

提高间充质干细胞治疗难愈性创面的策略

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.2176>

2095-4344.2176

投稿日期: 2020-04-18

送审日期: 2020-04-22

采用日期: 2020-05-19

在线日期: 2020-08-20

中图分类号:

R459.9; R394.2; R318

文章编号:

2095-4344(2021)07-01081-07

文献标识码: A

汪显耀^{1, 2}, 关亚琳³, 刘忠山³

文章快速阅读:

文章特点一

△系统介绍了难愈性创面的形成机制、间充质干细胞治疗难愈性创面的分子机制以及提高间充质干细胞对难愈性创面疗效的策略;

△重点介绍了间充质干细胞进行基因修饰和预处理。

文章背景:

(1) 以间充质干细胞为基础的细胞疗法治疗难愈性创面有好的效果;
(2) 难愈性创面的微环境限制了间充质干细胞固有功能的发挥。

目的:

就提高间充质干细胞治疗难愈性创面效果的策略作一综述。

意义:

文章总结出通过基因修饰和预处理的方法可提高间充质干细胞治疗难愈性创面效果的策略, 为间充质干细胞治疗难愈性创面提供理论依据。

文题释义:

难愈性创面: 创面愈合是一个完整、复杂的动态生物学过程, 其可分为炎症反应期、组织增殖期和组织重塑期3个阶段, 当某一阶段失控则会导致组织损伤无法得到正常的修复, 形成难愈性创面。难愈性创面多是在各种潜在性疾病的基础上形成的, 例如糖尿病、血管功能不全、烧伤、血管炎及辐射等, 同时创面持续的炎症状态会产生级联反应, 并使不愈合的状态持续下去。

间充质干细胞: 是一类具有自我更新能力的多能干细胞, 来源广泛, 具有分化、低免疫原性和免疫调节等优点。间充质干细胞应用于组织修复是近来研究的热点, 其可以通过直接分化参与组织修复, 也可通过旁分泌途径发挥免疫调节、促进创面血管化和再上皮化、动员基底干细胞发挥创面修复作用。

摘要

背景: 以间充质干细胞为基础的细胞疗法蓬勃发展, 在治疗难愈性创面方面具有很大的前景优势。

目的: 综述提高间充质干细胞治疗难愈性创面疗效的策略, 以期为临床治疗难愈性创面提供理论依据。

方法: 检索万方、CNKI、PubMed、Web of Science 等数据库2002年3月至2020年3月期间关于间充质干细胞应用于难愈性创面的文献, 检索词分别为“间充质干细胞, 难愈性创面(慢性难愈性创面), 创面修复, 组织再生”和“mesenchymal stem cells, nonhealing chronic wound, wound repair, tissue regeneration”。排除陈旧以及重复的观点, 将检索到的文献进行整理, 共纳入64篇文献来进行分析。

结果与结论: ①梳理了难愈性创面的形成机制; ②总结了间充质干细胞治疗难愈性创面的分子机制, 例如直接分化、旁分泌、免疫调节、动员创面基底干细胞参与创面修复等; ③总结了提高间充质干细胞对难愈性创面疗效的策略, 例如基因修饰、预处理等; ④上述研究为提高间充质干细胞治疗难愈性创面疗效提供了理论依据。

关键词: 干细胞; 间充质干细胞; 难愈创面; 基因修饰; 预处理; 创面修复; 综述

Strategies for improving the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells in the treatment of nonhealing wounds

Wang Xian Yao^{1, 2}, Guan Yalin³, Liu Zhongshan³

¹Center for Tissue Engineering and Stem Cell Research, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China; ²Department of Immunology, Guizhou Medical University, Gui'an New Area 550025, Guizhou Province, China; ³Department of Burn and Plastic Surgery, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Wang Xian Yao, Doctoral candidate, Center for Tissue Engineering and Stem Cell Research, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China; Department of Immunology, Guizhou Medical University, Gui'an New Area 550025, Guizhou Province, China

Corresponding author: Liu Zhongshan, MD, Associate chief physician, Master's supervisor, Department of Burn and Plastic Surgery, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

¹ 贵州医科大学组织工程与干细胞实验中心, 贵州省贵阳市 550004; ² 贵州医科大学免疫学教研室, 贵州省贵安新区 550025; ³ 贵州医科大学附属医院整形烧伤科, 贵州省贵阳市 550004

第一作者: 汪显耀, 男, 1991年生, 河南省信阳市人, 汉族, 贵州医科大学在读博士, 主要从事干细胞与组织工程基础研究。

通讯作者: 刘忠山, 博士, 副主任医师, 硕士生导师, 贵州医科大学附属医院整形烧伤科, 贵州省贵阳市 550004

<https://orcid.org/0000-0002-1742-2045>(汪显耀)

基金资助: 贵州省科技合作项目(黔科合LH字【2016】7233号), 项目负责人: 刘忠山

引用本文: 汪显耀, 关亚琳, 刘忠山. 提高间充质干细胞治疗难愈性创面的策略[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(7): 1081-1087.



Abstract

BACKGROUND: Mesenchymal stem cell-based therapy is pursued aggressively with promising preclinical studies and higher future prospect in the treatment of nonhealing wounds.

OBJECTIVE: To review the strategies for improving the efficacy of mesenchymal stem cells in the treatment of nonhealing wounds, which are expected to provide theoretical basis for clinical treatment of nonhealing wounds.

METHODS: Wanfang, CNKI, PubMed and Web of Science were searched for articles about the application of mesenchymal stem cells in nonhealing wounds from March 2002 to March 2020. The key words were “mesenchymal stem cells, nonhealing wounds (nonhealing chronic wounds), wound repair, tissue regeneration” in Chinese and “mesenchymal stem cells, nonhealing chronic wound, wound repair, tissue regeneration” in English. After excluding outdated and repetitive viewpoints, the retrieved literature was sorted out and a total of 64 articles were included for analysis.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The formation mechanism of nonhealing wounds was summarized. (2) The molecular mechanisms of mesenchymal stem cells in the treatment of nonhealing wounds were summarized, such as direct differentiation, paracrine, immunomodulatory, mobilization resident stem cells to participate in wound repair. (3) This paper summarized the improvement of the efficacy of mesenchymal stem cells in the treatment of nonhealing wounds, such as gene modification and pretreatment. (4) This study can provide a theoretical basis for improving the efficacy of mesenchymal stem cells in the treatment of nonhealing wounds.

