

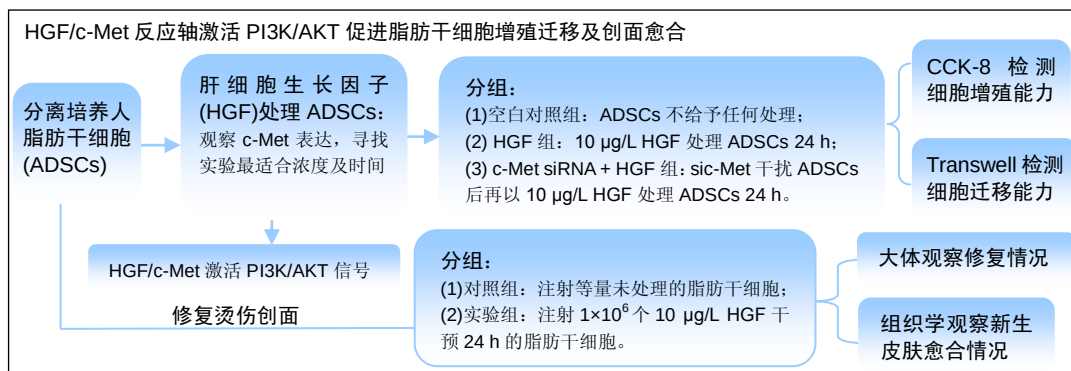
HGF/c-Met反应轴对脂肪干细胞修复烧伤创面的调控

李雪阳^{1,2}, 郑万玲², 杨超¹, 夏斯展², 邢新¹ (¹解放军第二军医大学附属长海医院整形外科, 上海市 200433; ²徐州医科大学附属医院整形外科, 江苏省徐州市 221002)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0929

ORCID: 0000-0003-0170-3114(李雪阳)

文章快速阅读:



李雪阳, 女, 1978 年生, 汉族, 江苏省徐州市人, 在读博士, 副主任医师, 主要从事皮肤难愈创面、脂肪干细胞修复相关研究。

通讯作者: 邢新, 博士, 教授, 解放军第二军医大学附属长海医院整形外科, 上海市 200433

中图分类号: R394.2

文献标识码: A

稿件接受: 2018-03-03



文题释义:

转染: 将携带外源基因的病毒感染受体细胞的方法。常规转染技术可分为两大类, 一类是瞬时转染, 一类是稳定转染。前者外源 DNA/RNA 不整合到宿主染色体中, 因此一个宿主细胞中可存在多个拷贝数, 产生高水平的表达, 但通常只持续几天, 多用于启动子和其他调控元件的分析。转染技术的选择对转染结果影响也很大, 许多转染方法需要优化 DNA 与转染试剂比例、细胞数量、培养及检测时间等。

PI3K/AKT 信号通路: 广泛存在于各种类型细胞中, 连接胞外信号和细胞应答, 与下游信号分子作用, 参与细胞的生长增殖和分化, 在多种疾病的分子机制及治疗研究中受到极大的关注。

摘要

背景: 研究发现, 肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)能促进脂肪干细胞增殖迁移, 进而促进创面愈合。

目的: 观察 HGF/c-Met 调节脂肪干细胞增殖和迁移的作用机制及其对烧伤创面愈合的影响。

方法: 将提取的人脂肪干细胞按实验要求分为空白对照组(未处理的脂肪干细胞)、HGF 组(10 μg/L, 24 h)、c-Met siRNA + HGF 组(10 μg/L, 24 h); 采用 Western blot 技术检测 c-Met、AKT、p-AKT 的蛋白表达, CCK-8 和 Transwell 法分别检测细胞增殖和迁移情况。将 12 只裸鼠随机分为 2 组, 用 99 °C 烫头接触裸鼠背部皮肤 5 s, 构建直径为 1 cm 的皮肤 III 度烫伤模型。实验组创面周围皮肤内注射 1×10⁶ 个 10 μg/L HGF 处理 24 h 的脂肪干细胞, 对照组注射等量未处理的脂肪干细胞。所有裸鼠在实验第 7 天处死, 取新生创面全层皮肤组织, 进行苏木精-伊红染色, 计算创面愈合率和再上皮化厚度。

结果与结论: ①HGF 能够诱导 c-Met 表达($P < 0.05$); HGF 促进脂肪干细胞的增殖和迁移, c-Met siRNA 对脂肪干细胞的增殖与迁移起抑制作用($P < 0.05$); HGF 促进 p-AKT 蛋白表达, c-Met siRNA 抑制 p-AKT 蛋白表达; ②实验组创面再上皮化厚度大于对照组($P < 0.05$), 创面愈合率高于对照组($P < 0.05$); ③结果表明, HGF 干预的脂肪干细胞能通过诱导 c-Met 基因的表达, 激活 PI3K/AKT 信号通路, 提高脂肪间充质干细胞的增殖与迁徙能力; HGF 干预的脂肪干细胞能促进裸鼠烫伤创面的愈合。

关键词:

