

脂肪干细胞在促进移植皮瓣血管化中的研究进展

张园园¹ 刘真² 贾赤宇²

【摘要】 皮瓣移植是整形外科中应用最广、修复皮肤缺损最为有效的方法,早期建立良好的血运是移植皮瓣成活的关键。随着干细胞研究的不断深入,发现脂肪干细胞(ADSC)在促血管化中的作用较为确切,且ADSC具有来源充足、提取方便、低免疫原性、无伦理问题等优势,结合ADSC来促进移植皮瓣血管化的作用逐渐得到实验证实,其主要通过两种作用机制促进移植皮瓣血管新生,为移植皮瓣提供良好血运。总之,这些实验研究为将来ADSC应用于临床奠定了基础,ADSC有望为皮瓣移植术后预防缺血坏死提供一条新途径。

【关键词】 干细胞; 外科皮瓣; 新生血管化,生理性; 移植

Research progress of the vascularization of the skin flap with adipose-derived stem cells

Zhang Yuanyuan¹, Liu Zhen², Jia Chiyu². ¹Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China;

²Department of Burn and Plastic Surgery, the 309th Hospital of People's Liberation Army, Beijing 100091, China

Corresponding author: Jia Chiyu, Email: 13911238533@163.com

【Abstract】 Flap transplantation is one of the most widely used and the most effective methods for repair of skin defect in plastic surgery. Early establishment of good circulation is the key method to the survival of the transplanted flap. With the deepening of stem cell research, a growing number of studies have shown that the role of adipose-derived stem cells are precise for the vascularization. In addition, adipose-derived stem cells have some special advantages such as abundant, easy extraction, low immunogenic, no ethical problems, et al. It is verified by experiments gradually that adipose-derived stem cells promote the skin flap vascularization. There are two important mechanisms promoting vasculogenesis and providing good vascularization for the transplanted flap. In conclusion, These experiments lay a foundation for adipose-derived stem cells clinical applications in the future. Furthermore, adipose-derived stem cells may some day become one of effective methods to prevent flap ischemia and necrosis.

【Key words】 Stem cells; Surgical flaps; Neovascularization, physiologic; Transplantation

皮瓣移植是整形外科中应用最为广泛且修复组织损伤最为有效的一种治疗手段,良好的血液供应是提高移植皮瓣存活率的基础。皮瓣移植在具体临床应用中存在一定的局限性,皮瓣远端缺血坏死时有发生。如何安全有效地提高移植皮瓣的存活率,保证皮瓣的血液供应,一直是烧伤整形外科临床工作中的棘手问题。随着干细胞研究的不断深入,越来越多的干细胞功能被挖掘,目前脂肪干细胞(adipose-derived stem cell, ADSC)在诱导分化为血管内皮细胞中的作用确切,ADSC在促血管化方面越来越受到关注。

ADSC是从脂肪组织中分离出来的具有多向分化潜能的

成体干细胞,其跟骨髓间充质干细胞功能相似,可以分化为成脂细胞^[1]、成肌细胞^[2]、成骨细胞^[3]、成软骨细胞^[4]、成神经细胞^[5]及血管内皮细胞^[6-7]。2001年Zuk等^[8]从脂肪组织中分离出一个多潜能细胞群,这群细胞后来被命名为ADSC。ADSC具有来源充足、提取方便、低免疫原性、无致瘤、无伦理问题等优势。利用ADSC来促进移植皮瓣血管化逐渐得到实验的肯定,有望被广泛应用于临床。

一、ADSC与促血管化

1. ADSC促血管化作用:随着ADSC血管化研究的不断深入,ADSC促进血管新生技术及机制日趋成熟,ADSC血管化应用于缺血性疾病的研究结果令人鼓舞。2005年,张端珍等^[9]在我国首次报道了运用ADSC血管化治疗缺血性疾病的研究,其将ADSC应用于心肌缺血的兔模型中,结果显示ADSC移植后5周,治疗组动物心功能显著改善,与细胞移植之前比较,动物左心室射血分数显著升高,说明ADSC移植可以促进心肌血管形成,改善心肌灌注和心脏功能,为临床应用提供了新的治疗依据。2011年,Kim等^[10]将人的ADSC注入糖尿病血管病变的小鼠体内,通过测定血液和组织中的血管内皮生长因子浓度,显示出ADSC通过提高糖尿

