



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2023.06.009
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2023.06.009
China Journal of General Surgery, 2023, 32(6):878-887.

· 基础研究 ·

基质细胞衍生因子1 α 诱导脂肪来源干细胞迁移促进 糖尿病缺血下肢肌肉修复的实验研究

黄东琳¹, 梁至洁², 朱丹丹², 蒋洪棉³, 宁艳⁴, 黎洪棉⁵

(1. 广西壮族自治区南宁市妇幼保健院 腺体外科, 广西 南宁 530028; 广西医科大学第五附属医院 2. 创面修复科 3. 病理科, 广西 南宁 530022; 4. 广西壮族自治区柳州工人医院 整形美容科, 广西 柳州 545005; 5. 广西壮族自治区人民医院 科研实验中心, 广西 南宁 530021)

摘要

背景与目的: 基质细胞衍生因子1 α (SDF-1 α) 是一种定向诱导细胞迁移的趋化因子, 研究显示, 间充质干细胞 (MSCs) 在受损组织中可以沿着 SDF-1 梯度迁移到损伤部位并参与组织修复, 然而目前尚缺乏 SDF-1 α 诱导脂肪来源干细胞 (ASCs) 对糖尿病缺血下肢进行组织修复的体内研究。因此, 本研究探讨 SDF-1 α 促进大鼠脂肪来源干细胞 (rASCs) 向糖尿病大鼠缺血下肢肌肉组织迁移及对组织修复的影响。

方法: 取 SD 大鼠脂肪组织分离培养 rASCs, 行细胞形态观察, 鉴定成脂、成软骨及成神经分化能力, 并使用带绿色荧光蛋白 (GFP) 的腺病毒转染和标记 rASCs。将大鼠用 STZ 法构建糖尿病模型, 并结扎大鼠的右下肢股动脉造成下肢缺血后, 随机分为两组, 通过尾静脉向两组大鼠体内注射 rASCs, 其中一组在患肢中段部位肌肉处注射 SDF-1 α 蛋白 (SDF-1 α +rASCs 组), 另一组则用同样方式注射等量磷酸盐缓冲溶液 (rASCs 组)。治疗后的第 1、2 周行大鼠双下肢血流量检测, 计算及比较各组大鼠的缺血下肢-健侧下肢血流比值。在第 4 周时处死大鼠, 取缺血部位的肌肉组织行 HE 染色, 观察不同治疗方法组中肌肉组织的排列情况。以因子 VIII (FVIII) 作为微血管的标记, 行免疫荧光染色, 荧光显微镜下观察组织中 FVIII 及 GFP 的分布情况。

结果: 所培养的细胞呈长梭形或多角形样生长, 并可向脂肪、软骨、神经细胞多向分化, 鉴定为 rASCs。糖尿病下肢缺血大鼠下肢血流量检测结果显示, 在治疗后第 1 周 SDF-1 α +rASCs 组的缺血下肢-健侧下肢血流比值明显高于 rASCs 组 (0.33 ± 0.03 vs. 0.26 ± 0.02 , $P=0.016$), 治疗后第 2 周可发现上述差异进一步扩大 (0.60 ± 0.02 vs. 0.47 ± 0.01 , $P=0.050$)。HE 染色结果显示, 在治疗后第 4 周 SDF-1 α +rASCs 组大鼠的肌肉组织排列更为整齐。免疫荧光结果显示, SDF-1 α +rASCs 组的骨骼肌组织中 rASCs 的数量在治疗后第 4 周明显高于 rASCs 组 ($P<0.05$), 还能观察到红色荧光 (FVIII) 与绿色荧光 (rASCs) 的重叠。

结论: 通过提高缺血部位的 SDF-1 α 的浓度能够有效增加迁移至患处的 rASCs 数量, 从而获得优化 rASCs 改善患肢血流灌注, 促进肌肉组织修复的明显效果。此外, rASCs 分化为血管内皮细胞可能是 rASCs 促进缺血肌肉修复的关键机制之一。

关键词

缺血; 下肢; 糖尿病; 趋化因子 CXCL12; 间质干细胞; 再生; 大鼠

中图分类号: R654.3

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81760346, 81860341); 广西壮族自治区自然科学基金资助项目 (2018GXNS - FAA281148); 广西壮族自治区研究生教育创新计划基金资助项目 (YCBZ2018041); 广西壮族自治区卫生健康委员会自筹经费科研课题基金资助项目 (Z20180679, Z20201242, Z20210797); 南宁市创新创业领军人才“邕江计划”基金资助项目 (2018-01-07); 南宁市科技局青年科技创新创业人才培养基金资助项目 (RC20180201, RC20190206)。

收稿日期: 2022-11-30; **修订日期:** 2023-05-17。

作者简介: 黄东琳, 广西壮族自治区南宁市妇幼保健院住院医师, 主要从事再生医学方面的研究。

通信作者: 黎洪棉, Email: lihongmian@gxmu.edu.cn

Experimental study of stromal cell-derived factor 1 α inducing migration of adipose-derived stem cells to promote muscle repair in diabetic ischemic lower limbs

HUANG Donglin¹, LIANG Zhijie², ZHU Dandan², JIANG Hongmian³, NING Yan⁴, LI Hongmian⁵

(1. Department of Gland Surgery, Nanning Maternal and Child Health Hospital, Nanning 530028, China; 2. Department of Wound Repair 3. Department of Pathology, the Fifth Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530022, China; 4. Department of Plastic Surgery, Liuzhou Workers' Hospital, Liuzhou, Guangxi 545005, China; 5. Laboratory Center, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China)

Abstract

Background and Aims: Stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α) is a chemotactic factor that directs cell migration. Studies have shown that mesenchymal stem cells (MSCs) can migrate along the SDF-1 gradient to the site of tissue injury and participate in tissue repair. However, there is currently a lack of in vivo studies on the tissue repair of diabetic ischemic lower limbs using SDF-1 α -induced adipose-derived stem cells (ASCs). Therefore, this study was conducted to investigate the effect of SDF-1 α on the migration of rat adipose-derived stem cells (rASCs) to the muscle tissue of diabetic ischemic rat lower limbs and its impact on tissue repair.

Methods: The rASCs were isolated and cultured from the adipose tissue of SD rats. Cell morphology was observed, and the differentiation capacity towards adipocytes, chondrocytes, and neurons was evaluated. Then, the rASCs were transfected and labeled with green fluorescent protein (GFP) using adenovirus. Diabetes was induced in rats using the streptozotocin (STZ) method, and the right femoral artery of the rats was ligated to induce lower limb ischemia. The rats were randomly divided into two groups and injected with rASCs via the tail vein. The SDF-1 α protein was injected into the midsection of the affected limb muscle in one group (SDF-1 α +rASCs group), while the other group was injected with an equal amount of phosphate-buffered saline (rASCs group). Blood flow measurements of the rat lower limbs were conducted at weeks 1 and 2 after treatment, and the ischemic limb-to-contralateral limb blood flow ratio was calculated and compared. At week 4, the rats were euthanized, and muscle tissue from the ischemic region was subjected to HE staining to observe the arrangement of muscle tissue in different treatment groups. Immunofluorescent staining using factor VIII (FVIII) as a marker for microvessels was performed to observe the distribution of FVIII and GFP in the tissues under a fluorescence microscope.

