

脂肪组织衍生物在修复再生领域的应用研究

刘彦君¹ 周双白¹ 汤妍² 汤其群² 李青峰^{1*}

¹上海交通大学医学院附属第九人民医院整复外科, 上海 200011;

²复旦大学基础医学院代谢分子医学教育部重点实验室, 上海 200032)

摘要 自体脂肪组织含量丰富、获取方便且组织相容性好, 作为一种软组织填充材料显示出良好的优势。除了大量成熟的脂肪细胞, 脂肪组织还富含干细胞、免疫细胞和血管相关细胞(统称为血管基质成分)。这些血管基质成分可以分泌大量的生物活性因子, 参与免疫调节和损伤修复, 从而为细胞疗法和修复重建提供新的思路。但由于脂肪组织成分复杂, 质量评价标准不详, 取得的疗效也不稳定, 因此脂肪组织衍生物在广泛应用的同时也备受争议。该文就脂肪组织衍生物在整形修复领域的临床前研究和临床研究进行综述, 以期脂肪组织衍生物的临床应用提供一定的指导意义。

关键词 脂肪组织; 修复重建; 细胞治疗

Application of Adipose Tissue Derivatives in the Field of Repair and Regeneration

LIU Yanjun¹, ZHOU Shuangbai¹, TANG Yan², TANG Qiqun², LI Qingfeng^{1*}

¹Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital,

Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China;

²Key Laboratory of Metabolism and Molecular Medicine, Ministry of Education, School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract Adipose tissue can be easily obtained in large quantities and has shown promise in the repair of soft-tissue defects. Except of adipocytes, adipose tissue provides an abundant source of SVF (stromal vascular fraction) cells including stem cells, immune cells and blood-vessel related cells. These SVF cells secrete various cytokines and mediate immune regulation and injury repair, providing novel ideas for cell therapy and repair and reconstruction. However, it's controversial to be widely used, due to the complex composition of adipose tissue, unclear quality evaluation criteria, and unstable efficacy. This review summarizes the preclinical and clinical studies of adipose tissue derivatives in the field of plastic repair to provide some guidance for the clinical application of adipose tissue derivatives.

Keywords adipose tissue; repair and reconstruction; cell therapy

先天异常、肿瘤疾病、外伤和衰老常导致软组织缺陷, 即使表皮完整也可能出现轮廓异常, 并且还可能导致伤口愈合不全以及对关键器官、结构(包

括骨骼、植入物和大血管)的保护不足^[1]。软组织修复分为体表修复和体内材料植入, 体内材料植入包括生物材料填充和自体组织移植。常见的生物材料

收稿日期: 2019-11-05 接受日期: 2020-03-16

国家自然科学基金(批准号: 81620108019)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13301990666, E-mail: dr.liqingfeng@yahoo.com

Received: November 5, 2019 Accepted: March 16, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81620108019)

*Corresponding author. Tel: +86-13301990666, E-mail: dr.liqingfeng@yahoo.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5298>

有胶原蛋白^[2]、透明质酸^[3]、硅橡胶等,然而植入材料在体内的吸收程度、稳定性、组织毒性反应以及致癌性等问题迄今尚有争议,这也极大地限制了它们的临床应用;自体组织移植包括植皮和皮瓣移植,但都会导致供区损伤,形成色素沉着或疤痕等问题。

1893年, NEUBER等^[4]首次将小块脂肪组织移植用于修复软组织缺损,自体脂肪组织因来源广泛、无免疫排斥、方便获取、供区创伤小、可重复应用等特点而被广泛应用于整形美容和修复重建。然而脂肪移植后容易被吸收、成活率不高、填充效果不可预知、大量抽脂后供区皮肤松垮等问题逐渐凸显,如何更好地利用脂肪组织被广泛研究。

1 脂肪组织衍生物

脂肪组织内主要存在两大细胞群,即成熟脂肪细胞和基质血管部分(stromal vascular fraction, SVF)。1994年,瘦素的发现让人们开始认识到脂肪组织还具有活跃的内分泌和旁分泌功能,分泌许多细胞因子和生物活性因子^[5]。COLEMAN^[6]在2006年通过一系列病例报道指出,脂肪组织不仅仅是一种填充物,它还对接触到的皮肤组织具有改善作用,这让大家开始重点关注脂肪组织内的成分。

1.1 基质血管部分

脂肪组织经过胶原酶消化、离心、去除成熟的脂肪细胞后剩余的组分被称为血管基质成分。它含有各种细胞,包括干细胞、内皮细胞、周细胞、基质细胞和免疫细胞^[7]。SVF是细胞治疗的理想原材料,在没有培养扩增的情况下还能实时分离出足够的细胞量。

