

普罗布考对糖尿病小鼠脂肪间充质干细胞功能的影响

王哲¹, 刘晓玉², 张殿宝², 王秋实¹

(1. 中国医科大学盛京医院输血科, 辽宁省沈阳市 110004;

2. 细胞生物学卫生部重点实验室 干细胞与再生医学研究室, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 普罗布考; 脂肪间充质干细胞; 细胞增殖; 细胞迁移; 活性氧

[摘要] **目的** 探讨普罗布考对糖尿病鼠脂肪来源的间充质干细胞(ADSC)功能的影响。**方法** 体外分离培养 ADSC, 应用流式细胞术对 3~5 代细胞表面抗原 CD34、CD45、CD90、CD105 进行表型鉴定。将 ADSC 分为: ①正常 ADSC 对照组; ②正常 ADSC + 普罗布考组; ③糖尿病 ADSC 对照组; ④糖尿病 ADSC + 普罗布考组; ⑤正常 ADSC + 高糖(30 mmol/L)组; ⑥正常 ADSC + 高糖 + 普罗布考组。应用 WST 法和 Transwell 迁移实验检测各组细胞增殖和迁移情况。应用 ELISA 和实时定量 PCR 检测各组细胞分泌血管内皮生长因子(VEGF)、肝细胞生长因子(HGF)、胰岛素样生长因子 1(IGF-1)蛋白和 mRNA 表达水平。应用二氯醋酸荧光素探针检测各组细胞活性氧(ROS)含量。**结果** ADSC 表达 CD90 和 CD105, 不表达 CD34 和 CD45; 与正常 ADSC 对照组相比, 糖尿病 ADSC 增殖能力和迁移能力下降, VEGF、HGF、IGF-1 蛋白和 mRNA 表达水平降低。与糖尿病 ADSC 对照组相比, 糖尿病 ADSC + 普罗布考组增殖能力和迁移能力增加, VEGF、HGF、IGF-1 蛋白和 mRNA 表达水平上升。**结论** 糖尿病能损伤 ADSC 的生物学特性。普罗布考对糖尿病鼠 ADSC 增殖、迁移和分泌能力具有保护作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Probucol on Function of Diabetic Mice Adipose Tissue-derived Stem Cell

WANG Zhe¹, LIU Xiao-Yu², ZHANG Dian-Bao², and WANG Qiu-Shi¹

(1. Department of Blood Transfusion, Affiliated Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang, Liaoning 110004, China; 2. Department of Stem Cells and Reproductive Medicine, Key Laboratory of Cell Biology, Shenyang, Liaoning 110001, China)

[KEY WORDS] Probucol; Adipose Tissue-derived Stem Cell; Cell Proliferation; Cell Migration; Reactive Oxygen Species

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of probucol on function of diabetic mice adipose tissue-derived stem cells (ADSC). **Methods** ADSC were isolated by mechanical separation and enzymatic digestion from nondiabetic and diabetic mice. The expression profiles of CD34, CD45, CD90 and CD105 were examined by flow cytometry. The ADSC were divided into 6 groups: control normal group, probucol normal group, control diabetic group, probucol diabetic group, high glucose normal group and probucol high glucose normal group. The proliferation and migration of ADSC was determined by WST-8 assay and transwell assay respectively. In addition, the mRNA and protein expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), hepatocyte growth factor (HGF), and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) were determined by real-time PCR and ELISA analysis. The content of reactivated oxygen species (ROS) was also measured. **Results** The morphological feature of ADSC displayed fibroblast-like phenotype. The cells were positive for stem cells markers, including CD90 and CD105, and negative for CD34 and CD45, as shown by flow cytometry. Diabetic ADSC showed decreased proliferative potential and migration. In addition, the mRNA expression of VEGF, HGF and IGF-1 in diabetic control group was obviously lower than that in nondiabetic control group. The contents of VEGF, HGF and IGF-1 on ADSC -conditioned medium in diabetic control group was also obviously lower than that in nondiabetic control group. Probucol promoted proliferation and migration of diabetic ADSC, and increase the mRNA expression of VEGF, HGF and IGF-1 in diabetic ADSC. In addition, Probucol could increase contents of VEGF, HGF and IGF-1 in ADSC -conditioned me-

