

皮肤外伤愈合中的基因修饰干细胞疗法

陈瑞¹ 杨晓农^{1*} 朱子凤² 文娟¹ 荣茂伶¹ 翟禹涵¹ 曾婉秋¹

(¹西南民族大学生命科学与技术学院, 成都 610041; ²西南民族大学校医院, 成都 610041)

摘要 皮肤外伤愈合的过程会受到多种因素的影响, 导致伤口难以愈合。许多皮肤外伤治疗新技术的研究取得了较大进展, 如重组生长因子、生物工程皮肤、干细胞生物学等。基因修饰干细胞疗法是干细胞和基因重组疗法的结合, 其中干细胞有治疗和基因传递载体两种作用, 已经成为最有吸引力的组织再生策略, 该文对此进行了综述。

关键词 基因修饰干细胞; 外伤愈合; 干细胞疗法; 基因疗法

Genetically Modified Stem Cells Therapy for Cutaneous Wound Healing

Chen Rui¹, Yang Xiaonong^{1*}, Zhu Zifeng², Wen Juan¹, Rong Maoling¹,

Zhai Yuhan¹, Zeng Wanqiu¹

(¹College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China;

²The Hospital of Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China)

Abstract Affected by many factors, some cutaneous wounds are difficult to heal. Significant progress has been achieved in researches on many new techniques for cutaneous wound treatment, such as recombinant growth factor, bioengineering skin and stem cells biology. Genetically modified stem cells therapy is a good combination of gene and stem cells therapy, in which the stem cells can play the role as both a therapy and a vehicle for gene delivery, and this method represents the most attractive technique for histo-regeneration strategy for wound therapy. This paper reviewed the recent progress in this field.

Key words genetically modified stem cells; wound healing; stem cells therapy; gene therapy

外伤愈合是一个高度进化过程, 缺失和受损组织的替换会受到多种因素的影响, 伤口不能充分愈合形成疤痕或难愈伤口, 严重影响患者的生活质量。防止伤口感染、坏死和形成慢性难愈伤口的最好办法是加速伤口的愈合。随着人们对伤口修复和再生机制的认识进一步加深, 生物因子成为目前伤口愈合研究的重点。然而生物因子种类繁多, 不同的细胞因子及其受体的表达具有时相性。基因疗法中使用的单个生长因子不能满足伤口愈合的所有需要, 也不能控制慢性伤口的复杂性。基因修饰干细胞是

基因疗法和干细胞疗法的结合, 也许是未来治疗伤口的一个重要方法。干细胞的生长潜能和多能性使得他们不只作为治疗物, 还可以作为向损伤部位传递基因的载体^[1]。本文就近年基因修饰干细胞疗法研究中采用的干细胞和转染载体, 以及其在皮肤外伤愈合中的应用作一综述。

1 干细胞

干细胞是促进组织修复的理想方法。它的特征自我更新和不对称复制^[2]。应用于受损部位的

收稿日期: 2014-02-13 接受日期: 2014-05-09

西南民族大学研究生创新型科研项目(批准号: CX2014SZ99)资助的课题

*通讯作者。Tel: 028-85522867, E-mail: yangxn058@163.com

Received: February 13, 2014 Accepted: May 9, 2014

This work was supported by the Postgraduate Innovation Programs of Southwest University for Nationalities (Grant No.CX2014SZ99)

*Corresponding author. Tel: +86-28-85522867, E-mail: yangxn058@163.com

网络出版时间: 2014-08-20 16:12 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.09.0040.html>

干细胞能分化为多种新组织直接改善伤口, 还可以通过旁分泌途径, 促进其他类型的细胞向伤口的移动^[3]。

1.1 胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESC)

