

脂肪源基质血管组分细胞及其临床应用进展

赵贤省, 金亮*, 胡文军**

(中国药科大学生命科学与技术学院, 江苏 南京 211198)

[摘要] 脂肪源基质血管组分 (SVF) 细胞是一种具有干细胞特性的异质性细胞群, SVF 含有的多种细胞类型使其具有强大的免疫调节、血管新生和组织重建等再生潜能。目前将其应用于多种疾病的临床治疗, 均显示出良好的安全性和治愈效果。综述目前提取脂肪源 SVF 的不同方法及其所含细胞群的具体表型, 同时也总结了 SVF 在脂肪移植、糖尿病、克罗恩病和骨关节炎等多种疾病中的临床应用进展。

[关键词] SVF 细胞; 基质血管组分; 脂肪源干细胞; 细胞治疗

[中图分类号] Q813

[文献标志码] A

[文章编号] 1001-5094 (2019) 06-0421-09

Adipose-derived Stromal Vascular Fraction Cells and Their Clinical Application Progress

ZHAO Xiansheng, JIN Liang, HU Wenjun

(School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

[Abstract] Adipose-derived stromal vascular fraction(SVF) cells are a heterogeneous cell population with the characteristics of stem cells. Because of their various cell types, they have strong regenerative potentials such as angiogenesis, tissue remodeling and immune regulation. They have been used for clinic treatment of various conditions with good safety and therapeutic effects. This article reviewed the different separation methods of adipose-derived SVF and characterizes the specific phenotypes of the cells contained in it. At the same time, the advances in clinical applications of SVF in fat transplantation, diabetes, Crohn's disease, osteoarthritis and other diseases were summarized.

[Key words] SVF cell; stromal vascular fraction; adipose-derived stem cell; cell therapy

在组织工程和再生医学中, 脂肪组织逐渐成为更具潜力的干细胞来源。人体中脂肪组织来源丰富, 可以通过吸脂术轻松获得。脂肪组织经过处理, 除去成熟脂肪细胞、结缔组织和来自脂肪抽吸物的血液等杂质后, 得到的异质细胞群被称为基质血管组分 (stromal vascular fraction, SVF)^[1]。SVF 中包含多种细胞类型, 例如造血干细胞、间充质细胞、内皮祖细胞、内皮细胞、周细胞和巨噬细胞等^[2] (见表 1)。最初研究较多的是 Zuk 等^[3] 鉴定的脂肪来源干细胞/基质细胞 (adipose-derived stem/stromal cells, ASCs), 因其具有多能分化潜力、旁分泌特性以及对再生医学有重大影响而被广泛关注。ASCs 是由新鲜分离的 SVF 经过贴壁传代培养后得到的一

种同质干细胞群。然而相较于 ASCs, SVF 不需要任何细胞培养过程, 分离获得后可直接使用, 因此相对更加安全, 能够满足较低的监管标准, 从而受到众多临床研究者的青睐^[4]。

表 1 SVF 中的细胞群^[2]

Table 1 Cell populations in SVF

细胞类型		细胞含量
造血系细胞	干/祖细胞	<0.1%
	粒性白细胞	10%~15%
	单核细胞	5%~15%
	淋巴细胞	10%~15%
内皮细胞		10%~20%
周细胞		3%~5%
基质细胞		15%~30%

1 脂肪来源 SVF 细胞

1.1 SVF 的分离

人体中脂肪组织一般分为皮下脂肪和内脏脂肪, 可通过吸脂术或手术切除的方式获取, 常见的取材部位包括腹部、臀部、前臂和腹股沟处等。Sinno 等^[5] 研究发现, 脂肪的不同取材部位对其活性无显著性影响。总的来说, SVF 的分离方法一般

接受日期: 2019-03-10

*通讯作者: 金亮, 教授;

研究方向: 干细胞与再生医学;

Tel: 025-83271152; E-mail: ljstemcell@cpu.edu.cn

**通讯作者: 胡文军, 副教授;

研究方向: 干细胞发育调控机制及其临床应用;

Tel: 025-83271398; E-mail: wjhu@cpu.edu.cn

可以分为两大类: 使用蛋白水解酶消化脂肪的酶法和不使用蛋白水解酶的物理机械方法。

酶法常采用 I 型胶原蛋白酶来消化脂肪组织, 大致过程概述如下: 脂肪组织与酶按适当比例混合后置于 37℃ 环境中震荡消化 1 h 左右, 加入等量完全培养基终止消化, 随后离心弃去上清, 再加入磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 重悬洗涤, 最后用特定孔径滤网过滤即得 SVF 悬液。各个实验室在消化过程中所采用的酶浓度、离心速率、消化时间以及滤网孔径等条件可能并不完全相同, 导致最后分离得到的 SVF 的活性、产率和表型均有一定的差异^[6]。酶消化法可以从脂肪组织中获得较多的有核细胞, 并且易于分离得到基质/干细胞, 然而造血来源细胞则产量不佳^[7]。同时需要注意的是酶消化法过程中可能会在终产物中引入残余的胶原酶外源蛋白, 因此美国 FDA 对 SVF 的临床应用制订了严格监管标准。

不使用酶的机械消化方法, 采用了包括诸如血清消化、机械振荡或推注剪切等方式来处理脂肪组织。Zeng 等^[8]将脂肪组织直接置于胎牛血清中进行消化, 但是整个消化过程耗时较长, 需要 3 d 才能消化完全。Markarian 等^[7]利用机械振荡的方式处理脂肪组织, 相较于酶消化法所得 SVF 中干细胞活性有所提升, 但其细胞总量不高。Tonnard 等^[9]通过在 2 个连接的注射器之间反复推注脂肪来乳化脂肪组织, 经离心去除上层油滴后可得到一种被称为纳米脂肪的胶状物质, 此法操作相对简单, 但所得

