

• 基础研究 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2025.04.001
网络首发 https://link.cnki.net/urlid/50.1097.r.20250303.1628.006(2025-03-04)

浓缩生长因子促进人微血管内皮细胞血管形成的作用及机制研究*

张佳佳¹, 尚圣兰², 刘万兵³, 李 涛^{1△}
(中部战区总医院: 1. 内分泌科; 2. 临床药学科; 3. 输血科, 武汉 430070)

[摘要] **目的** 探讨浓缩生长因子(CGF)对人微血管内皮细胞(HMEC-1)血管形成的影响及相关机制。**方法** 将 HMEC-1 细胞分为 Control 组、CGF 组、CGF+LY294002 组, 采用细胞计数试剂盒(CCK-8)、Transwell 实验及成管实验检测并比较各组细胞的增殖、迁移、小管形成能力, Western blot 检测并比较各组细胞内磷酸肌醇-3-激酶(PI3K)、磷酸化-PI3K(p-PI3K)、蛋白激酶 B(Akt)、磷酸化-Akt(p-Akt)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)及磷酸化-mTOR(p-mTOR)表达水平。**结果** 与 Control 组比较, CGF 组细胞增殖、迁移及成管能力提升($P<0.05$), 且细胞内 p-PI3K、p-Akt 及 p-mTOR 表达水平增加($P<0.05$); 与 CGF 组比较, CGF+LY294002 组细胞增殖、迁移及成管能力降低($P<0.05$), 细胞内 p-PI3K、p-Akt 及 p-mTOR 表达水平减少($P<0.05$)。**结论** CGF 可以通过 PI3K/mTOR/Akt 通路促进 HMEC-1 细胞的增殖、迁移及血管形成。**[关键词]** 浓缩生长因子; 人微血管内皮细胞; 血管生成; 磷酸肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白通路

[中图法分类号] R641 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2025)04-0801-05

Study of the angiogenic effects and mechanisms of concentrated growth factor on human microvascular endothelial cells*

ZHANG Jiajia¹, SHANG Shenglan², LIU Wanbing³, LI Tao^{1△}
(1. Department of Endocrinology; 2. Department of Clinical Pharmacology; 3. Department of Transfusion Medicine, General Hospital of Central Theater Command, Wuhan, Hubei 430070, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of concentrated growth factor (CGF) on angiogenesis in human microvascular endothelial cells (HMEC-1) and explore the underlying mechanisms. **Methods** HMEC-1 were divided into the control group, CGF group, and CGF+LY294002 group. Cell proliferation, migration, and tubule formation abilities were measured and compared using the Cell Counting Kit-8 (CCK-8), Transwell assay, and tube formation assay, respectively. The protein expression levels of phosphoinositide 3-kinase (PI3K), phosphorylated PI3K (p-PI3K), phospho-protein kinase B (Akt), phosphorylated Akt (p-Akt), mammalian target of rapamycin (mTOR), and phosphorylated mTOR (p-mTOR) were detected and compared by Western blot. **Results** Compared with the control group, the CGF group exhibited enhanced cell proliferation, migration, and tubule formation abilities ($P<0.05$), along with increased expression levels of p-PI3K, p-Akt, and p-mTOR ($P<0.05$). Compared with the CGF group, the CGF+LY294002 group demonstrated reduced cell proliferation, migration, and tubule formation abilities ($P<0.05$), accompanied by decreased expression levels of p-PI3K, p-Akt, and p-mTOR ($P<0.05$). **Conclusion** CGF promotes the proliferation, migration, and angiogenesis of HMEC-1 via the PI3K/mTOR/Akt pathway.

