

· 指南与共识 ·

干细胞在整形修复美容领域研究和临床试验的专家共识

中国医师协会整形美容医师分会干细胞和再生医学学组

【摘要】 干细胞是一类具有分化潜能的细胞,随着近年来对干细胞研究的深入,干细胞在促进组织修复与再生的作用也得到越来越多的关注。本学组就干细胞在整形修复美容领域的基础研究及临床试验研究组织专家讨论,并将专家共识总结成文,为干细胞在整形修复美容领域的研究与未来临床转化提供参考与支持。

过去十年见证了干细胞基础生物学和临床转化研究的飞速发展。干细胞分离、分化和纯化,干细胞特性、功能维持和稳定扩增技术方案不断完善,临床试验大量涌现。探索干细胞在整形修复美容领域的系统化、科学化、规范化和标准化,以及安全有效应用路径的共识,已具备扎实的科学理论和实践基础。本共识邀请国内外干细胞基础研究的一线专家和整形修复美容外科领域干细胞研究的前沿临床研究专家共同撰写,达成的每项陈述和推荐均至少有 3 位相关领域的专家总结。由于目前干细胞领域研究纷繁而复杂,本共识不可能解决所有的疑惑,旨在沟通和提高我国整形修复美容领域从事干细胞基础和临床研究工作者的认知,以期更好地推动干细胞的临床转化应用研究。希望本共识的发表,能够激发该领域未来的高质量研究去逐步探索 and 解决在本共识中未解决的相关问题。

1 总则

本共识所指干细胞是一类同时具备自我更新能力和分化潜能的细胞;可以来自胚胎组织,也可以来自成体组织;自体或者异体,体外分离、纯化浓缩、培养、传代或者是不培养、不传代,新鲜或者冻存。

1.1 开展干细胞临床前研究和临床研究的要求

2015 年,国家卫生和计划生育委员会(现国家卫生健康委员会)和国家食品药品监督管理总局(现国家药品监督管理局)连续发布《干细胞临床研究管理办法(试行)》^[1]、《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则(试行)》^[2]和《关于开展干细胞临床研究机构备案工作的通知》^[3]三项政策,标志着干细胞转化临床研究的相关政策落地。干细胞临床前研究和临床研究要在遵循这三项政策的原则指导下进行。

1.1.1 干细胞临床前研究要求 必须严谨设计研究计划、记录报告必须翔实可追溯、确保试验符合科学和医学的要求,为干细胞临床试验研究提供必须具备的充分科学依据。所用细胞要求与临床细胞一致。细胞产品的生产和加工必须在满足药品生产质量管理规范(good manufacture practices, GMP)的环境下进行;此外,还需要对细胞群,细胞基因组稳定性、成/致/促瘤性、异常分化及生物学功能和效应进行分析鉴定。动物模型的选择遵循减少(reduce)、优化(refine)和代替(replace)三个原则。有效性研究设计原则要求:模拟临床试验条件,足够的统计功效,合适足够的对照、随机法、盲法,建立剂量效应关系等。安全性研究包括:细胞生物分布、异位异常分布与分化及对其他长短期的可能毒副作用的监测。

1.1.2 干细胞临床研究的要求 干细胞临床研究机构需符合国家要求;干细胞临床研究项目应当在已完成备案的机构实施;干细胞临床研究必须具备充分的科学依据,应权衡受试者和公众健康预期的受益及风险,预期的受益应超过可能出现的损害。临床研究方案应当符合新版《药物临床试验质量管理规范》^[4]的要求,干细胞制剂符合《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则(试行)》^[2]的要求,同时通过机构的伦理审查和学术审查并提交国家卫生健康委员会和国家药品监督管理局备案。研究结束后,应当对受试者进行长期随访

DOI: 10.3969/j.issn.1673-7040.2021.01.001

基金项目:国家自然科学基金(81620108019);促进市级医院临床技能与临床创新能力三年行动计划(SHDC2020CR1019B);上海市临床重点专科建设项目(shslczdk00901);上海高水平地方高校创新团队(SSMU-ZDCX20180700);上海市黄浦区产业扶持基金(XK2020003)

通信作者:刘凯, Email: drkailiu@126.com

监测,评价干细胞临床研究的长期安全性和有效性。

1.2 干细胞及其相关产品制备机构的要求

(1)干细胞及其相关产品制备机构(以下简称机构)建设应有符合标准的 GMP 生产车间:整体万级,局部百级;符合 YY0033 第三类医疗器械生产标准;布局符合药品 GMP 要求;每台仪器的使用都有相应的标准操作流程(standard operation procedure, SOP)。(2)机构应建立符合 GMP 要求、完整的干细胞制剂制备质量管理体系,并设立独立的质量管理部门,履行质量保证和质量控制的职责。机构应根据每种干细胞制剂的特性及其制备工艺进行风险评估。(3)机构应建立合理的质量管理策略,指定具体的干细胞制剂制备管理负责人、质量管理负责人和质量授权人。同时建立人员、设备管理档案,并对相关人员完成专业知识、安全防护、应急预案的培训和继续教育,对设备进行计划性校验和维护,确保制剂生产的准确性。

