

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.20.002

ADSCs 联合 Exendin-4 治疗糖尿病大鼠创面愈合的机制研究*

段 鹏 许 静 刘 利 屈 慧 马 丽 杜俊凯[△]

(西安交通大学第一附属医院急诊科 陕西 西安 710061)

摘要 目的:探究 ADSCs 联合 Exendin-4 治疗糖尿病大鼠创面愈合的效果及可能机制。**方法:**通过高脂饲料喂养和腹腔注射链脲佐菌素(STZ, 45 mg/kg)建立糖尿病 SD 大鼠模型。使用直径 1 cm 的皮肤打孔活检器在大鼠背部制作创面。将 72 只建模成功的大鼠随机分为糖尿病组、ADSCs 组、Exendin-4 组和 ADSCs+Exendin-4 组, 每组 18 只。未建模的 20 只大鼠作为对照组。皮肤创伤后 1 天, 按照指定给药方案进行给药, 每天给药 1 次, 共 14 天。检测治疗后大鼠的血糖、创面愈合率、微血管密度、创面组织学改变和血管生成因子(VEGF-A、VEGFR-2、PDGF-BB、PDGFR- β 和 HIF-1 α)的蛋白表达水平。另外, 将 HUVEC 细胞分为对照组、高糖组、ADSCs 组、Exendin-4 组和 ADSCs+Exendin-4 组, 并对各组细胞进行相应的处理。检测了 ADSCs 和 Exendin-4 对缺氧和高糖培养的 HUVEC 的增殖、迁移和血管生成的影响。**结果:**ADSCs 和 / 或 Exendin-4 治疗组大鼠的血糖水平与糖尿病组无显著差异($P>0.05$)。与单独治疗组相比, ADSCs+Exendin-4 组的创面愈合率、微血管密度和创面组织中 VEGF-A、VEGFR-2、PDGF-BB、PDGFR- β 和 HIF-1 α 的蛋白表达水平显著升高($P<0.05$)。与单独治疗组的 HUVEC 相比, ADSCs+Exendin-4 组的 HUVEC 的增殖、迁移和血管生成能力显著提高, 并且血管生成因子的表达水平明显上调($P<0.05$)。**结论:**对糖尿病大鼠创面组织局部施用 ADSCs 和 Exendin-4 可明显促进创面愈合。ADSCs 和 Exendin-4 通过促进内皮细胞的增殖、迁移及血管生成因子的分泌来促进血管生成和创面愈合。

关键词:糖尿病; 创面愈合; 脂肪组织衍生的干细胞; Exendin-4; 血管生成; 内皮细胞

中图分类号:R-33; R587.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)20-3807-08

Study on the Mechanism of ADSCs Combined with Exendin-4 in the Treatment of Wound Healing in Diabetic Rats*

DUAN Peng, XU Jing, LIU Li, QU Hui, MA Li, DU Jun-kai[△]

(Department of Emergency, The First affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710061, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect and possible mechanism of ADSCs combined with Exendin-4 in the treatment of wound healing in diabetic rats. **Methods:** The diabetic SD rat model was established by feeding high-fat feed and intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ, 45 mg / kg). A skin punch biopsy with a diameter of 1 cm was used to make a wound on the back of the rat. 72 successfully modeled rats were randomly divided into diabetes group, ADSCs group, Exendin-4 group and ADSCs + Exendin-4 group, 18 rats in each group. 20 unmodeled rats served as a control group. One day after skin trauma, the drug was administered according to the prescribed dosing regimen, once a day for 14 days. After treatment, the blood glucose, wound healing rate, microvessel density, wound histology changes and protein expression of angiogenic factors (VEGF-A, VEGFR-2, PDGF-BB, PDGFR- β and HIF-1 α) were detected. In addition, HUVEC cells were divided into control group, high glucose group, ADSCs group, Exendin-4 group and ADSCs + Exendin-4 group, and the cells were treated accordingly. The effects of ADSCs and Exendin-4 on the proliferation, migration and angiogenesis of HUVEC cultured in hypoxia and high glucose were examined. **Results:** There was no significant difference in blood glucose levels between ADSCs and/or Exendin-4 treatment group and diabetes group ($P>0.05$). Compared with the single treatment group, the wound healing rate, microvessel density and protein expression levels of VEGF-A, VEGFR-2, PDGF-BB, PDGFR- β and HIF-1 α in the ADSCs + Exendin-4 group were significantly increased ($P<0.05$). Compared with HUVEC in the single treatment group, the proliferation, migration, and angiogenic capacity of HUVEC in the ADSCs + Exendin-4 group were significantly improved, and the expression level of angiogenic factors was significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion:** Local application of ADSCs and Exendin-4 in the wound tissues of diabetic rats can obviously promote wound healing. ADSCs and Exendin-4 promote angiogenesis and wound healing by promoting the proliferation and migration of endothelial cells and the secretion of angiogenic factors.

* 基金项目: 陕西省自然科学基金研究计划项目(2018JM7152; 2018JM7021);

西安交通大学第一附属医院基金自由探索项目(2019ZYTS-10)

作者简介: 段鹏(1987-), 男, 硕士研究生, 主要研究方向: 颅脑损伤、脏器功能保护及创伤修复,

E-mail: PiXumei@163.com, 电话: 17749023896

[△] 通讯作者: 杜俊凯(1976-), 男, 硕士生导师, 主任医师, E-mail: 68631784@qq.com, 电话: 13992819707

(收稿日期: 2020-04-22 接受日期: 2020-05-17)

Key words: Diabetes; Wound healing; Adipose-derived stem cells; Exendin-4; Angiogenesis; Endothelial cells

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R587.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)20-3807-08

前言

目前,世界各地的糖尿病发病率都在上升^[1-3]。糖尿病患者发生创伤后容易出现创面愈合困难^[4],虽然目前已经开发了干细胞、生长因子、皮肤替代品和基因疗法等相关疗法,但疗效仍然很差。糖尿病患者伤口愈合缓慢的主要原因是血管生成能力的降低^[5]。间质干细胞在伤口愈合过程中迁移到伤口部位并促进创面修复。据报道,干细胞的全身移植或局部移植可以促进皮肤伤口愈合、内皮细胞转化和血管形成^[6]。有研究显示,脂肪组织衍生的干细胞(Adipose derived stem cells, ADSCs)及其分泌物具有促进伤口愈合的作用^[7]。然而,干细胞疗法昂贵且细胞存活率非常低,并且单独的干细胞移植治疗不能提供令人满意的伤口愈合效果。

