

文章编号: 1001-6325(2013)11-1377-05

## 间充质干细胞与皮肤损伤修复专题

# 人脂肪间充质干细胞对皮肤创伤修复的作用

刘晓玉<sup>1</sup>, 王瑞<sup>1</sup>, 张涛<sup>1</sup>, 庞希宁<sup>1\*</sup>, 施萍<sup>2</sup>

(中国医科大学 1. 卫生部细胞生物学重点实验室 干细胞与再生医学研究室;  
2. 附属第一医院 全科医学教研室, 辽宁 沈阳 110001)

**摘要:**目的 探讨人脂肪间充质干细胞(hADSCs)皮内移植对小鼠皮肤创面修复的作用,为临床皮肤创伤后修复提供新的细胞治疗方法奠定基础。方法 分离培养 hADSCs, 取 3~5 代细胞通过免疫荧光法检测间充质干细胞相关的细胞表面标志物 CD90、CD105、CD34 和 CD45 的表达,并分别置于骨、软骨和脂肪诱导分化培养基中进行诱导分化,检测其多向分化潜能。在实验小鼠背部制备一个面积为 1 cm × 1 cm 的皮肤创面,将磁性纳米颗粒标记的 hADSCs 以皮内注射方式移植到小鼠创面四周。分别于伤后 0、7 和 14 d 观察创面愈合情况,并与对照组进行比较分析。结果 人脂肪间充质干细胞表达 CD90 和 CD105,不表达 CD34 和 CD45,具有骨,软骨,脂肪诱导分化潜能;实验小鼠皮肤创伤后 3 d 开始,可见各组创面逐渐缩小,伤后 21 d 创面愈合。移植组于创伤后第 7 天创面愈合率为 (74.6% ± 4.1%), 14 d 为 (96.5% ± 1.5%), 均显著高于对照组 7 d 的 (26.7% ± 1.9%), 14 d 的 (47.3% ± 2.3%), ( $P < 0.05$ )。结论 hADSCs 移植能够提高小鼠皮肤创面愈合的速度。

**关键词:** 脂肪;间充质干细胞;创伤愈合

中图分类号:R 329.2 文献标志码:A

## Effects of human adipose-derived mesenchymal stem cells on cutaneous wound healing

LIU Xiao-yu<sup>1</sup>, WANG Rui<sup>1</sup>, ZHANG Tao<sup>1</sup>, PANG Xi-ning<sup>1\*</sup>, SHI Ping<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Cell Biology, Ministry of Public Health of China, Dept of Stem Cells and Regenerative Medicine;  
2. Dept. of General Practice, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

**Abstract: Objective** To explore the effects of adipose derived mesenchymal stem cells (hADSCs) on cutaneous wound healing and provide a new method for clinical skin repair in the future. **Methods** The hADSCs were isolated by mechanical separation and enzymatic digestion. The expression profiles of CD90, CD105, CD34 and CD45 were examined by immunofluorescence. The hADSCs from passage 3~5 were used for bone, osteogenic, adipogenic differentiation assays. The mice were anesthetized and a 1 cm × 1 cm full-thickness excisional skin wound was made on the back. After labeling with superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs), hADSCs were injected intradermally around the wound at four different injection sites. After 0, 7 and 14 d, the area of the wounds were measured and performed to evaluate the quality of wound healing and compare with control. **Results** The morphological

收稿日期:2013-08-17 修回日期:2013-09-16

基金项目:国家重点基础研究发展计划(2012CB518103);辽宁省科学技术计划(2012225080);沈阳市科学技术计划(F11-262-9-01)

\*通信作者(corresponding author): pangxining@126.com

feature of hADSCs displayed fibroblast-like phenotype. The cells were positive for stem cells markers, including CD90 and CD105, and negative for CD34 and CD45, as shown by immunofluorescence. Osteogenic, chondrogenic, adipogenic differentiations were revealed in hADSCs when cultured in specific medium. The first 3 days of the experimental mice in each group after skin wound, wound size gradually reduced, most of the wounds healed after 21 d. Compared with the control group ( $26.7\% \pm 1.9\%$ ) at 7 d and ( $47.3\% \pm 2.3\%$ ) at 14 d, the most obvious effect at 7 d ( $74.6\% \pm 4.1\%$ ) and 14 d ( $96.5\% \pm 1.5\%$ ) after transplantation ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** hADSCs transplantation can improve wound healing.

