

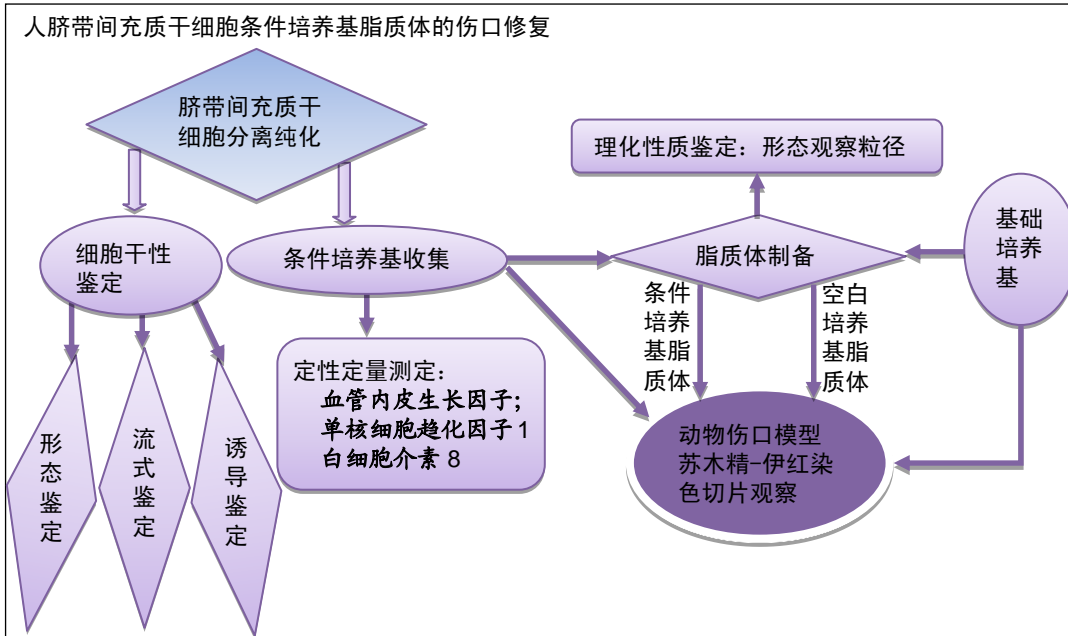
人脐带间充质干细胞条件培养基脂质体修复大鼠皮肤创面损伤

刘美林¹, 傅松涛², 王培森³, 郝冉³, 常冰梅¹, 侯秀英³ (¹山西医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室, 山西省太原市 030001; ²山西省生物医药健康研究生教育创新中心, 山西省太原市 030001; ³山西医科大学第一医院, 山西省太原市 030001)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1587

ORCID: 0000-0002-6203-1801(刘美林)

文章快速阅读:



刘美林, 女, 1990年生, 山西省柳林县人, 汉族, 山西医科大学基础医学院生物化学与分子生物学专业在读硕士, 主要从事干细胞研究。

通讯作者: 常冰梅, 博士, 副教授, 山西医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室, 山西省太原市 030001

通讯作者: 侯秀英, 硕士, 主任医师, 山西医科大学第一医院, 山西省太原市 030001

文献标识码:A

稿件接受: 2018-10-14



文题释义:

条件培养基: 培养过细胞的培养基去除细胞后的上清液, 里面含有如血管内皮生长因子、白细胞介素 8、单核细胞趋化蛋白 1 等细胞分泌因子, 其有助于伤口的修复。

脂质体: 是一种人工膜, 当两性分子如磷脂分散于水相时, 分子的疏水尾部倾向于聚集在一起, 避开水相, 而亲水头部暴露在水相, 形成具有双分子层结构的封闭囊泡可包封药物于腔内而形成的微型泡囊体, 改变药物的渗透和缓释作用。

摘要

背景: 干细胞条件培养基中含有大量有助于伤口修复的细胞分泌因子, 用脂质体包裹有助于细胞因子在伤口处的缓释作用。

目的: 研究人脐带间充质干细胞条件培养基脂质体对大鼠皮肤创面愈合的影响。

方法: 采用组织块贴壁法分离培养人脐带间充质干细胞并进行相关因子检测。取 20 只 SD 大鼠(购自山西医科大学实验动物中心)用于制备直径 1 cm 的皮肤创面模型。薄膜分散制备条件培养基脂质体囊泡用于大鼠皮肤缺损伤口, 取修复部位皮肤及周围组织进行苏木精-伊红染色病理切片观察, 通过组织学评分统计分析判断其对创伤的修复情况。

结果与结论: ①人脐带间充质干细胞表面标志物 CD73、CD90、CD105 阳性率分别为 99.7%、95.7%、99.4%, CD45、CD34 阳性率分别为 1.1%、0.1%, 且能诱导分化为骨细胞、脂肪细胞; ②条件培养基中血管内皮生长因子、白细胞介素 8、单核细胞趋化蛋白 1 的质量浓度分别为 558.60 ng/L、5 236.48 ng/L、2 972.55 ng/L; ③用薄膜分散法制备得到人脐带间充质干细胞条件培养基脂质体平均粒径为 262.3 nm; ④人脐带间充质干细胞条件培养及其脂质体均可促进大鼠皮肤缺损处的毛囊、腺体发生, 且表皮层加厚, 组织学评分显著升高, 第 2 天的条件培养基与条件培养基脂质体差异无显著性意义($P=0.730$), 其他各组之间有显著差异($P<0.05$); ⑤结果提示, 人脐带间充质干细胞条件培养基及其脂质体可以促进大鼠缺损伤口的修复。