2 在整形修复美容领域应用研究常见的干细胞类型

2.1 骨髓间充质干细胞

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)是从骨髓组织中分离获取的一类间充质干细胞,Friedenstein 等^[5]于 1976 年首次报道。BMMSCs 可贴壁生长,具有向中胚层组织细胞分化的能力。几乎所有的造血细胞表面标志物(CD34、CD14、CD45 等)在 BMMSCs 中呈阴性表达^[6-7],BMMSCs 表面表达的标记物包括整合素(CD49、CD29、LFA-3),免疫球蛋白超家族(CD54、CD102),血管细胞黏附分子(CD106、CD44、CD166)等^[8-10]。BMMSCs 主要来源于骨髓液,可通过髂前上棘穿刺抽取,也可自胫骨、股骨、胸骨等骨中获取。抽取的骨髓液通过密度梯度离心法、全骨髓培养贴壁筛选法、流式细胞仪分选法和免疫磁珠法等可筛选出大小均匀、纯度相对较高的 BMMSCs^[11]。BMMSCs 的扩增速度极快,短时间的培养后即可获取大量的细胞。

2.2 脂肪来源干细胞

1973 年,Poznanski 等在脂肪中发现了类似于成纤维样的细胞,在体外也能保持代谢活性^[12];2001 年,Zuk 等证实这些细胞中存在间充质干细胞并命名为脂肪来源干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)^[13]。其表达基质细胞相关标志物(CD29、CD44)、间充质细胞标志物(CD73、CD90),基本不表达造血源性细胞标志物 CD45 及 MHC II 相关蛋白 HLA-DR^[13-14]。从脂肪组织中分离 ADSCs 的主要方法是胶原酶消化法,操作简单,产量较高;此外还有组织块贴壁法、吸附柱法、直接离心法、机械振荡法等,但效率较低^[15-17]。在用胶原酶处理脂肪组织后,收集的底层细胞团被称为脂肪血管基质片段(stromal vascular fraction, SVF),是一类包括 ADSCs、脂肪前体细胞(脂肪祖细胞)、周细胞、内皮细胞、内皮祖细胞、单核/巨噬细胞和造血干细胞等在内的异质性细胞群,也具有促进组织再生的功能^[18-19]。

2.3 脐带间充质干细胞

脐带间充质干细胞(umbilical cord mesenchymal stem cells, UCMSCs)是一种自脐带分离的间充质干细胞,最早在 21 世纪初被报道^[20]。脐静脉内皮、脐带 Wharton's 胶质和血管周围组织中均可分离获得 UCMSCs^[21-23]。UCMSCs 具有典型的间充质干细胞表面标志物表达特点,CD29、CD44、CD105、CD166、OCT-4 和 c-myc 均呈阳性表达,CD34 和 CD14 均呈阴性表达^[24]。UCMSCs 具有长期自我更新、高扩增性和表型稳定性^[25]。目前尚无公认的分选 UCMSCs 方法,使用较多的方法有组织块贴壁法和酶消化法。UCMSCs 的来源是医疗废弃物脐带,伦理上较易获得知情同意授权回收利用,受到临床转化应用的青睐^[26]。

2.4 毛囊间充质干细胞

毛囊间充质干细胞(hair follicle mesenchyma stem cell, HFMSCs)分布在两个部位:毛囊球部的真皮乳头(dermal papilla, DP)和毛囊球部最外层的真皮鞘(dermal papilla, DS)内^[1-2]。通过周期性地在 DP 和 DS 间迁移,实现随毛发周期的 DP 和 DS 功能性重组^[3-4]。相比于来源于骨髓、脂肪、脐带等组织的间充质干细胞,HFMSCs 具有来源丰富、取材简单、对机体创伤小且无年龄限制等优点。HFMSCs 也具有成骨、成脂和成软骨潜能,表面阳性标记物有 CD44、CD73、CD90、CD105^[5-7]。HFMSCs 的分离是用中性蛋白酶+胶原酶消化皮脂腺下 2 mm 以下的毛囊下端,扩增培养后通过表面标志物分选出 HFMSCs^[8-9]。由于 HFMSCs 在体外培养过程中其诱导能力逐渐丧失,所以目前关于维持 HFMSCs 干细胞特性的方法主要是 3D 培养,包括悬滴法、ECM 法、LBL 法等^[9-12]。

