

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.04.004

胎盘间充质干细胞治疗小鼠烫伤愈合的相关研究*

吕润潇¹ 程绍航² Abdul Razaq Hirman² 许静² 杜莉莉^{3△}

(1 中国医科大学附属盛京医院康复科 辽宁 沈阳 110134; 2 中国医科大学附属盛京医院皮肤科 辽宁 沈阳 110134;

3 中国医科大学基础医学院病理生理教研室 辽宁 沈阳 110122)

摘要 目的: 观察胎盘间充质干细胞对 TGF- β 1/Smad 信号通路的调控作用, 探讨胎盘间充质干细胞对烫伤愈合及瘢痕形成的影响。**方法:** 构建小鼠烫伤模型, 注射人胎盘间充质干细胞(hPMSCs), 荧光显微镜观察小鼠创伤皮肤组织中 hPMSCs 细胞的存活情况; HE 和 Masson 染色观察小鼠创伤皮肤的变化; Western blot 检测观察创伤皮肤 TGF- β 1、p-Smad3、Smad7、 α -SMA、collagen I、Collagen III 蛋白表达变化。**结果:** 注射 hPMSCs 细胞后, 小鼠创伤面积逐渐减小, 创伤愈合率逐渐增加; hPMSCs 细胞分布在小鼠创伤皮肤组织中, 存活状况较好。进一步研究发现烫伤模型组皮肤表层细胞受损脱落, 真皮层组织疏松, 毛囊、皮脂腺等附属器坏死, 可见明显的毛细血管扩张, 并伴有炎性细胞渗出, 同时可见大量的成纤维细胞增生和胶原纤维形成; 注射 hPMSCs 细胞治疗后, 病理改变、纤维增生和胶原形成明显减轻; 此外, 烫伤模型组创伤皮肤组织中 TGF- β 1、p-Smad3 表达明显上调, Smad7 蛋白表达明显下调, α -SMA、collagen I、Collagen III 表达明显上调。经 hPMSCs 细胞治疗后, TGF- β 1、p-Smad3 蛋白表达明显下调, Smad7 蛋白表达明显上调, α -SMA、collagen I、Collagen III 蛋白表达明显下调。**结论:** 胎盘间充质干细胞可能通过抑制 TGF- β 1/Smad 信号通路, 发挥促进烫伤愈合且抑制瘢痕形成的作用。

关键词: 胎盘间充质干细胞; 烫伤愈合; 瘢痕形成; TGF- β 1/Smad 信号通路

中图分类号: R-33; R644 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2021)04-618-07

The Effect of Placental Mesenchymal Stem Cells on Scald Healing in Mice*

LV Run-xiao¹, CHENG Shao-hang², Abdul Razaq Hirman², XU Jing², DU Li-li^{3△}

(1 Rehabilitation department, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning, 110134, China;

2 Dermatological department, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning, 110134, China;

3 Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Science, China Medical University, Shenyang, Liaoning, 110122, China)

ABSTRACT Objective: To observe the regulation of placental mesenchymal stem cells on TGF- β 1/Smad signaling pathway, and to explore the effect of placental mesenchymal stem cells on scald healing and scar formation. **Methods:** We constructed mouse scald model and injected hPMSCs cells into the scald mice. The survival of hPMSCs in the wounded skin tissues of mice was observed by fluorescence microscopy and the changes of wounded skin in mice by HE and Mason staining, meanwhile the expression of TGF- β 1, p-Smad3, Smad7, α -SMA, collagen I and Collagen III protein in wounded skin was detected by Western blot. **Results:** The wound area of mice was decreased gradually, and the wound healing rate was increased gradually after injected into hPMSCs; The distribution of hPMSCs in the wounded skin tissue of mice was observed under fluorescence microscope, and the survival condition was better; Further research found that skin surface cells were damaged and exfoliated, dermal tissue was loose, hair follicles, sebaceous glands and other appendages were necrotic, and obvious telangiectasis was observed, accompanied by inflammatory cell exudation and a large number of fibroblast proliferation and collagen fibers were observed in the scald model group. After injection of hPMSCs, pathological changes, Fibrous proliferation and collagen formation were significantly alleviated; the expressions of TGF- β 1 and p-Smad3 was significantly higher, the expression of Smad7 protein was significantly lower, meanwhile the expressions of proteins α -SMA, collagen I and Collagen III were significantly increased in scald model group; while the expressions of TGF- β 1 and p-Smad3 was significantly lower and the expression of Smad7 protein was significantly higher and α -SMA, collagen I and Collagen III were significantly decreased after injection of hPMSCs. **Conclusion:** Placental mesenchymal stem cells may promote scald healing and inhibit scar formation by inhibiting TGF- β 1/Smad signaling pathway.

Key words: Placental mesenchymal stem cells; Scald healing; Scar formation; TGF- β 1/Smad signaling pathway

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R644 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)04-618-07

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81601696)

作者简介: 吕润潇(1989-), 男, 博士研究生, 研究方向: 康复医学, E-mail: moon0345@126.com

△ 通讯作者: 杜莉莉(1979-), 女, 博士研究生, 研究方向: 干细胞与损伤修复, E-mail: lilidu_2019@126.com

(收稿日期: 2020-07-28 接受日期: 2020-08-23)

