

DOI: 10.3969/j.issn.1673-713X.2019.03.004

· 论著 ·

人脐带间充质干细胞对人真皮成纤维细胞增殖和细胞外基质基因表达的影响

章毅*, 陈侃俊*, 伍婷, 祁成, 金魏名, 孔凡瑞, 陈亮

【摘要】

目的 探讨人脐带间充质干细胞(hucMSCs)对人真皮成纤维细胞(HDFib)增殖与细胞外基质相关基因表达的影响及其可能机制。

方法 采用 II 型胶原酶消化法从新生儿脐带中分离制备 hucMSCs, 用流式细胞术鉴定 P₃ 代 hucMSCs 表面标记抗原, 用油红 O 染色、茜素红 S 染色和 Masson 染色进行间充质干细胞三向分化能力鉴定; 随后与 P₃ 代 HDFib 进行 transwell 共培养, 对照组 transwell 小室上添加等量培养基, 观察 24、48 和 72 h 时两组 HDFib 的细胞形态, CCK8 法进行细胞增殖检测, qRT-PCR 法测定培养 24 和 48 h 时 HDFib 主要细胞外基质蛋白 collagen I、elastin、fibronectin、MMP-1 和细胞信号转导相关基因 PI3K、Akt、p38 和 caspase3 mRNA 表达水平。

结果 制备获得的 hucMSCs 呈典型成纤维细胞样并贴壁生长, 其表面间充质干细胞标志性抗原 CD105、CD90、CD73 阳性表达率分别为 96.97%、99.75% 和 99.81%, 诱导培养 16 d 后出现明显的成脂、成骨和成软骨细胞特性。hucMSCs 共培养处理 24、48 和 72 h, HDFib 细胞存活率较对照组分别显著增加了 7.29% ($P < 0.01$)、25.82% ($P < 0.05$) 和 11.74% ($P < 0.05$), 与形态学观察结果一致。qRT-PCR 结果显示, hucMSCs 共培养处理 24 h, HDFib elastin 和 fibronectin 基因表达分别上调为对照组的 1.45 倍 ($P < 0.01$) 和 1.30 倍 ($P < 0.05$), PI3K mRNA 水平上调为对照组的 1.19 倍 ($P < 0.05$); 共培养 48 h 时, collagen I、elastin、fibronectin 和 PI3K、Akt 分别上调 2.60 倍 ($P < 0.001$)、3.66 倍 ($P < 0.05$)、3.45 倍 ($P < 0.01$) 和 1.43 倍 ($P < 0.05$)、1.65 倍 ($P < 0.05$), MMP-1、p38 和 caspase3 转录水平显著降低至对照组的 0.70 倍 ($P < 0.01$)、0.60 倍 ($P < 0.01$) 和 0.86 倍 ($P < 0.05$)。

结论 hucMSCs 能够显著促进正常 HDFib 增殖, 同时提高 HDFib I 型胶原、弹性蛋白和纤维粘连蛋白转录水平, 是理想的皮肤组织工程学种子细胞。hucMSCs 对 HDFib 细胞外基质的调节作用可能与激活 HDFib 皮肤创伤修复信号通路 PI3K/Akt、下调细胞外基质调节基因 p38、凋亡基因 caspase3 的 mRNA 水平有关。

【关键词】 人脐带间充质干细胞; 人真皮成纤维细胞; 细胞外基质; 胶原

www.cmbp.net.cn

中国医药生物技术, 2019, 14(3):215-223

间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSCs)是一类能够自我更新和具有多向分化潜能的多能干细胞, 广泛存在于骨髓、脐带、胎盘、外周血和脂肪等组织中^[1]。脐带作为胚胎发育期间胎儿和胎盘之间的连系结构, 通常在分娩结束后被废弃, 其中富含间充质干细胞。人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hucMSCs)具有来源广泛、获取为非侵袭性操作、易于扩增且无道德伦理争议等优点, 已然成为干细胞研究和相关临床应用的热点。

随着人们生活水平的逐步提高, 皮肤健康和抗衰老日益受到重视。成纤维细胞是皮肤真皮组织中的主要细胞类型, 可以分泌胶原、弹性蛋白、纤维粘连蛋白等细胞基质成分, 对维持皮肤健康至关重要^[2]。随着年龄增长, 组织中成纤维细胞胶原合成量减少、胶原类型和含量比例改变、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)水平增加、弹性蛋白和纤维粘连蛋白等含量降低或出现结构性异常交联, 是皮肤衰老、皱纹产生的重要原因^[3]。

多项研究指出, MSCs 能够向创伤皮肤组织及炎症部位归巢迁移, 促进皮肤组织再生、创面修复、减少瘢痕形成, 在缓解皮肤炎症、改善纤维化、治疗系统性硬皮病、减轻皮肤放射性损伤等方面均具有很好的效果^[4-5]。此外, MSCs 还具有免疫抑制作

基金项目: 上海市自然科学基金(16ZR1429200); 上海市科委研发平台专项(16DZ2293000); 上海张江国家自主创新示范区专项发展资金重大项目(ZJ2017-ZD-010); 上海市科委工程技术研究中心建设专项(18DZ2250800)

作者单位: 200051 上海市脐带血造血干细胞库/上海市干细胞技术有限公司/中国干细胞集团有限公司

通信作者: 伍婷, Email: wuting@shanghaicordblood.org

收稿日期: 2018-09-18

*同为第一作者

用,其异体移植的排异反应极低,移植物存活率高,技术性移植壁垒较低^[6]。然而,目前关于 MSCs 对正常皮肤组织的潜在调节作用还鲜有报道。因此,本文以正常人真皮成纤维细胞(human dermal fibroblast, HDFib)为模型,探讨了 hucMSCs 对其增殖和细胞外基质主要蛋白基因表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂与耗材 独立采集足月产健康新生儿脐带,经产妇或家属签署知情同意后获得,符合国家相关法律和伦理委员会规定。成脂、成软骨、成骨诱导试剂盒以及 FBS、DMEM、0.25% Trypsin-EDTA、L-谷氨酰胺、0.4 $\mu\text{mol/L}$ transwell 小室均购自美国 Gibco 公司;CCK8 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;MSC Phenotyping Kit (CD105-PE、CD90-FITC、CD73-APC、CD14-/CD19-/CD34-/CD45-PerCP) 购自德国 Miltenyi Biotec 公司;油红 O 染液、Masson 染液、茜素红 S 染液购自南京建成生物工程研究所有限公司;0.4% 台盼蓝购自美国 Sigma 公司;Trizol 溶液、cDNA 合成试剂盒、PCR 试剂盒购自美国 Life Technologies 公司;基因引物购自美国 Invitrogen 公司;青霉素-链霉素溶液购自德国 PAN-biotech 公司。

