**案例正文**

**可注射式纳米脂肪基质血管凝胶对慢性创面愈合影响的研究**

文辉才

单位：南昌大学第一附属医院

【**案例内容介绍**】

慢性创面是临床上常见的一种慢性消耗性疾病，给医患造成了极大的痛苦并且具有较高的致残率，目前慢性创面的治疗方式主要包括外科治疗（清创、手术切除、植皮、皮瓣移植等），高压氧治疗，光疗，创面封闭负压引流术及药物治疗等，有一定的辅助作用但不能有效的改善慢性创面的愈合，近年来干细胞治疗取得了较为满意的治疗效果，由于骨髓干细胞含量较少且获取难度较大，对人体损害较大，所以脂肪来源干细胞的治疗成为了新的方向。在脂肪来源干细胞的治疗过程中，也存在较多的问题，比如脂肪来源干细胞需要体外培养，是一个花费较大，时间较长的过程，而富含脂肪来源干细胞的血管基质片段（svf）的提取需要应用胶原酶，易引起免疫排斥反应或污染，影响细胞活性，并且提取的SVF可能含有一定量的胶原酶，直接应用于人体存在较大的风险。在受到Tonnard通过对脂肪组织纯粹的物理剪切力作用得到含有丰富脂肪干细胞的纳米脂肪（Nanofat）的启示下，我们可以通过物理方法来获取 SVF 和 细胞外支架（ECM） 的混合物，即纳米脂肪脱脂滴基质血管凝胶，这种凝胶富含脂肪来源干细胞且获取容易，操作简便，花费较少，有望成为解决慢性创面的有效治疗手段，但其相关机制及治疗效果需要进一步探索；本实验案例总结了在南昌大学第一附属医院整形外科研究的可注射式纳米脂肪基质血管凝胶对慢性创面愈合影响的实验资料，探讨含脂肪干细胞的凝胶在体内的生物学特性及改善慢性创面愈合的效果，进一步阐明其促慢性创面愈合的机制。加深医学研究生对可注射式纳米脂肪基质血管凝胶对慢性创面愈合影响的机制的认识和理解。为人纳米脂肪基质血管凝胶的临床应用提供理论依据和实验基础。实践证明,将案例教学引入临床教学课程,不仅可为将理论与实际充分联系起来,而且可提高学生的学习兴趣,培养学生的学习能力和综合实践能力,为临床提供理论依据与指导。本实验案例来源于南昌大学第一附属医院整形外科实验室成果，所有数据确保真实可靠。

【**摘要**】

因缺血缺氧及细菌感染而导致的慢性皮肤创面甚至截肢是整形外科常见的临床问题，传统的治疗手段包括药物、外科手术、激光治疗等，疗效仍不理想。近年来，脂肪干细胞移植作为一个新兴的治疗手段运用于慢性创面的治疗。但提取纯脂肪干细胞成本高，耗时长，且胶原酶的应用对人体存在一定未知风险；本课题组在大量的前期研究基础上发现通过人的脂肪可以获取一种可注射式、富含脂肪来源干细胞（ASCs）的脱脂滴基质血管凝胶。因此，本实验案例库总结了在南昌大学第一附属医院整形外科研究可注射式、富含脂肪来源干细胞（ASCs）的脱脂滴基质血管凝胶的实验资料，用来培养脂肪干细胞治疗慢性创面方向的研究生，为难治性溃疡创面、褥疮、软组织缺损骨质外露、皮瓣缺血坏死等慢性创面开拓新的治疗思路。

**【关键词】**

脂肪来源干细胞；基质血管片段凝胶；创面愈合；慢性创面；案例

**【Abstract】**

Because of ischemia hypoxia and chronic skin wounds which caused by bacterial infections and even amputation is common clinical disease in plastic surgery, traditional treatments include medications, surgery, laser therapy and so on, but none of the ideal therapy has been established.In recent years, Adipose stem cell transplantation as a new treatment method for the treatment of chronic wounds.

However, the extraction of pure adipose stem cells is costly and time-consuming, and the application of collagenase has some unknown risks to human body.                                                   Our team have obtained an injectable nanofatextracellular matrix gel which is rich in ADSCs through our preliminary experiments.Therefore,This case library summarizes the experimental data of injectable, adipose derived stem cell (ASCs) rich skimmed matrix vascular gel in plastic surgery of the first affiliated Hospital of Nanchang University, and culturing postgraduates of adipose stem cells in the direction of treating chronic wound. To develop a new way of treatment for chronic wounds such as refractory ulcer, bedsore, soft tissue defect, bone exposure, flap necrosis and so on.

