

脂肪来源干细胞(ADSC)在脂肪移植中的应用

李云竹 杨伊兰 梁铮韵 龙笑

摘要 自体脂肪移植是整形外科一个常见的手术,临床应用广泛。然而,移植脂肪的存活率具有很大的不确定性。脂肪来源干细胞(adipose-derived stem cell, ADSC)是近年来从脂肪组织中发现的一类具有多功能分化能力的干细胞。ADSC能够在自体脂肪移植中起到辅助作用,增加脂肪存活率,这一技术又叫做细胞辅助脂肪移植术(cell-assisted lipotransfer, CAL)。本文对CAL的现状进行综述,为ADSC在脂肪移植中的临床应用和基础研究提供参考。

关键词 脂肪来源干细胞 脂肪移植 细胞辅助脂肪移植

中图分类号 R62

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.02.003

自体脂肪移植的临床应用广泛,包括面部年轻化、瘢痕疙瘩、伤口愈合、软组织再造等方面。除了取材方便、性价比高、不具有异体材料的免疫排斥反应等一系列优点,自体脂肪移植还能与抽脂术同期进行,在达到理想的治疗效果的同时,又额外起到了塑型瘦身的效果。但是同时,移植脂肪的存活率具有很大的不确定性,据目前的研究报道,脂肪移植的一年期存活率为20%~80%^[1,2]。

供区和受区的部位以及脂肪的获取、处理和注射过程中所使用的方法的多样性都会极大程度影响脂肪的存活率^[3]。除了在传统的操作过程中寻求方法,细胞辅助脂肪移植(cell-assisted lipotransfer, CAL)也能极大程度地提高脂肪细胞的存活率^[4]。脂肪来源干细胞(adipose-derived stem cell, ADSC)和脂肪血管基质组分(stromal vascular fraction, SVF)是目前最常用的成分。

一、ADSC和SVF概述

2001年Zuk等^[5]在脂肪组织中发现一类具有多能分化能力的干细胞,并将之命名为ADSC。与骨髓干细胞类似,ADSC可以分化成脂肪、软骨、肌肉和骨骼。更重要的是,ADSC还参与血管生成、免疫调节和组织再生的旁分泌信号转导的过程。而SVF是脂肪组织分离得到ADSC的过程中的中间产物。它是一个混合细胞群,其中除了2%~10%的ADSC外,还包含造血干细胞、内皮祖细胞、成纤维细胞、淋巴细胞、巨噬细胞、红细胞等细胞组分及细胞外基质。

二、SVF和ADSC的制备方法

1. 提取:提取SVF的方法众多,但目前还没有比较各种方法疗效的数据,尚无标准制备流程的文献发表。总的来说提取方法主要分为酶消化法和机械乳化法。酶消化法是使用胶原酶消化抽吸得到的脂肪,破坏掉细胞外基质后,通过离心、过滤或静置这3种方法都可以分离得到位于下层的SVF^[6,7]。酶分解法的问题在于其产量小、耗时,并且胶原酶可能残留的毒性都使得酶分解法无法在临床环境中很好地发挥作用。

Tonnard等^[8]在2013年提出了机械乳化法,他们将抽脂得到的脂肪经注射器快速对打30次以后破坏掉了成熟的脂肪细胞,再通过乳化液过滤以后制得纳米脂肪(nanofat)。这种纳米脂肪实际上并没有脂肪组织,而是由大量的ADSC组成。除此以外,Raposiso等^[9]随后又提出一种依靠快速振动和离心得到SVF的方法。这两种方法与消化酶法比较便捷许多,但是也有研究指出相比于酶法,这两种机械法得到的SVF中的ADSC的数目要少10~20倍^[10]。

传统的SVF提取方法并不能满足市场需求,为了更高效地提取SVF,各式各样的自动化提取仪器相继出现。目前大约有30种自动化和半自动化仪器处在开发中,他们的基本原理都是酶分解法或机械法^[11]。

2. ADSC的分离、培养与扩增:因为SVF是一个混合细胞群,因此还需要对提取到的SVF进行分离才能得到纯净的ADSC。ADSC具有贴壁性,可以利用这一点对ADSC进行分离。最常用的方法是在添加10%胎牛血清的标准培养基中进行单层培养,每2~3天更换一次培养基。当达到亚融合时,采集黏附细胞,在PBS中洗涤,计数并分析其生长情况、克隆

基金项目:国家自然科学基金资助项目(面上项目)(81670444)