1.2 纳米脂肪(nanofat)

纳米脂肪自2013年被提出后引起人们广泛的研究。脂肪组织在注射器内被反复推注,破坏成熟脂肪细胞后过滤去除较大的纤维,最后剩余的能通过27 G针头的组分被称为纳米脂肪,大小为400 μm至600 μm或更小^[8]。和SVF悬液相比,纳米脂肪很容易通过机械消化和脂肪过滤的步骤获得,在保留基质细胞数量的同时增加其活力并减小组织大小^[9]。由于生产微碎片脂肪组织的简单性和有效性,这种不添加酶的新型机械分离方法受到关注。然而纳米脂肪的确切组成成分尚未明确。2017年, YAO等^[10]提出了SVF-gel的概念,即抽脂得到的脂肪经过2次离心后,再在注射器内反复推注最后形成的胶状物。他认为胶状物内高度富含SVF成分,更好地保存了血管片段和细胞外

基质部分,修复再生效果优于SVF悬液^[11]。

1.3 脂肪干细胞条件培养基(adipose stem cells conditioned medium, ASC-CM)

脂肪干细胞体外培养同样旁分泌多种细胞因子和生长因子,因此很多研究者猜测去除细胞的培养液一样可以发挥作用^[12-13]。干细胞的条件培养基比细胞更容易生产、冷冻干燥、包装和运输。此外,条件培养基无需在供体和受体之间匹配,而细胞则需要^[14]。因此, ADSC-CM作为再生医学的治疗工具具有广阔的前景。目前已有基于ASC-CM的商品化产品AAPE[®](现称为NGAL[®])在韩国上市。

1.4 脂肪液体提取物

临床中应用细胞治疗总需要考虑很多问题,如加工后细胞的遗传稳定性、注射后细胞的活性和存活率、多次给药期间的细胞储存、使用异体脂肪细胞的免疫原性等。近2年有研究发现,将nanofat离心后分为3层:油脂层、基质细胞层和液体层。该液体层富含多种生长因子,具有和SVF相似的促血管生成、促增殖、抗凋亡的能力,并且在减少缺血性损伤方面表现出治疗潜力,却不包含细胞成分,更具有应用前景^[15-17]。

1.5 脂肪干细胞(adipose stem cells, ASCs)

2001年ZUK等^[18]首次发现抽脂手术获得的脂肪组织中存在具有多项分化潜能的细胞群,并与间充质干细胞有相同的表面标志^[19],脂肪干细胞的概念由此提出。ASCs贴壁培养后能稳定增殖,并可以在特定的诱导条件下分化为脂肪细胞、成骨细胞、软骨细胞、神经细胞等,同时分泌大量蛋白质,在血管生成、免疫调节、伤口愈合和组织再生中起作用^[20]。

1.6 外泌体(exosomes)

有研究表明,干细胞分泌的成分除了蛋白质,还有外泌体^[21]。外泌体是一种直径介于50~150 nm的亚细胞双层膜细胞外囊泡(extracellular vesicle, EV),通过受体-配体结合激活信号通路,或者通过胞吞和膜融合的方式进入宿主细胞,调控其生理状态^[22]。OGAWA等^[23]分析了脂肪细胞来源的微泡(包括外泌体)的mRNA谱,发现其与骨代谢、细胞功能、免疫过程、血管新生等有关。基于外泌体的治疗方法已经引起了修复再生领域的兴趣^[24-25]。

2 脂肪组织衍生物的作用原理

修复再生的重点是原组织再发育和移植物内

血管新生, 血管通过维持营养物质交换来支持细胞的生长和组织的功能^[26]。在机体发生组织损伤的时候, ASCs会自动迁移到损伤部位, 在外界刺激的情况下分化为健康的原受损细胞; 血管相关细胞如内皮祖细胞、内皮细胞、周细胞、成纤维细胞等和干细胞相互作用, 协同血管生成因子和抗凋亡因子, 如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)等, 共同促进血管生成^[27-29]。巨噬细胞、单核细胞等免疫细胞可以通过分泌抑炎性细胞因子如转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β), 减少促炎性细胞因子如肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)的表达量来减轻炎症, 促进伤口愈合^[30-31]。

3 脂肪衍生物临床应用

软组织损伤常发生伤口迁延不愈或瘢痕形成, 影响美观和功能; 也常出现血供不足和炎症反应而导致移植物坏死。因此, 脂肪组织的干性、血管生成能力、免疫调节能力引起大家的强烈关注。

