

自体富血小板凝胶在糖尿病足中的作用机制与应用

刘贯英 邓晓龙 王敏哲 高 静

摘 要 自体富血小板凝胶 (autologous platelet rich gel, APG) 系取自患者自身外周新鲜全血, 经离心、分离、浓缩制得富血小板血浆 (platelet-rich plasma, PRP), 将其与凝血酶-钙剂混合而形成的凝胶状物。与传统的局部辅助治疗技术相比, APG 能有效促进创面的修复, 目前已成为糖尿病足的辅助治疗手段之一。近期研究表明, APG 具有止血、抑菌、封闭保护创面、释放多种生长因子, 从而促进创面愈合, 加快骨及血管再生的作用, 本文综合有关血小板凝胶在糖尿病足治疗中的作用机制及应用予以综述。

关键词 血小板凝胶 糖尿病足 生长因子 抑菌

中图分类号 R587.2

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.09.002

糖尿病足 (diabetic foot, DF) 是糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 患者由于合并神经病变及不同程度末梢血管病变而导致下肢的感染、溃疡和 (或) 深层组织破坏^[1]。据 2010 年中国疾病预防控制中心调查显示我国 18 岁以上人群糖尿病的患病率已高达 9.7%, 而糖尿病足在糖尿病患者中的累积患病率可高达 15%^[2]。全世界估计每年因糖尿病足而截肢的糖尿病患者已超过 100 万, 大约每半分钟就会发生一个大的截肢事件。糖尿病足溃疡不仅是造成糖尿病患者残疾的主要原因, 而且给患者及社会也造成了巨大的经济负担, 目前糖尿病足已成为全球医疗卫生事业所面临的公共难题。糖尿病病足往往由于合并神经病变、局部供血不足、微循环障碍、局部衰老细胞增多、细胞增殖能力减退等原因, 常表现为对细胞信号的低应答。加之在外伤、感染、受压等外在因素的侵袭下, 创面常难以愈合而形成慢性不愈性溃疡, 故传统治疗往往效果欠佳^[3]。自 1997 年 Whitman 首次提出自体富血小板凝胶 (autologous platelet-rich gel, APG) 的概念后, 其被陆续应用于骨科、颌面外科、烧伤整形科等领域创面的治疗, 并取得了良好的治疗效果^[4]。2001 年 Margolis 等开始将自体富血小板凝胶用于糖尿病足溃疡的治疗, 随后大量的研究表明, 血小板凝胶具有止血、抑菌、封闭保护创面并可释放多种生长因子和细胞因子, 从而明显地加速创面愈合的

作用。目前 APG 已成为糖尿病足治疗的有效手段之一^[5]。

一、糖尿病足微环境的特殊性

糖尿病足往往继发于糖尿病的周围神经病变和周围血管病变。高血糖状态可加重血管内膜的损伤, 而血管病变可进一步导致血管内斑块形成, 从而促进动脉粥样硬化的发展。胰岛素抵抗可引起血管痉挛, 造成血流减少甚至闭塞, 而长期的缺血即表现为坏疽。糖尿病神经病变、血管病变和感染是糖尿病足发病的 3 大基本因素^[6]。糖尿病足溃疡分为神经性、缺血性和混合性 3 种类型, 我国以混合性最为多见^[7]。其中神经性溃疡相对于缺血性溃疡, 愈合率较高, 治疗周期短, 但复发率较高; 而缺血性溃疡, 由于局部血运较差, 治疗难度也往往较大, 截肢率较高。近期的研究表明, 造成糖尿病足创伤痊愈慢或难痊愈的主要原因有以下几方面^[7-9]: ①高糖毒性和神经血管病变等因素的综合作用, 使局部血流量下降, 组织处于缺氧状态, 各种修复细胞凋亡, 生长因子分泌减少; ②高糖毒性、蛋白酶类等可改变靶细胞生长因子受体的结构或减少结合位点, 使配体受体偶联障碍, 生长因子作用失效; ③细菌性负荷与创面感染不利于溃疡愈合; ④基质金属蛋白酶类增加, 胶原过度分解, 破坏了修复细胞迁移活化所必需的支架, 从而抑制了创面的愈合。总之糖尿病足患者因内在因素, 如足部微血管病变、神经病变、免疫力低下和外在因素, 如伤口感染、解剖结构的变异、局部压迫的影响, 致足部溃疡创面愈合慢, 并发症增多, 截肢率较高。

