

血管内皮祖细胞促进糖尿病小鼠皮肤创面血管化及愈合的研究

昆明市第一人民医院 高雪*, 昆明 650011

摘要 目的:探讨血管内皮祖细胞(EPC)在促进糖尿病小鼠皮肤创面血管化及愈合中的作用。方法:选取 21 只昆明鼠,随机选取 1 只行体外分离、培养、鉴定血管 EPC,其余 20 只昆明鼠均建立糖尿病动物模型,依据随机数字表法分为内皮组和对照组,每组 10 只,对照组给予裸处理,内皮组给予种植有 EPC 的聚乳酸聚乙醇酸(PLGA)支架处理。结果:处理后 7、15 d 在创面组织血管内皮细胞生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)水平和微血管密度(MVD)、创面愈合率方面,2 组明显高于处理后当日,且内皮组明显高于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:血管 EPC 可有效促进糖尿病小鼠皮肤创面血管化及有利于提高创面的愈合效果,其机制可能与促进创面中 VEGF、bFGF 等因子表达有关。

关键词 内皮祖细胞; 糖尿病; 创面; 血管化; 愈合

中图分类号 R587.1 文献标识码 A DOI 10.11768/nkjwzzzz20180420

The experimental study of vascular endothelial progenitor cells on promoting the wound vascularization and healing in diabetic rats GAO Xue*. The First People's Hospital of Kunming City, Kunming 650011, China

Abstract Objective: To explore the effect of vascular endothelial progenitor cells (EPCs) on promoting the wound vascularization and healing in diabetic rats. Methods: Twenty-one Kunming mice were selected. One Kunming mouse was randomly selected, and the EPCs were isolated, cultured, and identified. The diabetes animal model was established in the remaining 20 Kunming mice. According to the random number table method, 20 Kunming mice were divided into endothelial group and control group, 10 for each group. The control group was given naked treatment, and endothelial group was given PLGA with planting EPC treatment. Results: In wound tissue vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF) and microvascular density (MVD), wound healing rate at 7th and 15th day after treatment in the endothelial group and the control group were significantly higher than those on the day after treatment, and those in the endothelial group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Conclusions: EPCs can effectively promote the wound vascularization of diabetic mice, and are helpful to improve the healing effect of wound surface, which may be related to promote the VEGF and bFGF expression in the wound.

Key words Endothelial progenitor cells; Diabetes; Wound; Vascularization; Healing

糖尿病易并发血管、神经等组织损伤且创面愈合较难。有研究显示,血管内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)是一种血管内皮细胞的前体细胞,主要存在于骨髓中,具有参与缺血组织血管生成和血管损伤后修复等作用,且被证实对创面具有良好的修复作用,但其应用于糖尿病创面中的作用尚未明确^[1,2]。本研究通过建立糖尿病昆明鼠模型并给予 EPC 处理,探讨其在促进糖尿病创面血管化及愈合中的作用,报道如下。

材料与方法

实验动物及分组 选取 21 只雄性昆明鼠[许可证号:SCXK(鄂)2010-0007,湖北省实验动物研究中心],SPF 级,周龄 5 周,体质量 15 ~ 20 g,平均

(17.48 ± 1.24) g,随机选取 1 只用于 EPC 培养,其余 20 只昆明鼠均建立糖尿病动物模型,依据随机数字表法分为内皮组和对照组,每组 10 只,所有雄性昆明鼠均饲养于超净生物层流架内(恒温 24 ~ 26℃,恒湿 48% ~ 52%),饲水、饲料、垫料等均经高压消毒。

主要试剂 11995 DMEM 培养基、内皮细胞培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国 GIBCO 公司,聚乳酸聚乙醇酸购自博立生物材料有限公司,豚佐菌素、柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液、细胞裂解液购自美国 Sigma 公司,血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial cell growth factor, VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、CD34 等单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,磷酸缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)、乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetra acetic acid, ED-

* 通信作者:高雪, E-mail: gaioxuegx1@163.com

TA)、甲醛等其他辅助试剂均购自上海索宝生物科技有限公司。

主要仪器 外科手术器械、超净工作台购自苏州净化设备厂, Thermo 水套 3141 型 CO₂ 培养箱购自美国 Thermo 公司, Axioskop2 plus 显微镜及计算机图像分析系统购自德国 ZEISS 公司, Feb-80 台式离心机购自上海天美生化仪器设备工程有限公司, 7220 型分光光度计购自上海精密科学仪器有限公司, HITACH500 透射电镜购自日本日立公司; 聚乳酸聚乙醇酸(PLGA) 支架购自广州市中万新材料有限公司。

