

# 脂肪干细胞构建组织工程化角膜基质组织

鲍慧婧<sup>1</sup> 邹俊<sup>1\*</sup> 尹烁<sup>2</sup> 崔磊<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>上海交通大学附属第六人民医院眼科 上海 200233; <sup>2</sup>上海组织工程研究与开发中心 上海 200235)

**【摘要】** 目的 探讨以可降解高分子材料聚羟基乙醇(polylactic co glycolic acid, PLGA)为支架,复合自体脂肪干细胞构建组织工程角膜基质修复角膜基质层缺损的可行性。方法 兔脂肪干细胞(rabbit adipose derived stem cells, rASCs)培养至第4代接种在PLGA载体支架上,扫描电镜观察细胞在支架上生长黏附情况。体外培养7天后将rASCs/PLGA复合物回植到角膜基质缺损模型的兔角膜基质层间,术后第12周和24周取材行组织学和透射电镜超微结构观察。未接种细胞的PLGA材料移植基质层间作为对照组。结果 细胞在PLGA支架上生长增殖良好,实验组移植术后12周材料降解,角膜基本恢复透明。组织学检查显示移植后24周新生角膜基质样组织与正常角膜基质组织相似,电镜下胶原纤维直径与正常角膜基质组织比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 脂肪干细胞可作为种子细胞来源用于构建组织工程角膜基质。

**【关键词】** 脂肪干细胞; 组织工程; 角膜; 基质; 聚羟基乙醇; 兔

**【中图分类号】** Q 813.1; R 779.65 **【文献标志码】** A

## Tissue engineering of corneal stroma with adipose derived stem cells

BAO Huijing<sup>1</sup>, ZOU Jun<sup>1\*</sup>, YIN Shuo<sup>2</sup>, CUI Lei<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China; <sup>2</sup>Shanghai Tissue Engineering Research and Development Center, Shanghai 200235, China)

**【Abstract】 Objective** To explore the feasibility of using autologous rabbit adipose derived stem cells (rASCs) for corneal stromal defect repairing with biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) as scaffold. **Methods** ASCs isolated from rabbit lipoaspirate were cultured to passage 4 and seeded on PLGA to fabricate cell-PLGA constructs. Scanning electron microscope was used to observe the adhesion and proliferation of cells on scaffold. After 1 week of cultivation *in vitro*, the construct was implanted into rabbit corneal stroma. The tissue engineered cornea was observed and harvested for histological evaluation and transmission electron microscopy (TEM) examination at 12 weeks and 24 weeks after transplantation. The rabbits implanted with PLGA scaffold alone without cells were served as control. **Results** rASCs attached firmly and grew well on the scaffold *in vitro*. The PLGA material was degraded and the cornea was nearly transparent at 12 weeks after transplantation *in vivo*. Histological structure of tissue engineered cornea was relatively similar to that of normal cornea at 24 weeks after surgery. The diameter of collagen fibrils observed by transmission electron microscopy showed no significant difference with that of normal stroma. **Conclusions** Autologous rabbit adipose derived stem cells (rASCs) could be seed cells for constructing tissue engineered corneal stroma.

**【Key words】** adipose derived stem cells; tissue engineering; cornea; stroma; poly(lactic-co-glycolic acid); rabbit

角膜病是目前主要的致盲性疾病之一,角膜移植手术是当前治疗重症角膜疾病的有效方法,但是角膜供体的严重匮乏限制了角膜移植的广泛开展。随着组织工程技术的日新月异,组织工程角膜已成为眼科

研究领域中的热点<sup>[1]</sup>。角膜基质是角膜组织的重要组成部分,约占角膜厚度的90%,是维持角膜透明的重要组织结构。虽然我们曾利用角膜基质细胞作为种子细胞成功构建了组织工程化角膜基质<sup>[2]</sup>,但角膜

