

脂肪干细胞结合碱性成纤维细胞生长因子辅助颗粒脂肪移植的实验研究

蒋爱梅¹⁾, 王艳梅¹⁾, 董毅龙²⁾, 段文晶¹⁾, 孙哲¹⁾, 冒青¹⁾, 李维炜¹⁾
(1) 昆明医科大学第一附属医院乳腺外科, 昆明 云南 650032; 2) 云南大学生命科学院, 云南 昆明 650091)

[摘要] **目的** 探讨脂肪间充质干细胞 (ASCs) 结合碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 辅助颗粒脂肪移植是否能提高移植脂肪存活率. **方法** 采集人颗粒脂肪及人脂肪间充质干细胞 ASCs 分离、培养、标记, 对照组以 ASCs 直接与同一患者颗粒脂肪混合. 实验组以 ASCs 加 bFGF 后与同一患者颗粒脂肪混合. 各组细胞颗粒脂肪混合物注射移植至裸鼠皮下, 6 周后检测脂肪形成, 形态学及分子生物学方法检测比较两组脂肪标本. **结果** 成功获得 ASCs 用于移植实验. 在实验组 (ASCs+bFGF+ 颗粒脂肪组) 及对照组 (ASCs+ 颗粒脂肪组) 均形成脂肪组织, 新生组织湿重实验组明显高于对照组 ($P < 0.01$). Western blot 检测结果显示实验组 VEGF, bFGF 表达均高于对照组. **结论** 脂肪间充质干细胞结合碱性成纤维细胞生长因子辅助颗粒脂肪移植, 通过改善脂肪间充质干细胞存活、增殖及移植组织血运, 提高了移植脂肪存活率.

[关键词] 脂肪干细胞; 碱性成纤维细胞生长因子; 颗粒脂肪移植

[中图分类号] R622.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2013) 04-0008-05

The Research of Adipose-derived Stem Cells-assisted Lipotransfer Combined with bFGF

JIANG Ai - mei¹⁾, WANG Yan - mei¹⁾, DONG Yi - long²⁾, DUAN Wen - jing¹⁾, SUN Zhe¹⁾, MAO Qing¹⁾,
LI Wei - wei¹⁾

(1) Dept. of Breast Surgery, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032; 2) School of Life Science, Yunnan University, Kunming Yunnan 650091, China)

[Abstract] **Objective** To investigate whether the survival rate of graft can be improved by adipose-derived stem cells-assisted lipotransfer combined with bFGF. **Methods** ASCs were freshly isolated and cultured from the aspirated fat and labeled by E-GFP. Mixture of ASCs, bFGF, and aspirated fat was injected under the back skin of nude mouse in experimental group while mixture of ASCs and aspirated fat in control group. Six weeks later, transplanted fat was harvested and forwarded to morphological examination and molecular biological examination. **Results** ASCs were cultured successfully and used in lipotransfer. Experimental group showed significantly higher weight and cell morphology ($P < 0.01$). Western blot showed a significantly higher expression of VEGF and bFGF protein in experimental group. **Conclusion** Adipose-derived stem cells-assisted lipotransfer combined with bFGF can enhance neovascularization, improve the viability of the transplantation cells, and eventually improve the survival of graft.

[Key words] ASC; bFGF; Cells-assisted lipotransfer

采用颗粒脂肪注射移植的方法, 几乎不留瘢痕. 对于部分受术者还可以达到体形雕塑的目的, 一举两得. 然而, 注射移植后部分脂肪颗粒坏死、硬结及钙化改移植存活率降低仍然是临床中待解

[基金项目] 云南省科技厅计划项目 (2009CD084)

[作者简介] 蒋爱梅 (1966~), 女, 云南丽江市人, 医学硕士, 主任医师, 主要从事组织移植临床工作.