方法

EPC 及其支架制备: 将用于 EPC 培养的昆明鼠向腹腔注射 5 000 IU/kg 肝素, 20 min 后行颈椎脱臼断离脊髓处死, 吸取含 100 IU/mL 肝素的 M199 基本培养液, 常规纯净水冲洗股骨和胫骨髓腔, 收集骨髓、离心、界面层单个核细胞培养 7 d 后, 制备细胞片、丙酮固定 15 min、PBS 冲洗、滴加一抗 CD34 (1:100)、4℃ 过夜。PBS 冲洗、滴加 FITC 标记的抗鼠二抗(抗体稀释度为 1:100)、37℃ 孵育 40 min。蒸馏水冲洗, 碘化吡啶(pyridine iodide, PI) 染色后, 行免疫荧光法鉴定并在倒置显微镜下观察细胞的生长情况; 培养成功后, 将 PLGA 支架剪成可置入 24 孔板内的小块、加 EGM-2 培养液预湿 48 h, 分离、培养的 EPC, 以 10⁶/mL 密度接种至 24 孔板内, 置入 CO₂ 培养箱, 14 d 后行扫描电镜图、HIE 染色检测, 本组均种植成功(随机选取 5 个视野, EPC 存活率均 >90%), 另设未种植细胞的裸 PLGA 支架。

糖尿病动物模型建立: 将用于建立动物模型的 20 只昆明鼠禁食 12 h 后, 注射链脲佐菌素、柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液配成浓度为 1% 的链脲佐菌素液, 剂量为 65 mg/kg, 完毕后继续规律喂养 7 d, 随后 3 周内抽取腹部静脉血 1 mL 重复检测血糖, 本组模型均建立成功(禁食 8 h 后血糖 >13.80 mmol/L、随机血糖 >16.70 mmol/L, 表现为多饮、多食、多尿等症状和体质量持续性下降)。

糖尿病创面处理实验: 20 只昆明鼠在糖尿病模型建立后第 2 d 均通过手术刀于上背部正中处切开直径约 3 cm 的圆形创面, 内皮组昆明鼠将种植有 EPC 的 PLGA 剪成小块, 通过外科手术的方法异位移植入创面后缝合、固定移植物于皮下, 术后定期(3~5 d)伤口换药、抗菌药物预防感染、继续规律饲养, 对照组昆明鼠依上述相同的方法植入裸 PLGA 支架, 其余操作和处理均同内皮组。

创面组织 VEGF、bFGF 检测: 于植入 PLGA 支架

处理后当日、7、15 d 取 0.5 cm × 0.5 cm 的全层创面组织块并清除其附着的痂皮、血渍、坏死组织等, Earle's 平衡液漂洗 3 次, 3 min/次, 将创面组织块置入 10 mL 培养瓶、加 3 mL MCDB110 培养液(100 mg/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素)后, 置 5% CO₂ 孵育箱内培养 18 h, 取上清双抗体夹心酶联免疫吸附法检测其中 VEGF、bFGF 水平。

创面血管化检测: 于植入 PLGA 支架处理后当日、7、15 d 取 0.5 cm × 0.5 cm 的全层创面组织, 加抗 CD34 单克隆抗体标记显示血管内皮细胞, 先在低倍视野内(×40、×100)选择 CD34 标记的高微血管密度(microvascular density, MVD)的区域后, 在高倍视野内(×200)随机选取 3 个视野, 计数孤立棕黄色血管内皮细胞或细胞簇代表 1 条单独的微血管, 取平均值。

创面愈合观察: 于植入 PLGA 支架处理后当日、7、15 d 观察创面愈合大小、色泽、质地、深浅等, 并摄像后通过 Photoshop 7.0 软件(Adobe)和 KS400 图像分析系统(Kaiser)测量创面面积, 创面愈合率 = (初始面积 - 第 nd 面积) / 初始面积 × 100%^[3]。

统计学处理 采用 SPSS 22.0 统计软件, 计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 *t* 检验, 计数资料以百分数(%)表示, 采用 χ^2 检验, 对多组资料采用重复测量方差分析, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

