

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.10.003

脱氧胆酸钠对人脐静脉内皮细胞凋亡的影响*

张肖霄¹ 朱丽倩² 张盈帆¹ 赵耀忠¹ 江 华¹ 朱晓海^{1Δ}

(1 第二军医大学附属长征医院整形外科 上海 200003; 2 武警上海市总队医院整形外科 上海 201103)

摘要 目的:探讨脱氧胆酸钠(SD)对体外培养的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)凋亡的影响。**方法:**(1)以不同终浓度(0、0.015 mg/mL、0.05 mg/mL、0.15 mg/mL、0.5 mg/mL、1.0 mg/mL)的脱氧胆酸钠分别作用于人脐静脉血管内皮细胞,使用 CCK-8 检测细胞活力、TUNEL 荧光染色检测细胞凋亡;(2)以终浓度为 0.15 mg/mL 的 SD 作用于 HUVEC4、8、12 h 后用 Western blot 检测 Caspase-3、7、9 蛋白及 PARP 活化情况;(3)观察 Caspase-3 抑制剂 Z-DEVD-FMK 对 0.15 mg/mL 脱氧胆酸钠组的影响。**结果:**CCK8 结果显示随 SD 浓度(0~1.0 mg/mL)及作用时间(0~12 h)增加,HUVEC 活力降低,0.15 mg/mL 时活力为 80%,1.0 mg/mL 时细胞活力仅不到 10%;Tunel 检测示随着 SD 浓度的增加 HUVEC 凋亡明显增多;Western Blot 结果示 SD 作用于 HUVEC 后 Caspase-3、7、9 蛋白及 PARP 活化明显增加;Z-DEVD-FMK 明显抑制了 0.15 mg/mLSD 引起的 PARP 活化。**结论:**脱氧胆酸钠(SD)通过启动 Caspase 级联反应介导了人脐静脉内皮细胞的凋亡。

关键词:脱氧胆酸钠;人脐静脉内皮细胞;凋亡;Caspase 蛋白酶

中图分类号:R-33; Q591.5; R329.2+6 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)10-1810-05

Effect of Sodium Deoxycholate (SD) on Human Umbilical Vein Endothelial Cell Apoptosis*

ZHANG Xiao-xiao¹, ZHU Li-qian², ZHANG Ying-fan¹, ZHAO Yao-zhong¹, JIANG Hua¹, ZHU Xiao-hai^{1Δ}

(1 Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Changzheng Hospital of Second Military Medical University, Shanghai, 200003, China; 2 Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Armed Police Corps Hospital of Shanghai, Shanghai, 201103, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of sodium deoxycholate (SD) on the apoptosis of HUVECs in vitro. **Methods:** (1) After HUVECs were respectively exposed to different final concentrations of SD (0, 0.015 mg/mL, 0.05 mg/mL, 0.15 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL) cell viability was detected by CCK-8 assay and cell apoptosis was detected by TUNEL staining. (2) After 0.15 mg/mL SD was acted on HUVECs for 4 h, 6 h, 8 h, Western blot was used to detect the activation of Caspase-3, 7, 9 and PARP. (3) Observe the effect of Z-DEVD-FMK (a Caspase-3 inhibitor) on the groups with SD at a dose of 0.15 mg/mL. **Results:** CCK8 assay showed that with the increasing of SD concentrations (0~1.0 mg/mL) and action time (0~12h), cell viability of HUVECs decreased accordingly. Cell viability was 80% at a dose of 0.15 mg/mL, while merely less than 10% at a dose of 1.0 mg/mL. TUNEL staining displayed that the more the concentrations of SD, the more cell apoptosis there were. From Western blot, it could be seen that after adding SD into HUVECs the activation of Caspase-3, 7, 9 and PARP rose. Z-DEVD-FMK could inhibit the effect of SD at a dose of 0.15 mg/mL on the activation of PARP. **Conclusion:** SD could induce HUVEC apoptosis through the activation of Caspase Proteinases.