脂肪间充质干细胞; 肝细胞生长因子; 肝细胞生长因子受体; PI3K/AKT; 增殖; 迁移; 创面愈合; 干细胞

主题词:

脂肪组织; 间质干细胞; 肝细胞生长因子; 伤口愈合; 组织工程

基金资助:

徐州市科技局课题(KC15SH087)

缩略语:

脂肪干细胞: adipose-derived stem cells, ADSCs; 肝细胞生长因子: hepatocyte growth factor, HGF

HGF/c-Met axis regulates human adipose tissue-derived stem cells in burn wound healing

Li Xue-yang^{1,2}, Zheng Wan-ling², Yang Chao¹, Xia Si-zhan², Xing Xin¹ (¹Department of Plastic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; ²Department of Plastic Surgery, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221002, Jiangsu Province, China)

Li Xue-yang, Doctoral candidate, Associate chief physician, Department of Plastic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; Department of Plastic Surgery, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221002, Jiangsu Province, China

Corresponding author: Xing Xin, M.D., Professor, Department of Plastic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract

BACKGROUND: Studies have found that hepatocyte growth factor (HGF) can promote proliferation and migration of adipose-derived stem cells (ADSCs) and accelerate wound healing.

OBJECTIVE: To investigate the mechanism of HGF/c-Met on the proliferation and migration of ADSCs and its effects on burn wound healing.

METHODS: ADSCs were separated from subcutaneous adipose tissues and primary cultured. ADSCs untreated were considered as control group. Cells in experimental groups were treated with HGF (10 $\mu\text{g/L}$, 24 hours) or c-Met siRNA combined with HGF (10 $\mu\text{g/L}$, 24 hours). Then, western blot assay was used to detect expressions of c-Met, p-AKT, and AKT in the cells. The proliferation and migration abilities of ADSCs were observed by cell counting kit-8 and Transwell assay. Twelve nude mice were burned by copper bar at 99 $^{\circ}\text{C}$ for 5 seconds in order to establish animal models of skin III degree burns with the diameter of 1 cm, and then these model mice were randomly divided into experimental and control group ($n=6$ per group). In control group, only 1×10^6 ADSCs were injected around the wound, while in experimental group, 1×10^6 ADSCs transfected with Ad-HGF were injected around the wound. All the mice were killed at 7 days of the experiment, and fresh full-thickness skin wound tissues were taken. Wound healing rate was calculated and the thickness between dermis and epidermis was measured by hematoxylin-eosin staining.

RESULTS AND CONCLUSION: Significant expression of c-Met was induced by HGF ($P < 0.05$). The proliferation and migration of ADSCs were promoted by HGF but suppressed by c-Met siRNA ($P < 0.05$). p-AKT expression could be promoted by HGF but inhibited by c-Met siRNA. Compared with the control group, the experimental group showed higher wound healing rate and thickened re-epithelium ($P < 0.05$). To conclude, the HGF/c-Met axis can promote the proliferation and migration of ADSCs by activating PI3K/AKT pathway, and HGF can accelerate wound healing of burn nude mice.

Subject headings: Adipose Tissue; Mesenchymal Stem Cells; Hepatocyte Growth Factor; Wound Healing; Tissue Engineering

Funding: the Project of Xuzhou Municipal Office of Science and Technology, No. KC15SH087

0 引言 Introduction

多种细胞生长因子及相关基因的表达对烧伤创面的愈合起着重要作用, 创面愈合机制的研究能很大程度上促进临床烧伤患者的病情恢复。烧伤创面组织缺损具有血管化程度差、细胞增殖缓慢以及多种细胞因子分泌减少等多种特点^[1-5]。目前细胞因子可采用如局部喷洒、注射或通过生物敷料(如透明质酸-凝胶微球^[6]、壳聚糖等^[7])直接作用于创面, 但普遍存在半衰期短、易被酶降解等不足, 作用时间短, 持续性的直接给药方式虽能起到更好的效果, 但其生产成本高, 极大的增加了经济压力。近年来, 越来越多的研究者以细胞(如角质细胞^[8]、成纤维细胞^[9]、骨髓间充质干细胞等^[10-11])为载体携带目的基因进行创面治疗以期获得稳定持久的细胞因子分泌。脂肪干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)具有多向分化潜能, 能分泌多种细胞因子, 且来源广泛、易获取, 近年来在创面愈合的治疗中获得广泛关注。但是脂肪干细胞直接应用于烧伤创面, 具有组织强度低、易破损、表皮化程度差等缺点。c-Met即间质-上皮细胞转化因子, 胞内部分具有酪氨酸激酶活性, 肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)是其目前所知的惟一配体。HGF是一种具有多种生物学功能的细胞因子, 近年来研究已证实其可通过抗凋亡、抗纤维化、促进细胞再生等功能有效改善组织损伤^[12-14]。因此, 表达HGF的ADSCs可能成为一种更为有效促进创面愈合的新方法。

