

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001956

AMD3100联合 G-CSF 对糖尿病小鼠
骨髓内皮祖细胞的动员作用

林晓莹, 汪 虹

(昆明医科大学第二附属医院烧伤科, 昆明 650101)

【摘要】目的:以糖尿病小鼠(db/db)为研究对象,比较单一使用 AMD3100 与 AMD3100 联合粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating, G-CSF)及两者不同使用顺序对骨髓内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)的动员效果,为临床获取糖尿病人 EPCs 进行细胞治疗提供思路。**方法:**采用 AMD3100、重组人粒细胞集落刺激因子注射液(recombinant human granulocyte colony-stimulating, rhG-CSF)参考国内外文献所述剂量和方法进行骨髓 EPCs 的动员。选用 5~6 周雄性小鼠,随机将 80 只 db/db 小鼠分为 A 组(AMD3100+NS 动员组),B 组(AMD3100+G-CSF 动员组),C 组(G-CSF+AMD3100 动员组)和 D 组(NS 空白对照组);80 只 db/+小鼠为相应对照组,分组对应为 A'组, B'组, C'组和 D'组。每组在动员后第 3、7、10、14 天 4 个时间点于心脏部位取外周血,流式细胞仪检测 CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺细胞的比例。结果取平均值用均值±标准差(单位%)表示,统计学方法处理后进行比较和分析。**结果:**①D 组和 D'组在动员后第 3、7、10、14 天 4 个时间点,CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺细胞比例无差异($P>0.05$),但 D'组中 CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺细胞比例高于 D 组($P=0.003$)。②A 组、B 组和 C 组 db/db 小鼠在动员后第 3、7、10、14 天 4 个时间点,CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺细胞比例逐渐上升,A 组至第 7 天达到峰值,随后逐渐下降;B 组和 C 组至第 10 天达到峰值,随后逐渐下降,且在达到峰值时 CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺细胞比例与其余 3 个时间点相比差异有意义($P=0.000$)。在第 10 天,B 组和 C 组 db/db 小鼠外周血中 CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺细胞比例较 A 组和 D 组高($P=0.000$),但 B 组和 C 组 db/db 小鼠外周血中 CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺细胞比例之间的差异无统计学意义($P>0.05$)。③A'组、B'组和 C'组 db/+小鼠在动员后第 3、7、10、14 天 4 个时间点,CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺细胞比例逐渐上升,至第 7 天达到高峰,随后逐渐下降,且在第 7 天 CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺细胞比例与其余 3 个时间点相比差异有意义($P=0.000$)。在达到峰值的第 7 天,C'组 CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺细胞比例较 A'组、B'组和 D'组高($P=0.000$)。**结论:**AMD3100 联合 G-CSF 动员骨髓 EPCs 的效果优于单一使用 AMD3100 的动员效果,在非糖尿病状态下,先使用 G-CSF 再联合 AMD3100 的动员作用更优,但在糖尿病状态下先使用 AMD3100 再联合 G-CSF 的动员作用更优。

【关键词】血管内皮祖细胞;AMD3100;粒细胞集落刺激因子;动员

【中图分类号】R587.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-09-01

Role of AMD3100 combined with granulocyte colony-stimulating factor in the mobilization of bone marrow endothelial progenitor cells in diabetic mice

Lin Xiaoying, Wang Hong

(Department of Burns, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the role of AMD3100 and granulocyte colony-stimulating (G-CSF) used alone or in different sequences in the mobilization of bone marrow endothelial progenitor cells (EPCs) in diabetic mice (db/db mice), and to provide thoughts for collecting EPCs from diabetic patients for clinical treatment. **Methods:** With reference to the dose and methods described in related articles in China and foreign countries, AMD3100 and recombinant human granulocyte colony-stimulating (rhG-CSF) injection were used for the mobilization of bone marrow EPCs. A total of 80 male db/db mice aged 5~6 weeks were randomly divided into group A

作者介绍: 林晓莹, Email: 416167718@qq.com,

研究方向: 创面修复。

通信作者: 汪 虹, Email: 1953602234@qq.com。

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金资助项目(编号: 81660321);

云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项资助项目[编号: 2017FE468(-177)]。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190107.1745.002.html>

(2019-01-09)

(AMD3100+NS mobilization group), group B (AMD3100+G-CSF mobilization group), group C (G-CSF+AMD3100 mobilization group), and group D (NS blank control group). A total of 80 db/+ male mice were selected as corresponding controls and were divided into groups A', B', C', and D'. Peripheral blood samples were collected from the heart on days 3, 7, 10, and 14 after mobilization, and flow cytometry was used to measure the proportion

of CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺ cells. The results were expressed as mean $\pm$ standard deviation(%), and comparison and analysis were performed after statistical analysis. **Results:** On days 3, 7, 10, and 14 after mobilization, there was no significant difference in the proportion of CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺ cells between groups D and D' ($P>0.05$), but group D' had a higher proportion than group D ($P=0.003$). In group A, the proportion of CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺ cells gradually increased and reached the highest value on day 7 and then gradually decreased; in groups B and C, the proportion of CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺ cells gradually increased and reached the highest value on day 10 and then gradually decreased; the proportion of CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺ cells at the peak was significantly higher than that at the other three time points ($P=0.000$). On day 10, groups B and C had a significantly higher proportion of CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺ cells in peripheral blood of db/db mice than groups A and D ($P=0.000$), but there was no significant difference between groups B and C ($P>0.05$). In groups A', B', and C' after mobilization, the proportion of CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺ cells gradually increased and reached the peak on day 7 and then gradually decreased; the proportion of CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺ cells on day 7 was significantly higher than that at the other three time points ($P=0.000$). On day 7, the C' group had a significantly higher proportion of CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺ cells than groups A', B', and D' ($P=0.000$). **Conclusion:** AMD3100 combined with G-CSF has a better effect in the mobilization of bone marrow EPCs than AMD3100 alone. In non-diabetic conditions, G-CSF followed by the addition of AMD3100 has a better mobilization effect, but in diabetic conditions, AMD3100 followed by the addition of G-CSF has a better mobilization effect.