胰高血糖素样肽-1(Glucagon like peptide-1, GLP-1)是肠道末端内分泌L细胞分泌的肠降血糖素激素,已知具有许多抗糖尿病作用^[8]。Exendin-4是一种半衰期比GLP-1长的GLP-1受体激动剂,已开发用于治疗2型糖尿病^[9,10]。此外,Exendin-4还具有较好的抗氧化和抗炎作用^[11],因此,在治疗伤口愈合方面有较高的潜在应用价值。基于前人研究结果,本研究考察了ADSCs联合Exendin-4治疗糖尿病大鼠创面愈合的效果及机制,旨在开发一种新型高效促糖尿病创面愈合的疗法。

1 材料与方法

1.1 材料

Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM)购自美国 Gibco 公司; MesenPRO RSTM 培养基购自美国 Invitrogen 公司; 标准和高脂饲料购自南通特洛菲饲料科技有限公司; 链脲佐菌素(STZ)和 Exendin-4 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 苏木精-伊红(HE)和 Masson 三色染色试剂盒购自美国 Sigma-Aldrich 公司; CD31、血管内皮生长因子-A(VEGF-A)、血管内皮生长因子受体-2(VEGFR-2)、FITC 标记的山羊抗兔二抗购自美国 Santa Cruz 公司; 血小板源生长因子-BB(PDGF-BB)、血小板源生长因子受体-β(PDGFR-β)、缺氧诱导因子-1α(HIF-1α)和 GAPDH 抗体购自英国 Abcam 公司; TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司; M-MLV Reverse Transcriptase 试剂盒购自普洛麦格(北京)生物技术有限公司; SYBR-Green PCR 试剂盒购自美国 Applied Biosystems 公司; RIPA 缓冲液购自北京凯瑞基生物技术有限公司; ECL 化学发光检测系统购自美国 Pierce Biotechnology 公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒、MTT 溶液购自上海碧云天生物技术有限公司; DMSO 购自美国 Sigma 公司; Matrigel 基质胶购自美国 BD Biosciences 公司; Transwell 系统购自美国 Corning 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人脐静脉内皮细胞(HUVEC)购自美国 ATCC。将 HUVEC 细胞在添加了 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养,培养条件为 37℃ 和 5% CO₂。从美国 Invitrogen 公

司购买人脂肪源多能干细胞(ADSCs),并在 MesenPRO RSTM 培养基中培养,培养条件为 37℃ 和 5% CO₂。

1.2.2 实验动物 100 只 180~200 g 的雄性 Sprague Dawley (SD) 大鼠由西安交通大学医学部动物实验中心 [SYXK (陕) 2018-001] 提供。将大鼠饲养在 25℃、55% 相对湿度的实验室内环境中,给予蒸馏水喂养。

1.2.3 糖尿病模型建立 随机选取 20 只大鼠作为对照组(CK 组),用标准饲料喂养。其余 80 只大鼠作为建模组,用高脂饲料(胆酸盐 0.2%、胆固醇 1%、猪油 5%、蔗糖 10%、蛋黄粉 10% 和标准饲料 68.8%)喂养。大鼠喂养 1 个月后,对建模组大鼠腹腔注射 0.1 mol/L 柠檬酸盐缓冲液 [pH=4.5] 稀释的链脲佐菌素(STZ, 45 mg/kg)。对照组大鼠注射等体积的 0.1 mol/L 柠檬酸盐缓冲液。注射 7 天后,尾静脉取血测量大鼠随机血糖,血糖值至少 2 次 >16.7 mmol/L 时表明建模成功^[12]。20 只对照组大鼠生长良好。80 只糖尿病建模的大鼠中共有 3 只死亡,5 只建模未成功,即共有 72 只建模成功。

1.2.4 皮肤创伤模型的建立及分组 20 只对照组大鼠和 72 只建模组大鼠通过给予 10% 水合氯醛 300 mg/kg 对大鼠进行麻醉,剃毛后用碘酒对皮肤进行消毒。使用直径 1 cm 的皮肤打孔活检器在大鼠背部向下按压切除一个圆形皮肤。使用医用透明敷贴封闭创面。将 72 只建模组大鼠随机分为糖尿病组(Dia 组)、ADSCs 组(ADs 组)、Exendin-4 组(Ex-4 组)和 ADSCs+Exendin-4 组(ADs+Ex-4 组),每组 18 只。

1.2.5 给药处理 皮肤创伤后 1 天,对照组和糖尿病组大鼠在伤口周围皮下注射 100 μL 磷酸盐缓冲盐水(PBS)。ADSCs 组皮下注射 5×10⁵ ADSCs(溶于 100 μL PBS)。Exendin-4 组皮下注射 100 μL Exendin-4(100 nM)。ADSCs+Exendin-4 组皮下注射 100 μL 的 5×10⁵ ADSCs(溶于 50 μL PBS) 和 50 μL Exendin-4(200 nM)。每天给药 1 次,共 14 天。给药后用纱布包扎,并用凡士林纱布覆盖。皮肤创伤后使用数码相机记录伤口图像,用于评估伤口的愈合速度。使用 ImageJ 软件计算创面愈合率。

1.2.6 血糖水平的测量 创伤后第 14 天,从各组大鼠尾静脉获得血液样本,采用强生 OneTouch Ultra 血糖分析仪测量血糖水平。

1.2.7 创面组织学观察 创伤后第 14 天,处死大鼠并剪取圆形创面组织。将组织分成两部分,一部分固定在 10% 中性福尔马林缓冲液中,石蜡包埋并制作 4 μm 切片。另一部分在液氮中速冻并在 -80℃ 冰箱保持。切片用苏木精-伊红(HE)和 Masson 三色染色。将切片在二甲苯中脱蜡,在一系列乙醇(100%-95%-80%-70%)中水合,在蒸馏水中洗涤,然后用苏木精-伊红(HE)和 Masson 三色染液染色。对于 CD31 免疫组化染色,将切片与抗 CD31 的兔多克隆抗体(1:1000)在 4℃ 下过夜孵育。洗涤后,将切片与 FITC 标记的山羊抗兔二抗在室温下孵育 1 h, DAB 染色后,用苏木素复染。将切片在光学显微镜下观察,棕黄色染色为阳性。每张切片选取 5 个染色强烈的视野,计数视野下 CD31 标记的微血管数目。

1.2.8 RT-PCR 分析 使用 TRIzol 试剂从创面组织或 HUVEC 中分离总 RNA。使用 M-MLV Reverse Transcriptase 试剂盒将总 RNA 反转录成 cDNA。使用 SYBR-Green PCR 试剂盒在 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪进行 PCR,设计序列(表 1),相对表达水平通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算,GAPDH 为内参基因。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