DOI:10.3877/cma.j.issn.1673-9450.2015.05.017

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81372051);总参军事医学和老年病科基金项目(ZCWS14B06);解放军第三〇九医院院管课题(2014MS-001);全军医学科技“十二五”重点课题(BWS11C061);国家重点基础研究发展计划(973计划)(2012CB518104)

作者单位:030001 太原,山西医科大学¹;100091 北京,解放军第三〇九医院烧伤整形科²

通讯作者:贾赤宇,Email: 13911238533@163.com

病血管病变小鼠血液和组织中的血管内皮生长因子浓度从而达到促进新生血管形成的目的。但这种方法在一定程度上导致血管扩张,进而引起低血压的发生。2012年, Lee等^[11]利用ADSC对缺血肌肉进行治疗,结果显示ADSC促进了缺血肌肉的血运建立,显著提高了缺血肌肉活性。2014年,田甜等^[12]分离提取培养了大鼠ADSC,并将其进行注射于同种异体移植的脂肪组织,通过观察证明脂肪组织中微血管数量显著增加,验证了ADSC促血管化作用,提高了脂肪移植的存活率。实验表明,ADSC促血管化作用确切。

2. ADSC促血管化的机制:ADSC有确切的促血管化作用,但ADSC促血管化机制尚不完全明确,目前大多数学者认为ADSC血管化机制由以下2个方面协同完成:(1)ADSC在一定条件下可以诱导分化为血管内皮细胞及平滑肌细胞,形成新的血管网。2005年,Cao等^[13]首先利用ADSC在体外诱导分化为血管内皮细胞,实验中发现有管型结构形成,并且内皮细胞表型表达成阳性,随后大量实验证实了ADSC具有这种向血管内皮细胞分化的能力,并且有学者^[14]通过Dil标记示踪方式将ADSC注射入小鼠体内,观察发现其诱导分化为血管内皮细胞后聚集于微血管周围,充分说明ADSC可以在体内诱导分化为血管内皮细胞来促进血管新生。(2)实验研究表明^[15],ADSC可以旁分泌多种与血管新生相关的细胞因子和生长因子,而且这种旁分泌作用在血管新生中起着重要的作用。ADSC分泌的血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、胰岛素样生长因子-1(insulinlike growth factor- I, IGF- I)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、角质形成细胞生长因子(keratinocyte growth factor, KGF)等多种促进血管生成的细胞因子已被证实具有促进血管再生、改善局部血供作用^[16-17]。进一步实验研究显示^[18],ADSC在低氧环境较正常氧含量中分泌的VEGF明显增加,且能有效促进血管内皮细胞的生长和减少内皮细胞凋亡。

二、ADSC在移植皮瓣血管化中的实验研究

ADSC无论在体内还是在体外均可诱导分化为血管内皮细胞^[19],并且可以旁分泌多种促进血管生长的细胞因子或生长因子,利用ADSC这一特性,广大研究者试图通过ADSC移植来实现供血不明确的皮瓣早期血管化,以期提高移植皮瓣的成活率^[20]。

Suartz等^[21]将ADSC注射至大鼠随意皮瓣模型的皮下,与空白对照组比较显示,ADSC组皮瓣成活率显著提高。王白石^[22]用ADSC预处理随意皮瓣,以期达到随意皮瓣移植前富血管化的目的,但实验结果与之前设想几乎相悖,提前干预注射ADSC后皮瓣中未见明显富血管化,促皮瓣成活的作用不明显。与即刻注射ADSC组相比,提前干预注射后的皮瓣无论是肉眼所见还是实验检测指标,都提示不如即刻注射组的皮瓣成活率理想。随后通过调整研究思路,发现ADSC发挥其生物学特性需要一定的微环境作支持。即刻注射组与预先注射组的区别在于即刻注射对皮瓣进行了原位移植,造成了一定的组织损伤,发生了炎症反应,为ADSC发挥其生物学特性提供了必要的炎症微环境。继而王白石^[22]通过改进实验,联合肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF-

α)与ADSC联合预处理皮瓣,为ADSC发挥作用提供一定的微环境,该实验证实,经过炎症因子TNF- α 联合刺激后的ADSC预先移植至正常组织后,皮瓣内部VEGF的表达增加,微小血管数目增加,此种现象与即刻注射ADSC组结果相似。但较单纯ADSC预处理组具有更强的促移植组织血管化作用,增强了皮瓣的成活率。