Key words: stem cells; mesenchymal stem cells; nonhealing wounds; genetic modifications; preconditioning; wound repair; review

Funding: the Science and Technology Cooperation Project of Guizhou Province, No. Qian Kehe LH word [2016] 7233 (to LZS)

How to cite this article: WANG XY, GUAN YL, LIU ZS. Strategies for improving the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells in the treatment of nonhealing wounds. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(7):1081-1087.

0 引言 Introduction

创面愈合是一个动态的过程, 涉及出凝血、急性炎症、细胞迁移、增殖、分化、血管生成、再上皮化、细胞外基质合成与重塑等一系列事件, 而这些复杂的事件主要可分为3个阶段, 即炎症反应期、组织增殖期和组织重塑期。在创面修复过程中, 多种细胞间存在着复杂的信号关系^[1]。研究表明, 毛囊干细胞和表皮干细胞等对创面再上皮化过程具有一定的促进作用^[2]。虽然正常的创面愈合遵循这样的规律, 但在某些情况下损伤的程度决定了创面愈合的进程, 如放射性皮肤溃疡、重度烧伤、糖尿病足等难愈性创面久治不愈, 给患者带来了极大的痛苦。近年来, 间充质干细胞因独特的生物学特征使其成为组织工程和干细胞移植的理想种子细胞^[3]。但是, 难愈性创面的微环境限制了间充质干细胞固有功能的发挥, 因此对间充质干细胞进行有效地基因修饰或预处理以维持甚至提高间充质干细胞固有特征, 是促进创面愈合的关键。文章就提高间充质干细胞治疗难愈性创面效果的策略作一综述。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源 由第一作者通过计算机检索万方、CNKI、PubMed、Web of Science 等数据库中收录的文章。文献发表时间为2002年3月至2020年3月, 检索关于间充质干细胞治疗难愈性创面的系列研究。中文检索词为“间充质干细胞, 难愈性创面(慢性难愈性创面), 创面修复, 组织再生”, 检索公式为: (间充质干细胞 AND 难愈性创面) OR (间充质干细胞 AND 创面修复) OR (间充质干细胞 AND 组织再生); 英文检索词为“mesenchymal stem cells, nonhealing chronic wound, wound repair, tissue regeneration”, 检索公式为: (mesenchymal stem cells AND nonhealing chronic wound) OR (mesenchymal stem cells AND wound repair) OR (mesenchymal stem cells AND tissue regeneration)。共检索到中文文献394篇, 英文文献1126篇。

1.2 入选标准 将文献进行筛选, 去除重复文献, 选择与研究目的和研究内容紧密联系的文献。

1.3 质量评估 由2人进行信息情报检索, 选取64篇相关文献进行归纳整理。文献筛选流程见图1。

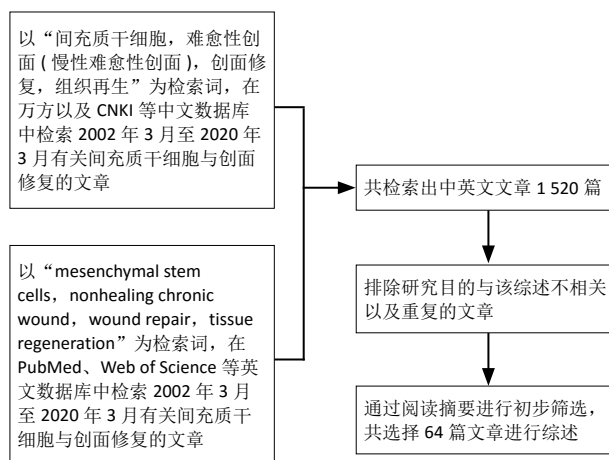


图1 | 文献筛选流程图

2 结果 Results

2.1 难愈性创面形成机制 创面愈合是一个完整、复杂的动态生物学过程, 其可分为炎症反应期、组织增殖期和组织重塑期3个阶段, 当某一阶段失控则会导致组织损伤无法得到正常的修复, 形成难愈性创面。难愈性创面多是在各种潜在性疾病的基础上形成的, 例如糖尿病、血管功能不全、烧伤、血管炎及辐射等^[4]。事实上, 创面的愈合过程往往会受到各种因素的干扰, 主要包括感染、组织缺氧、坏死、渗出物和过量的炎性细胞因子等^[5]。创面持续的炎症状态会产生级联反应, 并使不愈合的状态持续下去。中性粒细胞过度浸润是慢性伤口的生物学标志, 从一方面而言, 中性粒细胞释放大量的酶, 如胶原酶, 分解细胞外基质影响细胞支架的形成; 此外, 中性粒细胞释放弹性蛋白酶, 它会破坏部分细胞因子从而会影响创面的愈合, 如血小板衍生生长因子、转化生长因子β等^[6]。目前临床对于难愈性创面的治疗手段仍为手术治疗, 自体皮瓣移植是常用的手术方式。由于损伤部位和全身处于持续的炎症状态^[7], 为损伤修复带来了巨大的挑战。现阶段对于难愈性创面的治疗缺乏有效药物, 而外科手术术后

口再上皮化过程也会受到一定的影响,因此针对难愈性创面的治疗迫切需要开发新的技术和治疗手段。

2.2 间充质干细胞治疗难愈性创面 间充质干细胞是一类具有自我更新能力的多能干细胞,在骨髓、脂肪组织、脐带、脐血、羊膜、牙髓等组织中均有发现,能够分化为成骨细胞、脂肪细胞和软骨细胞^[8-9]。它们具有低免疫原性和免疫调节等优点,并且不同来源的间充质干细胞都具有诱导再生和维持组织内环境稳态的共同特征^[10]。目前,虽然在临床和基础实验中间充质干细胞已经应用到多种疾病研究中,并显示出良好的治疗效果,但是大部分移植的间充质干细胞并不能充分发挥其治疗潜能,其主要原因包括迁移到损伤或病灶部位的干细胞数量有限,被局部微环境破坏,以及长时间的培养使其分化和增殖能力减弱等。因此,需要对间充质干细胞进行基因改造或预处理以增强细胞迁移或黏附能力,提高细胞对微环境的抵抗能力,提高细胞存活率和细胞抗衰老能力等。

