

dried powder of culture medium was dissolved in 200 μL physiological saline, an then 100 μL was infused to rats through caudal vein, 100 μL was dropped to the ulcer tissue. In MSCs supernatant treatment group, the freeze-dried powder of supernatant was dissolved in 200 μL physiological saline, and then 100 μL was infused to rats through caudal vein, 100 μL was dropped to the ulcer tissue. After five days, the serum levels of TNF- α was detected by radioimmunoassay; the expression of VEGF and TNF- α in ulcer tissue of rats was measured by reverse transcription polymerase chain reaction and Western blotting. **Results** The serum level of TNF- α of rats in MSCs supernatant treatment group was significantly lower than that in model group and culture medium treatment group ($P < 0.05$); there was no statistic difference in serum level of TNF- α of rats between the model group and culture medium treatment group ($P > 0.05$). The expressions of TNF- α mRNA and protein in ulcer tissue of rats in MSCs supernatant treatment group were significantly lower than those in model group and culture medium treatment group ($P < 0.05$); the expressions of VEGF mRNA and protein in ulcer tissue of rats in MSCs supernatant treatment group were significantly higher than those in model group and culture medium treatment group ($P < 0.05$); there was no statistic difference in the expressions of VEGF and TNF- α mRNA and protein in ulcer tissue of rats between the model group and culture medium treatment group ($P > 0.05$). **Conclusion** Umbilical cord MSCs can effectively reduce the expression of TNF- α and increase the expression of VEGF in ulcer tissue.

Key words: umbilical cord; mesenchymal stem cells; diabetic skin ulcer; tumor necrosis factor- α ; vascular endothelial growth factor; rats

目前,全球糖尿病患者约为2.6亿人,预计到2025年将增加至3亿或更多^[1],我国糖尿病形势最为严峻,2013年糖尿病患者约为9800万^[2]。糖尿病皮肤溃疡(diabetic skin ulcer, DSU)是糖尿病并发症之一,反复发作,迁延不愈,易形成顽固且难愈性溃疡,治疗失当易向深部发展,乃至致残、截肢,严重威胁人类的健康^[3]。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一类具有自我更新和多向分化潜能的多能干细胞,存在于骨髓、脐血、脐带、全身结缔组织和器官间质等^[4-5]。脐带作为MSCs的一种来源有其无法比拟的优势,取材容易、来源广、收集简便^[6-8]。MSCs的治疗作用既包括细胞自身分化增殖替代异常的组织细胞,又包括MSCs所分泌的某些蛋白或生长因子所起到的局部微环境的调节作用。本实验利用脐带MSCs上清冻干粉进行干预,探讨其对DSU的作用,以期MSCs治疗DSU提供新的方向。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 无特定病原体级雄性 Sprague-Dawley 大鼠 30 只,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,编号:SCXK(京)2012-0001。体质量(225 ± 15)g,实验大鼠于动物室内分笼喂养,室内温度为(20 ± 3) $^{\circ}\text{C}$,湿度为(50 ± 20)%,每日光照 12 h,并提供适量全营养鼠粮及足量清洁饮水。

1.2 细胞获取 脐带来源于平津医院,脐带的采集经产妇本人同意并签署知情同意书,脐带去表皮及血管后留取华通胶,待较多细胞爬出,传代培养,细胞活力 $\geq 90\%$,病原菌检查未检出细菌,至第3代时用于本实验。

1.3 仪器与试剂 超净工作台(中国苏净集团安泰公司),培养基(美国 Sigma 公司),3K18 型台式离心机(德国 Sigma 公司);TRIZOL 试剂盒(上海索莱宝生物科技有限公司),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),血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)兔多克隆抗体(上海艾博抗贸易有限公司),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 blotting 电泳仪、电转仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.4 实验分组及各组大鼠干预措施 用随机数字表法将大鼠随机分为模型组、单纯培养基冻干粉治疗组和 MSCs 上清冻干粉治疗组,每组 10 只。3 组大鼠均进行造模,模型制作参照文献[9-10]。大鼠尾静脉注射四氧嘧啶($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),并予以高脂饲料喂养(质量分数 50% 基础饲料、10% 熟猪油、25% 蔗糖、15% 蛋黄粉),5 d 后测空腹血糖,筛选血糖在 $20 \sim 33 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的符合糖尿病诊断标准的大鼠。戊巴比妥钠麻醉,刀片在大鼠小腿作一长约 1 cm 的切口,深达皮下,并注入 1 mL 金黄色葡萄球菌悬液,术后 3~4 d 局部可出现溃疡。DSU 模型制作成功后,模型组大鼠尾静脉注射 100 μL 生理盐水,溃疡处滴加 100 μL 生理盐水;单纯培养基冻干粉治疗组大鼠将培养基冻干粉溶解至 200 μL 生理盐水,尾静脉注射 100 μL ,同时溃疡处滴加 100 μL ;