综上所述,ADSC运用于移植皮瓣可以有效增加移植皮瓣的血管新生,提高移植皮瓣的存活率。此种方法的巧妙之处还在于有效避免了致瘤风险。将ADSC即刻注射于移植皮瓣皮下,利用皮瓣移植的炎症微环境,促进ADSC血管化,提高移植皮瓣的血管新生,当皮瓣逐渐愈合,炎症反应渐趋消退时,ADSC也渐失去了诱导其血管化的微环境,因此,ADSC血管化作用也逐渐消失,这样有效避免ADSC在组织内长期促血管新生导致血管瘤。

三、ADSC血管化应用于移植皮瓣的优势

相对于其他干细胞,ADSC除了具有储存量丰富、容易获取、体外培养增殖速度快、免疫原性低、无致畸致癌反应、无伦理问题等优势,还具有受微环境调节的特点。这些优势为ADSC的血管化应用于移植皮瓣提供了可靠保障。

1. 贮存量丰富,容易获取,能反复取材:最早用于成血管化研究的干细胞是骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC),BMSC在VEGF与bFGF联合诱导下,体外可诱导分化为血管内皮细胞。但是骨髓组织获取操作相对复杂,需要多个部位进行骨髓穿刺,采集脂肪只需通过简单的吸脂术即可,患者承受痛苦小,取材方便,患者易于接受。ADSC在体内分布广泛,据研究表明^[23],动物体内1g脂肪中的干细胞含量比骨髓中干细胞含量高500倍,丰富的ADSC储备量是其他干细胞所不能比拟的。另外,BMSC容易受到动物年龄、性别、生理病理状态等影响,而ADSC来源稳定,与这些因素无关。

2. 体外增殖速度快,易于培养:研究表明^[24],ADSC在体外培养增殖力强,速度快,可以稳定扩增,不易衰老等且培养条件要求不高,培养过程中无需任何细胞因子,为体外大量增殖提供可能。

3. ADSC旁分泌和分化功能在体内移植微环境中增强^[25]:皮瓣移植后的微环境利于ADSC旁分泌血管新生相关因子如VEGF、IGF-1、HGF、bFGF、KGF等,并可以促进ADSC向血管内皮细胞分化,为移植皮瓣提供丰富的血运,进而提高移植皮瓣的成活率。

4. 免疫原性低,可用于异体移植^[26],安全并易于耐受,无急性和延迟毒性反应,无致瘤现象:研究者对小鼠ADSC的免疫原性及静脉移植安全性做了评估,结果发现ADSC在体外与淋巴细胞共培养时,不能有效刺激淋巴细胞增殖,不调动细胞免疫反应^[27];经小鼠尾静脉移植ADSC后,不能激活机体细胞免疫反应,但可以激活机体体液免疫反应;细胞移植后未观察到肿瘤的形成和组织畸变。说明ADSC总体免疫原性较低,移植后不会导致肿瘤样生长,安全性较好^[28-29]。

5. 无伦理问题:在目前的干细胞研究领域,胚胎干细胞来源于受精5~6d的胚泡中未分化的细胞,对其研究涉及伦理、宗教和法律等问题,而ADSC从脂肪中获得,不仅不涉及

伦理问题,而且可以变废为宝。

虽然 ADSC 的发现晚于 BMSC,但众多研究已表明^[30],ADSC 和 BMSC 在许多特性上几乎可以相互替代,无论在体内还是体外均具有较强的多向分化潜能,但目前 ADSC 作为种子细胞的优势逐渐得到人们的认可与推崇。运用 ADSC 促进移植皮瓣血管化的实验研究结果可观,疗效确切。部分临床实验在逐步探索中,有望成为临床中预防和治疗皮瓣缺血坏死的有效措施。