【Key words】endothelial progenitor cell; AMD3100; granulocyte colony-stimulating factor; mobilization

糖尿病是一种以血糖升高伴随胰岛功能下降的复杂代谢性疾病。血管病变是糖尿病多种慢性并发症的病理基础。糖尿病患者机体长期处于高糖环境,发生氧化应激使内皮功能受损,氧化还原状态失去平衡,细胞数量减少和功能受损^[1],导致在该环境下所形成的创面难以愈合。血管新生是创面修复的核心步骤。创面生成新的血管主要由原本遗留的血管内皮细胞发生迁移、增殖而形成,且有多种细胞及由细胞产生的细胞因子共同参与。

血管内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是内皮细胞的前体细胞,也是血管新生的关键因素。研究证实 EPCs 移植能促进糖尿病小鼠缺血后肢的血管新生^[2]。Chen 等^[3]应用腺苷发现其可改善 EPCs 的功能,从而促进糖尿病缺血性溃疡的愈合。但高糖环境会对 EPCs 数量及迁移至目的组织的能力造成影响^[4]。因此,调节糖尿病患者 EPCs 数量和功能以及进行 EPCs 移植,成为糖尿病难愈性创面的治疗靶点^[5]。此外,EPCs 数量极少,仅占骨髓细胞的 1%和外周血单核细胞的 0.01%,故在应用前的分离培养及扩增尤为重要。本研究探究了在高糖环境下及非高糖环境下,单一使用 AMD3100 与 AMD3100 联合粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating, G-CSF)及两者使用顺序对骨髓内皮祖细胞的动员效果,并观察在动员后第 3、7、10、14 天 4 个不同时间点糖尿病小鼠和非糖尿病小鼠外周血 EPCs 数量的差异。通过优选动员方法和时

机,寻找一种能有效动员骨髓 EPCs 的方法,从而为自体骨髓 EPCs 治疗糖尿病并发慢性难愈合性创面提供一种新的研究思路和理论依据,并可避免骨髓穿刺,减少患者痛苦。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/KsJ(db/db)小鼠和 C57BL/KsJ(db/+)小鼠各 80 只,雄性,购自常州卡文斯实验动物有限公司,许可证号:SCXK(苏)2016-0010。在昆明泉港生物科技有限公司实验动物中心饲养。

1.2 主要试剂和器材

AMD3100(Selleck 公司),重组人粒细胞集落刺激因子(recombinant human granulocyte colony-stimulating, rhG-CSF)(齐鲁制药有限公司),氯化钠注射液(上海百特医疗用品有限公司),肝素钠注射液(江苏万邦生化医药股份有限公司),Ficoll Paque PLUS(GE Healthcare 公司),PE/Cy7 anti-mouse CD34(Biolegend 公司),APC anti-mouse CD133(Biolegend 公司),PE anti-mouse CD309 (Flk-1)(Biolegend 公司),FAC SCanto II 流式仪(BD 公司)。

1.3 实验动物的分组

选用 5~6 周龄的 db/db 小鼠和 db/+小鼠各 80 只,均为雄性。采用随机数字表的方法将 db/db 小鼠分为 A 组(AMD3100+NS 动员组),B 组(AMD3100+G-CSF 动员组),C 组(G-CSF+AMD3100 动员组)和 D 组(NS 空白对照组);db/+小鼠分为 A'组(AMD3100+NS 动员组),B'组(AMD3100+G-CSF 动员组),C'组(G-CSF+AMD3100 动员组)和 D'组(NS

空白对照组)。每组在动员后第 3、7、10、14 天 4 个时间点随机选择 5 只糖尿病小鼠,于心脏部位采集外周血并进行免疫荧光染色,通过流式细胞仪检测 CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺细胞在相同微升数血液样品中所占的比例。结果取平均值用均数 ± 标准差(单位%)表示,统计学方法处理后进行比较和分析。

1.4 AMD3100、G-CSF 的注射剂量及配制

AMD3100 和 G-CSF 动员血管内皮祖细胞的皮下注射剂量参照国内外文献:AMD3100 6 mg/(kg·d),G-CSF 100 mg/(kg·d)^[6-7]。AMD3100 注射液配制方法如下:将 AMD3100 原料用灭菌 PBS 缓冲液溶解,配制成浓度为 50 mg/mL 的溶液,溶液无须进一步调整 pH 即可达到较高的稳定性,配制完成后将溶液进一步过滤、除菌,密封后避光,并置于 4℃ 冰箱中贮存备用。而 G-CSF 注射液无须进一步配制,可直接进行皮下注射,避光、密封并置于 4℃ 冰箱中贮存备用。

1.5 db/db 小鼠和 db/+小鼠给药方法

db/db 小鼠给药方法:A 组(AMD3100+NS 动员组),每只 db/db 小鼠先单次皮下注射 AMD3100 1 d,后连续皮下注射生理盐水 5 d;B 组(AMD3100+G-CSF 动员组),每只 db/db 小鼠先单次皮下注射 AMD3100 1 d,后连续皮下注射 G-CSF 5 d;C 组(G-CSF+AMD3100 动员组),每只 db/db 小鼠先连续皮下注射 G-CSF 5 d,再单次注射 AMD3100 1 d;每只糖尿病小鼠先单次皮下注射 AMD3100 1 d,D 组(NS 空白对照组),每只糖尿病小鼠连续皮下注射生理盐水 6 d,作为空白对照。db/+小鼠为对照组动物进行动员,给药方法同 db/db 小鼠。每只小鼠皮下注射部位均为左下肢。

