

# 过表达 HGF 的骨髓间充质干细胞通过 PI3K/Akt/eNOS 信号通路促进了大鼠缺血皮瓣的血管新生

竺枫\* 殷杰 薛建波 李俊杰 张健

宁波市第六医院

**【摘要】**目的：探讨 BMSCs 过表达 HGF 对大鼠缺血皮瓣的治疗效果。方法：培养 BMSCs 并用慢病毒载体转染 HGF，检测上清中 HGF。建立 SD 大鼠缺血皮瓣模型，注射 PBS、BMSCs、BMSC-HGF，检测 HGF、p-Akt、p-eNOS 表达及皮瓣血流、毛细血管密度、存活率。结果：BMSC-HGF 细胞成功表达了 HGF。BMSC-HGF 组在缺血皮瓣模型中较 BMSCs 组具有更能增强血流、血管新生和皮瓣存活，且 ELISA 和 Western Blot 表明 HGF、p-Akt、p-eNOS 表达增加。结论：HGF 过表达的 BMSCs 通过 PI3K/Akt/eNOS 通路增加血管新生和血流重建，提高皮瓣存活。

**【关键词】**肝细胞生长因子；骨髓间充质干细胞；缺血皮瓣；内皮型一氧化氮合酶；血管新生

## 引言

皮瓣移植关键在于维持血供，缺血与坏死是主要挑战<sup>[1]</sup>。间充质干细胞在提高皮瓣存活方面显示出潜力，但仍然存在局限性，如生物学功能退化等<sup>[2]</sup>；改善手段包括细胞预处理与基因修饰<sup>[3]</sup>。HGF 是促进血管新生及皮瓣存活的关键因子<sup>[4-5]</sup>。本研究利用 HGF 过表达的 BMSCs (BMSC-HGF) 探讨其促进血管新生与治疗大鼠皮瓣缺血的潜力，以期临床治疗提供新策略。

## 1 方法

### 1.1 表达载体的构建

以 HGF 氨基酸序列为基础优化并合成其编码 DNA。DNA 和慢病毒载体 pLVX-Puro 经 XhoI 和 BamHI 双酶切后，利用 T4 DNA 连接酶连接。将产物转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ，挑选氨苄青霉素抗性菌落培养并测序，确证正确后得到 pLVX-HGF 表达载体。

### 1.2 慢病毒包装

HEK 293T 细胞在 DMEM 中培养后，以 1:3:4 比例转染 PLVX-HGF、pXPAX2、PMD2G 质粒（总 20  $\mu$ g），利用 lipofectamine 3000 转染，48 h 收集病毒上清，离心去除碎片，用 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤。病毒沉淀经 PBS 重悬，-80  $^{\circ}$ C 保存。

### 1.3 大鼠骨髓间充质干细胞的提取

雄性 SD 大鼠 6 只，腹腔注射水合氯醛溶液麻醉。在无菌条件下取骨髓液，过滤去杂质后离心，弃上清保留细胞沉淀。细胞重悬于 DMEM/F12 培养基（10% FBS）并培养，2 h 后换液去非贴壁细胞，继续培养至 80-90% 汇合度时分传；用流式细胞仪检测 CD34+、CD73+ 细胞表面标志物。

### 1.4 转染大鼠骨髓间充质干细胞

对数生长期 BMSCs 胰酶消化后，接种至 12 孔板过夜至 70-80% 汇合。加入 PBS 稀释的病毒转染，继续培养 48 h；筛选稳转细胞，液氮保存。复苏后，培养 72 h 并用 Western Blot 检测 HGF 蛋白，包括 SDS-PAGE 分离、PVDF 转膜、抗体检测及 ECL 发光定量。

### 1.5 大鼠缺血皮瓣的制备及治疗处理

按文献<sup>[7]</sup>建立大鼠随意皮瓣模型。雄性 SD 大鼠麻醉后，切割背部 8  $\times$  2 cm 皮瓣，保留蒂部主要血管。分为 PBS 对照、BMSCs 空载及 BMSC-HGF 组（各 6 只），皮瓣 10 等分，分别注射 0.1 mL。第 3、7 d 观察皮瓣生存指标，用激光多普勒血流仪监测毛细血管血流量，HE 染色计算血管密度，Western Blot 检测 HGF、p-Akt、Akt、p-eNOS 及 eNOS 表达。

### 1.6 检测血清及皮瓣中的 HGF、p-Akt 及 p-eNOS 的表达水平

术后第 7 天，从大鼠尾巴采血，EDTA-Na<sub>2</sub> 离心分离血清，并用 ELISA 检测 HGF 浓度。取皮瓣组织快速冷冻后 -80  $^{\circ}$ C 保存。组织样本 RIPA 裂解，12000 g 离心收集蛋白。经 SDS-PAGE 电泳，PVDF 转印，5% 脱脂