前言

伤口愈合是由多种因素介导的伤口重组再生,保持皮肤完整性的复杂而动态的生物学过程^[1]。目前不愈合伤口及慢性伤口普遍增加,伤口愈合成为一个重要的公共健康问题。伤口创面可能出现在任何烧伤、烫伤等事故中,而烫伤所致的病理性瘢痕的形成是临床上面临的重要难题之一。病理性瘢痕带来的不仅是外观的变形,而且很大程度上是严重的瘢痕,可引起增生性痉挛、脱发等皮肤功能障碍^[2,3]。间充质干细胞具有分化成多种细胞的潜能,有利于伤口的修复,采用间充质干细胞治疗急性和慢性伤口利于创面加速闭合,增加创面上皮化,并提高再生强度^[4-8]。胎盘间充质干细胞(PMSCs)为间充质干细胞的一种,具有抗炎、抗癌、抗纤维化和免疫耐受的功能^[9,10],可促进血管生成^[11]、骨愈合^[12,13]及软骨修复^[14],并对胎儿脊柱裂具有一定的治疗作用^[15]。有报道指出胎盘间充质干细胞可促进小鼠皮肤烫伤愈合^[16,17],同时有效抑制瘢痕的形成^[18,19],但其相关机制还不是十分清楚。本实验通过构建小鼠烫伤模型,将 CM-Dil 标记的人胎盘间充质干细胞(hPMSCs)经皮内注射到小鼠烫伤部位,观察 hPMSCs 细胞对 TGF- β 1/Smad 信号通路的调控作用,探讨胎盘间充质干细胞对烫伤愈合及瘢痕形成的影响,为胎盘间充质干细胞治疗烫伤伤口的机制研究提供进一步依据。

1 材料与方法

1.1 材料

清洁级健康雄性 C57BL/6 小鼠(体重 20-22 g)购自辽宁长生生物股份有限公司;胎牛血清购自美国 Gibco 公司;低糖 DMEM 培养基购自 Biological Industries(BI)公司;CM-Dil 荧光染料购自上海翊圣生物科技有限公司;苏木精购自中国索莱宝公司;曙红 Y 购自上海生工生物公司、酸性品红购自国药公司;全蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒、TGF- β 1 抗体、Smad7 抗体、 α -SMA 抗体、collagen I 抗体、Collagen III 抗体、内参抗体 β -actin 及羊抗兔 IgG-HRP 抗体均购自沈阳万类生物科技有限公司;p-Smad3 抗体购自北京博奥森生物技术有限公司;PVDF 膜购自美国 Millipore 公司;CD90-FITC、CD105-PE、CD45-FITC、HLA-DR-PE 抗体均购自美国 eBioscience 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 人胎盘间充质干细胞(hPMSCs)提取 采用组织培养法提取分离人胎盘间充质干细胞^[6],经产妇同意,无菌条件下取足月健康剖宫产新生儿胎盘组织,分离胎盘绒毛膜面 1~2 cm 厚的组织,剪成 5 mm $\times$ 5 mm $\times$ 5 mm 的组织块,并将组织块移致培养皿中,加入含 10%胎牛血清和 1%青/链霉素的低糖培养基在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,7-10 天进行换液,弃去未贴壁的细胞继续培养至 2-3 周。

1.2.2 hPMSCs 细胞的鉴定 hPMSCs 细胞生长至密度为 90%左右,用 0.25%胰酶消化细胞后,按 1:2 进行传代,继续于培养箱中培养,培养至 P3 代时,消化细胞,调整细胞浓度为 5 $\times$ 10⁵/mL,分别加入 CD90-FITC、CD105-PE、CD45-FITC、HLA-DR-PE 抗体,4℃孵育 30 min,PBS 洗 2 次,进行流式细胞仪上机检测。

1.2.3 hPMSCs 细胞培养与 CM-Dil 标记 人胎盘间充质干细胞(hPMSCs)用含 10%胎牛血清的低糖 DMEM 培养基于

37℃、5% CO₂ 的培养箱内培养。细胞生长至密度为 90%左右,加入浓度为 2 μ M CM-Dil 进行细胞标记,将标记的细胞置于 37℃、5% CO₂ 培养箱内静置孵育 5 min,再于 4℃冰箱内孵育 15 min,消化离心,PBS 重悬细胞用于动物注射。

1.2.4 小鼠烫伤模型建立 20-22 g 雄性 C57BL/6 小鼠,用 1%戊巴比妥钠(80 mg/kg)腹腔注射麻醉后,背部皮肤进行脱毛,然后用 80℃的水在脱毛处烫伤 10 s,用烫伤模板在背部制造大约为 2 $\times$ 3 cm 的烫伤区。

1.2.5 hPMSCs 细胞注射 实验分为对照组、模型组、hPMSCs 组 3 组,每组 3 只小鼠。模型组和 hPMSCs 组小鼠建立烫伤模型,hPMSCs 组将 60 μ L 含 0.7 $\times$ 10⁶ 个细胞的 PBS 经皮内注射到小鼠烫伤周围的 4 个位点中,其余组基于等剂量的 PBS,每周测量创伤大小并计算愈合率,3 周后处死小鼠。

1.2.6 荧光显微镜观察小鼠创伤皮肤组织中 hPMSCs 细胞存活情况 在小鼠创面皮肤中心区域切取全层皮肤标本,然后制作冰冻切片,荧光显微镜下观察荧光信号。

1.2.7 HE 染色观察小鼠创伤皮肤的变化 小鼠处死后,取小鼠创伤皮肤组织固定于 10%中性甲醛溶液中。石蜡包埋切片,脱蜡至水,苏木素染色 5 min,蒸馏水中浸泡 5 min,1%盐酸酒精分化 3 s,自来水流水冲 20 min,蒸馏水中浸泡 2 min,伊红染色 3 min,脱水、透明、封片,于 200 $\times$ 显微镜下观察染色效果。

1.2.8 Masson 染色观察小鼠创伤皮肤的变化 小鼠处死后,取小鼠创伤皮肤组织固定于 10%中性甲醛溶液中。石蜡包埋切片,脱蜡至水,苏木素染色 6 min,充分水洗后 1%盐酸酒精分化 3 s,自来水流水冲 20 min,蒸馏水中浸泡 2 min,酸性品红染色 1 min,0.2%冰醋酸水溶液浸洗片刻,滴加 1%磷钼酸水溶液分化 5 min,用苯胺蓝复染 5 min,脱水、透明、封片,于 200 $\times$ 显微镜下观察染色效果。

