合物可促进脂肪干细胞向成熟脂肪细胞分化、成熟, 并可促进血管新生。

**目的:** 探查胶原海绵复合脂肪干细胞的生物学特性及其对血管新生的影响。

**方法:** ①实验组将人脂肪干细胞接种于胶原海绵上, 以细胞单独培养为阴性对照组, 培养 24 h 后, 检测细胞黏附率; 培养第 2, 4, 6 天, 检测细胞增殖与培养液中血管内皮生长因子水平; ②鸡胚绒毛尿囊膜实验: 暴露孵育 7 d 的鸡胚尿囊膜, 分 4 组, 空白组向尿囊膜加入 0.2 mL 无菌 PBS, 脂肪干细胞组加入 0.2 mL  $2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$  第 3 代脂肪干细胞悬液, 胶原海绵组加入胶原海绵, 复合组加入  $2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$  第 3 代脂肪干细胞悬液 0.2 mL 与胶原海绵。孵育 7 d 后, 测定尿囊膜周围微血管计数。

**结果与结论:** ①细胞黏附率: 脂肪干细胞在胶原海绵上的黏附率为  $(93.04 \pm 0.67)\%$ ; ②细胞增殖与培养液中血管内皮细胞生长因子水平: 实验组培养第 6 天的细胞增殖 A 值高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 培养第 4, 6 天的血管内皮生长因子水平高于对照组 ( $P < 0.05$ ); ③鸡胚绒毛尿囊膜实验: 脂肪干细胞组、胶原海绵组、复合组微血管计数高于空白组 ( $P < 0.05$ ), 复合组高于脂肪干细胞组、胶原海绵组 ( $P < 0.05$ ); ④结果表明: 脂肪干细胞与胶原海绵具有良好的生物相容性, 两者复合有良好的促进血管新生作用, 其机制可能与促进脂肪干细胞增殖与分泌血管内皮生长因子相关。

**关键词:**

生物材料; 材料相容性; 脂肪干细胞; 胶原海绵; 生物相容性; 支架; 血管新生; 国家自然科学基金

**主题词:**

胶原; 干细胞; 组织工程

**基金资助:**

国家自然科学基金(81373646); 康缘基金(HZ1009KY); 江苏省高校优势学科建设项目 II 期(012062003010);

江苏省中医院高峰学术人才培养(y2014cr06)

Xue Jing-xian, Studying for doctorate, Affiliated Hospital of Nanjing Medical University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Corresponding author: Yao Chang, Chief physician, Doctoral supervisor, Affiliated Hospital of Nanjing Medical University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Improving angiogenesis by collagen sponge carrying human adipose-derived stem cells

Xue Jing-xian<sup>1</sup>, Chen Xu<sup>1</sup>, Xu Yan-lei<sup>1</sup>, Ren Wei-ye<sup>2</sup>, Li Yan<sup>2</sup>, Zhang Yu-xuan<sup>1</sup>, Yao Chang<sup>1</sup> (1Affiliated

Hospital of Nanjing Medical University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China; <sup>2</sup>Wuxi Biot Bio-technology Co., Ltd., Wuxi 214902, Jiangsu Province, China)

## Abstract

**BACKGROUND:** Studies have found that adipose-derived stem cells (ADSCs)/collagen complexes can promote the ADSCs differentiation and maturation into mature adipocytes and promote angiogenesis.

**OBJECTIVE:** To explore the biological properties of the ADSCs/collagen sponge composite material and to detect its effect on angiogenesis.