Key words: Sodium Deoxycholate; Human Umbilical Vein Endothelial Cell; Apoptosis; Caspase Proteinases

Chinese Library Classification (CLC): R-33; Q591.5; R329.2+6 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)10-1810-05

前言

脱氧胆酸钠(SD)作为一种具有双极性特点的次级胆汁酸,经常被用作许多药物(如磷脂酰胆碱、两性霉素 B 等)的溶剂以便增加这些药物的水溶性^[1]。尤其是近些年,以 SD 为溶剂的磷脂酰胆碱作为局部溶脂药在整形美容领域掀起了一股潮流,尽管其尚未被国内及国外大多数权威机构认可,主要因为该溶脂药的作用具有非特异选择性,可对血管、肌肉等造成损伤^[2]。国内外众多学者对这类混合药物的作用机制进行了大

量研究,现在更多的研究发现该溶脂药物中发挥溶脂作用的主要成分并非磷脂酰胆碱而是脱氧胆酸钠^[3]。随后许多对单纯 SD 的溶脂作用研究亦与这一观点一致,但研究中同时也发现了 SD 对血管等的损伤作用^[4]。为了了解 SD 对血管内皮细胞的损伤机制并为今后防止其对血管的损伤提供可能,拟通过体外实验观察脱氧胆酸钠(SD)对体外培养的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)增殖与凋亡的影响。

1 材料与方法

* 基金项目:上海市科委科研计划项目(11DZ1921408)

作者简介:张肖霄(1989-),硕士研究生,主要研究方向:组织移植与体表器官再造,E-mail: lanpue@foxmail.com

Δ 通讯作者:朱晓海,博士,副主任医师,主要研究方向:组织移植与体表器官再造,E-mail: zhuxiaohai@hotmail.com

(收稿日期:2016-10-19 接受日期:2016-11-06)

1.1 实验材料

人脐静脉内皮细胞(HUVEC)由上海第二军医大学转化中心提供;PBS、胰酶、DMEM 培养基、血清(FBS)购自美国 Hyclone 公司;Z-DEVD-FMK 购自 ApexBio 公司;Tunnel 试剂盒购自碧云天生物技术公司;枪头购自 Axygen 公司;离心管、吸管、培养瓶、培养皿购自康宁公司;双抗(青霉素、链霉素)、脱氧胆酸钠、吡啶美辛、地塞米松、异丁基-1-甲基黄嘌呤购自美仑生物;Caspase-3、7、9 及 PARP 抗体购自 Abcam 公司;胰岛素购自 Solarbio。

1.2 人脐静脉内皮细胞株的培养与传代

HUVEC 由上海第二军医大学转化中心提供。将 HUVEC 培养于含 600 mg/mL 葡萄糖的 DME 加 10%胎牛血清、100 mg/L 链霉素、100 kU/L 青霉素的培养液中,并置于 37℃、体积分数 5%CO₂ 的培养箱培养。细胞贴壁约 80%时,用 EDTA 的胰酶消化,进行传代。待细胞长至对数生长期后进行后续实验。

1.3 不同时间点、不同浓度 SD 处理后用 CCK-8 进行细胞存活率测定

HUVEC 内皮细胞正常传代 2 次后,消化细胞,铺板。消化细胞:PBS 洗两遍,加入胰酶 1 mL,用培养液终止后,离心 1000 rpm× 5 min。铺板:铺三块 96 孔板,细胞每孔铺 4000-5000 个,放入 37℃的 CO₂ 孵箱 24 h。加药:按浓度梯度 0、0.015 mg/mL、0.05 mg/mL、0.15 mg/mL、0.5 mg/mL、1.0 mg/mL 加入药物,每个梯度取 5 复孔,加药后置于 37℃75%的 CO₂ 孵箱培养。按时间点 1,2,4,6,8,12(h)终止孵育,加入 CCK8(每 100 μL 培养上清加入 10 μLCCK8),避光,37℃75%的 CO₂ 孵箱培养。45 min 后置于酶标仪读值。读值 OD 为 450 nm。

1.4 TUNEL 法检测细胞凋亡

具体操作按试剂盒说明书步骤进行。取对数生长期的 HUVEC,稀释成 1×10⁴/mL,接种于含无菌盖玻片的 6 孔培养板,待细胞贴壁后,实验组加入终浓度分别为 0、0.015 mg/mL、0.05 mg/mL、0.15 mg/mL、0.5 mg/mL、1.0 mg/mL 的 SD,对照组不加 SD,4 h 后用 TUNEL 法检测细胞凋亡;加入终浓度为