1.2.9 Western Blot 检测 TGF- β 1、p-Smad3、Smad7、 α -SMA、collagen I、Collagen III 蛋白表达 RIPA 裂解法提取样本总蛋白,采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒对蛋白进行定量,取 40 μ g 蛋白上样,行 SDS-PAGE 并转印至 PVDF 膜,经 5%(M/V)脱脂奶粉封闭 1 h 后,放入一抗 TGF- β 1 (1:500)、p-Smad3 (1:1000)、Smad7 (1:500)、 α -SMA (1:500)、collagen I (1:500)、Collagen III (1:500)、 β -actin (1:1000)工作液中 4℃过夜孵育,TBST 缓冲液清洗 PVDF 膜,放入二抗羊抗小鼠 IgG-HRP (1:5000)工作液中 37℃孵育 45 min,ECL 底物发光,采用凝胶图象处理系统(Gel-Pro-Analyzer 软件)分析目标条带光密度值。

1.2.10 统计学方法 采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析,两组间比较采用独立样本 T 检验, $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 hPMSCs 细胞提取和鉴定

采用组织培养法从胎盘绒毛组织中分离胎盘间充质干细胞,成功分离胎盘间充质干细胞,组织分离培养 12 天时细胞(图 1A)以及 P3 代细胞见(图 1B);通过流式细胞术对间充质干细胞细胞表面标记抗原 CD90 和 CD105 及造血细胞表面抗原 CD45 和 HLA-DR-PE 进行检测,结果显示分离的 hPMSCs 细胞表面标记抗原 CD90 和 CD105 呈阳性,CD45 和 HLA-DR-PE 呈阴性,表明分离的 hPMSCs 具有间充质干细胞的特性,不具有造血细胞特性(见图 2)。

