

网络出版时间: 2017-5-22 17:45 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170522.1745.009.html>

富血小板纤维蛋白在治疗糖尿病兔皮肤溃疡中的实验研究

汪新伟 荣洁琳 蒋思静 马莉 贾大平 吴亮亮 赵宇

摘要 目的 观察富血小板纤维蛋白(PRF)对糖尿病动物模型皮肤创面的治疗作用及疗效。方法 将20只大白兔随机分为空白对照组(4只)、糖尿病模型组(4只)、重组人表皮生长因子凝胶(rhEGF)组(4只)、PRF组(8只),将糖尿病模型组、rhEGF组、PRF组建立糖尿病动物创面模型。A组动物创面分别予以1%碘伏清创、1%碘伏清创、rhEGF外敷、PRF外敷。观察各组创面面积及容积变化情况,标本予以HE染色观察创面组织生长情况,免疫组化标记血管内皮生长因子(VEGF)蛋白,计算VEGF平均光密度。结果 干预后3、7 d显示,rhEGF组、PRF组创面面积和容积缩小的速度高于空白对照组及糖尿病模型组($P < 0.05$)。第2、3周末大体病理观察 rhEGF组、PRF组创面组织表皮覆盖完全,真

皮结构致密,皮肤结构基本恢复正常,有大量毛细血管存在。第2、3周末标本 VEGF 平均光密度蛋白含量,rhEGF组、PRF组显著高于空白对照组、糖尿病模型组($P < 0.05$)。结论 PRF可显著促进糖尿病兔皮肤创面的愈合。

关键词 PRF;富血小板纤维蛋白;糖尿病溃疡;难治性溃疡
中图分类号 R 622

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)07-0983-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.07.009

难治性溃疡又称为慢性溃疡,是一种临床常见疾病,以糖尿病溃疡较为多见,其病程缠绵,经久不愈。其中糖尿病病足是导致患者截肢致残、死亡及生活能力丧失的重要原因。目前,对于治疗难治性溃疡有很多方法,包括生长因子产品、真空负压伤口引流、蛆虫疗法、光疗、超声治疗、电疗、生物工程组织或皮肤替代品、高压氧治疗^[1]。自体来源的生物材料应用是难治性溃疡最有前景的治疗方法之一,富血小板血浆(platelet-rich plasma,PRP)治疗已首

2017-03-08 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81171829)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院整形外科,合肥 230022

作者简介:汪新伟,男,硕士研究生;

赵宇,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:zhaoyuzj@aliyun.com

The mechanism of STAT5-ROS signal pathway to mediated imatinib resistance of K562 cells

Hao Yingchan, Xu Xiucui

(Central Laboratory, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the mechanism of STAT5-ROS pathway to mediate IM resistance of K562 cells. K562 cells were cultured with imatinib at gradually increased concentrations to generate resistance cell line. **Methods** CCK-8 assay was used to clarify the resistance ratio. The STAT5A and STAT5B mRNA levels were detected by RT-PCR. Flow cytometry assay was used to detect the level of ROS and cell apoptosis. The expression of STAT5 protein was detected by Western blot. **Results** Imatinib resistance cell line K562/G was successfully induced by gradually increasing concentrations of IM. The IC_{50} of K562/G was eighty times higher than K562 by CCK-8. Cell growth curve showed that K562/G was not inhibited in 20 $\mu\text{mol/L}$ imatinib, whereas the K562 cell was significantly inhibited by up to 0.1 $\mu\text{mol/L}$ imatinib. Intracellular level of ROS in K562/G was obviously higher than that of K562 cells ($P = 0.0001$). The apoptosis ratio of K562 was lower than that of K562/G when the same concentration of IM react on the two cell lines for the same time ($P < 0.05$). The expression of STAT5A and STAT5B mRNA in K562/G was higher than in K562 ($P = 0.0001$, $P = 0.0170$). Then the level of STAT5 proteins in K562/G cells was significantly increased ($P = 0.0090$). **Conclusion** The STAT5 is highly expressed in CML. STAT5-ROS is closely related to the formation of imatinib resistance of chronic myeloid leukemia.

