

网络出版时间: 2020-4-7 16:49 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200403.1821.028.html>

P188 抑制大鼠自体脂肪移植炎症浸润的实验研究

李吟秋,倪子樵,王鑫,宋家骞,朱飞

摘要 为研究表面活性剂 P188 是否对大鼠自体脂肪移植后的炎症浸润具有抑制作用。建立大鼠自体脂肪移植动物模型,分为对照组(生理盐水组)和实验组(P188组),于1、2、4周取出脂肪组织,测定体质量和体积;通过HE染色观察移植后脂肪炎症浸润的程度;通过RT-PCR和ELISA检测相关炎症因子基因和蛋白水平的表达。脂肪移植4周后,对照组与实验组的脂肪体质量、体积具有差异性[体质量: (0.13 ± 0.02) g vs (0.19 ± 0.02) g, $P < 0.01$; 体积: (0.15 ± 0.03) ml vs (0.19 ± 0.01) ml, $P < 0.05$]; HE结果显示,移植4周后实验组炎症浸润面积低于对照组; RT-PCR和ELISA结果显示P188抑制IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的mRNA以及蛋白表达。实验结果表明P188对大鼠自体脂肪移植后的炎症浸润具有抑制作用。

关键词 P188; 脂肪移植; 炎症

中图分类号 R 62

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)04-0629-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.04.028

近年,自体脂肪移植已成为修复软组织缺损的有效方法。移植过程中脂肪组织因遭受破坏而引发级联反应导致的细胞凋亡是存活率低的原因之一^[1]。由于创伤,机体产生应激反应,导致相关炎症因子释放引起炎症反应。创伤愈合过程中多种炎症细胞在创伤局部浸润并引起促纤维化因子的分泌,以致成纤维细胞在创伤发生后机体愈合过程中增殖导致瘢痕^[2]。当感受到炎症刺激和危险信号的存在,巨噬细胞会发生相关变化并且释放活性物质以及炎症细胞因子,如白细胞介素-12(interleukin-12, IL-12)、IL-1、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等^[3-4]。

Poloxamer 188(P188)是一种三嵌段聚合物,可以在细胞膜破损时有效恢复受损细胞膜的完整性^[5]。已有文献证明^[6], P188可以减轻兴奋性脑损

伤后的巨噬细胞浸润以减轻炎症反应,但尚无文献针对P188对自体脂肪移植的炎症浸润情况进行报道。该研究将在大鼠自体游离脂肪移植模型中,观察P188对大鼠自体脂肪移植炎症浸润的影响以及对移植术后存活率的影响作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料 表面活性剂 Kolliphor® P188(美国Sigma公司); ELISA试剂盒(武汉华美生物工程有限公司); 引物(南京金斯瑞生物科技有限公司); 逆转录试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司); TRIzol(美国Invitrogen公司); 离心机(德国Eppendorf公司); 荧光定量PCR仪(美国Thermo Fisher公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物与分组 随机选取36只健康雄性SD大鼠,体质量200~300 g,均购自安徽医科大学实验动物中心,饲养于SPF实验室条件下,在整个实验过程中保持饲养环境的昼夜节律。造模前,36只大鼠常规进行分笼饲养,每笼6只,使用标准饲料,采取自由饮水,维持室温在21~26℃,室内湿度控制在 $(50 \pm 5)\%$ 。将36只SD大鼠随机分为2组,每组18只,分为对照组(生理盐水组)和实验组(P188组)。两组大鼠于同一时间采取自体脂肪移植,于术后1、2、4周三个时间点取出标本。