奶粉封闭, 抗体孵育及 ECL 显影后, 使用 Image J 软件进行灰度分析, 以 GAPDH 内参, 计算目标蛋白的相对表达量。

## 2. 结果

### 2.1 BMSCs 培养及 HGF 表达载体的构建、转染、表达

成功提取并培养了 BMSCs, 并通过流式细胞仪检测确定, CD73+呈阳性表达, 而 CD34+呈阴性, 完全符合 BMSCs 的特征。构建了序列正确的 pLVX-HGF 载体; 通过脂质体转染将其导入 BMSCs 并通过 Western Blot 检测培养上清中的 HGF。结果表面 HGF 蛋白(约 90 kDa)在上清中被成功检出, 略大于预期分子量(85 kDa), 可能因为糖基化; 这证明 BMSCs 通过载体成功表达并分泌 HGF。

### 2.2 大鼠皮瓣存活情况及相关指标的检测

术后第 3 d, PBS 组皮瓣颜色加深、较硬、有淤血; BMSCs 和 BMSC-HGF 组无显著坏死。第 7 d, PBS 组皮瓣明显坏死; BMSCs 组较少, 统计学上显著( $p < 0.05$ ); BMSC-HGF 组坏死率最低, 显著低于 BMSCs 组( $p < 0.01$ ), 且有新生毛发。多普勒血流监测表明 BMSCs 组血流强于 PBS 组( $p < 0.05$ ), BMSC-HGF 组强于 BMSCs 组( $p < 0.01$ )。HE 染色显示 BMSCs 组毛细血管密度高于 PBS( $p < 0.05$ ), BMSC-HGF 组最高(表 1)。结果表明, BMSCs 与 HGF 联用显著增强血液循环和血管形成, 对皮瓣存活至关重要。

### 2.3 检测大鼠血清及皮瓣组织中 HGF 的表达

ELISA 检测 7 d 后血清样本, BMSC-HGF 组血清中 HGF 含量显著高于 PBS 和 BMSCs 组( $p < 0.01$ ), 而 BMSCs 组未显著增加 HGF。Western Blot 同样显示 BMSC-HGF 组皮瓣组织中 HGF 表达量显著提升(表 2)。

表 1 不同处理对大鼠皮瓣存活率、血流信号强度及毛细血管密度的影响

组别	皮瓣存活率 (%)	血流信号强度 (PU)	毛细血管密度 (条/mm <sup>2</sup> )
PBS	35.16 ± 6.29	176.89 ± 19.81	14.51 ± 3.22
BMSCs	48.65 ± 8.16 <sup>*</sup>	239.57 ± 34.27 <sup>*</sup>	20.52 ± 4.13 <sup>*</sup>
BMSC-HGF	68.73 ± 10.45 <sup>***#</sup>	317.15 ± 37.51 <sup>***#</sup>	28.95 ± 6.16 <sup>***#</sup>

注: 与 PBS 组相比, <sup>\*</sup> $p < 0.05$ , <sup>\*\*\*</sup> $p < 0.001$ ; 与 BMSC 组相比, <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $p < 0.01$ 。

表 2 采用 ELISA 和 Western Blotting 对血清和皮瓣内的 HGF 进行检测

组别	HGF (pg/mL, ELISA)	HGF (Western Blotting)
PBS	126.42 ± 21.59	1.05 ± 0.09
BMSCs	149.64 ± 31.25	1.19 ± 0.08
BMSC+VEGF+bFGF	246.11 ± 46.79 <sup>**</sup>	1.79 ± 0.16 <sup>**</sup>

注: 与 PBS 组相比, <sup>\*\*</sup> $p < 0.01$ 。

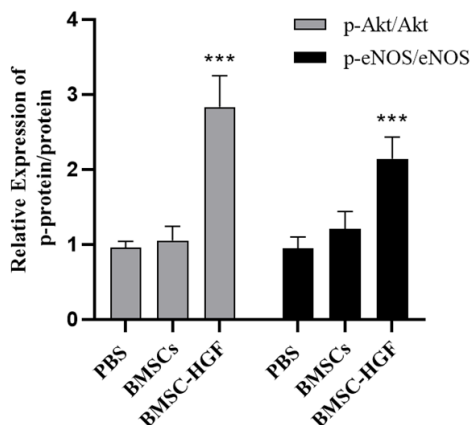


图 1 Image J 软件对 Western Blot 结果进行灰度分析。

### 2.4 检测大鼠皮瓣中的 p-Akt 及 p-eNOS 的量

通过 Western Blot 检测大鼠皮瓣组织内 p-eNOS 和 p-Akt, 结果表明 BMSC-HGF 显著增加了 p-Akt 和 p-eNOS 的表达( $p < 0.001$ ), 单独 BMSCs 没有显著性增加(图 1)。这表明 BMSC-HGF 可能通过 PI3K/Akt 通路提高 eNOS 磷酸化, 促进血管新生。