Key words chronic myeloid leukemia; imatinib resistance; STAT5-ROS signal pathway

先应用于临床治疗软组织溃疡^[2]。富血小板纤维蛋白(platelet-rich fibrin, PRF)是由 Dohan et al^[3]在 2001 年发现的第二代血小板浓缩物, PRF 已应用于口腔种植、骨缺损骨再生、瘢痕治疗、脂肪移植等医学领域^[4]。O'Connell et al^[5]将 PRF 应用于下肢溃疡创面取得了良好效果,国内将 PRF 应用于创面愈合治疗中的研究相对较少。所以研究 PRF 在软组织愈合中的作用,并将 PRF 应用于难治性溃疡的治疗当中具有现实临床意义。该实验以糖尿病兔溃疡创面为模型,观察创面局部使用 PRF 的疗效,并对其作用机制进行探讨,为其临床应用提供依据,为临床治疗难治性创面寻求新的方法和思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物 3 月龄雄性新西兰大白兔 20 只,重(2.0±0.3) kg/只,购自安徽医科大学实验动物中心。安徽医科大学动物实验中心饲养,饲养条件为(22±2)℃,室内通风良好,相对湿度为 40%~50%左右,实验前适应性预饲养 1 周。

1.2 方法

1.2.1 糖尿病兔皮肤创面模型的建立 以 pH 4.2、0.1 mmol/L 的枸橼酸钠缓冲液溶解链脲佐菌素,配成 1% 溶液,据称量体重,按 40 mg/kg 标准经耳缘静脉注入新鲜链脲佐菌素溶液。当血糖≥12.0 mmol/L 且持续 2 周维持在此高血糖水平时判断为建模成功^[6]。糖尿病兔实验期间自由进食、饮水,于注射药物后 12、24、48、72 h 及 7、14 d 分别在兔耳缘静脉取监测血糖,血糖仪测定禁食 4 h 后的血糖浓度并称量体重。糖尿病兔成模后用 1% 水合氯醛溶液腹腔注射麻醉。背部剃毛,用碘酒、酒精消毒皮肤后,在背部脊柱两侧旁 2.5 cm 处用亚甲兰标记预作创面大小,用 11 号剪刀沿标记线依次切开皮肤及皮下组织,保留深筋膜及以下组织,略作修剪,使肉眼

观察溃疡面积大致相等,制成全层皮肤缺损大小约 2.0 cm×2.0 cm 的皮肤创面模型^[7]。

1.2.2 制备 PRF 从 PRF 组兔耳中央动脉取 8 ml 血液,立即注入离心管直接离心,以 3 000 r/min 离心 10 min,离心后试管内血液被分为 3 层,上层淡黄色澄清液为贫血小板血浆,中层淡黄色凝胶即为 PRF,下层深红色胶冻状物为红细胞碎片,去掉上清液及下层红细胞,试管中部淡黄色凝胶状即为 PRF^[8],提取 PRF,置于无菌纱布中挤压脱水,使之形成膜状备用(图 1A、B)。

1.2.3 分组、干预 将实验动物按随机数字表法分为空白对照组(4 只)、糖尿病模型组(4 只)、重组人表皮生长因子凝胶(rhEGF)组(4 只)、PRF 组(8 只)。各组动物均单笼喂养,换药时空白对照组及糖尿病模型组均用 1% 碘伏清创,再以无菌生理盐水冲洗创面并拭干。rhEGF 组单用 rhEGF 凝胶均匀涂抹创面(每 100 cm² 创面使用凝胶 10 g),PRF 组用 PRF 膜覆盖创面(图 1C)。

