

骨髓间充质干细胞移植促进皮瓣存活的实验研究

方 芳,林建忠,庄跃宏,李光文*

(福建医科大学药学院,福建 福州 511400)

[摘要] 目的:探讨骨髓间充质干细胞移植促进跨区皮瓣存活的作用。方法:采用全骨髓差异贴壁法培养获得骨髓间充质干细胞,90%融合后消化传代扩增。传至第3代后行CD29⁺、CD90⁺、CD34⁻、CD45⁻细胞免疫表型鉴定后备用。SD大鼠20只,体重300~350g,随机等分为两组:对照组切取大鼠背部一侧跨3个区皮瓣后缝回原处;治疗组切取大鼠背部一侧跨3个区皮瓣,缝回原处后1h,按每100g体重注射1ml骨髓间充质干细胞悬液(1×10^6 个/ml)至尾静脉。观察两组大鼠1周后皮瓣坏死率,同时比较choke区choke血管的管径大小。结果:分离培养的第3代大鼠骨髓间充质干细胞中CD29阳性细胞为99.3%,CD90阳性细胞为93.5%,CD34阳性细胞为0.82%,CD45阳性细胞为2.22%。术后7d对照组皮瓣坏死率为(29.4 ± 4.2)%,髂腰动脉与肋间动脉之间choke血管的管径(183 ± 25)μm;治疗组皮瓣坏死率为(10.4 ± 3.3)%,髂腰动脉与肋间动脉之间choke血管的管径为(226 ± 23)μm,治疗组皮瓣坏死率显著小于对照组($P < 0.001$),治疗组choke血管管径显著大于对照组($P = 0.001$)。结论:骨髓间充质干细胞移植后能够通过促进choke血管扩张的方式促进皮瓣存活,其分子生物学机制有待进一步探讨。

[关键词] 干细胞;皮瓣;choke血管

[中图分类号] R622⁺.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)03-352-05

doi:10.7655/NYDXBNS20150311

Bone marrow mesenchymal stem cells promote survival of extended flap

Fang Fang, Lin Jianzhong, Zhuang Yuehong, Li Guangwen*

(Pharmacological Department, Fujian Medical University, Fuzhou 511400, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate whether systematic implantation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) can promote the survival of expanded flap. **Methods:** BMMSCs of rats were isolated through the whole bone marrow adherent method and propagated to the third generation. When 90% cells were confluent, BMMSCs were digested and cultured. After three passages, cell immunophenotype of CD29⁺, CD90⁺, CD34⁻ and CD45⁻ were determined. A total of 20 Sprague-Dawley (SD) rats, weighing 300-350 g, were randomly divided into 2 groups equally: the control group and the treatment group. In the control group, a dorsal expanded skin flap across 3 areas was harvested and sutured back. In the treatment group, 1 h after the harvest and suturing back of a dorsal expanded flap, 1 ml of suspension of BMSC/100 g (1×10^6 cell/ml) was injected in the rats through the tail veins. One week later, the necrotic flaps of rats in both groups and the diameter of choke vessels between the iliolumbar angiosome and the intercostal angiosome were measured and compared. **Results:** Positive expressions of CD29, CD9, CD34 and CD45 were 99.3%, 93.5%, 0.82% and 2.22%, respectively, in the third generation of cell culture. One week after flap harvest, the necrotic rate of the flap was (29.4 ± 4.2)% in the control group, which was significantly larger than that in the treatment group [(10.4 ± 3.3)%, $P < 0.001$]. The diameter of choke vessels between the iliolumbar angiosome and the intercostal angiosome in the control group was (183 ± 25) μm, which was statistically smaller than that in the treatment group [(226 ± 23) μm, $P = 0.001$]. **Conclusion:** BMMSCs can obviously promote survival of expanded flap in rats through enhancing the dilation of choke vessels, and the mechanism of which remains to be further investigated.