细胞活性有待提高。相对于酶消化法, 机械消化法均不涉及使用异种蛋白酶, 所以安全性较高, 但是脂肪组织经过这种长时间或剧烈的机械方式处理后, 细胞得率和活性都不够理想。

除了以上 2 种人工分离方法之外, 还有一类自动装置系统可以分离 SVF。使用这种装置可从脂肪组织中快速自动分离出可注射使用的 SVF。虽然自动化处理系统已经发展了很长时间, 但是大多数仍处于实验阶段, 美国 Cytori 公司的 Celution[®] 系统是第一个自动分离 SVF 的商用系统^[10]。目前, 大约有 30 种不同的自动化和半自动化系统正在开发中^[11]。虽然所使用的技术不尽相同, 但大多选择的是成熟的酶促反应方案, 例如 SundarRaj 等^[12]报道的 Stempeutics[®] 系统, 该系统使用了更高效安全的酶消化方式, 能在相对密闭的环境中自动分离成熟脂肪层, 最后通过高效过滤实现 SVF 的分离和浓缩。

1.2 SVF 的表型

细胞的表面分子, 例如分化抗原 (cluster of differentiation, CD), 对于细胞之间或细胞与环境之间的相互作用至关重要, 同时也可用于鉴定细胞群中的不同细胞类型。脂肪组织分离得到的 SVF 是含有多种细胞的异质细胞群, 可通过不同细胞表面的 CD 分子差异进行鉴别^[13]。尽管国际细胞治疗协会曾发表声明对 SVF 进行了定义, 但目前学术界对 SVF 细胞的表型鉴定还未达成共识^[14]。本文整理了先前的研究, 按照 SVF 中细胞的大小及其表面分子抗体类别进行了总结 (见表 2)。

表 2 SVF 中细胞的大小及表面标记
Table 2 Size and surface markers of cells in SVF

细胞类型	细胞大小	分子标记 ^[12,15-17]	
		阳性标记物	阴性标记物
ASCs	10~25 μm, 最大至超过 200 μm ^[18]	CD34, CD73, CD13, CD90, CD105, CD29	CD31, CD45, CD144
内皮祖细胞	7~8 μm ^[19]	CD34, CD31, CD133, CD146	CD45
内皮细胞	10~30 μm ^[20]	CD31, FVIII	CD34
T 调节细胞	7~12 μm ^[21]	CD4, CD25, Foxp3, CD8	-
巨噬细胞	20 μm ^[22]	CD45, CD14, CD34, CD206	-
平滑肌细胞	长 20~500 μm, 宽 3~20 μm ^[23]	平滑肌肌动蛋白 (SMA)	-
周细胞	最长约 70 μm ^[24]	CD146, CD90, CD73, CD44, CD29, CD13	CD34, CD45, CD56
前脂肪细胞	10 μm ^[25]	CD34	CD45, CD31, CD146

CD45 是一种经典的细胞标志物, 可用于鉴定除红细胞以外的造血系细胞。CD235 可用于检验细胞群中是否含有红细胞。CD31 是内皮细胞及其祖细胞的经典标志物, 同时也存在于血小板和白细胞表面。使用 CD45 和 CD31 这 2 种标志物的对应抗体对 SVF 进行表面标记, 通过流式分析仪即可鉴定出内皮细胞组分 (CD45⁻CD31⁺)^[26-28]。CD34 最初被作为间充质细胞的主要阴性标记^[29], 随后众多研究发现该标志物在新鲜分离的 SVF 中可以被检测到, 但是会随着不断的传代培养而逐渐消失。因此, CD34 被视为前脂肪细胞和祖细胞的标志物^[30]。

Bourin 等^[2]研究表明, SVF 中所含的基质组分细胞的表面标志组合为 CD45⁻CD235⁻CD31⁻CD34⁺, 同时 CD13、CD29、CD73 和 CD90 等脂肪干细胞经典标志物在 CD45⁻CD31⁻CD34⁺ 这一细胞群中高表达, 因此它们也可以作为辅助标志物用于鉴定 ASCs 组分^[17,31]。

SVF 中含有较多血管周围细胞, 占总细胞量的 50% 以上, 其中可以分为内皮祖细胞、前脂肪细胞和周细胞等^[17]。研究发现无论是人工还是自动分离系统消化所得的 SVF 中, CD146 阳性标记的细胞中约 90% 都表现为 CD34 阳性^[12]。因此, 内皮祖细胞表型为 CD45⁻CD31⁺CD34⁺CD146⁺; 与脂肪组织的血管壁密切相关的周细胞表型为 CD45⁻CD31⁻CD146⁺; 前脂肪细胞中含有较多的干细胞样组分, 其表型为 CD31⁻CD45⁻CD146⁻CD34⁺。

巨噬细胞是 SVF 中重要的免疫细胞。在最初的研究中, Astori 等^[32]发现在 SVF 细胞中, 单核细胞标志物 CD14 阳性标记的细胞约占 10.9% ± 9.6%。同时研究表明, SVF 中的这些 CD14⁺ 单核细胞具有促进组织血管新生的强大功能^[33]。Eto 等^[34]在 SVF 中发现的 M2 表型巨噬细胞呈 CD34⁺, 且具有和间充质细胞类似的特征, 例如细胞形态、贴壁吸附性和多能性等, 因此该类型巨噬细胞的表型被定义为 CD45⁺CD14⁺CD206⁺。