关键词:

人脐带间充质干细胞; 创面损伤; 伤口愈合; 条件培养基; 细胞因子; 脂质体

主题词:

间质干细胞移植; 细胞培养技术; 脂质体; 组织工程

中图分类号: R459.9, R392.4

基金资助:

山西省重点研发计划项目(201603D321080), 项目负责人: 侯秀英

Liu Meilin, Master candidate, Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Corresponding author: Chang Bingmei, MD, Associate professor, Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Corresponding author: Hou Xiuying, Master, Chief physician, First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Liposome prepared from human umbilical cord mesenchymal stem cell conditioned medium for repair of skin wound in rats

Liu Meilin¹, Fu Songtao², Wang Peisen³, Hao Ran³, Chang Bingmei¹, Hou Xiuying³ (¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China; ²Shanxi Biomedical Health Graduate Education Innovation Center, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China; ³First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China)

Abstract

BACKGROUND: The stem cell conditioned medium contains a large number of cell secretory factors contributing to wound repair. Liposome encapsulation facilitates the sustained release of cytokines at the wound site.

OBJECTIVE: To study the effect of liposomes prepared from the conditioned medium of human umbilical cord mesenchymal stem cells on the healing of skin wounds in rats.

METHODS: Human umbilical cord mesenchymal stem cells were isolated and cultured by tissue explant method, and cytokine detection was then performed. Twenty Sprague-Dawley rats were provided by the Experimental Animal Center of Shanxi Medical University in China to make skin wound models of 1 cm in diameter. Membrane dispersion technique was used to prepare the conditioned medium liposomal vesicles used for skin wounds in the rats. The skin and surrounding tissues of the repair site were taken for hematoxylin-eosin staining. The histological scores were used to judge the repair of wounds.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The human umbilical cord mesenchymal stem cells were positive for CD73 (99.7%), CD90 (95.7%), CD105 (99.4%), CD45 (1.1%) and CD34 (0.1%). The cells could be induced to differentiate into osteocytes and adipocytes. (2) The concentrations of vascular endothelial growth factor, interleukin-8, and monocyte chemoattractant protein 1 in the conditioned medium were 558.60 ng/L, 5 236.48 ng/L, and 2 972.55 ng/L, respectively. (3) The average particle size of liposome in the conditioned medium prepared by membrane dispersion method was 262.3 nm. Conditional culture of human umbilical cord mesenchymal stem cells and its liposome could increase the hair follicles and glands at the site of rat skin defects, the epidermis was thickened, and the histological score was markedly increased. There was no difference between the conditioned medium and conditioned medium liposome groups at 2 days of culture ($P=0.730$), but significant differences existed among the other groups ($P < 0.05$). To conclude, the human umbilical cord mesenchymal stem cell conditioned medium and its liposomes can promote the repair of skin defects in rats.

Subject headings: Mesenchymal Stem Cell Transplantation; Cell Culture Techniques; Liposomes; Tissue Engineering

Funding: the Major Research and Development Plan of Shanxi Province, No. 201603D321080 (to HXY)

0 引言 Introduction

创伤、烧伤、慢性溃疡等造成大面积皮肤缺损，常形成难以愈合的创面，严重影响患者健康及生活质量。干细胞移植治疗作为一种新型的治疗手段为组织损伤修复带来了希望。人脐带间充质干细胞是来源于脐带沃顿胶的一类成体干细胞，具有较强的增殖能力及多向分化能力，与其他来源的间充质干细胞相比，存在取材无创、含量丰富、避免伦理争议、免疫原性更低等优点^[1]。随着对干细胞研究的不断深入探索，研究者Modo等^[2]发现干细胞被移植到宿主后的存活能力低；且Kucia等^[3]发现间充质干细胞和肿瘤干细胞之间存在相似的特征。Sell^[4]研究表明癌症起源于正常组织内的干细胞。基于此，为确保干细胞治疗的安全性，开发一种替代直接移植干细胞治疗的方法尤为重要。

Lee等^[5]报道人胚胎干细胞来源的内皮前体细胞条件培养基，因其含表皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、趋化因子、集落刺激因子和白细胞介素6等细胞因子，明显改善大鼠切除伤口的创面愈合。Chen等^[6]研究发现，与成纤维细胞相比，骨髓间充质干细胞条件培养基中胰岛素样生长因子、表皮生长因子、角质细胞生长因子、血管蛋白1、基质衍生因子1和促红细胞生成素等水平明显升高^[5]。Kim等^[7]也证实脂肪源性干细胞条件培养基对皮肤创伤有再生作用，可以刺激皮肤成纤维细胞迁移和胶原纤维合成，从而促进创伤愈合和改善动物模型的皱纹。因此，干细胞依靠其分泌的营养因子网络改善病理微环境，修复组织器官的推论逐渐被接受^[8-11]。

脂质体是磷脂在水溶液中形成的囊泡状结构，结构上类似于活细胞的脂质双层膜。自20世纪60年代以来，脂质体作为研究细胞膜的模型以及作为保护和(或)递送生物活性剂的载体而被广泛研究，已用于不同的研究领域，包括疫苗、成像、化妆品和组织工程^[12-13]。磷脂作为生物膜的主要成分，可以被生物体内存在的分解酶所降解排出体外，脂质体具有生物降解性和生物相容性，其与皮肤角质层具有相似的脂质双层结构，可以促进药物的透皮吸收，是局部皮肤给药、皮肤外用药物以及化妆品剂型中有效成分的首选载体^[14-16]。脂质体作为理想的药物载体系统，现研究多集中于脂质体的生物医学应用或临床试验，以及少量脂质体缓释制备技术的发明创新、新型膜材的使用、脂质体的修饰等^[17-18]。