Primer	Primer sequence
VEGF-A	F:5'-TCAGTTGGCTTCCTTTCTGTGT-3'
	R:5'-ATGTAAGAGGAGAGTGCCCC-3'
VEGFR-2	F:5'-GGAGAGTCCACGCCAATCAAT-3'
	R:5'-GGTTGCTGCTCTACTTATCATGGA-3'
PDGF-BB	F:5'-GGCATAAGTAAGGTGCAATCAG-3'
	R:5'-TTCACACTGGAGGGCTAATT-3'
PDGFR- β	F:5'-GGCATGTACATGTAAGAAG-3'
	R:5'-TTCACACCAATCTAGATTGGT-3'
HIF-1 α	F:5'-AGTCAAGAAGGAGACCAACC-3'
	R:5'-GTACTTCCGATCCCTACATG-3'
GAPDH	F:5'-CTCTCGCTAGAGGCAGGCCA-3'
	R:5'-AACTTTGTGCTACACGGT-3'

1.2.9 蛋白质印迹分析 将创面组织或 HUVEC 在 RIPA 缓冲液中裂解,使用 BCA 法测定蛋白浓度,使用 SDS-PAGE 电泳分离蛋白质,并将其转移到硝酸纤维素膜上。将膜与 VEGF-A (1:1000)、VEGFR-2 (1:2000)、PDGF-BB (1:2000)、PDGFR- β (1:3000)、HIF-1 α (1:1000)和 GAPDH (1:2000)一抗在 4℃ 孵育过夜。之后,将膜与 HRP 标记的二抗在 37℃ 下孵育 1 h。使用 ECL 化学发光检测系统进行显影。

1.2.10 HUVEC 分组处理及缺氧培养 将 HUVEC 细胞分为对照组(CK 组)、高糖组(HG 组)、ADSCs 组(ADsC 组)、Exendin-4 组(Ex-4C 组)和 ADSCs+Exendin-4 组(ADsC+Ex-4C 组)。对照组在含有 5.5 mM 葡萄糖的低糖 DMEM 中培养,其他组均在含有 25 mM 葡萄糖的高糖 DMEM 中培养。此外,ADSCs 组细胞在 ADSC 条件培养基(CM)中培养(将 ADSC 与高糖 DMEM 混合 24 h 来制备 ADSC-CM)。Exendin-4 组细胞用含有 10 nM Exendin-4 的 DMEM 培养,ADSCs+Exendin-4 组细胞用含有 10 nM Exendin-4 的 ADSC-CM 培养。然后将各组细胞在 5% CO₂、94% N₂ 和 1% O₂ 的缺氧条件下培养 48 h。

1.2.11 MTT 测定 将 HUVEC 接种到 96 孔板中,用 PBS 洗涤后,将细胞在含有 10 μ L MTT 溶液(0.5 mg/mL)的培养基中于 37℃ 孵育 4 h。然后加入 DMSO(150 μ L)并孵育 15 min 以溶解甲瓚晶体。用酶标仪在 570 nm 处测量吸光度。

1.2.12 小管形成试验 将 200 μ L Matrigel 基质胶添加到 24 孔板中,并在 37℃ 和 5% CO₂ 条件下形成凝胶。凝胶固化 30 min 后,将 50 μ L HUVEC 悬浮液(4×10^5 /mL)添加到每个孔中,并将细胞培养基补充至 1 mL。将板在缺氧条件下于 37℃、5% CO₂、94% N₂ 和 1% O₂ 孵育。使用尼康 TS100 倒置显微镜观察

小管的形成。使用 Image-Pro Plus 5.0 软件分析 10 个随机视野中的小管长度。

1.2.13 Transwell 迁移测定 使用 6 孔 Transwell 系统(孔径 8 μ m)进行细胞迁移实验。用胰蛋白酶消化 HUVEC,并将其悬浮在无血清培养基中。接下来,将 1×10^5 /mL 细胞添加至上室,并且在下室中加入含有 10% FBS 的培养基。在缺氧条件下孵育 24 h 后,将上室用多聚甲醛固定 15 min,然后结晶紫染色 10 min。在 TS100 显微镜下计数细胞。

1.3 统计分析

所有数据采用 SPSS22.0 进行分析,数据均表示为至少 3 个独立实验的平均值 $\pm$ 标准差。使用单因素方差分析对数据进行分析,然后使用 Tukey 检验进行事后多重比较。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ADSCs 联合 Exendin-4 对糖尿病大鼠血糖的影响

糖尿病组大鼠的血糖水平显著高于对照组($P < 0.001$),ADSCs 组、Exendin-4 组和 ADSCs+Exendin-4 组大鼠血糖水平相较于糖尿病组大鼠均无显著性变化($P > 0.05$)。见图 1。

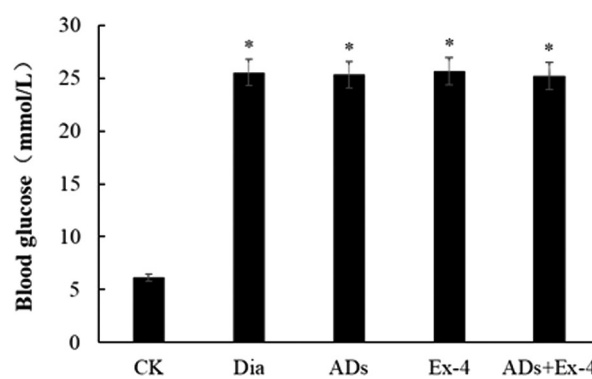


图 1 各组大鼠的血糖水平

Fig.1 Blood glucose levels of rats in each group

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$.

2.2 ADSCs 联合 Exendin-4 对糖尿病大鼠创面愈合的影响

皮肤创伤 3 d 时,各组大鼠的创面愈合率无显著差异($P > 0.05$)。在皮肤创伤 7 d 和 14 d 时,与糖尿病组相比,ADSCs 组、Exendin-4 组和 ADSCs+Exendin-4 组大鼠的创面愈合率显著升高($P < 0.05$)。此外,ADSCs+Exendin-4 组大鼠的创面愈合率显著高于单独治疗组($P < 0.05$)。见图 2。

苏木精-伊红(HE)染色结果显示,皮肤创伤 14 d 时,对照组大鼠创面形态完好,胶原基质丰富,中性粒细胞几乎消失;糖尿病组大鼠创面未完全修复,存在炎性细胞浸润,胶原基质较少,成纤维细胞少;ADSCs 组、Exendin-4 组和 ADSCs+Exendin-4 组的创面炎性细胞浸润基本消失,形态趋于正常,且 ADSCs+Exendin-4 组的修复效果最佳。见图 3。

Masson 三色染色结果显示,皮肤创伤 14 d 时,对照组大鼠创面绿染最多,且着色更深,胶原排列整齐。而糖尿病组大鼠创面绿染最少,胶原排列不规整。ADSCs 组、Exendin-4 组和 ADSCs+Exendin-4 组大鼠的创面绿染明显多于糖尿病组。见图 3。