0.15 mg/mL 的 SD 组分别在药物作用 4、6h 后用 TUNEL 法检测细胞凋亡;提前 1h 加入 10 μmol/L Caspase-3 抑制剂 Z-DEVD-FMK 后再加入终浓度为 0.15 mg/mL 的 SD 分别作用 4、6h 后进行 TUNEL 法检测细胞凋亡。

1.5 Western blot 检测 Caspase 蛋白酶及 PARP 表达与活化

加入终浓度为 0.15 mg/mL 的 SD 处理细胞 4、8、12 h 后,收集细胞,加入蛋白裂解液吹打混匀,按照试剂盒说明提取细胞总蛋白,蛋白浓度用 Bradford 法测定,取 50 μg 蛋白行 12.5%聚丙烯酰胺凝胶电泳,将蛋白转至硝酸纤维素膜,5%脱脂奶粉室温阻断 2 h,分别加入相应抗体孵育过夜,滤膜经缓冲液清洗 3 次后分别再与二抗室温下孵育 1 h;Odyssey 双色红外荧光扫描成像系统法显影、曝光。提前 1 h 加入 Caspase-3 抑制剂 Z-DEVD-FMK 后再加入终浓度为 0.15 mg/mL 的 SD,分别作用 4、12 h 后重复上述步骤,检测 PARP 表达、活化情况。

1.6 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件包进行分析。计量资料,在方差齐性的基础上应用单因素方差分析,P<0.05 提示差异具有统计学意义。Western blot 灰度值用 Image J 软件测量。

2 结果

2.1 SD 作用后 HUVEC 细胞活力下降

如图 1,在同一作用时间下(4 h),随着 SD 浓度逐渐增加,HUVEC 的细胞活力亦随之降低;当 SD 浓度为 0.015 mg/mL 时细胞活力无明显改变,浓度为 0.15 mg/mL 时细胞活力为 80%,浓度为 1 mg/mL 时细胞活力明显降低,不足 10%。同一浓度下(0.15 mg/mL)随时间增加细胞活力进行性降低,4 h 时活力降低已较明显,12 h 时细胞活力不及一半,除 SD 浓度为 0.015 mg/mL 作用 4 h 及 0.15 mg/mL 作用 1、2h 组差异无统计学意义外,其余各组差异具有统计学意义(P<0.05)。由于不同浓度的 SD 作用于 HUVEC 后引起其细胞活力降低,为明确是否有凋亡机制参与 HUVEC 活力的降低,进一步选择作用较明显的浓度为 0.15 mg/mL 的 SD 进行后续凋亡检测。

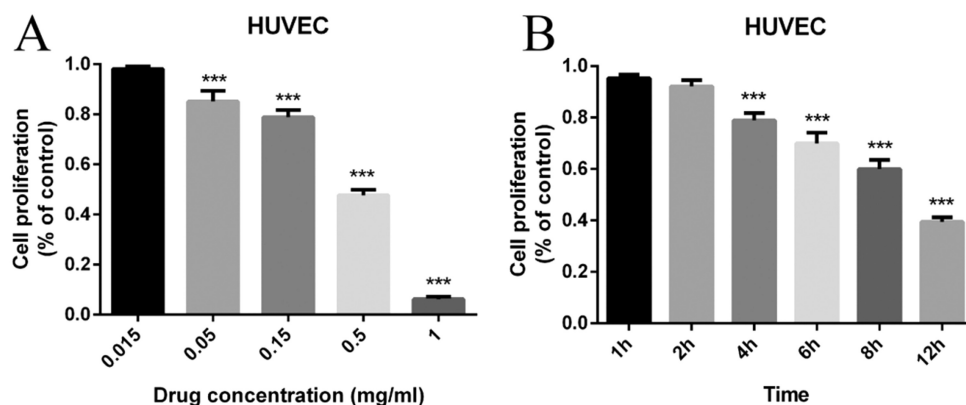


图 1A:不同浓度 SD 作用后 HUVEC 细胞存活率 B:0.15 mg/mL SD 作用后 HUVEC 细胞存活率

Fig.1 A:Cell proliferation of HUVEC acted by different concentrations of SD B: Cell proliferation of HUVEC acted by 0.15 mg/mL SD

Note: Compared with control group, ***P<0.05.

