

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

組織工程應用於生物體內脂肪生成之持續性監控

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC90-2314-B-002-414-

執行期間：90年08月01日至91年07月31日

執行單位：國立臺灣大學醫學院外科

計畫主持人：湯月碧

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 8 月 25 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告
組織工程應用於生物體內脂肪生成之持續性監控
Continued monitoring of De Novo Lipogenesis by Tissue Engineering
計畫編號: NSC90-2314-B-002-414
執行期限: 90年8月1日至91年7月31日
主持人: 湯月碧 執行機構及單位名稱: 台灣大學醫學院

一、中文摘要:

本計畫主要是應用基因轉殖於脂肪組織工程, 在我們希望的部位自行產生脂肪組織增生, 以達到重建或整形的目的。過去我們在老鼠皮下注射基底膜 (basement membrane) 的複合體 Matrigel 或 Cymetra 作為組織增生的支架, 其中混合可在生物體內分解的凝膠微粒, 這些微粒為可控制的藥物釋放系統, 可將我們所使用的生長因子包在其中並逐漸釋放, 以達到刺激細胞分化、增生的目的。但此藥物釋放系統只在特定的時間內持續釋放生長因子, 不可任意延長或中止。而細胞經基因轉殖後不僅能穩定不斷地釋放我們想要的生長因子, 且可經由調控基因隨時中止或重新啟動其釋放, 這也是基因療法的基本原理。基因療法已隨分子生物學的突飛猛進日趨成熟, 也是許多疾病治療希望所寄。我們在此將之應用於自體脂肪組織再生工程, 將必要生長因子的基因轉殖至脂肪幹細胞或其他間質細胞如纖維母細胞等, 使轉殖後之細胞能持續穩定地製造並釋放生長因子, 我們並在轉殖的基因上加上一段調控基因可隨時打開或關閉讓生長因子在必要時才被製造及釋放。在基因轉殖載體方面, 我們選擇正離子脂質體是因其具有轉殖效率高、容易操作且實驗結果重覆性高等優點, 並可避免病毒載體之危險性, 是目前廣被使用之基因轉殖載體。我們先在培養的細胞中評估, 如果轉殖的效率、生長因子的釋放與調控、甚至對細胞的毒性等皆有令人滿意的結果, 我們將進一步做動物實驗評估其將來應用於人體組織工程的可能性。

關鍵詞: 組織工程; 脂肪組織增生; 生長因子; 基因轉殖; 調控基因; 正離子脂質體

Abstract

The main purpose of this experiment is using gene transfection in the tissue engineering about adipogenesis. In the previous study, we used basement membrane complex (Matrigel or Cymetra) mixed with biodegradable gelatin microspheres, a controlled drug release system, was injected into subcutaneous layer of mice. bFGF, growth hormone and IGF1 were incorporated into these microspheres respectively before mixing. The adipose precursor cells are fibroblast like precursor cells and could be stimulated by growth hormones to migrate into the scaffold and differentiate to mature fatty tissue. Although this drug releasing system

could induce adipogenesis, the growth factors were released continuously but could not be stopped or restarted releasing at any time as we will. If we transfect genes of growth factors we need with regulatory genes into adipocyte precursor cells or other mesenchymal cells such as fibroblasts, the desired growth factors could be released stably and the genes could be turned on or off at any time we need. The cationic lipid reagents are the transfection system of our choice because it yields high transfection efficiency in a wide variety of eukaryotic cells, is simple to perform, and ensures consistently reproducible results. Here in vitro studies by transfection of desired genes into cultured cells were tried, if the results are satisfactory, we will apply it further to in vivo studies

二、緣由與目的

整形外科(Plastic Surgery)為雕塑、塑形外科，即改變外形或曲線(大多為改良)，及太大則減量、太小則填補組織或外來物。由多變小較容易，由小變大則須考慮各種填充材料之應用。

填充之材料可為自體組織或外來物，較大量的填補物常需使用外來物，若為軟組織，則常使用矽化合物做成的食鹽水袋或矽膠做成之球狀物(pillow)。若為硬組織，則材料更多，如陶瓷(Ceramics)、hydroxyapatite、polyethylene、矽膠成形物、鈦金屬製品、methacrylate 等。然而，外來填充物具有潛在之危險性，即怕感染、變形、斷裂、組織萎縮、植入物外露等問題，更何況，有的植入物價格十分昂貴。