**METHODS:** (1) ADSCs were cultured on collagen sponge (experimental group) or cultured alone (control group). After 24 hours of culture, cell adhesive rate of ADSCs was determined with flow cytometry. After 2, 4, 6 days of culture, cell proliferation and level of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the culture medium were detected. (2) Chick embryo chorioallantoic membranes were exposed and incubated for 7 days and then divided into four groups: 0.2 mL of sterile PBS was added in the blank group, 0.2 mL of  $2 \times 10^8/L$  passage 3 ADSCs suspension was added in the ADSCs group, collagen sponge was added in the collagen sponge group, and collagen sponge with 0.2 mL of  $2 \times 10^8/L$  passage 3 ADSCs suspension was added in the composite group. After 7 days of incubation, the microvessel count around the chorioallantoic membrane was measured.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) The cell adhesive rate of ADSCs to collagen sponge reached to  $(93.04 \pm 0.67)\%$ . (2) The absorbance value (at 6 days of culture) and level of VEGF (at 4 and 6 days of culture) in the experimental group were significantly higher than those in the control group ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). (3) Compared with the blank group, the number of microvessels was significantly higher in the ADSCs, collagen sponge and composite groups ( $P < 0.05$ ). Moreover, higher amount of microvessels were found in the composite group than the ADSCs and collagen sponge groups ( $P < 0.05$ ). To conclude, ADSCs can adhere well to the collagen sponge with good biocompatibility and their combined use can improve angiogenesis further by enhancing cell proliferation and VEGF secretion of ADSCs.

**Subject headings:** Collagen; Stem Cells; Tissue Engineering

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China, No. 81373646; Kanion Fund, No. HZ1009KY; the Preponderant Discipline Construction Project II for High Education in Jiangsu Province, No. 012062003010; the Academic Personnel Training Project of Traditional Chinese Medicine in Jiangsu Province, No. y2014cr06

**Cite this article:** Xue JX, Chen X, Xu YL, Ren WY, Li Y, Zhang YX, Yao C. Improving angiogenesis by collagen sponge carrying human adipose-derived stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2017;21(22): 3531-3535.

## 0 引言 Introduction

人们对美的追求,催生了植入生物组织工程材料的迅猛发展,但由于生物材料对人体属于异物,不可避免的产生异物反应,如纤维包膜挛缩、切口瘢痕增生等<sup>[1]</sup>;之后出现了自体组织填充方法以消除异物反应,如自体脂肪颗粒注射,该方法可与吸脂减肥同时进行,将吸出的脂肪作为填充材料,但脂肪颗粒在注射后可能存在不同程度的液化吸收。有研究表明在脂肪颗粒移植后10-12个月,30%-60%的移植物将被吸收<sup>[2]</sup>,原因为组织生长需要充分的血液供应<sup>[3]</sup>,脂肪细胞植入后得不到充分的机体营养支持,导致了液化与吸收,后期出现结节。脂肪干细胞是一种具有高度分化潜能的,从脂肪组织中获得的干细胞,其起源于中胚层的间充质成体干细胞,在体外也可保持自我更新,可分泌大量血管生成和抗凋亡因子。多项体内和体外实验均证实脂肪干细胞在机体难愈性损伤修复中发挥了主导作用<sup>[4-5]</sup>。将脂肪干细胞与可降解生物材料构成复合物,移植到体内,诱导目标组织形成,是提高植入生物组织工程材料存活的思路之一<sup>[6]</sup>。胶原是构成结缔组织的主要成分,可促进细胞的黏附和增殖,生物相容性和降解性良好,降解产物能被细胞利用,是想架的支理材料之一。有研究发现,脂肪干细胞在I型胶原支架材料上能够黏附、生长,并且能够促进皮肤愈合<sup>[7-8]</sup>。Wosnitza等<sup>[9]</sup>研究发现,脂肪干细胞胶原复合物促进脂肪干细胞向成熟脂肪细胞分化、成熟并可促进血管新生,效果明显优于单纯胶原海绵支架。研究拟进一步评价脂肪干细胞胶原复合物中脂肪干

细胞的生长与促血管新生及分泌血管内皮生长因子的相关关系。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照观察实验。

1.2 时间及地点 实验于2014年12月至2015年6月在江苏省中医院中心实验室完成。

1.3 材料 胶原海绵由无锡贝迪生物工程有限公司提供,国食药监械(准)字2011第3640408;二甲基亚砜(DMSO)、乙二胺四乙酸(EDTA)购于美国Gibco公司;I型胶原酶购于美国Sigma公司;EnoGene Cell Counting Kit-8试剂盒购于南京恩晶生物科技有限公司;人血管内皮细胞生长因子定量分析酶联免疫检测试剂盒(购自南京墨迹生物公司);7 d龄鸡胚购于江苏省农科院。