**【Key Word】**

     Adipose derived stem cells; Stromal vascular fraction gel; Wound healing; Chronic wound; Case

**【背景】**

慢性创面多发于糖尿病足、静脉性溃疡、褥疮及深度创伤等疾病[1]为南昌大学第一附属医院整形外科常见疾病。目前，临床上针对慢性创面仍缺乏有效的治疗方法，其修复难点在于新生血管较正常创面少，创面局部血液供应不足，炎症因素持续存在等[2]。研究表明，脂肪来源干细胞（adipose-derived stem cells, ADSCs）因具有自我更新和分化为各系组织细胞的能力，还可旁分泌多种促进血管新生的生长因子，较其他成体干细胞更易获取，储量丰富，较少涉及伦理问题，被广泛地运用到缺血性疾病的治疗[3, 4]。但是单纯的将ADSCs移植注射到创伤区域因缺乏细胞外基质（ECM）的保护，会出现细胞大量的流失和死亡，导致ADSCs在创面愈合过程中发挥的作用有限[5, 6]。因此，寻找到一种高效、可控的方法在临床治疗研究领域应对以上问题显得尤为重要。  SVF-gel是将脂肪组织中的成熟脂肪细胞最大程度的破坏而获取富含有脂肪来源干细胞和ECM的混合物[7]。有研究证实：将SVF-gel局部移植到大鼠缺血性皮瓣，可上调VEGF（血管内皮生长因子）和bFGF（碱性成纤维细胞生长因子）表达，促进皮瓣血管的新生[8]。本实验案例总结归纳SVF-gel对糖尿病鼠慢性创面的促进愈合作用的机制，为SVF-gel治疗慢性创面的优越性提供更有价值的依据。本课题组组近年来一直从事有关脂肪组织来源干细胞及脂肪移植相关的研究，负责人文辉才博士熟练掌握了分子生物学方面的理论知识和操作技术，细胞培养、指标检测与分析等方面积累了丰富的研究经验。并将此案例教学引入实验教学课程,通过使用案例,培养研究生综合学习及应用知识的能力,全面提高研究生生的综合素质,推进实践性教学改革,实现教学质量的提升。

**【案例内容】课件详见PPT附件**

1 、材料与方法

1.1实验动物及主要试剂、仪器

8～9周龄SPF级SD大鼠，体重200～220g，由南昌大学医学院动物中心提供。链尿佐菌素（ STZ  sigma公司），柠檬酸（北京化工厂），柠檬酸钠（北京化工厂），水合氯醛（上海化工厂），CD34免疫组织化学试剂盒（中杉公司），Ⅰ型胶原酶（sigma 公司），PBS(Gibco公司），胎牛血清（Gibco公司），红细胞裂解液（sigma 公司），高糖DMEM培养基（Gibco公司），离心机（中科中佳科学仪器有限公司），吸脂针TonnardHarvesterTM(Tulip，美国），一次性螺旋口无菌注射器10ml(BD公司），无菌二通接头（BD公司），200目筛网（CORNING公司）

1.2 方法

1.2.1 人脂肪组织的获取   用吸脂针按照传统的吸脂术获取人脂肪组织。组织来源：脂肪组织来源于南昌大学第一附属医院整形外科行吸脂术的女性患者。

1.2.2  SVF-gel的制备 参照Yao等[9]方法：将抽脂术收获的脂肪组织以1200g离心3min，弃去下层液体部分，得到标准的coleman脂肪，收集上层的油脂备用。将coleman脂肪置入两个以内径为2.4mm直二通管相连的10ml螺旋口注射器中，以10ml/sec的推注速度反复推注2min，成乳糜状后过滤除去粗大的结缔组织，将0,5ml的油加入乳糜化的脂肪组织中，推注3-5次轻轻混合，再以2000g离心3min，弃去下层的液体以及上层大量的油脂，得到中间层凝胶样的物质即为SVF-gel。

1.2.3  SVF悬液的制备  收集抽脂术患者的的脂肪组织10ml，加入等体积0.1%Ⅰ型胶原酶消化液混匀，37恒温摇床中消化60min，离心，加入完全培养液终止消化，200目尼龙网过滤，离心去上清，完全培养液重悬细胞，加入红细胞裂解液，室温下孵育5min，离心，细胞沉淀加入完全培养基混悬后，200目尼龙网过滤，计数[10]。

