

脂肪组织冻存的方法研究

夏洁芳¹,徐峰波²,李雁冰¹,田雨¹,王战涛¹,张建中³

(1.陕西干细胞工程有限公司,陕西 西安 710000;

2.银丰生物工程集团有限公司,山东 济南 250000;

3.吉林大学中日联谊医院内分泌科,吉林 长春 130033)

摘要:自体脂肪组织因具有来源丰富、易于取材、操作简单、无排异反应等优点,使得自体脂肪移植成为医疗美容行业进行面部凹陷填充、丰胸丰臀等整形手术时较为流行的技术。手术为达到较高的移植存活率和整形效果,需要对患者进行多次的脂肪抽吸并重复移植,过程较长,增加患者痛苦。因此,一次性抽吸足够量的脂肪组织进行冻存,再次移植时复苏使用便成为了解决这一问题的最优方法。本文现就脂肪组织的采集、取脂纯化方法、冻存保护剂的选择、冻存复苏方法及提高移植存活率研究做一综述。

关键词:脂肪组织;取脂方法;冻存保护剂;冻融;移植成活率

中图分类号:R622+.9

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2020.14.009

文章编号:1006-1959(2020)14-0024-03

Study on the Method of Cryopreservation of Adipose Tissue

XIA Jie-fang¹,XU Feng-bo²,LI Yan-bing¹,TIAN Yu¹,WANG Zhan-tao¹,ZHANG Jian-zhong³

(1.Shaanxi Stem Cell Engineering Co.,Ltd.,Xi'an 710000,Shaanxi,China;

2.Yinfeng Bioengineering Group Co.,Ltd.,Jinan 250000,Shandong,China;

3.Department of Endocrinology,China-Japan Lianyi Hospital of Jilin University,Changchun 130033, Jilin,China)

Abstract:Autologous fat tissue has the advantages of abundant sources, easy access to materials, simple operation, and no rejection reaction. Autologous fat transplantation has become a popular technique for plastic surgery in the medical and cosmetic industry for facial depression filling, breast enlargement and hip buttocks. In order to achieve a high transplant survival rate and plastic effect, it is necessary to perform multiple liposuctions and repeat transplantation on the patient. The process is longer and increases the patient's pain. Therefore, suctioning a sufficient amount of adipose tissue for cryopreservation at a time, and resuscitating it for transplantation again become the best way to solve this problem. This article will review the research on the collection of adipose tissue, the method of purifying fat, the choice of cryoprotectant, the method of cryopreservation and resuscitation, and the improvement of transplant survival rate.

Key words:Adipose tissue;Fat removal method;Cryopreservation agent;Freeze-thaw;Transplant survival rate

自体脂肪抽吸物是理想的填充材料,注射自体脂肪以矫正软组织缺损或增大体积是整形手术常见的方法。脂肪抽吸物作为填充材料优点很多,如数量多、易获得、便宜且与宿主相容,还可对脂肪供体部位起轮廓修饰作用,但自体脂肪移植因其存活率较低,临床应用中常采取连续多次移植以获得最佳效果,导致高花费,同时增加脂肪组织供体部位的发病率及患者的不适。目前,脂肪抽吸只能在与脂肪形成术相同的条件下进行即刻自体脂肪移植,因此剩余的从手术中获得的脂肪通常被丢弃。随着更多的软组织增强应用于整形手术,对储存已经收获的脂肪组织以备将来使用或重复使用的需求越来越多。本文将从脂肪组织的采集、取脂纯化方法、冻存保护剂的选择、冻存复苏方法及提高移植存活率方法方面,对脂肪组织体外深低温储存研究进展作一综述。

1 脂肪组织的采集

目前临床常用的取脂方法主要有 3 种:①切开取脂法:切开皮肤,按使用量切取脂肪组织,用剪刀剪成颗粒状,缝合皮肤。此法脂肪细胞损伤较小,但切口会产生瘢痕,一般选择腹部取脂,因此取脂量有