[Key words] stem cells; flap; choke vessels

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(03):352-356]

[基金项目] 福建省自然科学基金项目(2014J05090);福建省教育厅项目(JK2013020)

*通信作者(Corresponding author), E-mail:lgw6301@fjmu.edu.cn

临床上由创伤、肿瘤切除及先天性畸形等引起的组织缺损面积加大,进行组织修复时切区皮瓣往往超过单个轴型血管的解剖学供区,就是所谓的跨区皮瓣。大量动物实验及临床经验表明当以一个穿支为蒂,向一侧切取1个跨3个血管区的皮瓣时,皮瓣坏死常发生在动力供区与潜力供区之间的 Choke 吻合区^[1],也就是说蒂部的血供并不能通过血管体之间的吻合向远端无限制供血,越往远端,养分供应就越少。当满足不了组织最基本的需求时,皮瓣轻则出现纤维化、萎缩等,重则坏死。临床上在修复较大组织缺损时,为了尽量提高皮瓣存活率,最常采用的方法就是延迟皮瓣。虽然延迟术能够促进大型皮瓣的存活,但是由于其需要额外手术,增加患者的病痛及经济负担,并没有广泛开展,因此如能实现“药物延迟”,也就是通过药物促进跨区皮瓣内 choke 血管扩张,将更有临床意义。文献已有报道骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)能够促进缺血下肢中侧副血管的扩张,故本文旨在探讨 BMSCs 移植入大鼠背部跨区皮瓣坏死模型后是否能够促进跨区皮瓣的存活。

1 材料和方法

1.1 材料

补充清洁级雄性 SD 大鼠 20 只,体重 300~350 g,购于福建医科大学动物实验中心。DMEM/F12 (Hyclone 公司,美国),DMEM、青霉素、链霉素 (Gibco 公司,美国),胰蛋白酶 (Sigma 公司,美国),IX-70 倒置显微镜 (Olympus 公司,美国),CD29 抗体、CD90 抗体、CD34 抗体、CD45 抗体 (Biolegend 公司,美国),流式细胞仪 (Coulter 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 BMSCs 的全骨髓贴壁培养法

按照全骨髓差异贴壁培养法取 SD 大鼠两侧股骨及胫骨,超净台上剪去两骨端,DMEM/F12 冲洗髓腔,200 目滤网过滤后细胞悬液 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清。加入 10%FBS/DMEM-F12+1%青链霉素培养基重悬细胞,按 3×10^5 个/L 细胞密度接种于 25 cm² 培养瓶中,放入 37°C、饱和湿度、5% CO₂ 培养箱中孵育。48 h 后首次换液,以后 2~3 d 换液 1 次,定期观察细胞分裂增殖和形态特征变化等情况。待细胞长满培养瓶底部 90%后按 1:2 或 1:3 传代。传至 P3 代,胰酶消化,收获细胞,计数后备用。

1.2.2 细胞表面标记物流式细胞仪检测

0.25%胰酶-0.1%EDTA 消化并收集生长良好的

P3 代 BMSCs, PBS 漂洗重悬,经 200 目过滤网处理制成单细胞悬液。细胞计数后,分装入 7 个 EP 管,每管 100 μ l,约 1×10^6 个细胞。分别为 CD29 及其同型对照管、CD34 及其同型对照管、CD45 和 CD90 及其同型对照管 (CD45 和 CD90 为同一同型对照)。室温避光条件下按标准稀释各抗体 (CD29 及其同型对照 1:16 稀释,CD45、CD90 及其同型对照 1:8 稀释,CD34 不必稀释)。取标记抗体 20 μ l 加入相应各管内,室温混匀并避光孵育 40 min。PBS 洗涤 2 遍。通过光电倍增管 PMT2 通道检测 PE 的荧光强度,分析 CD29⁺、CD90⁺、CD34⁻、CD45⁻ 细胞占总体细胞比例,Coulter 分析系统测定样品中 BMSCs 纯度。

