

脂肪干细胞复合富血小板血浆对脂肪颗粒移植的影响*

李 昆^{1,2}, 李 锋^{1,2}, 郭丽娟^{1,2}, 李 杰^{1,3}, 黄 科^{1,2}, 郭维华¹, 田卫东^{1,2,△}

1. 四川大学 口腔疾病研究国家重点实验室(成都 610041); 2. 四川大学华西口腔医院 创伤与整形外科(成都 610041);
3. 四川大学 生命科学院(成都 610064)

【摘要】 目的 探讨运用组织工程技术构建的组织工程脂肪对颗粒脂肪移植的影响。方法 通过酶消化法获取脂肪干细胞(ASCs),采用两步离心法制备富血小板血浆(PRP),运用组织工程技术构建组织工程脂肪。根据移植物的组成不同分为 ASCs + PRP + 脂肪颗粒、PRP + 脂肪颗粒、ASCs + 脂肪颗粒及对照组(PBS + 脂肪颗粒),分别移植入裸鼠皮下,并于移植后 10 d、30 d、60 d 及 90 d 取出移植体,进行大体观察及体积测量,镜下观察组织结构变化。结果 90 d 后 ASCs + PRP + 脂肪颗粒组移植物质地柔软、颜色淡黄,较其它组别更接近于正常的脂肪组织,且具有更多的存活体积($P < 0.05$)及更好的组织学形态。结论 运用 ASCs 与 PRP 复合脂肪颗粒能够成功构建组织工程脂肪,是一种新的安全有效的修复颌面部及全身软组织缺损方法,具有较高的应用前景。

【关键词】 脂肪移植 富血小板血浆 脂肪干细胞

Increased Survival of Free Fat Grafts with Adipose-derived Stem Cells and Platelet-rich Plasma in Nude Mice LI Kun^{1,2}, LI Feng^{1,2}, GUO Li-juan^{1,2}, LI Jie^{1,3}, HUANG Ke^{1,2}, GUO Wei-hua¹, TIAN Wei-dong^{1,2,△}. 1. State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, West China Stomatological Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China

△ Corresponding author, E-mail: drtwd@sina.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the impact of combined adipose-derived stem cells (ASCs) and platelet-rich plasma (PRP) on the survival of transplanted fat. **Methods** The ASCs were isolated and cultured from fat tissues by enzyme digestion; and the PRP was prepared by two-step ultracentrifugation. The grafts of fat granules were divided into test groups (ASCs + PRP + fat granules, PRP + fat granules, ASCs + fat granules) and control groups (PBS + fat granules). The grafts were injected into the left and right dorsal subcutaneous areas of nude mice. General observations, volume measurements and microscope examinations were conducted 10 d, 30 d, 60 d and 90 d after transplantation. **Results** The grafts of the mice in the ASCs + PRP group showed soft structure, with light yellow color and closer to normal adipose tissue compared with those in other groups. Greater survival volumes ($P < 0.05$) and better histology were also observed in the grafts of the mice in the ASCs + PRP group. **Conclusion** The fat grafts consisting of PRP and ASCs constitute an ideal transplant strategy, which could provide a valuable and needed tool in plastic and reconstructive surgery.

【Key words】 Fat transfer Platelet-rich plasma Adipose-derived stem cells

颌面部及全身软组织缺损常见的原因有创伤、肿瘤切除、先天性发育畸形等,如何修复是我们所面临的重大难题之一^[1]。目前临床上修复软组织缺损常用方法有各种自体组织移植和人工合成生物材料植入。生物材料可塑性较好,但价格昂贵、易出现免疫排斥反应,自体组织移植虽然无免疫排斥,但会造成二次损伤及继发畸形。自体脂肪作为一种常用的软组织填充材料,具有取材方便、来源丰富、费用低廉、无免疫排斥等优点,已备受口腔颌面外科、修复

重建外科及整形等领域的关注^[2]。但难以预测的较高吸收率仍然是其最大的缺陷,严重的阻碍了该方法的临床应用。

脂肪干细胞(ASCs)作为组织工程种子细胞具有获取方便、创伤小、细胞量大、较强的成脂分化潜能等优点^[3]。脂肪组织已经被大家公认为一种内分泌器官,能够分泌一系列的脂肪素,如脂联素(adiponectin)、瘦素(leptin)等。这些细胞因子对于脂肪移植早期阶段建立血供具有重要的作用,同时也能够促进脂肪再生,有效的降低移植脂肪的远期吸收率^[4,5]。富血小板血浆(PRP)在凝血酶的作用下能够释放多种细胞因子及形成十分精细的纤维蛋