1.6 采血及流式细胞仪分析

1.6.1 小鼠单个核细胞(PBMC)的分离 ①采集小鼠心脏血 1 mL 于肝素抗凝管中,加入等体积的 HANK'S 缓冲液(或 PBS),混合均匀。②取 15 mL 离心管,加入 2 mL 分离液[分离过程保持在(20±2)℃]。③吸取血液样本加于分离液液面上,400~500 g,离心 20~30 min。④离心后管内可分为 4 层,由上至下分别为淡红黄色的稀释血浆层,第 2 层环状乳白色为单个核细胞(PBMC)层,无色透明为淋巴细胞分离液,最底层为红细胞。⑤收集 PBMC 至到新的 15 mL 离心管中,350 g,离心 10 min,用 6 mL PBS 漂洗 2 次,离心取沉淀。

1.6.2 CD34/CD133/Flk-1(CD309)检测 ①上述沉淀用 100 μL

Staining Buffer 重悬细胞,加入 Biolegend 荧光标记表面抗体(PE/Cy7 anti-mouse CD34/APC anti-mouse CD133/PE anti-mouse CD309)各 5 μL 染色,室温避光放置 20~30 min。②500 g 离心 5 min,弃上清。③加入 2 mL 预冷的 Staining Buffer,4℃,350 g,离心 6 min,弃上清并涡旋,重复步骤一次。④加入 350 μL 预冷的 Staining Buffer 即可用 BD 公司提供的 FAC-SCanto II 流式仪进行流式上机检测。

1.7 统计学分析

使用 SPSS17.0 统计软件处理所有的数据,计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间处理采用单因素方差分析和析因设计方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$,单因素方差分析及多重比较,对 P 值进行 Bonferroni 校正。

2 结果

2.1 实验动物基本情况

各组 db/db 小鼠和 db/+小鼠在动员药物皮下注射结束后,精神状况良好,饮食、体质量无明显变化,均无意外死亡情况出现。

2.2 不同时间点各组 db/db 小鼠和 db/+小鼠外周血 CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺细胞比例及变化趋势

应用流式细胞仪检测外周血中 CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺细胞的比例,经过析因方差分析,在 db/db 小鼠各组中,不同组别处理对外周血中 CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺细胞比例的变化有统计学意义($F=554.111, P=0.000$),不同时间点处理对外周血中 CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺细胞比例的变化有统计学意义($F=338.834, P=0.000$),组别和时间对外周血中 CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺细胞比例的变化存在交互作用($F=123.292, P=0.000$);而在 db/+小鼠各组中,不同组别处理对外周血中 CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺细胞比例的变化有统计学意义($F=347.908, P=0.000$),不同时间点处理对外周血中 CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺细胞比例的变化有统计学意义($F=260.952, P=0.000$),组别和时间对外周血中 CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺细胞比例的变化存在交互作用($F=36.380, P=0.000$)。因此,①D 组和 D' 组在动员后第 3、7、10、14 天 4 个时间点,CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺细胞比例无差异($P>0.05$)(表 1、表 2),但 D' 组中 CD34⁺/CD133⁺/Flk-

表 1 不同时间点各组 db/db 小鼠周血中 CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺ 细胞比例 ($n=5$)

时间	A 组	B 组	C 组	D 组	F 值	P 值
3 d	0.212 ± 0.015 ^c	0.672 ± 0.046 ^d	0.168 ± 0.018 ^a	0.069 ± 0.008	535.953	0.000
7 d	1.280 ± 0.117	1.110 ± 0.136 ^d	0.574 ± 0.091 ^c	0.071 ± 0.006	149.237	0.000
10 d	0.750 ± 0.039 ^{abc}	1.900 ± 0.023	1.850 ± 0.197	0.068 ± 0.005 ^{ab}	390.418	0.000
14 d	0.228 ± 0.026 ^c	0.812 ± 0.093 ^d	1.160 ± 0.175 ^c	0.069 ± 0.008	129.859	0.000
F 值	320.315	204.641	137.784	0.211		
P 值	0.000	0.000	0.000	0.888		

注:a:与动员后同一时间的 B 组比较, $P=0.000$;b:与动员后同一时间的 C 组比较, $P=0.000$;c:在 A 组内,动员第 7 天与其余 3 个时间点比较, $P=0.000$;d:在 B 组内,动员第 10 天与其余 3 个时间点比较, $P=0.000$;e:在 C 组内,动员第 10 天与其余 3 个时间点比较, $P=0.000$;单因素方差分析及多重比较,Bonferroni 校正

1⁺细胞比例高于 D 组($P=0.000$)。②A 组、B 组和 C 组 db/db 小鼠在动员后第 3、7、10、14 天 4 个时间点, CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺细胞比例逐渐上升, A 组至第 7 天达到峰值, 随后逐渐下降; B 组和 C 组至第 10 天达到峰值, 随后逐渐下降, 且在达到峰值时 CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺细胞比例与其余 3 个时间点相比差异有意义($P=0.000$)(图 1, 表 1)。在第 10 天, B 组和 C 组 db/db 小鼠外周血中 CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺细胞比例较 A 组和 D 组高($P=0.000$), 但 B 组和 C 组 db/db 小鼠外周血中 CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺细胞比例之间的差异无统计学意义($P>0.05$)(表 1)。③A' 组、B' 组和 C' 组 db/+ 小鼠在动员后第 3、7、10、14 天 4 个时间点, CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺细胞比例逐渐上升, 至第 7 天达到高峰, 随后逐渐下降, 且在第 7 天 CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺细胞比例与其余 3 个时间点相比差异有意义($P=0.000$)(图 1, 表 2)。在达到峰值的第 7 天, C' 组 CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺细胞比例较 A' 组、B' 组和 D' 组高($P=0.000$)(表 2)。④在第 7 天, B' 和 C' 组 CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺细胞比

例分别较 B 组和 C 组高($P=0.000$); 在第 10 天, B 组 CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺细胞比例高于 B' 组($P=0.000$), 而 C 组和 C' 组相比 CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺细胞比例的差异无统计学意义($P>0.05$)。