限;②注射器吸脂法:将大量肿胀液注射于皮下,用 16-22 号针头接 10-20 ml 注射器,进行脂肪抽吸。此法取脂量小,医务人员工作量大,但脂肪细胞损伤小,适用于小部位少量取脂;③负压吸脂法:在吸脂部位切开约 0.5-1 cm 切口,用剪刀在皮下脂肪层稍加分离,利用吸脂针、吸引头、无菌负压吸引瓶及负压吸引器串连设备,对手术部位脂肪层进行拉锯式刮吸。现临床上使用的吸脂方法包含超声吸脂、共振吸脂及水动力吸脂。张倩等^[1]研究了水动力吸脂法与负压吸脂法的吸脂时间及移植成活率,随访发现术后 1 年水动力吸脂法脂肪成活率大于负压吸脂法,且吸脂时间水动力组低于负压吸脂组。张新合等^[2]研究发现,不同取脂方法对细胞的损伤程度不同:剪刀剪碎法<注射器法<吸管法;当压力>-50 kPa 时,随着压力的增大,脂肪细胞损伤程度增加。赵廷峰等^[3]比较了注射器吸脂法及负压吸脂法,认为两种方法吸取的脂肪经静置后,完整脂肪细胞计数无显著差异,细胞壁也较完整。也有研究认为^[4],对于脂肪组织冻存,注射器吸脂法获得的脂肪细胞存活率相对较高,是较为理想的脂肪组织获取方式。上述研究结果看似矛盾,实际与吸脂方法所采用的吸引头直径、吸力压强等因素有关系,因此,如何选取脂肪组织冻存及采样方法环节有待进一步研究,以筛选出对脂肪细胞破坏率最小的方法。同时脂肪获取部位对脂肪颗粒移植吸收率也存在影响,李燕等^[5]研究不同取

基金项目:吉林省科技发展计划项目(编号:20180201029YY)

作者简介:夏洁芳(1988.9-),女,宁夏平罗人,硕士,工程师,主要从事干细胞相关技术研究

通讯作者:徐峰波(1980.10-),男,山东菏泽人,硕士,高级工程师,主要从事干细胞、人体组织深低温保存、细胞治疗产品开发与应用研究

脂部位自体脂肪颗粒移植吸收率发现,大腿及腰部的自体脂肪移植吸收率低于腹部,但取脂部位也因患者而异,因此进行组织冻存时,取脂部位的选择是否对冻存效果有影响,也有待进一步研究。

2 纯化脂肪颗粒的方法

为了去除脂肪抽吸物中的杂质,得到较为均一的脂肪颗粒,需要进行脂肪纯化。脂肪颗粒的纯化方法:①静置法:将脂肪抽吸物静置,待分层后,去除上层脂滴和下层肿胀液等混合液体,得到中间层脂肪层;②离心法:将抽吸物离心后,得到分为上、中、下三层的样本,取中间层;③棉垫过滤法:用医用脱脂纱布及脱脂棉制成棉垫,将抽吸物倾倒入无菌棉垫上,棉垫会吸附抽吸物中的液体及油滴,得到脂肪组织;④捞取法:将抽吸物置于无菌容器中,混以生理盐水,捞取漂浮的脂肪组织。多数研究认为脂肪纯化效果越好,移植后脂肪组织的存留率越高,这可能归因于纯化脂肪组织中脂肪来源间充质干细胞的数量最大化。从纯化效率方面比较,离心法优于静置法以及棉垫过滤法;而棉垫过滤法获得的活性脂肪细胞数高于离心法,且棉毛巾过滤得到的脂肪组织内,血管基质组分(SVF)的数目均高于离心法^[6],且随着离心速率的增加,离心法对脂肪组织的损伤力度会增加^[7],脂肪细胞的代谢活性也会降低^[8]。也有研究认为,棉垫法纯化效果优于离心法,静置沉淀法效果最差^[9],但其是从几种方法去除水分和油脂效率、对移植植物活性的影响方面对纯化效率进行分析的。因此,不同方法分析得出的结果也不同。目前临床上应用较多的是离心法及棉垫过滤法,关于脂肪组织冻存最佳取脂方法仍无临床统一标准。

