MSC 复合生物材料促进缺血性糖尿病溃疡愈合的研究

柏 力[1],杨明璨[2],谭 菊[2],孙建森[2] (1. 昆明军区总医院急诊科,云南 昆明 650000;2. 第三军医大学人体解剖学教研室,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 观察 MSC 复合生物材料对缺血性糖尿病溃疡愈合的作用,探讨干细胞复合生物材料的临床应用前景。**方法** 制作电纺丝生物材料,培养 MSC 细胞,通过电镜观察、增殖实验及条件培养基对内皮细胞的作用研究 MSC 复合生物材料的离体效果。并使用 5 ~ 8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠制备成糖尿病小鼠,结扎股动脉近端,在大腿背侧皮肤造成直径 5 mm 全层创面。观察 MSC 复合生物材料治疗糖尿病足缺血性溃疡的效果。**结果** 本研究发现将 MSC 种植与生物电纺丝材料上,通过扫描电镜观察,细胞生长良好,细胞足伸展,细胞间连结建立。高糖刺激下,MSC 在生物材料上具有更强的生长增殖能力。利用 MSC 在生物材料上生长的条件培养基作用人脐静脉内皮细胞,发现内皮细胞增殖能力增强。将单独的 MSC 和 MSC 复合生物材料覆盖在糖尿病小鼠大腿皮肤损伤处,发现 MSC 复合生物材料能够有效提高 MSC 对糖尿病足溃疡的治疗效果,促进伤口愈合,有利于血管生成。**结论** MSC 复合生物材料能够促进糖尿病足缺血性溃疡愈合。提示干细胞复合生物组织材料在加速糖尿病足等缺血性溃疡愈合方面具有很大治疗潜力和应用前景。

[关键词] 间质干细胞(MSC);生物材料;缺血性糖尿病溃疡;血管生成

[中图分类号] R587.2 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2015)04-0370-04

Research of MSC-seeded biomaterials promoting ischemic diabetic ulcers repair

BAI LI[1], YANG Ming-can[2], TAN Ju[2], SUN Jian-sen[2] (1. Department of Emergency, General Hospital of Kunming Military District, Kunming Yunnan 650000, China; 2. Department of Anatomy, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effect of mesenchymal stem cells (MSC) in treating ischemic diabetic ulcers, and to explore its clinical perspectives. **Methods** Prepared electro-spinning biomaterials and cultured MSC to study effect of MSC composite biomaterials in vitro by scanning electron microscope, MTT array and influence of MSC conditioned medium on endothelial cells. The use of 5 to 8 week old male C57BL/6J mice were prepared into diabetic mice, femoral artery ligation in the proximal thigh, in dorsal skin full-thickness wounds caused by the diameter 5 mm. Then the effect of MSC composite biomaterials on ischemic diabetic ulcers was determined. **Results** This study found that the MSC grow well on electro-spinning biomaterials. Cells foot extension and connections between cells were observed by scanning electron microscope. Stimulated by high glucose, growth and proliferation of MSC has a stronger ability on biomaterials. MSC conditioned medium on biomaterials increased human umbilical vein endothelial cells proliferation ability. **Conclusion** MSC composite biomaterials can effectively improve the treatment effect of MSC on ischemic diabetic ulcers. The study indicated stem cells composite biomaterials have great potential and application prospect in the treatment of ischemic diabetic ulcers healing.

Keywords: mesenchymal stem cells (MSC); biomaterials; ischemic diabetic ulcers; angiogenesis

随着糖尿病患者的急剧增多,难治性糖尿病足的发病率也逐年攀升[1-2]。糖尿病足伤口由于失去了正常伤口愈合的机制和过程,常导致伤口愈合障碍[3-4]。该发病机制尚不完全清楚,目前的研究认为糖尿病性周围血管、神经病变导致局部缺血性溃疡是其主要致病因素[5]。当前利用干/祖细胞等进行糖尿病足的细胞治疗成为研究热点[6-7]。但单纯细胞治疗存在细胞生长微环境不易改善,细胞生长困难等局限[8],因此迫切期待新型促进血管新生的有效方案治疗糖尿病足等缺血性溃疡。