[通讯作者] 王艳梅. E-mail: yaner6922@126.com

决的主要问题^[1,2]. 细胞辅助脂肪移植 (cell-assisted lipotransfer, CAL) 行软组织充填^[3]是近年来提出的新方法. 但移植术后2~3月, 移植术可能因为缺血再灌注损伤而需要更新, 吸脂术中的 ASCs 有限而不能满足需要更新细胞的数量需求, 致使术后6月发生移植脂肪萎缩而需再次重复移植. 碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 是最有效的血管生成因子之一, 作为一种广泛的生物活素, 它可促进血管生成, 使移植的脂肪血管化加速, 增加了脂肪移植后的成活. bFGF 还有明显的促分裂和增殖的作用, 对中胚层及外胚层的神经细胞有明显的促进增生的作用, 增加未成熟的新生脂肪细胞的数量, 使这些细胞增生成熟为大的脂肪细胞. 因此, 笔者的实验致力于促进 ASCs 存活与增殖, 创新性地提出脂肪干细胞结合碱性成纤维细胞生长因子辅助颗粒脂肪移植的实验研究. 以期通过增加新生脂肪细胞数量, 改善组织血运, 提高颗粒脂肪移植的远期效果, 为临床运用提供实验依据, 具有巨大的开发运用潜能.

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

胎牛血清, DMEM 高糖培养液 (美国 Gibco), 碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF, 美国 Sigma), 兔抗人 CD34, CD29, CD44, CD105, CD45 单克隆抗体 (英国 Abcam), 兔抗人碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF), 兔抗人血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和 β -actin (美国 Santa Cruz), 蛋白酶抑制剂复合物和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (美国 Pierce), ECL 发光液 (美国 Santa Cruz), 二步法免疫组化试剂盒 (北京中衫金桥), 基因转染试剂梭华 -SofastTM (厦门太阳马生物工程有限公司), RIPA 裂解液 (江苏碧云天), 增强绿色荧光蛋白质粒 EGFP 由北京协和医学院基础医学研究所左萍萍教授馈赠.

1.2 人颗粒脂肪采集及人脂肪间充质干细胞分离、培养

取得昆明医科大学第一附属医院因“脂肪堆积”需做吸脂术患者知情同意后, 按常规方法进行注射器脂肪抽吸术得到颗粒脂肪, 无菌盐水洗涤离心, 0.075% I 型胶原酶消化分离组织, 以 5×10^4 mL 细胞浓度接种于含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液, 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱

内培养. 倒置显微镜每日观察细胞生长状况, 细胞贴壁后每 2~3 d 更换 1 次培养液. 培养 7 d 后进行各项实验.

1.3 人脂肪间充质干细胞鉴定

免疫组织化学法检测 CD34, CD29, CD44, CD105, CD45 等干细胞标记物. 0.25% 胰酶消化贴壁细胞, 按 1×10^5 /mL 细胞浓度接种于置有盖玻片的 24 孔板中, 待细胞爬满至 80% 左右取出玻片, PBS 漂洗, 4% 多聚甲醛室温固定 60 min, PBS 漂洗; 依照试剂盒说明进行免疫组织化学染色观察. 兔抗人 CD34, CD29, CD44, CD105, CD45 单克隆抗体均以 1:100 稀释使用.

1.4 人脂肪间充质干细胞标记

转染增强绿色荧光蛋白质粒标记脂肪间充质干细胞. 0.25% 胰酶消化贴壁细胞, 按 1×10^5 /mL 细胞浓度接种 6 孔板中. GFP 质粒 (18 μ g 加 PBS 稀释至 600 μ L) 与梭华 -SofastTM 转染试剂 (30 μ L 加 PBS 稀释至 600 μ L) 均匀混合, 室温孵育 20 min. 200 μ L 梭华 -SofastTM/GFP 质粒复合物加到每孔中并轻轻摇动使均匀混合, 继续培养孵育 36 h 后, 于荧光显微镜下分析转染效率.

1.5 颗粒脂肪及 ASCs 移植

设置实验分组, 对照组: ASCs 直接与颗粒脂肪混合; 实验组: ASCs 加 bFGF 后与颗粒脂肪混合, 分别注射移植至 6 周龄裸鼠皮下, 每组 6 只. 对照组动物每只注射 1 mL 颗粒脂肪及由 4 mL 颗粒脂肪分离的 ASCs; 实验组动物注射 1 mL 颗粒脂肪及由 4 mL 颗粒脂肪分离的 ASCs 和 100 U bFGF. 移植 6 周后取材, 形态学及分子生物学检测比较各组形成的脂肪标本.

1.6 形态学观察

石蜡包埋组织, 10 μ m 连续超薄切片, H.E 染色观察细胞形态.

1.7 Western blot 检测 bFGF 和 VEGF 表达

RIPA 裂解提取总蛋白, SDS-PAGE 电泳, 将蛋白转到硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶室温封闭 60 min, bFGF (1:500), VEGF (1:500) 和 β -actin (1:2 000) 4℃ 孵育过夜, TBST 漂洗, 辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 室温反应 60 min, TBST 漂洗, ECL 增强发光液作用 1~3 min, Bio-rad 成像系统采集图像.

