

过表达 VEGF 和 bFGF 的骨髓间充质干细胞促进了大鼠缺血皮瓣的血管新生及存活

竺枫^(通讯作者) 殷杰 祝斌 滕晓峰 杨科跃
(宁波市第六医院)

摘要: 目的: 本研究旨在探索共过表达 VEGF 和 bFGF 的 BMSCs 对大鼠缺血皮瓣血管新生与存活的影响。方法: 经脂质体介导的 VEGF 和 bFGF 共转染后, 评估 BMSCs 对 HUVEC 增殖的作用; 建立 SD 大鼠缺血皮瓣模型, 设 PBS、BMSC、BMSC+VEGF+bFGF (BVbF) 组, 进行对应处理并检测 VEGF、bFGF、eNOS 表达及皮瓣存活率、血流与毛细血管密度。结果: BVbF 组较其他组更有效促进 HUVEC 增殖、皮瓣存活、血流恢复及 eNOS 的表达。结论: VEGF 和 bFGF 共表达 BMSCs 有助于缺血皮瓣血管新生和存活, 可能通过增强 eNOS 表达发挥作用。
关键词: 血管内皮生长因子; 碱性成纤维生长因子; 骨髓间充质干细胞; 缺血皮瓣; 内皮型一氧化氮合酶

引言

皮瓣移植是修复局部皮肤软组织缺损的关键手段, 但其成功受限于缺血性挑战^[1]。传统治疗方法, 如物理、药物治疗及手术, 尽管有所改善, 但在重度缺血情况下仍有局限^[2]。骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 因分化潜能及免疫调节作用, 被视为缺血皮瓣治疗的新途径^[3]。然而, BMSCs 疗效受限于分化效率及促血管生成因子的释放量。VEGF 与 bFGF 是促血管新生的关键因子, 其联合应用已显示出改善缺血组织血供的潜力^[4]。本研究通过将 VEGF 和 bFGF 共转染 BMSCs 并应用于大鼠缺血皮瓣模型, 旨在提高其促血管再生能力, 探讨其对皮瓣存活率的影响, 并分析相关生物学机制, 以期为临床研究提供新见解。

1. 实验方法

1.1 共表达载体构建

为实现 VEGF 与 bFGF 共表达, 采用 IRES 序列连接两基因, 确保独立表达。序列两端添加 HindIII 和 XhoI 位点, 与 pcDNA 3.1(+) 载体连接。连接产物转化入大肠杆菌 DH5 α , 经氨苄青霉素筛选后测序, 得到 pcDNA3.1-VEGF-IRES-bFGF。同时构建单独表达 VEGF 及 bFGF 的载体, 用于活性比较。

1.2 大鼠骨髓间充质干细胞的提取和培养

选用 SPF 级大鼠 5 只, 饲养适应后, 腹腔注射水合

氯醛溶液实施麻醉。无菌条件下提取股骨和胫骨, 骨髓用生理盐水冲洗, 离心后去上清, 沉淀用 DMEM/F12 培养。细胞培养至 P3 时, 用胰酶消化后, 用 CD73-PE、CD34-FITC、CD45-FITC、CD105-FITC 标记, 流式细胞仪检测 BMSCs 标志物。

1.3 细胞转染及表达

大鼠 BMSCs 在 10 cm 培养皿至 70~80% 融合度后使用 Lipofectamine 3000 进行转染。无血清培养基中加入表达载体与转染试剂混合物, 培养至 4~6h 后更换完全培养基, 继续培养 72 小时。后续使用 Western Blot 检测 VEGF 与 bFGF 表达, 包括 SDS-PAGE 分离, PVDF 膜转移, 特异性抗体检测及 eCL 化学发光确定蛋白信号。

1.4 VEGF 及 bFGF 对 HUVEC 细胞增殖的影响

HUVEC 细胞以 Ham's F-12K 培养基, 含 10% FBS、肝素和 ECGS, 分为 Control、BMSCs、BMSC+VEGF、BMSC+bFGF、BMSC+VEGF+bFGF (BVbF) 组进行培养。96 孔板接种 HUVEC, 加入质粒转染后细胞培养上清, 24h 后 CCK-8 法测细胞增殖。