体外培养 EPC 的鉴定及 PLGA 支架生物学情况 台盼兰染色观察显示细胞存活率 >95%, 接种培养皿培养 30 min 后出现细胞贴壁并开始伸展, 第 2 d 细胞开始贴壁、第 4 d 细胞明显增殖并由多角形逐渐伸展和逐渐变成长梭形、第 7 d 免疫荧光检测呈 CD34 阳性表达, 见图 1; 对照组的裸 PLGA 支架经扫描电镜后, 显示创面表面相对平滑的波浪形地貌, HIE 染色后创面表面呈长而卷曲、波浪状, 内皮组种植有 EPC 的 PLGA 支架经扫描电镜后, 显示创面表面 EPC 很好地在支架孔壁上粘附生长、突起相互交织且生长状态良好, HIE 染色后可见创面表面有大量的存活 EPC 存在, 见图 2、3。

创面组织 VEGF、bFGF 水平 处理后 7、15 d 内皮组和对照组创面组织 VEGF、bFGF 水平明显高于处理后当日, 且内皮组明显高于对照组, 差异有统计学意义(*P* < 0.01), 见表 1。

创面 MVD 创伤后 1 d 内皮组和对照组创面均有 CD34 阳性细胞表达, 且随时间推移而逐渐增多, 但内皮组处理后 7、15 d 的 CD34 阳性细胞表达明显

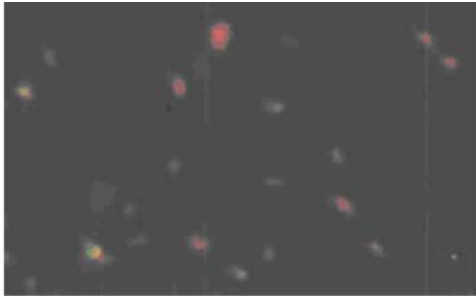
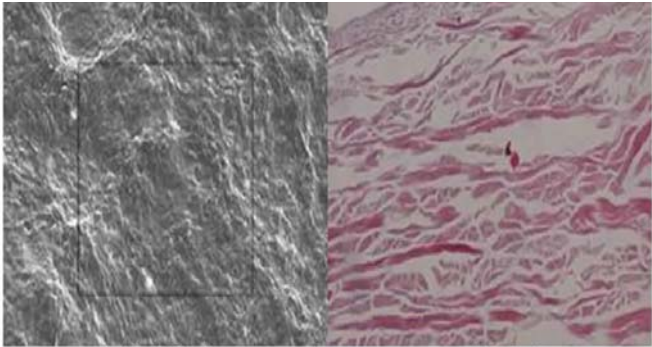
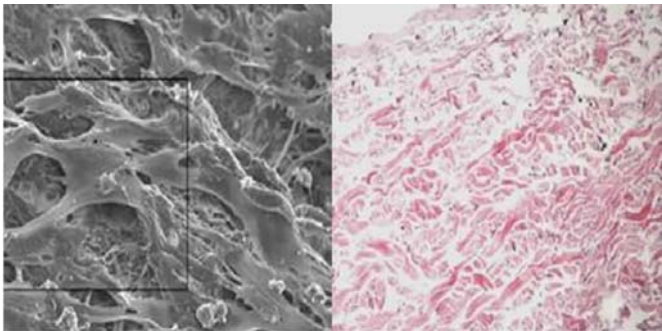


图 1 CD34 的免疫荧光检测



扫描电镜图 HIE染色图

图 2 对照组的裸 PLGA 支架



扫描电镜图 HIE染色图

图 3 内皮组种植有 EPC 的 PLGA 支架

高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2,图 4,5。

表 1 2 组处理后创面组织 VEGF 及 bFGF 水平比较
(pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	例	VEGF 水平		
		当日	7 d	15 d
对照组	10	22.2 ± 2.5	32.7 ± 3.6 *	40.7 ± 4.2 *
内皮组	10	22.3 ± 2.6	40.2 ± 4.3 * [△]	52.2 ± 5.6 * [△]

组别	例	bFGF 水平		
		当日	7 d	15 d
对照组	10	50.3 ± 5.2	66.8 ± 6.9 *	80.0 ± 8.2 *
内皮组	10	50.0 ± 5.1	77.2 ± 7.9 * [△]	95.4 ± 9.8 * [△]

注:与本组当日比较, * $P < 0.01$;与对照组比较, [△] $P < 0.01$

表 2 2 组处理后创面 MVD 比较 (mm², $\bar{x} \pm s$)

