

脂肪干细胞调节创面炎症反应并促进创面愈合

董 瑶 董飞君 李幼华

摘 要 **目的** 利用脂肪组织来源的干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)促进创面愈合并初步探讨其机制。**方法** 采用胶原酶消化 GFP 转基因小鼠(GFP-C57BL)腹股沟处脂肪组织,获得 ADSCs,并在体外证明其具有成骨和成脂的多向分化能力。14 只 C57BL 小鼠随机分为两组并制作创面,实验组注射 PBS 缓冲液悬浮的 ADSCs,对照组注射相同体积的 PBS 缓冲液。观察并分析创面愈合情况,通过荧光显微镜观察移植细胞的存活情况,利用 real-time PCR 检测创面组织中促炎因子白细胞介素-1(IL-1)、白细胞介素-6(IL-6)、单核细胞趋化蛋白-1(TCP-1)以及抗炎因子白细胞介素-10(IL-10)的表达。**结果** 分离的细胞具有较强的增殖能力,并具有多向分化潜能。同种异体移植 ADSCs 可以显著促进创面的愈合速度。移植两周后,荧光显微镜观察创面区域有少量 ADSCs 存活。与对照组相比,实验组小鼠的创面组织中促炎因子 IL-1、IL-6 和 TCP-1 表达下降,抗炎因子 IL-10 表达上升。**结论** 通过同种异体局部注射 ADSCs 可以显著促进皮肤创面的愈合,其机制可能与 ADSCs 降低了创面局部的炎症反应相关。

关键词 脂肪干细胞 皮肤创伤愈合 炎症

Adipose-derived Stem Cells Modulate Inflammation During Wound Healing and Enhance Wound Repair. Dong Yao, Dong Feijun, Li Youhua. Ningbo No. 2 Hospital, Zhejiang 315010, China

Abstract Objective To investigate the feasibility of adipose derived stem cells (ADSCs) from GFP-C57BL mouse for wound repair and explore the mechanism. **Methods** ADSCs were isolated from groin adipose tissue of GFP-C57BL mice. The differentiation potential of ADSCs was investigated. Fourteen C57BL mice were randomly divided into two groups; experimental group was treated with ADSCs suspended in PBS, and control group was treated with the same volume of PBS without ADSCs. Wound repair and the survival of ADSCs were observed and analyzed. Real-time PCR was used to investigate the effect of ADSCs on inflammation during wound repair. **Results** The cultivated ADSCs had the ability to proliferate continuously and showed characteristics of multi-potent mesenchymal stem cells. Allogeneic transplantation of ADSCs significantly enhanced wound repair. After two weeks of transplantation, a small number of ADSCs were observed using a fluorescence microscope. ADSCs inhibited the RNA expression of interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) and monocyte chemoattractant protein-1 (TCP-1) and promoted the RNA expression of IL-10 in wound area. **Conclusion** Allogeneic transplantation of ADSCs could enhance wound repair, which may be due to their regulation effect on inflammation during wound repair.

Key words Adipose tissue derived stem cells; Skin wound healing; Inflammation

皮肤是人体最大的器官,大面积的皮肤缺损和难愈性创面会导致皮肤功能的丧失,其治疗也是临床上的难题。临床治疗中采用的各种自体皮片或皮瓣移植修复,会造成供区新的创伤。同时,供皮来源的问题也限制了其有效的应用。近年来,干细胞相关机制及应用的研究为皮肤创伤的治疗带来了新的突破。研究表明,间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)能够促进皮肤创面的愈合,其机制包括分化为皮肤组织相关细胞^[1]、促进成纤维细胞的增殖^[2]、促进创面血管化^[3]等,但其相关机制仍需要进一步阐明。本研究利用 GFP-C57BL 小鼠脂肪组织来源的干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)用于小鼠皮肤创伤的治疗,并探讨 ADSCs 是否通过调节创