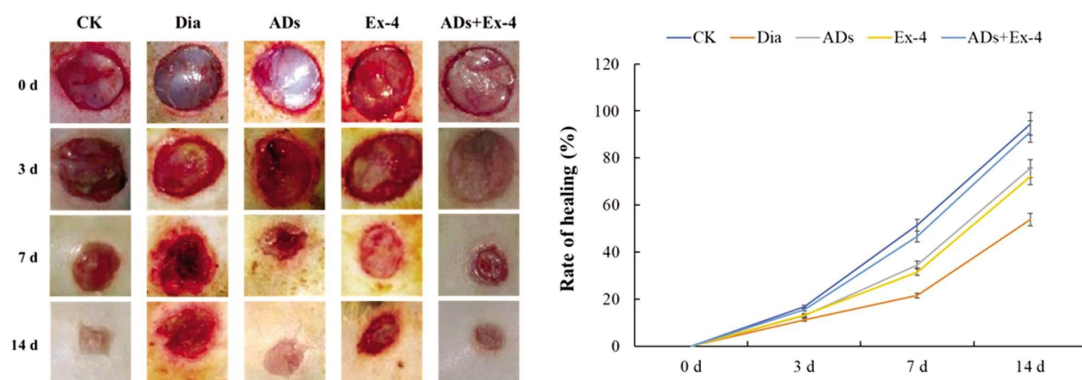


图2 大鼠的创面愈合情况

Fig.2 Wound healing in rats

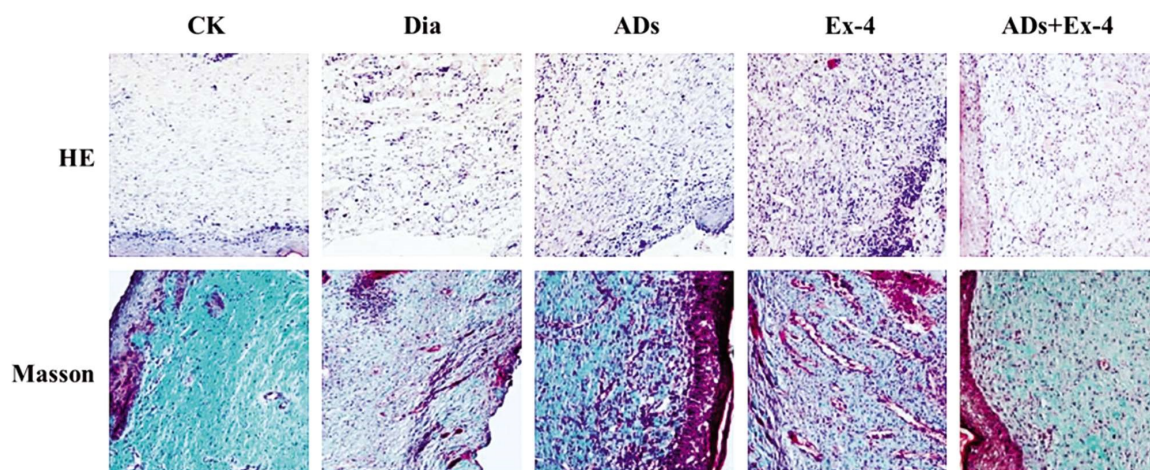


图3 大鼠创面组织的苏木精-伊红(HE)和 Masson 三色染色(100×)

Fig.3 Hematoxylin-eosin (HE) and Masson trichrome staining (100×)

2.3 ADSCs 联合 Exendin-4 对糖尿病大鼠创面微血管密度的影响

通过 CD31 免疫组化染色来标记创面微血管密度,结果显示,皮肤创伤 14 d 时,对照组大鼠的微血管密度最高。与糖尿

病组相比,ADSCs 组、Exendin-4 组和 ADSCs+Exendin-4 组大鼠的微血管密度升高($P<0.05$);ADSCs+Exendin-4 组大鼠的微血管密度高于 ADSCs 组和 Exendin-4 组($P<0.05$)。见图 4。

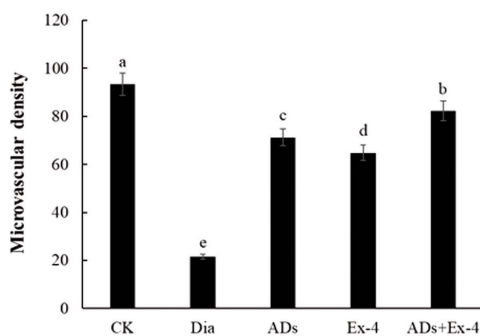
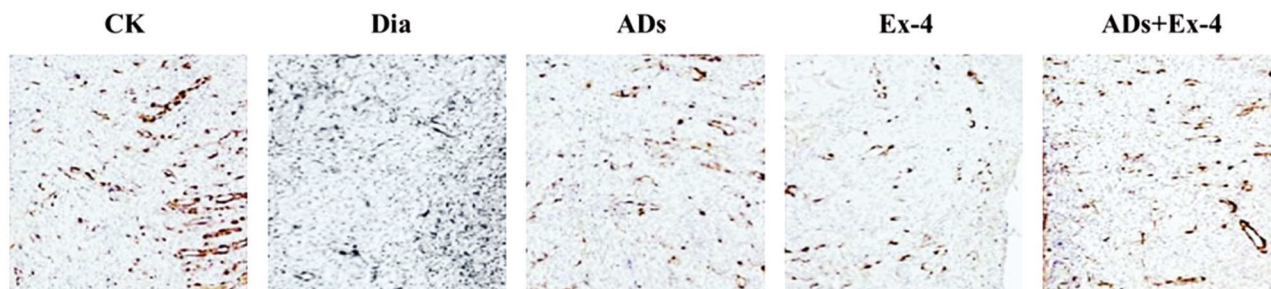


图4 大鼠创面组织的 CD31 免疫组化染色(100×)

Fig.4 CD31 immunohistochemical staining of rat wound tissues (100 ×)

Note: When comparing between groups, different letters indicate $P<0.05$, the same letter indicates $P>0.05$.