1.2.3 大鼠背部跨区皮瓣坏死模型建立及分组

由文献可知 SD 大鼠背部单侧背覆组织主要由 3 根血管供应,从头至尾分别为胸背动脉穿支、肋间后动脉穿支、髂腰动脉穿支,形成了上、中、下 3 个穿支体区 (图 1)。本研究设计切取以髂腰动脉穿支为蒂、囊括肋下动脉穿支及胸背动脉穿支、大小为 10 cm \times 3 cm 的皮瓣。皮瓣切取后,将大鼠随机分为两组:对照组,皮瓣切取后不进行任何干预;BMSCs 组,皮瓣切取 1 h 后,经尾静脉按每 100 g 体重注射 1 ml BMSCs 悬液 (1×10^6 个/ml)。1 周后,取肋间髂腰动脉与肋间动脉 choke 区一小块组织,石蜡包埋及组织切片后行 Von Willebrand 因子 (vWF) 免疫组化间接法染色。后随机取 3 张切片,每张切片取 10 个 200 倍视野 (在真皮层范围内),计算微血管管径的大小,对两个大鼠 choke 区血管管径的大小作比较。之后处死大鼠,脱毛,拍照,利用 Photoshop CS5 测量皮瓣坏死面积,计算皮瓣坏死率 [皮瓣坏死率 (%) = 皮瓣坏死面积 / 皮瓣总面积 \times 100%]。

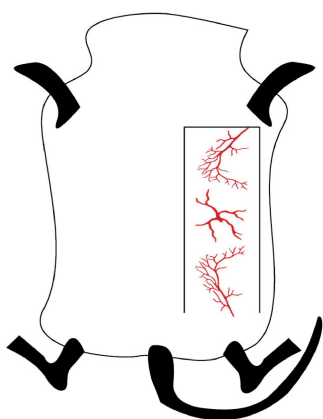
1.3 统计学方法

数据均采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,用 SPSS13.0 统计软件进行分析,两组 choke 区血管管径的比较用两样本独立 *t* 检验,皮瓣坏死率的比较利用 Mann-Whitney 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 光镜下 BMSCs 形态学观察

体外培养的 BMSCs 有较强增殖力。原代细胞培养 1 d 后可观察到多数死亡红细胞悬浮于培养基表面,部分沉淀细胞已贴壁;经过 2 d 换液后,大量



从头部至尾部的血管分别为胸背动脉穿支、肋间后动脉穿支、髂腰动脉穿支。皮瓣切取时,切断皮瓣的3个边,掀起皮瓣,保留靠近尾部的一个边,即为蒂部髂腰动脉所在位置。皮瓣切取后缝回原处。

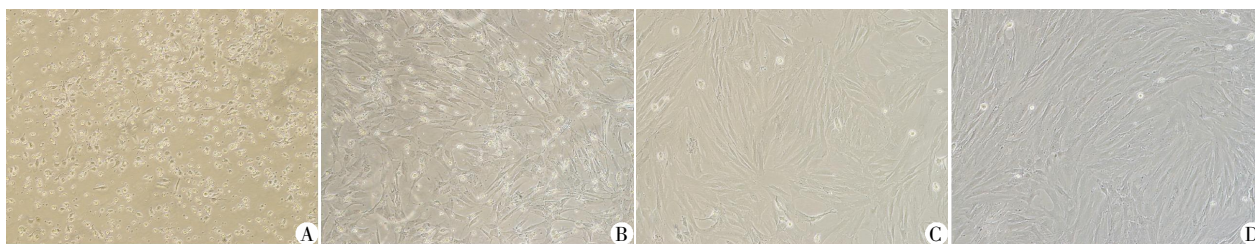
图1 大鼠背部跨区皮瓣切取示意图

Figure 1 The schematics of harvest of the extended flap on the back of the rat

未贴壁细胞被剔除,贴壁细胞体积较小,形态多样,多呈圆形或椭圆形(图2A)。4~6 d 细胞分裂增殖加快,多呈较瘦小的长梭形,体积较前稍大,迅速铺满瓶底局部区域,呈漩涡状排列,并有大小不等放射状密集排列的细胞集落(图2B)。传代培养时,细胞在接种后 1~2 d 即可贴壁,P2代 BMMSCs 细胞形态绝大多数为成纤维样,旋涡样分布增多(图2C)。P3代 BMMSCs 绝大多数呈长梭形,类似膜状铺展在瓶底,并保持旺盛的生长状态,旋涡样分布较 P2代更为明显(图2D)。

