

國立臺灣大學生物資源暨農學院動物科學技術學系



碩士論文

Department of Animal Science and Technology

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

預先皮膚擴張於豬模式中用以準備自體脂肪移植之潛能

The Potential of Pre-Expansion of Skin Preparing for  
Autologous Fat Grafting in a Swine Model

陳昇志

Sheng-Chih Chen

指導教授：吳信志 博士

Advisors: Shinn-Chih Wu, Ph. D.

中華民國 106 年 1 月

January, 2017

## 誌謝

本論文得以順利完成，承蒙恩師 吳信志 老師之悉心指導，吳老師不僅是學業上更是我人生的導師，總是不斷給予機會讓我勇於克服自己的弱點，從每次專討報告中吸取經驗並改正缺點，學習獨立思考和解決問題的能力，讓我深刻體會到自己確實在一點一滴進步當中；亦感謝長庚醫院 高煌凱 醫師在研究過程中於試驗設計之建議以及實驗方向之引導，並且於口試時對此論文之試驗結果提出獨到之解析，值得發人省思；感謝 鄭登貴 老師撥冗擔任此次口試委員，並給予此論文之指導和建議，使本論文得以漸趨完整。

碩士班求學之路雖然坎坷，所幸受到許多人的幫助，皆銘記於心。特此感謝 莊志遠 先生提供必要之實驗器材以及 魏恒巍 老師提供實驗用豬欄，讓我的研究得以順利進行。感謝系辦 奕雯 學姊和 位育 學長的關心，以及遇到挫折時的鼓勵。感謝動物生殖技術研究室的學長姐們：李妍樺 學姊、周志任 學長、林育聖 學長、張乃云 學姐、張家駿 學長、張廉本 學長、許慈宇 學姊、陳碩甫 學長、彭紹于 學長、曾哲揚 學長、葛亦辰 學長、鄭淳淳 學姊、蕭冠宇 學長於實驗技術之指導以及學習經驗分享；感謝曾經與我共同奮鬥的同學們：王浩、林書毅、高藝榕、歐陽桓、魏可軒 於實驗和生活上互相幫忙和照顧。

最後，感謝我最摯愛的家人：爸爸、媽媽、弟弟，你們一直是最忠實的聽眾，共同分享且分擔著我的所有喜怒哀樂，謝謝你們的陪伴、支持和包容，讓我有繼續堅持到最後的動力。另外感謝為此研究而犧牲奉獻的所有小豬。

謹誌于

國立臺灣大學動物科學技術學系

中華民國一百零六年一月

## 摘要

自體脂肪移植 (autologous fat grafting, AFG) 為採集自身的脂肪組織進行注射，目前已經廣泛用於整形外科中之乳房重建；然而，AFG 之手術成果通常被視為不可預測，因長期存留容積通常在 20%和 90%之間變化，其原因一般認為是移植後的早期階段缺乏血液供應所導致的結果。外部體積擴張 (external volume expansion, EVE) 的負壓處理，長期以來被認為具有預先處理受體部位之潛能。此外，機械力已被證實對於間葉幹細胞增殖和分化具有關鍵的作用。因此，為了探討 EVE 之體內機械力作用對於皮下脂肪中的細胞增殖，血管生長和成熟以及脂肪幹細胞 (adipose stem cells, ASCs) 的細胞標記，增殖能力和分化潛能的影響，利用豬的皮膚和皮下組織與人類之間在解剖和生理上相似性設計為動物模式。

本研究使用負壓 50 毫米汞柱，在每天相同 8 小時 (上午 9 點到下午 5 點) 的時間間隔連續作用於豬隻側腹表皮直到 10 或 21 天。在第 11 或 22 天進行採樣之前，使用超音波測量軟組織厚度，結果顯示 EVE 誘導軟組織擴增是屬於一種暫時性效應。接著將試驗組和對照組所取得之樣本進行各項分析。H&E 染色 (hematoxylin and eosin staining) 結果顯示，EVE 可以促進血管重塑的過程，但是對脂肪細胞的大小和數量並沒有顯著影響。Ki67 免疫組織化學染色的結果顯示，基底角質細胞和脂肪細胞之細胞增殖相較於對照組沒有出現顯著差異；相反地，通過  $\alpha$ -SMA 染色得到證實，具有平滑肌細胞的血管網絡在 EVE 處理組中有明顯增加。另外，使用 image J 測量表皮厚度的結果顯示各組之間並沒有觀察到顯著的差異。CD31 免疫螢光染色結果顯示，血管密度會隨著 EVE 的作用時間而逐漸增加。

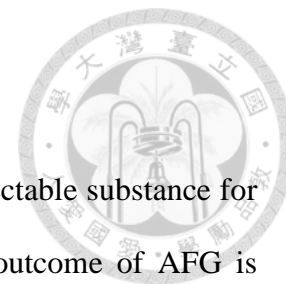
基質血管細胞 (stromal vascular fraction, SVF) 和 ASCs 分別從脂肪組織中分離和純化。ASCs 的增殖能力透過倍增時間和集落形成分析進行檢定，結果卻顯示對照組和 EVE 處理組之間沒有發現統計上的差異。ASCs 進行脂肪分化誘導 21 天，隨後進行油紅染色 (Oil-Red O staining)，結果 ASCs 的脂肪分化潛能在各組之中也沒有顯著差異。流式細胞術分析結果顯示，無論處理時間長短，ASCs 皆會表現諸如 CD29, CD44, CD90 與 CD105 等多種間葉細胞標記，惟缺乏表現造血細胞標記如 CD34 之能力。多色流式細胞儀分析 SVF 細胞組成，結果顯示各組之間 ASCs

的比例沒有顯著差異；相較之下，在 EVE 處理組中的內皮細胞，其百分比，顯著高於對照組者，且亦會隨著其作用時間之延長而顯著增加。

綜合上述，EVE 之主要作用機制，在於調節新血管網絡之形成、生長和功能化血管的成熟。EVE 的預先處理效果已經在李宋豬模式中得到證實，此結果可以輕易地轉化為臨床實踐，以提高細胞和組織移植存活率。期望本研究成果可以幫助臨床醫生在手術前優化受體組織的血管分布，以進一步改善脂肪移植的存留容積。

關鍵詞：自體脂肪移植、外部體積擴張、脂肪幹細胞、基質血管細胞、脂肪容積存留

## ABSTRACT



Autologous fat grafting (AFG) has been widely used as an injectable substance for breast reconstruction in cosmetic surgery; however, the clinical outcome of AFG is generally considered an unpredictable procedure, with long-term retention commonly varying between 20 and 90%, which is believed to be caused by poor blood supply in the early after grafting. Negative pressure using external volume expansion (EVE) has long been theorized as a potential means to precondition the recipient bed. In addition, the mechanical force has been confirmed to play a pivotal role in mesenchymal stem cells proliferation and differentiation. Accordingly, to investigate the effects of *in vivo* mechanical loading of EVE on cell proliferation, vascular growth and subsequent maturation as well as cellular markers, proliferation capacity and differentiation potential of adipose stem cells (ASCs) in subcutaneous fat, a swine model was devised to take advantage of anatomical and physiological similarities in skin and subcutaneous tissue between pigs and human.

In this study, pigs were treated with continuous suction at -50 mmHg during the same eight-hour (9:00-17:00) interval each day until 10 or 21 days. Before sampling on day-11 or 22, an ultrasonography was performed to study the soft tissue thickness and results revealed that EVE-induced soft tissue enlargement is a transient effect. Specimens from control and treated groups conducted a various analysis. The result of H&E staining showed that EVE can enhance the process of vascular remodeling but has no significant effect on adipocytes size and numbers. IHC stain with Ki67 showed cell proliferation in basal keratinocytes and adipocytes did not appear significant difference as compared with the non-treated group; in contrast, vascular networks layered with smooth muscle cells

increased in EVE treated groups as evident by the  $\alpha$ -SMA staining. On the other hand, the epidermal thickness was measured by image J but no significant difference was observed across the groups. Immunofluorescence stain with CD31 suggested that blood vessel density would gradually increase with the loading time of EVE.

Stromal vascular fraction (SVF) cells and ASCs were isolated and purified from fat tissue, respectively. Proliferation capacity of ASCs was measured by doubling time and colony-forming assay but no statistical difference was found between the control and EVE treated groups. ASCs were subjected to adipogenic induction for 21 days followed by Oil-Red O staining and adipogenic differentiation potential of ASCs had no significant difference across the groups. Flow cytometry analysis showed regardless of treatment interval, ASCs expressed mesenchymal markers such as CD29, CD44, CD90, CD105 while lacking expression of hematopoietic marker such as CD34. Multicolor flow cytometric analysis of SVF cells revealed no significant difference in the ratio of ASCs across the groups; in contrast, the percentage of endothelial cells of EVE treated groups significantly increased as treatment lengthened when compared with the control group.

In conclusion, the predominant mechanism of action of EVE, which would modulate neovascular network formation, growth and maturation of functional blood vessels. The preconditioning effect of EVE has been demonstrated in the swine model, which may be easily translated into clinical practices to enhance cell and tissue engraftment. It is expected that this understanding may help clinicians to optimize the vascularity of the recipient bed to further improve fat volume retention before the operation.

Key words: Autologous fat grafting, External volume expansion, Adipose stem cells,

Stromal vascular fraction, Fat volume retention

# 目次



口試委員審定書	I
誌謝	II
摘要	III
ABSTRACT	V
目次	VII
圖次	X
表次	XII
第一章 緒論	1
第二章 文獻探討	4
2.1 皮膚的解剖構造	4
2.1.1 皮膚結構簡介	4
2.1.2 皮下組織	4
2.1.3 結締組織	5
2.2 脂肪組織	7
2.2.1 脂肪組織之簡介	7
2.2.2 脂肪組織之分類	7
2.2.3 脂肪組織之生理功能	9
2.2.4 脂肪組織之擴增方式	9



2.2.5 脂肪組織之細胞組成	11
2.3 自體脂肪移植	13
2.3.1 簡介	13
2.3.2 非血管化脂肪移植	13
2.3.3 脂肪細胞移植後之命運	15
2.3.4 改善脂肪移植存留容積之策略	18
2.4 力學生物學	21
2.4.1 簡介	21
2.4.2 機械力與細胞增殖	22
2.4.3 機械力與間葉幹細胞分化	25
2.4.4 機械力與血管形成	34
2.5 豬為動物模式於生物醫學之研究	40
2.5.1 動物模式之簡介	40
2.5.2 小型豬為動物模式之優點	40
第三章 試驗研究	43
3.1 外部體積擴張對軟組織厚度、細胞增殖和血管重塑之影響	43
3.1.1 前言	43
3.1.2 材料與方法	44
3.1.3 結果與討論	51
3.2 外部體積擴張對脂肪幹細胞增殖、分化潛能及其細胞標記之探討	59



3.2.1 前言 .....	59
3.2.2 材料與方法 .....	61
3.2.3 結果與討論 .....	64
第四章 綜合討論 .....	70
第五章 結論 .....	73
第六章 未來展望 .....	74
REFERENCE.....	75



## 圖次



圖 1. 皮膚層之解剖構造 .....	6
圖 2. 固有結締組織之細胞和纖維 .....	6
圖 3. 棕色脂肪組織與白色脂肪組織 .....	8
圖 4. 肥厚型與增生型脂肪細胞之特徵 .....	10
圖 5. 脂肪組織和基質血管細胞之細胞組成 .....	12
圖 6. 脂肪組織於缺血時之細胞活動 .....	14
圖 7. 脂肪組織移植後之細胞和分子事件 .....	15
圖 8. 移植物的三個區域和脂肪細胞在移植脂肪中的命運之結論模式 .....	17
圖 9. EVE 允許大容積脂肪移植之原理 .....	20
圖 10. EVE 建立有利於自體脂肪移植生存之受體環境 .....	20
圖 11. 機械力調節內皮細胞之功能 .....	21
圖 12. 細胞之張拉整體結構 .....	22
圖 13. 整聯蛋白協同生長因子受體調節細胞週期 .....	24
圖 14. 細胞微環境調控細胞之命運 .....	26
圖 15. 培養基質剛度影響間葉幹細胞分化之機制 .....	28
圖 16. 整合素內部化經由 BMP – Smad 路徑調節間葉幹細胞分化 .....	29
圖 17. 胞外基質的物理性質調節間葉幹細胞分化 .....	31
圖 18. 胞外基質的剛度經由改變細胞與核骨架的張力影響基因表現 .....	32

圖 19. 胞外基質的物理因素調節間葉幹細胞之分化命運 .....	32
圖 20. 內在與外在機械信號調節間葉幹細胞分化 .....	34
圖 21. 封閉式負壓引流主要作用機制 .....	37
圖 22. 封閉式負壓引流造成氧氣和 VEGF 濃度梯度引導血管生長.....	38
圖 23. HIF-1 $\alpha$ -VEGF 訊息路徑.....	39
圖 24. 外部體積擴張裝置及其作用期間之示意圖 .....	45
圖 25. EVE 處理之試驗設計和流程圖 .....	46
圖 26. 免疫組織染色觀察血管重塑 .....	52
圖 27. 皮下脂肪中脂肪細胞大小對脂肪細胞數之標繪圖 .....	53
圖 28. 細胞增殖和表皮厚度之定量分析結果 .....	55
圖 29. 血管密度之定量分析結果 .....	56
圖 30. 血管成熟之定量分析結果 .....	58
圖 31. 成體幹細胞不同類型的分支 .....	60
圖 32. EVE 處理組與對照組中脂肪幹細胞增殖能力分析 .....	64
圖 33. EVE 處理組與對照組中脂肪幹細胞分化潛能分析 .....	65
圖 34. 流式細胞技術分析脂肪幹細胞之表面標記 .....	67
圖 35. 多色流式細胞儀分析基質血管細胞之細胞組成 .....	69



# 表次



表 1. 豬作為生物醫學模式動物之優點 .....	42
表 2. 超音波測量軟組織厚度 .....	51

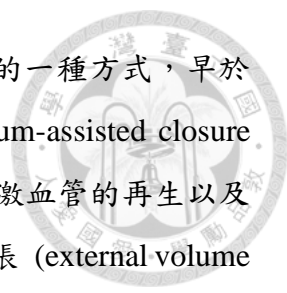
## 第一章 緒論



根據國際美容整形外科學會 (International Society of Aesthetic Plastic Surgery, ISAPS) 於 2016 年 7 月 25 日所發布之統計數據表示，2015 年全世界進行了超過 2100 萬次手術和非手術整形，其中女性進行了超過 1800 萬次整形，占整形總數的 85.6%。最常見的女性手術整形項目之前五名分別為：豐胸 (breast augmentation)、抽脂 (liposuction)、眼瞼手術 (eyelid surgery)、腹壁整形術 (abdominoplasty) 和隆鼻手術 (rhinoplasty)，因此就手術整形而言，豐胸在女性中相當受歡迎。

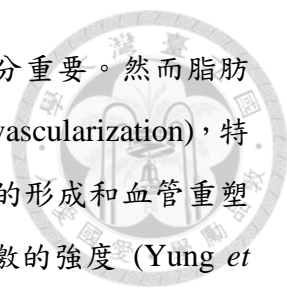
目前在醫學美容整形手術中，以自體脂肪移植 (autologous fat grafting, AFG) 進行豐胸或隆乳手術愈來愈受到歡迎。AFG 顧名思義就是從身上多餘的脂肪處，例如腹部，側腰，臀部，大腿等處，以吸取的方式取得小直徑的脂肪球，經過離心及純化後，再用針頭注入欠缺脂肪的部位，術後不易留下疤痕，且不會有交叉感染和異物反應等問題。而自體脂肪豐胸，就是將處理過的脂肪均勻地注入到乳房的肌肉層以及皮下層，從而創造出自然的乳房 (Schweizer *et al.*, 2015)。

應用自體脂肪移植於整形手術最早在 1893 年 Neuber 已有文獻報告，1911 年 Bruning 首次將自體脂肪注射到皮下組織進行軟組織擴增，1950 年 Peer 的研究發現脂肪移植的存活率可達 50%。1980 年代，抽脂手術 (liposuction) 開始盛行，當時檢驗技術還未成熟，抽脂豐胸手術可能會妨礙到乳癌之診斷，因此 1987 年遭美國整形外科醫師學會禁止。隨著新的診斷工具的發明和技術的進步，以及缺乏科學文獻上的證據，直到 2009 年才解禁 (Khoury *et al.*, 2012)。近年來應用自體脂肪移植進行乳房重建和擴增以及軟組織修復等方面已被廣泛的運用，儘管脂肪組織取得容易，可經由抽脂等低侵入性的方式大量取得，但植入至皮下的脂肪組織被吸收率介於 20% 至 90%，且長期生存率約 30% 至 50%，其主要原因為受體部位缺乏足夠的血液供應造成細胞處於局部缺血 (ischemia) 的情況 (Brucker *et al.*, 2008; Zhong *et al.*, 2009)。而脂肪存活率的高低會影響手術的結果和後遺症的多少，若存活率太低，壞死的脂肪細胞數太多，可能會造成鈣化和硬塊等問題。



以負壓進行外部體積擴張長久以來被視為組織再生與重建的一種方式，早於1997年 Argent 和 Morykwas 所設計的真真空輔助閉合裝置 (vacuum-assisted closure device, VAC) 用於治療糖尿病患之創傷修復，並證實可有效刺激血管的再生以及細胞的增殖 (Huang *et al.*, 2014)。2000年 Khouri 使用外部體積擴張 (external volume expansion, EVE) 的方式用於非手術性乳房擴增 (nonsurgical breast enlargement)，稱之為 Brava，其為一種外部負壓組織擴張裝置，標準使用方式為手術前4~6週每天連續使用8~12小時。隨著 Brava 的改良，目前可根據患者的需求調整不同的負壓強度和自動循環模式，大幅縮短整體作用時間並達成相同之預先處理效果 (Khouri *et al.*, 2014)。經過 EVE 作用之後，可以促進血管新生，增加組織空間，減少脂肪移植體的擁擠和注射時的壓力，使結果較為理想 (Khouri *et al.*, 2012)。此外，利用 EVE 於創傷修復和組織再生的優點，在於組織經負壓處理之後能夠接受比預期更多的脂肪移植容積。當大量的脂肪移植到一個狹窄的空間時，組織間隙液壓 (interstitial fluid pressure) 的增加會減少微血管血流量和脂肪移植物與周圍組織的接觸面積，導致脂肪細胞因無法獲取足夠的氧氣和養分而壞死。而 EVE 所產生的機械力可在手術前用以增加移植部位的組織間隙以及血管新生，因此可一次移植大量脂肪 (~250 ml) 並改善長期移植容積因缺血而流失的情況 (Khouri *et al.*, 2014)。此脂肪移植大量容積 (mega-volume) 的成功使臨床試驗上可引用另一種新的方法於乳房重建和擴增 (Khouri *et al.*, 2015)。

當一項新技術首次被使用時，對於其結果的定量方式以及潛在的生理過程通常有許多爭議 (Gundeslioglu, 2012; Herold *et al.*, 2012)。以小鼠為動物模式所做的研究顯示，在沒有脂肪移植的情況下，EVE 作用一段時間後能夠增加皮下組織的血管密度以及脂肪細胞數 (Heit *et al.*, 2012; Lancerotto *et al.*, 2013)。然而從齧齒動物模式所得到的實驗結果於臨床的實用性一直以來時常爭議不斷，並且在沒有脂肪移植的情況下進行外部負壓處理上缺乏臨床經驗。而從人類和小鼠所得到的實驗結果的差異，一直被歸因於兩者間先天解剖構造，生理情況以及作用機轉的不同所使然 (Swanson, 2014)。



新血管網路的形成對於脂肪移植的存活和組織再生而言十分重要。然而脂肪移植的生存能力依賴於周圍組織養分的擴散和血管之新生 (neovascularization)，特別是在移植後之早期階段。而外部機械力的刺激對於血管網路的形成和血管重塑的影響，顯示出血管新生的過程取決於周圍的環境和機械力刺激的強度 (Yung *et al.*, 2009)，因此使用負壓進行外部體積擴張對於提升移植部位的血管形成而言可以說是相當具有潛力的方式。

先前已有研究證實，機械力會影響多種類型細胞之細胞表型 (phenotype)、生長速率以及訊息傳遞；並且由這些結果也顯示機械力可以誘導間葉幹細胞分化為成骨細胞以及平滑肌細胞 (Kurpinski *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2004)。然而，經過 EVE 作用後的組織所分離出的脂肪幹細胞，迄今尚未對其增殖、分化能力以及表面標記進行評估。

基於上述，本研究以小型豬為模式動物，探討 EVE 之機械力作用在生物體內對於皮下脂肪之血管生成以及進一步成熟為具功能性血管的影響。首先假設機械力作用在生物體內所調節之新血管生成和血管的重塑的成效，在於作用時間長短之差異。因此，將 EVE 作用時間分為短時間 (10 天) 和長時間 (21 天)，再對皮下脂肪的血管生成和重塑進行定量評估。此外，比較 EVE 不同的作用時間對於小型豬的脂肪幹細胞其細胞表型，增殖能力，脂肪分化潛能以及幹性 (stemness) 的影響進行定量分析。

## 第二章 文獻探討



### 2.1 皮膚的解剖構造

#### 2.1.1 皮膚結構簡介

皮膚結構在人類和大多數哺乳動物非常相似，雖然人類皮膚都覆蓋著毛囊，但一般可將皮膚分為有毛和無毛兩種類型（圖 1）。皮膚是由表皮和真皮所組成，表皮 (epidermis) 位於皮膚最外層，是由多層排列緊密的上皮細胞所組成，形成保護屏障，可防止水分散失與細菌的侵入。真皮 (dermis) 位於表皮下方，由含有膠原纖維 (collagenous fiber) 及彈性纖維 (elastic fiber) 的緻密結締組織組成，富含血管、淋巴管、神經末梢、接受器、腺體和毛囊等。皮膚底下的皮下組織稱為皮下層 (hypodermis)，是由疏鬆結締組織和脂肪組織所組成 (許, 2008)。

#### 2.1.2 皮下組織的結構

皮下組織又稱為“皮下脂肪組織”，位於真皮下方，與真皮無明顯的界限，解剖學上稱為淺筋膜 (superficial fascia)，臨床上稱為蜂窩組織 (areolar tissue)。皮下脂肪組織是一層比較疏鬆的組織，它是一個天然的緩衝墊，能緩衝外來壓力，同時也是熱的絕緣體，能夠儲存能量。除脂肪外，皮下脂肪組織也含有豐富的血管、淋巴管、神經、汗腺和毛囊。

皮下組織屬於間葉組織 (mesenchymal tissue)，主要組成成分為脂肪細胞、纖維間隔 (fibrous septa) 和血管。此外，皮下組織內尚分佈有淋巴管、神經、汗腺體以及毛囊 (乳頭部)。脂肪細胞呈圓形或卵圓形，平均直徑約為 94 微米，大者可達 120 微米。細胞質內充滿脂質、少數粒線體和較多游離核糖體，細胞核擠向邊緣呈扁平。脂肪細胞聚集，形成大小不一的脂肪小葉 (fat lobules)，其間以纖維間隔為界 (脂肪小葉間隔)。皮下組織內富有血管，由小葉間隔小動脈分支形成微血管，伸入脂肪小葉並圍繞著每個脂肪細胞。微血管基底膜與脂肪細胞之細胞膜緊密接觸，有助於血液迴圈和脂質的輸送。皮下組織分布於真皮和肌膜，上方與真皮、下



方與肌膜密接，廣布於體表，形成脂肪層，約占人類體重 18%。其厚度因體表部位、年齡、性別、內分泌、營養和健康狀態等，而有明顯差異 (Marieb, 2009)。

### 2.1.3 結締組織 (connective tissue)

結締組織是體內含量最多，分布最廣的組織，外觀因種類不同而有很大差異，但均有細胞、細胞基質 (ground substance) 及纖維 (fiber)，所含的細胞均由胚胎期之間葉幹細胞 (mesenchymal stem cells) 分化而來，依所含細胞和基質的種類或比例可分為四大類：(1) 固有結締組織 (connective tissue proper)：分為疏鬆結締組織、緻密結締組織、脂肪組織、彈性結締組織和網狀結締組織，所含的主要細胞有纖維母細胞 (fibroblasts)、巨噬細胞 (macrophages)、脂肪細胞 (adipose cells) 和肥大細胞 (mast cells) 等 (圖 2)；(2) 軟骨 (cartilage)：分為透明軟骨、纖維軟骨和彈性軟骨；(3) 硬骨 (bone)：其基質的密度和硬度均較高，支撐力強，是身體的主要的支撐架構；(4) 血液 (blood)：屬一種液狀的結締組織，由定型成分 (如紅血球、白血球和血小板) 和血漿 (plasma) 所組成。其中除了軟骨不含血管外，結締組織均富含血管且有充足的血液供應 (許, 2008)。

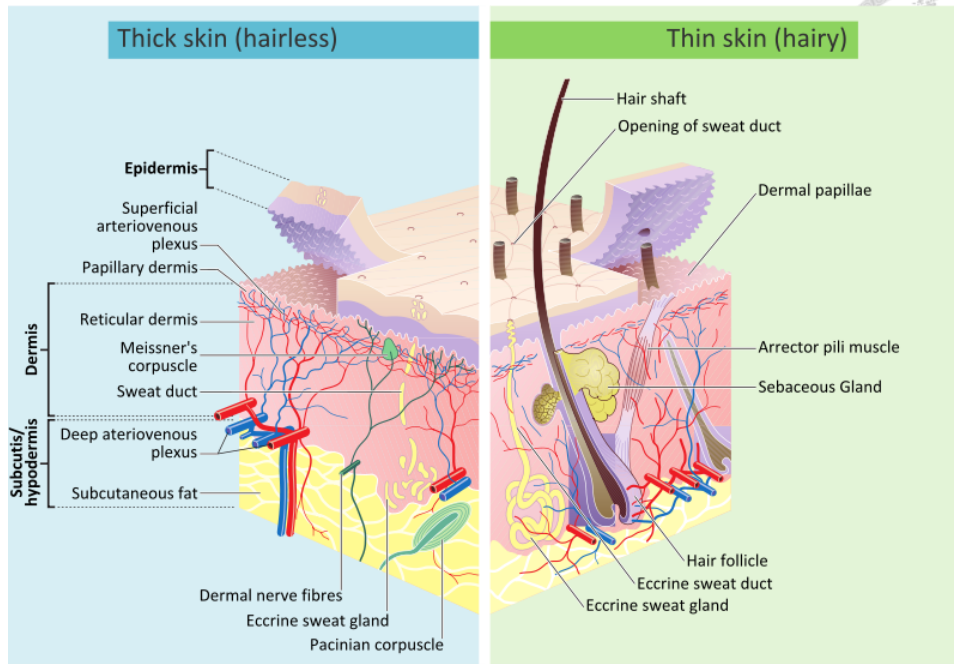
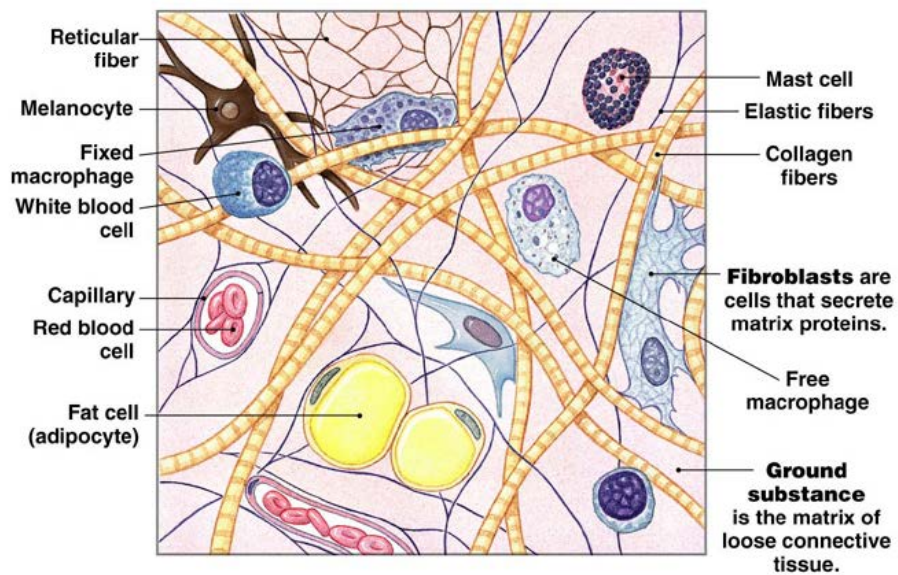


圖 1. 皮膚層之解剖構造。

([https://en.wikipedia.org/wiki/File:Skin\\_layers.png](https://en.wikipedia.org/wiki/File:Skin_layers.png))

Figure 1. Anatomic structure of skin layers.



(<http://asavory.edublogs.org/2012/11/05/connective-tissues/>)

圖 2. 固有結締組織之細胞和纖維。

Figure 2. Cells and fibers of connective tissue proper.



## 2.2 脂肪組織 (adipose tissue)

### 2.2.1 脂肪組織之簡介

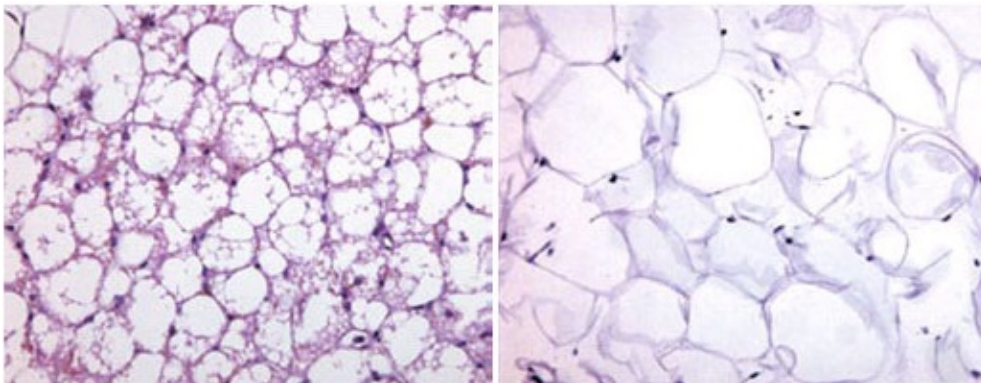
脂肪組織在組織學上屬於一種結締組織，主要由許多能儲存三酸甘油酯 (triglyceride) 的脂肪細胞 (adipocytes) 所構成，並被疏鬆結締組織分隔成許多脂肪小葉。由於細胞質與核被大脂肪油滴擠到細胞邊緣，因此形成形狀像印章戒指 (signet ring)。脂肪細胞常與疏鬆結締組織在一起，尤其是在皮下層、腎周圍、心臟底部與表面、長骨骨髓、關節周圍、眼眶內的眼球後等處，提供器官一般性的保護和支持，同時也是良好的絕緣體，可減少體內熱量由皮膚散失，並有儲存脂肪，緩衝機械性壓力，參與脂肪代謝等功能。脂肪組織能夠以旁泌、自泌和內分泌等方式產生生物活性因子，稱為脂肪因子，例如肥胖賀爾蒙 (leptin)、抵抗素 (resistin)、細胞激素 (cytokine) 及腫瘤壞死因子 (TNF $\alpha$ ) 等，影響胰島素敏感性、血壓、內皮功能、纖溶活動及發炎反應，參與多種重要病理與生理過程，因此脂肪組織不僅是最大的能量儲存庫，並且是重要的內分泌系統 (Illouz and Sterodimas, 2011)。

### 2.2.2 脂肪組織之分類

脂肪組織是一種高度特殊的結締組織，根據脂肪細胞結構和功能不同，可分為兩類：

(1) 白色脂肪組織 (white adipose tissue, WAT)，即通常所說的脂肪組織，由大量單泡脂肪細胞聚集而成，脂肪細胞呈圓形或多邊形，細胞中央有一大脂滴，胞質呈薄層，位於細胞邊緣，包繞脂滴。在 hematoxylin-eosin 切片上，脂滴被溶解成一大空泡。細胞核呈扁圓形，被脂滴推擠到細胞一側，連同部分細胞質呈新月形 (圖 3)。白色脂肪組織主要分布在皮下組織、網膜和腸系膜等處，在正常成年男子一般約占體重的 10%~20%，女性通常更多一些。WAT 為體內最大的能源庫，具有貯存脂肪、保持體溫、參與脂肪和能量代謝之功能，並具有產生熱能、維持體溫、緩衝保護和支持填充等作用。白色脂肪組織之運作可受神經與內分泌系統之調控，以調節其釋出或儲存之脂肪酸及甘油的速率與方向。

(2) 棕色脂肪組織 (brown adipose tissue, BAT) 之特點，乃其組織中含有豐富的微血管；脂肪細胞內儲存許多個小脂滴，其細胞核呈圓形位於細胞之中央，且細胞質內富含粒線體，此類脂肪細胞稱之為“多泡脂肪細胞”(圖 3)。棕色脂肪組織在成年者極少，新生兒和冬眠動物者則較多；在新生兒者主要分布於肩胛間區、腋窩及頸後部等處。棕色脂肪細胞在脂質氧化過程中不形成 ATP，而是將所含的能量以熱能形式釋放，提供動物體溫與熱能之需求；特別對小型哺乳動物體溫之維持與動物冬眠之甦醒分別扮演有極重要之角色。棕色脂肪組織的主要功能在於確保在寒冷刺激下，棕色脂肪細胞內的脂類得以被分解及氧化，從而散發出大量能量而不轉變為化學能，此功能受交感神經調節。人類之棕色脂肪組織從出生後到生命期之前十年內會逐漸減少，而白色脂肪組織則相反，因此成為成人之主要脂肪組織 (Albright and Stern, 1998)。



(Virtanen *et al.*, 2009)

圖 3. 棕色脂肪組織 (左) 與白色脂肪組織 (右)。

Figure 3. Brown adipose tissue (left) and white adipose tissue (right).