1.2.4 检测指标

1.2.4.1 溃疡面积 伤后即刻及 3、7 d,用玻璃纸覆盖溃疡面,用笔划出溃疡面边缘,沿边缘剪下玻璃纸,置分度值为 0.1 mg 的电子天平称重,并换算成面积。

1.2.4.2 溃疡容积 伤后即刻和药后 3、7 d,用 1 ml 无菌的注射器向溃疡腔内滴入灭菌生理盐水,至液面与皮肤边缘相平为止,记录滴入量,其为溃疡容积。

1.2.4.3 组织病理学检查 用药后 14、21 d,大体观察创面组织生长情况,再次用 1% 水合氯醛溶液腹腔注射麻醉。取创面及部分周围组织,置 10% 福尔马林溶液中固定,常规方法制作冰冻切片,冰冻切片烤干后进行染色,染色步骤如下:0.01 mmol/L PBS 冲洗 3~5 min,自来水冲洗数秒;苏木精染色



图 1 PRF 的制备与应用

A:制备 PRF;B:PRF 膜;C:PRF 膜覆盖创面

3~5 min, 自来水冲洗; 1% 盐酸乙醇分化 3~5 s; 于碱水中反蓝 20 s; 伊红染色 10~20 s, 自来水洗; 梯度脱水, 二甲苯透明后用中性树脂胶封片; 光镜下观察组织生长情况。

1.2.4.4 免疫组织化学检查 石蜡切片脱蜡、水化, 用柠檬酸盐缓冲液抗原修复 (pH 6.0) 微波炉大火 8 min, PBS 冲洗; 3% 过氧化氢酶 37 °C 孵育 20 min, PBS 冲洗; 切片滴加一抗单克隆抗体, 4 °C 冰箱过夜, PBS 液冲洗; 切片滴加二抗, 37 °C 温箱孵育 30 min; DAB 显色, 显微镜控制显色时间, 每张显色约 3 min, 自来水冲洗; 苏木精复染, 自来水冲洗返蓝, 50 °C 烤箱烤干后中性树脂封片固定。采用光学显微镜及 Image Plus Pro 6.0 图像分析系统测定血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 含量。VEGF 染色阳性呈不同程度的棕色。随机选择每张切片的 4 个高倍镜视野, 测量其各自的平均光密度, 并取其平均值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析。首先进行正态性检验, 符合正态分布计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多样本均数的比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大体情况 实验动物均进入结果分析, 实验动物均于麻醉后 1~2 h 苏醒, 开始活动, 自由进食饮水。实验期间动物活动好, 食欲可, 糖尿病动物饮水量及尿量明显增多, 体重下降。

2.2 创面面积及容积变化 相比于糖尿病模型组及空白对照组, rhEGF 组或 PRF 组治疗 3、7 d 后, 皮肤溃疡面积及容积减小 ($P < 0.05$), 且 7 d 时, PRF 组治疗的皮肤溃疡面积及容积均小于 rhEGF 组 ($P < 0.05$)。见表 1、2。

2.3 大体标本及组织病理学观察 各组在 2 周时创面面积都明显缩小, 其中 PRF 组及 rhEGF 组皮肤愈合良好, 大量肉芽组织形成, 表皮层结构基本恢复, 大量新生血管形成, 成纤维细胞形成聚集, 排列整齐。糖尿病模型组 2 周时表皮不连续, 肉芽组织较少, 成纤维细胞排列混乱, 部分变性, 新生血管较少。空白对照组 2 周时皮肤愈合良好, 表皮层结构基本恢复。见图 2。

2.4 免疫组化 VEGF 平均光密度值 在 2 周末及 3 周末, PRF 组和 rhEGF 组 VEGF 含量与糖尿病模型组及空白对照组相比, 差异均有统计学意义 ($P <$

表 1 伤后不同时间溃疡面积的变化 (cm^2 , $n = 16$, $\bar{x} \pm s$)