ESC是细胞疗法和再生医学中最有吸引力的干细胞来源之一。ESC来自于内细胞团, 能形成三个胚层, 在培养许多代后仍可以保持多能性^[4]。但ESC的分化是很难控制的, 有在体内形成肿瘤和畸胎瘤的可能。其次, 多代培养后染色体的稳定性很难维持^[5]。再次, 体外完成的实验转移到体内也有挑战性, 体内阻断ESC发展的环境依然不清楚。另外, 伦理问题也给ESC研究带来很大障碍。分离ESC需要破坏胚胎, 这个过程遭到政府、宗教和社会团体的反对。

1.2 诱导多功能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS)

Takahashi和Yamanaka^[6]用四种反转录因子(c-Myc、Klf4、Oct4和Sox2)构建了一种使成熟体细胞转化成多功能细胞的新技术, 得到的细胞称为诱导多功能干细胞。体细胞可以从病人体内分离、重编程成iPS细胞, 再用到同一个病人身上, 可以避免免疫系统和伦理争论^[7]。输血是重要的细胞疗法, 血液来源的安全性和充足性一直备受关注。用病人自己的iPS细胞生成的红细胞和血小板有望解决血液免疫排斥、污染、来源短缺等问题^[8]。Duan等^[9]第一次用iPS和釉质衍生物获得新生牙龈韧带, 为牙龈组织再生提供了一个新方法。但iPS技术也有许多限制。iPS技术转化效率非常低, 估计在0.01%~10%^[10]。重编程过程使用了修饰病毒, 这会造成关于临床使用这些细胞的安全性问题的猜测。iPS细胞分化发育能力低于ESC, 植入iPS细胞的很多胚胎都在中途停止发育^[11]。

1.3 成人干细胞

1.3.1 骨髓衍生间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMMSCs) BMMSCs具有强大的可塑性, 来源广泛, 可以分化为多种类型^[12]。伤口微环境吸引BMMSCs, 局部炎症和氧分压通过产生低氧环境诱导BMMSCs的快速增殖, 通过加速上皮形成促进伤口闭合和血管再生, 从而促进伤口愈合^[13]。Falanga等^[14]成功利用一种纤维蛋白聚合物喷剂将培养的BMMSCs喷于伤口, 加快了人和老鼠严重伤口和难愈伤口修复的速率。

1.3.2 脂肪衍生干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs) ADSCs由中胚层分化发育而来, 可以辅助脂肪移植对软组织进行修复^[15], 不但具有多向分化潜能, 而且易获取、再生能力强。但ADSCs还没有被证明能永久生长, 它显示许多“老化”信号。另外, 脂肪组织会随新陈代谢而变化, 它的扩增和分化能力取决于组织的部位、患者的年龄和性别^[16]。

1.3.3 表皮干细胞(epidermal stem cells, EpiSCs)

EpiSCs可分化形成全层表皮, 在皮肤的外伤修复、新陈代谢等方面发挥着重要作用^[17]。表皮是多层的, 它需要经常分化移动替代死亡或受损细胞。这个过程包括多种类型的干细胞, 每一种干细胞定位在一个特殊的表皮区域, 有益于保持皮肤离散部分的稳定^[18]。EpiSCs具有良好的自我更新能力和多能性, 是构建组织工程化皮肤良好的种子细胞, 一般保持稳定, 没有分化趋势。一旦机体损伤, 它们就会表现出增强的、持续的自我更新能力。

2 载体

2.1 病毒载体

2.1.1 慢病毒载体(lentivirus vector) 慢病毒可以高效、同时转载基因进入大量细胞, 宿主范围广, 能有效转染分裂和非分裂细胞。张金池等^[19]用慢病毒载体携带碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)基因修饰BMMSCs, 用以观察其在体外向血管内皮样细胞分化的能力。结果实验组表达更多的bFGF, BMMSCs在VEGF的诱导下能够更有效地向血管内皮细胞样细胞分化。