面局部的炎症反应促进创面愈合。

材料与方法

1. 材料:DMEM(L)培养基、胰酶、I型胶原酶胎牛血清、TRIzol Reagent(均购自美国 Gibco 公司),反转录试剂盒(Takara 公司),超净工作台(苏州净化总厂),CO₂培养箱(德国 Heraeus 公司),倒置显微镜、荧光显微镜(日本 Olympus 公司)。

2. GFP 小鼠脂肪组织来源干细胞(ADSCs)的分离、培养、鉴定:取 5 周龄 GFP 转基因小鼠(GFP-C57BL)2 只,10g/L 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,75%乙醇消毒腹股沟处,无菌条件下取腹股沟部的脂肪组织约 1ml,去除血管及其他组织,用青、链霉素的 PBS 反复冲洗以除去血液。用剪刀将脂肪组织剪成 1mm³ 小块,置于 2.5ml I 型胶原酶中,37℃ 摇床 100r/min 消化 50min,然后 800r/min 离心 5min,弃去上层的脂肪及上清,沉淀用含 100ml/L 胎牛血清的 DMEM(L)培养基制成单细胞悬液,进行细胞计数,以 2×10^5 /ml 的密度接种于培养瓶中,置于 37℃、50ml/L CO₂,培养箱中常规培养,原代培养 2 天后换

液,细胞长满 80% 时用胰酶和 EDTA 消化传代培养。

3. ADSCs 体外向脂肪细胞和成骨细胞的诱导分化:取第 3 代 GFP-ADSCs 细胞接种于 6 孔板内,用含 100 ml/L FBS 的 DMEM(L)培养基培养,达到 80% 融合后分为实验组和对照组,实验组分别更换成脂和成骨诱导液诱导培养。向成骨细胞的诱导:实验组细胞培养板中加入成骨诱导液培养(含 $50\mu\text{mol/L}$ 抗坏血酸、 10mmol/L 的 β -磷酸甘油钠、 $0.01\mu\text{mol/L}$ 的维生素 D_3 及 100ml/L FBS 的 DMEM/F12 培养基),3~4 天换液 1 次。培养 21 天时,取部分细胞爬片行茜素红钙盐染色观察矿化结节的形成。向脂肪细胞的诱导:实验组细胞换用成脂诱导液培养(含 $1\mu\text{mol/L}$ 地塞米松、 $10\mu\text{mol/L}$ 牛胰岛素、 $200\mu\text{mol/L}$ 吡嗪美辛、 $0.5\mu\text{mol/L}$ 的 IBMX、10% FBS 的 DMEM/F12 培养基),观察细胞形态变化,21 天后用 4% 多聚甲醛固定,油红 O 染色。

4. 动物移植实验:2 月龄 C57BL14 只,按随机数字法分为两组:ADSCs 注射组(实验组)及对照组。于实验前 10g/ml 戊巴比妥钠麻醉,在小鼠背部左右两侧分别制备 1 个直径为 1cm 的圆形创面,完整去除全层皮肤。将 5×10^5 个 ADSCs 混悬于 $500\mu\text{l}$ PBS 注射入实验组小鼠创面周围, $500\mu\text{l}$ 单纯 PBS 注射入对照组小鼠创面周围。术后凡士林油纱布包扎。