间质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)是干细胞家族的重要成员,因其具有多向分化潜能在人类疾病中应用非常广阔[9]。在心血管系统,MSC 可以通过旁分泌机制发挥对缺血心肌的保护作用[10],还可分泌促动脉新生的多种细胞因子[11]。但单纯间充质干细胞移植治疗糖尿病足效果不佳。随着生物材料在医药行业的快速发展,依赖生物材料实现药物或细胞的靶向输送和附着成为研究的热点。将间充质干细胞复合生物材料移植到糖尿病足创面治疗是否能够提高治疗效果,目前尚不清楚。我们将 MSC 种植在新型生物组织材料上,治疗小鼠糖尿病足,观察其伤口愈合的效果,分析其作用机制,为进一步研究奠定基础。

doi:10.11659/jjssx.01E015043

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(31200731)

[收稿日期] 2015-03-21 [修回日期] 2015-05-15

1 材料与方法

1.1 细胞培养及实验分组

人骨髓间质干细胞和人脐静脉内皮细胞(HUVEC)均购自 Cyagen Biosciences(Guangzhou, China)。使用 α-MEM, L-谷氨酰胺(2 mM)(all purchased from Hyclone Laboratories, USA),青霉素(100 U/mL),链霉素(100 mg/mL)(all purchased from Sangon. Com, China)和 10% FBS(Gibco, USA)作为 MSC 基本培养基。含 25 mM 葡萄糖分别为 MSC 高糖培养基。RPMI-1640 培养基(Hyclone Laboratories, USA),10% FBS(Gibco, USA)作为 HUVEC 基本培养基,30 mM 葡萄糖分别为 HUVEC 低糖或高糖培养基[6]。HUVEC 实验按 CM 类型而分组。

1.2 MSC 在材料上的观察

接种 8×10^3 个 MSC 于生物材料上,37 ℃,5% CO_2 孵育 48 h,采用扫描电镜进行观察。

1.3 细胞增殖实验

使用 MTT 法检测 MSC 或 HUVEC 增殖能力。MSC 单独培养或者在生物材料上培养 48 h,每孔加入 20 μl 的 5mg/mL MTT(Sigma),孵育 4 h,更换 150 μl DMSO(Sigma),使用 Emax 酶标仪(Molecular Devices),用 492 nm 波长测定每个样品吸光度。HUVEC 传代后,添加 1∶5 稀释的条件培养基[6],培养 48 h,每孔加入 20 μl 的 5 mg/mL MTT(Sigma),孵育 4 h,更换 150 μl DMSO(Sigma),使用 Emax 酶标仪(Molecular Devices),用 492 nm 波长测定每个样品吸光度。

1.4 动物实验

按第三军医大学(Chongqing, China)颁布的动物实验条例进行动物实验,并得到第三军医大学伦理道德委员会批准。使用 5 ~ 8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠(第三军医大学实验动物中心),腹腔注射 40 mg/kg 链脲佐菌素(STZ, Sigma),连续 5 d,空腹血糖大于 16.7 mmol/L 为糖尿病小鼠[12]。制作糖尿病足模型[13]。结扎股动脉近端,电凝小分支止血,使下肢缺血,在大腿背侧皮肤造成直径 5 mm 全层创面。MSC 复合生物组织材料覆盖于伤口区或直接将 MSC 滴附在伤口处,30 min 后均使用 TegadermTM 透明敷料(Minnesota Mining and Manufacturing, USA)包扎。手术后,给予小鼠充足的食物和饮水,在恒温、恒湿的环境中单独饲养。

1.5 伤口愈合效果和组织学观察

手术 7 d 后使用 Nikon D90 数码相机(JaPan),拍摄伤口,用 IPP 软件分析伤口面积。按观察时间切取伤口区皮肤,4% 多聚甲醛固定,9 μm 冰冻切片,进行伊红-苏木精(H-E)染色。使用 OLYMPUS BX50 显微镜,对 HE 染色的切片,随机选取 10 个视野(200 ×),采用 VERSOI 4.6 软件拍摄图像。对伤口处的毛细血管密度进行组织学定量分析。

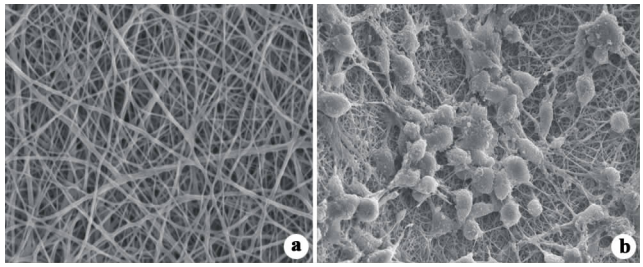
1.6 统计

每组实验至少重复 3 次。实验数据采用 SPSS 软件(Version 18.0)进行 t 检验和方差分析,结果以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。$P < 0.05$ 为具有统计学差异。