2.1.2 腺病毒载体(adenoviral vector, Ad) 腺病毒容易浓缩到高的滴度, 可达到 10^{11} , 转染效率高, 不依赖于细胞分裂。哈小琴等^[20]将腺病毒介导的肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)修饰BMMSCs, 应用于糖尿病Wistar大鼠背部皮肤创面, 加速了创面的愈合。另外, Ad-HGF修饰的BMMSCs还被用于研究对大鼠急性放射性皮肤损伤的影响, 同样获得了良好的治疗效果^[21]。Ad的主要缺点是病毒蛋白的细胞毒性和寄主细胞对腺病毒蛋白的炎症反应。炎症反应会导致病毒复制受限制和转导细胞的死亡。

2.1.3 腺病毒相关病毒载体(adenovirus-associated virus vector, AAV) AAV颗粒的物理化学性质稳定, 可以转载分化和未分化细胞, 它将野毒整合进染色体

上,可长期表达目的蛋白,减少原癌基因意外活化的可能性。AAV载体只能转染4.7 Kb以下的片段,并且制作过程繁琐,容易受到野生型腺病毒的污染,包装细胞产生的病毒滴度较低。AAV的转染机理不像慢病毒那样明确,通常插入宿主染色体的转染基因会产生串联重复。另外,AAV还会引起炎症反应^[22]。

2.1.4 单纯疱疹病毒载体(herpes simplex virus vector, HSV) HSV插入外源基因的长度可达到40~50 Kb,是目前容量最大的病毒,能获得很高的滴度,对神经元有特异的亲和力^[22]。然而,HSV转染时会对细胞产生较大的毒性。Soland等^[23]用巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)的US2基因修饰基质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs),首次证明US2基因过度表达会降低免疫系统对细胞的识别能力,使其存活率提高约59%。

病毒载体转染效率高,插入病毒基因组的外来基因可以快速转录,是临床试验的主要载体。其他常用的病毒有痘苗病毒、EB病毒、甲病毒等。但病毒载体仍然有许多问题,如病毒载体目的基因插入长度受限,病毒包装周期长、花费大,转染效率不稳定,有感染的风险等。许多使用病毒载体的临床试验因为副作用而中断^[24]。相反,越来越多的研究表明,使用非病毒转染系统是基因更好的转染方法。

2.2 非病毒载体

2.2.1 阳离子脂质体载体 阳离子脂质体(cationic liposome)是有阳性电荷的合成囊泡,可以和大片段的负电DNA形成正电的松散混合物(lipoplex),防止DNA在伤口环境中降解。Lipoplex以内吞、胞饮、噬菌吞噬作用进入细胞,在胞浆的低pH(5.0~6.5)环境中释放DNA。Hilal等^[25]用阳离子脂质体转染CXCR4基因到造血干细胞(hematopoietic stem/progenitor cell, HSPC)效率达到20%。最近的一项研究中用脂质体转染microRNA145到MSCs,使MSCs可以逃脱免疫系统的监控^[26]。脂质体介导的基因转移毒性和免疫原性都很低,具有很高的特异性,能介导多种大分子,脂质体也可以被其他分子修饰。脂质体介导的基因修饰干细胞仍保持它们的多向分化能力^[27]。但脂质体的转染效率较低,静脉注射容易在肺部聚积^[28]。通过病毒与非病毒载体的结合,研究者开发出了一种新的基因转染载体——膜融合脂质体,一种用病毒包膜融合蛋白修饰的脂质体。由于膜融合脂质体在酸性和中性条件下会发生融合作

用,与细胞表面融合能提高转染效率。

2.2.2 阳离子聚合物 阳离子多聚物可以和DNA结合形成复合物(polyplex),是高效的转染制剂。第一代阳性多聚物转染效率相对较低,第二代可以作为质子海绵调节核内体降解,如聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)、聚酰胺树形高分子(polyamidoamine, PAMAM)等。