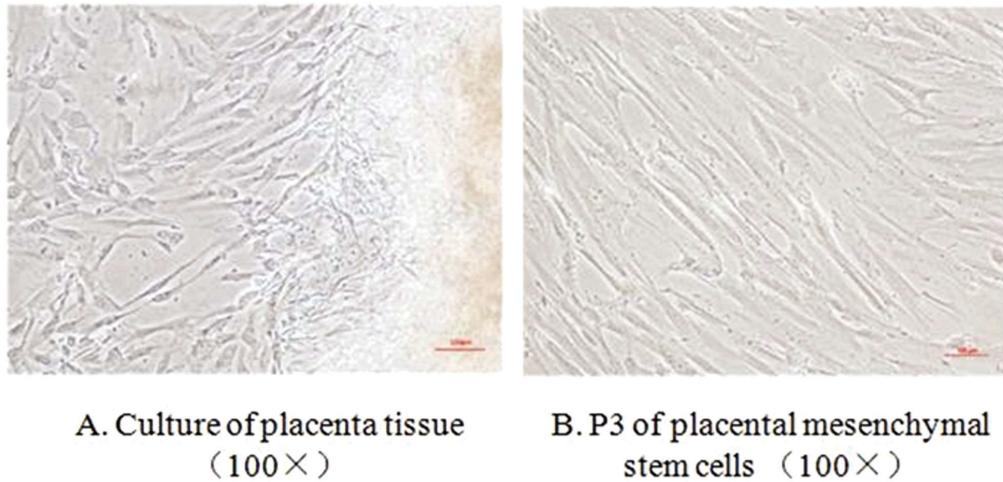


图1 胎盘间充质干细胞的提取和传代

Fig.1 Extraction and passage of placental mesenchymal stem cells

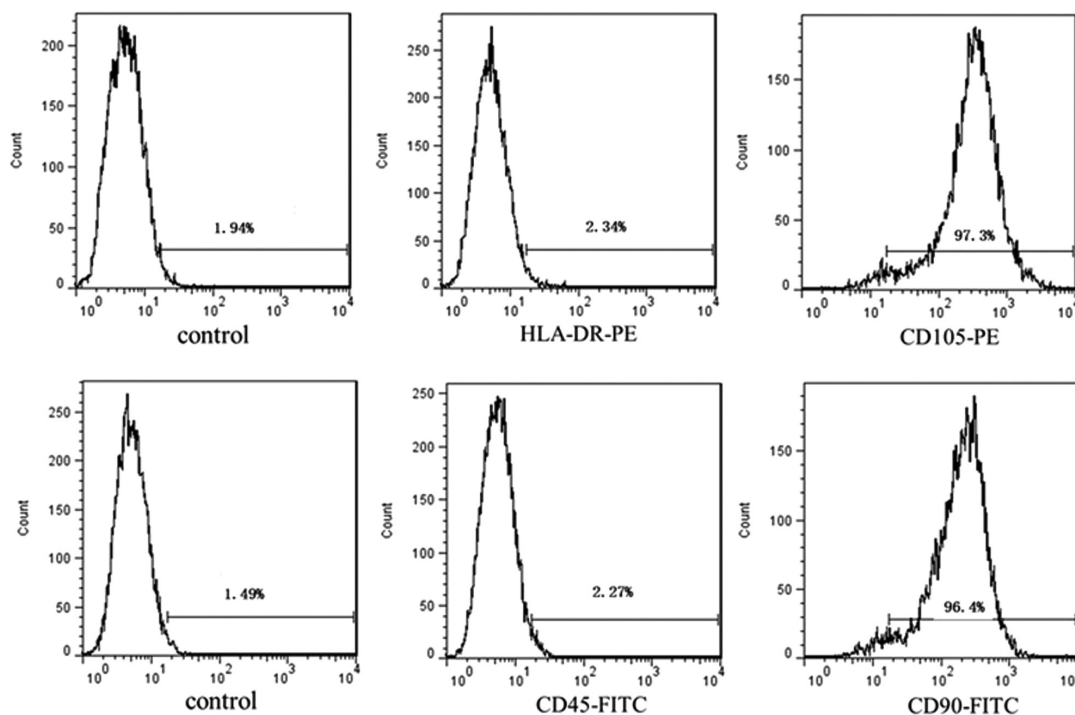


图2 胎盘间充质干细胞流式细胞术检测

Fig.2 Detection of placental mesenchymal stem cells by flow cytometry

2.2 人胎盘间充质干细胞(hPMSCs)对烫伤模型小鼠创伤愈合的影响

建立小鼠烫伤模型,将hPMSC细胞经皮内注射到小鼠烫伤周围的4个位点中,每周测量创伤大小,测量3周并计算愈合率。实验结果显示:hPMSC细胞治疗组与烫伤模型组相比,在7天时创伤面积有所减小,14天时小鼠创伤面积逐渐减小,具有极显著性差异($P<0.01$),21天时,创伤面积继续减小($P<0.05$), (见图3A);hPMSC细胞治疗组与烫伤模型组相比,在7天时创伤愈合率有所增加,14天时创伤愈合率显著增加($P<0.01$),21天时愈合率继续增加($P<0.05$), (见图3B)。表明hPMSC细胞可促进烫伤模型小鼠创伤的愈合。

2.3 小鼠创伤皮肤组织中CM-Dil标记的hPMSCs细胞存活情况

注射hPMSCs细胞21d时,取小鼠创面皮肤中心区域全

层皮肤标本,制作冰冻切片,荧光显微镜下观察荧光信号。结果显示注射hPMSCs细胞21d时hPMSCs细胞分布在创伤皮肤组织中,存活状况较好。(见图4,红色荧光代表CM-Dil标记的hPMSCs细胞)。

2.4 HE和Masson染色检测小鼠创伤皮肤的变化

注射hPMSCs细胞21d时取小鼠创伤皮肤组织,HE和Masson染色观察创伤皮肤病理变化,HE染色结果显示:对照组皮肤各层结构正常无明显病理改变,烫伤模型组皮肤表层细胞受损脱落,真皮层组织疏松,毛囊、皮脂腺等附属器坏死,并可见明显的毛细血管扩张,并伴有炎性细胞渗出,注射hPMSCs治疗后,病理改变明显减轻(见图5);Masson染色结果显示:模型组在真皮层可见大量的成纤维细胞增生和胶原纤维形成,经注射hPMSCs治疗后,纤维增生和胶原形成明显减轻(见图6)。

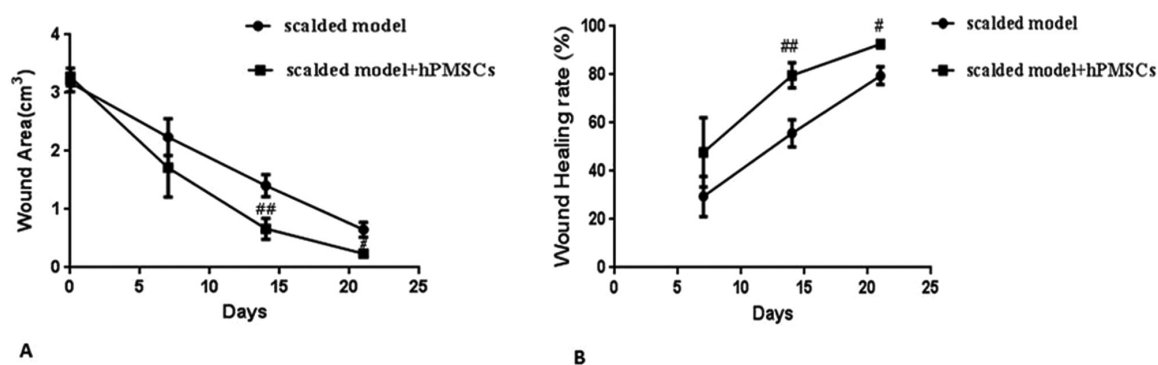


图3 hPMSCs对烫伤模型小鼠创伤愈合的影响

Fig.3 The effect of hPMSCs on wound healing in scald model mice

注:图3A为0-21 d小鼠创伤面积变化,图3B为7-21天小鼠创伤愈合率变化,

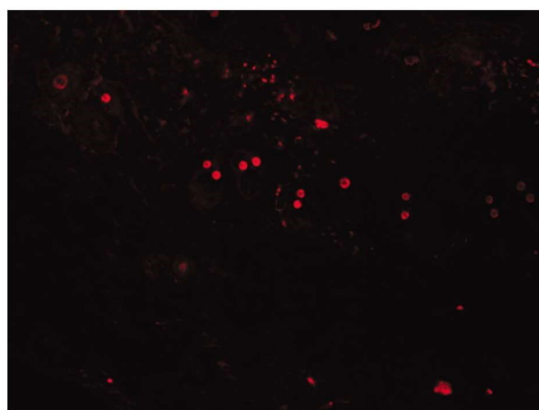
##表示与烫伤模型(scalded model)组比较, $P < 0.01$, #表示与烫伤模型(scalded model)组比较, $P < 0.05$ Note: Fig.3A the changes of wound area from 0 to 21 day in mice; Fig.3B the changes of wound healing rate from 0 to 21 day in mice, ## $P < 0.01$ versus scalded model group, # $P < 0.05$ versus scalded model group.