1.2.2 动物脂肪移植 实验动物采用10%水合氯醛腹腔麻醉,固定,脱毛,消毒,铺巾,于耻骨联合上方1 cm作切口夹取皮下脂肪组织,切取脂肪组织约0.4 ml后,结扎血管,缝合伤口。将取出的脂肪组织用组织剪除去包膜与血管后,剪碎。根据实验组和对照组需要,分别用生理盐水与一定浓度的药物浸润处理30 min,留置待用。背部脱毛消毒铺巾,在脊柱两侧分别作约1.5 cm圆形标记区域,分别作一小切口,止血钳皮下钝性分离,将剪碎的脂肪组织分别用生理盐水和相应浓度的药物处理后,用1 ml注射器分别将处理好的脂肪组织对应注射进分离好的间隙,每只大鼠背部两侧各注入脂肪组织 (0.2 ± 0.02) ml,体质量约为 (0.25 ± 0.05) g,最后缝合伤

2020-01-08 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 30973124)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院整形外科,合肥 230022

作者简介: 李吟秋,女,硕士研究生;

朱飞,男,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail:

hffzfx@163.com

口。分别在术后 1、2、4 周取出移植脂肪组织。同时腹主动脉取血,置于离心机以 6 000 r/min 离心 10 min,吸取上层血清, -80 ℃ 冻存,用于 ELISA 实验测定。

1.2.3 脂肪组织称重及体积测量 将取出组织置于无菌操作台上,去除其表面覆盖的筋膜。用超精密电子秤称重。取 1 ml 医用注射器,用蜡块封死注射器的针尖端,在自制注射器中加入 0.4 ml 蒸馏水,依次将取出的脂肪组织放置入内,记录量筒内液面上升的高度,高度差即是取出的脂肪组织体积。

1.2.4 组织学观察 将取出的脂肪组织用 10% 福尔马林固定 24 h,经过 4% 多聚甲醛固定,津蜡,包埋 2 μm 厚度连续切片,HE 染色,光镜下观察脂肪组织形态结构。

1.2.5 实时定量荧光 PCR 检测炎症因子的 mRNA 表达 将各组脂肪组织用 Trizol 裂解后,匀浆,按照试剂盒说明书,抽提总 RNA 样品,逆转录获得 cDNA,设计引物,然后使用 SYBR Green PCR mix 试剂盒分别检测 IL-1α、IL-1β、IL-6、TNF-α mRNA 水平,后用 Real-time PCR 检测炎症因子的 mRNA 表达。

表 1 RT-PCR 引物序列

基因名称	上游引物(5'-3')	下游引物(3'-5')
IL-1α	TGAGTCGGCAAGAAATCAA	AGAGAGATGGTCAATGCGAGA
IL-1β	TTGTGGCTGTGGAGAAGCTG	GCCGCTCTTCATACACAGG
IL-6	AGTTGCCTTCTTGGGACTGA	CAGAATTGCCATTGCACAAC
TNF-α	ACGGCATGGATCTCAAAGAC	CGGCAGAGAGGAGTTGACT
β-actin	TGACGTGGACATCCGCAAG	CTGGAAGGTGGACAGCGAGG

1.2.6 ELISA 试剂盒检测炎症因子的蛋白表达 检测 IL-1α、IL-1β、IL-6、TNF-α 的蛋白表达情况。将血清样品从冰箱取出,用恒温水浴箱解冻,按照 ELISA 试剂盒说明书,经过包被抗体洗涤,加入血清样品孵育洗涤,加入酶标再孵育洗涤和加底物显色等步骤,最后用酶标仪在 450 nm 波长下读取 OD 值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析。进行方差齐性检验,正态性检验。计量资料实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。单变量两组资料之间的比较采用 *t* 检验;多组资料之间的比较采用单因素方差分析;方差不齐采用非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脂肪组织称重及体积测量 结果显示,脂肪移植 1、2 周时,实验组与对照组之间体质量和体积比

较差异无统计学意义;4 周时对照组体质量为 (0.13 ± 0.02) g,实验组体质量为 (0.19 ± 0.02) g,两组比较差异有统计学意义($F = 113.781, P < 0.01$);4 周时对照组体积 (0.15 ± 0.03) ml,实验组体积为 (0.19 ± 0.01) ml,两组比较差异有统计学意义($F = 75.347, P < 0.05$)。见图 1。

