

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.16.004

网络首发 <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220506.1616.002.html>(2022-05-06)

ECM/SVF-gel 对比 Coleman 脂肪治疗糖尿病大鼠创面的效果与机制研究

赵文懿^{1,2}, 杨中玉^{1,2}, 孙晓涵¹, 宋培军¹, 徐 静^{1△}

(1. 蚌埠医学院第一附属医院整形外科, 安徽蚌埠 233000; 2. 蚌埠医学院组织移植实验室, 安徽蚌埠 233000)

[摘要] 目的 对脂肪来源干细胞基质胶(ECM/SVF-gel)与 Coleman 脂肪治疗糖尿病大鼠创面的疗效进行对比,并探讨 ECM/SVF-gel 促进创面愈合的作用机制。方法 选取体重 250~300 g 的 SD 雄性大鼠 10 只,腹腔注射链脲佐菌素进行糖尿病造模,成功后以直径 10 mm 的组织活检器于大鼠背部制备 2 个全层皮肤缺损创面,将预先制备好的同种异体 Coleman-条件培养基(CM)和 ECM/SVF-gel-CM 分别注射于 2 个创面,每个创面各注射 100 μ L,分别命名 A 组、B 组。记录各创面术后第 3、7、10、14 天愈合情况并计算对比创面愈合率,并在术后第 7、14 天取创面皮肤组织进行 CD34 免疫组织化学染色,运用酶联免疫吸附试验试剂盒检测并对比 Coleman-CM 和 ECM/SVF-gel-CM 生长因子——表皮细胞生长因子(EGF)、碱性成纤维生长因子(bFGF)、血管内皮生长因子(VEGF)和转化生长因子(TGF- β 1)表达水平。结果 与 A 组创面比较,B 组创面各时间点愈合情况均更好,创面愈合率更高,差异有统计学意义($P<0.05$),新生血管更多;B 组 ECM/SVF-gel-CM 生长因子——EGF、bFGF、VEGF、TGF- β 1 表达水平均高于 A 组,其中 EGF、bFGF、VEGF 表达水平比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 与 Coleman 脂肪比较,ECM/SVF-gel 促进糖尿病大鼠创面愈合的效果更优,其作用机制可能为通过旁分泌途径分泌生长因子作用于创面。

[关键词] 脂肪来源干细胞基质胶;科尔曼脂肪;糖尿病;创面;动物实验**[中图分类号]** R62**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2022)16-2719-04

Study on effect and mechanism of ECM/SVF-gel compared with Coleman fat in treatment of wound of diabetic rats

ZHAO Wenyi^{1,2}, YANG Zhongyu^{1,2}, SUN Xiaohan¹, SONG Peijun¹, XU Jing¹

(1. Department of Plastic Surgery, First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College,

Bengbu, Anhui 233000, China; 2. Tissue Transplantation Laboratory,

Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui 233000, China)

[Abstract] **Objective** To compare the effect of ECM/SVF-gel and Coleman fat in the treatment of diabetic rat wound, and to explore the mechanism of ECM/SVF-gel in promoting the wound healing. **Methods** Ten SD male rats with body weight of 250-300 g were selected, after successfully constructing the diabetic molding by intraperitoneal injection of STZ, two full-layer skin defect wounds were made in the back of the rats by the tissue biopsy instrument with a diameter of 10 mm, and the pre-prepared allogeneic Coleman-CM and ECM/SVF-gel-CM were injected in two wounds respectively, 100 μ L at each wound. On postoperative 3, 7, 10, 14 d, the healing situation of each wound was recorded respectively, the wound healing rate was calculated and compared, and the wound skin tissue was taken on postoperative 7, 14 d for conducting the CD34 immunohistochemical staining, and the ELISA kit was used to detect and compare the expression levels of growth factors EGF, bFGF, VEGF, and TGF- β 1 in Coleman-CM and ECM/SVF-gel-CM between Coleman-CM and ECM/SVF-gel-CM. **Results** Compared with the wounds injected with Coleman-CM, the healing situation of wounds injected with ECM/SVF-gel-CM was better at each time point, the wound healing rate was higher, and the differences were statistically significant ($P<0.05$), and there were more neovascularization. The expression levels of growth factors EGF, bFGF, VEGF and TGF- β 1 in ECM/SVF-gel-CM were higher than those in Coleman-CM, in which the expression levels of EGF, bFGF and VEGF had statistically significant difference ($P<0.05$). **Conclusion** Compared with Coleman fat, the effect of ECM/SVF-gel for promoting wound healing in diabetic rats is more superior, and its mechanism may secrete the growth factors to act on the wound through paracrine pathway.