1.8 统计学分析

实验结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 统计软件进行 *t* 检验, 分析各组间结果的差异.

2 结果

2.1 原代培养 ASCs 生物学特性

原代培养的细胞大部分于 24 h 内贴壁，呈梭形。经过换液、传代，造血细胞基本消失，视野中均为成纤维样细胞（图 1）。7 d 后细胞融合成单层，排列出现方向性，放射状或漩涡状。传代后的

ASCs 生长旺盛，细胞形态保持长梭形。ASCs 转染绿色荧光蛋白质质粒，24 h 后转染细胞形态较转染前略圆，荧光显微镜下可见绿色荧光蛋白阳性细胞（图 1）。

脂肪来源的干细胞的免疫表型:免疫组化染色检测了 ASCs 的 CD29, CD44, CD105, CD34, CD45 的表达，其中 CD29, CD44, CD105 表达阳性，CD34, CD45 表达阴性（图 2）。



图 1 脂肪来源的干细胞原代培养 (40×) 转染 24 h 后 GFP 阳性细胞 (100×)
Fig. 1 Primary culture of ASCs GFP-positive cell transfected EGFP plasmid

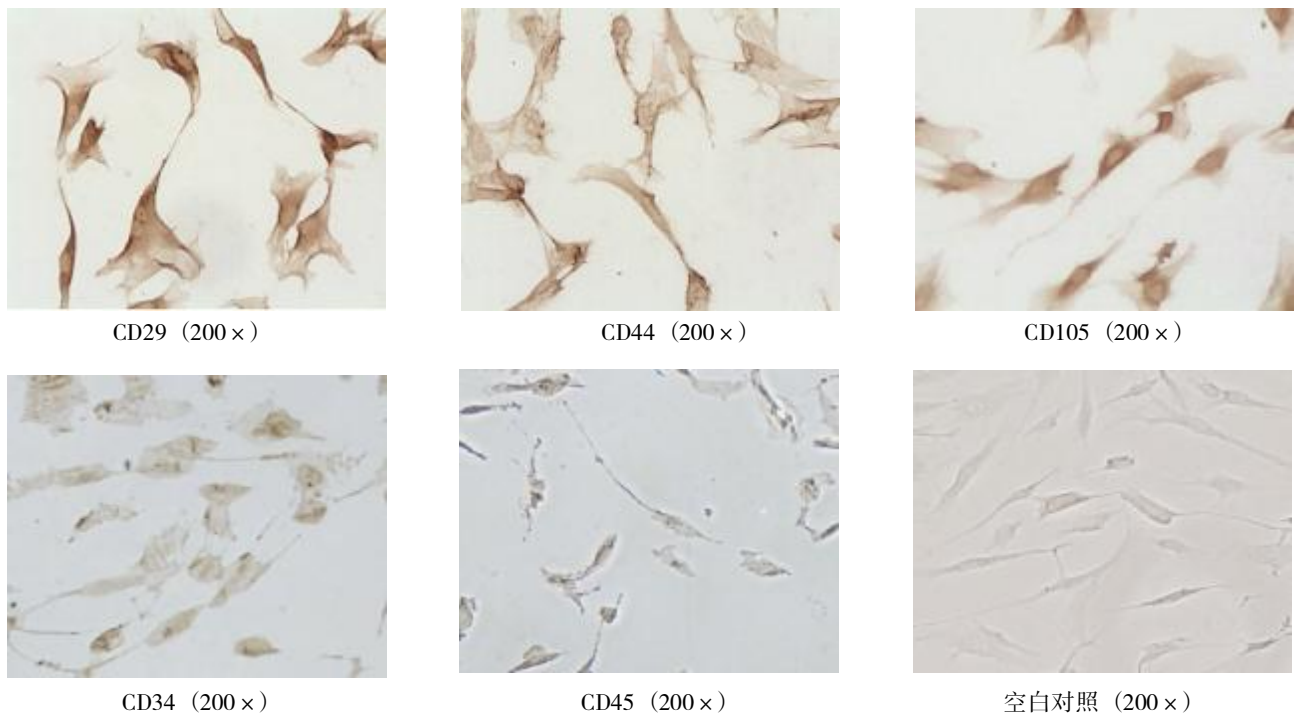


图 2 脂肪来源的干细胞的免疫表型
Fig. 2 ASCs surface markers

2.2 脂肪间充质干细胞颗粒脂肪混合物移植的动物实验

细胞颗粒脂肪混合物接种裸鼠体内 6 周后取

材，均见到有黄色类似脂肪组织形成，外有一层透明包膜，2 组标本大小不等，形态基本规则（图 3）。实验组 (n = 6) 新生组织湿重 (610.3 ± 25.3)

mg, 对照组 (n=5) 新生组织湿重 (420.7 ± 27.8) mg. 2组差异有统计学意义 ($P < 0.01$).