3.1 促毛发生长

毛发都经历生长、退化和静止的阶段^[32]。毛囊的生长和生长因子有关, 包括成纤维细胞生长因子、血管内皮生长因子、胰岛素样生长因子和血小板衍生生长因子^[33-34]。成熟的脂肪细胞能够分泌生长因子, 可以促进毛囊的活化^[35]。一些研究显示, 使用脂肪衍生产品能够促进毛发生长。ANDERL等^[36]研究了一次注射含细胞量为 4.7×10^6 个的自体SVF对于9名女性和11名男性斑秃患者的治疗效果, 治疗6个月后, 头发直径平均增加了32%, 头发密度平均增加了36%, 毛发也更强壮。SHIN等^[12]观察了每周注射4 mL AAFE对于女性脱发的治疗效果, 在治疗12周后, 平均头发密度从105.4根/cm²增加到122.7根/cm², 增加了16.4%; 平均头发厚度从57.5 μ m增加到64.0 μ m, 增加了11.3%。

3.2 促进创面愈合

创面的愈合是一个复杂连贯的过程, 包括止血期、炎症期、增生期和组织重构期^[37]。组织缺氧、糖尿病、细胞衰老、全身营养不良、感染等因素常导致创面延迟愈合甚至不能愈合, 形成慢性难愈性创面^[38]。常见的难愈性创面包括: 大面积烧伤晚期残余创面、糖尿病足、压疮、下肢静脉曲张及放射

性皮肤溃烂等。

实验证明, 肌肉注射ASCs(细胞量为 5×10^7 个)可以明显促进新西兰白兔臀部放射性溃疡创面愈合($P < 0.05$), 其机制可能与VEGF及碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)的升高有关^[39]。在构建糖尿病裸鼠下肢缺血模型25天后, 无治疗组常显示坏疽形成, 并伴有持续的炎症反应, 下肢存活率低; 而局部注射ASCs(细胞量为 3×10^6 个)组早期可形成丰富血管, 组织重构更好(不是纤维化瘢痕), 截肢率低^[40]。

临床也已有实验性治疗。在MARINO等^[41]的一项研究中, 他们挑选了20位周围动脉疾病和腿部溃疡患者(包括18例II型糖尿病)设计对照实验, 在实验组患者的溃疡边缘注射ASCs。与未治疗组相比, ASCs注射后溃疡直径、深度和相关疼痛明显减少, 无不良反应, 10例接受ASCs治疗的患者中有6例溃疡完全愈合。ASCs在增强糖尿病伤口愈合方面的功效的临床试验研究也已有登记(临床试验登记编号: NCT02092870、NCT03370874)。

3.3 减少瘢痕形成

瘢痕形成过程包括炎症、增殖和重塑, 其中生长因子发挥重要作用, 它能刺激纤维母细胞分化形成胶原沉积^[42]。细胞外基质的异常重塑导致瘢痕疙瘩形成和肥厚性瘢痕形成^[43]。近期一项研究给瘢痕模型小鼠($n=5$)静脉注射外泌体21天后, 观察到瘢痕深度、宽度、胶原密度均显著改善($P < 0.01$); 成纤维细胞分化和组织肉芽形成相关的基因 α -平滑肌肌动蛋白(alpha-smooth muscle actin, α -SMA)和I型胶原 $\alpha 1$ 链(collagen type I alpha 1, *Coll1A1*)表达显著降低($P < 0.01$); 体外实验表明, 外泌体还通过激活细胞外调节蛋白激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)/丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)途径增加真皮成纤维细胞的基质金属蛋白酶3(matrix metalloproteinase 3, MMP3)表达, 从而重塑细胞外基质^[25]。另有研究在BALB/c小鼠瘢痕模型中发现, 注射ASC-CM后伤口处胶原沉积更少, 同一时间点愈合更快, 并验证其可能是通过抑制P38/MAPK信号来减少 α -SMA和*Coll1A1*的表达的($P < 0.05$)^[44]。

临床治疗中, JAN等^[45]在48位患者的烧伤后面部疤痕处注射大约20 mL纳米脂肪, 6个月后疤痕质量有统计学上的显著改善($P < 0.0001$), 色素沉着明