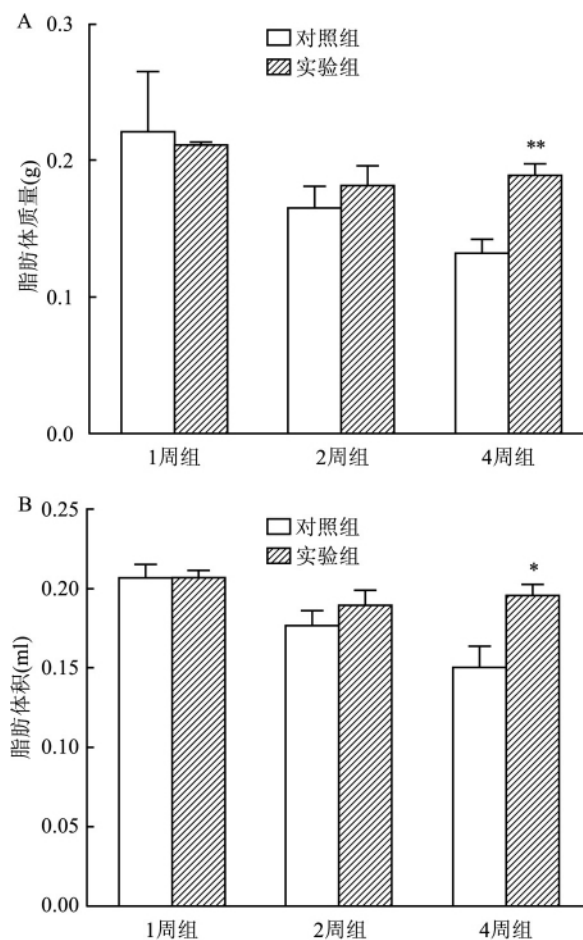


图 1 P188 对移植后脂肪组织的体积和体质量的影响

A: 体积; B: 体质量; 与生理盐水组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 组织学观察 HE 染色显示,对照组炎症反应较强,炎性细胞占据大部分视野,结构紊乱,脂肪细胞松散无规律,可见脂肪液化以及坏死。至 4 周时可见纤维结缔组织较多。而添加了 P188 的实验组在 2 周时可见到较多脂肪细胞产生,至 4 周时可见组织间隔不多,新生脂肪细胞排列相对整齐,形态规则。见图 2。

2.3 实时定量荧光 PCR 检测炎症因子的 mRNA 表达 4 周时,实验组移植脂肪组织中 IL-1α、IL-1β、IL-6、TNF-α 的 mRNA 表达水平低于对照组,差异有统计学意义,其中 IL-1α、IL-1β、IL-6 ($F_{IL-1\alpha} =$

45.158, $F_{IL-1\beta} = 137.533$, $F_{IL-6} = 65.187$, $P < 0.05$), $TNF-\alpha$ ($F_{TNF-\alpha} = 365.781$, $P < 0.01$)。见图3。