[Key words] concentrated growth factor; human microvascular endothelial cells; angiogenesis; phosphoinositide 3-kinase/phospho-protein kinase B/mammalian target of rapamycin pathway

慢性创面危害巨大, 其经久不愈使得患者身心备受折磨, 高额的医疗费用和沉重的社会负担严重影响患者生活质量和生命安全。浓缩生长因子(concentrated growth factor, CGF)是一种新型血小板制品, 通过对血液进行连续变速离心, 在离心过程中血小板沉积并受到激活, 释放多种生长因子而获得, 其能够促进组织的修复和再生, 对多种组织缺损和慢性创面修复都具有显著疗效^[1-2]。CGF 能够促进血管生成,

* 基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(82000776); 中部战区总医院育英计划项目(ZZY202202)。△ 通信作者, E-mail: leet85@163.com。

通过改善组织血供从而加速创面愈合。在血管生成的过程中血管内皮细胞发挥了始动作用,有报道了 CGF 对脐静脉内皮细胞增殖和迁移的促进作用^[3],但目前其对血管内皮细胞的影响机制尚不明确。磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是一条调控细胞基本生命活动的重要信号通路,同时也和血管生成及创面愈合相关^[4-5]。PI3K 的细胞外活化信号可以来源于多种生长因子,例如血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)、血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factors, IGF-1)等^[6],恰好这些生长因子在 CGF 中有着丰富的含量,因此猜测 PI3K/Akt/mTOR 通路可能是 CGF 调控血管内皮细胞功能并促进血管形成的一种重要途径。本研究通过在体外观察加入 PI3K 抑制剂前、后 CGF 对人微血管内皮细胞(human microvascular endothelial cell, HMEC-1)增殖、迁移和小管形成能力的影响并检测 PI3K/Akt/mTOR 通路中相关分子表达水平的变化,对 CGF 调控内皮细胞促进血管形成的机制进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞

HMEC-1 购自中国科学院细胞库, HMEC-1 使用由 89% MCDB131 培养基(Gibco 公司)+10%胎牛血清+1%青霉素-链霉素+10 ng/mL 人 EGF(hEGF)组成的 HMEC-1 专用培养液于 37℃、5% CO₂ 环境下培养。

1.1.2 实验试剂及仪器

HMEC-1 专用培养液购自中国科学院细胞库,胎牛血清、青霉素-链霉素购自美国 Gibco 公司, hEGF 购自美国 Sigma 公司, PI3K 广谱抑制剂 LY294002 购自安诺伦(北京)生物科技有限公司, 细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)购自上海碧云天生物技术股份有限公司; PI3K、磷酸化-PI3K(p-PI3K)、Akt、磷酸化-Akt(p-Akt)、mTOR、磷酸化-mTOR(p-mTOR)单克隆抗体购自美国 Abcam 公司; 辣根过氧化物酶标记的二抗购自美国 CST 公司。Matrigel 基质胶购自美国 Affinity 公司。体式显微镜、荧光显微镜购自日本 Olympus 公司; 多功能酶标仪购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 变速离心机购自意大利 Medifuge 公司。

1.1.3 血液来源

用于制备 CGF 的静脉血来自本院 6 名青年男性健康志愿者, 年龄 20~30 岁, 无吸烟史, 未曾使用抗血小板、抗凝血及非甾体抗炎药。血液采集经本院医

学伦理委员会批准(审批号:[2023]013-01), 志愿者在采血前均签署书面知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 CGF 的制备

使用含有柠檬酸钠作为抗凝剂的无菌离心管采集外周静脉血后立即置于变速离心机进行离心, 离心参数设置参照文献^[7], 具体为: 30 s 加速, 2 700 r/min 离心 2 min, 2 400 r/min 离心 4 min, 2 700 r/min 离心 4 min, 3 000 r/min 离心 3 min, 减速 36 s 至停止。离心完成后, 血液分为 3 层, 上层为贫血小板血浆(platelet-poor plasma, PPP), 中层为 CGF, 下层为红细胞层。用移液枪吸取 PPP 保存, 小心吸取 CGF 保存用于后续细胞实验。

