

脂肪组织提取液促进大鼠皮肤生长的实验研究

鲁刚 付小兵 李海红 陈伟 马秀玲 孙同柱

【摘要】 目的 观察脂肪组织提取液对大鼠皮肤体外培养生长的影响。**方法** 将 2 mm×2 mm 大小的新生大鼠皮肤接种到 24 孔培养板内,分别加入含有体积分数为 10%脂肪组织提取液(提取液组)或体积分数为 10%磷酸盐缓冲液(PBS 组)的胎牛血清 Dulbecco 改良 Eagle 培养基培养 6 d,测量皮肤培养后的面积。**结果** 两组皮肤培养后均有生长,脂肪组织提取液组皮肤培养后面积为(8.43±1.40)mm²,而 PBS 组为(4.18±1.11)mm²,脂肪组织提取液组皮肤培养后面积约为 PBS 组的 2 倍,两组间差异有显著性($P<0.05$)。**结论** 脂肪组织提取液对皮肤生长有促进作用,其机制可能是脂肪组织提取液内含有促细胞增殖的某些生长因子和其他有利于细胞生存的物质。

【关键词】 脂肪; 组织培养; 皮肤; 大鼠

Effects of adipose tissue extract on rat skin regeneration in vitro LU Gang*, FU Xiao-bing, LI Hai-hong, CHEN Wei, MA Xiu-ling, SUN Tong-zhu. * Key Research Laboratory of Wound Repair, Burns Institute, 304th Clinical Department of General Hospital of PLA, Beijing 100037, China (LU Gang is working on Department of Burn, General Hospital of Beijing Command of PLA, Beijing 100026, China)
Corresponding author: FU Xiao-bing (Email: fuxb@cgw.net.cn)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of adipose tissue extract on growth of rat skin in vitro. **Methods** Neonatal rat skin (area of 2 mm×2 mm) was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% adipose tissue extract and 10% phosphate buffered solution (PBS). After being cultured for 6 days, the area of skin was measured. **Results** Skin in both groups grew in area. With the addition of adipose tissue extract, the skin measured (8.43±1.40)mm² in area after 6 days, and it was approximately 2 times of that of PBS group, in which the skin area was (4.18±1.11)mm². The difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Adipose tissue extract promote skin growth, which may be attributed to the presence of some growth factors in the extract.

【Key words】 fat; tissue culture; skin; rat

以往认为机体多余的脂肪是无用的,但近来有一些研究表明,脂肪组织除含有多种功能干细胞外,还含有某些促进创伤愈合的生长因子^[1]。为此,本实验在前期利用自体脂肪促进创面愈合获得成功的基础上,进一步研究小型猪脂肪组织提取液对大鼠离体皮肤生长的作用,探讨脂肪组织提取液对创面愈合的影响,以期为临床创面治疗提供新的方法。

1 材料和方法

1.1 脂肪组织提取液制备:雄性 4 月龄健康小型猪(中国农业大学提供)1 只,体重 21 kg。速眠新和氯胺酮复合麻醉,背部剃毛(20 cm×20 cm),常规消毒,“L”型切口,翻开全层皮肤,切取脂肪组织,称

基金项目:国家重大基础研究“973”规划项目(G1999054204);国家自然科学基金重点项目(30230370);国家自然科学基金面上项目(30170966)

作者单位:100037 北京,解放军总医院三〇四临床部全军创伤修复重点实验室(鲁刚,付小兵,李海红,陈伟,马秀玲,孙同柱);100026 北京,北京军区总医院烧伤整形科(鲁刚)

通讯作者:付小兵,研究员 (Email: fuxb@cgw.net.cn)

作者简介:鲁刚(1972-),男(汉族),浙江省宁波市人,硕士研究生,主治医师,研究方向为创伤修复机制的基础研究和临床应用。

重,灭菌 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.2)进行 10 倍稀释,冰浴匀浆,1 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液,微孔滤膜过滤除菌,分装,-20℃冻存。

1.2 大鼠皮肤培养:选用出生 2 d 的 Wistar 大鼠 4 只,夹颈处死,放入体积分数为 75%的乙醇中浸泡 3 min,以下步骤均按无菌操作进行。生理盐水冲洗大鼠,剪下背部全层皮肤,刮除皮下组织,皮肤平铺在小木板上,切割成约 2 mm×2 mm 大小的方形皮肤数块。选择同一部位面积一致的皮肤接种到 24 孔培养板内,每孔接种一块皮肤,贴附 30 min。加入 0.4 ml 含有体积分数为 10%脂肪组织提取液的胎牛血清 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM,提取液组),同时设含有体积分数 10%PBS 胎牛血清 DMEM 培养的的皮肤作为对照(PBS 组)。置体积分数为 5%的 CO₂ 培养箱内 37℃下培养 6 d,2 d 更换培养液 1 次。

