

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.17.004
文章编号: 1005-8982(2019)17-0018-04

离心对不同层次脂肪移植成活率的影响*

张腾¹, 冯浩², 蒋甜甜², 张源¹

(1. 长沙市中医医院 皮肤科, 湖南 长沙 410199; 2. 湖南师范大学附属第一医院 皮肤科, 湖南 长沙 410005)

摘要: 目的 探究离心后不同层次脂肪的移植成活率, 以便更好地指导临床应用。**方法** 选取新西兰兔腹股沟脂肪, 按照 Coleman 方法离心脂肪, 并将其分为上、中、下3层, 每层各1 ml 移植于背部皮下; 3个月后, 对移植体进行组织学观察、测量体积及 CD31 免疫组织化学染色。**结果** 下层脂肪移植体成活体积、血管密度及成活质量均高于上层和中层脂肪移植体 ($P < 0.05$), 而中层和上层脂肪移植体成活体积、血管密度脂肪成活质量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 按 Coleman 方法离心后的下层的脂肪成活率及成活质量较好, 可以作为临床脂肪移植的理想选择。

关键词: 脂细胞; 移植; 离心法

中图分类号: R617

文献标识码: A

Effect of centrifugation fraction on survival rate of lipoaspirate*

Teng Zhang¹, Hao Feng², Tian-tian Jiang², Yuan Zhang¹

(1. Department of Dermatology, Changsha Hospital of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410199, China; 2. Department of Dermatology, The First Affiliated Hospital of Hunan Normal University, Changsha, Hunan 410005, China)

Abstract: Objective To explore the effect of centrifugation fraction on survival rate of lipoaspirate. **Methods** The inguinal fat tissue of New Zealand rabbits was harvested and centrifuged by Coleman procedure. Centrifuged lipoaspirate was divided into upper, middle and lower layers which were transplanted into the back of rabbits. Three months later, the fat grafts were assessed by survival volume, histological characteristics and immunohistochemical staining for CD31. **Results** The volume retention, density of vessel and survival quality of lower layers fat grafts were significantly higher than those of the other two layers ($P < 0.05$). There was no significant difference in the above index between the middle layers and upper layers ($P > 0.05$). **Conclusions** The lower centrifuged layer may be an ideal candidate for fat grafts.

Keywords: adipocytes; transplantation; centrifugation

近年来自体脂肪移植已广泛用于临床, 因其移植后过高的吸收率, 限制其临床应用, 如何提高脂肪移植后成活率成为了目前研究的热点^[1-2]; 目前临床公

认, 按 Coleman 离心方法^[3]提纯脂肪可最大限度提高其成活率, 本研究进一步探究按 Coleman 离心方法提纯后不同层次脂肪的成活率, 以便进一步指导临床,

收稿日期: 2018-12-10

* 基金项目: 湖南省卫生计生委一般项目 (No: B2016229, 20190106); 长沙市科技局一般项目 (No: kq1706033)

[通信作者] 张源, E-mail: 147528192@qq.com

现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂与仪器

伊红及苏木精(美国 Sigma 公司), CD31 抗体(英国 Abcam 公司), 青-链霉素(美国 Hyclone 公司), 超净工作台(上海索普仪器公司), 荧光显微镜(日本 Olympus 公司), 恒温水浴箱(上海跃进医疗器械厂), 电子天平(德国 Sartorius 公司), 外科手术器械及外科手术台(西安宝生手术器材有限公司)。

1.2 方 法

1.2.1 实验动物 3 月龄新西兰兔 12 只、雌雄不限, 体重 2 500 ~ 3 000 g, 购自第四军医大学实验动物中心。

1.2.2 模型复制及分组 复制新西兰兔自体脂肪移植模型(12 只): 获取新西兰兔腹股沟皮下脂肪并移植于该兔背部皮下。依次将新西兰兔固定于手术台, 背部及腹股沟备皮、消毒、用耳缘静脉注射戊巴比妥钠麻醉; 待麻醉生效后, 将新西兰兔腹股沟皮肤剪开, 分离出腹股沟脂肪, 并于超净台下剪碎, 剔除筋膜, 然后按照 Coleman 离心方法^[9]提纯脂肪, 脂肪离心后去掉上层油脂及下层细胞及筋膜残渣, 最后将剩余的脂肪组织分为上、中、下 3 组; 每组取 1 ml 脂肪组织; 依次注射于兔背部皮下; 待新西兰兔苏醒后放回饲养笼。