2.2 TUNEL 检测显示 SD 作用于 HUVEC 后其细胞凋亡增加

荧光显微镜下观察,细胞核中有绿色高亮着染者为凋亡细胞。

对照组几乎无凋亡细胞;实验组随 SD 浓度增加(0.05 mg/mL-0.5 mg/mL)高亮程度加深,凋亡细胞增多(图 2);且加

入 Caspase-3 抑制剂 Z-DEVD-FMK 后,0.15 mg/mL SD 作用于 HUVEC4h 产生的细胞凋亡比未加抑制剂时明显减少 (图 3 A 和 B)。

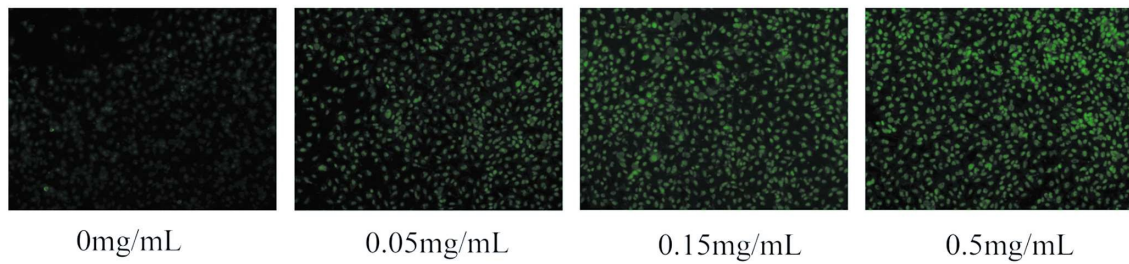


图 2 不同浓度 SD 作用于 HUVEC 后细胞凋亡检测

Fig.2 Detection of HUVEC apoptosis after being acted on by different concentrations of SD

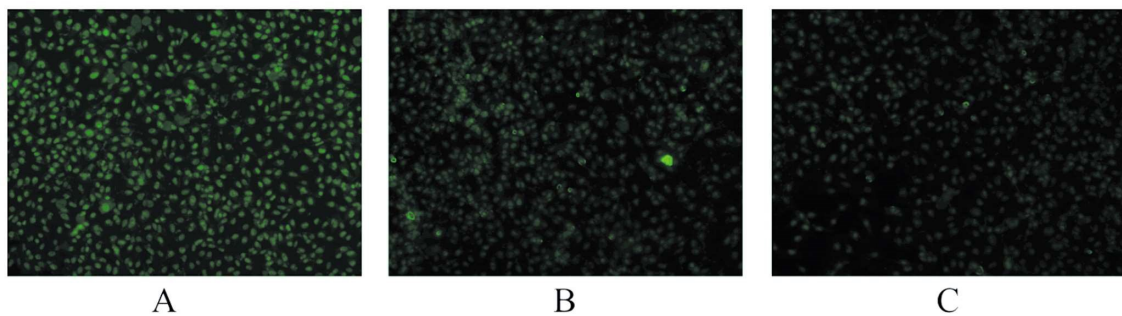


图 3 Z-DEVD-FMK 联合 SD 对 HUVEC 凋亡的影响

Fig.3 Effect of Z-DEVD-FMK and SD on HUVEC apoptosis

注:A:0.15 mg/mL 的 SD 作用 4h; B Z-DEVD-FMK+0.15 mg/mL SD 作用 4 h; C Z-DEVD-FMK+0.15 mg/mL SD 作用 6 h

Note: A 4 h after the effect of 0.15 mg/mL SD on HUVEC; B 4 h after the effect of 0.15 mg/mL SD associated with Z-DEVD-FMK on HUVEC;

