

文章编号:1005-6947(2007)02-0136-05

· 基础研究 ·

# bFGF 联合骨髓干细胞动员剂促进兔缺血后肢血管新生的研究

王志伟<sup>1</sup>, 马秀现<sup>1</sup>, 李天晓<sup>2</sup>, 党晓卫<sup>1</sup>

(1. 郑州大学第一附属医院 普通外科, 河南 郑州 450052; 2. 河南省人民医院 介入科, 河南 郑州 450052)

**摘要:**目的 观察局部应用碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)联合干细胞动员剂对促进兔缺血后肢血管新生的作用。方法 40只大耳白兔均切断左侧股动脉及其分支,制作兔后肢缺血模型。成模后随机分4组(每组10只):(1)bFGF组,在缺血后肢肌内多次注射重组人bFGF蛋白;(2)G-CSF组,皮下注射重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF);(3)bFGF+G-CSF组,按bFGF组和G-CSF组的方法给予bFGF和G-CSF;(4)对照组,给予等量生理盐水。术后4周,各组兔行腹主动脉造影,观察侧支血管形成情况。取内收肌和腓肠肌组织行病理切片检查;用图像分析系统统计血管密度;用免疫组化检测内收肌和腓肠肌中VEGF阳性表达的血管数。结果 兔侧支循环血管条数、血管密度及VEGF阳性表达的血管数均依次为:bFGF+G-CSF组>bFGF组>G-CSF组>对照组(均 $P<0.05$ )。结论

在缺血下肢肌内注射bFGF蛋白和皮下注射骨髓干细胞动员剂均可促进血管新生,改善肢体缺血状态;但在骨髓干细胞动员的同时,联合应用bFGF蛋白效果更好,缺血肢体改善更明显。

[中国普通外科杂志,2007,16(2):136-140]

**关键词:**成纤维细胞生长因子2;骨髓祖代细胞;粒细胞集落刺激因子,重组;血管生成;缺血;兔  
**中图分类号:**R392.114;R364.12 **文献标识码:**A

## Co-application of basic fibroblast growth factor (bFGF) and mobilization of bone marrow stem cells to improve the angiogenesis of ischemic limbs

WANG Zhi-wei<sup>1</sup>, MA Xiu-xian<sup>1</sup>, LI Tian-xiao<sup>2</sup>, DANG Wiao-wei<sup>1</sup>

(1 Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 2 Department of Intervention, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450052, China)

**Abstract: Objective** To evaluate the effect of local co-application of basic fibroblast growth factor (bFGF) and mobilized bone marrow stem cells on angiogenesis in ischemic limbs of rabbits. **Method** After ischemia models were induced by surgical section and ligation of left femoral artery and its branches in 40 rabbits, they were randomized to receive intramuscular injection of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) ( $n=10$ ) in ischemic zone, hypodermic injection of recombinant human G-CSF ( $n=10$ ), co-application of bFGF and G-CSF ( $n=10$ ), or normal saline ( $n=10$ ). Four weeks later, angiogenesis of ischemia models was observed and evaluated by abdominal aortography, histopathologic analysis and immunohistochemical studies with the antibodies of VEGF. **Results** The number of capillaries, the compensatory circulation blood vessel and the vascular endothelial cells that expressed VEGF protein in bFGF+G-CSF group was the most ( $P<0.05$ ), that of bFGF group was more than that of G-CSF group ( $P<0.05$ ), and that of saline group was the least ( $P<0.05$ ).

**Conclusion** Both intramuscular injection of recombinant human bFGF and hypodermic injection of recombinant human G-CSF (mobilization of bone marrow stem cells) can stimulate angiogenesis of the ischemic limbs. But the effect will be better if co-application of them is used.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(2):136-140]

收稿日期:2006-05-13 修改日期:2006-10-31

**作者简介:**王志伟,男,郑州大学第一附属医院硕士研究生,主要从事门静脉高压症(布加综合征)、血管外科方面的研究。

**通讯作者:**马秀现 E-mail: wangzhiwei126@126.com

**Key words:** Fibroblast Growth Factor 2; Myeloid Progenitor Cells; Granulocyte Colony Stimulating Factor,

Recombinant; Angiogenesis; Ischemia; Rabbits

**CLC number:** R392.114; R364.12

**Document code:** A

肢体缺血性疾病是外科常见的致残性疾病,静息痛、皮肤溃疡或坏疽是其典型的临床表现,严重影响患者的生活质量,甚至危及生命。本实验通过兔缺血后肢肌内注射重组人碱性成纤维细胞生长因子(rh-bFGF),及皮下注射重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF)使兔骨髓干细胞被动员,观察其对缺血组织血管新生情况的影响,报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物分组及制剂