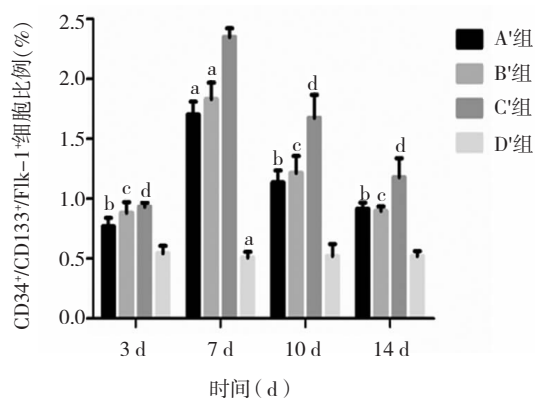
2.3 流式细胞仪检测各组 CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺细胞的点阵

在动员后第 3、7、10、14 天 4 个时间点, 对 db/db 小鼠和 db/+ 小鼠外周血中 CD34、CD133、Flk-1 (CD309) 比例通过流式细胞仪进行分析(图 2)。在动员后第 3、7、10、14 天, 分布于右上象限区域的 CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺细胞比例呈一定变化趋势: A 组 CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺细胞比例在动员后第 3、7、10、14 天逐渐上升, 至第 7 天达到高峰, 随后逐渐下降, B 组和 C 组 CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺细胞比例至第 10 天达到高峰, 随后逐渐下降; 而 A' 组、B' 组和 C' 组 CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺细胞比例在动员后第 3、7、10、14 天逐渐上升, 至第 7 天达到高峰, 随后逐渐下降; D 组和 D' 组 CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺细胞比例在动员后的 4 个时间点内基本没有变化。

表 2 不同时间点各组 db/+ 小鼠周血中 CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺ 细胞比例 ($n=5$)

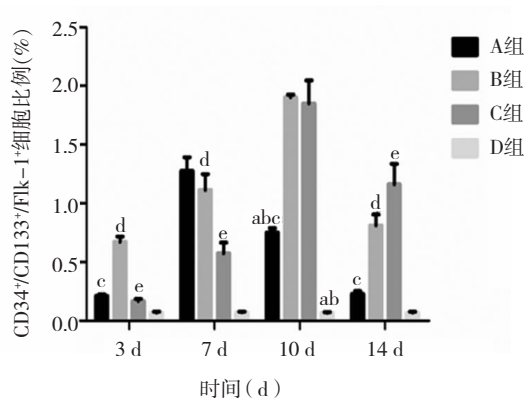
组别	A'组	B'组	C'组	D'组	F 值	P 值
3 d	0.770 ± 0.071 ^b	0.882 ± 0.089 ^c	0.934 ± 0.034 ^d	0.544 ± 0.064	33.146	0.000
7 d	1.700 ± 0.108 ^a	1.830 ± 0.139 ^a	2.350 ± 0.071 ^b	0.510 ± 0.047 ^a	316.739	0.000
10 d	1.140 ± 0.100 ^b	1.220 ± 0.142 ^c	1.680 ± 0.191 ^d	0.522 ± 0.100	58.623	0.000
14 d	0.918 ± 0.049 ^b	0.900 ± 0.037 ^c	1.180 ± 0.158 ^d	0.522 ± 0.041	48.184	0.000
F 值	115.156	81.062	115.530	0.223		
P 值	0.000	0.000	0.000	0.879		

注: a, 与动员后同一时间的 C' 组比较, $P=0.000$; b, 在 A' 组内, 动员第 7 天与其余 3 个时间点比较, $P=0.000$; c, 在 B' 组内, 动员第 7 天与其余 3 个时间点比较, $P=0.000$; d, 在 C' 组内, 动员第 7 天与其余 3 个时间点比较, $P=0.000$; 单因素方差分析及多重比较, Bonferroni 校正



A. db/+ 小鼠 CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺ 细胞比例的变化趋势

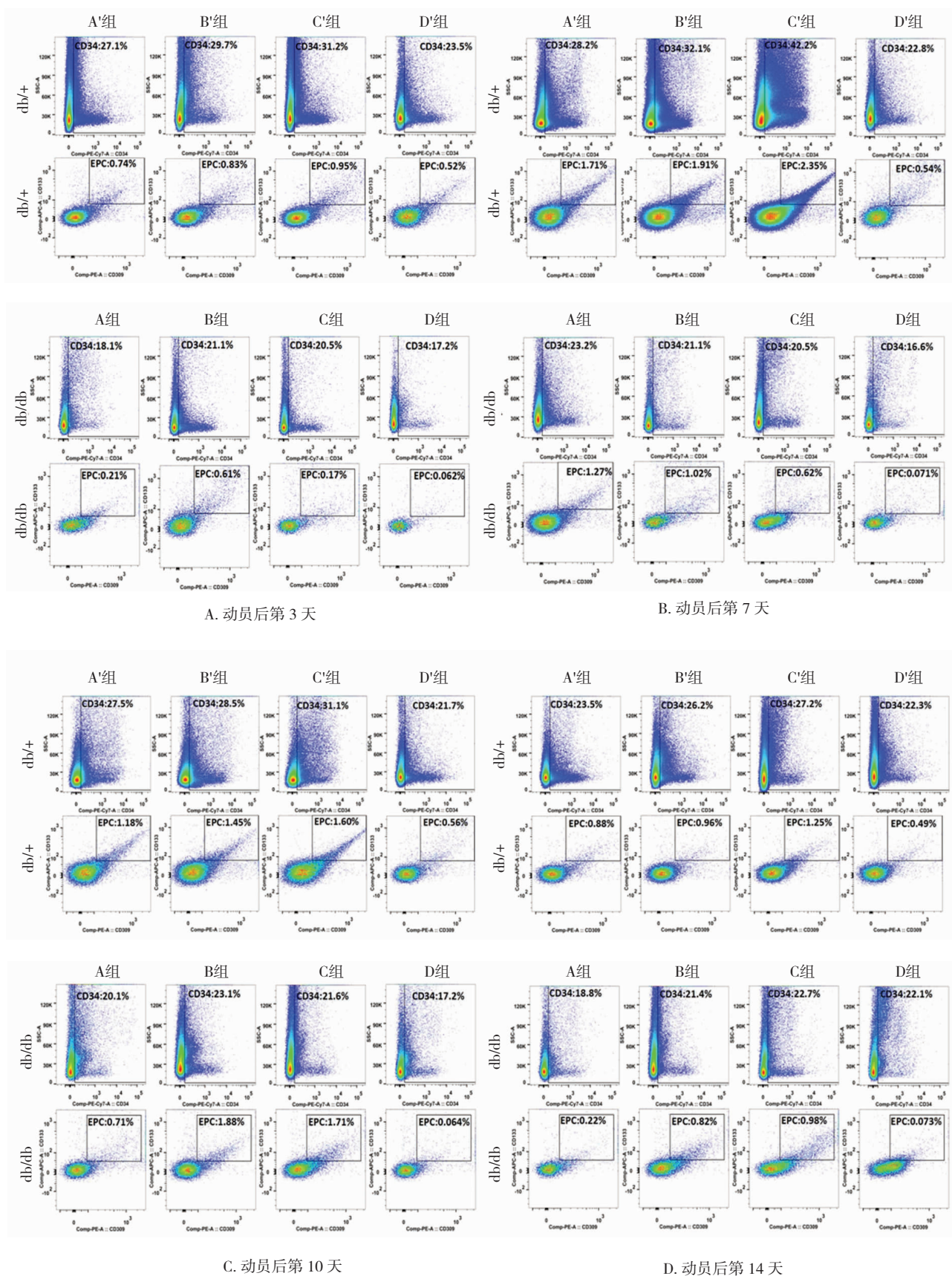
a: 与动员后同一时间的 C' 组比较 $P=0.000$; b: 在 A' 组内, 动员第 7 天与其余 3 个时间点比较 $P=0.000$; c: 在 B' 组内, 动员第 7 天与其余 3 个时间点比较 $P=0.000$; d: 在 C' 组内, 动员第 7 天与其余 3 个时间点