Results: The cultured cells exhibited spindle or multiangular growth and had the ability to differentiate into adipocytes, chondrocytes, and neurons, confirming their identity as rASCs. The blood flow measurements of the diabetic ischemic rat lower limbs showed that the ischemic limb-to-contralateral limb blood flow ratio was significantly higher in the SDF-1 α +rASCs group than in the rASCs group at week 1 (0.33 ± 0.03 vs. 0.26 ± 0.02 , $P=0.016$), and this difference further increased at week 2 (0.60 ± 0.02 vs. 0.47 ± 0.01 , $P=0.050$). HE staining revealed a more orderly arrangement of muscle tissue in the SDF-1 α +rASCs group at week 4. Immunofluorescent staining showed that the number of rASCs in the skeletal muscle tissue of the SDF-1 α +rASCs group was significantly higher than that in the rASCs group at week 4 ($P<0.05$), and overlapping red fluorescence (FVIII) and green fluorescence (rASCs) were observed.

Conclusion: Increasing the concentration of SDF-1 α at the site of ischemia can effectively increase the number of rASCs migrating to the affected area, resulting in optimized blood flow perfusion and

significant improvement in muscle tissue repair. In addition, the differentiation of rASCs into endothelial cells may be one of the key mechanisms.

Key words Ischemia; Lower Extremity; Diabetes Mellitus; Chemokine CXCL12; Mesenchymal Stem Cells; Regeneration; Rats
CLC number R654.3

糖尿病下肢动脉病变 (diabetic lower extremity arterial disease, DLEAD) 是糖尿病的慢性并发症之一。DLEAD 可导致下肢动脉狭窄、闭塞使得患者下肢缺血、溃疡甚至坏死。但由于血管病变弥漫、呈多阶段病变、远端流出道闭塞等特点, 使得部分下肢缺血严重的 DLEAD 患者无法在传统治疗手段如药物、外科手术及血管内介入等治疗中获得症状缓解, 截肢成为他们的必然选择, 而截肢后病死率高达 40%~50%^[1]。因此, 探索缺血肢体血液循环重建的新治疗策略, 对于降低患者截肢率, 提高其生活质量具有非常重要的临床意义。

脂肪来源干细胞 (adipose-derived stem cells, ASCs) 是目前研究应用极为广泛的间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 之一。ASCs 较其他类型的 MSCs 具有组织来源广泛, 易获得, 损伤小等优势, 能够分泌各类生长因子^[2-3], 以及分化成各种成熟体细胞^[4-6], 为糖尿病下肢缺血患者提供了新的治疗手段。目前已有一些研究将 ASCs 用于治疗下肢缺血, 并获得很好的疗效^[7-9], 但仍有学者致力于通过优化包括 ASCs 在内的 MSCs 的功能以进一步提高干细胞治疗的疗效^[10-12]。基质细胞衍生因子 1 α (stromal cell-derived factor 1 α , SDF-1 α) 又称为 CXCL12 (CXC chemokine ligand-12), 是一种 CXC 趋化因子^[13], 主要由基质细胞持续分泌, 可在低氧诱导下表达, 与其特异性受体 CXCR4 广泛地表达于许多组织和器官。有研究发现 SDF-1 在组织的损伤部位中浓度明显上调^[14], MSCs 可以沿 SDF-1 浓度梯度迁移至损伤区域参与组织的修复^[15-16]。已有部分研究^[17]证实 SDF-1 α 与骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 的迁移、分化和组织修复能力具有一定的关系, 而鲜有关于 SDF-1 α 诱导 ASCs 对影响其迁移功能以及改善缺血下肢组织修复疗效的相关研究报道。为了进一步优化 ASCs 治疗糖尿病下肢缺血的效果, 本研究拟使用 SDF-1 α 蛋白注射于糖尿病下肢缺血大鼠的患肢组织中, 同时通过静脉注射将经绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 标记的大

鼠脂肪来源干细胞 (rat adipose-derived stem cells, rASCs) 移植入大鼠体内, 观察治疗后患肢血流、肌肉恢复以及 rASCs 在患处组织分布的情况, 探索提高局部 SDF-1 α 浓度对 rASCs 促进糖尿病大鼠下肢缺血肌肉组织修复的影响, 以期有效优化 ASCs 提高其治疗效果以及发挥干细胞最大效能途径的选择提供更多的实验数据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级雌性成年大鼠 9 只 (其中 3 只用于提取 rASCs, 6 只用于构建糖尿病下肢缺血大鼠模型), 体质量 (200 \pm 20) g, 由广西医科大学动物实验中心提供。所有实验操作均遵循动物伦理学要求并获得广西医科大学动物伦理委员会批准 (批号: 201912005)。

1.2 主要材料与仪器

DMEM 培养基、I 型胶原酶、胰蛋白酶、无水乙醇、15% 水合氯醛、磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer saline, PBS)、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (HyClone 公司, 美国); 青链双抗 (生工生物工程有限公司, 中国); 地塞美松、吡啶美辛、胰岛素、甘油三酯检测试剂盒、 β -甘油磷酸钠、Vc (维生素 C)、甲苯胺蓝染色液、链尿佐菌素 (streptozotocin, STZ) (索莱宝科技有限公司, 中国); 油红 O (伊卡生物技术有限公司, 中国); 成软骨诱导液、0.1% 结晶紫染液 (中国临床试验集团, 中国); 大鼠重组 SDF-1 α 蛋白 (艾博抗上海贸易有限公司, 中国); Adv-GFP (吉玛基因, 中国); 因子 VIII (FVIII) 一抗 (Novus 公司, 美国); 荧光二抗 (三鹰生物技术有限公司, 中国)。

超净工作台 (安泰科技有限公司, 中国); 低温台式离心机 (Eppendorf 公司, 德国); 流式细胞仪 (BD 公司, 美国); 光学显微镜、荧光显微镜、倒置显微镜 (Olympus 公司, 日本); 细胞培养箱

超声细胞破碎仪(之信仪器有限公司,中国);血糖检测仪及检测试纸(怡成生物电子公司,中国);血流测量仪PeriCam PSI(PeriCam公司,瑞典),冷冻切片机、赛默飞轮转切片机(Thermo Shandon公司,英国),生物组织摊片机(中威医疗仪器有限公司,中国);组织包埋机、生物组织脱水机(亚光公司,中国);电陶炉(苏泊尔公司,中国)。