PEI是高电荷密度的有机大分子,是基因疗法的有效载体,用于体内外传递寡核苷酸和质粒。它有许多优点,如DNA保护、细胞绑定和摄取、核内体逃逸和载体释放等。Peng等^[29]设计了一个高效率的ESC 3D转染系统:β-环糊精连聚乙烯亚胺(CYD-PEI)。转染7 d后,3D转染系统与2D培养基相比获得了更长时间、更高水平的VEGF表达。TESCs的局部应用显著促进了皮肤的再上皮化。真皮基质的合成和毛囊的再生有瘢痕抑制作用。高分子量PEI是高效率传递DNA所必需的,然而高分子量的PEI不能降解,有一定毒性。PEI和具有生物适应性、低毒的载体(如β-环糊精、聚乙二醇和壳聚糖)结合在一起,细胞毒性显著下降到0%~60%,而未被修饰的PEI是85%~100%。这些结合物的转染效率也有所增加^[30]。

PAMAM是由中心向外对称发散并高度分支的球形结构,结构规整。高密度的正电荷表面有利于和DNA形成复合物。它们转染细胞的效率取决于大小、形状和聚合物表面伯胺基的数量。PAMAM没有免疫原性,临床应用主要考虑毒性。Paul等^[31]发明了一种新的干细胞基因传递系统,可以过量表达VEGF,系统中使用了重组杆状病毒和Bac-PAMAM修饰的ADSCs。

2.2.3 易降解高分子聚合物 PEI等这些大分子材料不能降解,在体内有自然堆积的风险。多种阳离子聚合物与细胞膜相互作用,导致细胞质蛋白、膜电势丧失。临床上更需要可降解、低毒、不在细胞内聚集的基因传递多聚物。同时,多聚物的降解还可以作为在细胞质中释放质粒DNA的方法。易降解高分子材料包括壳聚糖、明胶、聚乳酸、聚己内酯、聚乙丙交酯、阳离子多糖、硫酸鱼精蛋白等。

精胺淀粉(spermine-pullulan, SP)是一种阳离子多糖,可以和负电荷的质粒DNA相互作用减小体积,通过MSCs表面的糖特异去唾液酸蛋白反应器(sugar-specific-asialo-protein receptor)进入MSCs,提

高质粒DNA的表达水平^[32-33]。SP和质粒DNA混合物基因转染时细胞毒性低,对MSCs高度特异。基因修饰MSCs显示了更好的细胞生存能力。Ishikawa等^[34]用SP和HGF质粒DNA混合物转染的MSCs可以连续7 d以上表达HGF,有促进肝细胞产生白蛋白的活性。Nakamura等^[33]用SP和SDF-1质粒DNA混合物基因修饰MSCs,使其分泌有生物活性的SDF-1,促进MSCs和真皮纤维的迁移。当治疗皮肤外伤时,大量的基因修饰MSCs停留在伤口,促进伤口愈合。SP这种通过受体介导内吞作用促进MSCs基因表达的能力有广阔的组织再生应用前景。

非病毒载体有制备简单、价格低、无免疫原性等优点,但许多缺点限制它的应用,如转染效率低、具有一定的细胞毒性等^[35]。目前相关研究的重点是实现靶向传递并提高转染效率,降低细胞毒性。

3 基因修饰干细胞与皮肤外伤愈合

基于干细胞的基因传递主要包括三步:(1)干细胞分离和体外培养;(2)治疗基因引入干细胞,采用的方法与基因转染的方法类似;(3)将基因修饰干细胞移植回患者体内。

基因传递很大程度上依赖于一个安全有效的基因传递系统。病毒载体仍然是临床上用于基因转染的主要载体。Li等^[36]用Ad携带人*KGF*基因转染ESC,刺激ESC的生长和细胞分化。Li等^[37]使用Ad载体*Ang1*基因修饰BMMSCs,并观察其促进鼠皮肤外伤愈合的效率。结果显示,*Ang1*-BMMSCs促进血管化,增加上皮和真皮再生,显著促进伤口愈合。CXCR4是SDF-1的受体,陈伟等^[38]用慢病毒介导CXCR4基因转染BMMSCs,过表达的CXCR4可明显提高BMMSCs对划痕损伤修复的能力和向高浓度SDF-1迁移的能力。最近,一种微囊化技术被应用于UMSCs的*VEGF*基因转染^[39]。播种脐带基质干细胞(umbilical cord mesenchymal stromal cells, UM-SCs)衍生成纤维细胞的ADM复合支架上构建组织工程皮肤(tissue-engineered dermis, TED)。微囊化VEGF-UMSCs和TED移植到猪皮肤缺损模型上,有效改善了TED血管化和外伤修复的质量。MSCs能迁移到受伤的组织,促进创伤愈合。但MSCs也像其他细胞一样,容易被身体的免疫系统攻击杀死。经过基因修饰的MSCs可以逃脱免疫系统的监控^[23,26]。Nauta等^[40]用可降解多聚酯[poly(β -amino) esters,

