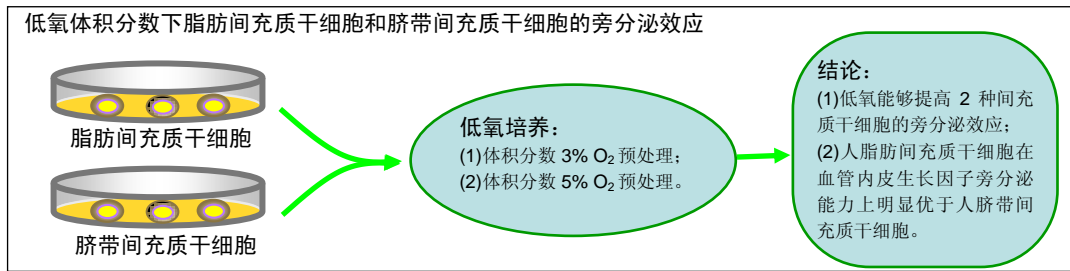


# 不同氧体积分数下脂肪间充质干细胞和脐带间充质干细胞的旁分泌能力

杨记农<sup>1</sup>, 姜亦瑶<sup>2,3</sup>, 袁超<sup>1,3</sup>, 刘志刚<sup>1</sup>, 刘晓程<sup>1</sup> (<sup>1</sup>中国医学科学院北京协和医学院, 泰达国际心血管病医院心外科, 天津市 300457; <sup>2</sup>蚌埠医学院第一附属医院心脏外科, 安徽省蚌埠市 233000; <sup>3</sup>南开大学, 天津市 300071)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0880 ORCID: 0000-0002-4649-1947(杨记农)

文章快速阅读:



杨记农, 中国医学科学院北京协和医学院, 泰达国际心血管病医院心外科, 天津市 300457

通讯作者: 刘晓程, 中国医学科学院北京协和医学院, 泰达国际心血管病医院心外科, 天津市 300457

中图分类号:R394.2

文献标识码:B

稿件接受: 2018-05-04



## 文题释义:

**旁分泌效应:** 细胞分泌某种细胞因子对邻近靶细胞(可以同种细胞也可以是异种细胞, 主要与内分泌长程效应相对)表现出的生物学作用。需要指出自身分泌效应是细胞产生因子再作用于自身细胞产生的生物学作用。

**血管内皮生长因子:** 是一种高度特异性的促血管内皮细胞生长因子, 具有促进血管通透性增加、细胞外基质变性、血管内皮细胞迁移、增殖和血管形成等作用。

## 摘要

**背景:** 间充质干细胞治疗急性心肌梗死的机制与间充质干细胞的迁移、定植和分化相关, 更重要的是间充质干细胞的旁分泌作用。

**目的:** 评估低氧体积分数下脂肪间充质干细胞和脐带间充质干细胞的旁分泌及促血管再生能力, 为选择合适的间充质干细胞应用于治疗急性心肌梗死提供依据。

**方法:** 分离并培养人脂肪间充质干细胞和人脐带间充质干细胞, 流式细胞术鉴定细胞的免疫表型; 2 种细胞按氧体积分数不同各分为体积分数 3% O<sub>2</sub> 预处理组、体积分数 5% O<sub>2</sub> 预处理组和体积分数 21% O<sub>2</sub> 对照组, 培养 24 h; 酶联免疫吸附法检测各组细胞上清液肝细胞生长因子、血管内皮生长因子、神经生长因子、角质细胞生长因子水平。

**结果与结论:** ①2 种间充质干细胞阳性表达 CD73、CD90、CD105, 阴性表达 CD34、CD45、CD54、HLA-DR; ②各氧体积分数条件下, 人脂肪间充质干细胞分泌血管内皮生长因子水平均显著高于人脐带间充质干细胞 ( $P < 0.01$ ); ③在体积分数 5% O<sub>2</sub> 条件下, 人脂肪间充质干细胞分泌肝细胞生长因子水平显著高于人脐带间充质干细胞 ( $P < 0.05$ ); ④在体积分数 3% O<sub>2</sub> 和体积分数 5% O<sub>2</sub> 条件下, 人脐带间充质干细胞分泌神经生长因子水平显著高于人脂肪间充质干细胞 ( $P < 0.01$ ); ⑤在体积分数 3% O<sub>2</sub> 和体积分数 5% O<sub>2</sub> 条件下, 人脐带间充质干细胞分泌角质细胞生长因子水平显著高于人脂肪间充质干细胞 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ), 在体积分数 21% O<sub>2</sub> 条件下, 人脂肪间充质干细胞分泌角质细胞生长因子水平显著高于人脐带间充质干细胞 ( $P < 0.01$ ); ⑥结果表明, 低氧能够提高 2 种干细胞旁分泌效应。人脂肪间充质干细胞在血管内皮生长因子旁分泌能力上明显优于人脐带间充质干细胞, 故认为人脂肪间充质干细胞可能更适合用于心肌梗死的干细胞治疗。