1.2.2 细胞分组与处理

将培养至对数生长期的 HMEC-1 用于实验, 细胞被分为 3 组: (1) Control 组, 采用专用培养液; (2) CGF 组, 专用培养液添加 20% 体积的 CGF; (3) CGF+LY294002 组, 专用培养液添加 20% 的 CGF 及 50 μmol/L 的 LY294002。上述各组设置 3 组重复, 相关实验每组设置 3 个复孔。

1.2.3 CCK-8 法检测 HMEC-1 细胞增殖能力

各组细胞加入 96 孔培养板培养 48 h, 吸去各组孔内液体, 用无菌磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤孔内细胞 3 次, 随后每孔加入含有 10% CCK-8 检测试剂的专用培养液 100 μL, 于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中孵育 2 h 后, 使用酶标仪测定各孔在 450 nm 波长下的吸光度值[A₍₄₅₀₎], 根据 A 值计算细胞增殖活力。

1.2.4 Transwell 实验检测 HMEC-1 迁移能力

调整各组 HMEC-1 密度至 3×10⁵/mL, 将 200 μL 的各组细胞悬液接种于 Transwell 小室的上室, 加入无血清培养液, 下室中加入 600 μL 的专用培养液, 培养 24 h 后取出小室, 弃去培养液并小心清洗滤膜上面未移动细胞, 以 70% 冰乙醇溶液固定细胞 1 h 后使用 0.5% 结晶紫染液染色, 室温放置 20 min, PBS 清洗 1 次后将滤膜置于载玻片上, 于倒置显微镜下观察拍照并计数迁移细胞数目。

1.2.5 成管实验检测 HMEC-1 细胞小管形成能力

将 4℃ 预平衡过夜的 Matrigel 基质胶加入 24 孔培养板中, 于 37℃ 孵育 30 min 成凝胶态, 将消化备用的各组 HMEC-1 密度调整至 1.5×10⁵/mL 并接种于 24 孔培养板的基质胶上, 培养 12 h 后, 在显微镜下观察各组细胞并拍照, 每孔选 3 个不同层面, 利用 ImageJ 软件计数 Branch point 以评估细胞的血管生成能力。

1.2.6 Western blot 检测信号通路相关蛋白表达

按照各分组措施干预细胞并培养 48 h 后, 使用含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解细胞, 提取总蛋白。采用 BCA 法进行蛋白定量, 取等量蛋白与 5×上

样缓冲液混合煮沸 5 min 后,进行 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE),电泳完成后将蛋白电转移至聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜。采用 5%的脱脂牛奶和 TBST 缓冲液室温下封闭 1 h,加入 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR 一抗 4 ℃ 孵育过夜,用 TBST 冲洗 3 次后,在室温下加入二抗(1:5 000 稀释)孵育 1 h。随后用增强化学发光剂(enhanced chemilumin-es-cence, ECL)染色显影,在显色数码凝胶成像仪中曝光,以 ImageJ 软件分析蛋白条带灰度值,计算蛋白表达水平。

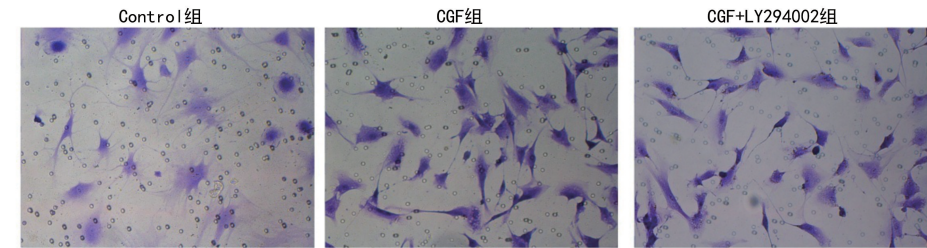
1.3 统计学处理

采用 SPSS25.0 软件进行数据分析,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,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

