

· 论 著 ·

富血小板血浆凝胶联合脂肪干细胞促进大鼠创面修复的实验研究

金长鑫¹, 吴 琼², 刘 烨³, 刘 波⁴, 刘 卫⁵, 黄进军³

[摘要] 目的 探讨富血小板血浆(PRP)凝胶联合脂肪干细胞(ADSCs)对大鼠创面修复的影响,为其临床应用提供理论基础。**方法** 体外分离、培养、鉴定大鼠 ADSCs。取 16 只 SD 大鼠,制备大鼠自体 PRP 凝胶,采用自身对照的方法,每只实验大鼠背部制作 4 个 1 cm² 的正方形皮肤全层缺损创面,分为 AP 组、A 组、P 组、O 组,分别给予 ADSCs+PRP 处理、ADSCs 处理、PRP 处理以及空白对照处理,观察术后各组创面愈合情况。并于术后 3、5、7、14 d 分别随机处死 4 只实验大鼠,取创面组织,HE 染色进行病理组织学观察,血小板-内皮细胞黏附分子(CD31)免疫组化分析各时间点新生血管化情况,天狼猩红染色对 I 型胶原含量和 III 型胶原含量进行检测,并对创面组织的转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 表达情况进行逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测。**结果** 大体观察 AP 组和 P 组较 A 组和 O 组结痂快、创缘收缩也较快;微血管计数 CD31 细胞阳性表达率及 I 型胶原蛋白含量 AP 组、A 组、P 组均高于 O 组,且 AP 组与 O 组差异更为显著,差异有统计学意义($P < 0.05$);创面愈合过程中,AP 组创面组织的 TGF- $\beta 1$ 表达也明显高于空白对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** ADSCs 与 PRP 凝胶的应用能加速新生血管化及增加胶原蛋白合成,可有效加速创面愈合。

[关键词] 脂肪干细胞;富血小板血浆凝胶;皮肤缺损;创面修复

[中图分类号] R641 **[文献标志码]** A **doi:**10.3969/j.issn.1672-271X.2016.04.004

Thereseach of platelet rich plasma gel combined with adipose-derived stem cells in repairing soft tissue wounds in rats

JIN Chang-xin¹, WU Qiong², LIU Ye³, LIU Bo⁴, LIU Wei⁵, HUANG Jin-jun³. 1. Department of Plastic Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shanxi 710032, China; 2. Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510282, China; 3. Department of Plastic and Aesthetic Surgery, 4. Department of Infection Diseases, 5. Department of Gastroenterology, 105 Hospital of PLA, Hefei, Anhui 230031, China

[Abstract] **Objective** To explore the role of ADSCs and PRP in skin defect repairing, and to provide theoretical basis for clinical application. **Methods** Adipose tissues from inguinalis fat pad of SD rats were harvested, isolated, cultured, and identified. 16 SD rats were taken, and autologous PRP gel was prepared. 4 square shaped full-thickness skin defect ($a = 1 \text{ cm}^2$) was made on the rat back using self-control method. The wounds were divided into 4 groups randomly, of which group AP was treated with ADSCs and PRP; group A was treated with ADSCs; group P was treated with PRP and group O is blank control group. The wound healing process was observed. HE, sirius red, CD31 stain were observed at 3 d, 5 d, 7 d, 14 d after surgery. TGF-beta 1 expression was detected by Rt-PCR in wound tissue. **Results** The wound contraction of group AP and group P were faster than the group A and O; CD31 positive expression rate and content of type I collagen of microvascular counts in group A, group P and group AP were higher than that of O group. There was significant difference between group AP and group O ($P < 0.05$). In the process of wound healing, the expression of TGF - beta 1 in wound tissue of group AP was significantly higher than the blank control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Application of ADSCs cominned with PRP gel by means of accelerating new blood vessels and increasing collagen synthesis can effectively accelerate wound healing.