实验选用成年健康日本大耳白兔40只,体重2.5~3.0kg,平均2.8kg,雌雄不限,由河南省动物实验中心提供。制剂:rh-bFGF和rhG-CSF均购自北京双鹭药业有限公司;76%复方泛影葡胺购自上海旭东海普药业有限公司;兔抗兔血管内皮生长因子(VEGF)多克隆抗体购自武汉博士德生物技术有限公司;SP-9000 二步法免疫组化检测试剂盒和DAB显色试剂盒均购自北京中山生物技术有限公司。

### 1.2 兔下肢缺血模型的制备

兔肌内注射氯胺酮(50mg/kg)麻醉后,常规备皮、消毒、铺巾;经左侧腹股沟韧带中点(摸到股动脉搏动后)作一长约1~2cm纵形皮肤切口,暴露股动脉,自其起始部分分离之,在股动脉起始处,用1号丝线结扎并切断,制成兔后肢缺血模型。成模后随机分4组,即对照组、bFGF组(缺血后肢肌注bFGF)、G-CSF组(皮下注射G-CSF)和bFGF+G-CSF组。每组10只。

### 1.3 给药及一般情况观察

兔后肢缺血模型制备成功3h后,各组按以下步骤给药:bFGF组实验兔给予bFGF2000U(约5 $\mu$ g,用生理盐水溶解成2mL)分5个点在股动脉结扎处下方肌内注射;按此法第3,5,7天各给药1次,共4次。G-CSF组给予G-CSF10 $\mu$ g/kg皮下注射。按上法连续5d各给药1次,共5次。bFGF+G-CSF组按bFGF组和G-CSF组的方法给予bFGF和G-CSF。对照组按bFGF+G-CSF组的给药方法给予等量生理盐水。实验开始后,每天

观察实验兔的一般状况:生命体征、饮食、切口愈合情况、毛发有无脱落及左后肢运动情况等。G-CSF组和bFGF+G-CSF组术后2~8d,每天测血常规1次;其余各组在术后2,4,6,8天各测血常规1次。

### 1.4 腹主动脉造影

术后4周,各兔肌内注射氯胺酮(50mg/kg)麻醉成功后,开腹,找到腹主动脉(肾动脉以下段),分离2cm。用5号头皮针刺入,加压快速推入76%复方泛影葡胺10mL。在推入造影剂过程中观察兔左后肢侧支循环显影情况并摄X线片(万东500型普通X光机,由郑州大学第三医院提供)。观察侧支循环和新生血管的形成情况。

### 1.5 组织切片和测量微血管密度

腹主动脉造影后立即处死各兔,取左后肢内收肌和腓肠肌中段肌肉组织各1cm $\times$ 1cm $\times$ 0.3cm,用甲醛固定,石蜡包埋;按肌肉横断面切片,片厚5 $\mu$ m,连续10张;取第2张,第10张,行HE染色(在郑州大学医学院病理教研室进行)。使用Biosens Digital Imaging System(V1.6)图像分析系统(郑州大学医学院人体解剖教研室提供),在400倍视野下对切片进行血管密度计数。

### 1.6 检测VEGF阳性表达的血管数

取石蜡包埋的内收肌和腓肠肌标本,按肌肉横断面切片,片厚5 $\mu$ m。按SP-9000二步法免疫组化试剂盒说明书进行免疫组化检测。血管内皮细胞胞浆染色呈棕黄色者为阳性细胞,该毛细血管即为VEGF阳性表达的血管。每一标本随机选取5个视野,在400倍显微镜下观察计数VEGF阳性表达的血管数,取其平均值。

### 1.7 统计分析

所得数据用SPSS11.5软件分析。数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。行单因素方差分析,SNK检验( $\alpha = 0.05$ )。P<0.05为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大体观察

实验兔麻醉意外死亡1只(bFGF+G-CSF组),术后2d内因肠梗阻死亡1只(bFGF组),术

后4d因腹泻死亡1只(对照组),术后5d和6d(G-CSF组)分别突然死亡1只,余均存活。在观察时间段内各兔均未见后肢缺血性坏死;术后4d手术切口均愈合良好;但对照组出现跛行3只,下肢足背部溃疡1只;其余3组各兔未出现跛行或溃疡;各兔均有左后肢毛发脱落现象。