2.2.1 间充质干细胞治疗难愈性创面的分子机制 早在2012年,BALAJI等^[11]就总结了间充质干细胞修复创面的主要4种机制,即间充质干细胞直接分化为皮肤细胞参与创面修复、间充质干细胞免疫调节、间充质干细胞旁分泌效应促进血管化和再上皮化、间充质干细胞动员基底干细胞发挥创面修复作用。目前,间充质干细胞修复创面的分子机制也主要以间充质干细胞的多系分化机制,以及间充质干细胞通过旁分泌途径发挥免疫调节、促进创面血管化和再上皮化、动员基底干细胞发挥创面修复作用为主。

虽然间充质干细胞来源于中胚层,但已有大量报道支持间充质干细胞具备向其他胚层分化的潜能。间充质干细胞除了成骨、成脂、成软骨分化外,在一定条件下间充质干细胞还可分化为血管平滑肌细胞、角质形成细胞、肝细胞、胰岛细胞等其他细胞类型^[12-14]。MAHMOOD等^[15]从胎盘中分离出羊膜上皮细胞和间充质干细胞,经鉴定发现分别能分化成角质形成细胞和成纤维细胞,有利于严重烧伤的创面修复。此外,也有报道证实间充质干细胞可直接分化为表皮细胞、血管内皮细胞、结缔组织、成纤维细胞等直接参与创面的修复。例如,间充质干细胞可以直接分化为上皮组织参与组织的修复^[16]。因此,间充质干细胞的分化特性使其成为未来开发人造皮肤的理想候选者,用于难愈性创面修复。

间充质干细胞具有强大的免疫调节能力,参与调节免疫细胞功能,利于创面修复。例如,将异体脂肪来源间充质干细胞应用于犬皮肤损伤,与常规治疗相比,脂肪来源间充质干细胞处理的伤口具有更高的再生能力,愈合速度更快;与对照创面相比,组织病理学检查显示炎症浸润消失,并出现多个毛囊,这表明脂肪来源间充质干细胞处理促进了表皮和真皮的再生^[17]。此外,间充质干细胞可通过直接接触或分泌细胞因子的方式抑制包括巨噬细胞、自然杀伤细胞、树突状细胞、单核细胞等免疫细胞在内的先天免疫系统细胞的激活,也能在减少T细胞增殖的同时阻止细胞毒性T细胞的增殖和B淋巴细胞的分化^[18]。NEMETH等^[19]将脂多糖刺激的巨噬细

胞与间充质干细胞共同培养时发现巨噬细胞产生更多的白细胞介素10,但如果间充质干细胞缺乏编码Toll样受体4、髓样分化因子MyD88、肿瘤坏死因子受体1 α 或环氧合酶2基因,这种现象就会消失。进一步研究发现间充质干细胞释放前列腺素E2,通过前列腺素EP2和EP4受体作用于巨噬细胞,从而影响细胞因子的分泌。然而,EL-SAYED等^[20]将不同来源以及不同培养代次的间充质干细胞与脾脏来源单个核细胞培养,发现各种来源的间充质干细胞均可抑制CD4的表达,而骨髓来源间充质干细胞抑制CD8的表达,脂肪来源间充质干细胞上调CD8的表达。脂肪来源间充质干细胞除了能促进单个核细胞释放白细胞介素10外,还可促进白细胞介素6、转化生长因子 β 的释放。但是与培养代次较早的骨髓来源间充质干细胞(第1代)相比,培养代次较晚的骨髓来源间充质干细胞(第6代)释放的转化生长因子 β 较少。因此,细胞来源和质量决定着间充质干细胞的免疫调节特性,提高间充质干细胞的免疫调节特性也是促进间充质干细胞治疗难愈性创面的关键因素。

间充质干细胞可通过旁分泌作用分泌多种因子促进组织修复并营造适宜的微环境。在患有I型白细胞黏附缺陷综合征(LAD1)的小鼠中,编码 β 2整合素共同 β 链的CD18基因突变会导致伤口愈合受损。通过移植间充质干细胞可恢复CD18基因突变的创面正常愈合速率,恢复转化生长因子 β 1水平。间充质干细胞释放的转化生长因子 β 1可促进肌成纤维细胞分化、伤口收缩和血管形成。JIANG等^[21]发现这种调节依赖于转化生长因子 β 1受体的感知,并将信号传递到miR-21,而miR-21抑制转化生长因子 β 1信号的负调控因子Smad7的翻译。MYUNG等^[22]检测发现富血小板血浆培养的脐血间充质干细胞分泌的细胞因子中血管内皮生长因子表达水平升高,体内实验发现脐血间充质干细胞联合富血小板血浆治疗组小鼠放射性皮肤溃疡伤口组织中血管内皮生长因子和CD31的表达较未治疗组增加,联合治疗可通过促进小鼠放射性皮肤溃疡模型中的血管生成来提高组织再生效率。最近研究表明,间充质干细胞来源的外泌体也在组织修复中发挥着重要作用。例如,经血间充质干细胞来源的外泌体可以通过诱导M1-M2巨噬细胞极化来降低炎症反应,上调血管内皮生长因子A促进新生血管生成^[23]。体内实验也发现外泌体很可能通过NF- κ B p65亚基的上调和激活NF- κ B信号通路,加速小鼠的再上皮化。此外,间充质干细胞来源的外泌体可以通过促进胶原合成和血管生成,进而促进创面的修复^[24]。因此,间充质干细胞来源的外泌体有效地提高了难愈性创面愈合效率,可用于再生医学,特别是难愈性创面的修复,如反射性皮肤溃疡、糖尿病足溃疡等。

间充质干细胞也可通过分泌细胞因子,动员基底干细胞参与创面修复。例如,间充质干细胞通过分泌细胞因子,激活 β 2肾上腺素能受体信号,促进角质形成细胞迁移,加速创面愈合^[25]。HOSSEINZADEH等^[26]将间充质干细胞与角质形成细胞在纳米纤维支架上共培养,发现间充质干细胞促进再