1.3 实验方法

1.3.1 rASCs的提取与鉴定 取3只SD大鼠腹腔注射10%水合氯醛(3 mL/kg)麻醉后脱颈处死,乙醇浸泡10 min,超净台中取腹股沟脂肪组织;移至离心管中剪成1 mm³糊状,无菌PBS冲洗;加入0.1% I型胶原酶37℃振荡消化30~40 min,加等体积完全DMEM培养基(含10% FBS、1%青链双抗)终止消化;将混合物倒至200目细胞滤网中吹打过筛,无菌培养皿收集滤过液,以17 mm离心直径、800 r/min离心5 min,吸弃上层组织及上清液后加入2 mL完全培养基重悬细胞,以17 mm离心直径、800 r/min离心5 min,弃上清;以3 mL完全培养基重悬细胞,接种于培养皿中并置于37℃、5% CO₂、饱和湿度95%培养箱,隔天换液;培养至细胞覆盖瓶壁90%左右,进行消化后按1:3~1:4比例传代培养。定期倒置显微镜观察细胞生长状态。

取第3代rASCs浓度调整为1×10⁴个/mL,接种至含10% FBS的DMEM培养基的35 mm细胞培养皿培养;待细胞贴壁并生长至90%左右时,分别更换为成脂诱导培养基、成软骨诱导液、成神经诱导培养基进行培养。分别于培养14、21、14 d后行油红O、甲苯胺蓝染色及MAP2免疫荧光染色,倒置显微镜及荧光显微镜下观察。

1.3.2 Ad-GFP转染及验证 将rASCs细胞铺板于96孔板中,铺板密度为4 000/孔,24 h后进行病毒感染(Adv-GFP腺病毒MOI=200);感染后48、72 h后,荧光显微镜下观察病毒的感染效率。

1.3.3 糖尿病下肢缺血大鼠模型的建立 应用STZ法构建1型糖尿病大鼠模型^[18],取6只大鼠在实验室适应7 d后,高脂饲料喂养8周,禁食12 h后腹腔注射STZ 20 mg/kg,高脂饲料喂养1周后,再注射1次STZ,继续高脂饲养1周后,禁食12 h空腹测量血糖,确认模型是否成功。糖尿病造模成功后,使用7%水合氯醛对大鼠进行腹腔注射麻醉,取右侧腹股沟切口,将右侧股动脉分离后完全结扎其下端制成右侧下肢缺血模型^[19-21],随后继续常规饲养。

1.3.4 rASCs治疗及大鼠下肢血流的检测 糖尿病下

肢缺血大鼠模型建立1周后,将6只大鼠随机分为两组即rASCs组及SDF-1 α +rASCs组(每组3只),按照分组通过尾静脉向两组大鼠体内注射rASCs 0.5 mL(1×10⁶个),而在SDF-1 α +rASCs治疗组的患肢中段部位肌肉处点状注射0.2 mL SDF-1 α 蛋白(1 μ g/100 μ L),rASCs治疗组患肢则注射等量PBS。并于移植术后第1、2周应用血流测量仪PeriCam PSI检测各组大鼠下肢血流灌注情况,以患侧肢体与健侧肢体血流之比来表示^[22]。在治疗后第4周处死大鼠,取各组患肢缺血部位肌肉组织,制作石蜡切片及冷冻切片,备用。

1.3.5 缺血肌肉组织的免疫荧光染色 取下肢肌肉组织冷冻切片行免疫荧光染色,以FVIII-抗标记血管内皮细胞,在荧光显微镜下观察rASCs(绿色荧光)及微血管(红色荧光)的分布情况。

1.3.6 缺血肌肉组织的HE染色 取下肢肌肉组织石蜡切片行HE染色,40倍光学显微镜下观察肌肉束排列情况。

1.4 统计学处理

采用SPSS 26.0软件进行统计学分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间对比采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 rASCs培养及鉴定

原代培养的rASCs为贴壁生长,细胞形态呈长梭形或多角形(图1A)。成脂诱导分化:诱导过程中细胞形态发生明显变化,细胞逐渐变圆,14 d后细胞内充满大量脂滴,细胞核被挤向边缘;油红O染色示细胞内脂滴呈红色,符合脂肪细胞的特征(图1B)。成软骨诱导分化:培养21 d,细胞呈多边形或类圆形,局部形成多个结节样结构,甲苯胺蓝染色可见染成蓝色的软骨结节样结构(图1C)。成神经诱导分化:培养14 d后行MAP2免疫荧光染色,可见大部分细胞均呈MAP2阳性(图1D)。

2.2 GFP标记rASCs

rASCs经Adv-GFP腺病毒(MOI=200)感染48 h后荧光显微镜下可见rASCs有细胞轮廓突起于表面,荧光强度较强,直到72 h后可见几乎所有细胞都带有荧光,表明多数细胞被转染并成功表达(图2)。