2.3 细胞流式检测

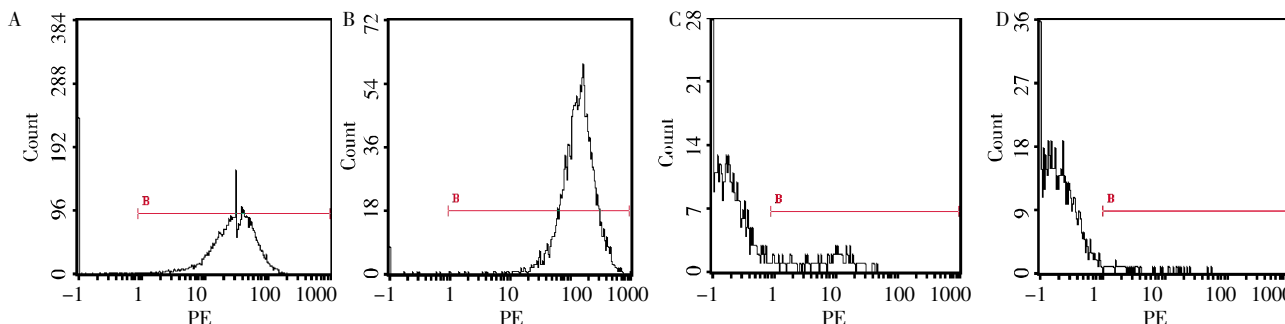
流式细胞仪检测 P3代 BMMSCs 细胞表面标志物,CD90 阳性细胞 99.3%,CD29 阳性细胞 93.5%,CD34 阳性细胞 0.82%,CD45 阳性细胞 2.22%(图3),与文献报道相符。



A: 原代培养 2 d,绝大多数贴壁细胞形态不规则、多样性;B: 原代培养过程中见到典型的长梭形 BMMSCs 细胞形态;C: P2代 BMMSCs 类似成纤维样,紧密排列,局部漩涡样分布;D: P3代 BMMSCs 培养 4 d,细胞排列具有较强方向性,漩涡样分布明显。

图2 光镜下 BMMSCs 形态学(x100)

Figure 2 Morphology of BMMSCs under light microscopy(x100)



A: 免疫表型 CD90⁺; B: 免疫表型 CD29⁺; C: 免疫表型 CD45⁺; D: 免疫表型 CD34⁺。

图3 细胞流式检测结果

Figure 3 The results of the flow cytometry

2.4 皮瓣坏死率及 choke 血管管径

术后 7 d 对照组皮瓣坏死率为 (29.4 ± 4.2)%, 治疗组皮瓣坏死率为 (10.4 ± 3.3)%, 经 Mann-Whitney 检验, 治疗组皮瓣坏死率显著小于对照组 (P < 0.001, 图4)。术后 7 d 对照组髂腰动脉与肋间动脉之间 choke 血管的管径为 (183 ± 25) μm, 治疗组为 (226 ± 23) μm, 治疗组 choke 血管的管径显著大于

对照组 (t = -4.43, P = 0.001, 图5)。

3 讨论

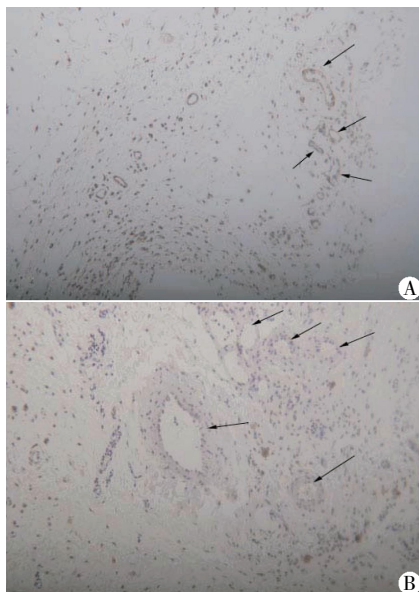
3.1 大鼠背部的跨区模型

以往文献资料表明, 人体皮肤的每一支动脉均有一个明确的供血范围, 即解剖学供区。每一个解剖学供区与其周围相邻动脉之间均有丰富的吻合,



图 4 7 d 后两组大鼠背部皮瓣的坏死情况

Figure 4 The development of necrosis on the flaps 7 d after harvest in the treatment and control groups