基质细胞来源有限,难以获得大量有活性的种子细胞,寻找新的种子细胞来源已成为角膜组织工程的研究热点。脂肪干细胞(adipose derived stem cells, ASCs)作为来源于脂肪组织的一种成体干细胞,与骨髓基质干细胞一样,具有不断自我更新和多向分化的潜能,已被证明具有向脂肪、骨、软骨、肌肉、内皮、造血和神经等多种细胞方向分化的多分化潜能<sup>[3-7]</sup>,是一种理想的种子细胞。本研究采用兔脂肪干细胞作为种子细胞,复合可降解生物材料 PLGA (rASCs-PLGA) 构建组织工程兔角膜基质,观察其对兔角膜基质缺损的修复情况,旨在为角膜基质的组织工程修复提供新的种子细胞来源和实验依据。

## 材料和方法

**实验动物** 3月龄雌性新西兰大白兔24只,体重1.5~2.5 kg,由上海交通大学农学院提供。随机分为2组,每组12只。实验组:每只兔选取1眼植入 rASCs-PLGA 复合材料;对照组:植入未接种细胞的 PLGA 材料。由计算机产生随机数,若 $< 0.5$ ,则左眼植入,若 $> 0.5$ ,则右眼植入。实验前裂隙灯显微镜检查兔眼前节无异常。

**主要实验仪器和试剂** CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(美国 Forma 公司);培养皿(美国 Corning 公司);50 mL 离心管(美国 Falcon 公司);低速离心机(美国 Biofuge 公司);倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司);扫描电镜(Philips Quanta 200 FEI);透射电镜(H2500,日本 Hitachi 公司);DMEM 培养液(美国 Gibco 公司);胎牛血清 FBS(澳大利亚 JRH 公司);L-谷氨酰胺 300 g/mL、胰蛋白酶(上海实生生物技术有限公司);抗坏血酸 50 mg/mL、氯仿、NaCl(国药集团化学试剂有限公司);青、链霉素各 100 IU/mL(华北制药有限公司);I 型胶原酶(美国 Sigma 公司);PLGA(济南健宝开元生物材料有限公司)。

**自体兔脂肪干细胞(rASCs)的分离培养** 新西兰大白兔12只,雌性,体重1.5~2.5 kg。戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉,无菌条件下取兔颈背部皮下脂肪,PBS 冲洗后剪碎,0.1%的 I 型胶原酶 37 °C 震荡消化 45 min,2 000 r/min 离心 10 min 并倾去上清液,将细胞重悬于含 10% FBS 的 DMEM 培养基,接种于培养皿中。置于 37 °C、CO<sub>2</sub> 体积分数为 5%、湿度为 100% 的培养箱中孵育,48 h 后首次换液,以后每 3 天更换一次培养液。待细胞生长达到 80%~90% 融合时,PBS 液洗涤,加入 0.25% 胰蛋白酶 1.0 mL,37 °C 下消化约 3 min,在倒置相差显微镜下观察到多数细胞皱缩变圆后,终止消化作用,1 500 r/min 离心 5 min,加

入新的含 10% EBS 的 DMEM 液,平均分配至多个新的培养皿继续培养。细胞传代至第 4 代待用。

**制备 PLGA 材料** 以氯仿为溶剂,配制 0.05 g/mL PLGA 溶液,充分溶解后以 9:1 (NaCl: PLGA) 的比例加入 NaCl 颗粒,充分搅拌使 NaCl 均匀分散,所得悬浮液快速倒入模具中,常温干燥 48 h,脱模后用蒸馏水洗去多孔膜中的 NaCl,空气干燥 48 h,再放入 40 °C 烘箱干燥 24 h。美康硬性隐形眼镜两片,夹持盐析膜,放置于 37 °C 烘箱静置 24 h,裁剪成直径 7 mm 的圆形材料备用。

**制备细胞-材料复合物** 将第 4 代 rASCs 用 0.25% 胰蛋白酶+0.02% EDTA 消化后收集在 50 mL 离心管,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清,10% FBS 的 DMEM 培养基重悬,计数。按  $1 \times 10^7$  / mL 的密度接种细胞到已制备的 PLGA 材料上,使细胞悬液均匀浸满于支架材料上,置于细胞培养箱中,4 h 后添加含 10% FBS 的 DMEM 培养液。ASCs 接种于 PLGA 后,每天倒置相差显微镜观察细胞在生物支架中的生长、增殖、基质分泌和细胞形态变化。取培养第 7 天的细胞-PLGA 复合物,PBS 洗涤,2.5% 的戊二醛固定 24 h,50%、70%、80%、90% 及 100% 乙醇溶液梯度脱水,醋酸正戊酯置换,CO<sub>2</sub> 临界点干燥,离子喷射仪喷金,扫描电镜观察。