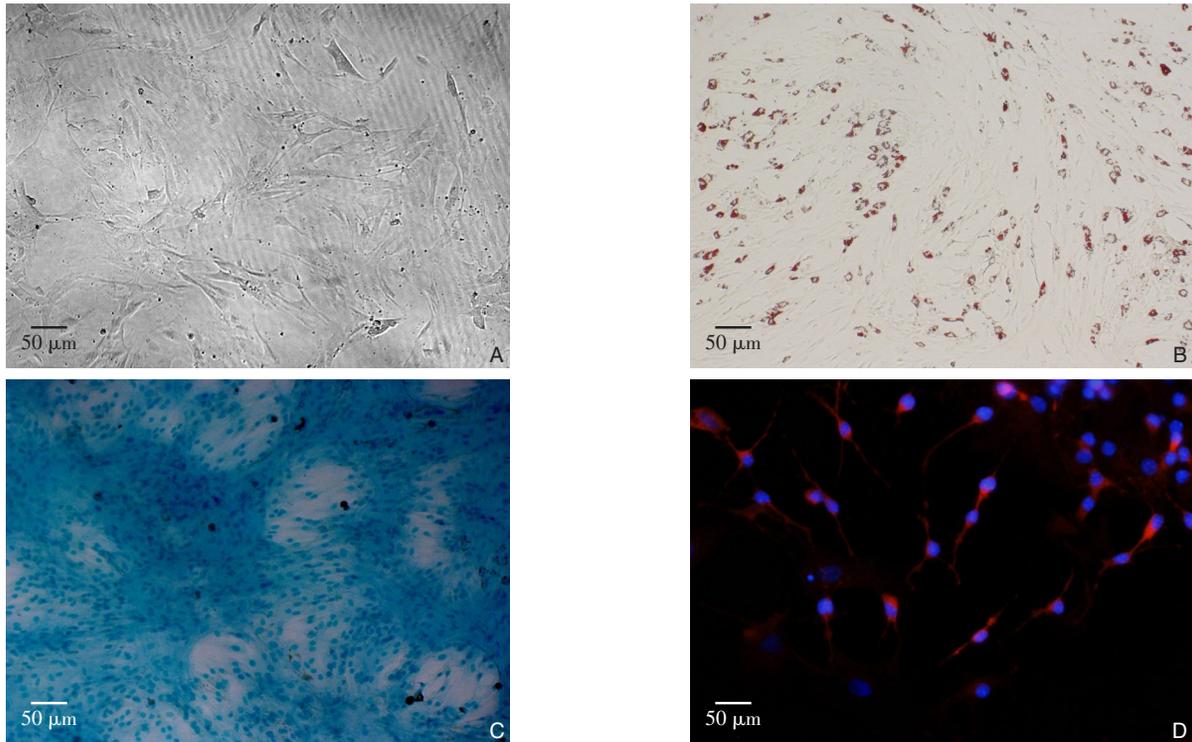


图1 rASCs培养与鉴定 A: 原代培养的rASCs形态; B: 成脂诱导分化后的rASCs的油红O染色; C: 成软骨诱导分化的rASCs的甲苯胺蓝染色; D: 成神经诱导分化的rASCs的MAP2染色

Figure 1 Culture and identification of rASCs A: Morphology of primary cultured rASCs; B: Oil red O staining of rASCs after adipogenic induction differentiation; C: Toluidine blue staining of rASCs after chondrogenic induction differentiation; D: MAP2 staining of rASCs after neurogenic induction differentiation

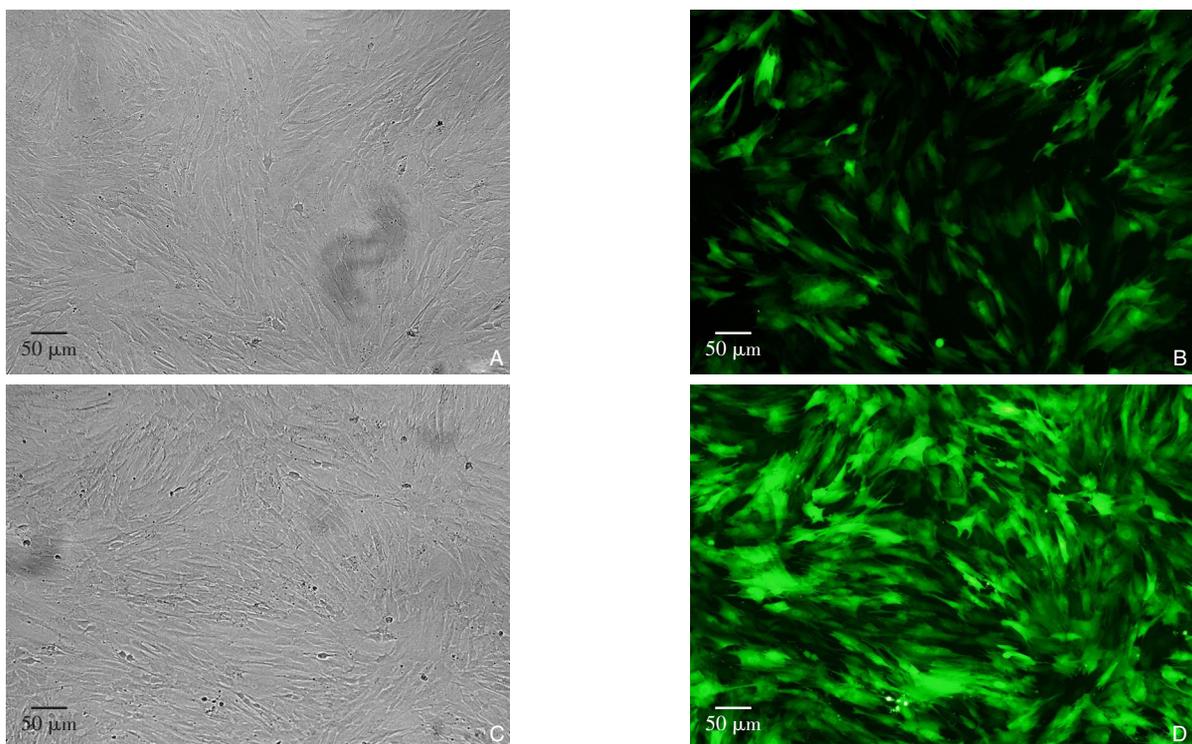


图2 Adv-GFP腺病毒 (MOI=200) 感染rASCs ($\times 100$)

A-B: 转染48 h; C-D: 转染72 h

Figure 2 Infection of rASCs with Adv-GFP adenovirus (MOI=200) ($\times 100$)

A-B: Transfection for 48 h; C-D: Transfection for 72 h

2.3 DLEAD大鼠模型的下肢血流监测结果

治疗后第1周, rASCs组大鼠的缺血下肢-健侧下肢血流比为 0.26 ± 0.02 , SDF-1 α +rASCs组大鼠的缺血下肢-健侧下肢血流比为 0.33 ± 0.03 , 明显高于前组 ($P=0.016$); 治疗后第2周, rASCs组大

鼠的缺血下肢-健侧下肢血流比为 0.47 ± 0.01 , SDF-1 α +rASCs组大鼠的缺血下肢-健侧下肢血流比为 0.60 ± 0.02 , 明显高于前组, 但差异无统计学意义 ($P=0.050$) (图3)。

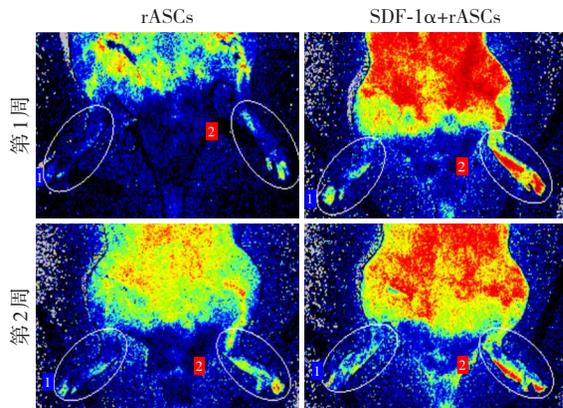
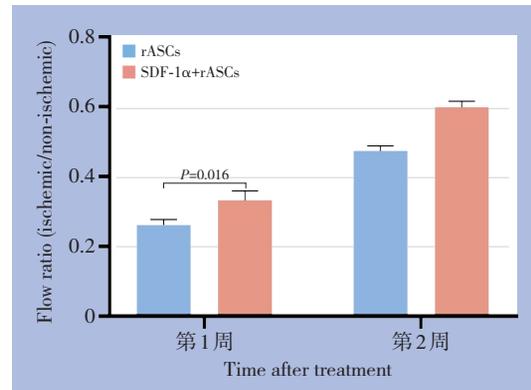


图3 治疗后第1、2周各组大鼠下肢血流情况 (1: 缺血下肢, 2: 健侧下肢)

Figure 3 Blood flow in the lower limbs of rats from each group at weeks 1 and 2 post-treatment (1: ischemic limb, 2: contralateral limb)



2.4 免疫荧光染色观察结果

免疫荧光结果显示, 在治疗后第4周时 SDF-1 α +rASCs组骨骼肌组织中单位视野下 rASCs (绿色荧光) 的数量明显高于 rASCs组 (6.67 ± 0.76 vs.