作者单位:100730 北京协和医院整形外科

通讯作者:龙笑,教授,硕士生导师,电子信箱:pumclongxiao@126.com

性和抗原表达^[12]。从 200ml 抽吸得到的脂肪中可获得(1~10)亿个有核细胞,其中至少 10% 是 ADSC^[13]。如果抽吸得到的脂肪量很多,那么分离后的细胞就可以直接用于科研或临床实验。相反,还需要进行体外扩增才能获得足够的 ADSC。ADSC 的分离和扩增较为简单,但细胞寿命较短,且在体外传代后,ADSC 的生长能力也显著降低,这不仅限制了它们在临床前的研究,也限制了它们治疗潜力的全面评估。

三、ADSC 在脂肪移植中的应用

1. 作用原理:移植的脂肪的存活原理,目前的主流观点仍然是 Peer^[14] 在 20 世纪 50 年代提出的“细胞存活理论”。他们认为移植的脂肪组织确实能够存活,其机制是移植脂肪和受区的血管发生早期吻合并建立血液循环。后来的研究又进一步深化了这个观点,并衍生出了“宿主替代理论”,在脂肪移植后的最初一段时间内,脂肪组织严重缺血,所有的脂肪细胞都经历了退行性变和适应性组织重塑。这两种变化的孰强孰弱决定了最终脂肪组织的存活率^[15]。Matsumoto 等^[16] 率先把 ADSC 运用在小鼠脂肪移植上,发展出了细胞辅助脂肪移植术(CAL)。他们发现抽吸得到的脂肪中的 ADSC 数量远远少于完整切除的脂肪,并且血管结构的数量比较之下也很稀少。其实验结果显示 CAL 组的移植脂肪的平均成活率比对照组高出 35%。

目前关于 ADSC 在脂肪移植中的作用原理主要包括以下 4 个方面^[17-19]:(1)ADSC 可以帮助宿主 ADSC 分化为成熟的脂肪细胞,增加脂肪细胞的数量。(2)ADSC 还可以分化成血管内皮细胞甚至血管壁细胞,为移植脂肪提供血供。(3)ADSC 能够释放大量的血管内皮因子,促进血管生成,改善血供,减少坏死。(4)即使在严重缺血的状态下,ADSC 都能够以干细胞的状态持续存在。在脂肪组织中,脂肪细胞的转化由 ADSC 介导,其过程非常缓慢,通常经历两年甚至更长的时间。然而脂肪移植的一系列操作过程给脂肪细胞造成了暂时性缺血再灌注损伤,这使得脂肪细胞在术后 2~3 个月就发生转化。然而在抽吸获取的脂肪中,相对缺乏的 ADSC 不足以支持整个转化过程,导致术后半年左右发生脂肪萎缩。相反,CAL 中足够的 ADSC 则可以支持术后发生的脂肪转化,避免了脂肪萎缩的发生^[19]。Qiu 等^[20] 发现移植脂肪的最外层有棕色脂肪的出现,提示移植脂肪的 ADSC 分化成棕色脂肪的可能性。这一研究结果补充说明了 ADSC 在脂肪移植中,不仅可以帮助宿主

ADSC 分化为成熟的脂肪细胞,增加脂肪细胞的数量,甚至可以直接分化为脂肪细胞,优化脂肪移植的效果。

2. 临床应用:CAL 技术最早在 2008 年由 Yoshimura 等^[21] 完成并报道。他们对 40 例女性实施了 CAL 隆乳术,术后两个月的脂肪保留率仍然令人满意。自此,CAL 在过去 10 年成为了整形外科临床研究的热点之一。不过,值得注意的是,并非所有的临床试验都取得了良好的效果。也有研究报道与传统的脂肪移植术比较,CAL 的脂肪存活率差异无统计学意义(54% vs 50%)^[22]。Laloze 等^[23] 在 2017 年对 24 篇相关文献进行了 Meta 分析,其研究结果显示与传统脂肪移植术比较,CAL 的脂肪存活率确实是增高的(64% vs 44%, $P=0.000$),然而这个优势仅在脂肪移植量 < 100ml 的时候才会体现出来($P=0.03$)。另一篇 Meta 分析的亚组分析结果提示,虽然面部 CAL 的脂肪存活率显著高于传统脂肪移植术($P=0.041$),但是胸部的脂肪存活率在 CAL 组和非 CAL 组之间比较差异无统计学意义^[24]。除了面部更为丰富的血管更有利于移植脂肪的存活以外,胸部手术需要的更大量的移植脂肪所伴随的延长的手术时间也可能影响结果。Sasaki^[25] 研究发现脂肪离体后 1h 的脂肪存活率为 90%,然而 6~8h 这一数值就会减少为 10%。