2.3 形态学染色

组织切片后, 行 H.E 染色. 实验组 (ASCs + bFGF+ 颗粒脂肪组) 与对照组 (ASCs+ 颗粒脂肪组) 均形成脂肪结构, 实验组成熟脂肪细胞排列

相对紧致, 细胞形态较好 (图 4).

2.4 Western blot 检测

Western blot 检测结果显示实验组 (ASCs + bFGF+ 颗粒脂肪组) VEGF, bFGF 表达均高于对照组 (ASCs+ 颗粒脂肪组) (图 5).



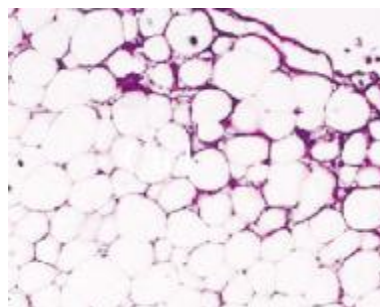
对照组



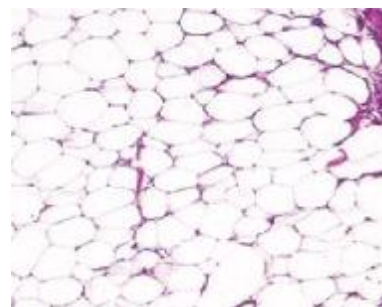
实验组

图 3 细胞颗粒脂肪混合物接种后形成组织 (Exp: ASCs+bFGF+ 颗粒脂肪组. Ctrl: ASCs+ 颗粒脂肪组.)

Fig. 3 Fat tissue of ASCs cells-assisted lipotransfer. (Experimental group: ASCs+bFGF+ fat grana. ; Ctrl group: ASCs+fat grana)



对照组



实验组

图 4 H.E 染色 (Exp: ASCs+bFGF+ 颗粒脂肪组. Ctrl: ASCs+ 颗粒脂肪组.)

Fig. 4 H.E staining of fat tissue. (Experimental group: ASCs+bFGF+ fat grana. ; Ctrl group: ASCs+fat grana)

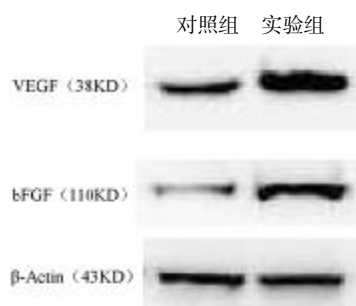


图 5 Western Blot 检测 VEGF, bFGF 结果. 实验组: ASCs+bFGF+ 颗粒脂肪组. 对照组: ASCs+ 颗粒脂肪组

Fig. 5 VEGF and bFGF protein detected by Western blotting. (Experimental group: ASCs+bFGF+ fat grana. ; Ctrl group: ASCs+fat grana)

3 讨论

自体脂肪移植在软组织充填年轻化治疗中具有广泛前景. Ellenbogen^[4]在 1986 年采用颗粒脂肪移植治疗颜面部凹陷及外伤后组织缺损均取得了良好效果. 之后 Bricoll^[5]于 1987 年首次报道了颗粒脂肪注射隆胸术. 但移植术后 2~3 月, 移植物可能因为缺血再灌注损伤导致细胞丢失而影响移植效应. 近年来, 随着干细胞研究的发展, Yoshimura 等提出细胞辅助脂肪移植 (cell-assisted lipotransfer, CAL) 行软组织充填^[6], 即通过吸脂手术获取自体脂肪, 然后分离纯化自体脂肪干细胞, 再与人体颗粒脂肪混合注射移植, 利用 ASCs 向脂肪细胞分化

增殖的特性来生长替代丢失的脂肪细胞,改善移植效果.然而随着 CAL 的应用,发现吸脂术中的 ASCs 有限而不能满足需要更新细胞的数量需求,同时因移植组织局部血供不足也会导致 ASCs 凋亡丢失增加,致使术后 ASCs 分化替代不足而发生移植脂肪萎缩.因此,在增加 ASCs 补充的同时,改善移植血运,必将利于 ASCs 长期存活,发挥良好移植效果.