1.3 镜下检查:分别于培养 2、4 和 6 d 在倒置显微镜下观察培养皮肤的生长情况,培养 6 d 后照相。

1.4 面积测定:在皮肤培养 6 d 后去除培养液,在

24 孔培养板内加入体积分数为 10% 的甲醛固定 30 min, 清水冲洗, 质量分数为 2% 的罗丹明耐尔蓝染色, 水洗晾干。24 孔培养板倒置, 覆以透明塑料膜沿皮肤生长后的边缘画线、剪膜, 置感量为 0.1 mg 的分析天平称重。称得的结果除以单位面积透明塑料膜的重量, 最后换算出皮肤生长后的面积 (mm^2), 其指标以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 并对结果进行 t 检验。

2 结果

2.1 镜下检查(彩色插页图 1, 图 2): 培养 2 d, 可见从接种皮肤的边缘向外生长出少许新生皮肤表皮细胞, 呈膜状, 接种皮肤周围有个别散在游离的成纤维细胞; 两组皮肤生长情况相似。培养 4 d, 脂肪组织提取液组新生皮肤较 2 d 时明显增多, 而 PBS 组生长很少; 两组新生皮肤组织成分相同, 主要为单层表皮细胞和部分成纤维细胞。培养 6 d, 两组皮肤新生组织进一步增加, 此时这些组织的细胞呈圆形、椭圆形和菱形, 大小均匀, 细胞排列较紧密并伴有较多的细胞间质; 两组皮肤生长情况差别明显。经罗丹明耐尔蓝染色, 更容易观察皮肤培养后的生长情况, 新生的表皮细胞着红色, 成纤维细胞着蓝色。

2.2 皮肤面积: 培养 6 d, 脂肪组织提取液组生长后的皮肤面积约是 PBS 组 2 倍; 脂肪组织提取液组皮肤生长后的面积平均为 $(8.43 \pm 1.40) \text{mm}^2$, PBS 组平均为 $(4.18 \pm 1.11) \text{mm}^2$, 两组比较差异有显著性 ($t = 8.240, P < 0.05$)。

3 讨论

皮肤缺损及难愈性创面比较常见, 在治疗上有一定的难度, 探讨加速创面愈合的方法很有意义。研究表明, 将某些外源性生长因子应用于创面修复取得了较好的效果^[2-4]。近年来随着对脂肪研究的进展, 逐渐发现脂肪除具有储存能量、提供营养等作用外, 还能分泌多种因子和激素。为此本实验中研究了小型猪脂肪组织提取液对大鼠离体皮肤生长的影响, 进一步了解其促进创面愈合的作用。实验结果表明, 皮肤在含有脂肪组织提取液的培养基内培养, 其生长后的面积明显大于 PBS 培养基组, 说明脂肪组织提取液对大鼠离体皮肤生长有促进作用。

脂肪组织提取液促进大鼠离体皮肤生长的作用机制可能是: ①脂肪分泌的生长因子促进皮肤生长。脂肪可以分泌血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 和胰岛素样生长因子 (IGF), VEGF 和 IGF 是促进血管内皮细胞增殖、迁移的重要因素^[5,6]。而生长因子的作用特点包括生长因子的多功能性和生长因子作用

之间的协同性, 表现为一种生长因子可作用于多种效应细胞, 同时一种效应细胞的生理反应往往又可由多种生长因子参与完成^[7]。脂肪组织提取液促进大鼠离体皮肤生长的作用可能与 VEGF 和 IGF 有关, 也可能是脂肪组织提取液内除 VEGF 和 IGF 外, 还含有其他生长因子。②脂肪为皮肤培养提供了营养物质。体外培养皮肤需要以营养物质为基础, 培养液营养成分不同对皮肤生长所表现出的作用也不同, 可以是促进细胞生长、增殖, 也可以是维持细胞缓慢生长或不死^[8]。脂肪组织提取液可能是提供了细胞生长所需的其他物质。

本实验结果提示, 脂肪组织提取液对皮肤体外培养有促进生长的作用。随着脂肪吸引术等美容术的日益开展, 脂肪组织来源充分, 脂肪组织提取液制备简单方便, 经过进一步实验研究, 脂肪组织提取液有可能成为一种新型有效治疗创面的制剂。

参考文献:

- 1 Zuk P A, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells [J]. *Mol Biol Cell*, 2002, 13: 4279 - 4295.
- 2 孙同柱, 付小兵, 赵志力, 等. 重组人血小板源性生长因子凝胶剂促进糖尿病大鼠创面愈合的实验研究 [J]. *中国危重病急救医学*, 2003, 15: 596 - 599.
- 3 Fu X B, Sheng Z Y, Chen Y L, et al. Randomized placebo controlled trial of use of topical recombinant bovine basic fibroblast growth factor for second degree burns [J]. *Lancet*, 1998, 352: 1661 - 1664.
- 4 付小兵, 沈祖尧, 陈玉林, 等. 碱性成纤维细胞生长因子与创面修复——1 024 例多中心对照实验 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 1998, 12: 209 - 211.
- 5 Asano A, Morimatsu M, Nikami H, et al. Adrenergic activation of vascular endothelial growth factor mRNA expression in rat brown adipose tissue; implication in cold - induced angiogenesis [J]. *Biochem J*, 1997, 328: 179 - 183.
- 6 Wabitsch M, Heinze E, Debatin K M, et al. IGF - I - and IGFBP - 3 - expression in cultured human preadipocytes and adipocytes [J]. *Horm Metab Res*, 2000, 32: 555 - 559.
- 7 孙志贤, 主编. 现代生物化学理论与研究技术 [M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1995. 62 - 63.
- 8 鄂征, 主编. 组织培养和分子细胞学技术 [M]. 北京: 北京出版社, 1995. 62 - 63.

(收稿日期: 2004 - 05 - 30 修回日期: 2004 - 12 - 20)

(本文编辑: 李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

《中国危重病急救医学》杂志 2005 年 3~6 期重点内容

第 3 期 心脑血管疾病急救

第 4 期 多器官功能衰竭

第 5 期 呼吸系统疾病

第 6 期 外科疾病急救

(本刊编辑部)

P物质和降钙素基因相关肽在胎兔皮肤无瘢痕愈合中的作用

(正文见76页)

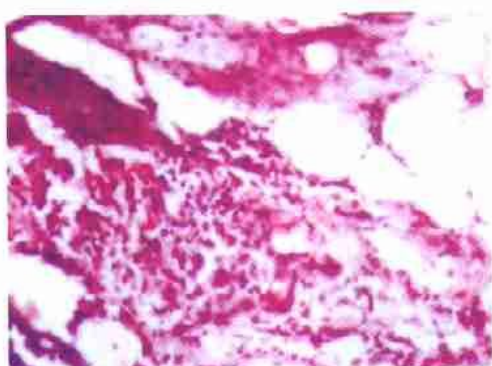


图1 创伤成兔伤后3 d皮肤真皮层肉芽组织
(HE, x200)
Figure 1 Granulation tissue in dermis of adult rabbit at the 3rd day post-injury(HE, x200)



图2 创伤胎兔伤后1 d皮肤SP阳性表达降低
(SP, x200)
Figure 2 Expression of SP of wound decreased in fetal rabbit at the 1st day post-injury(SP, x200)

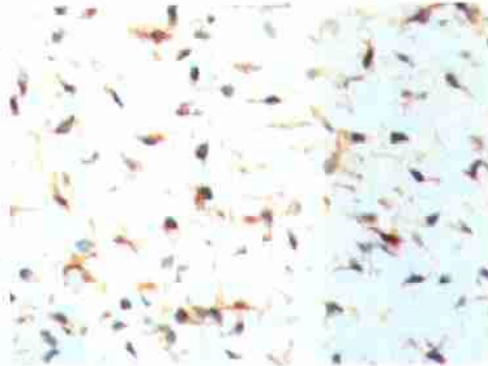
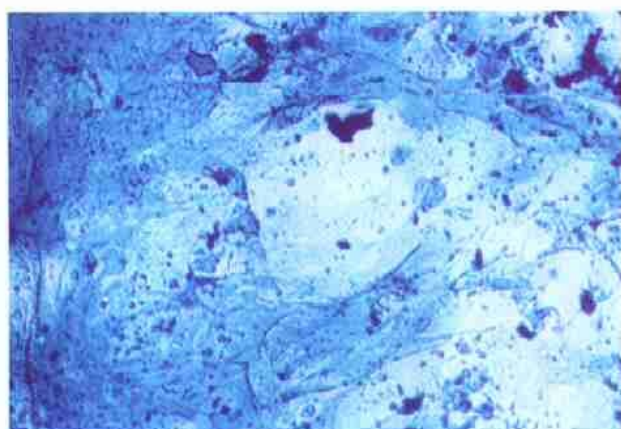