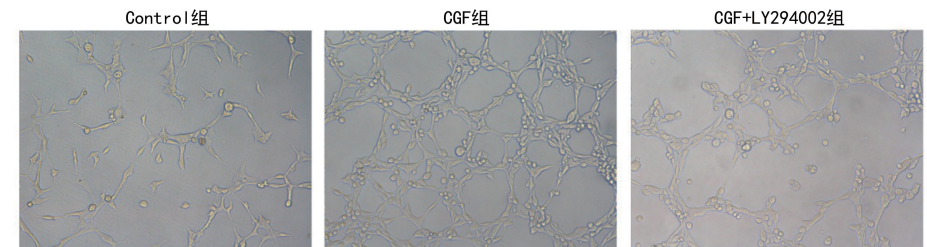
2.1 CGF 及 LY294002 对 HMEC-1 增殖能力的影响

CCK-8 实验结果显示:与 Control 组比较,CGF 组、CGF+LY294002 组细胞增殖明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 CGF 组比较,CGF + LY294002 组细胞增殖明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。



A: Transwell 迁移实验;B: Transwell 迁移实验定量分析;^a: $P < 0.05$ 。

图 2 CGF 及 LY294002 对 HMEC-1 细胞迁移能力的影响(100×)



A: 成管实验;B: 成管实验定量分析;^a: $P < 0.05$ 。

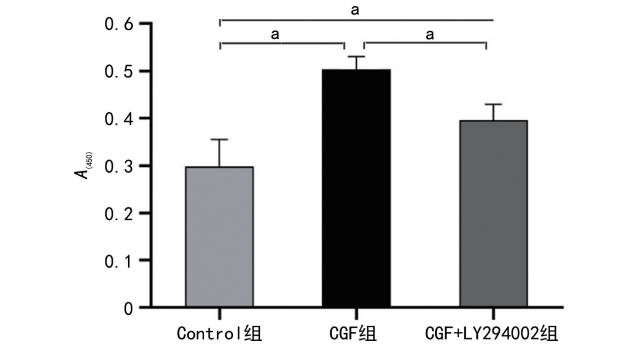
图 3 CGF 及 LY294002 对 HMEC-1 细胞小管形成的影响(100×)

2.4 CGF 及 LY294002 抑制剂对 PI3K/Akt/mTOR 通路的影响

Western blot 检测结果显示:与 Control 组比较,CGF 组、CGF + LY294002 组细胞中的 p-PI3K、p-

2.2 CGF 及 LY294002 对 HMEC-1 迁移能力的影响

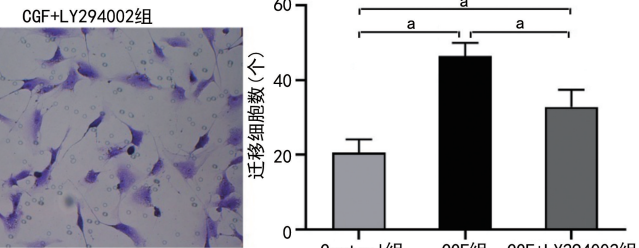
Transwell 实验结果显示:与 Control 组比较,CGF 组、CGF + LY294002 组的迁移细胞数明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 CGF 组比较,CGF+LY294002 组迁移细胞数量明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。



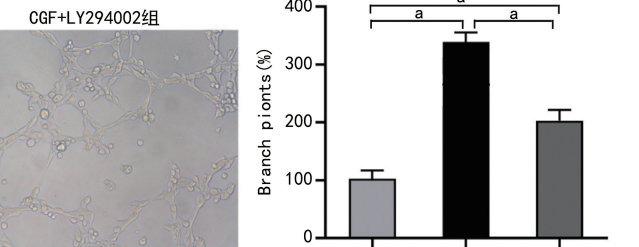
^a: $P < 0.05$ 。
图 1 CGF 及 LY294002 对 HMEC-1 细胞增殖的影响

2.3 CGF 及 LY294002 对 HMEC-1 小管形成能力的影响

成管实验结果显示:与 Control 组比较,CGF 组、CGF+LY294002 组细胞小管形成能力明显增强,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 CGF 组比较,CGF + LY294002 组细胞小管形成能力明显减弱,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3。