显减轻,质地更加柔软。

3.4 提高皮瓣存活率

由于血液供应不足导致皮瓣缺血坏死是整形修复手术最常见的术后并发症,缺氧导致细胞死亡和免疫细胞的活化,释放炎性细胞因子。脂肪衍生物通过生长因子和细胞因子调节微环境,在缺血模型中显示出有期望的治疗结果。PU等^[46]设计使小鼠胸膜皮肤缺血3 h再灌注,注射的ASC、ASC-CM、EV可促进ASCs直接分化为内皮细胞并激活白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)通路,显著促进血管生成($P<0.01$),提高皮瓣存活率,但并未比较三者的治疗效果是否有显著差异。UYSAL等^[47]在20只ICR鼠背部设计了2个皮瓣,右皮瓣注射ASCs,皮瓣均受6 h的局部缺血再灌注,检测发现治疗组中VEGF、TGF- β 和成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)的水平有统计学意义上的提高($P<0.001$),ASC在体内分化为内皮细胞,血管密度增加($P<0.05$),他们猜测ASCs可能是通过调节微环境中生长因子的水平来保护皮瓣组织的。

3.5 面部年轻化

皮肤老化表现为皱纹、粗糙纹理、色素沉着、毛细血管扩张和皮肤松弛萎缩,这个过程主要是由内在因素(基因、激素)和外在因素(紫外线、吸烟)共同引起的^[48]。在裸鼠光老化模型中分别注射ADSCs(每个注射区细胞量为 1×10^6 个/200 μ L)和nanofat(每个注射区200 μ L),4周后可观察到两组裸鼠的真皮层明显比磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)注射组厚($P<0.05$),毛细血管也更多($P<0.05$),表皮增殖指数显著增加($P<0.05$)^[49]。外泌体在体外皮肤损伤模型内可能通过Wnt/ β -catenin信号通路减少细胞凋亡,促进伤口愈合^[50]。有实验在11只年老无毛鼠背部一侧注射ASCs(细胞量为 5×10^5 个/30 μ L),2周后可观察到胶原蛋白合成、真皮厚度、胶原蛋白密度、血管均有显著增加($P<0.05$),注射脂肪组织衍生物可能实现抗皱的希望^[51]。

在临床治疗中,AMIRKHANI等^[52]评估患者注射自体SVF(2×10^7 个/次)后6个月鼻唇沟的结构改善,尽管没有观察到鼻唇沟中明显的表型变化,但注射导致真皮密度和厚度显著增加($P<0.05$)。YAO等^[53]回顾了2015年3月至2017年2月期间在本院接受SVF-gel注射的126例患者和接受常规脂肪注射的78例患者,所有患者均表现出面部增强和轮廓改善,

SVF-gel注射显示出有效的抗皱和嫩肤效果,SVF-gel组中77.3%的患者对他们的结果感到满意(54.5%)或非常满意(22.8%);相比之下,接受常规脂肪注射的患者中有53.8%的患者满意(48.7%)或非常满意(5.1%)。

3.6 提高脂肪移植存活率

脂肪移植已成为修复人体软组织缺陷的一种流行的方法。然而临床治疗中脂肪留存率的不可控问题仍待解决,已报道的脂肪吸收率在25%~80%之间^[54]。脂肪体积损失主要是由于成熟脂肪细胞注入受体区域后趋于死亡^[55]。2006年,MATSUMOTO等^[56]通过小鼠模型引入了细胞辅助脂质转移(cell-assisted lipotransfer, CAL)的概念,即抽吸得到的脂肪和SVF或ASCs共同移植,以提高脂肪组织移植物的存活率^[56]。早期实验将4 mL人体抽脂脂肪获得的SVF与1 mL抽脂脂肪混合注射在免疫缺陷小鼠背部,CAL组($\geq 35\%$)比单纯脂肪移植组具有更高的移植物保留率,并有更显著的微脉管系统建立,这提示了CAL方法在软组织修复方面具有临床潜力^[56]。为了进一步研究ASCs在CAL中的作用,有研究将表达绿色荧光蛋白的C57小鼠的脂肪和从表达DsRed(红色荧光蛋白)的同类小鼠的脂肪内提取培养后的SVF,共移植到野生C57小鼠中,术后第4周的追踪显示,存活的供体脂肪的基质细胞可分化为内皮细胞参与血管生成,同时与新分化脂肪和存活的供体脂肪整合在一起,从而改善了移植物的保留^[57]。最近的一篇研究也是在C57小鼠颅骨的骨膜上平面注射100 μ L来自表达绿色荧光蛋白的C57小鼠的脂肪,同时在眼球后静脉注射50 μ L含有 1.0×10^5 个细胞的从表达DsRed小鼠脂肪内提取培养后的基质细胞磷酸缓冲液,术后4周开始在移植物内观察到DsRed细胞,CAL组移植物内脂肪形成基因表达显著提高,移植物的体积和血管密度得到保持;术后第8周免疫荧光显示,静脉注射ASCs主要通过旁分泌发挥作用而不是直接分化诱导血管生成和脂肪生成^[58]。这些发现拓宽了脂肪移植的手术选择,并增强了细胞辅助脂质转移的临床价值。