当脂肪移植的数量较少,手术时间较短的时候,CAL 对细胞存活的正面影响更明显,使得 CAL 中脂肪存活率更高。反之,当脂肪移植的数量更大,操作的难度更高,手术时间更长的时候,CAL 对细胞存活的负面影响就会超过其正面影响,得到相反的结果。由此可见,CAL 在面部年轻化等微整形手术中可能会发挥更好的作用。需要多少细胞才能使移植脂肪的存活率最高,以及分离得到 ADSC 或者 SVF 需要用到多少脂肪,目前还没有一致的意见。并不是 ADSC 或 SVF 越多,脂肪细胞的存活率就越高。尽管 ADSC 或者 SVF 可能有助于脂肪细胞存活,但这些细胞本身也会和脂肪细胞竞争营养物质,因此想要达到最佳的效果,需要在 ADSC/SVF 和脂肪细胞之间寻找平衡。有小鼠实验显示,在 50000 个 SVF 细胞/毫升脂肪的浓度下,脂肪存活率是最高的^[26]。同时也有临床实验显示当移植脂肪量比较大(30ml)时,ADSC 的浓度达到 2000 万个/毫升时也能取得较好的效果,术后 3 个月的脂肪存活率可以达到 76.7%^[27]。最佳浓度与许多因素有关。笔者推断其可能原因为,当移植

脂肪量在一定范围内时,ADSC/SVF的最佳浓度与其呈正相关,即每一特定的脂肪移植量都有与之对应的最佳浓度,并且移植量越高,最佳浓度也越高。但是当脂肪移植量超过某一范围,即使增加ADSC/SVF的浓度,也不会改善移植的效果。还有一点需要注意的是,SVF由高度异质性的细胞群组成,它不光包含了ADSC,还有其他细胞,并且SVF中所含ADSC的比例以及活性也会受患者年龄、制备方式等多种因素影响^[28]。

四、安全性

1. 免疫方面:虽然有研究指出ADSC具有免疫抑制性,但是异体ADSC使用的安全性仍然令人担忧。虽然有研究显示接受异体ADSC治疗后,患者的CD4/CD8、细胞因子水平和非特异性IgM和IgG均未显示对外来细胞发生任何免疫反应的迹象^[29]。但同时也有两项研究测试供体特异性抗体,结果显示19%~34%的患者产生了这些抗体。这表明ADSC并不像人们想象的那样具有免疫豁免权。虽然以上的研究并非是CAL,但是研究的结果也应当引起注意。

2. 肿瘤方面:对于ADSC的安全性最大的担忧是其致癌性。细胞实验和动物实验都已经证实ADSC不仅可以加速肿瘤的进展和转移,还能增加肿瘤复发的风险。最新研究发现,虽然ADSC可以促进乳腺癌细胞的增殖和转移,但是含有相同ADSC数量的CAL却并不具备这种特性。研究者给出的解释是脂肪细胞可能对ADSC产生旁分泌影响,导致它们优先生成脂肪,而不是生成血管^[30]。Pérez - Cano等^[31]利用CAL对67例乳腺癌术后的患者进行乳房重建术并随访1年。在随访期内,没有患者出现疾病复发。Gotoh等^[32]将CAL运用在了对尿失禁的治疗上。接受治疗的患者中有9例有前列腺癌病史。这9例患者在治疗后1年的随访期内没有出现疾病复发。尽管截至目前,临床实验的结果都是相对令人满意的,但是相对较短的随访期仍然无法证实ADSC的远期安全性。对于有肿瘤病史的患者,CAL的使用需要格外谨慎。

五、法律、法规

目前尚没有关于规范化使用ADSC的统一标准,有关人类细胞治疗中ADSC的临床文献也存在不足,即文献中大多涉及基础研究和(或)临床治疗以外的其他应用。然而“脂肪干细胞治疗”这个概念所带来的巨大商业潜能使之成为医美领域的热点。为了规