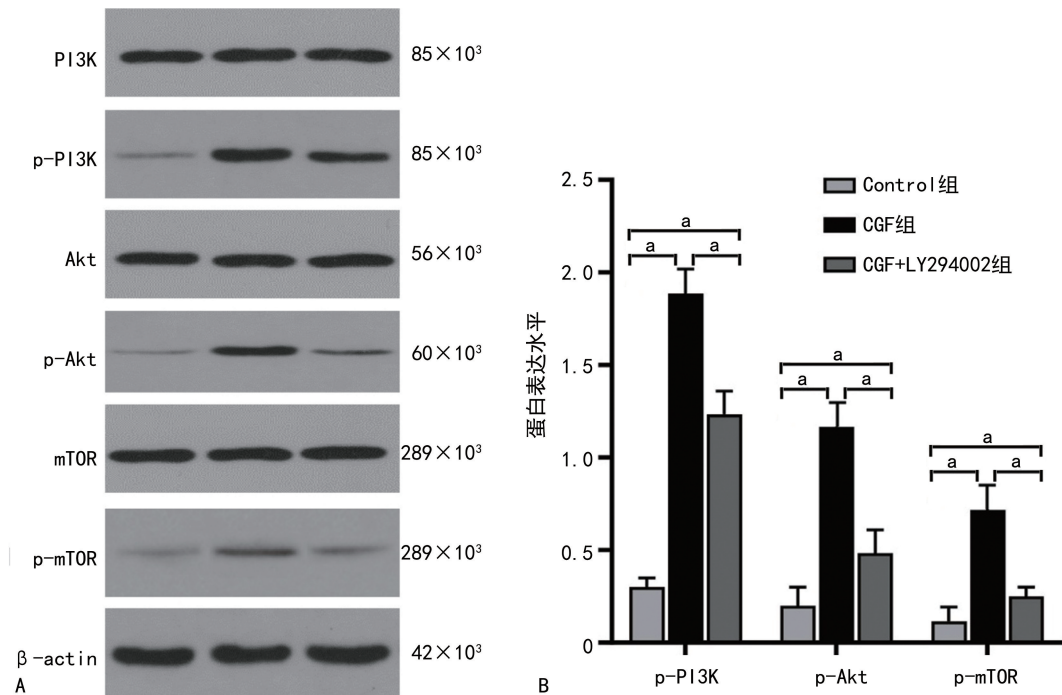


B: Transwell 迁移实验定量分析;^a: $P < 0.05$ 。



B: 成管实验定量分析;^a: $P < 0.05$ 。

Akt、p-mTOR 的表达水平明显增加,差异有统计学意义($P < 0.01$);与 CGF 组比较,CGF + LY294002 组细胞以上蛋白表达水平明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 4。



A: Western blot 图; B: Western blot 定量分析; ^a: $P < 0.05$ 。

图 4 各组 HMEC-1 细胞内 PI3K/Akt/mTOR 通路蛋白及磷酸化水平的比较

3 讨 论

创面愈合需要充足的血供作为基础,而血管新生则是血液供应的前提。在创面增生期血管内皮细胞在相关因子的刺激和引导下发生增殖、迁移并形成新的血管,为组织修复提供氧气和营养物质,使得愈合进程得以向前推进^[8]。循环障碍是慢性缺血性创面的病理特征,其中内皮细胞功能异常引起的血管生成受阻是导致创面愈合延迟的病理机制之一^[9]。寻找有效的干预方式来调节内皮细胞的功能,对改善创面的血运环境具有重要意义。