* 国家自然科学基金项目(No. 30973348)和国家“973”重大基础研究前期研究专项(No. 2006CB708505) 资助

△ 通讯作者, E-mail: drtwd@sina.com

白网状结构,具有较强的可塑性,能够黏附细胞及细胞因子等优点,在临床上得到了广泛应用^[6]。

因此,结合上述各组分优点,本实验拟使用脂肪颗粒、PRP及ASCs构建组织工程脂肪,从而提高颗粒脂肪移植物的存活。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

α -MEM培养基(Hyclone,美国)、I型胶原酶(Sigma,美国)、磷酸盐缓冲溶液(PBS, Sigma)、胎牛血清(FBS, Sigma)、人淋巴细胞分离液(GE,美国)、凝血酶冻干粉(迪龙制药有限公司)。

1.2 实验动物

4周龄裸鼠共16只,雌雄不限,由四川大学动物实验中心提供。裸鼠按照取材时间(10 d、30 d、60 d、90 d)随机分为4组,在每只裸鼠的背部均移植入实验组和对照组,共四个植入点。

1.3 ASCs的分离与培养

采用酶消化法获取ASCs。术中获取9岁烧伤患者植皮手术中的皮下脂肪(获家属知情同意),浸于培养基中,于超净工作台内,用含有2%双抗(青霉素100 U/mL、链霉素100 μ g/mL)的PBS冲洗3次,使用眼科剪将取得的脂肪组织充分剪碎,在剪碎的脂肪组织中加入等体积的1% I型胶原酶,充分混匀后于37 $^{\circ}$ C恒温摇床振荡消化40 min,1300 r/min离心5 min,去除上层的脂质及酶消化液,将离心管底部的细胞用 α -MEM培养基(含10% FBS, 1%双抗)重悬,并接种于培养瓶内,置于37 $^{\circ}$ C、饱和湿度、5%CO₂的孵箱内,4 d后换液,倒置相差显微镜下观察细胞的生长状况。待细胞长满80%时,0.25%胰酶消化、传代。传代后的细胞每3 d更换一次 α -MEM培养基(含10% FBS, 1%双抗)于37 $^{\circ}$ C、饱和湿度、5%CO₂的孵箱中培养。

1.4 PRP的制备

PRP的制备要求严格无菌,本实验采用改良两步离心法制备。首先,将采集的血液离心(1000 r/min、10 min),收集离心后的上层血浆成分,备用。将剩下的血液用PBS按照1:1的比例稀释,稀释后的血液缓慢加入含有1份比例淋巴细胞分离液的离心管内,使其分为上、下两层。离心管在400 \times g的条件下离心20 min,可见离心管内的液体分为4层,自上至下为:血浆层、单个核细胞层、淋巴细胞分离液层及红细胞层。使用移液枪小心吸取单个核细胞层,用PBS洗两次(1500 r/min、10 min),最后用

之前提取的血浆按照5 mL全血制备1 mL PRP的比例进行重悬,吹打混匀,即为制备得的PRP。

1.5 脂肪颗粒的制备

与ASCs的分离培养相同,取9岁烧伤病人准备植皮的皮下脂肪,在PBS冲洗3次之后,使用眼科剪去除肉眼可见的血管和结缔组织,将剪下的脂肪组织充分剪碎,使用1.2 mm针管抽吸脂肪颗粒,将抽吸出来的颗粒置于细胞筛内,PBS水洗2次,去除油脂。将脂肪颗粒置于离心管内,1000 r/min离心5 min,再次去除表面油脂,再次用针筒吸取,并分装,每个EP管0.2 mL。将EP管置于4 $^{\circ}$ C冰箱内保存,待体内移植使用。

1.6 实验分组及裸鼠皮下移植

根据移植物的不同,分为4组:ASCs+PRP组[0.1 mL PRP+ASCs(10^5 个)+0.2 mL脂肪颗粒];PRP组(0.1 mL PRP+0.2 mL脂肪颗粒);ASCs组[0.1 mL PBS+ASCs(10^5 个)+0.2 mL脂肪颗粒];对照组(0.1 mL PBS+0.2 mL脂肪颗粒)。将复合物与人凝血酶溶液按照体积比为6:1进行充分混合,在凝固前,使用皮试针加1.2 mm直径针尖抽取0.3 mL复合物,每只裸鼠均移植4种移植物。