對於軟組織之加強(augmentation): 首先考慮到使用自體組織，若為移植塊(graft)，則常碰到移植塊被部份吸收之問題。若為帶血管之組織瓣(flaps)，則需有一組織供應處(donor site)，或甚至需用顯微手術作組織移植，工程較為浩大，手術時間較長。臨床上，經常碰到軟組織需要加強的情況，最常見的是乳房加大或乳癌術後之重建、臉部輪廓之雕塑、臀部之加強等等。目前，組織工程之技術日新月異，若能取用少段脂肪細胞或脂肪細胞之前生細胞(precursor cells)，加入刺激生長之因素，令其複製多數脂肪細胞，並且其體積之量可以由我們控制，將是臨床上一大突破。傳統上，組織器官功能或結構上的缺損須賴自體或異體器官移植來作為最終解決之道，而近幾年來蓬勃發展的組織工程提供新的治療方向，它逐漸從實驗室中被拿來應用在臨床上，如皮膚及骨組織工程已廣被研究，軟組織則較少被提及。自體脂肪移植在整形及美容外科已有很久的歷史，但因有再吸收的問題，結果仍令人失望。有兩篇日本的研究報告指出他們將基底膜(Basement membrane)的萃取物和刺激性生長因子鹼性纖維母細胞生長因子混合後，注入老鼠的皮下，結果產生新的脂肪組織。這兩篇報告提供脂肪組織工程研究很好的方向及實驗模式，我們如能好好應用，加入自己新的觀點，例如更有效率地產生脂肪組織，如何控制脂肪組織產生的量，甚至如何控制新生脂

肪組織的形狀等等，都是我們探討的方向。並且，如能以簡單的注射方法即能達到上述目的，其在臨床上的應用價值是難以估計的。當然，本研究也將讓我們更深入了解脂肪細胞之分化及增生之機轉。

三、實驗結果

本計劃研究組織工程應用在脂肪組織增生，因此以動物實驗為主。6週大之 mice，飼養及追蹤半年。

實驗步驟如下：

1. 6週大之 mice，共 40 隻，分 ABCD 4 組，分別在背部同樣部位皮下注射實驗藥物
2. A 組打入 Cymetra 及 bFGF、GF、IGF-1 incorporated gelatin microspheres，B 組打入 Cymetra 及 free bFGF、GF、IGF-1，C 組打入 Cymetra，D 組打入 bFGF、GF、IGF-1 incorporated gelatin。
3. 將注入部位之組織切片取出，部份做染色處理，以特殊染色觀察脂肪組織，部份使用免疫螢光染色來觀察脂肪細胞之分佈，取出時間分別為打入後 1 週、2 週以後每隔 3 週取出，第 10 次取出時間剛好是打入後半年。除組織切片外，我們也取部份組織作脂肪生成之標記蛋白 glycerophosphate dehydrogenase 之 mRNA 生成之監控。

四、討論

由實驗結果可知使用基底膜(Basement membrane)的複合體 Cymetra 和刺激性生長因子鹼性纖維母細胞生長因子混合後，利用 Cymetra 作為組織增生的支架，混合可在生物體內分解的凝膠微粒，建立在生物體內可控制的藥物控制系統，將所使用的生長因子逐步釋放，可達到刺激細胞分化增生，產生新的脂肪組織。但此藥物釋放系統只在特定的時間內持續釋放生長因子，不可任意延長或中止。如能進一步利用基因療法原理，將必要生長因子的基因轉殖至脂肪幹細胞或其他間質細胞如纖維母細胞等，使轉殖後之細胞能持續穩定地製造並釋放生長因子；監測被載入生長因子 DNA 之幹細胞其生長因子之 mRNA 及蛋白質的後續表現情形，以及繼續觀察幹細胞受生長因子刺激後之分化情形，並紀錄脂肪生成標記蛋白 glycerophosphate dehydrogenase 之 mRNA 表現情形，將可評估轉殖的效率、生長因子的釋放與調控、甚至對細胞的毒性有所認知，以便進一步做動物實驗評估其將來應用於人體組織工程的可能性。

五、參考文獻

1. Hauner, H., Rohring, K., and Petruichke, T. Effects of epidermal growth factor(EGF), platelet-derived growth factor(PDGF) fibroblast growth factor(FGF) on human adipocyte development and function. Eur. J. Clin. Invest. 25, 90, 1995

2. Kawaguchi, N, Toriyama K, Nicodemou-Lena E. De novo adipogenesis in mice at the site of injection of basement membrane and basic fibroblast growth factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998 Feb; 95:1062-1066
3. Tabata Y, Miyao M, Inamoto T, Ishii T, Hirano Y. De novo formation of adipose tissue by controlled release of basic fibroblast growth factor. Tissue Eng 2000 June;6(3):279-289
4. Tabata Y., Hijikata, S., Muniruzzaman, MD., and Ikada, Y. Neovascularization effect of biodegradable gelatin microspheres incorporating basic fibroblast growth factor. J. Biomater. Sci. Polymer Edn. 10, 79, 1999.
5. Wang, J. W., and Aspenberg, P. Basic fibroblast growth factor promotes bone ingrowth in porous hydroxyapatite. Clin. Orthop. Rel. Res. 333, 252, 1997.
6. Gareis, M., Harrer, P., and Bertling, W. M. (1991) Cell. Mol. Biol. 37, 191
7. Gershon, H., Ghirlando, R., Guttman, S. B., and Minsky, A. (1993) Biochemistry 32, 7143
8. Smith, J. G., Walzem, R. L., and German, J. B. (1993) biochim. Biophys. Acta 1154, 327.