时间	空白对照组	糖尿病模型组	rhEGF 组	PRF 组	F 值	P 值
即刻	5.14±0.57	5.01±0.83	5.24±1.64	5.45±1.86	0.31	0.88
3 d	1.48±0.34	1.42±0.61	2.16±1.31*	2.43±0.59* #	6.29	0.01
7 d	1.05±0.38	1.04±0.38	1.51±0.96*	0.65±0.48* #△	6.16	0.01

与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与糖尿病模型组比较: # $P < 0.05$; 与 rhEGF 组比较: △ $P < 0.05$

表 2 伤后不同时间溃疡容积的变化 (ml, $n = 16$, $\bar{x} \pm s$)

时间	空白对照组	糖尿病模型组	rhEGF 组	PRF 组	F 值	P 值
即刻	0.63±1.15	0.61±1.05	0.63±1.15	0.64±1.13	0.70	0.56
3 d	0.31±0.83	0.31±0.98	0.29±0.75*	0.31±0.89* #	11.34	0.01
7 d	0.17±0.62	0.18±0.81	0.14±0.75*	0.15±0.68* #△	30.20	0.01

与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与糖尿病模型组比较: # $P < 0.05$; 与 rhEGF 组比较: △ $P < 0.05$

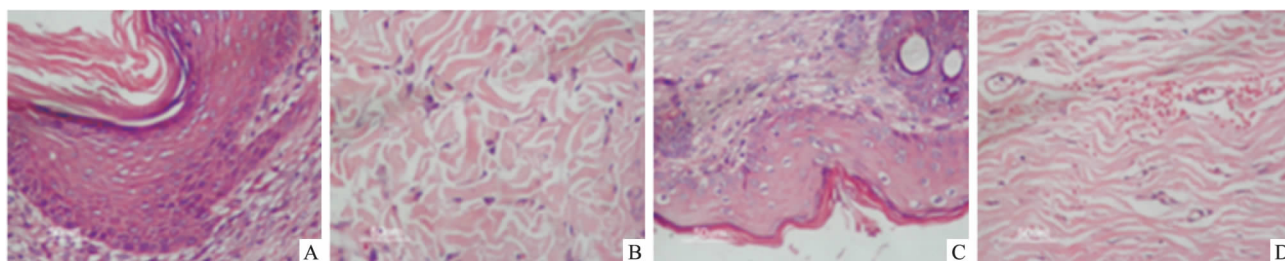


图 2 创面组织 HE×400

A: 空白对照组; B: 糖尿病模型组; C: rhEGF 组; D: PRF 组

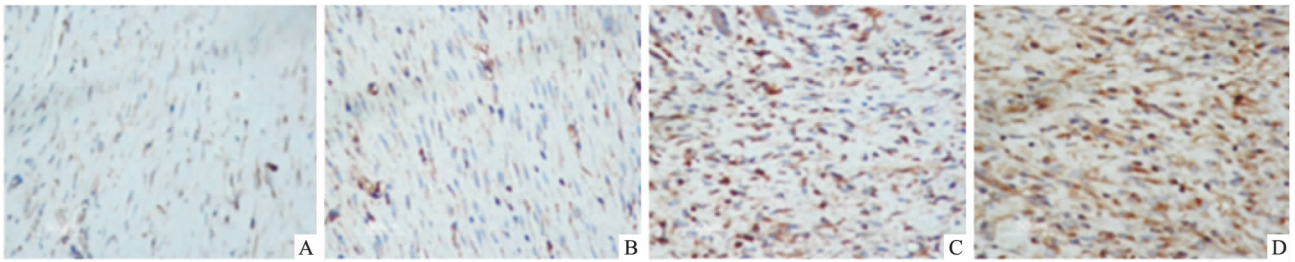


图3 VEGF免疫组化标记(棕色) DAB×400
A:空白对照组;B:糖尿病模型组;C:rhEGF组;D:PRF组

0.05)。2周时,rhEGF组与PRF组VEGF含量相近,3周时,PRF组VEGF含量高于rhEGF组($P < 0.05$)。见图3、表3。

表3 创面组织第2、3周末VEGF的平均光密度值($n=16, \bar{x} \pm s$)

