

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.15.010

文章编号: 1005-8982(2016)15-0056-04

论著

## 骨髓间充质干细胞促进皮肤创口愈合及 Wnt 信号通路在愈合过程中的作用

王志红<sup>1</sup>, 黄汉<sup>2</sup>, 张斌<sup>2</sup>, 马竞<sup>2</sup>, 张佳<sup>1</sup>

(1. 辽宁医学院 研究生学院, 辽宁 锦州 121001; 2. 辽宁医学院附属第一医院 口腔科, 辽宁 锦州 121001)

**摘要:目的** 研究骨髓间充质干细胞(BMSCs)对皮肤创口愈合及 Wnt 信号通路在愈合过程中的作用。

**方法** 原代培养 Sprague Dawly 大鼠 BMSCs 并 CD29、CD44、CD90、CD45 细胞表面标志物鉴定; 构建 SD 大鼠皮肤创口损伤模型; 实验分组:磷酸缓冲盐溶液(PBS)对照组、BMSCs 组, 分别将 PBS、BMSC 细胞皮下注射到创口周围, 观察创口愈合情况, 计算创口愈合率; 蛋白免疫印迹法检测 Wnt1 和  $\beta$ -catenin 基因表达水平。

**结果** 第 3 代 BMSCs 形态多为梭形、多突形。BMSCs 可均一表达 CD29、CD44、CD90, 其阳性率分别为 87.29%、91.66% 和 76.18%; 而 CD45 呈阴性, 其阳性率为 3.14%。BMSCs 可显著促进大鼠创口愈合; BMSCs 组大鼠创面愈合率均高于 PBS 组, 差异有统计学意义。蛋白免疫印迹结果 BMSCs 促进 Wnt1 和  $\beta$ -catenin 基因蛋白表达。**结论** BMSCs 能促进创口愈合, 其促进作用可能与 Wnt 信号通路有关。

**关键词:** 骨髓间充质干细胞; 伤口愈合; 信号通路

**中图分类号:** R683

**文献标识码:** A

## Effect of bone marrow mesenchymal stem cells on skin wound healing and role of Wnt signaling pathway in healing process

Zhi-hong Wang<sup>1</sup>, Han Huang<sup>2</sup>, Bin Zhang<sup>2</sup>, Jing Ma<sup>2</sup>, Jia Zhang<sup>1</sup>

(1. Graduate School of Liaoning Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China;

2. Department of Stomatology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

**Abstract: Objective** To study the effect of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) on skin wound healing and the role of Wnt signaling pathway in the healing process. **Methods** Primary cultured BMSCs were from SD rats. CD29, CD44, CD90 and CD45 cell surface markers were identified. SD rat skin wound healing model was constructed. Experimental groups included PBS control group and BMSCs group, in which the PBS and BMSCs were injected subcutaneously around the wound respectively. Wound healing was observed and the rate of wound healing was calculated. Using Western blot Wnt1 and  $\beta$ -catenin expression levels were detected. **Results** The third-generation BMSCs were fusiform and multi-shaped with protrusions. BMSCs could uniformly express CD29, CD44 and CD90, the positive rates were 87.29%, 91.66% and 76.18% respectively; the positive rate of CD45 was only 3.14%. BMSCs could significantly promote wound healing in the rats. The wound healing rate of the BMSCs group was significantly higher than that of the PBS group, and the BMSCs promoted Wnt1 and  $\beta$ -catenin protein expressions. **Conclusions** BMSCs can promote wound healing, which may be related to the promotion of the role of Wnt signaling pathway.

**Keywords:** bone marrow mesenchymal stem cell; wound healing; signal pathway

收稿日期: 2015-12-18

[通信作者] 黄汉, E-mail: kq2015525@163.com; Tel: 0416-4197262

口腔颌面部外伤、肿瘤等常可造成大面积创伤缺损、瘢痕,严重者可致面部外形改变,由于位置特殊,常给患者造成巨大心理压力。常规的皮肤、组织瓣等移植治疗有许多条件限制,难以满足目前临床需要。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)属于多潜能干细胞,具有多向分化潜能,在特定诱导条件下可分化成多种组织细胞,能够作为理想的种子细胞用于组织器官损伤修复。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物与试剂

实验所用 Sprague Dawley 大鼠(以下简称 SD 大鼠)雄鼠由辽宁医学院动物中心提供。达尔伯克必需基本(dulbecco's minimum essential medium, DMEM)低糖培养基购自美国 Hyclone 公司,胎牛血清购自美国 Hyclone 公司, Wnt1、 $\beta$ -链蛋白( $\beta$ -catenin)抗体购自上海万类生物公司。