图4 CM-Dil 标记的 hPMSCs 细胞的分布

Fig.4 The distribution of CM-Dil-labeled PMSCs

2.5 hPMSCs 细胞对 TGF- β 1/Smad 信号通路相关蛋白表达的影响

注射 hPMSCs 细胞 21 d 时,取小鼠创伤皮肤组织,Western blot 检测创伤皮肤组织中 TGF- β 1/Smad 信号通路相关蛋白 TGF- β 1、p-Smad3、Smad7 的表达,实验结果显示:烫伤模型组创伤皮肤组织中 TGF- β 1、p-Smad3 蛋白表达与对照组相比显著上调($P < 0.01$),Smad7 蛋白表达显著下调($P < 0.01$),hPMSCs 细胞治疗组与烫伤模型组相比 TGF- β 1、p-Smad3 蛋白表达显著下调($P < 0.01$),Smad7 蛋白表达显著上调($P < 0.01$)(见图 7)。

2.6 hPMSCs 细胞对瘢痕形成相关蛋白表达的影响

注射 hPMSCs 细胞 21 d 时,取小鼠创伤皮肤组织,Western blot 检测创伤皮肤组织中瘢痕形成相关蛋白 α -SMA、collagen I、Collagen III 的表达,实验结果显示:烫伤模型组创伤皮肤组织中 α -SMA、collagen I、Collagen III 蛋白表达与对照组相比显著上调($P < 0.01$),hPMSCs 细胞治疗组与烫伤模型组相比 α -SMA、collagen I、Collagen III 蛋白表达显著下调($P < 0.01$)(见图 8)。

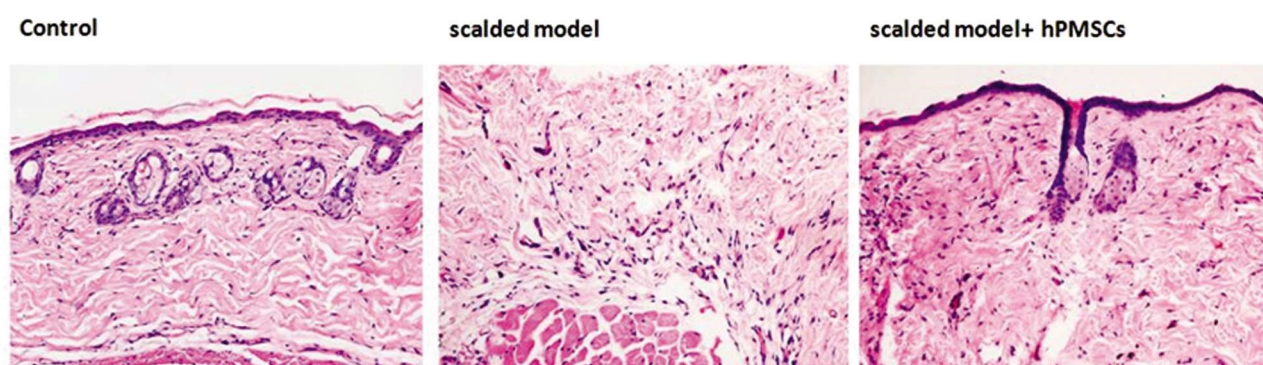


图5 HE 染色检测小鼠创伤皮肤的变化

Fig.5 The changes of wounded skin in mice were detected by HE assay

3 讨论

间充质干细胞(MSCs)可迁移至损伤部位并分化分成多种类型的细胞^[20],Kato 等^[21]报道指出骨髓间充质干细胞在移植 2 周后可分布在疤痕组织周围。本实验通过将 CM-Dil 标记的 hPMSCs 细胞经皮内注射到小鼠烫伤皮肤周围,注射 21 d 后,

取小鼠创面皮肤中心区域全层皮肤标本,制作冰冻切片,荧光显微镜下观察发现 hPMSCs 细胞分布在创伤皮肤组织周围,存活状况较好,与 Kato 等报道的骨髓间充质干细胞在疤痕组织中的分布基本一致;Wang 等^[17]研究表明胎盘间充质干细胞可促进糖尿病小鼠皮肤伤口愈合,Du 等^[18]研究指出胎盘间充质干细胞可促进小鼠皮肤烫伤愈合。本实验将 hPMSC 细胞经皮

内注射到小鼠烫伤周围 4 个位点中, 每周测量创伤大小, 测量 3 周并计算愈合率, 通过 HE 和 Masson 染色检测小鼠创伤皮肤的变化, 结果发现 hPMSCs 细胞治疗烫伤小鼠创伤愈合面