3.33 ± 0.58), 差异有统计学意义 ($P=0.046$)。此外还可观察到部分绿色荧光 (rASCs) 与红色荧光 (微血管) 发生重叠, 提示部分 rASCs 分化成了血管内皮细胞 (图4)。

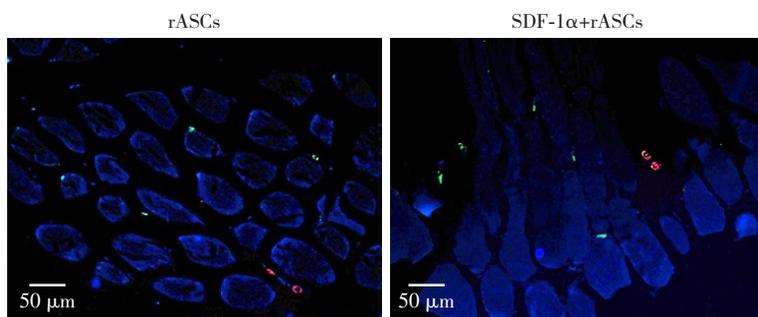
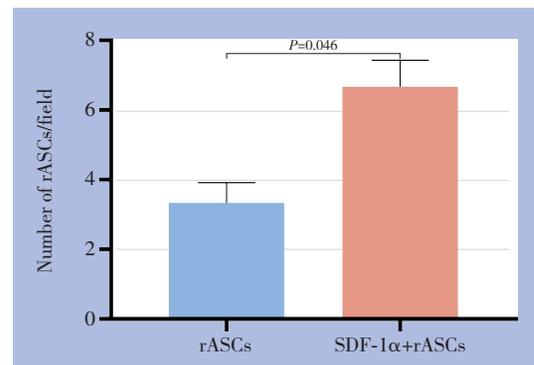


图4 治疗后第4周的各组大鼠下肢缺血组织免疫荧光染色 (绿色荧光: GFP-rASCs, 红色荧光: FVIII标记的血管内皮细胞; $\times 100$)

Figure 4 Immunofluorescent staining of ischemic tissue in the lower limbs of rats from each group at week 4 post-treatment (green fluorescence: GFP-labeled rASCs, red fluorescence: endothelial cells marked by FVIII; $\times 100$)



2.5 HE 染色结果

HE结果显示, 治疗后第4周的健侧骨骼肌肌纤维横截面呈多角形, 大小均一, 细胞核位于肌纤维周边, 骨骼肌连接紧密, 间距较小。与健侧相比, rASCs组大鼠患肢骨骼肌存在明显异常, 包

括肌纤维大小不一, 肌纤维间距变大, 排列紊乱, 部分肌纤维出现小角形萎缩, 中心核肌纤维数目增多, 而 SDF-1 α +rASCs组大鼠患肢骨骼肌形态则比较接近健侧肌肉形态 (图5)。

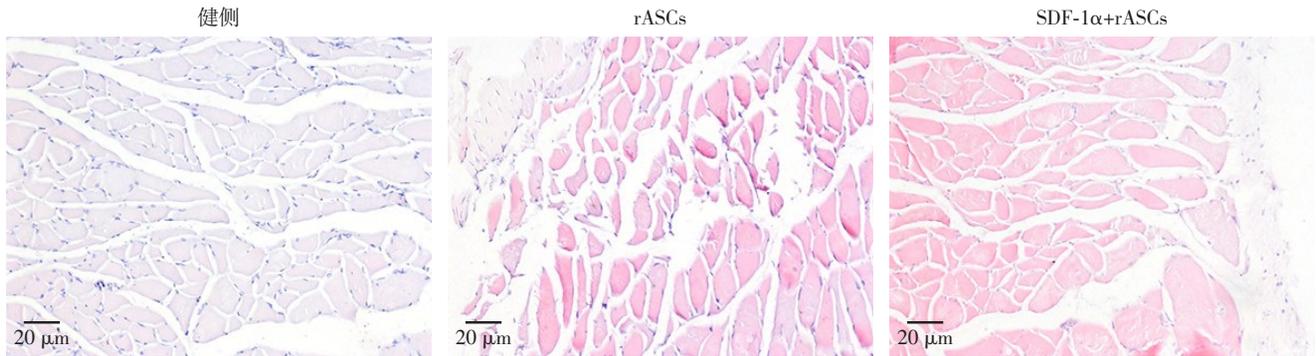


图5 治疗后第4周各组大鼠患肢骨骼肌的HE染色形态(×100)

Figure 5 Morphology of skeletal muscle in the affected limbs of rats from each group at week 4 post-treatment as revealed by HE staining (×100)

3 讨论

干细胞近年来成为组织修复领域的研究热点,凭借着拥有强大的旁分泌、向多种体细胞分化等功能被认为在再生医学研究中具有很大的临床应用潜力。ASCs是一种由脂肪组织中分离提取获得的MSCs,由于其来源丰富,分离、鉴定、培养较易操作,且与其他干细胞比较,在实际应用方面有着独特的优势,在干细胞治疗领域有着广阔的应用前景。本研究通过对大鼠脂肪组织进行分离提取、培养获得相应细胞,所培养的细胞形态呈长梭形或多角形,随后分别经成脂、成软骨、成神经诱导分化后结果提示可多向分化成脂肪细胞、软骨细胞、神经细胞,所培养的细胞经鉴定符合干细胞的特性并且明确为rASCs。

由于研究^[3-5]发现MSCs主要是通过分泌生长因子和直接分化为体细胞参与组织修复重建,故而治疗及到达损伤部位的细胞数量对疗效具有重要的决定作用。相较于静脉输注,向损伤部位直接移植MSCs可以保证细胞定位于靶点区域,但在治疗糖尿病下肢缺血患者的临床实践中,由于这类患者往往具有广泛的动脉病变,导致缺血区域范围较大,直接移植MSCs需要多点位多次注射,不仅需要较多量的细胞还增加了患者的痛苦。相对于局部注射而言,静脉输注的操作更为简单,可以对输入细胞的总数进行调控,同时患者痛苦小且方便重复治疗。然而,有研究^[23]显示, MSCs通过静脉输注后大部分会滞留于肺循环中,只有不到0.3%的细胞能够到达其他各组织器官,但也有学者发现随着时间的推移,肺部中MSCs的数量会逐渐下降,其他组织器官中的细胞数量有所上升,