二、自体富血小板凝胶在糖尿病足治疗中的机制

自体富血小板凝胶促进糖尿病足溃疡愈合的机

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目 (2014211C129)

作者单位: 830011 乌鲁木齐, 新疆医科大学第五附属医院

通讯作者: 王敏哲, 主任医师, 副教授, 硕士生导师, 电子信箱: wangminzhe2010@163.com

制主要与血小板受激活剂激活后释放出多种生长因子有关^[10,11]。其次 APG 中还含有丰富的纤维蛋白,这些纤维蛋白一方面为溃疡部位细胞的生长和组织的修复,提供了良好的支架,另一方面牵拉创面使创缘向中心移动,促进伤口愈合^[12,13]。而凝血酶作为 APG 的络合剂,将其凝固为胶状物敷于溃疡表面,既起到封闭保护创面有效的避免了外界的污染;同时营造出一个相对潮湿低氧的环境,有利于创面内的细胞因子的分泌,成纤维细胞以及毛细血管的增生,肉芽组织的再生,创缘表皮细胞的爬行,从而加速溃疡的愈合。此外 APG 中富含白细胞和单核细胞,对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌有明显的抑菌作用,起到有效的抗感染作用。

1. 自体富血小板凝胶中各种生长因子的作用:在富血小板血浆与激活剂混合激活后,血小板通过脱颗粒作用能够释放血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、转移生长因子(transforming growth factor, TGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, b-FGF)、骨连接素、骨钙素、纤维连接素、纤维蛋白原等多种生长因子和细胞因子,为组织修复和重建起到重要作用^[10,11]。有研究表明 APG 中血小板浓度与这些生长因子的浓度呈正相关。其中对于血小板衍生生长因子的研究较多,现已知 PDGF 具有广泛的生物学活性,其对基质干细胞、成纤维细胞、中粒细胞和单核细胞等多种细胞有趋化作用,并能刺激成纤维细胞分化为纤维母细胞、促进胶原蛋白的合成、加速毛细血管的再生^[14]。PDGF 与 EGF、IGF-1 共同作用可使细胞从 G₁ 期进入 S 期,并保持其旺盛的分裂能力^[15]。PDGF 与 IGF-1 都有促进间质细胞分裂增殖,加强胶原蛋白的合成,增加新生组织的强度及骨的修复作用,同时 PDGF 在伤口愈合后期可以激活胶原酶,对胶原改建、骨塑形重建起到积极的促进作用^[16]。总之在软组织及骨组织的修复过程中 PDGF 都表现出重要的地位。IGF-1 可加速内皮细胞、表皮细胞的生长,调控细胞外基质的合成,增加胶原纤维的分泌,刺激上皮或瘢痕组织的形成。EGF 可以趋化并促进表皮细胞、平滑肌细胞、神经胶质细胞等多种间质细胞的增殖和分裂,并通过成纤维细胞的趋化及促分裂作用,使胶原纤维呈线状排列,完成胶

原组织构建,加速创面肉芽组织生成,促进表皮细胞快速、规则生长,及时覆盖创面^[15,17]。VEGF 是生长因子家族中最强的促血管内皮细胞有丝分裂原,可刺激血管内皮再生,从而促进新生血管的形成和血管的重塑^[18]。IGF-1 可加强胶原蛋白的合成,促进成纤维细胞的分化,促进神经功能的恢复。总之各种生长因子在组织损伤修复过程中发挥不同的作用,各种生长因子之间发挥协同作用,共同推动伤口愈合的进程。

2. 提供纤维蛋白支架的作用:依据血小板凝胶成分、凝胶中纤维蛋白结构可将血小板凝胶分为 4 大类,即纯富血小板血浆凝胶、富白细胞-血小板血浆凝胶、纯富血小板纤维蛋白凝胶和富白细胞-血小板纤维蛋白凝胶。其中影响血小板凝胶功能的重要因素之一是纤维蛋白的空间结构。APG 作用于局部溃疡后,一部分生长因子释放 H 胞后并不立即进入创面发挥作用,而是被支架内基质蛋白黏附并绑定^[14]。这不仅可防止生长因子、细胞因子、白细胞等活性物质在创面的大量流失,还可延长 APG 在局部的效应时间,使组织拥有相对持久的生长因子来源。而评价纤维蛋白的两个主要参数为纤维蛋白的空间结构和密度,其中纤维蛋白的空间结构主要取决于凝胶中纤维蛋白原与凝血酶的比例,而密度主要取决于纤维蛋白原的数量。纤维蛋白原在凝血酶的作用下被激活形成纤维蛋白,形成的纤维蛋白的空间结构包括四分子结构(如富白细胞-血小板血浆凝胶)和三分子结构(如富白细胞-血小板纤维蛋白)两种形式。其中四分子结构一般形成于加入大量激活剂,快速激活过程;而三分子结构的纤维蛋白是由纤维束交织而成,它的产生类似于生理性凝集的缓慢激活过程,其分子结构弹性较好,与三分子结构相比可以有效的网罗大量的细胞成分和生长因子等 APG 的有效成分。研究表明若 APG 中的纤维蛋白与血小板比例适当,APG 不但不影响成纤维细胞、上皮细胞等修复细胞向创面的迁移以及血管的生成,而且可为修复细胞的迁移运动提供空间和支架作用,易化其正确运动。

