

· 综述 ·

间充质干细胞在烧伤创面修复中的研究进展

王宏宇^{1,2} 刘玲英³ 巴特²

【摘要】 烧伤是皮肤软组织损伤较常见的病因,给患者带来极大的生理及心理负担。目前临幊上对大面积烧伤的救治仍有较大的局限性。近年来,关于干细胞治疗皮肤烧伤创面的组织工程研究备受关注。本文归纳、总结间充质干细胞治疗烧伤创面的临幊前研究和临幊试验性研究,并对 MSC 应用于烧伤创面修复的研究进展作一综述。

【关键词】 烧伤; 伤口愈合; 间质干细胞; 组织工程

Advances in the study of mesenchymal stem cells in burn wound repair Wang Hongyu^{1,2}, Liu Lingying³, Ba Te². ¹Inner Mongolia Medical University, Huhhot 010059, China; ²Department of Burns, Institute of Burns Medicine, Inner Mongolia BaoGang Hospital, Baotou 014010, China; ³Department of Burns and Plastic Surgery, Fourth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100048, China

Corresponding author: Ba Te, Email: bgyybate@126.com

【Abstract】 Burn is a common cause of skin and soft tissue injury, which brings great physiological and psychological burden to patients. Currently, there are still great limitations in the treatment of large area burn in clinical practice. In recent years, tissue engineering research on stem cell therapy for skin burn wounds has attracted much attention. In this paper, preclinical and experimental studies on the treatment of burn wounds by mesenchymal stem cell (MSC) were summarized, and the research progress on the application of MSC in burn wound repair was reviewed.

【Key words】 Burns; Wound healing; Mesenchymal stem cells; Tissue engineering

烧伤为皮肤软组织损伤较常见的病因,据不完全统计,包括中国在内的西太平洋地区,每年由于烧伤而需要就医的患者比美洲地区高 20 倍^[1]。大面积烧伤常由于皮源匮乏,救治延迟而致多器官功能衰竭、重度感染甚至死亡^[2],即使在发达国家,烧创伤仍是造成病死的重要原因^[3]。皮肤组织烧伤后尽快促进创面的修复是至关重要的。近年来,间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)在组织工程和创面修复领域发挥着重要的作用^[4],越来越受到人们的关注^[5],临幊前研究和临幊试验性研究均表明, MSC 能够有效促进烧伤创面的修复^[6-7]。本文就 MSC 应用于烧伤创面修复的研究进展作一综述。

一、烧伤

烧伤属于开放性的病理损害,当皮肤组织遭受电烧伤、热力烧伤、化学烧伤等侵害时,可导致皮肤结构的完整性破

坏,生理功能受损。I 度烧伤,一般仅伤及表皮层,伤后 5~7 d 即可自行愈合,不留瘢痕;浅 II 度烧伤,伤及表皮层和部分真皮层,伤后 1~2 周可自行愈合,预后留有色素沉着;深 II 度烧伤,伤及真皮深层,创面依靠残存的上皮岛进行修复,愈合期为 3~4 周,易形成瘢痕和发生感染;III 度烧伤,伤及全层皮肤及附属器,创面愈合需行手术植皮或皮瓣修复;IV 度烧伤,深达深筋膜及以下,甚至伤及骨、肌腱、神经等重要组织器官,需行手术植皮或皮瓣修复,重者需截肢。皮肤屏障功能破坏后引起大量水、电解质流失,酸碱比例失衡,免疫功能紊乱,重者发生低血容量性休克,甚至危及生命。此外,深度烧伤是伤在体表,反应在全身的伤病,严重烧伤后,皮肤组织作为人体防御体系的第一道屏障被破坏,同时肠道的三大屏障功能(机械、生物、免疫)也遭损伤,加之机体内环境的紊乱、低血容量造成的各组织脏器灌注量不足、过量自由基的产生、各种炎性介质的释放加剧了全身病理生理改变,使病情更趋危重。因此烧伤后如何加速创面愈合,减少并发症,降低病死率显得尤为重要。

皮肤创面愈合是一个动态、复杂、有序的生物学过程^[8],理论上讲,创面愈合分为 4 个阶段:出血、止血期;炎症期;增生期;组织改建以及瘢痕形成期。修复过程中需要上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞等多种组织细胞的参与,涉及细胞的增殖、迁移,各种细胞因子及生长因子的信号传递^[9],从而完成修复、重建缺损的细胞结构及组织层次。多项研究表明, MSC 可有效干预创面修复的多个过程,加速创面愈合^[4-7]。