2 结果

2.1 MSC 在生物电纺丝材料上生长良好

将 MSC 种植于生物电纺丝材料上,培养 48 h 后进行扫描电镜观察。可见电纺丝生物材料纤维规则,孔隙均匀。MSC 呈集落分布,生长良好,细胞附着于生物电纺丝材料的孔隙中,细胞足长出,细胞间建立了细胞连结(图 1)。

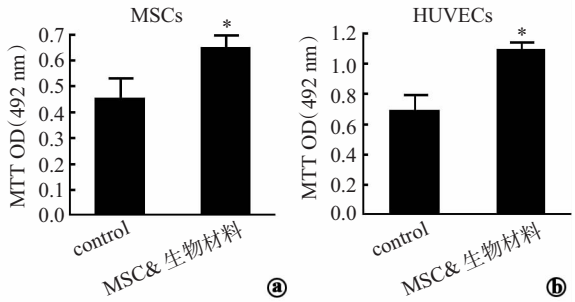


a:电纺丝生物材料扫描电镜;b:MSC 种植与电纺丝生物材料上培养 48 h

图 1 MSC 在生物电纺丝材料上生长情况

2.2 高糖培养下 MSC 在生物电纺丝材料上的增殖能力

使用 MTT 法探讨 MSC 高糖培养基对 MSC 的增殖作用,发现 MSC 在生物材料上使用高糖培养基培养 48 h 后,其 OD 值是对照组的 1.4 倍(图 2a)。这提示高糖环境下,间充质干细胞在生物材料上能够更好地实现复制与增殖。



a:MSCs 增殖的 OD 值比较,*:$P < 0.05$, N = 5;b:HUVECs 在 MSCs 条件培养基中的增殖的 OD 值比较,*:$P < 0.05$, N = 5

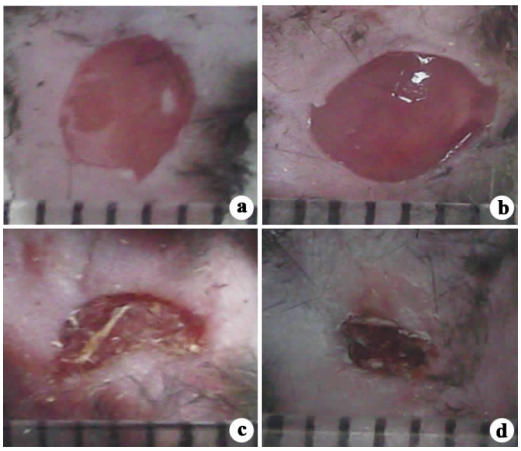
图 2 MSCs 与 HUVECs 在不同条件下的增殖情况

2.3 条件培养基对血管内皮细胞的增殖作用

为了解 MSC 条件培养基对 HUVEC 的增殖影响,使用 MTT 法发现,在 HUVEC 高糖环境下,相对于 MSC 条件培养基组,MSC + 生物材料条件培养基组 HUVEC 增殖的 OD 值是前者的 1.5 倍(图 2b)。结果提示,高糖环境下材料上生长的 MSC 具有更好的旁分泌功能,其分泌的活性因子进入条件培养基能够提高血管内皮细生存和增殖能力。

2.4 MSC 复合生物材料加速糖尿病足愈合

为明确 MSC 复合生物材料是否具有促糖尿病足愈合的作用,我们制作了糖尿病足小鼠模型,伤口处覆盖含有 2×10^4 cell MSC 复合生物材料(治疗组)或 2×10^4 cell MSC(对照组)。从手术开始,分别在术后即时和第 7 天测量伤口面积。发现 MSC 复合生物材料治疗组糖尿病足的愈合速度明显加快,而 MSC 对照组的愈合率相对缓慢(图 3),治疗效果具有显著差异($P < 0.01$)。