5. 创面愈合情况的观察和分析:记录并比较分析各组 1、2、3 周创面愈合情况的差异,创面局部照片通过 Image J 软件分析创面愈合率。

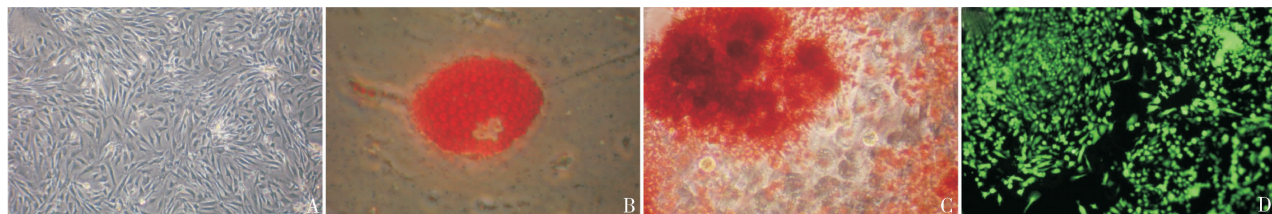


图 1 ADSCs 的培养及鉴定

A. ADSCs 在光学显微镜下的形态($\times 40$);B. ADSCs 向成脂方向分化,出现油红 O 阳性的脂滴($\times 400$);

C. ADSCs 向成骨方向分化,出现茜素红阳性的钙化结节($\times 400$);D. ADSCs 在荧光显微镜下观察呈绿色荧光($\times 40$)

2. ADSCs 促进创面愈合及在创面区域的存活:ADSCs 移植后 2 周,实验组较对照组愈合情况更为良好(图 2A、B)。利用 Image J 软件分析 1~3 周创面局部照片计算创面愈合率,在第 1 周和第 2 周,ADSCs 显著促进了实验组创面愈合率(图 2C),在第 3 周时实验组与对照组的愈合率没有显著性差异。通过荧光显微镜观察移植后 2 周创面区域组织的冷冻切片,发现只有少量移植 ADSCs 的存活(图 2D~F)。

3. ADSCs 调节创面愈合过程中的炎症反应:取 1 周和 2 周创面区域组织进行 real-time PCR 分析,结果显示在上述两个时间点,与对照组相比,实验组创面区域组织中炎症因子 IL-1、IL-6 显著下降(图 3A、B);MCP-1 在第 1 周时显著下降,第 2 周时与对

6. 荧光显微镜观察:取移植后 2 周实验组与对照组动物创面组织的冷冻切片,用丙酮固定 10min 后置于湿盒中,PBS 冲洗后,Hoechst33342 衬染 5min。荧光显微镜观察移植细胞的存活情况。

7. Real-time RT-PCR 检测创面组织中炎症因子的表达:分别取移植后 1、2 周实验组与对照组动物创面区域组织,液氮冷冻环境下研磨,加入细胞裂解液(Trizol Reagent),常规方法提取 RNA、反转录。IL-1、IL-6、MCP-1 和 β -actin 的引物由 Takala 公司设计及合成。采用 Toyobo 公司荧光定量 PCR 试剂盒,real-time RT-PCR 反应由 Light Cycler Instrument(Toyobo 公司)完成,RNA 相对表达量的分析方法为相对 C_T 法, β -actin 设为内参。

8. 统计学方法:实验数据采用 SPSS 13.0 软件进行 t 检验分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,

结 果

1. ADSCs 的分离培养和鉴定:第 1 代 ADSCs 在倒置显微镜下观察呈小多角形或短梭形并存在一些脂滴(图 1A),经传代后脂滴减少。细胞持续表达 GFP 蛋白,在荧光显微镜下呈绿色荧光(图 1D)。在成脂及成骨诱导环境下,ADSCs 可向成脂及成骨方向分化,出现油红 O 阳性的脂滴(图 1B)及茜素红阳性的矿化结节(图 1C),证明其具有多向分化潜能。

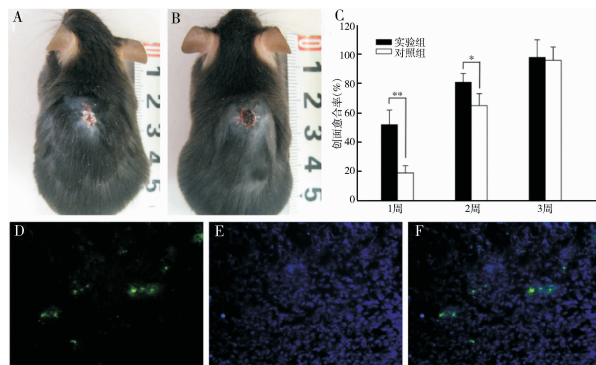


图 2 ADSCs 促进创面愈合及在创面周围的存活

A. 实验组在 ADSCs 移植后 2 周的愈合情况;B. 对照组术后 2 周的愈合情况;C. 实验组及对照组在 1~3 周愈合率的比较;D. 存活的 ADSCs(绿色)($\times 100$);E. Hoechst33342 衬染显示组织内的细胞核(蓝色)($\times 100$);F. D 和 E 合并后的图片($\times 100$);