DOI:10.3877/cma.j.issn.1673-9450.2020.06.013

基金项目:国家自然科学基金青年项目(81701900);解放军总医院科技创新苗圃基金项目(17KMM28);解放军总医院扶持基金项目(2017FC-304M-CXYY-01);解放军总医院转化医学项目(2017TM-029);内蒙古自治区自然科学基金项目(2015MS0815, 2020MS08022);内蒙古医科大学科技百万工程(联合)项目[YKD2016KJBW(LH)041]

作者单位:010059 呼和浩特,内蒙古医科大学¹;014010 包头,内蒙古包钢医院烧伤科,烧伤医学研究所²;100048 北京,解放军总医院第四医学中心烧伤整形科³

通信作者:巴特, Email: bgyybate@126.com

二、MSC

1. MSC 的分离培养: MSC 可以从多种器官和组织中分离出来,如脂肪组织、肌肉、胎盘、脐带基质、血液、肝脏和牙髓等^[10-12],目前脂肪组织与脐带仍然是 MSC 较常见的组织来源。目前常见的分离培养方法有:全骨髓贴壁法及其改良方法^[13]、组织消化法^[14]、梯度密度离心法^[15]、免疫磁珠分选法^[16]等。如何获得高纯度的 MSC 一直是学术领域的研究重点, MSC 的分离培养方法多种多样, 各有利弊, 具体分离方法的选择应根据不同的实验目的及实验条件进行。

2. MSC 的表面标志物鉴定: 目前尚未发现具有高度特异性的 MSC 表面标志物, MSC 缺乏 CD11 和 CD14(单核细胞和巨噬细胞标志物)、CD19(B 细胞标志物)、CD3(T 细胞受体标志物)、CD31(内皮细胞标志物)和人白细胞抗原 DR 的表达, 但表达 CD13、CD29、CD44、CD105 和 CD166, 多数研究人员推测它们可能具有一定的特异性。所以, MSC 经传代培养后对其表面标志物 CD29、CD44、CD105 等进行鉴定, 同时鉴定其阴性表面标志物(CD3、CD14、CD19、CD31)^[17], 因为单一表面标志物鉴定可能会造成其他 MSC 亚群的丢失。

3. MSC 的生物学特性: MSC 是一类起源于中胚层, 具有自我更新和多向分化能力的多能成体干细胞。MSC 组织来源广泛, 它能在特定的诱导条件下分化为肌细胞、肝细胞、成骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞、基质细胞等多种细胞^[18-19]。由于 MSC 无特定表面标志物, 因此异体移植排异反应较轻, 配型要求不严格。MSC 具有免疫调节功能。研究表明, MSC 旁分泌的转化生长因子-β (transforming growth factor -β, TGF-β) 及肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 是 MSC 发挥抑制 T 细胞增殖及其免疫应答的主要调节因子^[20-21]。动物实验模型发现, 脂肪 MSC 能分泌免疫抑制因子, 从而抑制免疫细胞的增殖及分化, 如减少 Th0 细胞分化为 Th1 细胞, 抑制自然杀伤细胞的活性, 减少急性炎症动物模型血清中的 γ 干扰素、肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α) 以及白细胞介素 (interleukin, IL)-4 水平, 从而减轻过度炎症反应和减少细胞的凋亡^[22-24]。正是由于 MSC 所具备的这些生物学特性, 使其在烧伤创面修复治疗方面具有无限的潜能。

三、MSC 在烧伤创面修复中的临床前研究

烧伤是一种复杂、多变的损伤, 促进创面快速修复和防止感染是治疗烧伤的关键。已有体内动物实验模型研究表明, MSC 能通过多重机制促进创面皮肤组织再生, 从而促进创面的快速修复^[25]。刘培等^[26] 研究报道, 利用人脂肪 MSC 条件培养基水凝胶涂抹于烧伤模型小鼠中, 发现人脂肪 MSC 能够促进小鼠烧伤创面的修复, 同时再生皮肤的质量显著提高, 其中机制尚未完全阐明, 一方面可能是人脂肪 MSC 分泌的一系列因子抑制创面过度炎症反应, 减轻炎症损伤; 另一方面可能是人脂肪 MSC 分泌的血管生长因子能够促进创面血管的新生及成熟, 为创面修复提供充足的氧气及营养物质, 加快创面修复进程。虽然该实验是在小鼠模型中完成, 小鼠皮肤的创面愈合过程与人类有所差异, 但这一实验成果的发现为 MSC 应用于临床提供了理论支持。范友芬等^[27] 将人脂肪 MSC 和人工真皮复合共同作用于深度烧伤的大鼠创面中, 发现人脂肪 MSC 能够明显促进烧伤大鼠