血小板作为一种多功能细胞,不仅参与止血和血栓的形成,还能够合成包括 PDGF、VEGF、转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、EGF、IGF-1、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)在内的多种生长因子^[10]。当高浓度的血小板受到激活时能够释放大量的上述生长因子,将其应用于创面可以通过促进细胞增殖、血管新生、胶原形成及再上皮化等作用加速创面愈合^[11-12]。浓缩血小板制品被应用于创面修复领域历史已久,CGF 是继第一代富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)和第二代富血小板纤维蛋白(platelet rich fibrin, PRF)之后的第三代制品。CGF 具备多种优势:由于通过变速离心的方式对血小板进行激活,无需加入外源性凝血酶等物质作为激活剂,可以减少免疫排斥反应的风险^[13];变速离心能够刺激血小板释放更高浓度的生长因子^[14]。固态 CGF 中形成的纤维蛋白三维结构具有更好的弹性和组织相容性,可以为组织生长提

供更好的支架平台,并且能够缓慢释放其中吸附的生长因子,产生更加持久的促修复作用^[15]。根据采血时是否加入抗凝剂,CGF 可以被制成液态或固态,或按照需要被压制成修复膜等多种形态应用于临床。考虑到液态的干预手段有利于在细胞实验中精确定量和便于操作,本研究选择制备液态 CGF 用于后续研究。

生长因子是浓缩血小板制品的核心,当使用这种“复合生长因子”干预创面时,可以通过不同的生长因子受体激活细胞中的多条信号通路产生效应。既往研究表明 PRP 可通过 PI3K/Akt、ERK、JNK 等多个信号通路发挥促细胞增殖作用^[16]。而作为新一代血小板制品,CGF 中生长因子的种类、浓度及比例较 PRP 和 PRF 有所变化,其对血管内皮细胞的调控机制尚不明确。PI3K/Akt/mTOR 通路是一条维持细胞生存的重要信号通路,当 PI3K 被激活时,信号经 Akt 传递到下游靶点 mTOR, mTOR 通过调控基因转录对细胞的增殖、分化、代谢、凋亡及细胞周期等进行管理^[6,17]。VEGF 是已知的 PI3K 外源性活化因子之一,既往有研究表明,VEGF 能够通过激活 PI3K/Akt/mTOR 通路促进内皮细胞增殖迁移,拮抗细胞凋亡,增加血管通透性^[18-19]。IGF-1 能够通过激活该信号通路促进内皮细胞/脂肪源性干细胞共培养体系中的血管生成^[20]。HGF 能够通过该信号通路诱导脐静脉内皮细胞的迁移和血管形成^[21]。PDGF 能够通过该信号通路诱导血管平滑肌细胞的增殖和迁移,辅助促进血管生成^[22]。CGF 中富含上述生长因子,推测 PI3K/Akt/mTOR 通路在 CGF 对血管内皮细胞

的影响中具有重要地位并通过体外试验进行了验证。

LY294002 是一种广谱的 PI3K 抑制剂,通过干扰 PI3K 催化亚基及抑制下游 Akt 的活化从而能够对该信号通路产生抑制作用。本研究发现接受 CGF 干预的 HMEC-1 在增殖、迁移和小管形成能力上同 Control 组比较均有明显提升,且伴随有细胞中的 p-PI3K、p-Akt 及 p-mTOR 水平的增加,说明在 CGF 刺激下 HMEC-1 细胞内该信号通路被激活。而在同时采用 CGF 和 LY294002 干预的 HMEC-1 中 p-PI3K、p-Akt 及 p-mTOR 水平较 CGF 组明显下降,并伴有上述能力的下降,说明经 LY294002 抑制该信号通路后,CGF 诱导的细胞增殖和血管生成受到阻碍。然而与 Control 组比较,同时采用 CGF 和 LY294002 干预的细胞中 p-PI3K、p-Akt 及 p-mTOR 表达水平仍有所增加,且细胞的增殖、迁移和成管能力也有所增加,推测可能与该信号通路下游的反馈调节及在 CGF 的刺激下来自其他信号通路的交叉作用有关。因此,PI3K/Akt/mTOR 通路可能是多种生长因子刺激效应的一处汇集点,至少作为 CGF 调控内皮细胞功能的一条主要途径发挥了促进内皮细胞增殖、迁移和血管形成的作用。