PBAE]转染*VEGF*基因修饰ADSCs,在小鼠皮肤伤口真皮有更多胶原沉积和成熟胶原纤维,显著促进了愈合效率。原癌基因*v-myc*也被用于修饰ADSCs^[41]。*v-myc*-ADSCs活性增殖时间更久,迁移和血管发生能力得到促进,VEGF分泌量增加。为了使细胞治疗的潜力达到最大化,输送的干细胞能否最大限度地到达损伤部位是至关重要的。3D支架可以使干细胞集中于受伤部位,避免注射引起的器官分布,是基因传递和细胞移植结合的最新方法。与2D培养皿相比,它可以为细胞的接触传播提供更大的扩增、吸附表面积和在多种转染细胞中持续释放目的基因的更好环境^[42-44]。Cucchiari等^[45]用AAV介导*FGF-2*修饰MSCs,并在一个体外3D环境中培养观察rAAV-*hFGF-2*对MSCs迁移能力的影响。与对照组相比,实验组*FGF-2*的表达量增加,表达时间延长,MSCs迁移能力增加。

4 基因修饰干细胞疗法的应用前景

越来越多的研究表明,基因修饰干细胞比单独应用其他生物因子具有更优秀的特点。但是,实现基因修饰干细胞的临床应用,仍有许多的问题需要解决。主要包括以下内容:(1)阐明各种基因在创面愈合中的真正角色,寻找皮肤外伤愈合中真正有治疗作用的目的基因。(2)患者干细胞治疗的适用性。基于不同的外伤病理学筛选最合适的干细胞类型和使用策略。尽管MSCs可以帮助愈合伤口恢复拉力,但倾向于形成瘢痕疙瘩的病人应避免在伤口使用BMMSCs^[46]。(3)研究出更合适的载体,精确控制基因表达。由于体内的各种屏障,如抗体、吞噬系统、酶、胞膜、核膜等,体外细胞转染到体内转染需要进一步的验证。(4)干细胞的自体移植可能有许多问题。只有少量的干细胞能被分离,为了足够的产量需要处理大量的血液或者骨髓,给患者病情带来负担。随着时间的迁移这些细胞的表型会发生改变,加重免疫反应,降低转染效率^[47]。(5)基因修饰干细胞和局部组织之间不良影响要进一步研究。伤口愈合的机理是非常复杂的,动物、人之间伤口愈合的机制有很大区别。预计用于伤口的多种治疗基因如果在非目的器官过量表达可能产生副作用,只有彻底了解组织再生的生物学机理,实现基因修饰干细胞对皮肤外伤的精细调控,才能实现它在修复医学和兽医方面的临床应用。

参考文献 (References)