1.1.2 仪器 Varioskan LUX 多功能酶标仪、ST-16R 低温离心机、CryoMed 7453 型程控降温仪为美国 Thermo 公司产品;stepone plus 实时荧光定量 PCR 仪为美国 Life 公司产品;1800 系列-190 气相液氮罐为美国 MVE 公司产品;自动细胞计数仪为美国 Invitrogen 公司产品;FACS Calibur 流式细胞仪为美国 BD 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 hucMSCs 的分离培养 无菌条件下剪取脐带华通胶,剪成约 2 mm^3 的碎块,加入 II 型胶原酶 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温消化 1.5 h, $100\text{ }\mu\text{m}$ 细胞筛过滤,收集滤液室温 2000 r/min 离心 10 min,收集细胞沉淀加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基重悬细胞,置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱内进行培养,在倒置相差显微镜下观察细胞形态和生长情况,待细胞融合度达到 80%~90% 时,0.25% 胰酶消化传代,接种密度为 $5 \times 10^4/\text{ml}$,每 2 天全量换液,每 3~4 天传代 1 次。

1.2.2 hucMSCs 表面抗原检测 取 P_3 代对数生

长期 hucMSCs,参考文献[7]鉴定方法,简要如下:用 PBS 调整细胞密度为 $5 \times 10^6/\text{ml}$,取 1 ml 细胞,分别加入鼠抗人单克隆标记抗体 CD90-FITC、CD105-PE、CD73-APC、CD14-/CD19-/CD34-/CD45-PerCP,以鼠抗人的 IgG1-FITC、IgG1-PE、IgG1-APC、IgG1-PerCP、IgG2a-PerCP 作为同型对照,室温避光孵育 30 min,流式细胞仪上样检测。

1.2.3 hucMSCs 三向分化检测 取 P_3 代对数生长期 hucMSCs 接种于六孔板中,参考文献[7]鉴定方法,简要如下:细胞密度为 $5 \times 10^4/\text{ml}$,2 ml/孔,置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度的恒温培养箱中培养,待细胞融合度达到 60%~70% 时,弃去原培养基,分别更换为成脂、成软骨和成骨诱导分化培养基,每 3 天换液一次。诱导 14 d 后,分别用油红 O 染液、Masson 染液、茜素红 S 染液染色,倒置相差显微镜下观察 pMSCs 的成脂、成软骨、成骨分化水平。

1.2.4 Transwell 共培养及 HDFib 形态学观察 取 P_3 代 HDFib 接种于六孔板中,接种密度为 $5 \times 10^4/\text{ml}$,2 ml/孔。在 HDFib 细胞上方放置 transwell 小室,实验组 transwell 小室接种 P_3 代 hucMSCs,细胞密度为 $5 \times 10^4/\text{ml}$,1 ml/孔,对照组的 transwell 小室添加等量 DMEM 培养基(10% FBS)。每个处理组设置 3 个重复。在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中连续培养 24、48 和 72 h,倒置显微镜下观察 HDFib 的细胞形态并拍照。

1.2.5 细胞增殖检测 取 P_3 代 HDFib 接种于 24 孔板中,细胞密度为 $5 \times 10^4/\text{ml}$,1 ml/孔。在 HDFib 细胞上方放置 transwell 小室,实验组 transwell 小室接种 P_3 代 hucMSCs,细胞密度为 $5 \times 10^4/\text{ml}$,0.5 ml/孔,对照组的 transwell 小室添加等量 DMEM 培养基(10% FBS)。每个处理组设置 3 个重复。在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中连续培养 24、48 和 72 h。培养结束后,弃去 hucMSCs 及小室,每孔加入 $200\text{ }\mu\text{l}$ CCK8 工作液, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 2 h,酶标仪检测 450 nm 处吸光值。

1.2.6 qRT-PCR 检测基因 mRNA 表达 按照 1.2.4 所述方法培养 HDFib,连续培养 24、48 h 后,采用 Trizol 法提取细胞总 RNA,反转录为 cDNA, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。qRT-PCR 测定细胞外基质相关蛋白 collagen I、elastin、fibronectin、MMP-1 和细胞信号转导相关基因 PI3K、Akt、p38、caspase3 的 mRNA 表达。PCR 扩增条件: $50\text{ }^\circ\text{C}$ 保持 2 min, $95\text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 2 min, $95\text{ }^\circ\text{C}$ 变性 3 s, $60\text{ }^\circ\text{C}$ 退火

30 s, 循环 40 次, 95 °C 延伸 15 s, 60 °C 延伸 1 min, 95 °C 延伸 15 s。基因引物序列见表 1。

1.3 统计学处理

采用 FlowJo 7.6.1 软件分析流式检测结果, 用 GraphPad Prism 6.0 软件进行作图、统计学分析, 组间比较采用 one-way ANOVA, 所得计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。当 $P < 0.05$ 时表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 hucMSCs 表面抗原鉴定

流式细胞术检测 P₃ 代 hucMSCs 表面抗原标志物, 结果显示 CD14⁺/CD19⁺/CD34⁺/CD45⁺ 阳性细胞数百分比为 0.58%, 表达特异性抗原 CD73⁺、CD90⁺、CD105⁺ 阳性细胞百分比分别为 99.81%、99.75%、96.97% (图 1), 符合国际细胞治疗协会定义的 MSCs 标志性抗原表达鉴定标准^[8]。表明本研究采用的 hucMSCs 具有很好的间充质干细胞生物学特性。

