

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.25.003

负压创面治疗术对大鼠脂肪干细胞迁移行为的影响*

李晓明¹, 刘 苹¹, 汪 超², 杨佳佳¹, 姚仕采², 张 波^{1△}

(1. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所, 重庆 400042; 2. 重庆医科大学附属儿童医院 PICU/ 儿童发育疾病研究教育部重点实验室, 重庆 400014)

[摘要] **目的** 探讨负压创面治疗术(NPWT)对大鼠脂肪干细胞(ADSCs)迁移行为的影响。**方法** 8 头体质量为(20±2) kg 巴马小香猪, 分别接受假手术(A 组, n=16)、持续负压吸引(B 组, n=8)和间歇负压吸引(C 组, n=8), 治疗 72 h 后观察 3 个月。细胞水平观察 NPWT 对 ADSCs 迁移行为的影响, 提取大鼠 ADSCs, 采用 8 h 持续负压吸引和间歇负压作用于 ADSCs, Transwell 检测 ADSCs 迁移能力, MTT 检测细胞增殖能力, Western blot 法检测缺氧诱导因子 1α(HIF-1α)的表达。**结果** B 组和 C 组创面愈合效果明显优于 A 组; 与 A 组比较, B、C 组 ADSCs 细胞迁移数量差异均有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$), 而细胞增殖差异均无统计学意义($P>0.05$); HIF-1α 表达与 ADSCs 细胞迁移结果一致。**结论** NPWT 通过上调 HIF-1α 蛋白表达进而促进大鼠 ADSCs 迁移。

[关键词] 负压创面治疗术; 脂肪干细胞; 迁移

[中图法分类号] R649.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)25-3463-03

Effect of negative-pressure wound therapy on adipose-derived stem cells migration behavior*

Li Xiaoming¹, Liu Ping¹, Wang Chao², Yang Jiajia¹, Yao Shicai², Zhang Bo^{1△}

(1. Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042; 2. Pediatric Intensive Care Unit Affiliated Children's Hospital of Chongqing Medical University/ Key Laboratory of Child Developmental Diseases, Ministry of Education, Chongqing 400014, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of negative-pressure wound therapy (NPWT) on the migration behavior of rat adipose-derived stem cells (ADSCs). **Methods** Eight (20±2) kg Bama miniature pigs respectively received the sham operation (group A, n=16), continuous negative pressure suction (group B, n=8) and intermittent negative pressure suction (group C, n=8). The pigs were observed for 3 months after 72 h treatment. The effect of NPWT on the migration behavior of ADSCs was observed at the cellular level. In order to avoid the influence of serum-free on cell viability, ADSCs were extracted and treated with continuous negative pressure suction or intermittent negative pressure suction for 8 h. The migration ability of ADSCs was detected by transwell. The proliferation ability of ADSCs was detected by MTT. The expression of hypoxia inducible factor-1α (HIF-1α) was detected by Western blot. **Results** The wound healing effect of continuous negative pressure suction group and intermittent negative pressure suction group was better than that of the control group, and compared with the control group, the number of migrating ADSCs cells had statistically significant difference ($P<0.05$, $P<0.01$), but cell proliferation had no statistically significant difference. The expression of HIF-1α was consistent with the migration results of ADSCs. **Conclusion** NPWT can promote the migration of rat ADSCs by up-regulating HIF-1α protein expression.

[Key words] negative-pressure wound therapy; stem cells; migration

创面难愈是目前医学界关注的热点和难点, 尤其是糖尿病足、压迫性溃疡等症状, 严重影响着人们的健康。负压创面治疗术(negative-pressure wound therapy, NPWT)作为一种加快患者创面愈合的新方法, 多应用于难愈性创面的治疗并在临床治疗中取得了很好的疗效, 但其作用机制尚不明确^[1-2]。脂肪干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)具有多向分化潜能、取材方便、来源充足等优点, 被称为修复治疗中的“种子细胞”, 有研究表明, 局部移植 ADSCs 可有效促进皮肤创面组织修复^[3-5]。因此, 假设 NPWT 可通过上调 ADSCs 迁移, 进而促进皮肤创面组织修复, 缩短创面愈合时间。本实验主要目的在于观察 NPWT 对大鼠 ADSCs 迁移行为的影响, 进一步探讨 NPWT 促进创面愈合的作用机制, 以便更好地将 NPWT 应用于难愈性创面相关疾病的研究及治疗。