组别	例	当日	7d	15d
对照组	10	12.4 ± 0.3	18.7 ± 2.2 *	28.7 ± 3.0 *
内皮组	10	12.3 ± 0.3	26.2 ± 3.1 * [△]	43.2 ± 4.8 * [△]

注:与本组当日比较, * $P < 0.01$;与对照组比较, [△] $P < 0.01$

创面愈合率 处理后 7、15 d 内皮组和对照组创面愈合率明显高于处理后当日,且内皮组明显高于对照组($P < 0.01$),见表 3、图 6,7。

表 3 2 组处理后创面愈合率比较 (%) , $\bar{x} \pm s$)

组别	例	当日	7 d	15 d
对照组	10	0.0 ± 0.0	12.7 ± 2.5 *	30.6 ± 4.1 *
内皮组	10	0.0 ± 0.0	52.1 ± 5.4 * [△]	88.2 ± 5.1 * [△]

注:与本组当日比较, * $P < 0.01$;与对照组比较, [△] $P < 0.01$

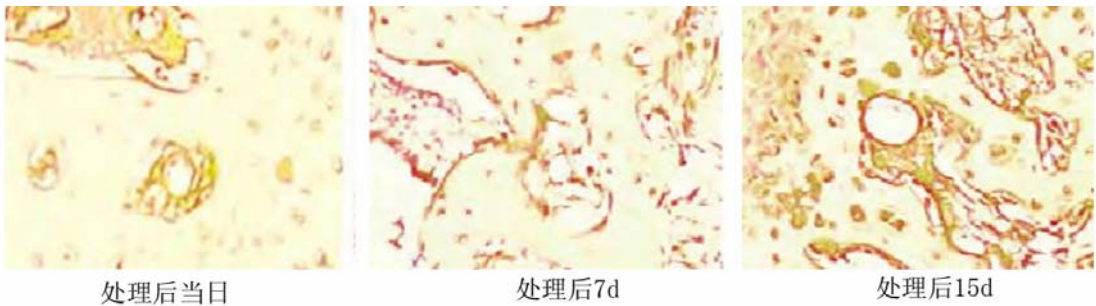


图 4 对照组创面愈合情况

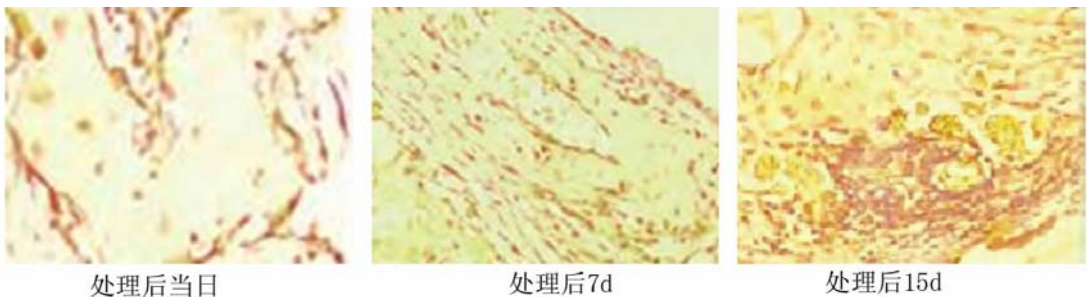


图 5 内皮组创面愈合情况



图6 对照组创面愈合情况



图7 内皮组创面愈合情况

讨论

约有 15% 糖尿病患者存在不同程度的溃疡,尤其是足部溃疡,因炎性细胞迁移和增殖能力而降低组织修复细胞因子产生,导致细胞外基质沉积和重塑能力的下降^[4];同时,还可损伤血管组织,使微血管内皮细胞损伤逐渐加重,导致其未能有效向创伤区域提供营养和运输代谢产物而影响巨噬、角质、血管内皮等细胞分泌促血管生长因子,从而影响创面的愈合^[5]。