2.5 牙髓间充质干细胞

牙髓间充质干细胞(human dental pulp stem cells, hDPSCs)作为人体牙髓组织中存在的一种间充质干细

胞,与其他间充质干细胞一样具有很强的增殖力、自我更新和多向分化能力,同时还具有免疫调节功能和潜在的组织再生特性^[27-28]。hDPSCs 与 BMMSCs 具有相似的免疫表型,同样表达 CD73、CD90 和 CD105,不表达 CD14、CD34 和 CD45 等表面标记,但 hDPSCs 具有更高的增殖率和克隆形成能力^[27]。迄今为止,已分离和鉴定出 8 种不同的 hDPSCs,其中应用最为广泛的是 hDFSCs,其分离培养的方法与其他组织间充质干细胞方法类似^[29]。

2.6 胚胎干细胞、诱导性多功能干细胞等其他干细胞

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)是一种从早期胚胎或内细胞团中分离出来的全能干细胞,可以向 3 个胚层分化,在体内或体外环境均可被诱导分化为机体几乎所有细胞类型^[30]。ESCs 表达的特异性标志物包括 SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81、TRA-2-49/6E 和 Nanog^[31]。然而胚胎干细胞的使用仍存在风险和伦理问题。诱导性多功能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)是利用哺乳动物的成体细胞,由人工转入 Oct4、Sox2、c-Myc、Klf4 四种转录因子,使成体细胞执行去分化途径而形成类似于胚胎干细胞的多能干细胞^[32]。iPSCs 与 ESCs 拥有相似的再生能力,理论上可以分化为所有成体器官、组织,其表面标志物与未分化的 ESCs 类似。相比 ESCs, iPSCs 面临的伦理道德争议较小,但 iPSCs 诱导技术面临着诱导效率低,用于治疗存在长期肿瘤风险等挑战^[33-34]。其他的干细胞还包括胎盘、羊水以及尿液等来源间充质干细胞,这些细胞也具有多向分化能力和较高的增殖能力。

3 干细胞保存的规范

高质量稳定保存干细胞资源是干细胞应用中的关键环节,低温冷冻保存技术为干细胞的运输、长期存储、活性和功能的保存提供了至关重要的保证。研究表明组织和细胞虽然可以在 -196℃ 低温下长期保存,但却易在降温和复温过程中受溶液冻结、融化以及溶液渗透压变化等因素的作用而发生损伤^[35]。冷冻损伤通常原因是在 -60~0℃ 细胞内冰晶形成,在对细胞造成直接损伤的同时导致细胞内外酸碱度、渗透压等发生改变。通过加入冷冻保护剂和程序性降温,可减少细胞内冰晶形成,提高细胞活性。冷冻保护剂根据其是否穿透细胞膜通常分为两大类型,即渗透性冷冻保护剂和非渗透性冷冻保护剂^[35]。渗透性冷冻保护剂多为小分子中性物质,其作用为弱化水结晶过程,减少对细胞结构和功能的破坏,主要包括甘油、二甲基亚砜(DMSO)、丙二醇、乙二醇、乙酰胺、甲醇等。非渗透性保护剂多为大分子物质,通过降低溶质浓度来减少低温冻存对细胞的损伤,主要包括海藻糖、聚乙二醇、羟乙基淀粉、聚乙烯吡咯烷酮、葡聚糖、白蛋白等。不同种干细胞的低温生物特性不相同,应对冷冻损伤的能力各有不同。因此,应用特有的最佳低温保存方法保存不同的干细胞才能确保复温后的干细胞“安全-有效”^[36-38]。

4 整形修复美容领域干细胞的主要临床研究方向

4.1 在增加组织血管化和抗纤维化中的应用

组织血运障碍是整形外科常处理的问题,干细胞可被用于治疗皮瓣缺血及其他组织缺血性疾病。临床前研究已证实,干细胞有促进细胞迁移、成管的能力,可改善皮瓣血液循环,促进皮瓣成活^[39-40]。在缺血的手部移植皮瓣内及周围组织中注射 SVF,可观察到皮瓣血运有明显改善,手功能改善^[41]。干细胞在下肢缺血性疾病中也有应用,在严重下肢缺血的病例中,通过肌肉内注射 CD133+ 的干细胞,可刺激新血管生成^[42-43]。在瘢痕治疗方面,BMMSCs 可用于预防肥厚性瘢痕患者移植后皮肤移植物的收缩^[13]。此外,皮下局部应用 BMMSCs 可明显改善中、重度萎缩性痤疮瘢痕,且无明显副作用^[44]。还有研究应用 ADSCs 治疗系统性硬化症的指端溃疡,发现可促进创面愈合,改善疼痛症状和手功能^[44]。