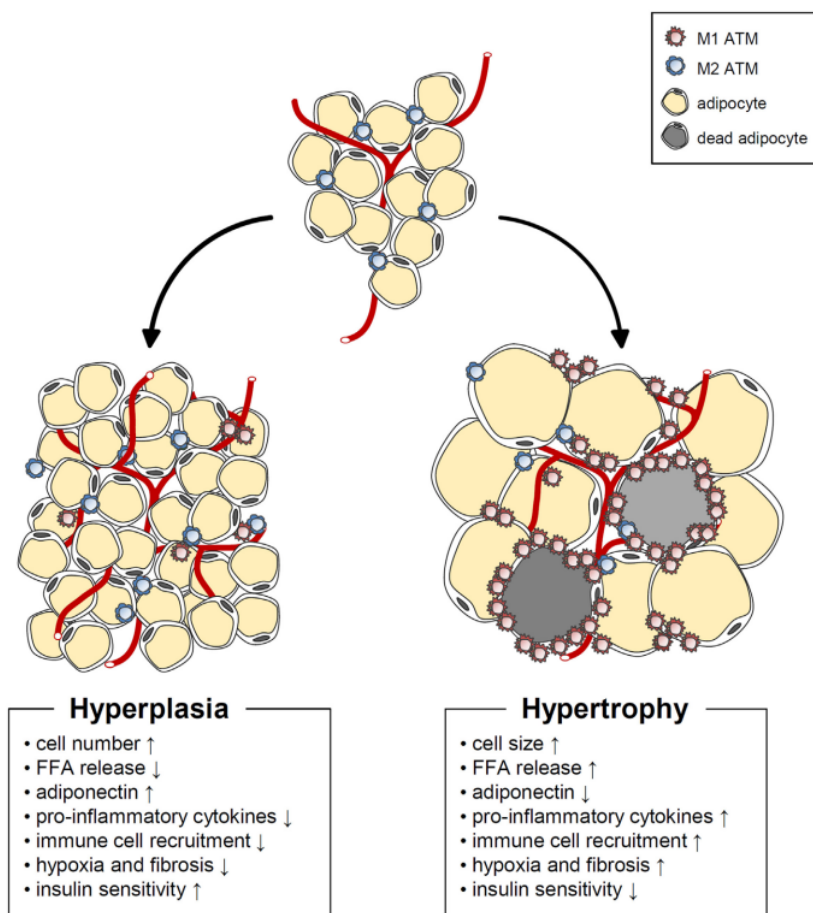
### 2.2.3 脂肪組織之生理功能

脂肪組織不僅一直被視為動物體之能量儲存站，且兼具絕緣功能與動物體重要結構之機械支撐；直到 1990 年 Friedman 之研究團隊發現脂肪細胞會根據生物體的營養狀態分泌一種蛋白質類細胞激素稱為 leptin。此後，更多研究所發現由脂肪細胞所分泌的細胞激素、賀爾蒙和胜肽 (peptides)，例如 adiponectin, resistin, retinol-binding protein 4, omentin 和 nesfatin 等由胜類組成的激素，統稱為脂肪因子 (adipokines)；另由細胞中脂質的合成和降解之脂質代謝物 (lipid metabolites) 則稱為 lipokines。因此，脂肪組織也被視為一種內分泌器，可參與調節止血、血壓、免疫功能、血管生成的過程和生物體內能量平衡 (Rosen and MacDougald, 2006)。

### 2.2.4 脂肪組織之擴增方式

脂肪組織的擴增可經由脂肪細胞體積的增加 (hypertrophy) 以及脂肪細胞數量的增加 (hyperplasia) (圖 4)。肥厚性脂肪細胞 (hypertrophic adipocytes) 具有下列特點：(1) 在過度肥胖的脂肪組織中，肥厚的脂肪細胞具有壞死樣異常 (necrotic-like abnormalities)，進而導致細胞的壞死。(2) 肥厚的脂肪細胞會增加促發炎反應細胞激素 (pro-inflammatory cytokines) 的表現和分泌，包括腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF $\alpha$ ), interleukin (IL)-6, IL-8 以及單核細胞趨化蛋白 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)，這些激素會經由 nuclear factor  $\kappa$ B 和 Jun N-terminal kinase signaling，使 insulin receptor substrate-1 中的絲胺酸發生磷酸化 (serine phosphorylation)，導致胰島素阻抗性 (insulin resistance) 的發展。此等促進發炎反應細胞激素且會吸引各種免疫細胞，包括巨噬細胞和 T 細胞，導致脂肪組織產生發炎反應。(3) 脂肪細胞的肥厚會造成相對的血液供應減少，而導致局部性脂肪組織缺氧；當組織發生缺氧，血管生成因子以及發炎反應相關的基因表現量會增加。此外脂質分解作用會提高，使大量的游離脂肪酸從脂肪組織中釋放出來，而被其他組織例如肝臟和肌肉所吸收，導致異位性脂肪堆積 (ectopic lipid accumulation) 和脂肪中毒 (lipotoxicity)。相對而言，脂肪組織的增殖性擴增 (hyperplastic expansion)，需由脂肪前驅細胞分化成脂肪細胞，此過程受許多轉錄因

子和激素所調節，例如 peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) 調節脂肪生成、CCAAT/enhancer binding protein (CEBP) 誘導和維持脂肪生成。近年來，許多生物體內和體外研究針對脂肪前驅細胞的表型進行鑑別，在人類 WAT 脂肪前驅細胞大量存在於 CD31<sup>-</sup>, CD34<sup>+</sup> stromal vascular fraction (SVF)，而在小鼠有更多特定的脂肪生成前驅細胞被辨別出來，包括 CD45<sup>-</sup>, CD31<sup>-</sup>, Ter119<sup>-</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, Sca-1<sup>+</sup>和 CD24<sup>+</sup> 細胞 (Choe *et al.*, 2016)。



(Choe *et al.*, 2016)

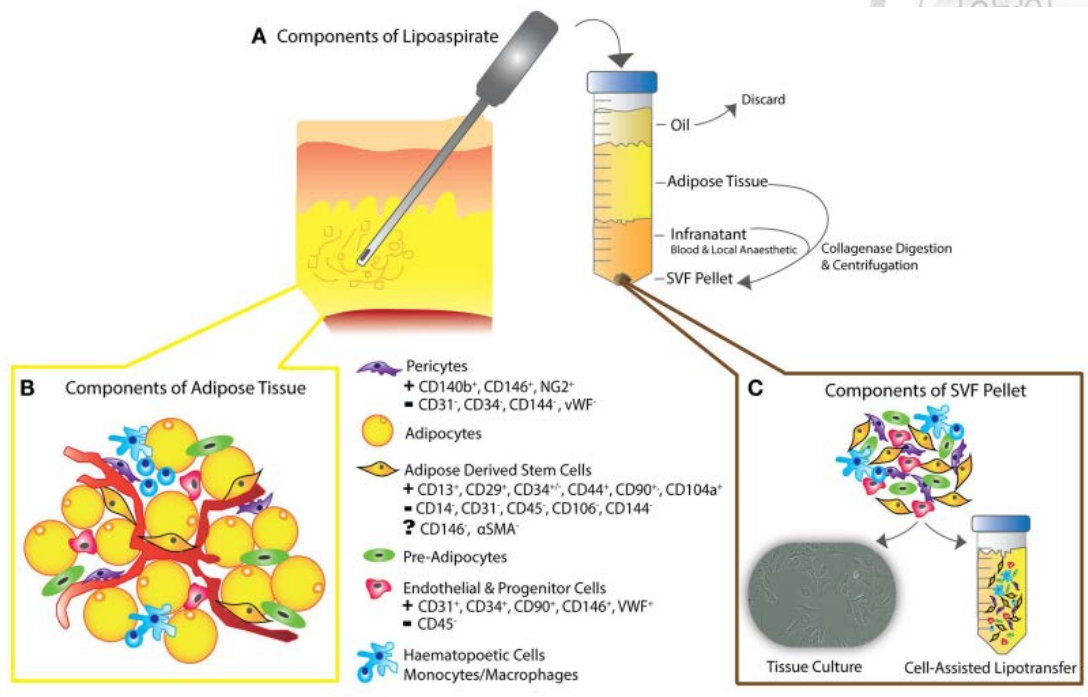
圖 4. 肥厚型與增生型脂肪細胞之特徵。

Figure 4. Characteristics of hypertrophic and hyperplastic adipocytes.

### 2.2.5 脂肪組織之細胞組成

脂肪組織主要由脂肪細胞、脂肪幹細胞、血管內皮細胞、血管外膜細胞 (pericytes)、纖維母細胞、巨噬細胞和胞外基質等所組成 (Yoshimura *et al.*, 2006)。脂肪細胞由於直徑介於 50~130  $\mu\text{m}$ ，故佔組織體積 90% 以上，但以細胞數量而言卻低於 50% (Suga *et al.*, 2008)。脂肪組織中富含微血管網，脂肪細胞由膠原蛋白固定在基質 (stroma) 中，每一個脂肪細胞至少和一條微血管接觸，儘管脂肪細胞具有較大的體積，使得微血管彼此相距相當大的距離 (Gomillion and Burg, 2006)。

將取出的脂肪組織去除血水後，再經由膠原蛋白酶 (collagenase) 進行分解後，可以將脂肪細胞從脂肪組織中與其它類型的細胞分離出來形成細胞團塊 (cell pellet)，經此過程脂肪細胞被瓦解到油脂中，然後經過離心後將懸浮的組織包含脂肪細胞和油液去除。沉澱於離心管底部的細胞團塊稱為基質血管細胞 (stromal vascular fraction, SVF)，其中主要包含血管內皮伴隨著基質細胞 (stromal cells) 和壁細胞 (mural cells)。存在於 SVF 中的細胞為中胚層或間葉細胞來源的細胞，包括：脂肪前驅細胞 (pre-adipocytes)、纖維母細胞、內皮細胞、血管平滑肌細胞 (vascular smooth muscle cells)、免疫細胞 (immune cells) 和脂肪幹細胞 (Shukla *et al.*, 2015) (圖 5)。在基質血管細胞中，同時也包含大量源自循環血液之細胞 (circulating blood-derived cells) 例如白血球和紅血球，雖然大部分之紅血球可經由低滲溶液進行破壞。剛分離出來的脂肪幹細胞可經由表現出  $\text{CD31}^- \text{CD34}^+ \text{CD45}^- \text{CD90}^+ \text{CD105}^- \text{CD146}^-$  的細胞進行鑑定，但培養時會另外表現  $\text{CD105}^+$  (Yoshimura, 2006)。而經由抽脂所取得之 SVF 中的有核細胞包含 37% 的白血球 ( $\text{CD45}^+$ )，35% 脂肪幹細胞 ( $\text{CD31}^- \text{CD34}^+ \text{CD45}^-$ )，15% 的內皮細胞 ( $\text{CD31}^+ \text{CD34}^+ \text{CD45}^-$ ) 和其它細胞 ( $\text{CD31}^- \text{CD34}^- \text{CD45}^-$ )，儘管這些血液來源的細胞所佔的百分比會根據個體出血情況而有明顯的不同 (Suga *et al.*, 2008; Yoshimura *et al.*, 2009)。



(Shukla *et al.*, 2015)

圖 5. 脂肪組織和基質血管細胞之細胞組成。

Figure 5. Cellular compositions of adipose tissue and stromal vascular cells.





## 2.3 自體脂肪移植

### 2.3.1 簡介

脂肪組織可視為一種自體填充物 (autologous filler)，目前已廣泛運用於整形、美容和重建手術 (Mailey *et al.*, 2013)。相較於其它人工填充材質，自體脂肪具有取得容易、高生物相容性、可根據需求重複採集及外觀呈現自然等優點 (Khouri *et al.*, 2014)。脂肪組織具有其代謝活性，由異質細胞群 (heterogeneous cell population) 組成，可分泌細胞因子、激素和生長因子，故脂肪移植可通過添加複能性幹細胞 (multipotent stem cells) 和刺激因子來改變組織的微環境 (Largo *et al.*, 2014)。脂肪組織可視為一種動態填料 (dynamic filler)，其具有兩種不同的補充效應 (supplementary effects)，包括：體積效應 (volumetric effect) 和再生效應 (regenerative effect)；前者用於修復軟組織的缺陷，後者則能促進受體部位令其逐漸回復自然的外觀 (Mojallal *et al.*, 2009; Rigotti *et al.*, 2016)。

脂肪組織具有高度血管化之能力，遂能促使脂肪細胞周遭被圍繞形成高密度之微細管網絡。因此，脂肪移植最重要的是受體組織需有充足之血液供應。然而，移植的脂肪組織由於缺乏血管形成，導致組織的再吸收，正因如此，臨床上自體脂肪移植之手術結果非常難以預測，其長期存留容積一般在 20~90% 之間變化 (Cherubino and Marra, 2009)。

此外，自體脂肪移植於臨床應用尚有許多問題需要克服，例如脂肪細胞無法忍受低氧環境 (Rueda-Clausen *et al.*, 2011)；移植的脂肪組織容易液化 (liquefied)，其原因可能係由於缺氧或環境變化所使然 (Eirin *et al.*, 2012)；鑒於脂肪移植物常由於被組織吸收，遂會隨著時間之進展而失去其體積約 20% 到 90% 之譜 (Cherubino and Marra, 2009)；即使大部分脂肪組織或大量脂肪細胞用於移植，但業經老化之脂肪細胞已不具再生能力遂會被逐漸吸收而消失 (Chien *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2016)。

### 2.3.2 非血管化脂肪移植

非血管化脂肪移植 (nonvascularized fat grafts, nVFGs) 乃指從供體部位採集獲得之脂肪，經離心去除其上層之油脂及下層之紅血球細胞後，即可將剩餘之脂肪組

織進行注射到受體部位 (Serra-Renom *et al.*, 2010)。鑒於移植之脂肪組織並未添加任何生長因子或組織細胞協助其建立血管系統，故又稱傳統的脂肪移植 (conventional fat grafting) (Mailey *et al.*, 2013)。

脂肪細胞對局部缺血非常敏感，在移植後的早期階段，氧氣是細胞存活所需的關鍵分子；特別在低氧分壓 ( $pO_2 = 15 \text{ mmHg}$ ) 將導致脂肪細胞於 24 小時內死亡。隨著缺血的時間延長，內皮細胞也開始死亡。相較之下，脂肪幹細胞可存活長達 3 天，在該 3 天之內，脂肪幹細胞會被活化，並通過其再生能力協助其組織之再修復，且可協同免疫細胞促進其血管和脂肪之生成 (Suga *et al.*, 2010) (圖 6)。

脂肪移植會導致受體組織的損傷，因此受體組織的出血會激活血小板釋放各種生長因子，進而激活幹細胞或前驅細胞。同時，受傷組織以及死亡細胞會釋放 bFGF 和其它因子，來刺激脂肪幹細胞釋放 HGF 等生長因子，進而促進血管和脂肪的生成，並且抑制纖維化產生。而組織損傷會進一步誘導發炎細胞的浸潤，並且釋放各種炎性細胞因子 (圖 7)。大多數的已分化細胞會在移植後死亡，但駐留的幹細胞和前驅細胞會活化，或從宿主的骨髓聚集過來。部分死亡細胞在血管成功形成後會被幹細胞或前驅細胞所分化的下一代細胞替換 (Yoshimura *et al.*, 2011)。

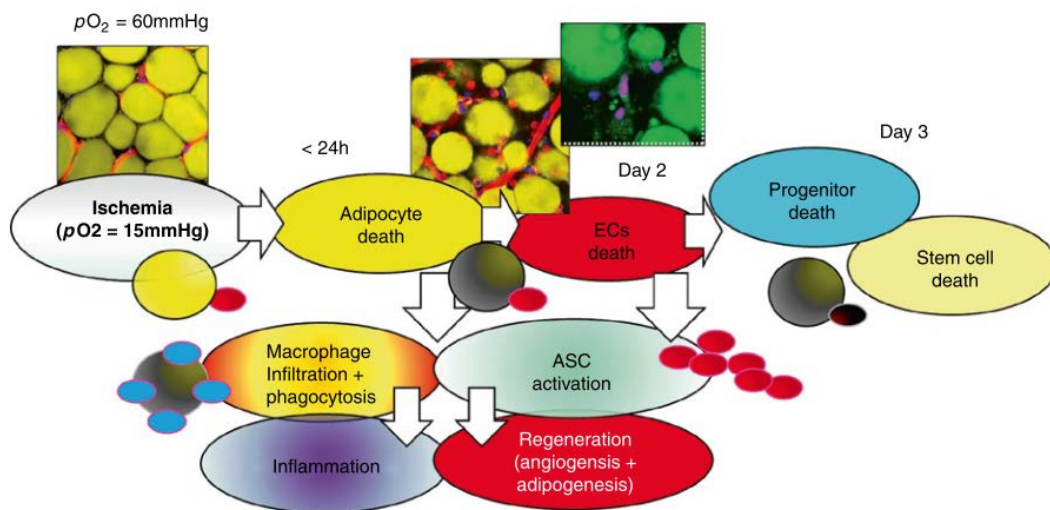
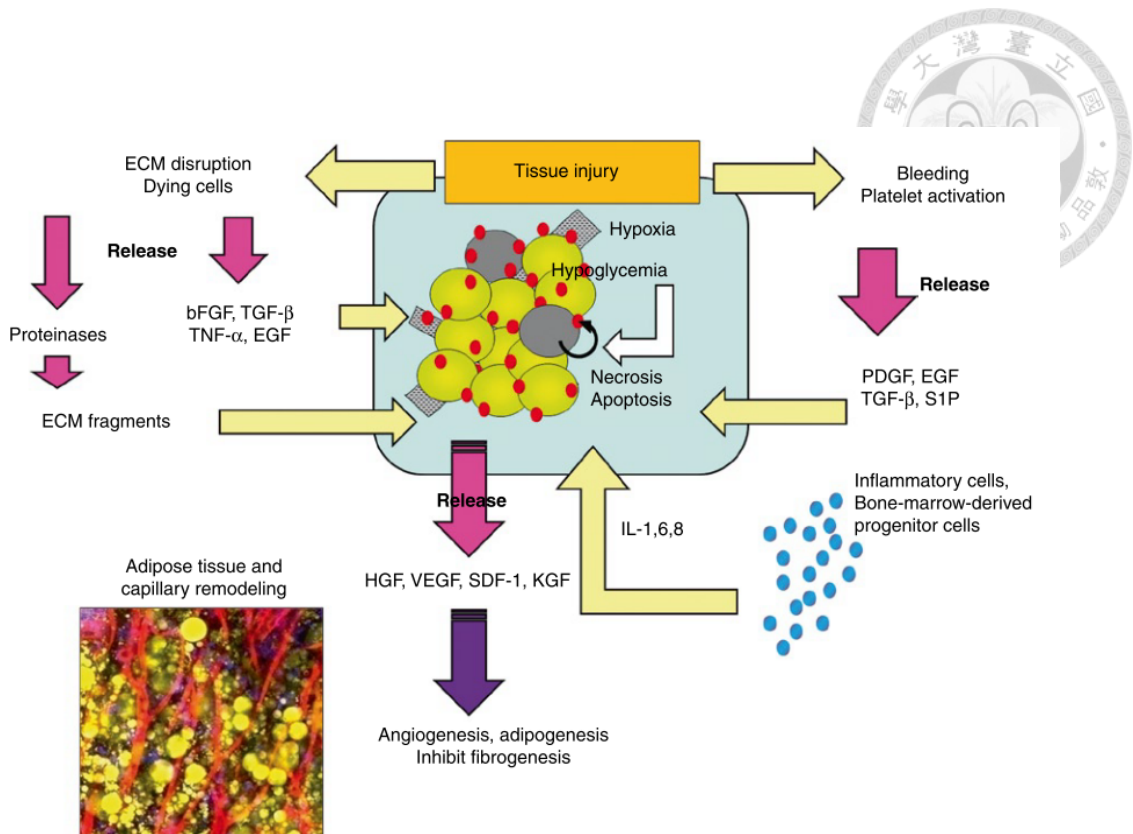


圖 6. 脂肪組織於缺血時之細胞活動。

(Suga *et al.*, 2010)

Figure 6. Cellular events in ischemia tissue.



(Yoshimura *et al.*, 2011)


圖 7. 脂肪組織移植後之細胞和分子事件。

Figure 7. Cellular and molecular events after adipose-tissue grafting.

### 2.3.3 脂肪細胞移植後之命運

移植後之脂肪細胞，其存活率，主要係取決於受體組織之微環境，包括：血管分布和氧氣供應；另外脂肪油滴的大小會影響移植物和周邊組織的接觸面積，因為移植的脂肪在早期缺乏血管的支持，因此必須通過附近的微血管藉由擴散作用來取得氧氣和養分，直到新生血管之形成，所以移植物的整體表面積大小勢必會影響細胞的生存 (Yazawa *et al.*, 2006)。

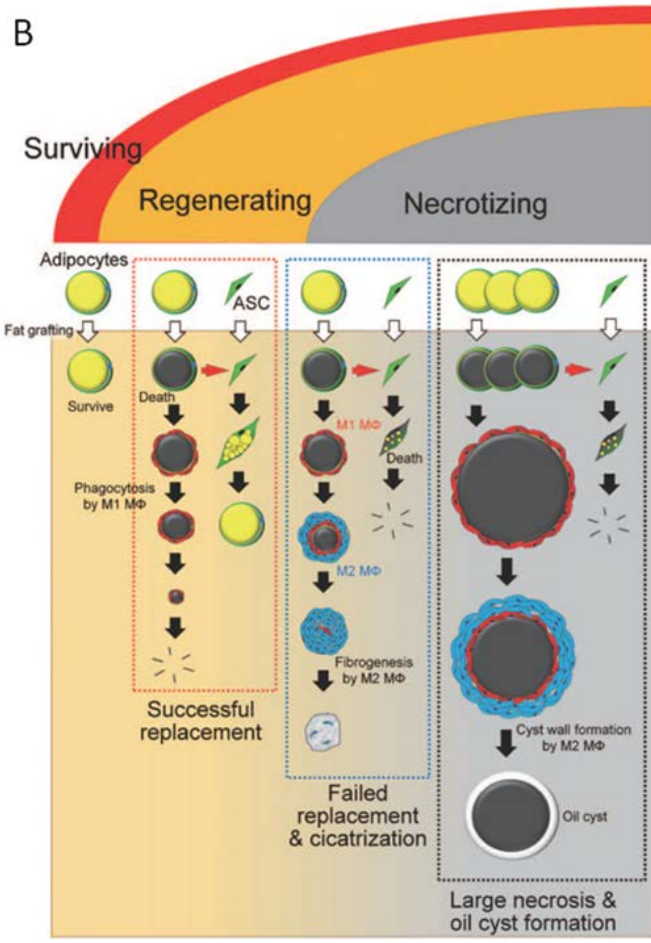
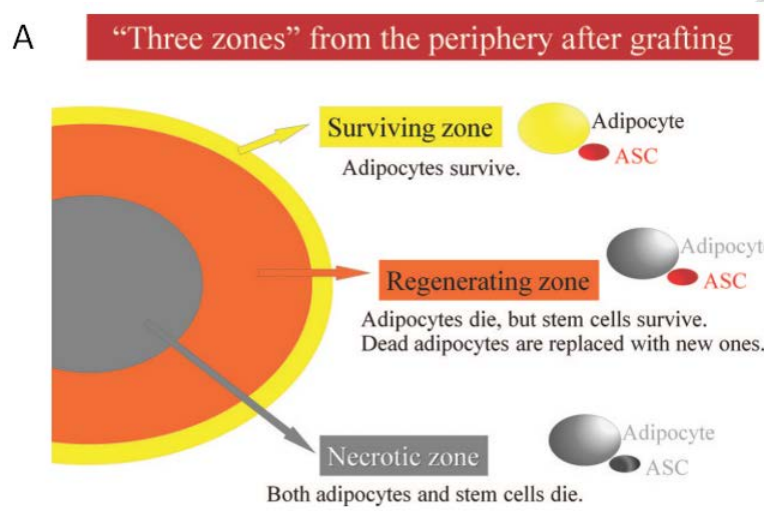
根據移植組織中的氧氣濃度是否足以供應脂肪細胞和脂肪幹細胞 (adipose derived stem cells, ASCs) 的存活，可將移植組織分為三個區域：存活區、再生區和壞死區 (圖 8)。最表面的區域為存活區，厚度約 300  $\mu\text{m}$ ；其中位於存活區者最容



易獲得氧氣，因此脂肪細胞和 ASCs 皆可存活；第二區為再生區，其厚度根據微環境條件，例如周圍組織的血管分布和氧氣供應而變化，在此區域，脂肪細胞早在第 1 天就已死亡，而 ASCs 會被鄰近的死亡細胞激活並產生新的脂肪細胞，死亡的細胞最終被 M1 macrophage 所吞噬，並成功被新細胞替換；最中心的區域為壞死區，其中脂肪細胞和 ASCs 皆死亡，最終停止其再生之過程。彼等死亡之細胞中殘存之油滴，經由 M1 macrophage 吸收並且由 M2 macrophage 作用形成纖維化而替換之 (Eto *et al.*, 2012)。

關於脂肪移植後之長期容積存留有兩個主要論點，包括：(1) The cell survival theory：係假設移植初期之脂肪細胞由受體部位組織經擴散作用取得血液供應直到血管生成，故最終存活的脂肪細胞為最初移植之細胞 (Peer, 1950)；與 (2) The host replacement theory：係假設移植之脂肪細胞全部死亡，作為供體與受體組織中與血管生成相關之前驅細胞的基質，並誘導 ASCs 增殖和分化，故最終存活的脂肪細胞為 ASCs 產生之新細胞 (Dolderer *et al.*, 2011; Eto *et al.*, 2012; Kato *et al.*, 2014)。

Kato *et al.* (2014) 曾基於小鼠研究成果為脂肪移植後的續發事件做一總結，指稱：除了位於組織表面 300  $\mu\text{m}$  內的脂肪細胞外，幾乎所有脂肪細胞在脂肪移植後的最初幾天內死亡。脂肪生成由活化的脂肪幹細胞和前驅細胞開始，並在 3 個月內完成，而死亡脂肪細胞殘餘的脂肪油滴在接下來的 9 個月內被吸收。部分死亡的脂肪細胞在前 3 個月會被新的脂肪細胞替換。脂肪油滴 (lipid droplets) 會被巨噬細胞經吞噬作用吸收，但是非常緩慢，且吸收時間取決於脂肪油滴的直徑。若脂肪油滴直徑過大，會在完全吸收之前形成囊壁，並且隨時間而鈣化。在移植物的中心區域，因脂肪幹細胞和前驅細胞死亡而不形成新的脂肪細胞，導致癩痕組織或囊腫形成。脂肪移植後的最終存留容積由脂肪細胞的成功替換速率決定，若僅移植具有小脂滴的脂肪，則可在 3 個月內完成吸收，且體積在 3 個月後基本上不會改變。如果 3 個月後仍存在許多大脂滴，則脂肪組織會在 3 到 12 個月之內萎縮 (Kato *et al.*, 2014) (圖 8)。



(Eto *et al.*, 2012; Kato *et al.*, 2014)

圖 8. 移植物的三個區域和脂肪細胞在移植脂肪中的命運之結論模式。

Figure 8. (A) Conclusive schema for three zones of the grafts. (B) Conclusive schema for the fate of adipocytes in grafted fat.