上皮化过程,利于伤口愈合。此外,间充质干细胞也能促进成纤维细胞和角质形成细胞的迁移来促进创面愈合^[27-28]。

2.2.2 通过基因修饰提高间充质干细胞治疗效果 应用间充质干细胞治疗难愈性创面时,通常都是以局部注射的方式进行给药。因此,通过对间充质干细胞进行基因修饰主要是为了提高细胞的黏附、增殖、存活能力以及减缓细胞衰老等。提高间充质干细胞的黏附性是决定其增殖和存活的关键,有助于细胞移植和组织再生。研究表明,细胞黏附能力与整合素关系密切,整合素通过黏附分子和细胞外基质参与调节细胞间黏附^[29]。通过提高整合素和黏着斑复合物的表达可提高间充质干细胞的黏附能力。例如,将大鼠骨髓间充质干细胞高表达整合素连接激酶,细胞内 ERK1/2 和 Akt 的磷酸化水平增加,细胞存活率显著提高^[30]。MAO 等^[31]首次在缺氧条件下高表达整合素连接激酶,发现骨髓间充质干细胞的白细胞介素 6 表达和分泌显著增加,骨髓间充质干细胞的自我更新能力和存活率得到提高。由于白细胞介素 6 的增加,检测到 JAK2/STAT3 信号激活,并显著上调 lncRNA-TCF7 的表达,促进了维持骨髓间充质干细胞活力和干性所需的 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活。此外,WP1066 特异性抑制 STAT3 信号传导和沉默 lncRNA-TCF7 的表达消除了整合素连接激酶过表达对低氧状态下骨髓间充质干细胞存活和自我更新的保护作用。总之,整合素连接激酶促进骨髓间充质干细胞存活和自我更新,提示高表达整合素连接激酶的骨髓间充质干细胞在组织修复领域具有较大的应用潜力。除了直接改变细胞黏附相关基因的表达外,也可以通过改变非编码 RNA(ncRNA)来调控间充质干细胞黏附。例如,高表达 miR-9-5p 不仅可以增强大鼠骨髓间充质干细胞的迁移能力,而且改善了细胞黏附性^[32]。miR-9-5p 直接靶向 CK1 α 和 GSK3 β ,促进骨髓间充质干细胞中 β -catenin 入核,增加 β -catenin 信号通路靶基因 Runx2 和 c-Myc 的表达,而且 miR-9-5p- β -catenin 信号轴涉及调控黏着斑的组装和细胞骨架的重排。移植的骨髓间充质干细胞对组织损伤修复效果不佳的原因主要是病灶组织供血不足、氧含量低。COPLAND 等^[33]研究了小鼠骨髓间充质干细胞对氧含量低、营养不良的应激环境的反应,以确定在骨髓间充质干细胞移植之前可以进行基因改造的目标分子。结合基因芯片和蛋白质组学筛选,他们发现纤溶酶原激活物抑制物 1(PAI-1)是在体外模拟缺血条件下持续上调的分子,随后研究将纤溶酶原激活物抑制物 1 定义为骨髓间充质干细胞在体内存活的负调控因子。骨髓间充质干细胞来源的纤溶酶原激活物抑制物 1 并不通过纤溶酶依赖的方式影响间充质干细胞的存活,而是直接影响间充质干细胞与其周围基质的黏附性。因此,抑制或敲除纤溶酶原激活物抑制物 1 基因表达可增强间充质干细胞黏附和移植细胞存活率,促进治疗效果。

移植的间充质干细胞存活率往往受到低氧和低营养条件的限制,而提高移植间充质干细胞的存活率对于改善创面愈合的疗效也起着积极的作用。缺氧诱导因子 1 α 是调节缺氧适应性反应的关键转录因子,缺氧诱导的细胞迁移、增殖、分

化和血管生成过程均与 Notch 信号上游的缺氧诱导因子 1 α 直接相关^[34]。当改变大鼠骨髓间充质干细胞中缺氧诱导因子 1 α 的表达,并将其暴露于缺氧低糖环境中,LV 等^[35]实验发现在缺氧低糖条件下高表达缺氧诱导因子 1 α 可提高细胞存活率,减少 G₁ 期细胞积聚,抑制细胞凋亡。进一步研究发现,高表达缺氧诱导因子 1 α 使 Beclin1 的表达增加,LC3 II /LC3 I 的比值降低,使 PI3K/AKT/mTOR 信号失活;而缺氧诱导因子 1 α 下调可使 PI3K/AKT/mTOR 信号激活。因此,高表达缺氧诱导因子 1 α 可通过细胞自噬和 PI3K/AKT/mTOR 信号通路参与保护骨髓间充质干细胞免受缺氧低糖环境诱导的损伤。肝细胞生长因子是另一种参与血管生成、抗炎以及抗凋亡的重要细胞因子。将人脐带间充质干细胞高表达肝细胞生长因子,发现缺氧条件下细胞凋亡率降低^[36],缺氧条件下高表达肝细胞生长因子的人脐带间充质干细胞培养液中检测到更高水平的磷酸化 Akt(p-Akt),降低 Bax/Bcl-2 比例。此外,缺氧条件下细胞培养液中血管内皮生长因子、表皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子的表达水平显著升高。因此,高表达肝细胞生长因子显著降低人脐带间充质干细胞移植凋亡率,促进细胞存活,有利于发挥组织修复的功能。DONG 等^[37]将大鼠骨髓间充质干细胞通过慢病毒的方式高表达 miR-10a,发现 miR-10a 抑制 KLF4-Bax/BCL2 信号通路,降低了缺氧诱导的细胞凋亡,提高了成熟骨髓间充质干细胞的存活率。此外,也有其他修饰基因,包括高表达长链非编码 RNA H19 (lncRNA H19)^[38]、miR-21^[39]、Gremlin1(GREM1)^[40]、蛋白激酶 C ϵ ^[41]、脑源性神经营养因子受体 (TrkB)^[42]、肿瘤坏死因子受体 (TNFR)^[43],共同高表达 Bcl-2 和血管内皮生长因子^[44],以及抑制 miR-34a 等^[45]。

间充质干细胞基因修饰的另一个关键问题是减缓培养或移植的细胞衰老。细胞衰老是不可逆的细胞增殖停滞,也是间充质干细胞移植效果不佳的重要原因。高表达 Sox2 和 Oct4 基因已被证明能导致人脂肪间充质干细胞 G₁ 期细胞比例减少,S 期细胞比例增加,说明 Sox2 和 Oct4 能使脂肪间充质干细胞从 G₁ 期向 S 期的转变加快,有效提高移植脂肪间充质干细胞的分化和增殖潜能^[46]。LI 等^[47]将高表达 Sox2 和 Oct4 基因的脂肪间充质干细胞与巨噬细胞 RAW264.7 共培养,与对照组培养上清液相比,共培养上清液诱导的 RAW264.7 细胞的促炎细胞因子表达明显降低。体内实验显示与对照注射组相比,高表达 Sox2 和 Oct4 基因的脂肪间充质干细胞组小鼠疾病评分降低到 34.9%,存活率提高了 11.1%。因此,高表达 Sox2 和 Oct4 除了降低脂肪间充质干细胞衰老,促进细胞增殖与分化外,还能提高脂肪间充质干细胞的抗炎作用。此外,线粒体活性氧(mtROS)稳态的破坏是诱导间充质干细胞衰老的关键因素。因此,防止线粒体活性氧积累有助于抑制间充质干细胞衰老。JUNG 等^[48]观察到人脐血间充质干细胞以传代依赖的方式反向调节 EphrinB2 和 EphB2 的表达,EphB2 信号诱导 SIRT3 线粒体易位。SIRT3 基因敲除可抑制 EphB2 信号在人脐血间充质干细胞中的作用,EphrinB2-Fc