4.2 在创伤后皮肤再生与创面愈合中的应用

创伤居疾病谱首位,其中皮肤缺损最为多发。同时,糖尿病、脉管疾病等引发的皮肤溃疡创面也是高发疾病^[45]。近年来发现干细胞可通过直接分化、旁分泌生长因子等多个途径参与皮肤再生。在外伤导致的急性皮肤全层缺损中,局部注射 ADSCs 可缩短创面愈合时间,减少继发性瘢痕挛缩、色素沉着和增生的发生^[46]。在糖尿病足、慢性创面等多种难愈性创面的治疗中,在创面边缘及基底注射干细胞可有效促进组织血管新生、加速肉芽组织形成、改善组织血供,同时促进创缘角质形成细胞的增殖,加速创面再上皮化进而促进愈合^[47-48]。相较于无毛囊的皮片,带有毛发的皮肤移植植物因含有毛囊干细胞和更多的表皮干细胞,在促进慢性溃疡愈合中可达到更好的效果^[49]。皮肤扩张中,局部的张力可诱导血液循环中干细胞向扩张皮肤局部迁移,在局部定植后

通过分化和合成生长因子促进扩张皮肤组织再生^[50]。另有研究证实,干细胞在促进光老化和衰老后的皮肤再生年轻化等方面有显著效果^[51]。

4.3 在脂肪移植后再生中的应用

脂肪移植是软组织萎缩和缺损修复的重要方法,但移植的脂肪组织由于缺乏血供与生长因子,常出现较高的吸收率及纤维化、钙化等现象,影响其疗效^[52]。应用干细胞辅助脂肪移植(cell-assisted lipotransfer, CAL)后脂肪细胞成活率提高,组织结构形态更好,并发症更少^[53-55]。在乳房脂肪填充中,加入干细胞可以提高移植后脂肪的成活率,减少脂肪注射后纤维化、囊肿等并发症的发生率,同时未观察到脂肪异常增殖、肿瘤等并发症的发生^[55-56]。另外,在半面萎缩的治疗中,也观察到应用 CAL 可提高脂肪的成活率^[57]。

4.4 在毛发再生中的应用

脱发是困扰现代人的重要问题,除了与雄激素代谢物二氢睾酮相关的代谢障碍有关,也与毛囊周围血管化减少和生长因子失去平衡有关^[58]。干细胞分泌的血管内皮生长因子、肝细胞生长因子、胰岛素样生长因子、血小板衍生生长因子等多种细胞因子^[59],一方面可调控复杂的毛发生长周期,另一方面可促进毛囊周围的血管化^[60],诱导毛囊真皮乳头增殖及调控毛囊由休止期进入生长期,促进毛发生长、毳毛发育为终毛^[61-62]。在脱发区域皮肤内注射 ADSCs 和 SVF,可观察到注射区域毛发密度有所增加、毛发直径显著增粗^[63-64]。ADSCs 的条件培养基也具有促进毛发再生的效果,多次注射后效果与非那雄胺疗效接近^[65]。自体 BMSCs 及自体 HFMSCs 也被报道在治疗难治性斑片状脱发和雄激素性脱发中有显著作用^[66]。

4.5 在骨与软骨再生中的应用

目前针对因创伤、肿瘤、先天畸形等导致的骨和软骨缺损的修复,临床上主要采用的是自体组织移植、异体组织移植和替代物植入等方法,但应用范围和治疗效果有一定的局限性^[67-69]。BMSCs 和 ADSCs 是在骨和软骨缺损临床研究应用中最常见的干细胞类型,向骨、软骨的局部缺损注射 BMSCs 或 ADSCs 可促进组织修复再生^[70-72]。将干细胞与生物支架材料复合,不仅可提高干细胞利用效率,而且支架材料的引入也为干细胞再生提供更有利的微环境,使其具有更稳定的结构和更优化的功能^[73]。关节腔内注射 ADSCs、BMSCs 或 hDPSCs,可以通过调节局部炎症、促进软骨再生修复从而缓解疼痛、控制关节炎的发展^[74]。临床研究显示采用自体干细胞治疗骨缺损是安全有效的,尚无研究显示发生炎症、感染、组织过度生长或肿瘤发生等^[75]。