**制作兔角膜基质缺损模型并构建组织工程角膜基质** 兔耳缘静脉注射戊巴比妥钠(30 mg/kg)全麻平稳后,常规消毒铺巾,开睑器开睑,手术显微镜下使用眼科角膜隧道刀制作直径 8 mm、1/3 角膜厚度的带蒂角膜基质瓣,切除其下直径 7 mm、1/3 厚度的角膜基质层,植入直径 7 mm 的 rASCs-PLGA 复合物,复位基质瓣并予 10-0 缝线间断缝合。手术由同一经验丰富的眼科医师操作完成。术后 2 周林可霉素滴眼液点术眼,每日 3 次,每晚红霉素眼膏涂眼,术后持续观察 6 个月。对照组采用与实验组相同的手术方法,在角膜基质缺损层间植入未接种细胞的空白 PLGA 材料,同样观察 6 个月。

**活体和组织学动态观察** 术后 1~7 天、2 周、1 个月、3 个月、6 个月裂隙灯显微镜观察兔眼角膜愈合情况,注意角膜新生血管生长、植片有无脱落、角膜透明度恢复情况。分别于术后 3 个月和 6 个月处死实验组和对照组兔并取材,取兔角膜固定于 4% 多聚甲醛溶液 24 h,常规脱水后,石蜡包埋封片,行组织学切片,苏木精-伊红(HE)染色。

**超微结构观察** 分离获取第 6 个月实验组新生角膜基质组织和正常兔角膜基质组织,分别置于 2.5% 戊二醛液中固定 24 h,1% 锇酸液固定 1 h 后,乙醇溶液梯度脱水,环氧树脂(EPON)包埋,行超薄切

片透射电镜观察。随机(将胶原纤维编号 1~ 600, 每个编号由计算机产生随机数, 将随机数字按大小排序, 抽取较小的 300 个随机数对应的胶原纤维, 测定其直径)抽取兔正常角膜胶原纤维 300 次和组织工程化角膜组织胶原纤维 300 次, 测量胶原纤维直径。

**统计学分析** 采用 SPSS 11.5 软件统计, 实验组与对照组胶原直径的数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用方差分析和  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

**rASCs 生长特性** 初分离的原代细胞形态呈小圆形, 色深, 接种 3~ 4 h 开始贴壁, 48 h 细胞完全贴

壁, 开始伸展, 5~ 6 天细胞可达到 90% 的融合, 传代后细胞呈成纤维细胞样梭形外观(图 1A), 形态均一, 生长活跃, 3~ 4 天即可达到融合。

**rASCs 在 PLGA 支架材料上的生长, 增殖** 扫描电镜观察, 细胞接种材料后第 1 天可见细胞较均匀黏附在生物支架上, 由圆形逐渐向两级伸展, 呈梭形或多角形(图 1D)。第 3 天可见细胞呈长梭形, 分泌基质向邻近纤维支架伸展, 邻近细胞相互连接, 形成拉网状结构(图 1E)。第 7 天细胞相互连接紧密, 细胞表面分泌大量的细胞外基质, 填充于支架材料的微孔中, 细胞基质纤维支架连接成片, 呈膜样结构(图 1F)。细胞在 PLGA 支架上生长良好, 增殖明显。