2.4 ELISA 试剂盒检测炎症因子的蛋白表达 图4结果显示在自体脂肪移植4周时, P188作用实验

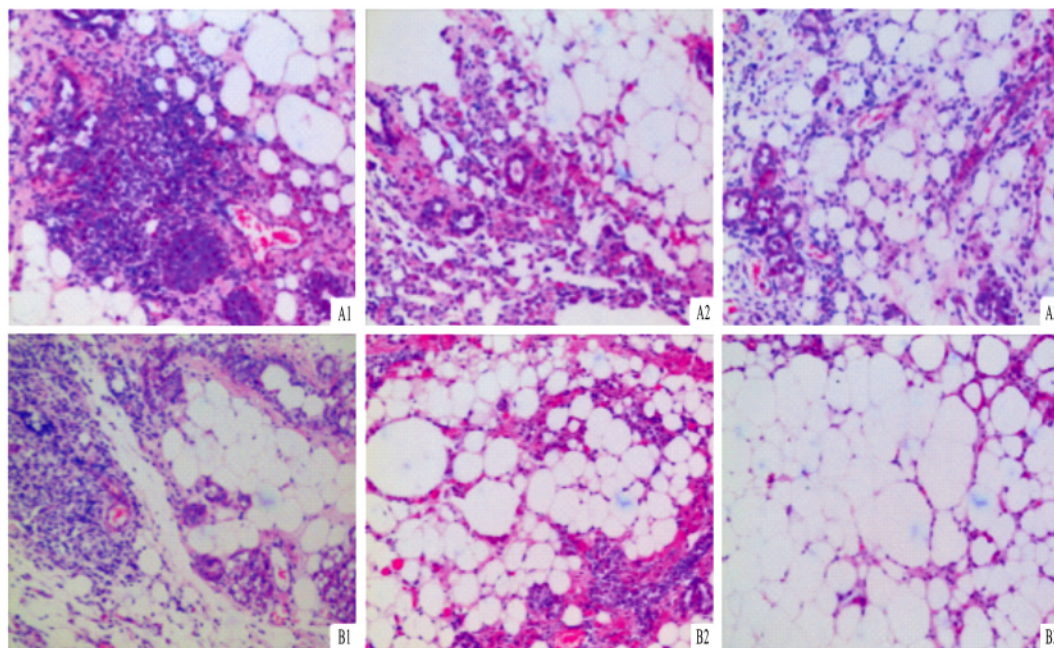


图2 HE染色观察移植后脂肪组织炎症浸润 $\times 200$

A: 对照组; B: 实验组; 1: 1周组; 2: 2周组; 3: 4周组

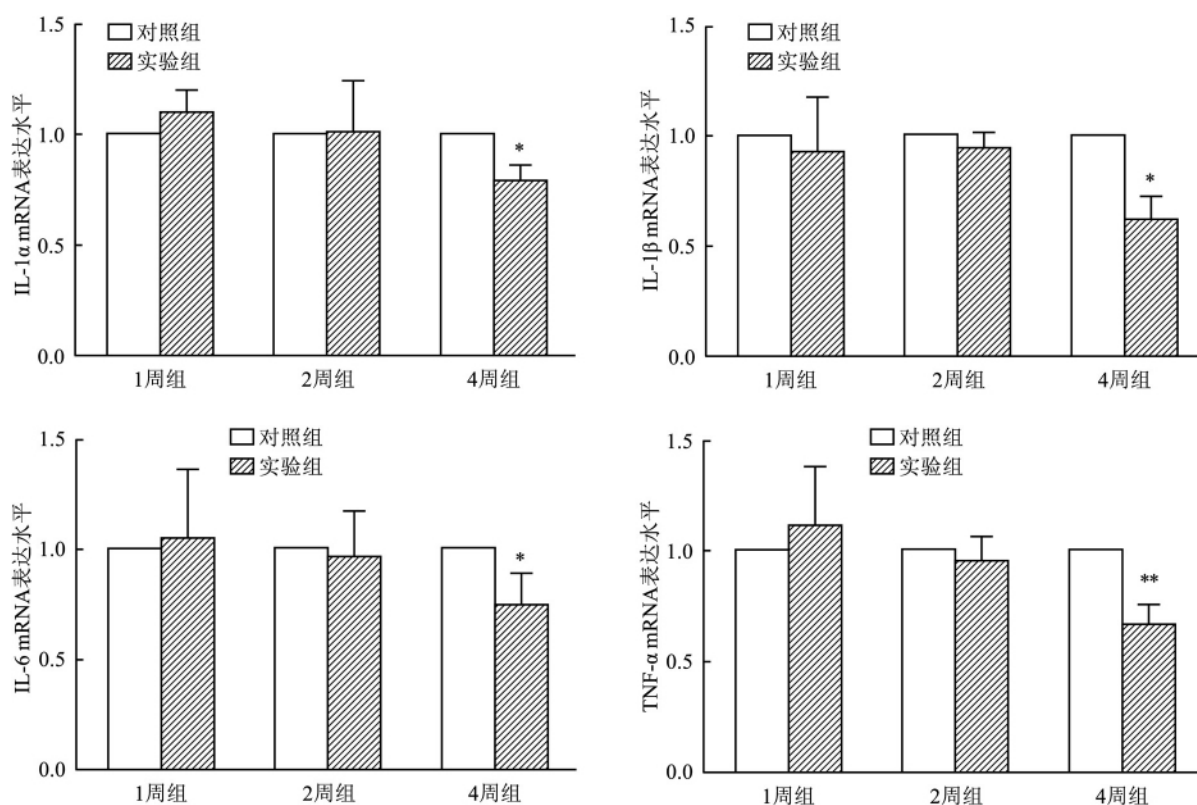


图3 两组炎症因子 mRNA 的表达情况