[Key words] adipose stem cell; platelet-rich plasma gel; skin defects; wound healing

基金项目: 南京军区医药科研项目(12MA033)

作者单位: 1. 710032 陕西西安,第四军医大学西京医院整形外科;2. 510280 广东广州,南方医科大学珠江医院整形外科;3. 230031 安徽合肥,解放军 105 医院整形美容外科;4. 感染科;5. 消化科

通讯作者: 黄进军, E-mail: surgeonhuangjj@163.com

引用格式: 金长鑫, 吴 琼, 刘 烨, 等. 富血小板血浆凝胶联合脂肪干细胞促进大鼠创面修复的实验研究 [J]. 东南国防医药, 2016, 18(4): 349-353.

战伤是军事医学的重点研究对象,由于战伤导致的皮肤与软组织缺损,将直接影响战斗力和战士战后的生活质量,是亟待解决的课题之一。脂肪干细胞(ADSCs)可增加真皮细胞外基质中胶原的合成,促进皮肤创面愈合^[1];富血小板血浆(PRP)在血管发生、组织修复和炎症过程中也起重要作用,促进创面愈合。本实验研究通过建立皮肤全层

缺损的动物模型,观察应用 ADSCs 和富血小板血浆修复皮肤全层缺损后创面愈合、组织学变化,对创面组织的血小板-内皮细胞黏附分子(CD31)的表达、转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 的表达以及 I 型胶原和 III 型胶原含量进行检测。探讨 ADSCs 和 PRP 促进战伤创面愈合的机制,为其临床应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和设备 DMEM/F12 培养基,含 EDTA 0.25% 胰蛋白酶(美国 Hyclone 公司),PBS 缓冲液(美国 Hyclone 公司),DMEM 溶液,一抗 CD31 (abcam, ab28364),二抗 Envision, anti-rabbit-HRP (DAKO, K4003),DAB 染色液(DAKO, K5007),天狼猩红染色混合液,TRE-Trizol (Invitrogen),Primers (上海生工),PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa),SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa),CO₂ 培养箱(Heraeus, German),拍照系统(Olympus, DP71),高速冷冻离心机(SIGMA 3K15,德国 SIGMA 公司),Real Time PCR 仪(CFX96,美国 Bio-Rad 公司)等。

1.2 方法

1.2.1 SD 大鼠 ADSCs 体外分离、培养与扩增 取 4 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠,使用水合氯醛(7%, 0.3 mL/100 g)腹腔注射麻醉,取两侧腹股沟脂肪垫组织,用 PBS 缓冲液反复漂洗去除组织中的小血管、外包膜和明显的结缔组织,剪碎至糜状。0.2% 一型胶原酶恒温消化 40~50 min。采用基础培养液中和一型胶原酶后,以 1500 r/min 离心 10 min(离心机半径为 15 cm),弃杂质及上清后,沉淀混悬后 200 目滤网过滤,再以 1000 r/min 离心 5 min,弃上清,含 10% FBS 的 DMEM/F12 混悬细胞后,按细胞数 $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^4$ 个/培养瓶接种于 25 cm² 培养瓶中,培养瓶中加入 3 mL 全培,置入 37 °C,5% CO₂ 及饱和湿度恒温培养箱中培养,48 h 换液,后每 3~4 d 换液一次,倒置显微镜下观察细胞生长情况,原代细胞培养 6~7 d 后细胞融合达 80%~90% 时进行传代。细胞传代时弃去原培养液,PBS 洗涤 1 次,以去除血清,加入适量 0.25% 胰蛋白酶+0.03% EDTA 进行消化,在倒置显微镜下观察见胞质回缩、细胞间隙增大,细胞变圆,立即加入适量完全培养基终止消化,用吸管反复轻柔吹打,将细胞吹打下来,1000 r/min 离心 5 min,含 10% 胎牛血清,1% 青、链霉素原液的高糖 DMEM 培养基重悬沉积细胞,按 1 传 3 的比例进行传代。当传代细胞生长接近单层汇