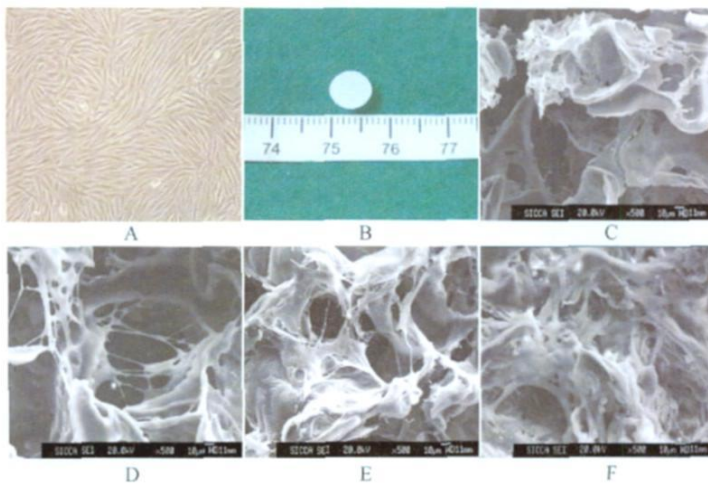


图 1 rASCs, PLGA 形态观与 rASCs PLGA 复合物扫描电镜观

Fig 1 Morphology of rASCs, PLGA and SEM view of rASCs PLGA complex

A: Fibroblast like uniform shape of rASCs at passage 4 ( $\times 100$ ); B: Gross view of PLGA scaffold with 7 mm in diameter; C: Scanning electronic micrograph (SEM) of PLGA material ( $\times 500$ ); D-F: The SEM view of rASCs on PLGA scaffold at 1, 3, 7 days after seeding ( $\times 500$ ).

**rASCs PLGA 复合物在角膜基质缺损修复中的变化(图 2)** 术中刚移植到角膜基质层间的 rASCs PLGA 复合物位于角膜中央, 白色不透明, 1 周后复合物呈现半透明, 2 周时见新生血管从角膜缘开始向角膜的中央复合物方向生长, 并逐渐增多。4 周后可见 PLGA 材料逐渐开始降解, 12 周时材料几乎全部降解, 新生血管基本消失, 角膜基本恢复透明。在材料降解吸收的整个过程未见引起周围角膜组织水肿及炎症反应, 眼内未见其他反应。观察至 24 周角膜仍保持透明, 与正常角膜无显著差异。PLGA 组材料降解速度比实验组略慢, 12 周时仍有部分材料残余, 24 周角膜恢复透明。

**组织学检查** rASCs+ PLGA 组术后第 12 周, PLGA 支架材料降解完全吸收, HE 染色可见新生角膜基质样组织形成, 植入的 ASCs 分散分布于新

生胶原间, 沿胶原方向伸展, 新生胶原与角膜表面基本平行, 排列较为整齐, 新生组织与周围组织染色相似(图 3A1)。PLGA 组缺损区域可见明显空缺, 极少量新生角膜基质组织生成(图 3B1)。术后 24 周, rASCs+ PLGA 组新生角膜基质样组织排列更为规则, 板层胶原纤维与前后或上下邻近的纤维相互吻合, 形成交叉网状结构(图 3A2), 与正常角膜几乎无差异。新生组织周围基质未见明显炎症细胞浸润, 无角膜水肿。PLGA 组损伤部位边缘有少量纤维生成, 仍有明显缺损区存在(图 3B2)。

**透射电镜检查结果(图 4)** 术后第 12 周 rASCs + PLGA 组新生胶原排列基本规则, 部分区域可见胶原间距增大(箭头所示), 第 24 周新生胶原纤维直径均一, 排列规则, 呈典型板层排列, 与正常角膜纤维排列无明显差别。PLGA 组第 12 周可见部分未降解材

料残存于新生角膜纤维间, 24周时可见缺损周围胶原纤维排列方向改变, 无规则板层结构。随机抽取每组角膜纤维各300次, 测得 rASCs-PLGA 组胶原纤维直径平均为  $(31.4 \pm 4.0)$  nm, PLGA 组胶原纤维直径平均为  $(33.3 \pm 5.5)$  nm, 正常兔角膜胶原纤维直径为

$(30.9 \pm 3.3)$  nm,  $t$  检验进行统计学分析, 结果提示 rASCs-PLGA 组胶原纤维直径与正常兔角膜胶原纤维直径分布差异无统计学意义 ( $P=0.08$ ), PLGA 组胶原纤维直径与正常角膜胶原纤维直径差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。



图2 术后0、12、24周兔角膜大体观

Fig 2 Gross view of rabbit cornea at 0, 12 and 24 weeks post implantation

0 week: Whitish opaque disk of grafts within the cornea; 12 weeks: PLGA material was mostly degraded and the cornea became nearly transparent in rASCs+ PLGA group while partial material retained in PLGA alone group; 24 weeks: The cornea of both groups became transparent.