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

照组无显著性差异(图 3C)。与对照组相比,实验组中抑制炎症发生的因子 IL-10 在上述两个时间点均

有显著上升(图 3D)。

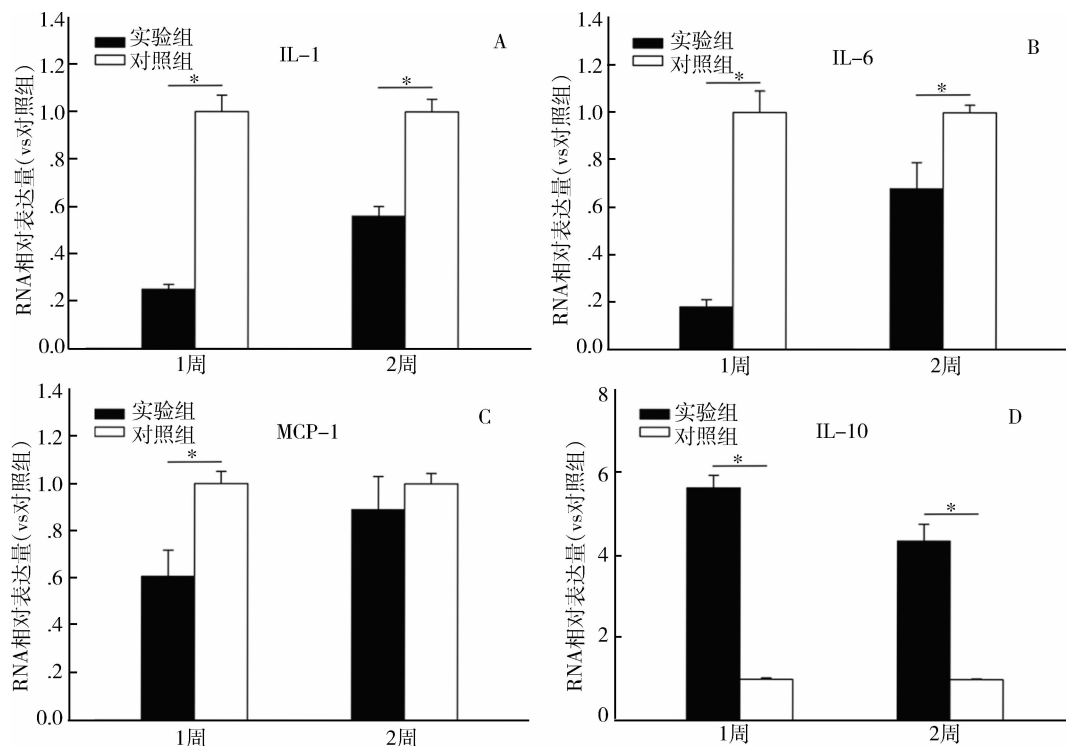


图 3 ADSCs 对创面愈合过程中(1、2 周)炎症因子 IL-1(A)、IL-6(B)、MCP-1(C)和 IL-10(D)表达的影响(* $P < 0.01$)