### 2.3.4 改善脂肪移植存留容積之策略

為了減少壞死區，可以經由製備具有更好活力和適當大小的移植物，通過理想分布使移植物之接觸面積最大化，以及將移植物置於具有高血管分布之受體組織中，因此提高脂肪生存主要有兩種策略：

一、脂肪移植物的優化 (optimization of the fat grafts)，常見的有兩種方式：

(1) 細胞輔助脂肪移植 (cell-assisted lipotransfer, CAL)，其利用 ASCs 具有分化為脂肪細胞和血管內皮細胞的再生能力，以及 ASCs 因組織損傷或缺氧誘導分泌血管生成因子例如 HGF 和 SDF-1 (stromal derived factor-1) 幫助血管生成，所以科學家額外添加 ASCs 或 SVF 來充實脂肪組織，並以脂肪組織作為移植後支持 ASCs 生存之生物骨架 (Yoshimura *et al.*, 2009)。但是，最近在臨床應用上卻發現幾個問題：ASCs 缺乏端粒酶，且其端粒較短，因此只能在體外的有限時間內增殖 (Zhao *et al.*, 2012)；從老年患者分離的 ASCs 具有較低的增殖能力和穩定性，因此需要使用年輕個體的 ASCs 進行同種異體移植 (Pandey *et al.*, 2011; Sharpless and DePinho, 2007)。另外，如何在體外和體內調節 ASCs 的增殖和分化過程、哪些因子調控 ASCs 的增殖和分化、調節 ASCs 的增殖和分化過程的主要因素、哪些因子刺激 ASCs 分泌旁分泌因子、移植的 ASCs 是否致瘤、什麼原因導致 ASCs 在體內液化，這些問題都需要在 CAL 廣泛應用於臨床之前更深入探討 (Huang *et al.*, 2016)。

(2) 高濃度血小板血漿 (platelet-rich plasma, PRP)，其再生潛能主要取決於血小板活化時分泌之蛋白，包括血管內皮生長因子 (VEGF)，表皮生長因子 (epidermal growth factor, EGF)，血小板衍生生長因子 (PDGF)，轉化生長因子 (TGF-1)，TGF $\beta$ 2 和類胰島素生長因子 (IGF-1) (Nakamura *et al.*, 2010; Oh *et al.*, 2011)。PRP 的取得方式簡單來說，是通過全血 (未除去任何成分的血液) 離心之後獲得高於正常值 5~7 倍濃度的自體血小板，懸浮在小體積血漿中。PRP 在使用前，必須先用氯化鈣 (CaCl<sub>2</sub>) 和血漿凝血酶 (plasma thrombin) 來激活血小板觸發  $\alpha$ -granules 的去顆粒作用 (degranulation)，然後釋放各種生長因子，包括血管相關的生長因子來促進血管生成 (James *et al.*, 2016)。但是，最近的試驗卻發現，使用添加 PRP 的脂肪會導致顯著的發炎反應以及不良的血管變化，例如血管基底膜會重複複製

(Rigotti *et al.*, 2016)。因此，儘管有研究表示利用 EGF，纖維母細胞生長因子 (fibroblast growth factor, FGF)，以及 PRP 來改善脂肪移植的存活率並可達到理想的效果 (Oh *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2011; Tamura *et al.*, 2007)，但是這些方法的缺點在於需要有專業的實驗室以及繁複的處理步驟，且目前對於臨床試驗以外的採用，尚未充分對其利益和風險進行評估。因此，PRP 在大規模使用在人體試驗之前，其中安全性和功效還需要進一步證實和確認。

二、手術前受體組織的預先處理 (preconditioning the recipient bed)，做法是利用外部擴張裝置 (EVE) 的負壓處理作用在受體部位。目前已經有許多研究證實機械力具有刺激細胞再生的能力，因此可利用外部機械力的作用來增加受體部位的組織間隙空間以及血管生成，進而允許大量體積的脂肪移植，而不會減少移植物與受體交界面積或增加組織間隙的液體壓力 (interstitial fluid pressure, IFP)。如果沒有經過術前 EVE 之處理，而移植大量體積的脂肪到緊密的組織空間當中，IFP 會上升而減弱微血管的血流量，進而減少氧氣輸送，導致新血管形成之前移植組織發生中心壞死 (Khoury *et al.*, 2014) (圖 9)。所以在臨床應用上，經過 3 週的外部體積擴張之後，可以產生具有豐富微血管網絡所形成的生物骨架，以及充分的組織空間，提供自體脂肪移植良好的受體環境，來提高細胞的存活 (Kosowski *et al.*, 2015) (圖 10)。

綜觀上述，EVE 簡單執行就能達到良好的效果。研究表明負壓療法 (negative pressure therapy) 可產生許多效果，其中最吸引人的就是能促進血管生成 (Heit *et al.*, 2012)。負壓作用時導致組織暫時性缺氧，可刺激 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 分子路徑，進而促進血管生成 (Erba *et al.*, 2011; Lancerotto *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2015)。

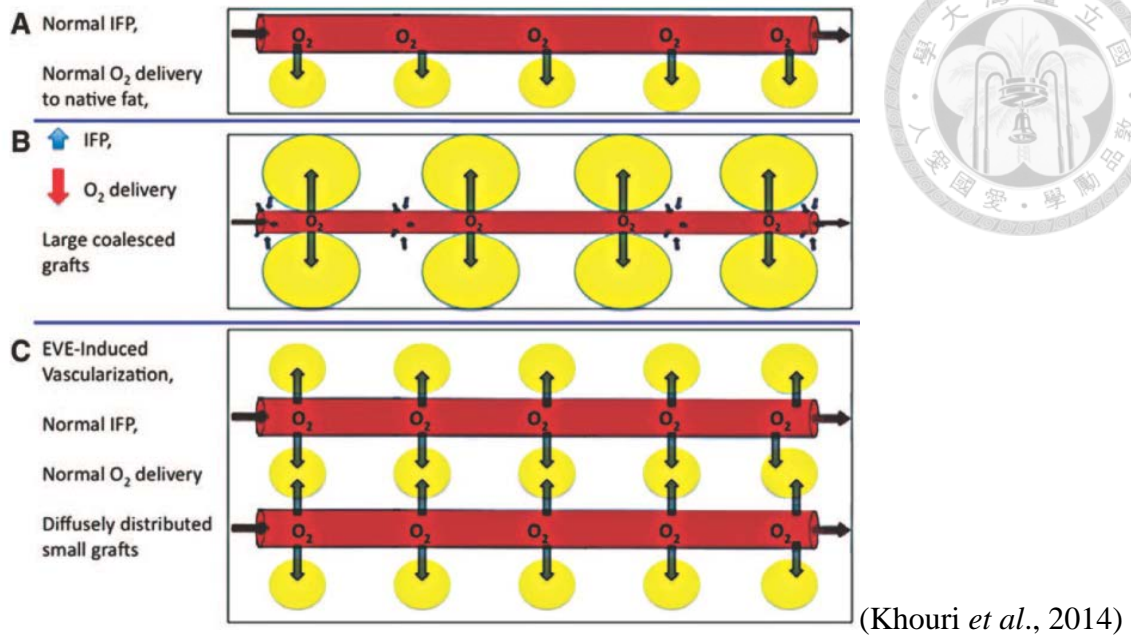


圖 9. EVE 允許大容積脂肪移植之原理。

Figure 9. The principle of EVE allows large volume fat transplantation.

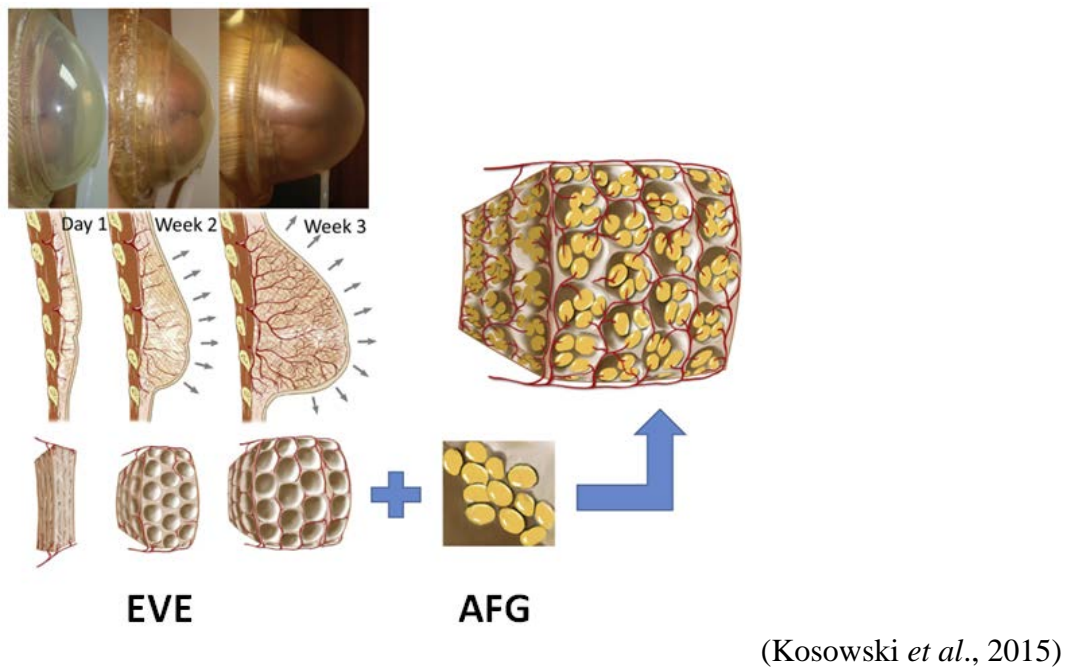


圖 10. EVE 建立有利於自體脂肪移植生存之受體環境。

Figure 10. EVE creates a larger and more favorable recipient site for AFG surviving.

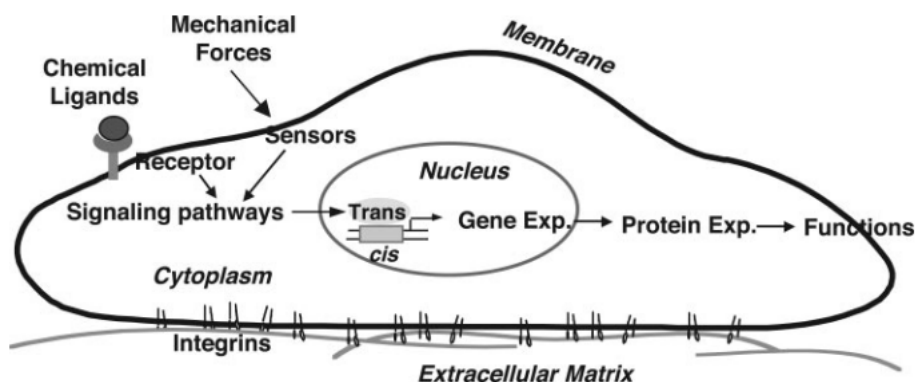




## 2.4 力學生物學 (mechanobiology)

### 2.4.1 簡介

生物力學 (biomechanics) 泛指研究生物體的力學現象，例如肢體運動、神經肌肉控制、呼吸運動等。隨著科學技術的進步逐漸深入到細胞分子層次，形成新的學科稱為力學生物學 (mechanobiology)，其主要於探討受力環境下細胞的感知與細胞內力學訊息傳遞之分子機制，稱為機械力傳導 (mechanotransduction)，對於生物體生理、發育和疾病的影響 (David Merryman and Engler, 2010)。例如內皮細胞的力學感應器 (mechanosensors) 受機械力刺激，以及細胞受體和化學配體結合，皆可經由訊息傳遞路徑活化下游的轉錄因子導致基因和蛋白質的表現，進而調控細胞的功能包括遷移、增殖、分化、凋亡及代謝等 (Chien, 2007) (圖 11)。



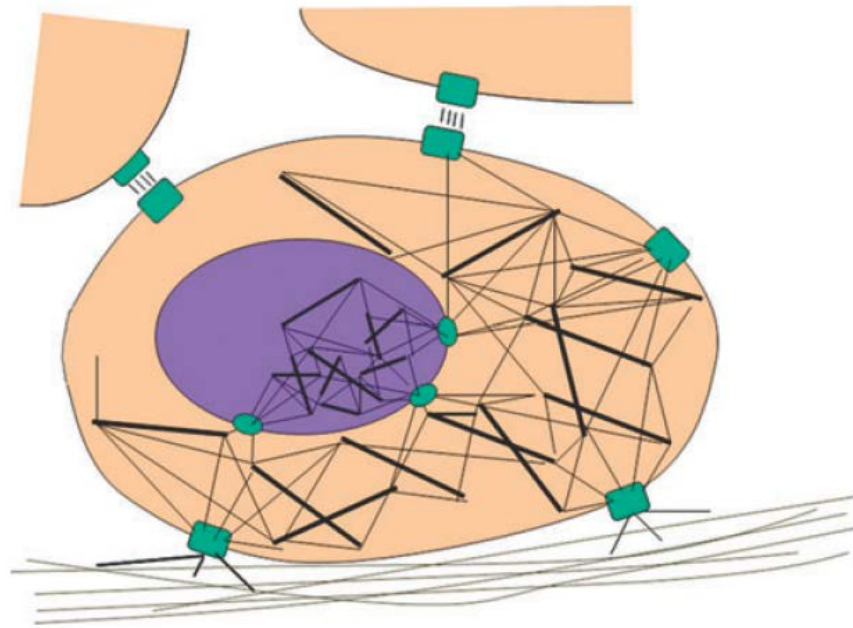
(Chien, 2007)

圖 11. 機械力調節內皮細胞之功能。

Figure 11. Mechanical forces modulate the functions of endothelial cells.

## 2.4.2 機械力與細胞增殖

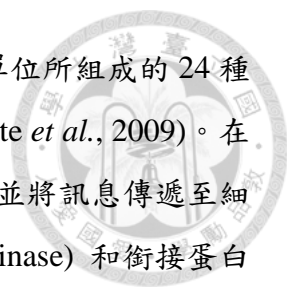
早期 Folkman 和 Moscona 觀察到細胞形狀是決定細胞功能的關鍵因素 (Folkman and Moscona, 1978)。細胞膜上的黏著斑 (focal adhesions, FAs) 主要由穿膜蛋白組成例如整聯蛋白 (integrins)，將細胞內的細胞骨架和胞外基質以及鄰近細胞作連接，為機械力傳遞的主要路徑。其中細胞骨架的微小管為堅硬的支架 (rigid struts)，微細絲和中間細絲為彈性元件 (elastic elements)，這些組件之間拉伸和壓縮力的平衡用以維持細胞完整的立體結構，稱為張拉整體 (tensional integrity or tensegrity) (圖 12)，一旦有外力干擾此平衡使細胞內與細胞骨架連結的胞器和分子移動，就會改變細胞的型態，進而影響細胞的功能 (Ingber, 2003)。此外細胞核的結構同樣根據 tensegrity 原理，其內部架構經由核膜與細胞骨架緊密連結，機械力的刺激會直接傳遞到 DNA 影響基因的轉錄 (Buxboim *et al.*, 2010)。



(Ingber, 2003)

圖 12. 細胞之張拉整體結構。

Figure 12. The tensegrity structures of cells.

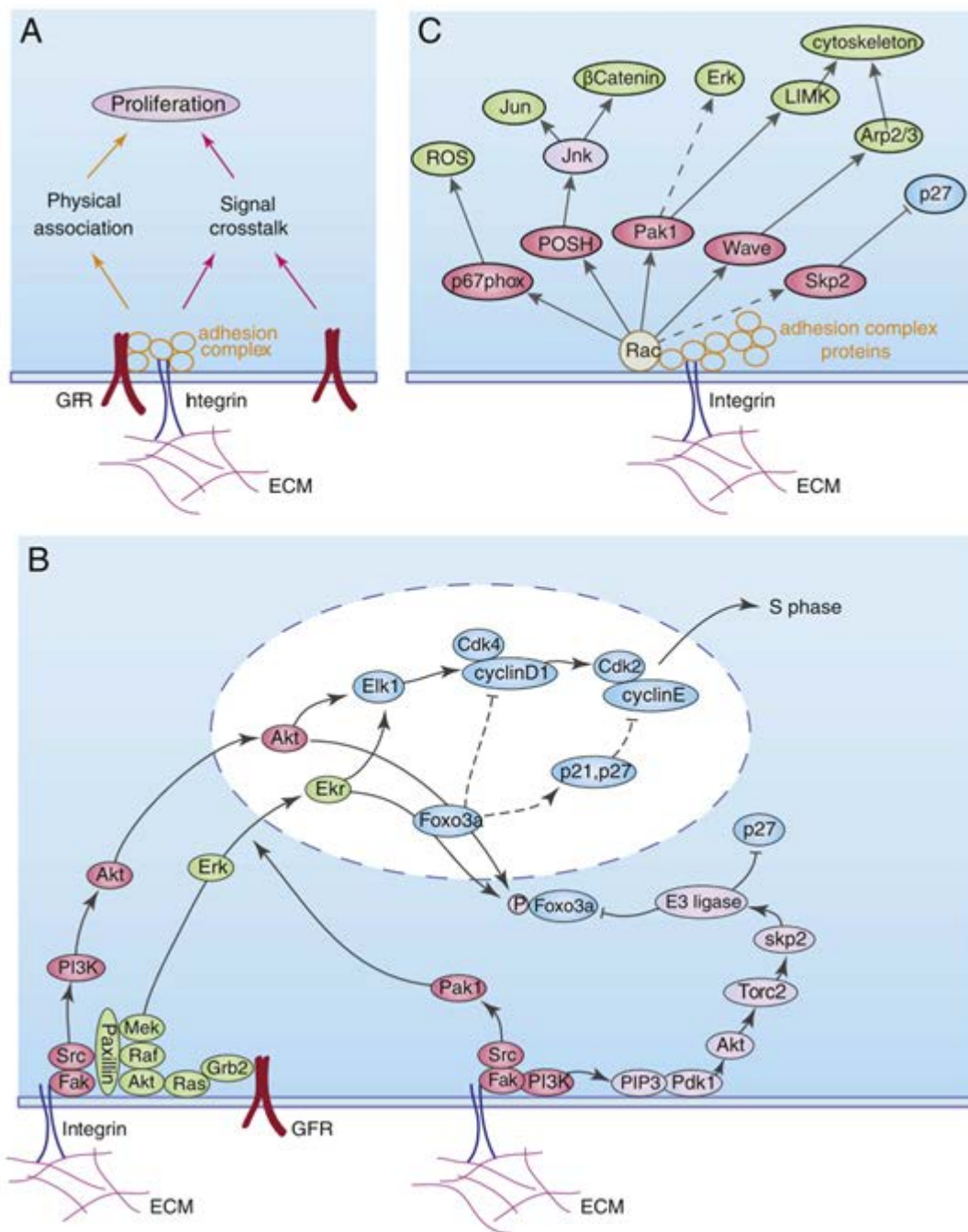


Integrins 是細胞膜上的醣蛋白受體，由 18 個  $\alpha$  和 8 個  $\beta$  次單位所組成的 24 種 heterodimer receptors，調節細胞與胞外基質的黏附與溝通 (Legate *et al.*, 2009)。在訊息傳遞中，integrins 能感知周圍環境的化學成分和力學狀態，並將訊息傳遞至細胞內細胞骨架之組成蛋白 (e.g. actomyosin)、酵素 (e.g. tyrosine kinase) 和銜接蛋白 (adaptor protein) 而形成 integrin adhesion complex (IACs)，進而調節細胞的功能特性，包括型態、運動、增殖、分化等 (Ross *et al.*, 2013)。近十年研究發現細胞週期除了經由生長因子調節啟動細胞增殖，整合素黏附 (integrin adhesion) 也是多細胞動物細胞增殖的必要條件，若細胞與胞外基質分離或基因剔除 integrin 次單位，即使有生長因子的存在仍無法進入細胞週期 (Jeanes *et al.*, 2012; Nikolopoulos *et al.*, 2005; Streuli and Akhtar, 2009)。Integrins 協同生長因子受體 (growth factor receptors, GFRs)，經由 PI3K/Akt 和 Mek/Erk 路徑促進 S 期所需 cyclin/Cdk complexes 形成，並抑制及降解 cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs) 例如 p27 和 p21；另外 integrins 經由 Rac 活化的下游路徑調節細胞的增殖 (Moreno-Layseca and Streuli, 2014) (圖 13)。

體外培養的細胞，常在細胞膜與細胞質之特定區域，以及胞外基質之間形成緊密黏附之黏著斑 (focal adhesions, FAs)，在 FAs 的細胞質內側常有許多機動蛋白絲 (actin filaments) 排列成束，稱為應力纖維 (stress fibers, SFs) (Tojkander *et al.*, 2012)。SFs 的結構組成除微細絲之外，還包括肌動球蛋白 (actomyosin)、肌球蛋白 (myosin II)、輔肌動蛋白 ( $\alpha$ -actinin) 和其它細胞骨架之組成蛋白 (Burrige and Wittchen, 2013)。在應力纖維中，機械力傳遞發生在細胞與胞外基質以及鄰近細胞之黏合處，分別主要由 integrins 和 cadherins 組成。當機械力由細胞外往細胞內移動時，可經由活化黏合處之組成蛋白，進而啟動細胞內的訊息傳遞改變細胞行為例如型態發生、分化和胞質分裂 (cytokinesis) 等 (Chen *et al.*, 2004; Horton *et al.*, 2016; Tojkander *et al.*, 2012)。在黏著斑的組成蛋白中，p130Cas (Crk-associated substrate) 會直接受機械力影響發生磷酸化進而活化下游因子 Rap1 (Sawada *et al.*, 2006)；talin 則會改變構型而揭露出其它蛋白之接合位例如 vinculin，從而將機械作用力轉變為化學訊息 (Kanchanawong *et al.*, 2010)。另外有某些 actin filaments 從黏著斑連接至細胞核周圍形成 actin cap associated focal adhesion (ACAFAs)，由此形成之 actin cap



fibers 藉由核骨架和細胞骨架連接的複合體 (LINC complexes) 直接與核膜連結，說明機械力可能經由此物理路徑 (physical pathway) 調節基因的表現 (Kim *et al.*, 2012)。



(Moreno-Layseca and Streuli, 2014)



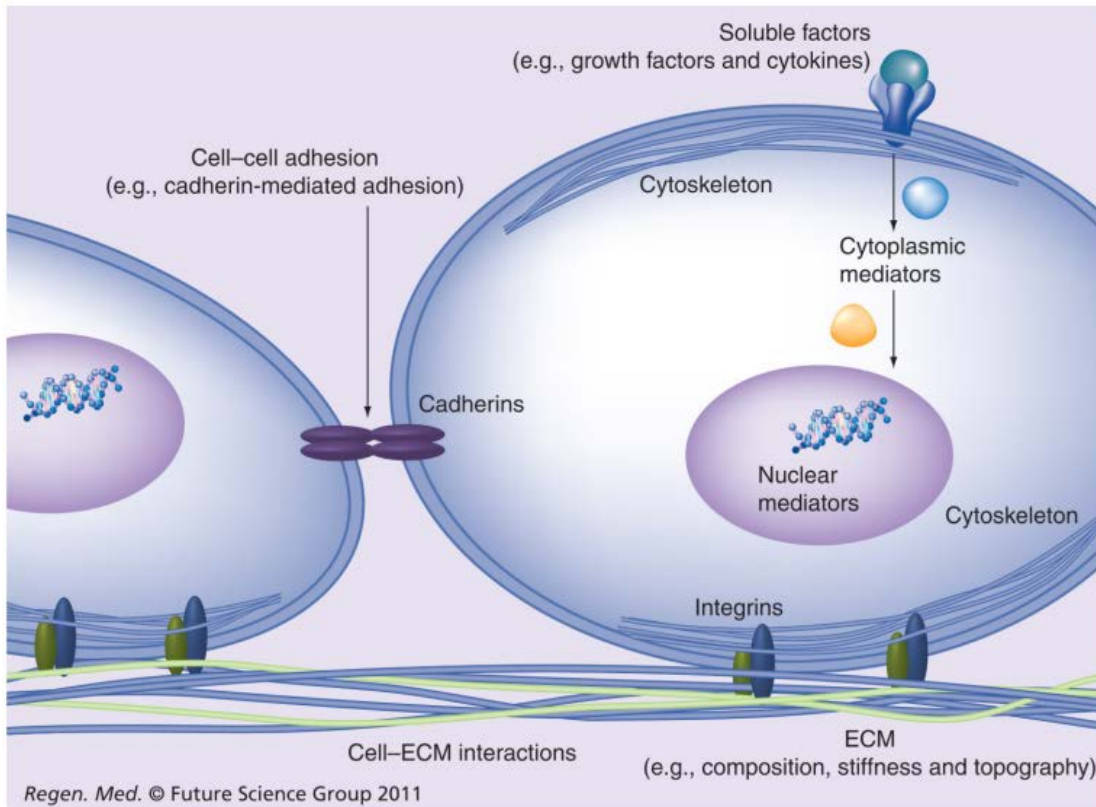
圖 13. 整聯蛋白協同生長因子受體調節細胞週期。

Figure 13. Integrins cooperate with growth factor receptors in cell cycle regulation.

### 2.4.3 機械力與間葉幹細胞分化

間葉幹細胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 屬複能性幹細胞 (multipotent stem cells)，具自我更新 (self-renew) 能力，可分離自骨髓、脂肪、肌腱、周邊血液、骨骼肌等組織，並可體外誘導分化為源自中胚層的細胞系包括脂肪細胞、成骨細胞、軟骨細胞、心肌細胞和平滑肌細胞等，此外也可轉分化為其它胚層細胞，例如源自外胚層的神經細胞以及源自內胚層的肝細胞和胰臟細胞 (Zhang *et al.*, 2012)。

幹細胞之分化命運決定於細胞所存在之微環境，包括可溶性因子、細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) 以及相鄰細胞之間的相互協調作用，可提供細胞能夠增殖、存活、遷移或分化的生物化學和機械訊號。此外，表面粘附受體，例如整聯蛋白 (integrins) 和鈣粘素 (cadherins)，可分別調節細胞黏附於 ECM 骨架與鄰近細胞 (Li *et al.*, 2011) (圖 14)。在可溶性因子當中，transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )、platelet-derived growth factor (PDGF) 和 fibroblast growth factor (FGF) 作為激活素 (activin) 所調節的三種分子訊號參與 MSCs 分化之關鍵途徑 (Ng *et al.*, 2008)。ECM 物理性質包括剛度 (stiffness)、構型 (topography) 和組成 (composition) 可調節細胞行為。此外，細胞會因應來自微環境中的訊息而採取不同的形狀，進而將產生的牽引應力傳遞到相鄰細胞。若施加外部之機械力刺激例如流體剪切應力，可激活細胞表面的離子通道、異源三聚體 G 蛋白 (heterotrimeric G proteins)、蛋白激酶和其它膜上之訊息傳遞分子，進而觸發下游之訊息傳遞，導致機械力依賴性 (force-dependent) 之基因表現的變化 (Wang *et al.*, 2009)。



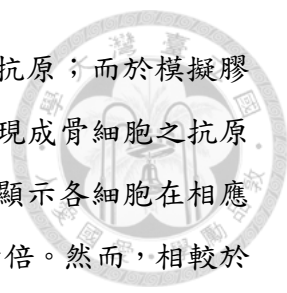
(Li *et al.*, 2011)

圖 14. 細胞微環境調控細胞之命運。

Figure 14. The cellular microenvironment control cell fate.

#### 2.4.3.1 基質剛度引導間葉幹細胞之分化命運 (Substrate stiffness directs MSC fate specification)

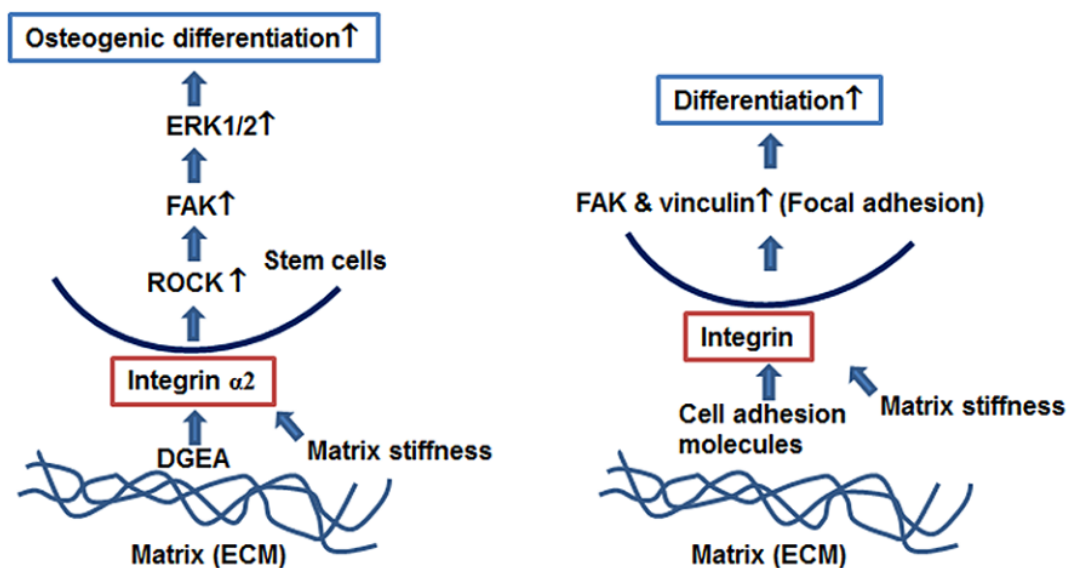
從纖維母細胞和其它細胞之力學研究已顯示出細胞感測到 ECM 彈性性質的重要性 (Paszek *et al.*, 2005)。Engler 研究團隊第一次嘗試評估基質剛度 (stiffness) 對於調節人類間葉幹細胞 (hMSCs) 命運的重要性 (Engler *et al.*, 2006)。他們生成塗有膠原蛋白之聚丙烯酰胺凝膠 (polyacrylamide gel, PAAG) 作為體外細胞附著之人工基質，而基質的彈性性質根據化學交聯的程度，從軟性到相對剛性。當培養基保持相同時，測試各種彈性對 hMSCs 的影響。結果發現細胞命運由基質剛度決定：當細胞培養於模擬腦組織彈性 (0.1-1 kPa) 的基質時，細胞會表現出神經元表



型；於模擬肌肉之中等剛度 (8-17 kPa) 的基質會表現出肌原性抗原；而於模擬膠原骨 (collagenous bone) 之相對高剛性 (25-40 kPa) 的基質會表現成骨細胞之抗原 (Engler *et al.*, 2006)。另以微陣列分析 (microarray analysis) 結果顯示各細胞在相應之基質上，神經元，肌肉或骨骼之表面抗原的表現可增加四至六倍。然而，相較於分化誘導培養基，此三種細胞之特殊標記表現水平於人工基質僅有其 50%。因此，儘管基質彈性不足以誘導終末分化，但對於發育早期引導 MSCs 之細胞特化相當重要。關於分子機制，Engler 等人表示非肌肉肌球蛋白 (non-muscle myosin II, NMMII) 的抑制會阻斷基質彈性所誘導之細胞特化，但不影響細胞其它正常功能，表示基質剛度可透過不同機制調控定向分化 (directed differentiation) (Engler *et al.*, 2006)。另有研究證實當 MSCs 和基質剛度相似性達最大值時，NMMII 於應力纖維中的排列非專一性依賴於基質剛度，說明機械耦合 (mechanical coupling) 存在於外部環境和細胞內部骨架組織之間 (Zemel *et al.*, 2010)。因此微環境剛度調控細胞特化之分子訊息傳遞尚需更深入探討。

ECM 剛度對 MSCs 細胞特化的影響在更多生理相關之 3D 培養系統進行評估。Huebsch 等人將小鼠 MSCs 封裝培養於 3D 水凝膠合成之 ECM (Huebsch *et al.*, 2010)。在此培養模式中，基質剛度對 MSCs 表型具有較顯著之影響，其中成骨分化主要發生在中等彈性 (11-30 kPa)，而脂肪分化主要在較柔軟 (2.5-5.0 kPa) 微環境中。雖然基質剛度對 MSCs 的效應大致上與先前所提及之 2D 培養模式一致，但是 3D 培養基質剛度可調節整合素 (integrins) 的結合以及粘附配體的重組，兩者對於 MSCs 都具有牽引依賴性以及成骨分化相關性 (Engler *et al.*, 2006)。更重要的是，基質剛度不僅調節細胞特化，並且可調節成體幹細胞之自我更新。舉例而言，在高剛度培養基 ( $\sim 10^6$  kPa) 所培養的肌肉幹細胞會失去其幹性 (stemness)，導致前驅細胞的再生能力大幅下降；相較之下，將模擬肌肉自身彈性 (12 kPa) 的柔軟基質上培養的肌肉幹細胞隨後移植到小鼠，其自我更新和肌肉再生能力大幅提升 (Gilbert *et al.*, 2010)。此項研究結果再次證實，基質剛度可調控各種幹細胞之分化命運。

基質彈性影響 MSCs 成骨分化是經由 integrin- $\alpha$ 2/ROCK/FAK/ERK1/2 路徑 (Shih *et al.*, 2011) (圖 15)。基質上 ECM 彈性 (elasticity) 對 MSCs 產生機械性刺激，從而誘導 FAs 蛋白活性和重塑之變化 (Du *et al.*, 2011)。FAs 的生長和延長取決於培養基質的剛度，表示 ECM 彈性可調節 FAs 聚集 (assembly)。Integrins 為細胞重要之力學感應器 (mechanical sensors)，MSCs 於柔軟培養基誘導  $\beta$ 1 integrin 活化的程度明顯高於堅硬培養基，但是位於細胞膜上的 integrins 卻明顯低於堅硬培養基，其原因是柔軟的 ECM 會明顯提高 integrin 之內部化 (internalization)，此現象主要經由 caveolae/raft-dependent 內吞作用 (endocytosis)。Integrin 內部化會抑制 bone morphogenetic protein (BMP) – Smad pathway 而誘導 MSCs 往神經細胞分化；若使用 caveolae/raft 的抑制劑：methyl- $\beta$ -cyclodextrin，將會抑制 integrin 內部化進而阻礙 MSCs 於柔軟基質上分化為神經細胞。柔軟基質抑制 BMP – Smad pathway 部分是經由 integrins 調節之 BMP 受體的內吞作用 (Higuchi *et al.*, 2013) (圖 16)。

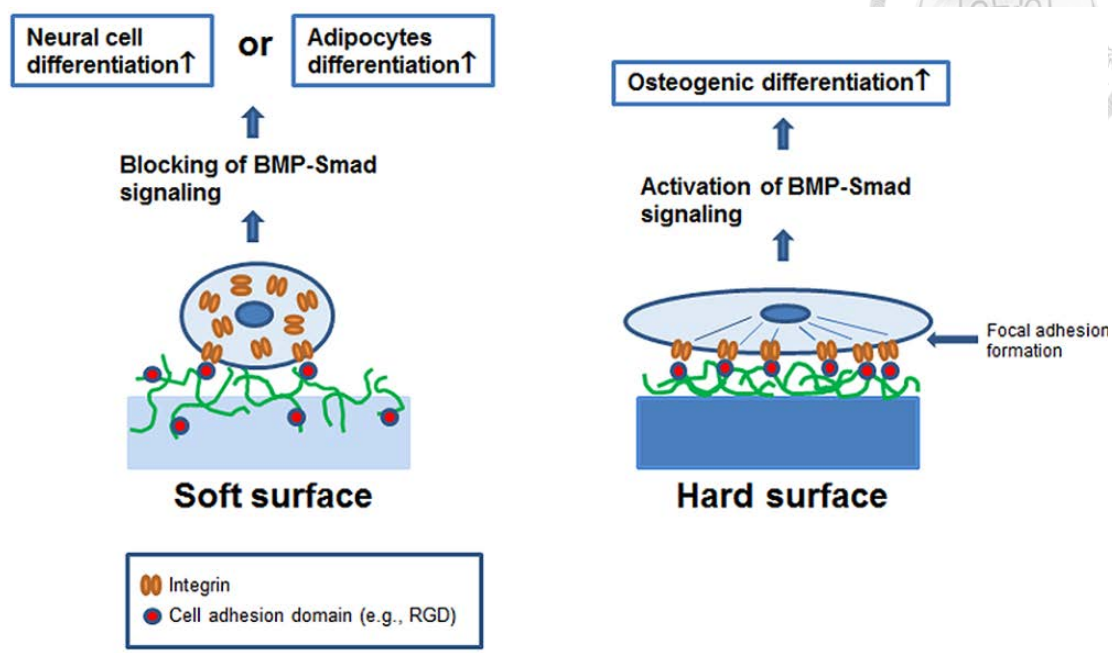


(Shih *et al.*, 2011)

圖 15. 培養基質剛度影響間葉幹細胞分化之機制。

Figure 15. The mechanism of the effect of culture substrate stiffness on MSCs differentiation.