基于以上理论依据，当前实验以人脐带间充质干细胞的细胞分泌因子通过薄膜分散法制备成缓释脂质体用于大鼠皮肤损伤创面模型，观察其对皮肤创面修复的影响，为人脐带间充质干细胞分泌因子治疗皮肤创面提供新的方向。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 对比观察动物实验。

1.2 时间及地点 于2016年3月至2018年3月在山西医科大学生物化学与分子生物学教研室完成。

1.3 材料

1.3.1 脐带标本 来源于山西医科大学附属第一医院产科健康婴儿脐带组织，排除细菌、病毒、支原体等感染，

无梅毒、艾滋病等传染病, 经产妇及家属知情同意并已获得知情同意书。

1.3.2 实验动物 健康雄性体质量220–250 g的SD大鼠20只, 由山西医科大学实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(晋)2015-0001。

1.3.3 试剂与仪器 DMEM/F12培养基、胎牛血清、胰酶、链霉素、青霉素(Gibco, 美国), 人脐带间充质干细胞成骨、成脂诱导分化培养基试剂盒(Cyagen, 美国), 小鼠抗人CD105-FITC、CD34-PE、CD29-FITC、CD44-PE、CD45-PC7(Beckman Coulter, 美国), 胆固醇(上海艾伟特医药科技有限公司, 中国), 卵磷脂(供注射用)(上海太伟药业有限公司, 中国), RE-52A旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂, 中国), SHB-III循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司, 中国), Mastersizer3000型激光粒度仪(Malvern, 英国), 显微镜(Nikon, 日本), 洁净工作台(上海博讯医疗设备厂, 中国), 恒温细胞培养箱(上海力申科学仪器有限公司, 中国), 高速冷冻离心机(Eppendorf, 德国)。

1.4 方法

1.4.1 人脐带间充质干细胞的分离与培养 于超净工作台中取出脐带组织标本, 浸泡于体积分数75%乙醇中消毒约30 s, 再用无菌PBS冲洗去除残余血液后置于无菌培养皿中。将处理后的脐带样本剪成约2 cm长小段, 仔细剔除脐带外膜及脐动静脉, 剥离脐带组织中的胶状物质沃顿胶(Wharton's jelly)并用PBS洗涤干净, 将剥离的组织剪为约2 mm³大小的组织碎块后接种于25 cm²塑料培养瓶中^[18-19]。添加5 mL的DMEM/F12培养液(含体积分数10%胎牛血清、链霉素100 g/L、青霉素100 U/mL), 轻轻摇晃培养瓶使组织块和培养基均匀分散在培养瓶底部, 置于饱和湿度、37 °C、体积分数5%CO₂培养箱中静置培养。第1周内每3 d半量换液, 以后每3 d全换液^[20]。待细胞长至80%–90%融合时, 用2.5 g/L胰蛋白酶(含0.02%EDTA)消化, 按1:2或1:3比例传代, 扩增培养。将生长良好的第3代人脐带间充质干细胞调整细胞浓度为1×10¹⁰ L⁻¹冻存备用。

1.4.2 人脐带间充质干细胞表面标志物测定 取生长良好的第3代细胞, 2.5 g/L胰蛋白酶消化后PBS洗涤3次, 加入荧光标记抗体, 4 °C避光孵育30 min, PBS洗涤2次, 流式细胞仪检测细胞表面标志物CD29、CD34、CD105、CD45、CD44的表达。

1.4.3 人脐带间充质干细胞成骨细胞、成脂肪细胞诱导分化 取生长状态良好的第3代细胞, 消化离心后按2×10⁴个/cm²接种于6孔板中, 24 h后待细胞完全贴壁, 更换诱导培养液。①成骨细胞方向分化: 弃去培养液, 用成骨诱导分化培养液培养, 间隔3 d更换新鲜培养液, 连续培养4周, 体积分数4%甲醛固定, 茜素红染色; ②成脂细胞方向分化: 弃去培养液, 加入成脂诱导液A继续培养, 3 d后更换为成脂诱导液B, 24 h后更换为成脂诱导液A, 重复四五次后, 体积分数4%甲醛固定, 油红O染色。

1.4.4 人脐带间充质干细胞条件培养基收集及电泳 取生长良好的第5代后细胞, 在生长旺盛时期, 换用无血清基础培养基培养3 d, 收集条件培养基并用0.22 μm的过滤器过滤, 除去细胞碎片及其他较大粒径的颗粒物。用BCA测定条件培养基的总蛋白浓度后, 凝胶电泳考马斯亮蓝染色检测条件培养基中的蛋白质。

1.4.5 人脐带间充质干细胞条件培养基中相关因子蛋白质量浓度测定 使用ELISA试剂盒测定脐带间充质干细胞条件培养基中血管内皮生长因子、白细胞介素8、单核细胞趋化蛋白1质量浓度。严格按照ValukineTMELISA试剂盒说明书配置洗涤液、显色剂、稀释剂、标准品(2 000 ng/L)进行实验操作测定各种细胞因子的质量浓度。