## 关键词:

急性心肌梗死; 脂肪间充质干细胞; 脐带间充质干细胞; 低氧; 旁分泌; 干细胞

## 主题词:

心肌梗塞; 脂肪组织; 脐带; 间质干细胞; 细胞低氧; 血管内皮生长因子类; 肝细胞生长因子; 神经生长因子; 组织工程

## 基金资助:

天津市滨海新区卫生局基金项目(2014BHKY010); 天津市企业博士后创新项目择优资助计划(2015-001); 安徽省高校优秀青年人才支持计划重点项目(GXYQZD2016167)

Yang Ji-nong, Department of Cardiac Surgery, TEDA International Cardiovascular Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300457, China

Corresponding author: Liu Xiao-cheng, Department of Cardiac Surgery, TEDA International Cardiovascular Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300457, China

## Paracrine abilities of adipose-derived mesenchymal stem cells and umbilical cord mesenchymal stem cells under different oxygen concentrations

Yang Ji-nong<sup>1</sup>, Jiang Yi-yao<sup>2,3</sup>, Yuan Chao<sup>1,3</sup>, Liu Zhi-gang<sup>1</sup>, Liu Xiao-cheng<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Department of Cardiac Surgery, TEDA International Cardiovascular Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300457, China; <sup>2</sup>Department of Cardiac Surgery, First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233000, Anhui Province, China; <sup>3</sup>Nankai University, Tianjin 300071, China)

## Abstract

**BACKGROUND:** Therapeutic mechanisms of mesenchymal stem cells for acute myocardial infarction are related to the migration, colonization, and differentiation of mesenchymal stem cells, and more importantly, it is related to the paracrine effects of mesenchymal stem cells.

**OBJECTIVE:** To evaluate the paracrine and vascular regeneration abilities of human adipose-derived mesenchymal stem cells (hAD-MSCs) and human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUC-MSCs) under low oxygen concentrations, thereby providing the basis for the selection of appropriate mesenchymal stem cells used in the treatment of acute myocardial infarction.

**METHODS:** hUC-MSCs and hAD-MSCs were isolated and cultured, and cell immunophenotype was identified using flow cytometry. Two kinds of cells were pretreated with 3%, 5% and 21% (control) O<sub>2</sub> for 24 hours. Enzyme linked immunosorbent assay was used to detect the contents of hepatocyte growth factor (HGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), nerve growth factor (NGF) and keratinocyte growth factor (KGF) in the cell supernatant in each group.

**RESULTS AND CONCLUSION:** hUC-MSCs and hAD-MSCs were positive for CD73, CD90 and CD105, and negative for CD34, CD45, CD54 and HLA-DR. Under different oxygen concentrations, the VEGF level in the hAD-MSCs was significantly higher than that in the hUC-MSCs ( $P < 0.01$ ). Under 3% O<sub>2</sub> conditions, the HGF level in the hAD-MSCs was significantly higher than that in the hUC-MSCs ( $P < 0.05$ ). Under 3% and 5% O<sub>2</sub>, the NGF level in the hUC-MSCs was significantly higher than that in the hAD-MSCs ( $P < 0.01$ ). Under 3% and 5% O<sub>2</sub>, the KGF level in the hUC-MSCs was significantly higher than that in the hAD-MSCs ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). Under 21% O<sub>2</sub>, the KGF level in the hAD-MSCs was significantly higher than that in the hUC-MSCs ( $P < 0.01$ ). To conclude, hypoxia can promote the paracrine effects of and hAD-MSCs. Moreover, hUC-MSCs show better paracrine ability than hAD-MSCs. Therefore, hAD-MSCs are more likely to be a stem cell therapy suitable for myocardial infarction.

**Subject headings:** Myocardial Infarction; Adipose Tissue; Umbilical Cord; Mesenchymal Stem Cells; Cell Hypoxia; Vascular Endothelial Growth Factors; Hepatocyte Growth Factor; Nerve Growth Factor; Tissue Engineering

**Funding:** the Health Bureau Fund Project of Binhai New Area, Tianjin, No. 2014BHKY010; Tianjin Enterprise Postdoctoral Innovation Funding Program, No. 2015-001; Anhui Provincial Young Talent Support Project for Universities, No. GXYQZD2016167

## 0 引言 Introduction

急性心肌梗死常见的死亡原因是心力衰竭, 另外心律失常、休克也常常是急性心肌梗死导致死亡的原因<sup>[1]</sup>。急性心肌梗死是冠状动脉急性、持续性缺血缺氧所引起的心肌坏死。存活心肌细胞长时间的超负荷工作以及慢性高血压疾病最终会引起心力衰竭<sup>[2-3]</sup>, 近年来干细胞移植作为一种新型治疗急性心肌梗死的方案, 较其他常规治疗手段更具潜力。