1.7 移植物大体观察及体积测量

16只裸鼠分别于移植后10 d、30 d、60 d、90 d取出移植物,每个时间点4只,切开背部皮肤游离出移植物,大体观察移植物的体积、颜色、质地并记录。将移植物取出后,采用排水法精确记录移植物体积,测量体积后,采用100 g/L多聚甲醛固定移植物2 d,常规石蜡包埋,切片。

1.8 组织结构观察

石蜡切片行常规HE染色,观察组织结构形态,每个组别取10个镜下视野,统计其血管数量。

1.9 统计学方法

数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间采用 χ^2 检验,两组间采用 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ASCs的分离与培养

取下的皮下脂肪,采用酶消化法分离培养(图1),3 d左右可见部分细胞开始贴壁,原代细胞生长至第10 d时可见细胞长满至80%,获得的细胞呈成纤维细胞样梭形,细胞形态较均匀,胞核胞质明显。传代的细胞增殖速度快,成旋涡状排列,一般3 d使用胰酶消化传代一次。

2.2 PRP 的制备

第一次离心后能够获得清晰的四层结构(图 2A),吸取中间的血小板,然后再次重悬,可以得到我们所需要的 PRP。新鲜制备的高纯度 PRP 为淡

黄色液体(图 2B),加入凝血酶之后,1 min 之内可以凝固成果冻状胶体,具有较好的可塑性,色泽淡黄且透明,质地较脆(图 2C)。

2.3 体内移植实验

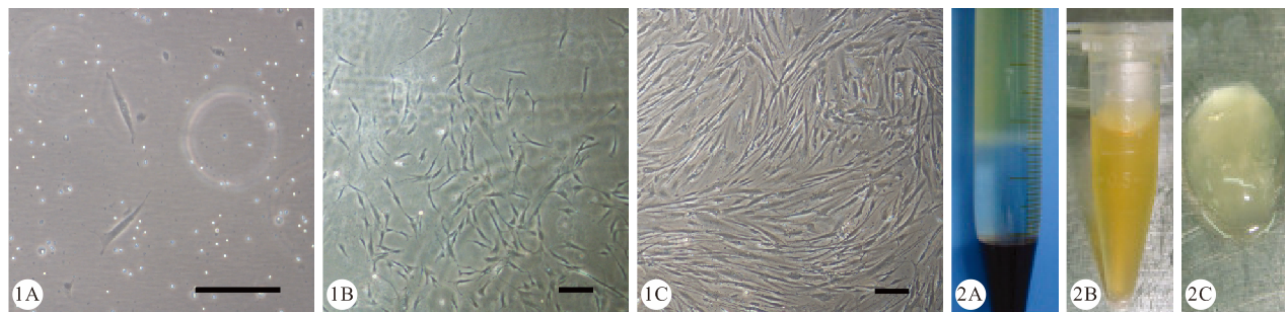


图 1 酶消化法培养脂肪干细胞

图 2 新鲜 PRP 及凝胶

Fig 1 ASCs were harvested by enzyme digestion (scale bar=50 μm)

Fig 2 Preparation of PRP

1A: ASCs assumed spindle shapes and a vortex-like arrangement under light microscopic examinations; 1B: The growth of ASCs at 7 days; 1C: The morphous and microstructure of ASCs at 10 days; 2A: The four phases observed after centrifuging; 2B: The fresh PRP; 2C: The gel structure of PRP

大体观察可见,移植第 10 d 时,各组移植物差别不大。90 d 后出现明显的差异,ASCs+PRP 组移植物周围血管更丰富,无分叶状,颜色更黄,质地柔软,内部无硬结,接近于正常的脂肪组织。PRP 组质地较硬,局部区域颜色发白,存在小的分叶;ASCs 组吸收较重,且局部可见坏死;对照组体积最小,部分脂肪组织已液化。总体比较,含有 PRP 的组别较不含 PRP 的对照组组织吸收较少,生长较好;含有 ASCs 的组别与不含 ASCs 的对照组比较,组织的颜色质地均较好。