### 1.2 SD 大鼠 BMSCs 的原代培养

选取同一时期繁殖的 4 只 200 g 左右 SD 雄鼠, 10%水合氯醛按 0.3 ml/100 g 腹腔注射麻醉, 75%酒精浸泡消毒,超净台内取双侧股骨,分离去除骨表面附着组织。剪开一侧骨髓,暴露髓腔,用含 20%胎牛血清的 DMEM 完全培养基自另一侧髓端反复冲洗骨髓腔,将冲洗液收集到 10 cm 培养皿中,吹打混匀,置于 37℃、5%二氧化碳 CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中培养。

3 d 后首次更换培养基,每 48 h 更换培养基,直至细胞融合至 90%, 0.25%胰蛋白酶消化,按 1:3 接种于新的培养皿, 2~3 d 更换培养基,选择形态均一、生长状态良好的继续传代,第 3~5 代培养的 BMSCs 用作实验收集细胞。

### 1.3 细胞鉴定

取第 3 代骨髓间充质干细胞, 0.25%胰酶消化,离心收集细胞,加磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)吹打成细胞悬液,调整密度为  $1 \times 10^6$ /ml,加入到已标记抗体(CD29、CD44、CD90、CD45)的流式管中, 37℃孵育 30 min,离心收集细胞,留沉淀, PBS 漂洗 3 次, PBS 重悬细胞,流式细胞仪检测并分离含 BMSCs 阳性表面标志物的细胞继续培养用于后续实验。

### 1.4 皮肤创口损伤模型制备及处理

SD 雄鼠 20 只,随机分成两组。经 10%水合氯醛

麻醉后,背部剃毛,用无菌眼科剪在一侧背部做直径 2 cm 左右的全层皮肤损伤模型,将 PBS、分离纯化后的 BMSCs 分别皮下注射到两组大鼠创口周围,模型制备当天记为第 1 天,分别于 1、7 和 14 d 观察创口愈合情况,计算创面愈合率。创面愈合率(%)=(开始创伤面积 - 未愈合创面面积)/开始创伤面积。

### 1.5 蛋白免疫印迹法

14 d 麻醉处死实验大鼠,沿创口周围 2 mm 处剪下创口皮肤全层,取下的组织经研磨、裂解,提取蛋白样品。蛋白浓度测定后,样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,半干法转至聚偏二氟乙烯膜上。一抗 4℃过夜,三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液(tris buffered saline and tween 20, TBST)洗 3 次,二抗室温 1 h,化学发光法检测蛋白表达。

### 1.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,计量资料用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,各组间比较用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 第 3 代大鼠骨髓间充质干细胞

BMSCs 细胞形态多为梭形、多突形,其中混杂圆形的造血细胞。细胞培养 5~7 d 细胞融合可 > 90%;传代细胞 24 h 内基本贴壁,之后细胞单克隆复制多呈束状或漩涡状排列。见图 1。

### 2.2 BMSCs 表面标记物鉴定流式细胞仪的检测

第 3 代大鼠的 BMSCs 可均一表达 CD29、CD44、CD90,其阳性率分别为 87.29%、91.66%和 76.18%;而 CD45 呈阴性,其阳性率为 3.14%。

### 2.3 大鼠创口愈合过程

3 组实验大鼠 7 和 14 d 时创口愈合情况比较, BMSCs 组大鼠创口愈合明显较 PBS 组快, BMSCs 可显著促进大鼠创口愈合(见图 2)。BMSCs 组 7 和 14 d 大鼠创面愈合率分别为  $(86.464 \pm 1.278)\%$  和

