论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.02.005

富血小板血浆对小鼠下肢缺血血管生成的作用研究*

袁 园[1],张 潇[1],邵 菊[1],孙 芳[1],李 蓉[2△]
(西南医科大学:1.基础医学院;2.药物与功能性食品研究中心,四川泸州 646000)

[摘要] **目的** 探究富血小板血浆(PRP)促进下肢缺血血管新生的作用与机制。**方法** 12 只 C57BL/6J 小鼠在下肢缺血术后,将其分为两组,用多普勒血流扫描仪在不同时间节点扫描记录下肢的血流灌注情况;术后 14 d 收集小鼠腓肠肌来评价肌肉中血管新生,同时检测血管内皮细胞生长因子(VEGF-A)、血小板衍生生长因子(PDGF-BB)的表达。**结果** 研究发现,PRP 组小鼠下肢缺血部位血流恢复明显,缺血侧肌肉中 CD31 和 α-SMA 表达存在差异,且 VEGF-A、PDGF-BB 的表达存在显著性差异($P<0.05$)。**结论** PRP 能促进缺血下肢的血管形成,促进其血流恢复。

[关键词] 下肢缺血;血管形成;富血小板血浆
[中图法分类号] R965.1 [文献标识码] A [文章编号] 1671-8348(2019)02-0198-04

Effects of platelet rich plasma on angiogenesis in mice with hindlimb ischemia*

YUAN Yuan[1], *ZHANG Xiao*[1], *SHAO Ju*[1], *SUN Fang*[1], *LI Rong*[2△]
(1. *School of Basic Medical*; 2. *Drug and Functional Food Research Center*, *Southwest Medical University*, *Luzhou*, *Sichuan* 646000, *China*)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects and mechanisms of platelet rich plasma (PRP) on angiogenesis in hindlimb-ischemia mice. **Methods** 12 male C57BL/6J mice were randomly divided into two groups after the ligation of left hindlimb femoral artery. Laser Doppler scanner was used to monitor the blood perfusion of the hindlimb pre- and post-artery ligation at different time points. Mice were sacrificed after 14 days after surgery and the gastrocnemius muscle were harvested to evahuate angiogenesis in muscle. Vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) expressions were measured. **Results** Compared with the control group, blood flow perfusion in the PRP group significantly increased. There were differences of CD31 and α-SMA expressions in ischemic muscle between the PRP group and the control group ($P>0.05$). And their VEGF-A, PDGF-BB expressions were significantly different ($P<0.05$). **Conclusion** PRP can promote angiogenesis and blood flow recovery in the ischemic hindlimb.

[**Key words**] hindlimb ischemia; angiogenesis; platelet-rich plasma

下肢缺血疾病是动脉狭窄或闭塞引起的下肢溃疡、坏疽、跛行等,严重时导致截肢甚至死亡[1]。随着对缺血性疾病研究的深入,细胞移植成为治疗下肢缺血的热点,其机制为血管新生。富血小板血浆(platelet rich plasma,PRP)是静脉血经梯度离心获得的血小板浓缩物,含有丰富的自体生长因子,如血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)、血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor,PDGF)、内皮细胞生长因子(endothelial cell growth factor,EGF)、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor,IGF)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factors,FGF)等,它们可促进血管生长、修复细胞、生成新生组织、促进肌肉再生等[2-3]。本研究通过对小鼠下肢缺血模型缺血下肢的血流灌注、血管密度、VEGF-A、PDGF-BB 表达的观察,探讨 PRP 对小鼠下肢缺血后血管形成的影响及其机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物、仪器与试剂 雄性 C57BL/6J 小鼠 12 只,6~8 周龄,体质量 20 g 左右,购买于重庆腾鑫生物科技有限公司。激光多普勒血流仪,购于英国 Moor Instruments Ltd 公司;反转录 PCR 仪,购于美国 Bio-Rad 公司;荧光倒置相差显微镜,购于美国 AMG 公司。PCR 引物,购于上海 Invitrogen 公司;总 RNA 提

* **基金项目**:国家自然科学基金资助项目(81402431);四川省泸州市人民政府-四川医科大学科技战略合作项目[2015LZCYD-S01(1/15)];四川省卫生和计划生育委员会科研项目(16ZD035);四川省教育厅重点项目(18ZA0532)。 **作者简介**:袁园(1989-),实验员,硕士,主要从事基础药理学研究。 △ **通信作者**,E-mail:hubeilirong@126.com。