2 SVF 临床应用

2.1 脂肪移植

整容手术越来越多地采用转移人体自体脂肪的

方式来进行丰胸或改善面部皮肤及轮廓^[35-36], 但临床报告显示, 大部分脂肪组织在注射到受体部位后会被机体吸收而无法存活^[37], 其主要归因于移植物的缺血和缺氧^[38]。Matsumoto 等^[39]发现, 将新鲜分离的 SVF 混合到脂肪中进行移植可有助于组织血管重建并能显著提升移植物的保留率, 他们将这种改善脂肪移植存活率的方法定义为细胞辅助脂肪移植术 (cell-assisted lipotransfer, CAL)。Yoshimura 等^[40]将 CAL 应用到临床美容丰胸中, 当植入 270 mL 脂肪组织后乳房体积可增加 100~200 mL, 且能保持乳房的自然纹理和轮廓。在 CAL 被证明有足够的安全性后, Li 等^[41]在临床上将其应用到面部轮廓重建中, 最后也取得了满意的临床效果, 进一步证明了 CAL 方案可明显提高脂肪移植物的存活率。Tanikawa 等^[42]使用混有 SVF 的脂肪移植, 成功使颌面微小症患者的软组织明显增加。Charles-De-Sá 等^[43]将 CAL 用于面部皮肤改善的治疗, 发现 CAL 可促进衰老皮肤的血管增多、胶原重塑和新弹性纤维的形成。同时研究也表明使用 SVF 或 ASCs 均能达到组织学上相同的治疗效果。但是也有一些研究发现, 在切除乳腺肿瘤后使用 CAL 进行乳房重建时, ASCs 可以促进乳腺癌细胞的增殖、迁移和转移^[44-46], 因此, 在某些癌症患者的脂肪移植中可能不适合采用 CAL 手术。

2.2 糖尿病

SVF 在糖尿病所引起的多种并发症中也有着广泛的应用, 例如用于改善糖尿病足溃疡 (diabetic foot ulcer, DFU) 和糖尿病视网膜病变等^[47-48]。作为糖尿病最常见的并发症, DFU 是一种根植于缺血和神经病变的疾病, 随着病程的延长, 溃疡处极易引发感染而加重病情^[49]。成纤维细胞是参与 DFU 伤口愈合的主要细胞, Chae 等^[50]在体外研究发现, 使用 SVF 对 DFU 进行治疗后, 成纤维细胞的数量不仅显著增加, 由成纤维细胞合成的胶原物质也明显增多。随后进行的临床试验结果显示, SVF 治疗的患者伤口愈合率为 100% 时, 对照组的愈合率仅为 62%, 说明 SVF 可以加速伤口愈合。随后在动物实验中发现, 将含有 SVF 的 Pluronic 水凝胶注射到伤口周围时, 可增加成纤维细胞数量及加快再上皮化

过程, 从而明显加速伤口愈合过程。Didangelos 等^[51]将自体血浆来源的 SVF 应用到 1 型糖尿病患者的 DFU 时同样取得了很好的治疗效果。Tan 等^[52]进行的基础研究显示, SVF 可通过上调伤口周围的细胞因子, 提升高血糖环境中的成纤维细胞活力及迁移水平, 使得伤口愈合加快。Eto 等^[34]发现 SVF 中的巨噬细胞超过 90% 都是具有抗炎特性的 M2 表型, 这类细胞也对 DFU 的愈合起到积极的抗炎作用。

糖尿病视网膜病变的特征在于视网膜血管网络的功能障碍和退化^[48]。Rajashekhara 等^[53]将 SVF 传代培养得到 ASCs 后注射到糖尿病大鼠中, 随后发现血管渗漏以及细胞凋亡的情况都得到减少。研究者认为, ASCs 与视网膜内皮细胞间的相互作用可以促进血管形成并能阻碍神经退行性病变的发生。Park 等^[54]在糖尿病视网膜病变动物模型中注射 SVF 后, 发现内皮祖细胞和脂肪基质细胞整合到了受损的视网膜血管壁中, 同时 ASCs 也可以通过旁分泌作用起到积极的影响。

2.3 克罗恩病

克罗恩病是一种存在于胃肠道中的以炎症性肠紊乱为特征的异常炎症, 其病症包括腹痛、血性腹泻及肠梗阻等, 病理变化会从炎症逐渐引发溃疡并最终形成瘘管^[55]。虽然克罗恩病的确切病因还不确定, 但有研究表明, 环境改变和遗传异常等因素可导致机体的免疫调节、黏膜屏障和细菌清除等功能障碍^[56]。随着 SVF 在糖尿病足溃疡中的广泛应用, 越来越多的研究者也选择使用 SVF 来尝试治疗克罗恩病^[57]。体外研究发现, SVF 中的 ASCs 组分可以抑制 T 细胞的异源性反应, 这可能是由于 ASCs 和 M2 表型的巨噬细胞对细胞微环境进行了免疫调控^[58]。Dryden 等^[59]采用生物支架承载 SVF 的方式治疗模型动物, 相比于直接使用 SVF 的方式, 实验组动物的瘘管中血管新生更快且溃疡愈合时间更短。在临床试验中, Philandrianos 等^[60]将患者的自体 SVF 细胞局部注射到病灶周围后, 所有的外部创面完全再上皮化。经过核磁共振成像也未检测到瘘管, 患者也没有出现任何严重的不良反应, 进一步肯定了该临床细胞疗法的安全性。此外, Molendijk 等^[61]提出了一种使用 ASCs 细胞来治疗肛周克罗恩病的标