1.2.4 糖尿病大鼠创面模型的建立及分组 SD雌性大鼠，适应性喂养2周后，禁食12h，按55mg/kg体质量剂量一次性腹腔内注射STZ（溶于0.1mmol/L柠檬酸缓冲液，pH4.4）72小时后，连续3次断尾取血，用血糖试纸测大鼠的血糖值均≥16.7mmol/L，糖尿病大鼠模型诱导成功[11]。将36只糖尿病鼠用10%水合氯醛按照0.3ml/kg体质量剂量作大鼠腹腔注射麻醉，待麻醉成功后，在大鼠背部两侧分别制作半径为0.6cm的圆形皮肤全层创面。随机分为A组（SVF-gel）组,B组（SVF悬液）,C组（生理盐水），每组共12只大鼠，A组创面周围注射1ml的SVF-gel，B组创面周围注射1ml的SVF悬液，C组创面周围注射同等剂量的生理盐水。治疗0d、3d、7d、10d、14d观察创面闭合情况，并于10d、14d每组取4只大鼠观察创面组织学变化。

1.3观察指标

1.3.1不同时间三组动物创面愈合大小  每组各随机抽取4只大鼠观察拍照，每只大鼠2个创面，每组共8个创面用来记录各观察时间点创面愈合情况。数码相机拍照后采用Image Proplus6.0图像分析系统测量创面面积，计算创面愈合率。创面愈合率=（创面初始面积－创面形成后第n天后的面积）/创面初始面积

1.3.2 组织学观察  治疗后14d，腹腔注射麻醉大鼠，取创面及其周围2mm组织，4%多聚甲醛固定，梯度酒精脱水，常规石蜡包埋切片，取部分切片行HE染色，镜下观察创面组织内炎症细胞浸润情况，创面内新生血管的形成，肉芽组织生长和再上皮化情况等。

1.3.3 免疫组织化学染色观察 取部分切片按照CD34免疫组织化学染色试剂盒说明书进行染色，光镜下观察血管形成情况，以棕黄色为阳性染色。

1.4.统计学处理 采用spss17.0统计软件进行统计学分析。数据结果以*x*±*s*表示。组间比较采用配对样本*t*检验，多个样本均数多重比较采用SNK方差分析，以*P*≤0.05为差异有统计学意义。

2.结果

2.1 大体观察结果  所有SD大鼠术后分笼饲养。常规观察，术后无死亡全部成活。术后3d拆去敷料后三组创面无血肿、感染及其他不良反应。移植7d后，三组创面表层都被淡红色或者暗红色的痂皮覆盖，揭去血痂后，A组创面肉芽组织生长良好，颜色鲜红，湿润，触之易出血；B组创面内也可见肉芽组织生成，未见液体渗出；C组创面肉芽组织生长缓慢，颜色略暗，部分表面尚有渗出。第10d时，A组创面面积较其它两组显著减小，再上皮化程度明显，C组创面愈合较缓慢，表面仍有部分血痂及少许渗出。第14d，A组创面几乎完全愈合，B组创面部分愈合，表面有薄层的上皮覆盖，C组创面愈合最差，创面面积明显大于A、B两组，见图1。      



2.2创面愈合率的比较

用Image-Proplus图像分析软件计算不同时间点的创面面积并计算出各个创面的创面愈合率。A、B组创面愈合率在3d、7d、10d、14d都比C组大，差别具有统计学意义（*P*＜0.05），A组创面愈合率在各个时间点都比B、C两组大，差别具有统计学意义（*P*＜0.05），见表1

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 表1： 各组不同时间点创面愈合率比较 （n=8,ｘ±ｓ) | | | | |
|  | 伤后各时间点创面愈合率（%） | | | |
| 组别 | 3d | 7d | 10d | 14d |
| A 组 | 35.6±3.92 | 71.56±4.35 | 90.68±3.51 | 98.32±3.43 |
| B组 | 30.1±4.73 | 64.81±4.59 | 80.40±3.25 | 92.05±2.65 |
| C 组 | 21.3±3.00 | 27.32±2.55 | 57.42±4.30 | 86.04±3.86 |
|  |  |  |  |  |