2.2 hucMSCs 三向分化能力鉴定

传代培养的 hucMSCs 接种 12 h 左右贴壁, 细胞为长梭形、多角形, 以旋涡状、放射状兼平行

表 1 qRT-PCR 基因引物序列

Table 1 Gene primer sequences for qRT-PCR

基因名称			引物 (5' - 3')
Gene name			Primers (5' - 3')
β-actin	上游	Forward	AGAAAATCTGGCACCACACC
	下游	Reverse	AGAGGGTACAGGGATAGCA
Collagen I	上游	Forward	CACAGAGGTTTCAGTGGTTTGG
	下游	Reverse	GCACCAGTAGCACCATCATTTC
Elastin	上游	Forward	GGGTTGTGTCCACAGAAGCA
	下游	Reverse	CAACCCCGTAAGTAGGAATGC
Fibronectin	上游	Forward	AAGATTGGAGAGAAGTGGGACC
	下游	Reverse	GAGCAAATGGCACCAGATA
MMP-1	上游	Forward	TTGAGAAAGCCTTCCAACCTCTG
	下游	Reverse	CCGCAACACGATGTAAGTTGTA
PI3K	上游	Forward	GCCTTTGGAAGTTGGCACTG
	下游	Reverse	AGAGCTCCAAAGCAGCAGAG
Akt	上游	Forward	CCAGCTGGGTCAAAGAAGT
	下游	Reverse	TGTACTCCCTCGTTTGTGC
p38	上游	Forward	TGGGATGCATAATGGCCGAG
	下游	Reverse	TGGTCAACTTACCCAGGGGATT
Caspase-3	上游	Forward	TGCTATTGTGAGGCGGTTGT
	下游	Reverse	AGCTTTGGTTCGCCAAAC

排列状生长, 呈典型成纤维细胞样, 连续培养 3 ~ 4 d 后所有细胞汇合成单细胞层铺满培养皿底部, 排列紧密, 生长状态好 (图 2A)。

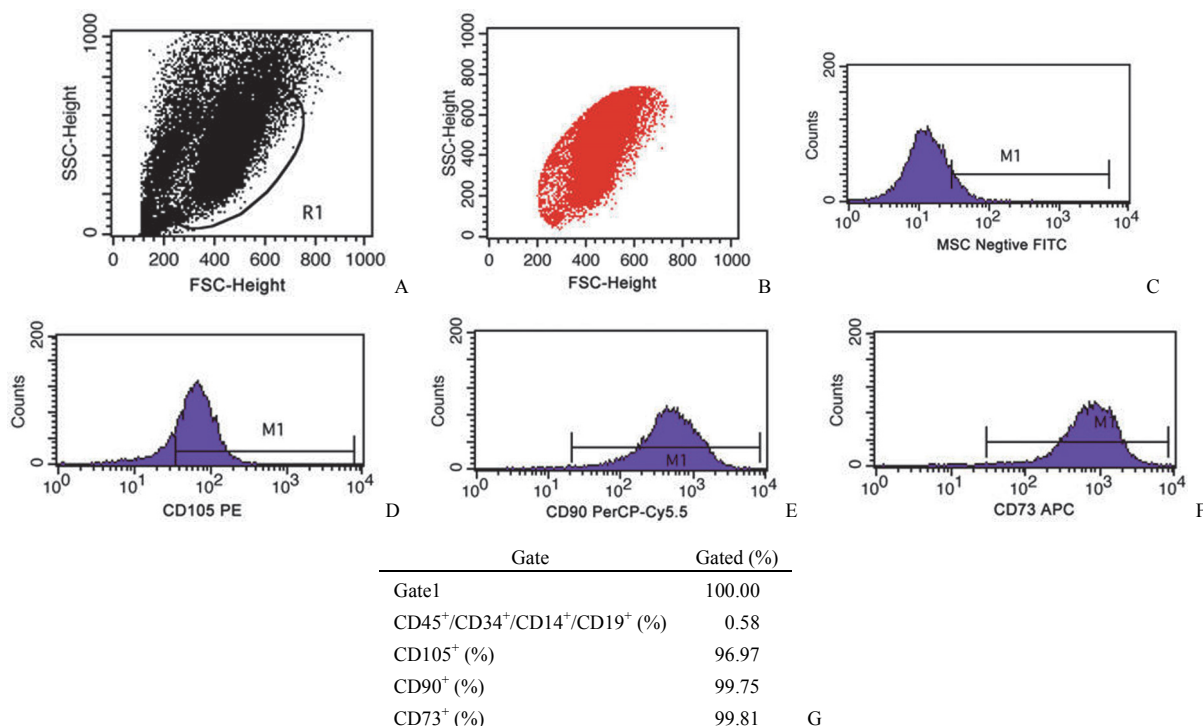


图 1 hucMSCs 表面标志抗原流式鉴定结果 (A: 总细胞散点分布; B: 活性; C: 阴性对照; D ~ F: CD105⁺、CD90⁺、CD73⁺ 细胞比例; G: 阳性细胞比例)

Figure 1 Phenotype characterization of hucMSCs through flow cytometry (A: Total cells scatter diagram; B: Alive cells; C: Negative staining; D - F: CD105⁺, CD90⁺, CD73⁺ cells ratio; G: Positive cell proportion)

hucMSCs 经成脂诱导培养 16 d, 油红 O 染色后观察到细胞的胞浆出现大小不等的脂滴, 随着诱导培养时间的延长, 脂滴持续增大、增多, 同时细胞形态从梭形、多角形向椭球形转变, 表现出脂肪细胞特点; hucMSCs 经成骨诱导培养 16 d, 观察到单个细胞体积增大, 开始形成多层结节状结构, 经茜素红 S 染色后出现大量橘色沉淀颗粒, 有明显的“矿化”结节, 提示细胞产生钙化基质沉积, 具有成骨细胞特点; hucMSCs 成软骨诱导培养 16 d, 观察到细胞收回其突起, 趋向扁平圆形贴壁生长并发生聚集, Masson 染色后细胞基质和纤维