四、ADSC 血管化在移植皮瓣中的局限性

烧伤整形外科皮瓣移植手术成功率相对较高,而对于一些超长皮瓣或存在缺血风险的移植皮瓣,运用外界干预来提高移植皮瓣的存活率是非常必要的。ADSC 促进移植皮瓣血管化作用确切,但单纯为了预防性避免移植皮瓣缺血坏死而进行有创性的 ADSC 提取与移植,操作复杂,费时费力,临床效果不稳定,因此患者接受起来比较困难,依从性差。如果能够将整形外科抽脂术后所遗弃的脂肪利用起来,从中提取 ADSC,进而同种异体应用于有需要的患者,将 ADSC 收集并安全保存于干细胞库,解除从患者自身提取 ADSC 所带来的痛苦,ADSC 才能在临床中得到广泛应用。已有研究报道^[31],深度低温保存 ADSC,对 ADSC 的增殖分化潜能和旁分泌因子特性没有明显影响,细胞库的建立可利于其将来向商品化方向推广。另外 ADSC 血管化应用于皮瓣的临床研究目前多停留在动物实验阶段,其临床应用的剂量、应用时间、应用部位等问题各家做法没有统一标准。

五、小结与展望

目前 ADSC 用于促进移植皮瓣血管化的动物实验研究作用确切,但临床研究报道甚少,分析其原因可能是随着临床植皮手术技术的提高,皮瓣移植存活率相对较好,出现皮瓣移植后缺血坏死的概率较先前大为减少,以至对皮瓣缺血坏死问题缺乏重视,临床研究新进展少,相对缓慢。一旦发生皮瓣缺血坏死,便成为临床棘手问题,其解决方法仍停留于最初利用手术二次植皮的阶段,给患者带来不必要的痛苦及经济负担。ADSC 应用于临床中移植皮瓣血管化还有很长的路要走,其促进移植皮瓣血管化的研究目前仍处于基础实验阶段,要全面应用于临床移植皮瓣血管化的治疗,还存在许多问题。第一,对于 ADSC 的长期应用预后效果如何仍不确切,还需要研究者对 ADSC 在移植皮瓣血管化中的后期效果做大量的实验及临床观察研究。第二,基础实验表明 ADSC 促移植皮瓣血管化效果确切,需要临床实验的跟进。第三,ADSC 库的建立有助于为临床提供简便、快捷、大规模的应用基础条件。

综上所述,尽管尚未见 ADSC 用于移植皮瓣血管化的临床报道,但基础动物实验研究结果显示 ADSC 促进移植皮瓣血管化作用确切。ADSC 在移植皮瓣中可以分化为血管内皮细胞和平滑肌细胞,并且通过旁分泌作用分泌大量促血管新生的生长因子,进而促进血管化,有效提高皮瓣的存活率。ADSC 在促进移植皮瓣血管化方面具有其独特的优势,ADSC 有望为临床移植皮瓣血管化治疗提供一条新途径。

