

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.25.012

小型猪 ASCs 生物学性状研究及其骨组织工程应用探讨

骆 虎 陈建民[△] 赵红军 方振东 苏明海 贾小宝

(解放军第 81 医院骨科 江苏 南京 210000)

摘要 目的:观察小型猪脂肪来源干细胞(adipose derived stem/stromal cells, ASCs)的形态学特点,研究其多向分化潜能和生物学特性,探讨其在骨组织工程方面的应用。**方法:**切取雄性小型猪背部皮下脂肪,体外分离培养并鉴定 ASCs,观察其生长、增殖特性和组织学形态;并诱导其向脂肪细胞和骨细胞多向分化,分别采用油红 O 染色和茜素红染色鉴定,细胞表面分子通过流式细胞术鉴定。**结果:**贴壁的 ASCs 为长梭形,生长增殖快,性状稳定,流式细胞术检测显示 CD29、CD90 阳性表达,CD14、CD31、CD34 阴性表达。通过相应的诱导培养液诱导,ASCs 可向脂肪细胞和骨细胞分化并表现出相应的生物学特征。**结论:**小型猪背部皮下脂肪取材方便,可获得大量脂肪用以分离 ASCs,ASCs 增殖分化能力较强,在条件培养基诱导下可成骨分化,可作为种子细胞应用于骨组织工程。

关键词:脂肪来源干细胞;小型猪;鉴定;分化;骨组织工程

中图分类号:Q95-3;R318.08;R68 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)25-4852-04

Study on the Characteristics of Miniature Pig Adipose Derived Stem/Stromal Cells and its Application in Bone Tissue Engineering

LUO Hu, CHEN Jian-min[△], ZHAO Hong-jun, FANG Zhen-dong, SU Ming-hai, JIA Xiao-bao

(Department of Orthopaedics, the 81st Hospital of PLA, Nanjing, Jiangsu, 210000, China)

ABSTRACT Objective: To observe the morphological and biological characteristics and multilineage potential of adipose derived stem/stromal cells (ASCs) of miniature pig. Otherwise, we discussed its application and experimental study in bone tissue engineering. **Methods:** ASCs were isolated from the subcutaneous adipose tissue of miniature pig by collagenase digestion. The characteristics and morphology of ASCs were observed by microscopic observation, flow cytometry, and lipogenic and osteogenic differentiation. The differentiations were identified by Oil Red O and Alizarin red staining respectively. **Results:** ASCs appeared to be spindle-shaped, a general bionomics of ASCs, and expressed positive of CD29 and CD90, while negative of CD14, CD31 and CD34. Moreover, ASCs were able to differentiate into adipocytes and osteoblasts. **Conclusions:** It is simple and feasible to obtain enough adipose tissue from the back of miniature pig, and from which ASCs can be effectively isolated. Besides, ASCs have good proliferation and multipotential ability.

Key Words: Adipose derived stem/stromal cells; Miniature pig; Identification; Differentiation; Bone tissue engineering

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R318.08; R68 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2014)25-4852-04

前言

目前,骨组织工程中应用最为广泛的种子细胞是骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs)^[1],BMSCs 一般从骨髓中提取,但取骨髓的过程会给患者带来较大痛苦,且获取的细胞数量也少,限制了其在骨组织工程中的应用。如骨髓一样,脂肪也是中胚层分化而来,其中含有大量的基质成分,可以从中提取出类似于 BMSCs 的干细胞,即脂肪来源干细胞(adipose derived stem/stromal cells, ASCs)^[2-3]。近几年,ASCs 的分化可塑性和治疗潜力越来越受到关注,它可分化为多种细胞类型,包括骨、脂肪、软骨、神经细胞、心肌细胞等^[4-8]。在动物实验方面,研究较多的是大鼠^[9]和兔^[10]的 ASCs,而