实验探讨HGF/c-Met反应轴调节ADSCs增殖和迁移的作用机制及其对裸鼠烧伤创面愈合的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 基因修饰种子细胞的实验研究。

1.2 时间及地点 于2016年7月至2017年12月在解放军第二军医大学附属长海医院中心实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验所用材料 脂肪组织取材于徐州医科大学附属医院整形美容中心的抽脂患者, 经患者、患者家属知情同意及徐州医科大学附属医院伦理委员会审批。

1.3.2 实验所用试剂和仪器 胎牛血清(澳洲Gibco公司); Western blot细胞裂解液(碧云天公司, 上海); 低糖培养基(L-DMEM, 美国Gibco公司); 二喹啉甲酸蛋白试剂盒(上海碧云天公司); c-Met和HGF(美国PeproTech公司); 兔抗人AKT/磷酸化AKT单克隆抗体(美国Cell Signaling Technology公司); 兔抗人 β -肌动蛋白单克隆抗体(β -actin, 美国BD公司); 山羊抗兔FITC标记IgG(北京博奥森公司); Transwell小室(美国Corning Costar公司); 化学发光试剂盒(上海天能公司); 倒置相差显微镜(日本Nikon公司)。

1.3.3 实验动物 SPF级BALB/c裸鼠12只, 雄性, 6-8周龄, 体质量18-20 g, 由解放军第二军医大学动物实验中心提供。

1.4 实验方法

1.4.1 分离培养ADSCs 术中获取无菌脂肪组织, 剔除筋膜等软组织后, PBS反复冲洗, 离心至下层液体基本无血色; 去除下层液体, 将等体积的0.1% I型胶原酶加入留取的上层脂肪中振荡消化(1 200 r/min, 45-60 min); 离心后保留下层沉淀, 加入完全培养基, 用吸管将细胞吹打均匀并接种于培养皿中, 放入培养箱(37 $^{\circ}\text{C}$, 体积分数为5% CO_2)孵育; 原代培养36-48 h后, PBS漂洗2次, 每次漂洗2 min, 每2 d或3 d更换培养液1次, 至细胞长满瓶底80%或接近融合时传代。

1.4.2 HGF处理ADSCs 设置HGF诱导c-Met表达的浓度梯度为0, 4, 8, 10, 12 $\mu\text{g/L}$, 干预ADSCs 12 h; 另设置10 $\mu\text{g/L}$ HGF干预ADSCs诱导c-Met表达的时间梯度为0, 4, 12, 24, 38 h, 通过Western blot检测c-Met蛋白的表达, 筛选HGF处理ADSCs的最适浓度及时间。

1.4.3 实验分组 将ADSCs分为3组:空白对照组(未处理的ADSCs)、HGF组(10 $\mu\text{g/L}$ HGF处理ADSCs 24 h)、HGF+c-Met siRNA组(c-Met siRNA干扰ADSCs后再以10 $\mu\text{g/L}$ HGF处理ADSCs 24 h)。

1.4.4 基因转染 将脂肪干细胞培养至第3代后,选取对数生长期细胞接种于6孔板,细胞生长至80%左右开始转染。每孔加入100 μL 无血清培养基稀释500 ng c-Met siRNA及18 μL Lipfectamine2000TM转染试剂,在室温下孵育10 min,使转染混合物形成,再将其混匀于700 μL 的无血清培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养4-6 h后,加入1 600 μL 含体积分数为10%胎牛血清的完全培养基培养48 h,然后加入10 $\mu\text{g/L}$ HGF处理ADSCs 24 h进行相关指标检测。

1.4.5 Western blot检测c-Met、AKT蛋白表达 以 β -actin为内参照来进行Western blot检测。取生长活跃的上述3组细胞,吸弃细胞培养液,PBS洗3次,加入细胞裂解液,提取总蛋白,通过BCA法测量蛋白浓度,取60 μg 总蛋白进行SDS-PAGE电泳,设定恒压100 V,电转膜100 min^[12];用Tris盐酸缓冲液(含5%脱脂奶粉)和TBST封闭2 h,加入c-Met(1:500)、AKT(1:800)、p-AKT(1:600)、 β -actin(1:1 000)一抗4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,二抗常温孵育2 h后显影,应用Image J进行定量分析。

1.4.6 细胞增殖情况 将3组细胞以每孔 1×10^5 个接种于96孔板中,每组6个复孔,每孔加入100 μL 完全培养基,恒温培养箱(37 $^{\circ}\text{C}$,体积分数为5% CO_2)孵育24 h。在接种后的连续3 d,每孔加入10 μL CCK-8溶液,继续孵育2 h,用酶标仪测定450 nm处的吸光度值。

1.4.7 Transwell迁徙实验 将3组细胞消化并计数,在Transwell小室中加入 1×10^5 个细胞和200 μL 无血清DMEM培养基,小室下层加入400 μL L-DMEM培养基(含体积分数为10%胎牛血清),放于恒温培养箱(37 $^{\circ}\text{C}$,体积分数为5% CO_2)中培养24 h。取出Transwell小室,PBS冲洗3遍,40 g/L多聚甲醛固定15 min,加适量Giemsa应用染色液浸染30 min,小心拭去上室底部膜表面上的细胞,PBS冲洗3遍,空气干燥,显微镜($\times 200$)下计数细胞数。