2.4 各组移植物体积的比较

由图 3 可见,各组别的移植物随着时间的延长,体积不断减小,在 60 d 左右趋于稳定。移植物早期阶段,由于细胞大量增殖,细胞密度越大,其吸收率越低。在 60 d 时,体积吸收与脂肪再生趋于平衡,可见 ASCs+PRP 组吸收速度最慢,移植物存留体

积大于其他各组($P < 0.05$),且在远期观察中发现,有脂肪再生,脂肪组织体积有增长的迹象。

2.5 HE 染色结果

由图 4 可见,ASCs+PRP 组细胞维持较好的

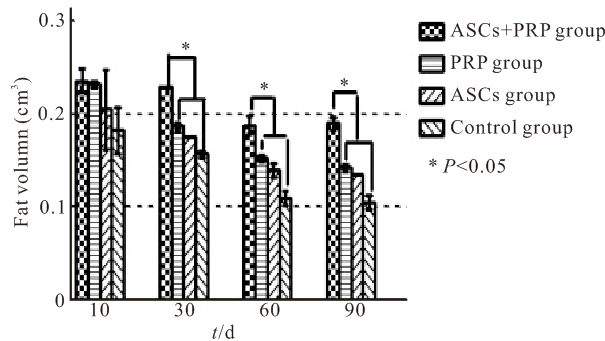


图 3 移植脂肪体积分析

Fig 3 Comparison of average retained fat volumn after 10, 30, 60, and 90 d

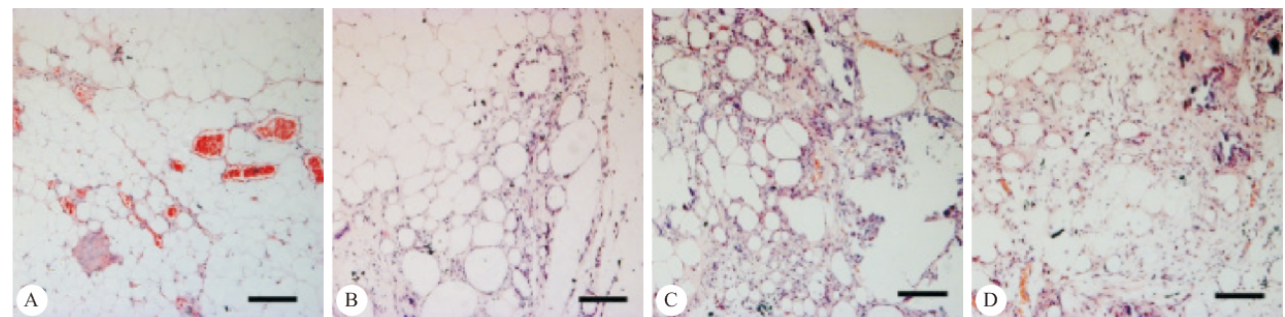


图 4 90 d 后 HE 染色结果分析

Fig 4 Histological analysis at 90 d after transplantation (scale bar=50 μm)

A: ASCs+PRP group; B: PRP group; C: ASCs group; D: Control group

形态,细胞间隙保持较好;PRP组早期无坏死形成,但在30d后即可见炎症细胞的浸润,60d左右可见坏死组织,细胞形态较差,有空泡形成。ASCs组及对照组90d后的组织结构较混乱,大量结缔组织及空泡形成,部分出现坏死,仅少量细胞能够维持正常的形态。在早期阶段,由于PRP的促血管生成作用,含PRP组别血管生成较多,60d后血管数量趋于稳定,在各个时间段,ASCs+PRP组别血管数量均较其它组别多,差异有统计学意义,见图5。

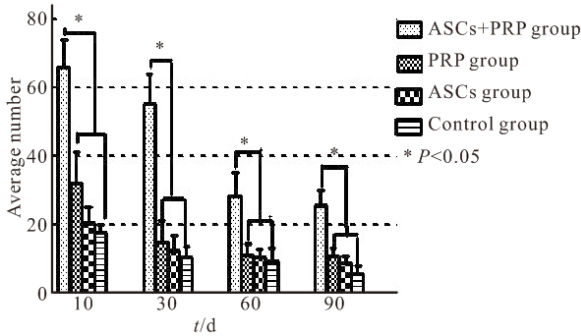


图5 移植血管数量比较

Fig 5 Comparison of average blood vessels in all groups after 10, 30, 60, and 90 d