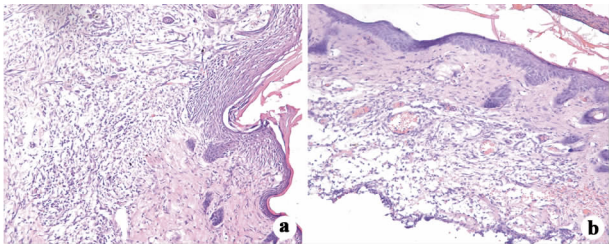


a:MSC 组手术后即时创面;b:MSC 复合生物材料组手术后即时创面;c:MSC 组手术后 7 d 创面;d:MSC 复合生物材料组手术后即时创面

图 3 MSC 复合生物材料治疗糖尿病足溃疡情况

2.5 MSC 复合生物材料促血管再生作用

血管新生是伤口愈合的关键事件[3-4],为确定 MSC 复合生物材料促进糖尿病足血管新生的能力,我们对第 7 d 伤口周围皮肤进行 H-E 染色。结果显示,与 MSC 组相比,MSC 复合生物材料组血管密度明显增高(图 4)。说明 MSC 复合生物材料能够促进血管生成。



a:MSC 组手术后 7 d 皮肤切片 HE 染色;b:MSC 复合生物材料组手术后 7 d 皮肤切片 HE 染色。

图 4 皮肤修复的病理染色

3 讨论

全世界范围内,每年有 1.0% ~4.1% 的糖尿病患者发生不同程度的足部溃疡,截肢率达到 0.21% ~1.37%,糖尿病足导致的截肢已经成为非外伤截肢的最主要原因[14]。目前的研究认为糖尿病足的发生主要是神经、血管病变、感染相互作用的结果。初始阶段,周围神经和血管病变是导致糖尿病患者发生糖尿病足的主要原因,当局部溃疡形成之后,溃疡局部组织的过度炎症也成为糖尿病足进行性加重的主要原因之一。由于糖尿病足溃疡丧失了正常伤口愈合的过程和机制,因此,伤口愈合存在障碍。糖尿病足的传统治疗主要有营养治疗和内科治疗。但是,大量临床结果表明,随着时间的推移,传统的治疗只能减缓糖尿病足的进展,并且作用微乎其微。细胞反应或炎症介质等互相作用,有效参与伤口愈合过程[15],血管新生是伤口愈合的关键部分[3-4]。针对糖尿病足病变特点,有效促使血管新生是解决问题的有效办法。

间质干细胞既具有多分化性[16],又可以分泌 IGF-1、bFGF、VEGF、IL-6 等多种促动脉生长因子[11]。但是面对高糖的微环境,间充质干细胞的功能受到抑制。干细胞治疗虽然具有一定的优势,但是,随着时间的进展,单因素治疗糖尿病足的效果逐渐不尽人意。为了提高干细胞治疗的疗效,目前已经开发出了各种新型生物材料作为干细胞的载体,虽然取得了一定的效果,但是依然不能达到我们的预期。我们利用组织工程技术,人间质干细胞复合生物电纺丝材料,发现 MSC 能够在高糖环境下更好地生长增殖。并且其条件培养基能够更好地促进内皮细胞的生长和增殖,这为加速糖尿病足血管新生,促进伤口愈合奠定了基础。MSC 在生物材料上良好生长并相互连结,是否能够抵御高糖的损伤值得深入研究,其机制有待进一步阐明。

通过生物材料复合 MSC 移植到糖尿病足创面后,细胞能够锁定在生物材料中较好发挥其旁分泌功能和多向分化的潜能,较单独细胞移植,提高了促进伤口愈合的治疗效果。本研究虽然观察周期比较短,但是已经出现促进血管新生和伤口愈合的良好效果,提示应用干细胞生物组织工程技术治疗糖尿病足等缺血性溃疡具有重大发展潜力。这给我们带来了治疗糖尿病足的希望,下一步拟研究其长期作用效果及其机制。

[参考文献]

[1] Wild S, Roglic G, Green A, et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030[J]. Diabetes Care, 2004, 27(5): 1047 - 1053.

[2] Bartus CL, Margolis DJ. Reducing the incidence of foot ulceration and amputation in diabetes[J]. Curr Diab Rep, 2004, 4(6): 413 - 418.

[3] Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot[J]. Lancet, 2005, 366(9498): 1736 - 1743.

[4] Blakytny R, Jude E. The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes[J]. Diabet Med, 2006, 23(6): 594 - 608.

[5] Sims DS Jr, Cavanagh PR, Ulbrecht JS. Risk factors in the diabetic foot. Recognition and management[J]. Phys Ther, 1988, 68(12): 1887 - 1902.

[6] Barcelos LS, Duplaa C, Kränkel N, et al. Human CD133 + progenitor cells promote the healing of diabetic ischemic ulcers by paracrine stimulation of angiogenesis and activation of Wnt signaling[J]. Circ Res, 2009, 104(9): 1095 - 1102.