C 6 h after the effect of 0.15 mg/mL SD associated with Z-DEVD-FMK on HUVEC

2.3 Western blot 结果示 SD 可导致 HUVEC 细胞凋亡增加

与对照组相比,终浓度为 0.15 mg/mL 的 SD 处理细胞 4 h、8 h、12 h 后 Cleaved-Caspase3、7、9 及 Cleaved-PARP 均明显增多,且随着时间推移其活化量随之增加(图 4);然而,提前 1 h 加入 10 μ mol/L 的 Caspase-3 抑制剂 Z-DEVD-FMK 再加入 0.15 mg/mL 的 SD 处理 HUVEC 4 h 及 12 h 后,与不加该抑制剂(4 h(—)及 12 h(—))相比,其 PARP 的活化减少(图 4 D),说明 Caspase-3 活化减少。由此推测 SD 通过活化 Caspase-3 途径介导了 HUVEC 的细胞凋亡。

3 讨论

现代生活中各种原因引起的全身或局部脂肪堆积(全身性或局部肥胖、眼袋等),不同程度地影响了人们外形的美观,因此各种溶脂方法相继出现以解决这一难题。到目前为止采用的溶脂手段包括脂肪抽吸术及一些微创方法,如超声溶脂、激光溶脂、静脉溶脂等,但因超声及激光溶脂对局部组织具有不同程度热损伤作用,静脉溶脂可能引起一些全身性反应,故这些微创方法并未得到广泛普及^[4]。脂肪抽吸术仍是临床上解决脂肪堆积尤其局部脂肪堆积较为理想的方法^[5]。尽管如此,脂肪抽吸术作为一种有创手术仍然可能会带来术后疼痛、肿胀、淤青、感染甚至脂肪栓塞等并发症。因此,损伤更小的微创溶脂依然备受整形外科医生及患者的青睐。近几十年,注射溶脂(中胚层疗法中的一种)首先在欧美等国家出现^[6],随后开始传入国内。

1952 年 Pistor^[7]首次提出将中胚层疗法作为使药物传输至体内的新型手段。具体地说,中胚层疗法是将不同的药物进行配制后注射到人体局部的皮下,达到治疗目的的一种医疗技术^[8]。多年来,中胚层疗法已被广泛应用于慢性疼痛、脂肪栓塞、高脂血症、血管炎、淋巴水肿、秃发、牛皮癣、人体外形塑造等^[9-15]。而中胚层疗法的注射药物中最受关注的当属脂肪溶解性药物,如磷脂酰胆碱、脱氧胆酸钠等。据报道,1988 年有人将磷脂酰胆碱通过这一注射方法用于治疗睑黄瘤^[16]。巴西一位名叫 Patricia Rittes 的皮肤科专家首次报道了运用磷脂酰胆碱治疗眶下脂肪堆积和其他局部脂肪堆积^[17,18]。当磷脂酰胆碱作为溶脂药物时需溶解在一定溶剂中以便增加其水溶性,发挥溶脂作用,最常用的溶剂是脱氧胆酸钠。然而,近来越来越多的研究发现,脱氧胆酸钠单独作用亦可导致脂肪溶解^[19],甚至发现溶脂药物混合制剂中脱氧胆酸钠才是主要的溶脂成分^[3]。

相对于传统的手术抽脂方法,注射溶脂因其创伤小、操作简单、恢复较快等特点更为患者及术者所接受^[20]。然而,目前常用的溶脂药,无论磷脂酰胆碱还是脱氧胆酸钠,虽然溶脂效果较确切^[21],但其对周围其他组织(血管、肌肉、皮肤等)亦具有损伤作用^[22],这就限制了这类药物在整形美容领域的应用。近年来,亦有一些研究发现只要正确掌握注射层次,脱氧胆酸钠这类溶脂药对肌肉层及皮肤的损伤作用就会得到抑制,但其对血管的损伤仍然存在。如果能探明脱氧胆酸钠对血管内皮细胞损伤的机制,就能有针对性的阻断或减轻其对血管内皮细胞的