1.4.8 裸鼠烫伤创面模型的建立 取12只BALB/c裸鼠,随机分为2组,每组6只,以水合氯醛腹腔注射麻醉后使用烫伤棒,预设温度99 $^{\circ}\text{C}$,使烫头垂直并紧压裸鼠背部皮肤,持续接触皮肤5 s,构建直径为1 cm的皮肤III度烫伤模型。实验组裸鼠烫伤创面周围皮内注射10 $\mu\text{g/L}$ HGF干预24 h的ADSCs(细胞数 1×10^6 个),对照组裸鼠烫伤创面周围皮内注射等量第3代ADSCs,表面覆盖纱布,3 d后打开敷料,继续饲养10 d,每天定时观察裸鼠背部创面的肿胀、水疱、溃疡创面形成及愈合情况。

1.4.9 苏木精-伊红染色 造模后第7天,处死各组裸鼠,在裸鼠背部创面新生组织处切取半径为1 cm的圆形皮肤,40 g/L多聚甲醛固定后进行苏木精-伊红染色。通过显微镜测量再上皮化厚度,计算创面愈合率。创面愈合率=(原始

创面面积-未愈合创面面积)/原始创面面积 $\times 100\%$ 。

1.5 主要观察指标 ①Western blot检测HGF干预后ADSCs中c-Met蛋白的表达;②CCK-8法绘制细胞增殖曲线;③Transwell检测细胞迁移能力;④苏木精-伊红染色观察烫伤创面再上皮化厚度。

1.6 统计学分析 数据处理采用SPSS 16.0统计软件,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,采用LSD-*t*法进行方差齐的两两比较, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 HGF诱导c-Met蛋白的表达 采用0, 4, 8, 10, 12 $\mu\text{g/L}$ HGF处理ADSCs 12 h后通过Western blot检测c-Met蛋白的表达,差异有显著性意义($P < 0.05$),与0 $\mu\text{g/L}$ 组相比较,4 $\mu\text{g/L}$ 组c-Met表达无明显变化($P=0.235$),8, 10 $\mu\text{g/L}$ 组c-Met的表达逐渐上调,12 $\mu\text{g/L}$ 组c-Met表达较10 $\mu\text{g/L}$ 组下降($P < 0.05$,图1A)。因此,选择10 $\mu\text{g/L}$ HGF处理ADSCs 0, 4, 12, 24, 38 h后通过Western blot检测c-Met蛋白的表达,差异有显著性意义($P < 0.05$),与0 h组相比较,4 h组c-Met表达无明显变化($P=0.523$),12, 24 h组c-Met的表达明显逐渐上调,38 h组较24 h组c-Met表达下调($P < 0.05$,图1B),综上实验结果作者认为以10 $\mu\text{g/L}$ HGF处理ADSCs 24 h为最适浓度及时间。

2.2 c-Met siRNA抑制c-Met蛋白的表达 3组ADSCs中c-Met蛋白的表达差异有显著性意义($P < 0.05$),HGF(10 $\mu\text{g/L}$)处理ADSCs 24 h后,HGF组与空白对照组比较,c-Met蛋白表达明显上调($P < 0.05$);与HGF组比较,HGF+c-Met siRNA组c-Met蛋白表达明显下调($P < 0.05$,图2)。

2.3 HGF促进ADSCs增殖, c-Met siRNA抑制ADSCs增殖 通过重复测量数据的方差分析,不同因素处理ADSCs后,比较不同时间点的细胞增殖情况,差异有显著性意义($P < 0.05$);与空白对照组比较,HGF组细胞增殖能力升高,差异有显著性意义($P < 0.05$);与HGF组比较,HGF+c-Met siRNA组细胞增殖能力降低,差异有显著性意义($P < 0.05$),见图3。

2.4 HGF促进ADSCs迁移, c-Met siRNA抑制ADSCs迁移 采用重复数据方差分析,不同因素处理ADSCs后,细胞迁移能力差异有显著性意义($P < 0.05$)。与空白对照组比较,HGF组细胞迁移能力增强,差异有显著性意义($P < 0.05$);与HGF组比较,HGF+c-Met siRNA组细胞迁移能力降低,差异有显著性意义($P < 0.05$),见图4。

2.5 HGF/c-Met激活PI3K/AKT信号通路 HGF(10 $\mu\text{g/L}$)处理c-Met siRNA ADSCs及ADSCs 24 h,AKT的表达均未见明显改变;与空白对照组比较,HGF组p-AKT表达明显增多;与HGF组比较,HGF+c-Met siRNA组p-AKT表达明显减少(图5)。