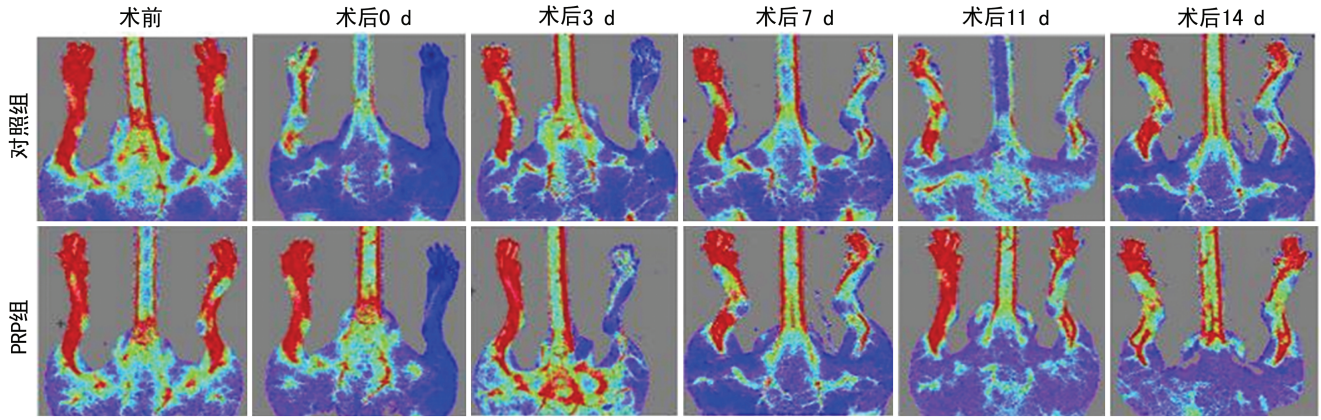


图 1　下肢血流的激光多普勒扫描图

取试剂盒，购于天根生化科技有限公司；反转录试剂盒、荧光染料，购于宝日医生物技术有限公司。

1.2　方法

1.2.1　小鼠下肢缺血模型的建立　小鼠麻醉后，脱尽腹部毛发，在显微镜下，分开股动脉与股深动脉，结扎股深动脉下缘与腘动脉上缘处的股动脉干支，离断双结之间的股动脉干支，缝合皮肤后复温。

1.2.2　PRP 的制备　选取健康的小鼠，麻醉后腔静脉抽取静脉血，梯度离心获得 PRP。血浆置于离心机，在 4 ℃，100 r/min 离心 10 min，吸取上层清液及中间层血小板于新 EP 管中，再置于离心机中，4 ℃，1 600 r/min 离心 10 min，吸走上层清液的 3/4，轻轻混悬，即得到 PRP。合并 PRP 后用血球计数板计数，调整血小板浓度为 6×10^6 个/μL。

1.2.3　动物分组　小鼠术后分为 2 组，即对照组（腓肠肌注射生理盐水 50 μL）和 PRP 组（腓肠肌注射 PRP 50 μL），每组 6 只。

1.2.4　激光多普勒扫描小鼠缺血下肢血流灌注　用激光多普勒血流仪扫描并记录术前、术后 0、3、7、11、14 d 小鼠双侧下肢的血流灌注情况。应用缺血侧/非缺血侧的血流比值评价小鼠下肢血流恢复情况。

1.2.5　病理学检测　小鼠术后 14 d 处死，取双侧腓肠肌，制成病理切片用于苏木精-伊红（HE）染色、免疫荧光分析。以 HE 染色评价小鼠缺血后的毛细血管分布情况；免疫荧光部分：用 anti-CD31 靶向标记血管内皮细胞，用 anti-α-SMA 靶向标记血管平滑肌细胞，以评价缺血部位血管形成和血管稳定性。