1 材料与方法

1.1 实验动物 8 头巴马小香猪, 雌雄不限, 体质量(20±2) kg; 10 只雌性 3 月龄 SD 大鼠, 体质量(200±20)g。动物由第三军医大学大坪医院野战外科研究所动物实验中心提供, 动物使用许可证号: SYXK(渝)2012-0010。

1.2 仪器与试剂 仪器主要包括组织匀浆器(德国 Miltenyi), 8 MV Precise 医用直线加速器(瑞典 Elekta), 负压引流仪(山东威高), 低温离心机(美国 Thermo), 电泳仪(美国 Bio-Rad), 凝胶成像仪(美国 Bio-Rad), 核酸蛋白定量仪(美国 Thermo)。试剂主要包括 BSA(武汉博士德生物), MTT(美国 Hyclone), 结晶紫(成都科龙), 0.4 μm Transwell 小室(美国 Corning), 蛋白酶抑制剂(美国 Roche), cDNA 试剂盒(大连宝生物), 缺氧诱导因子 1α(hypoxia-inducible factor 1-alpha,

* 基金项目: 中国科学院-威高集团高技术研究发展计划(ZKYWG2013-05) 作者简介: 李晓明(1988—), 硕士, 助理实验师, 主要从事创伤修复、再生医学研究。△ 通信作者, E-mail: zhangbo67184@163.com。

HIF-1 α)抗体(北京博奥森),GAPDH 抗体(北京博奥森),辣根过氧化物酶山羊抗兔(联科生物),聚偏氟乙烯(PVDF)膜(美国 Millipore),增强型 ECL 显色液(美国 Thermo),BCA 试剂盒(碧云天)。

1.3 方法

1.3.1 分组及难愈性创面模型制备 小香猪在动物实验前 12 h 禁食,10 mg/kg 氯胺酮快速麻醉,5~10 min 后肌肉注射 0.5 mg/kg 地西洋和 25 mg/kg 阿托品,后续视动物麻醉情况按 0.2 g/kg 肌肉注射追加 15 g/L 戊巴比妥钠。将小香猪背部剃毛,采用直线加速器照射脊柱两侧 4 cm 区域,创面照射剂量 20 Gy。备皮打孔,形成直径 4 cm、深度为 0.8 cm 皮肤全层缺损。每头小香猪单侧 2 个创面,共 4 个创面,一侧作为对照组接受假手术(A 组, $n=16$),另一侧分别接受 120 mm Hg 持续负压吸引(B 组, $n=8$)和 120 mm Hg 间歇负压吸引(C 组, $n=8$)治疗 72 h 后,观察 3 个月。

1.3.2 ADSCs 分离与培养 采用 0.5 mL/100 g 肌肉注射速眠新对 SD 大鼠进行麻醉;用剃毛器去除腹股沟表皮毛发,局部消毒,切开皮肤,取皮下脂肪组织;用生理盐水和 PBS 液冲洗脂肪组织块 3 次,以洗去血迹;采用组织剪将组织块搅碎,呈糊状;将浓度为 0.075% 的 2~3 倍体积 I 型胶原酶加入搅碎的组织块中消化 60~90 min;然后用 50 目的滤网过滤脂肪组织,滤液进行 1 000 r/min 离心 10 min;弃上清液,得到的细胞沉淀用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基溶液重悬;调整细胞浓度为 1×10^5 /mL,接种于 25 cm² 培养瓶中;37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养;24 h 后全量换液,弃去未贴壁细胞,以后根据细胞生长情况,每 3 天换 1 次液,待细胞达到 80% 融合时用 0.25% 胰酶消化传代,隔天换液;倒置相差显微镜观察记录培养细胞生长情况。本课题组前期工作已对该方法提取的 ADSCs 进行了鉴定,因此本文未进行进一步探讨^[6]。

1.3.3 Transwell 迁移实验 将细胞制备成单细胞悬液,计数并调节细胞浓度,将 Transwell 上室加入 20 000 个细胞,下室加入含 1% 血清培养基,使用不同负压模式作用于 Transwell 小室。在孵箱中静置 8 h 后,使用棉球轻轻将膜上层未迁移过去的细胞擦掉,倒置晾干;使用 0.1% 结晶紫室温染色 30 min;细胞进行染色后用 PBS 清洗,晾干;在显微镜下挑选 5 个视野,拍照并计数。