(Higuchi *et al.*, 2013)

圖 16.整合素內部化經由 BMP – Smad 路徑調節間葉幹細胞分化。

Figure 16. Integrin internalization regulates MSCs differentiation via the BMP – Smad pathway.

#### 2.4.3.2 細胞形狀調節間葉幹細胞之分化方向 (Cell shape regulates commitment of MSCs)

根據先前研究證實，細胞形狀對於細胞的增殖，存活和分化的調節至關重要 (Chen *et al.*, 1997; Roskelley *et al.*, 1994)。為了探討細胞形狀的變化是否可以調節 hMSCs 細胞特化，McBeath 等人通過微縮成像技術 (micropatterning technique) 來控制細胞形狀和細胞擴散程度：當允許 hMSCs 粘附、扁平 and 延展時，將進行成骨分化；反之，未延展且呈現圓細胞型的 hMSCs 將分化為脂肪細胞 (McBeath *et al.*, 2004)。另有研究表示細胞形狀會影響 Rho 家族中 GTPases 的活性 (Ren *et al.*, 1999)。為了證實 RhoA 是否涉及細胞特化，McBeath 等人研究發現：ECM 調控之細胞形

狀會通過 RhoA 以及 Rho 相關蛋白激酶 (Rock) 之分子路徑決定 MSCs 分化命運 (McBeath *et al.*, 2004)。RhoA 的活化將誘導 MSCs 之成骨分化，反之則分化為脂肪細胞。此等藉由 RhoA 調控之細胞特化訊息需要肌動蛋白—肌球蛋白產生的張力，而不需要可溶性分化因子參與 (Arnsdorf *et al.*, 2009)。此項研究顯示細胞形狀，細胞骨架力學和 RhoA 訊息傳遞是決定幹細胞分化命運的組成要素。

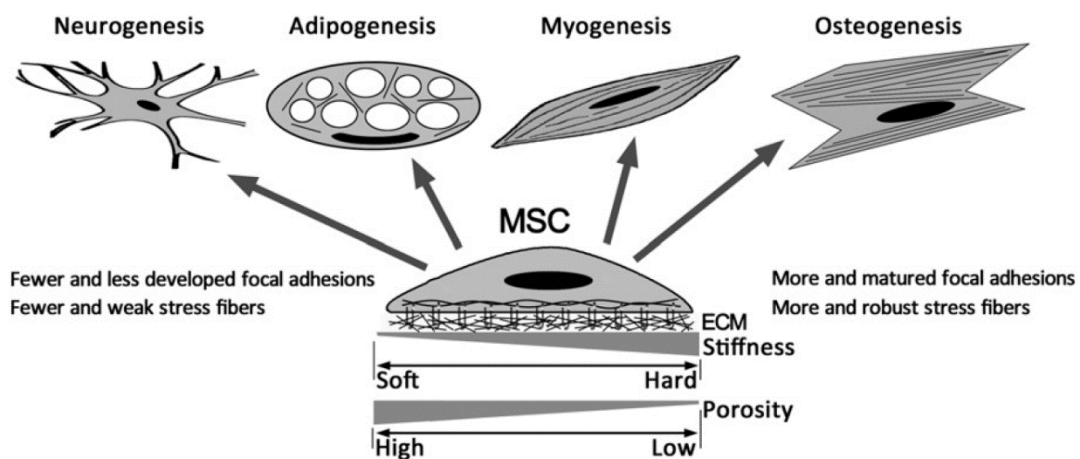
#### 2.4.3.3 構型變化影響間葉幹細胞之命運 (Topographic changes influence MSC fate)

ECM 是由許多孔隙、脊梁和不同大小的纖維所組成奈米級網絡結構，研究表示 ECM 物理構型會影響細胞行為 (Curtis and Wilkinson, 2001)。隨著電子束光刻 (electron beam lithography, EBL) 技術之發展，已可用於製造極精密之奈米形貌，大幅地促進細胞與奈米微環境相互作用之研究。通過 EBL 技術，Dalby 等人證實 MSCs 如何響應奈米級地形特徵 (Dalby *et al.*, 2007)。然而 EBL 所創造之奈米構型還不足以代表性的呈現生物體內之組織水平，因此 Dalby 研究團隊不僅利用 EBL 產生高度有序的對稱性，並產生具有不同水平的奈米無序和隨機表面，其中包括 (1) 正方形陣列 (square array, SQ)：基底從原始圖案壓印 120 nm 直徑，100 nm 深的奈米比特 (nanopits)，平均間隔皆為 300 nm；(2) 無序正方形陣列 (disordered square array, DSQ)：nanopits 從原本 SQ 位置在兩軸上隨機位移至多 50 nm (DSQ50) 或 20 nm (DSQ20)；(3) RAND：nanopits 隨機在 150  $\mu\text{m}$   $\times$  150  $\mu\text{m}$  的區域，並重複以填充 1 $\text{cm}^2$  面積。經培養 21 天後，DSQ50 上的 MSCs 表現骨骼專一性 ECM 蛋白質例如骨橋蛋白 (osteopontin) 和骨鈣蛋白 (osteocalcin) 以及早期結節形成 (Dalby *et al.*, 2007)。

因此 ECM 具有較複雜之幾何結構以及相對高剛度可促使 MSCs 產生 SFs 和 FAs 而往成骨細胞分化，若 SFs 和 FAs 形成受到抑制則往脂肪細胞分化 (圖 17)。此結果可能因柔軟的 ECM 無法使 integrins 和 ECM 穩定結合造成整合素內化 (integrin internalization)，進而使 FAs 無法形成，細胞無法感知並傳遞足夠的機械信號 (Du *et al.*, 2011)。ECM 物理性質可藉由改變細胞以及核骨架之張力影響基因的

表現，當 ECM 具有較高之剛度可增加細胞內的張力，導致細胞核變形並且增加 lamin A 和成骨細胞分化相關基因之表現；反之，低剛度 ECM 會降低細胞內張力，而增加脂肪分化相關基因之表現 (Higuchi *et al.*, 2013)。細胞黏著過程中藉由建立細胞骨架的張力調節 MSCs 的分化方向，ECM 剛度可穩定核骨架蛋白 - lamin A，經由 serum response factor (SRF) 與 YAP1 轉而提高 SFs 相關基因之表現 (Swift *et al.*, 2013)。lamin A 靜默 (silencing) 會促使 MSCs 在柔軟的 ECM 分化為脂肪細胞，而 lamin A 增加則促使 MSCs 在堅硬的 ECM 分化為成骨細胞。ECM 的物理訊號經 retinoic acid (RA) 路徑轉換至細胞核調節 lamin A 的轉錄 (Huang *et al.*, 2015; Swift *et al.*, 2013) (圖 18)。

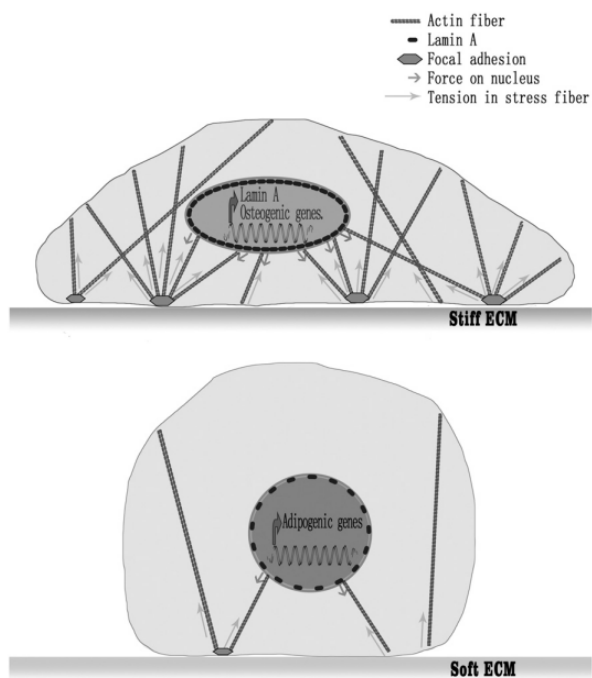
綜合上述，ECM 的物理性質決定 MSCs 的分化命運。當 MSCs 培養在具有高剛度、尖銳邊緣或大尺寸固定區域的 ECM 基質上，會誘導成骨細胞分化；反之，當 MSCs 培養在具有低剛度、平滑邊緣或小尺寸固定區域的 ECM 基質上，則會誘導脂肪細胞分化 (Huang *et al.*, 2015) (圖 19)。



(Huang *et al.*, 2015)

圖 17. 胞外基質的物理性質調節間葉幹細胞分化。

Figure 17. Physical properties of ECM regulate MSCs fate and differentiation.



(Huang *et al.*, 2015)

圖 18. 胞外基質的剛度經由改變細胞與核骨架的張力影響基因表現。

Figure 18. ECM stiffness affect gene expression by altering cytoskeletal and nuclearskeletal tension.

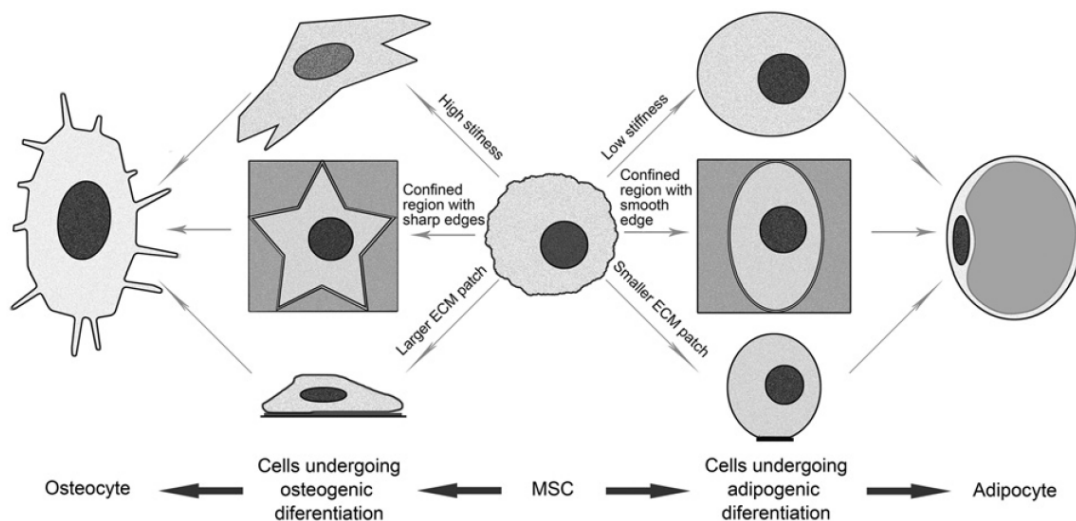
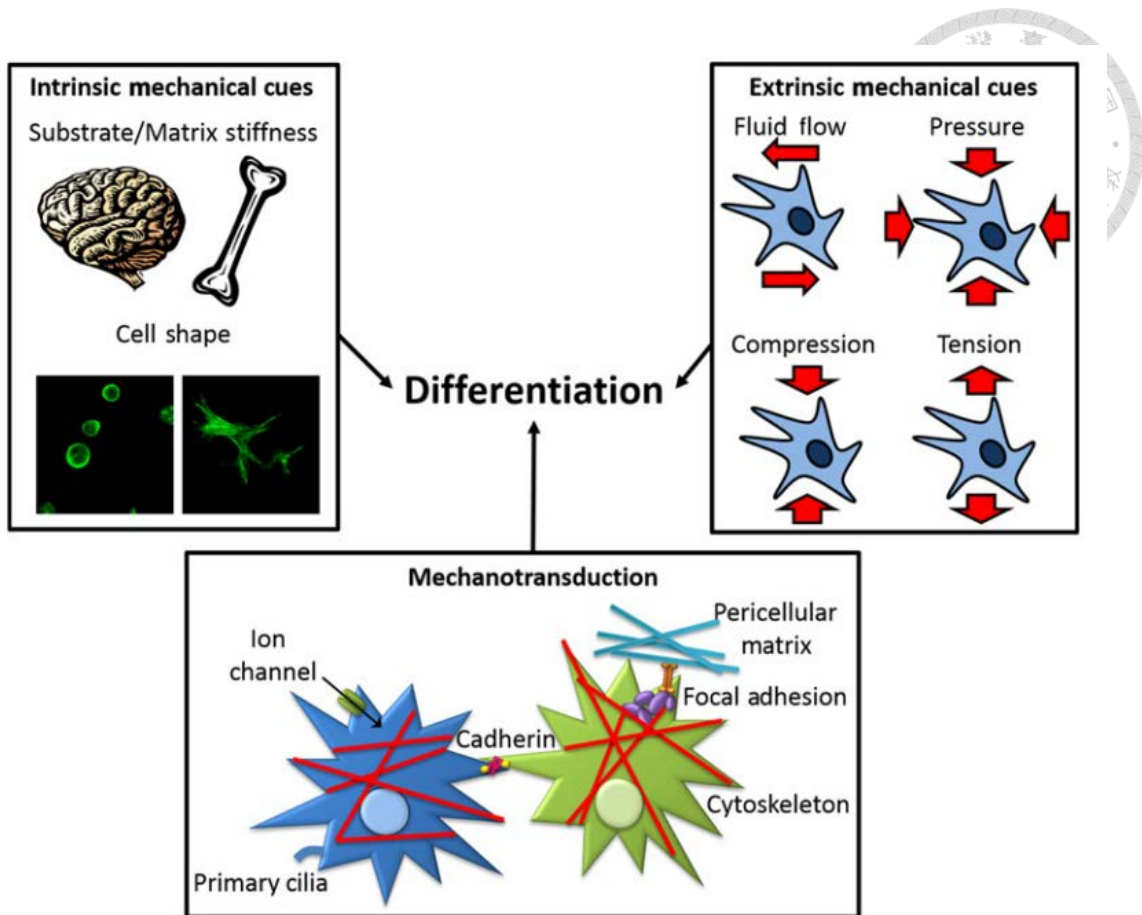


圖 19. 胞外基質的物理因素調節間葉幹細胞之分化命運。 (Huang *et al.*, 2015)

Figure 19. Physical parameters of ECM regulate MSC fate and differentiation.

#### 2.4.3.4 機械力調控間葉幹細胞的基因表現

MSCs 的分化除了受基質剛度 (stiffness) 和構型 (topography) 等內在機械信號 (intrinsic mechanical cues) 所影響，外在的機械信號例如流體剪力、壓縮力、靜水壓力和張力等，可經由細胞膜上的離子通道、細胞之間的 cadherins、細胞和胞外基質的 focal adhesion 或細胞內的細胞骨架轉換為化學訊息，從而活化不同之分子路徑進而調節 MSCs 的分化 (Steward and Kelly, 2015) (圖 20)。先前已有許多研究將機械力刺激視為調節細胞結構和功能的關鍵因素。細胞將感測到的機械力傳遞到本身或其它細胞內部，並將其轉換為化學訊號進而調節細胞之運動、分化和增殖 (Discher *et al.*, 2009; Engler *et al.*, 2004; Janmey and McCulloch, 2007; Yeung *et al.*, 2005)。Kurpinski 等人使用微化條帶 (micropatterned strip) 使 MSCs 的排列沿著單軸應力的方向。結果顯示平滑肌細胞的標記 calponin 1 的表現增加，而軟骨基質標記表現降低。然而，當細胞排列垂直於應力方向時，會減少基因表現的變化 (Kurpinski *et al.*, 2006)。此結果表示機械力對 MSCs 的基因表現具有深遠的影響。而另一項研究發現，若同一組中 TGF- $\beta$ 1 和循環之機械應力同時作用時，可協同 calponin1 基因表現增加，說明可溶性因子和機械應力可協同調控 MSCs 的基因表現 (Kurpinski *et al.*, 2009)。此外，流體剪力會經由活化 RhoA - ROCKII 路徑提高 actin filaments 的張力，誘導成骨細胞分化相關基因 Runx2, Wnt, Ror2 的表現。若使用 LPA (lysophosphatidic acid) 激活 RhoA 則會抑制脂肪細胞分化相關基因 PPAR $\gamma$  的表現；而使用 cytochalasin D 抑制機動蛋白聚合可增加 PPAR $\gamma$  並抑制 Runx2 的表現 (Arnsdorf *et al.*, 2009)。



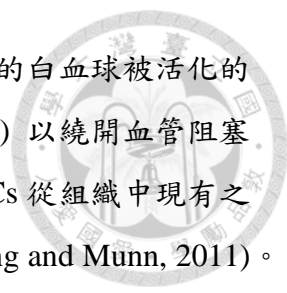
(Steward and Kelly, 2015)

圖 20. 內在與外在機械信號調節間葉幹細胞之分化。

Figure 20. The intrinsic and extrinsic mechanical cues that regulate the differentiation of MSCs.

#### 2.4.4 機械力與血管形成

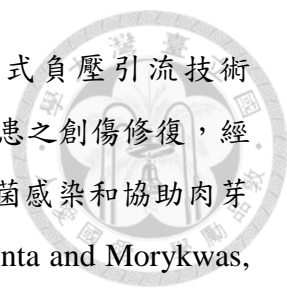
新血管形成 (neovascularization) 根據血管生長的機制不同主要分為三種：(1) 血管新生 (vasculogenesis) 由中胚層來源之內皮前驅細胞或稱為血管母細胞 (angioblasts) 分泌內皮細胞遷移所需的生長因子和趨化因子 (chemokines) 重新形成新的血管，負責胚胎時期原始血管之形成。(2) 血管生成 (angiogenesis) 為低氧 (hypoxia) 所誘導之內皮細胞 (endothelial cells, ECs) 的活化，沿著血管生成訊號的



方向形成小口徑的血管。(3) 動脈生成 (arteriogenesis) 為循環中的白血球被活化的血管內皮所吸引，形成成熟具功能的側支動脈 (collateral arteries) 以繞開血管阻塞的部位 (van Oostrom *et al.*, 2008)。在 angiogenesis 過程當中，ECs 從組織中現有之血管滲入到無血管的空間稱為血管萌芽 (vascular sprouting) (Song and Munn, 2011)。血管內皮生成因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 為血管生成主要的調節因子，從無血管空間的細胞分泌出的 VEGF 形成 VEGF 濃度梯度，提供附近的血管具有方向性和趨化性的訊號，進而刺激並引導血管萌芽 (Eilken and Adams, 2010)。有研究表示流動血液產生的流體剪力 (fluid shear stress) 會以一氧化氮依賴的方式 (nitric oxide-dependent manner) 減弱 ECs 的萌芽；另外從血管滲出之血漿產生的間隙滲流 (interstitial flow) 會引導 ECs 型態發生和萌芽。因此，流體剪力和 VEGF 濃度梯度使 ECs 整合達到血管擴張和萌芽之目的 (Song and Munn, 2011)。

流體剪力 (fluid shear stress, FSS) 是指血液或組織液流動時對組織或細胞所造成的摩擦力，可促進骨髓來源之內皮前驅細胞 (endothelial progenitor cells, EPCs) 分化為成熟之內皮細胞。EPCs 於體外經 FSS 作用後其黏附、遷移、增殖和管狀形成能力明顯增強，且內皮細胞特有標記之蛋白質如 Tie2, VEGF-R2, VE-cadherin 等及其 mRNA 表現量皆明顯上升，而 PI3K/Akt/mTOR 訊息傳遞路徑涉及 EPCs 的增殖和黏附並與內皮細胞特有標記之蛋白質表現有關 (Obi *et al.*, 2012)。另外抑制分析顯示 FSS 作用於 integrin  $\beta 1$  後會經由 Ras/ERK 或 FAK/Paxillin 兩種訊息傳遞路徑調節細胞骨架的重新組織 (cytoskeletal rearrangement) 進而導致 EPCs 的分化 (Cheng *et al.*, 2013)。

機械性拉力 (mechanical tension force) 施於大鼠耳部可觀察到真皮層血管的直徑以及內皮細胞的標記 PECAM-1 都有明顯增加，而且拉力作用後的血管口徑呈現異質性 (heterogeneity) 和高度彎曲，這些皆為血管重塑 (vascular remodeling) 的早期特徵 (Pietramaggiore *et al.*, 2007)。此外拉力作用的過程中會造成組織短暫性缺氧，RT-PCR 分析結果顯示週期性拉力可明顯提升 hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF-1 $\alpha$ ) 的基因表現，其為低氧環境所活化之血管生成轉錄因子 (Chin *et al.*, 2010)。

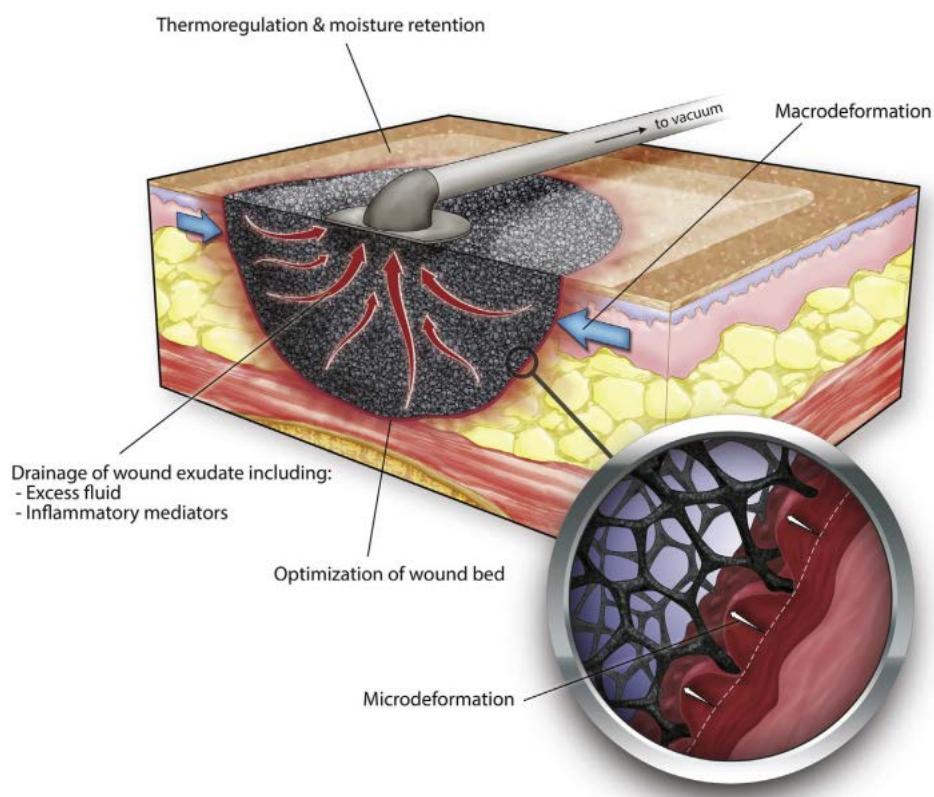


此外，負壓使用於傷口修復的方式於臨床上稱為封閉式負壓引流技術 (vacuum-assisted closure, VAC)，最早於 1997 年用以治療糖尿病患之創傷修復，經動物和臨床實驗證實可有效刺激血管生成，並且可防止傷口細菌感染和協助肉芽組織 (granulation tissue) 的形成達到加速傷口癒合之目的 (Argenta and Morykwas, 1997)。VAC 裝置通常包括填充材料例如多孔性泡棉 (porous foam) 放置於創傷部位，半開放式傷口敷料 (semiocclusive wound dressing) 用來隔離傷口環境，並允許真空裝置傳輸低於大氣壓的壓力於傷口床 (wound bed)，以及連接管 (connecting tube) 連接至真空裝置 (vacuum device)。當使用 VAC 裝置用於可移動部位例如腹部，傷口邊緣會受泡棉的收縮所牽引而逐漸癒合，另外在傷口與泡棉的接觸面會產生微變形 (microdeformations) 使細胞伸展 (stretch cells) 並活化血管生成和細胞分裂的分子路徑，並可移除水腫產生的大量組織液以減少組織腫脹，此外敷料另可作為絕緣體隔絕外界環境以保持傷口的溫暖和濕潤 (Lancerotto *et al.*, 2012) (圖 21)。

于 2011 年 Erba 等人使用 VAC 作用於小鼠背部傷口分別施予連續性 (125 mmHg; 6 小時, 3 天和 7 天) 與週期性 (125 mmHg 和 50 mmHg 交替 2 分鐘; 7 天) 之負壓，個別與其對照組相較，以觀察血管生長情況及分析傷口因低氧所誘導之血管生長相關因子：HIF-1 $\alpha$ , VEGF, VEGF-R2 和 PDGF。結果顯示 VAC 處理之血管孔徑較小，密度較高，且生長較具次序及功能性；另以 Pimonidazole hydrochloride 染色及 Western Blot 分析結果顯示，VAC-foam 與傷口介面處因低含氧量進而驅使厭氧性巨噬細胞 (hypoxic macrophages) 形成 VEGF 濃度梯度，促使血管從傷口內部往濃度高之表面生長；RT-PCR 分析對照組各血管生成因子 mRNA 表現量，在第 6 小時無明顯表現，但從第 3 天開始表現量逐漸增加且持續到第 7 天，而連續及週期性 VAC 處理組表現量變化則較不明顯 (Erba *et al.*, 2011)。為進一步了解其作用機制，2013 年 Lancerotto 等人以相同壓力吸附小鼠背部表皮 2 小時後，發現真皮組織深層缺氧及局部缺血情況至少維持 1 小時，且直至 4 小時才恢復到正常值，因此認為短暫性缺氧會激活 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 路徑而促進血管生成 (Lancerotto *et al.*, 2013)。



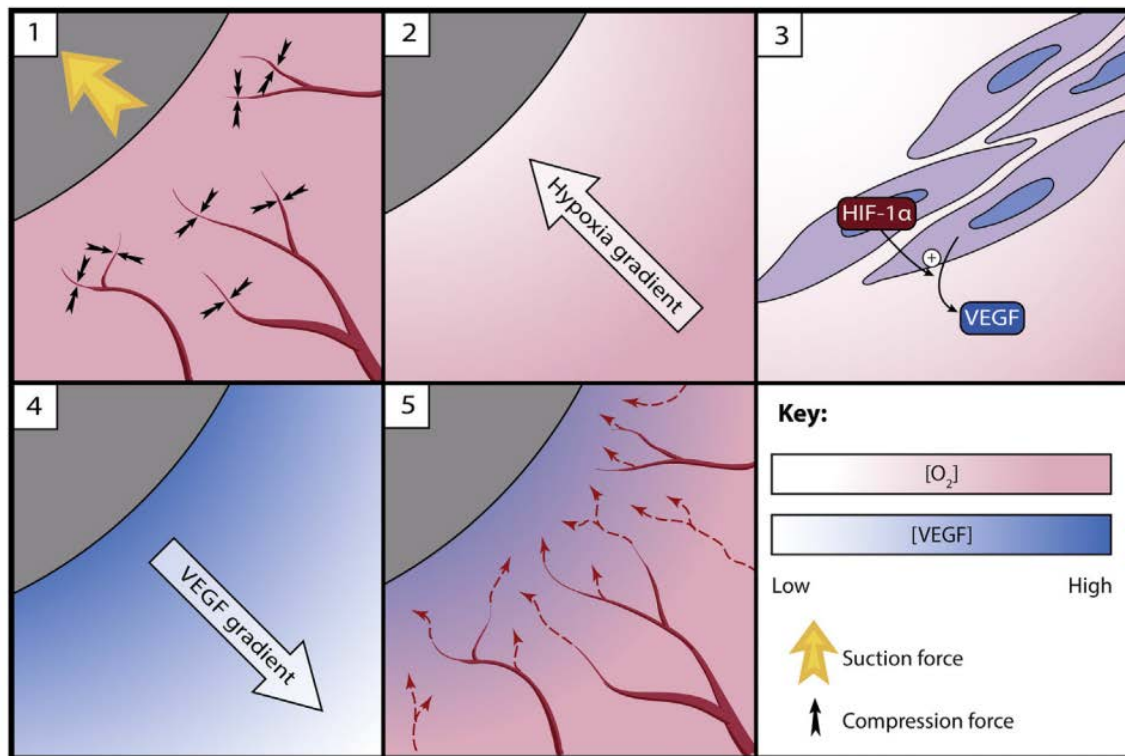
VAC 作用時會增加皮下組織壓力，導致小血管的收縮。而皮下組織因局部性血流量的減少所產生缺氧梯度 (hypoxia gradient)，會誘導皮下組織細胞之 HIF-1 $\alpha$  表現量增加，進而刺激 VEGF 的表現。根據組織中的缺氧梯度從組織深層到外部逐漸嚴重的情況，細胞所表現的 VEGF 會從組織外部往深層逐漸減少，而產生 VEGF 濃度梯度 (concentration gradient)，能誘導血管往靠近表皮的方向生長 (Huang *et al.*, 2014) (圖 22)。



(Lancerotto *et al.*, 2012)

圖 21. 封閉式負壓引流主要作用機制。

Figure 21. The primary mechanisms of action of VAC.



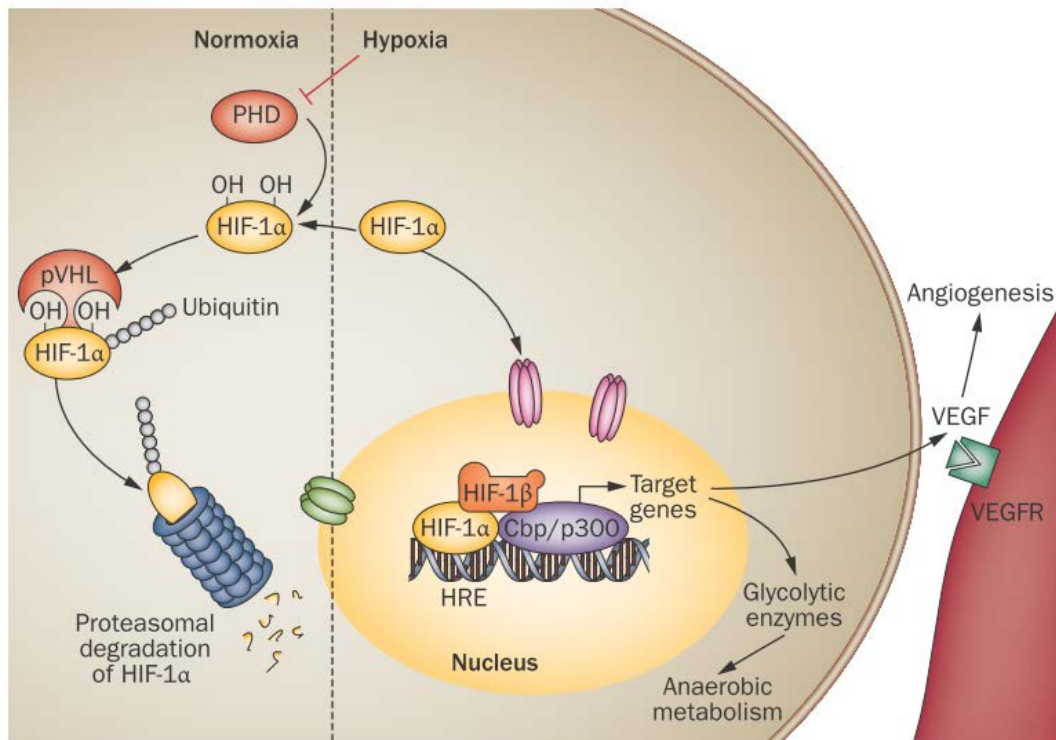
(Huang *et al.*, 2014)

圖 22. 封閉式負壓引流造成氧氣和 VEGF 濃度梯度引導血管生長。

Figure 22. VAC establishes hypoxia and a subsequent VEGF gradient that drives the directionalized blood vessel growth.