研究证实,与切取的脂肪组织块相比,通过吸脂术获取的脂肪颗粒,更容易培养并获取较多的 ASCs. Kurita 等^[6]报道,通过对吸脂脂肪 3 000 r/min 的离心,虽有 12% 的成熟脂肪细胞损失,但 ASCs 的损失为 0,并使每升吸脂脂肪中的 ASCs 浓缩 43%,极大地提升了同等移植体积中 ASCs 的含量.我们的实验采用吸脂术所得的颗粒脂肪,干细胞特异性标志物检测显示所培养细胞具备 ASCs 特性,适宜细胞辅助脂肪移植.而对移植物的形态学检测发现,移植的颗粒脂肪在裸鼠体内长成了成熟的脂肪组织,且成熟的脂肪细胞排列相对紧致,细胞形态均匀,移植效果良好.与对照组相比,实验组脂肪湿重明显升高,提示 bFGF 促进了移植物的增殖分化,改善了移植颗粒脂肪的存活.

bFGF 做为一种广泛的生物活素,它可促进血管生成,使移植的脂肪血管化加速.笔者的实验发现,实验组标本的 VEGF 及 bFGF 表达升高. VEGF 是内皮细胞的特异性丝裂原,与存在于内皮细胞表面的特异性受体 (Flt-1、Flk-1/KDR) 结合^[7],促进血管内皮细胞增殖,刺激体内新生血管生成.此外,VEGF 作为一种局部内生性调节剂还起着维持血管的正常状态和完整性的作用^[8].而 bFGF 在发挥促血管生成作用的同时,还有明显的促细胞分裂和增殖效应,增加未成熟的新生脂肪细胞的数量,使这些细胞增生成熟为大的脂肪细胞.实验组高表达 VEGF 提示移植组织血管形成优于无 bFGF 对照组,将有利于减少因血供不良所致的 ASCs 丢失,提升 ASCs 存活.另外,实验组 bFGF 表达升高也提示外源性 bFGF 可促进内源性 bFGF

分泌,从而进一步强化 bFGF 的促细胞增殖作用,增加新生脂肪细胞数量.

需要指出的是,实验中未检测到由标记 ASCs 分化的成熟脂肪细胞,这可能是由于成熟脂肪细胞浆多为脂滴充盈,难以检测胞浆中 E-GFP,事实上,当前未有文献报道可检测到 E-GFP 标记细胞浆的成熟脂肪细胞.

[参考文献]

- [1] PARRISH J N, METZINGER S E. Autogenous fat grafting and breast augmentation: a review of the literature [J]. *Aesthet Surg J*, 2010, 30(4):549 - 556.
- [2] CHAN C W, MCCULLEY S J, MACMILLAN R D. Autologous fat transfer—a review of the literature with a focus on breast cancer surgery [J]. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2008, 61(12):1 438 - 1 448.
- [3] ELLENBOGEN R. Free autogenous pearl fat grafts in the face: a liminary report of a rediscovered technique [J]. *Ann Plast Surg*, 1986, 16(3):179 - 194.
- [4] BIREDL M. Cosmetic breast augmentation utilizing autologous fat and liposuction techniques [J]. *Plast Reconstr Surg*, 1987, 79(2):267 - 271.
- [5] PEARL R A, LEEDHAM S J, PACIFICO M D. The safety of autologous fat transfer in breast cancer: lessons from stem cell biology [J]. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2012, 65(3):283 - 288.
- [6] KURITA M, MATSUMOTO D, SHIGEURA T, et al. Influences of centrifugation on cells and tissues in liposuction aspirates: optimized centrifugation for lipotransfer and cell isolation [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2008, 121(3):1 033 - 1 041.
- [7] FERRARA N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress [J]. *Endocr Rev*, 2004, 25(4):581 - 611.
- [8] KAJDANIUK D, MAREK B, FOLTYN W, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - part 1: in physiology and pathophysiology [J]. *Endokrynol Pol*, 2011, 62(5):444 - 455.

(2013-02-10 收稿)