合达到 70% 以上时,可继续传代。

1.2.2 ADSCs 多能分化及流式细胞表面标记物的鉴定 取生长良好的第 3 代细胞消化后,以 5×10^4 /mL 接种于放有玻片的 6 孔板中,分别加入成脂及成骨分化诱导液培养基进行诱导分化,每 3 d 更换诱导培养基 1 次;成脂诱导分化组进行诱导分化处理后 2 周行油红 O 染色倒置显微镜下观察,成骨诱导分化组进行诱导分化处理后 4 周后行茜素红染色观察鉴定。

1.2.3 PRP 凝胶的制备 利用改良 Cascade-Esforax 法制备 PRP^[2-4],用 Ca²⁺ 激活制成 PRP 凝胶^[5]。7% 水合氯醛(0.3 mL/100 g)经腹腔内注射成功麻醉大鼠后,用装有 0.3 mL 4% 枸橼酸钠抗凝剂的 5 mL 注射器连接硬膜外管进行颈静脉插管抽取大鼠静脉血 3 mL,将抽取的静脉血等分两份分别以 1100 g 离心 10 min,之后分别加入 0.15 mL 50 mg/mL 氯化钙激活,静置后,取出中间层的淡黄色凝胶,即 PRP 凝胶备用。

1.2.4 大鼠皮肤软组织缺损创面模型的构建与分组 造模前 10 min 将 ADSCs 自培养瓶中消化下来,以 DMEM 溶液混悬,制成 ADSCs 为 3×10^6 /mL 的 DMEM 混悬液备用。大鼠在提取 PRP 后,在其背部正中脊柱两侧相距 2 cm 处,等距分别设计四个边长为 1 cm 的方形创面,全背部用 1% 碘伏消毒 3 次后,沿标记线全层切除皮肤,形成皮肤软组织缺损创面,并用硅胶板对创面边缘进行固定,防止创面愈合早期过度收缩,同一只大鼠背部四个创面进行随机分组,AP 组为 ADSCs+PRP 处理组,A 组为 ADSCs 处理组,P 组为 PRP 处理组,O 组为空白对照组。

1.2.5 组织标本的制备与处理 术后 3、5、7、14 d 分别处死四只大鼠,取愈合组织及其周围部分组织,使用 4% 甲醛固定,脱梯度脱水、浸蜡、包埋后制成约 5 μ m 厚的切片。使用 HE 染色对愈合后的创面组织进行组织病理学观察。使用 CD31 免疫组化染色,衡量新生微血管密度。可视化量化 I 型和 III 型胶原蛋白的比例,使用天狼星红染色,偏振光下观察两种胶原蛋白的比例。I 型胶原纤维呈现红色或黄色,III 型胶原蛋白呈现绿色。提取各时间点各组愈合组织中的核糖核酸(RNA),逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测其中 TGF- $\beta 1$ 的表达情况。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析,采用单因素方差分析,各组间的两两比较采用 Bonferroni 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ADSCs 体外诱导多向分化及流式细胞鉴定 第 3 代细胞置于培养基诱导分化 2 周后细胞

体积增大,胞浆内充满圆形脂滴呈葡萄串状,这时进行油红 O 染色阳性;圆形细胞内出现亮红色的颗粒,说明细胞可向脂肪细胞分化。成骨分化培养基内诱导分化 4 周后,经茜素红染色阳性,可见红色钙结节,证明成骨诱导后细胞可向成骨细胞系分化。流式细胞分析显示细胞表型为 CD29、CD90 阳性, CD34、CD45 阴性,与 ADSCs 表型相符。见图 1、图 2。

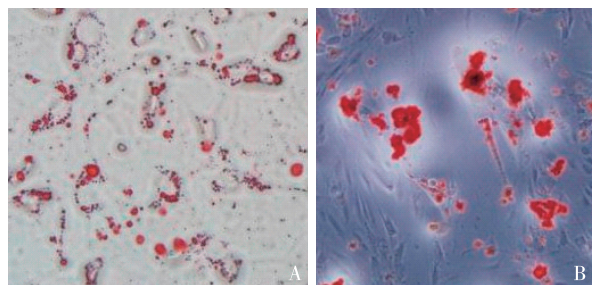


图 1 A:ADSCs 体外诱导 ADSCs 成脂诱导分化,2 周后油红 O 染色($\times 200$);B:ADSCs 成骨诱导分化,4 周后茜素红染色($\times 200$)