组别	第2周末	第3周末
空白对照	0.47±0.09	0.70±0.12
糖尿病模型	0.40±0.04	0.65±0.08
rhEGF	0.60±0.07*	0.82±0.07*
PRF	0.64±0.05* #	0.92±0.16* #△

与空白对照组比较: * $P < 0.05$;与糖尿病模型组比较: # $P < 0.05$;与rhEGF组比较: △ $P < 0.05$

3 讨论

皮肤创面的愈合是一个相当复杂的生物学过程,是一种多因素和多环节共同作用的结果,是由炎症细胞、细胞外基质、修复细胞和细胞因子等多种因素共同参与的复杂机制^[9]。由于各种复杂因素的存在导致了组织正常愈合过程的中断,从而导致了慢性溃疡伤口的发展形成,并且伤口愈合后可能会有增生性瘢痕形成。糖尿病、外周血管性疾病、组织受压、血管炎症综合征、高龄以及创面的局部因素,如局部细菌繁殖、白细胞生长因子浓度过低、炎症细胞过度聚集、相关金属酶的缺乏等因素均可导致创面的延迟愈合和不愈合^[10]。

糖尿病慢性创面是临床常见的慢性难愈性创面。病程缠绵,经久不愈。随着对其创面愈合过程的深入研究,显示创面局部的生长因子缺乏和活性下降是造成创面不愈合的重要影响因素^[10]。因此,临床治疗中改善创面局部的微环境,提高局部生长因子浓度是治疗关键。

自体来源的PRF是第二代血小板浓缩物^[3],含有多种生长因子,如转化生长因子-β1、血小板衍生生长因子-AB、VEGF和基质糖蛋白(血小板反应素-1)以及多种免疫因子,如白介素-1β、白介素-6、肿瘤

坏死因子-α等^[11]。

PRF相比PRP具有以下优点:①PRF制备更容易,不需要添加任何辅助试剂,使用更安全,避免了过敏反应及免疫排斥反应的发生^[3];②具有纤维蛋白矩阵结构能吸附高浓度的血小板,能以更高浓度更长时间释放生长因子^[3]。而且,PRF能够抵抗内源性纤维蛋白酶的降解,其释放的生长因子时间长,关键生长因子的释放至少可以持续1周,作用持久^[12]。He et al^[13]通过动物实验认为PRF与PRP相比更能逐步释放生长因子,并且表达更强烈,对于组织的分化增殖作用更持久。同时,PRF中的纤维蛋白聚集形成疏松的立体网格状的支架结构,有利于血小板和白细胞的吸附和聚集,从而为生长因子的持续作用提供结构基础,并且具有减轻炎症反应和预防感染的功能^[14],为PRF在临床的应用提供了理论依据。

综上所述,PRF含有多种生长因子的协同作用以及其显微立体网格状的支架结构使其在难愈性创面治疗中的应用具有显著的优势。通过本次实验研究结果表明,PRF的使用可促进糖尿病创面肉芽组织的形成和再上皮化,明显缩短溃疡愈合时间,加快溃疡面积和容积缩小速度,显著促进了创面的愈合,为今后其在临床中的应用提供了实验依据。

参考文献

[1] Baltzis D, Eleftheriadou I, Veves A. Pathogenesis and treatment of impaired wound healing in diabetes mellitus: new insights [J]. Adv Ther, 2014, 31(8): 817-36.
 [2] Yotsu R R, Hagiwara S, Okochi H, et al. Case series of patients with chronic foot ulcers treated with autologous platelet-rich plasma [J]. J Dermatol, 2015, 42(3): 288-95.
 [3] Dohan D M, Choukroun J, Diss A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate, Part I: technological concepts and evolution [J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2006, 101(3): e37-44.
 [4] 龚正兴, 赵宇. 富血小板纤维蛋白辅助的面部自体颗粒脂肪