A: IL-1α; B: IL-1β; C: IL-6; D: TNF-α; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

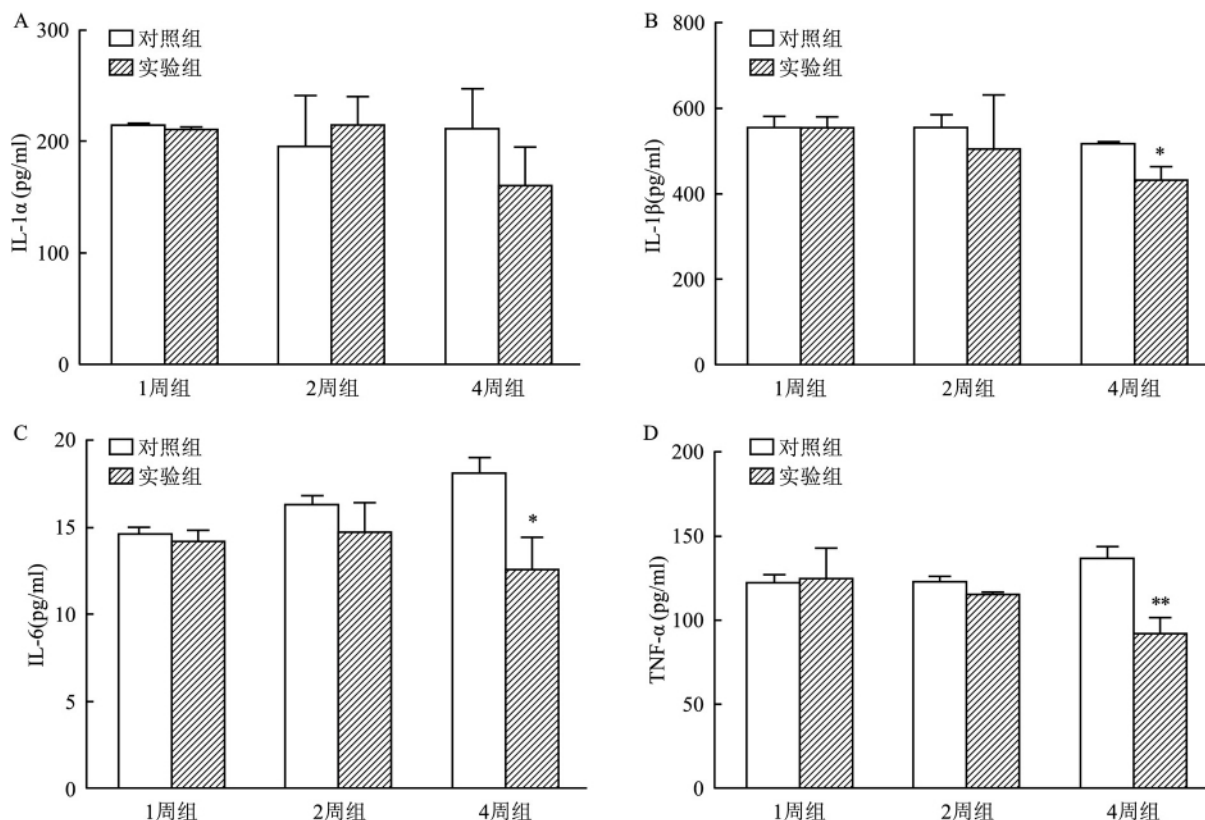


图4 两组炎症因子蛋白表达情况

A: IL-1α; B: IL-1β; C: IL-6; D: TNF-α; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