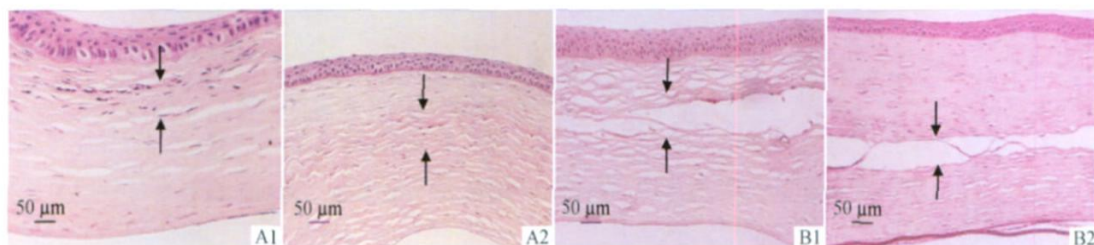


图3 移植12和24周后组织形态学观察(黑色箭头示手术区域)

Fig 3 Histological evaluation of the engineered corneal stroma at 12 and 24 weeks after transplantation

A1, A2: Engineered cornea in rASCs+ PLGA group at 12 (A1) and 24 weeks (A2) after transplantation; B1, B2: Engineered cornea in PLGA group at 12 (B1) and 24 weeks (B2) after transplantation. Arrows show operation area.

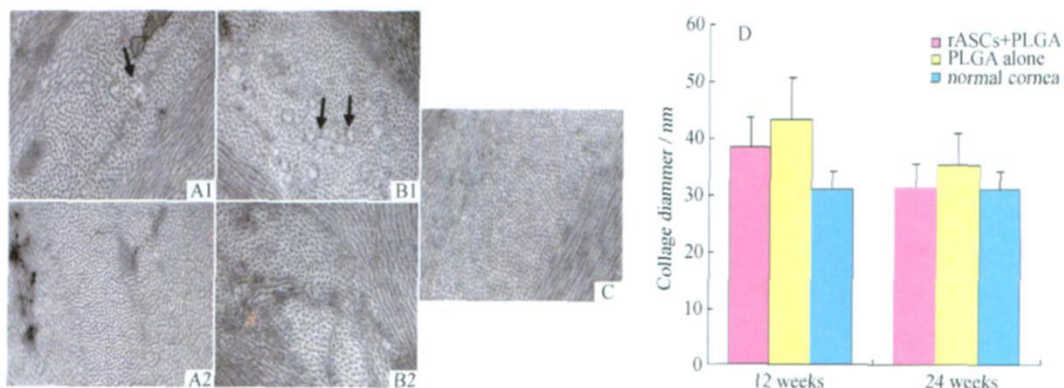


图4 移植12和24周后的透射电镜观和胶原纤维直径检测( $\times 12000$ )

Fig 4 TEM evaluation of diameter of collagen fibrils in each group at 12 weeks (A1, B1) and 24 weeks (A2, B2) after implantation ( $\times 12000$ )

A1: Fewer increased inter-fibril spacing in rASCs PLGA group at 12 weeks after transplantation; A2: Nearly normal collagen fibrils distribution in rASCs-PLGA group at 24 weeks after transplantation; B1: PLGA material among collagen fibrils in PLGA group at 12 weeks after transplantation; B2: Interlaced collagen fibrils in PLGA group at 24 weeks after transplantation; C: Normal cornea; D: Average diameters of collagen fibrils in each group.