1.4.6 脐带间充质干细胞条件培养基脂质体制备 按一定比例($m_{胆固醇} : m_{卵磷脂} = 10 : 1$)称取适量的胆固醇和卵磷脂溶解于三氯甲烷置于圆底烧瓶中, 在旋转蒸发器中真空干燥形成脂质体薄膜, 按照 $V(三氯甲烷) : V(条件培养基) = 2 : 3$ 加入条件培养基进行水化, 然后超声均质, 制得人脐带间充质干细胞条件培养基脂质体, 观察其形态并测定其粒径^[21-23]。

1.4.7 大鼠皮肤创面模型制备并用人脐带间充质干细胞分泌因子脂质体处理伤口 将SD大鼠经腹腔注射10%水合氯醛(3.5 mL/kg)麻醉后将其固定进行背部脱毛、清洁。在大鼠背部脊椎两侧分别切除两个直径为1 cm的全层皮肤缺损伤口, 分笼饲养。对每只大鼠的不同伤口给予空白培养基、空白培养基脂质体、条件培养基、条件培养基脂质体4种不同的药物包扎处理并分组(将纱布剪成适当大小长条状(1 cm×2 cm)浸泡于各药液中, 将药液浸湿的纱条覆盖在伤口处, 纱条上覆盖油纱、纱布, 最后用绷带缠绕大鼠腹部使辅料固定), 每天换药1次观察1周, 见图1。术后2, 3, 5, 7 d定时观察伤口修复情况拍照记录并收集组织样本(创面新生皮肤组织及周围少许正常皮肤)。

1.4.8 伤口组织病理切片苏木精-伊红染色 收集的组织样本用体积分数4%甲醛固定1 d, 梯度脱水, 石蜡包埋, 4 μm连续切片, 常规苏木精-伊红染色, 中性树胶封固, 光学显微镜下观察新生皮肤病理学改变。

1.4.9 组织学评分^[24] 对伤口组织病理切片进行组织学评分, 见表1。

表1 组织学评分标准
Table 1 Histological scoring

分值	表皮和真皮再生	细胞浸润	肉芽组织
1-3	在伤口中具有或不具有最小发育的腺体结构形成的最小至中度的上皮再形成	伤口覆盖有薄至中等的细胞层	仅围绕伤口边缘的颗粒
4-7	完全重新上皮化, 在伤口中形成最小的发育腺体结构	伤口覆盖厚细胞层	围绕伤口边缘和30%–50%的伤口创面
8-10	完全重新上皮化, 在伤口中形成相当多的发展中腺体结构	伤口覆盖有非常稠密和密集的细胞层	围绕伤口边缘和>50%的伤口床的厚的肉芽

1.5 主要观察指标 ①人脐带间充干细胞的形态;②人脐带间充干细胞表面标志物的表达;③人脐带间充干细胞成脂细胞、成骨细胞诱导分化能力;④条件培养基SDS-PAGE凝胶中细胞分泌因子蛋白条带鉴定;⑤条件培养基中细胞因子血管内皮生长因子、白细胞介素8、单核细胞趋化蛋白1的质量浓度测定;⑥条件培养基脂质体囊泡的形态观察;⑦条件培养基脂质体囊泡粒径测定;⑧大鼠伤口术后不同时间点伤口修复情况与组织病理观察及评分。

1.6 统计学分析 实验数据用统计软件SPSS 17.0进行分析。多样本均数比较采用单因素方差分析,采用 t 检验进行组间比较,当 $P < 0.05$ 认为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 人脐带间充质干细胞的原代培养 原代培养第10天可见脐带组织块周围有大量贴壁细胞爬出,细胞大小不一,呈短棒状或多角形。待生长达80%融合时去除组织块,进行消化传代。传至第3代时,细胞呈形态大小均一的长梭形漩涡状。见图2。

2.2 人脐带间充质干细胞表面标志物检测 第3代人脐带间充质干细胞经流式细胞仪检测细胞表面抗原,结果显示CD105、CD44、CD29的阳性率分别为99.7%、95.7%、99.4%,CD45、CD34的阳性率分别为1.1%、0.1%,见图3。

2.3 人脐带间充质干细胞成骨细胞、成脂肪细胞诱导 如图4, 5所示:人脐带间充质干细胞成骨细胞诱导28 d后,经茜素红染色可见红色颗粒物;成脂细胞诱导21 d后,油红O染色呈可见大量油样的红色空泡。表明人脐带间充质干细胞可向成骨细胞、成脂细胞方向分化。

2.4 人脐带间充质干细胞条件培养基SDS-PAGE考马斯亮蓝染色 第5代人脐带间充质干细胞的条件培养液蛋白质量浓度为0.145 g/L,经考马斯亮蓝染色SDS-PAGE,70 kD有蛋白条带出现,而空白培养基没有蛋白条带出现,见图6。人脐带间充质干细胞条件培养基中含有细胞分泌因子,用无血清的基础培养基培养人脐带间充质干细胞可获得无动物源性的条件培养基(干细胞分泌因子)。

2.5 人脐带间充质干细胞条件培养基中相关因子蛋白浓度 经ELISA测定,条件培养液中血管内皮生长因子、白细胞介素8、单核细胞趋化蛋白1的质量浓度分别为558.60 ng/L、5 236.48 ng/L、2 972.55 ng/L。