Hypoxia-inducible factors (HIFs) 為異質二聚體 (heterodimeric) 的轉錄因子，由 HIF-1 $\alpha$ /HIF-1 $\beta$  和 HIF-2 $\alpha$ /HIF-1 $\beta$  分別組成 HIF-1 和 HIF-2，其所調節目標基因之表現包括厭氧代謝、血管生成、紅血球生成和細胞增殖或凋亡等，使細胞能在低氧條件下存活 (Dunwoodie, 2009; Rankin and Giaccia, 2008)。在常氧情況下 (氧含量 >5%)，HIF-1 $\alpha$  的半衰期會變得非常短 (<5 分鐘)，細胞的氧氣感應器 (cellular oxygen sensors)：脯胺酸羥基化酶 (prolyl hydroxylase, PHD)，會在 HIF-1 $\alpha$  中特定的脯胺酸進行羥基化 (Pro402 和 Pro564)，經由 E3 ubiquitin ligase 或稱為 von Hippel-Lindau protein (pVHL) 調節，最終在蛋白酶體進行降解 (proteosomal degradation)。

而在低氧情況下 (氧含量<5%)，會被 2-oxoglutarate-dependent 和  $\text{Fe}^{2+}$ -dependent prolyl hydroxylases 所偵測，使 HIF-1 $\alpha$  活化而不被泛素 (ubiquitin) 作用降解，然後 HIF-1 $\alpha$  累積並轉移到細胞核內做為轉錄因子，與 HIF-1 $\beta$  形成二聚體 (dimers) 並且與其它活化因子結合至 hypoxia-responsive genes 中的 promoter : hypoxia response element (HRE) 啟動目標基因的表現，包括醱解酵素進行厭氧代謝 (anaerobic metabolism) 以及 VEGF 會被分泌到細胞外與其受體結合後促進血管生成 (Maes *et al.*, 2012) (圖 23)。



(Maes *et al.*, 2012)

圖 23. HIF-1 $\alpha$ -VEGF 訊息路徑。

Figure 23. The HIF-1 $\alpha$ -VEGF signal pathway.



## 2.5 豬為動物模式於生物醫學之研究


### 2.5.1 動物模式之簡介

動物模式 (animal model) 指某種動物經自發或人為誘導產生疾病或特定之生命現象，若與人類發生相似生理或病理過程，則可利用該種動物作為模式，以瞭解發生該疾病或特定之生命現象的機制，進而發展適合人類疾病之治療策略。另外某些模式動物因具有取材容易、操作方便、繁殖週期短，且可標準化飼養管理等優點，而普遍用於科學研究，又稱為實驗動物，常見的有小鼠、大鼠、天竺鼠、兔子等。實驗動物在生理或病理過程中與人類有許多相似之處，可互相做為參照，並執行於人體上直接進行之工作，因此可透過各種方式將所要研究之目標穩定呈現在標準化之動物身上，以供試驗研究之用。

為改善人類健康，科學所發現的新知和技術的發展必須轉至實際應用上，科學的進展通常起始於基礎研究，然後逐漸到臨床階段。在這些科學技術發展的過程當中，動物模式的利用於臨床試驗前扮演著相當重要的角色。雖然沒有動物模式能夠完全模擬人類複雜的生理或病理狀態，動物模式於疾病作用機制的評估以及技術診斷的測試卻相當關鍵。在生命科學領域，對於細胞和分子機制的重大發現大多數來自小型實驗動物，特別是小鼠。以小鼠為動物模式已讓我們瞭解人類的造血作用、先天和後天免疫、自體免疫、傳染病、腫瘤學以及再生醫學 (Shultz *et al.*, 2007)。然而小鼠的生理特徵與人類還是有明顯的不同，小鼠通常無法忠實的模擬人類確切的條件，因此在生理、功能和解剖學上勢必採用與人類相近的大型動物模式。例如 2005 年 Turk 等人以豬作為模式動物進而了解動脈粥狀硬化的疾病進展和發病原理，並發展出新的療法 (Suzuki *et al.*, 2011; Turk *et al.*, 2005)。

### 2.5.2 小型豬為動物模式之優點

用於生物醫學研究的大型動物模式當中，豬相當受歡迎，全世界的豬有數百個品種，其中一些被歸類為小型豬 (miniature swine)，或通稱的迷你豬 (minipigs)。豬的性成熟早，繁殖週期為一年 (breed year-round)，且單一窩仔數多達 10~12 隻；



此外小型豬在生理特徵、器官大小以及遺傳組成皆與人類相當接近 (Lunney, 2007) (表 1)。豬體型夠大且夠強健，能夠忍受複雜的實驗過程，例如小型豬可以提供多樣的活組織檢查 (multiple tissue biopsies) 而且不需要安樂死，因此單一動物個體可延長試驗執行時間，另外可進行重複的組織或流體採樣，並符合醫院所採用的標準化成像技術 (Duran-Struuck *et al.*, 2015)。在早期豬的基因組研究計畫便已證實豬的系統發育狀態 (phylogenetic status) 相較於啮齒動物更接近人類，且豬的基因體和蛋白質體相較於其它大型動物模式來的更高等 (advanced) (Aigner *et al.*, 2010; Swindle *et al.*, 2012)，因此選擇小型豬作為動物模式在生物醫學研究中相當重要。

以小型豬取代啮齒動物於基礎研究上已有十幾年，常用於藥理學實驗和人類疾病治療模式研究，小型豬動物模式經常被設計用以評估新的治療方式其功效和安全性。相較於人類的臨床試驗是經由明確的定義去評估新療法的各種成效，利用動物模式進行的試驗較不明確，主要是用以闡述治療的基本理論，這些動物試驗有時被稱為概念性驗證之試驗 (proof-of-concept trials)，其主要目的是希望從動物模式所得到的實驗數據經轉換後能夠再應用到人類身上；另一個研究目標是希望藉由動物模式的鑑定改善療效及安全性之結果預測，盡早排除效果較差或者會呈現嚴重副作用的方式，以減少人類臨床試驗之數量 (Stricker-Krongrad *et al.*, 2016)。基於上述研究，倫理上的考量，以及相關背景資料的缺乏，使用小型豬於生醫領域相關之研究堪稱為較理想的動物模式。

表 1. 豬作為生物醫學模式動物之優點。



Table 1. Advantages of swine as a biomedical model.

- 
- Human size – particularly miniature pigs
  - Physiology similar to humans
  - Large litter sizes
  - Cloning and transgenic technology well-advanced
  - Numerous well defined cell lines
  - Similar disease progression
    - metabolic , e.g. obesity and heart disease
    - infectious diseases – numerous organisms cause infections across species
  - Ability to deliberately time studies and collect repeated and, at kill, detailed tissue samples
  - High sequence and chromosome structure homology with humans
  - Improving genomic and proteomic tools
- 

(Lunney, 2007)

## 第三章 試驗研究



### 3.1 外部體積擴張對軟組織厚度、細胞增殖和血管重塑之影響

#### 3.1.1 前言

根據 2012 年 Heit 研究團隊所發表的文獻表示，利用負壓 25 mmHg 連續作用在小鼠背部表皮 28 日進行外部體積擴張 (external volume expansion, EVE)，可提供潛在的干預方式預先處理 (precondition) 受體部位，進而改善自體脂肪移植後的存留容積。試驗結果顯示包括：皮下組織厚度、脂肪細胞之數目和血管密度等均有顯著之增加。另於第 7 日以 corrosion casting 觀察微血管系統的重塑 (remolding of microvasculature) 成效，結果顯示 EVE 會以調節血管之重組 (reorganization)、改變血管方向，及增加血管管腔之厚度等方式進行血管之重塑。此外，經過 EVE 作用 28 日之後，採樣進行內皮細胞標記 platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1 or CD31) 免疫組織染色，結果顯示其血管密度相較於對照組者，可增加高達 1.9 倍 ( $p = 0.01$ ) 之譜。另以 proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 做為細胞增殖標記進行免疫組織染色，結果顯示脂肪組織和表皮當中增殖細胞所占的比例，相較於對照組者，分別高出 2 和 1.9 倍 ( $p < 0.05$ ) (Heit *et al.*, 2012)。另有研究顯示相較於連續性拉力，週期性拉力能更有效提高細胞之增殖和血管之生成 (Chin *et al.*, 2010)。然而，動物試驗所得到的結果是否具有臨床顯著性 (clinical significance) 仍需進一步評估，由於人類之組織相較於小鼠者較為堅硬且不易變形；職是之故，在相同負壓下可能會導致不同之結果 (Lancerotto *et al.*, 2013)。本試驗使用之李宋豬，其表皮和皮下組織在解剖及生理上與人類皆具相似性，並且以每天相同 8 小時之時間間隔，比較 EVE 作用時間 (10 日和 21 日) 對受體部位之軟組織厚度、細胞增殖、血管生長及其功能性成熟的影響，進行定量分析。



### 3.1.2 材料與方法

#### 3.1.2.1 試驗動物飼養環境及條件

本試驗所採用三隻體重介於 43~44 公斤，6~6.5 月齡之雌性李宋豬 (Lee-Sung female pigs)，皆購自國立台灣大學動物科學系，並經國立台灣大學倫理委員會所核准的動物協議。本試驗之實行嚴格遵照美國國家衛生研究院 (National Institutes of Health, NIH) 所發布之實驗動物護理和使用指南 (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) 的規範。試驗流程中所使用的麻醉和止痛方式皆符合標準。

試驗豬隻飼養於專門設計之畜欄內，每日在試驗前和試驗結束時 (約早上 9 點和下午 5 點) 飼予完全配合飼料，並給予適當乾淨飲水，試驗過程中也會適時補充水分。每日試驗前 30 分鐘會固定清掃畜舍，以維持試驗環境整潔，並以窗口之小型風扇維持畜舍良好通風。

#### 3.1.2.2 試驗處理和設計

試驗過程當中豬隻皆放置於一個侷限的空間內，可採站姿或臥姿但不能移動 (圖 24A)。試驗所使用之外部體積擴張裝置包括直徑 7 公分，內部容積為 140 毫升之圓頂狀橡膠裝置 (dome-shaped rubber device)，以塑膠管連接至真空吸力幫浦 (suction pump) (VAC Instill, San Antonio, Texas)，並將壓力設定為 700 mmAq (約 50 mmHg) (圖 24B, C&D)。此壓力設定為豬隻所能承受之最大限度，並且在試驗過程中不會立即產生不良之生物反應，例如疼痛或皮膚起紅疹。

豬隻以負壓 50 mmHg 每日於相同之時間間隔連續作用 8 小時 (9:00~17:00) 直至第 10 日或第 21 日 (圖 25B)。吸力杯 (suction cups) 放置之位置在豬隻側腹部的皮膚，與最靠近的一排乳腺距離 6 公分。每一邊側腹部同時以負壓作用於前和後兩個位置，兩者之間間距大約 5 公分，並且在前後兩個位置的中間點作為對照組，因此每個位置分為三個試驗組，分別為對照組 (未經任何處理)、EVE 作用 10 日和 EVE 作用 21 日。為了試驗的一致性和方便性，所有前端位置分配為 10 日處



理組，所有後端位置分配為 21 日處理組，兩者間的中間位置皆做為對照組 (圖 25C)。由於將一頭豬的一側分為 3 組，而每頭豬的兩側都有經過 EVE 處理，因此總共三頭豬每組樣本數為 6。各組在試驗時間結束後一日分別進行組織採樣，也就是前端位置 (10 日處理組) 在第 11 日採樣，後端位置 (21 日處理組) 連同對照組在第 22 日採樣，每組在採樣前先以超音波測量軟組織厚度 (圖 25A)。另外每組所採取之樣本皆進行以下分析：(1) H&E 染色觀察血管重塑以及脂肪細胞的大小和數量；(2) 免疫組織染色以 Ki67 觀察細胞增殖， $\alpha$ -SMA 觀察血管平滑肌細胞；(3) Image J 測量表皮厚度；(4) 免疫螢光染色以 CD31 分析血管密度。

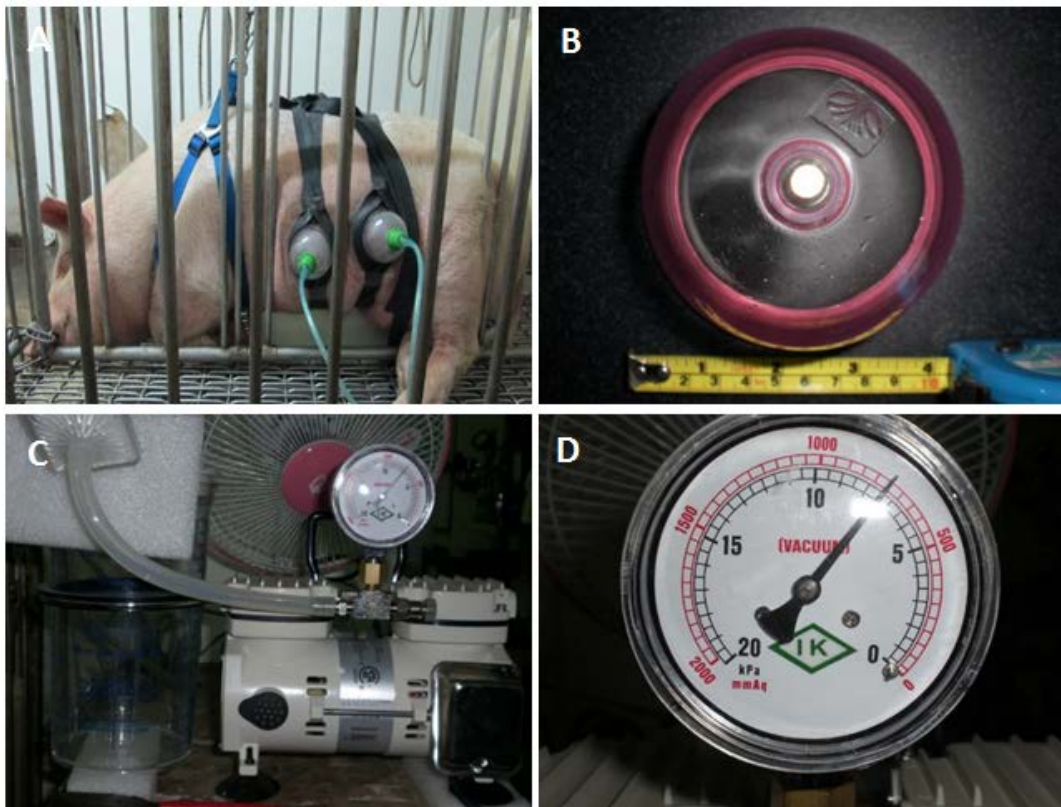


圖 24. 外部體積擴張裝置及其作用期間之示意圖。

Figure 24. External volume expansion device and the pig was positioned in a limited space during EVE treatment.

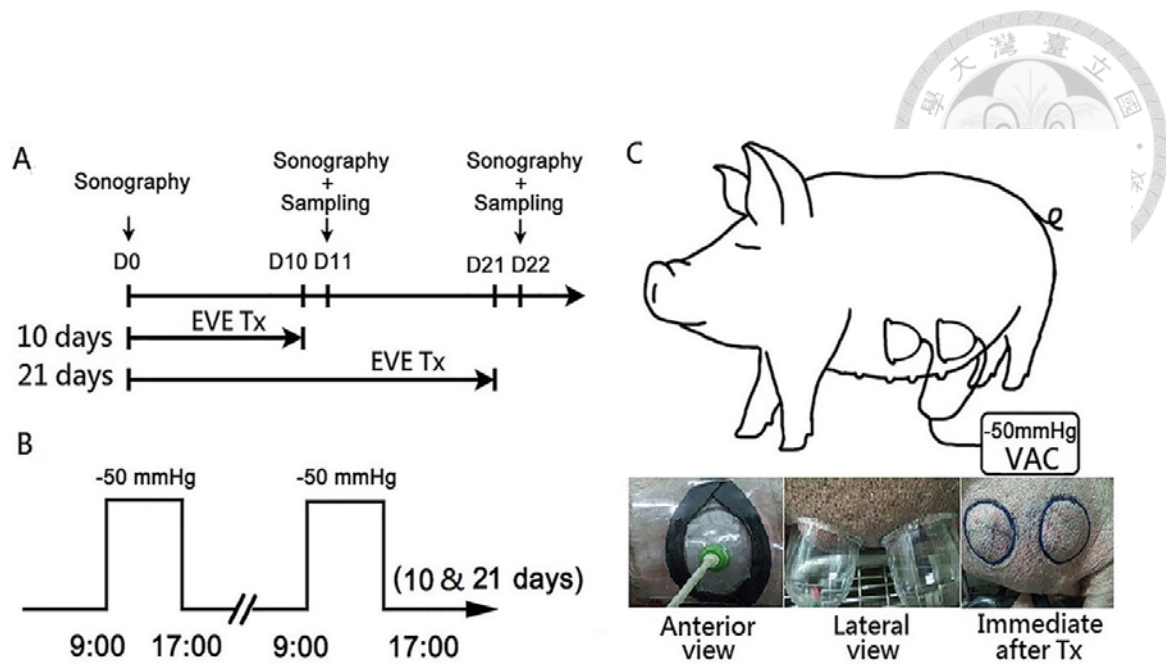



圖 25. EVE 處理之試驗設計和流程圖。(A) 試驗設計之實驗組別和時間流程圖。(B) 外部體積擴張之處理模式。(C) 外部擴張裝置所採用之負壓及其作用部位。

Figure 25. The experimental designs and flow chart of EVE treatment. (A) Study groups and time chart of experimental design. (B) The EVE treatment pattern. (C) The negative pressure and treated sites of EVE device.

### 3.1.2.3 超音波測量軟組織厚度

軟組織厚度，包括皮膚和皮下脂肪，利用超音波單位 7.5 MHz 線性陣列之實時傳感器 (linear-array real-time transducer) 進行測量 (LOGIQ 700 MR, General Electronic Company, Milwaukee, WI, USA)。軟組織厚度於三個時間點進行測量，分別是 EVE 處理前 (day 0)，EVE 處理剛結束時 (day 10 或 21) 以及採樣前 (day 11 或 22)。超音波測量皆由同一人進行操作。

#### 3.1.2.4 H&E 染色以及脂肪細胞大小和數量之測量



取出的組織以 10% 的福馬林進行固定後，將樣本於一系列濃度遞增的酒精中進行脫水，再將樣本置於二甲苯，替換出組織中的酒精，最後以石蠟浸潤包埋。先將樣本置於已融化的石蠟中，待石蠟完全浸入組織之前，預先準備好一容器，倒入已融化的石蠟，再將以被石蠟浸透組織樣本放入其中，待冷卻凝固成塊，即可進行切片。以切片機將石蠟樣本連續切成 4  $\mu\text{m}$  厚度的組織切片，將切片於溫水浴中展平，並載於玻片上，置於 45°C 恆溫箱中烘乾，幫助切片和玻片之黏著。將含切片之玻片置於二甲苯中脫蠟，再經由濃度遞減酒精進行水化，最後放入蒸餾水中即可染色。將切片置於蘇木精染液進行染色 5 分鐘，取出切片以流水沖洗 15 分鐘放入蒸餾水片刻，放入 70% 和 90% 酒精中脫水各 10 分鐘，再將切片置於伊紅染液進行染色 5 分鐘，再經由濃度遞增的酒精脫水，最後放入二甲苯內澄清切片，最後將切片滴上樹脂，蓋上蓋玻片封固，即可以顯微鏡觀察。光學顯微鏡 (AxioImager M1 microscope, Zeiss, Germany) 個別以 40 和 200 放大倍率 (Plan-Neofluar objective with 0.50 NA) 對組織切片中的細胞結構進行觀察，脂肪細胞的大小和數量是利用 Adiposoft 自動化程式進行分析。

Adiposoft 是一個開放性軟體 (open-source software)，可針對組織切片中白色脂肪組織進行全自動化分析。首先描述由此程式所執行的圖像分析例程序列 (sequence of image analysis routines)，然後比較此軟體和其它方式，包括以人為對組織切片中的細胞進行定量分析作為黃金標準 (gold standard)，以及最常用的自動化細胞懸浮液 (cells in suspension) 分析。結果顯示 Adiposoft 和其它兩種方式之間有明顯的一致性 (significant concordance)，並且證實 Adiposoft 能區別出三隻不同豬隻的脂肪組織中的細胞組成。另外，Adiposoft 與手動分析的脂肪細胞直徑具有高度相關和低分歧性 (low disagreement) (Pearson correlation = 0.856, with 95% confidence interval) (Galarraga *et al.*, 2012)。因此在有限的時間和人力的情況下，Adiposoft 能夠提供精確的分析結果。

### 3.1.2.5 Ki67 和 $\alpha$ -SMA 免疫組織染色 (Immunohistochemistry for Ki67 and $\alpha$ -SMA)

檸檬酸鈉緩衝溶液之配置



#### Citrate Buffer Antigen Retrieval Protocol

福馬林固定會造成蛋白質交互連接 (cross-links)，而掩飾樣本組織的抗原位點，導致免疫螢光染色偵測某特定蛋白時會產生微弱或者錯誤的訊號。檸檬酸鹽溶液可用來破壞蛋白質間的交互鍵結，而揭露福馬林固定和石蠟包埋組織切片的抗原以及抗原決定位 (epitopes)，進而增強抗體的染色強度。

檸檬酸鈉緩衝溶液配置 (10 mM Sodium Citrate, 0.05% Tween 20, pH 6.0)：

將 2.94 克的 tri-sodium citrate (dihydrate) 溶解於 1000 毫升的蒸餾水 (distilled water)，以 1N HCl 調整 pH 值到 6.0，再加入 0.5 毫升的 Tween 20，並混和均勻，將溶液放入 4°C 冰箱儲存。

1. 將切片置於二甲苯中兩次，每次 5 分鐘，進行脫蠟。
2. 將切片放入 100% 乙醇兩次，每次 3 分鐘，再分別放入 95% 和 80% 乙醇各一次，每次 1 分鐘，進行再水化 (rehydrated)，然後放入蒸餾水中漂洗 (rinse)。
3. 將切片放入 10 mmol/L 檸檬酸鈉 (sodium citrate) 溶液中 (pH 6.0)，微波 10 分鐘，進行抗原修復 (antigen retrieval)。
4. 將切片進入染色培養皿 (staining dish)，輕輕蓋上蓋子，水浴 20~40 分鐘 (根據使用者決定最佳的時間)。
5. 將培養皿中的溶液倒掉，然後移至室溫中，風乾 20 分鐘。
6. 將切片放入 PBS Tween 20 兩次進行漂洗，每次 2 分鐘。
7. 將切片以 avidin 或 biotin 進行 blocking，30 分鐘。
8. 將切片放入含有一級抗體之稀釋緩衝液 (dilution buffer)，於室溫下水浴 1 小時，或放入 4°C 冰箱過夜。
9. 以 PBS Tween 20 沖洗切片兩次，每次 2 分鐘。
10. 將切片放入 peroxidase blocking solution，10 分鐘。
11. 以 PBS Tween 20 沖洗切片 3 次，每次 2 分鐘。

12. 與 Ki67 一級抗體 (Lab Vision, Fremont, CA) 於室溫水浴 1 小時。

冷凍切片以丙酮固定後針對 alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) 進行染色 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO)。 $\alpha$ -SMA 一級抗體於 4°C 水浴過夜，而 Ki67 一級抗體 (Lab Vision, Fremont, CA) 於室溫水浴 1 小時，訊號放大使用 tyramide amplification system (PerkinElmer, Boston, MA)。

### 3.1.2.6 細胞增殖和表皮厚度之定量

脂肪和表皮細胞的增殖以 Ki67 免疫組織切片，在 200 放大倍率下個別計算，增殖的脂肪細胞數的計算在五個高倍率視野 (five high power fields)，增殖的比率以細胞核呈現 Ki67 陽性佔所有細胞核的百分比。另外只計算 basal keratinocytes 的原因是在所有角質細胞中它唯一具有增殖的潛能。三個各自獨立的觀察者在不知實驗設計模式的情況下完成分析，每次計算結果得到的平均值再進行統計分析，表皮厚度在五個均勻空間點 (evenly space points) 進行測量再用 Image J 分析。

### 3.1.2.7 CD31 免疫螢光染色 (Immunofluorescence for CD31)

1. 將 3  $\mu$ m 的石蠟切片進行脫蠟、再水化。
2. 將切片放入 10 mmol/L 檸檬酸鈉溶液 (pH 6.0)，微波 10 分鐘，共 2 次，進行抗原修復 (antigen retrieval)。
3. 以含有 4% Bovine albumin solution 的 PBS 對非特異性內源性抗原 (non-specific endogenous antigens) 進行 block。
4. 使用未標定 (unlabeled) 一級抗體針對 CD31 進行檢測 (Abnova, Cat # PAB11924, Taipei, Taiwan)，於 4°C 水浴過夜。
5. 以 PBS 沖洗切片 3 次，每次 5 鐘。
6. 以螢光標定之二級抗體和切片於 4°C 進行水浴過夜。
7. 同樣以 PBS 沖洗 3 次，每次 5 分鐘。
8. 以螢光顯微鏡 (Axiovert 100, Zeiss) 進行觀察。

9. 將 CD31 的染色切片在 200 放大倍率下以 3 個不同視野 (three fields) 進行評估。新生血管區 (CD31 positive cells) 以 Image J 影像分析軟體計算 CD31 陽性區 (CD31 positive area) 佔全圖像區 (total image area) 的百分比。



### 3.1.2.8 血管密度和直徑之定量

為了定量血管密度，將 CD31 的染色切片在 200 放大倍率下以 3 個不同視野 (three fields) 進行評估。新生血管區 (CD31 positive cells) 以 Image J 影像分析軟體計算 CD31 陽性區 (CD31 positive area) 佔全圖像區 (total image area) 的百分比。血管形成管腔結構的數量和直徑以  $\alpha$ -SMA 之免疫組織切片進行計算，每一切片隨機選取三個視野，計算每平方釐米的血管數最後採平均值。

### 3.1.2.9 統計分析

本試驗之數據使用 SPSS version 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) 軟體進行分析，以 Student's t-test 測試實驗組和對照組之差異，數據表示為平均值  $\pm$  標準偏差 (Mean  $\pm$  SD)。所有測試均為雙尾，信賴區間為 95%。使用 Shapiro-Wilk 檢測數據的常態分布，使用 F-test 測試等方差 (equal variance)。若  $H_0$  被拒絕時，使用無母數統計中的 Mann-Whitney U 檢定法。當  $p < 0.05$  時定義兩者具有顯著差異。



### 3.1.3 結果與討論

#### 3.1.3.1 皮膚和皮下厚度之觀察

使用超音波掃描 (ultrasonography) 測量軟組織厚度，包括皮膚和皮下脂肪層的變化，觀察時間點分別為 EVE 處理前，EVE 處理剛結束後 (第 10 天和 21 天)，以及採樣前 (第 11 天和 22 天)。統計結果顯示，EVE 處理前以及採樣前的軟組織厚度並沒有顯著差異 ( $p > 0.01$ )。然而，若 EVE 處理結束後立即進行超音波檢查，則會發現相較於 EVE 處理前，軟組織厚度有顯著增加 ( $15.7 \pm 0.99$  mm vs.  $13.2 \pm 1.04$  mm，第 10 天； $15.9 \pm 1.02$  mm vs.  $13.24 \pm 0.99$  mm，第 21 天， $p < 0.01$ )，由此可得知經過 8 小時的外部負壓作用，軟組織厚度平均增加 19% (表 2)。此外，EVE 作用剛結束後會發現經過負壓處理的部位呈現局部性腫脹 (第 10 或 21 天)，此現象會在 EVE 作用停止後逐漸消失。此結果說明 EVE 引發軟組織的增厚屬於暫時性效應，即使經過 21 天負壓作用，軟組織厚度也沒有明顯改變。

表 2. 超音波測量軟組織厚度。

Table 2. Measurement of soft tissue thickness by ultrasonography.

	Average soft tissue thickness (mm)			<i>p</i> value	
	Pre-EVE	Immediate after EVE	Before sampling	Immediate vs. Pre-EVE	Before sampling vs. Pre-EVE
10 days (n=4)	$13.13 \pm 0.98$	$15.7 \pm 0.99$	$13.2 \pm 1.04$	<0.01	0.38
21 days (n=4)	$13.24 \pm 0.99$	$15.9 \pm 1.02$	$13.3 \pm 1.01$	<0.01	0.41



### 3.1.3.2 血管重塑之觀察

經由 H&E 染色進行組織型態的分析 (histomorphometrical analysis)，可以觀察到在 EVE 處理組當中，從第 10 天到第 21 天，管腔化 (lumenization) 逐漸形成，血管壁也逐漸增厚，進而形成穩定的血管網絡。此結果顯示 EVE 處理能有效促使血管重塑的過程 (圖 26)。

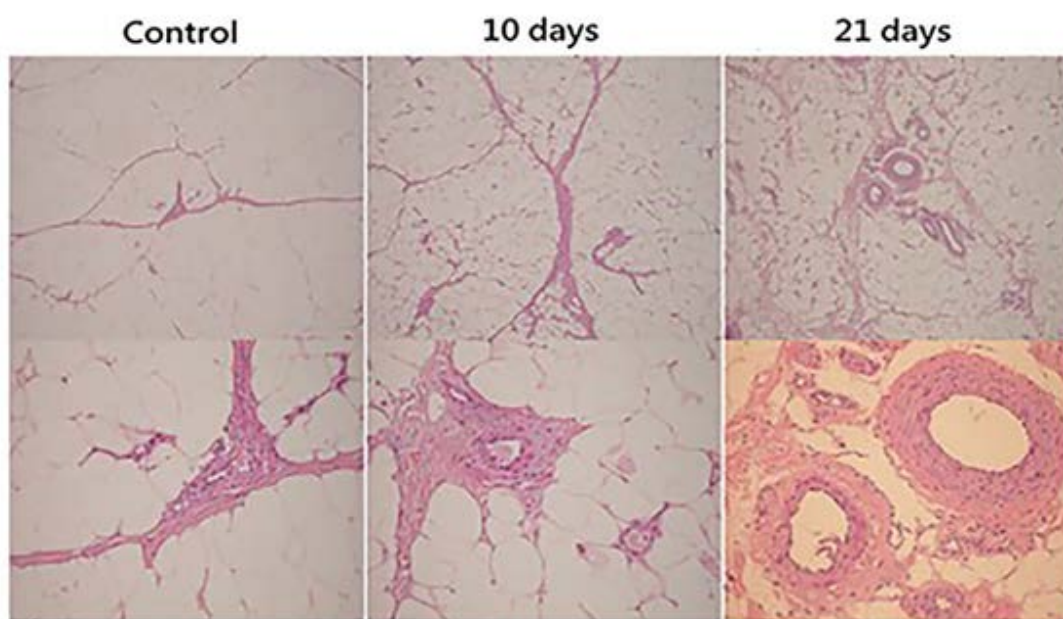


圖 26. 免疫組織染色觀察血管重塑。在 EVE 處理組中，皮下脂肪的血管網絡的穩定經由逐漸管腔化和血管壁的特化以維持結構上的穩定 (放大倍率；上圖：40 倍，下圖：200 倍)。

Figure 26. The vascular remodeling was examined by IHC. In EVE treated groups, the vascular networks in subcutaneous fat were stabilized by progressive lumenization and specialization of vessel wall (magnification; upper panel: 40X, lower panel: 200X).