准化方法, 使用这种标准化方案能更加有效地评估这种细胞局部治疗的疗效。

2.4 骨再生及骨关节炎

最初的基础研究发现, ASCs 在动物模型中可以诱导骨再生以及帮助骨骼快速愈合^[62]。随后的临床研究也发现, 使用 ASCs 结合 β -磷酸三钙支架来辅助治疗颅骨再生, 可取得良好的治疗效果且没有任何临床相关的并发症^[63]。此外, 脂肪源干细胞除了能够诱导骨形成外, 还能将其施用到动物模型的骨缺损处, 相关的实验已经证明了其具有加速骨骼愈合的潜力^[64]。鉴于 ASCs 治疗的成功案例, 研究者开始关注 SVF 在骨科方面的应用前景。Mehrkens 等^[65]使用诱导试剂成功将 SVF 细胞诱导分化为成骨细胞并产生了新的骨组织, 证明了 SVF 的成骨潜能。Jurgens 等^[66]分别将 SVF 和其传代培养的 ASCs 接种到胶原支架上来治疗山羊膝盖软骨缺损, 结果显示这 2 种支架中都发现了骨骼再生且两者无明显差异。但是最新的研究表明, SVF 在成骨细胞分化和刺激成骨细胞分泌可溶性因子方面, 具有比 ASCs 更好的骨诱导能力^[67]。

在骨科中另一类广泛应用 SVF 治疗的疾病是骨关节炎。2011 年, Pak^[68]首次在临床上向膝关节内注射患者自体 SVF, 成功治疗了骨关节炎。随后的大量研究都显示出类似的治疗结果^[69]。Nguyen 等^[70]通过设置空白对照实验, 进一步验证了脂肪 SVF 关节注射的安全性和有效性。在临床中也有将 SVF 与细胞外基质及透明质酸等进行联合使用, 一起注射到髌关节中, 最后成功在患者的骨关节中发现了再生的软骨样组织^[71]。Bansal 等^[72]将 SVF 与富含血小板的血浆进行混合, 随后注射到患者膝关节内。临床评估报告显示该方案可明显降低患者疼痛水平, 同时也显示出了良好的安全性。

2.5 在其他疾病中的应用

硬皮病又称为系统性硬化症, 是一种临床表现多样、多器官损伤的自身免疫性疾病, 病理性特点为皮肤和内脏的纤维化并伴有血管病变^[73]。Granel 等^[74]在 2014 年开展临床试验, 将硬皮症患者自体 SVF 注射到手指中, 初步验证了 SVF 细胞治疗的安全性和有效性。12 个月的随访报告显示, 患者手

部的皮肤硬化、水肿以及手部力量都有了明显的改善^[75]。由于 SVF 在糖尿病足等溃疡中具有较好的治疗效果, 所以其逐渐也被应用于皮肤烧伤等与创面愈合相关的适应证。例如在烧伤治疗中, SVF 的使用可以减弱皮肤移植物所引起的感染和免疫排斥等问题, 使得皮肤移植物的存活率增加^[76]。Atalay 等^[77]发现, 皮下注射 SVF 可以增加成纤维细胞活性和血管形成, 同时也可以减少炎症进而改善烧伤创面的愈合情况。SVF 出色的血管再生能力还在心肌梗死及严重肢体缺血等病症的治疗中得到了验证。研究者向心肌梗死模型动物中静脉注射 SVF 后, 可以明显观察到梗死面积减小, 且无任何明显不良反应发生^[78]; Darinskas 等^[79]在临床上向严重肢体缺血患者多次肌肉注射自体 SVF, 最后发现患处动脉

中形成了大量血管侧支网络, 由此说明 SVF 对于此类缺血性疾病具有良好的通用治疗效果。

3 SVF 临床试验的现状

目前, SVF 研究处于临床前研究阶段或正朝着人体试验的方向发展。自 SVF 首次应用到临床以来, 有关 SVF 治疗相关疾病的基础研究不断增多, 运用其治疗多种疾病的临床试验也在不断开展。使用“血管基质组分”或“脂肪干细胞”等关键词在临床研究数据库 (www.ClinicalTrials.gov) 中进行搜索, 除去已被撤回的研究之外, 总共可找到 47 项涉及人体的注册临床研究, 其中大多数都处于 I 期和 II 期临床研究阶段, 也有少部分还处于临床前的招募受试者状态。SVF 在不同疾病中开展的一些主要临床试验如表 3 所示。

表 3 SVF 临床试验概述

Table 3 Overview of SVF clinical trials

适应证	临床试验 NCT 码	研究状态
骨关节炎	NCT03818737	III 期临床
骨关节炎	NCT02846675, NCT03164083	II 期临床
膝关节骨关节炎	NCT02827851, NCT02142842	II 期临床
系统性硬化症	NCT02558543, NCT02866552	II 期临床
克罗恩病	NCT02520843	II 期临床
慢性阻塞性肺病	NCT02216630	II 期临床
糖尿病足	NCT02092870	II 期临床
肛周瘻	NCT03726255	II 期临床
少精无精症	NCT03762967	II 期临床
前列腺肥大	NCT02961114	II 期临床
骨质疏松性骨折	NCT01532076	II 期临床
平胸	NCT02116933	II 期临床
面部萎缩	NCT02526576	II 期临床
肌腱撕裂	NCT03332238	II 期临床
皮肤移植	NCT02546882	II 期临床
雄激素性脱发	NCT02865421	II 期临床
截肢疼痛	NCT02076022	I 期临床
糖尿病足	NCT02394886	I 期临床
直肠阴道瘻	NCT01548092, NCT01584713	I 期临床
严重肢体缺血	NCT02145897, NCT02234778	I 期临床
骨关节炎	NCT03089762, NCT01739504, NCT02697682, NCT01947348	I 期临床
雄激素性脱发	NCT02729415, NCT02849470	I 期临床
系统性硬化症	NCT03060551, NCT02975960	I 期临床
膝关节骨关节炎	NCT02276833, NCT02726945	I 期临床
乳腺癌	NCT02035085	I 期临床
烧伤	NCT03113747	I 期临床
气管食管瘻	NCT03792360	I 期临床
软组织缺陷	NCT02590042	I 期临床
慢性静脉溃疡	NCT02961699	I 期临床
多发性硬化症	NCT02157064	I 期临床
帕金森病	NCT02184546	I 期临床
颅面损伤	NCT01633892	I 期临床
皮肤老化	NCT03189628	临床前