1.3.4 细胞活性检测 将细胞消化计数,按一定密度接种至 24 孔板中,待细胞贴壁后,去除培养基,使用 PBS 清洗并加入无血清培养基,置于孵箱内孵育 8 h 后,将每孔中分别加入 60 μ L 的 MTT 溶液,然后置于孵箱中孵育 4 h 后轻轻吸掉培养基,再在孔中分别加入 300 μ L DMSO,置于摇床上摇 5 min;在

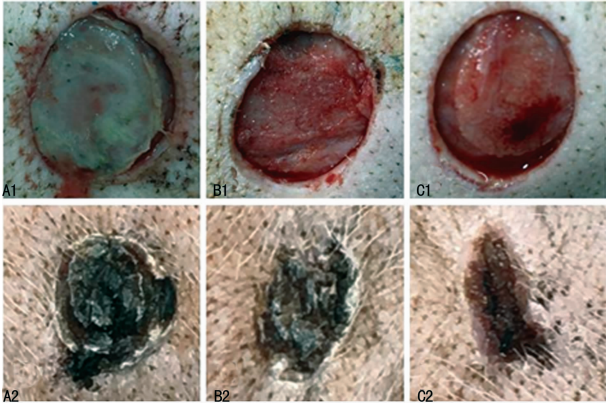
490 nm 波长下使用酶标仪检测吸光度(A)值。

1.3.5 Western blot 检测 收集蛋白样品,用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。蛋白上样量为每孔 20 μ g,电泳过程中,跑 60 V 浓缩胶尽量保持 1 h 以上,110 V 分离胶大概所需 2.5 h,待溴酚蓝跑至底部后,暂停电泳仪;200 mA 下持续 100 min 电转至 PVDF 膜上。5% BSA 溶液中封闭 1 h,TBST 洗涤 3 次,将 PVDF 膜置于含有 HIF-1 α (1 : 1 000)、GAPDH 抗体(1 : 1 000)的 5% BSA 中,4℃ 摇床孵育过夜,次日加入 HRP 抗体室温孵育 2 h,显影。用 Image J 软件(美国国立卫生研究院)进行灰度分析,结果以目的蛋白与甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)平均吸光度值的比值表示。

1.4 统计学处理 应用 SPSS17.0 统计软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间比较采用 *t* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

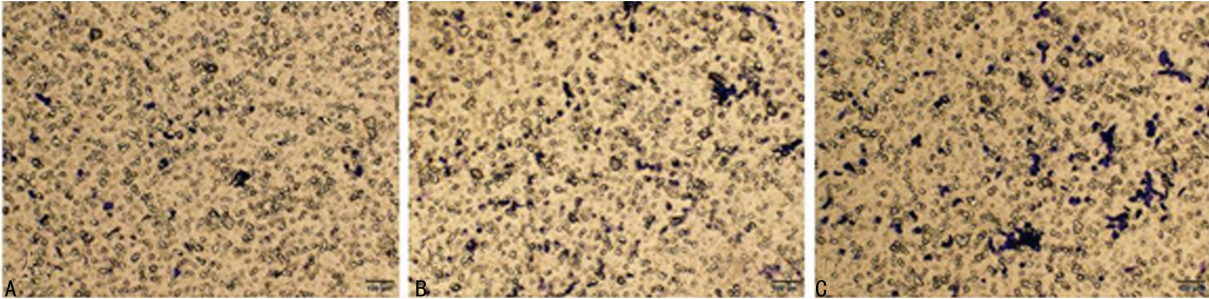
2.1 NPWT 对难愈性创面愈合的影响 NPWT 治疗难愈性创面 72 h 后,A 组肉芽组织较晦暗,B 组和 C 组肉芽组织鲜红,呈细颗粒状。治疗 21 d 后 A 组创面大小未见明显变化,B 组和 C 组创面明显收缩,且 C 组愈合程度优于 B 组,见图 1。



A1~C1:负压吸引 72 h 后小香猪创面图;A2~C2:负压吸引 21 d 后小香猪创面图(A1、A2 为对照组,B1、B2 为持续负压吸引组,C1、C2 为间歇负压吸引组)