[Key words] ECM/SVF-gel; Coleman fat; diabetes mellitus; wound; animal experiment

脂肪来源于干细胞基质胶(ECM/SVF-gel)是一种对脂肪进行简单的物理机械处理后获得的凝胶状物质,制作过程中无外源性物质的添加,同时,含有高浓度的具有生物活性的细胞外基质(extracellular matrix,ECM)和血管基质组分(stromal vascular fraction,SVF)^[1]。基于 Coleman 脂肪的制作过程,ECM/SVF-gel 只需在 Coleman 脂肪的基础上再进行简单的破碎和离心即可获得,其制备过程中的破碎与离心步骤使脂肪组织中的成熟脂肪细胞被最大限度地破坏,从而获得了富含脂肪来源干细胞(adipose derived stem cells,ADSCs)和 ECM 的混合物^[2-3]。已有研究证实,ECM/SVF-gel 可上调组织中生长因子——碱性或纤维生长因子(bFGF)和血管内皮生长因子(VEGF)表达水平,促进大鼠缺血性皮瓣中血管再生^[4]。本研究对 ECM/SVF-gel 与 Coleman 脂肪治疗糖尿病大鼠创面的疗效进行了对比,并对 ECM/SVF-gel 的作用机制进行了初步探讨,旨在为临床应用 ECM/SVF-gel 治疗糖尿病导致的创面提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物来源

糖尿病造模选用 14 只 300~350 g 的 SD 大鼠,雄性,8~9 周龄;脂肪供体鼠选用 5 只 350~400 g 的 SD 大鼠,雌性,6~8 周龄;实验用鼠均购于山东省实验动物中心。实验过程中对动物的处置均符合动物伦理学标准。

1.1.2 主要试剂

特级胎牛血清(FBS)购自澳洲 CLARK 公司,杜氏改良 Eagle 培养基(DMEM)/F12 培养基、高糖 DMEM 培养基、磷酸盐缓冲液(PBS)均购自美国 HyClone 公司;4%多聚甲醛、青霉素-链霉素双抗均购自北京 Biosharp 公司,链脲佐菌素(STZ)、柠檬酸、柠檬酸钠均购自上海 Yeason 公司,4%多聚甲醛、石蜡、中性树脂均购自北京 Solarbio 公司;无水乙醇、二甲苯、水合氯醛均购自上海 Macklin 公司,大鼠表皮细胞生长因子(epidermal growth factor,EGF)、bFGF、VEGF 和转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$,TGF- $\beta 1$)的酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒均购自上海酶联生物科技有限公司。

1.1.3 仪器及耗材

100、40 μm 滤网,0.22 μm 滤芯均购自美国 Biotologix 公司,2.4 mm 鲁尔连接器购自黑龙江四海医疗,10 mL 注射器购自上海 KDL 公司,超净工作台购自蚌埠新科净化设备厂,手术器械购自河南美邦医疗器械,石蜡包埋机购自孝感宏业医用仪器公司,切片机(RM2245)购自德国 LEICA 公司,移液枪购自德国 Eppendorf 公司,高速离心机(Multifuge X1R)、细胞培养箱均购自美国 Thermo 公司。