1.5 大鼠缺血皮瓣的制备

参照文献^[5]制备大鼠随意皮瓣, 麻醉后分为 PBS、BMSCs、BVbF 组进行处理。皮瓣存活通过颜色、硬度评估, 并计算存活率。术后第 7 天用激光多普勒仪测定血流, HE 染色分析毛细血管密度。

1.6 检测血清及皮瓣中的 VEGF 及 bFGF 的表达水平
术后 7 天, 采集大鼠血清, 用 ELISA 检测 VEGF 和 bFGF。处死大鼠后, 皮瓣组织冷冻保存, 用 TRIzol 提取 RNA 进行 qRT-PCR。组织样品匀浆后离心, 获得蛋白上清, SDS-PAGE 电泳后 PVDF 转膜, 用抗体孵育, eCL 显色, Image J 软件分析蛋白表达。

2. 结果

2.1 VEGF 及 bFGF 的表达

成功提取了大鼠 BMSCs, 通过流式细胞仪检测发现 CD34+和 CD45+呈现阴性, 而 CD73+和 CD105+呈现阳性表达, 符合 BMSCs 的特征。成功构建了 pcDNA3.1-VEGF-IRES-bFGF 表达载体, 实现了 VEGF 和 bFGF 共表达。载体转染 BMSCs 后, Western Blot 检测蛋白表达, 结果表明 VEGF 的分子量大约 19 kDa, bFGF 的分子量大约 17 kDa, 与理论分子量相符, 证实成功表达了 VEGF 和 bFGF。

2.2 大鼠皮瓣存活情况观察及检测

术后各大鼠组皮瓣肿胀, 至第 3 天 PBS 组出现坏死, BMSC 及 BVbF 组状况较好。第 7 天, PBS 组坏死加剧, BMSC 组较低, BVbF 组坏死率最低, 且有新生毛发 ($p < 0.01$, 表 1)。多普勒显示 BVbF 组血流最佳。HE 染色证实 BVbF 组毛细血管密度最高, 表明 VEGF 和 bFGF 显著促进血液循环和血管新生。

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)	毛细管密度 (条/mm ²)
PBS	40.28 ± 7.89	204.68 ± 21.59	16.59 ± 3.26
BMSC	52.49 ± 9.51*	258.56 ± 31.42*	24.46 ± 4.24**
BVbF	72.88 ± 10.45** ##	335.56 ± 38.16***##	31.72 ± 5.44***#

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

2.3 大鼠血清中 VEGF 和 bFGF 的含量

通过 ELISA 的方式检测了手术后第 7 d 时血清中的 VEGF 和 bFGF 的含量。结果显示, 与 PBS 组相比, BMSC 组 VEGF 和 bFGF 的含量均有显著升高 ($p < 0.01$); 而转染共表达载体后, 更进一步的提高了血清中的 VEGF ($p < 0.01$) 和 bFGF ($p < 0.05$) 表达量 (表 2)。

表 2 ELISA 方法检测大鼠血清中 VEGF 及 bFGF 的量

组别	VEGF	bFGF
PBS	98.78 ± 16.24	596.58 ± 59.87
BMSC	186.35 ± 29.56**	895.97 ± 66.95**
BVbF	258.69 ± 36.64***##	1208.62 ± 102.24***#

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

2.4 检测大鼠皮瓣中的 VEGF、bFGF 及 eNOS 的表达量

eNOS 在血管功能中扮演关键角色。利用 qRT-PCR 和 Western Blot 技术检测大鼠皮瓣中 VEGF、bFGF、eNOS 表达。结果显示, BMSC 注射组的表达量显著高于 PBS 组, BVbF 组更高 ($p < 0.05$, 表 3)。Western Blot 定量分析 (Image J 灰度分析) 与 qRT-PCR 结果一致, 反映 BVbF 显著促进 eNOS 表达。

表 3 检测大鼠皮瓣组织中 VEGF、bFGF 及 eNOS 的表达量

组别	VEGF	bFGF	eNOS
PBS	1.03 ± 0.15	1.01 ± 0.11	1.02 ± 0.21
BMSC	1.96 ± 0.56*	2.20 ± 0.32*	1.94 ± 0.31*
BVbF	4.20 ± 0.91***#	3.01 ± 0.52**#	3.62 ± 0.68**#