1.2.3 计算脂肪移植后成活体积 分别于脂肪移植术后 3 个月麻醉处死新西兰兔, 剥离背部脂肪移植植物, 用排水法测量其体积。

1.2.4 HE 染色观察脂肪移植植物成活质量 将所取脂肪移植植物迅速置于 10% 甲醛中固定。24 h 常规脱水、浸蜡、包埋、切片, 行苏木精-伊红染色。在 10 倍镜下观察脂肪组织的囊泡、纤维化程度及其完整脂肪细胞。评价方法包含 3 个参数: 脂肪组织中囊泡数目、纤维化程度、完整脂肪细胞数目; 每个参数分为 0 ~ 6 个分值: 0= 无、1= 少量、2= 比中量少、3= 中量、4= 比中量多、5= 大量。所有组织学评价均由经过培训的实验人员完成。

1.2.5 CD31 染色观察脂肪移植植物血管密度 石蜡包埋移植脂肪组织, 切片机切成约 5 μm 厚度的组织白片用于 CD31 免疫组织化学染色。经过 65 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤、脱蜡、水化后微波抗原修复, 3% 过氧化氢去内源性过氧化物酶, 一抗为鼠源 Anti-CD31 抗体(1 : 100 稀释), 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜后行 DAB 染色, 苏木精复染, 中性树脂胶封片。在脂肪细胞周围的间质中, 血管内皮

细胞被标记为深棕色, 并构建成官腔样结构。采用 Image-Pro Plus 6 计数血管密度(条)。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组比较采用方差分析, 进一步两两比较采用 LSD- t 检验; 两组比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 脂肪移植后成活体积的比较

脂肪移植术后 3 个月, 剥离移植植物, 采用排水法测量各组移植植物成活体积(ml)。结果显示, 下层移植植物成活体积为(0.51 \pm 0.15) ml, 上层移植植物(0.32 \pm 0.11) ml 和中层移植植物(0.38 \pm 0.13) ml, 3 组间移植植物成活体积比较, 差异有统计学意义($F = 19.453$, $P = 0.000$); 下层移植植物成活体积高于上层和中层($t = 3.538$ 和 2.269, $P = 0.002$ 和 0.033)。上层和中层移植植物成活体积比较, 差异无统计学意义($t = 1.122$, $P = 0.589$)。见图 1。

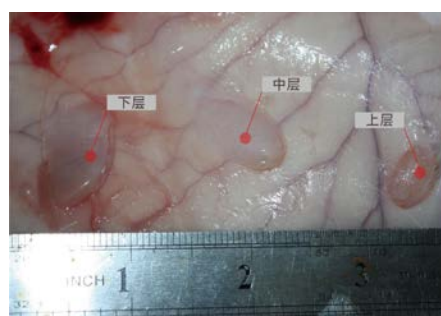


图 1 3 组移植植物成活体积比较

2.2 各组移植植物的成活质量评估

上层和中层移植植物脂肪细胞形成大量囊泡并被纤维组织包裹或分隔, 完整的脂肪细胞较少。采用半定量原则, 结果显示: 3 层移植植物囊泡得分比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 且下层移植植物囊泡的得分低于上层和中层移植植物体积($t = 6.365$ 和 4.895, 均 $P = 0.000$); 而上层和中层比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。3 层纤维化程度得分比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 且下层纤维化程度低于上层和中层($t = 5.357$ 和 6.215, 均 $P = 0.000$); 而上层和中层比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。3 层完整脂肪细胞数得分比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 下层完整脂肪细胞数高于上层和中层($t = 5.091$ 和 5.195, 均 $P =$