3. APG 的抑菌作用及其机制:APG 中血小板浓度是正常外周血的 5~7 倍,同时白细胞浓度接近正常外周血浓度的 2 倍。Bielecki 等首次通过体外研究显示 APG 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌表现出抗菌活性;Moojen 等研究亦证实 APG 对金黄色葡萄球菌有抗菌作用,并认为其主要的抑菌成分来源于血小板。Naldini 等在对 APG 和外周血单核细胞共同培养

的研究证实 APG 中活化的血小板有促进白细胞活化从而起到抗菌的作用。目前研究表明 APG 对皮肤溃疡的常见病原菌,如球菌、杆菌以及念珠菌等具有抗菌作用。目前认为 APG 的抑菌作用主要与血小板活化后血小板内的 α 颗粒释放出抗菌肽密切相关;此外,血小板活化后还可释放出趋化因子、组胺、腺苷、免疫球蛋白、血小板杀菌蛋白等抗菌活性物质。这些抗菌活性物质可以通过直接诱导血小板聚集,从而抑制或杀灭病原体;也可以通过趋化和激活白细胞间接发挥抗菌效应^[19]。

三、自体富血小板凝胶的优势

APG 是采集自身血液制备,这从根本上避免了外来因素引起的免疫排斥反应,断绝了传染性疾病的传播以及使用异体重组基因产品可能造成人类遗传基因结构改变的担忧。APG 中含有多种高浓度的生长因子,且各种生长因子的比例恰到好处,使其在促创面愈合方面发挥最佳的协同作用。APG 凝胶具有黏附性,胶状的 APG 不仅对溃疡创面起到填充黏合的作用,而且可以减缓血小板流失的速度,使溃疡局部长时间处在高浓度的生长因子环境中,有研究表明 APG 治疗后局部高浓度的生长因子可维持长达 15 天。APG 对患者的损伤小,只需从患者静脉取血即可,操作简便,所需时间短。到目前为止,还没有发现 APG 对机体的严重不良反应,但有少数患者在 APG 治疗早期溃疡部位可有蚁行感,后期均可自行缓解^[20~22]。

四、自体富血小板凝胶的局限性

由于制备 APG 的血小板取自于患者自身,故会由于血小板的数量及功能的不同而存在治疗效果的差异,因此患者良好的营养及身体条件可以更好的为自身治疗。APG 用于治疗糖尿病足溃疡适用于局部血供较好的神经性糖尿病足患者,但如溃疡局部血供较差,则治疗效果欠佳,缺血性糖尿病溃疡早期并不推荐使用。APG 治疗时应在溃疡局部彻底清创,感染控制后使用,如果局部感染严重,会导致 APG 治疗的失败;APG 不适用于存在骨髓炎且炎症未控制的患者。APG 不能用于糖尿病急性并发症和有心、肝、肺、肾等器官功能衰竭以及中-重度贫血的患者;这些患者全身状态较差,可能不能耐受治疗。

APG 作为一种较新的糖尿病足溃疡的局部治疗技术,其明显的疗效和安全性已被许多临床研究证实。目前认为 APG 主要通过浓缩的血小板及较高浓度的生长因子发挥治疗作用,后者可提高糖尿病足慢

性难愈合创面中生长因子水平和活性,恢复生长因子受体偶联机制,改善组织修复环境,促进组织再生的同时发挥抗菌活性;其他一些血小板源性生物活性物质、纤维蛋白支架及数量不等的白细胞也为溃疡的修复提供了一定的帮助。然而,由于对局部组织内各种生物活性物质的观测较为困难,对于生长因子以外的生物活性物质的动态变化情况也少有报道,现有证据并不足以完全阐明 APG 的作用机制。生长因子在组织中的效应过程十分复杂,生长因子间、生长因子与修复细胞间相互影响、相互作用的机制并不明确;APG 中生物活性物质含量丰富,可能还存在一些效应尚不明确生物活性物质,其对溃疡愈合的影响有待于今后进一步探索。