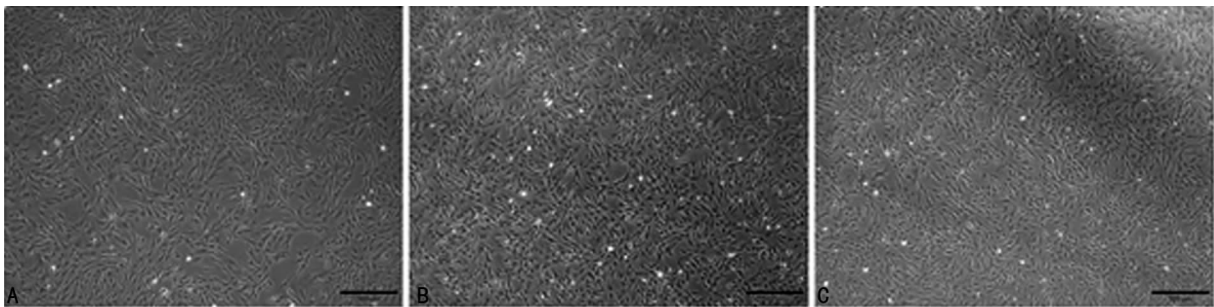
图 1 不同 NPWT 模式对难愈性创面愈合的影响

2.2 NPWT 对大鼠 ADSCs 迁移行为的影响 采用 Transwell 法检测不同负压创面治疗模式作用 ADSCs 8 h 后迁移变化情况,结果显示:B 组、C 组与 A 组相比,ADSCs 细胞迁移数量增加且差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$);B 组与 C 组相比差异有统计学意义($P<0.01$),且迁移数量低于 C 组,见表 1、图 2。



A:对照组;B:持续负压吸引组;C:间歇负压吸引组

图 2 不同 NPWT 模式对大鼠 ADSCs 迁移行为的影响($\times 100$)



A:对照组;B:持续负压吸引组;C:间歇负压吸引组

图 3 不同 NPWT 模式对大鼠 ADSCs 增殖行为的影响

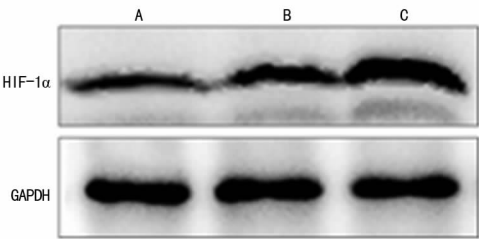
2.3 NPWT 对大鼠 ADSCs 增殖行为的影响 采用 MTT 法检测不同负压创面治疗模式作用 ADSCs 8 h 后细胞增殖变化情况,结果显示:B 组、C 组与 A 组之间 ADSCs 细胞增殖差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 1、图 3。

2.4 Western blot 检测大鼠 ADSCs HIF-1 α 表达 经与内参 GAPDH 对比后,B 组(0.62 ± 0.09)、C 组(1.39 ± 0.27)与 A 组(0.47 ± 0.07)相比 HIF-1 α 表达增加且差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$);B 组与 C 组相比差异有统计学意义($P<0.01$),且 HIF-1 α 表达低于 C 组,见图 4。

表 1 不同 NPWT 模式对大鼠 ADSCs 迁移、增殖行为的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	迁移(个)	增殖(A 值)
A 组	24.25 \pm 7.37	0.33 \pm 0.02
B 组	41.00 \pm 10.55 ^{ac}	0.33 \pm 0.01
C 组	68.75 \pm 9.11 ^b	0.32 \pm 0.02

^a: $P<0.05$,^b: $P<0.01$,与 A 组比较;^c: $P<0.01$,与 C 组比较



A:对照组;B:持续负压吸引组;C:间歇负压吸引组

图 4 HIF-1 α 在 ADSCs 中的表达

3 讨 论

NPWT 是近年来创立并开展的创面治疗新方法,被广泛应用于各种急性或慢性复杂难愈性创面,我国最早由裘华德教授引进并改良后应用于骨科和普通外科患者。NPWT 可避免化学药物治疗可能引起的不良反应,较常规开放式换药,具有创面愈合快、感染率低、更换敷料次数少等优点,但其促进创面愈合的确切作用机制尚未完全清楚^[1,7]。NPWT 可分为持续负压吸引、间歇负压吸引及变压负压吸引,目前临床常采用持续负压吸引,这种治疗模式的优点是简单方便、易操作,而欧美负压创伤治疗学会的基础理论研究显示:间歇负压吸引更加有利于肉芽组织再生,加速创伤愈合过程,本研究采用不同负压吸引模式治疗结果显示,间歇负压吸引组创面愈合效果明显优于对照组和持续负压吸引组,这与同类型研究结果相吻合^[8-9]。