作为与人体解剖和生理更为接近的小型猪的 ASCs 研究较少。本研究拟采用胶原酶消化法分离 ASCs,体外培养和扩增,并采用流式细胞术对其表面标志进行鉴定,观察其增殖和生长特性和多向分化潜能,探讨其在骨组织工程中的应用的优势和前景。

1 材料与方法

1.1 实验动物

4 月龄贵州小型猪 3 头,体重 15~20 kg,雄性,由成都达硕生物科技有限公司提供。实验期间单笼饲养,采用混合饲料喂养,每头猪每天喂等量饲料和水各两次。

1.2 主要试剂

改良型 α -MEM 培养基、青-链霉素(HyClone,美国),胰岛素(Thermo,美国),0.25%胰酶(碧云天),胎牛血清(PAA,奥地利),PBS、I 型胶原酶、L-抗坏血酸、 β -甘油磷酸钠、地塞米松、异丁基甲基黄嘌呤(IBMx)、吡嗪美辛、油红 O、噻唑兰(MTT)(Sigma,美国),鼠抗猪 CD14 抗体、鼠抗猪 CD29 抗体、鼠抗猪 CD31 抗体、鼠抗猪 CD34 抗体、鼠抗猪 CD90 抗体(Abcam,美

作者简介:骆虎(1984-),男,本科,住院医师。主要研究方向:干细胞与骨缺损修复,E-mail:luohu_85@163.com

[△]通讯作者:陈建民(1975-),科室主任,副主任医师,主要研究方向:创伤与骨缺损修复,E-mail:luohu_85@163.com

(收稿日期:2013-09-15 接受日期:2013-10-13)

国),苏木素、伊红、茜素红、二甲基亚砷(上海索莱宝生物科技有限公司)。

1.3 主要仪器

BIOB 洁净台(鑫贝西生物技术有限公司),CO₂细胞培养箱(Thermo,美国),TD25-WS 多管架自动平衡离心机、TG16-W 微量高速离心机(湘潭湘仪仪器公司),倒置显微镜及照相系统(Nikon,日本),酶联免疫检测仪(Thermo,美国),流式细胞仪(BD 公司,美国),荧光显微镜及照相系统(Laica,德国),恒温培养摇床(上海福玛实验设备有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 小型猪 ASCs 的分离和培养 小型猪全身麻醉后备皮,常规消毒铺单,盐酸利多卡因局麻后切取背部皮下脂肪,PBS 清洗干净,用剪刀将脂肪剪碎,按 1:1 的体积比与 2.5 mg/ml I 型胶原酶混合,放在离心管中,封口膜封口,将混合物放在 37℃ 恒温培养摇床中消化约 40 min。1000 rpm 离心 10 min,弃去上层液体及脂肪,加入 10% FBS- α -MEM 培养液 1 mL 重悬,200 目筛网过滤,收集滤液放入离心管内,封口膜封口,1000 rpm 离心 5 min,弃去上清,加入适量 PBS 重悬,1000 r/min,5 min 离心洗涤 2 次。用含 10%FBS 的 α -MEM 培养液重悬细胞,取适量细胞悬液加入到细胞计数板中,于倒置显微镜下计数,调整细胞浓度约 1×10^5 /ml 接种到培养瓶中,放入 37℃、体积分数为 5% 的 CO₂ 细胞培养箱中培养。72 h 后换液,去除未贴壁的细胞,以后每 2-3 d 换液 1 次,细胞融合生长达 90%,常规消化传代。

1.4.2 HE 染色 取第 3 代 ASCs,将盖玻片放置于培养皿中,以 1×10^5 的密度接种于盖玻片上,2 h 后往培养皿中加入适量的含 10% FBS 的 α -MEM 培养液培养 24 h 后,取出盖玻片固定进行 HE 染色。

1.4.3 表面 CD 分子鉴定 取第 3、4 代的猪 ASCs,常规消化,离心重悬并调整细胞密度为 1×10^6 /ml,然后用 PBS 在 1000 r/min,5 min 条件下离心洗涤 2 次,加入 100 μ L PBS 重悬细胞,分别加入鼠抗猪单克隆抗体 CD14、CD29、CD31、CD34、CD90,置于 4℃ 冰箱避光孵育 30 min,PBS 漂洗 2 次,1000 r/min,5 min,最后用流式细胞检测仪上机检测细胞表面标志情况,每个样本各测 3 次。