## 讨 论

组织工程的核心是建立由细胞和生物材料构成的三维空间复合体。针对角膜的结构特点, 构建组织工程角膜的方法是将体外培养扩增的细胞植附于一种可降解、生物相容性好的生物材料上形成复合物, 将细胞-生物材料复合物植入受体眼角膜内, 角膜细胞在生物材料逐渐被机体吸收降解的过程中, 形成具有正常角膜形态和功能的新生组织工程角膜, 从而实现对病损角膜的修复和重建<sup>[8]</sup>。

近年来诸多文献报道, 临床上已经应用组织工程角膜上皮治疗角膜缘干细胞缺乏症<sup>[9-11]</sup>。同时, 能够维持正常角膜透明度的组织工程角膜内皮细胞层也已在动物模型上构建成功<sup>[12-15]</sup>, 而有关构建组织工程角膜基质的报道相对较少。角膜基质细胞曾被用于尝试构建组织工程角膜基质组织<sup>[6]</sup>, 术后角膜能够维持较好的透明度, 但角膜基质细胞来源有限, 增殖能力不强, 且对供体角膜损伤较大。骨髓间充质干细胞由于其具有多向分化功能成为人们研究的焦点<sup>[17-18]</sup>。2006年 Yamagami 等<sup>[9]</sup> 研究显示, 正常人角膜基质中存在骨髓来源细胞, 尽管该研究并未明确骨髓来源细胞存在的意义, 但至少说明了骨髓来源细胞参与了角膜基质的构成。2006年国内郭彤等<sup>[20]</sup> 报道人骨髓间充质干细胞移植治疗兔眼表损伤可诱导出人角膜上皮样细胞, 同时, 兔角膜基质中有骨髓源性细胞存在, 从侧面反应了骨髓干细胞向角膜基质细胞转化的可能。但是骨髓间充质干细胞来源有限, 易造成供区损伤。

ASCs 由于其取材方便、来源广泛, 且具有与骨髓干细胞几乎同等的多向分化能力, 成为另一可供选择的种子细胞对象。Francisco 等<sup>[21]</sup> 尝试将人 ASCs 直接注入活体兔角膜内, 发现移植术后 12 周仍可检测到人 ASCs 的存在, 无免疫排斥现象发生, 并且免疫学检测发现在体内微环境诱导下人 ASCs 向角膜基质细胞转化, 表达角膜基质细胞特异性蛋白聚糖 keratocan。本实验室也曾应用 ASCs 作为种子细胞成功构建组织工程骨软骨和血管组织<sup>[22-23]</sup>。PLGA 为聚乳酸与聚羟基乙酸的共聚物, 是一种可降解的微孔高分子材料, 曾多次被作为支架材料构建组织工程化膀胱、气管等, 并取得较好的效果<sup>[24-26]</sup>。Hadlock 等<sup>[27]</sup> 也曾应用 PLGA 培养视网膜色素上皮细胞和角膜内皮细胞, 在共聚物膜上得到单层人视网膜色素上皮细胞和兔角膜内皮细胞, 并在细胞间检测到紧密连接蛋白, 证实这种可降解材料可作为载体支架培养角膜组织的有关细胞。本实验中我们尝试利用 rASCs 与可降解生物材料

PLGA 构建复合物修复角膜基质缺损, 期望能建立与正常角膜相似的组织工程角膜基质。

我们采用胶原酶消化法分离培养 ASCs, 最初从脂肪组织中分离获取的细胞团块中并不是单一的 ASCs, 尚含有少量其他细胞及结缔组织, 其中红细胞、白细胞、淋巴细胞、内皮细胞可以于换液时逐步除去, 成纤维细胞可以应用细胞差速贴壁培养法除去。经过 3 次传代换液后, 基本可使 ASCs 得到纯化。在这一过程中, ASCs 也不断扩增, 考虑到本实验需要数量充足、功能完善的 ASCs 作为种子细胞, 我们选择了第 4 代细胞构造组织工程角膜基质。为了进一步确定该方法所获得细胞是否 ASCs, 我们对第 4 代细胞进行了多向分化功能的鉴定。通过诱导 rASCs 向成骨、成脂和成软骨 3 个方向分化成功, 证实我们得到的细胞确实是脂肪组织中存在的干细胞, 具有多向分化功能, 可以用于进一步实验。