2.2 大体观察结果 实验第 3 天,肉眼观察下可见 AP、P 组表面可见覆盖 PRP 凝胶处形成淡红色血痂,且该两组创面较 A 组、O 组干燥;实验第 7 天,肉眼观察到创面大小、深度 AP 组<P 组<A 组<O 组。第 14 天时,各组创面几乎完全愈合。

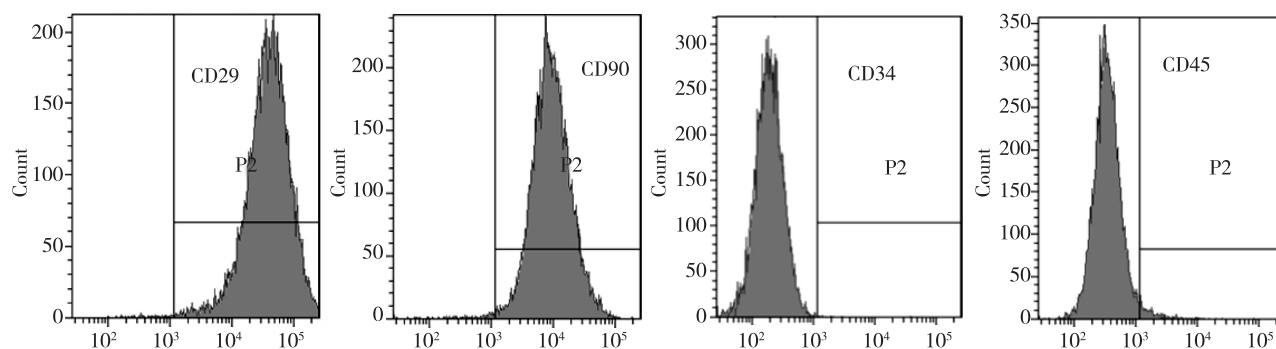
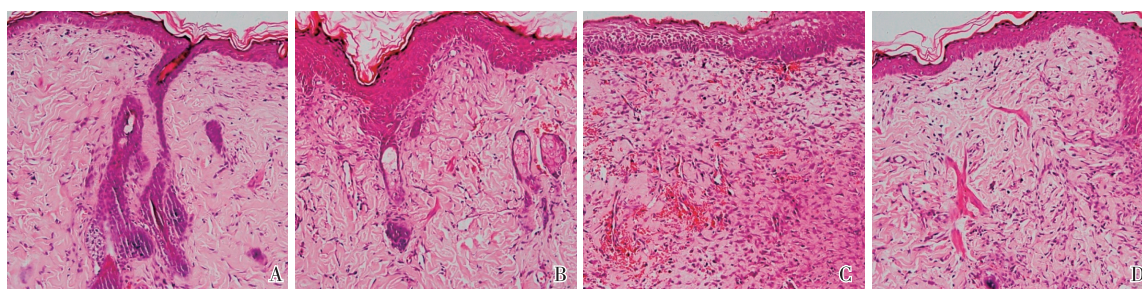