组可以降低炎症因子 IL-1β、IL-6、以及 TNF-α 的表达,且差异有统计学意义,其中 IL-1β、IL-6 ($F_{IL-1\beta} = 34.607$, $F_{IL-6} = 16.224$, $P < 0.05$), TNF-α ($F_{TNF-\alpha} = 198.633$, $P < 0.01$)。而 IL-1α 的蛋白表达水平虽然有下降趋势,但差异无统计学意义 ($F_{IL-1\alpha} = 54.657$, $P > 0.05$)。

3 讨论

自 Neuber 于 1893 年完成第一例脂肪移植术至今,自体脂肪移植已经成为当下整形手术以及组织修复重建手术的热点。由于脂肪移植存在多个步骤,且会对局部组织造成一定程度的损伤,伴随的炎症反应不可避免的会对移植存活率造成影响。炎症反应存在于多种病理过程中,炎症反应的激活、炎症细胞因子的分泌对创伤发生后机体愈合过程中局部组织的修复和功能的重建有着重要影响作用。除巨噬细胞之外,局部炎症反应对成纤维细胞的增殖也有促进作用^[7],在局部创面愈合过程中,促炎性因子的分泌,炎性细胞因子的释放导致炎症反应的激活,从而引起成纤维细胞的增殖。研究表明^[8],促炎因子的高表达,抑炎因子的低表达,促进形成瘢痕

组织及瘢痕疙瘩。

脂肪组织中除脂肪细胞外,还有成纤维细胞、前脂肪细胞、巨噬细胞等。巨噬细胞是与炎症相关的至关重要的细胞之一。由于炎症反应集中在脂肪移植术后早期阶段,故为验证 P188 对脂肪移植的影响作用,取出脂肪组织的时间点设置在移植后早期,通过评估 P188 对脂肪移植的早期影响作用,可以有效评估其远期效果^[9]。有文献^[10]报道,在脂肪移植过程中,移植的成熟脂肪细胞会因缺氧缺血而凋亡,而前体脂肪细胞分化为脂肪细胞来替代坏死细胞,从而重新构建移植脂肪的结构。高水平的巨噬细胞浸润会抑制前体脂肪细胞的成脂倾向,因此可以推断,抑制脂肪移植炎症反应,会对脂肪移植存活率产生影响。正常生理环境下,脂肪细胞分泌的多种细胞因子处于动态平衡状态,当受到环境威胁时,稳定状态失衡,促进 IL-1、IL-6、TNF-α 等炎症因子分泌增加从而使巨噬细胞活化。与巨噬细胞一样,脂肪细胞表达了大量受体,对炎症因子介导的炎症反应非常敏感,多个炎症信号转导级联反应被激活,分泌相关炎症因子^[11]。脂肪细胞对 TNF-α 十分敏感, TNF-α 对脂肪细胞的生理功能产生多种影响,包括

活化细胞因子的基因表达^[12]。

Poloxamer188 是一种合成表面活性剂,是一种非离子三嵌段共聚物,可插入人工脂质单层膜中,修复受损的生物膜。已有文献^[13]研究证明,P188 可以减轻兴奋性脑损伤后的巨噬细胞浸润,以减轻炎症反应。Ruhl et al^[14]通过体外细胞实验证实 P188 对脂肪细胞的增殖及分化有促进作用,对相关因子的释放如 IGF-1、VEGF 等虽有影响,但作用甚微,不具备统计学意义。