2.4 ADSCs 联合 Exendin-4 对糖尿病大鼠创面血管生成因子的影响

皮肤创伤 14 d 时,与对照组相比,糖尿病组大鼠创面组织中的血管生成因子 VEGF-A、VEGFR-2、PDGF-BB、PDGFR- β 和 HIF-1 α 蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$)。与糖尿病组相

比,ADSCs 组、Exendin-4 组和 ADSCs+Exendin-4 组大鼠的血管生成因子表达水平均显著升高($P<0.05$)。ADSCs+Exendin-4 组的血管生成因子表达水平高于 ADSCs 组和 Exendin-4 组($P<0.05$)。见图 5。

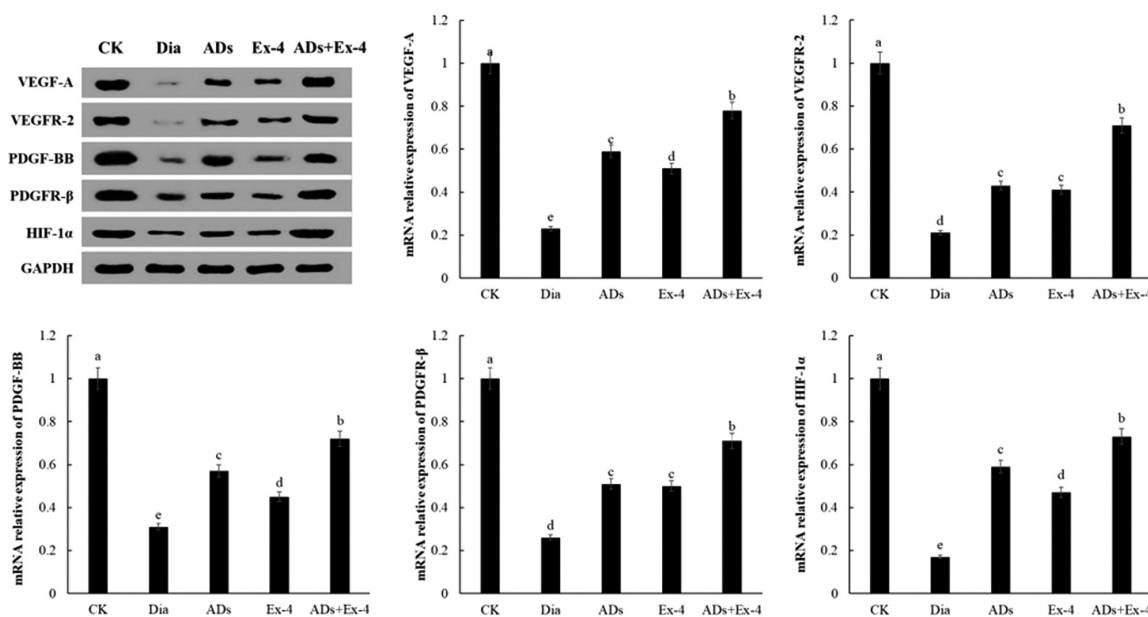


图 5 大鼠创面组织中 VEGF-A、VEGFR-2、PDGF-BB、PDGFR- β 和 HIF-1 α 的蛋白表达

Fig.5 Protein expression of VEGF-A, VEGFR-2, PDGF-BB, PDGFR- β and HIF-1 α in rat wound tissue

Note: When comparing between groups, different letters indicate $P<0.05$, the same letter indicates $P>0.05$.

2.5 ADSCs 联合 Exendin-4 对 HUVEC 的增殖、迁移和血管生成的影响

皮肤创伤 14 d 时,与对照组相比,高糖组 HUVEC 细胞活力、迁移和小管生成能力均降低($P<0.05$)。与高糖组相比,ADSCs 组、Exendin-4 组和 ADSCs+Exendin-4 组的细胞活力、迁移和小管生成能力均显著升高($P<0.05$)。ADSCs+Exendin-4 组的细胞活力、迁移和小管生成能力显著高于 ADSCs 组和 Exendin-4 组($P<0.05$)。见图 6、图 7 和图 8。

与对照组相比,高糖组 HUVEC 细胞中的 VEGF-A、VEGFR-2、PDGF-BB、PDGFR- β 和 HIF-1 α 蛋白表达水平均降低($P<0.05$)。与高糖组相比,ADSCs 组、Exendin-4 组和 ADSCs+Exendin-4 组 HUVEC 细胞的血管生成因子表达水平均显著升高($P<0.05$)。ADSCs+Exendin-4 组的血管生成因子表达水平显著高于 ADSCs 组和 Exendin-4 组($P<0.05$)。见图 9。

Exendin-4 治疗的效果最佳。

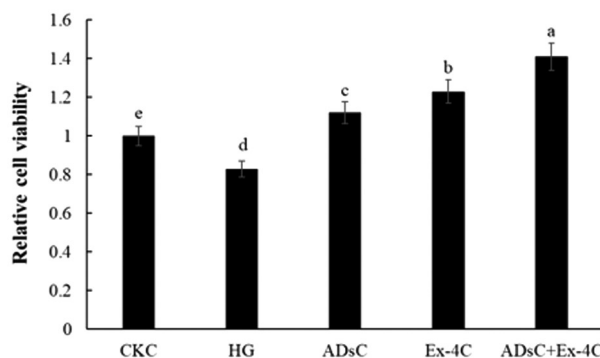


图 6 HUVEC 的相对细胞活力

Fig.6 Relative cell viability of HUVEC

Note: When comparing between groups, different letters indicate $P<0.05$, the same letter indicates $P>0.05$.

3 讨论

ADSCs 是一种广泛用于再生医学和伤口修复的干细胞。ADSCs 很容易分化为内皮细胞,从而形成血管样结构^[13-16]。将 ADSCs 单独注射或与其他类型的细胞联合注射可以有效修复神经阻滞并治疗心梗^[17,18]。Exendin-4 是一种半衰期比 GLP-1 长的 GLP-1 受体激动剂,已知 Exendin-4 会诱导内皮细胞增殖并促进血管生成作用^[19],并且 Exendin-4 可防止后肢缺血性损伤^[20]。另一项研究表明,皮内注射 Exendin-4 可促进血糖正常大鼠的皮肤伤口愈合^[21]。在本研究中发现,ADSCs 和 Exendin-4 单独治疗均有效促进了糖尿病大鼠创面愈合,并且 ADSCs 联合

众所周知,糖尿病伤口愈合缓慢的主要原因是缺乏血管生成。血管生成是通过激活内皮细胞和平滑肌细胞,并触发细胞迁移,侵袭,增殖和肾小管结构形成而发生的。本研究调查了 ADSCs 和 Exendin-4 单独治疗或联合治疗对糖尿病大鼠血糖的影响,研究表明局部施用 ADSCs 和 Exendin-4 未影响糖尿病大鼠的血糖水平。其他研究者发现,Exendin-4 具有降血糖的作用^[22]。另外,本研究中的体内和体外实验均表明,Exendin-4 和 ADSC 均促进了糖尿病性血管生成。这些结果表明,ADSCs 和 Exendin-4 的伤口愈合作用不是由降低血糖水平引起的,而是 ADSCs 和 Exendin-4 通过促进血管生成而直接发挥了促进伤

口愈合的作用。

血管生成主要的生理过程包括内皮细胞的活化、增生、迁移和形成管状结构。本研究显示,ADSCs 和 Exendin-4 的联合应用可最大程度的提高 HUVEC 的增殖、迁移和血管生成能