MSCs 上清冻干粉治疗组处理:取原代细胞扩增至3代,数量为 1×10^8 ,留取相应的上清液并冻干,余同单纯培养基冻干粉治疗组。5 d后留取血清及溃疡处组织,检测血清 TNF- α 水平及溃疡组织中 TNF- α 、VEGF 的变化。本研究中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.5 MSCs 上清冻干粉获得 将第3代细胞扩增至 1×10^8 ,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°C 低温冰箱,将 -80°C 冻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°C 保存。使用前用生理盐水溶解, $0.22 \mu\text{m}$ 过滤器过滤,溶于2 mL生理盐水中,然后经尾静脉途径注射,每只大鼠注射 $100 \mu\text{L}$,另取 $100 \mu\text{L}$ 滴于皮肤溃疡处。

1.6 大鼠血清 TNF- α 水平检测 各组动物均于第5天行心脏静脉取血2 mL,立即低温分离血清,采用放射免疫试剂盒,按试剂盒说明书操作检测 TNF- α 水平。

1.7 大鼠溃疡组织中 TNF- α mRNA 及 VEGF mRNA 检测 应用 TRIzol 试剂提取组织总 RNA,根据试剂盒说明反转录合成 cDNA。TNF- α 上游引物序列:5'-CCCAATCTGTGTCCTTCTAACT-3';下游引物序列:5'-CAGCGTCTCGTGTGTTTCT-3';VEGF 上游引物序列:5'-TTTACTGCTGTACCTCCACC-3';VEGF 下游引物序列:5'-ATCTCTCCTATGTGCTG-GCTTT-3'。反应条件:94 $^\circ\text{C}$ 预变性3 min,变性30 s,60 $^\circ\text{C}$ 退火30 s,72 $^\circ\text{C}$ 延伸30 s,共29个循环,72 $^\circ\text{C}$ 再延伸10 min。PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳,采用快速凝胶成像系统拍摄电泳图谱条带,利用图像分析软件分析条带灰度值。

1.8 大鼠溃疡组织中 TNF- α 、VEGF 蛋白检测 取溃疡处皮肤组织,每100 mg组织加入1 mL细胞裂解液与蛋白磷酸酶混合物(99:1, v/v)液氮研磨,4 $^\circ\text{C}$ 下 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心20 min,去上清即为总蛋白。取部分上清液加入聚丙烯酰胺凝胶电泳蛋白

上样缓冲液混匀,沸水浴5 min,冰上冷却,蛋白变性, -20°C 保存。以聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,用湿转法转移至聚偏二氟乙烯膜上, $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱脂牛奶封闭1 h,分别加一抗 TNF- α 多克隆抗体或 VEGF 多克隆抗体,4 $^\circ\text{C}$ 过夜。三羟甲基氨基甲烷缓冲液冲洗后,分别与辣根酶标记的山羊抗兔/小鼠 IgG 抗血清(1:12 000)室温震荡孵育2 h,暗室内 X 线片曝光显影,扫描仪扫描底片,分析目的条带的灰度值。以目的条带与甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)灰度值之比作为目的基因蛋白的表达。

1.9 统计学处理 应用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,数据以均数 \pm 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 3组大鼠血清 TNF- α 水平比较 模型组、单纯培养基冻干粉治疗组和 MSCs 上清冻干粉治疗组血清 TNF- α 水平分别为(29.1 ± 3.3)、(27.1 ± 6.8)和(20.1 ± 5.7) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。MSCs 上清冻干粉治疗组大鼠血清 TNF- α 水平显著低于模型组和单纯培养基冻干粉治疗组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);模型组与单纯培养基冻干粉治疗组大鼠血清 TNF- α 水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 3组大鼠皮肤溃疡组织中 TNF- α 和 VEGF mRNA 及蛋白表达情况 结果见表1。MSCs 上清冻干粉治疗组大鼠溃疡组织中 TNF- α mRNA 及蛋白表达低于模型组和单纯培养基冻干粉治疗组,差异有统计学意义($P < 0.05$);MSCs 上清冻干粉治疗组大鼠溃疡组织中 VEGF mRNA 及蛋白的表达高于模型组和单纯培养基冻干粉治疗组,差异有统计学意义($P < 0.05$);模型组大鼠溃疡组织中 TNF- α 、VEGF mRNA 及其蛋白表达与单纯培养基冻干粉治疗组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

表1 3组大鼠溃疡组织中 TNF- α 和 VEGF mRNA 及蛋白表达

| 组别 | n | TNF- α mRNA | TNF- α 蛋白 | VEGF mRNA | VEGF 蛋白 |
|---------------|----|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 模型组 | 10 | 0.69 \pm 0.08 | 0.57 \pm 0.07 | 0.34 \pm 0.11 | 0.39 \pm 0.11 |
| 单纯培养基冻干粉治疗组 | 10 | 0.66 \pm 0.11 | 0.51 \pm 0.12 | 0.37 \pm 0.09 | 0.41 \pm 0.19 |
| MSCs 上清冻干粉治疗组 | 10 | 0.37 \pm 0.09 ^{ab} | 0.34 \pm 0.17 ^{ab} | 0.68 \pm 0.15 ^{ab} | 0.73 \pm 0.22 ^{ab} |