- 1 Dalberto TP, Nardi NB, Camassola M. Mesenchymal stem cells as a platform for gene therapy protocols. *Sci Prog* 2010; 93(Pt 2): 129-40.
- 2 Cha J, Falanga V. Stem cells in cutaneous wound healing. *Clin Dermatol* 2007; 25(1): 73-8.
- 3 Chen L, Tredget EE, Wu PY, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One* 2008; 3(4): e1886.
- 4 Yao S, Chen S, Clark J, Hao E, Beattie GM, Hayek A, *et al.* Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(18): 6907-12.
- 5 Baker DE, Harrison NJ, Maltby E, Smith K, Moore HD, Shaw PJ, *et al.* Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis *in vivo*. *Nat Biotechnol* 2007; 25(2): 207-15.
- 6 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 663-6.
- 7 Araki R, Uda M, Hoki Y, Sunayama M, Nakamura M, Ando S, *et al.* Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells. *Nature* 2013; 494(7435): 100-4.
- 8 Smith BW, Rozelle SS, Leung A, Ubellacker J, Parks A, Nah SK, *et al.* The aryl hydrocarbon receptor directs hematopoietic cell expansion and differentiation. *Blood* 2013; 122(3): 376-85.
- 9 Duan X, Tu Q, Zhang J, Ye J, Sommer C, Mostoslavsky G, *et al.* Application of induced pluripotent stem (iPS) cells in periodontal tissue regeneration. *J Cell Physiol* 2011; 226(1): 150-7.
- 10 Yamanaka S. Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation. *Nature* 2009; 460(7251): 49-52.
- 11 Stadtfeld M, Apostolou E, Akutsu H, Fulleit P, Natesan S, Kono T, *et al.* Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. *Nature* 2010; 465(7295): 175-81.
- 12 Tang J, Xie Q, Pan G, Wang J, Wang M. Mesenchymal stem cells participate in angiogenesis and improve heart function in rat model of myocardial ischemia with reperfusion. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006; 30(2): 353-61.
- 13 Lee EY, Xia Y, Kim WS, Kim MH, Kim TH, Kim KJ, *et al.* Hypoxia-enhanced wound-healing function of adipose-derived stem cells: Increase in stem cell proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF. *Wound Repair Regen* 2009; 17(4): 540-7.
- 14 Falanga V, Iwamoto S, Chartier M, Yufit T, Butmarc J, Koultab N, *et al.* Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds. *Tissue Eng* 2007; 13(6): 1299-312.
- 15 Wu AY, Morrow DM. Autologous fat transfer with in-situ mediation (AIM): A novel and compliant method of adult mesenchymal stem cell therapy. *J Transl Med* 2013; 11(1): 136.
- 16 Tholpady SS, Lull R, Ogle RC, Rubin JP, Futrell JW, Ketz AJ. Adipose tissue: Stem cells and beyond. *Clin Plast Surg* 2006; 33(1): 55-62.
- 17 Wang Z, Coleman DJ, Bajaj G, Liang X, Ganguli-Indra G, Indra AK. RXR α ablation in epidermal keratinocytes enhances UVR-induced DNA damage, apoptosis, and proliferation of keratinocytes and melanocytes. *J Invest Dermatol* 2011; 131(1): 177-87.
- 18 Blanpain C, Fuchs E. Epidermal homeostasis: A balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10(3): 207-17.