间充质干细胞具有免疫原性低, 可以异体移植<sup>[4]</sup>, 并且能够为受损心肌细胞提供生长因子等优势<sup>[5-6]</sup>, 成为目前常用于细胞移植治疗的组织工程种子细胞。目前用于治疗急性心肌梗死的间充质干细胞以骨髓间充质干细胞、脂肪间充质干细胞为主, 从小动物实验到大动物实验, 还有早期临床试验, 都证实间充质干细胞治疗心肌梗死的有效性<sup>[7]</sup>。间充质干细胞治疗急性心肌梗死的机制与间充质干细胞的迁移、定植和分化相关, 更重要的是间充质干细胞的旁分泌作用。

实验比较低氧体积分数下脂肪间充质干细胞和脐带间充质干细胞旁分泌肝细胞生长因子、血管内皮生长因子、神经生长因子、角质细胞生长因子水平, 从而初步评估二者在低氧条件下的旁分泌及促血管再生能力, 为筛选最佳干细胞应用于治疗急性心肌梗死提供参考。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外对比观察实验。

1.2 材料 低氧细胞培养箱(Thermo Scientific公司); 流式细胞仪(美国Becton Dickinson公司); 酶标仪(TECAN公司); 肝细胞生长因子、血管内皮生长因子、神经生长因子、角质细胞生长因子的ELISA试剂盒(北京嘉美生物); 单克隆抗体 PE-CD31、PE-CD45、PE-CD54、PE-CD73、

PE-CD90、PE-CD105、PE-HLA-DR、PE-IgG1(美国BD Biosciences公司)。

### 1.3 实验方法

1.3.1 脂肪间充质干细胞的分离与培养 患者知情同意后, 经吸脂术获取脂肪组织并剪除组织中明显的血管。用含有2 mL双抗(100 U/mL青霉素, 1 g/mL链霉素)的200 mL D-Hank's清洗组织两三次后剪碎。将剪碎的组织通过150目尼龙筛网过滤, 用含有DNase I (40 U/50 mL)和250 mg/L两性霉素的D-Hank's冲洗滤网上的组织。将组织加入D-Hank's中, 并以1 500 r/min离心5 min, 将上清转移至离心管中, 加入含有0.5%胶原酶I的等体积D-Hank's, 在37 °C恒温振荡器上振荡约75 min后, 以1 800 r/min离心5 min, 弃上清, 加入含有体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养基, 调整每个T75 cm<sup>2</sup>培养瓶中的细胞数约为2×10<sup>6</sup>, 置入37 °C, 体积分数为5% CO<sub>2</sub>孵箱中培养, 约24 h后, 将未贴壁的细胞移除, 7-10 d后瓶中细胞增殖并铺满瓶底, 待融合率达到80%, 以0.25%胰蛋白酶-0.01%EDTA消化, 所得细胞为原代细胞, 继续培养, 每3 d换液1次, 当细胞融合率达80%时, 用0.25%胰蛋白酶消化、传代。

1.3.2 脐带间充质干细胞的分离与培养 脐带来源于行剖腹产术的健康初产妇, 经产妇及家属同意, 在手术室无菌条件下采集脐带, 置于含生理盐水的无菌瓶中。清洗剪碎脐带的方法同脂肪, 用200目滤网过滤脐带组织, 获得直径约1 mm的脐带组织块, 经含有双抗的D-Hank's清洗后, 将组织块接种在T75 cm<sup>2</sup>培养瓶, 放置于恒温培养箱内静置2 h, 待组织块贴壁比较牢固后, 添加含体积分数为10%胎牛血清、100 U/mL双抗、1%谷氨酰胺与10 μg/L表皮生长因子的DMEM/F12完全培养液, 置于恒温培养箱内继续培养, 5 d后贴壁细胞铺满约80%, 以0.25%胰蛋白

酶-0.01%EDTA消化, 所得细胞为原代细胞。

**1.3.3 干细胞免疫表型鉴定** 收集生长状态良好的脂肪间充质干细胞和脐带间充质干细胞, 经胰酶消化后, 用含0.5% BSA的PBS冲洗。将细胞悬液加入8个1.5 mL的EP管中, 每管待测细胞数 $\geq 10^5$ 。在EP管中分别加入一抗CD34, CD45, CD54, CD71, CD73, CD90, CD105和HLA-DR, 以及IgG-PE的同型对照抗体各4  $\mu\text{L}$ , 充分混匀, 4  $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30 min, 2 000 r/min离心1 min, 弃上清, 用1 mL PBS洗涤1次, 弃上清, 40 g/L多聚甲醛400  $\mu\text{L}$ 重悬, 移至流式上样管, 上机检测。

**1.3.4 实验分组及低氧处理** 将2种干细胞传代至第4代, 使细胞融合达50%, 更换培养基, 分别按以下分组调整氧体积分数: 体积分数为3%  $\text{O}_2$ 预处理组(体积分数为3%  $\text{O}_2$ , 体积分数为5%  $\text{CO}_2$ , 体积分数为92%  $\text{N}_2$ ), 体积分数为5%  $\text{O}_2$ 预处理组(体积分数为5%  $\text{O}_2$ , 体积分数为5%  $\text{CO}_2$ , 体积分数为90%  $\text{N}_2$ )组, 对照组(体积分数为5%  $\text{CO}_2$ , 体积分数为95%空气)。在上述氧环境中培养24 h。