[7] Badiavas EV, Falanga V. Treatment of chronic wounds with bone marrow-derived cells[J]. Arch Dermatol, 2003, 139(4): 510 - 516.

对比剂注射技术对乳腺癌磁共振间质淋巴成像的影响

程 琳,孟 珊,刘晓玲,李传明 (第三军医大学西南医院放射科,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 研究对比剂注射技术对乳腺癌磁共振间质淋巴成像的影响,建立并标准化乳腺癌磁共振间质淋巴成像对比剂注射技术流程。**方法** 将 36 例浸润性乳腺癌患者随机均分为 4 组,研究对比剂注射剂量及注射后局部按摩时间的差异对磁共振间质淋巴成像中前哨淋巴结达到最佳强化所用时间的影响,根据实验结果选择最佳对比剂注射技术方案。**结果** 相同按摩时间下,注射不同剂量对比剂对前哨淋巴结达到最佳强化图像所用时间差异无统计学意义($P>0.05$);注射相同剂量对比剂情况下,不同按摩时间对出现 SLN 最佳强化图像所用时间差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 临床工作中采用乳晕皮内注射对比剂每人 0.5 mL的剂量,注射后局部按摩 1 min,可使乳腺局域淋巴系统最佳显影。

[关键词] 乳腺癌;磁共振间质淋巴成像;注射技术

[中图分类号] R472.9;R814 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2015)04-0373-03

Influence of contrast injection methods in interstitial magnetic resonance lymphography of breast cancer

CHENG Lin, MENG Shan, LIU Xiao-ling, LI Chuan-ming (Radiology Department, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the influence of different contrast injection skills in interstitial magnetic resonance lymphography (IMRL) of breast cancer, and standardize the IMRL contrast injection process. **Methods** A total of 36 patients with invasive breast cancer were randomly divided into four groups. The imaging time of different contrast agent dose and local massage time on sentinel lymph node (SLN) were analyzed. According to the results, the best contrast injection methods technology program was choosed. **Results** For the same massage time, different contrast agent doses showed no significant difference in the SLN imaging time ($P>0.05$); For same contrast agent dose, different massage time showed significant statistically different SLN imaging time ($P<0.05$). **Conclusion** In clinical work, IMRL with a contrast agent injection dose of 0.5 mL/person, local massage 1 min after injection can successfully achieve the lymphatic system image of breast cancer.

Keywords: breast cancer; interstitial magnetic resonance lymphography; nursing

doi:10.11659/jjssx.03E015001

[通讯作者] 李传明,E-mail:451173005@qq.com

[收稿日期] 2015-03-03 [修回日期] 2015-03-20

[8] Kermani P, Rafii D, Jin DK, et al. Neurotrophins promote revascularization by local recruitment of TrkB + endothelial cells and systemic mobilization of hematopoietic progenitors[J]. J Clin Invest, 2005, 115(3): 653 - 663.

[9] Hodgkinson CP, Gomez JA, Mirotsou M, et al. Genetic engineering of mesenchymal stem cells and its application in human disease therapy[J]. Hum Gene Ther, 2010, 21(11): 1513 - 1526.

[10] Gnecchi M, He H, Liang OD, et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells[J]. Nat Med, 2005, 11(4): 367 - 368.

[11] Huang NF, Li S. Mesenchymal stem cells for vascular regeneration[J]. Regen Med, 2008, 3(6): 877 - 892.

[12] Rosenberg L, Lipsett M, Yoon JW, et al. A pentadecapeptide fragment of islet neogenesis-associated protein increases beta-cell mass and reverses diabetes in C57BL/6J mice[J]. Ann Surg, 2004, 240(5): 875 - 884.

[13] Luo JD, Wang YY, Fu WL, et al. Gene therapy of endothelial nitric oxide synthase and manganese superoxide dismutase restores delayed wound healing in type 1 diabetic mice[J]. Circulation, 2004, 110(16): 2484 - 2493.

[14] Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration[J]. Science, 1997, 276(5309): 75 - 81.

[15] Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. N Engl J Med 1999, 341(10): 738 - 46.

[16] Zhang YQ, Zeng X, He LM, et al. NT-3 gene modified Schwann cells promote TrkC gene modified mesenchymal stem cells to differentiate into neuron-like cells in vitro[J]. Anat Sci Int, 2010, 85(2): 61 - 67.

(编辑:周小林)