CAL的使用也在人体试验中显示出了相同的功效^[59]。最近有研究用CAL术($n=10$)和仅脂肪移植($n=10$)治疗了20例稳定的半面部萎缩患者,在术后6个月可观察到CAL移植物的脂肪存活率和疾病

临床改善程度大于单纯脂肪移植, 并且无术后并发症^[60]。

4 挑战与展望

已有的基础和临床研究表明, 脂肪组织衍生物在整形修复领域的应用是安全有效的^[61], 但在实际应用中仍存在很多问题。

SVF细胞成分复杂, 具有很强的异质性, 可能会影响其治疗效果。有研究发现, 用SVF内分离的未培养细胞(CD45⁻、CD146⁺、CD34⁻和CD45⁻、CD146⁻、CD34⁺)治疗小鼠颅骨缺损的效果优于未培养的SVF^[62]。通过表面标志物表征SVF组分及含量具有重要意义。有研究回顾了2017年之前的文章, 总结出ASC表面标记在一组通用标志物上(如CD90、CD44、CD29、CD105)已达成共识, 但在某些标记[包括CD31、CD34、c-Kit(CD117)和STRO-1]上仍存在一些相互矛盾的证据^[63]。并非所有的原代ASC都在培养初期就表达了特征性标记, 在传代后它们在成分上变得更加同质化^[64]。SVF组分复杂导致其表面标志物分类也不同于ASCs^[65]。在处理和培养脂肪抽吸物时, 不同实验室中的不同方法也可能导致结果存在差异, 如何形成统一的标准是未来亟需解决的问题。

细胞功能也受到各种因素的影响。年龄被认为是主要的影响因素, 有研究观察到50岁以上患者的ASCs的增殖和分化能力下降, 衰老相关基因水平显著增高^[66-67]。有研究发现, 年老小鼠(24月龄)SVF体外促人脐静脉内皮细胞成管能力要弱于年轻小鼠(4月龄)^[68]。肥胖也会影响细胞的增殖和分化。超重患者[身体质量指数(body mass index, BMI)>25]的ASCs在早期成脂、成骨潜能以及体外增殖能力上受到很大的损害^[69]; 糖尿病患者的皮下脂肪与内脏脂肪来源SVF增殖能力均明显减弱, 培养后的细胞只有40%~50%可以分化成脂, 而单纯肥胖组来源的SVF培养后的细胞可以成脂分化的达到70%~80%^[70-71]; 不同供区也可能影响细胞活力, 7位健康女性[平均年龄为(26.3±10.8)岁]的大腿脂肪来源ASCs比腹部皮下脂肪的ASCs显示出更强的血管生成和脂肪形成潜力($P<0.05$)^[72]; 性别也可能影响ASCs的干性, AKSU等^[73]研究发现, 首先从男性腹部皮下脂肪层分离的ASCs在体外具有最大的成骨分化能力, 其次是男性腹部深层ASCs, 两者均高于女性两层脂肪来源ASCs的成骨能力。另有研究表明,

外科手术的类型虽然不会影响脂肪获得的活细胞总数, 但影响细胞增殖频率和数量倍增时间, 与超声辅助抽脂相比, 整块脂肪组织切除和传统负压套管抽脂获得的细胞的平均数无差异, 但细胞倍增所需时间显著减少^[74]。因此, 在选择衍生物来源的时候需要考虑很多因素。除此之外, 面对不同的疾病该选择什么衍生物进行治疗目前尚无研究, 细胞治疗的最佳注射量也没有定论, 脂肪衍生物的商品化仍有很多问题需要解决。尽管存在许多挑战, 但脂肪组织衍生物的生物特性决定了其在修复重建中仍然前景光明, 将来在治疗不同的疾病时, 选择不同表面标志物的成分组合可能使疗效最大化。在不久的将来, 脂肪组织衍生物会成为各种疾病治疗的“现成”产品, 并使数百万人受益。

参考文献 (References)