- 19 张金池, 蔡森林, 吴佳文, 吴明祥, 郑国富, 欧阳远亮. 人碱性成纤维生长因子基因转染大鼠骨髓间充质干细胞的研究. *中华实验外科杂志* (Zhang Jinchi, Cai Senlin, Wu Jiawen, Wu Mingxiang, Zheng Guofu, Ouyang Yuanliang. Human basic fibroblast growth factor gene modified rat bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro*. *Chinese Journal of Experimental Surgery*) 2013; 30(5): 928-30.
- 20 哈小琴, 尹强, 董芳, 贾庆华, 吕同德. BMSCs联合携带干细胞生长因子的重组腺病毒促进糖尿病大鼠创面修复的研究. *中国修复重建外科杂志* (Ha Xiaoqin, Yin Qiang, Dong Fang, Jia Qinghua, Lü Tongde. Study on bone marrow mesenchymal stem cells transfected with adenovirus hepatocyte growth factor gene promoting wounds repair in diabetic rats. *Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery*) 2010; 24(12): 1520-4.
- 21 哈小琴, 张俊, 邓芝芸, 董菊子, 彭俊华, 赵勇, 等. 肝细胞生长因子基因重组腺病毒修饰间充质干细胞修复急性放射性损伤大鼠的创面. *中国组织工程研究* (Ha Xiaoqin, Zhang Jun, Deng Zhiyun, Dong Juzi, Peng Junhua, Zhao Yong, *et al.* Effects of adenovirus hepatocyte growth factor modified bone marrow mesenchymal stem cells on radioactive skin wound healing. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*) 2012; 16(49): 9226-31.
- 22 Murphy SL, Li H, Mingozzi F, Sabatino DE, Hui DJ, Edmonson SA, *et al.* Diverse IgG subclass responses to adeno-associated virus infection and vector administration. *J Med Virol* 2009; 81(1): 65-74.
- 23 Soland MA, Bego M, Colletti E, Zenjani ED, St Jeor S, Porada CD, *et al.* Mesenchymal stem cells engineered to inhibit complement-mediated damage. *PLoS One* 2013; 8(3): e60641.
- 24 Escámez MJ, Carretero M, García M, Martínez-Santamaría L, Mirones I, Duarte B, *et al.* Assessment of optimal virus-mediated growth factor gene delivery for human cutaneous wound healing enhancement. *J Invest Dermatol* 2008; 128(6): 1565-75.
- 25 Gul-Uludag H, Xu P, Marquez-Curtis LA, Xing J, Janowska-Wieczorek A, Chen J. Cationic liposome-mediated CXCR4 gene delivery into hematopoietic stem/progenitor cells: Implications for clinical transplantation and gene therapy. *Stem Cells Dev* 2012; 21(10): 1587-96.
- 26 Karlsen TA, Brinchmann JE. Liposome delivery of microRNA-145 to mesenchymal stem cells leads to immunological off-target effects mediated by RIG-I. *Mol Ther* 2013; 21(6): 1169-81.
- 27 Boura JS, Santos FD, Gimble JM, Cardoso CM, Madeira C, Cabral JM, *et al.* Direct head-to-head comparison of cationic liposome-mediated gene delivery to mesenchymal stem/stromal cells of different human sources: A comprehensive study. *Hum Gene Ther Methods* 2013; 24(1): 38-48.
- 28 Kawakami S, Ito Y, Fumoto S, Yamashita F, Hashida M. Enhanced gene expression in lung by a stabilized lipoplex using sodium chloride for complex formation. *J Gene Med* 2005; 7(12): 1526-33.
- 29 Peng LH, Wei W, Qi XT, Shan YH, Zhang FJ, Chen X, *et al.* Epidermal stem cells manipulated by pDNA-VEGF165/CYD-PEI nanoparticles loaded gelatin/ β -TCP matrix as a therapeutic