2.6 人脐带间充质干细胞条件培养基脂质体电镜观察 电镜下,用薄膜分散法制备得到人脐带间充质干细胞分泌因子脂质体呈不规则的圆球状,大小不均一,但分散比较均匀,见图7。

2.7 脐带间充质干细胞分泌因子脂质体囊泡粒径 用薄膜分散法制备得到人脐带间充质干细胞条件培养基脂质体,其粒径呈拟正态分布,粒径范围在37.84~3 580.00 nm,平均粒径为262.3 nm,见图8。

2.8 观察大鼠伤口愈合情况及病理组织切片判断其修复效果 大鼠皮肤创口修复实验表明,人脐带间充质干细胞条件培养基及其脂质体制剂均可以促进创伤的修复,创口及周边组织石蜡切片苏木精-伊红染色后,光镜下观察可见:空白对照组与空白脂质体对照组,创面修复缓慢,真皮层及创面深层未见腺体和毛囊生成,有组织水肿;人脐带间充质干细胞条件培养基组,早期大鼠皮肤表皮层加厚,创面下腺体与毛囊增多;人脐带间充质干细胞条件培养基脂质体组,早期大鼠皮肤表皮层加厚,创面下及皮肤深层的腺体与毛囊增多,后期毛囊和皮脂腺细胞发生迁移和上皮分化。干细胞分泌因子及其脂质体处理伤口,可促进了创口的愈合和修复,表现为促进伤口处毛囊和皮脂腺生成、迁移和上皮分化,从而促进创面缩小,加快损伤组织的修复。与单纯的人脐带间充质干细胞条件培养基组相比,人脐带间充质干细胞条件培养基脂质体组在皮肤深层也发现大量腺体和毛囊生成的变化,说明人脐带间充质干细胞条件培养基脂质体制剂具有渗透到皮肤深层来促进损伤修复的作用,见图9。

对伤口组织病理切片进行组织学评分,见图10。第2天的条件培养基与条件培养基脂质体差异无显著性意义($P=0.730$),其他各组之间有显著差异($P < 0.05$)。

3 讨论 Discussion

通过人脐带组织块贴壁培养法分离纯化获得的人脐带间充质干细胞符合目前国际细胞治疗协会关于间充质干细胞的鉴定标准^[25]。用无血清的基础培养基培养人脐带间充质干细胞可获得无动物源性的条件培养基,为收集细胞分泌因子提供了技术支持。选用天然蛋黄卵磷脂与胆固醇通过薄膜分散法制得包裹条件培养基的脂质体囊泡,为脂质体包裹天然细胞分泌因子或蛋白多肽物质提供了理论支持和技术路线。

血管内皮生长因子是一种特异性作用于血管内皮细胞的多功能因子,它能引起血管通透性增加、细胞外基质成分改变,诱导新生血管的形成和肉芽组织形成;白细胞介素8通过加速角质形成细胞迁移和增殖促进皮肤再上皮化;单核细胞趋化蛋白1促进皮肤伤口愈合作为免疫系统特别是巨噬细胞的化学引诱物^[26]。在大鼠皮肤创伤修复过程中,用干细胞分泌因子及其脂质体处理伤口,促进创口的愈合和修复,且条件培养基脂质体组在皮肤深层发现大量皮脂腺和毛囊生成,表明干细胞分泌因子的脂质体制剂通过渗透到皮肤深层来促进损伤修复,其值得临床应用研究和开发。通过EILSA技术检测,确定人脐带间充质干细胞条件培养基中含有血管内皮生长因子、白细胞介素8和单核细胞趋化蛋白1等细胞因子。

干细胞分泌因子经SDS-PAGE电泳考马斯亮蓝染色后,发现70 kD及 ≥ 180 kD有明显的蛋白条带出现,这些大分子蛋白条带有可能是人脐带间充质干细胞分泌的大分

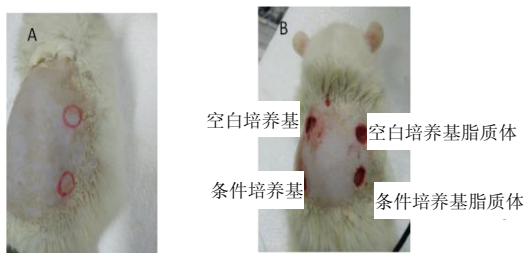
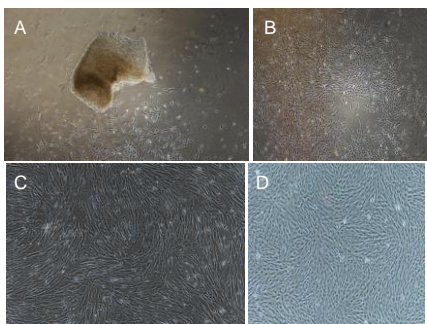
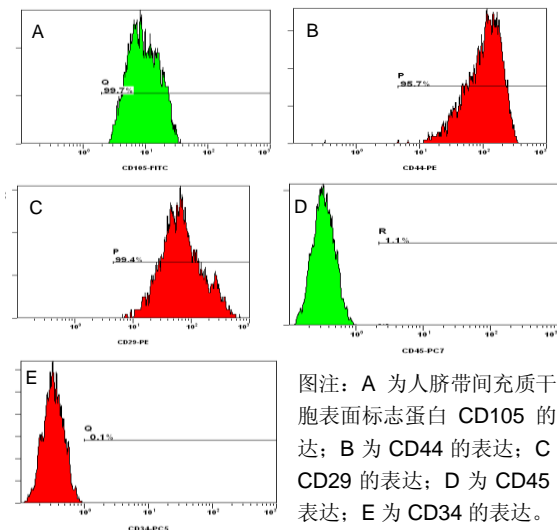