皮肤创面的修复, 同时未观察到大鼠出现明显的免疫排斥反应, 该项研究不仅证明 MSC 可以促进烧伤创面的修复, 为 MSC 应用于临床烧伤病例提供理论依据, 还有力地证明了 MSC 在异体移植治疗皮肤损伤中同样具有免疫耐受性和有效性。Chen 等^[28] 研究证实, 在小鼠创面模型中局部注射 MSC 培养上清液可有效促进创面愈合; 同样在小鼠皮肤缺损模型中, 研究者发现同体 MSC 和异体 MSC 均能促进创面修复^[29]。

Nie 等^[30] 研究表明, 人脂肪 MSC 能表达 VEGF、HGF 和成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF) 等, 从而促进受损皮肤组织中的血管再生并缩短创面愈合时间。将人脐带 MSC 作用于大鼠深Ⅱ度烫伤模型中, 发现人脐带 MSC 能明显促进烧伤后创面组织细胞的增殖, 胶原的沉积以及表皮再上皮化^[31]。将人骨髓 MSC 注射到兔皮肤损伤创面模型中, 人骨髓 MSC 能够加速创面愈合, 且能更有力地加强伤口拉伸强度并减少创面瘢痕的形成^[32]。以上研究表明, 不同来源的 MSC 对不同类别的动物皮肤创面模型均具有明显促修复作用。此外, 研究证实, MSC 移植到烧伤创面后可分泌一系列细胞因子, 抑制机体免疫细胞 (B 细胞、T 细胞) 的过度激活, 减少促炎因子 IL-1、TNF-α 等的释放, 抑制创面过度炎症反应^[33-37]。胡克苏等^[38] 将人脐带 MSC 移植于大鼠烧伤创面中, 发现大鼠烧伤后移植的脐带 MSC 能通过抑制 TNF-α 及 IL-1 的表达, 减轻烧伤创面局部炎症反应, 增加碱性 FGF、VEGF 的表达量, 促进烧伤创面血管的再生和成纤维细胞的生长, 促进创面的快速修复。

四、MSC 在烧伤创面修复中的临床试验性研究

大量动物实验研究结果作为基础理论依据, 部分研究者开始将 MSC 进行临床烧伤创面修复的试验性研究。系列研究表明, MSC 能有效促进创面的修复, 并在创面愈合的各阶段发挥重要作用^[39-40]。

蔡德南等^[41] 选取Ⅱ度烧伤患者 82 例作为研究对象, 将所有患者随机分为 2 组, 分别接受脐带 MSC 移植和常规烧伤治疗, 试验结果发现, 脐带 MSC 移植对Ⅱ度烧伤患者新生肉芽组织 EGF 及 VEGF 表达促进效果优于常规烧伤治疗方法。Badiavas 和 Falanga^[42] 研究表明, 骨髓 MSC 可促进伤口愈合和组织重建。

另外, 在 MSC 移植修复创面方面, 已经报道了应用骨髓 MSC、表皮干细胞、胚胎干细胞等移植促进糖尿病溃疡和静脉曲张性溃疡等慢性难愈性创面的临床病例, 并取得显著效果^[43]。Vojtassak 等^[44] 将自体成纤维细胞与 MSC 结合到可生物降解的胶原膜上, 用于治疗糖尿病足, 将这种复合物注射在创面边缘, 结果发现足部溃疡面积开始缩小, 真皮层的厚度明显增加, 血管数量明显增多。Lu 等^[45] 用自体骨髓 MSC 或新鲜骨髓来源的单核细胞治疗双下肢糖尿病溃疡性创面, 一侧下肢肌内注射 MSC 或单核细胞, 另一侧下肢作为对照, 结果发现, 在注射后第 24 周, 相对于对照肢体, 无论是 MSC 还是新鲜骨髓来源的单核细胞治疗肢体溃疡, 效果均较显著, 并可以进行无痛行走; 同时发现相比单核细胞注射, MSC 治疗溃疡愈合率显著上升。

五、总结与展望

综上所述, 由于 MSC 具有抗创面感染、促创面血管新

生、促创面愈合的能力,在创面修复的各阶段均发挥着重要作用,因此其广泛应用于再生医学修复领域。但是这一领域仍然还有许多问题需要解决。例如 MSC 来源间的差异;移植入体内的 MSC 存活能力低、扩增能力个体差异大、潜在的致瘤风险等;移植的时间、频率、数量以及确切的作用机制尚未完全阐明,这些都制约了 MSC 在临床中的广泛应用。相信随着医学工作者对 MSC 生物学特性的不断深入研究(如 MSC 预处理技术的应用),必将在不远的将来造福人类,给再生医学带来新的希望。