### 1.4 实验方法

1.4.1 制备脂肪干细胞 脂肪组织来源于江苏省中医院整形外科抽脂患者术后废弃脂肪,无菌条件下以PBS洗涤3次后,用I型胶原酶消化40 min,滤除未能消化的组织块和细胞团块,离心5 min,弃上清,取沉淀物,用DMEM培养基将其制成细胞悬液,置于培养箱内孵育,随后每二三天换液,细胞达70%-80%融合时进行传代,吸去旧培养液,洗涤、胶原酶消化孵育5 min,观察细胞浮起变圆,终止消化,离心弃上清,将沉淀制成细胞悬液,行流式细胞仪表面抗原及脂滴油红O染色与细胞茜素红S染色鉴定。

1.4.2 胶原海绵孔隙率测定 将胶原海绵称质量,计为

$m_3$ : 比重瓶中盛满乙醇, 计质量为 $m_1$ , 然后将胶原海绵浸入比重瓶中, 使乙醇充分充盈于胶原孔隙, 计质量为 $m_2$ ; 取出胶原海绵, 剩余乙醇与比重瓶称质量, 计为 $m_3$ , 孔隙率(%) =  $(m_2 - m_1 - m_3) / (m_1 - m_3) \times 100\%$ 。

**1.4.3 脂肪干细胞与胶原海绵复合的黏附率测定** 无菌条件胶原海绵制成10 mm×10 mm×1 mm大小, 将细胞浓度为 $2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 第3代脂肪干细胞悬液0.2 mL加入胶原海绵, 静置4 h后, 移入体积分数5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱, 培养8 h后将胶原海绵取出, 移至平皿, 以培养液冲洗, 测定流失细胞数; 细胞材料复合物培养24 h后, 重复上述步骤, 得出未黏附细胞数。黏附率=(接种细胞数-流失细胞数-未黏附细胞数)/(接种细胞数-流失细胞数)×100%。

**1.4.4 脂肪干细胞增殖实验** 取第3代脂肪干细胞, 分组培养, 以常规培养的细胞为对照组, 实验组为与胶原海绵共培养, 加入100 μL完全培养基, 于培养箱继续培养, 培养第2, 4, 6天, 每孔加入10 μL CCK-8溶液, 后续培养孵育2 h, 以用酶标仪测定在450 nm处的吸光度。

**1.4.5 血管内皮生长因子测定** 取第3代脂肪干细胞, 分组培养, 以常规培养的细胞为对照组, 实验组为与胶原海绵共培养, 加入100 μL完全培养基, 于培养箱继续培养, 培养第2, 4, 6天, 用离心管采集细胞上清标本, 3 000 r/min离心20 min后, 去除悬浮物和沉淀物, 用无菌管封装, 按人定量分析酶联免疫检测试剂盒(millipore分装标准品)试剂盒指示进行测定培养液中血管内皮生长因子水平。

**1.4.6 鸡胚绒毛尿囊膜实验** 采用Ribatti<sup>[10]</sup>方法建立鸡胚绒毛尿囊膜: 消毒后鸡胚孵育7 d时, 将孵化的鸡胚气室处切割出一个边长约2 cm的三角形窗口, 揭去蛋壳及其附着的部分卵壳膜, 暴露尿囊膜, 分4组, 每组12枚鸡胚。空白组在尿囊膜加入0.2 mL无菌PBS, 脂肪干细胞组加入细胞浓度为 $2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 的第3代脂肪干细胞悬液0.2 mL, 胶原海绵组加入10 mm×10 mm×1 mm胶原海绵, 复合组加入细胞浓度为 $2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 第3代脂肪干细胞悬液0.2 mL与胶原海绵。无菌膜将窗口覆盖后继续孵育7 d, 测定标本周围尿囊膜微血管计数: 甲醇: 丙酮(1: 1)的固定液固定鸡胚尿囊膜15 min后, 剪取连接标本处尿囊膜铺于载玻片, 独立2人在50倍放大显微镜下将不重复的3个视野毛细血管利用格子法计数, 3个视野内微血管(直径在20-40 μm之间)取平均数, 以分叉数计数。