B. db/db 小鼠 CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺ 细胞比例的变化趋势

a: 与动员后同一时间的 B 组比较 $P=0.000$; b: 与动员后同一时间的 C 组比较 $P=0.000$; c: 在 A 组内, 动员第 7 天与其余 3 个时间点比较 $P=0.000$; d: 在 B 组内, 动员第 10 天与其余 3 个时间点比较 $P=0.000$; e: 在 C 组内, 动员第 10 天与其余 3 个时间点比较 $P=0.000$

图 1 各组 db/db 小鼠和 db/+ 小鼠在 3 d、7 d、10 d 和 14 d 4 个时间点外周血 CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺ 细胞比例的变化趋势

图 2 流式细胞仪检测各组外周血中 CD34⁺/CD133⁺/Flk-1⁺ 细胞的点阵图

3 讨论

EPCs 是一种可分化为内皮细胞的前体细胞,最早是被 Asahara 等首次用免疫磁珠法从循环外周血中发现。其主要来源于骨髓、脐血、胚胎肝和外周血。成年后主要来源于骨髓,它可替代损伤的血管内皮细胞,维持血管内皮的完整性^[8]。目前认为 EPCs 促进血管新生的机制包括两个方面:一方面是分化为成熟的内皮细胞并直接与新生血管结合;另一方面在特定刺激下,EPCs 被动员或释放到血液循环中,通过旁分泌调控,参与血管形成和内皮修复^[9-10]。

3.1 AMD3100、G-CSF 对 EPCs 的动员作用

动员是在细胞因子和趋化因子的作用下,介导造血干/祖细胞锚定于骨髓基质细胞的黏附分子被破坏,使造血干/祖细胞被释放到外周血。近来的研究表明,基质细胞衍生因子-1(stromal derived factor-1, SDF-1, 又称趋化因子 CXCL12)及其特异性受体 4 (CXCR4) 轴恰是该过程中的关键因素。AMD3100 是人工合成的 SDF-1 受体 CXCR4 的特异性拮抗剂,可与 CXCR4 紧密结合,竞争性抑制 CXCR4 与 SDF-1 的结合,阻断 SDF-1/CXCR4 轴介导的一系列信号转导。目前认为 AMD3100 对造血干/祖细胞的动员机制主要为两个方面:一方面降低 SDF-1 在骨髓中的表达水平,升高其在血浆中的表达水平^[11-12],且干/祖细胞的迁移具有 SDF-1 浓度依赖性的特点,即 CXCR-4⁺细胞具有向高浓度 SDF-1 趋化性移动的能力,而 CXCR4 在 EPCs 表面高表达^[13],因此 EPCs 向 SDF-1 浓度高的外周血移动;另一方面,AMD3100 在阻断 SDF-1/CXCR4 轴的信号传递后,使骨髓微环境的 SDF-1 对造血干/祖细胞失去了趋化性,造血干/祖细胞无法顺着 SDF-1 浓度梯度进行跨内皮细胞移行并迁移至骨髓龛,从而达到动员骨髓造血干/祖细胞进入外周血循环的效果。Perez 等^[14]证实提高血浆中 SDF-1 浓度可促进 CD34⁺造血干/祖细胞动员到外周血。Jujo 等^[15]研究表明,AMD3100 可增强 EPC 的动员,从而促进心肌梗死后的血管新生。在本次实验中,单纯应用 AMD3100 动员后,db/db 小鼠和 db/+ 小鼠外周血中 EPCs 比例均比未动员时增加,表明 AMD3100 确有动员作用且与文献中所述一致。

G-CSF 是一种由 174 个氨基酸残基组成的糖蛋白。rhG-CSF 是通过重组 DNA 技术制备而成的蛋白质,其分子结构与天然 G-CSF 几乎相同,主要区别在于 rhG-CSF 链的 N 端含有蛋氨酸,因此两者具有相近的功能和作用,临床上可用于在化疗期间中性粒细胞减少的患者及增加外周血中造血干/祖