通过 c-Src 磷酸化依赖的方式诱导 NRF-2 的核转位, 而 NRF-2 调控 SIRT3 的表达。EphB2 基因高表达使人脐血间充质干细胞中锰超氧化物歧化酶水平升高, 线粒体活性氧水平降低。此外, SIRT3 的脱乙酰酶作用通过赖氨酸 68 位点的脱乙酰基增强了锰超氧化物歧化酶的活性, EphB2 的激活增强了人脐血间充质干细胞对皮肤创面愈合的治疗作用。因此, EphB2 可通过 EphB2/c-Src 信号通路和 NRF-2 依赖的 SIRT3 表达, 通过锰超氧化物歧化酶介导的线粒体活性氧清除作用, 为提高人脐血间充质干细胞在创面修复治疗中的疗效提供新的靶点。

2.2.3 通过预处理提高间充质干细胞的治疗效果 间充质干细胞的预处理主要是利用化学或物理方式对间充质干细胞进行体外处理, 以期维持和增强间充质干细胞黏附、增殖、存活能力, 减少细胞衰老等。此外, 预处理也可以改善间充质干细胞与先天/适应性免疫系统的相互作用。例如, 经过低氧处理的间充质干细胞可通过释放多种抗炎细胞因子, 尤其是白细胞介素 10^[49], 使间充质干细胞比正常状态下具有更强的抗炎作用。JIANG 等^[50]发现低氧刺激可以增强人牙龈来源间充质干细胞对外周血单个核细胞的抑制作用, 提高人牙龈来源间充质干细胞的免疫调节作用。体内实验表明, 24 h 低氧刺激可显著促进人牙龈来源间充质干细胞的皮肤创面修复能力。经过低氧处理的人牙龈来源间充质干细胞可以通过降低炎症细胞因子肿瘤坏死因子 α 、升高抗炎细胞因子白细胞介素 10 等来抑制损伤皮肤的局部炎症, 提高创面修复疗效。

如前所述, 纤溶酶原激活物抑制物 1 是纤溶酶原激活系统的关键调节因子, 也是影响间充质干细胞移植后在病灶组织中存活的重要因素。既往研究表明, 在纤溶酶原激活物抑制物 1 中和抗体存在的情况下, 移植到损伤组织的细胞存活率显著增加, 而且辛伐他汀在调节纤溶酶原激活物抑制物 1 水平的蛋白质级联反应中起着重要的作用。De FARIA 等^[51]将辛伐他汀作为间充质干细胞移植的佐剂, 发现辛伐他汀促进间充质干细胞归巢效率, 从而提高间充质干细胞对组织修复的疗效。促红细胞生成素主要由肾脏产生, 能促进红系祖细胞的增殖和分化, 因此, 它被广泛应用于各种贫血的临床治疗, 如再生障碍性贫血等^[52]。研究发现, 促红细胞生成素受体也广泛分布于除肾脏以外的各种系统, 如大脑, 因此, 促红细胞生成素具有神经保护、抗氧化、抗炎、抗凋亡、抗氧化等功能^[53]。此外, 促红细胞生成素受体也分布在间充质干细胞中, LU 等^[54]在体外将人骨髓间充质干细胞以促红细胞生成素预处理, 发现促红细胞生成素能在高糖微环境中刺激骨髓间充质干细胞分泌血管内皮生长因子。更重要的是, 促红细胞生成素能减轻高糖微环境对骨髓间充质干细胞的损伤, 并促进其增殖和迁移功能, 抑制高糖诱导的骨髓间充质干细胞分泌炎症因子肿瘤坏死因子 α 。体内实验显示促红细胞生成素预处理的骨髓间充质干细胞实验组血管生成明显高于对照组, 间充质干细胞部分分化为内皮细胞。此外, 促红细胞生成素激活的骨髓间充质干细胞可抑制局部糖尿病足溃

瘍的单核细胞浸润。

在氧化应激条件下, 间充质干细胞活性降低, 并伴有凋亡发生。BAI 等^[55]用肿瘤坏死因子 α 预处理大鼠骨髓间充质干细胞 24 h, 发现骨髓间充质干细胞在氧化应激下的存活和迁移能力均增强。进一步研究发现肿瘤坏死因子 α 预处理可通过 NF- κ B 信号途径促进骨髓间充质干细胞在氧化应激下的存活和迁移。缺氧预处理的间充质干细胞也可通过 HIF-1 α 和 Beclin-1 信号通路发挥神经保护作用^[56]。不同低氧浓度预处理可减缓人骨髓间充质干细胞衰老, 在骨髓间充质干细胞的治疗中显示出良好的效果。例如, 体积分数为 1%O₂ 可以促进骨髓间充质干细胞增殖、细胞存活、干细胞相关基因 OCT4 和趋化因子受体 CXCR7 的表达, 降低衰老相关基因 β -gal 的表达^[57]。此外, 缺氧 (体积分数为 2% O₂) 预处理导致 78 kD 葡萄糖调节蛋白 (GRP78) 的表达上调, HIF-1 α -GRP78-Akt 信号激活, 使移植人脂肪间充质干细胞存活、增殖、迁移和血管生成因子分泌能力增强^[58]。

HEO 等^[59]在分析多聚赖氨酸对人骨髓间充质干细胞基因表达谱的影响时发现, 多聚赖氨酸上调参与细胞周期、黏附、干性维持、增殖、分化和 FGF-2 信号传导等基因表达, 并且多聚赖氨酸能够促进骨髓间充质干细胞生长, 减缓其衰老。多聚赖氨酸培养法为骨髓间充质干细胞生长提供了有利的微环境。此外, 中药提取物也可用于间充质干细胞预处理, 以促进细胞增殖, 减少细胞凋亡, 减缓细胞衰老。SANAP 等^[60]首次发现中药提取物预处理人华通胶来源间充质干细胞后, 细胞衰老延迟, 凋亡细胞减少, 增殖增加, 细胞周期 G₂/M 期增加。