- [1] COURY A J. Expediting the transition from replacement medicine to tissue engineering [J]. Regen Biomater, 2016, 3(2): 111-3.
- [2] PAWELEC K M, BEST S M, CAMERON R E. Collagen: a network for regenerative medicine [J]. J Mater Chem B, 2016, 4(40): 6484-96.
- [3] HEMSHEKHAR M, THUSHARA R M, CHANDRANAYAKA S, et al. Emerging roles of hyaluronic acid bioscaffolds in tissue engineering and regenerative medicine [J]. Int J Biol Macromol, 2016, 86: 917-28.
- [4] NEUBER G. Fat transplantation [J]. Verh Dtsch Ges Chi, 1893, 22: 66.
- [5] ZHANG Y, PROENCA R, MAFFEI M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue [J]. Nature, 1994, 372(6505): 425-32.
- [6] COLEMAN S R. Structural fat grafting: more than a permanent filler [J]. Plast Reconstr Surg, 2006, 118(3 Suppl): 108S-20S.
- [7] 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): 641-8.
- [8] TONNARD P, VERPAELE A, PEETERS G, et al. Nanofat grafting: basic research and clinical applications [J]. Plast Reconstr Surg, 2013, 132(4): 1017-26.
- [9] BI H S, ZHANG C, NIE F F, et al. Basic and clinical evidence of an alternative method to produce vivo nanofat [J]. Chin Med J (Engl), 2018, 131(5): 588-93.
- [10] YAO Y, DONG Z, LIAO Y, et al. Adipose extracellular matrix/stromal vascular fraction gel: a novel adipose tissue-derived injectable for stem cell therapy [J]. Plast Reconstr Surg, 2017, 139(4): 867-79.
- [11] ZHANG P, FENG J, LIAO Y, et al. Ischemic flap survival improvement by composition-selective fat grafting with novel

- adipose tissue derived product-stromal vascular fraction gel [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(3): 2249-56.
- [12] SHIN H, RYU H H, KWON O, et al. Clinical use of conditioned media of adipose tissue-derived stem cells in female pattern hair loss: a retrospective case series study [J]. *Int J Dermatol*, 2015, 54(6): 730-5.
- [13] SHREE N, BHONDE R R. Conditioned media from adipose tissue derived mesenchymal stem cells reverse insulin resistance in cellular models [J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(8): 2037-43.
- [14] PAWITAN J A. Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 965849.
- [15] YU Z, CAI Y, DENG M, et al. Fat extract promotes angiogenesis in a murine model of limb ischemia: a novel cell-free therapeutic strategy [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 294.
- [16] ZHENG H, YU Z, DENG M, et al. Fat extract improves fat graft survival via proangiogenic, anti-apoptotic and pro-proliferative activities [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 174.
- [17] HE Y, XIA J, CHEN H, et al. Human adipose liquid extract induces angiogenesis and adipogenesis: a novel cell-free therapeutic agent [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 252.
- [18] ZUK P A, ZHU M, MIZUNO H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies [J]. *Tissue Eng*, 2001, 7(2): 211-28.
- [19] GRONTHOS S, FRANKLIN D M, LEDDY H A, et al. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells [J]. *J Cell Physiol*, 2001, 189(1): 54-63.
- [20] ZHANG B, YIN Y, LAI R C, et al. Immunotherapeutic potential of extracellular vesicles [J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 518.
- [21] YUAN Y, DU W, LIU J, et al. Stem cell-derived exosome in cardiovascular diseases: macro roles of micro particles [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 547.
- [22] THÉRY C, WITWER K W, AIKAWA E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines [J]. *J Extracell Vesicles*, 2018, 7(1): 1535750.
- [23] OGAWA R, TANAKA C, SATO M, et al. Adipocyte-derived microvesicles contain RNA that is transported into macrophages and might be secreted into blood circulation [J]. *Biophys Res Commun*, 2010, 398(4): 723-9.