1.4.4 生长曲线测定 常规消化收集细胞,以每孔 4×10^3 细胞接种到 96 孔板上,每孔 200 μ L,将 96 孔板中的细胞放入 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养。从第 2 天开始,每天定时每孔加 MTT 溶液 20 μ L,继续孵育 4 h 后终止培养,小心吸弃孔内培养上清液,每孔加 150 mL DMSO,振荡器振荡 10 min,使结晶物充分溶解。选择 492 nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值。连续如上操作 8 天,统计分析实验结果,以时间为横坐标,吸光值为纵坐标绘制生长曲线。

1.4.5 成脂成骨分化

1.4.5.1 成脂诱导 将第 3 代 ASCs 按 10^5 个/cm² 浓度接种到 6 孔培养板中,含 10% FBS 的 α -MEM 培养液继续培养 2 天后,更换为含 0.5 mmol/L 异丁基甲基黄嘌呤(IBMx)、200 μ mol/L 吡嗪美辛、100 nmol/L 地塞米松、10 μ g/ml 胰岛素的成脂诱导培养液,隔日换液 1 次。成脂诱导培养 14 d 后,4%多聚

甲醛固定 15 min,PBS 冲洗,油红 O 染色液室温孵育 15 min,蒸馏水冲洗,镜下观察。

1.4.5.2 成骨诱导 第 3 代的 ASCs 以 10^5 个/cm² 细胞浓度接种于 6 孔培养板中,以成骨培养液诱导(体积分数 10%胎牛血清、0.05 mmol/L L-抗坏血酸、地塞米松 10 nmol/L、 β -磷酸甘油钠 10 mmol/L 的 α -MEM 培养基)。成骨诱导 14 d,取出盖玻片,PBS 冲洗 2 遍,4%多聚甲醛室温固定 15 min,蒸馏水冲洗 2 遍,加入 40 mmol/L 的茜素红染色液,室温孵育 20 min,蒸馏水漂洗并振荡 5 min 重复 4 次,吸取多余的蒸馏水,倒置显微镜观察拍照记录。

2 结果

2.1 猪 ASCs 细胞形态学观察

ASCs 体外培养 24 h 后,有少量散在的贴壁细胞,呈梭形或多角形。3 d 时,细胞呈长梭形,呈克隆样生长。10-12 d 左右细胞长满培养瓶壁约 90%,排列紧密,漩涡样生长(见图 1)。传代细胞中部分细胞的细胞浆内可见较多小脂滴聚集。



图 1 小型猪 ASCs 形态($\times 200$)

Fig.1 Morphology of ASCs($\times 200$)

2.2 猪 ASCs 的 HE 化学染色观察

镜下可见 HE 染色的 ASCs 细胞形态、排列分布与镜下活细胞形态一致,为长梭形细胞,胞浆丰富、核大,呈簇集漩涡状生长(见图 2)。

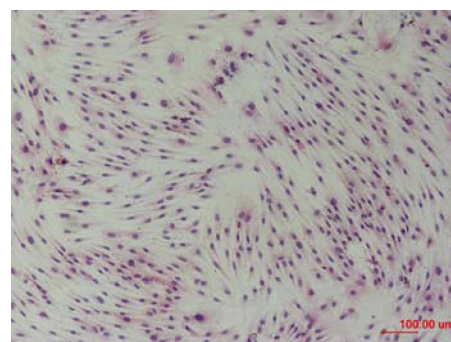


图 2 小型猪 ASCs 形态($\times 200$)