故而推测MSCs可以通过体内迁移到达靶点组织^[24]。既往也有关于静脉输注内皮祖细胞或干细胞治疗下肢缺血的研究,如Maeda等^[25]将BMSCs静脉输注至大鼠后肢缺血模型,发现与对照组相比,细胞组缺血后肢组织中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的基因表达水平明显升高,毛细血管密度明显增加,缺血后肢组织灌注获得明显改善。Long团队^[26]通过尾静脉注射内皮祖细胞治疗后肢缺血大鼠,治疗3周后检测发现缺血组织血流恢复可达50%以上,与对照组(28.3 ± 7.8)%相比,差异有统计学意义($P < 0.001$)。这说明干细胞或内皮祖细胞通过静脉输注是能够经血流到达缺血损伤部位并治疗后肢缺血组织。本研究通过将GFP标记的rASCs经尾静脉注射移植至DLEAD大鼠模型体内,4周后对缺血患肢肌肉组织进行免疫荧光检测结果显示在缺血下肢肌肉组织中可以观察到绿色荧光的分布,同样证实了GFP标记的rASCs经尾静脉注射后能经血流迁移到达分布于受损组织处。Nagata等^[27]的研究通过将ASCs经尾静脉注入心肌梗死小鼠模型中,6周后的心肌组织免疫荧光染色结果提示ASCs已经分化成心肌细胞和血管内皮细胞,促进了受损心肌的再生修复,小鼠心功能获得明显改善,发现治疗效果及机制主要取决于干细胞逐渐分化为血管内皮细胞等体细胞,促使新生毛细血管形成,促进受损组织的修复。本研究中发现了有部分绿色荧光(rASCs)与代表血管内皮细胞的红色荧光发生了重叠,同样说明了rASCs在体内可以分化为血管内皮细胞参与新生血管生成,从而发挥促进缺血骨骼肌修复的作用。

然而,现有的ASCs移植治疗肢体缺血的难点在于外源性ASCs注射移植至体内后迁移至靶器官的细胞数量有限,虽然理论上可通过注射的大量干细胞来解决到达受损靶器官部位的细胞数量不足的问题,但注射过多的干细胞不仅耗费体外培养时间,还可能会导致细胞干性下降,甚至可能会引起血管栓塞等严重问题。因此,对于探索促进ASCs高效迁移归巢的方法,指导并应用于干细胞治疗肢体缺血病变无疑具有非常重要的意义。已有学者^[28]提出改善MSCs迁移至靶部位的能力是MSCs输注治疗效果获得优化的最有潜力的方法之一。有研究^[29-30]表明归巢率低被归因于CXCR4、SDF-1等趋化因子和黏附分子的缺乏。其中,趋化因子是一类能够促使趋化细胞向特定方向移动的信号蛋白或小细胞因子^[31-32]。与趋化因子相关的SDF-1/CXCR4信号轴在胚胎发育器官形成过程中对调节干细胞的迁移和发育有着重要作用,而且当机体处于创伤、感染等应激条件下,还能提高成体组织中的干细胞、内皮细胞的归巢能力,这些细胞被动员起来发挥组织修复作用并维持机体内环境稳定。SDF-1在损伤部位的浓度可呈明显的上调^[14],这可能会影响干细胞、免疫细胞、内皮细胞等在组织修复中发挥重要作用的细胞向损伤部位的迁移和聚集。Gallagher等^[33]发现糖尿病小鼠外周血中SDF-1/CXCR4水平下降,合并血管病变患者下降更明显。国内学者韦玉和等^[34]发现糖尿病患者外周血中SDF-1的水平及内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)的数量明显低于正常人群,而在合并血管病变的患者中两者下降程度更甚,同时也提高了血管壁与血中SDF-1/CXCR4的浓度梯度,血管修复能力受损,加快动脉粥样硬化进展,可见SDF-1/CXCR4在糖尿病血管病变发生发展中起到重要的作用。近年来仅有少量研究表明SDF可以增强MSCs的迁移、增殖和成骨分化等,如Zhang等^[35]证实上调SDF-1的表达可通过SDF-1/CXCR4信号通路促进MSCs的动员和迁移;Zhang团队^[36]通过在损伤椎间盘内注射含有SDF-1 α 的载体,发现SDF-1 α 不被降解以实现持续释放并能诱导MSCs以剂量依赖的方式迁移。目前对于SDF-1 α 诱导影响ASCs在肢体缺血动物体内的归巢及作用能力尚无研究报道。本研究在向DLEAD大鼠模型静脉输注rASCs的同时,向大鼠下肢缺血部位注射SDF-1 α 蛋白以提高局部SDF-1 α 的

浓度,笔者发现免疫荧光结果提示SDF-1 α +rASCs组大鼠的缺血肌肉组织中rASCs(GFP标记)的数量明显高于rASCs组(6.67 ± 0.76 vs. 3.33 ± 0.58 , $P=0.046$),这说明提高缺血部位的SDF-1 α 浓度能够进一步促进rASCs向损伤部位迁移的能力,使得更多的rASCs聚集于患处,增加受损靶器官部位的rASCs归巢数量。此外,在治疗后第1周进行双下肢血流监测,发现SDF-1 α +rASCs组大鼠的缺血下肢-健侧下肢血流比明显高于rASCs组(0.33 ± 0.03 vs. 0.26 ± 0.02 , $P=0.016$),治疗后第2周可发现上述差异进一步扩大(0.60 ± 0.02 vs. 0.47 ± 0.01 , $P=0.050$),说明缺血部位SDF-1 α 的增加能够明显改善rASCs治疗肢体缺血的效果。不仅如此,HE染色结果还发现SDF-1 α +rASCs组大鼠的缺血肌肉组织恢复情况明显优于rASCs组,与健肢肌肉的结构更为相似。由此可见,参与组织修复的rASCs数量增加是SDF-1 α +rASCs组大鼠缺血下肢的血流改善及肌肉组织恢复更为明显的重要原因之一。然而,本研究结果来自大鼠动物模型,而鼠等动物与人体组织相关结构层次有较大差异,SDF-1 α 诱导优化ASCs应用于临床治疗的安全性和具体效果还需进一步评估。