呈蓝紫色, 具有成软骨细胞样特点(图 2B~D)。表明本研究获得的 hucMSCs 具有很好的成脂、成骨和成软骨分化潜能。

2.3 hucMSCs 对 HDFib 细胞生长及形态的影响

传代培养的 HDFib 贴壁生长, 细胞轮廓清晰, 呈突起的纺锤形、不规则多角形或细长条状, 当培养时间延长至 72 h, 基本形成完整单层细胞层铺满皿底。采用 transwell 小室与 hucMSCs 共培养的 HDFib 在贴壁培养 24 h 后即出现放射状生长态势, 48 h 时细胞较对照组更为密集, 72 h 时已形成致密的细胞层, 呈明显的旋涡状或放射状生长。

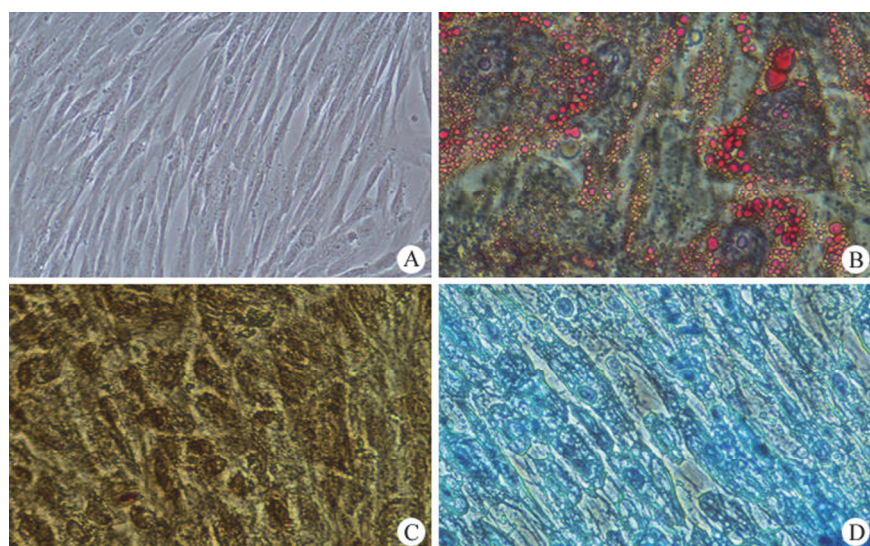


图 2 hucMSCs 成脂、成骨、成软骨分化潜能鉴定(A: 正常 hucMSCs 细胞形态; B: 油红 O 染色; C: 茜素红 S 染色; D: Masson 染色)

Figure 2 Adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiation capacities of hucMSCs (A: Normal hucMSCs morphology; B: Oil red O staining; C: Alizarin red S staining; D: Masson staining)

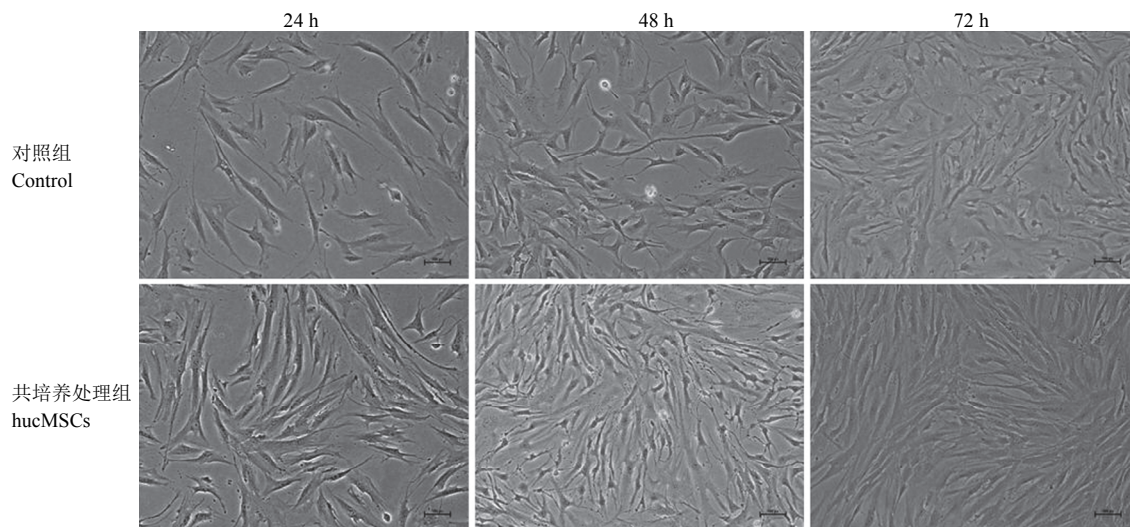


图 3 hucMSCs 与 HDFib 共培养对其细胞生长及形态的影响

Figure 3 Effects of co-culture with hucMSCs on HDFib cell growth and morphology

提示 hucMSCs 共培养下 HDFib 的细胞形态更好、增殖更快 (图 3)。

2.4 hucMSCs 对 HDFib 增殖的影响

CCK8 细胞增殖检测结果 (图 4、表 2) 显示, hucMSCs 与 HDFib 共培养 24、48 和 72 h, 其细胞存活率分别增加了 7.29% ($P < 0.01$)、25.82% ($P < 0.05$) 和 11.74% ($P < 0.05$), 差异均具有统计学意义, 与 HDFib 形态学观察结果 (图 3) 一致。提示 hucMSCs 共培养对 HDFib 的增殖促进作用是高效而持续的。

2.5 hucMSCs 对 HDFib 胶原合成基因表达的影响

为了探究 hucMSCs 对 HDFib 胶原合成的影响, 本研究测定了 hucMSCs 共培养 24 和 48 h 下 HDFib 的细胞外基质相关蛋白基因的 mRNA 水平。结果显示, 与对照组相比, 共培养 48 h 时 HDFib 的 I 型胶原基因表达水平极显著升高 ($P < 0.001$, 图 5A); 共培养 24 或 48 h, fibronectin 和 elastin 基因表达均显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 图 5B~C); 共培养 48 h, 基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase-1, MMP-1) mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$, 图 5D)。表明 hucMSCs 与 HDFib 共培养能够显著促进体外细胞胶原合成相关基因的表达水平。