**1.5 主要观察指标** 人脂肪干细胞与胶原海绵复合培养后的黏附率、增殖及血管内皮细胞生长因子水平; 鸡胚绒毛尿囊膜实验中, 各组微血管计数。

**1.6 统计学分析** 采用SPSS 13.0进行统计学分析, 以One-Way ANOVA(单因素方差分析)进行组间比较。

## 2 结果 Results

**2.1 脂肪干细胞原代及传代细胞的形态和表面抗原特征** 原代细胞于培养24 h后贴壁完成。流式细胞仪检测第3代细

胞表面抗原CD34阴性、CD90阳性(阳性率>95%), 结果见图1。

细胞经成脂培养基诱导培养二三周后, 油红O染色可见脂滴且脂滴随诱导时间的延长而增大(图2A); 成骨培养基诱导培养3周后, 茜素红S染色阳性(图2B)。结果表明, 这些从脂肪组织中提取并培养后的细胞为脂肪干细胞。

**2.2 胶原海绵孔隙率及脂肪干细胞黏附率检测结果** 胶原海绵孔隙率为91%。测定5块胶原海绵24 h黏附率分别为92.24%、93.25%、92.66%、94.02%与93.04%, 平均黏附率为(93.04±0.67)%。

**2.3 脂肪干细胞增殖检测结果** 随着时间的增加, 实验组与对照组脂肪干细胞都保持递增增殖状态。两组培养第2, 4天的细胞A值比较差异无显著性意义( $P > 0.05$ ), 说明细胞增殖前期, I型胶原对细胞增殖无明显的增殖作用; 实验组培养第6天的细胞A值高于对照组( $P = 0.006$ ), 见表1。

表1 实验组与对照组脂肪干细胞增殖的比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ , A)

Table 1 Cell proliferation of human adipose-derived stem cells in experimental and control groups

组别	2 d	4 d	6 d
对照组	0.70±0.39	0.72±0.34	0.77±0.09
实验组	1.03±0.49	1.27±0.57	1.42±0.40
P	> 0.05	> 0.05	< 0.01

**2.4 脂肪干细胞分泌血管内皮生长因子测定结果** 随着时间的增加, 各组脂肪干细胞分泌血管内皮生长因子保持递增状态, 实验组培养第4, 6天的血管内皮生长因子水平高于对照组( $P = 0.007$ ,  $P = 0.002$ ), 见表2。

表2 实验组与对照组脂肪干细胞分泌血管内皮生长因子水平的比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ , ng/L)

Table 2 Secretion of vascular endothelial growth factor from human adipose-derived stem cells in the experimental and control groups

组别	2 d	4 d	6 d
对照组	44.30±2.41	48.05±1.25	50.25±1.70
实验组	47.04±0.36	52.99±1.08	58.94±1.27
P	0.325	0.007	0.002

**2.5 鸡胚绒毛尿囊膜实验结果** 接种部鸡胚绒毛尿囊膜的血管以接种部位为中心呈轮辐状分布, 接种第3天时已有中粗血管形成, 微血管形成增多, 新的血管网逐渐构成, 取材时见胚胎仍活动生长, 鸡胚绒毛尿囊膜接种部位血管丰富, 管腔饱满。

脂肪干细胞组、胶原海绵组、复合组微血管计数高于空白组(109.21±22.83, 119.00±14.26, 169.64±46.03, 88.75±6.5,  $P < 0.05$ ), 复合组高于脂肪干细胞组、胶原海绵组( $P < 0.05$ ), 脂肪干细胞组和胶原海绵组比较差异无显著性意义, 见图3。

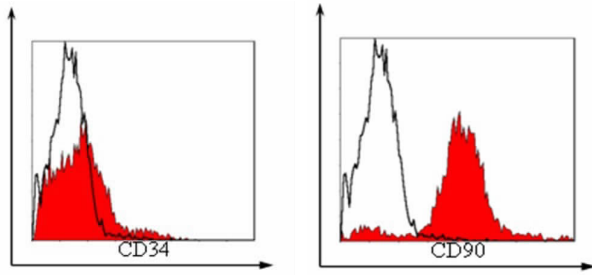


图1 流式细胞仪检测第3代人脂肪干细胞表面标记物  
Figure 1 Surface marker expression of passage 3 human adipose-derived stem cells by flow cytometry  
图注: 表面抗原 CD34 阴性、CD90 阳性(阳性率>95%)。