力。据报道,内皮细胞和 ADSCs 的共培养可诱导内皮细胞的血管形成,而 ADSCs 的分泌因子对伤口的愈合有很大的作用^[23]。本研究结果也进一步证实,在 ADSCs 的基础上联合施用 Exendin-4 可进一步提高血管生成能力。

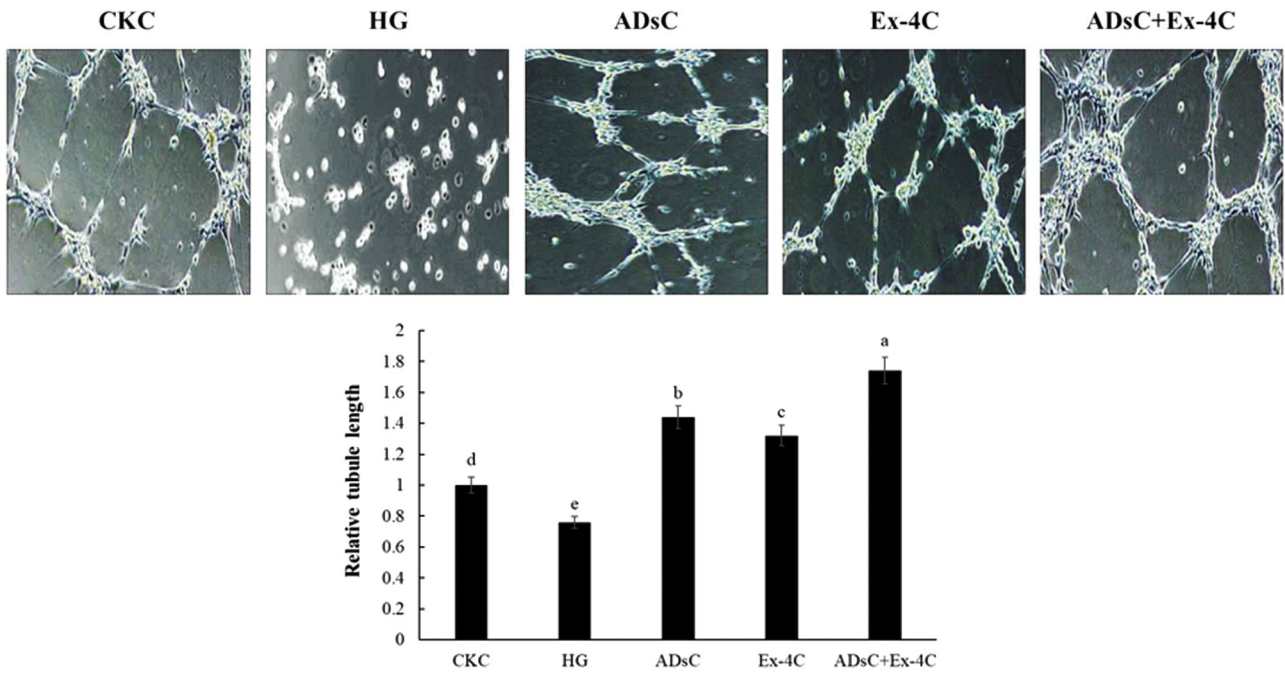


图 7 HUVEC 的小管形成能力(200×)

Fig.7 Tubule forming ability of HUVEC (200×)

Note: When comparing between groups, different letters indicate $P < 0.05$, the same letter indicates $P > 0.05$.

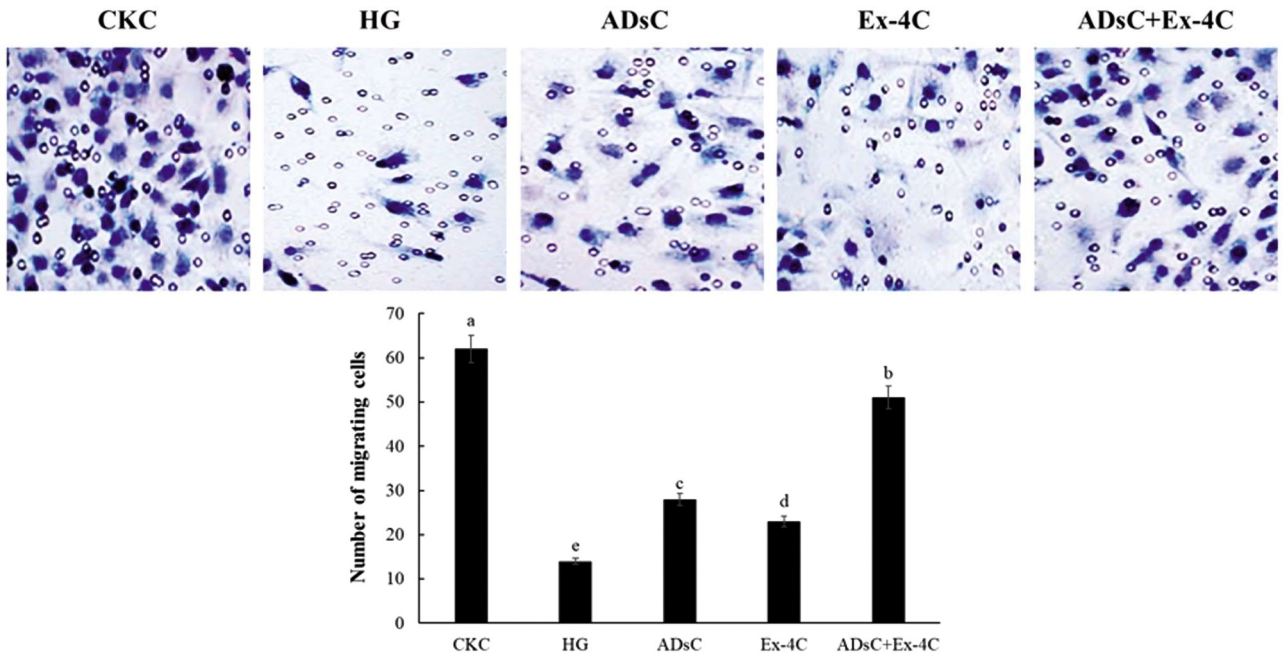


图 8 HUVEC 的迁移能力(400×)

Fig.8 Migration capability of HUVEC (400×)

Note: When comparing between groups, different letters indicate $P < 0.05$, the same letter indicates $P > 0.05$.