续表3

适应症	临床试验 NCT 码	研究状态
类风湿性关节炎	NCT02348086	临床前
脱发/秃头	NCT03427905	临床前
皮肤异常	NCT01801878	临床前
勃起功能障碍	NCT03518333	临床前
骨关节炎	NCT02241408, NCT03166410	临床前

4 结语

脂肪来源 SVF 细胞的治疗潜力及安全性已经在脂肪转移和各种疾病模型中得到验证, 相关的临床试验也在顺利进行。虽然 SVF 在再生医学中的应用潜力巨大, 多数疾病治疗的研究报道也显示出良好的治疗效果, 但是也存在由于脂肪干细胞的滥用, 最后使患者出现视力下降、肿瘤发生甚至死亡的情况^[80-81]。因此, 美国 FDA 对用于临床治疗的干细胞制品制订了严格的监管标准。目前采用酶消化法提取 SVF 的方式, 在 FDA 文件中被明确指出“超过最小操作”, 所以此法分离的细胞制品只能作为生物制剂使用, 且需要经过 FDA 的严格监管^[82]。因此在后续的实验开展中研究者仍需要探索其他提取 SVF 的新型方法。

虽然 SVF 具有的多细胞组分可以实现血管再生、

组织重建和抗炎等多种功能, 但是这种异质细胞群完成以上复杂生物学过程的具体基质还不够清楚。现有的研究表明, SVF 细胞可通过胞外分泌和细胞分化等机制在受损组织或器官中发挥再生潜力; 此外也能通过免疫调节作用减少炎症的发生, 从而增强机体免疫耐受性^[83]。这些生物功能可能是由特定种类的细胞群产生, 亦或是需要多种细胞组分协同参与才能实现, 但是其中各种细胞群的具体参与机制和贡献情况有待进一步的阐明。另外, 由于使用细胞表面分子鉴定 SVF 细胞表型仍存在不确定性, 所以有关 SVF 细胞表型及其具体变化情况也需要更加系统深入的研究。总的来说, 以干细胞疗法为主的 SVF 细胞治疗还处于早期研究阶段, 但其临床应用潜力巨大。相信随着基础研究的不断深入, 脂肪来源 SVF 细胞会在临床中展示其独有的细胞优势和治疗价值。

[参考文献]

- [1] Locke M, Windsor J, Dunbar P R. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery[J]. *ANZ J Surg*, 2010, 79(4): 235-244.
- [2] Bourin P, Bunnell B A, Casteilla L, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT)[J]. *Cytotherapy*, 2013, 15(6): 641-648.
- [3] Zuk P, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies[J]. *Tissue Eng Part A*, 2001, 7(2): 211-228.
- [4] Domergue S, Bony C, Maumus M, et al. Comparison between stromal vascular fraction and adipose mesenchymal stem cells in remodeling hypertrophic scars[J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): 156-161.
- [5] Sinno S, Wilson S, Brownstone N, et al. Current thoughts on fat grafting: using the evidence to determine fact or fiction[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2016, 137(3): 818-824.
- [6] Gimble J M, Bunnell B A, Frazier T, et al. Adipose-derived stromal/stem cells: a primer[J]. *Organogenesis*, 2013, 9(1): 3-10.
- [7] Markarian C F, Frey G Z, Silveira M D, et al. Isolation of adipose-derived stem cells: a comparison among different methods[J]. *Biotech Lett*, 2014, 36(4): 693-702.
- [8] Zeng G, Lai K, Li J, et al. A rapid and efficient method for primary culture of human adipose-derived stem cells[J]. *Organogenesis*, 2013, 9(4): 287-295.
- [9] Tonnard P, Verpaele A, Peeters G, et al. Nanofat grafting: basic research and clinical application[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2013, 132(4): 1017-1026.
- [10] Fraser J K, Hicok K C, Shanahan R, et al. The Celution[®] system: automated processing of adipose-derived regenerative cells in a functionally closed system[J]. *Adv Wound Care*, 2014, 3(1): 38-45.
- [11] Oberbauer E, Steffenhagen C, Wurzer C, et al. Enzymatic and non-enzymatic isolation systems for adipose tissue-derived cells: current state of the art[J]. *Cell Regen*, 2015, 4(1): 7. Doi: 10.1186/s13619-015-0020-0.
- [12] SundarRaj S, Deshmukh A, Priya N, et al. Development of a system and method for automated isolation of stromal vascular