**1.3.5 酶联免疫吸附法检测肝细胞生长因子、血管内皮生长因子、神经生长因子、角质细胞生长因子水平** 经低氧环境培养24 h后, 收集各组细胞上清液备用。参照试剂盒说明操作, 试剂盒中的96孔酶标孔板已被肝细胞生长因子、血管内皮生长因子、神经生长因子、角质细胞生长因子多抗包被, 将酶标板置于4  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内过夜, PBS洗3次; 每孔加入1%BSA 200  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  1 h, PBS洗3次; 每孔加入100  $\mu\text{L}$ 以上处理的待测样本, 4  $^{\circ}\text{C}$ 过夜, PBS冲洗3次; 每孔加入100  $\mu\text{L}$ 小鼠抗人肝细胞生长因子、血管内皮生长因子、神经生长因子、角质细胞生长因子单抗(用1%BSA的PBS稀释成4 mg/L), 37  $^{\circ}\text{C}$  1 h, PBS洗3次; 每孔加入OPD底物液100  $\mu\text{L}$ , 室温10-15 min; 每孔加入1 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  50  $\mu\text{L}$ 终止反应; 在450 nm处测定吸光度值。根据标准曲线计算肝细胞生长因子、血管内皮生长因子、神经生长因子、角质细胞生长因子水平。

**1.4 主要观察指标** 脂肪间充质干细胞与脐带间充质干细胞的形态、免疫表型和肝细胞生长因子、血管内皮生长因子、神经生长因子、角质细胞生长因子蛋白分泌量。

**1.5 统计学分析** 应用SPSS 19.0统计软件进行统计处理。计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 同一氧体积分数下2种干细胞分泌肝细胞生长因子、血管内皮生长因子、神经生长因子、角质细胞生长因子水平的比较用 $t$ 检验, 同一种细胞不同氧体积分数组间若方差齐则采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 组间两两比较采用LSD法。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义,  $P < 0.01$ 为差异有非常显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 脂肪间充质干细胞与脐带间充质干细胞的形态** 原代细胞在24-48 h内, 少量细胞开始贴壁, 呈梭形, 多角形分布; 5-7 d可见贴壁细胞数量增多; 7-10 d融合率达80%

以上, 12 d左右细胞密度增高。按1:2-1:3的比例传代, 传代细胞于接种后4-6 h迅速贴壁, 最初为短粗的梭形或卵圆形。随后, 细胞展开呈梭形、多角形, 细胞均匀分布, 可呈片状融合, 低倍镜下细胞排列紧密, 具有方向性, 杂质细胞明显减少。经传代扩增, 细胞形态不变(图1)。

**2.2 脂肪间充质干细胞与脐带间充质干细胞的免疫表型鉴定结果** 脂肪间充质干细胞与脐带间充质干细胞的免疫表型表达具有共性, 即CD73、CD90、CD105呈阳性表达, 而CD34、CD45、CD54、HLA-DR为阴性表达。

**2.3 脂肪间充质干细胞与脐带间充质干细胞的肝细胞生长因子、血管内皮生长因子、神经生长因子、角质细胞生长因子蛋白分泌量** 在低氧环境下, 2种干细胞的血管内皮生长因子分泌均呈现增高趋势。在脂肪间充质干细胞中, 与对照组相比, 体积分数为3%  $\text{O}_2$ 预处理组血管内皮生长因子蛋白分泌量差异有非常显著性意义( $P < 0.01$ )。在脐带间充质干细胞中, 与对照组相比, 体积分数为3%  $\text{O}_2$ 预处理组血管内皮生长因子蛋白分泌量同样差异有非常显著性意义( $P < 0.01$ )。在体积分数为3%  $\text{O}_2$ 条件下, 脂肪间充质干细胞与脐带间充质干细胞的血管内皮生长因子蛋白分泌量差异有非常显著性意义( $P < 0.01$ ), 在体积分数为5%  $\text{O}_2$ 条件下, 脂肪间充质干细胞与脐带间充质干细胞的血管内皮生长因子蛋白分泌量差异有非常显著性意义( $P < 0.01$ ), 见表1, 图2A。

在低氧环境下, 2种干细胞的肝细胞生长因子分泌均呈现增高趋势。在脂肪间充质干细胞中, 与对照组相比, 体积分数为3%  $\text{O}_2$ 预处理组肝细胞生长因子蛋白分泌量差异有非常显著性意义( $P < 0.01$ )。在脐带间充质干细胞中, 与对照组相比, 体积分数为3%  $\text{O}_2$ 预处理组肝细胞生长因子蛋白分泌量同样差异有非常显著性意义( $P < 0.01$ )。在体积分数为5%  $\text{O}_2$ 条件下, 脂肪间充质干细胞与脐带间充质干细胞的肝细胞生长因子蛋白分泌量差异有显著性意义( $P < 0.05$ ), 见表2, 图2B。