- agent and gene delivery vehicle for wound healing. *Mol Pharm* 2013; 10(8): 3090-102.
- 30 Zhao QQ, Chen JL, Lv TF, He CX, Tang GP, Liang WQ, *et al.* N/P ratio significantly influences the transfection efficiency and cytotoxicity of a polyethylenimine/chitosan/DNA complex. *Biol Pharm Bull* 2009; 32(4): 706-10.
- 31 Paul A, Shao W, Abbasi S, Shurn-Tim D, Prakash S. PAMAM dendrimer-baculovirus nanocomplex for microencapsulated adipose stem cell-gene therapy: *In vitro* and *in vivo* functional assessment. *Mol Pharm* 2012; 9(9): 2479-88.
- 32 He CX, Li N, Hu YL, Zhu XM, Li HJ, Han M, *et al.* Effective gene delivery to mesenchymal stem cells based on the reverse transfection and three-dimensional cell culture system. *Pharm Res* 2011; 28(7): 1577-90.
- 33 Nakamura Y, Ishikawa H, Kawai K, Tabata Y, Suzuki S. Enhanced wound healing by topical administration of mesenchymal stem cells transfected with stromal cell-derived factor-1. *Biomaterials* 2013; 34(37): 9393-400.
- 34 Ishikawa H, Jo JI, Tabata Y. Liver anti-fibrosis therapy with mesenchymal stem cells secreting hepatocyte growth factor. *J Biomater Sci Polym Ed* 2011.
- 35 Braeckmans K, Buyens K, Naeye B, Vercauteren D, Deschort H, Raemdonck K, *et al.* Advanced fluorescence microscopy methods illuminate the transfection pathway of nucleic acid nanoparticles. *J Control Release* 2010; 148(1): 69-74.
- 36 Li X, Liang L, Zhao P, Uchida K, Baha H, Huang H, *et al.* The effects of adenoviral transfection of the keratinocyte growth factor gene on epidermal stem cells: An *in vitro* study. *Mol Cells* 2013; 36(4): 316-21.
- 37 Li Y, Zheng L, Xu X, Song L, Li Y, Li w, *et al.* Mesenchymal stem cells modified with angiopoietin-1 gene promote wound healing. *Stem Cell Res Ther* 2013; 4(5): 113.
- 38 陈伟, 李淼, 闫志凌, 程海, 潘彬, 曾令宇, 等. 慢病毒载体介导CXCR4基因过表达对骨髓间充质干细胞生物学特性的影响. *中华血液学杂志*(Chen Wei, Li Miao, Yan Zhiling, Cheng Hai, Pan Bin, Zeng LingYu, *et al.* Effect of CXCR4 gene over-expression mediated by lentiviral vector on the biological characteristics of mesenchymal stem cells. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*) 2013; 34(5): 440-4.
- 39 Han Y, Tao R, Han Y, Sun T, Chai J, Xu G, *et al.* Microencapsulated VEGF gene-modified umbilical cord mesenchymal stromal cells promote the vascularization of tissue-engineered dermis: An experimental study. *Cytotherapy* 2014; 16(2): 160-9.
- 40 Nauta A, Seidel C, Deveza L, Montoro D, Grova M, Ko SH, *et al.* Adipose-derived stromal cells overexpressing vascular endothelial growth factor accelerate mouse excisional wound healing. *Mol Ther* 2013; 21(2): 445-55.
- 41 Song SH, Lee MO, Lee JS, Jeong HC, Kim HG, Kim WS, *et al.* Genetic modification of human adipose-derived stem cells for promoting wound healing. *J Dermatol Sci* 2012; 66(2): 98-107.
- 42 Shokrgozar MA, Fattahi M, Bonakdar S, Ragerdi Kashani I, Majidi M, Haghighipour N, *et al.* Healing potential of mesenchymal stem cells cultured on a collagen-based scaffold for skin regeneration. *Iran Biomed J* 2012; 16(2): 68-76.
- 43 Zhang J, Duan Y, Wei D, Wang L, Wang H, Gu Z, *et al.* Co-electrospun fibrous scaffold-adsorbed DNA for substrate-mediated gene delivery. *J Biomed Mater Res A* 2011; 96(1): 212-20.
- 44 Kobsa S, Kristofik NJ, Sawyer AJ, Bothwell AL, Kyriakides TR, Saltzman WM. An electrospun scaffold integrating nucleic acid delivery for treatment of full-thickness wounds. *Biomaterials* 2013; 34(15): 3891-901.
- 45 Cucchiari M, Ekici M, Schetting S, Kohn D, Madry H. Metabolic activities and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells following recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer and overexpression of fibroblast growth factor 2. *Tissue Eng Part A* 2011; 17(15/16): 1921-33.
- 46 Stoff A, Rivera AA, Sanjib Banerjee N, Moore ST, Michael Numunm T, Espinosa-de-Los-Monteros A, *et al.* Promotion of incisional wound repair by human mesenchymal stem cell transplantation. *Exp Dermatol* 2009; 18(4): 362-9.
- 47 Wu Y, Zhao RC, Tredget EE. Concise review: Bone marrow-derived stem/progenitor cells in cutaneous repair and regeneration. *Stem Cells* 2010; 28(5): 905-15.