本研究将 ASCs 接种到 PLGA 材料上, 体外构建细胞-PLGA 复合物, 光学显微镜和扫描电镜观察结果显示, 细胞能与 PLGA 牢固结合, 细胞在 PLGA 材料上生长增殖良好, 材料对细胞没有毒性。PLGA 在活体角膜内的降解始于术后 1 个月, 降解过程中出现角膜新生血管, 但新生血管随着材料降解而逐渐消退。材料降解过程中周围角膜组织未出现水肿和排斥反应, 我们推测新生血管的产生可能与手术操作的刺激因素以及材料本身有关, 另外 PLGA 降解过程中会产生一定量的乙醇酸和乳酸, 也会刺激新生血管生成。PLGA 虽然具有组织相容性好、无毒、无免疫性和可降解的特性, 但其作为组织工程角膜的支架材料有待于进一步改良。

角膜基质由大量胶原纤维及散在分布于胶原纤维间的角膜基质细胞构成, 角膜胶原板层排列整齐, 胶原纤维均一, 直径约 30 nm, 这对维持角膜透明性具有重要作用。在本实验中, 我们以未接种 rASCs 的空白 PLGA 材料为对照组, 将 rASCs-PLGA 复合物回植于新西兰大白兔角膜基质缺损层, 借助正常角膜所提供的上皮和内皮以及局部微环境, 尝试进行角膜基质缺损的修复。结果发现: 基质缺损区形成了与正常角膜类似的组织工程化角膜基质组织, 并且维持了接近正常的角膜透明度。组织学检查证实, 移植后第 24 周时, PLGA 材料全部降解, 新生角膜基质样组织形成, 与正常角膜无明显差别。同时, 应用透射电镜进一步观察显示: 实验组新生角膜基质组织的胶原纤维排列规则, 其直径与正常角膜基质组织差异无统计学意义。而未接种 ASCs 的对照组在第 24 周末仍未完成对缺损区的修复, 遗留大部分空白缺损, 只在缺损区边缘有少量胶原生成。说明新生角膜胶原主要来源于植入的

ASCs 而不是损伤区域周围角膜基质细胞的迁移。对照组缺损区周边新生胶原纤维直径比正常角膜直径略大,我们推测这可能与缺损区周围蛋白聚糖含量的明显降低导致部分新生胶原产生融合有关。

本研究结果提示:以自体 ASCs 为种子细胞与可降解生物材料 PLGA 复合可以构建与正常角膜类似的组织工程角膜基质,维持角膜的透明度。我们猜测其可能的机制是角膜局部的微环境诱导 ASCs 分化成为角膜基质细胞,并分泌大量蛋白聚糖及胶原,从而形成具有正常功能的组织工程化角膜基质组织。而进一步明确细胞的来源以及是否发生诱导分化,尚需更深入的研究。

综上所述,以 ASCs 复合可降解材料可实现组织工程角膜基质构建并修复角膜基质缺损。ASCs 来源广泛,取材方便,并可取自自体,有望成为组织工程角膜基质组织新的种子细胞来源。