2.6 hucMSCs 对 HDFib 增殖和细胞外基质调控相关基因表达的影响

本研究进一步测定 hucMSCs 共培养对 HDFib 增殖、凋亡和迁移及细胞外基质调控相关基因表达的可能影响。结果发现, hucMSCs 共培养 48 h 显著下调 HDFib 细胞 p38 MAPK ($P < 0.01$, 图 6A) 和 caspase3 ($P < 0.05$, 图 6B) mRNA 水平; 同时显著上调共培养 48 h 组 HDFib 细胞的 Akt 基因表达水平 ($P < 0.05$, 图 6C) 和 24、48 h 组 HDFib 细胞的 PI3K mRNA 表达 ($P < 0.05$, 图 6D)。提示 hucMSCs 可能激活 PI3K/Akt 信号通路、下调 p38 和 caspase3 水平并与其促进 HDFib 细胞增殖、提高细胞外基质水平有关。

3 讨论

随着再生医学领域的快速发展和人们对 MSCs 细胞特性及功能认识的不断深入, 越来越多研究开始将 MSCs 与皮肤再生修复及医学美容关联起来。Wu 等^[1]研究表明, 在脐带、羊膜、绒毛膜板和壁蜕膜等围产组织来源的 MSCs 中, 脐带来源的 MSCs 选择性旁分泌因子水平最高, 自我更新能力强, 是理想的疾病治疗种子细胞。本研究从人脐带中分离制备了间充质干细胞, 与 HDFib 细胞共培养并探讨其对成纤维细胞增殖率和相关

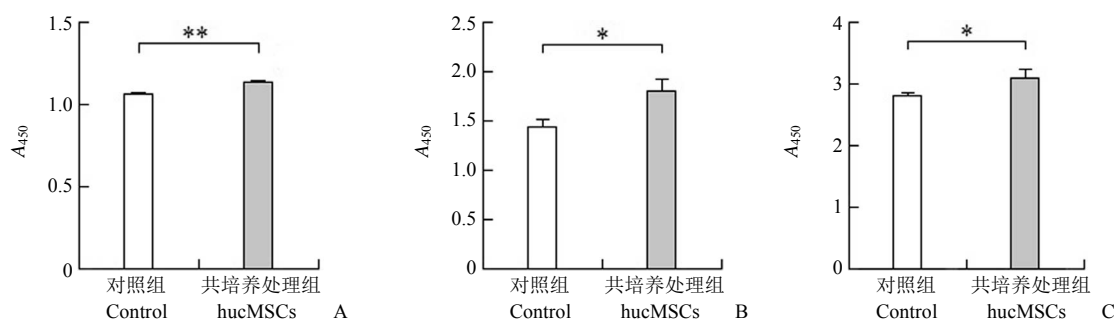


图 4 HDFib 细胞 CCK8 增殖检测结果 (A~C: 共培养 24、48、72 h; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Figure 4 HDFib cell proliferation measured by CCK8 method (A - C: HDFib co-culture with hucMSCs in a transwell for 24, 48 and 72 h, respectively; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

表 2 HDFib 增殖率分析

Table 2 Analysis of HDFib cell proliferation

共培养时间 (h)	存活率增加比例 ($\bar{x} \pm s$, %)	P 值
Co-culture duration (h)	Increment ratio of survival rate ($\bar{x} \pm s$, %)	P value
24	7.29 ± 2.41	0.0018
48	25.82 ± 13.31	0.016
72	11.74 ± 5.89	0.013

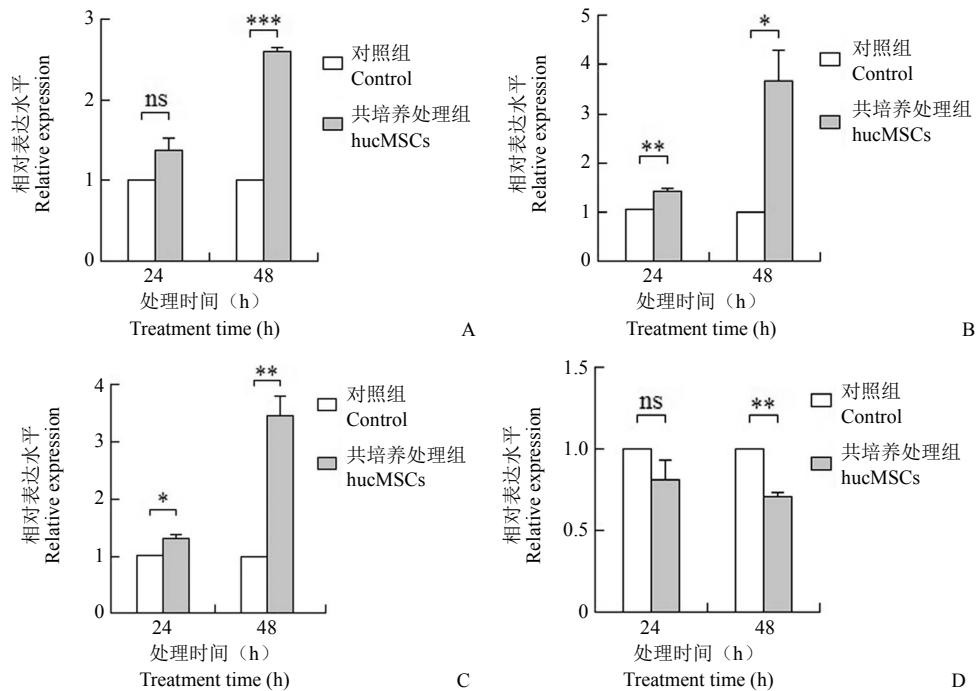


图 5 HDFib 细胞外基质相关蛋白基因表达检测结果 (A: I 型胶原; B: 弹性蛋白; C: 纤连蛋白; D: 基质金属蛋白酶-1; $^{ns}P > 0.05$, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$)

Figure 5 Extracellular matrix mRNA levels determined by qRT-PCR (A: Collagen I; B: Elastin; C: Fibronectin; D: MMP-1; $^{ns}P > 0.05$, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$)

