

【基础研究】

间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 是一类具有显著的自我更新和多向分化的细胞, 其来源丰富, 主要存在于骨髓、脐血、脐带、全身结缔组织和器官间质^[1-3], 脐带作为一种 MSCs 的来源有着无法比拟的优势^[4-6], 其与骨髓来源的 MSCs 比较亦有较明显的优势, 如取材容易、来源广、易收集、保存、冷冻及相对纯净等。近年来, 随着干细胞技术的

不断发展,其在很多临床领域得到应用并取得令人鼓舞的效果。较大的皮肤缺损往往迁延难愈、治疗棘手,本研究旨在探讨利用脐带 MSCs 上清冻干粉干预治疗皮肤缺损,以期为干细胞治疗皮肤缺损提供一定的理论基础和依据。

1 材料与方法

1.1 细胞获取 脐带来源于武警后勤学院附属医院,脐带的采集经产妇本人同意并签署知情同意书,脐带去表皮以及血管留取华通胶,待较多细胞爬出,传代培养,细胞活力≥90%,病原菌排查未检出细菌,至第 2~3 代时用于本研究。

1.2 实验动物 日本大耳兔,雌雄不计,共 12 只,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证编号:SCXK(京)2012-0001。体质量(2 400 ± 100)g,大耳兔于动物室内分笼喂养,室内温度为(20 ± 3)℃,湿度为(50 ± 20)%,每日光照 12 h,并提供适量全营养兔粮及足量清洁饮水。将实验大耳兔采用随机数字表法分为对照组、单纯培养基冻干粉治疗组和 MSCs 上清冻干粉治疗组,每组 4 只,3 组均在日本大耳兔耳部制作皮肤缺损,深度达软骨骨膜层,造成直径为 0.5 cm 的圆形缺损。

1.3 实验仪器及药品 超净工作台(中国苏净集团安泰公司),培养基(美国 Sigma 公司),台式离心机(德国 Sigma 公司),血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)抗体(上海易佰聚经贸有限公司),UltraCULYURETM 无血清培养基(美国 Lonza 公司),肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)多克隆抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(上海西唐生物科技有限公司),TNF-α 放射免疫(radioimmunoassay, RIA)试剂盒(上海雅吉生物科技有限公司),反转录聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)仪(美国 MJ Research 公司),Western blot 电泳仪、电转仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.4 MSCs 培养及上清冻干粉获得 将 3 代 MSCs 进行扩增,每 3 d 换液(无血清培养基),每次每培养瓶(底面积 75 cm²)14 mL,细胞扩增至 5 × 10⁷ 个,留取扩增期间所有上清液,上清液留取后迅速转移至液氮内,然后转移至 -80℃ 低温冰箱,将 -80℃ 冷存凝固的上清液抽真空,升华干燥,除去冰晶,最后制得冻干粉, -20℃ 保存(单纯培养基冻干粉治疗组留取与 MSCs 上清冻干粉治疗组同等体积的培养基进行冻干)。使用前生理盐水溶解,0.22 μm 过滤器过滤后经动物耳缘静脉注射,5 × 10⁷ 个 MSCs 上清冻干粉溶解至生理盐水,终体积为 2 mL,注射总体积为每只 500 μL;对照组每只注射 500 μL 生理盐

水;单纯培养基冻干粉治疗组注射与 5 × 10⁷ 个 MSCs 培养所用等体积的纯培养基冻干粉溶解至 2 mL 生理盐水,注射总体积为每只 500 μL。

1.5 检测指标及方法 3 组动物均在模型制作后干预的第 3、5、7 天经耳缘静脉取血 2 mL,立即低温分离血清,应用放射免疫试剂盒,按试剂盒说明书操作检测血清中 TNF-α 的水平;第 7 天处死动物,取 3 组动物耳部皮损周围肉芽组织,应用 TRIzol 匀浆,提取总 RNA,紫外光检测样品吸光度(A),A₂₆₀/A₂₈₀ 为 1.90 ~ 2.10,应用 RT-PCR 检测 VEGF、TNF-α mRNA 表达;将组织加入裂解液,研磨至无肉眼可见的组织碎片,用 200 μL 裂解液冲洗研磨器,4℃ 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,上清即为总蛋白,用 Western blot 检测 VEGF、TNF-α 蛋白表达。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脐带 MSCs 形态 脐带 MSCs 放入培养箱中,定时观察培养液变化,每 3 d 半量换液,1 周左右可见细胞开始游离出组织块, MSCs 呈梭形、圆钝,漩涡状生长,较为饱满(图 1)。