0.000)。而上层和中层完整脂肪细胞数目比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 1 和图 2。

2.3 移植物新生血管密度评估

下层移植物新生血管密度 (6.5 ± 0.5) 条, 中层 (3.4 ± 0.7) 条, 上层 (3.2 ± 0.6) 条, 3 组间比较差异有统计学意义 ($F=126.066, P=0.000$), 下层移植物新生血管密度高于中层及上层 ($t=13.79$ 和 11.14 , 均 $P=0.000$); 上层移植物新生血管密度与中层比较, 差异无统计学意义 ($t=0.704, P=0.490$)。见图 3。

表 1 3 层脂肪移植物 HE 染色成活质量比较
($n=12$, 分, $\bar{x} \pm s$)

组别	囊泡	纤维化	完整脂肪细胞
上层	$1.6 \pm 0.3^{\dagger}$	$2.1 \pm 0.5^{\dagger}$	$2.9 \pm 0.4^{\dagger}$
中层	$1.5 \pm 0.4^{\dagger}$	$2.2 \pm 0.4^{\dagger}$	$2.8 \pm 0.4^{\dagger}$
下层	0.6 ± 0.4	1.1 ± 0.4	3.8 ± 0.4
F 值	26.13	37.371	18.155
P 值	0.000	0.000	0.000

注: † 与下层比较, $P<0.05$ 。

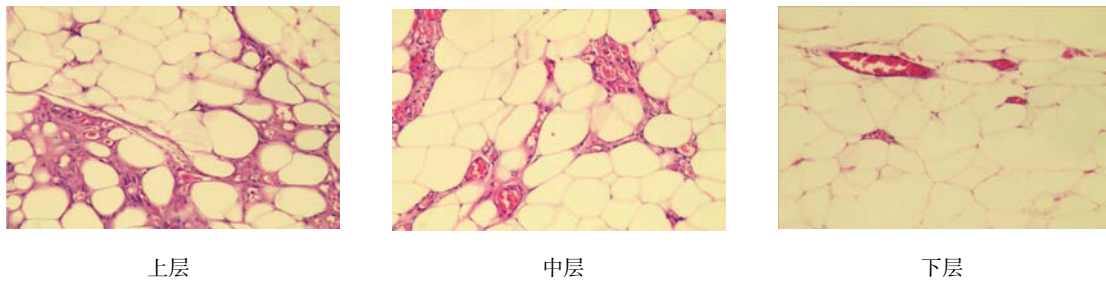


图 2 各组脂肪成活质量比较 (HE $\times 200$)

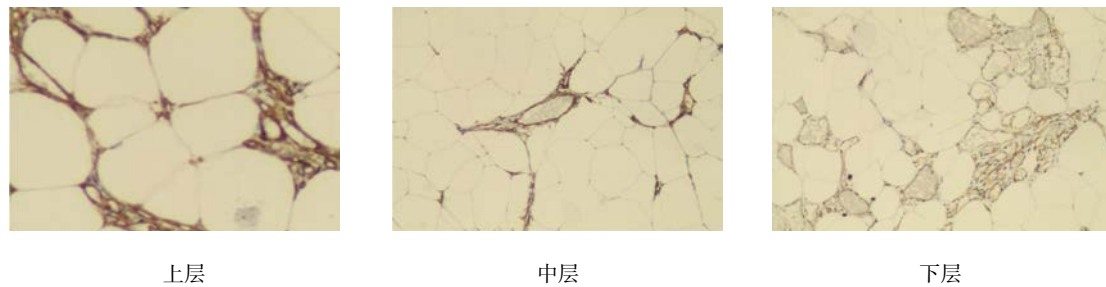


图 3 各组移植物血管密度比较 (免疫组织化学 $\times 200$)