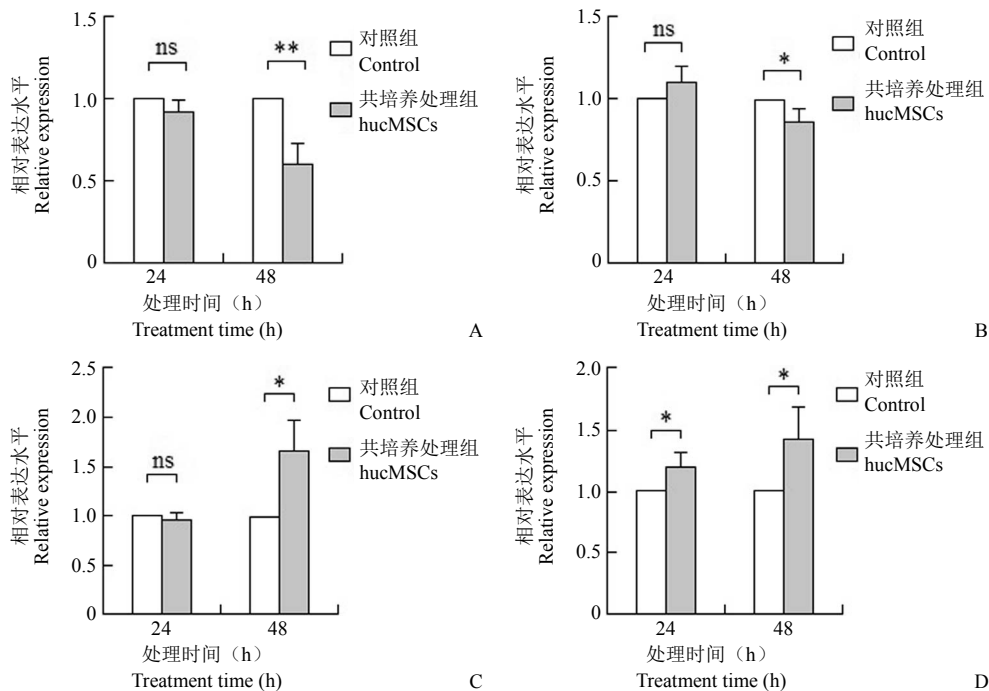


图 6 HDFib 增殖和细胞外基质调控相关基因表达检测结果 (A: p38 丝裂原活化蛋白激酶; B: 半胱天冬酶-3; C: 蛋白激酶 B; D: 磷脂酰肌醇 3 激酶; $^{ns}P > 0.05$, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$)

Figure 6 Extracellular matrix regulation and cell proliferation related genes mRNA levels in HDFib cells determined by qRT-PCR (A: p38 MAPK; B: Caspase3; C: Akt; D: PI3K; $^{ns}P > 0.05$, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$)

基因表达的影响。结果显示, hucMSCs 能够显著促进 HDFib 增殖,同时显著上调 collagen I、elastin 和 fibronectin 的基因表达水平,显著下调 MMP-1 mRNA 水平,且具有持续的作用效果。

胶原是细胞外基质的框架结构,也是动物体内含量最丰富的蛋白质,对于维持皮肤健康至关重要^[9]。青少年时期,皮肤胶原蛋白含量丰富,其中主要分布在真皮层的 I 型胶原占比高达 70%,随着皮肤的逐渐老化,细胞胶原含量逐渐降低,各胶原类型的比例发生倒置,胶原变粗并出现异常共价交联,使皮肤、血管等组织变得僵硬,是皮肤老化的一个重要特征^[10-11]。有研究指出,老化的皮肤胶原蛋白含量降低是因为成纤维细胞合成胶原量减少,而 MMPs 分泌水平却大幅提高^[12]。MMPs 几乎能降解细胞外基质的所有蛋白成分,其中 MMP-1 是胶原酶的主要类型,其活性受到基因转录水平、无活性酶前体经蛋白水解作用激活以及 MMP 组织抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)的调节^[13]。本文研究结果显示, hucMSCs 处理 24 和 48 h, HDFib 的 collagen I mRNA 水平分别上调 1.37 倍、2.60 倍,同时 MMP-1 水平降低至对照组的 0.79 倍和 0.70 倍,表明 hucMSCs 处理能够在提升胶原转录水平的同时抑制其降解进程,以将成纤维细胞外胶原含量维持在较高水平。

弹性蛋白是弹性纤维的主要成分,其氧化赖氨酸形成的锁链素和开链锁链素特殊交联结构赋予其极大的伸展性,与胶原纤维共同存在形成富有弹性和抗张能力的网状结构。弹性蛋白生成减少、降解增多是导致皮肤失去弹性、产生皱纹的重要原因之一^[14]。纤维粘连蛋白主要存在于成纤维细胞表面,通过与其他细胞外基质或细胞表面受体结合,使细胞外基质形成网络并将细胞附着到细胞外基质上。Jeon 等^[15]在探究 MSCs 对皮肤创伤愈合的影响及作用机制时发现, MSCs 条件培养基处理可以有效促进成纤维细胞的增殖和迁移,提高弹性蛋白、纤维粘连蛋白和胶原的转录水平及分泌量,同时下调细胞氧化应激水平,促进体内外皮肤创伤修复。我们的研究发现, hucMSCs 处理 24 和 48 h, HDFib 的 elastin mRNA 水平分别上调 1.45 倍和 3.66 倍, fibronectin mRNA 表达分别上调 1.30 倍和 3.45 倍,与文献报道结果相似。作为真皮成纤维细胞的细胞外基质主要成分,胶原、弹性蛋白和纤维粘连蛋白基因转录水平在 hucMSCs 的作用

下均出现不同程度的显著上调,与 HDFib 细胞增殖趋势一致,同时 MMP-1 水平下调,提示间充质干细胞可能通过促进皮肤细胞中真皮成纤维细胞增殖以及提高细胞外基质相关蛋白表达,从而改善正常皮肤的健康状况。