综上所述,本研究通过提高缺血部位的SDF-1 α 的浓度验证其能够有效增加通过尾静脉注射迁移至患处局部的rASCs数量,从而获得优化rASCs改善患肢血流灌注,促进肌肉组织修复的明显效果,为静脉移植ASCs优化治疗肢体缺血的方案选择提供了有力的实验依据。此外,本研究在动物体内验证了部分移植的rASCs可以直接分化为血管内皮细胞,这可能是rASCs促进缺血肌肉修复的关键机制之一。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:黄东琳、梁至洁负责动物实验;黄东琳负责文章撰写;梁至洁、黄东琳、朱丹丹、宁艳负责数据的收集和分析;蒋洪棉负责动物组织病理检测;梁至洁、黎洪棉负责科研设计。

参考文献

- [1] Gu Y, Rampin A, Alvino VV, et al. Cell therapy for critical limb ischemia: advantages, limitations, and new perspectives for treatment of patients with critical diabetic vasculopathy[J]. Curr

- Diab Rep, 2021, 21(3):11. doi: [10.1007/s11892-021-01378-4](https://doi.org/10.1007/s11892-021-01378-4).
- [2] Alió Del Barrio JL, De la Mata A, De Miguel MP, et al. Corneal regeneration using adipose-derived mesenchymal stem cells[J]. Cells, 2022, 11(16):2549. doi: [10.3390/cells11162549](https://doi.org/10.3390/cells11162549).
- [3] Satilmis B, Cicek GS, Cicek E, et al. Adipose-derived stem cells in the treatment of hepatobiliary diseases and sepsis[J]. World J Clin Cases, 2022, 10(14):4348–4356. doi: [10.12998/wjcc.v10.i14.4348](https://doi.org/10.12998/wjcc.v10.i14.4348).
- [4] Lin H, Zhang Y, Yu L, et al. Salvia miltiorrhiza injection promotes the adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells[J]. Plast Reconstr Surg, 2021, 147(3): 613–624. doi: [10.1097/PRS.00000000000007671](https://doi.org/10.1097/PRS.00000000000007671).
- [5] Huang CP, Hsu KC, Wu CP, et al. Osteogenic differentiation from mouse adipose-derived stem cells and bone marrow stem cells[J]. Chin J Physiol, 2022, 65(1):21–29. doi: [10.4103/cjp.cjp_64_21](https://doi.org/10.4103/cjp.cjp_64_21).
- [6] Kyriakidis T, Iosifidis M, Michalopoulos E, et al. Good mid-term outcomes after adipose-derived culture-expanded mesenchymal stem cells implantation in knee focal cartilage defects[J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2020, 28(2): 502–508. doi: [10.1007/s00167-019-05688-9](https://doi.org/10.1007/s00167-019-05688-9).
- [7] Shen Z, Wang W, Chen J, et al. Small extracellular vesicles of hypoxic endothelial cells regulate the therapeutic potential of adipose-derived mesenchymal stem cells via miR-486-5p/PTEN in a limb ischemia model[J]. J Nanobiotechnology, 2022, 20(1):422. doi: [10.1186/s12951-022-01632-1](https://doi.org/10.1186/s12951-022-01632-1).
- [8] Liu J, Qiu P, Qin J, et al. Allogeneic adipose-derived stem cells promote ischemic muscle repair by inducing M2 macrophage polarization via the HIF-1 α /IL-10 pathway[J]. Stem Cells, 2020, 38(10):1307–1320. doi: [10.1002/stem.3250](https://doi.org/10.1002/stem.3250).
- [9] Katagiri T, Kondo K, Shibata R, et al. Therapeutic angiogenesis using autologous adipose-derived regenerative cells in patients with critical limb ischaemia in Japan: a clinical pilot study[J]. Sci Rep, 2020, 10(1):16045. doi: [10.1038/s41598-020-73096-y](https://doi.org/10.1038/s41598-020-73096-y).
- [10] Wang W, Shen Z, Tang Y, et al. Astragaloside IV promotes the angiogenic capacity of adipose-derived mesenchymal stem cells in a hindlimb ischemia model by FAK phosphorylation via CXCR2[J]. Phytomedicine, 2022, 96: 153908. doi: [10.1016/j.phymed.2021.153908](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153908).
- [11] Kim JH, Lim IR, Park CY, et al. Thymosin β 4-enhancing therapeutic efficacy of human adipose-derived stem cells in mouse ischemic hindlimb model[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(6): 2166. doi: [10.3390/ijms21062166](https://doi.org/10.3390/ijms21062166).
- [12] Ou T, Yang W, Li W, et al. SIRT5 deficiency enhances the proliferative and therapeutic capacities of adipose-derived mesenchymal stem cells via metabolic switching[J]. Clin Transl Med, 2020, 10(5):e172. doi: [10.1002/ctm2.172](https://doi.org/10.1002/ctm2.172).
- [13] Kawaguchi N, Zhang TT, Nakanishi T. Involvement of CXCR4 in normal and abnormal development[J]. Cells, 2019, 8(2):185. doi: [10.3390/cells8020185](https://doi.org/10.3390/cells8020185).
- [14] Wang R, Wei W, Rong S, et al. Intravenous injection of SDF-1 α -overexpressing bone marrow mesenchymal stem cells has a potential protective effect on myocardial ischemia in mice[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2022, 17(4): 348–360. doi: [10.2174/1574888X17666220318144608](https://doi.org/10.2174/1574888X17666220318144608).
- [15] Li L, Liu X, Gaihe B, et al. SDF-1 α /OPF/BP composites enhance the migrating and osteogenic abilities of mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells Int, 2021, 2021:1–12. doi: [10.1155/2021/1938819](https://doi.org/10.1155/2021/1938819).
- [16] Wu Q, Ji FK, Wang JH, et al. Stromal cell-derived factor 1 promoted migration of adipose-derived stem cells to the wounded area in traumatic rats[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 467(1):140–145. doi: [10.1016/j.bbrc.2015.09.097](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.09.097).
- [17] Meng Z, Xin L, Fan B. SDF-1 α promotes subchondral bone sclerosis and aggravates osteoarthritis by regulating the proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2023, 24(1):275. doi: [10.1186/s12891-023-06366-1](https://doi.org/10.1186/s12891-023-06366-1).
- [18] 毕国善, 张侠陵, 刘辉, 等. caveolin-1 表达在糖尿病大鼠下肢缺血中的作用及其与 eNOS/NO 通路的关系[J]. 中国普通外科杂志, 2021, 30(6): 678–685. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.2021.06.007](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2021.06.007).
Bi GS, Zhang XL, Liu H, et al. Effects of caveolin-1 expression on lower limb ischemia in diabetic rat and its association with eNOS/NO pathway[J]. China Journal of General Surgery, 2021, 30(6): 678–685. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.2021.06.007](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2021.06.007).
- [19] Nammian P, Asadi-Yousefabad SL, Daneshi S, et al. Comparative analysis of mouse bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells for critical limb ischemia cell therapy[J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1):58. doi: [10.1186/s13287-020-02110-x](https://doi.org/10.1186/s13287-020-02110-x).
- [20] Ali AMEA, Ahmed AS, El-Yasergy DF, et al. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for peripheral artery disease in a rat model of hindlimb ischemia[J]. Iran J Basic Med Sci, 2021, 24(6): 805–814. doi: [10.22038/ijbms.2021.55861.12491](https://doi.org/10.22038/ijbms.2021.55861.12491).
- [21] Gomes de Almeida Schirmer B, Cruet M, Stivala S, et al. The NO-donor MPC-1011 stimulates angiogenesis and arteriogenesis and improves hindlimb ischemia via a cGMP-dependent pathway involving VEGF and SDF-1 α [J]. Atherosclerosis, 2020, 304:30–38. doi: [10.1016/j.atherosclerosis.2020.05.012](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2020.05.012).
- [22] 杨盛家, 陈兵, 罗涛, 等. 大鼠后肢急性缺血模型的构建及评估[J]. 中国普通外科杂志, 2009, 18(6):580–583. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.2009.06.009](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2009.06.009).
Yang SJ, Chen B, Luo T, et al. Construction and evaluation of rat hindlimb acute ischemia model[J]. China Journal of General