参 考 文 献

- [1] Zhanzeng F, Yurong Z, Chuangang Y, et al. Basic investigation into the present burn care system in China: Burn units, doctors, nurses, beds and special treatment equipment[J]. Burns, 2015, 41(2): 279-288.
- [2] Shen YI, Song HG, Papa A, et al. Acellular hydrogels for regenerative burn wound healing: Translation from a porcine model[J]. J Invest Dermatol, 2015, 135(10): 2519-2529.
- [3] Brusselaers N, Monstrey S, Vogelaers D, et al. Severe burn injury in Europe: A systematic review of the incidence, etiology, morbidity, and mortality[J]. Crit Care, 2010, 14(5): R188.
- [4] 韩冰, 付小兵, 梁雪梅, 等. 烧伤大鼠血清诱导骨髓间充质干细胞分化为表皮细胞和血管内皮细胞的实验研究[J]. 解放军医学杂志, 2004, 29(8): 652-654.
- [5] 朱舜明, 郭卫平, 田琼. 骨髓间充质干细胞的研究进展[J]. 实用医学杂志, 2007, 23(19): 3116-3118.
- [6] Keating A. Mesenchymal stromal cells: new directions[J]. Cell Stem Cell, 2012, 10(6): 709-716.
- [7] Sémond A, Mouiseddine M, Fran A, et al. Mesenchymal stem cells improve small intestinal integrity through regulation of endogenous epithelial cell homeostasis[J]. Cell Death Differ, 2010, 17(6): 952-961.
- [8] Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration[J]. Eur Surg Res, 2012, 49(1): 35-43.
- [9] Liu L, Yu Y, Hou Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation promotes cutaneous wound healing of severe burned rats[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e88348.
- [10] 王静, 蔡霞, 王志国, 等. 分离与鉴定人脂肪间充质干细胞来源的外泌体[J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(17): 2651-2658.
- [11] 张飞, 王武, 李慧娟, 等. 两种方法培养人胎盘间充质干细胞的生物特性比较[J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(33): 5292-5296.
- [12] 赵军, 张晓峰, 徐西林, 等. 骨髓间充质干细胞定向分化治疗股骨头坏死:应用效果与评价[J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(13): 2127-2132.
- [13] Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method[J]. Exp Hematol, 1974, 2(2): 83-92.
- [14] Lee KS, Nah JJ, Lee BC, et al. Maintenance and characterization of multipotent mesenchymal stem cells isolated from canine umbilical cord matrix by collagenase digestion[J]. Res Vet Sci, 2013, 94(1): 144-151.
- [15] Rosca AM, Burlacu A. Isolation of a mouse bone marrow population enriched in stem and progenitor cells by centrifugation on a Percoll gradient[J]. Biotechnol Appl Biochem, 2010, 55(4): 199-208.
- [16] 刘全华, 葛健, 刘开彦. CD271 和 CD133 双阳性细胞能否用于脐血间充质干细胞分选[J]. 中国实验血液学杂志, 2010, 18(5): 1286-1291.
- [17] 刘婉薇, 陈韵, 郑跃, 等. 炎症预激活骨髓间充质干细胞条件培养基修复小肠黏膜急性辐射损伤[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(10): 1544-1550.
- [18] Strong AL, Neumeister MW, Levi B. Stem Cells and Tissue Engineering: Regeneration of the Skin and Its Contents[J]. Clin Plast Surg, 2017, 44(3): 635-650.
- [19] Yang YJ, Li XL, Xue Y, et al. Bone marrow cells differentiation into organ cells using stem cell therapy[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20(13): 2899-2907.
- [20] Gharibi T, Ahamdi M, Seyfizadeh N, et al. Immuno-modulatory characteristics of mesenchymal stem cells and their role in the treatment of multiple sclerosis[J]. Cell Immunol, 2015, 293(2): 113-121.
- [21] Savukinas UB, Enes SR, Sjoland AA, et al. Concise review: the bystander effect: mesenchymal stem cell-mediated lung repair[J]. Stem Cells, 2016, 34(6): 1437-1444.
- [22] Maria AT, Maumus M, Le Quellec A, et al. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Autoimmune Disorders: State of the Art and Perspectives for Systemic Sclerosis[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2017, 52(2): 234-259.
- [23] Cao F, Liu T, Xu Y, et al. Culture and properties of adipose-derived mesenchymal stem cells: characteristics in vitro and immunosuppression in vivo[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(7): 7694-7709.
- [24] Xishan Z, Baoxin H, Xinna Z, et al. Comparison of the effects of human adipose and bone marrow mesenchymal stem cells on T lymphocytes[J]. Cell Biol Int, 2013, 37(1): 11-18.
- [25] 赵贵芳. 脐带间充质干细胞及其来源外泌体修复皮肤损伤的机制研究[D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- [26] 刘培, 胡振生, 马玲, 等. 脂肪间充质干细胞条件培养基制备温敏凝胶外用治疗皮肤烫伤[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(30): 4852-4859.
- [27] 范友芬, 乐欣, 晋国营, 等. 脂肪间充质干细胞复合人工真皮修复大鼠深度烧伤创面的研究[J]. 浙江医学, 2017, 39(19): 1633-1637.
- [28] Chen L, Tredget EE, Wu PY, et al. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing[J]. PLoS one, 2008, 3(4): e1886.
- [29] Chen L, Tredget EE, Liu C, et al. Analysis of allogenicity of mesenchymal stem cells in engraftment and wound healing in mice[J]. PLoS one, 2009, 4(9): e7119.
- [30] Nie C, Yang D, Xu J, et al. Locally administered adipose-derived stem cells accelerate wound healing through differentiation and vasculogenesis[J]. Cell Transplant, 2011, 20(2): 205-216.
- [31] Zhang B, Wang M, Gong A, et al. HucMSC-exosome mediated-Wnt4 signaling is required for cutaneous wound healing[J].