- fraction from adipose tissue lipoaspirate[J]. *Stem Cells Int*, 2015, 2015: 1-11.
- [13] Zhang W J, Sun J J. Isolation, culture and identification of human adipose-derived mesenchymal stem cells[J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2016, 30(9): 726-729.
- [14] Nguyen A, Guo J, Banyard D A, *et al*. Stromal vascular fraction: a regenerative reality? Part 1: current concepts and review of the literature[J]. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2016, 69(2): 170-179.
- [15] Gimble J, Bunnell B, Chiu E, *et al*. Concise review: adipose-derived stromal vascular fraction cells and stem cells: let's not get lost in translation[J]. *Stem Cells*, 2011, 29(5): 749-754.
- [16] Guo J, Nguyen A, Banyard D A, *et al*. Stromal vascular fraction: a regenerative reality? Part 2: mechanisms of regenerative action[J]. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2016, 69(2): 180-188.
- [17] Zimmerlin L, Donnenberg V S, Rubin J P, *et al*. Mesenchymal markers on human adipose stem/progenitor cells[J]. *Cytometry A*, 2013, 83A(1): 134-140.
- [18] Ryu Y, Cho T, Lee D, *et al*. Phenotypic characterization and *in vivo* localization of human adipose-derived mesenchymal stem cells[J]. *Molecules Cells*, 2013, 35(6): 557-564.
- [19] Asahara T, Kawamoto A, Masuda H. Concise review: circulating endothelial progenitor cells for vascular medicine[J]. *Stem Cells*, 2011, 29(11): 1650-1655.
- [20] Garipcan B, Maenz S, Pham T, *et al*. Image analysis of endothelial microstructure and endothelial cell dimensions of human arteries—a preliminary study[J]. *Adv Eng Mater*, 2011, 13(1/2): B54-B57.
- [21] Rosenbluth M J, Lam W A, Fletcher A. Force microscopy of nonadherent cells: a comparison of leukemia cell deformability[J]. *Biophys J*, 2006, 90(8): 2994-3003.
- [22] Krombach F, Münzing S, Allmeling A M, *et al*. Cell size of alveolar macrophages: an interspecies comparison[J]. *Environ Health Persp*, 1997, 105(Suppl 5): 1261-1263.
- [23] Ammit A J, Panettieri R A. Invited review: the circle of life: cell cycle regulation in airway smooth muscle[J]. *J Appl Physiol*, 2001, 91(3): 1431-1437.
- [24] Proebstl D, Voisin M, Woodf A, *et al*. Pericytes support neutrophil subendothelial cell crawling and breaching of venular walls *in vivo*[J]. *J Exp Med*, 2012, 209(6): 1219-1234.
- [25] Lai N, Sims K, Jeon L, *et al*. Adipocyte induction of preadipocyte differentiation in a gradient chamber[J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2012, 18(12): 958. Doi: 10.1089/ten.TEC.2012.0168.
- [26] Pachón-Pea G, Yu G, Tucker A, *et al*. Stromal stem cells from adipose tissue and bone marrow of age-matched female donors display distinct immunophenotypic profiles[J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226(3): 843-851.
- [27] Coralie S, Karine L, Alexia Z G, *et al*. Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells[J]. *J Cell Physiol*, 2010, 205(1): 114-122.
- [28] Maumus M, Peyrafitte J A, D'angelo R, *et al*. Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype[J]. *Int J Obes*, 2011, 35(9): 1141-1153.
- [29] Dominici M, Blanc K, Mueller I, *et al*. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement[J]. *Cytotherapy*, 2006, 8(4): 315-317.
- [30] Sidney L E, Branch M J, Dunphy S E, *et al*. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors[J]. *Stem Cells*, 2014, 32(6): 1380-1389.
- [31] Traktuev D O, Prater D N, Merfeld-Clauss S, *et al*. Robust functional vascular network formation *in vivo* by cooperation of adipose progenitor and endothelial cells[J]. *Circ Res*, 2009, 104(12): 1410-1420.
- [32] Astori G, Vignati F, Bardelli S, *et al*. “*In vitro*” and multicolor phenotypic characterization of cell subpopulations identified in fresh human adipose tissue stromal vascular fraction and in the derived mesenchymal stem cells[J]. *J Transl Med*, 2007, 5(1): 55-57.
- [33] Navarro A, Marín S, Riol N, *et al*. Human adipose tissue-resident monocytes exhibit an endothelial-like phenotype and display angiogenic properties[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2014, 5(2): 50-51.
- [34] Eto H, Ishimine H, Kinoshita K, *et al*. Characterization of human adipose tissue-resident hematopoietic cell populations reveals a novel macrophage subpopulation with CD34 expression and mesenchymal multipotency[J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(6): 985-997.
- [35] Tocco I, Widgerow A D, Lalezari S, *et al*. Lipotransfer: the potential from bench to bedside[J]. *Ann Plast Surg*, 2014, 72(5): 599-609.
- [36] Moustaki M, Papadopoulos O, Verikokos C, *et al*. Application of adipose derived stromal cells in fat grafting: basic science and literature review[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(3): 2415-2423.
- [37] Køllef S F T, Fischernielsen A, Mathiasen A B, *et al*. Enrichment of autologous fat grafts with *ex-vivo* expanded adipose tissue-derived stem cells for graft survival: a randomised placebo-controlled trial[J]. *Lancet*, 2013, 382(9898): 1113-1120.
- [38] Karacaoglu E, Kizilkaya E, Cermik H, *et al*. The role of recipient sites in fat-graft survival: experimental study[J]. *Ann Plast Surg*, 2005, 55(1): 63-68.
- [39] Matsumoto D, Sato K, Gonda K, *et al*. Cell-assisted lipotransfer: supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection[J]. *Tissue Eng*, 2006, 12(12):