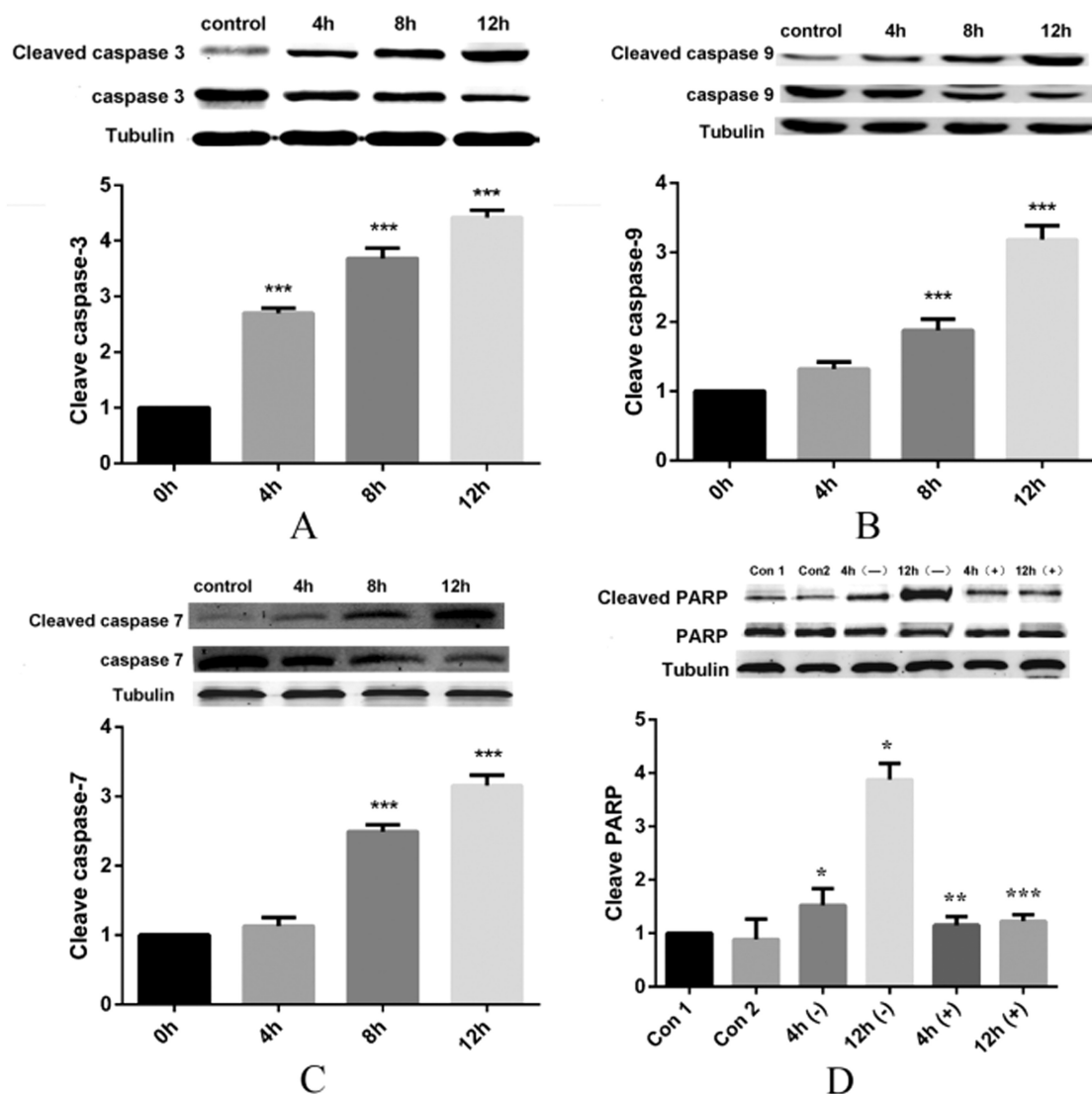


图 40.15 mg/mLSD 处理 HUVEC 后各 Caspase 蛋白酶活化情况以及 Z-DEVD-FMK 对 SD 所致 PARP 活化的影响

Fig. 4 Activation of Caspase Proteinases after being acted on by 0.15 mg/mLSD and the effect of Z-DEVD-FMK on activation of PARP

Note: Compared with control groups, *** $P < 0.05$ in panel A, B, C, * $P < 0.05$ in panel D; in panel D, compared with the groups not added with Z-DEVD-FMK, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.05$.