图 2 流式细胞表型鉴定:CD29、CD90 阳性,CD34、CD45 阴性



A:ADSCs+PRP 组;B:PRP 组;C:ADSCs 组;D:空白对照组

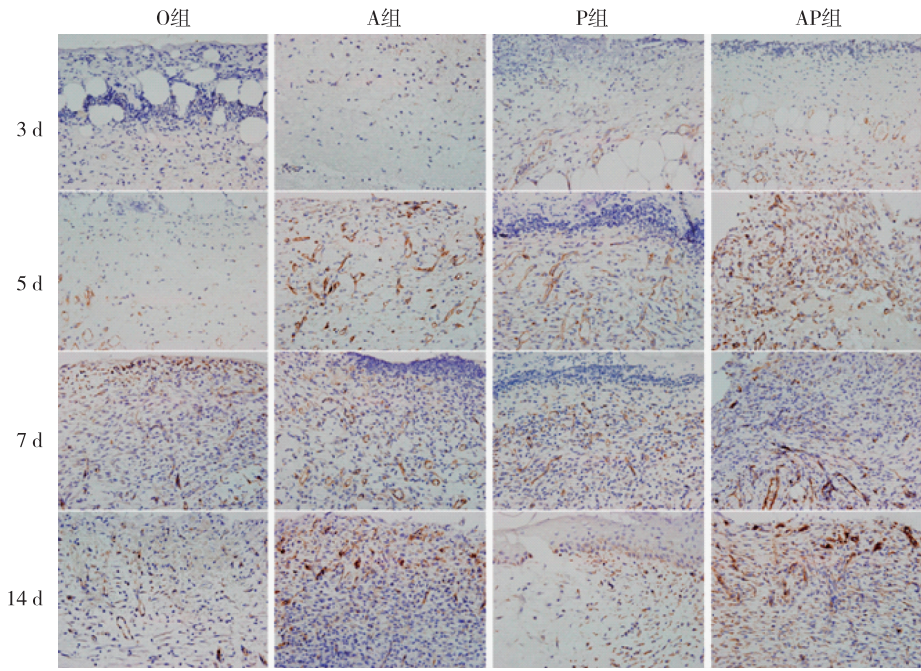
图 3 术后第 14 天,各组 HE 染色($\times 100$)

2.3 组织学分析

2.3.1 HE 染色组织学分析 观察创面愈合后组织切片,AP 组腺体样结构层次分明,新生血管较多,胶原纤维排列与正常皮肤组织类似;A 组腺体样结构较多,新生血管较 AP 组少,胶原纤维排列较 AP 组紊乱;P 组新生毛细血管较多,腺体样结构较少,但其胶原纤维排列有序;O 组新生血管形成,视野里被紊乱排列的胶原纤维填充,腺体样组织较少。见图 3。

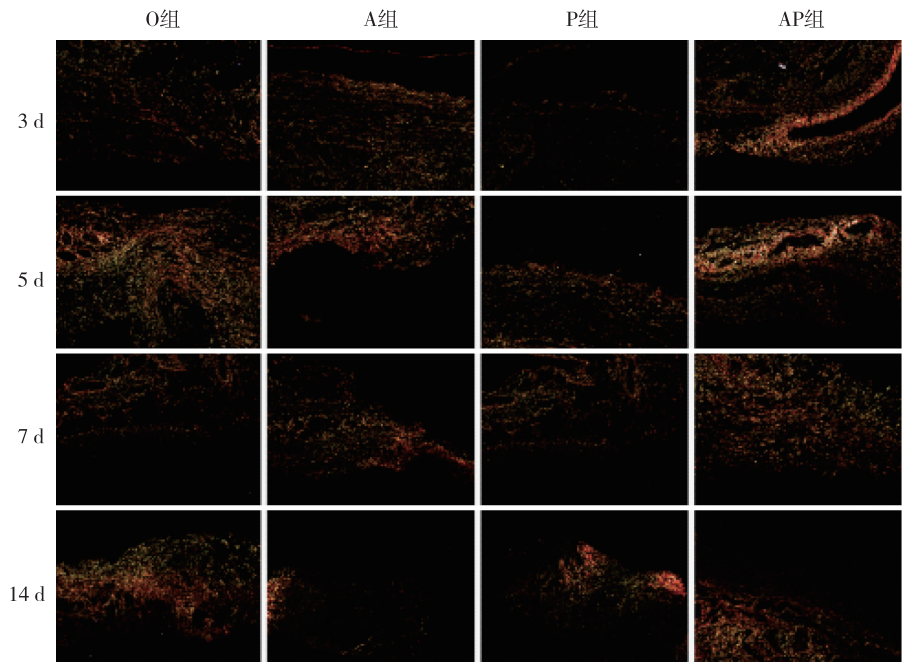
2.3.2 CD31 染色观察微血管密度 各组随着时间的迁移 CD31 阳性表达率呈上升趋势,其中术后第 14 天,ADSCs+PRP 组与其他 3 组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 4。