3 讨论

国内外众多学者针对如何提高移植脂肪存活的问题,做了大量的体内及体外的研究,但仍然未取得满意的效果。移植脂肪吸收率较高,且获得组织的形态和功能都远不能和正常脂肪组织相比,其主要原因在于构建的组织工程化脂肪血管化不足、再生脂肪量较少,不能长期稳定存活^[7,8]。既往已有研究证明,移植脂肪早期丰富的血管化能够为其提供充足的营养,有效减少脂肪的吸收^[9,10]。因此,血管再生及脂肪再生是有效降低移植脂肪吸收的关键。

组织工程脂肪主要包括自体脂肪、支架材料及种子细胞。种子细胞必须具备以下特点:取材方便,细胞丰富,具有多向分化潜能,无免疫排斥^[2,11]。ASCs具有上述优点,且与胚胎干细胞相比,不存在伦理问题的争议,因此更适合选择ASCs作为组织工程种子细胞。

虽然PRP已在临床得到广泛应用,但是血液中成分比例变化较大、制备方法较多、温度等等因素,都严重的影响了其质量,无法对PRP进行标准化定量^[12,13]。本研究采用改良的两步离心法,有效的解决了PRP纯度及血小板回收率低的问题。选用人淋巴细胞分离液,其沉降系数在红细胞与血小板之

间,能够有效的分离两者,提高了PRP的纯度及血小板回收率。采用低速离心及自然降速,使分层明显且减少了血小板的破裂。本实验的结果表明,使用该方法制备的PRP,纯度及血小板回收率均大大提高。且PRP在促凝之后,能够有效的塑性,颜色质地也较好,能够保持凝胶状态较长时间,满足临床应用的需要。

脂肪移植后如何获得充足的组织灌流,为其提供氧和营养成分并排泄代谢产物,是其存活的关键因素。众多学者进行了大量的相关探索和研究。血管内皮生长因子(VEGF)是血管形成和脂肪形成调节过程中的一个关键因子^[14],Matsuda等考虑到网膜组织内含有丰富的血管及微血管内皮细胞,且网膜脂肪细胞高水平表达VEGF,设计实验将网膜颗粒移植至Wistar鼠的皮下,取材后证实移植过程中可观察到高水平的VEGF及VEGF mRNA的表达,为提高移植脂肪血管化提供了一种有效方法^[15]。PRP中丰富的血小板在激活后可以释放大量生长因子,包括:血小板衍生生长因子(PDGF)、转化生长因子- β (TGF- β)、VEGF、胰岛素样生长因子(IGF)等,不但能够促进脂肪细胞的增殖,同时促进移植组织内的血管增生及创伤修复。这进一步促进了移植脂肪组织的存活。

在降低脂肪吸收率、维持脂肪体积的同时,提高移植脂肪的质量也是一个关键的因素。早期阶段,由于供血较差移植入的脂肪组织处于缺血状态,未能存活的脂肪细胞逐渐坏死、液化,间质部分缓慢增生,常常会造成组织发生炎症反应,最终导致囊性病变及纤维化,移植物的生物性能、形态、质地均无法满足临床的需要,严重者甚至威胁患者生命安全。Shoshani等将具有加速血管形成并吸引炎症细胞和成纤维细胞的活性的IL-8应用于脂肪移植中,实验组结果显示囊泡形成明显少于对照组,表明应用IL-8能够降低炎症反应,提高脂肪移植的质量^[16]。本实验发现,复合ASCs及PRP的移植脂肪早期、远期阶段均能够保持一定的血管数量,提供充足的营养,使得大部分脂肪细胞和间质成分保持了原有的形态,故采用该方法能够获得正常组织结构的脂肪组织。

本研究将ASCs、PRP及脂肪颗粒三者结合构建移植脂肪,体内移植后发现此方法能够促进血管及脂肪再生,有效的控制脂肪的吸收,降低炎症反应的发生;为构建具有丰富血管及良好组织结构的组织工程脂肪提供了实验依据,也为临床提供了一种