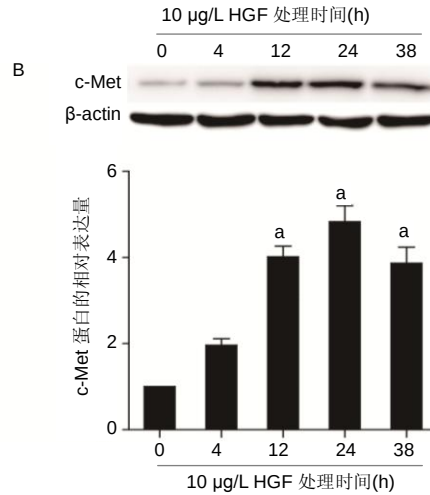
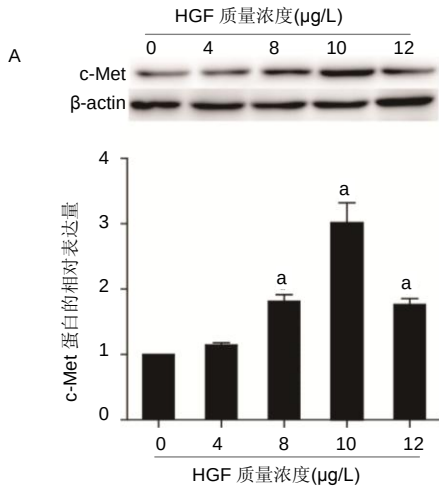


图1 Western blot 检测肝细胞生长因子(HGF)干预后脂肪干细胞(ADSCs)中 c-Met 蛋白的表达

Figure 1 Western blot detection of c-Met protein expression in hepatocyte growth factor-induced adipose-derived stem cells
图注: 图中 A 为 0, 4, 8, 10, 12 μg/L HGF 干预 12 h 后 ADSCs 中 c-Met 的表达; B 为 10 μg/L HGF 干预 ADSCs 0, 4, 12, 24, 38 h 后 c-Met 的表达。与 0 μg/L 或 0 h 比较, ^a $P < 0.05$ 。

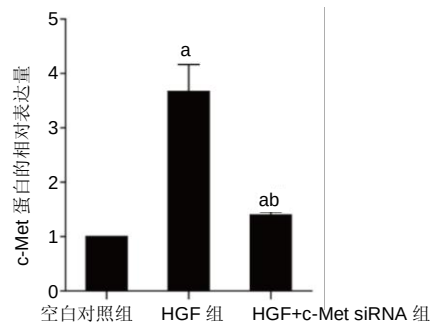
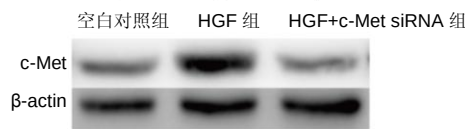


图2 转染 c-Met siRNA 下调 c-Met 基因的表达

Figure 2 Transfection of c-Met siRNA down-regulated the expression of c-Met
图注: 肝细胞生长因子(HGF)促进脂肪干细胞中 c-Met 的表达, c-Met siRNA 抑制脂肪干细胞中 c-Met 的表达。与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 HGF 组比较, ^b $P < 0.05$ 。

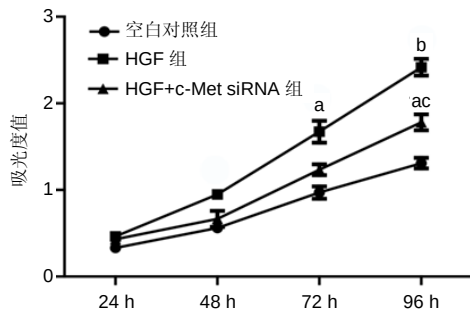


图3 CCK-8 检测脂肪干细胞增殖率

Figure 3 Cell counting kit-8 detection of cell proliferation rate of adipose-derived stem cells

图注: 肝细胞生长因子(HGF)促进脂肪干细胞增殖, c-Met siRNA 抑制脂肪干细胞增殖。与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与 HGF 组比较, ^c $P < 0.05$ 。

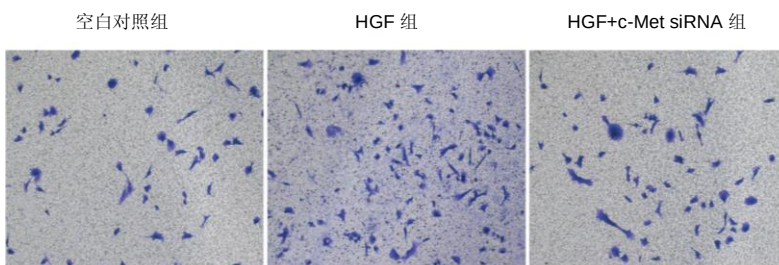


图4 Transwell 小室检测脂肪干细胞迁移能力

Figure 4 Transwell detection of migration ability of adipose-derived stem cells

图注: 应用结晶紫染色观察迁移细胞数($\times 200$)。肝细胞生长因子(HGF)促进脂肪干细胞迁移, c-Met siRNA 抑制脂肪干细胞迁移。与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 HGF 组比较, ^b $P < 0.05$ 。