3 冻存保护剂的选择

在细胞冻存过程中,温度快速下降导致胞内冰晶形成,从而损伤细胞,温度下降速率越高,胞内冰晶形成越多;而温度下降速率慢则导致细胞外溶质浓度升高,造成细胞损伤。

冻存保护剂根据其是否穿透细胞膜可分为渗透性和非渗透性 2 类。渗透性冷冻保护剂可以渗透到细胞内,易与溶液中的水分子结合,一般是一些小分子物质,如甘油、DMSO、乙二醇、乙酰胺、甲醇等;相反,非渗透性冷冻保护剂不能渗透到细胞内,一般是大分子物质,如聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖、聚乙二醇、葡萄糖、白蛋白、羟乙基淀粉等。冻存时,在冰晶形成之前,非渗透性冻存保护剂优先结合溶液中水分子,降低细胞外溶液的电解质浓度,减少阳离子进入细胞的数量,从而达到保护细胞的作用。

研究发现^[10],不使用冻存保护剂时,脂肪组织在-80℃下冻存 3 个月,其形态学观察结果优于-20℃和-196℃,且移植吸收率及纤维化情况相对较低。但魏国茜^[11]使用 60%小牛血清+15%DMSO+25%DMEM

作为冻存保护剂时,-196℃冻存温度优于-80℃及-20℃,且-196℃下可以冻存 6 个月甚至更长时间,-80℃冻存 6 个月时脂肪细胞活性不及冻存 3 个月,仅适用于短期保存。孙音等^[12]研究发现,人大腿内侧脂肪组织冻存 6 个月后复苏移植,60%小牛血清+15%DMSO+25%DMEM 组脂肪活性高于 30%胎牛血清+15%DMSO+55%DMEM 组。程爱娟^[13]采用与正常乳房脂肪等体积的生理盐水和海藻糖作为冻存保护剂,在-196℃冻存 2 周后复苏解冻,发现低温条件下,与生理盐水相比海藻糖能较好保持脂肪细胞活性。黄桢雅等^[14]采用分段降温法,在不使用冻存保护剂条件下,在-80℃将脂肪组织冻存不同时间,发现随着冻存时间的延长,脂肪组织的结构及生物学活性逐渐下降,不建议临床移植不添加保护剂直接冻存的脂肪组织。对于脂肪组织冻存保护剂的选择,目前没有公认的保护剂配比标准,各类研究相对较多,且选择不同储存温度时,不同的冻存保护剂使用效果不同。可见,选择何种冻存保护剂进行脂肪组织冻存,在何种储存条件下如何配比,还需继续探索。

4 冻存及复苏方法

细胞冻存方法主要有玻璃化法(即快速冻存法)和超低温慢速冻存法。玻璃化法冻存液的配制步骤繁琐,且高浓度冻存液对细胞存在毒性,因而超低温慢速冻存法变得更为常用。超低温慢速冻存主要有两种降温程序:①程序降温法:利用程序降温盒设定程序由室温降低至-70℃后再放置到液氮中进行长期保存;或利用程序降温仪设定程序降温至-196℃,然后转移至液氮中长期保存;②分段降温法:利用冻存管处于 4℃、-20℃、-80℃保存。常规分段降温的缺点是耗时较长,而程序降温费用昂贵、操作复杂、对设备要求高。复苏方法基本均认可 37℃水浴震荡快速复温。多篇文献中均有提及引用 Pu 及其同事的研究^[15],以 1~2℃/min 速率从 22℃降至-30℃,再将脂肪组织转移至液氮中长期保存,复苏时使用 37℃水浴快速溶解,其各项结果均较好。Mashiko T 等^[16]将脂肪组织简单冷却保存至-80℃或采用程序降温法保存至-196℃,37℃快速复温后发现冷冻脂肪组织较新鲜组织而言,多数脂肪细胞坏死,且基质血管细胞数目显著下降,移植至免疫缺陷裸鼠体内后,冷冻保存的脂肪多数被保留为坏死组织或纤维组织。目前对脂肪组织冻存方法的研究繁多,结果也不同,甚至相悖,该如何选择应不断筛选、论证。