预处理除了维持和增强间充质干细胞固有特性外, 还能恢复间充质干细胞受损的功能。例如, 胰岛素样生长因子 1 和成纤维细胞生长因子 2 联合预处理糖尿病小鼠骨髓间充质干细胞 1 h, KHAN 等^[61]发现 IGF-1、FGF-2、Akt、GATA-4、Nkx2.5 等表达上调, 而 p16(INK4a)、p66(SHC)、p53、Bax、Bak 等表达下调。在低氧应激条件下, 胰岛素样生长因子 1 和成纤维细胞生长因子 2 联合预处理的骨髓间充质干细胞表现出较高的超氧化物歧化酶活性 (52.3%), Annexin-V 阳性细胞数降低, 趋化迁移能力增强。此外, 联合预处理后骨髓间充质干细胞的存活、增殖、促血管生成能力均得到改善, Akt 磷酸化水平增加^[62]。因此, 联合应用胰岛素样生长因子 1 和成纤维细胞生长因子 2 预处理可能是一种增强恢复间充质干细胞受损功能, 促进难愈性创面修复的新策略。

研究表明, 血管紧张素 II 预处理不仅增加间充质干细胞的自身保护作用, 还可以加强间充质干细胞的旁分泌功能, 加速创面愈合和组织修复。如宋奕辰等^[63]发现血管紧张素 II 预处理大鼠骨髓间充质干细胞能够通过 Akt、ERK1/2 通路, 明显减轻 H₂O₂ 诱导的细胞损伤, 显著提高骨髓间充质干细胞活力。杨靖等^[64]以血管紧张素 II 预处理脐血间充质干细胞后, 发现脐血间充质干细胞上清液明显促进人脐静脉内皮细胞增殖、抑制细胞凋亡。创面早期的治疗关键之一是恢复血流和

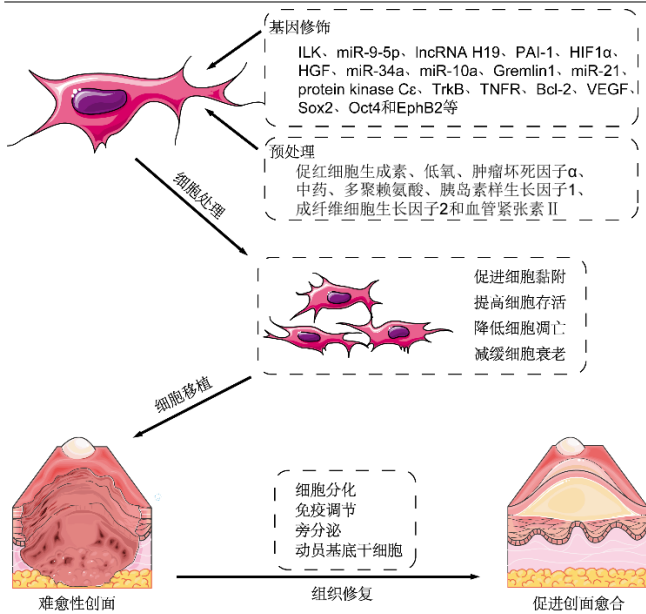


图2 | 间充质干细胞治疗难愈性创面

修复受损的内皮细胞，因此，将血管紧张素Ⅱ预处理的间充质干细胞应用于难愈性创面治疗具有较好的临床前景。

3 总结与展望 Summary and prospects

间充质干细胞在组织再生与修复中的应用越来越广泛，通过基因修饰和预处理等方式可促进间充质干细胞细胞黏附、增殖和存活，降低细胞凋亡，减缓细胞衰老。基因修饰和预处理使间充质干细胞具有更强的抵抗创面微环境的能力，在难愈性创面的治疗中具有巨大的临床应用价值，见图2。目前，间充质干细胞同种异体移植治疗皮肤烧伤的临床Ⅰ期试验正在进行(NCT02104713)，并显现出良好的效果。因此，在保证间充质干细胞质量的前提下，应用间充质干细胞移植治疗难愈性创面，遏制难愈性创面患者病情进展，值得尝试。但需要进一步实验研究去探索将更多的基因修饰和/或预处理技术结合起来，使间充质干细胞具备更强的抵抗创面微环境的能力、以及向靶细胞分化能力和旁分泌效应，增强其修复效果。

作者贡献：所有作者构思并设计此综述，第一作者完成资料收集并撰写，通讯作者审核。

经费支持：该文章接受了“贵州省科技合作项目(黔科合LH字【2016】7233号)”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。