**Key words:** adipose; mesenchymal stem cells; wound healing

皮肤是人体最大的组织器官,具有体温调节,感觉传递,保护机体免于干燥的功能,是防止微生物入侵,避免机械刺激,化学物质等侵入的屏障。因此,创伤后尽快愈合皮肤创面,恢复皮肤功能,至关重要<sup>[1]</sup>。

近年来,成体干细胞对创面愈合的作用越来越受到人们的关注。脂肪间充质干细胞(adipose mesenchymal stem cells,hADSCs)具有多向分化潜能,来源广泛,自体细胞移植一般不涉及伦理问题,在临床治疗中具有广泛的应用前景,已成为近年医学研究和应用的热点之一<sup>[2-4]</sup>。

本研究将磁性纳米颗粒标记的hADSCs移植于小鼠皮肤创面以观察其对提高创面愈合质量的作用,为创伤修复的基础研究和临床应用提供参考资料<sup>[5-8]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

人皮下脂肪组织样本由中国医科大学附属第一医院外科提供,并与患者签署知情同意书。雌性昆明小鼠18只,体质量25~30 g,由中国医科大学实验动物中心提供、DMEM/F12和胎牛血清(Hyclone公司)、抗体CD90,CD105,CD34,CD45(Santa Cruz公司)、聚乙烯亚胺包被的磁性纳米颗粒(东纳生物科技有限公司)、其他常规试剂购自沈阳化学试剂采购供应站。

### 1.2 方法

1.2.1 hADSCs的分离与培养:将去除血管、筋膜的脂肪组织置于平皿中,PBS洗3次后剪碎,加入2倍体积胶原蛋白酶I,37℃消化60 min,终止消化后于细胞筛上过滤,1 500 r/min离心5 min收集细胞后以 $2 \times 10^5$ 个/mL的浓度接种于培养瓶中,置于

37℃,5% CO<sub>2</sub>的饱和湿度培养箱中培养,记为P0。根据细胞细胞贴壁情况,1~2 d全量换液1次。待细胞增殖达80%~90%时,按1:3的比例传代记为P1。

1.2.2 免疫荧光法检测鉴定hADSCs:将处理好的干净盖片,置入6孔板内。以 $2 \times 10^5$ 个/mL浓度将hADSCs接种到盖片上。待细胞汇合达70%~80%时,4%多聚甲醛室温固定20 min,1×PBS洗涤5 min并重复3次,1%牛血清白蛋白室温封闭30 min后,按1:100的比例稀释一抗CD90,CD105,CD34,CD45覆盖盖玻片表面并置入湿盒内,4℃过夜后,1×PBS洗涤5 min。二抗室温孵育1 h后,DAPI染色1 min,95%甘油封片,置于荧光显微镜下观察。

1.2.3 诱导hADSCs向成骨细胞分化和鉴定:将获得的hADSCs以 $2 \times 10^5$ 个/mL浓度种入6孔板内,待细胞汇合达70%时添加0.1 μmol/L地塞米松、50 μg/mL抗坏血酸和10 mmol/L甘油磷酸酯。每3天换液,培养21 d。

hADSCs成骨分化鉴定:室温,四唑硝基蓝(BCIP/NBT)染色孵育2 h,置于显微镜下观察。

1.2.4 诱导hADSCs向软骨细胞分化和鉴定:将获得的hADSCs以 $2 \times 10^5$ 个/mL浓度种入6孔板内,培养液更换为ITS与人血清白蛋白培养液。并添加50 μg/mL抗坏血酸,100 μg/mL丙酮酸钠,0.1 μmol/L地塞米松和10 ng/mL转化生长因子β1。隔天换液,每次换液时现加入TGF-β1,培养22 d。