2.3.3 胶原蛋白合成分析 I 型胶原蛋白,在天狼星红染色过程中被染成红色或黄色,是各组创面含量最为丰富的胶原蛋白。III 型胶原蛋白(未成熟的胶原蛋白、被染成绿色)含量较少。结果显示 I 型胶原含量在 14 d 内随着时间的迁移而增加,其中 3 d 时,除 A 组与 P 组组间差异无统计学意义($P>0.05$),其余各组间差异均有统计学意义($P<0.05$),即 AP 组 I 型胶原蛋白含量较其余三组高,A 组、P 组 I 型胶原蛋白含量均较 O 组高;5 d 时,除 A 组与 P 组组间差异无统计学意义($P>0.05$),其余各组间差异均有统计学意义($P<0.05$),即 AP 组 I 型胶原蛋白含量较其余三组高,A 组、P 组 I 型胶原蛋白含量均较 O



O 组:空白对照组;A 组:ADSCs 组;P 组:PRP 组;AP 组:ADSCs+PRP 组

图 4 各组各时间点创面组织的 CD31 染色(×100)



O 组:空白对照组;A 组:ADSCs 组;P 组:PRP 组;AP 组:ADSCs+PRP 组

图 5 各组各时间点创面组织的天狼猩红染色(×100)

组高;7 d, AP 组、A 组、P 组、O 组各组间差异均有统计学意义($P<0.05$), 即 I 型胶原蛋白含量 AP 组>P 组>A 组>O 组;14 d 时, AP 组、A 组、P 组、O 组各组间差异均有统计学意义($P<0.05$), 即 I 型胶原蛋白含量 AP 组>A 组>P 组>O 组。见图 5。

2.4 TGF- β 1 含量的 RT-PCR 检测结果 各组 TGF- β 1 的表达在术后第 1 周内均呈上升趋势, AP 组、A

组及 P 组的上升情况高于 O 组, 其中 AP 组上升更为明显;在术后第 2 周时 TGF- β 1 的表达下降, AP 组下降较为显著, 与 O 组差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨 论

3.1 PRP 联合 ADSCs 可有效促进新生血管再生 许多成熟组织中含有干细胞, 用于组织损伤

修复过程。自脂肪组织中分离干细胞已有十几年,并且越来越多地用于临床前和临床模型,ADSCs 可提供有效的血管生成生长因子,包括血管内皮生长因子、成纤维细胞生长因子、肝细胞生长因子等,促进病灶的新生血管化。大量实验研究发现单一的生长因子不会促进细胞增殖及细胞转移,只有当多种细胞因子结合在一起时才能发挥作用,促进创面愈合。而 PRP 是全血经离心后得到的血小板浓缩物,被 Ca^{2+} 激活后,可释放大量的生长因子,如血小板衍生生长因子(PDFG)、转化生长因子- β (TGF- β)和类胰岛素生长因子 1(IGF-1)等^[6]。本实验中我们发现,ADSCs 联合 PRP 凝胶使局部创面组织血管化的程度优于单纯 ADSCs 组及 PRP 组。这种差异在我们第 2 周的研究中更加明显。值得注意的是,PRP 凝胶对 ADSCs 在新生血管化方面起着协同作用,并且可能加强了 ADSCs 的增殖及对生长因子的分泌。