写作指南：该研究遵守《系统综述和荟萃分析报告规范》(PRISMA指南)。

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期刊发稿宗旨。

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] AKITA S. Wound Repair and Regeneration: Mechanisms, Signaling. *Int J Mol Sci.* 2019;20(24):6328.
- [2] LAY K, KUME T, FUCHS E. FOXC1 maintains the hair follicle stem cell niche and governs stem cell quiescence to preserve long-term tissue-regenerating potential. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016; 113(11): E1506-E1515.
- [3] FAN XL, ZHANG Y, LI X, et al. Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy. *Cell Mol Life Sci.* 2020;1-24.
- [4] AZEVEDO MM, LISBOA C, COBRADO L, et al. Hard-to-heal wounds, biofilm and wound healing: an intricate interrelationship. *Br J Nurs.* 2020;29(5):S6-S13.
- [5] LI S, MOHAMED AH, SENKOWSKY J, et al. Imaging in Chronic Wound Diagnostics. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2020; 9(5):245-263.
- [6] LIU J, HU F, TANG J, et al. Homemade-device-induced negative pressure promotes wound healing more efficiently than VSD-induced positive pressure by regulating inflammation, proliferation and remodeling. *Int J Mol Med.* 2017;39(4): 879-888.
- [7] KARALASHVILI L, MARDALASHVILI K, UHRYN M, et al. Current condition and challenges in treatment of non-healing wound after radiation therapy (Review). *Georgian Med News.* 2018; (280-281): 23-28.
- [8] CAMERNIK K, ZUPAN J. Complete assessment of multilineage differentiation potential of human skeletal muscle-derived mesenchymal stem/stromal cells. *Methods Mol Biol.* 2019; 2045: 131-144.
- [9] LAURITANO D, PALMIERI A, CANDOTTO V, et al. Regenerative dentistry and stem cells: a multilineage differentiation as a safe and useful alternative way of harvesting and selection adipose derived mesenchymal stem cells. *Curr Drug Targets.* 2018; 19(16): 1991-1997.
- [10] LI Z, HU X, ZHONG JF. Mesenchymal stem cells: characteristics, function, and application. *Stem Cells Int.* 2019; 2019: 8106818.
- [11] BALAJI S, KESWANI SG, CROMBLEHOLME TM. The role of mesenchymal stem cells in the regenerative wound healing phenotype. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2012; 1(4): 159-165.
- [12] SI Z, WANG X, SUN C, et al. Adipose-derived stem cells: Sources, potency, and implications for regenerative therapies. *Biomed Pharmacother.* 2019; 114: 108765.
- [13] VARGHESE J, GRIFFIN M, MOSAHEBI A, et al. Systematic review of patient factors affecting adipose stem cell viability and function: implications for regenerative therapy. *Stem Cell Res Ther.* 2017; 8(1): 45.
- [14] DOS SANTOS JF, BORÇARI NR, DA SILVA ARAÚJO M, et al. Mesenchymal stem cells differentiate into keratinocytes and express epidermal kallikreins: Towards an in vitro model of human epidermis. *J Cell Biochem.* 2019;120(8):13141-13155.
- [15] MAHMOOD R, MEHMOOD A, CHOUDHURY MS, et al. Human neonatal stem cell-derived skin substitute improves healing of severe burn wounds in a rat model. *Cell Biol Int.* 2019; 43(2): 147-157.
- [16] 刘博宇, 蒲磊, 张应杰, 等. 干细胞治疗皮肤缺损: 是未来研究的重点 [J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(25):4082-4088.
- [17] ENCISO N, AVEDILLO L, FERMIN ML, et al. Regenerative potential of allogeneic adipose tissue-derived mesenchymal cells in canine cutaneous wounds. *Acta Vet Scand.* 2020; 62(1):13.
- [18] BULATI M, MICELI V, GALLO A, et al. The immunomodulatory properties of the human amnion-derived mesenchymal stromal/stem cells are induced by inf-gamma produced by activated lymphomonocytes and are mediated by cell-to-cell contact and soluble factors. *Front Immunol.* 2020;11:54.
- [19] NEMETH K, LEELAHAVANICHKUL A, YUEN PS, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med.* 2009;15(1):42-49.
- [20] EL-SAYED M, EL-FEKY MA, EL-AMIR MI, et al. Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells: Cell origin and cell quality variations. *Mol Biol Rep.* 2019; 46(1):1157-1165.
- [21] JIANG D, SINGH K, MUSCHAMMER J, et al. MSCs rescue impaired wound healing in a murine LAD1 model by adaptive responses to low TGF-β1 levels. *EMBO Rep.* 2020;21(4):e49115.