1.2 方法

1.2.1 Coleman 脂肪和 ECM/SVF-gel 的制备

将体重 350~400 g 的 SD 大鼠麻醉后脱毛,用聚维酮碘消毒;无菌手术器械取大鼠腹股沟处脂肪,用无菌 PBS 反复冲洗,去除血液;移入无菌培养皿中,反复用剪刀剪切脂肪组织约 3 min;加入适量无菌 PBS,672 r/min 离心 3 min,将位于底层的水及结缔组织去除,位于中层的脂肪组织即为所需的 Coleman 脂肪。离心去水的脂肪组织按密度大小分为高、低密度脂肪组织,位于离心管中上 2/3 的组织为低密度脂肪组织,位于下 1/3 的组织为高密度脂肪组织。以内径为 2.4 mm 的鲁尔连接器连接 2 个 10 mL 注射器,将低密度脂肪组织置入,推注速度保持恒定(10 mL/s),反复推注约 2 min,通过机械方式使脂肪乳糜化;推注完成后脂肪呈乳糜状;将高密度脂肪与推注完成后的低密度脂肪混合均匀,置于以内径为 2.4 mm 的鲁尔连接器连接的 2 个 10 mL 注射器中,再次互相推注约 30 s 后 1 200 r/min 离心 3 min,可见上层有大量的油,底层则可见有少量的水,以上二者皆弃去,离心管中余下的位于油层之下的凝胶样物质即为所需的 ECM/SVF-gel^[5-6],见图 1。

1.2.2 生长因子的收集

SVF 细胞数以 5×10^5 为基线,准备相应质量的 ECM/SVF-gel 及 Coleman 脂肪。将计算好相应质量的 2 种不同的脂肪组织制品分别移入 T25 培养瓶中,每个培养瓶中各添加 5 mL 完全培养基(含 10% FBS),将培养瓶置于含有 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 24 h。24 h 后为获得条件培养基(conditioned medium,CM)以 DMEM/F12 培养基(无 FBS)将培养瓶中的完全培养基全部替换,培养 24 h;24 h 后分别收集培养瓶中的上清液,依次通过 100、40 μm 滤网,去除细胞及组织碎片;收集滤液,168 r/min 离心 5 min,离心后的上清液通过 0.22 μm 滤芯过滤除菌;移入冻存管中,置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱储存备用。

1.2.3 建立糖尿病大鼠模型

选取体重 300~350 g 的 SD 雄性大鼠 14 只,适应性饲养 1 周后禁食不禁饮,12 h 后按 55 mg/kg 一次性腹腔注射 1% 的 STZ 溶液。注射 1 周后检测大鼠血糖变化。空腹血糖超过 16.8 mmol/L,发生多饮、多尿、多食、体重减轻等即可确定为建模成功。

1.2.4 建立大鼠创面模型及条件培养基的干预

取建模成功的糖尿病大鼠(14 只)采用戊巴比妥腹腔麻醉,以直径 10 mm 的组织活检器在大鼠背部制作直径 10 mm 的全层皮肤缺损创面,每只大鼠 2 个创面;预先制备直径 1 cm 的环形硅胶片置于创面,再使用 4-0 尼龙线缝合 4~6 针,以防止创周皮肤在早期便严重皱缩,影响观察,见图 2。

将 14 只大鼠分为 A 组(Coleman-CM)和 B 组(ECM/SVF-gel-CM),将每只大鼠背部的 2 个创面按

随机法进行随机分配,做好标记,2 个创面分别注射 A 组(Coleman-CM)与 B 组(ECM/SVF-gel-CM),每个创面注射 100 μ L,其中 20 μ L 注射在创面基底,80 μ L 注射在创面周围(4 个点,每个点 20 μ L);注射完毕后以无菌敷贴包裹创面,单笼喂养。术后连续 2 d 给予青霉素皮下注射,预防感染。

1.2.5 观察指标

1.2.5.1 大体观察

对 14 只大鼠术后即刻,3、7 d,以及 10 只大鼠术后 10、14 d 进行创面观察和拍照,对比观察创面愈合情况。

1.2.5.2 创面愈合率

通过 Image J 软件测量 14 只大鼠背部创面术后即刻,3、7 d,以及 10 只大鼠术后 10、14 d 创面面积,创面愈合率=(创面初始面积-剩余创面面积)/创面初始面积 $\times$ 100%。