2.3组织病理学观察

取14d的组织切片进行HE染色可见：C组创面内有大量炎症细胞浸润和成纤维细胞，细胞排列紊，新生血管少，肉芽组织结构疏松，再上皮化不完整，。A组与C组相比，炎症细胞浸润减少，真皮毛细血管数量明显增多，再上皮化程度明显，肉芽组织结构致密。B组与C组相比，炎症细胞浸润减少，较多的胶原纤维及毛细血管，再上皮化较完整，但不及A组。见图2。

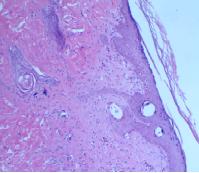


图2 gel组，SVF组，对照组创面组织HE染色（×200）

A，B，C分别为SVF-gel组，SVF悬液组，对照组10d创面HE染色，A组可见完整的再上皮化，浸润的炎症细胞较少，真皮毛细血管数量明显多于对照组；C组创面可见大量的炎症细胞浸润，再上皮化不完整及真皮毛细血管数量少；B组介于两者之间。

2.4 免疫组织化学染色观察  治疗后10d，3组创面肉芽组织内均有垂直于创面的新血管生成。A、B两组新生血管数量多于C组，部分新生血管尚无明显的管腔结构，血管断层仅有单个内皮细胞。14d后，创面内血管的数量均较10d明显增加。A组、B组创面内均可见较多具有成熟管腔的新生血管，而C组较少。见图3。

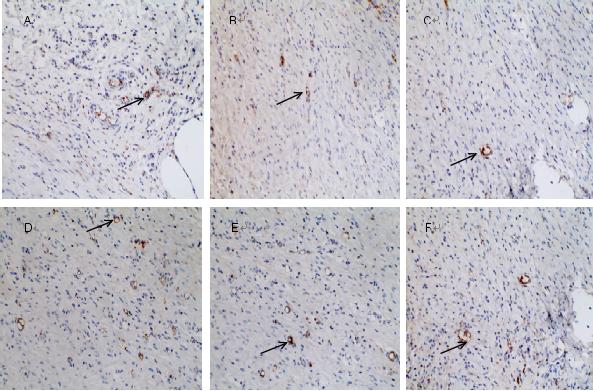


图3  A组，B组，C组创面CD34的表达（×200）

A，B，C分别为gel组，SVF组，对照组10d染色

D，E，F分别为gel组，SVF组，对照组14d染色

gel组在10d和14d时血管内皮细胞表达CD34均较其他两组多

3.思考

正常情况下，创面组织的愈合是通过一个及时有序的连续过程来恢复组织功能与解剖的完整性。当创面受到内外因素的影响，这种有序的过程会受到干扰，使创面一直停留在病理炎症反应状态，导致创面迁延不愈[12]。血管再生是创面修复的重要环节，血管新生速度减慢或者功能降低都有可能导致局部血液循环不良，周围组织缺血缺氧。这样不仅会损害人体抵抗细菌的防御系统，使创面对感染的易感性增加，而脂肪基质血管凝胶中的血管基质部分（SVF）是一个ADSC与其他细胞成分相混杂的群体，包括血管内皮细胞，基质细胞，血管平滑肌细胞，周细胞以及大量血液循环来源的细胞等[14, 15]。实验研究证实，SVF可以在创面组织内直接分化成各种修复细胞如血管内皮细胞，成纤维细胞和表皮细胞等，还可分泌出多种生物活性分子如血管内皮生长因子（VEGF）、肝细胞生长因子（HGF）、成纤维细胞生长因子（FGF）等，促进血管生成和创面再上皮化，减少炎症和细胞凋亡，参与创面的损伤修复，实现创面加速愈合过程[16-18]。SVF-gel是脂肪抽吸物经简单的机械方法处理获取的凝胶状物质，其含有高度浓缩的近似生理状态下的脂肪组织ECM和SVF。ECM可为SVF提供生物型的细胞支架，其包含了胶原蛋白，纤维蛋白、弹性蛋白和蛋白聚糖，为细胞提供良好的微环境，调节细胞的行为，促进细胞的增殖和分化潜能，同时也可保护细胞免遭巨噬细胞的吞噬，使其能在创面处充分地发挥治疗作用[19, 20]。

脂肪来源干细胞是目前治疗慢性创面的新趋势，但脂肪来源干细胞的提取，无风险的应用于临床还存在较大的难处，而可注射式纳米脂肪基质血管凝胶中富含脂肪来源干细胞及其他利于创面愈合的各种成分，为脂肪来源干细胞的一种良好的替代品，但充分了解其中的机制及原理技术难度大，学习曲线长，对整形外科研究生充分掌握来说有一定难度，而实验案例的建设，简单明了的讲解与呈现，能缩短研究生的学习时间，并未下一步试验提供技术支持及理论基础，为下一步试验的进行提供思路。让可注射式纳米脂肪基质血管凝胶能更安全广泛地运用于慢性创面。

**References:**

 [1].       廖新成, 慢性难愈性创面的分类鉴别及临床评估. 中华损伤与修复杂志, 2017. 12(4): 第303-305页.