5 脂肪移植成活率及安全性问题

自体脂肪移植获得长期良好组织填充效果的一个主要障碍是移植部位注射脂肪吸收率高,达其体积的 70%,随着时间的推移,移植植物中的一些坏死物质和血运重建不足可能是造成这一问题的原因。因此提高脂肪移植成活率也是一个重要的临床问题。

关于提高脂肪组织移植成活率的研究多集中于移植过程中尽量减少创伤,优化组织生存能力,加强血运重建等。有研究利用富血小板血浆(PRP)联合脂肪组织共同移植,结果表明 PRP 可促进脂肪组织存活及血管形成^[17]。董政等^[18]利用高压氧处理脂肪组织移植后大鼠,发现脂肪组织周围的微血管数量明显增加,促进了脂肪细胞增殖,进而提高脂肪成活率。脂肪组织的移植部位也会影响其存活率,移植至脂肪较少部位时脂肪组织存活率低^[19]。研究显示^[20],冷冻脂肪组织移植比新鲜脂肪在手术部位引起的肿胀和变色少。Ko MS 等^[21]将来自同一供体的人脂肪间充质干细胞与低温保存的脂肪组织混合移植,发现脂肪组织移植存活率有提高。目前,脂肪组织移植并无标准方法或最优方法来提高移植存活率,深低温保存后脂肪组织移植的存活率研究也较少,有待深入研究。

在自体脂肪移植时,除考虑成活率问题外,安全性问题也是临床应用中极为重视的。任姝锦等^[22]追踪统计了 82 例接受自体脂肪颗粒移植治疗面部凹陷的患者,部分患者虽在术后出现血肿或不同程度的硬结节,但后期均逐渐恢复,预后良好,患者满意度达 97%。蔡磊等^[23]分析了 450 例患者应用自体脂肪移植进行面部轮廓重塑及年轻化术后效果及安全性,其中 132 例患者术后皮肤出现局部淤青,但 2 周后均逐步消退,无严重并发症。自体脂肪移植术后轻微并发症如纤维化、钙化、感染等均预后较好。但严重并发症如脂肪移植物导致血管栓塞、失明等目前仍无有效治疗措施,也无充分证据证明脂肪移植术可增加患者患肿瘤的风险。因此脂肪移植的安全性还需通过大量临床研究总结经验。

6 总结

脂肪组织体外冻存研究目前已有大量成果,但整个冻存方案如脂肪组织的采集方法、部位的选择、纯化脂肪颗粒方法的确定、冻存保护剂的选择及配比、冻融程序、使用前质量标准等方面均无公认统一的标准。脂肪组织冻存的目的是方便使用,但冻存后移植存活率受收集处理脂肪的方法、组织接触血液或多卡因药物、供受体位置、离心注射方法等多种因素影响,因此其相关研究结果也各式各样。在脂肪组织冻存各环节选择何种条件以组成最优化的标准方案,仍需继续探索以及更多的临床研究。脂肪组织冻存后移植的成活率问题及安全性问题也需要通过大量临床研究来探究。这些问题的解决可能推动脂肪组织移植乃至再生医学及组织工程的前进发展。

参考文献:

- [1]张倩,时杰,李晓殿,等.两种吸脂方法在自体脂肪移植隆乳术的应用及效果[J].中华医学美容杂志,2019,25(1):25-28.
- [2]张新合,高建华.吸脂方法及吸脂压力对脂肪细胞损伤程度的实验研究[J].中华医学美容杂志,2001,7(5):254-257.
- [3]赵延峰,董雅明,董宏华,等.不同取材及处理方法对脂肪细

胞影响的研究[J].中国美容医学,2014(22):46-49.