1.2.5.3 免疫组织化学染色观察

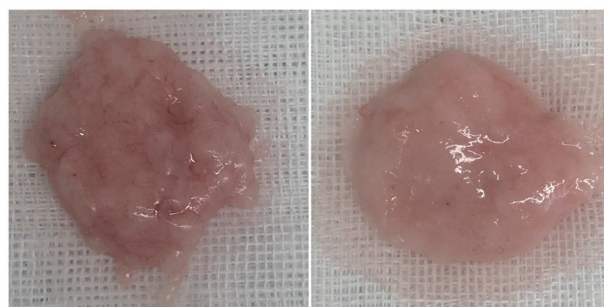
术后 7 d 随机挑选 4 只大鼠处死,术后 14 d 处死剩余 10 只大鼠,取创面皮肤组织制作切片,进行 CD34 免疫组织化学染色,镜下观察新生血管形成情况,阳性染色显示为棕色,通过 Image J 软件将各组样本的阳性染色结果进行分离,并分析比较各组阳性染色比例。

1.2.5.4 生长因子检测

按照 ELISA 试剂盒的实验步骤,检测 2 种条件培养基(CMs)中的 4 种生长因子——EGF、bFGF、VEGF、TGF- β 1 表达水平。

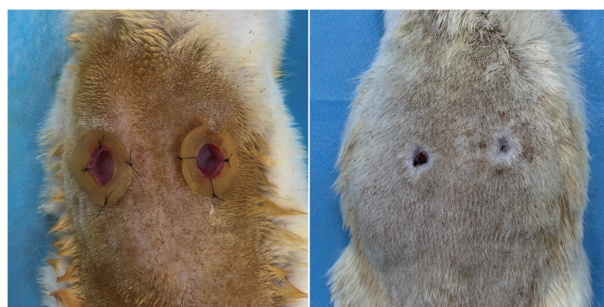
1.3 统计学处理

采用 SPSS25.0 软件进行统计分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Wilcoxon 秩和检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。



左: Coleman 脂肪;右: ECM/SVF-gel;肉眼观察,与 Coleman 脂肪比较,ECM/SVF-gel 质地更加细腻、光滑。

图 1 Coleman 脂肪和 ECM/SVF-gel 的制备



左:术后即刻;右:术后 14 d,可见位于右侧的注射 ECM/SVF-gel-CM 的创面,相比位于左侧的注射 Coleman-CM 的创面,愈合情况更为良好,已近乎完全愈合。

图 2 大鼠创面模型

2 结 果

2.1 创面愈合率

B 组创面愈合率均明显高于 A 组,A 组术后 14 d 创面愈合率为 $(82.04 \pm 3.84)\%$,B 组创面愈合率则达到了 $(95.54 \pm 3.57)\%$,创面基本已全部上皮化。两组术后 3、7、10、14 d 创面愈合率比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见图 3、表 1。