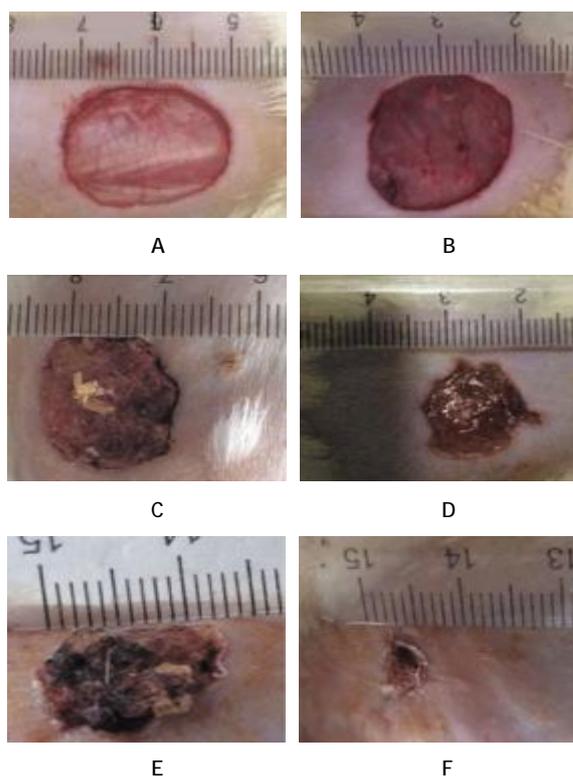


图 1 第 3 代大鼠骨髓间充质干细胞 ( $\times 100$ )

( $90.062 \pm 0.172$ )%均明显高于 PBS 组的 ( $41.972 \pm 1.621$ )%和 ( $61.664 \pm 2.477$ )%，经用单因素方差分析,差异有统计学意义( $P=0.000$ )(见图 3)。

#### 2.4 蛋白免疫印迹法检测

BMSCs 组 Wnt1 和  $\beta$ -catenin 基因蛋白表达水平高于 PBS 组。见图 4。



A:PBS 组第 1 天;B:BMSCs 组第 1 天;C:PBS 组第 7 天;D:BMSCs 组第 7 天;E:PBS 组第 14 天;F:BMSCs 组第 14 天

图 2 大鼠创口愈合过程

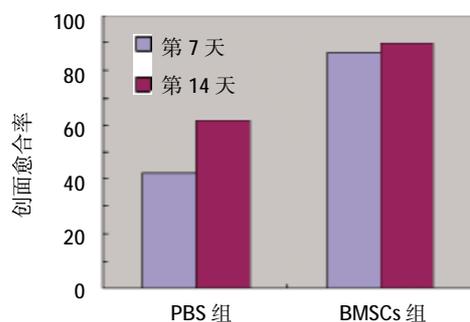


图 3 大鼠创口愈合率

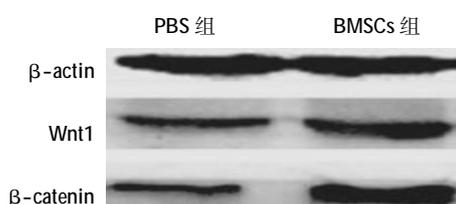


图 4 免疫印迹法检测 Wnt1 和  $\beta$ -catenin 蛋白表达水平

### 3 讨论

皮肤创口愈合是一个涉及多种细胞、多种因子的修复、重建过程<sup>[1]</sup>,是各种组织再生和肉芽组织增生、瘢痕组织形成的复杂组合,表现出各种过程的协同作用。大致包括炎症、增殖和重塑阶段<sup>[2]</sup>。长期的皮肤创口愈合不良对患者生活、工作具有重大影响,是临床研究的重点与热点。近年来,随着分子生物学的发展,人们对皮肤创面愈合机制的研究也逐渐深入。

BMSCs 属于多能干细胞,具有多向分化潜能、造血支持、免疫调控和自我复制等特点。在特定诱导条件下,体内或是体外培养的 BMSCs 可分化为骨、软骨、内皮、心肌等多种组织细胞,能够用于衰老病变组织器官的损伤修复。BMSCs 在骨髓中的含量很少,约占有核细胞的 0.001%~0.100%<sup>[3]</sup>,原代培养 BMSCs 通过换液去除大量未贴壁的造血细胞,呈圆形或类圆形的贴壁细胞传代培养后形态多为梭形、多突形。本研究中,原代培养的 BMSCs 可大量扩增并传代,且经鉴定第 3 代大鼠的 BMSCs 均可一表达 CD29、CD44、CD90,其阳性率分别为 87.29%、91.66%和 76.18%;而 CD45 呈阴性,其阳性率为 3.14%。

BMSCs 可显著促进实验大鼠创口愈合,且创面愈合率明显高于对照组。BMSCs 促进创口愈合的具体机制目前仍不完全清楚。其可能机制有:①BMSCs 的自我更新能力和多向分化能力可长期保持,其可在创面局部增生并分化为创面修复所需的细胞,如角质形成细胞、毛囊细胞、皮脂腺细胞、汗腺细胞等<sup>[4-5]</sup>。②促进皮肤网状嵴样结构形成。③BMSCs 的旁分泌作用。许多研究表明,BMSCs 可分泌大量促进创面愈合的生长因子<sup>[6]</sup>。④免疫调理作用。⑤BMSCs 可能还有促进体内干细胞迁移到伤口局部、减轻纤维化、保持细胞外基质内环境平衡及减少细胞凋亡等作用<sup>[7]</sup>。