### 3.1.3.3 脂肪細胞的數量和大小

從 2012 年 Heit 研究團隊以小鼠模式的實驗結果顯示，EVE 可增加皮下脂肪的厚度。然而，脂肪組織的擴增方式分為細胞體積的肥大 (hypertrophy) 和細胞數量的增加 (hyperplasia)，兩者在生理上具有不同的意義，前者為胞質中油脂的堆積，後者為幹細胞或前驅細胞之成脂分化 (adipogenic differentiation)，故本試驗使用 Adiposoft software 對皮下脂肪組織切片中的脂肪細胞大小和數量進行自動化處理和分析。經統計結果顯示，10 天和 21 天 EVE 處理組之皮下脂肪中的脂肪細胞大小和數量，相較於對照組，皆沒有顯著差異 ( $p > 0.05$ ) (圖 27)。

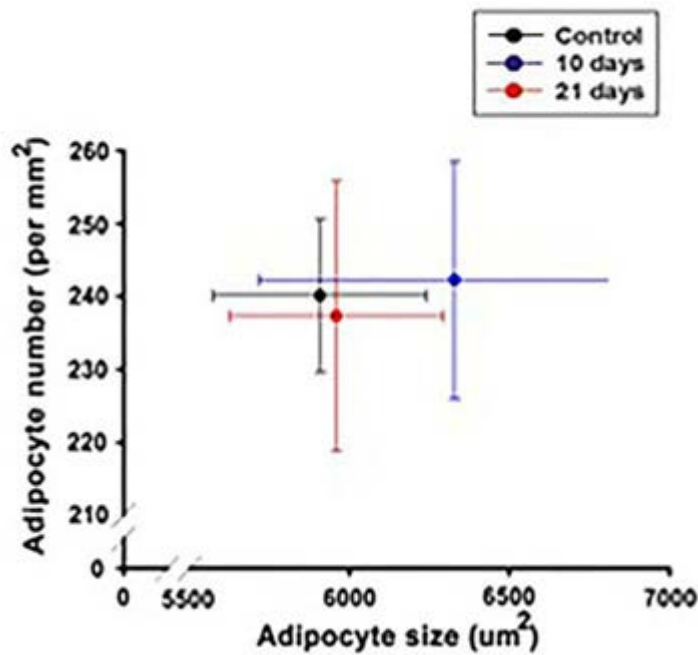


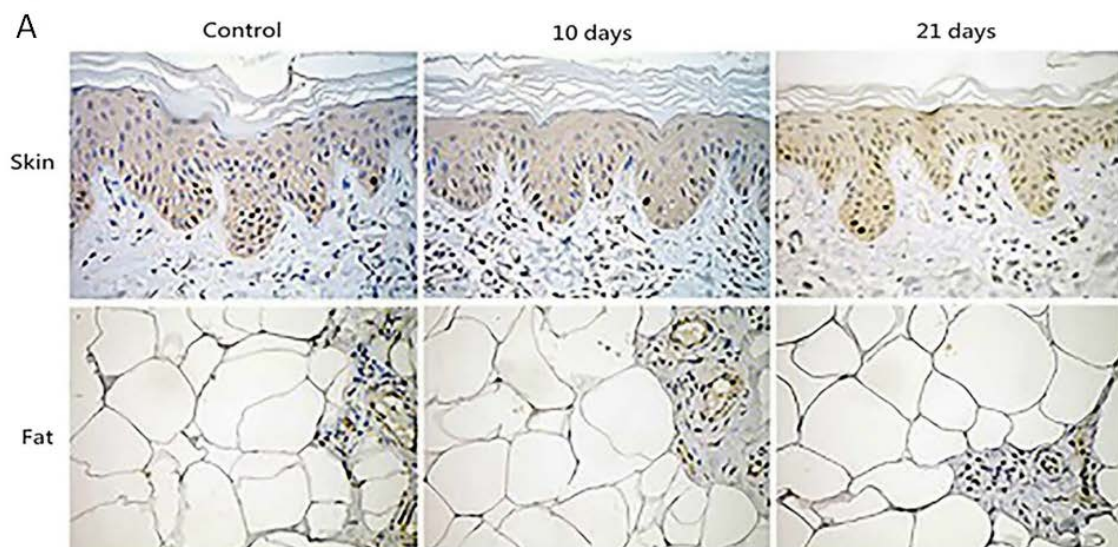
圖 27. 皮下脂肪中脂肪細胞大小對脂肪細胞數之標繪圖。

Figure 27. Plotting of adipocyte size versus adipocyte number in subcutaneous fat.

### 3.1.3.4 細胞增殖和表皮厚度之定量分析

Ki67 是一種與細胞增殖相關的核蛋白 (nuclear protein)，並與核糖體 RNA (ribosomal RNA, rRNA) 的轉錄有關，Ki67 的失活將對 rRNA 的合成造成抑制作用 (Bullwinkel *et al.*, 2006)。在細胞分裂間期 (interphase)，可在細胞核內專一偵測到 Ki67，而在有絲分裂中 (mitosis)，大部分 Ki67 蛋白會重新定位到染色體表面。Ki67 在細胞分裂週期中的 G1、S、G2 和 M phases 均有表現，但在細胞靜止期 G0 則不表現。Ki67 的表現與細胞增殖有緊密的關聯性，使其成為非常好的蛋白質標記，可設計專一性抗體與之結合，進而分析細胞的生長或增殖速率 (Rahmanzadeh *et al.*, 2007; Scholzen and Gerdes, 2000)。

本試驗採用 Ki67 為細胞增殖標記，對活細胞的細胞核進行染色，藉由 Ki67 免疫組織染色觀察基底角質細胞 (basal keratinocytes) 和脂肪細胞的增殖速率 (圖 28A)。另將表皮和皮下脂肪中呈現 Ki67 陽性反應的細胞進行鑑定和量化，經統計分析後可發現，EVE 處理組的軟組織在表皮和脂肪層中 Ki67 陽性細胞所佔的百分比相較於對照組雖然有稍微增加，然而並沒有統計上的差異性 ( $p > 0.05$ ) (圖 28B)。此外，Image J 測量表皮厚度之結果顯示，10 天和 21 天處理組和對照組之間的表皮厚度沒有顯著差異 ( $p > 0.05$ ) (圖 28C)。



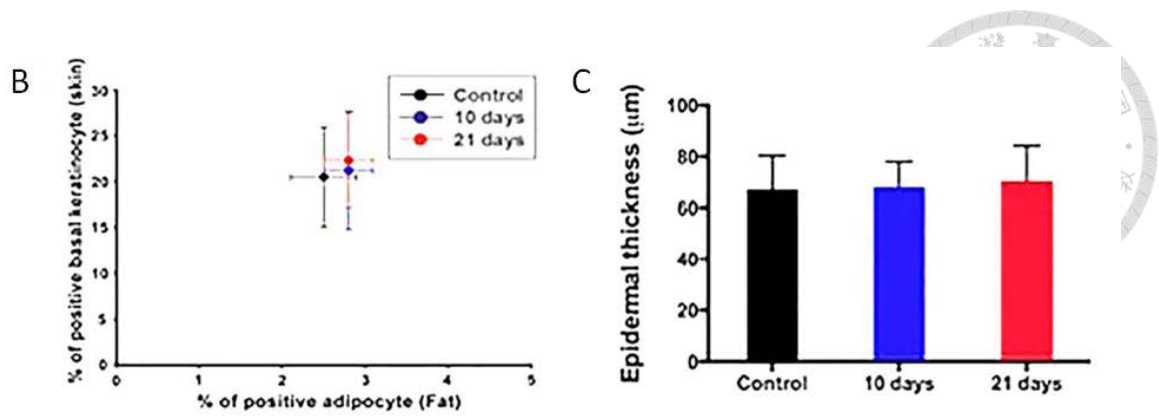


圖 28. 細胞增殖和表皮厚度之定量分析結果。(A) Ki67 免疫組織染色觀察基底角質細胞和脂肪細胞之細胞增殖 (放大率：200 倍)。(B) Ki67 所標記之基底角質細胞和脂肪細胞的百分比無顯著差異 ( $n = 6$  per group;  $*p < 0.05$ )。(C) 表皮厚度於所有組別之間無顯著差異。

Figure 28. The results of the quantitative analysis of cell proliferation and epidermal thickness. (A) Immunohistochemistry stain with Ki67 for cell proliferation in basal keratinocytes and adipocytes (magnification: 200X). (B) There was no difference in the percentage of basal keratinocytes and adipocytes labeled with Ki67 ( $n = 6$  per group;  $*p < 0.05$ ). (C) No difference in epidermal thickness across all groups.

### 3.1.3.5 血管密度之定量分析

血小板內皮細胞黏附分子-1 (platelet-endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1) 或稱 cluster of differentiation 31 (CD31)，是免疫球蛋白的超家族 (superfamily) 成員之一，分布於血小板、單核球 (monocytes)、嗜中性球 (neutrophils) 和某些類型之 T 細胞。CD31 為內皮細胞的細胞間連接 (intercellular junction) 主要構成蛋白，故高度表現於內皮細胞。此外，CD31 可維持血管壁的完整性，並涉及白血球穿越微血管壁 (leukocyte transmigration)，血管生成 (angiogenesis) 和整合素 (integrin) 的活化 (Baldwin *et al.*, 1994)。

本試驗使用 CD31 (PECAM-1) 對內皮細胞進行免疫螢光染色，進而進行血管密度之定量分析。結果發現 EVE 處理組 (10 日與 21 日) 相較對照組，於真皮和皮下脂肪可觀察到更多呈現 CD31 陽性細胞 (圖 29A)。另外統計結果顯示，10 天處理組於真皮和皮下脂肪的血管密度相較於對照組明顯增加 ( $p < 0.05$ )；此外，21 天處理組位於真皮和皮下脂肪的血管密度也明顯高於 10 天 EVE 處理組 ( $p < 0.05$ ) (圖 29B&C)。此結果說明，血管密度將隨著 EVE 的作用時間而逐漸增加。

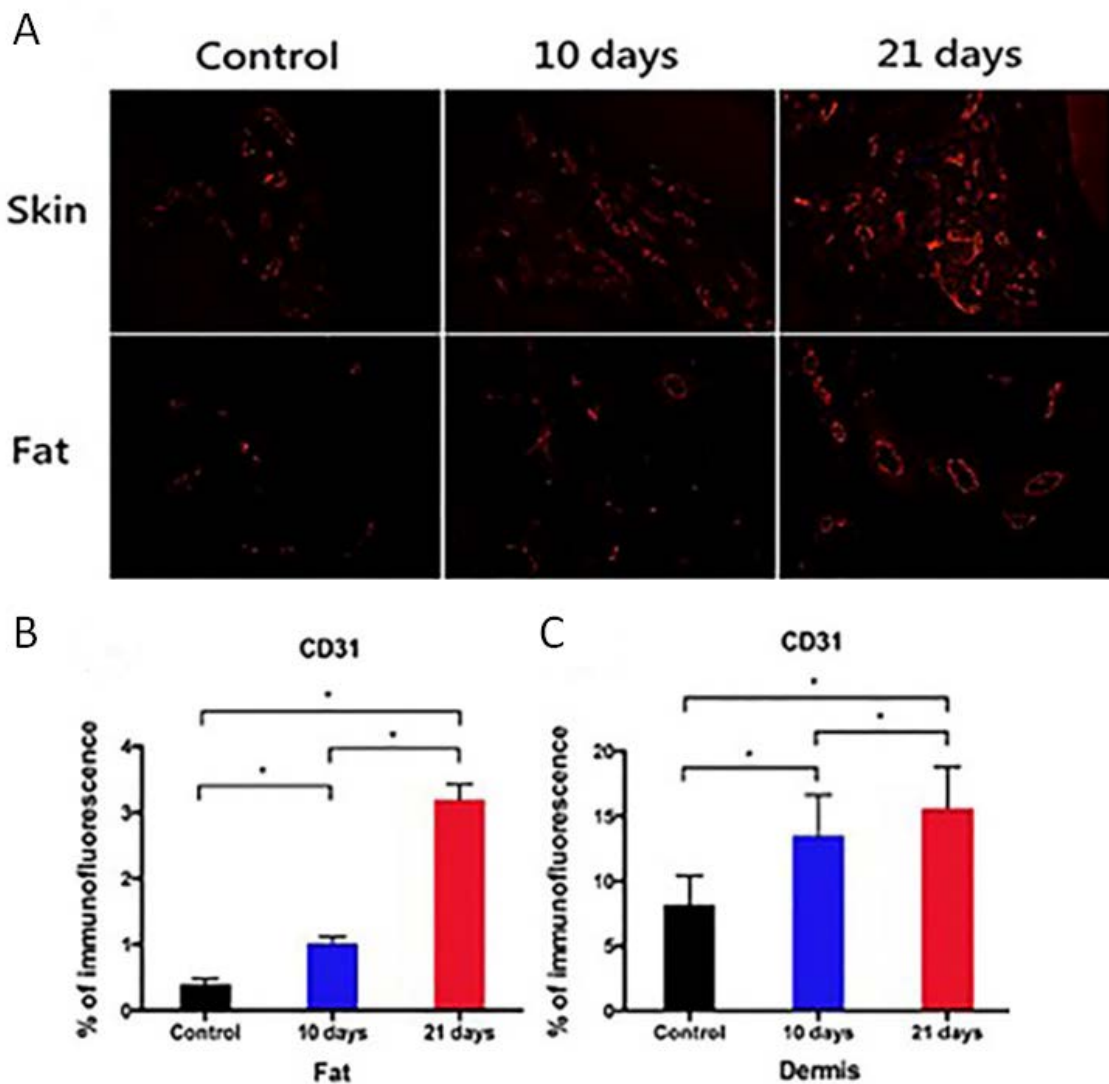


圖 29. 血管密度之定量分析結果。(A) PECAM-1 (CD31) 免疫螢光染色觀察真皮和皮下脂肪中的新血管形成 (放大倍數：200 倍)。(B, C) 在真皮和皮下脂肪中，EVE 處理組相較於對照組血管密度有明顯增加。

Figure 29. Quantitative analysis of blood vessel density. (A) Immunofluorescence stain with PECAM-1 (CD31) for neovascularization in dermis and subcutaneous fat (magnification: 200X). (B, C) In dermis and subcutaneous fat, the EVE-treated groups showed significant increases in calculated blood vessel density when compared with the control groups (n = 6 per group; \*p < 0.05).

### 3.1.3.6 功能性血管成熟之定量分析

除了血管密度之外，血管成熟可透過血管壁中平滑肌細胞與  $\alpha$ -SMA 的可染性 (stainable property) 來觀察。因為管壁具有平滑肌的血管被視為功能性成熟，其可以調節血管彈性 (vasoactivity) 和血管壁的重塑 (Park *et al.*, 2004)。本試驗利用平滑肌細胞具有表達高水平的收縮標記蛋白 (contractile marker proteins) 例如 smooth muscle  $\alpha$ -actin ( $\alpha$ -SMA) 之特性，進行免疫組織染色。結果如圖 30A 所示，可觀察到在 EVE 處理組中，具有平滑肌細胞之血管網絡形成明顯增加。具體而言，21 天 EVE 處理組每平方毫米大約有 16.8 個血管，而 10 天 EVE 處理組和對照組每平方毫米分別只發現 7.1 和 2.5 個血管 (圖 30B)。

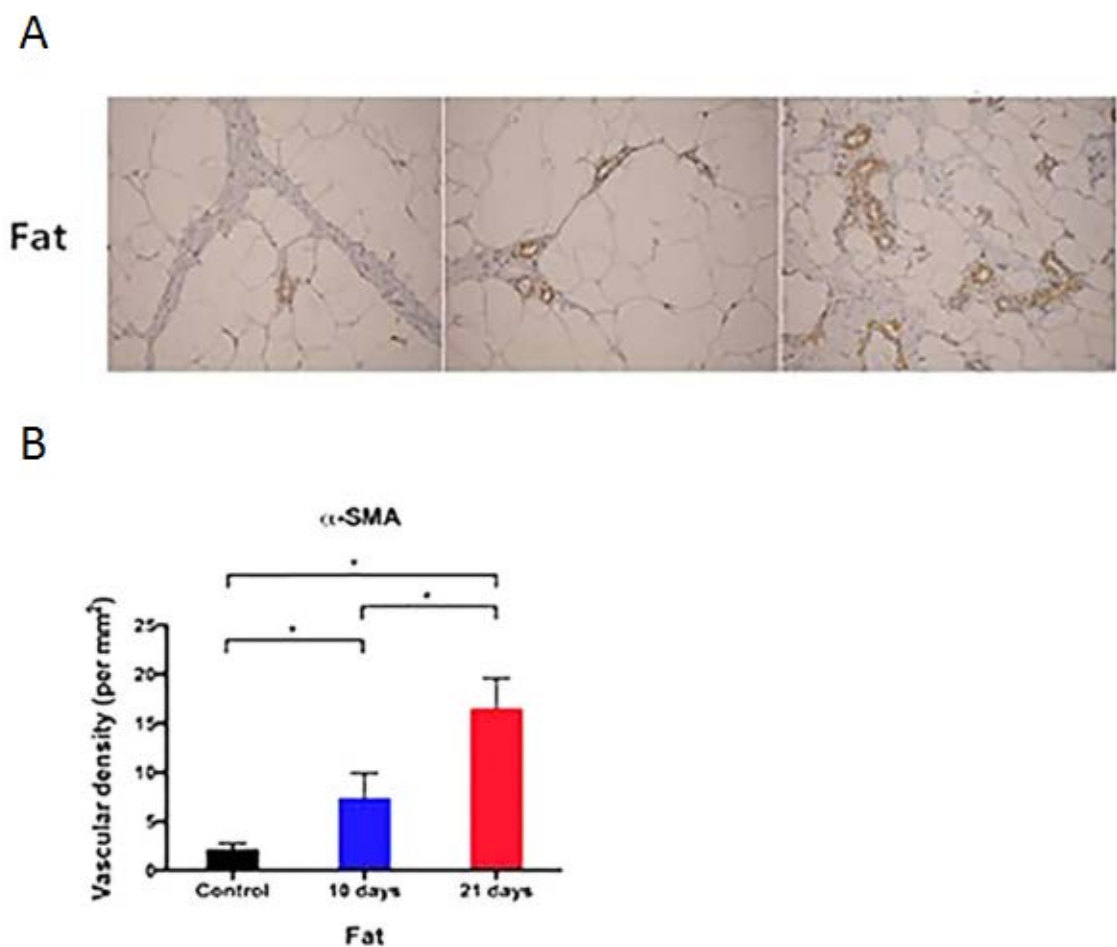


圖 30. 血管成熟之定量分析結果。(A)  $\alpha$ -SMA 免疫組織染色於皮下脂肪之血管網絡 (放大率：200 倍)。(B) EVE 處理組顯示出  $\alpha$ -SMA 標記之血管網絡明顯增加。

Figure 30. Quantitative analysis of vascular maturation. (A) Immunohistochemistry stain with  $\alpha$ -SMA for vascular networks in subcutaneous fat (magnification: 200X). (B) The EVE-treated groups demonstrated a significant increase in vascular networks layered with  $\alpha$ -SMA (n = 6 per group; \*p < 0.05).



## 3.2 外部體積擴張對脂肪幹細胞增殖、分化潛能及其細胞標記之探討

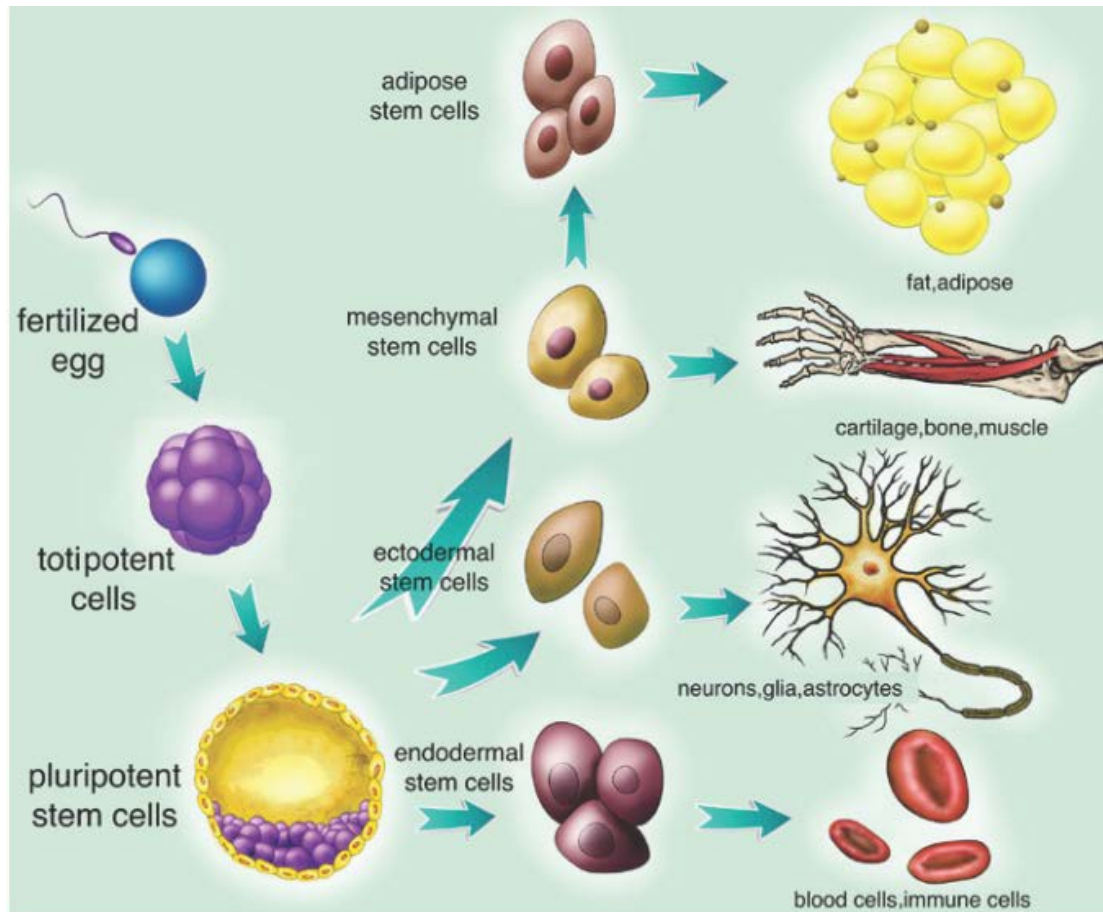
### 3.2.1 前言

脂肪幹細胞 (adipose stem cells, ASCs) 是存在脂肪組織中的成體幹細胞，屬於幹細胞的特定分支 (圖 31)，可視為存在脂肪組織中的間葉幹細胞 (MSCs)。ASCs 具有自我更新與複能性分化能力 (multi-potent differentiation capacity)，可輕易在生物體擴增，並可體外誘導分化為成骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、肌肉細胞、內皮細胞和神經細胞等，因此是自體細胞移植的理想細胞來源 (Wolbank *et al.*, 2007)。ASCs 可以促進血管生成，對於移植的脂肪組織存活相當重要，另外抽脂技術被廣泛用於整形手術中，使 ASCs 取得更為容易 (Huang *et al.*, 2016)。

ASCs 的表面標記 (surface markers) 與間葉幹細胞、血管外膜細胞 (pericytes) 以及平滑肌細胞有 90% 的相似度 (Traktuev *et al.*, 2008)。有研究指出人類的 ASCs 與骨髓間葉幹細胞 (BM-MSCs) 不同處在於 CD49d 僅表現於 ASCs，而 CD106 僅表現於 BM-MSCs (De Ugarte *et al.*, 2003; Zuk *et al.*, 2002)，而且 BM-MSCs 僅含有非常少量 (<1%) 的 CD34<sup>+</sup>細胞，這是與 ASCs 的唯一差異 (Yoshimura *et al.*, 2006)。此外，ASCs 會隨著培養時間或繼代次數 (passage number) 的增加而改變其表面標記，例如 CD11, CD14, CD34 和 C45 的表現水平會逐漸減少，反之 CD29, CD73, CD90 和 CD166 的表現水平會增加到第 2 代 (McIntosh *et al.*, 2006; Mitchell *et al.*, 2006)。ASCs 相較於 BM-MSCs 會表現較高水平的 CD117, HLA-DR 和 CD34 等成體幹細胞表面標記 (Hamid *et al.*, 2012; Reich *et al.*, 2012)。整體而言，大部分 ASCs 皆會表現 CD13, CD29, CD44, CD63, CD73, CD90 和 CD105 等間葉細胞標記 (mesenchymal markers)，而不表現 CD14, CD31, CD45 和 CD144 等造血細胞標記 (hematopoietic markers) (Tsuji *et al.*, 2014)。然而經體外培養後，ASCs 會顯著增加 CD105 的表現，但有將近一半的 ASCs 會在培養後 2 週失去 CD34 的表現 (Yoshimura *et al.*, 2006)。

先前研究顯示機械力對多種細胞類型之細胞表型，生長速率以及訊息傳遞的影響，並可誘導間葉幹細胞之硬骨分化和平滑肌分化 (Kurpinski *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2004)。然而，尚未對 EVE 作用後的組織所分離出的 SVF 其細胞組成，以及

ASCs 的增殖能力、分化潛能和細胞標記進行評估。因此，本試驗比較不同 EVE 處理時間 (10 日和 21 日)，對李宋豬脂肪幹細胞的增殖能力、脂肪分化潛能以及細胞表型進行定量分析。



(Huang *et al.*, 2016)

圖 31. 成體幹細胞不同類型的分支。

Figure 31. Branches of different types of adult stem cells.





### 3.2.2 材料與方法

#### 3.2.2.1 脂肪幹細胞分離、純化與培養

從李宋豬側腹部取出之皮下脂肪組織，先放入裝有 transport buffer (DMEM 內含 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 1.5  $\mu$ g/ml amphotericin B) 之燒杯中，再移至無菌操作台之中。首先將脂肪組織上的肌肉和結締組織去除，再以剪刀將組織剪成小碎塊後以 phosphate-buffer saline (PBS) 進行清洗。然後將脂肪組織放入含有 0.075% 膠原蛋白酶 (collagenase) 之 PBS 溶液中 (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)，於 37°C 進行震盪 30 分鐘。膠原蛋白酶分解過後之組織經過濾至離心管中，於室溫下以 800g 離心 10 分鐘，將懸浮於上層的成熟脂肪細胞和結締組織移除，而離心管底部的細胞團塊視為 stromal vascular fraction (SVF)，其中富含脂肪來源之幹細胞 (adipose-derived stem cells)。接著以 20 ml DMEM/F12 10% FBS 培養液將 SVF 細胞沖洗打散，再於室溫以 800g 離心 10 分鐘，重複清洗 2~3 次。將最後一次清洗的細胞混和液以 70 mm 濾網過濾到新的離心管內，並使總體積為 30 ml，進行細胞計數，每 10 cm 培養皿約  $5 \times 10^5$  個細胞，於 37°C 及 5% CO<sub>2</sub> 進行培養。利用 ASCs 具貼附特性，經培養 24 小時後去除未貼附細胞，可得到更豐富之 ASCs。本試驗細胞培養液使用 M-199 medium，內含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum), 100 UI penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 5  $\mu$ g/ml 肝素 (heparin) 和 2 ng/ml 酸性纖維母細胞生長因子 (acidic fibroblast growth factor)。初代細胞 (primary cells) 培養 7 天，並定義為 Passage 0 (P0)。每 3 天更換培養液，每週繼代細胞。經初代培養 7 天後，將附著的細胞以胰蛋白酶消化，並以 2000 cells/cm<sup>2</sup> 的密度培養於相同培養液中。

#### 3.2.2.2 倍增時間測量和細胞聚落形成分析

將純化的脂肪幹細胞培養於 6 well 培養皿，每個 well 含有 5000 個 ASCs，每 24 小時計數一次，連續進行 168 小時，每組進行三重複，所得之細胞數進行增殖曲線 (growth curve)。倍增時間 (doubling time, DT) 的計算是選取細胞在對數生長

期的一段時間 ( $t_2 - t_1, \Delta t$ )， $DT = (t_2 - t_1) \times \log 2 / \log(q_2 - q_1)$ ， $t_2 - t_1$  為細胞生長時間， $q_2$  為對數生長期任意點的細胞觀察值， $q_1$  為對數生長期細胞數初始值，計算細胞數增加一倍所需時間，並比較三組 (control, 10-day, 21-day treated groups) 的倍增時間。

細胞聚落形成分析 (colony-forming assay) 為檢測幹細胞增殖能力的另一方式，首先將初代 (P0) 之 ASCs 利用 6 well 培養皿以 5000 cell/well 培養 7 日。七天後將形成之細胞聚落進行 giesa stain (Gibco, 10092-013, USA)，每個聚落含有 20 個以上的細胞才列入計算。

### 3.2.2.3 脂肪幹細胞體外誘導脂肪分化之分析

將 ASCs 加入脂肪分化誘導培養液 (M-199 medium 內含 10  $\mu$ M dexamethasone, 0.25  $\mu$ M 3-isobutyl-1-methyl-xanthine, 4  $\mu$ M recombinant human insulin, 10  $\mu$ M troglitazone, 10% fetal calf serum)，每隔 3 天換一次誘導培養液，培養至 21 天進行油紅染色 (Oil-Red O stain)。染色前先將細胞以 PBS 清洗 2 次，加入含有 10% formalin 之 PBS 溶液中進行固定 1 小時，再用無菌蒸餾水清洗 3 次，然後加入 Oil-Red O 染劑 (0.6% Oil Red O dye in isopropanol : water = 3 : 2) 於室溫染色 1 小時，過量的染劑以無菌蒸餾水沖洗去除，並將染色細胞進行乾燥。染色的油滴以 isopropanol 含有 4% Nonidet P-40 進行溶解後，再以分光光度計波長 520 nm 進行定量分析。

### 3.2.2.4 流式細胞技術分析 (flow cytometry analysis)

本試驗以流式細胞儀鑑定 ASCs 之免疫細胞表現型。將培養中的 ASCs 培養液去除後，以 PBS 沖洗 3 次，加入 blocking solution (3% serum in PBS) 作用 30 分鐘。細胞以 trypsin-EDTA 懸浮後取下，將細胞懸浮液以 1200 rpm 離心 5 分鐘。吸去培養液後，以 washing buffer (49.5 ml PBS, 0.5 ml FBS) 清洗，取 10 ml washing buffer 使細胞團塊重新懸浮，再以 1200 rpm 離心 5 分鐘。將檢測欲使用之抗體 (BD

Biosciences) 與細胞混和 ( $1 \times 10^5$  cells/100  $\mu$ l)。檢測之抗體分別為 CD29-PE, CD44-PE, CD90-PE, CD105-PE 與 CD34-PE。將離心管以鋁箔紙包裹避光，置於 4°C 培養 30 分鐘。之後加入 500  $\mu$ l washing buffer 重新懸浮，以 2000 rpm 離心 5 分鐘，此步驟重複兩次。去除上清液後，將細胞團塊加入 500  $\mu$ l fixing buffer (48.1 ml PBS, 0.5 ml FBS, 1.35 ml formaldehyde) 懸浮後進行流式細胞儀分析 (FACSCalibur, BD Biosciences, San Jose, CA)。

另以多色流式細胞儀 (LSR II, BD Biosciences, San Jose, CA) 分析 SVF cells 之細胞組成。檢測之抗體分別為 anti-CD31-phycoerythrin, anti-CD34-phycoerythrin-Cy7, anti-CD45-fluorescein isothiocyanate (BD Biosciences, San Jose, Calif.)。根據表面標記表現圖譜之數據計算細胞組成百分比。



### 3.2.3 結果與討論

#### 3.2.3.1 脂肪幹細胞增殖能力分析

脂肪幹細胞的增殖能力會隨著繼代次數增加而逐漸下降 (Wall *et al.*, 2007)，故本試驗使用初代 (P0) ASCs 對其增殖能力進行定量分析。首先以平均倍增時間測量 ASCs 之增殖速率，統計結果顯示三組之間於倍增時間上並沒有顯著差異 (圖 32A)。另外以聚落形成分析 ASCs 之增殖能力，統計結果也顯示 EVE 處理組與對照之間並無顯著差異 (圖 32B)。此結果表示 ASCs 增殖能力並不會受到外部施加之機械力所影響，而且與作用時間無關。

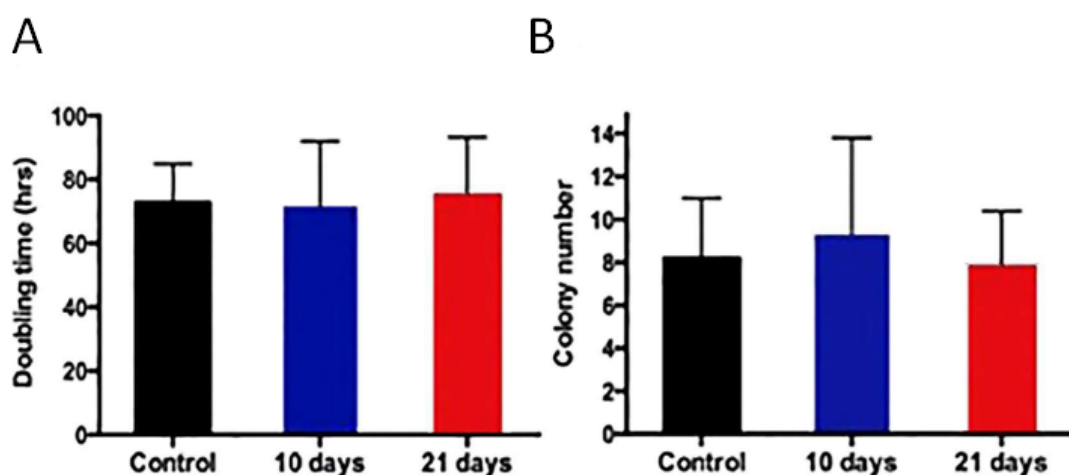


圖 32. EVE 處理組與對照組中脂肪幹細胞增殖能力分析。(A) 初代脂肪幹細胞之倍增時間於各組中並沒有觀察到明顯差異。(B) 每組 5000 個脂肪幹細胞於初始培養後所形成的聚落數。

Figure 32. Proliferation capacity of adipose stem cells (ASCs) from control and EVE treated groups. (A) Doubling time of P0 ASCs. No difference was noted across all groups. (B) Number of colonies formed after 7 days of culture at initial plating of 5000 ASCs for each group.