本实验通过对移植后 1、2、4 周的脂肪炎症因子进行检测发现表面活性剂 P188 对移植前两周的脂肪细胞保护和抑制炎症浸润的作用并不明显,与生理盐水组差异无统计学意义;而 4 周组的结果表明,P188 组不仅能抑制炎症的浸润并且可以抑制炎症因子 IL-1 β 、IL-6 以及 TNF- α 的 mRNA 和蛋白水平的表达(与对照组比较,差异有统计学意义,IL-1 β 、IL-6 $P < 0.05$; TNF- α $P < 0.01$)。

综上所述,通过对实验结果的观察和数据的比较,P188 可以减轻自体脂肪移植术过程中产生的炎症反应。因此也可以推断,在创伤愈合领域,因 P188 对炎症反应具有抑制效应,而对瘢痕以及瘢痕疙瘩的形成具有抑制作用,在整形外科修复创面方面的应用有待发掘。

参考文献

- [1] 邵云,秦小霞,魏从真等. α -硫辛酸对肥胖模型大鼠血清脂肪因子的影响[J]. 检验医学 2015 30(11):1147-9.
- [2] 叶飞轮. 瘢痕疙瘩中 HIF-1 α 的表达及其与血管新生、炎症反应及细胞凋亡的相关性研究[J]. 海南医学院学报 2017 23(17):2442-4.
- [3] Murray P J, Allen J E, Biswas S K, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guideline [J]. *Immunity* 2014 41(1):14-20.
- [4] Anghelina M, Krishnan P, Moldovan L, et al. Monocytes/macrophages cooperate with progeny cells during neovascularization and tissue repair: conversion of cell columns into fibrovascular bundles [J]. *Am J Pathol* 2006 168(2):529-41.
- [5] Medina M A, Nguyen J T, Kirkham J C, et al. Polymer therapy: a novel treatment to improve fat graft viability [J]. *Plastic Reconstruction Surg* 2011 127(6):2270-82.
- [6] Curry D J, Wright D A, Lee R C, et al. Surfactant poloxamer 188-related decreases inflammation and tissue damage after experimental brain injury in rats [J]. *J Neurosurg* 2004 101(1 Suppl):91-6.
- [7] Mescher A L. Macrophages and fibroblasts during inflammation and tissue repair in models of organ regeneration [J]. *Regeneration (Oxf)* 2017 4(2):39-53.
- [8] Lynam E C, Xie Y, Dawson R, et al. Severe hypoxia and malnutrition collectively contribute to scar fibroblast inhibition and cell apoptosis [J]. *Wound Repair Regen* 2015 23(5):664-71.
- [9] Medina M A, Nguyen J T, McCormack M M, et al. A high-throughput model for fat graft assessment [J]. *Lasers Surg Med* 2009 41(10):738-44.
- [10] Mashiko T, Yoshimura K. How does fat survival and remodel after grafting [J]. *Clin Plast Surg* 2015 42(2):181-90.
- [11] Suga H, Eto H, Aoi N, et al. Adipose tissue remodeling under ischemia: death of adipocytes and activation of stem/progeny cells [J]. *Plast Reconstr Surg* 2010 126(6):1911-23.
- [12] Cheng H L, Kuo C Y, Liao Y W, et al. EMCD, a hypoglycemic triterpene isolated from *Momordica charantia* wild variant, attenuates TNF- α -induced inflammation in FL83B cells in an AMP-activated protein kinase-independent manner [J]. *Eur J Pharmacol* 2012 689(1/3):241-8.
- [13] Lichtnekert J, Kawakami T, Parks W C, et al. Changes in macrophage phenotype as the immune response evolves [J]. *Curr Opin Pharmacol* 2013 13(4):555-64.
- [14] Ruhl T, Storti G, Pallua N, et al. Proliferation, metabolic activity, and adipogenic a of human preadipocytes exposed to 2 Surfactants In Vitro [J]. *J Pharm Sci* 2018 107(5):1408-15.