[收稿日期] 2014-02-13

[基金项目] 辽宁省科技厅项目(2011225020); 辽宁省科技厅项目(2012225014); 沈阳市科技局项目(F11-262-9-52)

[作者简介] 王哲, 博士, 讲师, 研究方向为干细胞与再生医学, E-mail 为 wz_cmu@126.com。通讯作者王秋实, 博士, 副教授, 研究方向为现代细胞治疗技术, E-mail 为 wangqs18@126.com。

dium in diabetic mice. **Conclusion** Our data indicate that diabetes alters ADSC intrinsic properties and impairs their function. Probuco can protect diabetic ADSC function of proliferation and migration, as well as releasing growth factors.

糖尿病足部溃疡(diabetic foot ulcers, DFU)在糖尿病患者中的发病概率高达25%,这些患者之中有14%~24%的人群最终需要接受截肢治疗^[1,2]。治疗DFU一直是个困扰全世界医学工作者的难题。长期高血糖损伤了角质形成细胞、成纤维细胞、内皮细胞、噬细胞及血小板,而间充质干细胞的功能损伤也是导致DFU难以愈合的重要因素之一。国内外治疗DFU的传统疗法效果不佳,虽然创面愈合技术在不断发展,但是仍有近50%的患者未能治愈。脂肪间充质干细胞(stem cells derived from adipose tissue, ADSC)是一种来源于脂肪组织的间充质干细胞,动物和临床试验均已经证实ADSC对DFU明显的促进作用^[3]。ADSC一方面通过自身的增殖、迁移和分化来修复创面;另一方面通过分泌多种生长因子,如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、胰岛素样生长因子1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)等来调节创面周围细胞功能^[4,5]。尽管自体ADSC治疗皮肤溃疡取得了很好的效果,但是一些研究中仍然发现由于ADSC功能损伤导致DFU患者愈合不良^[6]。抗氧化剂可以改善糖尿病患者氧化应激指标,提示可以将抗氧化剂用于间充质干细胞移植。降脂药普罗布考作为一种抗氧化剂,由于其具有保护血管内皮细胞作用目前已成为糖尿病患者的常用药物。本研究体外分离培养糖尿病小鼠ADSC并应用抗氧化剂普罗布考进行干预,通过对干细胞增殖和迁移能力及多种生长因子的检测,探讨普罗布考对糖尿病对小鼠ADSC生物学功能的影响,为临床上提高自体干细胞移植治疗DFU后供体干细胞的功能提供新的依据。

1 材料和方法

1.1 主要材料

链脲佐菌素(STZ,美国Sigma公司),血糖试剂盒(四川迈克科技股份有限责任公司),普罗布考原料药(山东齐鲁药业有限公司),胎牛血清(Gibco公司),荧光标记的抗CD34、CD45、CD90、CD105抗体(Biolegend公司),葡萄糖和二氯醋酸荧光素(Sigma公司),人纤维连接蛋白(Roche公司),甲基纤维素(Amresco 0458公司),DMEM培养液、胰

蛋白酶(Gibco公司),WST细胞生长检测试剂盒(日本株氏会社同仁化学研究所),生长因子检测试剂盒(R&D公司)。

1.2 实验动物

昆明种小鼠,SPF级,雌雄各半,体重 20 ± 2 g,由中国医科大学实验动物中心提供。实验期间动物自由摄食、饮水。动物饲养于符合医学实验动物环境设施要求的饲养环境中。

1.3 糖尿病小鼠模型

造模前禁食12 h,一次性腹腔注射链脲佐菌素150 mg/kg。3天后眼内眦采血测空腹血糖(FBG)水平,选取 $FBG \geq 11.1$ mmol/L的小鼠作为糖尿病模型。