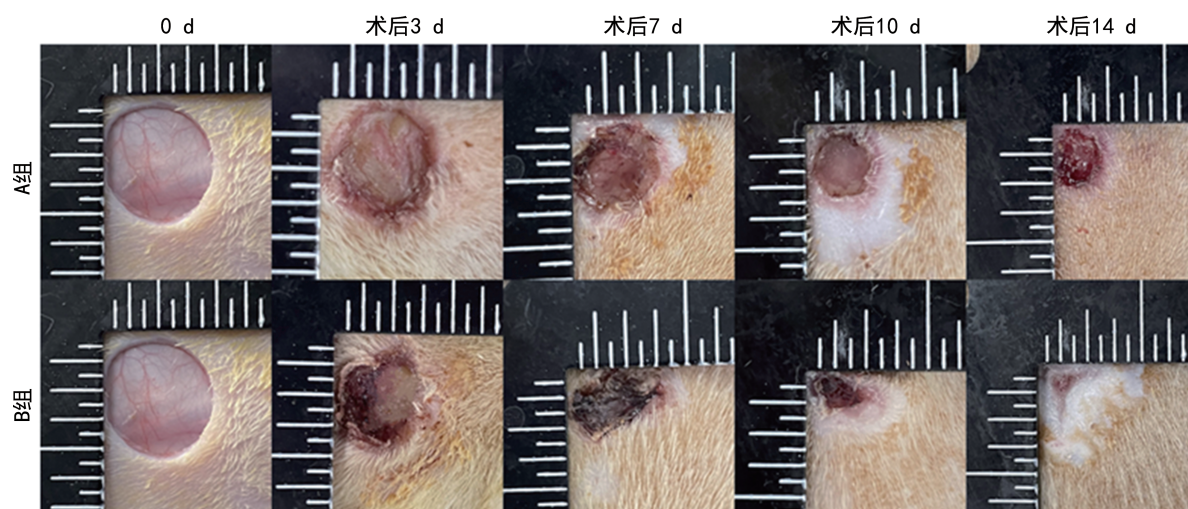


图 3 两组糖尿病鼠的创面各个时间点的代表照片

2.2 CD34 免疫组织化学染色结果

两组术后 7 d 创面内均出现了新生血管,B 组阳

性染色比例为 19.304% ,A 组为 14.276% ,B 组新生血管生成较 A 组多;两组术后 14 d 新生血管数量均

有不同程度增长,B 组阳性染色比例为 32.726%,A 组为 26.155%,B 组术后 7、14 d 新生血管生成均较 A 组多,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 4。

表 1 不同时间点各组创面愈合率比较($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	3 d	7 d	10 d	14 d
A 组	30.99 $\pm$ 5.03	42.98 $\pm$ 8.38	61.12 $\pm$ 12.63	82.04 $\pm$ 3.84
B 组	37.99 $\pm$ 5.81 ^a	60.49 $\pm$ 6.73 ^a	82.21 $\pm$ 3.85 ^a	95.54 $\pm$ 3.57 ^a

^a: $P<0.05$,与 A 组比较。

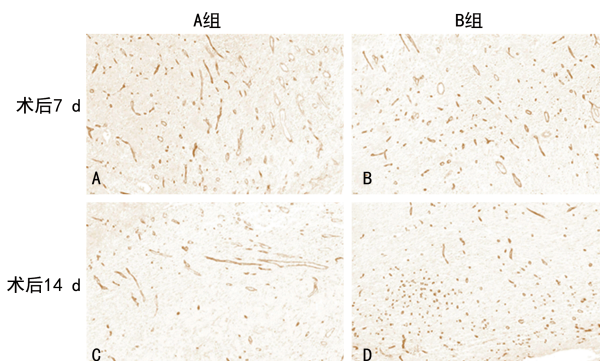


图 4 创面组织 CD34 免疫组织化学染色图($\times 20$)

2.3 生长因子表达水平

A 组 EGF、bFGF、VEGF、TGF- β 1 表达水平均低于 B 组。其中 EGF、bFGF、VEGF 表达水平比较,差异均有统计学意义($P<0.05$);TGF- β 1 表达水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

表 2 ELISA 检测 2 组 CMs 中生长因子水平($\bar{x}\pm s, \text{pg/mL}$)

组别	EGF	bFGF	VEGF	TGF- β 1
A 组	3.35 $\pm$ 2.00	4.73 $\pm$ 3.30	133.28 $\pm$ 87.82	14.28 $\pm$ 7.23
B 组	14.39 $\pm$ 12.53 ^a	11.75 $\pm$ 5.97 ^a	414.39 $\pm$ 37.41 ^a	23.77 $\pm$ 14.03

^a: $P<0.05$,与 A 组比较。

3 讨 论

以 Coleman 脂肪的制作过程为基础,ECM/SVF-gel 是在经过后续的机械破碎和离心后获得的含有高度浓缩的、具生物活性且近似于生理状态下的 ECM、SVF 和 ADSCs 的凝胶状的可注射材料,相比于含有相同 SVF 细胞数的 Coleman 脂肪,ECM/SVF-gel 中浓缩的 ECM(胶原蛋白、纤维蛋白和弹性蛋白等)更多,从而起到了为 ADSCs 提供适宜生存的微环境的作用,同时,通过调节细胞行为,促进细胞增殖,激活细胞的分化潜能,促进更多的生长因子分泌,并免于巨噬细胞的吞噬^[1-3]。