图1 大鼠皮肤缺损模型(A)及分组(B)
Figure 1 Rat skin defect model (A) and grouping (B)



图注: 图中 A 为.原代人脐带间充质干细胞, 细胞大小不一, 呈短棒状或多角形; B 为第 1 代人脐带间充质干细胞; C 为第 3 代人脐带间充质干细胞, 细胞呈形态大小均一的长梭形漩涡状; D 为第 5 代间充质干细胞。
图 2 人脐带间充质干细胞形态特征(x40)
Figure 2 Morphological characteristics of human umbilical cord mesenchymal stem cells (x40)



图注: A 为人脐带间充质干细胞表面标志蛋白 CD105 的表达; B 为 CD44 的表达; C 为 CD29 的表达; D 为 CD45 的表达; E 为 CD34 的表达。
图 3 第 3 代人脐带间充质干细胞表面标志蛋白检测结果
Figure 3 Surface marker protein detection of passage 3 human umbilical cord mesenchymal stem cells



图注: 间充质干细胞成骨细胞诱导茜素红染色可见可见红色颗粒物。
图 4 人脐带间充质干细胞成骨细胞分化(x50)
Figure 4 Osteogenic differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells (x50)

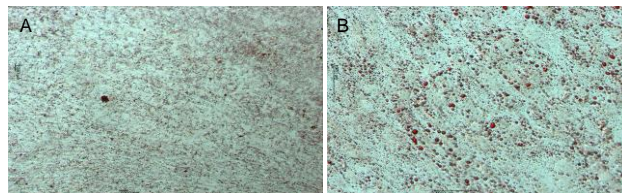


图 5 人脐带间充质干细胞成脂肪细胞分化(油红 O 染色, A: x50, B: x200)
Figure 5 Adipogenic differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells (oil red O staining, A: x50, B: x200)

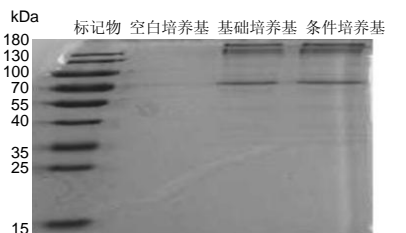


图 6 条件培养基考马斯亮蓝染色电泳图
Figure 6 Coomassie brilliant blue staining electrophoresis in the conditioned medium



图 7 脐带间充质干细胞分泌因子脂质体囊泡形态学电镜观察
Figure 7 Morphological observation of human umbilical cord mesenchymal stem cells secreting factor liposomal vesicles

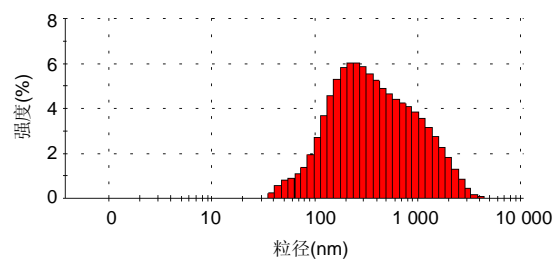
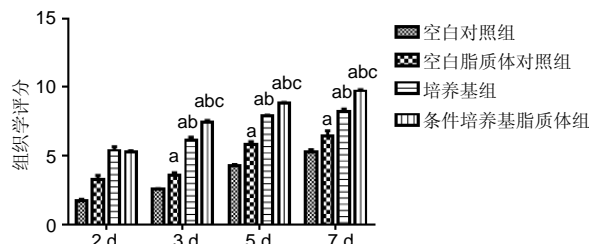
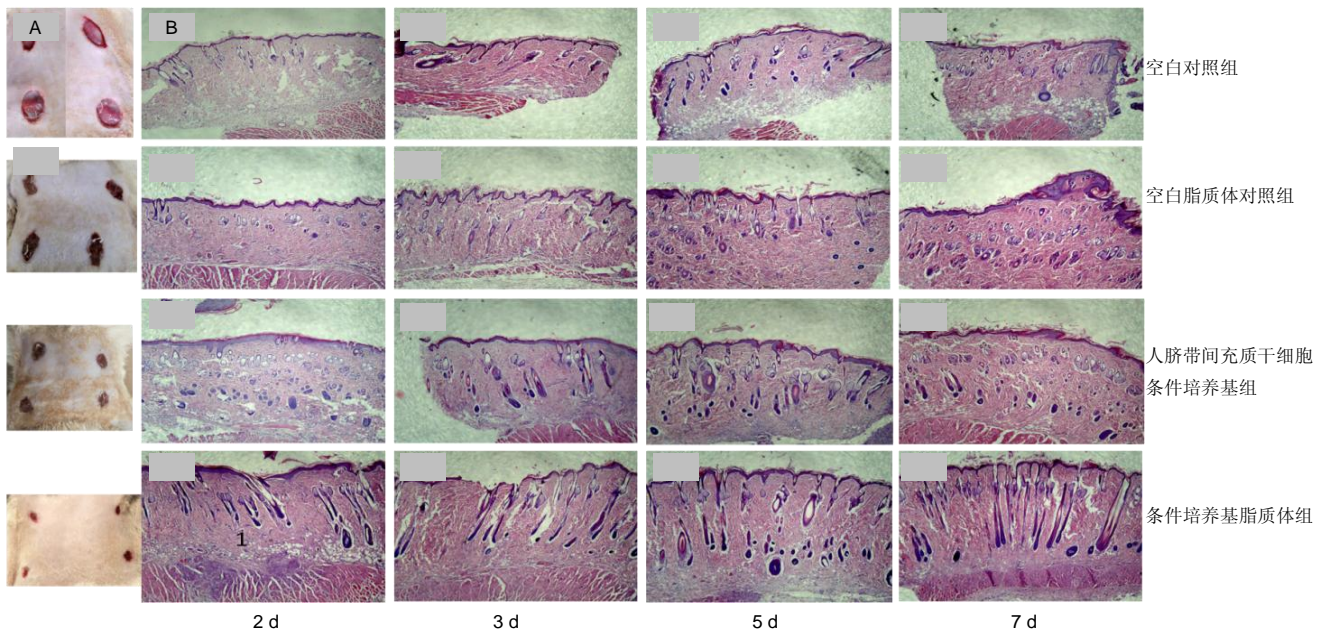