1.4 小鼠ADSC分离与鉴定

无菌条件下取腹腔脂肪组织并置于平皿中,PBS洗3次后剪碎,加入2倍体积胶原蛋白I,37℃消化60 min,终止消化后于细胞筛上过滤,1500 r/min离心5 min收集细胞后以 2×10^8 个/L的浓度接种于培养瓶中,置于37℃,5%CO₂的饱和湿度培养箱中培养,记为P₀。根据细胞贴壁情况,1~2天全量换液1次,具体方法参照文献^[7,8]。待细胞增殖达80%~90%时,按1:3的比例传代记为P1。取第3代细胞,胰酶消化后计数,以 5×10^4 个/孔接种于96孔板,每孔加入10 μL CCK-8溶液,37℃,饱和湿度,体积分数为5%CO₂培养箱孵育2 h后,用酶联免疫检测仪于450 nm波长下检测吸光度值。然后在检测第1、2、3、4、5、6、7天同一时间作相同检测。根据吸光度值绘制细胞增殖曲线。应用荧光标记的抗CD34、CD45、CD90、CD105抗体,进行流式细胞仪检测。

1.5 实验分组

将无血清培养基同步化培养24 h的ADSC分为6组,分别为:①正常ADSC对照组;②正常ADSC+普罗布考组;③糖尿病ADSC对照组;④糖尿病ADSC+普罗布考组;⑤正常ADSC+高糖(30 mmol/L)组;⑥正常ADSC+高糖+普罗布考组。实验组使用含50 μmol/L^[9,10]的普罗布考的培养基诱导ADSC,对照组培养基中不含普罗布考,诱导后分别在24 h和36 h时间点对各组细胞进行检测。

1.6 增殖能力检测(WST法)

实验终止前2 h向各组细胞每孔中加入CCK-8试剂20 μL,培养结束时以酶标仪检测吸光度(A₄₅₀)

值)。

1.7 迁移能力检测

将 25 μL 含普罗布考 (50 mmol/L) 的培养液加入改良的 Boyden Chamber 的下室, 盖上滤膜和趋化小室的上室; 将含 2×10^4 个 ADSC 的 50 μL 培养液注入上室, 盖以载玻片; 放入培养箱中培养 24 h; 刮去滤膜上面的未移动细胞, 用 4% 多聚甲醛固定滤膜, Giemsa 染色, 蒸馏水冲洗, 干后镜检, 随机选择 3 个显微镜视野 ($\times 400$) 计数迁移到低层的细胞数。

1.8 ELISA 测定

采用 ELISA 测定各组细胞诱导 24 h 后, 培养上清液中蛋白含量。严格按照试剂说明书进行操作, 酶标仪测定 450 nm 处的吸光度, 根据标准曲线分别计算样品中和含量。

1.9 实时定量 PCR 检测

诱导后 24 h 后收集各组细胞进行 PCR 检测。VEGF 上游引物序列 5'-GCCAGACAGGGTTGC-CATAC-3', 下游引物序列为 5'-GGAGTGGGATG-GATGATGTCAG-3'。HGF 上游引物序列 5'-AA-CAGGGGCTTTACGTTCACT-3', 下游引物序列为 5'-CGTCCCTTTATAGCTGCCTCC-3'。IGF-1 上游引物序列为 5'-CACATCATGTCGTCTTCACACC-3', 下游引物序列为 5'-GGAAGCAACTCATCCACAATG-3'。内参照 GAPDH 的上游引物为 5'-AATGGATTT-GGACGCATTGGT-3', 下游引物序列为 5'-TTTG-CACTGGTACGTTTGAT-3', 由上海捷瑞生物工程有限公司合成。抽提总 RNA, 按照 Trizol 试剂盒说明操作; 反转录形成 cDNA, 按试剂说明配制 10 μL 逆转录体系, 37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s; 实时荧光定量 PCR, 按照试剂说明配制 20 μL PCR 反应体系, 反应条件为: 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 61 $^{\circ}\text{C}$ 34 s, 共 42 个循环。Ct 值表示目标扩增产物达到设定阈值

经历的循环数。参考文献 [11] 计算 $\Delta\Delta\text{Ct}$, 采用相对定量法计算各组 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 。

1.10 细胞活性氧生成的测定

收集各组细胞并重悬于 300 μL Binding Buffer 中, 加入 10 μL 二氯醋酸荧光素 (2HDCF-DA) 轻轻混匀, 室温避光情况下反应 30 min, 流式细胞仪测定荧光强度, 即为细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的含量。

1.11 统计学分析

所有实验数据均重复 3 次以上, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 利用 SPSS 17.0 软件进行组间方差分析, 组间再做两两比较 SNK 分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠糖尿病模型的建立