## 3. 讨论

皮瓣移植中的主要挑战是缺血引发的组织损伤与坏死, 血管生成是关键过程, 但涉及多种生物学机制<sup>[6]</sup>。BMSCs 因多向分化潜能、免疫调节

及旁分泌效应被视为治疗工具, HGF 则因促进血管新生等显著作用而被重视。先前研究表明, HGF 增强血管内皮生长因子表达, 提高皮瓣存活<sup>[7,8]</sup>。

本研究通过慢病毒转染 BMSCs 表达 HGF, 证实了 HGF 蛋白在 BMSCs 培养上清中成功表达。构建的大鼠缺血皮瓣模型中, BMSC-HGF 提高了血清和皮瓣 HGF 表达, 促进了毛细血管密度和血流强度, 改善了皮瓣存活率。BMSCs 可能通过分泌 VEGF、bFGF 等促血管新生因子, 或分化成内皮和平滑肌细胞直接参与血管再生<sup>[9,10]</sup>。

Western Blott 结果显示 BMSC-HGF 提高了 p-Akt 和 p-eNOS 表达, 表明参与了 PI3K/Akt 信号通路, 可能通过 Akt 介导磷酸化增加 eNOS 活性, 促进 NO 生成, 该过程对血管新生和皮瓣存活至关重要<sup>[11,12]</sup>。VEGF、bFGF 及 PDGFs 等在血管生成中也表现出了显著的促进作用<sup>[13]</sup>。未来研究应考虑联合多种细胞因子, 以增强移植皮瓣的血管新生与存活。

综上所述, 本研究利用大鼠缺血皮瓣模型, 证明了注射过表达 HGF 的 BMSCs 可以显著增加血清及皮瓣组织中的 HGF 的表达量, 更有效的促进缺血皮瓣的血管新生及皮瓣存活; 这可能与 BMSC-HGF 参与了 PI3K/Akt/eNOS 信号通路有关; 本研究结果为进一步优化临床上治疗移植皮瓣缺血提供了理论依据和治疗思路。

#### 参考文献:

[1] Li RG, Yu B, Wang G, et al. Sequential therapy of vacuum sealing drainage and free-flap transplantation for children with extensive soft-tissue defects below the knee in the extremities[J]. *Injury*, 2012, 43(6):822-828.

[2] Xuan W, Khan M, Ashraf M. Extracellular vesicles from Notch activated cardiac mesenchymal stem cells promote myocyte proliferation and neovascularization[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 11.

[3] 何波, 何志军, 李金鹏, 等. 提高间充质干细胞治疗皮瓣缺血再灌注损伤的策略[J]. *中国组织工程研究*, 2024, 28(19): 2097-3103.

[4] Nakamura T, Sakai K, Nakamura T, et al. Hepatocyte growth factor twenty years on: Much more than a growth factor[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26 Suppl 1: 188-202.

[5] Seyed Jafari SM, Shafiqhi M, Beltraminelli H, et al. Improvement of flap necrosis in a rat random skin flap model by in vivo electroporation-mediated HGF gene transfer[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2017, 139(5): 1116e-1127e.

[6] Hsueh YY, Wang DH, Huang TC, et al. Novel skin chamber for rat ischemic flap studies in regenerative wound repair[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7(1): 72.

[7] Otrrock ZK, Mahfouz RA, Makarem JA, et al. Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2007, 39(2): 212-220.

[8] 赵毅, 闫洪伟, 王玉琦, 等. 腺病毒介导的肝细胞生长因子/血管内皮生长因子 165 对大鼠超比例随意皮瓣成活的影响其机制研究[J]. *中国美容医学*, 2024, 33(2): 60-63.

[9] Rah DK, Yun IS, Yun CO, et al. Gene therapy using hepatocyte growth factor expressing adenovirus improves skin flap survival in a rat model[J]. *J Korean Med Sci*, 2014, 29 Suppl 3(Suppl 3): S228-36.

[10] Pill K, Hofmann S, Redl H, et al. Vascularization mediated by mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue: a comparison[J]. *Cell Regen*, 2015, 4: 8.

[11] Kuppuswamy S, Annex BH, Ganta VC. Targeting anti-angiogenic VEGF165b-VEGFR1 signaling promotes nitric oxide independent therapeutic angiogenesis in preclinical peripheral artery disease models[J]. *Cells*, 2022, 11(17): 2676.

[12] Zhang Y, Khoi PN, Cai B, et al. Sulforaphane regulates eNOS activation and NO production via Src-mediated PI3K/Akt signaling in human endothelial EA.hy926 Cells[J]. *Molecules*, 2022, 27(17): 5422.

[13] Omorphos NP, Gao C, Tan SS, et al. Understanding angiogenesis and the role of angiogenic growth factors in the vascularisation of engineered tissues[J]. *Mol Biol Rep*, 2021, 48(1): 941-950.

基金项目: 浙江省宁波市科技计划项目(2018A610258)