Fig.2 HE staining of minipig ASCs($\times 200$)

2.3 猪 ASCs 表面标志鉴定

流式细胞仪检测结果显示,CD29 呈弱阳性表达(见图 3A),约 $(58.2 \pm 1.5)\%$,CD90 呈强阳性表达(见图 3B),约

(97.1 ± 2.8)%, CD14 呈阴性表达(见图 3C), 约(1.4 ± 0.4)%, 达(见图 3E), 约(1.5 ± 0.2)%, 表明培养细胞具有 ASCs 的 CD31 呈阴性表达(见图 3D), 约(1.2 ± 0.3)%, CD34 呈阴性表 CD 分子表型特征。

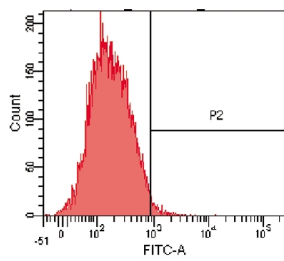


图 3A CD29

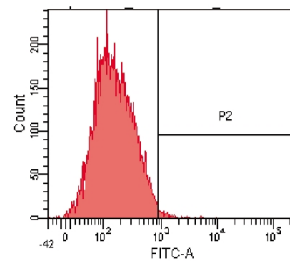


图 3B CD14

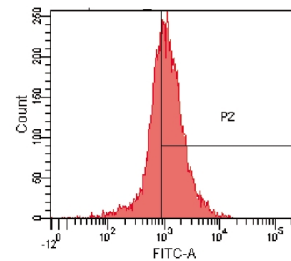


图 3C CD31

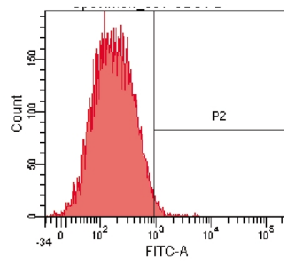


图 3D CD34

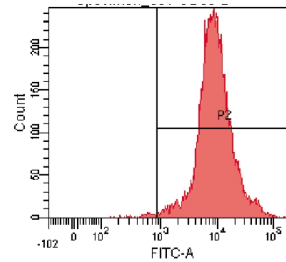


图 3E CD90

图 3 小型猪 ASCs 表面标记鉴定

Fig.3 Identification of surface markers of ASCs

2.4 细胞生长曲线

小型猪 ASCs 生长曲线整体呈 "S" 形(见图 4), 细胞接种后第 1-2 d 为细胞生长潜伏适应期, 细胞增殖较慢, 细胞数目缓慢增加。第 3-6 d 为细胞对数生长期, 细胞分裂增殖活跃, 细胞数目快速增加, 第 6 天达到高峰, 此时镜下可见细胞已基本长满, 第 7、8 d 为细胞生长平台期, 细胞数目趋于稳定。