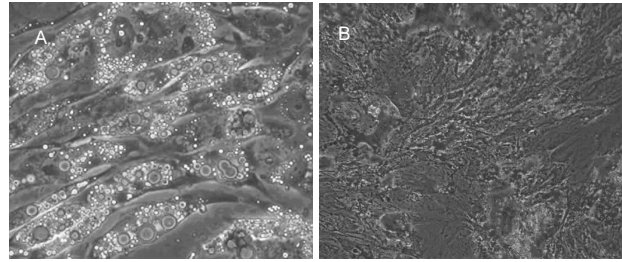


图2 第3代人脂肪干细胞的多向分化( $\times 400$ )  
Figure 2 Multidirectional differentiation of passage 3 human adipose-derived stem cells ( $\times 400$ )  
图注: 图中 A 为油红 O 染色, 可见脂滴; B 为茜素红 S 染色, 呈阳性。

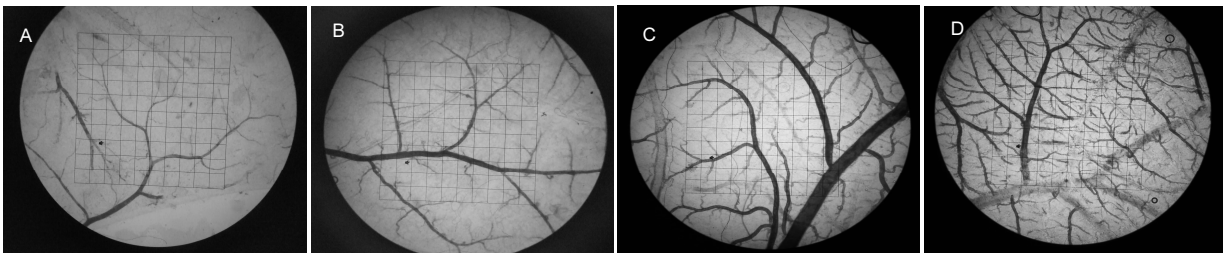


图3 鸡胚绒毛尿囊膜实验中各组新生血管形成( $\times 22.5$ )  
Figure 3 Angiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane ( $\times 22.5$ )  
图注: 图中 A-D 分别为空白组、脂肪干细胞组、胶原海绵组及复合组, 以复合组新生血管数最多。

### 3 讨论 Discussion

寻找可使支架内快速血管化的方法, 始终是组织工程中最具挑战性的研究领域之一<sup>[12]</sup>。前期研究显示在胶原材料植入血管内皮生长因子, 能促进血管内皮细胞增殖, 体内实验中能刺激提高周围组织血管生长及促进血管从周围组织长入生物材料内<sup>[13-15]</sup>。然而各种生长因子半衰期短, 易降解失效, 价格昂贵, 因此, 寻找一种具有自我更新与分泌促血管生成生长因子的细胞复合支架是可行的发展组织工程植入材料之一。人自体脂肪细胞来源丰富, 是理想的组织工程支架载细胞之一。但移植的脂肪组织成活率低, 限制了其在临床的推广应用。脂肪干细胞是一种具有多向分化潜能的多能干细胞, 同时具有来源丰富、取材容易、对机体损伤小、体外增殖迅速和生物学性状稳定等优点, 是理想的组织工程和再生治疗的种子细胞<sup>[16]</sup>。现代研究显示, 人脂肪干细胞与 I 型胶原复合具有良好的组织相容性与促血管生长作用<sup>[17-18]</sup>, 可有效修复组织缺损<sup>[19]</sup>。

研究采用临床使用无锡贝迪生物工程有限公司生产的胶原海绵。胶原为海绵状高纯度 I 型胶原冻干品, 具备完整的三螺旋结构, 相对分子量约 300 000, 胶原海绵孔径均匀, 大小为 70-100  $\mu\text{m}$ , 有良好的修复性, 临床可用于创面修复<sup>[20-21]</sup>、手术创腔缺损填充<sup>[22-23]</sup>。研究结果显示胶原海绵孔隙率为 91%, 对脂肪干细胞的黏附率达 93.04%, 与于志永等<sup>[24]</sup>研究显示孔隙率与黏附率大于 90% 可获得较好的脂肪干细胞生长与组织相容性, 显示出此次研究中的胶原海绵可以较好地复合脂肪干细胞。