而 EPC 是一种具有游走特性、能进一步增殖分化的幼稚内皮细胞,与造血干细胞表达相同表面标志物,通过分泌血管源性生长因子和刺激宿主内皮细胞来促进血管生成^[6]。EPC 由于参与血管发生及参与机体局部缺血组织的修复,逐渐被应用于肿瘤血管再生、心血管疾病、微血管病变、促创面愈合中,且具有良好的作用^[7,8]。此外,VEGF、bFGF 是创面血管化的主要调控因子,均具有促内皮细胞游走、促进新血管形成等作用,其中 VEGF 是一种血管内皮细胞特异性的肝素结合生长因子,是目前促血管新生最强的细胞因子,bFGF 则可有效刺激成纤维细胞生长、增殖、调节胶原代谢并刺激内皮细胞分裂来引发血管再生,因此二者水平可有效反映创面血管中的功能状态^[9,10]。

本研究通过建立糖尿病昆明鼠模型并给予 EPC 处理,发现在创面组织 VEGF、bFGF 水平和 MVD 方面,内皮组处理后 7、15 d 明显高于对照组,表明血管 EPC 可有效促进糖尿病创面血管化,其机制可能与促进创面中 VEGF、bFGF 等因子表达有关。这可

能是由于在 EPC 处理中,研究所用的支架材料为 PLGA,其代谢产物是人代谢途径常见的副产物(乳酸和羟基乙酸),且其生物组织相容性良好^[11,12],因此可在不对 EPC 及昆明鼠等生命体产生毒性作用下,将 EPC 安全、有效地植入至昆明鼠创面中;而 EPC 在昆明鼠创面的前炎症因子等的刺激下,可有效在创面组织中刺激 VEGF、bFGF 等血管源性生长因子的大量合成和分泌,进而起促使血管新生、修复等作用,且分泌后的 VEGF、bFGF 等还可与 EPC 特异性结合^[13],活化受体细胞内段偶联的络氨酸激酶、催化下游的信号蛋白而促使 EPC 增殖并定向内皮细胞分化,从而可有效促使创面的血管化。同时研究中显示血管 EPC 有效提高了创面的愈合效果,这可能是由于 EPC 处理中,使创面可有足够的血管为其输送组织修复、再生等生物学行为所需的营养和代谢产物的运输,最终提高了创面愈合效果。

参考文献

- 1 张炜,蔡第心,汪虹,等. 动员血管内皮祖细胞促进真皮支架移植区的血管新生[J]. 中国组织工程研究,2013,17(24):4386-4393.
- 2 徐俊,王鹏华,褚月颖,等. 表皮生长因子纳米微粒对糖尿病大鼠皮肤创面愈合的影响[J]. 中华糖尿病杂志,2013,5(11):674-677.
- 3 Baltzis D, Eleftheriadou I, Veves A. Pathogenesis and treatment of impaired wound healing in diabetes mellitus: new insights[J]. Adv Ther,2014,31(8):817-36.
- 4 Walsh JW, Hoffstad OJ, Sullivan MO, et al. Association of diabetic foot ulcer and death in a population-based cohort from the United Kingdom [J]. Diabet Med,2016,33(11):1493-1498.
- 5 Ambasta RK, Kohli H, Kumar P. Multiple therapeutic effect of endothelial progenitor cell regulated by drugs in diabetes and diabetes related disorder[J]. J Transl Med,2017,15(1):185.

(下转第 352 页)

高的发病率^[4]。PPCM 是排除性诊断,诊断困难,常因为怀孕最后 1 个月大部分健康的孕妇可出现疲劳、脚踝部水肿和气短。血清 cTnT、NT-proBNP 和 hs-CRP 测定能及时发现高危孕产妇,胸部 X 光检查发现心脏增大要警惕 PPCM 的可能。

本例起病与 CKD 密切相关,贫困、营养差、多次妊娠、肾病治疗不当、妊娠中后期肾功能进行性下降、血压升高、贫血加重以及低蛋白血症是重要诱因。心肌酶谱提示心肌损伤,产后 2 h 出现心力衰竭症状,5 个月后我院检查 NT-proBNP 及 cTnT 仍然处于高水平是心脏受损的重要证据;超声心动图结果支持扩张性心肌病,与尿毒症性心肌病的心肌肥厚、舒张功能减退的超声结果明显不同,因孕早期已排除心脏疾病可能,支持做出 PPCM 诊断。回顾病例可以发现 PPCM 的各种危险因素均在该患者身上得到体现。