细胞的数量^[16-17]。Herrmann 等^[18]研究证实 G-CSF 可使外周血中 CD34⁺细胞数量增加,且在连续注射 G-CSF 5 d 后的第 1 天,外周血中 CD34⁺细胞数量达到峰值^[19]。因此,G-CSF 对 EPCs 的动员作用是肯定的,主要是通过刺激骨髓中 EPCs 由静息期进入增殖期和影响 EPCs 所处的骨髓微环境,使其更易从骨髓迁至外周循环中。

值得注意的是 Fruehauf 等^[20]报道,在动员干细胞时应用 AMD3100+G-CSF 方案比单用 G-CSF 效果更好。在 Jantunen 等^[21]的研究中,AMD3100+G-CSF 动员方案的有效性和安全性都优于单独应用 G-CSF 动员方案。这与本次实验中所做的结果一致,AMD3100 联合 G-CSF 无论动员的顺序在 db/db 小鼠和 db/+ 小鼠外周血中 EPCs 数量均高于单一应用动员剂组。但针对 db/db 小鼠和 db/+ 小鼠骨髓 EPCs 动员的最佳方案和时机是不同的。本次实验的结果提示:对于 db/+ 小鼠采用 G-CSF+AMD3100 方案在第 7 天时,外周血中 EPCs 数量达到峰值;而 db/db 小鼠采用 AMD3100+G-CSF 方案在第 10 天时,外周血中 EPCs 数量达到峰值。

3.2 在糖尿病状态下 AMD3100 联合 G-CSF 动员 EPCs 的有效性

成人体内 EPCs 大多分布于骨髓,而外周循环中的含量较少,当机体受到外源性或内源性因素刺激时,EPCs 会从骨髓中动员至外周血。正常情况下,给予外源性药物 AMD3100 或 G-CSF 均能提高外周循环中血管内皮祖细胞的含量。然而,在糖尿病状态下,不仅外周血中 EPCs 数量减少、功能受损^[22],而且给予单一刺激因素,尤其是 G-CSF 很难发挥其对骨髓 EPCs 动员的作用。因此寻找一种能有效动员糖尿病状态下骨髓 EPCs 的方法,是未来自体移植 EPCs 治疗糖尿病所致慢性难愈性创面及相关血管病变的关键。

糖尿病状态下,单一应用 G-CSF 很难有效动员骨髓 EPCs 至外周循环。研究认为,相较于 AMD3100 直接干扰 SDF-1/CXCR4 轴,从而允许 EPCs 从骨髓释放到外周血中而言,G-CSF 的动员作用是间接的,涉及交感神经,调节产生 CXCL12 的细胞(巨噬细胞、基质细胞、成骨细胞)及 CXCL12 裂解酶 CD26/DPP-4^[23-24]。而高糖环境可破坏骨髓微环境,导致交感神经病变、造血干细胞数量失衡、CXCL12 裂解酶 CD26/DPP-4 的适应性调节等^[25-26],因此,在糖尿病患者中,G-CSF 的动员作用减弱,这样的功能障碍被称为“糖尿病干细胞运动病”^[27]。此外,Fadini 等^[28]的研究也发现糖尿病限制了 G-CSF 对 EPCs 的动员作用,而不限 AMD3100 的作用。本次实验发现,在达到峰值之前 AMD3100+G-CSF 动员方案优于

G-CSF+AMD3100 方案;在第 10 天经 2 种方案均达到峰值时,AMD3100+G-CSF 方案略优于 G-CSF+AMD3100 方案,但无统计学意义。本课题组推测可能是因为:高糖环境主要影响的是 SDF-1/CXCR4 轴的下游,对于 G-CSF+AMD3100 方案而言,在未使用 AMD3100 时均比 AMD3100+NS 方案和 AMD3100+G-CSF 方案动员效果差;而在连续应用 G-CSF 动员 5 d 后加用 AMD3100 动员则显著改善该方案的动员效果。而在 AMD3100+G-CSF 方案中,AMD3100 除直接干扰 SDF-1/CXCR4 轴反应以增加游离 SDF-1 的含量外,可能间接改善了机体对 G-CSF 的反应性,而使 G-CSF 可发挥动员作用。

3.3 动员对创面修复的影响

创面修复的过程涉及多种细胞的相互配合。近年来,激活“内源性”干细胞的优势较移植“外源性”干细胞日益凸显。G-CSF 已被国际上批准用于干细胞动员的标准方案^[29],临床应用安全有效。研究发现 G-CSF 动员外周血 CD34⁺细胞治疗不愈合的糖尿病足溃疡是有效的,且经移植 CD34⁺细胞治疗的患者其创面具有较高的血管生成潜能^[30]。G-CSF 还可动员造血干细胞和间充质干细胞等的骨髓来源细胞,经动员后骨髓来源细胞大量积聚于创面并促进创面愈合^[31]。成纤维细胞是创面愈合过程中重要的间质细胞^[32],骨髓来源细胞可影响成纤维细胞的增殖迁移从而促进创面愈合^[33]。之前的研究发现成纤维细胞在脱离糖尿病高糖环境后,其增殖活性得以改善且在局部移植成纤维细胞于糖尿病小鼠皮肤全层缺损创面可加快创面愈合进展^[34]。因此推测在脱离高糖环境后,EPCs 的生物学活性可能改善,但需进一步验证。此外,AMD3100 的单一局部应用促进了糖尿病小鼠的伤口愈合,这与将干细胞募集于创面、纤维母细胞和单核细胞/巨噬细胞的活性增加有关^[35]。由此可见,在动员后,除 EPCs 主要参与创面血管新生外,其余骨髓来源细胞也可促进创面愈合,但众多干/祖细胞之间的相互作用还需进一步探究。