- 注射治疗[J].中国临床研究,2016,29(4):491-3.
- [5] O'Connell S M, Impeduglia T, Hessler K, et al. Autologous platelet-rich fibrin matrix as cell therapy in the healing of chronic lower-extremity ulcers[J]. *Wound Repair Regen*, 2008, 16(6): 749-56.
- [6] 孙 昱 杨海山 柳 林. 链脉佐菌素与四氧嘧啶诱导建立兔1型糖尿病模型比较[J]. *中国实验诊断学*, 2008, 12(4): 442-4.
- [7] 孙同柱 付小兵 陈 伟 等. 小型猪全皮缺损创面模型的制备与应用[J]. *中华实验外科杂志*, 2002, 19(2): 466-7.
- [8] Pripatnanont P, Nuntanarant T, Vongvacharanon S, et al. The primacy of platelet-rich fibrin on bone regeneration of various grafts in rabbit's calvarial defects[J]. *J Craniomaxillofac Surg*, 2013, 41(8): e191-200.
- [9] 陆树良. 烧伤创面愈合机制与新技术[M]. 北京: 人民军医出版社, 2003: 46.
- [10] Rappl L M. Effect of platelet rich plasma gel in a physiologically relevant platelet concentration on wounds in persons with spinal cord injury[J]. *Int Wound J*, 2011, 8(2): 187-95.
- [11] Dohan D M, Choukroun J, Diss A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates? [J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2006, 101(3): e51-5.
- [12] Lundquist R, Dziegiel M H, Agren M S. Bioactivity and stability of endogenous fibrogenic factors in platelet-rich fibrin [J]. *Wound Repair Regen*, 2008, 16(3): 356-63.
- [13] He L, Lin Y, Hu X, et al. A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts *in vitro* [J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2009, 108(5): 707-13.
- [14] 孙 洁, 张剑明, 李彦球. 富血小板纤维蛋白超微结构的观察与探讨[J]. *口腔医学研究*, 2010, 26(1): 98-100.

Experimental study of platelet-rich fibrin in the treatment of diabetic rabbit with skin ulcers

Wang Xinwei, Rong Jieli, Jiang Sijing, et al

(Dept of Plastic Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To observe the therapeutic effect of platelet rich fibrin (PRF) on the skin wound of a diabetic animal model. **Methods** 20 white rabbits were randomly divided into blank control group ($n=4$), diabetic model group ($n=4$), recombinant human epidermal growth factor gel (rhEGF) group ($n=4$), and PRF group ($n=8$). Diabetic model group, rhEGF group and PRF group were established into a diabetic animal model. The wounds of the four groups were respectively handled by 1% iodine wound debridement, 1% iodophor debridement, rhEGF application, and PRF application. The changes of the wound area and volume were observed in each group. The morphology of the wound was observed by HE staining. The vascular endothelial growth factor (VEGF) protein was detected by immunohistochemical staining, and the mean optical density (MOD) of VEGF was calculated. **Results** The wound area and volume reduction rate in rhEGF group and PRF group were higher than that in blank control group and diabetic model group at 3 and 7 days after intervention ($P<0.05$). At 2 and 3 weeks, through gross pathological observation, the wound surface of rhEGF group and PRF group were covered with a complete skin covering, the dermis was dense, the structure of the skin was (basically-not a very professional word, choose another like essentially) normal, and there was a large number of capillaries. The VEGF protein content of rhEGF group and PRF group in the tissue was determined by immunohistochemical examination and was significantly higher than those in the blank control group and diabetic model group ($P<0.05$). **Conclusion** PRF can significantly promote the healing of skin wounds in diabetic rabbits.

Key words PRF; platelet rich fibrin; diabetic ulcer; refractory ulcer