图 8 脐带间充质干细胞分泌因子脂质体囊泡粒径检测图
Figure 8 Detection of liposomal vesicle size of human umbilical cord mesenchymal stem cell secreting factors



图注: 与空白对照组相比, ^aP < 0.05; 与空白脂质体对照组相比, ^bP < 0.05; 与人脐带间充质干细胞条件培养基组, ^cP < 0.05。
图 10 伤口组织病理切片组织学评分统计
Figure 10 Histological scoring of wound tissues



图注: 图中 A 为 7 d 伤口愈合情况; B 为病理组织切片(苏木精-伊红染色, $\times 50$): 空白对照组与空白脂质体对照组, 创面修复缓慢, 真皮层及创面深层未见腺体和毛囊生成, 有组织水肿; 人脐带间充质干细胞条件培养基组, 早期大鼠皮肤表皮层加厚, 创面下腺体与毛囊增多; 人脐带间充质干细胞条件培养基脂质体组, 早期大鼠皮肤表皮层加厚, 创面下及皮肤深层的腺体与毛囊增多, 后期毛囊和皮脂腺细胞发生迁移和上皮分化。

图 9 大鼠伤口模型修复情况

Figure 9 Rat model of skin wound repair

子蛋白外, 还有可能是干细胞分泌的外泌体, Zhang等^[27]人研究报道人脐带间充质干细胞外泌体亦有助于伤口的修复。

脂质体囊泡、条件培养基、条件培养基(细胞分泌因子)脂质体囊泡均可促进皮肤伤口修复, 但条件培养基与细胞分泌因子脂质体囊泡对早期伤口修复没有明显差别。脂质体囊泡选用的是可降解天然生物磷脂材料, 与细胞膜具有相似的结构和成分可加速伤口处细胞的新陈代谢, 从而有助于伤口的修复。条件培养基中含有大量有助于伤口修复的细胞因子诱导皮肤创伤基底层和浅层结缔组织处毛囊和腺体的发生与上皮化从而促进皮肤伤口修复, 细胞分泌因子脂质体囊泡中的磷脂可以将细胞分泌因子递送到创伤深层, 诱导皮肤深层结缔组织毛囊和腺体的发生与上皮化^[28-29]。

干细胞移植治疗作为一种新型的治疗手段为组织损伤修复带来了希望, 但其在体内的存活能力差, 可以募集宿主体内的干细胞迁移到伤口处, 从而促进伤口的修复^[30-31]。研究发现间充质干细胞分泌物与间充质干细胞功能相似, 直接递送间充质干细胞分泌物修复损伤组织可能是干细胞移植替代策略之一, 其增加药物在体内的半衰期^[32]。干细胞移植治疗法可引发机体免疫排斥反应, 亦可选择免疫原性较低的胎盘干细胞用于治疗。

细胞分泌因子脂质体囊泡包裹率应是当前研究的一个重要参数, 但实验中细胞分泌因子脂质体囊泡作为表皮药物发挥作用, 其未包裹的细胞因子可以直接快速作用于伤口。鉴于细胞因子成分复杂, 且目前掌握的脂质体分离技

术方法未能将实验中的细胞分泌因子与细胞因子制备的脂质体囊泡有效分离, 故未对细胞分泌因子脂质体囊泡的包裹率进行检测。

当前实验对人脐带间充质干细胞分泌因子脂质体在伤口修复中的作用进行研究, 人脐带间充质干细胞条件培养基对促进伤口修复的具体作用机制尚未阐明, 有待进一步研究, 为人脐带间充质干细胞分泌因子治疗伤口愈合提供新的治疗方向。

作者贡献: 实验设计实施为傅松涛、刘美林; 实验实施为刘美林、王培森、郝冉; 实验指导, 傅松涛、常冰梅; 实验评估由傅松涛、常冰梅、侯秀英。

经费支持: 该文章接受了“山西省重点研发计划项目(201603D321080)”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。

机构伦理问题: 实验方案经山西医科大学动物实验伦理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在戊巴比妥麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

知情同意问题: 参与实验的所有供者均对试验过程完全知情同意, 在充分了解该实验方案的前提下签署了“知情同意书”。

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: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合本刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经山西医科大学生物统计学专家审核。