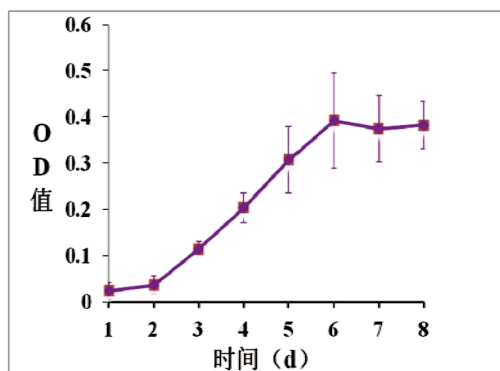


图 4 小型猪 ASCs 生长曲线

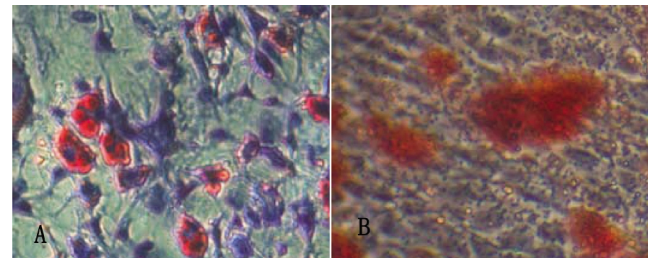
Fig.4 Growth curve of minipig ASCs

2.5 猪 ASCs 多向分化特征鉴定

成脂诱导 4 d 后, 脂肪干细胞由长梭形逐渐变为圆形或多边形, 体积略增大, 部分细胞的细胞浆内出现折光性很强的圆形小脂滴。诱导 1 w 后, 含脂滴的细胞增多, 胞浆内脂滴增多, 部分小脂滴融合成大脂滴, 细胞体积逐渐增大, 脂肪细胞呈串珠状分布。诱导 3 w 后, 油红 "O" 染色, 可见脂肪细胞中含大量大小不等的橘红色脂滴(图 5A)。

成骨诱导后, 脂肪干细胞由长梭形变为细胞胞体较小的短

梭形或多边形, 呈复层重叠生长, 细胞质颜色变深, 并分泌细胞外基质, 形成颗粒状钙盐沉积, 10-12 d 后可见不透光的大小不等的团块状矿化结节形成。4 w 后经茜素红染色观察到, 细胞外基质中可见红染的团块状钙结节分布(图 5B)。

图 5 小型猪 ASCs 诱导分化($\times 200$)

(A: 成脂诱导油红 O 染色; B: 成骨诱导茜素红染色)

Fig.5 Differentiation of minipig ASCs($\times 200$)

(A: Oil Red O staining after adipogenic differentiation; B: Alizarin red staining after osteogenic differentiation)

3 讨论

目前, 研究所用的 ASCs 主要来源于人、鼠、兔和小型猪。小型猪作为分离 ASCs 的实验动物具有以下优势: (1) 皮下脂肪丰富, 可大量切取或抽取; (2) 小型猪脂肪生长快, 同一部位可反复获取脂肪用以分离细胞, 是非常好的获取 ASCs 的动物。

本研究采用手术切取贵州小型猪背部脂肪组织, 通过消化法成功分离出脂肪干细胞。ASCs 的分离一般采用胶原酶消化脂肪后离心的方法, 鼠兔等小动物的 ASCs 培养采用含 10%

FBS 的 DMEM 完全培养基培养,而小型猪的 ASCs 则采用含 10%FBS 的 α -MEM 完全培养基培养。本实验采用传统的胶原酶消化^[11]脂肪后离心得到富含 ASCs 的细胞悬液,用含 10% FBS 的 α -MEM 完全培养基培养,通过培养过程中定时不断的更换培养液,逐渐去除未贴壁的血细胞、肌细胞、内皮细胞等,经过 2-3 次传代,获得较纯的 ASCs,细胞形态多呈长梭形,排列整齐均一,到第 3 代之后细胞增殖活跃,可为基础及临床研究提供大量细胞。

ASCs 的鉴定尚无直接方法,且体外培养的 ASCs 与新鲜的 ASCs 表型不同^[12],目前公认干细胞常用的鉴定方法都是通过分化表型逆推得知是否为干细胞^[13,14]。我们采用流式细胞仪鉴定 ASCs 细胞表面标志,由于 ASCs 在不同培养时间及不同培养环境下其细胞表面标志表达有差异,且不同种属动物的 ASCs 细胞表面标志也不一样,我们发现小型猪第 3 代、第 4 代 ASCs 的 CD29 均呈弱阳性表达,CD90 呈强阳性表达,CD14、CD31、CD34、CD45 呈阴性表达,与其他学者的研究结果基本一致^[15,16],证实了本实验分离的细胞具有间充质干细胞表面抗原标记特性。