注:与模型组比较^a $P < 0.05$;与单纯培养基冻干粉治疗组比较^b $P < 0.05$ 。

3 讨论

DSU 是较常见的糖尿病微血管病变之一,是糖尿病较为严重的并发症,迄今仍缺乏有效的防治方

法。糖尿病周围神经病变、血管病变和感染是导致 DSU 的3大要素^[9-10]。血管病变导致血液循环障碍,局部组织呈慢性缺氧缺血状态,导致溃疡难以愈合,临床处理不当可造成严重后果,甚至截肢,严重

威胁糖尿病患者的生活质量。近年来,干细胞技术的不断进步为 DSU 患者带来了新的希望。

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^[11],可用于同种甚至异种细胞移植。有文献报道,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(interleukin, IL)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^[8,12-14]。

DSU 患者由于血运不佳,无论是缺损区域炎症反应控制,还是血运重建及血管再生均是临床处理的难题。干细胞技术的出现和发展为此类患者带来了新的希望。TNF- α 可促使多种炎性介质释放,引起炎症反应的级联放大效应^[10],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 IL-1、IL-6 等的释放构成炎性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,放大炎症反应。MSCs 具有免疫抑制的活性,可分泌多种抗炎细胞因子,对机体免疫反应的动态调控有重要的意义。本实验证实, MSCs 的冻干粉可有效控制或抑制 TNF- α , 无疑对 DSU 具有重要的意义。

VEGF 是唯一对血管形成具有特异性的重要生长因子,可在体内诱导血管新生^[15], VEGF 的上调在一定意义上可加速 DSU 附近血管新生和生成,利于血供重建。本研究结果显示,脐带 MSCs 上清冻干粉可有效抑制溃疡处皮肤组织中 TNF- α 的表达,同时又可上调 VEGF 的表达,其对抑制炎症的进展和促进 DSU 血管再生和重建有着重要意义。MSCs 对组织的修复是通过“旁观者效应”实现的。MSC 受到损伤/炎症信号的趋化向损伤局部迁移,并优先选择通过释放营养因子和抗凋亡分子来刺激并修复受损伤部位的组织细胞,而不是直接横向分化为受损细胞。本课题组证实,使用 MSCs 上清冻干粉同样可以起到抗炎和促进血管生成的作用,不涉及伦理问题,易于实现规范化和产业化管理,且容易操控,潜力巨大。

参考文献:

- [1] 李晶艳,周琦,吕红彬. 糖尿病早期视网膜神经元退行性病最新研究进展[J]. 眼科新进展,2015,35(5):493-496.
- [2] 沈盛县,严宏. 糖尿病性白内障与视网膜病变联合治疗的时机和策略[J]. 眼科新进展,2015,35(8):791-794.
- [3] 张云华,陆汉军. 2型糖尿病及其并发症中西医结合诊疗与预防[M]. 武汉:华中科技大学出版社,2009:1-2.
- [4] 蔡丽萍,孟然,张宏. 眼局部应用骨髓间充质干细胞(BMSC)治疗小鼠干眼的实验研究[J]. 眼科新进展,2016,36(11):1024-1028.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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]. *Genet Mol Res*, 2015, 14 (4): 19005-19015.
- [9] 张永文,张洁,吴秉司,等. 丹参酮 II A 磺酸钠注射液治疗糖尿病足疗效观察 [J]. 新乡医学院学报,2016,33(2):142-144, 147.
- [10] 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.
- [11] 杨汉华,陈元国,赖秀蓝,等. 六个转录因子将人脐带间充质干细胞高效重编程为诱导性多能干细胞的实验研究 [J]. 中华实用儿科临床杂志,2014,29(17):1331-1336.
- [12] CAPLAN A L. Mesenchymal stem cells [J]. *Orthop Res*, 1991, 9(5):641-650.
- [13] HE H, ZHAO Z H, HAN F S, et al. Overexpression of protein kinase C ϵ improves retention and survival of transplanted mesenchymal stem cells in rat acute myocardial infarction [J]. *Cell Death Disease*, 2016, 7(1): e2056.
- [14] LEE R H, PULIN A A, SEO M J, et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6 [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 5(1): 54-63.
- [15] 常丽,刘卓,王玉平,等. 闭塞性细支气管炎患儿血清血管内皮生长因子的表达及其与病程的相关性 [J]. 中华实用儿科临床杂志,2016,31(12):947-948.

(本文编辑:孟月 英文编辑:孟月)