为了考察其中可能的分子机制,本研究检测了血管生成因子(包括 VEGF-A、VEGFR-2、PDGF-BB、PDGFR- β 和 HIF-1 α)的表达变化。VEGF 是伤口愈合中的重要血管生成因子。VEGF 通过结合内皮细胞上的 VEGFR-2 来激活下游 PI3K/Akt、

ERK1/2 等信号传导通路,从而升高血管的通透性,增加内皮细胞的运动性并向创面缺氧部位募集,刺激血管和肉芽组织形成^[24]。内皮细胞可分泌大量 PDGF-BB,PDGF-BB 可募集表达 PDGFR- β 的周细胞。此外,PDGFR- β 与 PDGF-BB 结合可激活

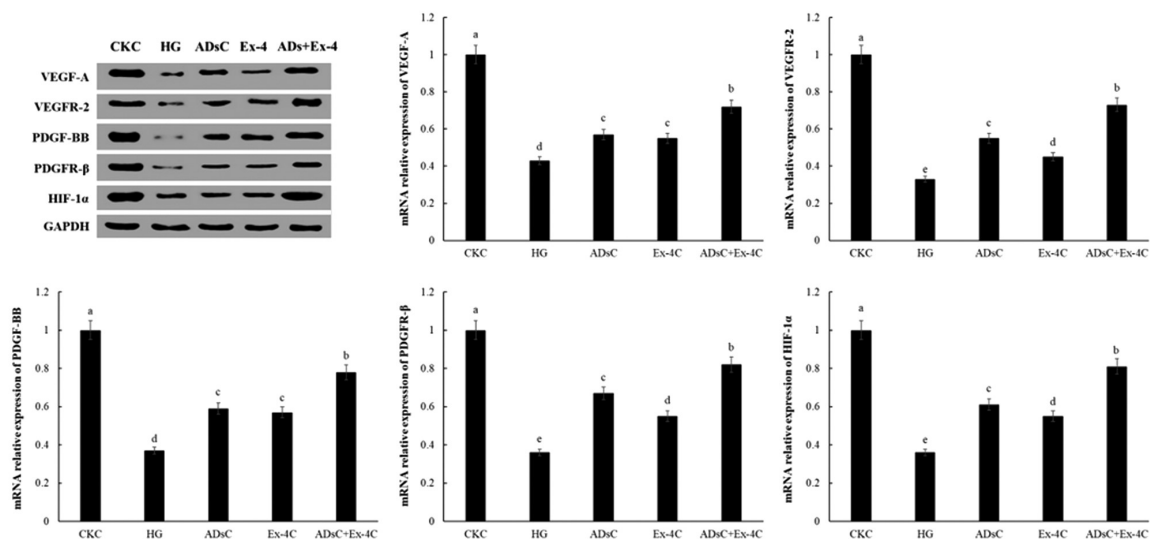


图9 HUVEC 中 VEGF-A、VEGFR-2、PDGF-BB、PDGFR-β 和 HIF-1α 的蛋白表达

Fig.9 Protein expression of VEGF-A, VEGFR-2, PDGF-BB, PDGFR-β and HIF-1α in HUVEC

Note: When comparing between groups, different letters indicate $P < 0.05$, the same letter indicates $P > 0.05$.

PI3K/AKT、MAPK/ERK 等经典的信号级联反应^[25]。HIF-1 是在创伤后缺氧组织中高度表达的转录因子，HIF-1 可调控多种生长因子（包括 VEGF 和 PDGF）、细胞存活、无氧糖代谢中的关键酶等相关基因表达^[26-29]。HIF-1 在调节创伤组织的缺氧适应和血管生成中作用重大。本研究发现，ADSCs 联合 Exendin-4 治疗均在体内和体外上调了 VEGF-A、VEGFR-2、PDGF-BB、PDGFR-β 和 HIF-1α 的表达。其他研究报道，ADSCs 可以分泌大量创伤修复相关的生长因子，包括 VEGF、表皮生长因子（Epidermal growth factor, eEGF）、角化细胞生长因子（Keratinocyte growth factor, KGF）、成纤维细胞生长因子（Fibroblast growth factor, FGF）等^[30]。此外，已有研究报道，GLP-1 或 GLP-1 类似物可刺激各种细胞中 VEGF 的表达^[31]。在大鼠后肢缺血模型中，Exendin-4 可预防缺血损伤并增加 VEGF^[20]。因此，上述研究说明，ADSCs 和 Exendin-4 对创面愈合的双重促进作用在糖尿病创面修复中具有较高的潜在应用价值。

综上所述，本研究表明对糖尿病大鼠创面组织局部施用 ADSCs 或 Exendin-4 均可促进创面愈合，但 ADSCs 和 Exendin-4 联合用药的效果更佳。ADSCs 和 Exendin-4 通过促进内皮细胞的增殖、迁移及血管生成因子的分泌来促进血管生成和创面愈合。ADSCs 和 Exendin-4 的联合应用在治疗糖尿病创面愈合方面具有较高的潜在应用价值。

参考文献(References)

- [1] Bruce D G, Davis T M, Davis W A, et al. Dementia complicating type 2 diabetes and the influence of premature mortality: the fremantle diabetes study[J]. *Acta Diabetologica*, 2019, 56(7): 767-776
- [2] Deacon C F. Peptide degradation and the role of DPP-4 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes[J]. *Peptides*, 2018, 100: 150-157
- [3] Bommer C, Sagalova V, Heesemann E, et al. Global economic burden of diabetes in adults: projections from 2015 to 2030 [J]. *Diabetes Care*, 2018, 41(5): 963-970
- [4] Long M, Cai L, Li W, et al. DPP-4 inhibitors improve diabetic wound healing via direct and indirect promotion of epithelial-mesenchymal transition and reduction of scarring[J]. *Diabetes*, 2017, 67(3): 518-531
- [5] Lin S, Zhang Q, Li S, et al. Antioxidative and angiogenesis-promoting effects of tetrahedral framework nucleic acids in diabetic wound healing with activation of the Akt/Nrf2/HO-1 pathway [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(10): 11397-11408
- [6] Kanji S, Das H. Advances of stem cell therapeutics in cutaneous wound healing and regeneration[J]. *Mediators of Inflammation*, 2017, 2017: 5217967-5217967
- [7] Zhang W, Bai X, Zhao B, et al. Cell-free therapy based on adipose tissue stem cell-derived exosomes promotes wound healing via the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Experimental Cell Research*, 2018, 370(2): 333-342
- [8] Douros A, Filion K B, Yin H, et al. Glucagon-like peptide 1 receptor agonists and the risk of incident diabetic retinopathy [J]. *Diabetes Care*, 2018, 41(11): 2330-2338
- [9] He J, Zhang X, Lian C, et al. Exendin-4 prevented pancreatic beta cells from apoptosis in (Type I) diabetic mouse via keap1-Nrf2 signaling [J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2019, 244(1): 28-35
- [10] Zanutto C, Hansen F, Galland F, et al. Glutamatergic Alterations in STZ-induced diabetic rats are reversed by Exendin-4 [J]. *Molecular Neurobiology*, 2019, 56(5): 3538-3551
- [11] Zhong X, Yang S, Liu T, et al. Engineering a novel protease-based Exendin-4 derivative for type 2 antidiabetic therapeutics[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, 150: 841-850
- [12] Xie X, Peng J, Huang K, et al. Polydatin ameliorates experimental diabetes-induced fibronectin through inhibiting the activation of NF-κB signaling pathway in rat glomerular mesangial cells [J]. *Molecular & Cellular Endocrinology*, 2012, 362(1-2): 183-193
- [13] Gong M, Zhai X, Yu L, et al. ADSCs inhibit photoaging- and photo-carcinogenesis-related inflammatory responses and extracellular matrix degradation [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2020, 121(2): 1205-1215
- [14] Liang W, Chen J, Li L, et al. Conductive Hydrogen Sulfide-Releasing Hydrogel Encapsulating ADSCs for Myocardial Infarction Treatment