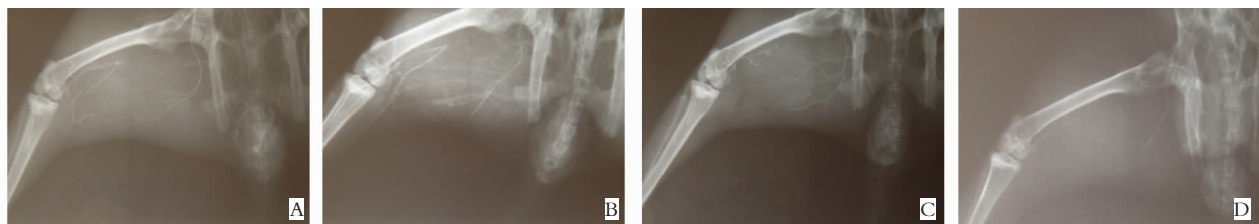
## 2.2 血常规情况

G-CSF组和bFGF+G-CSF组术后第6天白细胞数最高达 $26.2 \times 10^9/L \sim 43.6 \times 10^9/L$ ,平均 $35.3 \times 10^9/L$ 。术后第8天基本恢复正常。其余2组各兔血常规未有明显变化 $5.4 \times 10^9/L \sim 10.2 \times 10^9/L$ ,

平均 $8.6 \times 10^9/L$ 。

## 2.3 侧支血管数

各X线片均显示左侧股动脉连续性中断,并出现不同数量的侧支循环血管(附图)。在腹主动脉造影X线片上经股骨中点画一条垂直于股骨纵轴的直线,记录通过该直线显示的血管数(附表)。bFGF+G-CSF组侧支血管数多于bFGF组( $P=0.034$ ),也多于G-CSF组( $P=0.001$ );bFGF组侧支血管数多于G-CSF组( $P=0.036$ );3个实验组侧支血管数均多于对照组( $P<0.05$ )。



A: bFGF + G-CSF 组,侧支血管呈网状,很密集  
B: bFGF 组,侧支血管紊乱,较密集  
C: G-CSF 组,有一定数量的侧支血管形成  
D: 对照组,少数侧支血管形成

附图 腹主动脉造影均见股动脉连续性中断,不同数量的侧支血管形成

## 2.4 毛细血管计数

bFGF+G-CSF组血管密度多于bFGF组( $P=0.002$ ),也多于G-CSF组( $P=0.000$ );bFGF组侧支血管数多于G-CSF组( $P=0.000$ );3个实验组侧支血管数均多于对照组( $P<0.05$ )(附表)。

## 2.5 VEGF 阳性表达的血管数

VEGF 阳性表达的血管数依次为:bFGF+G-CSF组 > bFGF组 > G-CSF组 > 对照组(均 $P<0.05$ )(附表)。

附表 4组各观测指标对比表

分组	例数	侧支血管数(条)	切片数	血管密度 ( $n/mm^2$ )	VEGF 阳性表达的血管数(条)
对照组	9	$6.11 \pm 1.054$	18	$122.22 \pm 5.936$	$9.02 \pm 1.91$
G-CSF 组	8	$7.50 \pm 1.309^{1)}$	16	$126.87 \pm 5.302^{1)}$	$11.44 \pm 2.22^{1)}$
bFGF 组	9	$8.78 \pm 0.972^{1),2)}$	18	$134.33 \pm 4.947^{1),2)}$	$16.55 \pm 2.58^{1),2)}$
bFGF + G-CSF 组	9	$9.89 \pm 1.501^{1),2),3)}$	18	$139.89 \pm 4.993^{1),2),3)}$	$21.13 \pm 2.23^{1),2),3)}$

注:各组间比较, $P<0.05$

## 3 讨论

尽管近年来血管成形术和外科搭桥术有了很大发展,但对于远端流出道差或肢体动脉弥漫性病变的患者的治疗却束手无策。血管新生(angiotogenesis)指在血管床的基础上血管内皮细胞

的增生和迁移,即从先前存在的血管发芽生成新的毛细血管。血管新生疗法,是指通过应用外源血管生长因子(VEGF, bFGF等)或其基因,促进缺血组织的血管新生和侧支血管的形成,使缺血组织获得改善的治疗方法。血管发生(vasculogenesis)指发生在胚胎发育时期的血管内

皮祖细胞(EPC)形成原始血管的过程。然而近年来发现在成年体内也存在EPC,主要分布于骨髓,外周血中含量极少。1997年Asahara等<sup>[1]</sup>首次证明在出生后循环外周血中存在EPC,且EPC同样参与后天的血管新生<sup>[1-2]</sup>。这就加深了对血管新生的认识,扩大了血管新生的概念。