7 d 后对照组大鼠(A)与治疗组大鼠(B)髂腰动脉与肋间动脉之间 choke 血管的管径,箭头所示为血管壁。

图 5 Von Willebrand 因子免疫组化间接法染色($\times 200$)

Figure 5 Indirect immunostaining results of Von Willebrand($\times 200$)

Taylor 等^[2]将这种吻合称为 choke 血管。当一侧血管被切断或阻断时,其管道内的血压下降。此时,解剖学供区血管内的血流就会跨越原来的吻合部位向其供血。这种紧邻解剖学供区的扩张部分被称之为血流动力供区。在跨越动力学供区的基础上,若再继续向远邻的供区延伸,则称其为潜力供区^[3-4]。切取了超过单一血管供区的皮瓣便为跨区皮瓣,其是临床上修复大面积组织缺损的主要手段,切取跨区皮瓣时,动力学供区与潜力学供区之间 choke 区的皮瓣很可能发生坏死^[1]。故建立一个可靠的动物跨区皮瓣模型对跨区皮瓣的病理生理研究具有重要意义。大鼠背部主要有 6 个大的血管体供应,左右两

侧从上到下分别各有一胸背动脉皮支、第 12 肋间后动脉皮支及髂腰动脉皮支。以髂腰动脉皮穿支为蒂,中间血管体也就是第 12 肋间后动脉穿支体从中线向侧面的跨度为宽(约为 3 cm),胸背动脉皮支及髂腰动脉皮支的距离为长(约为 9 cm),可以切取一个含有 3 个血管体区、2 个 choke 区的跨区皮瓣,而且该跨区皮瓣切取后,能得到一个远端 30%左右的坏死,为研究人员提供了一个研究皮瓣切取后缺血、缺氧及预防其发生的良好模型。

3.2 BMMSCs 对大鼠背部跨区皮瓣坏死的影响

Kinnaird 等^[5]发现将 BMMSCs 植入缺血性小鼠的下肢,原来管径狭小的侧副血管发生扩张,小鼠下肢远端的缺血状况明显改善,这种促进血管扩张的现象除了与 BMMSCs 能够分化为血管内皮外,更重要的是 BMMSCs 在植入肢体后,能够汇集到缺血组织,通过旁分泌形式产生多种促血管扩张细胞因子,如单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)等。虽然文献上已经报道了 BMMSCs 能够促进缺血性下肢中侧副血管的扩张,从而改善远端肢体血供,但目前尚未见将其应用到促跨区皮瓣存活的报道。本研究采用全骨髓差异贴壁法分离培养 SD 大鼠 BMMSCs,并根据 BMMSCs 特异性表型对其进行鉴定,证实此法具有较强的可靠性和可行性,其所获取的干细胞纯度高、活性好、增殖力较强。通过流式细胞检测鉴定 BMMSCs,发现表面标记物特征与相关文献结果相似^[6]。之后将其通过尾静脉注射入大鼠体内,观察到其能够显著改善跨区皮瓣的存活率,并且初步观察到了血管体比邻区 choke 血管的管径增加。我们设想这种扩 choke 血管的现象与 BMMSCs 的旁分泌现象相关。BMMSCs 进入皮瓣后,通过旁分泌形式产生 MCP-1,单核细胞/巨噬细胞被趋化至血管壁,并迁徙出血管壁至外周组织,分泌 MMP-2,该蛋白酶能够消化细胞外基质。首先对血管基膜及弹力纤维进行消化,而弹力纤维裂解产生的多肽片段与生长因子结合,吸附到平滑肌表面,促进血管平滑肌层的细胞增生,促进 choke 血管管径扩张^[7]。目前文献上报道有较多利用细胞因子如粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子等来减少皮瓣的坏死面积^[8-9]。这种方法简单有效,但是由于细胞因子易流失,很难长时间维持有效水平。此外,血管新生是一个受多种因子顺序调控的过程,单一因子应用难以达到很好效果^[10]。与细胞因子疗法相比,细胞植入体内之后,能够通过迁移、分化,自动向缺血缺氧及损伤的部位富集,同时又能释放多种细胞