在低氧环境下, 脐带间充质干细胞的神经生长因子分泌呈现增高趋势, 与对照组相比, 体积分数为3%  $\text{O}_2$ 预处理组神经生长因子蛋白分泌量差异有非常显著性意义( $P < 0.01$ )。在体积分数为3%  $\text{O}_2$ 条件下, 脂肪间充质干细胞与脐带间充质干细胞的神经生长因子蛋白分泌量差异有非常显著性意义( $P < 0.01$ ), 在体积分数为5%  $\text{O}_2$ 条件下, 脂肪间充质干细胞与脐带间充质干细胞的神经生长因子蛋白分泌量差异有非常显著性意义( $P < 0.01$ ), 见表3, 图2C。

在低氧环境下, 脐带间充质干细胞的角质细胞生长因子分泌呈现增高趋势, 与对照组相比, 体积分数为3%  $\text{O}_2$ 预处理组角质细胞生长因子蛋白分泌量差异有非常显著性意义( $P < 0.01$ )。在体积分数为3%  $\text{O}_2$ 条件下, 脂肪间充质干细胞与脐带间充质干细胞的角质细胞生长因子蛋白分泌量差异有非常显著性意义( $P < 0.01$ ), 在体积分数为5%  $\text{O}_2$ 条件下, 脂肪间充质干细胞与脐带间充质干细胞的角质细

胞生长因子蛋白分泌量差异有显著性意义( $P < 0.05$ ), 见表4, 图2D。

### 3 讨论 Discussion

近年来尽管药物、介入治疗、外科手术和器官移植等都取得了重大进展, 受损心肌的恢复和再生仍然是一个巨大的挑战。干细胞治疗受损心肌仍然吸引着许多学者的兴趣, 许多研究证实了干细胞移植治疗心肌梗死仍然是一项非常有潜力的治疗方式<sup>[8-10]</sup>, 这一治疗方式的作用机制尚不完全明确, 近年来旁分泌效应是干细胞治疗疾病的主要机制得到人们的共识。Boullier等<sup>[11]</sup>发现, 在低氧条件下(体积分数为1% O<sub>2</sub>), 血管内皮生长因子、肝细胞生长因子、LYVE-1等成血管因子基因表达量增高。另外, 抗炎因子白细胞介素1、白细胞介素6和白细胞介素10的基因表达在低氧条件下也得到上调<sup>[11-12]</sup>。因此, 低氧条件下培养干细胞可明显提高各种细胞因子的表达, 对促进组织血管再生、抑制炎症反应都有明显效果。实验通过对比低氧条件下脂肪间充质干细胞和脐带间充质干细胞的细胞因子表达与分泌, 再次证实低氧培养可以提高干细胞的旁分泌效应。

目前以骨髓间充质干细胞为主的研究都证实干细胞移植治疗心肌梗死的有效性, 但骨髓标本的获取是一个痛苦、有创伤、易污染的过程, 获取所需的骨髓有一定的困难。与骨髓间充质干细胞相比, 皮下脂肪含量十分丰富, 提取方便, 脂肪间充质干细胞可以分泌具有生物活性的血管内皮生长因子、肝细胞生长因子等多种促进血管新生的因子<sup>[13]</sup>。Cai等<sup>[14]</sup>研究表明脂肪间充质干细胞能够分泌碱性成纤维细胞生长因子来维持体外的自我更新能力。人脐带间充质干细胞的原料来源于医学废弃物, 没有伦理和法律的限制, 不会给供者带来痛苦, 能够在体外相对容易的扩增出足够数量的干细胞, 更低的免疫原性适合同种异体移植, 这些特点使其成为最近研究的热门<sup>[15-16]</sup>。实验初步比较了脂肪间充质干细胞和脐带间充质干细胞在旁分泌各种细胞因子能力上的差异。

血管内皮生长因子是目前为止在促血管再生方面研究最多的一种细胞因子。血管内皮生长因子能提高血管通透性, 从而促进纤维蛋白原和其他血浆蛋白外渗, 有利于新生毛细血管网的形成。血管内皮生长因子通过诱导基质蛋白酶的表达诱导内皮细胞迁移。血管内皮生长因子作为促血管再生非常重要的细胞因子, 能高度特异地作用于血管内皮细胞的有丝分裂原, 能促使动静脉和淋巴管的内皮细胞分裂增生, 但对其他细胞没有促有丝分裂作用<sup>[17]</sup>。Kalka等<sup>[18]</sup>研究证实血管内皮生长因子对动员内皮祖细胞, 促进缺血心肌的再血管化有重要作用。Guzman等<sup>[19]</sup>研究证实外源性血管内皮生长因子对缺血再灌注后的心功能恢复有益。Markel等<sup>[20]</sup>通过siRNA技术干扰成熟骨髓间充质干细胞血管内皮生长因子表达不利于干细胞移植治疗心肌梗死心脏收缩功能的恢复。Scalia等<sup>[21]</sup>研究表明血管内皮生长