参考文献

- 臧莎莎,李玲,宋光耀.糖尿病足的研究进展[J].河北联合大学学报:医学版,2014,24(1):45-47
- 中华医学会糖尿病学分会.中国2型糖尿病防治指南(2013年版)[J].中国糖尿病杂志,2014,22(8):后插2-2,后插42
- 冉兴无,杨兵全,许樟荣.我国糖尿病足病的诊治现状与未来的研究方向[J].中华糖尿病杂志,2014,7:437-439
- Burnouf T, Goubran HA, Chen TM, *et al.* Blood-derived biomaterials and platelet growth factors in regenerative medicine[J]. Blood Rev, 2013,27(2):77-89
- Carter MJ, Fylling CP, Parnell LK. Use of platelet rich plasma gel on wound healing: a systematic review and meta-analysis[J]. Eplasty, 2011,11:e38
- 韩莉.糖尿病足发病机制及诊疗现状[J].医学综述,2014,20(7):1259-1261
- 国际血管联盟中国分会糖尿病足专业委员会.糖尿病足诊治指南[J].介入放射学杂志 2013,22(9):705-708
- 吴冬波,廖明.糖尿病足治疗进展[J].临床合理用药杂志,2014,7(1):178-179
- 李光善,张红,任志雄,等.糖尿病足治疗内科常见问题[J].中华损伤与修复杂志:电子版,2012,7(2):3-6
- Amable PR, Carias RB, Teixeira MV, *et al.* Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors[J]. Stem Cell Res Ther, 2013,4(3):67
- Anitua E, Orive G. Endogenous regenerative technology using plasma- and platelet-derived growth factors[J]. J Control Release, 2012,157(3):317-320
- 李兰.自体富血小板凝胶治疗糖尿病皮肤慢性难愈合创面机制的研究进展[J].感染·炎症·修复,2012,13(1):53-55
- Kang YH, Jeon SH, Park JY, *et al.* Platelet-rich fibrin is a Bioscaffold and reservoir of growth factors for tissue regeneration[J]. Tissue Eng Part A, 2011,17(3-4):349-359
- Mazzucco L, Borzini P, Gope R. Platelet-derived factors involved in tissue repair-from signal to function[J]. Transfus Med Rev, 2010,24(3):218-234

(下转第56页)

粥样硬化的作用,氨氯地平组药物干预后 SIRT1 mRNA 较干预前有明显升高趋势,但差异无统计学意义,可能为样本量过小有关。

综上所述,本研究结果显示冠心病患者单核细胞中 SIRT1 mRNA 表达水平较正常下降,应用氨氯地平干预后 SIRT1 mRNA 水平较非氨氯地平组冠心病患者有明显升高。SIRT1 mRNA 表达水平与空腹血糖、TC、TG、LDL-C 呈负相关,与 HDL-C 呈正相关,提示 SIRT1 与糖脂代谢相关,可能直接或通过参与糖脂代谢调控保护冠脉;氨氯地平可能通过干预 SIRT1 mRNA 表达起到延缓动脉粥样硬化进展作用。

参考文献

- Pierre T. Acute coronary syndromes [M]. 北京:人民卫生出版社, 2007:280-301
- Aronson D. Hyperglycemia and the pathobiology of diabetic complications [J]. Adv Cardiol, 2008, 45:1-16
- Tulenok TN, Brown J, Laury - kleintop L, et al. Atheroprotection with amlodipine: cells to lesions and the PREVENT trial [J]. Cardiovasc Pharmacol, 1999, 33:17-22
- Zhao ZC, Wang SH, Yan CS, et al. Targeting cardiovascular disease with novel SIRT1 pathways [J]. Future Cardiol, 2012, 8(1): 89-100
- Schmitt CA, Heiss EH, Dirsch VM. Effect of resveratrol on endothelial cell function: molecular mechanisms [J]. Biofactors, 2010, 36(5):342-349
- Sundaresan NR, Pillai VB, Gupta MP. Emerging roles of SIRT1 deacetylase in regulating cardiomyocyte survival and hypertrophy [J]. J Mol Cell Cardiol, 2011, 51(4):614-618
- Clarke M, Bennett M. Defining the role of vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerosis [J]. Cell Cycle, 2006, 5(20):2329-2331
- Kitamura YI, Kitamura T, Kruse JP. FOXO1 protects against pancreatic beta cell failure through NeuroD and MafA induction [J]. Cell