讨 论

如何获得足够数量的可以应用于治疗的干细胞一直是干细胞应用过程面对的难题。胚胎干细胞具有分化为人体各种类型细胞的潜能,但是其应用一直受到伦理学的限制。成体干细胞,尤其是 MSCs 的应用,受到了广泛的关注。MSCs 具有自我更新及多向分化潜能,其应用不受伦理学限制。目前研究最为深入的 MSCs 为骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs),然而 BMMSCs 需要从骨髓中获取,其应用也受到一定的限制。2001 年 Zuk PA 和 Zhu Min 从人抽脂术中抽取的脂肪组织悬液中第一次分离获得了具有多向分化潜能的干细胞,能向脂肪细胞、软骨细胞、成骨细胞及肌肉细胞等定向诱导分化^[4-6]。脂肪组织中干细胞含量远远高于骨髓中的干细胞含量,而且人脂肪组织获取较为容易,可以从抽脂手术中获取大量的脂肪组织。因此,脂肪干细胞可以作为人干细胞库的重要来源,有非常重要的研究和应用价值。本研究中成功从 GFP-C57BL 小鼠腹股沟脂肪组织中获取 ADSCs,其具有成脂及成骨多向分化潜能,并能持续表达 GFP 蛋白,为体内干细胞的示踪提供很好的条件。

MSCs 促进皮肤创面愈合的机制一直受到广泛的关注,研究表明 MSCs 可通过分化为皮肤相关细胞、促进成纤维细胞的增殖、促进创面血管化^[3]等途径促进皮肤创面的愈合,而另外存在的机制仍需要进一步研究^[1-3]。MSCs 具有免疫调节和炎症调节能力,能够抑制过度发生的炎症,缓解炎症相关疾病发生的程度^[7]。有大量的研究表明,胚胎期皮肤愈合是低炎症环境下发生的,愈合速度较成体皮肤快,并且不会有瘢痕的形成^[8];同时,创面炎症程度的适当减弱以及某些炎性细胞的缺失也能够促进创面愈合的速度。基于上述研究背景可以推测, MSCs 有可能通过缓解创面局部的炎症反应促进创面的愈合。本研究发现,在创面术后 1 周和两周,ADSCs 可以显著抑制促炎因子 IL-1、IL-6 和 MCP-1 的表达,提示 ADSCs 缓解了创面局部炎症的发生。同时,ADSCs 促进了抗炎因子 IL-10 的表达,提示 ADSCs 是通过促进体内 IL-10 的表达调节炎症反应的。研究表明, BMMSCs 可在炎症环境下分泌前列腺素 E_2 (prostaglandin E_2 , PGE_2),后者可促进巨噬细胞分泌 IL-10。由此可以推测,ADSCs 植入体内后,在炎症环境诱导下分泌 PGE_2 , PGE_2 促进体内巨噬细胞分泌抗炎

因子 IL-10, IL-10 最终缓解了创面愈合过程中的炎症反应,进而愈合速度加快。

早期研究一般认为干细胞修复组织再生主要通过分化为组织相关细胞,参与新生组织的构建^[1,3]。近年来,越来越多的研究倾向于认为干细胞在移植后存活数量随时间急剧下降,极少量的细胞不会通过直接参与新生组织的构建促进组织再生,更有可能是通过改变局部微环境(如炎症)促进组织再生的。本研究同样证实了这一观点。利用本研究中获取 GFP-C57BL 小鼠来源的 ADSCs 持续表达 GFP 蛋白的特点,进行了细胞在体内失踪及存活情况的研究。结果表明,在细胞移植后 2 周,体内只有少量 ADSCs 存活,提示 ADSCs 可能是通过旁分泌作用缓解创面局部炎症反应,进而促进创面愈合。

参考文献

- Altman AM, Yan Y, Matthias N, *et al.* Human adipose - derived stem cells seeded on a silk fibroin - chitosan scaffold enhance wound repair in a murine soft tissue injury model [J]. *Stem Cells*, 2009, 27 (1):250 - 258