范市场操作,美国食品药品监督管理局(FDA)于2014年出台了一系列操作规范草案。首先,根据整个操作流程,脂肪干细胞治疗被分为低危和高危两个级别并分别对应不同严格程度的法规。低危组需要满足:(1)对人体细胞、组织或相关产品进行最低限度的操作。(2)人类细胞、组织或相关产品仅同源使用。(3)人体细胞、组织或细胞和组织产品的制造不含有其他物质。(4)人体细胞、组织或细胞及组织产品不具有系统性效应,且其主要功能不依赖于活细胞的代谢活性。在这种情况下,FDA允许ADSC在没有特定审批流程的情况下,作为一种试验性新药,在临床实验中使用。如果ADSC的制备过程中具有超过最低限度的操作,如体外扩增或者与非组织成分结合,那么这样的人体细胞、组织或相关产品会被视为药物或生物产品,并受美国《公共卫生系统法》第351节的管制。因此,在较高的风险水平下,引入ADSC或将其作为药物,发起人需要作出相关申请,只有在证明产品预期用途安全有效后,此类产品才能用作临床使用。在欧洲,如果ADSC是自体来源,由机械分离法制备得到,并且仅用作皮下使用,那么这样的ADSC就可以被用在临床治疗中。然而具体到ADSC在脂肪移植的应用上面,目前并没有任何已知的专门的法律法规。我国已陆续出台《干细胞临床研究管理办法》、《干细胞制剂质量控制及临床前研究技术指导原则》等有关规定,有关ADSC的临床实验仍然需要按规范进行^[33,34]。

六、展望

凭借其多功能分化能力,ADSC可以用于协助脂肪移植,显著提高脂肪存活率,并具有良好的再生医学方面的潜力。但是,ADSC本身所具备的潜在致癌性,以及制备过程中存在的挑战都限制了其广泛临床应用的开展。寻求在短时间内大量制备ADSC的可行方法以及ADSC与移植脂肪的最佳配比将会对ADSC的临床应用起到极大的推进作用。与此同时,严格按照相关法律规定进行临床操作,不侵害患者的权益,将是ADSC未来应用中重要的原则。

参考文献

- 1 Delay E, Garson S, Tousson G, et al. Fat injection to the breast: technique, results, and indications based on 880 procedures over 10 years[J]. *Aesthet Surg J*, 2009, 29(5): 360 - 376
- 2 Park S, Kim B, Shin Y. Correction of superior sulcus deformity with orbital fat anatomic repositioning and fat graft applied to retro-orbicularis oculi fat for asian eyelids[J]. *Aesthet Plast Surg*, 2010, 35(2): 162 - 170