hADSCs成软骨分化鉴定:37℃,用0.1%艾茜蓝(Alcian blue)染色30 min,蒸馏水冲洗后,置于显微镜下观察。

1.2.5 诱导hADSCs向脂肪细胞分化和鉴定:将获

得的 hADSCs 以  $2 \times 10^5$  个/mL 浓度种入 6 孔板内, 待细胞汇合达 70% 时添加 1  $\mu\text{mol/L}$  地塞米松、0.5  $\mu\text{mol/L}$  异丁基黄嘌呤、60  $\mu\text{mol/L}$  苷甲新和 170  $\mu\text{mol/L}$  胰岛素。每 3 天换液, 培养 14 d。

hADSCs 成脂肪分化鉴定: 培养终止后, 室温用油红 O 孵育 10 min, 蒸馏水冲洗 5 min, 置于显微镜下观察。

**1.2.6 磁性纳米颗粒标记 hADSCs 及鉴定** 将 hADSCs 以  $2 \times 10^5$ /mL 浓度种入 6 孔板内, 待细胞汇合达到 70% 时, 以 8 mg/L 的浓度加入磁性纳米颗粒继续培养 24 h。

hADSCs 标记后鉴定: 培养终止后, 4% 多聚甲醛溶液室温固定 30 min, PBS 洗后用普鲁士蓝染色 20 min, 置于显微镜下观察。

**1.2.7 创伤模型制备及分组**: 将小鼠常规饲养 7 d 后, 腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 麻醉, 剃去背部毛, 在背中部制备一个 1 cm × 1 cm 创面, 深至皮下制备成机械损伤小鼠模型。随机将小鼠均分为对照组: 在小鼠背部创面处外敷人羊膜; 和移植组: 在小鼠背部伤口外取四个点, 皮内注射  $0.25 \times 10^6$  个磁性纳米颗粒标记的 hADSCs, 后外敷羊膜。

**1.2.8 创面愈合大体观察**: 进行上述实验后小鼠分笼饲养, 每天观察进食情况、创面变化及愈合情况, 计算创面愈合率。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS13.0 统计软件对实验结果进行统计学分析, 实验数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间差异比较行 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 hADSCs 的原代培养

原代培养获得的 hADSCs 接种到培养瓶中, 5 h 后部分细胞即开始贴壁, 贴壁后的细胞呈圆形, 随后细胞开始集落样生长至 10 d 时已有较大集落的形成, 部分集落与集落间相互汇合, 细胞呈纤维形(图 1), 即可传代。传代后的细胞生长迅速, 3~4 d 即可传 1 代。传至第 3 代时, 细胞形态均一, 呈鱼群样排列。

### 2.2 免疫荧光鉴定 hADSCs

大部分 hADSCs 表达 CD90 和 CD105。但几乎不表达 CD45、CD34(图 2)。

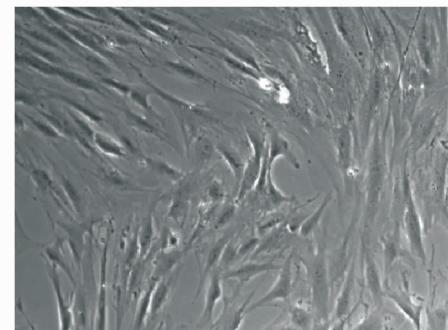
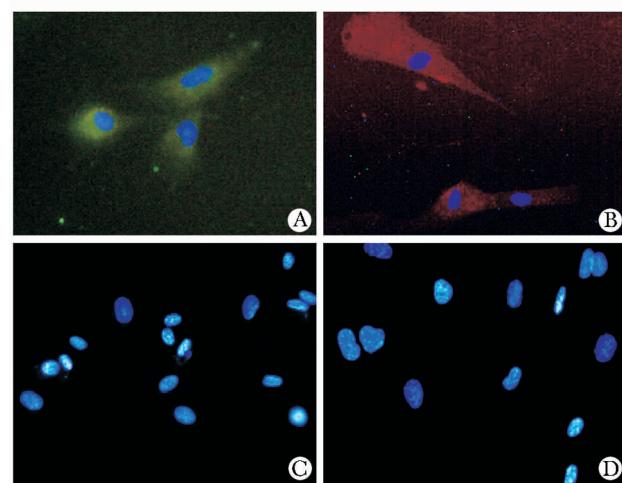