因子可以通过长期抑制白细胞黏附从而抑制慢性炎症反应。

肝细胞生长因子的作用较广泛, 对于各种组织和细胞都具有调控作用, 它的受体是酪氨酸激酶型受体, 且具有高亲和力。细胞膜上的c-Met与HGF结合, 将信号传入细胞内, 通过作用其下游信号传导通路而产生相关的效应, 与细胞的生长、分化、血管生成等有十分紧密的关系<sup>[22]</sup>。Cai等<sup>[14]</sup>研究证实抑制肝细胞生长因子表达后将损害脂肪间充质干细胞促进缺血组织进行血运重建的能力。

神经生长因子不仅对神经系统具有重要的神经元营养和促神经突起生长的生物效应, 在非神经系统中也具有调节免疫, 促进损伤修复的作用。在炎症部位, 神经生长因子的浓度增高, 神经生长因子与TrkA结合, 抑制下游TLRS信号介导的炎症反应。神经生长因子能够减少促炎因子如白细胞介素1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、白细胞介素6和白细胞介素8的产生, 增加抗炎因子的释放, 以发挥抗炎作用<sup>[23]</sup>。神经生长因子有细胞趋化作用, 将其应用于烧伤创面后, 上皮增生活跃, 真皮层有核细胞数明显增多, 并使免疫细胞趋化, 释放生长因子和胶原酶等基质蛋白酶, 帮助清除损伤创面变性坏死的细胞及细胞外基质, 有益于新生上皮细胞增殖、爬行, 加快创面的愈合<sup>[24-25]</sup>。同时, 神经生长因子能激活巨噬细胞清除坏死组织细胞和不良的细胞外基质, 为创面修复提供了有利环境<sup>[26]</sup>。

角质细胞生长因子通过旁分泌作用于上皮细胞, 经MAPK信号途径引起一系列的级联反应, 发挥生物学效应<sup>[27]</sup>。角质细胞生长因子能够促进皮肤、肺、肝和胃肠等器官细胞的增殖。角质细胞生长因子通过诱导上皮细胞增殖, 加快真皮和表皮再生, 新生血管形成, 促进角质化细胞从伤口边缘移行至基质, 促进皮肤及角膜损伤的修复<sup>[28]</sup>。动物实验发现, 角质细胞生长因子可刺激小鼠气管引起显著的支气管和肺泡上皮细胞的增生, 在两三天细胞增殖达到高峰。同时, 角质细胞生长因子可减少肝星状细胞激活, 抑制肝细胞纤维化、坏死, 明显提高肝细胞存活和增殖<sup>[29]</sup>。

综上所述, 低氧条件下脂肪间充质干细胞和脐带间充质干细胞旁分泌各种细胞因子的能力均有所提高, 2种干细胞分泌细胞因子的水平又有所差异, 其中脂肪间充质干细胞分泌促血管再生细胞因子血管内皮生长因子的量明显多于脐带间充质干细胞, 初步认为脂肪间充质干细胞较脐带间充质干细胞更适合心肌梗死的干细胞移植治疗。

**作者贡献:** 实验设计、实施、评估为全部作者。

**经费支持:** 该文章接受了“天津市滨海新区卫生局基金项目(2014BHKY010)”、“天津市企业博士后创新项目择优资助计划(2015-001)”、“安徽省高校优秀青年人才支持计划重点项目(GXYQZD2016167)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**伦理问题:** 研究用人体组织的实验方案符合相关伦理学要求, 文

表 1 ELISA 检测各组细胞的血管内皮生长因子蛋白分泌量 ( $\bar{x}\pm s$ , ng/L)

细胞	体积分数为 3% O <sub>2</sub> 预处理组	体积分数为 5% O <sub>2</sub> 预处理组	对照组
脂肪间充质干细胞	2 819.03±164.92 <sup>ab</sup>	2 201.10±91.07 <sup>a</sup>	2 017.57±79.74 <sup>a</sup>
脐带间充质干细胞	654.62±76.88 <sup>b</sup>	526.67±34.50	482.70±40.07

表注: 与脐带间充质干细胞比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与对照组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$ 。

表 3 ELISA 检测各组细胞的神经生长因子蛋白分泌量 ( $\bar{x}\pm s$ , ng/L)

细胞	体积分数为 3% O <sub>2</sub> 预处理组	体积分数为 5% O <sub>2</sub> 预处理组	对照组
脂肪间充质干细胞	42.97±2.69 <sup>a</sup>	44.07±3.81 <sup>a</sup>	58.77±8.50
脐带间充质干细胞	75.34±3.96 <sup>b</sup>	80.07±4.50	57.90±5.32

表注: 与脐带间充质干细胞比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与对照组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$ 。

表 2 ELISA 检测各组细胞的肝细胞生长因子蛋白分泌量( $\bar{x}\pm s$ , ng/L)