- [4]Cheriyian T,Kao HK,Qiao X,et al.Low Harvest Pressure Enhances Autologous Fat Graft Viability [J].Plast Reconstr Surg, 2014,133(6):1365-1368.

- [5]李燕,郭莉,谢森,等.不同取脂部位自体脂肪颗粒移植吸收率的临床研究[J].河北医药,2017,39(1):51-53.

- [6]Pfaff M,Wu W,Zellner E,et al.Processing Technique for Lipofilling Influences Adipose-Derived Stem Cell Concentration and Cell Viability in Lipoaspirate [J].Aesthetic Plastic Surgery,2014,38(1):224-229.

- [7]Ni Y,He X,Yuan Z,et al.Effect of Fat Particle-to-SVF Ratio on Graft Survival Rates in Rabbits [J].Annals of Plastic Surgery, 2015,74(5):609-614.

- [8]吴荣薇,陆海滨,杨晓楠,等.不同纯化方法在脂肪体积保持方面的实验研究[J].中华整形外科杂志,2018(2):141-145.

- [9]陆海滨.不同方法纯化颗粒脂肪的效果评价及其对移植后转归的影响[D].中国医学科学院北京协和医学院,2017.

- [10]Zheng W,Shen J,Wang H,et al.Effects of Frozen Stromal Vascular Fraction on the Survival of Cryopreserved Fat Tissue[J].Aesthetic Plastic Surgery,2019,43(3):826-835.

- [11]魏国茜.不同冻存条件对人颗粒脂肪活性影响的实验研究[D].大连医科大学,2017.

- [12]孙音,伍明政,顾洛莎,等.不同配比低温保护剂对冻存人颗粒脂肪裸鼠移植的影响[J].中国医药导报,2019,16(5):19-22.

- [13]程爱娟,陈文,王少华.海藻糖对颗粒脂肪细胞冷冻保存效果的影响[J].徐州医学院学报,2013,33(10):692-694.

- [14]黄楦祺,陈俊男,赖琳英,等.不同冻存时间对脂肪组织生物学活性的影响[J].中国美容医学,2019,28(2):14-17.

- [15]Pu LL.Cryopreservation of adipose tissue [J].Organogenesis, 2009,5(3):138-142.

- [16]Mashiko T,Wu SH,Kanayama K,et al.Biological Properties and Therapeutic Value of Cryopreserved Fat Tissue[J].Plastic and Reconstructive Surgery,2018,141(1):104-115.

- [17]Lei X,Liu H,Pang M,et al.Effects of Platelet-Rich Plasma on Fat and Nanofat Survival:An Experimental Study on Mice[J].Aesthetic Plastic Surgery,2019(43):1085-1094.

- [18]董政,任纪祯,李坤,等.高压氧促进自体脂肪移植成活率的实验研究[J].中国美容整形外科杂志,2019,30(6):336-337,355.

- [19]Yu P,Yang X,Qi Z.Influence of Recipient Site on the Function and Survival of Fat Grafts [J].Annals of Plastic Surgery, 2019(83):241.

- [20]Shu Z,Gao D,Pu LLQ.Update on Cryopreservation of Adipose Tissue and Adipose-derived Stem Cells[J].Clinics in Plastic Surgery,2015,42(2):209-218.

- [21]Ko MS,Jung JY,Shin IS,et al.Effects of Expanded Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells on the Viability of Cryopreserved Fat Grafts in the Nude Mouse [J].Int J Med Sci,2011,8(3):231-238.

- [22]任姝锦,刘玉丽,李正斌.自体脂肪颗粒移植在面部凹陷整形美容中的应用研究[J].中国医疗美容,2019(7):31-34.

- [23]蔡磊,杨明霞,商婷,等.450 例应用自体脂肪移植进行面部轮廓重塑及年轻化的临床报告[J].中华整形外科杂志,2019,35(8):748-752.

收稿日期:2020-03-19;修回日期:2020-05-06

编辑/宋伟