- [24] BAI Y, HAN Y D, YAN X L, et al. Adipose mesenchymal stem cell-derived exosomes stimulated by hydrogen peroxide enhanced skin flap recovery in ischemia-reperfusion injury [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 500(2): 310-7.
- [25] WANG L, HU L, ZHOU X, et al. Exosomes secreted by human adipose mesenchymal stem cells promote scarless cutaneous repair by regulating extracellular matrix remodelling [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 13321.
- [26] ROUWKEMA J, KHADEMOSSEINI A. Vascularization and angiogenesis in tissue engineering: beyond creating static networks [J]. *Trends Biotechnol*, 2016, 34(9): 733-45.
- [27] KOH Y J, KOH B I, KIM H, et al. Stromal vascular fraction from adipose tissue forms profound vascular network through the dynamic reassembly of blood endothelial cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(5): 1141-50.
- [28] 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): 1410-20.
- [29] REHMAN J, TRAKTUEV D, LI J, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells [J]. *Circulation*, 2004, 109(10): 1292-8.
- [30] BERTHEUIL N, CHAPUT B, MÉNARD C, et al. Adipose mesenchymal stromal cells: definition, immunomodulatory properties, mechanical isolation and interest for plastic surgery [J]. *Ann Chir Plast Esthet*, 2019, 64(1): 1-10.
- [31] SALGADO A J, REIS R L, SOUSA N J, et al. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2010, 5(2): 103-10.
- [32] BERNARD B A. The hair follicle enigma [J]. *Exp Dermatol*, 2017, 26(6): 472-7.
- [33] LIN W H, XIANG L J, SHI H X, et al. Fibroblast growth factors stimulate hair growth through β -catenin and Shh expression in C57BL/6 mice [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 730139.
- [34] MEEPHANSAN J, THUMMAKRIENGKRAI J, PONNIKORN S, et al. Efficacy of topical tofacitinib in promoting hair growth in non-scarring alopecia: possible mechanism via VEGF induction [J]. *Arch Dermatol Res*, 2017, 309(9): 729-38.
- [35] WON C H, PARK G H, WU X, et al. The basic mechanism of hair growth stimulation by adipose-derived stem cells and their secretory factors [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2017, 12(7): 535-43.
- [36] ANDERI R, MAKDISSY N, AZAR A, et al. Cellular therapy with human autologous adipose-derived adult cells of stromal vascular fraction for alopecia areata [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 141.
- [37] BIELEFELD K A, AMINI-NIK S, ALMAN B A. Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(12): 2059-81.
- [38] HAN G, CEILLEY R. Chronic wound healing: a review of current management and treatments [J]. *Adv Ther*, 2017, 34(3): 599-610.
- [39] NI X, SUN W, SUN S, et al. Therapeutic potential of adipose stem cells in tissue repair of irradiated skeletal muscle in a rabbit model [J]. *Cell Reprogram*, 2014, 16(2): 140-50.
- [40] KIM E K, LI G, LEE T J, et al. The effect of human adipose-derived stem cells on healing of ischemic wounds in a diabetic nude mouse model [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2011, 128(2): 387-94.
- [41] MARINO G, MORACI M, ARMENIA E, et al. Therapy with autologous adipose-derived regenerative cells for the care of chronic ulcer of lower limbs in patients with peripheral arterial disease [J]. *J Surg Res*, 2013, 185(1): 36-44.
- [42] EMING S A, MARTIN P, TOMIC-CANIC M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation [J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(265): 265sr6.
- [43] XUE M, JACKSON C J. Extracellular matrix reorganization during wound healing and its impact on abnormal scarring [J]. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2015, 4(3): 119-36.
- [44] LI Y, ZHANG W, GAO J, et al. Adipose tissue-derived stem cells suppress hypertrophic scar fibrosis via the p38/MAPK signaling pathway [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7(1): 102.
- [45] JAN S N, BASHIR M M, KHAN F A, et al. Unfiltered nanofat