糖尿病模型组小鼠 FBG 为 19.27 ± 2.04 mmol/L, 非糖尿病对照组小鼠 FBG 为 7.84 ± 3.10 mmol/L, 两者差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 提示造模成功。

2.2 ADSC 培养与鉴定

原代培养获得的 ADSC 接种到培养瓶中, 8 h 后部分细胞开始贴壁, 4~5 天贴壁后细胞呈纺锤形, 细胞生长至 7~8 天后, ADSC 即可达 80%~90% 融合状态 (图 1)。传代后细胞生长迅速, 3~4 天即可传 1 代。传至第 3 代时, 细胞形态均一。图 1C 为第 3 代小鼠 ADSC 的生长曲线, 第 3 代 ADSC 生长曲线呈 S 形, 细胞生长经历潜伏生长期 (1~2 天), 对数生长期 (3~5 天), 生长平台期 (6~8 天)。

经流式细胞术检测后, 大部分细胞表达 CD90 和 CD105。不表达 CD45 和 CD34 (图 2)。

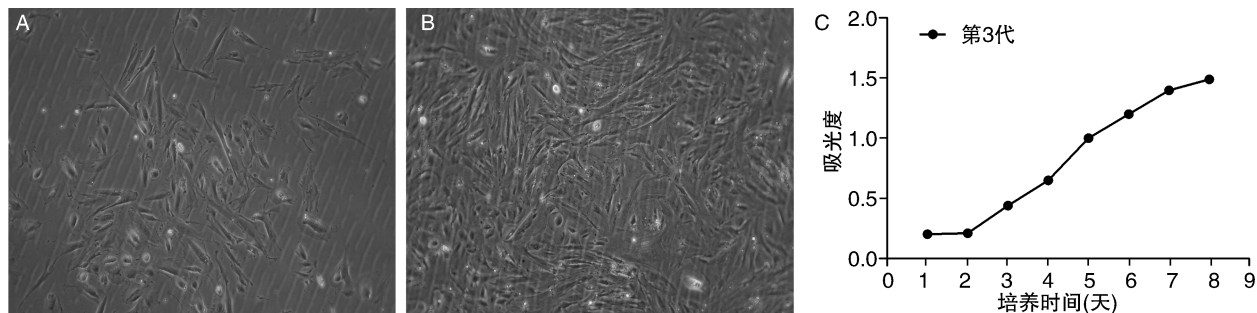


图 1. ADSC 的分离、培养以及生长曲线 A 为原代培养 5 天的 ADSC ($\times 100$), B 为 80%~90% 融合状态的 ADSC ($\times 100$), C 为第 3 代 ADSC 生长曲线。

Figure 1. Isolation, culture and growth curves of ADSC

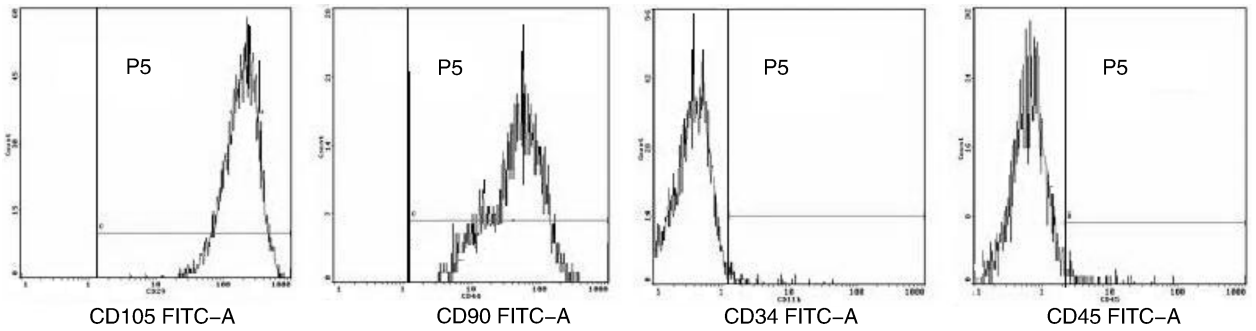


图 2. ADSC 的鉴定

Figure 2. Identification of ADSC

2.3 普罗布考对糖尿病小鼠 ADSC 增殖的影响

与正常 ADSC 对照组比较,糖尿病 ADSC 组细胞增殖能力明显降低,普罗布考诱导 24 h 和 36 h 均能促进糖尿病 ADSC 增殖($P < 0.05$)。与正常 ADSC 对照组相比,正常 ADSC 高糖对照组细胞增殖能力明显降低,普罗布考诱导 24 h 和 36 h 均能促进高糖培养下 ADSC 增殖($P < 0.05$;表 1)。