5 干细胞衍生物的应用研究

干细胞附属产品包括干细胞条件培养液(conditioned medium, CM)、促进组织再生的生长因子(growth factor, GF)、分离自血液的富血小板血浆(platelet rich plasma, PRP)等^[76-78]。此类产品主要地有效成分是干细胞分泌的生长因子,使用方法包括凝胶状制剂涂抹创面、局部组织内注射填充以及液体产品在局部组织内的注射。通过在老化的皮肤中补充生长因子,可提高皮肤通过各种活性因子促进真皮层内纤维母细胞的增殖能力,修复老化的胶原纤维与弹性纤维,还原肌肤弹性并减少皱纹。在脱发治疗中局部注射此类产品可促进毛囊的活化和再生。PRP 类产品一般可在临床机构直接采集获取;CM 和 GF 类产品则需要由符合 GMP 标准的专业干细胞制剂生产机构或制药机构进行制备。干细胞的另一类重要的衍生产品外泌体(exosome)近年来得到了广泛关注。外泌体是机体内细胞通过胞吞作用形成多泡小体后,通过细胞膜融合分泌到细胞外环境中的微小囊泡,直径为 30~100 nm^[79];其内含有功能性蛋白质、mRNA 及 microRNA 等物质,在细胞间的信息传递过程中发挥重要作用^[80]。外泌体可从多种体液和细胞培养上清液中分离,最广泛使用的分离方法是高速离心与超滤法。近年来发现 ADSCs-exo 具有与 ADSCs 近似生物活性的生长因子、趋化因子、脂质等多种活性物质^[81-82],可促进血管内皮的增生。应用血小板衍生的生长因子可促进 ADSCs 释放增强血管生长潜力的外泌体^[83]。在骨缺损模型研究中发现,将外泌体加载于生物支架上,有促进细胞迁移与归巢,诱导骨再生的作用^[84]。

干细胞衍生物相较于干细胞产品具有如下优势:属于无细胞生物治疗,伦理上容易接受;同时性质更稳定,易于保存,便于管理及运输;生物学功能不随时间延长而衰减;低抗原性,同种异体应用不会引起免疫反应,可能会比干细胞临床转化更快地走向临床。

6 总结与展望

干细胞作为体内一种具有多向分化能力和分泌能力的细胞,具有增殖能力强、免疫力低的特点。干细胞及其衍生物的治疗是具有重要临床应用前景的再生医学手段。在整形修复美容外科领域经过了多年的基础

与临床研究证明其在促进皮肤再生与修复、组织血管化、软组织再生、骨与软骨修复、多组织年轻化及毛囊再生等多方面均有较好的治疗效果。但是仍需看到干细胞应用中存在的致突变、致瘤等问题并未完全解决,尤其是治疗的标准化问题未解决,说明干细胞在治疗疾病中的作用机制、应用方法、安全性和有效性等基础和临床研究均需进一步完善。总之,整形修复美容外科领域干细胞临床应用潜力是巨大的,期待更多的有识之士加入。

执笔: 刘宏伟 郭澍 程颢 金培生 胡志奇 李青峰 徐靖宏 高正良 刘上峰 杨铨庆 高大勇 苗勇 展望 田卫东 周双白 刘凯

整理: 周双白

参考文献:

- [1] 国家卫生计生委,国家食品药品监管总局. 干细胞临床研究管理办法(试行)[EB/OL]. (2015-07-20)[2020-11-01]. <https://www.nmpa.gov.cn/yaopin/ypfgwj/ypfgbmgzh/20150720120001607.html>.
- [2] 国家卫生计生委,国家食品药品监管总局. 干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则(试行)[EB/OL]. (2015-07-31)[2020-11-01]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/gzwj/gzwjyp/20150731120001226.html>.
- [3] 国家卫生计生委,国家食品药品监管总局. 关于开展干细胞临床研究机构备案工作的通知[EB/OL]. (2015-12-01)[2020-11-01]. <http://www.nhc.gov.cn/qjjys/s3581/201512/a8ef28444b8e4d4382f06353bb09909c.shtml>.
- [4] 国家药监局,国家卫生健康委. 药物临床试验质量管理规范[EB/OL]. (2020-04-26)[2020-11-01]. <https://www.nmpa.gov.cn/yaopin/ypggtg/2020426162401243.html>.
- [5] FRIEDENSTEIN A J, GORSKAJA J F, KULAGINA N N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs[J]. Exp Hematol, 1976,4(5):267-274.
- [6] DVORAKOVA J, HRUBA A, VELEBNY V, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cell population entrapped in bone marrow collection sets[J]. Cell Biol Int, 2008,32(9):1116-1125.
- [7] PITTENGER M F, MACKAY A M, BECK S C, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999,284(5411):143-147.
- [8] BARRY F, BOYNTON R, MURPHY M, et al. The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001,289(2):519-524.
- [9] BARRY F P, BOYNTON R E, HAYNESWORTH S, et al. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105)[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999,265(1):134-139.
- [10] CONGET P A, MINGUELL J J. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells[J]. J Cell Physiol, 1999, 181(1):67-73.
- [11] COLTER D C, CLASS R, DIGIROLAMO C M, et al. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000,97(7):3213-3218.
- [12] POZNANSKI W J, WAHEED I, VAN R. Human fat cell precursors. morphologic and metabolic differentiation in culture[J]. Lab Invest, 1973,29(5):570-576.
- [13] GIMBLE J M, KATZ A J, BUNNELL B A. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine[J]. Circ res, 2007,100(9):1249-1260.
- [14] 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):484-492.
- [15] PRIYA N, SARCAR S, MAJUMDAR A S, et al. Explant culture: a simple, reproducible, efficient and economic technique for isolation of mesenchymal stromal cells from human adipose tissue and lipoaspirate[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2014,8(9):706-716.
- [16] DOI K, KUNO S, KOBAYASHI A, et al. Enrichment isolation of adipose-derived stem/stromal cells from the liquid portion of liposuction aspirates with the use of an adherent column[J]. Cytotherapy, 2014,16(3):381-391.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] BOUMELHEMB B, ASSINDER S J, BELL-ANDERSON K S, et al. Flow cytometric single cell analysis reveals heterogeneity between adipose depots[J]. Adipocyte, 2017,6(2):112-123.
- [20] ERICES A A, ALLERS C I, CONGET P A, et al. Human cord blood-derived mesenchymal stem cells home and survive in the marrow of immunodeficient mice after systemic infusion[J]. Cell Transplant, 2003,12(6):555-561.
- [21] WEISS M L, MEDICETTY S, BLEDSOE A R, et al. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of parkinson's disease[J]. Stem Cells, 2006,24(3):781-792.
- [22] JOMURA S, UY M, MITCHELL K, et al. Potential treatment of cerebral global ischemia with OCT-4+ umbilical cord matrix cells[J]. Stem Cells, 2007,25(1):98-106.