在条件培养基下,ASCs 体外可成脂成骨诱导分化,表明小型猪 ASCs 具有多向分化能力。成骨诱导 4 周后,细胞形态变为短梭形或多边形,胞质颜色变深,与体内成骨细胞形态类似,细胞外可见较多的钙结节,这种体外成骨分化的特性使得 ASCs 在骨组织工程中具有很大的前景^[17-19]。ASCs 与 BMSCs 具有相似的分化能力^[20,21],除此之外,ASCs 应用于骨组织工程还具有以下优势:(1)来源更为丰富^[22];研究报道每年约有 400,000 患者接受吸脂手术,每次手术可获 100 mL 到 3L 不等的脂肪组织,且人体皮下脂肪含量丰富,这些脂肪可以为获得脂肪来源干细胞提供丰富的来源;(2)获取途径简单^[24];通过抽脂法或抽吸辅助的脂肪切除术便可得到大量可用于分离 ASCs 的脂肪,且这种手术也是临床上最常用的整形美容手术,操作简单,通常在局部麻醉下就可进行,也可在门诊进行,手术很安全;(3)对人体创伤小;(4)可反复取材分离干细胞;(5)增殖分化能力强,对缺氧耐受力更强^[25]。

目前,对 ASCs 的应用研究主要集中在促进骨移植骨再生和软骨再生、降低脂肪充填吸收率及治疗严重心衰等方面,并都取得了不错的效果。随着生物技术和材料不断发展,小型猪 ASCs 在组织工程和再生领域已成为一种重要的种子细胞,其在骨组织工程方面的研究和应用也越来越广泛。

参考文献(References)

- [1] Liu W, Cui L, Cao Y. Bone reconstruction with bone marrow stromal cells[J]. *Methods Enzymol*, 2006, 420: 362-380
- [2] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies [J]. *Tissue Eng*, 2001, 7(2): 211-228
- [3] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells[J]. *Mol Cell*, 2002, 13(12): 4279-4295
- [4] Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, et al. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(5): 560-567
- [5] Sen A, Lea-Currie YR, Sujkowski D, et al. The adipogenic potential of human adipose derived stromal cells from multiple donors is heterogeneous[J]. *J Cell Biochem*, 2001, 81: 312-319
- [6] Awad HA, Wickham MQ, Leddy HA, et al. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds[J]. *Biomaterials*, 2004, 25: 3211-3222
- [7] Safford KM, Safford SD, Gimble JM, et al. Characterization of neuronal/glial differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells[J]. *Exp Neurol*, 2004, 187(2): 319-328
- [8] Choi YS, Dusting GJ, Stubbs S, et al. Differentiation of human adipose-derived stem cells into beating cardiomyocytes [J]. *J Cell Mol Med*, 2010, 14(4): 878-889
- [9] 梁丽华,李龙,赵建辉,等.大鼠脂肪干细胞体外培养及成骨诱导分化研究[J]. *实用口腔医学杂志*, 2012, 28(3): 289-293
- [10] Liang Li-hua, Li Long, Zhao Jian-hui, et al. Isolation, culture and osteogenic differentiation of rat adipose-derived stem cells [J]. *J Pract Stomatol*, 2012, 28(3): 289-293
- [11] 李龙,赵建辉,刘斌,等.兔脂肪干细胞的分离培养鉴定及诱导分化研究[J]. *口腔医学研究*, 2012, 28(5): 426-429
- [12] Li Long, Zhao Jian-hui, Liu Bin, et al. Isolation, characterization and differentiation of rabbits adipose-derived stem cells[J]. *J Oral Sci Res*, 2012, 28(5): 426-429
- [13] Yoshimura K, Suga H, Eto H. Adipose-derived stem/progenitor cells: roles in adipose tissue remodeling and potential use for soft tissue augmentation[J]. *Regen Med*, 2009, 4(2): 265-273
- [14] Varma MJ, Breuls RG, Schouten TE, et al. Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells[J]. *Stem Cells Dev*, 2007, 16(1): 91-104
- [15] Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, et al. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates[J]. *J Cell Physiol*, 2006, 208(1): 64-76
- [16] Pittenger MF, Mackay A, Beck S, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *Science*, 1999, 284 (5411): 143-147
- [17] Song SH, Kumar BM, Kang EJ, et al. Characterization of porcine multipotent stem/stromal cells derived from skin, adipose, and ovarian tissues and their differentiation in vitro into putative oocyte-like cells[J]. *Stem Cells Dev*, 2011, 20(8): 1359-1370
- [18] Pilchard HL, Richerd W M, Klitzman B, et al. Adult adipose-derived stem cell attachment to biomaterials [J]. *Biomaterials*, 2007, 28 (6): 936-946
- [19] Cui L, Liu B, Liu G, et al. Repair of cranial bone defects with adipose derived stem cells and coral scaffold in a canine model[J]. *Biomaterials*, 2007, 28: 5477-5486
- [20] Levi B, James AW, Nelson ER, et al. Longaker MT. Human adipose derived stromal cells heal critical size mouse calvarial defects [J]. *PLoS One*, 2010, 5: e11177
- [21] Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G, et al. Dose-dependent effect of adipose-derived adult stem cells on vertical bone regeneration in rabbit calvarium[J]. *Biomaterials*, 2010, 31: 3527-3535
- [22] Quirici N, Scavullo C, de Girolamo L, et al. Anti-L-NGFR and -CD34 monoclonal antibodies identify multipotent mesenchymal stem cells in human adipose tissue [J]. *Stem Cells Dev*, 2010, 19: 915-925