大量实验研究表明,Wnt 蛋白家族参与细胞增殖、凋亡、分化等多种生物学过程<sup>[8]</sup>,并参与维持干细胞的多潜能性等。Wnt 信号通路是一条高度保守的信号通路,由 Wnt 蛋白及其受体、调节蛋白等组成。Wnt 信号通路主要有 3 条途径:①经典 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路,又称为经典 Wnt 通路;②Wnt/PCP 通路,又称平面细胞极性信号通路;③Wnt/ $Ca^{2+}$  通路。其中,最被熟知的是经典 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路,而 Wnt1 是激活经典 Wnt 信号通路的主要 Wnt 蛋白<sup>[9-10]</sup>。有研究证实,经典 Wnt 信号通路中的相关成员参与创面愈

合<sup>[1]</sup>,其参过程可能与其具有调控皮肤及其附属器的发育、诱导皮肤附件的形态发生、促进创面血管新生及上皮重塑等多种功能有关。免疫印迹检测结果表明,BMSCs 能促进 Wnt1 和  $\beta$ -catenin 基因蛋白表达水平,激活经典 Wnt/ $\beta$ -catenin,促进创口愈合。

BMSCs 能够有效促进大鼠皮肤创伤愈合,为临床治疗提供实验依据。但 BMSCs 实际应用临床仍有一些不足之处。自体 and 同种异体干细胞移植治疗均已有致瘤报道,例如干细胞移植后致皮肤恶性肿瘤、胃癌、成骨肉瘤等<sup>[2]</sup>。并且 BMSCs 还可促进宿主体内原有肿瘤的生长<sup>[3]</sup>。另外,BMSCs 体外移植后能否继续保持未分化状态、是否能起到长期的作用效果还需要进一步探索。因此,BMSCs 治疗创口愈合的临床应用还有待进一步评估。

#### 参 考 文 献:

- [1] LEE S H, ZAHOOR M, HWANG J K, et al. Valproic acid induces cutaneous wound healing in vivo and enhances keratinocyte motility[J]. PLoS One, 2012, 7(11): DOI: 10.1371/journal.pone.0048791.
- [2] MENDOCA R J, COUTINHO-NETTO J. Cellular aspects of wound healing[J]. An Bras Dermatol, 2009, 84(3): 257-262.
- [3] 祝旭龙, 颜谭, 姚维杰, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞的分离与培养方法优化[J]. 南方医科大学学报, 2014, 34(11): 1621-1626.
- [4] MA K, LIAO S, HE L, et al. Effects of nanofiber/stem cell composite on wound healing in acute full-thickness skin wounds[J]. Tissue Eng Part A, 2011, 17(9/10): 1413-1424.
- [5] WU Y, CHEN L, SCOTT P G, et al. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis[J]. Stem Cells, 2007, 25(10): 2648-2659.
- [6] HOCKING A M, GIBRAN N S. Mesenchymal stem cells:paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair [J]. Exp Cell Res, 2010, 316(14): 2213-2219.
- [7] BARANIAK P R, MCDEVITT D C. Stem cell paracrine actions and tissue regeneration[J]. Regen Med, 2010, 5(1): 121-143.
- [8] IGOTA S, TOSA M, MURAKAMI M, et al. Identification and characterization of Wnt signaling pathway in keloid pathogenesis[J]. Int J Med Sci, 2013, 10(4): 344-354.
- [9] HLUBEK F, BRABLETZ T, BUDCZIES J, et al. Heterogeneous expression of Wnt/beta-catenin target genes with in colorectal cancer[J]. Int J Cancer, 2007, 121(9): 1941-1948.
- [10] MANOLAGAS S C, ALMEIDA M. Gone with the Wnts: beta-eatenin, T-cell factor, forkhead box O, and oxidative stress in age-dependent diseases of bone, lipid, and glucose metabolism[J]. MolEndocrinol, 2007, 21(11): 2605-2615.
- [11] KATOH M, KATOH M. WNT signaling pathway and stem cell signaling network[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(14): 4042-4045.
- [12] HERBERTS C A, KWA M S, HERMSEN H P. Risk factors in the development of stem cell therapy[J]. J Transl Med, 2011, 9: 29.
- [13] LAZENNEC G, JORGENSEN C. Concise review:adult multipotent stromal cells and cancer: risk or benefit [J]. Stem Cells, 2008, 26(6): 1387-1394.

(童颖丹 编辑)