- [23] WANG H S, HUNG S C, PENG S T, et al. Mesenchymal stem cells in the wharton's jelly of the human umbilical cord[J]. Stem Cells, 2004,22(7): 1330- 1337.
- [24] LANGE- CONSIGLIO A, PERRINI C, BERTERO A, et al. Isolation, molecular characterization, and in vitro differentiation of bovine wharton jelly- derived multipotent mesenchymal cells[J]. Theriogenology, 2017,89:338- 347.
- [25] BEERAVOLU N, MCKEE C, ALAMRI A, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stromal cells from human umbilical cord and fetal placenta[J]. J Vis Exp, 2017,3(122):55224.
- [26] BERGLUND S, MAGALHAES I, GABALLA A, et al. Advances in umbilical cord blood cell therapy: the present and the future[J]. Expert Opin Biol Ther, 2017,17(6):691- 699.
- [27] LIU J, YU F, SUN Y, et al. Concise reviews: characteristics and potential applications of human dental tissue- derived mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells, 2015,33(3):627- 638.
- [28] GRONTHOS S, MANKANI M, BRAHIM J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000,97(25):13625- 13630.
- [29] ZHAI Y, WEI R, LIU J, et al. Drug- induced premature senescence model in human dental follicle stem cells[J]. Oncotarget, 2017,8(5):7276- 7293.
- [30] YOUNG R A. Control of the embryonic stem cell state[J]. Cell, 2011,144(6):940- 954.
- [31] ZHAO W, JI X, ZHANG F, et al. Embryonic stem cell markers[J]. Molecules, 2012,17(6):6196- 6236.
- [32] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. Cell, 2006,126(4):663- 676.
- [33] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induced pluripotent stem cells in medicine and biology[J]. Development, 2013,140(12):2457- 2461.
- [34] NELSON T J, MARTINEZ- FERNANDEZ A, TERZIC A. Induced pluripotent stem cells: developmental biology to regenerative medicine[J]. Nat Rev Cardiol, 2010,7(12):700- 710.
- [35] MAZUR P, LEIBO S P, CHU E H. A two- factor hypothesis of freezing injury. Evidence from chinese hamster tissue- culture cells[J]. Exp Cell Res, 1972,71(2):345- 355.
- [36] SHU Z, GAO D, PU L L Q. Update on cryopreservation of adipose tissue and adipose- derived stem cells[J]. Clin Plast Surg, 2015,42(2):209- 218.
- [37] KUBIAK A, MATUSZAK P, BEMBNISTAE, et al. Banking of hematopoietic stem cells: influence of storage time on their quality parameters[J]. Transplant Proc, 2016,48(5):1806- 1809.
- [38] FLEMING K K, HUBEL A. Cryopreservation of hematopoietic and non- hematopoietic stem cells[J]. Transfus Apher Sci, 2006,34(3):309- 315.
- [39] ZENG R X, HE J Y, ZHANG Y L, et al. Experimental study on repairing skin defect by tissue- engineered skin substitute compositely constructed by adipose- derived stem cells and fibrin gel[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017,21(3 SUPPL):1- 5.
- [40] YUCELE, ALAGOZ M S, EREN G G, et al. Use of adipose- derived mesenchymal stem cells to increase viability of composite grafts[J]. J Craniofac Surg, 2016,27(5):1354- 1360.
- [41] CARSTENS M H, MENDIETA M, PÉREZ C, et al. Assisted salvage of ischemic fasciocutaneous flap using adipose- derived mesenchymal stem cells: in- situ revascularization[J]. Aesthet Surg J, 2017,37(SUPPL_3):S38- S45.
- [42] ARICI V, PEROTTI C, FABRIZIO C, et al. Autologous immuno magnetically selected CD133+ stem cells in the treatment of no- option critical limb ischemia: clinical and contrast enhanced ultrasound assessed results in eight patients[J]. J Transl Med, 2015,13:342.
- [43] WIJNAND J G J, TERA A M, GREMMELS H, et al. Rationale and design of the sail trial for intramuscular injection of allogeneic mesenchymal stromal cells in no- option critical limb ischemia[J]. J Vasc Surg, 2018,67(2):656- 661.
- [44] 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.
- [45] CHUA A W, KHOO Y C, TAN B K, et al. Skin tissue engineering advances in severe burns: review and therapeutic applications[J]. Burns Trauma, 2016,4:3.
- [46] JO D I, YANG H J, KIMS H, et al. Coverage of skin defects without skin grafts using adipose- derived stem cells[J]. Aesthetic Plast Surg, 2013,37(5): 1041- 1051.
- [47] RENNERT R C, RODRIGUES M, WONG V W, et al. Biological therapies for the treatment of cutaneous wounds: phase III and launched therapies[J]. Expert Opin Biol Ther, 2013,13(11):1523- 1541.
- [48] BADIYAS E V, FALANGA V. Treatment of chronic wounds with bone marrow- derived cells[J]. Arch Dermatol, 2003,139(4):510- 516.
- [49] FOX J D, BAQUERIZO- NOLE K L, DRIESCH F V, et al. Optimizing skin grafting using hair- derived skin grafts: the healing potential of hair follicle pluripotent stem cells[J]. Wounds, 2016,28(4):109- 111.
- [50] WU Q, LEI X, CHEN L, et al. Autologous platelet- rich gel combined with in vitro amplification of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation to treat the diabetic foot ulcer: a case report[J]. Ann Transl Med, 2018,6(15):307.
- [51] AKITA S, YOSHIMOTO H, AKINO K, et al. Early experiences with stem cells in treating chronic wounds[J]. Clin Plast Surg, 2012,39(3):281- 392.
- [52] MASHIKO T, WU S H, KANAYAMA K, et al. Biological properties and therapeutic value of cryopreserved fat tissue[J]. Plast Reconstr Surg, 2018,141(1):104- 115.
- [53] ZHOU S B, CHIANG C A, XIE Y, et al. In vivo bioimaging analysis of stromal vascular fraction- assisted fat grafting: the interaction and mutualism of cells and grafted fat[J]. Transplantation, 2014,98(10):1048- 1055.
- [54] TOYSERKANI N M, QUADE M L, SORENSEN J A. Cell- assisted lipotransfer: A systematic review of its efficacy[J]. Aesthetic Plast Surg,

2016,40(2):309-318.