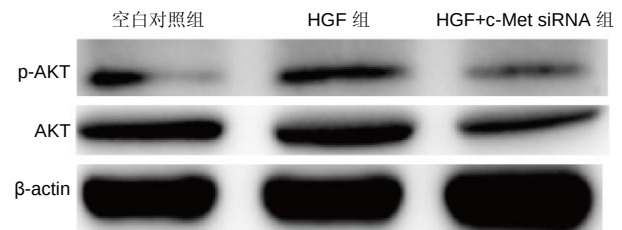
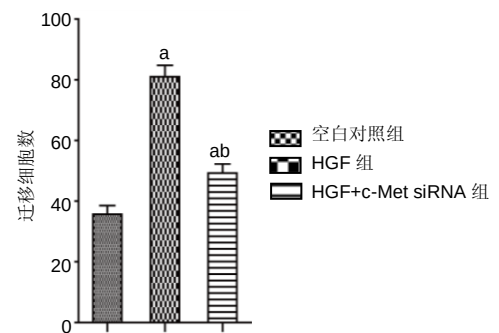


图5 Western blot 测定脂肪干细胞中 AKT、pAKT 蛋白表达

Figure 5 Western blot detection of AKT and pAKT protein expression in adipose-derived stem cells

图注: 10 μg/L 肝细胞生长因子处理脂肪干细胞 24 h 后, AKT 的表达均未见明显改变, p-AKT 表达明显增多, 说明肝细胞生长因子能够磷酸化激活 AKT。



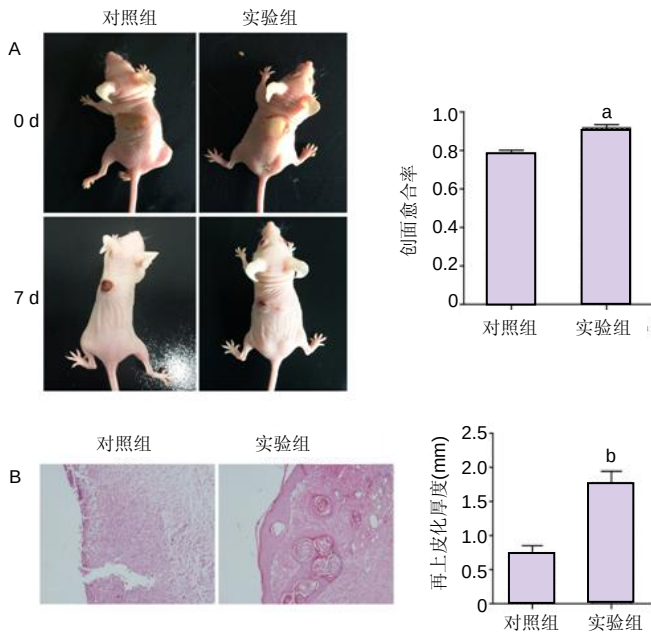


图6 脂肪干细胞移植修复裸鼠烫伤创面

Figure 6 Repairing burn wound in nude mice by adipose-derived stem cells transplantation

图注: 图中 A 为大体观察裸鼠烫伤创面愈合情况; B 为苏木精-伊红染色观察裸鼠烫伤创面新生皮肤的再上皮化厚度($\times 200$)。与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。由实验结果可见, 肝细胞生长因子转染的脂肪干细胞能够更好地促进烫伤创面的愈合。

2.6 HGF预处理ADSCs移植对裸鼠烫伤创面愈合的影响在移植后第7天进行裸鼠模型的创面比较(图6)。实验组在创伤后第7天的创面愈合率和上皮化厚度显著高于对照组, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。

3 讨论 Discussion

c-Met是Cooper等人在研究人骨肉瘤Hos细胞系时最新发现的位于人类7号染色体长臂(7q31)上的活性片段, 大小约110 kb。由于c-Met在不同细胞、不同分化阶段作用的底物不同, 使其在特定条件下表现出多种功能, 例如控制胚胎发育过程中的细胞移动, 促进内皮细胞、肝细胞和干细胞的增殖、分裂, 诱导细胞形态变化等^[15-16]。c-Met是由原癌基因编码的受体酪氨酸激酶, 具有高度结合性, 其启动子区域有IL-6和HGF等多种调控序列^[17]。目前研究显示在肿瘤细胞中有多种分子机制可以激活c-Met, 其是HGF惟一的已知受体。PI3K/AKT信号转导通路对于调节干细胞的生长、分化、增殖及凋亡有着重要的作用^[18-20]。AKT是细胞内重要的促存活因子, 是PI3K的下游作用底物, 当PIP3作用于下游信号分子AKT, 使其从细胞质转移到细胞膜上, 此时, 激活的AKT通过磷酸化作用激活或抑制其下游靶蛋白GSK3-B、mTOR、Bcl-2蛋白家族和caspase-3, 进而调节细胞的增殖、分化、凋亡^[21-23]。HGF诱导c-Met发生自身磷酸化, 使其酪氨酸激酶活性增强, 导致PI3K、生长因子受体结合蛋白1(GAB-1)和生长因子受体结合蛋白2(GAB-2)等多种底物蛋白的酪氨酸磷酸化, 调控细胞的