- 3 Sinno S, Wilson S, Brownstone N, *et al.* Current thoughts on fat grafting[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2016, 137(3): 818 – 824
- 4 Wang Y, Wu Y. Assessment of the clinical efficacy of cell – assisted lipotransfer and conventional fat graft: a Meta – analysis based on case – control studies[J]. *J Orthop Surg Res*, 2017, 12(1): 155
- 5 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
- 6 Palumbo P, Miconi G, Cinque B, *et al.* In vitro evaluation of different methods of handling human liposuction aspirate and their effect on adipocytes and adipose derived stem cells[J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(8): 1974 – 1981
- 7 Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, *et al.* Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates [J]. *J Cell Physiol*, 2006, 208(1): 64 – 76
- 8 Tonnard P, Verpaele A, Peeters G, *et al.* Nanofat grafting[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2013, 132(4): 1017 – 1026
- 9 Raposio E, Caruana G, Bonomini S, *et al.* A novel and effective strategy for the isolation of adipose – derived stem cells: minimally manipulated adipose – derived stem cells for more rapid and safe stem cell therapy[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2014, 133(6): 1406 – 1409
- 10 Chaput B, Bertheuil N, Escubes M, *et al.* Mechanically isolated stromal vascular fraction provides a valid and useful collagenase – free alternative technique[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2016, 138(4): 807 – 819
- 11 Oberbauer E, Steffenhagen C, Wurzer C, *et al.* Enzymatic and non – enzymatic isolation systems for adipose tissue – derived cells: current state of the art[J]. *Cell Regen*, 2015, 4(1): 4 – 7
- 12 Palumbo P, Lombardi F, Siragusa G. Methods of isolation, characterization and expansion of human adipose – derived stem cells (ASCs): an overview[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(7): E1897
- 13 Yoshimura K, Suga H, Eto H. Adipose – derived stem/progenitor cells: roles in adipose tissue remodeling and potential use for soft tissue augmentation[J]. *Regen Med*, 2009, 4: 265 – 273
- 14 Peer LA. Loss of weight and volume in human fat grafts with postulation of a “Cell Survival Theory”[J]. *Plast Reconstr Surg*, 1950, 5: 217 – 230
- 15 Pu LLQ. Mechanisms of fat graft survival[J]. *An Plast Surg*, 2016, 77: S84 – S86
- 16 Matsumoto D, Sato K, Gonda K, *et al.* Cell – assisted lipotransfer: supportive use of human adipose – derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection [J]. *Tissue Engineering*, 2006, 12(12): 3375 – 3382
- 17 Mizuno H, Hyakusoku H. Fat grafting to the breast and adipose – derived stem cells: recent scientific consensus and controversy[J]. *Aesthet Surg J*, 2010, 30(3): 381 – 387
- 18 Suga H, Eto H, Aoi N, *et al.* Adipose tissue remodeling under ischemia: death of adipocytes and activation of stem/progenitor cells[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2010, 126(6): 1911 – 1923
- 19 Utsunomiya T, Shimada M, Imura S, *et al.* Human adipose derived stem cells: potential clinical applications in surgery[J]. *Surg Today*, 2011, 41: 1823, 2011
- 20 Qiu L, Zhang Z, Zheng H, *et al.* Browning of human subcutaneous adipose tissue after its transplantation in nude mice[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2018, 142(2): 392 – 400
- 21 Yoshimura K, Sato K, Aoi N, *et al.* Cell – assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose – derived stem/stromal cells aesthetic[J]. *Plast Surg*, 2008, 32: 48 – 55
- 22 Chiu CH. Does stromal vascular fraction ensure a higher survival in autologous fat grafting for breast augmentation? A volumetric study using 3 – dimensional laser scanning[J]. *Aesthet Surg J*, 2019, 39(1): 41 – 52
- 23 Laloze J, Varin A, Gilhodes J, *et al.* Cell – assisted lipotransfer: friend or foe in fat grafting? Systematic review and Meta – analysis [J]. *J Tissue Engin Regen Med*, 2017, 12(2): e1237 – e1250
- 24 Zhou Y, Wang J, Li H, *et al.* Efficacy and safety of cell – assisted lipotransfer[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2016, 137(1): 44e – 57e
- 25 Sasaki GH. Water – assisted liposuction for body contouring and lipo-harvesting: safety and efficacy in 41 consecutive patients[J]. *Aesthet Surg J*, 2011, 31(1): 76 – 88
- 26 Paik KJ, Zielins ER, Atashroo DA, *et al.* Enhance fat graft retention is dose dependent[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2015, 126(1): 67 – 75
- 27 Rasmussen BS, Lykke Sørensen C, Vester – Glowinski PV, *et al.* Effect, feasibility, and clinical relevance of cell enrichment in large volume fat grafting: a systematic review[J]. *Aesthet Surg J*, 2017, 37: S46 – S58
- 28 Kølbe ST, Fischer – Nielsen A, Mathiasen AB, *et al.* Enrichment of autologous fat grafts with ex – vivo expanded adipose tissue – derived stem cells for graft survival: a randomised placebo – controlled trial [J]. *The Lancet*, 2013, 382(9898): 1113 – 1120
- 29 Park KJ, Ryou SB, Kim JS, *et al.* Allogeneic adipose – derived stem cells for the treatment of perianal fistula in Crohn’s disease: a pilot clinical trial[J]. *Colorectal Dis* 2016, 18: 468 – 476
- 30 Gebremeskel S, Gencarelli J, Gareau AJ, *et al.* Promotion of primary murine breast cancer growth and metastasis by adipose – derived stem cells is reduced in the presence of autologous fat graft[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2019, 143(1): 137 – 147
- 31 Pérez – Cano R, Vranckx JJ, Lasso JM, *et al.* Prospective trial of adipose – derived regenerative cell (ADRC) – enriched fat grafting for partial mastectomy defects: the RESTORE – 2 trial[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2012, 38(5): 382 – 389
- 32 Gotoh M, Yamamoto T, Kato M, *et al.* Regenerative treatment of male stress urinary incontinence by periurethral injection of autologous adipose – derived regenerative cells: 1 – year outcomes in 11 patients [J]. *Int J Urol*, 2014, 21: 294 – 300
- 33 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 干细胞临床研究管理办法(试行)[J]. *中国生物工程杂志*, 2015, 9: 133
- 34 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则(试行)[J]. *中国医药生物技术*, 2015, 5: 459

(收稿日期: 2019 – 04 – 15)

(修回日期: 2019 – 05 – 05)