成纤维细胞生长因子(FGF)<sup>[3]</sup>,又称肝素亲和生长因子,按等电点不同分为碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和酸性成纤维细胞生长因子(aFGF)。bFGF的生物学活性远大于aFGF。bFGF是动物和人体组织中存在的一种微量蛋白,对多种中胚层和神经外胚层来源的细胞具有广泛生物学活性,是一种多功能细胞因子<sup>[4]</sup>。bFGF可趋化血管内膜的各类细胞,并诱导这些细胞表达组织重建所需的血浆酶原激活剂、胶原酶和蛋白水解酶等;这些酶类通过促使血管基底膜降解和刺激内膜各类细胞的增殖与迁移,诱导血管内皮细胞长入胶原基质中形成管腔并促进神经元及新生血管共同生长<sup>[5]</sup>。研究表明<sup>[6-7]</sup>,组织缺血后局部内源性bFGF表达增加,促进血管再生以适应缺血的变化。但此过程非常缓慢,而且bFGF增加的量不足以完全改善组织缺血状态。因此,在缺血组织内适时适量地增加局部外源性bFGF的量,将会加快血管新生的速度和加大血管新生的幅度,这可能成为一条新的治疗缺血性疾病的途径。有学者用bFGF基因治疗缺血性疾病的研究也取得了一定效果。随着重组人bFGF蛋白的出现,应用bFGF蛋白治疗缺血性疾病将更加简单易行。研究<sup>[8-9]</sup>表明bFGF蛋白治疗心肌缺血同样能改善心肌功能,减少梗死面积及增加缺血区小动脉毛细血管数量。本实验应用bFGF蛋白在兔缺血后肢肌内注射,可使侧支血管增加(bFGF组>对照组, $P<0.05$ ),缺血状态得以改善。研究<sup>[8-10]</sup>表明,组织缺血后局部内源性VEGF蛋白表达增加以促进血管新生,代偿局部缺血状态。本实验还表明,应用外源性bFGF蛋白可加大缺血组织内血管内皮细胞中VEGF蛋白的表达( $P<0.05$ ),使bFGF蛋白和VEGF蛋白共同加快缺血组织内毛细血管的新生速度和幅度。

业已证实,骨髓干细胞CD34+细胞可分化为血管内皮细胞<sup>[11]</sup>。近年来,血管内皮祖细胞或骨髓干细胞移植开始用于血管新生疗法的研究<sup>[12]</sup>。应用骨髓干细胞动员剂将骨髓干细胞“驱赶”到外周血,增加外周血干细胞数量,同样可达到自体干细胞移植治疗缺血性疾病的目,此称为“干细胞自我移植”<sup>[13-14]</sup>。组织缺血后骨髓干细胞能自行迁移到缺血部位,并在缺血环境中横向分化为血管内皮细胞等,参与血管新生和促进组织功能恢复,也称此为“归巢”定向运动。组织缺血、损伤时,机体常伴随发热、白细胞数上升等现象,虽然此时外周血干细胞的数量会增加但增加幅度有限且时间短。因此应用骨髓干细胞动员剂促进骨髓内的干细胞复制并将一定量的干细胞“驱赶”到外周血,增加外周血干细胞数量,即增加了干细胞“归巢”到缺血组织的数量,血管新生也就加快了速度和增加了幅度。有关心肌缺血的研究<sup>[13-14]</sup>表明,骨髓干细胞动员具有改善心肌功能,减少梗死面积,增加缺血区小动脉毛细血管数量等作用。G-CSF<sup>[15]</sup>是传统的强有力的骨髓干细胞动员剂,可在较短时间内使外周血干细胞提高几十倍至几百倍。本实验G-CSF组和bFGF+G-CSF组各实验兔应用G-CSF后外周血白细胞数量快速提升,第6天达到高峰;且在用药第3天后,在白细胞计数中均发现幼稚细胞。应用上述各种方法,侧支血管数、血管密度及VEGF阳性表达的血管数G-CSF组均大于对照组。

研究<sup>[11]</sup>发现干细胞在分化为血管内皮细胞的过程中能分泌bFGF。bFGF等血管生长因子又可促进干细胞增殖并向血管内皮细胞分化,诱导内皮细胞产生纤维酶原激活物和基质金属蛋白酶,从而降解基质,加速新生血管管腔结构的形成和三维构像形成<sup>[16]</sup>;笔者用骨髓干细胞动员剂增加外周血干细胞数量进行“干细胞自我移植”的同时,在局部缺血组织内注射bFGF,可使在增加了干细胞“归巢”到缺血组织数量的基础上,再适时适量地增加局部外源性bFGF蛋白的量,加大加快诱导干细胞分化为血管内皮细胞,有利于血管新生,从而缺血状态得以改善。