图 1 倒置显微镜下观察原代培养的 hADSCs

Fig 1 Primary culture, inverted microscope (×40)



A. CD90; B. CD105; C. CD34; D. CD45

图 2 免疫荧光检测 hADSCs CD90、CD105、CD34 和 CD45 的表达情况

Fig 2 Immunofluorescence analysis of hADSCs confirmed that hADSCs were positive for CD90 (A) and CD105 (B), but negative for CD34 (C) and CD45 (D) (×100)

### 2.3 hADSCs 向骨、软骨、脂肪细胞诱导分化能力

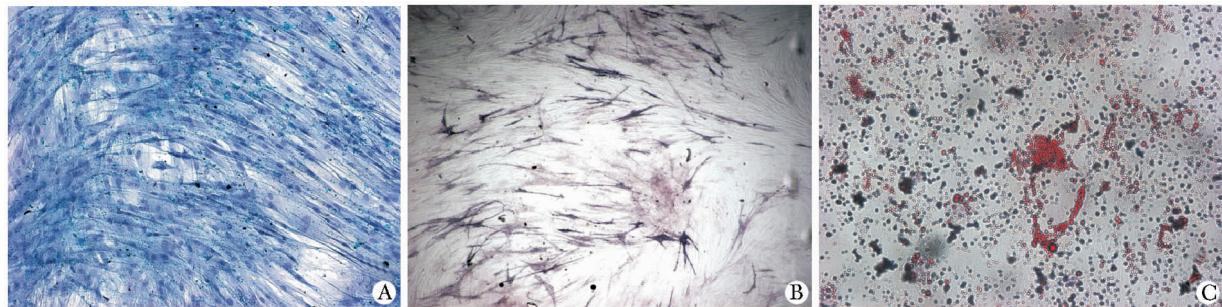
hADSCs 成骨诱导 21 d 发现明显的矿物质沉积, 四唑硝基蓝染色可见蓝紫色矿化结节; hADSCs 成软骨诱导 22 d, 经艾茜蓝染色可见呈蓝色的软骨细胞; hADSCs 成脂肪诱导 14 d, 镜下细胞可见明显脂滴, 经油红 O 染色脂滴呈红色(图 3)。

### 2.4 普鲁士蓝染色检测磁性纳米颗粒对 hADSCs 的标记率

hAMSCs 用磁性纳米颗粒进行标记 24 h 后, 经普鲁士蓝染色呈蓝色, 阳性率高达 95% (图 4)。

### 2.5 hADSCs 移植对小鼠创伤愈合的影响

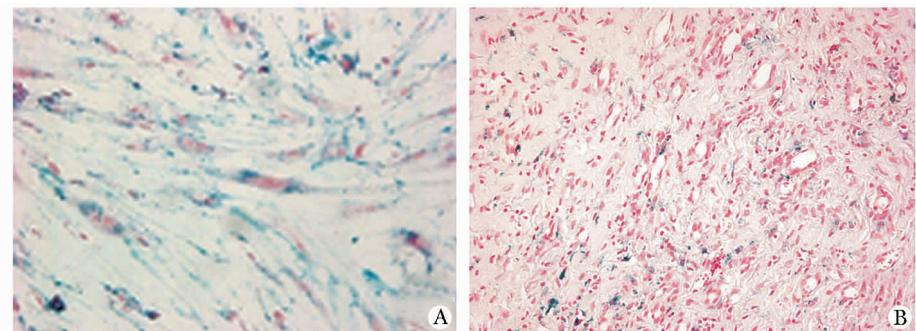
将  $1 \times 10^6$  个磁性纳米颗粒标记的 hADSCs 以



A. hADSCs differentiate to osteoblasts after culture with osteogenic medium, as detected by alkaline phosphatase kit;  
B. hADSCs differentiate to chondrocytes after culture with chondrocytes medium, as detected by alcian blue; C. hADSCs differentiate to adipose cells after culture with adipose cells medium, as detected by oil red O