积显著减小, 创伤愈合率显著增加, 创伤组织部位炎性细胞减少, 纤维化细胞明显减轻, 表明 hPMSCs 细胞可促进小鼠皮肤伤口愈合, 与前人研究结果基本一致。

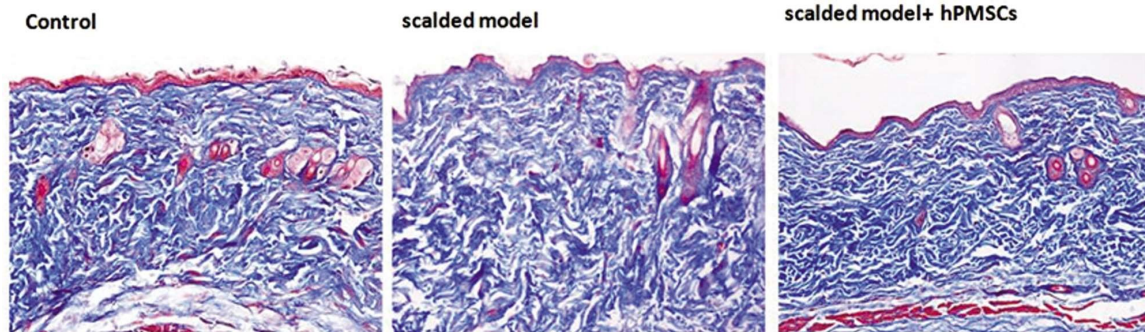


图 6 Masson 染色检测小鼠创伤皮肤的变化

Fig.6 The changes of wounded skin in mice were detected by Masson assay

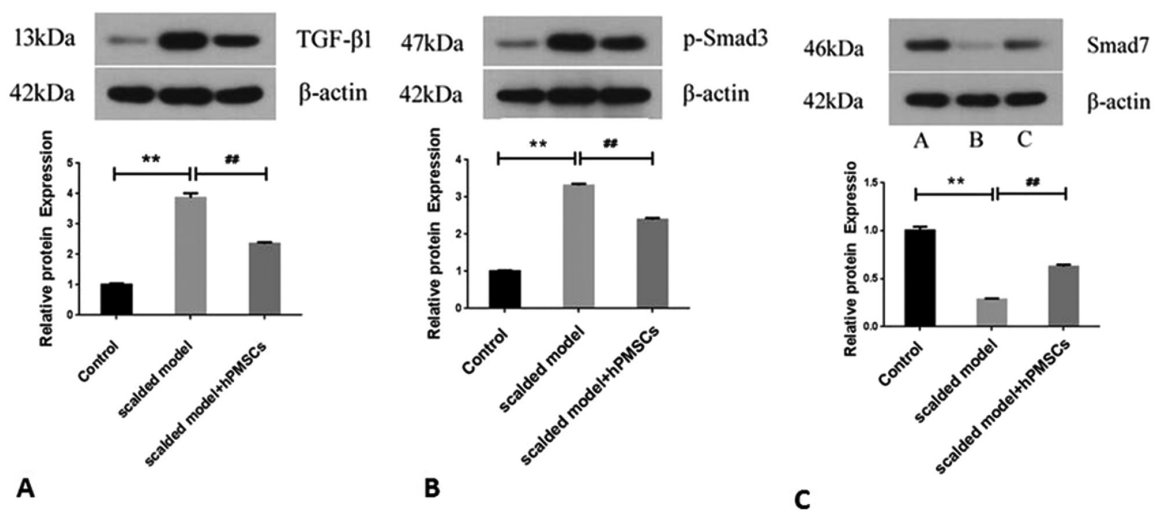


图 7 TGF-β1、p-Smad3、Smad7 蛋白表达变化

Fig.7 The changes of expression of TGF-beta 1, p-Smad3 and Smad7 proteins

注: 图 7A 为 TGF-β1 蛋白表达变化, 图 7B 为 p-Smad3 蛋白表达变化, 图 7C 为 Smad7 蛋白表达变化, ** 表示与对照 (control) 组比较, $P < 0.01$; # 表示与烫伤模型 (scalded model) 组比较, $P < 0.01$

Note: Fig.7A the changes of expression of TGF-β1 protein, Fig.7B the changes of expression of p-Smad3 protein, Fig.7C the changes of expression of Smad7 protein, ** $P < 0.01$ versus control group, # $P < 0.01$ versus scalded model group.

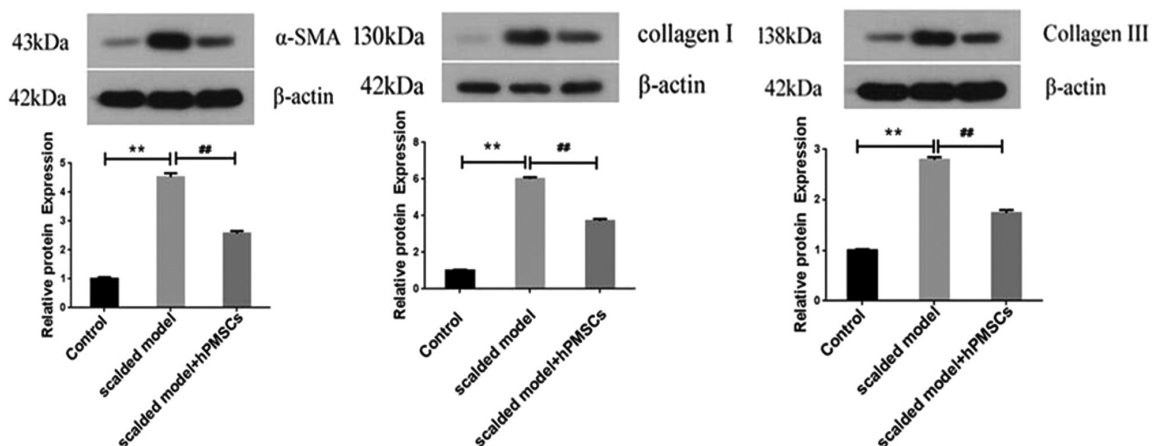


图 8 α-SMA、collagen I、Collagen III 蛋白表达变化

Fig.8 The changes of expression of α-SMA, collagen I and Collagen III proteins

注: 图 8A 为 α-SMA 蛋白的表达, 图 8B 为 collagen I 蛋白表达, 图 8C 为 Collagen III 蛋白表达, ** 表示与对照 (control) 组比较, $P < 0.01$; # 表示与烫伤模型 (scalded model) 组比较, $P < 0.01$

Note: Fig.8A the changes of expression of α-SMA protein, Fig.8B the changes of expression of collagen I protein, Fig.8C the changes of expression of Collagen III protein, ** $P < 0.01$ versus control group, # $P < 0.01$ versus scalded model group.