参 考 文 献

- Choi YS, Cha SM, Lee YY, et al. Adipogenic differentiation of adipose tissue derived adult stem cells in nude mouse [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 345(2): 631-637.
- Kim M, Choi YS, Yang SH, et al. Muscle regeneration by adipose tissue-derived adult stem cells attached to injectable PLGA spheres [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 348(2): 386-392.
- Weinzierl K, Hemprich A, Frerich B. Bone engineering with adipose tissue derived stromal cells [J]. *J Craniomaxillofac Surg*, 2006, 34(8): 466-471.
- Huang JI, Zuk PA, Jones NF, et al. Chondrogenic potential of multipotential cells from human adipose tissue [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2004, 113(2): 585-594.
- Jiang L, Zhu JK, Liu XL, et al. Differentiation of rat adipose tissue derived stem cells into Schwann like cells in vitro [J]. *Neuroreport*, 2008, 19(10): 1015-1019.
- Rehman J, Traktuev D, Li J, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells [J]. *Circulation*, 2004, 109(10): 1292-1298.
- 段红杰, 柴家科. 间充质干细胞在创面愈合中的作用[J/CD]. *中华损伤与修复杂志: 电子版*, 2012, 7(6): 658-661.
- 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.
- 张端珍, 盖鲁粤, 刘宏伟, 等. 脂肪干细胞移植促进心肌新血管形成研究[J]. *心脏杂志*, 2005, 17(5): 405-404.
- Kim EK, Li G, Lee TJ, et al. The effect of human adipose-derived stem cells on healing of ischemic wounds in a diabetic nude mouse model [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2011, 128(2): 387-394.
- Lee HC, An SG, Lee HW, et al. Safety and effect of adipose tissue-derived stem cell implantation in patients with critical limb ischemia: a pilot study [J]. *Circ J*, 2012, 76(7): 1750-1760.
- 田甜, 贾赤宇, 刘毅, 等. 大鼠同种异体脂肪来源间充质干细胞对移植脂肪早期微血管形成的影响[J]. *中华烧伤杂志*, 2014, 30(6): 512-517.
- Cao Y, Meng Y, Sun Z, et al. Potential of human adipose tissue derived adult stem cells differentiate into endothelial cells [J]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*, 2005, 27(6): 678-682.
- 曹菁, 姜南, 徐扬阳, 等. 人脂肪干细胞促进小鼠随意型皮瓣血管的新生[J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(19): 2993-2998.
- Deveza L, Choi J, Imanbayev G, et al. Paracrine release from nonviral engineered adipose-derived stem cells promotes endothelial cell survival and migration in vitro [J]. *Stem Cells Dev*, 2012, 22(3): 483-491.
- Skalnikova H, Motlik J, Gader SJ, et al. Mapping of the secretome of primary isolates of mammalian cells, stem cells and derived cell lines [J]. *Proteomics*, 2011, 11(4): 691-708.
- Jung H, Kim HH, Lee DH, et al. Transforming growth factor-beta 1 in adipose derived stem cells conditioned medium is a dominant paracrine mediator determines hyaluronic acid and collagen expression profile [J]. *Cytotechnology*, 2011, 63(1): 57-66.
- Rehman J, Traktuev D, Li J, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells [J]. *Circulation*, 2004, 109(10): 1292-1298.
- 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.
- 20 Xu N, Guo S, Wang Y, et al. Transplantation of adipose tissue-derived stromal cells promotes the survival of venous-congested skin flaps in rabbit ear [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 71(2): 557-563.
- 21 Suartz CV, Gaiba S, Franca JPD, et al. Adipose-derived stem cells (ADSC) in the viability of random skin flap in rats [J]. *Acta Cirurgica Brasileira*, 2014, 29(2): 6-9.
- 22 王白石. 脂肪干细胞对皮瓣血运作用的研究^[D]. 北京:解放军医学院, 2013: 9-59.
- 23 Helder MN, Knippenberg M, Klein-Nulend J, et al. Stem cells from adipose tissue allow challenging new concepts for regenerative medicine [J]. *Tissue Eng*, 2007, 13(8): 1799-1808.
- 24 张卫泽, 李国庆, 陈永清, 等. 人脂肪间充质干细胞的分离培养及其遗传稳定性[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(40): 7833-7837.
- 25 Pereira LH, Sterodimas A. Macroscopic and microscopic proof of long-term survival of gluteal fat transplantation [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2009, 123(4): 162e-163e.
- 26 Liu H, Kemeny DM, Heng BC, et al. The immunogenicity and immunomodulatory function of osteogenic cells differentiated from mesenchymal stem cells [J]. *Immunol*, 2006, 176(5): 2864-2871.
- 27 梁爽, 袁桂峰, 钟毓娟, 等. 小鼠脂肪干细胞免疫原性及移植安全性[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(1): 47-50.
- 28 Morandi F, Rafaghelli L, Bianchi G, et al. Immunogenicity of human mesenchymal stem cells in HLA-class I-restricted To-cell responses against viral or tumor associated antigens [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(5): 1275-1287.
- 29 Uysal AC, Mizuno H, Tobita M, et al. The effect of adipose derived stem cells on ischemia-reperfusion injury: immunohistochemical and ultrastructural evaluation [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2009, 124(3): 804-815.
- 30 Huang SJ, Fu RH, Shyu WC, et al. Adipose-derived stem cells: Isolation, characterization, and differentiation potential [J]. *Cell Transplant*, 2013, 22(4): 701-709.
- 31 Karpov AA, Uspenskaya YK, Minasian SM, et al. The effect of bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cell transplantation on myocardial remodelling in the rat model of ischaemic heart failure [J]. *Int J Exp Pathol*, 2013, 94(3): 169-177.

(收稿日期:2015-06-24)

(本文编辑:甘丽)

张园园, 刘真, 贾赤字. 脂肪干细胞在促进移植皮瓣血管化中的研究进展[J/CD]. *中华损伤与修复杂志: 电子版*, 2015, 10(5): 446-449.