由于使用骨髓干细胞动员剂后使外周血白细胞数量迅猛升高,会产生“类白血病反应”;白细胞数量达到一定数量则有可能发生“白细胞淤滞”而引起脑梗死、心肌梗死等并发症。本实验中2只G-CSF组兔术后第5,6天(皮下注射G-CSF4,5次)突然死亡,末次白细胞计数分别为 $40.1 \times 10^9/L$ 和 $42.6 \times 10^9/L$ ,死后解剖发现心、肺、肠、肾、肝等未见异常,死亡原因可能为脑梗死。故在骨髓干细胞动员过程中应注意预防“白细胞淤滞”引起的并发症。

总之,在缺血下肢肌内注射bFGF蛋白和骨髓干细胞动员剂均可促进血管新生,从而增加缺血下肢血液灌注,改善肢体缺血状态;而两者联合使用效果更好,缺血肢体改善更明显。

#### 参考文献:

- [1] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, *et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis [J]. *Science*, 1997, 275 (5302): 964 - 967.
- [2] Li TS, Hamano K, Nishida M, *et al.* CD117 + stemcell play a key role in therapeutic angiogenesis induced by bone marrow cell implantation [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285 (3): H931 - 937.
- [3] Bossard C, Laurell H, Ven den Berghe L, *et al.* Translokine is an intracellular mediator of FGF-2 trafficking [J]. *Nat Cell Biol*, 2003, 5 (5): 433 - 439.
- [4] Detillieux KA, Sheikh F, Kardami E, *et al.* Biological activities of fibroblast growth factor-2 in the adult myocardium [J]. *Cardiovasc Res*, 2003, 57 (1): 8 - 9.
- [5] Pu LL, Holme KR, Symes JF. Heparinase enhances collateral vessel development in the ischemic limb [J]. *Int Surg*, 2002, 87 (4): 260 - 268.
- [6] 杨靖,毛晓波,曾秋棠,等. 急性心肌梗死后血管内皮生长因子及碱性成纤维细胞生长因子表达动态变化[J]. *中国介入心脏病学杂志*, 2005, 13 (2): 114 - 116.
- [7] Banai S, Shweiki D, Pinson A, *et al.* Up regulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischemia: implication for coronary angiogenesis [J]. *Cardiovasc Res*, 1994, 28 (8): 1176 - 1179.
- [8] 刘莹,孙立军,宦怡,等. 碱性成纤维生长因子对急性心肌梗死血管生成和碱性成纤维生长因子及血管内皮生长因子表达的作用 [J]. *中国医学杂志*, 2004, 84 (1): 54 - 57.
- [9] 张小勇,李易,谭强,等. 碱性成纤维细胞生长因子对兔正常和缺血心肌血管新生的影响 [J]. *中国心血管杂志*, 2003, 8 (3): 159 - 160.
- [10] 周兆熊,张纪蔚,张皓,等. 兔缺血后肢内源性 VEGF 蛋白表达与侧支形成相关性研究 [J]. *外科理论与实践*, 2001, 6 (5): 301 - 304.
- [11] Shi Q, Rafii S, Wu MH, *et al.* Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells [J]. *Blood*, 1998, 92 (2): 362 - 367.
- [12] 栾景源,董国祥,赵军,等. 自体外周血干细胞移植治疗下肢缺血性疾病的早期报道 [J]. *中国微创外科杂志*, 2004, 4 (1): 63 - 65.
- [13] 吴贤仁,杨敏,李玉光,等. 骨髓干细胞动员对大鼠缺血心肌的治疗作用 [J]. *中国免疫学杂志*, 2004, 20 (7): 471 - 474.
- [14] Orlic D, Kajstural J, Chimenti S, *et al.* Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart improving function and survival [J]. *PNAS*, 2001, 98 (18): 10344 - 10349.
- [15] Kocher AA, Schuster MD, Szabo ML, *et al.* Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis reduces remodeling and improves cardiac function [J]. *Nat Med*, 2001, 7 (4): 430 - 436.
- [16] 李明焕,田铎,刘执玉,等. ECV304 细胞用于三维血管新生的研究 [J]. *中国现代普通外科进展*, 2004, 7 (3): 165 - 167.