瘢痕的形成与成纤维细胞对 TGF- β 1 的敏感性密切相关^[22], TGF- β 1 是瘢痕形成的关键效应因子^[23], 抑制 TGF- β 1 的表达可降低成纤维细胞增殖, 抑制胶原蛋白分泌, 有助于改善增生性瘢痕的形成^[24]。Smad3 是 TGF- β 1 重要的信号分子, TGF- β 1 与 TGF- β 1 受体结合激活引发 Smad2/3 磷酸化, 激活 Smad2/3, 活化的 Smad2/3 与 Smad4 结合形成复合体转移到细胞核中进而调节靶基因的表达^[25]; 在 TGF- β 1 信号传导通路中 Smad6/7 通过与 Smad2/3 竞争结合受体 I 以及干扰 Smad2/3 和 Smad4 的结合来抑制 TGF- β 1 信号的传导^[26]。Smad3 参与胶原的合成和收缩, 并在瘢痕中表达显著升高^[26]。有报道指出, Smad 相互作用蛋白 1 (Smad interacting protein 1, SIP1) 可通过抑制 TGF- β 1/Smad 信号通路抑制瘢痕的形成^[27]; 内源性肽 LYENRL 通过抑制 TGF- β 1/Smad 通路来抑制肥大瘢痕源成纤维细胞的激活^[28], 可见 TGF- β 1/Smad 信号通路在瘢痕形成的过程中起关键作用; 同时研究表明, 骨髓间充质干细胞可通过抑制 TGF- β 1 的表达, 改善博来霉素诱导的皮肤纤维化的形成过程^[29]; 自体脂肪源性间充质干细胞可能通过下调 TGF- β 1 与胶原蛋白的表达, 发挥抑制兔耳增生性瘢痕的形成^[30]。肌成纤维细胞在伤口愈合和疤痕形成中发挥重要作用^[31,32]。皮肤损伤过程中, 皮肤成纤维细胞向肌成纤维细胞转变, 肌动蛋白 α -SMA 表达及收缩能力增强^[33]。Hu 等^[34]研究发现胎盘间充质干细胞分泌的外泌体通过抑制 TGF- β 1/Smad 信号通路抑制皮肤成纤维细胞向肌成纤维细胞分化, 提示胎盘间充质干细胞分泌的外泌体可通过调控 TGF- β 1/Smad 信号通路抑制瘢痕形成, 加速创口愈合。为了明确胎盘间充质干细胞对 TGF- β 1/Smad 信号通路的调控作用, 我们通过 Western blot 检测创伤皮肤组织中 TGF- β 1/Smad 信号通路相关蛋白 TGF- β 1、p-Smad3、Smad7 的表达, 结果显示在烫伤小鼠中 TGF- β 1 和 p-Smad3 表达显著上调, Smad7 表达显著下调, 而在人胎盘间充质干细胞治疗小鼠中 TGF- β 1 和 p-Smad3 表达显著下调, Smad7 表达显著上调, 表明烫伤可诱导 TGF- β 1 和 p-Smad3 的高表达, p-Smad3 的高表达可抑制 Smad7 表达进而激活 TGF- β 1/Smad 信号通路, 而人胎盘间充质干细胞可抑制烫伤诱导的 TGF- β 1/Smad 信号通路的激活; 为了明确胎盘间充质干细胞对烫伤瘢痕形成的影响, 我们通过 Western blot 检测创伤皮肤组织中瘢痕形成相关蛋白 α -SMA、collagen I、Collagen III 的表达, 结果表明烫伤可引起 α -SMA、collagen I、Collagen II 的高表达, 促进瘢痕的形成, 而人胎盘间充质干细胞治疗可抑制烫伤引起的 α -SMA、collagen I、Collagen III 的高表达, 抑制瘢痕的形成。

综上所述, 我们推测人胎盘间充质干细胞可能通过抑制 TGF- β 1/Smad 信号通路, 发挥促进烫伤愈合且抑制瘢痕形成的作用。本研究为胎盘间充质干细胞治疗小鼠烫伤伤口相关机制的研究奠定了基础, 对于开发新的有效的靶点治疗药物也具有十分重要的理论和实际意义。

参考文献(References)

- [1] Kirker KR, James GA. In vitro studies evaluating the effects of biofilms on wound-healing cells: a review[J]. APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica, 2017, 125 (4): 344-352
- [2] Sheikholslam M, Mee W, Jeschke MG, et al. Biomaterials for Skin Substitutes[J]. Advanced Healthcare Materials, 2018, 7(5)
- [3] Xu HL, Chen PP, Wang LF, et al. Skin-permeable liposome improved stability and permeability of bFGF against skin of mice with deep second degree scald to promote hair follicle neogenesis through inhibition of scar formation [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2018, 172: 573-585
- [4] Sheng W, Feng Z, Song Q, et al. Modulation of mesenchymal stem cells with miR-375 to improve their therapeutic outcome during scar formation [J]. American journal of translational research, 2016, 8(5): 2079-2087
- [5] Zahorec P, Koller J, Danisovic L, et al. Mesenchymal stem cells for chronic wounds therapy [J]. Cell and Tissue Banking, 2014, 16(1): 19-26
- [6] Lee DE, Ayoub N, Agrawal DK. Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: novel methods to increase cell delivery and therapeutic efficacy[J]. Stem Cell Res Ther, 2016, 7: 37
- [7] Feng JW, Mineda K, Wu SH, et al. An injectable non-cross-linked hyaluronic-acid gel containing therapeutic spheroids of human adipose-derived stem cells[J]. Sci Rep, 2017, 7: 1548
- [8] Jackson WM, Nesti LJ, Tuan RS. Mesenchymal stem cell therapy for attenuation of scar formation during wound healing [J]. Stem cell research & therapy, 2012, 3(3): 20
- [9] Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, et al. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells[J]. Stem Cells, 2008, 26: 300-311
- [10] Silini A, Parolini O, Huppertz B, et al. Soluble factors of amnion-derived cells in treatment of inflammatory and fibrotic pathologies[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2013, 8: 6-14
- [11] Mathew SA, Naik C, Cahill PA, et al. Placental mesenchymal stromal cells as an alternative tool for therapeutic angiogenesis [J]. Cell. Mol. Life Sci., 2020, 77: 253-265
- [12] González-Gil, Ana B., Lamo-Espinosa, et al. Periosteum-derived mesenchymal progenitor cells in engineered implants promote fracture healing in a critical-size defect rat model [J]. J Tissue Eng Regen Med, 2019, 13: 742-752
- [13] Jin J, Wang J, Huang J, et al. Transplantation of human placenta-derived mesenchymal stem cells in a silk fibroin/hydroxyapatite scaffold improves bone repair in rabbits [J]. J. Biosci. Bioeng., 2014, 118: 593-598
- [14] Sun Jk, Luo ZL, WG, et al. Notch ligand Jagged1 promotes mesenchymal stromal cell-based cartilage repair [J]. Exp. Mol. Med., 2018, 50: 126
- [15] Feng C, D Graham C, Connors JP, et al. A comparison between placental and amniotic mesenchymal stem cells for transamniotic stem cell therapy (TRASCET) in experimental spina bifida [J]. J. Pediatr. Surg., 2016, 51: 1010-1013
- [16] Ertl J, Pichlsberger M, Tuca AC, et al. Comparative study of regenerative effects of mesenchymal stem cells derived from placental amnion, chorion and umbilical cord on dermal wounds [J]. Placenta, 2018, 65: 37-46
- [17] Wang HF, Chen LY, Liu Y, et al. Implantation of placenta-derived mesenchymal stem cells accelerates murine dermal wound closure