目前脂肪干细胞尚无确定的特异表面标记物, 主要通过测定其定向分化能力等方面确定其性质。研究显示脂肪干细胞抗原有 CD29、CD44、CD90 高表达, 同时 CD31、CD34、CD45 阴性表达, 可通过流式细胞仪分拣。研究通过流式细胞仪分拣出 CD90 高表达同时 CD34 阴性的干细胞, 可诱导培养出脂滴且细胞茜素红 S 染色阳性, 显示研究中的种子细胞为脂肪干细胞。研究显示胶原海绵在与脂肪干细胞共培养 4-6 d 时, 可显著促进脂肪干细胞增殖, 而培养 2-4 d 时虽有促进增殖作用, 但疗效欠显著, 推测脂肪干细胞在培养 4-6 d 时进入快速增殖期, 而在培养 2-4 d 为增殖前期<sup>[25]</sup>, 同时, 胶原一定程度的降解, 其降解产物可作为养料进入细胞, 促进了脂肪干细胞的增殖<sup>[26]</sup>。脂肪干细胞的增殖, 分泌血管内皮生长因子水平增加, 因此脂肪干细胞复合胶原中血管内皮生长因子含量升高, 由此刺激血管新生。前期研究显示胶原本身具有促进血管新生作用<sup>[27-28]</sup>, 此次研究结果显示脂肪干细胞复合胶原海绵可提高血管新生 1 倍以上, 前期研究显示血管内皮生长因子载入胶原蛋白, 其促血管新生作用不显著<sup>[13-14]</sup>, 而脂肪干细胞本身促血管生长作用显著<sup>[18]</sup>, 因此, 脂肪干细胞复合胶原海绵显著促进血管新生的作用应是脂肪干细胞与胶原本身作用叠加结果。

研究结果显示, 目前临床运用的胶原海绵具有较好的脂肪干细胞黏附率与相容性, 与脂肪干细胞复合培养后可促进脂肪干细胞的增殖, 又可刺激脂肪干细胞血管内皮生长分泌, 进一步促进血管新生, 有利于植入体内存活与促进机体缺损部位的修复。