### 3.2.3.2 脂肪幹細胞成脂分化潛能分析

通常成熟的脂肪細胞已不具有增殖能力，因此脂肪細胞數的增加一般認為是從脂肪幹細胞或前驅細胞所分化而來 (Kajita *et al.*, 2012)。而最近研究發現 EVE 作用於小鼠背部表皮每天 2 小時連續 5 天後可明顯增加皮下組織的脂肪細胞數量 (Lujan-Hernandez *et al.*, 2016)。本試驗將 EVE 作用後的組織所分離出的 ASCs 進行體外脂肪分化誘導 21 天後，以 Oil-red O stain 對 ASCs 脂肪分化潛能進行定量分析。結果顯示，儘管分化水平在每組之間各有差異，但經過統計之後三組之間呈現 Oil-red O 陽性的細胞所占百分比並沒有顯著差異 (圖 33)。

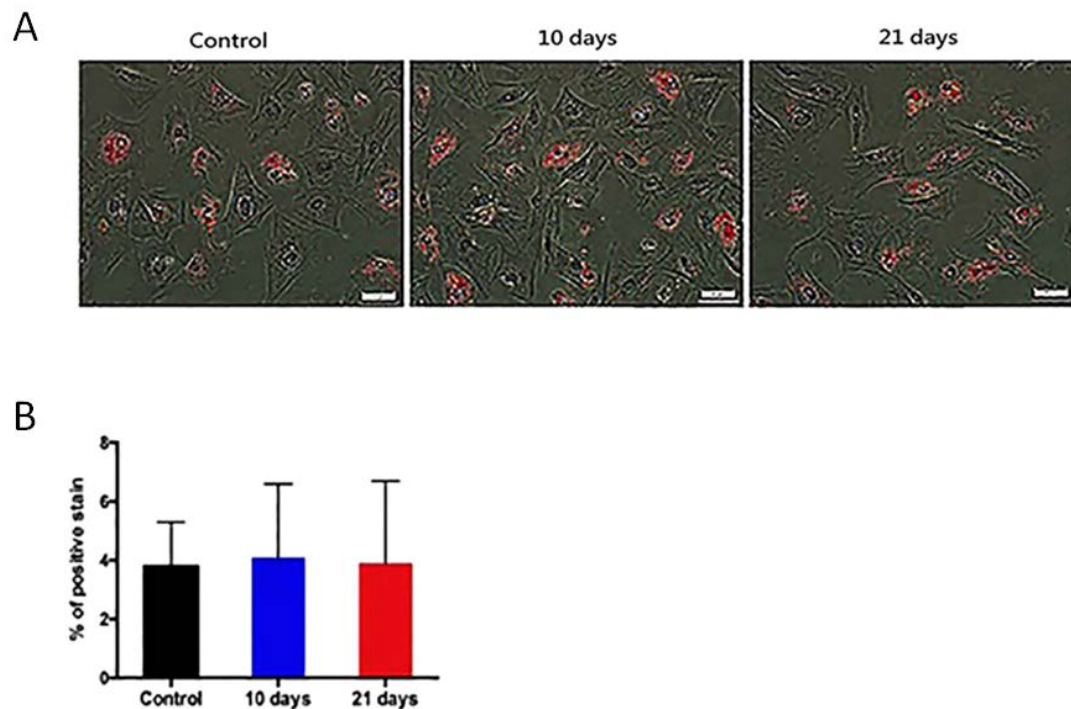


圖 33. EVE 處理組與對照組中脂肪幹細胞分化潛能分析。

Figure 33. Analysis of differentiation potentials of adipose stem cells from control and EVE treated group.

### 3.2.3.3 脂肪幹細胞表面分子標記

本試驗透過流式細胞技術分析 ASCs 之表面抗原，儘管目前用於 ASCs 之專一性表面抗原仍然有待闡明，並且沒有從脂肪組織中分離 ASCs 的有效方法，故取得純 ASCs 對科學家而言仍是一個挑戰 (Huang *et al.*, 2016)。因此使用多種表面抗原之組合來鑑定細胞的特性，結果顯示 ASCs 於 CD29, CD44, CD90 和 CD105 皆會表現，但不表現 CD34 (圖 34)。CD29 ( $\beta$ 1-integrin) 為細胞膜受體，與細胞貼附有關，並涉及胚胎發育、凝血、免疫反應和組織修復等訊息傳遞 (Hynes, 1992)；CD44 為細胞表面之糖蛋白，可與透明質酸 (hyaluronate)、骨調素 (osteopontin)、膠原蛋白和 MMPs 交互作用進而參與細胞黏附和遷移 (Goodison *et al.*, 1999)；CD90 (thymus cell antigen-1, Thy-1) 最早發現於小鼠胸腺細胞 (Ades *et al.*, 1980)，除表現於胸腺細胞和 T 淋巴球，另有許多幹細胞也會表現此抗原，例如間葉幹細胞、造血幹細胞和角質幹細胞等 (Kisselbach *et al.*, 2009)；CD105 (endoglin) 為 TGF- $\beta$  受體組成之一，在心血管系統的發育和血管重塑中具有作用，另參與細胞骨架組成進而影響細胞型態和遷移 (Sanz-Rodriguez *et al.*, 2004)；CD34 則常表現於血液和骨髓來源之前驅細胞，例如造血幹細胞和內皮前驅細胞等 (Sidney *et al.*, 2014)。從圖中可觀察到 ASCs 的代表性表型分析顯示，ASCs phenotype 的同質性以及 surface marker 的表現模式非常相似。另一方面，從每組分離的 ASCs 顯示與間葉幹細胞具有共同的 phenotype，而且和 EVE 作用時間無關。也就是說，無論處理時間長短，ASCs 同樣表現 CD29, CD44, CD90 和 CD105 等間葉細胞的 markers，而缺少 CD34 造血細胞 marker 的表現 (圖 34)。根據 Pittenger 研究團隊於 1999 年發表之文獻中表示，人類 MSCs 的特徵在於其表面上存在特定標記蛋白，包括 CD29, CD44, CD71, CD90 和 CD105，以及缺乏白血球和造血細胞之標記蛋白，包括 CD14, CD34 和 CD45 (Pittenger *et al.*, 1999)。說明李宋豬 ASCs 與人類 MSCs 所表現之標記蛋白非常相似。

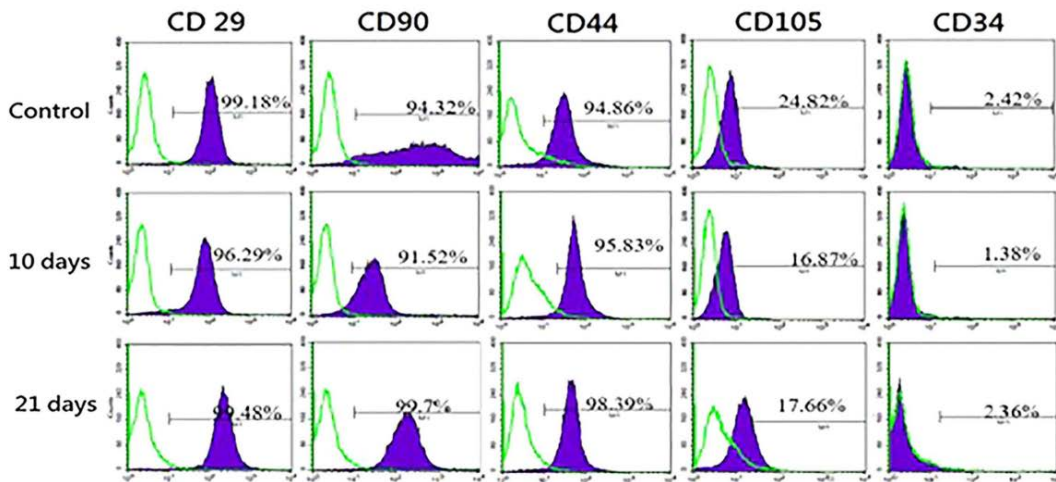
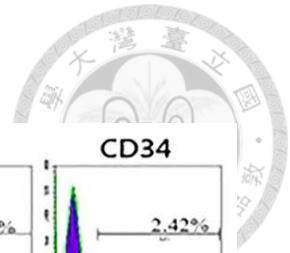



圖 34. 流式細胞技術分析脂肪幹細胞之表面標記。脂肪幹細胞的免疫表型顯示每組表面標記的表現模式非常相似。流式細胞儀分析顯示 CD29, CD44, CD90 和 CD105 的表現處於高水平，CD34 的表現處於較低水平。

Figure 34. Flow cytometry analysis of surface marker expression of ASCs. Immunophenotype of adipose stem cells (ASCs) of each group revealed very similar expression patterns of surface markers. Flow cytometry analysis showed the expression of CD29, CD44, CD90, and CD105 were at high levels and the expression of CD34 was at a lower level.

### 3.2.3.4 基質血管細胞之細胞組成

將脂肪組織以 collagenase 分解後並經由離心去除成熟脂肪細胞與結締組織，最後沉澱在離心管底部的細胞團塊視為基質血管細胞 (SVF cells)。SVF 由許多異質細胞群組成，包括脂肪和造血幹細胞及其前驅細胞、內皮細胞、紅血球、纖維母細胞、淋巴細胞、血管外膜細胞、單核球與巨噬細胞等 (Cawthorn *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2010)。本試驗使用多色流式細胞儀分析 SVF 之細胞組成，首先分為 CD34<sup>+</sup> & CD45<sup>+</sup> 血液來源細胞與 CD34<sup>-</sup> & CD45<sup>-</sup> 脂肪來源細胞，後者進一步分為 CD31<sup>+</sup>



& CD34<sup>+</sup> 內皮細胞, CD31<sup>-</sup> & CD34<sup>+</sup> 脂肪幹細胞, CD31<sup>-</sup> & CD34<sup>-</sup> 其它細胞 (纖維母細胞、壁細胞和血管外膜細胞等) (圖 35A)。CD45 為白血球之共同抗原, CD31 (PECAM-1) 大量表現於內皮細胞。CD34 主要表現於造血幹細胞及其前驅細胞, 但已有許多研究表明 CD34 同樣表現於其它類型細胞, 例如間葉細胞、間質樹突狀細胞 (interstitial dendritic cells)、角質細胞及內皮前驅細胞等 (Lin *et al.*, 2012; Nielsen and McNagny, 2008)。此外 CD34 也會表現於某些幹細胞, 但會因體外培養而逐漸失去其表現 (Cawthorn *et al.*, 2012; Sidney *et al.*, 2014)。

比較 EVE 處理對各類型細胞於 SVF 占有百分比之影響; 蓋統計結果顯示三組之間 ASCs 比例並沒有明顯差異 (對照組:  $5.0 \pm 1.9\%$ , 10 天處理組:  $5.6 \pm 2.5\%$ , 21 天處理組:  $4.8 \pm 2.3\%$ ) ( $p > 0.05$ )。相反地, EVE 處理組當中的內皮細胞所占百分比會隨著作作用時間延長明顯增加 (對照組:  $8.1 \pm 1.9\%$ , 10 天處理組:  $15.2 \pm 3.0\%$ , 21 天處理組:  $20.3 \pm 3.8\%$ ) (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ) (圖 35B)。

另外計算各組中每克脂肪所含 SVF 細胞和 ASCs 的數量, 統計結果顯示三組之間基質血管細胞和脂肪幹細胞的總數沒有顯著的差異 (圖 35C)。



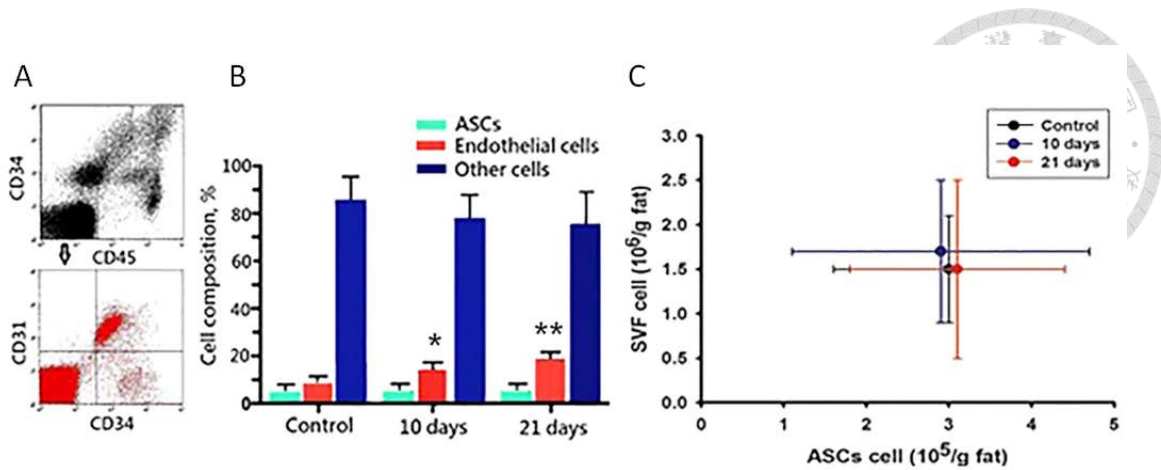


圖 35. 多色流式細胞儀分析基質血管細胞之細胞組成。(A) 使用多色流式細胞儀分析 SVF 細胞之代表性繪圖數據。(B) 各組間 ASCs 的比例無差異，而 EVE 處理組中內皮細胞的百分比與對照組相比有顯著增加（每組樣本數=6；\* $p < 0.05$  相較於對照組，\*\* $p < 0.01$  相較於對照組， $p < 0.05$  相較於 10 天處理組）。(C) 脂肪幹細胞和基質血管細胞的總數並沒有觀察到明顯差異。

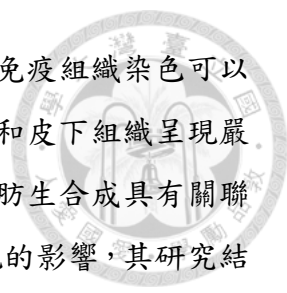
Figure 36. Multicolor flow cytometric analysis was performed to determine cell compositions of SVF cells. (A) Representative plotted data of SVF cells using multicolor flow cytometry analysis. (B) No difference in the ratio of ASCs across the groups, whereas the percentage of endothelial cells of EVE treated groups significantly increased when compared to the control group ( $n=6$  per group; \* $p < 0.05$  vs. control, \*\* $p < 0.01$  vs. control, and  $p < 0.05$  vs. 10-day treated groups). (C) No significant difference was noted in the total number of ASCs and stromal vascular fraction cells.

## 第四章 綜合討論

2013 年，Lancerotto 研究團隊表示 EVE 會引發組織暫時性缺氧，並激活 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 分子路徑，進而誘導血管生成 (Lancerotto *et al.*, 2013)，因此通過機械力調控血管分布可創造新穎之組織及細胞移植策略。相較於單向伸拉之機械刺激，EVE 可施予立體性之機械力包括吸力、拉力、壓力和剪力等，以更好達成移植部位之預先處理效果 (Heit *et al.*, 2012)。為證實 EVE 可用於改善自體脂肪移植之長期存留容積和細胞存活，本試驗參考 Heit 研究團隊於 2012 年所發表之試驗成果，設計李宋豬動物模式，並以每天相同 8 小時之時間間隔，使用負壓 50 mmHg 作用至 10 日或 21 日，期望能更好地瞭解 EVE 對於移植部位表皮和皮下組織所產生的效應。

首先以超音波測量各組的軟組織厚度，在經過 8 小時 EVE 作用後，平均軟組織厚度可增加 19%，然而此增厚現象在 EVE 終止後的 16 小時內逐漸消失，此時使用超音波測量並經過統計會發現軟組織厚度與 EVE 處理前相比並沒有顯著增加 ( $p > 0.05$ )。此結果說明，至少在 21 日的實驗過程之內，EVE 誘導軟組織擴增是一種快速、自我可逆和瞬時過程。在一般組織擴增期間，表皮厚度的增加主要是由於連續以及慢性拉伸力誘導生物組織緩慢之蠕變，而 EVE 對完整皮膚之機械效應則更為快速且短暫；其中軟組織者變化，則於擴張過程停止後將隨時間之進展而返回到擴張前之狀態。

另以免疫組織染色證實 EVE 具有刺激血管生成和血管重塑的潛能，但是對細胞增殖以及脂肪生成並沒有顯著性的影響；推測其可能原因為，真皮和皮下脂肪中的血管網絡對外部施加的機械力相較於基質細胞例如角質細胞和脂肪細胞更為敏感。在小鼠模式中，其皮膚比人或豬的皮膚更鬆弛和柔軟，因此較短的處理過程可能對潛在的脂肪生成會有更深遠的影響。另有學者認為，負壓作用於小鼠背部表皮容易使 suction cups 吸引更多周圍皮膚組織進入其內，導致組織體積加倍 (Swanson, 2014)。因此 EVE 連續 28 天是否真能誘導新組織的形成，或僅是組織體積膨脹尚須更嚴謹之研究。此外，脂肪組織因應外部機械力刺激的可擴展性 (expandability) 在本試驗中並沒有得到證實；相較於小鼠模式得到的實驗數據顯示，EVE 2 小時



後，從外觀可以用肉眼觀察到作用部位呈現局部性腫脹，並且以免疫組織染色可以明顯觀察到 EVE 剛結束時，以及結束後 1 小時，真皮組織深層和皮下組織呈現嚴重水腫的現象 (Lancerotto *et al.*, 2013)。在臨床上淋巴水腫和脂肪生合成具有關聯性，有研究以小鼠尾部探討淋巴液滯留對脂肪分化相關基因表現的影響，其研究結果顯示淋巴液的滯留於時間和空間上，都會對脂肪分化因子包括 CEBP- $\alpha$ 、PPAR- $\gamma$  和 adiponectin 進行調節 (Aschen *et al.*, 2012)。由此可推測 EVE 於小鼠模式所引發的局部性水腫間接調節脂肪的生合成。然而，淋巴水腫屬於一種慢性疾病，其所導致脂肪細胞的擴增於病理生理學上似乎與負壓作用的急性效應不盡相同。因此有學者認為，組織水腫只是負壓處理期間的一個暫時性階段，可能與脂肪細胞數的增加無關 (Gigliofiorito *et al.*, 2013)。

成熟的脂肪細胞通常已失去增殖能力，因此有學者認為脂肪生成是一種經由脂肪幹細胞或前驅細胞所分化，並且需要與血管和細胞外微環境緊密相互作用的過程 (Kajita *et al.*, 2012)。另有許多研究表示外部機械力刺激可調節幹細胞或其它細胞之結構和功能；細胞可將感測到的物理訊號傳遞到本身或其它細胞內部，並將其轉換為生物化學訊號進而調節細胞之遷移、分化和增殖 (Discher *et al.*, 2009; Engler *et al.*, 2004; Janmey and McCulloch, 2007; Yeung *et al.*, 2005)。本試驗將分離純化後的脂肪幹細胞透過倍增時間和聚落形成進行增殖能力檢測以及體外誘導脂肪分化，結果顯示在實驗過程中的 10 天或 21 天之內，EVE 對於脂肪幹細胞的增殖能力和脂肪分化潛能相較於對照組都沒有顯著的影響 ( $p > 0.05$ )；相較於小鼠模式，EVE 連續 28 天卻可明顯增加皮下組織的脂肪細胞數 (Heit *et al.*, 2012)。

細胞所處之微環境將決定幹細胞之分化命運，包括可溶性因子、細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) 以及相鄰細胞之間的相互協調作用，提供細胞能夠增殖、存活、遷移或分化的生化和機械訊號 (Li *et al.*, 2011)。可溶性因子包括 TGF- $\beta$ 、PDGF 和 FGF 參與調節 MSCs 分化之訊息路徑 (Ng *et al.*, 2008)。ECM 之物理性質，包括剛度 (stiffness) 和構型 (topography)，對 MSCs 自我更新和分化命運之調控具有關鍵作用；例如具有高剛度之 ECM 環境可誘導 MSCs 之成骨分化，反之低剛度誘導脂肪分化 (Engler *et al.*, 2006; Huebsch *et al.*, 2010)。ECM 之構型若使 MSCs

呈現粘附、扁平和延展之型態將進行成骨分化，而未延展且呈現圓型之 MSCs 將分化為脂肪細胞 (McBeath *et al.*, 2004)。透過上述研究結果推測，在小鼠皮下組織中其 ECM 的物理性質則更有利於 ASCs 之往脂肪細胞進行分化；惟就李宋豬皮下組織之 ECM 物理性質而言，其是否有利於成骨細胞分化，則尚需更進一步釐清之。

綜觀上述試驗結果，在 EVE 處理組中比較第 10 天至第 21 天，有明顯的證據顯示，隨著 EVE 時間之進行，皮下組織中血管生成、管腔形成及其成熟的穩定發展等分別有伴隨著血管壁肌層之發展而增厚，說明 EVE 對於自體脂肪移植之應用潛能，主要是透過生物體內作用，調節血管網絡形成、生長以及其功能化血管之成熟，從而可以提供適合脂肪組織生存環境之預先處理效果。

## 第五章 結論

本試驗結果證實 EVE 的主要作用機制在於生物體內可調節皮下脂肪組織中的血管分布、重塑以及功能性血管的成熟。在 EVE 處理組中比較第 10 天至第 21 天，有明顯的證據證實，隨著 EVE 處理的進行，血管網絡之穩定生成伴隨著血管平滑肌細胞的增加、管腔逐漸形成以及血管壁逐漸增厚。此結果與多色流式細胞儀分析基質血管細胞之細胞組成的結果相一致，其中 EVE 處理組並且含有顯著較高百分比的內皮細胞。由此可以推測，負壓處理在小鼠模式可協助傷口癒合可能經由相同之作用機制。此外，在面對外部施加的負壓時，真皮和皮下脂肪組織中的血管生長、成熟以及功能性血管的形成，具有時間之依賴性。因此，EVE 的時間長度顯然是值得額外關注的參數，其可能影響臨床上在移植前後的使用。

## 第六章 未來展望

以往豐胸手術大多採用人工材質之填料例如矽膠或鹽水袋，隨著抽脂技術的發展以及脂肪組織中幹細胞分離技術的成熟，自體脂肪移植已廣泛用於軟組織重建和擴增。然而，脂肪細胞對缺血非常敏感，因此受體組織的微環境包括血管分布和氧氣供應，成為長期移植存留容積之關鍵因素。為此科學家透過移植組織優化例如 CAL 和 PRP 等方式，期望在移植階段早期促進血管網絡形成，除了提供細胞生存充足之氧氣，並作為細胞生長之生物骨架，進而提高脂肪移植之存活率。但是基於安全性和功效之考量，迄今於臨床應用仍受限制。

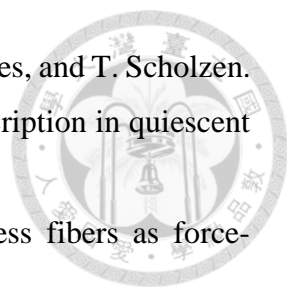
隨著力學生物學之研究日漸成熟和深入理解，目前已刺激轉譯性研究 (translational research) 將基礎研究成果和臨床實踐應用之間建立緊密結合，並允許臨床設備的開發和改良以使用機械力治療疾病，其中非侵入性組織擴張裝置近年來於整形手術中越來越受到歡迎，通過施加到皮膚上的真空吸力可增加皮下組織間隙以及血管分布。由於 EVE 的預先處理效果已經在李宋豬模式中得到證實，此結果可以輕易地轉化為臨床實踐上，用以提高細胞和組織的移植存活率，並協助臨床醫生在移植手術前優化受體部位的血管分布，進一步改善脂肪移植物的存活。未來的研究必須要釐清更長的外部擴張時間，在與人類相似的皮膚，例如小型豬模式中，是否真能誘導脂肪形成；另外，移植的脂肪除了在有更好血管供應的受體組織的行為觀察外，其對 EVE 可能產生的反應也需要進一步探討。

目前在臨床實踐中已將 EVE 作為自體脂肪移植豐胸之輔助技術，用以提升手術結果之成效和滿意度。此外，最近於小鼠模式之研究結果表示，EVE 及其誘發之水腫和發炎反應，可促進脂肪細胞的生合成，然而相關之分子作用機制尚需進一步釐清和證實。期望有朝一日 EVE 在自體脂肪移植之臨床應用上，不僅可用於脂肪移植前刺激血管的生成，於移植後也可用以提升幹細胞和前驅細胞往脂肪細胞分化的潛能。

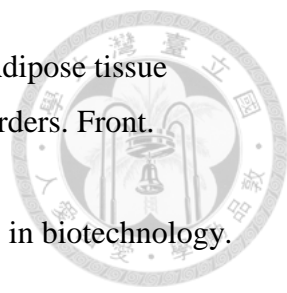
## REFERENCES

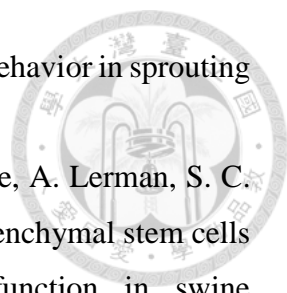


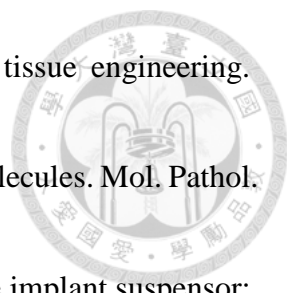
- 許世昌。2008。解剖生理學 (二版)。台北市：永大書局有限公司。
- Albright, A.L., and Stern, J.S. 1998. Adipose tissue. In: *Encyclopedia of Sports Medicine and Science*, T.D.Fahey (Editor). Internet Society for Sport Science: <http://sportsoci.org>.
- Elaine N. Marieb. 2009. *Essentials of human anatomy and physiology* (9th ed.). San Francisco: Pearson Benjamin Cummings Publishing.
- Illouz, Y. G., and Sterodimas A. 2011. *Adipose stem cells and regenerative medicine*. Verlag Berlin Heidelberg: Springer.
- Ades, E. W., R. K. Zwerner, R. T. Acton, and C. M. Balch. 1980. Isolation and partial characterization of the human homologue of Thy-1. *J. Exp. Med.* 151 (2): 400-406.
- Aigner, B., S. Renner, B. Kessler, N. Klymiuk, M. Kurome, A. Wunsch, and E. Wolf. 2010. Transgenic pigs as models for translational biomedical research. *J. Mol. Med. (Berl)* 88: 653-664.
- Argenta, L. C., and M. J. Morykwas. 1997. Vacuum-assisted closure: a new method for wound control and treatment: clinical experience. *Ann. Plast. Surg.* 38: 563-577.
- Arnsdorf, E. J., P. Tummala, R. Y. Kwon, and C. R. Jacobs. 2009. Mechanically induced osteogenic differentiation--the role of RhoA, ROCKII and cytoskeletal dynamics. *J. Cell. Sci.* 122: 546-553.
- Aschen, S., J. C. Zampell, S. Elhadad, E. Weitman, M. De Brot, and B. J. Mehrara. 2012. Regulation of adipogenesis by lymphatic fluid stasis: part II. Expression of adipose differentiation genes. *Plast. Reconstr. Surg.* 129: 838-847.
- Baldwin, H. S., H. M. Shen, H. C. Yan, H. M. DeLisser, A. Chung, C. Mickanin, T. Trask, N. E. Kirschbaum, P. J. Newman, S. M. Albelda, and C. A. Buck. 1994. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31): alternatively spliced, functionally distinct isoforms expressed during mammalian cardiovascular development. *Development* 120: 2539-2553.
- Brucker, M., S. Sati, A. Spangenberg, and J. Weinzeig. 2008. Long-term fate of transplanted autologous fat in a novel rabbit facial model. *Plast. Reconstr. Surg.* 122: 749-754.