表 1. 普罗布考对糖尿病小鼠 ADSC 增殖的影响 (OD 值) ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1. The effect of probucol on proliferation of ADSC in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分 组	12 h	24 h	36 h
正常 ADSC 对照组	0.25 ± 0.02	0.40 ± 0.07	0.45 ± 0.09
正常 ADSC + 普罗布考组	0.27 ± 0.03	0.40 ± 0.02	0.47 ± 0.05
糖尿病 ADSC 对照组	0.23 ± 0.04	0.32 ± 0.06 ^a	0.34 ± 0.06 ^a
糖尿病 ADSC + 普罗布考组	0.26 ± 0.06	0.36 ± 0.05 ^{ab}	0.39 ± 0.04 ^{ab}
正常 ADSC + 高糖组	0.24 ± 0.02	0.30 ± 0.05 ^a	0.33 ± 0.04 ^a
正常 ADSC + 高糖 + 普罗布考组	0.25 ± 0.05	0.36 ± 0.03 ^c	0.44 ± 0.07 ^c

a 为 $P < 0.05$,与正常 ADSC 对照组比较; b 为 $P < 0.05$,与糖尿病 ADSC 对照组比较;c 为 $P < 0.05$,与正常 ADSC + 高糖组比较。

2.4 普罗布考对糖尿病小鼠 ADSC 迁移的影响

与正常 ADSC 对照组比较,糖尿病组 ADSC 迁移明显抑制,普罗布考诱导 24 h 和 36 h 能促进糖尿病小鼠 ADSC 迁移。与正常 ADSC 对照组相比,正常 ADSC + 高糖组细胞迁移能力明显降低;与正常 ADSC + 高糖组相比,普罗布考诱导 24 h 和 36 h 均能促进高糖培养下 ADSC 迁移($P < 0.05$;图 3)。

2.5 普罗布考对糖尿病小鼠 ADSC 分泌 VEGF、HGF 和 IGF-1 蛋白含量的影响

与正常 ADSC 对照组比较,糖尿病 ADSC 对照

组 ADSC 条件培养液中 VEGF、HGF 和 IGF-1 蛋白含量明显降低($P < 0.05$),普罗布考诱导 24 h 能明显增加 ADSC 条件培养液中 VEGF、HGF 和 IGF-1 蛋白含量($P < 0.05$)。与正常 ADSC 对照组相比,正常 ADSC + 高糖组条件培养液中 VEGF、HGF 和 IGF-1 蛋白含量明显降低($P < 0.05$),普罗布考诱导 24 h 能明显增加 ADSC 条件培养液中 VEGF、HGF 和 IGF-1 蛋白含量($P < 0.05$;表 2)。

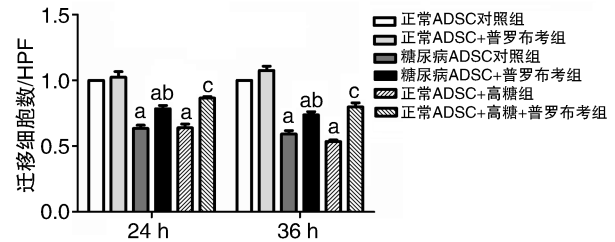


图 3. 普罗布考对糖尿病小鼠 ADSC 迁移的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$) a 为 $P < 0.05$,与正常 ADSC 对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与糖尿病 ADSC 对照组比较;c 为 $P < 0.05$,与正常 ADSC + 高糖组比较。