生长、增殖、迁徙与存活。通常, c-Met受体和HGF结合时间较短, 然而在多种人类恶性肿瘤如膀胱癌、神经胶质瘤、胃癌、骨肉瘤、乳腺癌中均发现异常高水平表达的HGF和c-Met, 并形成正反馈, 诱发肿瘤的发生和转移^[24-26]。该研究将ADSCs用不同浓度的HGF进行预处理并作用不同时间, 通过Western blot检测发现HGF能够诱导c-Met的表达, 24 h的处理时间和10 $\mu\text{g/L}$ 的质量浓度为最适时间和质量浓度, HGF对c-Met基因的表达呈明显的促进作用, 通过CCK-8及Transwell实验检测HGF/c-Met信号对ADSCs增殖、迁移的影响, 结果显示, HGF促进ADSCs增殖、迁移, c-Met siRNA抑制ADSCs增殖、迁移。最后将HGF干预的ADSCs植入烫伤创面模型, 与对照组比较发现: 移植HGF干预ADSCs组裸鼠创面愈合率显著增高, 苏木精-伊红染色发现两组上皮化厚度差异也有显著性意义, 多方面证实经HGF干预的ADSCs能促进裸鼠烫伤创面的愈合。

促进烧伤创面愈合一直是临床上一个巨大挑战, 它需要细胞-细胞和细胞-基质信号间的精细相互作用。大量的研究结果显示, 间充质干细胞在创面愈合过程中发挥着非常重要的作用, 间充质干细胞具多向分化潜能, 同时具有分泌与血管生成相关的多种生长因子、促进血管形成的作用^[27-28]。脂肪干细胞既能自我复制、多向分化, 又易获取、无免疫排斥反应, 是近年来干细胞研究的热点, 且其分离、培养及鉴定技术也已日益成熟。但是干细胞移植后存活率较低, 很大程度上限制了细胞治疗的发展, 其中影响移植干细胞存活的因素主要有烧伤创面的局部缺氧、营养不良、生成自由基及炎症反应等^[11, 29-30]。实验通过研究证实, 经HGF干预的ADSCs能通过诱导c-Met基因表达, 使PI3K/AKT信号通路激活, 脂肪干细胞的增殖与迁移能力提高, 从而可以促进烧伤创面愈合, 从分子水平为临床开展烧伤创面治疗提供理论依据。

作者贡献: 实验设计为李雪阳, 实验实施为夏斯展、郑万玲, 资料收集为杨超, 实验评估为刑新。

经费支持: 该文章接受了“徐州市科技局课题(KC15SH087)”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, 不存在利益冲突。

伦理问题: 研究对象采用来自人体的细胞, 符合相关伦理学要求, 文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》。