ADSCs 作为一种存在于人或动物不同部位脂肪组织中的“种子细胞”,可明显加快全程皮肤组织切除后的创面愈合及糖

尿病创面等难愈创面的修复,此外,ADSCs 在创面局部微环境下可以诱导分化为创面修复所必需的成纤维细胞、血管内皮细胞和角质层细胞^[10-11]。尽管 ADSCs 在创面愈合过程中发挥着极其重要的作用,但 ADSCs 异体或自体移植仍面临生物安全性等诸多问题,且该细胞的迁移能力差,因此寻找合适的方式提高 ADSCs 的迁移能力和修复功能显得至关重要^[10]。HIF-1 α 是缺氧环境密切相关的蛋白,其介导的缺氧信号传导是调节细胞迁移的重要机制,相关研究证实 HIF-1 α 蛋白表达变化与 ADSCs 细胞迁移能力关系密切^[12],而 NPWT 能诱导 HIF-1 α 表达上调^[13],由此推断 NPWT 可通过增加 HIF-1 α 蛋白水平表达促进 ADSCs 迁移,进而加速皮肤创面组织修复,缩短创面愈合时间。

本研究通过采用持续负压吸引和间歇负压吸引两种不同 NPWT 模式治疗小香猪难愈性创面,发现不同负压吸引模式在创面愈合过程中存在着差异,且间歇负压吸引更加有利于创面组织修复。进一步研究发现持续负压吸引组、间歇负压吸引组与对照组相比 ADSCs 细胞迁移数量增加,且间歇负压吸引组优于持续负压吸引组;为排除因细胞增殖而导致的迁移差异,采用 MTT 观察迁移过程中 ADSCs 生物活性,结果显示持续、间歇负压吸引均对 ADSCs 细胞增殖无显著影响。分析负压吸引后蛋白表达变化发现,间歇负压吸引可增加 HIF-1 α 蛋白水平表达,以往有研究证实,HIF-1 α 受氧分压的调控,能在缺氧条件下稳定表达^[14]。

综上所述,本研究揭示了 NPWT 通过上调 HIF-1 α 蛋白水平表达,诱导 ADSCs 细胞迁移,进而调控创面修复。NPWT 促进 ADSCs 细胞迁移可能成为创面修复潜在治疗靶点,为 NPWT 用于难愈性创面治疗的深入研究提供理论依据。

参考文献

[1] Wu SC, Skratsky MK, Andersen CA. The evolution of negative pressure wound therapy NPWT1: a review of science, available devices, and evolution in the usage of NPWT [J]. Surg Technol Int, 2013, 23(1): 40-50.

[2] 程红缨,郝娜. 几种难愈创面的发生原因与发病机制[J]. 创伤外科杂志, 2011, 13(4): 368-370.

[3] Wankhade UD, Shen M, Kolhe R, et al. Advances in adipose-derived stem cells isolation, characterization, and application in regenerative tissue engineering [J]. Stem Cells Int, 2016(5): 1-9.

[4] Frese L, Dijkman PE, Hoerstrup SP. Adipose tissue-derived stem cells in regenerative medicine [J]. Transfus Med Hemother, 2016, 43(4): 268-274. (下转第 3469)

示其保护效应可能存在一定的量效关系,但需进一步研究。

综上所述,H₂ 对高氧致肺损伤过程中肺组织的氧化应激损伤、肺发育受阻及肺纤维化等过程均发挥了保护效应,腹腔注射等体积 H₂ 的 H₂ 摄入量远大于腹腔注射富氢生理盐水,在部分检测指标中观察到了更好的保护作用,提示其保护效应可能存在一定的量效关系。H₂ 可能成为防治 BPD 的有效手段之一,而目前 H₂ 的研究多为动物实验,其临床效应有待进一步验证,其用量、方式及具体作用机制有待更深入的研究。

参考文献

[1] Shen M,Zhang H,Yu C,et al. A review of experimental studies of hydrogen as a new therapeutic agent in emergency and critical care medicine[J]. Med Gas Res,2014,4 (1):17.

[2] Sun Q,Cai J,Liu S,et al. Hydrogen-rich saline provides protection against hyperoxic lung injury[J]. J Surg Res, 2011,165(1):43-49.

[3] 胡良冈,钱燕,龚永生,等. SPF 级新生大鼠高氧肺损伤模型的建立[J]. 中国实验动物学报,2008,16(6):441-444.

[4] Mobius MA,Thebaud B. Cell therapy for bronchopulmonary dyspsia: promises and perils [J]. Paediatr Respir Rev,2016,20(1):18.