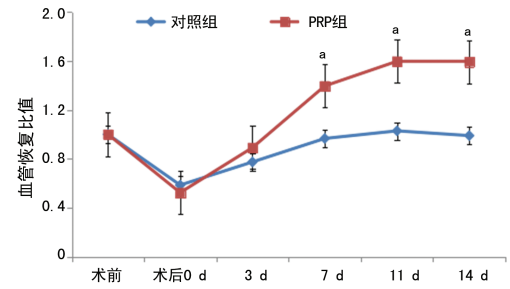
1.2.6　反转录 PCR 检测　提取肌肉组织中的 RNA，反转录成 cDNA；用软件 Premier6.0 设计引物，用于反转录 PCR 反应。VEGF-A 引物：上游 5′-GCC AGC ACA TAG AGA GAA TGA GC-3′，下游 3′-CAA GGC TCA CAG TGA TTT TCT GG-5′；PDGF-BB 引物：上游 5′-CAT CCG CTC CTT TGA TGA TCT T-3′，下游 3′-ATG AGC TTT CCA ACT CGA CTC C-5′；GAPDH 引物：上游 5′-TTC ACC ACC ATG GAG AAG G-3′，下游 3′-CTC GTG GTT CAC ACC CAT C-5′。反转录 PCR 反应条件为：95 ℃预变性 2 min；95 ℃变性 5 s，55.3 ℃退火 30 s，其中 VEGF-A 39 个循环，PDGF-BB 48 个循环。反应完毕后，计算各基因的相对表达水平，相对表达水平等于 $2^{-\triangle Ct}$，其中-△Ct＝基因（Ct）－DAPDH（Ct）。

1.3　统计学处理　采用 SPSS17.0 软件进行数据分析，计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，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　激光多普勒图像分析　通过对小鼠双下肢的扫描记录和分析，PRP 组的血流恢复优于对照组，说明 PRP 能促进小鼠缺血下肢的血流恢复。前 3 d 两组血流恢复无显著性差异，从第 7 天开始，PRP 组的血流恢复要优于对照组的血流恢复，第 14 天，PRP 组双下肢的血流无显著性差异，见图 1。

2.2　小鼠下肢缺血血流恢复比值　用缺血侧/非缺血侧的血流比值评价下肢缺血侧血流恢复情况，两组比较差异有统计学意义（$P<0.05$），PRP 组的血流恢复情况优于对照组的恢复情况，见图 2。



[a]：$P<0.05$，与对照组比较

图 2　下肢缺血血流恢复比值

2.3　病理学检测结果

2.3.1　HE 染色分析　通过对小鼠缺血侧与非缺血侧的腓肠肌 HE 染色观察，发现非缺血侧的血管较少，缺血侧形成的血管较多，与对照组比较 PRP 组有

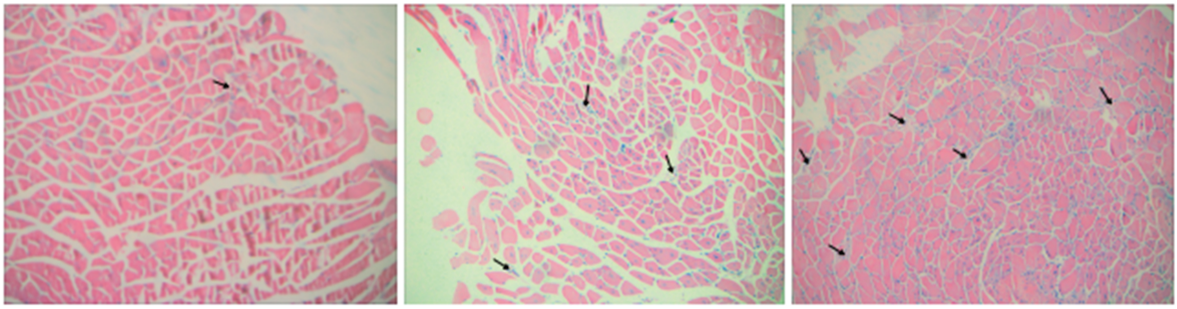


图 3 缺血侧与非缺血侧的 HE 染色图(箭头所指为毛细血管,×10)