3.2 PRP 联合 ADSCs 可增加胶原蛋白合成 皮肤的强度及耐力主要与真皮中胶原蛋白的组成有关,通常起主要作用的是 I 型胶原蛋白(85%~95%),其次是 III 型胶原蛋白(10%~15%)。在本研究中,我们发现,ADSCs 联合 PRP 凝胶组 I 型胶原蛋白的含量较其他几组明显增加。这种差异在第 2 周时更为明显,表明胶原蛋白再生已经加速,并形成了高质量的瘢痕。之前有研究可以解释该结果的产生,ADSCs 可通过 TGF- β 等细胞因子调控其旁分泌作用,从而加速成纤维细胞的迁移和增殖^[7-8]。TGF- β 是一种多功能蛋白质,作用于细胞增殖、分化和细胞外基质分泌,参与调控生物体免疫调节、血管形成、胚胎发育、创伤愈合骨的重建等生理过程。其中 TGF- β 1 有动物实验表明它可以促进伤口愈合和典型肉芽组织形成等^[9-10]。亦有实验证明 TGF- β 1 治疗可以提高 I、III 型胶原 mRNA 的表达^[11]。所以 TGF- β 1 在治疗伤口愈合方面有潜在的应用前景。在本实验中可见在 AP 组、A 组 P 组及 O 组 TGF- β 1 的表达在术后第 1 周内均呈上升趋势,且 AP 组较其他各组增加尤为明显,而在术后第 2 周时表达下降,这一结果可能和 TGF- β 1 在预防瘢痕方面有关。研究认为 TGF- β 1 这种细胞因子的过度表达可以致瘢痕形成,而在创面愈合后期适当的抑制可以减少

瘢痕的产生^[12]。这种现象说明 PRP 联合 ADSCs 可以通过改变 TGF- β 1 的提前表达加速创面组织的愈合,同时后期表达的下降可以减少瘢痕组织的形成。

综上所述,本研究结果表明,联合 ADSCs 与 PRP 凝胶的应用能加速新生血管化及增加胶原蛋白合成,可有效加速创面愈合。未来的实验可侧重于如何完整上皮化的研究,从而使这项技术早日应用于临床。

【参考文献】

- [1] 杨爱珍,文 献,张志敏,等.脂肪源性干细胞的临床转化研究[J].东南国防医药,2013,15(5):503-507.
- [2] Anitua E, Andia I, Ardanza B, et al. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration[J]. Thromb Haemost, 2004, 91(1):4-15.
- [3] Azzena B, Mazzoleni F, Abatangelo G, et al. Autologous platelet-rich plasma as an adipocyte in vivo delivery system: case report[J]. Aesth Plast Surg, 2008, 32(1):155-158.
- [4] Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants[J]. Int J Oral Maxillofac Implants, 1999, 14(4):529-535.
- [5] Cervelli V, Gentile P, Scioli MG, et al. Orlandi A application of platelet-rich plasma in plastic surgery: clinical and in vitro evaluation[J]. Tissue Eng Part C Methods, 2009, 15(4):625-634.
- [6] Soffer E, Ouhayoun JP, Anagnostou F. Fibrin sealants and platelet preparations in bone and periodontal healing[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2003, 95(5):521-528.
- [7] Kim WS, Park BS, Sung JH, et al. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: A critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts[J]. J Dermatol Sci, 2007, 48(1):15-24.
- [8] Kim WS, Park BS, Park SH, et al. Antiwrinkle effect of adipose-derived stem cell: Activation of dermal fibroblast by secretory factors[J]. J Dermatol Sci, 2009, 53(2):96-102.
- [9] Hou Y, Mao Z, Wei X, et al. The roles of TGF-beta1 gene transfer on collagen formation during Achilles tendon healing[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 383(2):235-239.
- [10] Hou Y, Mao Z, Wei X, et al. Effects of transforming growth factor-beta1 and vascular endothelial growth factor 165 gene transfer on Achilles tendon healing[J]. Matrix Biol, 2009, 28(6):324-335.
- [11] Kashiwagi K, Mochizuki Y, Yasunaga Y, et al. Effects of transforming growth factor-beta1 on the early stages of healing of the achilles tendon in a rat model[J]. Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg, 2004, 38(4):193-197.
- [12] Chang J, Thunder R, Most D, et al. Studies in flexor tendon wound healing: neutralizing antibody to TGF-b1 increases postoperative range of motion[J]. Plast Reconstr Surg, 2000, 105(1):148-155.

(收稿日期:2016-02-23;修回日期:2016-05-04)

(本文编辑:黄攸生; 英文编辑:王建东)