- [55] 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.
- [56] BIELLI A, SCIOLI M G, GENTILE P, et al. Adipose tissue-derived stem cell therapy for post-surgical breast reconstruction- more light than shadows[J]. *Adv Clin Exp Med*, 2015,24(3):545-548.
- [57] KOH K S, OH T S, KIM H, et al. Clinical application of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in progressive hemifacial atrophy (Parry- Romberg disease) with microfat grafting techniques using 3-dimensional computed tomography and 3-dimensional camera[J]. *Ann Plast Surg*, 2012,69(3):331-337.
- [58] GUO H, GAO W V, ENDO H, et al. Experimental and early investigational drugs for androgenetic alopecia[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2017, 26(8):917-932.
- [59] HORI H, MORETTI G, REBORA A, et al. The thickness of human scalp: normal and bald[J]. *J Invest Dermatol*, 1972,58(6):396-399.
- [60] YUAN Y, GAO J, LIU L, et al. Role of adipose-derived stem cells in enhancing angiogenesis early after aspirated fat transplantation: induction or differentiation?[J]. *Cell Biol Int*, 2013,37(6):547-550.
- [61] GUPTA A K, CARVIEL J L. Meta-analysis of efficacy of platelet-rich plasma therapy for androgenetic alopecia[J]. *J Dermatolog Treat*, 2017,28(1):55-58.
- [62] GIORDANO S, ROMEO M, LANKINEN P. Platelet-rich plasma for androgenetic alopecia: Does it work? Evidence from meta analysis[J]. *J Cosmet Dermatol*, 2017,16(3):374-381.
- [63] PEREZ- MEZA D, ZIERING C, SFORZA M, et al. Hair follicle growth by stromal vascular fraction-enhanced adipose transplantation in baldness[J]. *Stem Cells Cloning*, 2017,10:1-10.
- [64] 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.
- [65] FUKUOKA H, NARITA K, SUGA H. Hair regeneration therapy: application of adipose-derived stem cells[J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2017,12(7): 531-534.
- [66] ELMAADAWI I H, MOHAMED B M, IBRAHIM Z A S, et al. Stem cell therapy as a novel therapeutic intervention for resistant cases of alopecia areata and androgenetic alopecia[J]. *J Dermatolog Treat*, 2018,29(5):431-440.
- [67] SCHUBERT T, LAFONT S, BEAURIN G, et al. Critical size bone defect reconstruction by an autologous 3D osteogenic-like tissue derived from differentiated adipose MSCs[J]. *Biomaterials*, 2013,34(18):4428-4438.
- [68] MAKRISE A, GOMOLL A H, MALIZOS K N, et al. Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2015,11(1): 21-34.
- [69] WANG L, FAN H, ZHANG Z Y, et al. Osteogenesis and angiogenesis of tissue-engineered bone constructed by prevascularized beta-tricalcium phosphate scaffold and mesenchymal stem cells[J]. *Biomaterials*, 2010,31(36):9452-94561.
- [70] VEGA A, MARTÍN- FERRERO M A, DEL CANTO F, et al. Treatment of knee osteoarthritis with allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells: a randomized controlled trial[J]. *Transplantation*, 2015,99(8):1681-1690.
- [71] GUPTA P K, DAS A K, CHULLIKANA A, et al. Mesenchymal stem cells for cartilage repair in osteoarthritis[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2012,3(4):25.
- [72] OROZCO L, MUNAR A, SOLER R, et al. Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: a pilot study[J]. *Transplantation*, 2013,95(12):1535-1541.
- [73] WARNKE P H, SPRINGER I N G, WILTFANG J, et al. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man[J]. *The Lancet*, 2004,364(9436):766-770.
- [74] JO C H, LEE Y G, SHIN W H, et al. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial[J]. *Stem Cells*, 2014,32(5):1254-1266.
- [75] IM G I. Stem cells for reutilization in bone regeneration[J]. *J Cell Biochem*, 2015,116(4):487-493.
- [76] SCHAFER R, DEBAUN M R, FLECK E, et al. Quantitation of progenitor cell populations and growth factors after bone marrow aspirate concentration[J]. *J Transl Med*, 2019,17(1):115.
- [77] FAN S M, TSAI C, YEN C, et al. Inducing hair follicle neogenesis with secreted proteins enriched in embryonic skin[J]. *Biomaterials*, 2018,167:121-131.
- [78] WU P I, DIAZ R, BORG-STEIN J. Platelet-rich plasma[J]. *Phys Med Rehabil Clin N Am*, 2016,27(4):825-853.
- [79] PHINNEY D G, PITTENGER M F. Concise review: MSC-Derived exosomes for cell-free therapy[J]. *Stem Cells*, 2017,35(4):851-858.
- [80] RIAZIFAR M, PONE E J, LOTVALL J, et al. Stem cell extracellular vesicles: Extended messages of regeneration[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2017,57:125-154.
- [81] LIANG X, DING Y, ZHANG Y, et al. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives[J]. *Cell Transplant*, 2014,23(9):1045-1059.
- [82] HAO Z C, LU J, WANG S Z, et al. Stem cell-derived exosomes: A promising strategy for fracture healing[J]. *Cell Prolif*, 2017,50(5):e12359.
- [83] JING H, HE X, ZHENG J. Exosomes and regenerative medicine: state of the art and perspectives[J]. *Transl Res*, 2018,196:1-16.
- [84] LI W, LIU Y, ZHANG P, et al. Tissue-engineered bone immobilized with human adipose stem cells-derived exosomes promotes bone regeneration[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018,10(6):5240-5254.

(收稿日期:2020-11-01)