细胞	体积分数为 3% O <sub>2</sub> 预处理组	体积分数为 5% O <sub>2</sub> 预处理组	对照组
脂肪间充质干细胞	2 617.48±234.63 <sup>b</sup>	2 467.05±93.16 <sup>a</sup>	1 711.83±66.88 <sup>a</sup>
脐带间充质干细胞	2 879.71±146.60 <sup>b</sup>	2 288.43±78.85	1 803.14±69.66

表注: 与脐带间充质干细胞比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与对照组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$ 。

表 4 ELISA 检测各组细胞的角质细胞生长因子蛋白分泌量 ( $\bar{x}\pm s$ , ng/L)

细胞	体积分数为 3% O <sub>2</sub> 预处理组	体积分数为 5% O <sub>2</sub> 预处理组	对照组
脂肪间充质干细胞	31.17±2.24 <sup>a</sup>	47.10±3.84 <sup>b</sup>	77.91±2.34 <sup>a</sup>
脐带间充质干细胞	60.49±6.55 <sup>c</sup>	59.78±5.04	36.00±3.64

表注: 与脐带间充质干细胞比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与对照组比较, <sup>c</sup> $P < 0.01$ 。

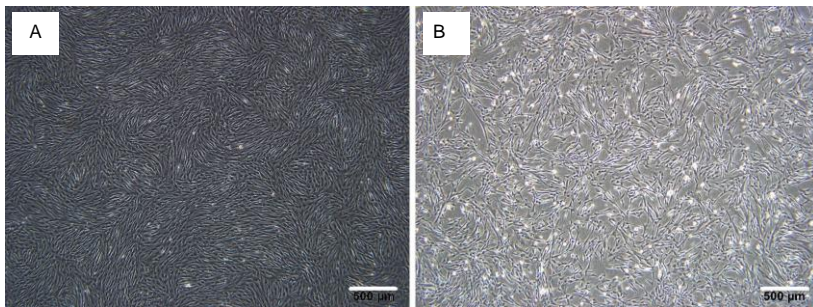
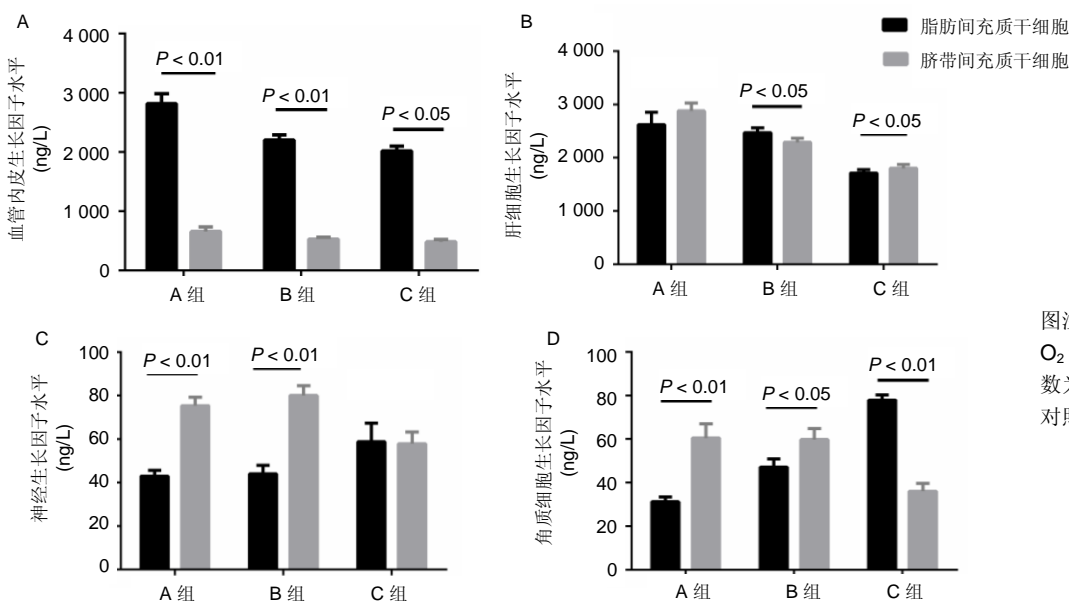


图 1 脂肪间充质干细胞与脐带间充质干细胞的形态  
Figure 1 Morphology of adipose-derived mesenchymal stem cells and umbilical cord mesenchymal stem cells

图注: 图中 A 为脂肪间充质干细胞; B 为脐带间充质干细胞。



图注: A 组: 体积分数为 3% O<sub>2</sub> 预处理组; B 组: 体积分数为 5% O<sub>2</sub> 预处理组; C 组: 对照组。

图 2 各组细胞分泌肝细胞生长因子、血管内皮生长因子、神经生长因子、角质细胞生长因子的差异

Figure 2 Difference in hepatocyte growth factor, vascular endothelial growth factor, nerve growth factor and keratinocyte growth factor secreted from cells under different oxygen concentrations



章的撰写与编辑修改后文章遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**写作指南:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