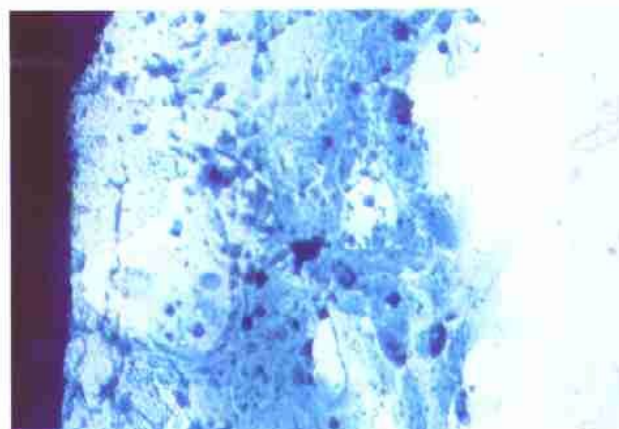
图3 创伤成兔伤后3 d皮肤SP阳性表达增高
(SP, x200)
Figure 3 Expression of SP of wound increased in adult rabbit at the 3rd day post-injury(SP, x200)

脂肪组织提取液促进大鼠皮肤生长的实验研究

(正文见87页)



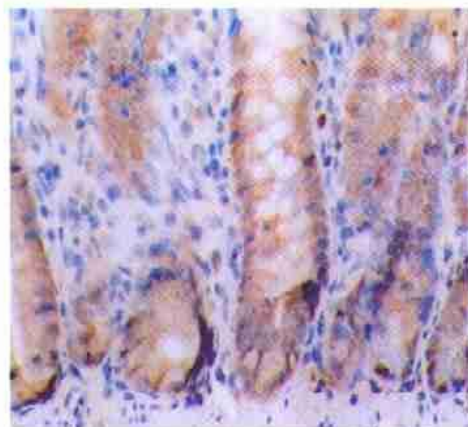
注：左侧颜色较深部分为接种皮肤，右侧颜色较浅部分为新生皮肤
图1 脂肪组织提取液培养后的大鼠皮肤(罗丹明耐尔蓝, x100)
Figure 1 Rat skin cultured in adipose tissue extract
(Rhodamine-Nile blue sulfate, x 100)



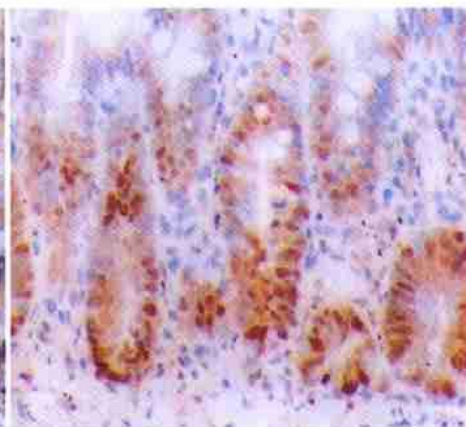
注：左侧颜色较深部分为接种皮肤，右侧颜色较浅部分为新生皮肤
图2 PBS培养后的大鼠皮肤(罗丹明耐尔蓝, x100)
Figure 2 Rat skin cultured in PBS
(Rhodamine-Nile blue sulfate, x 100)

改构型和野生型酸性成纤维细胞生长因子对肠缺血-再灌注损伤的保护作用及剂量-效应关系研究

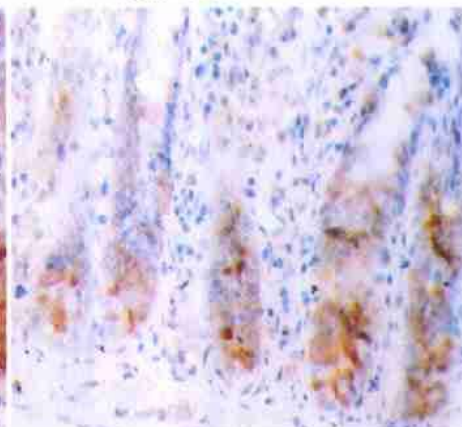
(正文见98页)



注：小肠隐窝下部的大部分细胞和绒毛下1/3的细胞核均为阳性染色
图1 改构型aFGF 2 μg剂量组PCNA在肠缺血-再灌注6 h的表达(免疫组化, x200)
Figure 1 Expression of PCNA of reconstruction human aFGF 2 μg group at 6 hours after intestinal I/R injury in rats (Immunohistochemical, x200)



注：PCNA表达增强，肠壁各层均有表达
图2 改构型aFGF 4 μg剂量组PCNA在肠缺血-再灌注6 h的表达(免疫组化, x200)
Figure 2 Expression of PCNA of reconstruction human aFGF 4 μg group at 6 hours after intestinal I/R injury in rats (Immunohistochemical, x200)



注：小肠隐窝下部的大部分细胞和绒毛下1/3的细胞核均为阳性染色
图3 改构型aFGF 8 μg剂量组PCNA在肠缺血-再灌注6 h的表达(免疫组化, x200)
Figure 3 Expression of PCNA of reconstruction human aFGF 8 μg group at 6 hours after intestinal I/R injury in rats(Immunohistochemical, x200)