综上所述,本研究针对新一代浓缩血小板制品 CGF,在体外证实其可促进 HMEC-1 增殖、迁移及血管形成,同时还发现 PI3K/Akt/mTOR 通路介导了这种效应的发生。研究结果部分阐释了 CGF 的促血管生成机制,为 CGF 的临床应用增加了理论支撑。本研究也存在局限性,对 PI3K/Akt/mTOR 通路下游的反应机制未开展深入探讨,此外 CGF 成分复杂,其对其他信号通路在调控内皮细胞中的地位及对 PI3K/Akt/mTOR 通路的交叉影响还有待进一步探索。

参考文献

- [1] KAO C H. Use of concentrate growth factors gel or membrane in chronic wound healing: description of 18 cases[J]. *Int Wound J*, 2020, 17(1):158-166.
- [2] AMATO B, FARINA A M, CAMPISI S, et al. CGF treatment of leg ulcers: a randomized controlled trial[J]. *Open Medicine*, 2019, 14(1): 959-967.
- [3] 宦俊, 窦磊, 严崎方, 等. 浓缩生长因子促人脐静脉血管内皮细胞成血管化作用研究[J]. *华西口腔医学杂志*, 2018, 36(3): 247-251.
- [4] KARAR J, MAITY A. PI3K/Akt/mTOR pathway in angiogenesis[J]. *Front Mol Neurosci*, 2011, 4: 51.
- [5] JERE S W, HOURELD N N, ABRAHAMSE H. Role of the PI3K/Akt (mTOR and GSK3 β) signalling pathway and photobiomodulation in diabetic wound healing[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2019, 50: 52-59.
- [6] FRUMAN D A, CHIU H, HOPKINS B D, et al. The PI3K pathway in human disease[J]. *Cell*, 2017, 170(4): 605-635.
- [7] PENSATO R, ZAFFIRO A, D'ANDREA M, et al. Liquid phase concentrated growth factor improves autologous fat graft survival in vivo in nude mice[J]. *Aesthetic Plast Surg*, 2022, 46(4): 2089-2090.
- [8] DEMIDOVA-RICE T N, DURHAM J T, HERMAN I M. Wound healing angiogenesis: innovations and challenges in acute and chronic wound healing[J]. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2012, 1(1): 17-22.
- [9] 芦阳, 刘宏伟. 血管内皮细胞的自分泌和旁分泌与创面愈合的相关性[J]. *感染、炎症、修复*, 2017, 18(3): 169-174.
- [10] MARTINEZ-ZAPATA M J, MARTÍ-CARVAJAL A J, SOLÀ I, et al. Autologous platelet-rich plasma for treating chronic wounds[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2016(5): CD006899.
- [11] LACCI K M, DARDIK A. Platelet-rich plasma: support for its use in wound healing[J]. *Yale J Biol Med*, 2010, 83(1): 1-9.
- [12] BENNETT S P, GRIFFITHS G D, SCHOR A M, et al. Growth factors in the treatment of diabetic foot ulcers[J]. *Br J Surg*, 2003, 90(2): 133-146.
- [13] MASUKI H, OKUDERA T, WATANEBE T, et al. Growth factor and proinflammatory cytokine contents in platelet-rich plasma (PRP), plasma rich in growth factors (PRGF), advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), and concentrated growth factors (CGF)[J]. *Int J Implant Dent*, 2016, 2(1): 19-27.
- [14] QIAO J, AN N, OUYANG X. Quantification of growth factors in different platelet concentrates[J]. *Platelets*, 2017, 28(8): 774-778.
- [15] YU M, WANG X, LIU Y, et al. Cytokine release kinetics of concentrated growth factors in different scaffolds[J]. *Clin Oral Invest*, 2019, 23(4): 1663-1671.
- [16] LAI F, KAKUDO N, MORIMOTO N, et al. Platelet-rich plasma enhances (下转第 812 页)