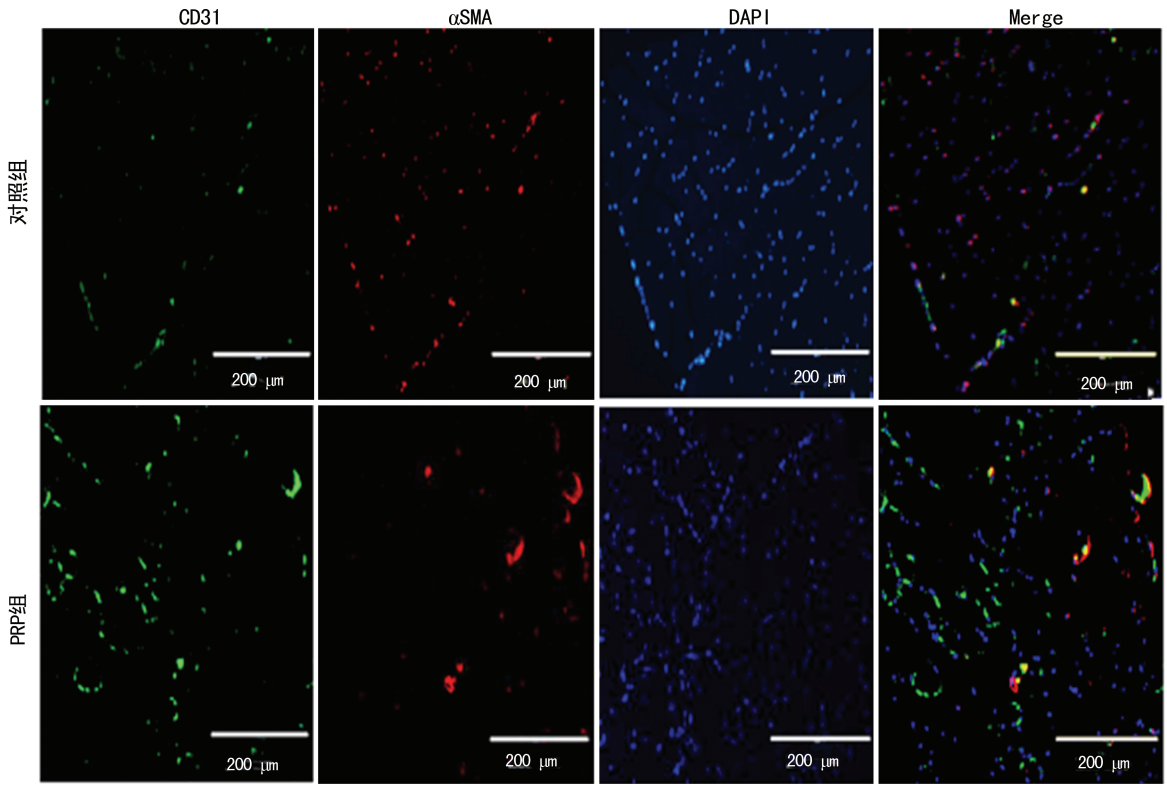
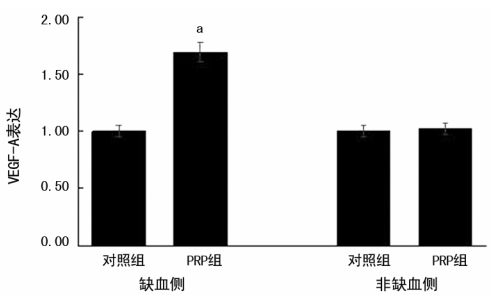


图 4 免疫荧光图片(绿色为 CD31 染色;红色为 α-SMA 染色)

更多的血管,见图 3。

2.3.2 免疫荧光分析 肌肉组织的荧光免疫分析显示,与对照组比较,PRP 组 CD31 和 α-SMA 的阳性表达更多,其血管密度有明显差异,见图 4。

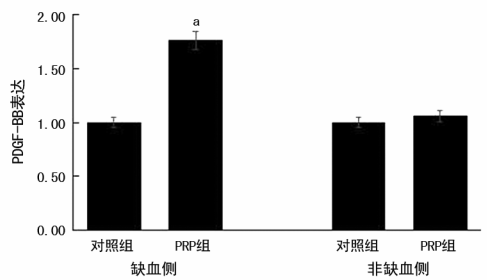


[a]:$P<0.05$,与对照组比较

图 5 缺血侧与非缺血侧的 VEGF-A 的反转录 PCR 结果图

2.4 反转录 PCR 结果

2.4.1 VEGF-A 的表达情况 反转录 PCR 结果分析显示,缺血侧两组的 VEGF-A 的表达差异有统计学意义($P<0.05$),PRP 组表达高于对照组($P<0.05$);非缺血侧比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图 5。



[a]:$P<0.05$,与对照组比较

图 6 缺血侧与非缺血侧的 PDGF-BB 的反转录 PCR 结果图

2.4.2 PDGF-BB 的表达情况 反转录 PCR 结果分析显示,缺血侧两组的 PDGF-BB 表达差异有统计学

意义($P<0.05$),PRP 组表达高于对照组($P<0.05$);非缺血侧比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图 6。