- [22] MYUNG H, JANG H, MYUNG JK, et al. Platelet-rich plasma improves the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells by enhancing their secretion of angiogenic factors in a combined radiation and wound injury model. *Exp Dermatol*. 2020; 29(2): 158-167.
- [23] DALIRFARDOUEI R, JAMIALAHMADI K, JAFARIAN AH, et al. Promising effects of exosomes isolated from menstrual blood-derived mesenchymal stem cell on wound-healing process in diabetic mouse model. *J Tissue Eng Regen Med*. 2019; 13(4): 555-568.
- [24] 张恩国, 陈尚雅, 杨叶, 等. 干细胞源外泌体应用于再生医学的研究进展 [J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(5): 801-806.
- [25] HUO J, SUN S, GENG Z, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promoted cutaneous wound healing by regulating keratinocyte migration via beta2-adrenergic receptor signaling. *Mol Pharm*. 2018; 15(7): 2513-2527.
- [26] HOSSEINZADEH S, SOLEIMANI M, VOSSOUGH M, et al. Study of epithelial differentiation and protein expression of keratinocyte-mesenchyme stem cell co-cultivation on electrospun nylon/B. vulgaris extract composite scaffold. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017; 75: 653-662.
- [27] DONG L, HAO H, LIU J, et al. A conditioned medium of umbilical cord mesenchymal stem cells overexpressing wnt7a promotes wound repair and regeneration of hair follicles in mice. *Stem Cells Int*. 2017; 2017: 3738071.
- [28] MURPHY KC, WHITEHEAD J, FALAHEE PC, et al. Multifactorial experimental design to optimize the anti-inflammatory and proangiogenic potential of mesenchymal stem cell spheroids. *Stem Cells*. 2017; 35(6): 1493-1504.
- [29] CLARK AY, MARTIN KE, GARCIA JR, et al. Integrin-specific hydrogels modulate transplanted human bone marrow-derived mesenchymal stem cell survival, engraftment, and reparative activities. *Nat Commun*. 2020; 11(1): 114.
- [30] ZENG B, LIU L, WANG S, et al. ILK regulates MSCs survival and angiogenesis partially through AKT and mTOR signaling pathways. *Acta Histochem*. 2017; 119(4): 400-406.
- [31] MAO Q, LIANG XL, WU YF, et al. ILK promotes survival and self-renewal of hypoxic MSCs via the activation of lncTCF7-Wnt pathway induced by IL-6/STAT3 signaling. *Gene Ther*. 2019; 26(5): 165-176.
- [32] LI X, HE L, YUE Q, et al. MiR-9-5p promotes MSC migration by activating beta-catenin signaling pathway. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2017; 313(1): C80-C93.
- [33] COPLAND IB, LORD-DUFOR S, CUERQUIS J, et al. Improved autograft survival of mesenchymal stromal cells by plasminogen activator inhibitor 1 inhibition. *Stem Cells*. 2009; 27(2): 467-477.
- [34] LI Y, ZHANG Y, LIU X, et al. Lutein inhibits proliferation, invasion and migration of hypoxic breast cancer cells via downregulation of HES1. *Int J Oncol*. 2018; 52(6): 2119-2129.
- [35] LV B, HUA T, LI F, et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha 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.
- [36] ZHAO L, LIU X, ZHANG Y, et al. Enhanced cell survival and paracrine effects of mesenchymal stem cells overexpressing hepatocyte growth factor promote cardioprotection in myocardial infarction. *Exp Cell Res*. 2016; 344(1): 30-39.
- [37] DONG J, ZHANG Z, HUANG H, et al. miR-10a rejuvenates aged human mesenchymal stem cells and improves heart function after myocardial infarction through KLF4. *Stem Cell Res Ther*. 2018; 9(1): 151.
- [38] HOU J, WANG L, WU Q, et al. Long noncoding RNA H19 upregulates vascular endothelial growth factor A to enhance mesenchymal stem cells survival and angiogenic capacity by inhibiting miR-199a-5p. *Stem Cell Res Ther*. 2018; 9(1): 109.
- [39] ZHANG H, WANG Y, LV Q, et al. MicroRNA-21 overexpression promotes the neuroprotective efficacy of mesenchymal stem cells for treatment of intracerebral hemorrhage. *Front Neurol*. 2018; 9: 931.
- [40] XIANG Q, HONG D, LIAO Y, et al. Overexpression of Gremlin1 in Mesenchymal Stem Cells Improves Hindlimb Ischemia in Mice by Enhancing Cell Survival. *J Cell Physiol*. 2017; 232(5): 996-1007.
- [41] HE H, ZHAO ZH, HAN FS, et al. Overexpression of protein kinase C varepsilon improves retention and survival of transplanted mesenchymal stem cells in rat acute myocardial infarction. *Cell Death Dis*. 2016; 7: e2056.
- [42] AHN SM, KIM YR, SHIN YI, et al. Therapeutic Potential of a Combination of Electroacupuncture and TrkB-Expressing Mesenchymal Stem Cells for Ischemic Stroke. *Mol Neurobiol*. 2019; 56(1): 157-173.
- [43] ALVES VBF, DE SOUSA BC, FONSECA MTC, et al. A single administration of human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells (MSC) induces durable and sustained long-term regulation of inflammatory response in experimental colitis. *Clin Exp Immunol*. 2019; 196(2): 139-154.
- [44] NI X, OU C, GUO J, et al. Lentiviral vector-mediated co-overexpression of VEGF and Bcl-2 improves mesenchymal stem cell survival and enhances paracrine effects in vitro. *Int J Mol Med*. 2017; 40(2): 418-426.
- [45] LIU Y, ZHANG X, CHEN J, et al. Inhibition of mircoRNA-34a Enhances Survival of Human Bone Marrow Mesenchymal Stromal/Stem Cells Under Oxidative Stress. *Med Sci Monit*. 2018; 24: 264-271.
- [46] HAN SM, HAN SH, COH YR, et al. Enhanced proliferation and differentiation of Oct4- and Sox2-overexpressing human adipose tissue mesenchymal stem cells. *Exp Mol Med*. 2014; 46: e101.
- [47] LI Q, HAN SM, SONG WJ, et al. Anti-inflammatory Effects of Oct4/Sox2-overexpressing Human Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells. *In Vivo*. 2017; 31(3): 349-356.
- [48] JUNG YH, LEE HJ, KIM JS, et al. EphB2 signaling-mediated Sirt3 expression reduces MSC senescence by maintaining mitochondrial ROS homeostasis. *Free Radic Biol Med*. 2017; 110: 368-380.
- [49] MUHAR AM, PUTRA A, WARLI SM, et al. Hypoxia-mesenchymal stem cells inhibit intra-peritoneal adhesions formation by upregulation of the IL-10 expression. *Open Access Maced J Med Sci*. 2019; 7(23): 3937-3943.
- [50] JIANG CM, LIU J, ZHAO JY, et al. Effects of hypoxia on the immunomodulatory properties of human gingiva-derived mesenchymal stem cells. *J Dent Res*. 2015; 94(1): 69-77.
- [51] De FARIA CA, ZANETTE DL, SILVA WA, et al. PAI-1 inhibition by simvastatin as a positive adjuvant in cell therapy. *Mol Biol Rep*. 2019; 46(1): 1511-1517.
- [52] TSAI SF, TARNG DC. Anemia in patients of diabetic kidney disease. *J Chin Med Assoc*. 2019; 82(10): 752-755.
- [53] AUZMENDI J, PUCHULU MB, RODRÍGUEZ JCG, et al. EPO and EPO-Receptor System as Potential Actionable Mechanism for the Protection of Brain and Heart in Refractory Epilepsy and SUDEP. *Curr Pharm Des*. 2020; 26(12): 1356-1364.
- [54] LU H, WU X, WANG Z, et al. Erythropoietin-activated mesenchymal stem cells promote healing ulcers by improving microenvironment. *J Surg Res*. 2016; 205(2): 464-473.
- [55] BAI X, XI J, BI Y, et al. TNF-alpha promotes survival and migration of MSCs under oxidative stress via NF-kappaB pathway to attenuate intimal hyperplasia in vein grafts. *J Cell Mol Med*. 2017; 21(9): 2077-2091.
- [56] LU N, LI X, TAN R, et al. HIF-1alpha/Beclin1-Mediated Autophagy Is Involved in Neuroprotection Induced by Hypoxic Preconditioning. *J Mol Neurosci*. 2018; 66(2): 238-250.
- [57] KIM DS, KO YJ, LEE MW, et al. Effect of low oxygen tension on the biological characteristics of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Stress Chaperones*. 2016; 21(6): 1089-1099.
- [58] LEE JH, YOON YM, LEE SH. Hypoxic Preconditioning Promotes the Bioactivities of Mesenchymal Stem Cells via the HIF-1α-GRP78-Akt Axis. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(6): 1320.
- [59] HEO JS, KIM HO, SONG SY, et al. Poly-L-lysine Prevents Senescence and Augments Growth in Culturing Mesenchymal Stem Cells Ex Vivo. *Biomed Res Int*. 2016; 2016: 8196078.
- [60] SANAP A, CHANDRACANSHI B, SHAH T, et al. Herbal pre-conditioning induces proliferation and delays senescence in Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells. *Biomed Pharmacother*. 2017; 93: 772-778.
- [61] KHAN M, AKHTAR S, MOHSIN S, et al. Growth factor preconditioning increases the function of diabetes-impaired mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2011; 20(1): 67-75.
- [62] KHAN M, ALI F, MOHSIN S, et al. Preconditioning diabetic mesenchymal stem cells with myogenic medium increases their ability to repair diabetic heart. *Stem Cell Res Ther*. 2013; 4(3): 58.
- [63] 宋奕辰, 胡亮, 周露, 等. 血管紧张素 II 预处理提高骨髓间充质干细胞抗凋亡能力 [J]. *南京医科大学学报 (自然科学版)*, 2014, 34(9): 1157-1162.
- [64] 杨靖, 柴家科, 刘玲英, 等. 血管紧张素 -II (Ang-II) 处理后的人脐带 MSCs 上清液对 HUVEC 凋亡和增殖的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2016, 16(10): 1816-1820.