- Stem Cells, 2015, 33(7): 2158-2168.
- [32] Stoff A, Rivera AA, Sanjib Banerjee N, et al. Promotion of incisional wound repair by human mesenchymal stem Cell Transplant[J]. Exp Dermatol, 2009, 18(4): 362-369.
- [33] 杨靖, 柴家科, 刘玲英. 间充质干细胞对烧伤创面免疫调控作用的研究进展[J/CD]. 中华损伤与修复杂志(电子版), 2014, 9(6): 668-671.
- [34] Manferdini C, Maumus M, Gabusi E, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells exert antiinflammatory effects on chondrocytes and synoviocytes from osteoarthritis patients through prostaglandin E2[J]. Arthritis Rheum, 2013, 65(5): 1271-1281.
- [35] Soleymaninejadian E, Pramanik K, Samadian E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: cytokines and factors[J]. Am J Reprod Immunol, 2012, 67(1): 1-8.
- [36] Liu S, Yuan M, Hou K, et al. Immune characterization of mesenchymal stem cells in human umbilical cord Wharton's jelly and derived cartilage cells[J]. Cell Immunol, 2012, 278(1/2): 35-44.
- [37] Shalaby SM, Sabbah NA, Saber T, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells modulate the immune response in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis model[J]. IUBMB Life, 2016, 68(2): 106-115.
- [38] 胡克苏, 邱俊, 蔡玉辉, 等. 人脐带间充质干细胞移植修复烧伤皮肤的机制[J]. 江苏医药, 2014, 40(7): 759-761.
- [39] Leclerc T, Thepenier C, Jault P, et al. Cell therapy of burns [J]. Cell Prolif, 2011, 44(1): 48-54.
- [40] Isakson M, De BC, Whelan D, et al. Mesenchymal Stem Cells and Cutaneous Wound Healing: Current Evidence and Future Potential[J]. Stem Cells Int, 2015, 2015: 831095.
- [41] 蔡德南, 陈斐, 王木盛. 脐带间充质干细胞移植对烧伤患者新生肉芽组织EGF及VEGF表达的影响[J]. 广东医学, 2018, 39(5): 740-744.
- [42] Badiavas EV, Falanga V. Treatment of chronic wounds with bone marrow-derived cells[J]. Arch Dermatol, 2003, 139(4): 510-516.
- [43] Akita S, Yoshimoto H, Akino K, et al. Early experiences with stem cells in treating chronic wounds[J]. Clin Plast Surg, 2012, 39(3): 281-292.
- [44] Vojtassak J, Danisovic L, Kubes M, et al. Autologous biograft and mesenchymal stem cells in treatment of the diabetic foot[J]. Neuro Endocrinol Lett, 2006, 27 Suppl 2: 134-137.
- [45] Lu D, Chen B, Liang Z, et al. Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: a double-blind, randomized, controlled trial[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2011, 92(1): 26-36.

(收稿日期:2020-10-27)

(本文编辑:蒋妍妍)

王宏宇, 刘玲英, 巴特. 间充质干细胞在烧伤创面修复中的研究进展[J/CD]. 中华损伤与修复杂志(电子版), 2020, 15(6): 495-498.