[5] Iida AI,Nosaka N,Yumoto T,et al. The clinical application of hydrogen as a medical treatment[J]. Acta Med Okayama,2016,70(5):331-337.

[6] 孟超,周华成. 氢气对肺损伤保护作用的研究进展[J]. 临床肺科杂志,2014,19(10):1896-1904.

[7] Ohsawa I,Ishikawa M,Takahashi K,et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cyto-

toxic oxygen radicals[J]. Nat Med,2007,13(6):688-694.

[8] 林涛,黄国庆,文明祥,等. 腹腔注射氢气与腹腔注射氨水对大鼠氢气代谢的影响[J]. 广西医学,2012,34(11): 1488-1491.

[9] 黄国,詹蔚,熊艳,等. 不同给氢方式对兔代谢的影响[J]. 中国组织工程研究,2012,16(11):2023-2027.

[10] Huang G,Zhou J,Zhan W,et al. The neuroprotetive effects of intraperitoneal injection of hydrogen in rabbits with cardiac arrest[J]. Resuscitation,2013,84(5):690-695.

[11] 王大为,刘琦,陈兴,等. 富氢生理盐水对烟雾吸入所致大鼠急性肺损伤的保护作用[J]. 山东医药,2014,54(2):20-23.

[12] 李葛威,吴成如,方健,等. 富氢生理盐水对兔脊髓损伤神经细胞凋亡及凋亡相关蛋白表达的影响[J]. 颈腰痛杂志,2015,36(3):197-204.

[13] 赵婷婷,耿立成. 富氢生理盐水对大鼠视网膜缺血再灌注损伤神经保护作用的研究[J]. 海峡药学,2016,28(1):25-27.

[14] Liu NH,Zhang Y,He J,et al. Hydrogen sulfide protects H9c2 cardiac cell against doxorubicin? induced cytotoxicity through the PI3K/Akt/FoxO3a pathway [J]. Cell Physiol Biochem,2013,32(6):1668-1680.

[15] Muramatsu Y,Ito M,Oshima T,et al. Hydrogen-rich water ameliorates bronchopulmonary dysplasia (BPD) in newborn rats [J]. Pediatr Pulmonol,2016,51(9):928-935.

(收稿日期:2017-01-20 修回日期:2017-06-08)

(上接第 3465 页)

[5] Qiang LI,Guo Y,Chen F,et al. Stromal cell-derived factor-1 promotes human adipose tissue-derived stem cell survival and chronic wound healing [J]. Exp Ther Med, 2016,12(1):45-50.

[6] 彭伟. ADSCs 在体内/外环境下的生物学效应研究[D]. 重庆:第三军医大学,2013.

[7] Saraiya HA,Shah N. Use of indigenously made negative-pressure wound therapy system for patients with diabetic foot [J]. Adv Skin Wound Care,2013,26(2):74-77.

[8] Borgquist O,Ingemansson R,Malmsjö M. The effect of intermittent and variable negative pressure wound therapy on wound edge microvascular blood flow [J]. Ostomy Wound Manage,2010,56(3):60-67.

[9] Söylemez MS,Özkan K,Kilic B,et al. Intermittent negative pressure wound therapy with instillation for the treatment of persistent periprosthetic hip infections;a report of two cases [J]. Ther Clin Risk Manag,2016(12):

161-166.

[10] 兰俊红,林小婷,张选奋. 脂肪干细胞促进皮肤创面愈合的研究进展[J]. 中华医学杂志,2013,93(32):2602-2604.

[11] 廖怀伟,韩超,刘丽忠,等. 富血小板血浆凝胶对脂肪干细胞修复皮肤软组织缺损创面的影响[J]. 重庆医学,2013, 42(32):3859-3862.

[12] Chen J,Gu Z,Wu M,et al. C-reactive protein can up regulate VEGF expression to promote ADSC-induced angiogenesis by activating HIF-1 α via CD64/PI3k/Akt and MAPK/ERK signaling pathways [J]. Stem Cell Res Ther,2016,7(1):114.

[13] 高兵. 负压创面治疗对慢性创面 HIF-1 α 和 VEGF 表达的影响[D]. 重庆:重庆医科大学,2009.

[14] Sitkovsky M,Lukashev D. Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension;HIF1 alpha and adenosine receptors [J]. Nat Rev Immunol,2005,5(9):712-721.

(收稿日期:2017-01-18 修回日期:2017-06-06)