包括 EPCs 在内的骨髓来源细胞经动员后,对创面修复的促进作用是肯定的,而其中所涉及的分子信号通路仍在探究中。基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinases-9,MMP-9)为骨髓 EPCs 动员的关键调节因子。本次实验使用 G-CSF 及 AMD3100 作为将 EPCs 从骨髓动员至外周血的动员剂。G-CSF 可依赖磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt)通路,激活内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase,eNOS)促使 L-精氨酸产生释放一氧化氮(nitric oxide,NO),骨髓 NO 浓度增加可激活 MMP-9,活化的 MMP-9 可裂解基质膜结合配体 Kit(membrane bound ligand Kit,mKitL)释放出可溶性

配体(soluble ligand Kit,S-kitL),从而促使 EPCs 释放进入外周循环中^[36]。当 NO 浓度过低或 PI3K/Akt/eNOS 通路受到抑制时,骨髓 EPCs 的动员明显降低,而上调 eNOS 表达或增加 NO 的生成均可提高 EPCs 的动员^[36]。AMD3100 使游离 SDF-1 的含量增加,也可激活骨髓基质细胞上表达 MMP-9^[37],进而通过上述途径实现 EPCs 的动员。另外,Notch 是与血管生成、内皮细胞迁移相关的信号通路^[38]。在糖尿病小鼠模型中,Notch-1 及其靶基因 Hes-1、Hes-5 的表达增加,导致循环 EPCs 数量减少及 EPCs 的迁移、分化能力降低,血管新生作用被抑制^[39]。Liu 等^[40]发现 Notch 持续被激活抑制了成纤维细胞生长因子诱导的血管新生。Notch 激活后,最早促使 CXCR4 的表达,从而调节血管新生,但当功能性动-静脉血流模式建立后,Notch 信号通路会减少 CXCR4 的表达量,以防止血管过度生长^[41]。因此,本课题组推测在糖尿病状态下,AMD3100 联合 G-CSF 动员骨髓 EPCs 可能的机制:一方面通过增加游离 SDF-1 的含量,从而加强 G-CSF 对 PI3K/Akt 信号通路的激活作用;另一方面 Notch 信号通过调节 CXCR4 的表达决定 EPCs 的动员与归巢,但需进一步实验验证。

综上所述,本次实验证实了在糖尿病状态和非糖尿病状态,AMD3100 与 G-CSF 联合动员均优于单一应用 AMD3100,也明确了在这 2 种状态下动员小鼠骨髓 EPCs 的最佳方案及时机。这将为改善“糖尿病干细胞运动病”提供思路,但 AMD3100 与 G-CSF 之间的相互作用及相关的信号机制仍需进一步探究,以期临床糖尿病患者提供安全精准有效的动员方案,从而改善自体 EPCs,以促进糖尿病所致慢性难愈性创面的愈合。

参 考 文 献

- [1] 吉宗珊,刘思颖,权 威,等. 内皮祖细胞分离培养及应用技术新进展[J]. 现代生物医学进展,2016,16(8):1567-1572.
- [2] Shen WC,Liang CJ,Wu VC,et al. Endothelial progenitor cells derived from Wharton's jelly of the umbilical cord reduces ischemia-induced hind limb injury in diabetic mice by inducing HIF-1 α /IL-8 expression[J]. Stem Cells Dev,2013,22(9):1408-1418.
- [3] Chen W,Wu Y,Li L,et al. Adenosine accelerates the healing of diabetic ischemic ulcers by improving autophagy of endothelial progenitor cells grown on a biomaterial[J]. Sci Rep,2015,5:11594.
- [4] Sukmawati D,Fujimura S,Jitsukawa S,et al. Oxidative stress tolerance of early stage diabetic endothelial progenitor cell[J]. Regen Ther,2015,1:38-44.
- [5] 高彩艳,买超平,哈小琴. 内皮祖细胞修复糖尿病患者血管并发症:可成为新治疗策略吗[J]. 中国组织工程研究,2014,18(32):5214-5219.
- [6] Yttikhilde N,Masaaki I,Gangjian Q,et al. CXCR4 antagonist AMD3100 accelerates impaired wound healing in diabetic mice[J]. J