在本研究进行 ELISA 检测的 4 种生长因子中,EGF 可促进上皮细胞、成纤维细胞增殖;bFGF 可促进血管生成;VEGF 可促进血管内皮细胞迁移、增殖,并促进新生血管形成;TGF- β 1 在促进各类 ECM(如胶原蛋白、纤粘连蛋白等)表达的同时,也能够抑制降解^[7-11]。

本研究应用的条件培养基(CM)本质即为干细胞的旁分泌产物,其中包括各种生长因子、免疫因子和

外泌体。经检测上述 4 种生长因子在 Coleman-CM 和 ECM/SVF-gel-CM 中均有不同程度的表达,ECM/SVF-gel-CM 中 EGF、bFGF、VEGF 水平均明显高于 Coleman-CM,差异均有统计学意义($P<0.05$),证实了相较于 Coleman 脂肪,ECM/SVF-gel 能分泌更多的生长因子——EGF、bFGF 和 VEGF,并以旁分泌的途径作用于创面;虽然 ECM/SVF-gel-CM 中 TGF- β 1 水平仍高于 Coleman-CM,但差异无统计学意义($P>0.05$);造成该生长因子水平差异无统计学意义的原因可能为检测时样品在低温冷冻中储存时间过长,造成了一定数量的生长因子失活或是多次检测过程中反复的冷冻和复苏导致样品中生长因子的失活^[12]。

本研究将等量的 2 种 CM 分别注射至糖尿病大鼠背部创面,B 组术后 3、7、10、14 d 创面愈合率均明显高于 A 组,差异均有统计学意义($P<0.05$);A 组术后 14 d,创面愈合率为(82.04 $\pm$ 3.84)%,B 组创面愈合率则达到了(95.54 $\pm$ 3.57)%,差异有统计学意义($P<0.05$),符合 ELISA 检测的结果。同时,CD34 免疫组织化学染色结果显示,与 A 组比较,B 组术后 7、14 d 阳性染色结果更多,即 B 组新生血管数量在术后 7、14 d 均比 A 组更多,同样符合 ELISA 检测的结果。

综上所述,与 Coleman 脂肪比较,ECM/SVF-gel 促进糖尿病大鼠创面愈合的效果更突出,其作用机制为通过旁分泌途径分泌更高浓度的生长因子(EGF、bFGF、VEGF 等)作用于创面,促进创面部位生成新生血管,加速创面愈合;ECM/SVF-gel 作为一种经机械破碎、浓缩自 Coleman 脂肪的制品具有局部注射用于修复慢性创面的潜力,为今后临床应用 ECM/SVF-gel 治疗各类创面,尤其是糖尿病患者肢体创面等难愈性创面提供了新的思路。

参考文献

- [1] YAO Y, DONG Z, LIAO Y, et al. Adipose extracellular matrix/stromal vascular fraction gel: a novel adipose tissue-derived injectable for stem cell therapy [J]. Plast Reconstr Surg, 2017, 139(4): 867-879.
- [2] ZUK P A, ZHU M, MIZUNO H, et al. Multi-lineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies [J]. Tissue Eng, 2001, 7(2): 211-228.
- [3] ZHAO L, JOHNSON T, LIU D. Therapeutic angiogenesis of adipose-derived stem cells for ischemic diseases [J]. Stem Cell Res Ther, 2017, 8(1): 125.
- [4] ZHANG P, FENG J, LIAO Y, et al. Ischemic flap survival improvement by composition-selective fat grafting with novel (下转第 2729 页)