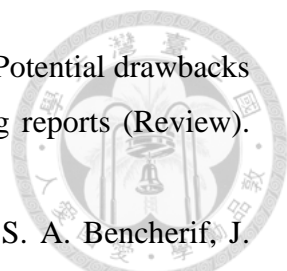
- 
- Bullwinkel, J., B. Baron-Luhr, A. Ludemann, C. Wohlenberg, J. Gerdes, and T. Scholzen. 2006. Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J. Cell. Physiol.* 206: 624-635.
- BurrIDGE, K., and E. S. Wittchen. 2013. The tension mounts: stress fibers as force-generating mechanotransducers. *J. Cell. Biol.* 200: 9-19.
- Buxboim, A., I. L. Ivanovska, and D. E. Discher. 2010. Matrix elasticity, cytoskeletal forces and physics of the nucleus: how deeply do cells 'feel' outside and in? *J. Cell. Sci.* 123: 297-308.
- Cawthorn, W. P., E. L. Scheller, and O. A. MacDougald. 2012. Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future. *J. Lipid. Res.* 53: 227-246.
- Chen, C. S., M. Mrksich, S. Huang, G. M. Whitesides, and D. E. Ingber. 1997. Geometric control of cell life and death. *Science* 276: 1425-1428.
- Chen, C. S., J. Tan, and J. Tien. 2004. Mechanotransduction at cell-matrix and cell-cell contacts. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 6: 275-302.
- Cheng, M., X. Guan, H. Li, X. Cui, X. Zhang, X. Li, X. Jing, H. Wu, and E. Avsar. 2013. Shear stress regulates late EPC differentiation via mechanosensitive molecule-mediated cytoskeletal rearrangement. *Plos One* 8: e67675.
- Cherubino, M., and K. G. Marra. 2009. Adipose-derived stem cells for soft tissue reconstruction. *Regen. Med.* 4: 109-117.
- Chien, S. 2007. Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 292: 1209-1224.
- Chien, M. S., M. Y. Bien, C. C. Ku, Y. C. Chang, H. Y. Pao, Y. L. Yang, M. Hsiao, C. L. Chen, and J. H. Ho. 2012. Systemic human orbital fat-derived stem/stromal cell transplantation ameliorates acute inflammation in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Crit. Care. Med.* 40: 1245-1253.
- Chin, M. S., R. Ogawa, L. Lancerotto, G. Pietramaggiori, K. T. Schomacker, J. C. Mathews, S. S. Scherer, P. V. Duyn, M. J. Prsa, M. P. Ottensmeyer, A. Veves, and D. P. Orgill. 2010. In vivo acceleration of skin growth using a servo-controlled stretching device. *Tissue. Eng. Part. C. Methods* 16: 397-405

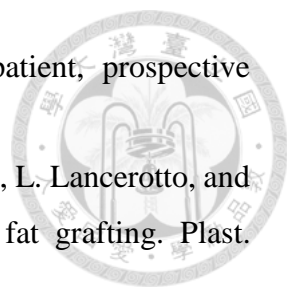


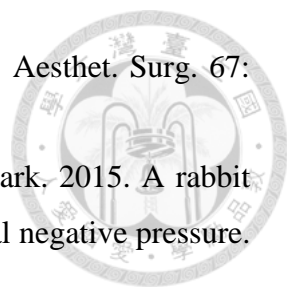
- 
- Choe, S. S., J. Y. Huh, I. J. Hwang, J. I. Kim, and J. B. Kim. 2016. Adipose tissue remodeling: its role in energy metabolism and metabolic disorders. *Front. Endocrinol.* 7: 30.
- Curtis, A., and C. Wilkinson. 2001. Nanotechnology and approaches in biotechnology. *Trends Biotechnol.* 19: 97-101.
- Dalby, M. J., N. Gadegaard, R. Tare, A. Andar, M. O. Riehle, P. Herzyk, C. D. Wilkinson, and R. O. Oreffo. 2007. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nat. Mater.* 6: 997-1003.
- David Merryman, W., and A. J. Engler. 2010. Innovations in cell mechanobiology. *J. Biomech.* 43: 1.
- De Ugarte, Daniel A., Zeni Alfonso, Patricia A. Zuk, Amir Elbarbary, Min Zhu, Peter Ashjian, Prosper Benhaim, Mare H. Hedrick, and John K. Fraser. 2003. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunology Letters* 89: 267-270.
- Discher, D., C. Dong, J. J. Fredberg, F. Guilak, D. Ingber, P. Janmey, R. D. Kamm, G. W. Schmid-Schonbein, and S. Weinbaum. 2009. Biomechanics: cell research and applications for the next decade. *Ann. Biomed. Eng.* 37: 847-859.
- Dolderer, J. H., E. W. Thompson, J. Slavin, N. Trost, J. J. Cooper-White, Y. Cao, J. O'Connor A, A. Penington, W. A. Morrison, and K. M. Abberton. 2011. Long-term stability of adipose tissue generated from a vascularized pedicled fat flap inside a chamber. *Plast. Reconstr. Surg.* 127: 2283-2292.
- Du, J., X. Chen, X. Liang, G. Zhang, J. Xu, L. He, Q. Zhan, X. Q. Feng, S. Chien, and C. Yang. 2011. Integrin activation and internalization on soft ECM as a mechanism of induction of stem cell differentiation by ECM elasticity. *Curr. Issue* 108: 9466-9471.
- Dunwoodie, S. L. 2009. The role of hypoxia in development of the Mammalian embryo. *Dev. Cell.* 17: 755-773.
- Duran-Struuck, R., C. A. Huang, K. Orf, R. T. Bronson, D. H. Sachs, and T. R. Spitzer. 2015. Miniature swine as a clinically relevant model of graft-versus-host disease. *Comp. Med.* 65: 429-443.

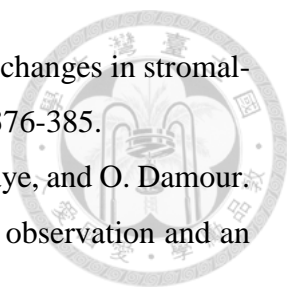
- 
- Eilken, H. M., and R. H. Adams. 2010. Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 22: 617-625.
- Eirin, A., X. Y. Zhu, J. D. Krier, H. Tang, K. L. Jordan, J. P. Grande, A. Lerman, S. C. Textor, and L. O. Lerman. 2012. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve revascularization outcomes to restore renal function in swine atherosclerotic renal artery stenosis. *Stem Cells* 30: 1030-1041.
- Engler, A. J., M. A. Griffin, S. Sen, C. G. Bonnemann, H. L. Sweeney, and D. E. Discher. 2004. Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments. *J. Cell. Biol.* 166: 877-887.
- Engler, A. J., S. Sen, H. L. Sweeney, and D. E. Discher. 2006. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126: 677-689.
- Erba, P., R. Ogawa, M. Ackermann, A. Adini, L. F. Miele, P. Dastouri, D. Helm, S. J. Mentzer, R. J. D'Amato, G. F. Murphy, M. A. Konerding, and D. P. Orgill. 2011. Angiogenesis in wounds treated by microdeformational wound therapy. *Ann. Surg.* 253: 402-409.
- Eto, H., H. Kato, H. Suga, N. Aoi, K. Doi, S. Kuno, and K. Yoshimura. 2012. The fate of adipocytes after nonvascularized fat grafting: evidence of early death and replacement of adipocytes. *Plast. Reconstr. Surg.* 129: 1081-1092.
- Folkman, J., and A. Moscona. 1978. Role of cell shape in growth control. *Nature* 273: 345-349.
- Galarraga, M., J. Campion, A. Munoz-Barrutia, N. Boque, H. Moreno, J. A. Martinez, F. Milagro, and C. Ortiz-de-Solorzano. 2012. Adiposoftware: automated software for the analysis of white adipose tissue cellularity in histological sections. *J. Lipid. Res.* 53: 2791-2796.
- Gigliofiorito, P., G. F. Marangi, M. Langella, D. Tosi, A. L. Pendolino, and P. Persichetti. 2013. The effects of negative pressure on blood supply and the adipogenic role of edema. *Plast. Reconstr. Surg.* 131: 931e-932e.
- Gilbert, P. M., K. L. Havenstrite, K. E. Magnusson, A. Sacco, N. A. Leonardi, P. Kraft, N. K. Nguyen, S. Thrun, M. P. Lutolf, and H. M. Blau. 2010. Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture. *Science* 329: 1078-1081.

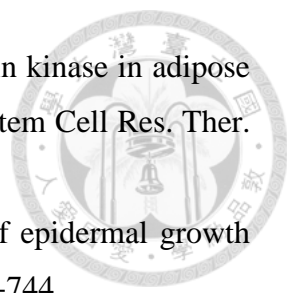
- 
- Gomillion, C. T., and K. J. Burg. 2006. Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomaterials* 27: 6052-6063.
- Goodison, S., V. Urquidi, and D. Tarin. 1999. CD44 cell adhesion molecules. *Mol. Pathol.* 52: 189-196.
- Gundeslioglu, A. O. 2012. Correction of severe ptosis with a silicone implant suspensor: 22 years of experience. *Plast. Reconstr. Surg.* 130: 752e-753e.
- Hamid, A. A., R. B. H. Idrus, A. B. Saim, S. Sathappan, and K. H. Chua. 2012. Characterization of human adipose-derived stem cells and expression of chondrogenic genes during induction of cartilage differentiation. *Clinics.* 67: 99-106.
- Han, J., Y. J. Koh, H. R. Moon, H. G. Ryoo, C. H. Cho, I. Kim, and G. Y. Koh. 2010. Adipose tissue is an extramedullary reservoir for functional hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 115: 957-964.
- Heit, Y. I., L. Lancerotto, I. Mesteri, M. Ackermann, M. F. Navarrete, C. T. Nguyen, S. Mukundan, Jr., M. A. Konerding, D. A. Del Vecchio, and D. P. Orgill. 2012. External volume expansion increases subcutaneous thickness, cell proliferation, and vascular remodeling in a murine model. *Plast. Reconstr. Surg.* 130: 541-547.
- Herold, C., K. Ueberreiter, and P. M. Vogt. 2012. Brava and autologous fat transfer is a safe and effective breast augmentation alternative: results of a 6-year, 81-patient, prospective multicenter study. *Plast. Reconstr. Surg.* 130: 479e-480e.
- Higuchi, A., Q. D. Ling, Y. Chang, S. T. Hsu, and A. Umezawa. 2013. Physical cues of biomaterials guide stem cell differentiation fate. *Chem. Rev.* 113: 3297-3328.
- Horton, E. R., P. Astudillo, M. J. Humphries, and J. D. Humphries. 2016. Mechanosensitivity of integrin adhesion complexes: role of the consensus adhesome. *Exp. Cell. Res.* 343: 7-13.
- Huang, C., J. Dai, and X. A. Zhang. 2015. Environmental physical cues determine the lineage specification of mesenchymal stem cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1850: 1261-1266.
- Huang, C., T. Leavitt, L. R. Bayer, and D. P. Orgill. 2014. Effect of negative pressure wound therapy on wound healing. *Curr. Probl. Surg.* 51: 301-331.

- 
- Huang, S., W. Zhao, Z. Wang, K. Tao, X. Liu, and P. Chang. 2016. Potential drawbacks in cell-assisted lipotransfer: A systematic review of existing reports (Review). *Mol. Med. Rep.* 13: 1063-1069.
- Huebsch, N., P. R. Arany, A. S. Mao, D. Shvartsman, O. A. Ali, S. A. Bencherif, J. Rivera-Feliciano, and D. J. Mooney. 2010. Harnessing traction-mediated manipulation of the cell/matrix interface to control stem-cell fate. *Nat. Mater.* 9: 518-526.
- Hynes, R. O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69: 11-25.
- Ingber, D. E. 2003. Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *J. Cell. Sci.* 116: 1157-1173.
- James, Isaac B., Sydney R. Coleman, and J. Peter Rubin. 2016. Fat, Stem Cells, and Platelet-Rich Plasma. *Clin. Plast. Surg.* 43: 473-488.
- Janmey, P. A., and C. A. McCulloch. 2007. Cell mechanics: integrating cell responses to mechanical stimuli. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 9: 1-34.
- Jeanes, A. I., P. Wang, P. Moreno-Layseca, N. Paul, J. Cheung, R. Tsang, N. Akhtar, F. M. Foster, K. Brennan, and C. H. Streuli. 2012. Specific beta-containing integrins exert differential control on proliferation and two-dimensional collective cell migration in mammary epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 287: 24103-24112.
- Kajita, K., I. Mori, T. Hanamoto, T. Ikeda, K. Fujioka, M. Yamauchi, H. Okada, T. Usui, N. Takahashi, Y. Kitada, K. Taguchi, T. Kajita, Y. Uno, H. Morita, and T. Ishizuka. 2012. Pioglitazone enhances small-sized adipocyte proliferation in subcutaneous adipose tissue. *Endocr. J.* 59 (12): 1107-1114.
- Kanchanawong, P., G. Shtengel, A. M. Pasapera, E. B. Ramko, M. W. Davidson, H. F. Hess, and C. M. Waterman. 2010. Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature* 468: 580-584.
- Kato, H., K. Mineda, H. Eto, K. Doi, S. Kuno, K. Kinoshita, K. Kanayama, and K. Yoshimura. 2014. Degeneration, regeneration, and cicatrization after fat grafting: dynamic total tissue remodeling during the first 3 months. *Plast. Reconstr. Surg.* 133: 303e-313e.
- Khouri, R. K., M. Eisenmann-Klein, E. Cardoso, B. C. Cooley, D. Kacher, E. Gombos, and T. J. Baker. 2012. Brava and autologous fat transfer is a safe and effective

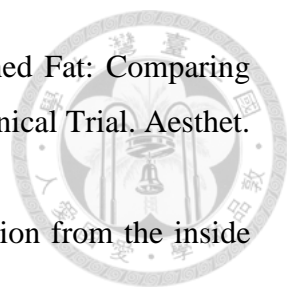
- 
- breast augmentation alternative: results of a 6-year, 81-patient, prospective multicenter study. *Plast. Reconstr. Surg.* 129: 1173-1187.
- Khouri, R. K., Jr., R. E. Khouri, J. R. Lujan-Hernandez, K. R. Khouri, L. Lancerotto, and D. P. Orgill. 2014. Diffusion and perfusion: the keys to fat grafting. *Plast. Reconstr. Surg. Glob. Open.* 2: e220.
- Khouri, R. K., R. K. Khouri, Jr., G. Rigotti, A. Marchi, E. Cardoso, S. C. Rotemberg, and T. M. Biggs. 2014. Aesthetic applications of Brava-assisted megavolume fat grafting to the breasts: a 9-year, 476-patient, multicenter experience. *Plast. Reconstr. Surg.* 133: 796-807.
- Khouri, R. K., G. Rigotti, R. K. Khouri, Jr., E. Cardoso, A. Marchi, S. C. Rotemberg, T. J. Baker, and T. M. Biggs. 2015. Tissue-engineered breast reconstruction with Brava-assisted fat grafting: a 7-year, 488-patient, multicenter experience. *Plast. Reconstr. Surg.* 135: 643-658.
- Kim, D. H., S. B. Khatau, Y. Feng, S. Walcott, S. X. Sun, G. D. Longmore, and D. Wirtz. 2012. Actin cap associated focal adhesions and their distinct role in cellular mechanosensing. *Sci. Rep.* 2: 555.
- Kosowski, T. R., G. Rigotti, and R. K. Khouri. 2015. Tissue-Engineered Autologous Breast Regeneration with Brava(R)-Assisted Fat Grafting. *Clin. Plast. Surg.* 42: 325-337.
- Kurpinski, K., J. Chu, C. Hashi, and S. Li. 2006. Anisotropic mechanosensing by mesenchymal stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 16095-16100.
- Kurpinski, K., J. Chu, D. Wang, and S. Li. 2009. Proteomic Profiling of Mesenchymal Stem Cell Responses to Mechanical Strain and TGF-beta1. *Cell. Mol. Bioeng.* 2: 606-614.
- Lancerotto, L., L. R. Bayer, and D. P. Orgill. 2012. Mechanisms of action of microdeformational wound therapy. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 23: 987-992.
- Lancerotto, L., M. S. Chin, B. Freniere, J. R. Lujan-Hernandez, Q. Li, A. Valderrama Vasquez, F. Bassetto, D. A. Del Vecchio, J. F. Lalikos, and D. P. Orgill. 2013. Mechanisms of action of external volume expansion devices. *Plast. Reconstr. Surg.* 132: 569-578.
- Largo, R. D., L. A. Tchang, V. Mele, A. Scherberich, Y. Harder, R. Wettstein, and D. J. Schaefer. 2014. Efficacy, safety and complications of autologous fat grafting to

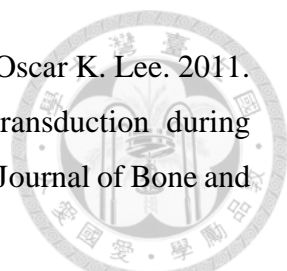
- 
- healthy breast tissue: a systematic review. *J Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* 67: 437-448.
- Lee, J. W., Y. S. Han, S. R. Kim, H. K. Kim, H. Kim, and J. H. Park. 2015. A rabbit model of fat graft recipient site preconditioning using external negative pressure. *Arch. Plast. Surg.* 42: 150-158.
- Legate, K. R., S. A. Wickstrom, and R. Fassler. 2009. Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes. Dev.* 23: 397-418.
- Li, D., J. Zhou, F. Chowdhury, J. Cheng, N. Wang, and F. Wang. 2011. Role of mechanical factors in fate decisions of stem cells. *Regen. Med.* 6: 229-240.
- Lin, C. S., H. Ning, G. Lin, and T. F. Lue. 2012. Is CD34 truly a negative marker for mesenchymal stromal cells? *Cytotherapy.* 14: 1159-1163.
- Lujan-Hernandez, J., L. Lancerotto, C. Nabzdyk, K. Z. Hassan, G. Giatsidis, R. K. Khouri, Jr., M. S. Chin, F. Bassetto, J. F. Lalikos, and D. P. Orgill. 2016. Induction of Adipogenesis by External Volume Expansion. *Plast. Reconstr. Surg.* 137: 122-131.
- Lunney, J. K. 2007. Advances in swine biomedical model genomics. *Int. J. Biol. Sci.* 3: 179-184.
- Maes, C., G. Carmeliet, and E. Schipani. 2012. Hypoxia-driven pathways in bone development, regeneration and disease. *Nat. Rev. Rheumatol.* 8: 358-366.
- Mailey, B., S. Saba, J. Baker, C. Tokin, S. Hickey, R. Wong, A. M. Wallace, and S. R. Cohen. 2013. A comparison of cell-enriched fat transfer to conventional fat grafting after aesthetic procedures using a patient satisfaction survey. *Ann. Plast. Surg.* 70: 410-415.
- McBeath, R., D. M. Pirone, C. M. Nelson, K. Bhadriraju, and C. S. Chen. 2004. Cell Shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev. Cell.* 6: 483-495.
- McIntosh, K., S. Zvonic, S. Garrett, J. B. Mitchell, Z. E. Floyd, L. Hammill, A. Kloster, Y. Di Halvorsen, J. P. Ting, R. W. Storms, B. Goh, G. Kilroy, X. Wu, and J. M. Gimble. 2006. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells* 24: 1246-1253.
- Mitchell, J. B., K. McIntosh, S. Zvonic, S. Garrett, Z. E. Floyd, A. Kloster, Y. Di Halvorsen, R. W. Storms, B. Goh, G. Kilroy, X. Wu, and J. M. Gimble. 2006.

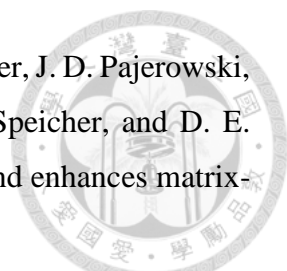
- 
- Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* 24: 376-385.
- Mojallal, A., C. Lequeux, C. Shipkov, P. Breton, J. L. Foyatier, F. Braye, and O. Damour. 2009. Improvement of skin quality after fat grafting: clinical observation and an animal study. *Plast. Reconstr. Surg.* 124: 765-774.
- Moreno-Layseca, P., and C. H. Streuli. 2014. Signalling pathways linking integrins with cell cycle progression. *Matrix. Biol.* 34: 144-153.
- Nakamura, S., M. Ishihara, M. Takikawa, K. Murakami, S. Kishimoto, S. Nakamura, S. Yanagibayashi, S. Kubo, N. Yamamoto, and T. Kiyosawa. 2010. Platelet-rich plasma (PRP) promotes survival of fat-grafts in rats. *Ann. Plast. Surg.* 65: 101-106.
- Ng, F., S. Boucher, S. Koh, K. S. Sastry, L. Chase, U. Lakshmiopathy, C. Choong, Z. Yang, M. C. Vemuri, M. S. Rao, and V. Tanavde. 2008. PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood.* 112: 295-307.
- Nielsen, J. S., and K. M. McNagny. 2008. Novel functions of the CD34 family. *J. Cell. Sci.* 121: 3683-3692.
- Nikolopoulos, S. N., P. Blaikie, T. Yoshioka, W. Guo, C. Puri, C. Tacchetti, and F. G. Giancotti. 2005. Targeted deletion of the integrin beta4 signaling domain suppresses laminin-5-dependent nuclear entry of mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB, causing defects in epidermal growth and migration. *Mol. Cell. Biol.* 25: 6090-6102.
- Obi, S., H. Masuda, T. Shizuno, A. Sato, K. Yamamoto, J. Ando, Y. Abe, and T. Asahara. 2012. Fluid shear stress induces differentiation of circulating phenotype endothelial progenitor cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 303: C595-606.
- Oh, D. S., Y. W. Cheon, Y. R. Jeon, and D. H. Lew. 2011. Activated platelet-rich plasma improves fat graft survival in nude mice: a pilot study. *Dermatol. Surg.* 37: 619-625.
- Pandey, A. C., J. A. Semon, D. Kaushal, R. P. O'Sullivan, J. Glowacki, J. M. Gimble, and B. A. Bunnell. 2011. MicroRNA profiling reveals age-dependent differential

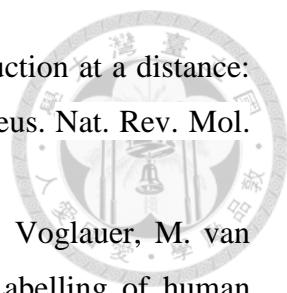
- 
- expression of nuclear factor  $\kappa$ B and mitogen-activated protein kinase in adipose and bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* 2: 49-67.
- Park, B., J. S. Kong, S. Kang, and Y. W. Kim. 2011. The effect of epidermal growth factor on autogenous fat graft. *Aesthetic. Plast. Surg.* 35: 738-744.
- Park, J. S., J. S. Chu, C. Cheng, F. Chen, D. Chen, and S. Li. 2004. Differential effects of equiaxial and uniaxial strain on mesenchymal stem cells. *Biotechnol. Bioeng.* 88: 359-368.
- Paszek, M. J., N. Zahir, K. R. Johnson, J. N. Lakins, G. I. Rozenberg, A. Gefen, C. A. Reinhart-King, S. S. Margulies, M. Dembo, D. Boettiger, D. A. Hammer, and V. M. Weaver. 2005. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer. Cell.* 8: 241-254.
- Pietramaggiore, G., P. Liu, S. S. Scherer, A. Kaipainen, M. J. Prsa, H. Mayer, J. Newalder, M. Alperovich, S. J. Mentzer, M. A. Konerding, S. Huang, D. E. Ingber, and D. P. Orgill. 2007. Tensile forces stimulate vascular remodeling and epidermal cell proliferation in living skin. *Ann. Surg.* 246: 896-902.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, and D. R. Marshak. 1999. *Science.* 284 (5411): 143-147.
- Rahmanzadeh, R., G. Hüttmann, J. Gerdes, and T. Scholzen. 2007. Chromophore-assisted light inactivation of pKi-67 leads to inhibition of ribosomal RNA synthesis. *Cell Prolif.* 40: 422-430.
- Rankin, E. B., and A. J. Giaccia. 2008. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell. Death. Differ.* 15: 678-685.
- Reich, C. M., O. Raabe, S. Wensch, P. S. Bridger, M. Kramer, and S. Arnhold. 2012. Isolation, culture and chondrogenic differentiation of canine adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells--a comparative study. *Vet. Res. Commun.* 36: 139-148.
- Ren, X. D., W. B. Kiosses, and M. A. Schwartz. 1999. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J.* 18: 578-585.
- Rigotti, G., L. Charles-de-Sa, N. F. Gontijo-de-Amorim, C. M. Takiya, P. R. Amable, R. Borojevic, D. Benati, P. Bernardi, and A. Sbarbati. 2016. *Expanded Stem Cells,*

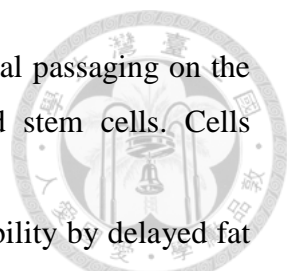


- 
- Stromal-Vascular Fraction, and Platelet-Rich Plasma Enriched Fat: Comparing Results of Different Facial Rejuvenation Approaches in a Clinical Trial. *Aesthet. Surg. J.* 36: 261-270.
- Rosen, E. D., and O. A. MacDougald. 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7: 885-896.
- Roskelley, C. D., P. Y. Desprez, and M. J. Bissell. 1994. Extracellular matrix-dependent tissue-specific gene expression in mammary epithelial cells requires both physical and biochemical signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 12378-12382.
- Ross, T. D., B. G. Coon, S. Yun, N. Baeyens, K. Tanaka, M. Ouyang, and M. A. Schwartz. 2013. Integrins in mechanotransduction. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 25: 613-8.
- Rueda-Clausen, C. F., V. W. Dolinsky, J. S. Morton, S. D. Proctor, J. R. Dyck, and S. T. Davidge. 2011. Hypoxia-induced intrauterine growth restriction increases the susceptibility of rats to high-fat diet-induced metabolic syndrome. *Diabetes* 60: 507-516.
- Sanz-Rodriguez, F., M. Guerrero-Esteo, L. M. Botella, D. Banville, C. P. Vary, and C. Bernabeu. 2004. Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the Lim family of proteins. *J. Biol. Chem.* 279: 32858-32868.
- Sawada, Y., M. Tamada, B. J. Dubin-Thaler, O. Cherniavskaya, R. Sakai, S. Tanaka, and M. P. Sheetz. 2006. Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell* 127: 1015-1026.
- Scholzen, T., and J. Gerdes. 2000. The ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology* 182: 311-322.
- Schweizer, R., W. Tsuji, V. S. Gorantla, K. G. Marra, J. P. Rubin, and J. A. Plock. 2015. The role of adipose-derived stem cells in breast cancer progression and metastasis. *Stem Cells Int.* 2015: 120949.
- Serra-Renom, J. M., J. L. Muñoz-Olmo, and J. M. Serra-Mestre. 2010. Fat grafting in postmastectomy breast reconstruction with expanders and prostheses in patients who have received radiotherapy: formation of new subcutaneous tissue. *Plast. Reconstr. Surg.* 125: 12-18.
- Sharpless, N. E., and R. A. DePinho. 2007. How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8: 703-713.

- 
- Shih, Yu-Ru V., Kuo-Fung Tseng, Hsiu-Yu Lai, Chi-Hung Lin, and Oscar K. Lee. 2011. Matrix stiffness regulation of integrin-mediated mechanotransduction during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Journal of Bone and Mineral Research* 26: 730-738.
- Shukla, L., W. A. Morrison, and R. Shayan. 2015. Adipose-derived stem cells in radiotherapy injury: a new frontier. *Front. Surg.* 2: 1.
- Shultz, L. D., F. Ishikawa, and D. L. Greiner. 2007. Humanized mice in translational biomedical research. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 118-130.
- Sidney, L. E., M. J. Branch, S. E. Dunphy, H. S. Dua, and A. Hopkinson. 2014. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells* 32: 1380-1389.
- Song, J. W., and L. L. Munn. 2011. Fluid forces control endothelial sprouting. *Current Issue* 108: 15342-15347.
- Steward, A. J., and D. J. Kelly. 2015. Mechanical regulation of mesenchymal stem cell differentiation. *J. Anat.* 227: 717-731.
- Streuli, C. H., and N. Akhtar. 2009. Signal co-operation between integrins and other receptor systems. *Biochem. J.* 418: 491-506.
- Stricker-Krongrad, A., C. R. Shoemaker, and G. F. Bouchard. 2016. The Miniature Swine as a Model in Experimental and Translational Medicine. *Toxicol. Pathol.* 44: 612-623.
- Suga, H., H. Eto, N. Aoi, H. Kato, J. Araki, K. Doi, T. Higashino, and K. Yoshimura. 2010. Adipose tissue remodeling under ischemia: death of adipocytes and activation of stem/progenitor cells. *Plast. Reconstr. Surg.* 126: 1911-1923.
- Suga, H., D. Matsumoto, K. Inoue, T. Shigeura, H. Eto, N. Aoi, H. Kato, H. Abe, and K. Yoshimura. 2008. Numerical measurement of viable and nonviable adipocytes and other cellular components in aspirated fat tissue. *Plast. Reconstr. Surg.* 122: 103-114.
- Suzuki, Y., A. C. Yeung, and F. Ikeno. 2011. The representative porcine model for human cardiovascular disease. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011: 195483.
- Swanson, E. 2014. Mechanisms of action of external volume expansion devices. *Plast. Reconstr. Surg.* 133: 425e-426e.

- 
- Swift, J., I. L. Ivanovska, A. Buxboim, T. Harada, P. C. Dingal, J. Pinter, J. D. Pajerowski, K. R. Spinler, J. W. Shin, M. Tewari, F. Rehfeldt, D. W. Speicher, and D. E. Discher. 2013. Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. *Science* 341: 1240104.
- Swindle, M. M., A. Makin, A. J. Herron, F. J. Clubb, Jr., and K. S. Frazier. 2012. Swine as models in biomedical research and toxicology testing. *Vet. Pathol.* 49: 344-356.
- Tamura, E., H. Fukuda, and Y. Tabata. 2007. Adipose tissue formation in response to basic fibroblast growth factor. *Acta Otolaryngol.* 127: 1327-1331.
- Tojkander, S., G. Gateva, and P. Lappalainen. 2012. Actin stress fibers--assembly, dynamics and biological roles. *J. Cell Sci.* 125: 1855-1864.
- Traktuev, D. O., S. Merfeld-Clauss, J. Li, M. Kolonin, W. Arap, R. Pasqualini, B. H. Johnstone, and K. L. March. 2008. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ. Res.* 102: 77-85.
- Tsuji, W., J. P. Rubin, and K. G. Marra. 2014. Adipose-derived stem cells: Implications in tissue regeneration. *World. J. Stem Cells* 6: 312-321.
- Turk, J. R., K. K. Henderson, G. D. Vanvickle, J. Watkins, and M. H. Laughlin. 2005. Arterial endothelial function in a porcine model of early stage atherosclerotic vascular disease. *Int. J. Exp. Path.* 86: 335-345.
- van Oostrom, M. C., O. van Oostrom, P. H. Quax, M. C. Verhaar, and I. E. Hoefer. 2008. Insights into mechanisms behind arteriogenesis: what does the future hold? *J. Leukoc. Biol.* 84: 1379-1391.
- Virtanen, K. A., E. L. Martin, B. S. Janne Orava, M. Heglind, R. Westergren, T. Niemi, M. Taittonen, J. Laine, N. J. Savisto, S. Enerbäck, and P. Nuutila. 2009. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N. Engl. J. Med.* 360: 1518-1525.
- Wall, M. E., S. H. Bernacki, and E. G. Lobo. 2007. Effects of serial passaging on the adipogenic and osteogenic differentiation potential of adipose-derived human mesenchymal stem cells. *Tissue. Eng.* 13: 1291-1298.

- 
- Wang, N., D. Jessica, Tytell, and E. Donald. 2009. Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 10: 75-82.
- Wolbank, S., A. Peterbauer, E. Wassermann, S. Hennerbichler, R. Voglauer, M. van Griensven, H. C. Duba, C. Gabriel, and H. Redl. 2007. Labelling of human adipose-derived stem cells for non-invasive in vivo cell tracking. *Cell. Tissue. Bank.* 8: 163-177.
- Yazawa, M., T. Mori, K. Tuchiya, Y. Nakayama, H. Ogata, and T. Nakajima. 2006. Influence of vascularized transplant bed on fat grafting. *Wound. Repair. Regen.* 14: 586-592.
- Yeung, T., P. C. Georges, L. A. Flanagan, B. Marg, M. Ortiz, M. Funaki, N. Zahir, W. Ming, V. Weaver, and P. A. Janmey. 2005. Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell. Motil. Cytoskeleton.* 60: 24-34.
- Yoshimura, K., T. Shigeura, D. Matsumoto, T. Sato, Y. Takaki, E. Aiba-Kojima, K. Sato, K. Inoue, T. Nagase, I. Koshima, and K. Gonda. 2006. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J. Cell. Physiol.* 208: 64-76.
- Yoshimura, K., H. Suga, and H. Eto. 2009. Adipose-derived stem/progenitor cells: roles in adipose tissue remodeling and potential use for soft tissue augmentation. *Regen. Med.* 4: 265-273.
- Yoshimura, K., H. Eto, H. Kato, K. Doi, and N. Aoi. 2011. In vivo manipulation of stem cells for adipose tissue repair/reconstruction. *Regen. Med.* 6: 33-41.
- Yung, Y. C., J. Chae, M. J. Buehler, C. P. Hunter, and D. J. Mooney. 2009. Cyclic tensile strain triggers a sequence of autocrine and paracrine signaling to regulate angiogenic sprouting in human vascular cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 15279-15284.
- Zemel, A., F. Rehfeldt, A. E. Brown, D. E. Discher, and S. A. Safran. 2010. Optimal matrix rigidity for stress fiber polarization in stem cells. *Nat. Phys.* 6: 468-473.
- Zhang, Y., D. Khan, J. Delling, and E. Tobiasch. 2012. Mechanisms underlying the osteo- and adipo-differentiation of human mesenchymal stem cells. *Scientific World Journal* 2012: 793823.

- 
- Zhao, Y., S. D. Waldman, and L. E. Flynn. 2012. The effect of serial passaging on the proliferation and differentiation of bovine adipose-derived stem cells. *Cells Tissues Organs* 195: 414-427.
- Zhong, X., W. Yan, X. He, and Y. Ni. 2009. Improved fat graft viability by delayed fat flap with ischaemic pretreatment. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* 62: 526-531.
- Zuk, P. A., M. Zhu, P. Ashjian, D. A. De Ugarte, J. I. Huang, H. Mizuno, Z. C. Alfonso, J. K. Fraser, P. Benhaim, and M. H. Hedrick. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell.* 13: 4279-4295.