抗心力衰竭 + 靶向药物治疗是 PPCM 的首选,PPCM 与扩张型心肌病同属于射血分数降低的心力衰竭 (heart failure with reduced ejection fraction, HFrEF),如果患者有症状或充血水肿的体征可使用利尿剂消除水肿,但要注意减少胎盘血流量的问题。ACEI (ARB) 可致胎儿畸形并对肾功能有不良影响,禁用于妊娠期。使用 ACEI 与 β 受体阻滞剂后仍有症状的患者可加入螺内酯或依普利酮。沙库巴曲/缬沙坦钠是一种作用于 RAAS 和中性肽链内切酶的新型药物,对降低心力衰竭死亡和住院风险优于 ACEI。不能耐受 ACEI 或 ARB 或属产前禁忌的、有

症状的 HFrEF 患者,可以选择肼苯哒嗪与硝酸异山梨酯联用。怀孕期超声心动图发现有血栓者可以给予低分子肝素抗凝,华法令可以通过胎盘导致畸胎、严重骨骼发育异常,产前禁用。溴隐亭和卡麦角林是抑制催乳素分泌的多巴胺拮抗剂,不但可用于 PPCM 标准心力衰竭治疗,还可预防左心室扩大和收缩功能恶化^[5]。曹勤等^[6]报道了 1 例用溴隐亭治疗 PPCM 病例,疗程 8 周,4 个月后随访,患者症状明显改善,超声心动图结果显著好转。

参考文献

- 1 张爱平,王艳侠,丁尧海,等.妊娠时肾脏损害临床和肾组织病理变化的分析研究[J].中国中西医结合肾病杂志,2002,3(1):26-27,59.
- 2 岳晓辉,刘楠,薛晓艳.我国围产期心肌病流行病学特点及转归荟萃分析[J].中国妇产科临床杂志,2011,12(5):359-363.
- 3 Davidson NL, Wolski P, Callaway LK, et al. Chronic kidney disease in pregnancy: Maternal and fetal outcomes and progression of kidney disease[J]. Obstet Med, 2015, 8 (2):92-98.
- 4 Murat B, Kadir K, Dursun D, et al. Peripartum cardiomyopathy: current state of knowledge new developments and future directions[J]. Curr Cardiol Rev, 2014, 10(4):317-326.
- 5 Sliwa K, Hilfiker-kleiner D, Petrie MC, et al. Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of peripartum cardiomyopathy: a position statement from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology Working Group on peripartum cardiomyopathy[J]. Eur J Heart Fail, 2010, 12(8):767-778.
- 6 曹勤,李晟,唐家荣.溴隐亭治疗围生期心肌病 1 例并文献复习[J].内科急危重症杂志,2017,23(2):168-170.

(2017-08-27 收稿 2018-07-03 修回)

(上接第 331 页)

- 6 王仁,张凯,刘峰涛,等.载脂蛋白(a)对小鼠骨髓源性内皮祖细胞血管生成能力的影响[J].中国动脉硬化杂志,2013,21(9):10041-10041.
- 7 Kampmann A, Lindhorst D, Schumann P, et al. Additive effect of mesenchymal stem cells and VEGF to vascularization of PLGA scaffolds [J]. Microvasc Res, 2013, 90 (1):71-79.
- 8 Wang L, Zhou R, Zhao Y, et al. MACC-1 promotes endothelium-dependent angiogenesis in gastric cancer by activating TWIST1/VEGF-A signal pathway[J]. PLoS One, 2016, 11(6):e0157137.
- 9 杨亚冬,张文元,赵佳骏,等.骨髓间充质干细胞联合血管内皮生长因子移植治疗糖尿病兔下肢缺血实验研究[J].医学研究杂志,2015,44(6):47-51.
- 10 Tischfield MA, Robson CD, Gilette NM, et al. Cerebral vein malforma-

tions result from loss of twist1 expression and BMP signaling from skull progenitor cells and dura [J]. Dev Cell, 2017, S1534-5807 (17):30628-30627.

- 11 Berendsen AD, Olsen BR. Regulation of adipogenesis and osteogenesis in mesenchymal stem cells by vascular endothelial growth factor A [J]. J Intern Med, 2015, 277 (6):674-680.
- 12 吴莉,赵娟,柯腾飞,等.自体内皮祖细胞促进组织工程骨血管化的体内外实验研究[J].重庆医学,2016,45(2):159-163.
- 13 Ke X, Zou J, Hu Q, et al. Hydrogen sulfide-preconditioning of human endothelial progenitor cells transplantation improves re-endothelialization in nude mice with carotid artery injury [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 43(1):308-319.

(2017-09-15 收稿 2018-01-18 修回)