- (6):4959-4966.
- [17] DENG X, ZUO M, PEI Z, et al. MicroRNA-455-5p contributes to cholangiocarcinoma growth and mediates galangin's Anti-Tumor effects[J]. J Cancer, 2021, 12(15):4710-4721.
- [18] XING Q, XIE H, ZHU B, et al. MiR-455-5p suppresses the progression of prostate cancer by targeting CCR5[J]. Biomed Res Int, 2019, 2019:6394784.
- [19] SHOSHAN E, MOBLEY A K, BRAEUER R R, et al. Reduced adenosine-to-inosine miR-455-5p editing promotes melanoma growth and metastasis[J]. Nat Cell Biol, 2015, 17(3):311-321.
- [20] SAND M, SKRYGAN M, SAND D, et al. Expression of microRNAs in basal cell carcinoma[J]. Br J Dermatol, 2012, 167(4):847-855.
- [21] CHIA W J, TANG B L. Emerging roles for Rab family GTPases in human cancer[J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1795(2):110-116.
- [22] DONG Q, FU L, ZHAO Y, et al. Rab11a promotes proliferation and invasion through regulation of YAP in non-small cell lung cancer[J]. Oncotarget, 2017, 8(17):27800-27811.
- [23] AMORNPHIMOLTHAM P, RECHACHE K, THOMPSON J, et al. Rab25 regulates invasion and metastasis in head and neck cancer[J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(6):1375-1388.
- [24] JI X, GUO X, WANG Y, et al. Rab18 regulates proliferation, invasion and cisplatin sensitivity through STAT3 signaling in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Onco Targets Ther, 2020, 13(13):4123-4134.
- [25] GONG T, ZHOU B, LIU M, et al. RAB18 promotes proliferation and metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. Am J Transl Res, 2019, 11(2):1009-1019.
- [26] WU B, QI R, LIU X, et al. Rab18 overexpression promotes proliferation and chemoresistance through regulation of mitochondrial function in human gastric cancer[J]. Onco Targets Ther, 2018, 11:7805-7820.
- [27] ZHONG K, CHEN K, HAN L, et al. microRNA-30b/c inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation by targeting Rab18[J]. BMC Cancer, 2014, 14(1):703.

(收稿日期:2021-12-18 修回日期:2022-03-08)

(上接第 2722 页)

- adipose tissue derived product-stromal vascular fraction gel[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 495(3):2249-2256.
- [5] 姚尧. SVF-gel:一种高浓度脂肪来源干细胞基质胶的实验研究及临床应用[D]. 广州:南方医科大学, 2017.
- [6] 邓呈亮. 脂肪来源干细胞基质胶促进慢性创面愈合的基础和临床研究[D]. 广州:南方医科大学, 2018.
- [7] 唐林平, 刘惠铂, 蒋亚楠, 等. 脂肪来源基质血管组分对难愈性创面愈合的影响[J]. 江苏医药, 2015, 41(8):912-914.
- [8] RAPOSIO E, BERTOZZI N, BONOMINI S, et al. Adipose-derived Stem Cells Added to Platelet-rich Plasma for Chronic Skin Ulcer Therapy[J]. Wounds, 2016, 28(4):126-131.
- [9] CHAE D S, HAN S, SON M, et al. Stromal vascular fraction shows robust wound healing through high chemotactic and epithelialization property[J]. Cytotherapy, 2017, 19(4):543-554.
- [10] LI Q, GUO Y P, CHEN F F, et al. Stromal cell-derived factor-1 promotes human adipose tissue-derived stem cell survival and chronic wound healing[J]. Exp Ther Med, 2016, 12(1):45-50.
- [11] CHOI J S, KIM B S, KIM J D, et al. In vitro cartilage tissue engineering using adipose-derived extracellular matrix scaffolds seeded with adipose-derived stem cells[J]. Tissue Eng Part A, 2012, 18(1/2):80-92.
- [12] FENG J, HU W, FANAI M L, et al. Mechanical process prior to cryopreservation of lipoaspirates maintains extracellular matrix integrity and cell viability; evaluation of the retention and regenerative potential of cryopreserved fat-derived product after fat grafting[J]. Stem Cell Res Ther, 2019, 10(1):283.

(收稿日期:2021-12-18 修回日期:2022-04-08)