- 3375-3382.
- [40] Yoshimura K, Sato K, Aoi N, *et al.* Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells[J]. *Aesthetic Plast Surg*, 2008, 32(1): 48-55.
- [41] Li J, Gao J, Cha P, *et al.* Supplementing fat grafts with adipose stromal cells for cosmetic facial contouring[J]. *Dermatol Surg*, 2013, 39(3Pt1): 449-456.
- [42] Tanikawa D Y S, Aguená M, Bueno D, *et al.* Fat grafts supplemented with adipose-derived stromal cells in the rehabilitation of patients with craniofacial microsomnia[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2013, 132(1): 141-152.
- [43] Charles-De-Sá L, Gontijo-De-Amorim N, Takiya C M, *et al.* Antiaging treatment of the facial skin by fat graft and adipose-derived stem cells[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2015, 135(4): 999-1009.
- [44] Mandel K, Yang Y, Schambach A, *et al.* Mesenchymal stem cells directly interact with breast cancer cells and promote tumor cell growth *in vitro* and *in vivo*[J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(23): 3114-3127.
- [45] Lu Y, Yang Y, Liu Y, *et al.* Upregulation of PAG1/Cbp contributes to adipose-derived mesenchymal stem cells promoted tumor progression and chemoresistance in breast cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 494(3/4): 719-727.
- [46] Riccardo S, Wakako T, Gorantla V, *et al.* The role of adipose-derived stem cells in breast cancer progression and metastasis[J]. *Stem Cells Int*, 2015, 2015: 1-17.
- [47] Hi-Jin Y, Seung-Kyu H. Cell therapy for wound healing[J]. *J Korean Med Sci*, 2014, 29(3): 311-319.
- [48] Hedhli J, Konopka C J, Schuh S, *et al.* Multimodal assessment of mesenchymal stem cell therapy for diabetic vascular complications[J]. *Theranostics*, 2017, 7(16): 3876-3888.
- [49] Ricco J B, Phong L T, Schneider F, *et al.* The diabetic foot: a review[J]. *J Card Surg*, 2013, 54(6): 755-762.
- [50] Chae D S, Han S, Son M, *et al.* Stromal vascular fraction shows robust wound healing through high chemotactic and epithelialization property[J]. *Cytotherapy*, 2017, 19(4): 543-554.
- [51] Didangelos T, Koliakos G, Kouzi K, *et al.* Accelerated healing of a diabetic foot ulcer using autologous stromal vascular fraction suspended in platelet-rich plasma[J]. *Regen Med*, 2018, 13(3): 277-281.
- [52] Tan S S, Yeo X Y, Liang Z C, *et al.* Stromal vascular fraction promotes fibroblast migration and cellular viability in a hyperglycemic microenvironment through up-regulation of wound healing cytokines[J]. *Exp Mol Pathol*, 2018, 104(3): 250-255.
- [53] Rajashekhar G, Ramadan A, Abburi C, *et al.* Regenerative therapeutic potential of adipose stromal cells in early stage diabetic retinopathy[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): 8-17.
- [54] Park S S. Cell therapy applications for retinal vascular diseases: diabetic retinopathy and retinal vein occlusion[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(5): 1-10.
- [55] Laass M W, Roggenbuck D, Conrad K. Diagnosis and classification of Crohn's disease[J]. *Autoimmun Rev*, 2014, 13(4/5): 467-471.
- [56] Sartor R B. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis[J]. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 2006, 3(7): 390-407.
- [57] Cao Y, Ding Z, Han C, *et al.* Efficacy of mesenchymal stromal cells for fistula treatment of Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis[J]. *Dig Dis Sci*, 2017, 62(4): 851-860.
- [58] Dalal J, Gandy K, Domen J. Role of mesenchymal stem cell therapy in Crohn's disease[J]. *Pediatric Res*, 2012, 71(4 Pt 2): 445-451.
- [59] Dryden G W, Boland E, Yajnik V, *et al.* Comparison of stromal vascular fraction with or without a novel bioscaffold to fibrin glue in a porcine model of mechanically induced anorectal fistula[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2017, 23(11): 1-4.
- [60] Philandrianos C, Serrero M, Grimaud F, *et al.* First clinical case report of local microinjection of autologous fat and adipose-derived stromal vascular fraction for perianal fistula in Crohn's disease[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 4-9.
- [61] Molendijk I, Verspaget H, Veenendaal R, *et al.* Standardization of mesenchymal stromal cell therapy for perianal fistulizing Crohn's disease[J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2018, 30(10): 1148-1154.
- [62] Lee M K, DeConde A S, Lee M, *et al.* Biomimetic scaffolds facilitate healing of critical-sized segmental mandibular defects[J]. *Am J Otolaryngol*, 2015, 36(1): 1-6.
- [63] Thesleff T, Lehtimäki K, Niskakangas T, *et al.* Cranioplasty with adipose-derived stem cells, betatricalcium phosphate granules and supporting mesh: six-year clinical follow-up results[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6(7): 1576-1582.
- [64] Weisgerber D W, Milner D J. A mineralized collagen-polycaprolactone composite promotes healing of a porcine mandibular defect[J]. *Tissue Eng Part A*, 2018, 24(11/12): 943-954.
- [65] Mehrkens A, Saxer F, Güven S, *et al.* Intraoperative engineering of osteogenic grafts combining freshly harvested, human adipose-derived cells and physiological doses of bone morphogenetic protein-2[J]. *Eur Cell Mater*, 2012, 24(7): 308-319.
- [66] Jurgens W J F M, Kroeze R, Zandieh-Doulabi B, *et al.* One-step surgical procedure for the treatment of osteochondral defects with adipose-derived stem cells in a caprine knee defect: a pilot study[J]. *Biores Open Access*, 2013, 2(4): 315-325.
- [67] Ilaria R, Carolina B D, Mara C, *et al.* Adipose-derived stromal vascular fraction/xenohybrid bone scaffold: an alternative source for bone regeneration[J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 1-11.
- [68] Pak J. Regeneration of human bones in hip osteonecrosis and human cartilage in knee osteoarthritis with autologous adipose-tissue-derived stem cells: a case series[J]. *J Med Case Rep*, 2011,