Metab, 2005, 2(3):153-163

- Cardellini M, Menghini R, Martelli E, et al. TIMP3 is reduced in atherosclerotic plaques from subjects with type 2 diabetes and increased by SirT1 [J]. Diabetes, 2009, 58(10):2396-2401
- Shiota A, Shimabukuro M, Fukuda D, et al. Activation of AMPK - SirT1 pathway by telmisartan in white adipose tissue: a possible link to anti - metabolic effects [J]. Eur J Pharmacol, 2012, 692(1-3):84-90
- Kim MY, Lim JH, Youn HH, et al. Resveratrol prevents renal lipotoxicity and inhibits mesangial cell glucotoxicity in a manner dependent on the AMPK - SIRT1 - PGC1 α axis in db/db mice [J]. Diabetologia, 2013, 56(1):204-217
- Stein S, Matter CM. Protective roles of SIRT1 in atherosclerosis [J]. Cell Cycle, 2011, 10(4):640-647
- Toba H, Nakagawa Y, Miki S, et al. Calcium channel blockades exhibit anti - inflammatory and antioxidative effects by augmentation of endothelial nitric oxide synthase and the inhibition of angiotensin converting enzyme in the N(G) - nitro - L - arginine methyl ester - induced hypertensive rat aorta: vasoprotective effects beyond the blood pressure - lowering effects of amlodipine and manidipine [J]. Hypertens Res, 2005, 28(8):689-700
- Navarro - Gonzalez J, Mora - Fernandez C, Gomez - Chinchon M, et al. Serum and gene expression profile of tumor necrosis factor - α and interleukin - 6 in hypertensive diabetic patients: effect of amlodipine administration [J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2010, 23(1):51-59
- Salehi I, Mohammadi M, Mirzaei F, et al. Amlodipine attenuates oxidative stress in the heart and blood of high - cholesterol diet rabbits [J]. Cardiovascular Journal of Africa, 2012, 23(1):18-22
- Kahn MB, Boesze - Battaglia K, Stepp DW, et al. Influence of serum cholesterol on atherogenesis and intimal hyperplasia after angioplasty: inhibition by amlodipine [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005, 288(2):H591-600

(收稿日期:2015-01-14)

(修回日期:2015-01-26)

(上接第6页)

- Singla S, Singla S, Kumar A, et al. Role of epidermal growth factor in healing of diabetic foot ulcers [J]. Indian J Surg, 2012, 74(6):451-455
- Souza TF, Andrade AL, Ferreira GT, et al. Healing and expression of growth factors (TGF - β and PDGF) in canine radial osteotomy gap containing platelet - rich plasma [J]. Vet Comp Orthop Traumatol, 2012, 25(6):445-452
- 刘如俊, 赵文志, 张路, 等. 表皮生长因子在糖尿病足溃疡创面愈合过程中的作用观察及其机制探讨 [J]. 大连医科大学学报, 2014, 4:322-327
- Ruszkowska - Ciastek B, Sokup A, Socha MW, et al. A preliminary evaluation of VEGF - A, VEGFR1 and VEGFR2 in patients with well - controlled type 2 diabetes mellitus [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2014, 15(6):575-581

- Lopez C, Carmona JU, Giraldo CE, et al. Bacteriostatic effect of equine pure platelet - rich plasma and other blood products against methicillin - sensitive staphylococcus aureus. An in vitro study [J]. Vet Comp Orthop Traumatol, 2014, 27(5):372-378
- 刘晓韬, 洪小芳, 张志文, 等. 自体富血小板血浆凝胶与重组生长因子在糖尿病足治疗的比较研究 [J]. 医药前沿, 2013, 1:140-141
- 齐昆青, 程团结, 朴金龙, 等. 自体血小板凝胶在糖尿病足溃疡治疗中的应用研究 [J]. 中国糖尿病杂志, 2014, 22(12):1102-1105
- 郎红梅, 金小岚, 艾智华, 等. 自体富血小板凝胶治疗糖尿病足和糖尿病皮肤慢性溃疡的疗效分析 [J]. 四川医学, 2013, 34(1):13-14

(收稿日期:2015-01-23)

(修回日期:2015-02-06)