#### 参 考 文 献

- [ 1 ] 谢立信.角膜移植的简史[M].角膜移植学,北京:人民卫生出版社,2000:1-5.
- [ 2 ] 胡晓杰,王敏,柴刚,等.组织工程技术构建兔角膜基质组织的实验研究[J].中华眼科杂志,2004,40(8):517-521.
- [ 3 ] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells[J]. *Mol Biol Cell*, 2002, 13(12):4279-4295.
- [ 4 ] Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, et al. Surface protein characterization of human adipose tissue derived stromal cells[J]. *J Cell Physiol*, 2001, 189(1):54-63.
- [ 5 ] Safford KM, Hicok KC, Safford SD, et al. Neurogenic differentiation of murine and human adipose derived stromal cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 294(2):371-379.
- [ 6 ] Miranville A, Heschel C, Sengenès C, et al. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue derived stem cells[J]. *Circulation*, 2004, 110(3):349-355.
- [ 7 ] Planat Benard V, Silvestre JS, Cousin B, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives[J]. *Circulation*, 2004, 109(5):656-663.
- [ 8 ] Minami Y, Sugihara H. Reconstruction of cornea in three dimensional collagen gel matrix culture[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1993, 34(7):2316-2324.
- [ 9 ] Tseng SC, Pralhasawat P, Barton K, et al. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency[J]. *Arch Ophthalmol*, 1998, 116(4):431-441.
- [ 10 ] Tsai RJ, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells[J]. *N Engl J Med*, 2000, 343(2):86-93.
- [ 11 ] Shimazaki J, Aiba M, Goto E, et al. Transplantation of human limbal epithelium cultivated on amniotic membrane for the treatment of severe ocular surface disorders[J]. *Ophthalmology*, 2002, 109(7):1285-1290.
- [ 12 ] Mimura T, Shimomura N, Usui T, et al. Magnetic attraction of ironendocytosed corneal endothelial cells to Descemet's membrane[J]. *Exp Eye Res*, 2003, 76(6):745-751.
- [ 13 ] Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, et al. Cultured human corneal endothelial cell transplantation with a collagen sheet in a rabbit model[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45(9):2992-2997.
- [ 14 ] Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, et al. Sphere therapy for corneal endothelium deficiency in a rabbit model[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46(9):3128-3135.
- [ 15 ] Mimura T, Yamagami S, Usui T, et al. Necessary prone position time for human corneal endothelial precursor transplantation in a rabbit endothelial deficiency model[J]. *Curr Eye Res*, 2007, 32(7-8):617-623.
- [ 16 ] Belaoussoff M, Farrington SM, Baron MH. Hematopoietic induction and respecification of A-P identity by visceral endoderm signaling in the mouse embryo[J]. *Development*, 2002, 129:5009-5018.
- [ 17 ] Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(4):568-584.
- [ 18 ] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*, 1999, 284(5411):143-147.
- [ 19 ] Yamagami S, Ebihara N, Usui T, et al. Bone marrow derived cells in normal human corneal stroma[J]. *Arch Ophthalmol*, 2006, 124:62-69.
- [ 20 ] 郭彤,王薇,张君.骨髓间充质干细胞移植治疗眼表损害的初步实验研究[J].中华眼科杂志,2006,42(3):246-250.
- [ 21 ] Arnalich Montiel F, Pastor S, Blazquez Martinez A, et al. Adipose derived stem cells are a source for cell therapy of the corneal stroma[J]. *Stem Cells*, 2008, 26(2):570-579.
- [ 22 ] Cui L, Liu B, Liu GP, et al. Repair of cranial bone defects with adipose derived stem cell and coral scaffold in a canine model[J]. *Biomaterials*, 2007, 28(36):5477-5486.
- [ 23 ] Wang C, Cen L, Yin S, et al. A small diameter elastic blood vessel wall prepared under pulsatile conditions from polyglycolic acid mesh and smooth muscle cells differentiated from adipose derived stem cells[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(4):621-630.
- [ 24 ] Jack GS, Zhang R, Lee M, et al. Urinary bladder smooth muscle engineered from adipose stem cells and a three dimensional synthetic composite[J]. *Biomaterials*, 2009, 30(19):3259-3270.
- [ 25 ] Liu LQ, Wu W, Tuo XY, et al. Novel strategy to engineer trachea cartilage graft with marrow mesenchymal stem cell macroaggregate and hydrolyzable scaffold[J]. *Artificial Organs*, 2010, 34(5):426-446.
- [ 26 ] Lloyd DA, Arsanjani TI, Gundabolu P, et al. A pilot study investigating a novel subcutaneously implanted pre cellularised scaffold for tissue engineering of intestinal mucosa[J]. *Eur Cells Materials*, 2006, 11:27-34.
- [ 27 ] Hadlock T, Singh S, Vacanti JP, et al. Ocular cell monolayers cultured on biodegradable substrates[J]. *Tissue Eng*, 1999, 5(3):187-190.

(收稿日期:2010-06-09;编辑:王蔚)