- [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2019, 11(16): 14619-14629
- [15] Luo L, Zheng W, Lian G, et al. Combination treatment of adipose-derived stem cells and adiponectin attenuates pulmonary arterial hypertension in rats by inhibiting pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation and regulating the AMPK/BMP/Smad pathway [J]. Int J Mol Med, 2018, 41(1): 51-60
- [16] Bacakova L, Zarubova J, Travnickova M, et al. Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells - a review [J]. Biotechnol Adv, 2018, 36(4): 1111-1126
- [17] Rohringer S, Hofbauer P, Schneider K, et al. Mechanisms of vasculogenesis in 3D fibrin matrices mediated by the interaction of adipose-derived stem cells and endothelial cells [J]. Angiogenesis, 2014, 17(4): 921-933
- [18] Merfeldclaus S, Lupov I P, Lu H, et al. Adipose stromal cell contact with endothelial cells results in loss of complementary vasculogenic activity mediated by induction of activin[J]. Stem Cells, 2015, 33(10): 3039-3051
- [19] Kang H, Kang Y, Chun H J, et al. Evaluation of the in vitro and in vivo angiogenic effects of exendin-4 [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2013, 434(1): 150-154
- [20] Kang H, Sohn I, Jung J, et al. Exendin-4 protects hindlimb ischemic injury by inducing angiogenesis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 465(4): 758-763
- [21] Bacci S, Laurino A, Manni M E, et al. The pro-healing effect of exendin-4 on wounds produced by abrasion in normoglycemic mice[J]. European Journal of Pharmacology, 2015, 764: 346-352
- [22] Lee J G, Ryu J H, Kim S M, et al. Replacement of the C-terminal Trp-cage of exendin-4 with a fatty acid improves therapeutic utility [J]. Biochemical Pharmacology, 2018, 151: 59-68
- [23] Holnthoner W, Hohenegger K, Husa A, et al. Adipose-derived stem cells induce vascular tube formation of outgrowth endothelial cells in a fibrin matrix [J]. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2015, 9(2): 127-136
- [24] Goel H L, Mercurio A M. VEGF targets the tumour cell [J]. Nature Reviews Cancer, 2013, 13(12): 871-882
- [25] Andrae J, Gallini R, Betsholtz C, et al. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine[J]. Genes & Development, 2008, 22(10): 1276-1312
- [26] Ruthenborg R J, Ban J J, Wazir A, et al. Regulation of wound healing and fibrosis by hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 [J]. Molecules and Cells, 2014, 37(9): 637-643
- [27] Zhang L, Luo X, Chen F, et al. LncRNA SNHG1 regulates cerebrovascular pathologies as a competing endogenous RNA through HIF1 α /VEGF signaling in ischemic stroke [J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2018, 119(7): 5460-5472
- [28] Liang H, Xiao J, Zhou Z, et al. Hypoxia induces miR-153 through the IRE1 α -XBP1 pathway to fine tune the HIF1 α /VEGFA axis in breast cancer angiogenesis[J]. Oncogene, 2018, 37(15): 1961-1975
- [29] Maybin J A, Murray A A, Saunders P T, et al. Hypoxia and hypoxia inducible factor-1 α are required for normal endometrial repair during menstruation[J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 295
- [30] Nie C, Yang D, Xu J, et al. Locally administered adipose-derived stem cells accelerate wound healing through differentiation and vasculogenesis[J]. Cell Transplantation, 2011, 20(2): 205-216
- [31] Sun Z, Tong G, Kim T H, et al. PEGylated Exendin-4, a modified GLP-1 analog exhibits more potent cardioprotection than its unmodified parent molecule on a dose to dose basis in a murine model of myocardial infarction[J]. Theranostics, 2015, 5(3): 240-250

(上接第 3844 页)

- [19] 朱元增, 吴刚, 张建成, 等. 腹腔镜下胃背侧系膜完整切除 +D2 根治术治疗进展期胃癌的效果及术后并发症危险因素分析[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2018, 32(6): 554-557
- [20] Li H, Xu CX, Gong RJ, et al. How does Helicobacter pylori cause gastric cancer through connexins: An opinion review[J]. World J Gastroenterol, 2019, 25(35): 5220-5232
- [21] Cainap C, Vlad C, Seicean A, et al. Gastric cancer: adjuvant chemotherapy versus chemoradiation. A clinical point of view [J]. J BUON, 2019, 24(6): 2209-221
- [22] 曾国祥, 黄文伟, 黄修仿. 腹腔镜辅助胃癌 D2 根治术的临床疗效及其对腹腔微转移的影响 [J]. 蚌埠医学院学报, 2018, 43(11): 1450-1452
- [23] Kim JH, Lee SY, Choi JE, et al. Polymorphism in ASCL1 target gene DDC is associated with clinical outcomes of small cell lung cancer patients[J]. Thorac Cancer, 2020, 11(1): 19-28
- [24] Shaikh MY, Burmeister J, Scott R, et al. Dosimetric evaluation of incorporating the revised V4.0 calibration protocol for breast intraoperative radiotherapy with the INTRABEAM system[J]. J Appl Clin Med Phys, 2020, 21(2): 50-59
- [25] 张慧, 陈景志, 陈建立, 等. DCC 和 MKK4 基因在结直肠癌组织中的表达及临床意义[J]. 陕西医学杂志, 2019, 48(8): 968-971
- [26] 肖毅频, 熊璐琪, 钟晓华, 等. 腹腔镜胃癌根治术对进展期胃癌患者腹腔冲洗液 CEA、DDC 浓度及炎症因子影响研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2018, 17(9): 986-990
- [27] Nakanishi K, Kanda M, Umeda S, et al. The levels of SYT13 and CEA mRNAs in peritoneal lavages predict the peritoneal recurrence of gastric cancer[J]. Gastric Cancer, 2019, 22(6): 1143-1152