Figure 3. The effect of Probucol' on migration of ADSC in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 2. 普罗布考对糖尿病小鼠 ADSC 分泌 VEGF、HGF 和 IGF-1 蛋白含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2. The effect of probucol on content of VEGF, HGF and IGF-1 of ADSC in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分 组	VEGF-A (μg/L)	HGF(μg/L)	IGF-1 (μg/L)
正常 ADSC 对照组	9.39 ± 0.11	3.88 ± 0.19	12.45 ± 1.09
正常 ADSC + 普罗布考组	9.01 ± 1.14	3.92 ± 0.28	12.37 ± 2.12
糖尿病 ADSC 对照组	5.32 ± 0.86 ^a	2.33 ± 0.79 ^a	5.34 ± 0.59 ^a
糖尿病 ADSC + 普罗布考组	7.33 ± 0.45 ^{ab}	3.09 ± 0.53 ^{ab}	6.89 ± 0.93 ^{ab}
正常 ADSC + 高糖组	4.96 ± 0.19 ^a	2.14 ± 0.23 ^a	5.21 ± 0.44 ^a
正常 ADSC + 高糖 + 普罗布考组	8.01 ± 1.02 ^c	3.27 ± 0.35 ^c	7.88 ± 1.01 ^c

a 为 $P < 0.05$,与正常 ADSC 对照组比较; b 为 $P < 0.05$,与糖尿病 ADSC 对照组比较;c 为 $P < 0.05$,与正常 ADSC + 高糖组比较。

2.6 普罗布考对糖尿病小鼠 ADSC VEGF、HGF 和 IGF-1 mRNA 表达的影响

与正常 ADSC 对照组比较,糖尿病 ADSC 对照组 VEGF、HGF 和 IGF-1mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.05$),普罗布考预处理 24 h 能明显促进糖尿病 ADSC VEGF、HGF 和 IGF-1mRNA 表达 ($P < 0.05$);与正常 ADSC 对照组相比,正常 ADSC + 高糖组 VEGF、HGF 和 IGF-1mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.05$);与正常 ADSC + 高糖组相比,普罗布考诱导 24 h 能明显增加正常高糖培养下 ADSC VEGF、HGF 和 IGF-1 mRNA 表达 ($P < 0.05$;图 4)。

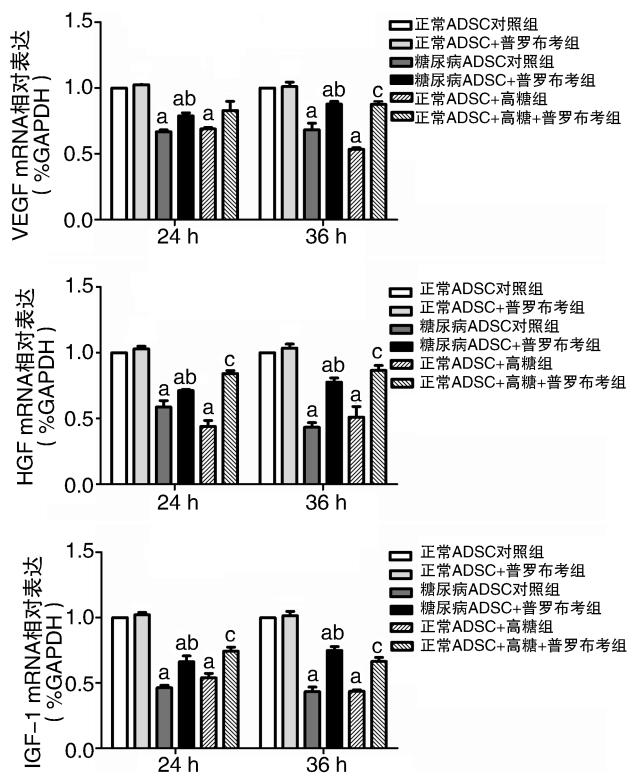


图 4. 普罗布考对糖尿病小鼠 ADSC 中 VEGF、HGF 和 IGF-1mRNA 表达的影响 ($n=6$) a 为 $P < 0.05$, 与正常 ADSC 对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与糖尿病 ADSC 对照组比较; c 为 $P < 0.05$, 与正常 ADSC + 高糖组比较。

Figure 4. The effect of probucal on level of VEGF, HGF and IGF-1 in ADSC of each group by real-time PCR ($n=6$)

2.7 普罗布考对糖尿病小鼠 ADSC ROS 含量的影响

ROS 含量检测的结果显示,与正常 ADSC 对照组比较,糖尿病 ADSC 对照组 ROS 含量明显升高 ($P < 0.05$),普罗布考预处理 24 h 和 36 h 能明显降低糖尿病小鼠 ADSC ROS 含量。与正常 ADSC 对照组