- injections rejuvenate postburn scars of face [J]. *Ann Plast Surg*, 2019, 82(1): 28-33.
- [46] PU C M, LIU C W, LIANG C J, et al. Adipose-derived stem cells protect skin flaps against ischemia/reperfusion injury via IL-6 expression [J]. *J Invest Dermatol*, 2017, 137(6): 1353-62.
- [47] UYSAL A C, MIZUNO H, TOBITA M, et al. The effect of adipose-derived stem cells on ischemia-reperfusion injury: immunohistochemical and ultrastructural evaluation [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2009, 124(3): 804-15.
- [48] MAKRANTONAKI E, ZOUBOULIS C C. Molecular mechanisms of skin aging: state of the art [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2007, 1119: 40-50.
- [49] XU P, YU Q, HUANG H, et al. Nanofat increases dermis thickness and neovascularization in photoaged nude mouse skin [J]. *Aesthetic Plast Surg*, 2018, 42(2): 343-51.
- [50] MA T, FU B, YANG X, et al. Adipose mesenchymal stem cell-derived exosomes promote cell proliferation, migration, and inhibit cell apoptosis via Wnt/ β -catenin signaling in cutaneous wound healing [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(6): 10847-54.
- [51] KIM J H, JUNG M, KIM H S, et al. Adipose-derived stem cells as a new therapeutic modality for ageing skin [J]. *Exp Dermatol*, 2011, 20(5): 383-7.
- [52] AMIRKHANI M A, SHOAE-HASSANI A, SOLEIMANI M, et al. Rejuvenation of facial skin and improvement in the dermal architecture by transplantation of autologous stromal vascular fraction: a clinical study [J]. *BioImpacts*, 2016, 6(3): 149-54.
- [53] YAO Y, CAI J, ZHANG P, et al. Adipose stromal vascular fraction gel grafting: a new method for tissue volumization and rejuvenation [J]. *Dermatol Surg*, 2018, 44(10): 1278-86.
- [54] KÖLLE S F, FISCHER-NIELSEN A, MATHIASSEN 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): 1113-20.
- [55] KARACA OGLU 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): 63-8.
- [56] 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): 3375-82.
- [57] HONG K Y, YIM S, KIM H J, et al. The fate of the adipose-derived stromal cells during angiogenesis and adipogenesis after cell-assisted lipotransfer [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2018, 141(2): 365-75.
- [58] HONG K Y, KIM I K, PARK S O, et al. Systemic administration of adipose-derived stromal cells concurrent with fat grafting [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2019, 143(5): 973e-82e.
- [59] LALOZE J, VARIN A, GILHODES J, et al. Cell-assisted lipotransfer: friend or foe in fat grafting? systematic review and meta-analysis [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2018, 12(2): e1237-e50.
- [60] CHANG Q, LI J, DONG Z, et al. Quantitative volumetric analysis of progressive hemifacial atrophy corrected using stromal vascular fraction-supplemented autologous fat grafts [J]. *Dermatol Surg*, 2013, 39(10): 1465-73.
- [61] VÉRITER S, ANDRÉ W, AOUASSAR N, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells in cell therapy: safety and feasibility in different "hospital exemption" clinical applications [J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0139566.
- [62] JAMES A W, ZARA J N, CORSELLI M, et al. An abundant perivascular source of stem cells for bone tissue engineering [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2012, 1(9): 673-84.
- [63] MILDMAY-WHITE A, KHAN W. Cell surface markers on adipose-derived stem cells: a systematic review [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2017, 12(6): 484-92.
- [64] BAER P C, KUÇI S, KRAUSE M, et al. Comprehensive phenotypic characterization of human adipose-derived stromal/stem cells and their subsets by a high throughput technology [J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(2): 330-9.
- [65] BALOLONG E, LEE S, NEMENO J G, et al. Are they really stem cells? scrutinizing the identity of cells and the quality of reporting in the use of adipose tissue-derived stem cells [J]. *Stem Cells Int*, 2016, 2016: 2302430.
- [66] CHOUDHERY M S, BADOWSKI M, MUISE A, et al. Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation [J]. *J Transl Med*, 2014, 12: 8.
- [67] ALT E U, SENST C, MURTHY S N, et al. Aging alters tissue resident mesenchymal stem cell properties [J]. *Stem Cell Res*, 2012, 8(2): 215-25.
- [68] AIRD A L, NEVITT C D, CHRISTIAN K, et al. Adipose-derived stromal vascular fraction cells isolated from old animals exhibit reduced capacity to support the formation of microvascular networks [J]. *Exp Gerontol*, 2015, 63: 18-26.
- [69] FRAZIER T P, GIMBLE J M, DEVAY J W, et al. Body mass index affects proliferation and osteogenic differentiation of human subcutaneous adipose tissue-derived stem cells [J]. *BMC Cell Biol*, 2013, 14: 34.
- [70] STAFEEV I, PODKUYCHENKO N, MICHURINA S, et al. Low proliferative potential of adipose-derived stromal cells associates with hypertrophy and inflammation in subcutaneous and omental adipose tissue of patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *J Diabetes Complications*, 2019, 33(2): 148-59.
- [71] DZHOYASHVILI N A, EFIMENKO A Y, KOCHEGURA T N, et al. Disturbed angiogenic activity of adipose-derived stromal cells obtained from patients with coronary artery disease and diabetes mellitus type 2 [J]. *J Transl Med*, 2014, 12: 337.
- [72] LI W, ZHANG Y, CHEN C, et al. Increased angiogenic and adipogenic differentiation potentials in adipose-derived stromal cells from thigh subcutaneous adipose depots compared with cells from the abdomen [J]. *Aesthet Surg J*, 2019, 39(5): NP140-NP9.
- [73] AKSU A E, RUBIN J P, DUDAS J R, et al. Role of gender and anatomical region on induction of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells [J]. *Ann Plast Surg*, 2008, 60(3): 306-22.
- [74] OEDAYRAJSINGH-VARMA M J, VAN HAM S M, KNIP-PENBERG M, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure [J]. *Cytotherapy*, 2006, 8(2): 166-77.