**作者贡献:** 薛静娴、陈绪、许岩磊、任伟业、李燕、张宇轩、姚昶进行实验设计, 实验实施为薛静娴、陈绪、许岩磊、张宇轩. 实验评估为姚昶, 资料收集为李燕、薛静娴, 姚昶成文, 薛静娴、任伟业、姚昶审校。

**利益冲突:** 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

**伦理问题:** 研究用人体组织的实验方案符合相关伦理学要求, 文章的撰写与编辑修改后文章遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

**文章外审:** 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

**作者声明:** 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

- [1] Cunningham BL, Lokeh A, Gutowski KA. Saline-filled breast implant safety and efficacy: a multicenter retrospective review. *Plast Reconstr Surg.* 2000;105(6):2143-2149.
- [2] 戚可名. 女性整形美容外科学[M]. 北京: 人民军医出版, 2001: 673-674.
- [3] Ryuto M, Ono M, Izumi H, et al. Induction of vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha in human glioma cells. Possible roles of SP-1. *J Biol Chem.* 1996;27(45):28220-28228.
- [4] Hong S, Traktuev J, March KL, et al. Therapeutic potential of adipose-derived stem cells in vascular growth and tissue repairs. *Curr Opin Organ Transplant.* 2010;15(1): 86-91
- [5] 杨超, 邢新, 徐达圆, 等. 脂肪干细胞-透明质酸复合物促进放射性复合损伤创面愈合的初步研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2011, 25(12):1499-1501.
- [6] Hattori H, Masuoka K, Sato M, et al. Bone formation using human adipose tissue-derived stromal cells and a biodegradable scaffold. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2006;76(1):230-239.
- [7] 张云松, 高建华, 鲁峰, 等. I型胶原支架材料与脂肪干细胞体外生物相容性研究[J]. *南方医科大学学报*, 2007, 27(2):223-225
- [8] 陆伟, 金岩, 张勇杰, 等. 脂肪组织来源干细胞复合胶原构建组织工程皮肤修复皮肤缺损[J]. *实用口腔医学杂志*, 2007, 23(2): 161-164.
- [9] Wosnitzer M, Hemmrich K, Pallua N. Plasticity of human adipose stem cells to perform adipogenic and endothelial differentiation. *Differentiation.* 2007;75(1):12-23.
- [10] Ribatti D. Chick embryo chorioallantoic membrane as a useful tool to study angiogenesis. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2008;270: 181-224.
- [11] 唐昱, 盛国太, 钟志英. 丹红注射液促进鸡胚绒毛尿囊膜血管生成的实验研究[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2010, 8(3): 3110-3111
- [12] Sun X, Altalhi W, Nunes SS. Vascularization strategies of engineered tissues and their application in cardiac regeneration. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;96:183-194.
- [13] Yao C, Roderfeld M, Rath T, et al. The impact of proteinase-induced matrix degradation on the release of VEGF from heparinized collagen matrices. *Biomaterials.* 2006;27(8): 1608-1616.
- [14] Steffens GC, Yao C, Prevel P, et al. Modulation of angiogenic potential of collagen matrices by covalent incorporation of heparin and loadig with vascular endothelial growth factor. *Tissue Eng.* 2004;10(9-10):1502-1509.
- [15] Koch S, Yao C, Grieb G, et al. Enhancing angiogenesis in collagen matrices by covalent incorporation of VEGF. *Mater Sci: Mater Med.* 2006;17:735-741.
- [16] Lindroos B, Suuronen R, Miettinen S. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Rev.* 2011;7(2): 269-291.
- [17] 李晓童, 支运霞, 张喜, 等. 脂肪源性干细胞与胶原海绵支架的相容性[J]. *解剖学杂志*, 2012, 35(6):741-744, 769.
- [18] 徐永飞, 张建成, 暴志国, 等. 脂肪来源干细胞复合不同生物支架在裸鼠皮下的促血管化作用[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2013, 39(6): 773-776.
- [19] 许颖激, 刘林峰, 徐永飞, 等. 脂肪干细胞复合 I 型胶原对裸鼠移植组织生长的影响[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2014, 40(2): 255-257.
- [20] 乐音子, 陈灵, 任伟业, 等. 胶原海绵对创面愈合的影响[J]. *中国基层医药*, 2014, 21(13):1954-1956.
- [21] 魏庆, 任伟业, 张晶, 等. 胶原海绵在慢性下肢溃疡中应用临床疗效观察[J]. *安徽医药*, 2012, 16(7):949-951.
- [22] 陈运, 邵大畏, 任伟业, 等. 胶原海绵填充甲状腺手术残腔与止血疗效临床观察[J]. *中国医药指南*, 2012, 10(5):79-80.
- [23] 邵大畏, 陈运, 任伟业, 等. 胶原海绵填充乳腺缺损 20 例临床观察 [J]. *中国医药指南*, 2012, 10(2):85-86.
- [24] 于志永, 付勤, 张涛, 等. 脂肪间充质干细胞复合壳聚糖-胶原-硫酸软骨素多孔支架体外成软骨能力的实验研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2009, 15(3):165-170.
- [25] 杨震, 李波, 周焯家, 等. 人脂肪干细胞体外培养及细胞载体复合物诱导培养[J]. *中国老年学杂志*, 2014, 34(18):5187-5190.
- [26] Han B, Wang HC, Li H, et al. Nucleus pulposus mesenchymal stem cells in acidic conditions mimicking degenerative intervertebral discs give better performance than adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs.* 2014;199(5-6):342-352.
- [27] 李琳, 姚昶, 朱永康, 等. 胶原海绵促进人脐静脉血管内皮细胞生长的体外实验研究[J]. *临床和实验医学杂志*, 2014, 13(18): 1494-1496.
- [28] 周勇, 任伟业, 邵大畏, 等. 胶原海绵促进创面止血与血管新生的实验研究[J]. *湖南中医杂志*, 2012, 28(3):140-141, 165.