- Surgery, 2009, 18(6): 580–583. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.2009.06.009](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2009.06.009).
- [23] Devine SM, Cobbs C, Jennings M, et al. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman Primates[J]. Blood, 2003, 101(8):2999–3001. doi: [10.1182/blood-2002-06-1830](https://doi.org/10.1182/blood-2002-06-1830).
- [24] Gholamrezanezhad A, Mirpour S, Bagheri M, et al. In vivo tracking of ¹¹¹In-oxine labeled mesenchymal stem cells following infusion in patients with advanced cirrhosis[J]. Nucl Med Biol, 2011, 38(7): 961–967. doi: [10.1016/j.nucmedbio.2011.03.008](https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2011.03.008).
- [25] Maeda S, Kawamura T, Sasaki M, et al. Intravenous infusion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves tissue perfusion in a rat hindlimb ischemia model[J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 16986. doi: [10.1038/s41598-022-18485-1](https://doi.org/10.1038/s41598-022-18485-1).
- [26] Long J, Wang S, Zhang Y, et al. The therapeutic effect of vascular endothelial growth factor gene- or heme oxygenase-1 gene-modified endothelial progenitor cells on neovascularization of rat hindlimb ischemia model[J]. J Vasc Surg, 2013, 58(3): 756–765. doi: [10.1016/j.jvs.2012.11.096](https://doi.org/10.1016/j.jvs.2012.11.096).
- [27] Nagata H, Ii M, Kohbayashi E, et al. Cardiac adipose-derived stem cells exhibit high differentiation potential to cardiovascular cells in C57BL/6 mice[J]. Stem Cells Transl Med, 2016, 5(2): 141–151. doi: [10.5966/sctm.2015-0083](https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0083).
- [28] Teo GS, Yang Z, Carman CV, et al. Intravital imaging of mesenchymal stem cell trafficking and association with platelets and neutrophils[J]. Stem Cells, 2015, 33(1):265–277. doi: [10.1002/stem.1848](https://doi.org/10.1002/stem.1848).
- [29] Katayama Y, Hidalgo A, Furie BC, et al. PSGL-1 participates in E-selectin-mediated progenitor homing to bone marrow: evidence for cooperation between E-selectin ligands and α 4 integrin[J]. Blood, 2003, 102(6): 2060–2067. doi: [10.1182/blood-2003-04-1212](https://doi.org/10.1182/blood-2003-04-1212).
- [30] Meng ZQ, Feng GN, Hu XY, et al. SDF factor-1 α promotes the migration, proliferation, and osteogenic differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells through the Wnt/ β -catenin pathway[J]. Stem Cells Dev, 2021, 30(2):106–117. doi: [10.1089/scd.2020.0165](https://doi.org/10.1089/scd.2020.0165).
- [31] Zhou W, Guo S, Liu M, et al. Targeting CXCL12/CXCR4 axis in tumor immunotherapy[J]. Curr Med Chem, 2019, 26(17): 3026–3041. doi: [10.2174/0929867324666170830111531](https://doi.org/10.2174/0929867324666170830111531).
- [32] Hughes CE, Nibbs RJB. A guide to chemokines and their receptors[J]. FEBS J, 2018, 285(16): 2944–2971. doi: [10.1111/febs.14466](https://doi.org/10.1111/febs.14466).
- [33] Gallagher KA, Liu ZJ, Xiao M, et al. Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1 α [J]. J Clin Invest, 2007, 117(5):1249–1259. doi: [10.1172/JCI29710](https://doi.org/10.1172/JCI29710).
- [34] 韦玉和, 罗春媛, 周斌, 等. 2型糖尿病患者外周血中 SDF-1 水平和内皮祖细胞 CXCR4 表达率的变化[J]. 江苏大学学报: 医学版, 2009, 19(5):413–416. doi: [10.3969/j.issn.1671-7783.2009.05.012](https://doi.org/10.3969/j.issn.1671-7783.2009.05.012).
Wei YH, Luo CY, Zhou B, et al. Changes of serum level of SDF-1 and expression of CXCR4 on endothelial progenitor cells in peripheral blood of patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Journal of Jiangsu University: Medicine Edition, 2009, 19(5):413–416. doi: [10.3969/j.issn.1671-7783.2009.05.012](https://doi.org/10.3969/j.issn.1671-7783.2009.05.012).
- [35] Zhang H, Li X, Li J, et al. SDF-1 mediates mesenchymal stem cell recruitment and migration via the SDF-1/CXCR4 axis in bone defect[J]. J Bone Miner Metab, 2021, 39(2):126–138. doi: [10.1007/s00774-020-01122-0](https://doi.org/10.1007/s00774-020-01122-0).
- [36] Zhang H, Yu S, Zhao X, et al. Stromal cell-derived factor-1 α -encapsulated albumin/heparin nanoparticles for induced stem cell migration and intervertebral disc regeneration in vivo[J]. Acta Biomater, 2018, 72:217–227. doi: [10.1016/j.actbio.2018.03.032](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.03.032).

(本文编辑 熊杨)

本文引用格式: 黄东琳, 梁至洁, 朱丹丹, 等. 基质细胞衍生因子1 α 诱导脂肪来源干细胞迁移促进糖尿病缺血下肢肌肉修复的实验研究[J]. 中国普通外科杂志, 2023, 32(6): 878–887. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.2023.06.009](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2023.06.009)

Cite this article as: Huang DL, Liang ZJ, Zhu DD, et al. Experimental study of stromal cell-derived factor 1 α inducing migration of adipose-derived stem cells to promote muscle repair in diabetic ischemic lower limbs[J]. Chin J Gen Surg, 2023, 32(6): 878–887. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.2023.06.009](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2023.06.009)