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4.0”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] Dominici M, Le BK, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315.
- [2] Modo M, Rezaie PP, Patel S, et al. Transplantation of neural stem cells in a rat model of stroke: assessment of short-term graft survival and acute host immunological response. *Brain Res*. 2002;958(1):70-82.
- [3] Kucia M, Reza R, Miekus K, et al. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem Cells*. 2005;23(7):879-894.
- [4] Sell S. On the stem cell origin of cancer. *Am J Pathol*. 2010; 176(6):2584-2494.
- [5] Lee M J, Kim J, Lee K I, et al. Enhancement of wound healing by secretory factors of endothelial precursor cells derived from human embryonic stem cells. *Cytotherapy*. 2011;13(2): 165-178.
- [6] Chen L, Tredget EE, Wu PY, et al. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *Plos One*. 2008; 3(4):e1886.
- [7] Kim W S, Park B S, Sung J H. Protective role of adipose-derived stem cells and their soluble factors in photoaging. *Arch Dermatol Res*. 2009;301(5):329.
- [8] Larios C, Espina M, Alsina MA, et al. Interaction of three β -interferon domains with liposomes and monolayers as model membranes. *Biophys Chem*. 2004;111(2):123-133.
- [9] Proksch E, Brandner JJ. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol*. 2008;17(12):1063-1072.
- [10] Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, et al. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008;453(7193):314-321.
- [11] Wang T, Fang X, Yin ZS. Endothelial progenitor cell-conditioned medium promotes angiogenesis and is neuroprotective after spinal cord injury. *Neural Regen Res*. 2018;13(5):887-895.
- [12] Monteiro N, Martins A, Rui LR, et al. Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. *J R Soc Interface*. 2014;11(101):20140459.
- [13] Xing Y, Wen CY, Li ST, et al. Non-viral liposome-mediated transfer of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. *Neural Regen Res*. 2016;11(4):617-622.
- [14] Thomas HE, Zhang Y, Stefely JA, et al. Mitochondrial complex I activity is required for maximal autophagy. *Cell Rep*. 2018; 24(9):2404-2417.
- [15] Sapar ML, Ji H, Wang B, et al. Phosphatidylserine externalization results from and causes neurite degeneration in drosophila. *Cell Rep*. 2018;24(9):2273-2286.
- [16] Bozzuto G, Molinari A. Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine*. 2015;2015:975-999.
- [17] Yingchoncharoen P, Kalinowski DS, Richardson DR. Lipid-based drug delivery systems in cancer therapy: what is available and what is yet to come. *Pharmacol Rev*. 2016; 68(3):701-787.
- [18] Irina A, Andrey E, Andrey M, et al. Umbilical cord as prospective source for mesenchymal stem cell-based therapy. *Stem Cells Int*. 2016; 2016(3):6901286.
- [19] Davies JE, Walker JT, Keating A. Concise review: wharton's jelly: the rich, but enigmatic, source of mesenchymal stromal cells. *stem cells Transl Med*. 2017;6(7):1620.
- [20] Arno AI, Amininik S, Blit PH, et al. Human Wharton's jelly mesenchymal stem cells promote skin wound healing through paracrine signaling. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5(1):28.
- [21] Li, ZY, Paulson AT, Gill T A. Encapsulation of bioactive salmon protein hydrolysates with chitosan-coated liposomes. *J Funct Foods*. 2015;19:733-743.
- [22] Jøraholmen MW, Basnet P, Acharya G, et al. PEGylated liposomes for topical vaginal therapy improve delivery of interferon alpha. *Eur J Pharm Biopharm*. 2017;113:132-139.
- [23] Yang L, Yang W, Bi D, et al. A novel method to prepare highly encapsulated interferon- α -2b containing liposomes for intramuscular sustained release. *Eur J Pharm Biopharm*. 2006;64(1):9-15.
- [24] Boulton AJ, Vileikyte L, Ragnarsontennvall G, et al. The global burden of diabetic foot disease. *Lancet*. 2005;366(9498): 1719-1724.
- [25] Dominici M, Le BK, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317.
- [26] Jayaraman P, Nathan P, Vasanthan P, et al. Stem cells conditioned medium: a new approach to skin wound healing management. *Cell Biol Int*. 2013;37(10):1122-1128.
- [27] Zhang B, Wang M, Gong A, et al. HucMSC-exosome mediated -Wnt4 signaling is required for cutaneous wound healing. *Stem Cells*. 2015;33(7):2158.
- [28] Ueda M, Nishino Y. Cell-based cytokine therapy for skin rejuvenation. *J Craniofac Surg*. 2010;21(6):1861-1866.
- [29] 王黎明. 脐带间充质干细胞的分泌蛋白表达谱研究[D]. 合肥:安徽医科大学, 2014.
- [30] Arno AI, Saeid AN, Blit PH, et al. Effect of human Wharton's jelly mesenchymal stem cell paracrine signaling on keloid fibroblasts. *Stem Cells Transl Med*. 2014;3(3):299-307.
- [31] Shin L, Peterson D A. Human mesenchymal stem cell grafts enhance normal and impaired wound healing by recruiting existing endogenous tissue stem/progenitor cells. *Stem Cells Transl Med*. 2013;2(1):33-42.
- [32] Talwadekar MD, Kale VP, Limaye LS. Placenta-derived mesenchymal stem cells possess better immunoregulatory properties compared to their cord-derived counterparts—a paired sample study. *Sci Rep*. 2015;5:15784.