损伤,进而减少脱氧胆酸钠溶脂时出现局部淤血、组织缺血坏死等可能性,为其在溶脂方面的应用有利地解决一大障碍。若可解决脱氧胆酸钠对血管的损伤作用,将来还可将脱氧胆酸钠运用制备超薄皮瓣,而不会因血运问题而导致皮瓣无法存活,这可作为今后研究的方向。

本实验通过体外实验观察了脱氧胆酸钠(SD)对体外培养的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)增殖与凋亡的影响,试图了解SD对血管内皮细胞损伤的具体机制。研究发现,脱氧胆酸钠(SD)作用于HUVEC后可引起细胞活力降低,且随SD浓度及作用时间增加,细胞活力随之降低,而SD引起HUVEC活力的降低可能由于细胞增殖减少或凋亡增加等。为验证SD导致HUVEC活力降低的机制中是否有细胞凋亡的参与,本实验进一步采用了Tunel及Western Blot检测。Tunel检测发现浓度为0.05 mg/mL、0.15 mg/mL和0.5 mg/mL的SD作用于HUVEC后细胞凋亡明显较对照组增加,且浓度越高凋亡越明显;相同药物浓度和作用时间下,Caspase-3抑制剂可以明显减少细胞

凋亡,说明SD可使HUVEC发生凋亡。根据CCK8检测结果选取了SD作用效果较明显的浓度(0.15 mg/mL)及作用时间(4h)进行Western Blot检查选择0.15 mg/mL的浓度作用4h后检测凋亡相关蛋白如Caspase-3、7、9及PARP,发现均活化(Cleaved-Caspase-3、7、9及PARP)增加(图4);而不加抑制剂组相比,提前加入Caspase-3抑制剂Z-DEVD-FMK后再加0.15 mg/mLSD分别作用4、12h明显抑制了脱氧胆酸钠诱导的PARP的活化(图4D)。

Caspase家族与真核细胞凋亡密切相关,并参与细胞的生长、分化与凋亡调节。Caspase家族已经被鉴定有14种类型,在其介导的凋亡过程中,Caspase-3是最重要的效应蛋白酶之一。在正常的细胞内,每一种Caspase都是以非活性状态存在的,凋亡刺激因素作用于细胞后通过激活上游Caspase分子,如Caspase-9,进而激活Caspase-3,活化后的Caspase-3可剪切下游分子使其活化,并最终启动凋亡过程。Caspase-3最主要的底物是多聚(ADP-核糖)聚合酶PARP(poly(ADP-ribose) poly-

merase),该酶与DNA修复、基因完整性监护有关。本实验中用不同浓度的SD作用于HUVEC后发现均引起HUVEC细胞活力降低;TUNEL免疫荧光检测显示与对照组相比,实验组HUVEC凋亡明显,且随药物浓度及作用时间增加,凋亡细胞增多;Western blot检测示Caspase-3、7、9及PARP活化增加进一步证实了细胞凋亡的存在,且这种凋亡作用可以被Caspase-3抑制剂Z-DEVD-FMK所抑制。因此,本实验证实了脱氧胆酸钠(SD)可通过Caspase-3途径诱导人脐静脉内皮细胞凋亡。

不足之处是,此次研究并未深入探讨Caspase信号通路在脱氧胆酸钠(SD)诱导人脐静脉内皮细胞凋亡的一系列级联反应,本实验也未排除尚存在其他途径介导的HUVEC凋亡以及SD通过其他途径导致HUVEC死亡的机制,这都有待进一步研究。

4 结论

脱氧胆酸钠(SD)对人脐静脉内皮细胞具有损伤作用,其中一种损伤机制是通过Caspase-3途径诱导人脐静脉内皮细胞凋亡。

参考文献(References)