- through immunomodulation[J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8: 4912-4921
- [18] Du L, Lv R, Yang X, et al. Hypoxia enhances the protective effects of placenta-derived mesenchymal stem cells against scar formation through hypoxia-inducible factor-1 α [J]. *Biotechnology letters*, 2016, 38(6): 931-939
- [19] Du LL, Lv RX, Yang XY, et al. Hypoxic conditioned medium of placenta-derived mesenchymal stem cells protects against scar formation [J]. *Life Sci.*, 2016, 149: 51-57
- [20] Nuschke A. Activity of mesenchymal stem cells in therapies for chronic skin wound healing[J]. *Organogenesis*, 2014, 10(1): 29-37
- [21] Kato J, Kamiya H, Himeno T, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate impaired wound healing through enhancing keratinocyte functions in diabetic foot ulcerations on the plantar skin of rats[J]. *Journal of diabetes and its complications*, 2014, 28(5): 588-595
- [22] Bettinger DA, Yager DR, Diegelmann RF, et al. The effect of TGF- β on keloid fibroblast proliferation and collagen synthesis[J]. *Plastic and reconstructive surgery*, 1996, 98(5): 827-833
- [23] Hsu M, Peled ZM, Chin GS, et al. Ontogeny of expression of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), TGF- β 3, and TGF- β receptors I and II in fetal rat fibroblasts and skin [J]. *Plastic and reconstructive surgery*, 2001, 107(7): 1787-94
- [24] 毋巨龙, 李荟元, 李世荣. TGF- β 1 对增生性瘢痕成纤维细胞中 c-myc 和 c-fos 表达及胶原分泌的影响 [J]. *第三军医大学学报*, 2002, 24(5): 594-596
- [25] Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF- β : the master regulator of fibrosis[J]. *Nature reviews Nephrology*, 2016, 12(6): 325-338
- [26] 但洋. shRNA-Smad3 对瘢痕疙瘩成纤维细胞的影响[D]. 重庆医科大学, 2009
- [27] Fang XB, Hu XL, Zheng Z, et al. Smad interacting protein 1 influences transforming growth factor- β /Smad signaling in extracellular matrix protein production and hypertrophic scar formation [J]. *J Mol Histol*, 2019, 50: 503-514
- [28] Ji XJ, Tang Z, Shuai WW, et al. Endogenous peptide LYENRL prevents the activation of hypertrophic scar-derived fibroblasts by inhibiting the TGF- β 1/Smad pathway[J]. *Life Sci.*, 2019, 231: 116674
- [29] Wu Y, Huang S, Enhe J, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell attenuates skin fibrosis development in mice[J]. *International wound journal*, 2014, 11(6): 701-710
- [30] 陈璐, 王达利, 魏在荣, 等. 自体脂肪源性间充质干细胞局部移植对兔耳增生性瘢痕形成的影响 [J]. *中华烧伤杂志*, 2016, 32(10): 582-587
- [31] Lebonvallet N, Laverdet B, Misery L, et al. New insights into the roles of myofibroblasts and innervation during skin healing and innovative therapies to improve scar innervation [J]. *Exp Dermatol*, 2018, 27(9): 950-958
- [32] Liu JQ, Wang YC, Pan Q, et al. Wnt/ β -catenin Pathway Forms a Negative Feedback Loop During TGF- β 1 Induced Human Normal Skin Fibroblast-To-Myofibroblast Transition [J]. *Dermatol Sci*, 2012, 65(1): 38-49
- [33] Sasaki N, Itakura Y, Toyoda M. Sialylation regulates myofibroblast differentiation of human skin fibroblasts [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8: 81
- [34] Hu J, Chen YW, Huang YB, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes suppress dermal fibroblasts-myofibroblasts transition via inhibiting the TGF- β 1/Smad 2/3 signaling pathway[J]. *Exp. Mol. Pathol.*, 2020, 115: 104468

(上接第 644 页)

- [16] Fernandez S P, Muzerelle A, Scotto-Lomassese S, et al. Constitutive and acquired serotonin deficiency alters memory and hippocampal synaptic plasticity [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2017, 42 (2): 512-523
- [17] Kutlu M G, Gould T J. Nicotinic modulation of hippocampal cell signaling and associated effects on learning and memory [J]. *Physiology & behavior*, 2016, 155: 162-171
- [18] Jiang Y, Yang S, Tao J, et al. Opposing needling promotes behavior recovery and exerts neuroprotection via the cAMP/PKA/CREB signal transduction pathway in transient MCAO rats[J]. *Molecular medicine reports*, 2016, 13(3): 2060-2070
- [19] Moyano S, Del Rfo J, Frechilla D. Role of hippocampal CaMKII in serotonin 5-HT 1A receptor-mediated learning deficit in rats[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2004, 29(12): 2216-2224
- [20] Yang Y, Takeuchi K, Rodenas-Ruano A, et al. Developmental switch in requirement for PKA RII β in NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity at Schaffer collateral to CA1 pyramidal cell synapses [J]. *Neuropharmacology*, 2009, 56(1): 56-65
- [21] Sanderson J L, Gorski J A, Dell'Acqua M L. NMDA receptor-dependent LTD requires transient synaptic incorporation of Ca²⁺-permeable AMPARs mediated by AKAP150-anchored PKA and calcineurin[J]. *Neuron*, 2016, 89(5): 1000-1015