在作用机制方面,有不少学者认为 MSCs 通过旁分泌作用发挥促进细胞增殖和损伤修复功能。Arno 等^[16]和 Sato 等^[17]先后研究发现 hucMSCs 和羊膜 MSCs 通过分泌并调节 TGF- β 2、TGF- β 3 转录水平、以及 IL-6、IL-8、TGF- β 1 和 TGF- β 2 蛋白表达水平来促进成纤维细胞迁移和增殖。Li 等^[18]则认为, MSCs 强大的分化潜能允许其分化产生成纤维细胞、软骨细胞和间叶细胞等促进皮肤组织再生和创面修复。近年来,越来越多研究观察到 MSCs 可能通过分泌一种被称为外泌体的细胞外囊泡,进行细胞间信号传递并发挥生物学功能。Shabbir 等^[19]发现, MSCs 源外泌体可以被人脐静脉内皮细胞吸收,并以剂量依赖方式诱导正常皮肤和慢性创面的成纤维细胞增殖与迁移,这与创伤修复相关信号通路 Akt/ERK 和 STAT3 的激活有关。Sarojini 等^[20]采用小鼠 MSCs 源条件培养基处理创伤成纤维细胞,发现可以显著诱导细胞的趋药性,发挥促血管生成作用。Kim 等^[21]从骨髓 MSCs 培养基上清制备外泌体,发现其可以通过激活 PI3K/Akt 通路信号转导促进肺成纤维细胞的增殖和迁移,恢复吸烟引起的细胞外基质基因转录水平和蛋白表达水平降低,最终修复吸烟引起的肺部成纤维细胞损伤。丝裂素活化的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)是一类序列极端保守的苏氨酸和丝氨酸双位磷酸化酶系,在氧化、紫外线、神经递质及激素等不同应激条件下将细胞外信号传递到细胞核内,其中 p38 MAPK 也被认为在皮肤切创损伤区成纤维细胞的凋亡中起重要作用^[22]。此外, JNK 和 p38 可以最终启动转录因子激活蛋白 1,后者是 MMPs 转录所必需,从而促使 MMPs 高表达,特异性抑制其磷酸化可抑制 MAPKs 信号通路参与的皮肤光老化、炎症反应、凋亡等过程^[23]。在本研究中, hucMSCs 共培养处理 24 或 48 h 后 HDFib 细胞的 PI3K 和 Akt 基因表达水平得到显著上调,48 h 时分别为对照组的 1.43 倍和 1.65 倍,同时显著下调 p38 和细胞凋亡关键基因 caspase3 表达,提示 hucMSCs 可能通过激活创伤修复信号通路 PI3K/Akt,同时降低 p38 表达以减少细胞外基

质降解,提高 HDFib 增殖活力和细胞外基质水平。

综上,我们的研究表明, hucMSCs 能够显著促进正常 HDFib 增殖并上调其主要细胞外基质相关蛋白的基因转录水平,尤其通过同时上调 collagen I mRNA 表达和抑制 MMP-1 基因表达来维持较高的胶原水平,是皮肤组织工程的理想种子细胞。这可能与其上调创伤修复信号通路 PI3K/Akt、下调 MMPs 调节相关基因 p38 和凋亡基因 caspase3 表达有关。另一方面,在细胞间非接触式共培养方式下, hucMSCs 与 HDFib 能够共享营养因子和分泌产物,提示 hucMSCs 可能通过产生外泌体或细胞因子的方式影响 HDFib 增殖等生物学表现。接下来,我们将在体内、外模型中进一步探究 hucMSCs 对皮肤及相关细胞类型产生影响的分子作用机制,以期开发皮肤组织损伤及相关疾病的无细胞治疗新手段,更好地发挥 MSCs 的临床价值。

参考文献

- [1] Wu M, Zhang R, Zou Q, et al. Comparison of the biological characteristics of mesenchymal stem cells derived from the human placenta and umbilical cord. *Sci Rep*, 2018, 8(1):5014.
- [2] Chang Y, Li H, Guo Z. Mesenchymal stem cell-like properties in fibroblasts. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 34(3):703-714.
- [3] Zeng TF, Xin GH, He Y. Research progress of bone marrow mesenchymal stem cells on skin injury repairing. *Chin J Clin (Electronic Ed)*, 2011, 5(16):4831-4834. (in Chinese)
曾逃方, 辛国华, 何勇. 应用骨髓间充质干细胞修复皮肤损伤的研究进展. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2011, 5(16):4831-4834.
- [4] Trial J, Entman ML, Cieslik KA. Mesenchymal stem cell-derived inflammatory fibroblasts mediate interstitial fibrosis in the aging heart. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 91:28-34.
- [5] Linard C, Tissedre F, Busson E, et al. Therapeutic potential of gingival fibroblasts for cutaneous radiation syndrome: comparison to bone marrow-mesenchymal stem cell grafts. *Stem Cells Dev*, 2015, 24(10):1182-1193.
- [6] Liu M, Wang JS, Liu MY, et al. Study of immunomodulatory function of exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Natl Med J China*, 2015, 95(32):2630-2633. (in Chinese)
刘明, 汪劲松, 刘沐芸, 等. 人脐带间充质干细胞外泌体免疫调节功能的研究. *中华医学杂志*, 2015, 95(32):2630-2633.
- [7] Zhang Y, Chen KJ, Li P, et al. Effects of cryopreservation methods on human pMSCs: programmed versus stepwise freezing. *Chin Med Biotechnol*, 2017, 12(6):515-519. (in Chinese)
章毅, 陈侃俊, 李萍, 等. 程控降温法与二步法对胎盘间充质干细胞冻存效果的影响. *中国医药生物技术*, 2017, 12(6):513-519.
- [8] Dominici M, Le Blanc K, 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.
- [9] Yannas IV, Tzeranis D, So PT. Surface biology of collagen scaffold explains blocking of wound contraction and regeneration of skin and peripheral nerves. *Biomed Mater*, 2015, 11(1):014106.
- [10] Quan T, Little E, Quan H, et al. Elevated matrix metalloproteinases and collagen fragmentation in photodamaged human skin: impact of altered extracellular matrix microenvironment on dermal fibroblast function. *J Invest Dermatol*, 2013, 133(5):1362-1366.
- [11] Dang QF, Liu H, Yan JQ, et al. Characterization of collagen from haddock skin and wound healing properties of its hydrolysates. *Biomed Mater*, 2015, 10(1):015022.
- [12] Mohamed MA, Jung M, Lee SM, et al. Protective effect of disporum sessile D.Don extract against UVB-induced photoaging via suppressing MMP-1 expression and collagen degradation in human skin cells. *J Photochem Photobiol B*, 2014, 133:73-79.
- [13] Agren MS, Schnabel R, Christensen LH, et al. Tumor necrosis factor-alpha-accelerated degradation of type I collagen in human skin is associated with elevated matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 ex vivo. *Eur J Cell Biol*, 2015, 94(1):12-21.
- [14] Mora Huertas AC, Schmelzer CEH, Luise C, et al. Degradation of tropoelastin and skin elastin by neprilysin. *Biochimie*, 2018, 146:73-78.
- [15] Jeon YK, Jang YH, Yoo DR, et al. Mesenchymal stem cells' interaction with skin: wound-healing effect on fibroblast cells and skin tissue. *Wound Repair Regen*, 2010, 18(6):655-661.
- [16] Arno AI, Amini-Nik S, 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.
- [17] Sato C, Yamamoto Y, Funayama E, et al. Conditioned medium obtained from amnion-derived mesenchymal stem cell culture prevents activation of keloid fibroblasts. *Plast Reconstr Surg*, 2018, 141(2):390-398.
- [18] Li X, Hamada T, Ohata C, et al. Potential mesenchymal stem cell therapy for skin diseases. *Exp Dermatol*, 2013, 22(8):515-516.
- [19] Shabbir A, Cox A, Rodriguez-Menocal L, et al. Mesenchymal stem cell exosomes induce proliferation and migration of normal and chronic wound fibroblasts, and enhance angiogenesis in vitro. *Stem Cells Dev*, 2015, 24(14):1635-1647.
- [20] Sarojini H, Estrada R, Lu H, et al. PEDF from mouse mesenchymal stem cell secretome attracts fibroblasts. *J Cell Biochem*, 2008, 104(5):1793-1802.
- [21] Kim YJ, Yoo SM, Park HH, et al. Exosomes derived from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells stimulates rejuvenation of human skin. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 493(2):1102-1108.
- [22] Zhang JJ, Guan DW, Yang DL. A study on the time-dependent expression of phospho-p38MAPK during the skin incised wound healing in mice. *J Forensic Med*, 2007, 23(5):321-324, cover 4. (in Chinese)
张建军, 官大威, 杨大利. 小鼠皮肤切创愈合过程中磷酸化 p38MAPK 表达及其与时间的相关性. *法医学杂志*, 2007, 23(5):321-324, 封 4.
- [23] Pan M. Photoprotection effects of EGCG on reducing protein secretion and mRNA expression of MMP-1 in human skin fibroblasts after UVB or UVA irradiation and the relevant molecules mechanisms. Nanjing: Nanjing Medical University, 2008. (in Chinese)
潘敏. EGCG 抑制 UVB 及 UVA 诱导的人皮肤成纤维细胞 MMP-1 水平及其相关分子机制的实验研究. 南京: 南京医科大学, 2008.

Effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells on the cell proliferation and extracellular matrix gene expression of human dermal fibroblast

ZHANG Yi, CHEN Kan-jun, WU Ting, QI Cheng, JIN Wei-ming, KONG Fan-ru, CHEN Liang

【Abstract】

Objective To investigate the effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hucMSCs) on the cell proliferation and extracellular matrix genes expression of normal human dermal fibroblast (HDFib) and potential mechanisms.

Methods The hucMSCs were derived from healthy full-term newborn umbilical cord through a collagenase digestion method. Flow cytometry was applied to determine the characteristic mesenchymal stem cell antigenic markers of P3-generation hucMSCs, and oil red O, alizarin red S and Masson staining were used for testing its adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiation capacities, respectively. Then, P3-generation HDFib were treated with hucMSCs by transwell experiment (co-culture group), while equal volume of medium was added to the control group. After a period of 24, 48 and 72 h co-culture, the proliferation of HDFib was measured by CCK8 assay and cell morphology were also recorded. The mainly extracellular matrix proteins, collagen I, elastin, fibronectin, matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and cellular signal transduction pathways PI3K, Akt, p38 and caspase3 mRNA expression after 24 and 48 h culture were further characterized by qRT-PCR.

Results The adherent hucMSCs showed the shape of fibroblast, which could differentiate into osteoblasts, adipocytes and chondrocytes after 16 d induction culture period *in vitro*. The expression of CD105, CD90 and CD73 on hucMSCs were 96.97%, 99.75% and 99.81%, respectively. Consistent with the morphologic results, the viability of HDFib treated with hucMSCs was significantly increased for 7.29% ($P < 0.01$), 25.82% ($P < 0.05$) and 11.74% ($P < 0.05$) after 24, 48 and 72 h co-culture, respectively. Moreover, elastin, fibronectin and PI3K gene expression of HDFib were up-regulated by 1.45 ($P < 0.01$), 1.30 ($P < 0.05$) and 1.19 ($P < 0.05$) folds after 24 h co-culture with hucMSCs compared to the control group, and collagen I, elastin, fibronectin, PI3K and Akt mRNA level were up-regulated by 2.60 ($P < 0.001$), 3.66 ($P < 0.05$), 3.45 ($P < 0.01$), 1.43 ($P < 0.05$) and 1.65 ($P < 0.05$) folds after 48 h co-culture, while MMP-1, p38 and caspase3 were down-regulated by 0.70 ($P < 0.01$), 0.60 ($P < 0.01$) and 0.86 ($P < 0.05$) folds of control.

Conclusion Our results show that hucMSCs can significantly promote the proliferation of HDFib and increase the transcription levels of collagen I, elastin and fibronectin, which indicates that hucMSCs are potential seed cells for skin tissue engineering. Besides, our results indicate that the regulation of hucMSCs on HDFib extracellular matrix may be related to the activation of skin wound repair pathway PI3K/Akt and the decrease of p38 and caspase3 expression.

【Key words】 Human umbilical cord mesenchymal stem cells; Human dermal fibroblast; Extracellular matrix; Collagen

Author Affiliation: Shanghai Cord Blood Bank/Shanghai Stem Cell Technology Co., Ltd./China Stem Cell Group Co., Ltd., Shanghai 200051, China

Corresponding Author: WU Ting, Email: wuting@shanghaicordblood.org