相比,正常 ADSC + 高糖组 ADSC ROS 含量明显增加 ($P < 0.05$),与常 ADSC + 高糖组相比,普罗布考诱导 24 h 能明显抑制高糖引起的正常 ADSC ROS 含量增加 ($P < 0.05$;图 5)。

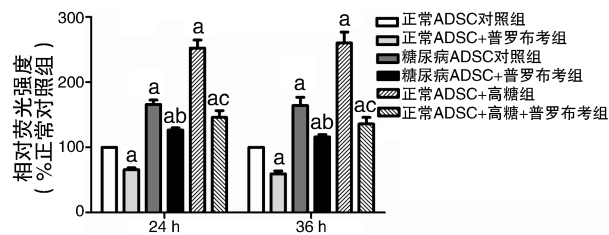


图 5. 普罗布考对糖尿病小鼠 ADSC ROS 含量的影响 ($n=6$) a 为 $P < 0.05$, 与正常 ADSC 对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与糖尿病 ADSC 对照组比较; c 为 $P < 0.05$, 与正常 ADSC + 高糖组比较。

Figure 5. The effect of probucal on level of ROS in ADSCs of each group ($n=6$)

3 讨论

ADSC 作为一种成体 MSC 群,由于其无伦理问题,来源广泛,易获得,易扩增等优点目前已成为糖尿病患者细胞移植和基因治疗的有效载体^[3,4]。本实验采用胶原蛋白酶消化和差速贴壁法分离培养 ADSC,并对其生物学特性进行初步观察,结果发现 ADSC 与骨髓等其他组织来源的 MSC 具有相似的特征,ADSC 高表达 CD90 和 CD105,不表达 CD34 和 CD45。

DFU 是糖尿病严重慢性并发症,严重影响患者的生活质量。尽管自体 ADSC 治疗皮肤溃疡取得了很好的效果,但是一些研究中仍然发现由于 ADSC 功能损伤导致糖尿病患者皮肤溃疡愈合不良^[6]。临床上迫切需要找到一种方法来改善糖尿病状态下 ADSC 功能。

普罗布考作为一种抗氧化剂,具有调血脂、抗氧化、抗炎、改善内皮细胞功能。普罗布考强大的抗氧化作用可能与普罗布考构效关系有关。普罗布考含 14 个亲脂性甲基,是合成的抗氧化剂,具有极强的亲脂性^[12]。有研究发现抗氧化剂可以改善糖尿病患者氧化应激指标,提示可以将抗氧化剂用于改善糖尿病 ADSC 功能。为了进一步证实普罗布考在保护糖尿病 ADSC 功能中的作用,本实验应用抗氧化剂普罗布考进行干预,检测结果显示,糖尿病能损伤 ADSC 的生物学特性,而普罗布考对糖尿病小鼠 ADSC 增殖和迁移能力具有保护作用。

ADSC 对创伤修复的作用机制一方面通过自身的增殖、迁移和分化,另一方面通过自分泌或者旁

分泌^[13-14]。研究证实,糖尿病小鼠骨髓间充质干细胞旁分泌功能受损。在多项关于糖尿病皮肤溃疡的研究中发现多种生长因子表达不足或者功能障碍时皮肤溃疡不愈合的主要原因^[6]。VEGF、HGF和IGF-1是体内重要的生长因子,研究表明,ADSC能分泌大量的VEGF、HGF和IGF-1,而这些因子在创伤修复过程中的起到非常重要的作用^[15]。本研究结果证实糖尿病损伤ADSC分泌功能,此结果与文献报道一致。我们通过对普罗布考预处理后ADSC VEGF、HGF和IGF-1蛋白和mRNA表达的检测,结果发现普罗布考能改善糖尿病小鼠分泌VEGF、HGF和IGF-1的功能。由此推断,普罗布考对于糖尿病患者体内ADSC的修复功能可能具有很好的保护作用。但由于本研究中并未对氧化应激的指标的进行检测,所以我们并不能完全推断普罗布考对间充质干细胞生物学功能的影响是由于其抗氧化作用,具体机制还有待于进一步研究。