- Kim WS, Park BS, Sung JH, *et al.* Wound healing effect of adipose - derived stem cells;a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts [J]. *J Dermatol Sci*, 2007, 48(1):15 - 24
- Wu Y, Chen L, Scott PG *et al.* Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis [J]. *Stem Cells*, 2007, 25(10):2648 - 2659
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells[J]. *Mol Biol Cell*, 2002, (12):4279 - 4295
- Ogawa R, Wizuno H, Hyakusoku H. Chondrogenic and osteogenic differentiation of adipose - derived stem cells isolated from GFP transgenic mice [J]. *Nippon Med Sch*, 2004, 71(4):240 - 241
- 孙雅娟, 刘鲁川, 金岩, 等. 绿色荧光蛋白转基因小鼠脂肪间充质干细胞的多向分化潜能[J]. 第四军医大学学报, 2008, 29 (7):623 - 625
- Zhang Q, Shi S, Liu Y, *et al.* Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation - related tissue destruction in experimental colitis [J]. *J Immunol*, 2009, 183(12):7787 - 7798
- 吴国强, 李耀辉, 刘晓艳, 等. 兔胚胎皮肤伤口无瘢痕愈合机制研究[J]. 中国临床康复, 2004, 8(26):5574 - 5575

(收稿:2011-06-01)

(修回:2011-07-18)

月经中期血清雄激素水平对多囊卵巢综合征促排卵中妊娠预测作用研究

程 静 侯晓红 池海虹 黄永刚 陈益鲁 肖 宇 吕杰强

摘 要 目的 探讨围排卵期血清睾酮(testosterone, T)水平对氯米芬(clomiphene citrate, CC)抵抗的多囊卵巢综合征(PCOS)病人妊娠的预测作用。**方法** 60 名 CC 抵抗的 PCOS 病人随机分为 A 组和 B 组。A 组患者予以维生素 E 100mg; B 组患者予以二甲双胍 1000mg; 口服, 每日 2 次, 连续 3 个月作为预处理。随后 A 组患者予以二甲双胍(1000mg 口服, 每日 2 次)、CC、尿促性腺激素(HMG)、人绒毛膜促性腺激素(HCG)促排卵; B 组患者予以 CC/HMG/HCG 促排卵, 连续 3 个月。另选 30 名正常排卵妇女作为对照组(C 组)。促排卵周期及正常周期中测定患者排卵前后血清中生殖激素水平, 并对妊娠和非妊娠周期排卵前后生殖激素水平进行比较。**结果** 实验组 A、B 两组中共 56 人完成 141 治疗周期, A 组中临床妊娠、非妊娠周期排卵后血清睾酮(T)水平分别为 $0.74 \pm 0.11 \text{ ng/ml}$ 和 $0.95 \pm 0.16 \text{ ng/ml}$, 差异有显著意义($P = 0.001$); B 组中临床妊娠、非妊娠周期排卵后 T 分别为 $0.70 \pm 0.04 \text{ ng/ml}$ 和 $0.85 \pm 0.09 \text{ ng/ml}$, 差异有显著意义($P < 0.001$); C 组 30 个周期中妊娠和非妊娠者排卵后血清 T 分别为 $0.73 \pm 0.05 \text{ ng/ml}$ 和 $0.71 \pm 0.07 \text{ ng/ml}$, 差异无统计学意义($P > 0.05$); A、B 组妊娠周期排卵后 T 水平与正常组相比差异无显著性, 而非妊娠周期 A、B 组排卵后 T 水平显著高于 C 组($P < 0.001$)。**结论** 二甲双胍治疗的 CC 抵抗的 PCOS 病人, 排卵后血清 T 水平对妊娠具有一定的预测价值。

关键词 睾酮 多囊卵巢综合征 促排卵 妊娠

Prognostic Value of Testosterone for Pregnancy in the Midcycle During Treatment in Patients with Polycystic Ovary Syndrome. Cheng Jing, Hou Xiaohong, Chi Haihong, *et al.* Department of Obstetrics and Gynecology, Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325027, China

作者单位: 325000 温州医学院附属第二医院生殖健康中心

通讯作者: 吕杰强, 电子信箱: jieqianglu@126.com