3 讨论

自体脂肪移植手术后早期填充效果较好, 随着时间的推移, 移植后脂肪组织逐渐被吸收, 导致填充体积及质量减少, 影响术后效果, 严重妨碍自体脂肪移植进一步临床应用, 曾一度被传统的生物填充材料所取代^[4-5]。随着脂肪抽吸术及 Coleman 技术的兴起^[6], 自体脂肪移植成活率及脂肪组织成活质量较以前均有明显改善。目前整形外科医师按 Coleman 技术离心提纯脂肪后就直接用于脂肪移植, 并未对 Coleman 方法提纯后的进一步量化; 本研究的目的就是进一步探究 Coleman 方法离心后的不同层次的脂肪移植后成活情况, 更好地指导临床。

本研究发现, Coleman 方法离心后的下层的脂肪移植后成活体积、成活质量及新生血管密度均高于中、

上层。其原因可能为以下几点: ①离心后由于离心力的影响造成干细胞分布不同, 既往研究已经表明脂肪干细胞能够分泌多种生长因子促进血管化, 提高移植物成活率^[7-9]。本研究结果与既往研究结果基本一致^[10-11], 脂肪干细胞多的下层, 其成活的体积, 血管密度均优于中、上层; ②由于离心力的影响, 体积较大较重脂肪细胞可能位于上层, HE 染色结果发现上层脂肪组织中形成大量的囊泡。

虽然脂肪干细胞能够提高脂肪移植的成活质量, 但是许多缺点制约其临床应用。首先: 脂肪干细胞的获取及提纯过程都是在实验室完成, 其过程复杂, 容易形成污染; 其次, 脂肪干细胞回输过程中安全性还需进一步探究; 本研究结果说明如果单纯移植 Coleman 方法提纯的下层脂肪组织能够提高脂肪移植成活率, 值得临床推广。

参 考 文 献:

- [1] BRAYFIELD C, MARRA K, RUBIN J P. Adipose stem cells for soft tissue regeneration[J]. *Handchir Mikrochir Plast Chir*, 2010, 42(2): 124-128.
- [2] STERODIMAS A, de FARIA J, NICARETTA B. Tissue engineering with adipose-derived stem cells (ADSCs): current and future applications[J]. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2010, 63(11): 1886-1892.
- [3] COLEMAN S R. Structural fat grafting: more than a permanent filler[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2006, 118(3s): 108-120.
- [4] YIN S, LUAN J, FU S, et al. Does water-jet force make a difference in fat grafting: in vitro and in vivo evidence of improved lipoaspirates viability and fat grafts survival[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2015, 135(1): 127-138.
- [5] HOPPE D L, UEBERREOTER K, SURLEMONT Y, et al. Breast reconstruction de novo by water-jet assisted autologous fat grafting: a retrospective study[J]. *GMS Ger Med Sci*, 2013, 11: Doc17.
- [6] COLEMAN S R, KATZEL E B. Fat grafting for facial filling and regeneration[J]. *Clin Plast Surg*, 2015, 42(3): 289-300.
- [7] BUTALA P, HAZEN A, COLEMAN S R. Endogenous stem cell therapy enhances fat graft survival[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2012, 130(2): 293-306.
- [8] SON D, CHOI T, YEO H. The effect of centrifugation condition on mature adipocytes and adipose stem cell viability[J]. *Ann Plast Surg*, 2014, 72(5): 589-593.
- [9] PALLUA N, SERIN M, WOLTER T P. Characterization of angiogenic growth factor production in adipose tissue-derived mesenchymal cells[J]. *J Plast Surg Hand Surg*, 2014, 48(6): 412-416.
- [10] VARGHESE J, GRIFFIN M, MOSAHEBI A. Systematic review of patient factors affecting adipose stem cell viability and function: implications for regenerative therapy[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 28, 8(1): 45.
- [11] QIU L, SU Y, ZHANG D, et al. Identification of the centrifuged lipoaspirate fractions that are suitable for post-grafting survival[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2016, 137(1): 67-76.

(王荣兵 编辑)