参 考 文 献(References)

- [1] Whitty JA, Crosland P, Hewson K, et al. A cost-minimisation analysis comparing photoselective vaporization (PVP) and transurethral resection of the prostate (TURP) for the management of symptomatic benign prostatic hyperplasia (BPH) in Queensland, Australia[J]. BJU Int. 2013[Epub ahead of print]
- [2] Yi Qingtong. Efficacy of Solifenacin in the treatment of overactive bladder syndrome after transurethral resection of the prostate [J]. China Medical Abstracts (Surgery), 2011, 20(4): 239-239
- [3] Starkman JS, Duffy JW, Wolter CE, et al. The evolution of obstruction induced overactive bladder symptoms following urethrolysis for female bladder outlet obstruction [J]. J Urol, 2008, 179(3): 1018-1023
- [4] Geoffrion R. Treatments for overactive bladder: focus on pharmacotherapy[J]. J Obstet Gynaecol Can, 2012, 34(11): 1092-1101
- [5] Hung MJ, Chou CL, Yen TW, et al. Development and validation of the Chinese Overactive Bladder Symptom Score for assessing overactive bladder syndrome in a RESORT study[J]. J Formos Med Assoc, 2013, 112(5): 276-282
- [6] Giarenis I, Cardozo L. Management of refractory overactive bladder. Minerva Ginecol, 2013, 65(1): 41-52
- [7] Kuo HC. Analysis of the pathophysiology of lower urinary tract symptoms in patients after prostatectomy [J]. Urol Int, 2002, 68(2): 99-104
- [8] 李如兵, 杨燮樵, 杨远清, 等. 索利那新联合坦索罗辛治疗 TURP 术后膀胱过度活动症 20 例报告[J]. 海峡药学, 2012, 24(5): 95-97
Li Ru-bing, Yang Xie-qiao, Yang Yuan-qing, et al. Solifenacin combined with tamsulosin for the treatment of postoperative TURP overactive bladder: report of 20 case[J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2012, 24(5): 95-97
- [9] 宋波, 金锡卿, 熊庆恩, 等. 硬膜外注射吗啡在前列腺切除术后中的应用[J]. 中华泌尿外科杂志, 1991, 12(6): 452
Song Bo, Jin Xi-yu, Xiong Qing-en, et al. Application of epidural injection of morphine in prostatectomy[J]. Chinese Journal of Urology, 1991, 12(6): 452
- [10] 毕玉梅, 李洪平, 马金艳. 托特罗定治疗 TURP 术后膀胱过度活动症 30 例临床观察[J]. 山东医药, 2009, 49(39): 54
Bi Yu-mei, Li Hong-ping, Ma Jin-yan. The clinical effect of Tofth Luoding for the treatment of postoperative TURP overactive bladder. report of 30 case[J]. Shandong Medical Journal, 2009, 49(39): 54
- [11] Price DA, Ramsden PD, Stobbs D. The unstable bladder and prostatectomy[J]. Br J Urol, 1980, 52(6): 529-531
- [12] 倪颖, 周金才, 顾丽兰, 等. 超前使用双氯芬酸钠栓治疗改善 TURP 手术当晚舒适度的疗效效果观察 [J]. 海南医学, 2012, 23(19): 27-28