因子,而且移植的细胞能够长期存在甚至增殖^[11]。因此利用细胞来促进局部组织的再血管化,与利用细胞因子相比具有一定优势。

3.3 血管扩张对皮瓣血流动力学的影响

根据 Hagen-Poiseuille 流体方程 $R = \frac{8\eta L}{\pi r^4}$, $F = \frac{\pi \Delta P r^4}{8\eta L}$ (R:阻力;L:血管长度; η :粘度系数;r:血管的半径;F:流量; ΔP :血压差; π :常数),血管对流的阻力与血管半径的4次方成反比,血流量与血管半径的4次方成正比。生理状态下 choke 管径极其细小,是跨区皮瓣切取后血流通往远端的最大障碍,因此通过适当干预,小程度地扩张 choke 血管管径能够明显改善皮瓣远端血供。本研究中,治疗组中 choke 血管的平均管径是对照组中的1.2倍左右,根据以上血流动力学公式,可以得出治疗组中皮瓣远端的血流量为对照组的2.07倍,故皮瓣远端的坏死得到改善。

综上所述,在大鼠背部切取 10 cm × 3 cm 含胸背动脉穿支、肋间后动脉穿支、髂腰动脉穿支血管体的皮瓣可以获得稳定的皮瓣坏死模型。系统性注射 BMMSCs 能够促进皮瓣存活,其机制可能是 BMMSCs 能够促进血管体之间的 choke 血管扩张。

[参考文献]

[1] 毛以华,唐茂林. choke vessels 与穿支皮瓣的扩展[J]. 中国临床解剖学杂志,2010,22(2):228-230

[2] Taylor GI,Palmer JH. The vascular territories (angiosomes)of the body:experimental study and clinical applications[J]. Br J Plast Surg,1987,40(2):113-141

[3] Cormack GC,Lamberty BG. A classification of fascio-cutaneous flaps according to their patterns of vascularisation [J]. Br J Plast Surg,1984,37(1):80-87

[4] 赵京玉,陈敏亮,李兵园. 皮瓣延迟术改善局部静脉淤血扩张皮瓣血供的临床应用[J]. 中国美容医学,2012,21(5):708-710

[5] Kinnaird T,Stabile E,Burnett MS,et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote *in vitro* and *in vivo* arteriogenesis through paracrine mechanisms [J]. Circ Res,2004,94(5):678-685

[6] Kevin C,Kemp J,Jill H,et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. Leuk Lymphoma,2005,46(11):1531-1544

[7] Scholz D,Cai WJ,Schaper W. Arteriogenesis,a new concept of vascular adaptation in occlusive disease [J]. Angiogenesis,2001,4(4):247-257

[8] Sugiyama Y,Yagita Y,Oyama N,et al. Granulocyte colony-stimulating factor enhances arteriogenesis and ameliorates cerebral damage in a mouse model of ischemic stroke [J]. Stroke,2011,42(3):770-775

[9] Todo K,Kitagawa K,Sasaki T,et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances leptomeningeal collateral growth induced by common carotid artery occlusion [J]. Stroke,2008,39(6):1875-1882

[10] Simons M. Angiogenesis:where do we stand now? [J]. Circulation,2005,111(12):1556-1566

[11] Maniopoulos C,Sodek J,Melcher AH. Bone formation *in vitro* by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats [J]. Cell Tissue Res,1988,254(2):317-330

[收稿日期] 2014-04-22

本刊现已启用网上稿件管理系统,作者登陆
<http://jnmunjmuedu.cn/>即可在线投稿并查询稿件
 审理情况。