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。

作者声明: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

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] Sitton E. Early and late radiation-induced skin alterations. Part II: Nursing care of irradiated skin. *Oncol Nurs Forum*. 1992;19(6):907-912.
- [2] Noble-Adams R. Radiation-induced reactions. 1: An examination of the phenomenon. *Br J Nurs*. 1999;8(17):1134-1140.
- [3] Porock D. Factors influencing the severity of radiation skin and oral mucosal reactions: development of a conceptual framework. *Eur J Cancer Care (Engl)*. 2002;11(1):33-43.
- [4] Maduro JH, Pras E, Willemse PH, et al. Acute and long-term toxicity following radiotherapy alone or in combination with chemotherapy for locally advanced cervical cancer. *Cancer Treat Rev*. 2003;29(6):471-488.
- [5] Vaz AF, Pinto-Neto AM, Conde DM, et al. Quality of life of women with gynecologic cancer: associated factors. *Arch Gynecol Obstet*. 2007;276(6):583-589.
- [6] Naylor W, Mallett J. Management of acute radiotherapy induced skin reactions: a literature review. *Eur J Oncol Nurs*. 2001;5(4):221-233.
- [7] Morgan K. Radiotherapy-induced skin reactions: prevention and cure. *Br J Nurs*. 2014;23(16):S24, S26-32.
- [8] De Ruyck K, Van Eijkeren M, Claes K, et al. Radiation-induced damage to normal tissues after radiotherapy in patients treated for gynecologic tumors: association with single nucleotide polymorphisms in XRCC1, XRCC3, and OGG1 genes and in vitro chromosomal radiosensitivity in lymphocytes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005;62(4):1140-1149.
- [9] Hymes SR, Strom EA, Fife C. Radiation dermatitis: clinical presentation, pathophysiology, and treatment 2006. *J Am Acad Dermatol*. 2006;54(1):28-46.
- [10] Yarnold J, Brotons MC. Pathogenetic mechanisms in radiation fibrosis. *Radiother Oncol*. 2010;97(1):149-161.
- [11] Ahmed EA, Agay D, Schrock G, et al. Persistent DNA damage after high dose in vivo gamma exposure of minipig skin. *PLoS One*. 2012;7(6):e39521.
- [12] Valente S, Ciavarella C, Pasanisi E, et al. Hepatocyte Growth Factor Effects on Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Arteries: A Novel Strategy to Accelerate Vascular Ulcer Wound Healing. *Stem Cells Int*. 2016;2016:3232859.
- [13] Broekman W, Amatngalim GD, de Mooij-Eijk Y, et al. TNF- α and IL-1 β -activated human mesenchymal stromal cells increase airway epithelial wound healing in vitro via activation of the epidermal growth factor receptor. *Respir Res*. 2016;17:3.
- [14] Sun B, Meng XH, Liu R, et al. Mechanism study for hypoxia induced differentiation of insulin-producing cells from umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;466(3):444-449.
- [15] Fuse MA, Plati SK, Burns SS, et al. Combination Therapy with c-Met and Src Inhibitors Induces Caspase-Dependent Apoptosis of Merlin-Deficient Schwann Cells and Suppresses Growth of Schwannoma Cells. *Mol Cancer Ther*. 2017;16(11):2387-2398.
- [16] Yen BL, Yen ML, Hsu PJ, et al. Multipotent human mesenchymal stromal cells mediate expansion of myeloid-derived suppressor cells via hepatocyte growth factor/c-met and STAT3. *Stem Cell Reports*. 2013;1(2):139-151.
- [17] Branski LK, Gauglitz GG, Herndon DN, et al. A review of gene and stem cell therapy in cutaneous wound healing. *Burns*. 2009;35(2):171-180.
- [18] Peyvandi AA, Abbaszadeh HA, Roozbahany NA, et al. Deferoxamine promotes mesenchymal stem cell homing in noise-induced injured cochlea through PI3K/AKT pathway. *Cell Prolif*. 2018 Jan 17. doi: 10.1111/cpr.12434. [Epub ahead of print]
- [19] Reddy LVK, Sen D. DADLE enhances viability and anti-inflammatory effect of human MSCs subjected to 'serum free' apoptotic condition in part via the DOR/PI3K/AKT pathway. *Life Sci*. 2017;191:195-204.
- [20] Lv B, Hua T, Li F, et al. Hypoxia-inducible factor 1 α protects mesenchymal stem cells against oxygen-glucose deprivation-induced injury via autophagy induction and PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Am J Transl Res*. 2017;9(5):2492-2499.
- [21] Rahmani M, Aust MM, Attkisson E, et al. Dual inhibition of Bcl-2 and Bcl-xL strikingly enhances PI3K inhibition-induced apoptosis in human myeloid leukemia cells through a GSK3- and Bim-dependent mechanism. *Cancer Res*. 2013;73(4):1340-1351.
- [22] Li J, Huang S, Zhang J, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate inflammatory cytokine-induced impairment of AT-II cells through a keratinocyte growth factor-dependent PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Mol Med Rep*. 2016;13(5):3755-3762.
- [23] Zhang R, Yang G, Wang Q, et al. Acylated ghrelin protects hippocampal neurons in pilocarpine-induced seizures of immature rats by inhibiting cell apoptosis. *Mol Biol Rep*. 2013;40(1):51-58.
- [24] Kim JW, Lee MN, Jeong BC, et al. Chemical inhibitors of c-Met receptor tyrosine kinase stimulate osteoblast differentiation and bone regeneration. *Eur J Pharmacol*. 2017;806:10-17.
- [25] Deying W, Feng G, Shumei L, et al. CAF-derived HGF promotes cell proliferation and drug resistance by up-regulating the c-Met/PI3K/Akt and GRP78 signalling in ovarian cancer cells. *Biosci Rep*. 2017;37(2):BSR20160470.
- [26] Ahn SY, Kim J, Kim MA, et al. Increased HGF Expression Induces Resistance to c-MET Tyrosine Kinase Inhibitors in Gastric Cancer. *Anticancer Res*. 2017;37(3):1127-1138.
- [27] An Y, Liu WJ, Xue P, et al. Autophagy promotes MSC-mediated vascularization in cutaneous wound healing via regulation of VEGF secretion. *Cell Death Dis*. 2018;9(2):58.
- [28] Du HC, Jiang L, Geng WX, et al. Growth Factor-Reinforced ECM Fabricated from Chemically Hypoxic MSC Sheet with Improved In Vivo Wound Repair Activity. *Biomed Res Int*. 2017;2017:2578017.
- [29] Nuschke A. Activity of mesenchymal stem cells in therapies for chronic skin wound healing. *Organogenesis*. 2014;10(1):29-37.
- [30] Herberg S, Shi X, Johnson MH, et al. Stromal cell-derived factor-1 β mediates cell survival through enhancing autophagy in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *PLoS One*. 2013;8(3):e58207.