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

3. 讨论

皮瓣移植在修复皮肤缺损、重建功能及外观中至关重要^[6]。血管新生对皮瓣存活至关重要。BMSCs 具多向分化潜力, 已研究用于促进缺血组织血管化, 且临床应用安全^[7]。VEGF 和 bFGF 为关键血管生成因子, 影响内皮细胞增殖和血管形成^[8]。基因工程技术应用于细胞, 如

ADSCs 和 BMSCs, 可持续产生 VEGF 或 bFGF, 促进血管新生。本研究探讨 BMSCs 联合 VEGF 和 bFGF 于移植皮瓣血管新生, 可能存在协同效应, 增强血管形成效率和质量。BMSCs 能分泌多种因子及释放外泌体, 促进血管修复^[9], 来源广泛且易得。

本研究中在 BMSCs 中实现了 VEGF 与 bFGF 共表达, 促进了 HUVEC 增殖, 显示了协同效应。模型大鼠实验中, BVbF 提高血清及皮瓣中 VEGF 及 bFGF 表达, 促进了血管新生和血运重建, 优于单独的 BMSCs。eNOS 的表达也被显著提升, eNOS 能催化 NO 产生, 改善缺血供血^[10,11]。研究表明 VEGF 和 bFGF 通过激活 PI3K/Akt 通路增强 eNOS 磷酸化, 增加 NO 产生, 促进血管舒张与新生, 对缺血皮瓣存活有益^[21]。PDGFs、HGF、Angiopoietins 等也能促进血管生成, 可考虑联合应用^[12]。

综上所述, 本研究在大鼠缺血皮瓣模型中证实, BMSCs 共表达 VEGF 和 bFGF 显著促进 VEGF、bFGF 及 eNOS 表达, 有效支持血管新生与组织修复。这为临床皮瓣移植提供了新策略。未来需进一步深入研究该协同作用的具体信号通路和分子机制, 并探索其在临床上的应用潜力。

参考文献:

- [1]Tang X, Ren, J, Wei X, et al. Exploiting synergistic effect of CO/NO gases for soft tissue transplantation using a hydrogel patch[J].Nat Commun 2023, 14(1): 2417.
- [2]Afrooghe A, Damavandi AR, Ahmadi E, et al. The current state of knowledge on how to improve skin flap survival: A review[J]. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2023, 82:48–57.
- [3]Tang YH, Pennington LA, Scordino JW, et al. Dynamics of early stem cell recruitment in skin flaps subjected to ischemia reperfusion injury[J]. Pathophysiology. 2016, 23(3):221–228.
- [4]Pei YK, Zhang LC, Mao XY, et al. Biomaterial scaffolds for improving vascularization during skin flap regeneration[J]. Chinese Journal of Plastic and Reconstructive Surgery, 2020, 2(2): 109–119.
- [5]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.
- [6]徐永清, 何晓清. 皮瓣外壳的新进展[J]. 中国修复重建外科杂志, 2018, 32(7): 781–785.
- [7]Wang X, Li C, Zheng Y, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells increase skin regeneration efficiency in skin and soft tissue expansion[J]. Expert Opin Biol Ther. 2012, 12(9):1129–1139.
- [8]Spanholtz TA, Theodorou P, Holzbach T, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF165) plus basic fibroblast growth factor (bFGF) producing cells induce a mature and stable vascular network—a future therapy for ischemically challenged tissue[J].J Surg Res.2011,171(1):329–338.
- [9]Lu GD, Cheng P, Liu T, Wang Z. BMSC-derived exosomal miR-29a promotes angiogenesis and osteogenesis[J]. Front Cell Dev Biol. 2020, 8:608521.
- [10]Dulak J, Guzik TJ. Angiogenesis, stem cells, eNOS and inflammation—the many faces of vascular biology[J]. Thromb Haemost. 2012, 108(5):801–803.
- [11]Yang X, Li X, Luo M, et al. Tubeimoside I promotes angiogenesis via activation of eNOS-VEGF signaling pathway[J]. J Ethnopharmacol. 2021, 267:113642.
- [12]Grochot-Przeczek A, Dulak J, Jozkowicz A. Therapeutic angiogenesis for revascularization in peripheral artery disease[J]. Gene. 2013, 525(2):220–228.
- [基金项目]浙江省宁波市科技计划项目(2018A610258)