Inhibiting effects of P188 on inflammatory infiltration of fat transplantation on rats

Li Yinqiu, Ni Ziqiao, Wang Xin, et al

(Dept of Plastic Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract To study whether Kolliphor® P188 could inhibit the inflammation during autologous fat transplantation, from the perspective of inflammation to analyze the effect of P188 on transplantation. The animal models of autologous fat transplantation were divided into the control group (normal saline group) and the experimental group (下转第 639 页)

[11] Ohta T ,Katsuda Y ,Miyajima K et al. Gender differences in metabolic disorders and related diseases in spontaneously diabetic torii-leprfa rats[J]. *J Diabetes Res* 2014; 2014: 841957

[12] Brooks H L ,Pollow D P ,Hoyer P B. The VCD mouse model of

menopause and perimenopause for the study of sex differences in cardiovascular disease and the metabolic syndrome[J]. *Physiology (Bethesda)* 2016; 31(4): 250-7.

Effect of gender on the establishment of mouse psoriasis induced by imiquimod

Luo Tingting ,Han Chencheng ,Cui Dongqian et al

(*Institute of Clinical Pharmacology Anhui Medical University Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine Ministry of Education Anhui Collaborative Innovation Center of Anti-inflammatory and Immune Medicine Hefei 230032*)

Abstract An imiquimod (IMQ)-induced psoriasis mouse model was established to evaluate the model and explore the effect of gender on IMQ-induced mouse psoriasis model establishment. Half of male and female BALB/c mice were randomly divided into normal control group, model group 1 (male) and model group 2 (female), and IMQ was applied to the back skin of mice to establish a mouse psoriasis model. The psoriasis area and severity index (PASI) was scored daily for mouse skin. The pathological changes of skin were observed by HE staining. The thymus index and spleen index were calculated. The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was detected by immunohistochemistry and the expression of involucrin was detected by immunofluorescence. Compared with the control mice, IMQ-induced male and female mice showed scaly erythema and thickening and continued to deteriorate, and the PASI score also showed the same results. HE staining found that compared with control mice, the epidermis of IMQ-induced male and female mice were thickened ($P < 0.001$), telangiectasia and inflammatory cell infiltration were observed in the superficial epidermis. Parakeratosis was observed in the stratum corneum and the granular layer became thinner or even disappeared. The acanthosis was thick, and epidermis extended downward. The spleen index of IMQ-induced mice increased ($P < 0.001$) and there was no significant difference in spleen index between male and female mice. The expression of keratinocytes in IMQ-induced male and female mice increased ($P < 0.05$) and there was abnormal differentiation. There was no significant difference in the expression of PCNA and involucrin between male and female mice. The IMQ-induced mouse psoriasis model has many similarities with human psoriasis, and gender has little effect on the establishment of IMQ-induced mouse psoriasis model.

Key words gender; psoriasis; imiquimod; animal model

(上接第 633 页)

(P188 group). Weight and volume were measured after fat tissue was removed at time points 1, 2 and 4 weeks. The degree of fat inflammatory infiltration after transplantation was observed by HE staining. Finally, the mRNA and protein levels of inflammation-related factors IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α were detected by RT-PCR and ELISA. After 4 weeks of fat transplantation, there were differences in fat weight and volume between the control group and the experimental group [weight: (0.13 ± 0.02) g vs (0.19 ± 0.02) g, $P < 0.01$], volume: (0.15 ± 0.03) ml vs (0.19 ± 0.01) ml, $P < 0.05$]. HE staining results showed that the inflammatory infiltration area of P188 group was lower than that of normal saline group 4 weeks later. RT-PCR and ELISA results showed that 4 weeks after fat transplantation, P188 inhibited the mRNA levels of inflammatory cytokines IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α and the protein expressions of IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α . It's proved that P188 can inhibit inflammatory infiltration after autologous fat transplantation in rats.

Key words P188; fat transplant; inflammation