本研究初步证实糖尿病能够损伤ADSC多种生物学功能,抗氧化剂普罗布考能够有效改善糖尿病ADSC功能。由此推断临床上应用ADSC为糖尿病患者细胞移植和基因治疗时,普罗布考等抗氧化剂可能对ADSC功能损伤具有很好的保护作用。深入研究高血糖对ADSC功能与活性的影响及普罗布考保护作用机制,为临床上通过应用抗氧化剂或者基因修饰促进生长因子分泌等干预方法来提高干细胞移植治疗DFU的疗效提供新的理论依据。

[参考文献]

- [1] Singh N, Armstrong DG, Lipsky BA. Preventing foot ulcers in patients with diabetes[J]. JAMA, 2005, 293(2): 217-228.
- [2] Lobmann R, Schultz G, Lehnert H. Molecular fundamentals of wound healing in diabetic foot syndrome[J]. Med Klin (Munich), 2003, 98(5): 292-301.
- [3] Gu JH, Lee JS, Kim DW, et al. Neovascular potential of adipose-derived stromal cells (ASCs) from diabetic patients [J]. Wound Repair Regen, 2012, 20(2): 243-252.
- [4] El-Ftesi S, Chang EI, Longaker MT, et al. Aging and diabetes impair the neovascular potential of adipose-derived stromal cell [J]. Plast Reconstr Surg, 2009, 123(2): 475-485.
- [5] Vöö S, Dunaeva M, Eggermann J, et al. Diabetes mellitus impairs CD133 + progenitor cell function after myocardial

infarction[J]. J Intern Med, 2009, 265(2): 238-249.

- [6] Fiorina P, Pietramaggiore G, Scherer SS, et al. The mobilization and effect of endogenous bone marrow progenitor cells in diabetic wound healing [J]. Cell Transplant, 2010, 19(11): 1369-381.
- [7] Liu X, Wang Z, Wang R, et al. Direct comparison of the potency of human mesenchymal stem cells derived from amnion tissue, bone marrow and adipose tissue at inducing dermal fibroblast responses to cutaneous wounds [J]. Int J Mol Med, 2013, 31(2): 407-415.
- [8] 刘晓玉, 王瑞, 张涛, 等. 人脂肪间充质干细胞对皮肤创伤修复的作用 [J]. 基础医学与临床, 2013, 33(11): 1377-381.
- [9] Negre-Salvayre A, Alomar Y, Trolly M, et al. Ultraviolet-treated lipoproteins as a model system for the study of the biological effects of lipid peroxides on cultured cells. III. The protective effect of antioxidants (probulcol, catechin, vitamin E) against the cytotoxicity of oxidized LDL occurs in two different ways [J]. Biochim Biophys Acta, 1991, 1096(4): 291-300.
- [10] Turgeon J, Dussault S, Haddad P, et al. Probulcol and antioxidant vitamins rescue ischemia-induced neovascularization in mice exposed to cigarette smoke; potential role of endothelial progenitor cells [J]. Atherosclerosis, 2010, 208(2): 342-349.
- [11] 贾青, 张维东, 王朝霞, 等. 不同剂量乙醇对小鼠早期肝纤维化的影响及机制研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(9): 1801-806.
- [12] Nam SM, Lee MY, Koh JH, et al. Effects of NADPH oxidase inhibitor on diabetic nephropathy in OLETF rats; the role of reducing oxidative stress in its protective property [J]. Diabetes Resc Clin Pract, 2009, 83(2): 176-182.
- [13] Amos PJ, Kapur SK, Stapor PC, et al. Human adipose-derived stromal cells accelerate diabetic wound healing; impact of cell formulation and delivery [J]. Tissue Eng Part A, 2010, 16(5): 1595-606.
- [14] Nambu M, Kishimoto S, Nakamura S, et al. Accelerated wound healing in healing-impaired db/db mice by autologous adipose tissue-derived stromal cells combined with atelo collagen matrix [J]. Ann Plast Surg, 2009, 62(3): 317-321.
- [15] Nie C, Yang D, Xu J, et al. Locally administered adipose-derived stem cells accelerate wound healing through differentiation and vasculogenesis [J]. Cell Transplant, 2011, 20(2): 205-216.

(此文编辑 李小玲)