- Invest Dermatol, 2012, 132(3 Pt 1): 711–720.
- [7] 刘峰, 刘志达, 武楠, 等. 粒细胞集落刺激因子动员对大鼠内皮祖细胞体外扩增的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(51): 10033–10036.
- [8] Ma XL, Sun XL, Wan CY, et al. Significance of circulating endothelial progenitor cells in patients with fracture healing process[J]. J Orthop Res, 2012, 30(11): 1860–1866.
- [9] Berezin AE, Kremzer AA, Berezina TA, et al. Data regarding association between serum osteoprotegerin level, numerous of circulating endothelial-derived and mononuclear-derived progenitor cells in patients with metabolic syndrome[J]. Data In Brief, 2016, 8: 717–722.
- [10] Berezin AE, Kremzer AA. Circulating endothelial progenitor cells as markers for severity of ischemic chronic heart failure[J]. J Card Fail, 2014, 20(6): 438–447.
- [11] Im JY, Min WK, Park MH, et al. AMD3100 improves ovariectomy-induced osteoporosis in mice by facilitating mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells[J]. BMB Rep, 2014, 47(8): 439–444.
- [12] Dar A, Schajnovitz A, Lapid K, et al. Rapid mobilization of hematopoietic progenitors by AMD3100 and catecholamines is mediated by CXCR4-dependent SDF-1 release from bone marrow stromal cells[J]. Leukemia, 2011, 25(8): 1286–1296.
- [13] Otsuka S, Bebb G. The CXCR4/SDF-1 chemokine receptor axis: a new target therapeutic for non-small cell lung cancer[J]. J Thor Oncol, 2008, 3(12): 1379–1383.
- [14] Perez LE, Alpdogan O, Shieh JH, et al. Increased plasma levels of stromal-derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) enhance human thrombopoiesis and mobilize human colony-forming cells (CFC) in NOD/SCID mice[J]. Exp Hematol, 2004, 32(3): 300–307.
- [15] Jujo K, Hamada H, Iwakura A, et al. CXCR4 blockade augments bone marrow progenitor cell recruitment to the neovasculature and reduces mortality after myocardial infarction[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(24): 11008–11013.
- [16] Mehta HM, Malandra M, Corey SJ. G-CSF and GM-CSF in neutropenia[J]. J Immunol, 2015, 195(4): 1341–1349.
- [17] Hsu YM, Cushing MM. Autologous stem cell mobilization and collection[J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2016, 30(3): 573–589.
- [18] Herrmann M, Zeiter S, Eberli U, et al. Five days granulocyte colony-stimulating factor treatment increases bone formation and reduces gap size of a rat segmental bone defect: a pilot study[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2018, 6: 5.
- [19] Deng MW, Wei SJ, Yew TL, et al. Cell therapy with G-CSF-mobilized stem cells in a rat osteoarthritis model[J]. Cell Transplant, 2015, 24(6): 1085–1096.
- [20] Fruehauf S, Seeger T, Maier P, et al. The CXCR4 antagonist AMD3100 releases a subset of G-CSF-primed peripheral blood progenitor cells with specific gene expression characteristics[J]. Exp Hematol, 2006, 34(8): 1052–1059.
- [21] Jantunen E. Novel strategies for blood stem cell mobilization: special focus on plerixafor[J]. Expert Opin Biol Ther, 2011, 11(9): 1241–1248.
- [22] Fadini GP, Avogaro A. Potential manipulation of endothelial progenitor cells in diabetes and its complications[J]. Diabetes Obes Metab, 2010, 12(7): 570–583.
- [23] Winkler IG, Pettit AR, Raggatt LJ, et al. Hematopoietic stem cell mobilizing agents G-CSF, cyclophosphamide or AMD3100 have distinct mechanisms of action on bone marrow HSC niches and bone formation[J]. Leukemia, 2012, 26(7): 1594–1601.
- [24] Broxmeyer HE, Hoggatt J, O'Leary HA, et al. Dipeptidylpeptidase 4 negatively regulates colony-stimulating factor activity and stress hematopoiesis[J]. Nat Med, 2012, 18(12): 1786–1796.
- [25] Albiero M, Poncina N, Tjwa M, et al. Diabetes causes bone marrow autonomic neuropathy and impairs stem cell mobilization via dysregulated p66Shc and Sirt1[J]. Diabetes, 2014, 63(4): 1353–1365.
- [26] Spinetti G, Cordella D, Fortunato O, et al. Global remodeling of the vascular stem cell niche in bone marrow of diabetic patients: implication of the microRNA-155/FOXO3a signaling pathway[J]. Circ Res, 2013, 112(3): 510–522.
- [27] DiPersio JF. Diabetic stem-cell “mobilopathy”[J]. N Engl J Med, 2011, 365(26): 2536–2538.
- [28] Fadini GP, Fiala M, Cappellari R, et al. Diabetes limits stem cell mobilization following G-CSF but not plerixafor[J]. Diabetes, 2015, 64(8): 2969–2977.
- [29] Bendall LJ, Bradstock KF. G-CSF: from granulopoietic stimulant to bone marrow stem cell mobilizing agent [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2014, 25(4): 355–367.
- [30] Tanaka R, Masuda H, Kato S, et al. Autologous G-CSF-mobilized peripheral blood CD34+ cell therapy for diabetic patients with chronic nonhealing ulcer[J]. Cell Transplant, 2014, 23(2): 167–179.
- [31] 王钰, 龙爽, 谭力, 等. 粒细胞集落刺激因子激活 β -catenin 促进创面修复[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(16): 1648–1651.
- [32] Zou SB, Yoon WY, Han SK, et al. Cytotoxicity of silver dressings on diabetic fibroblasts[J]. Int Wound J, 2013, 10(3): 306–312.
- [33] Dulchavsky D, Gao X, Liu YB, et al. Bone marrow-derived stromal cells (BMSCs) interact with fibroblasts in accelerating wound healing[J]. J Invest Surg, 2008, 21(5): 270–279.
- [34] 彭颖, 赵阳, 解英, 等. 异体皮肤成纤维细胞在糖尿病小鼠创面愈合中的作用及其机制[J]. 中华烧伤杂志, 2018, 34(8): 532–541.
- [35] Lin Q, Wesson RN, Maeda H, et al. Pharmacological mobilization of endogenous stem cells significantly promotes skin regeneration after full thickness excision: the synergistic activity of AMD3100 and tacrolimus[J]. J Invest Dermatol, 2014, 134(9): 2458–2468.
- [36] 张培岩, 陈丁丁. 内皮祖细胞的迁移及对血管修复作用的研究进展[J]. 海峡药学, 2017, 29(3): 10–15.
- [37] Newey SE, Tsaknakis G, Khoo CP, et al. The hematopoietic chemokine CXCL12 promotes integration of human endothelial colony forming cell-derived cells into immature vessel networks[J]. Stem Cells Dev, 2014, 23(22): 2730–2743.
- [38] Tanaka R, Masuda H, Fujimura S, et al. Quality-quantity control culture enhances vasculogenesis and wound healing efficacy of human diabetic peripheral blood CD34+ cells[J]. Stem Cells Transl Med, 2018, 7(5): 428–438.
- [39] Sukmawati D, Tanaka R, Ito-Hirano R, et al. The role of Notch signaling in diabetic endothelial progenitor cells dysfunction[J]. J Diabetes Complications, 2016, 30(1): 12–20.
- [40] Liu J, Deutsch U, Jeong J, et al. Constitutive notch signaling in adult transgenic mice inhibits bFGF-induced angiogenesis and blocks ovarian follicle development[J]. Genesis, 2014, 52(9): 809–816.
- [41] Hasan SS, Tsaryk R, Lange M, et al. Endothelial Notch signalling limits angiogenesis via control of artery formation[J]. Nat Cell Biol, 2017, 19(8): 928–940.