- [1] AGupta, CLobocki, SSingh, et al. Actions and Comparative Efficacy of Phosphatidylcholine Formulation and Isolated Sodium Deoxycholate for Different Cell Types [J]. Aesth Plast Surg, 2009, 33 (3): 346-352
- [2] Rotunda AM, Kolodney MS. Mesotherapy and phosphatidylcholine injections: Historical clarification and review [J]. Dermatol Surg, 2006, 32: 465-480
- [3] Rotunda AM, Suzuki H, Moy RL, et al. Detergent Effects of Sodium Deoxycholate Are A Major Feature of An Injectable Phosphatidylcholine Formulation Used for Localized Fat Dissolution [J]. Dermatol Surg, 2004, 30: 1001-1008
- [4] 袁继龙, 秦宏智, 王莉波, 等. 微创溶脂术在美容外科的应用及进展 [J]. 中国美容整形外科杂志, 2008, 19(4): 285-290
Yuan Ji-long, Qin Hong-zhi, Wang Li-bo, et al. The application and development of minimally invasive lipolysis in esthetic surgery [J]. Chin J Aesth Plast Surg, 2008, 19(4): 285-290
- [5] Heymsfield S B, Greenberg A S, Fujioka K, et al. Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial [J]. JAMA, 1999, 282(16): 1568-1575
- [6] 高景衡. 注射溶脂 [J]. 中国美容整形外科杂志, 2009, 20(12): 768
- Gao Jing-heng. Injective lipolysis [J]. Clin J Aesth Plast Surg, 2009, 20 (12): 768
- [7] Pistor M. What is mesotherapy [J]. Chir Dent Fr, 1976, 46: 59-60
- [8] 王伟. 中胚层疗法 [J]. 中国美容整形外科杂志, 2007, 18(3): 161-162
Wang Wei. Mesotherapy [J]. Clin J Aesth Plast Surg, 2007, 18 (3): 161-162
- [9] De Beir J, Bazon H. On the subject of mesotherapy [J]. Chir Dent Fr, 1984, 54: 27-28
- [10] Gallo R. Mesotherapy in phlebology [J]. Phlebologie, 1980, 33: 53-156
- [11] Menkes CJ, Laoussadi S, Kac-Ohana N, et al. Controlled trial of injectable diclofenac in mesotherapy for the treatment of tendonitis [J]. Rev Rhum Mal Osteoartic, 1990, 57: 589-591
- [12] Hexsel D, Serra M, Mazzucco R, et al. Phosphatidylcholine in the treatment of localized fat [J]. Drugs Dermatol, 2003, 2: 511-518
- [13] Young VL. Lipostabil: the effect of phosphatidylcholine on subcutaneous fat [J]. Aesthet Surg J, 2003, 23: 413-417
- [14] Bauman LS. Phosphatidylcholine [J]. Skin Allergy News, 2003, 34: 24
- [15] Nattermann International GMBH (1990) Lipostabil [P]. Nattermann International, Cologne, Germany, p 9
- [16] Maggiori S. Treatment of xanthelasma with phosphatidylcholine [R]. Fifth international meeting of mesotherapy, 2003, Paris, France
- [17] Rittes PG. The use of phosphatidylcholine for correction of lower lid bulging due to prominent fat pads [J]. Dermatol Surg, 2001, 27: 391-392
- [18] Rittes PG. The use of phosphatidylcholine for correction of localized fat deposits [J]. Aesth Plast Surg, 2003, 27: 315-318
- [19] Rotunda AM, Suzuki H, Moy RL, et al. Detergent effects of sodium deoxycholate are a major feature of an injectable phosphatidylcholine formulation used for localized fat dissolution [J]. Dermatol Surg, 2004, 30: 1001-1008
- [20] Diane Duncan, Adam M. Rotunda. Injectable Therapies for Localized Fat Loss: State of the Art [J]. Clin Plastic Surg, 2011, 38: 489-501
- [21] 李瑞珊, 柳大烈. 卵磷脂在脂肪细胞溶解方面的研究进展 [J]. 中国美容整形外科杂志, 2009, 20(4): 239-241
Li Rui-shan, Liu Da-lie. The Research Progress of Phosphatidylcholine in the Aspect of Adipocytes Dissolution [J]. Chin J Aesth Plast Surg, 2009, 20(4): 239-241
- [22] Diane Irvine Duncan, Mark Palmer. Fat Reduction Using Phosphatidylcholine/Sodium Deoxycholate Injections: Standard of Practice [J]. Aesth Plast Surg, 2008, 32: 858-872