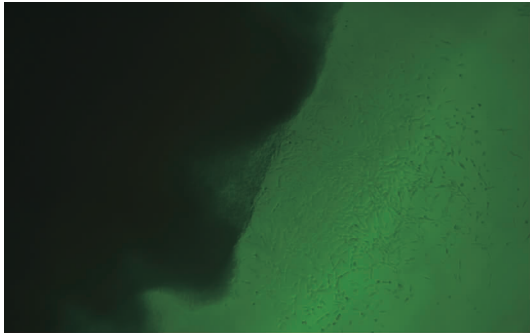


图 1 MSCs 形态(×40)

Fig.1 Morphology of MSCs(×40)

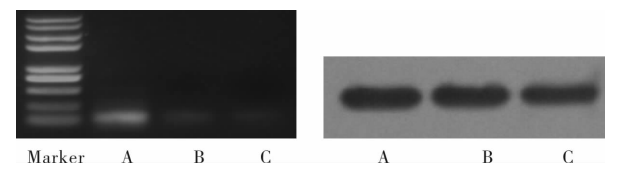
2.2 3 组大耳兔血清中 TNF-α 表达比较 结果见表 1。在皮肤缺损后第 3、5、7 天 MSCs 上清冻干粉治疗组大耳兔血清中 TNF-α 表达低于对照组和单纯培养基冻干粉治疗组(P < 0.05),单纯培养基冻干粉治疗组高于对照组,差异均有统计学意义(P < 0.05)。

表 1 3 组大耳兔血清 TNF-α 表达水平比较
Tab.1 Comparison of serum TNF-α level of rabbits in the three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF-α/(mg·L ⁻¹)		
		第 3 天	第 5 天	第 7 天
对照组	4	24.7 ± 5.3	26.9 ± 4.1	11.9 ± 3.1
单纯培养基冻干粉治疗组	4	27.1 ± 7.1 ^a	29.9 ± 7.0 ^a	13.4 ± 3.0 ^a
MSCs 上清冻干粉治疗组	4	20.1 ± 5.1 ^{ab}	16.9 ± 1.2 ^{ab}	6.1 ± 1.2 ^{ab}

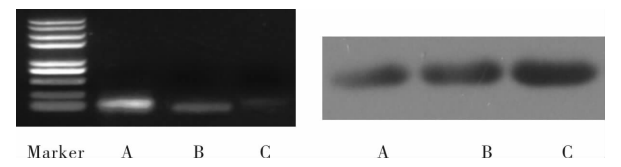
注:与对照组比较^aP < 0.05;与单纯培养基冻干粉治疗组比较^bP < 0.05。

2.3 3 组兔损伤区周围组织中 VEGF 和 TNF- α mRNA 及蛋白表达情况 结果见图 2、3。MSCs 上清冻干粉治疗组大耳兔损伤区周围组织中 VEGF mRNA 及蛋白表达均高于对照组和单纯培养基冻干粉治疗组 ($P < 0.05$);MSCs 上清冻干粉治疗组大耳兔 TNF- α mRNA 及蛋白表达均低于对照组和单纯培养基冻干粉治疗组 ($P < 0.05$);对照组与单纯培养基冻干粉治疗组 VEGF mRNA、TNF- α mRNA 及其蛋白表达比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。



A:MSCs 上清冻干粉治疗组;B:单纯培养基冻干粉治疗组;C:对照组。
图 2 3 组兔损伤区周围组织中 VEGF mRNA (左) 和蛋白表达 (右) 情况

Fig.2 Expressions of the VEGF mRNA (left) and protein (right) in the tissues around skin defect of rabbits in the three groups



A:MSCs 上清冻干粉治疗组;B:单纯培养基冻干粉治疗组;C:对照组。
图 3 3 组兔损伤区周围组织中 TNF- α mRNA (左) 和蛋白表达 (右) 情况

Fig.3 Expressions of the TNF- α mRNA (left) and protein (right) in the tissues around skin defect of rabbits in the three groups