3 讨 论

下肢缺血疾病是常见的外周动脉疾病之一,严重危害人们健康,常见的治疗方法有外科手术、介入治疗、药物溶栓等,但均达不到良好的治疗效果。血管新生是缺血部位恢复血流灌注最有效的方法,是治疗下肢缺血最彻底的手段,现已成为临床上的研究重点。

PRP 含有多种与血管生成相关的细胞因子,如:VEGF、PDGF、TGF-β、EGF 等。VEGF 能增加血管活性物质、促进血管内皮细胞的增殖、迁移和趋化,直接参与血管新生的整个过程[4-5]。其中 VEGF-A 的作用尤为突出,它是促进血管新生和生长的主要生物因子,可以促进血管新生及侧枝血管的形成[6]。

PDGF-BB 由血小板、血管内皮细胞、周细胞等产生,对内皮细胞迁移和增生有重要作用,有利于血管的成熟、稳定和存活[7]。PDGF-BB 在血管生成中具有招募周细胞的重要作用,有研究发现,PDGF-BB 能提高 B16 小鼠黑色素瘤模型中周细胞浓度和肿瘤微血管密度[8];若抑制了 PDGF-BB 信号,肿瘤血管中周细胞会大量减少,也可导致肿瘤血管退化[9]。

除此之外,PRP 还含有能促增殖、分化、迁移、黏附的细胞因子和蛋白质,肝细胞生长因子(HGF)可以协同 VEGF 促进血管化;IGF 和 FGF 能促进组织修复、成熟和重塑[10]。它们能在不同的阶段发挥出不同的作用,共同作用于受损区域,刺激血管生成并使其更加成熟、稳定。PRP 丰富的生物因子为组织重塑、创面愈合和促进血管生成等方面提供了独特的性能,且制备简单方便、效果好,在临床上应用广泛[11]。

综上所述,PRP 能促进缺血部位的血管形成和血管的成熟稳定,从而促进缺血组织的血流恢复,为临床上 PRP 用于外周缺血疾病的治疗提供了一定的依据。

参考文献

[1] 龙刚,黄文. 生物治疗在下肢缺血性疾病中的应用[J]. 重庆医学,2017,46(34):4865-4867.

[2] TAKIKAWA M,NAKAMURA S. Enhancement of vascularization and granulation tissue formation by growth factors in human platelet-rich plasma-containing fragmin/protamine microparticles[J]. Biomed Mater Res B Appl Biomater,2011,97(2):373-380.

[3] MARX R E. Platelet-rich plasma:evidence to support its use[J]. J Oral Maxillofac Surg,2004,62:489-496.

[4] ZHAO T,ZHAO W,MENG W,et al. VEGF-C/VEGFR-3 pathway promotes myocyte hypertrophy and survival in the infarcted myocardium[J]. Am J Transl Res,2015,7(4):697-709.

[5] IACOVELLI R,STERNBERG C N,PORTA C,et al. Inhibition of the VEGF/VEGFR pathway improves survival in advanced kidney cancer:a systematic review and meta-analysis[J]. Curr Drug Targets,2015,16(2):164-170.

[6] WALTHAM M,EVANS C E,HUMPHRIES J,et al. Protein fragments from the VEGF binding domain of fibronectin are expressed in distinct spatial and temporal patterns during venous thrombus resolution[J]. Thromb Res,2012,130(2):281-284.

[7] LI X,ANNICA P,KARIN A,et al. PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor[J]. Nat Cell Biol,2000,2(5):302-309.

[8] BETSHOLTZ C,LINDBLOM P,BJARNEGARD M,et al. Role of platelet-derived growth factor in mesangium development and vasculopathies:lessons from platelet-derived growth factor and platelet-derived growth factor receptor mutations in mice[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens,2004,13(1):45-52.

[9] OZERDEM U. Targeting of pericytes diminishes neovascularization and lymphangiogenesis in prostate cancer[J]. Prostate,2006,66(3):294-304.

[10] HALL M P,BAND P A,MEISLIN R J,et al. Platelet-rich plasma:current concepts and application in sports medicine[J]. J Am Acad Orthop Surg,2009,17(10):602-608.

[11] 咸杰,何本祥,吴骁等. 自体富血小板血浆对兔膝关节骨性关节炎的治疗效果观察[J]. 重庆医学,2017,46(20):2747-2750.

(收稿日期:2018-05-20 修回日期:2018-08-05)