Ni Ying, Zhou Jin-cai, Gu Li-lan, et al. Preemptive use of Diclofenac Sodium Suppositories can improve the comfort of the first night after TURP[J]. Hainan Medical Journal, 2012, 23(19): 27-28
- [13] 杨志伟, 吴达丰, 梁勤敏, 等. 双氯芬酸钠盐酸利多卡因注射液超前镇痛在腹腔镜手术中的应用[J]. 中国微创外科杂志, 2013, 13(5): 429-431
Yang Zhi-wei, Wu Da-feng, Liang Qin-min, et al. Preemptive Analgesia with Diclofenac Sodium and Lidocaine Hydrochloride Injection in Patients Undergoing Laparoscopic Operation [J]. Chin J Min Inv Surg, 2013, 13(5): 429-431
- [14] 刘洁, 张维怡, 柳应旭, 等. 索利那新治疗女性中重度膀胱过度活动症的疗效观[J]. 中华泌尿外科杂志, 2013, 34(1): 74
Liu Jie, Zhang Wei-yi, Liu Ying-xu, et al. Effect of Solifenacin in the treatment of women with Moderate to severe overactive bladder[J]. Chinese Journal of Urology, 2013, 34(1): 74
- [15] Kaplan SA, He W, Koltun WD, et al. Solifenacin plus tamsulosin combination treatment in men with lower urinary tract symptoms and bladder outlet obstruction: a randomized controlled trial[J]. Eur Urol, 2013, 63(1): 158-165
- [16] 邢那群, 叶章群, 孙光, 等. 中国泌尿外科疾病诊断治疗指南[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 147-148
Na Yan-qun, Ye Zhang-qun, Su Guang, et al. CUA guideline on Urology[M]. Beijing: people's health publishing house, 2011: 147-148

(上接第 4855 页)

- [21] de Girolamo L, Sartori MF, Arrigoni E, et al. Human adipose-derived stem cells as future tools in tissue regeneration: osteogenic differentiation and cell-scaffold interaction [J]. Int J Artif Organs, 2008, 31: 467-479
- [22] de Girolamo L, Lopa S, Arrigoni E, et al. Human adipose-derived stem cells isolated from young and elderly women: their differentiation potential and scaffold interaction during in vitro osteoblastic differentiation[J]. Cytotherapy, 2009, 11: 793-803
- [23] Yoshimura K, Sato K, Aoi N, et al. Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: efficacy of clinical use of adipose-derived stem cells [J]. Dermatol Surg, 2008, 34(9): 1178-1185
- [24] Yoshimura K, Sato K, Aoi N, et al. Cell-assisted lipotransfer (CAL) for cosmetic breast augmentation-supportive use of adipose-derived stem/stromal cells[J]. Aesthetic Plast Surg, 2008, 32(1): 48-55
- [25] Eto H, Suga H, Inoue K, et al. Adipose injury-associated factors mitigate hypoxia in ischemic tissues through activation of adipose-derived stem/progenitor/stromal cells and induction of angiogenesis [J]. Am J Pathol, 2011, 178(5): 2322-2332