**文章外审:** 文章经国内小同行外审专家双盲外审,符合本刊发稿宗旨。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

- [1] Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, et al. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet*. 2006;367(9524):1747-1757.
- [2] Diwan A, Dorn GW 2nd. Decompensation of cardiac hypertrophy: cellular mechanisms and novel therapeutic targets. *Physiology (Bethesda)*. 2007;22:56-64.
- [3] Diwan A, Krenz M, Syed FM, et al. Inhibition of ischemic cardiomyocyte apoptosis through targeted ablation of Bnip3 restrains postinfarction remodeling in mice. *J Clin Invest*. 2007;117(10):2825-2833.
- [4] Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, et al. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(32):11474-11479.
- [5] Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*. 2006;98(5):1076-1084.
- [6] Gnechchi M, He H, Noiseux N, et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J*. 2006;20(6):661-669.
- [7] Pal SN, Kofidis T. New cell therapies in cardiology. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2012;10(8):1023-1037.
- [8] Wollert KC, Drexler H. Cell therapy for the treatment of coronary heart disease: a critical appraisal. *Nat Rev Cardiol*. 2010;7(4):204-215.
- [9] Krause K, Schneider C, Kuck KH, et al. Stem cell therapy in cardiovascular disorders. *Cardiovasc Ther*. 2010;28(5):e101-110.
- [10] Van Oorschot AA, Smits AM, Goumans MJ. Stem cells: the building blocks to repair the injured heart. *Panminerva Med*. 2010;52(2):97-110.
- [11] Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. 2008;371(9624):1579-1586.
- [12] Gustafsson MV, Zheng X, Pereira T, et al. Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell*. 2005;9(5):617-628.
- [13] Efimenko A, Starostina E, Kalinina N, et al. Angiogenic properties of aged adipose derived mesenchymal stem cells after hypoxic conditioning. *J Transl Med*. 2011;9:10.
- [14] Cai L, Johnstone BH, Cook TG, et al. Suppression of hepatocyte growth factor production impairs the ability of adipose-derived stem cells to promote ischemic tissue revascularization. *Stem Cells*. 2007;25(12):3234-3243.
- [15] Puissant B, Barreau C, Bourin P, et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol*. 2005;129(1):118-129.
- [16] Weiss ML, Anderson C, Medicetty S, et al. Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. *Stem Cells*. 2008;26(11):2865-2874.
- [17] Zachary I, Gliki G. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res*. 2001;49(3):568-581.
- [18] Kalka C, Tehrani H, Lundenberg B, et al. VEGF gene transfer mobilizes endothelial progenitor cells in patients with inoperable coronary disease. *Ann Thorac Surg*. 2000;70(3):829-834.
- [19] Guzman MJ, Crisostomo PR, Wang M, et al. Vascular endothelial growth factor improves myocardial functional recovery following ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res*. 2008;150(2):286-292.
- [20] Markel TA, Wang Y, Herrmann JL, et al. VEGF is critical for stem cell-mediated cardioprotection and a crucial paracrine factor for defining the age threshold in adult and neonatal stem cell function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295(6):H2308-2314.
- [21] Scalia R, Booth G, Lefer DJ. Vascular endothelial growth factor attenuates leukocyte-endothelium interaction during acute endothelial dysfunction: essential role of endothelium-derived nitric oxide. *FASEB J*. 1999;13(9):1039-1046.
- [22] Ogura Y, Hamanoue M, Tanabe G, et al. Hepatocyte growth factor promotes liver regeneration and protein synthesis after hepatectomy in cirrhotic rats. *Hepatogastroenterology*. 2001;48(38):545-549.
- [23] Prencipe G, Minnone G, Strippoli R, et al. Nerve growth factor downregulates inflammatory response in human monocytes through TrkA. *J Immunol*. 2014;192(7):3345-3354.
- [24] 顾鹏毅,孙晋民,詹丽芬,等.神经生长因子凝胶抗炎抑菌作用初探[J].实用药物与临床, 2008, 11(6):347-348.
- [25] 叶兰萍,武元元,曹广通.神经生长因子促进烫伤创面释放内源性生长因子[J].中国组织工程研究, 2013, 17(28):5204-5208.
- [26] 杨敏烈,黄金井.神经生长因子的作用及其在创面修复和瘢痕形成中的意义[J].组织工程与重建外科, 2008, 4(1):56-58.
- [27] Ceccarelli S, Romano F, Angeloni A, et al. Potential dual role of KGF/KGFR as a target option in novel therapeutic strategies for the treatment of cancers and mucosal damages. *Expert Opin Ther Targets*. 2012;16(4):377-393.
- [28] Pereira CT, Herndon DN, Rocker R, et al. Liposomal gene transfer of keratinocyte growth factor improves wound healing by altering growth factor and collagen expression. *J Surg Res*. 2007;139(2):222-228.
- [29] Boullier V, Sengenès C, Zakaroff-Girard A, et al. TGFβ family members are key mediators in the induction of myofibroblast phenotype of human adipose tissue progenitor cells by macrophages. *PLoS One*. 2012;7(2):e31274.