操作简便、安全有效的移植方法。

参 考 文 献

- 1 Crandall DL, Hausman GJ, Kral JG. A review of the microcirculation of adipose tissue: anatomic, metabolic, and angiogenic perspectives. *Microcirculation*, 1997; 4(2): 211-232.
- 2 Ersek RA. Transplantation of purified autologous fat: a 3-year follow-up is disappointing. *Plast Reconstr Surg*, 1991; 87(2): 219-227.
- 3 Cherubino M, Marra KG. Adipose-derived stem cells for soft tissue reconstruction. *Regen Med*, 2009; 4(1): 109-117.
- 4 Crandall DL, Busler DE, McHendry-Rinde B, *et al.* Autocrine regulation of human preadipocyte migration by plasminogen activator inhibitor-1. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000; 85(7): 2609-2614.
- 5 Hausman GJ, Richardson RL. Adipose tissue angiogenesis. *J Anim Sci*, 2004; 82(3): 925-934.
- 6 Wu CC, Chen WH, Zao B, *et al.* Regenerative potentials of platelet-rich plasma enhanced by collagen in retrieving pro-inflammatory cytokine-inhibited chondrogenesis. *Biomaterials*, 2011; 32(25): 5847-5854.
- 7 Yoshimura K, Suga H, Eto H. Adipose-derived stem/progenitor cells: roles in adipose tissue remodeling and potential use for soft tissue augmentation. *Regen Med*, 2009; 4(2): 265-273.
- 8 Stosich MS, Moioli EK, Wu JK, *et al.* Bioengineering strategies to generate vascularized soft tissue grafts with sustained shape. *Methods*, 2009; 47(2): 116-121.
- 9 Butler DL, Goldstein SA, Guilak F. Functional tissue engineering: the role of biomechanics. *J Biomech Eng*, 2000; 122(6): 570-575.
- 10 Gomillion CT, Burg KJ. Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomaterials*, 2006; 27(36): 6052-6063.
- 11 Coleman WP. Autologous fat transplantation. *Plast Reconstr Surg*, 1991; 88(4): 736.
- 12 Robiony M, Zorzan E, Polini F, *et al.* Osteogenesis distraction and platelet-rich plasma: combined use in restoration of severe atrophic mandible. Long-term results. *Clin Oral Implants Res*, 2008; 19(11): 1202-1210.
- 13 Robiony M, Polini F, Costa F, *et al.* Osteogenesis distraction and platelet-rich plasma for bone restoration of the severely atrophic mandible: preliminary results. *J Oral Maxillofac Surg*, 2002; 60(6): 630-635.
- 14 Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, *et al.* Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. *Diabetes*, 2007; 56(6): 1517-1526.
- 15 Masuda T, Furue M, Matsuda T. Novel strategy for soft tissue augmentation based on transplantation of fragmented omentum and preadipocytes. *Tissue Eng*, 2004; 10(11-12): 1672-1683.
- 16 Shoshani O, Livne E, Armoni M, *et al.* The effect of interleukin-8 on the viability of injected adipose tissue in nude mice. *Plast Reconstr Surg*, 2005; 115(3): 853-859.

(2012-09-07 收稿, 2012-12-11 修回)

编辑 沈 进

本 刊 征 稿 启 事

《四川大学学报(医学版)》(原《华西医科大学学报》)是中文核心期刊,曾荣获全国优秀科技期刊一等奖、首届国家期刊奖提名奖、第二、三届国家期刊奖百种重点期刊、四川省十佳科技期刊称号和第一、二、三、四届中国高校精品科技期刊奖。本刊被美国《医学索引》(INDEX MEDICUS, IM/MEDLINE),《生物学文摘》(BIOLOGICAL ABSTRACTS, BA),《化学文摘》(CHEMICAL ABSTRACTS, CA),荷兰《医学文摘》(EXCERPTA MEDICA, EM),中国科技论文与引文数据库(CSTPCD),中国生物医学文献光盘数据库(CBMdisc),中文生物医学期刊文献数据库(CMCC),中国学术期刊网全文数据库(CNKI),中国学术期刊(光盘版),万方数据-数字化期刊群等数据库收录。

为了更好地开展国内外学术交流,促进医药卫生事业的发展,凡符合编辑部稿件要求(见每卷末期稿约),均可向本刊投稿。凡属于国家自然科学基金及其他部省级以上科研基金资助的来稿,编辑部将适当地给予优先。用英文撰写的稿件投稿时应附上中文稿。英文稿一经采用,刊出时间可提前。

本刊在线投稿网址: <http://scdx.cnjournals.com>

地址:四川省成都市人民南路三段17号四川大学学报(医学版)编辑部

邮政编码:610041

电话/传真:(028)85501320

E-mail: huaxib@sina.com

四川大学学报(医学版)编辑部