3 讨论

脐带 MSCs 是一类具有自我更新和分化潜能的干细胞,体外培养易于扩增,免疫原性低,可用于同种甚至异种细胞移植。文献报道,脐带 MSCs 体外培养可分泌多种细胞因子,包括基质起源的因子,如肝细胞生长因子、胰岛素样生长因子、纤维母细胞生长因子;缺血诱导的因子,如血管内皮生长因子、血管生成素、单核细胞趋化蛋白和白细胞介素等,以起到维持机体稳态、抗炎及免疫调节的作用,对维持机体内环境稳定起着不可小觑的作用^[6]。

皮肤缺损是临床常见病,当缺损面积较大时处理相对棘手,无论是炎症还是缺损区域周围血运重建和血管再生均是临床必须面对和解决的问题。作为炎症反应的重要介质之一,TNF- α 可促使多种炎性介质释放,构成炎症损伤的级联放大效应^[7],同时,TNF- α 又是炎症早期最具影响的介质,既可通过促使炎性介质释放和诱导白细胞介素 (interleukin,

IL)-1、IL-6 等炎性因子,产生构成炎症损伤的级联放大效应,还可通过一系列的病理生理过程向炎症部位迁移,启动炎症反应的发生,参与皮肤缺损后瘢痕形成等一系列病理进程^[8]。本研究结果证实,脐带 MSCs 培养上清冻干粉可有效抑制皮肤缺损动物 TNF- α 的升高,提示脐带 MSCs 分泌蛋白的某些因子对抑制炎症的进展有重要意义,对抑制皮损后炎症反应的发生发展以及病理生理过程有重要意义。

VEGF 是血管内皮细胞特异性的肝素结合生长因子,可在体内诱导血管新生。本研究结果证实,脐带 MSCs 上清冻干粉治疗皮肤缺损大耳兔后可有效上调 VEGF 的表达,而单纯培养基干预治疗组和对照组无变化,以上结果证明脐带 MSCs 分泌相应蛋白或因子对血管再生起着重要的调控作用,推测这一作用将有利于皮损区域的修复重建。

通过本研究结果推测,脐带 MSCs 分泌蛋白对机体免疫调节和调控炎症反应具有重要作用,同时对受损组织周围 VEGF 的表达也有着相应的调控,对改善皮肤缺损后组织血管新生和重建有着重要的作用。本研究不足之处在于尚不明确是 MSCs 上清液中哪些具体成分的作用,在今后的研究工作中将进行深入探究。

参考文献:

[1] 谷涌泉,韩志朝,付小兵. 干细胞临床研究与应用[M]. 北京: 人民卫生出版社,2012:1-29.
[2] SCHOUTEN J W,FULP C T,ROYO N C,*et al.* A review and rationale for the use of cellular transplantation as a therapeutic strategy for traumatic brain injury[J]. *J Neurotrauma*, 2004, 21 (11): 1501-1538.
[3] PITTENGER M F,MACKAY A M,BECK S C,*et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*, 1999,284(5411):143-147.
[4] MARESCHI K,BIASIN E,PIACIBELLO W,*et al.* Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood[J]. *Hematological*,2001,86(10):1099-1100.
[5] LI J P,WAN D W,SONG Q H. Transplantation of erythropoietin gene transfected umbilical cord mesenchymal stem cells as a treatment for limb ischemia in rats[J]. *Gene Mol Res*, 2015, 14 (4): 19005-19015.
[6] HE H,ZHAO Z H,HAN F S,*et al.* Overexpression of protein kinase C varepsilon improves retention and survival of transplanted mesenchymal stem cells in rat acute myocardial infarction[J]. *Cell Death Disease*,2016,7(417):e2056.
[7] 何文彤,单娜娜,董化江,等. 青蒿素对骨关节炎大鼠肿瘤坏死因子- α 表达的影响[J]. 新乡医学院学报,2012,29(11):813-814,817.
[8] 于鑫,董化江,单娜娜,等. 三七总甙对糖尿病皮肤溃疡大鼠肿瘤坏死因子- α 水平的影响[J]. 新乡医学院学报,2012,29(12):893-895.

(本文编辑:徐刚珍 英文编辑:徐自超)