 [2].       Demidova-Rice, T.N., J.T. Durham and I.M. Herman, Wound Healing Angiogenesis: Innovations and Challenges in Acute and Chronic Wound Healing. Adv Wound Care (New Rochelle), 2012. 1(1): p. 17-22.

 [3].       Zhi, K., et al., Application of adipose-derived stem cells in critical limb ischemia. Front Biosci (Landmark Ed), 2014. 19: p. 768-76.

 [4].       Bura, A., et al., Phase I trial: the use of autologous cultured adipose-derived stroma/stem cells to treat patients with non-revascularizable critical limb ischemia. Cytotherapy, 2014. 16(2): p. 245-57.

 [5].       Cheng, N.C., S. Wang and T.H. Young, The influence of spheroid formation of human adipose-derived stem cells on chitosan films on stemness and differentiation capabilities. Biomaterials, 2012. 33(6): p. 1748-58.

 [6].       Arana, M., et al., Epicardial delivery of collagen patches with adipose-derived stem cells in rat and minipig models of chronic myocardial infarction. Biomaterials, 2014. 35(1): p. 143-51.

 [7].       Sun, M., et al., Adipose Extracellular Matrix/Stromal Vascular Fraction Gel Secretes Angiogenic Factors and Enhances Skin Wound Healing in a Murine Model. Biomed Res Int, 2017. 2017: p. 3105780.

 [8].       Zhang, P., et al., Ischemic flap survival improvement by composition-selective fat grafting with novel adipose tissue derived product - stromal vascular fraction gel. Biochem Biophys Res Commun, 2018. 495(3): p. 2249-2256.

 [9].       Yao, Y., et al., Adipose Extracellular Matrix/Stromal Vascular Fraction Gel: A Novel Adipose Tissue-Derived Injectable for Stem Cell Therapy. Plast Reconstr Surg, 2017. 139(4): p. 867-879.

[10].       Alharbi, Z., et al., Conventional vs. micro-fat harvesting: how fat harvesting technique affects tissue-engineering approaches using adipose tissue-derived stem/stromal cells. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2013. 66(9): p. 1271-8.

[11].       郭蔚莹等, 碱性成纤维细胞生长因子对糖尿病大鼠创面愈合的影响. 中国实验诊断学, 2008(03): 第315-318页.

[12].       Bjarnsholt, T., et al., Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. Wound Repair Regen, 2008. 16(1): p. 2-10.

[13].       Zhao, R., et al., Inflammation in Chronic Wounds. Int J Mol Sci, 2016. 17(12).

[14].       Bora, P. and A.S. Majumdar, Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: a brief review on biology and translation. Stem Cell Res Ther, 2017. 8(1): p. 145.

[15].       Gimble, J.M., et al., Concise review: Adipose-derived stromal vascular fraction cells and stem cells: let's not get lost in translation. Stem Cells, 2011. 29(5): p. 749-54.

[16].       Tan, S.S., et al., Stromal vascular fraction promotes fibroblast migration and cellular viability in a hyperglycemic microenvironment through up-regulation of wound healing cytokines. Exp Mol Pathol, 2018.

[17].       Chae, D.S., et al., Stromal vascular fraction shows robust wound healing through high chemotactic and epithelialization property. Cytotherapy, 2017. 19(4): p. 543-554.

[18].       Zimmerlin, L., et al., Human adipose stromal vascular cell delivery in a fibrin spray. Cytotherapy, 2013. 15(1): p. 102-8.

[19].       Choi, J.S., et al., In vitro cartilage tissue engineering using adipose-derived extracellular matrix  scaffolds seeded with adipose-derived stem cells. Tissue Eng Part A, 2012. 18(1-2): p. 80-92.

[20].       Wang, X., et al., Preparation and Characterization of a Chitosan/Gelatin/Extracellular Matrix Scaffold and Its Application in Tissue Engineering. Tissue Eng Part C Methods, 2017. 23(3): p. 169-179.