图3 hADSCs成骨、成软骨和成脂肪体外诱导分化

Fig 3 The osteoblasts, chondrocytes and adipose differentiation of hADSCs( $\times 100$ )



A. slide-cultured cells; B. sectioned tissue

图4 磁性纳米颗粒标记 hADSCs 普鲁士蓝染色

Fig 4 hADSCs labeled with SPIONs and stained by Prussian blue staining( $\times 40$ )

皮内注射的方式移植到创伤模型小鼠的创面四周,细胞移植后,所有小鼠均存活,活动自如,进食正常,未见血尿和血便。分别于移植后第0,7和14天,将移植组与对照组小鼠模型的创面进行比较(图5)。移植组于创伤后第7天创面愈合率为 $(74.6\% \pm 4.1\%)$ ,14 d为 $(96.5\% \pm 1.5\%)$ ,均分别显著高于对照组7 d的 $(26.7\% \pm 1.9\%)$ , $(47.3\% \pm 2.3\%)(P < 0.05)$ 。

### 3 讨论

创伤组织的修复是一个较为复杂的生物学过程,主要经过炎性反应、增殖期、组织重构3个阶段。炎性渗出后,逐渐出现成纤维细胞和毛细血管内皮细胞的增殖,随着肉芽组织的形成,新生上皮向创面中心推进,逐渐填补创口,覆盖创面,直至创面愈合<sup>[9-11]</sup>。

近来,随着对间充质干细胞(mesenchymal stem

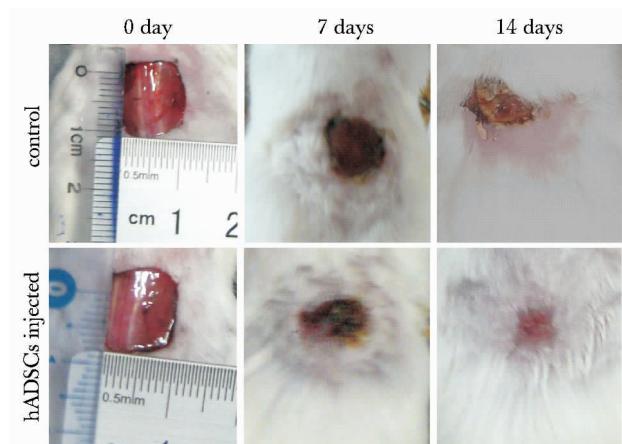


图5 hADSCs对小鼠皮肤创伤愈合的作用

Fig 5 Wound healing effects of hADSCs in a mouse model of cutaneous wounds

cells, MSC)的深入研究发现, MSC 在损伤刺激条件下能参与多种创伤组织的修复,其机制可能与创伤刺激及局部微环境有关。促进 MSC 趋化,诱导其向

所需要的组织或细胞分化是 MSC 参与组织修复的重要环节。细胞治疗的关键问题是寻找合适的种子细胞,理想的种子细胞应具备以下条件:可靠的细胞来源,容易获得,能在体外可快速扩增培养<sup>[12-13]</sup>。

脂肪来源的 MSC 与骨髓来源的 MSC 相比具有取材容易的优势,极大的减轻了供者的痛苦,同时 hADSCs 具有更高的增殖能力,在体外可快速扩增培养,因此是一种理想的种子细胞。本实验采用胶原蛋白酶消化,差速贴壁法分离培养 hADSCs,并对其生物学特性进行研究,利用免疫荧光的方法分析脂肪间充质干细胞表面分子特征,发现 hADSCs 与骨髓等其他组织来源的 MSC 具有相似特征,hADSCs 高表达 CD90 和 CD105,不表达 CD34 和 CD45;在不同的诱导条件下被成功诱导分化为成骨