- 5(1): 296. Doi: 10.1186/1752-1947-5-296.
- [69] Pak J, Lee J, Pak N, *et al.* Cartilage regeneration in humans with adipose tissue-derived stem cells and adipose stromal vascular fraction cells: updated status[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(7): 2146. Doi: 10.3390/ijms19072146.
- [70] Nguyen P D, Tran T D, Nguyen H T, *et al.* Comparative clinical observation of arthroscopic microfracture in the presence and absence of a stromal vascular fraction injection for osteoarthritis[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6(1): 187-195.
- [71] Pak J, Lee J H, Park K S, *et al.* Efficacy of autologous adipose tissue-derived stem cells with extracellular matrix and hyaluronic acid on human hip osteoarthritis[J]. *Biomed Res*, 2017, 28(4): 192-200.
- [72] Bansal H, Comella K, Leon J, *et al.* Intra-articular injection in the knee of adipose derived stromal cells (stromal vascular fraction) and platelet rich plasma for osteoarthritis[J]. *J Transl Med*, 2017, 15(1): 141. Doi: 10.1186/s12967-017-1242-4.
- [73] Saygin D, Highland K. Microvascular involvement in systemic sclerosis and system lupus erythematosus[J]. *Microcirculation*, 2019, 26(3): e12440. Doi:10.1111/micc.12440.
- [74] Granel B, Daumas A, Jouve E, *et al.* Safety tolerability and potential efficacy of injection of autologous adipose-derived stromal vascular fraction in the fingers of patients with systemic sclerosis: an open-label phase I trial[J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74(12): 2175-2182.
- [75] Guillaume-Jugnot P, Daumas A, Magalon J, *et al.* State of the art autologous fat graft and adipose tissue-derived stromal vascular fraction injection for hand therapy in systemic sclerosis patients[J]. *Curr Res Transl Med*, 2016, 64(1): 35-42.
- [76] Giudice G, Filoni A, Maggio G, *et al.* Use of the stromal vascular fraction in intermediate-deep acute burns: a case with its own control[J]. *J Burn Care Res*, 2017, 39(5): 846-849.
- [77] Atalay S, Coruh A, Deniz K. Stromal vascular fraction improves deep partial thickness burn wound healing[J]. *Burns*, 2014, 40(7): 1375-1383.
- [78] Lim M, Wang W, Liang L, *et al.* Intravenous injection of allogeneic umbilical cord-derived multipotent mesenchymal stromal cells reduces the infarct area and ameliorates cardiac function in a porcine model of acute myocardial infarction[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 129. Doi: 10.1186/s13287-018-0888-z.
- [79] Darinskas A, Paskevicius M, Apanavicius G, *et al.* Stromal vascular fraction cells for the treatment of critical limb ischemia: a pilot study[J]. *J Transl Med*, 2017, 15(1): 143. Doi: 10.1186/s12967-017-1243-3.
- [80] Cyranoski D. Korean deaths spark inquiry[J]. *Nature*, 2010, 468(7323): 485. Doi:10.1038/468485a.
- [81] McLean A K, Stewart C, Kerridge I. Untested, unproven, and unethical: the promotion and provision of autologous stem cell therapies in Australia[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6(1): 1-8.
- [82] Tocco I, Widgerow A D, Lalezari S, *et al.* Lipotransfer: the potential from bench to bedside[J]. *Ann Plast Surg*, 2014, 72(5): 599-609.
- [83] Dykstra J A, Facile T, Patrick R J, *et al.* Concise review: fat and furious: harnessing the full potential of adipose-derived stromal vascular fraction[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6(4): 1096-1108.



【专家介绍】金亮: 博士, 教授, 江苏省特聘教授, 博士生导师。江苏省杰出青年基金获得者, 江苏省“333 高层次人才培养工程”第二层次培养对象, 江苏省青蓝工程科技创新团队带头人, 江苏省科技创新团队核心人才, 江苏省“六大人才高峰”优秀人才。2006年6月于中国药科大学获博士学位, 同年8月留校任讲师; 2010年5月晋升为副教授, 同年7月赴美国国家医学中心(City of Hope)从事博士后研究, 2014年5月返回中国药科大学, 同年聘为教授。主要研究方向为人脂肪源干细胞在组织损伤中的应用与开发; 组织干细胞的正常发育、变异及肿瘤干细胞的形成机制; 糖尿病治疗的多肽类药物研究与开发。近5年主持及参与国家863计划项目、国家“重大新药创制”科技重大专项及国家自然科学基金项目多项。目前发表SCI收录研究论文30余篇, 授权专利5项。



【专家介绍】胡文军: 理学博士, 副教授, 硕士研究生导师。2001年毕业于中国科学院上海生命科学研究院, 获理学博士学位后加入中国药科大学生命科学与技术学院分子生物学教研室, 从事教学与科研工作至今。教学方面, 主要从事药理学本科理科基地班和研究生的《生物化学》和《分子生物学》等课程的教学工作。主要科研方向包括: 1) 鼠干细胞和人胚胎干细胞的发育调控机制及其临床应用; 2) 中药现代化; 3) 转基因水稻的安全性评价等。主持和参加国家级及省部级课题多项, 发表论文多篇。