细胞、软骨细胞、脂肪细胞等中胚层细胞,证明 hADSCs 具有多向分化潜能。

超顺磁性氧化铁纳米颗粒 (superparamagnetic iron oxide, SPIO) 是一种处于纳米级(1~100 nm)的磁性材料(Fe 氧化物为主)。具备表面效应、量子尺寸效应、小尺寸效应及宏观量子隧道效应。具有良好的生物相溶性,磁导向性和生物降解性等,可用于基因转运和细胞标记<sup>[14-15]</sup>。本实验首次采用磁性纳米颗粒作为脂肪间充质干细胞移植示踪剂,经皮内移植到创伤模型小鼠的创面四周,与对照组进行比较,发现移植组的愈合速度明显加快,初步证实了 hADSCs 能促进损伤皮肤的组织修复,但其具体机制还需进一步深入研究。

## 参考文献:

- [1] Chen M, Przyborowski M, Berthiaume F. Stem cells for skin tissue engineering and wound healing [J]. Crit Rev Biomed Eng, 2009, 37:399~421.
- [2] Zuk P, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies [J]. Tissue Eng, 2001, 7: 211~228.
- [3] Safford K, Hicok K, Safford S, et al. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 294: 371~379.
- [4] Kim S, Song C, Shon S, et al. Effects of human amniotic membrane grafts combined with marrow mesenchymal stem cells on healing of full-thickness skin defects in rabbits [J]. Cell Tissue Res, 2009, 336: 59~66.
- [5] Wu Y, Chen L, Scott Pg, et al. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis [J]. Stem Cells, 2007, 25: 2648~2659.
- [6] Yoo J, Park C, Jung D, et al. In vivo cell tracking of canine allogenic mesenchymal stem cells administration via renal arterial catheterization and physiopathological effects on the kidney in two healthy dogs [J]. J Vet Med Sci, 2011, 73: 269~274.
- [7] Balakumaran A, Pawelczyk E, Ren J, et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles labeling of bone marrow stromal (mesenchymal) cells does not affect their ‘stemness’ [J]. PLoS One, 2010, 5.
- [8] Chen L, Tredget E, Wu P, et al. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing [J]. PLoS One, 2008, 3.
- [9] Smith A, Willis E, Chan V, et al. Mesenchymal stem cells induce dermal fibroblast responses to injury [J]. Exp Cell Res, 2010, 316: 48~54.
- [10] Shojaku H, Takakura H, Okabe M, et al. Effect of hyperdry amniotic membrane patches attached over the bony surface of mastoid cavities in canal wall down tympanoplasty [J]. Laryngoscope, 2011, 121: 1953~1957.
- [11] 霍双枝, 施萍, 庞希宁. 人羊膜负载人羊膜间充质干细胞对 SD 大鼠皮肤创面愈合的影响 [J]. 中国医学科学院学报, 2011, 33:611~614.
- [12] Xing L, Franz M, Marcelo C, et al. Amnion-derived multipotent progenitor cells increase gain of incisional breaking strength and decrease incidence and severity of acute wound failure [J]. J Burns Wounds, 2007, 7:e5.
- [13] Jung K, Song S, Yi T, et al. Human bone marrow-derived clonal mesenchymal stem cells inhibit inflammation and reduce acute pancreatitis in rats [J]. Gastroenterology, 2011, 140: 998~1008.
- [14] 张阳德, 张洋, 潘一峰. 磁性纳米颗粒靶向性肿瘤热疗的研究进展 [J]. 中国医学工程, 2006, 14: 148~152.
- [15] 向娟娟, 朱诗国, 吕红斌, 等. 用氧化铁磁性纳米颗粒作为基因载体研究 [J]. 癌症, 2001, 20:1009~1014.