

# 人皮肤成纤维细胞和脐带间充质干细胞 分泌蛋白差异比较研究

段婧<sup>1</sup> 王琰<sup>1</sup> 王伟<sup>1</sup> 芦现杰<sup>1</sup> 刘延明<sup>1</sup> 王晓兵<sup>2</sup> 庞保军<sup>3</sup> 韩发彬<sup>1,4\*</sup>

(<sup>1</sup>聊城市人民医院/聊城大学组织工程与再生医学研究所, 聊城 252000; <sup>2</sup>聊城市人民医院/聊城大学妇产科, 聊城 252000; <sup>3</sup>聊城市人民医院检验科, 聊城 252000; <sup>4</sup>山东大学第二医院转化医学研究所, 济南 250013)

**摘要** 该文探讨人皮肤成纤维细胞(NCF)和脐带间充质干细胞(hUC-MSCs)分泌蛋白的差异, 从而初步阐明脐带间充质干细胞分泌蛋白对于治疗退行性疾病的可能分子机理。基于串联质谱(LC-MS/MS)的方法, 收集用无血清培养基培养48 h的NCF和hUC-MSCs上清样品, 进行TMT(tandem mass tags for relative and absolute quantitation)检测, 从而对蛋白质酶解之后的肽段进行同位素标记, 之后对分泌蛋白的表达差异进行精确的鉴定和定量。通过生物信息学分析, 建立NCF和hUC-MSCs分泌蛋白谱图, 并通过GO(gene ontology)对这些分泌蛋白进行功能分析, 对于在蛋白分子互作图中处于中心位置的CCL2、COL4A1、TGF $\beta$ 1、SERPINE1、SEMA7A我们进行了Real-time PCR定量分析。通过TMT以及生物信息学分析, 该文鉴定出1 000多种共有蛋白, 其中有704种蛋白在hUC-MSCs中的表达量比NCF中高。通过Real-time PCR, 我们证实了CCL2、COL4A1在hUC-MSCs中的分泌量的确高于其在NCF中的分泌量, 且差异具有显著性。通过检索文献以及Uniprot的相应数据库数据, 该文发现, 这两种分子在炎症的消除方面起到十分重要的作用, 而炎症反应在帕金森病等退行性疾病的发生与发展过程中起到重要作用。通过对NCF和hUC-MSCs培养基中分泌的蛋白进行检测分析, 该研究为探讨脐带间充质干细胞分泌蛋白治疗神经退行性疾病的可能分子机制提供启示。

**关键词** 人皮肤成纤维细胞; 脐带间充质干细胞; TMT标记定量蛋白质组学技术; 分泌蛋白

## Comparison of Secreted Proteins between Human Skin Fibroblasts and Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells

DUAN Jing<sup>1</sup>, WANG Yan<sup>1</sup>, WANG Wei<sup>1</sup>, LU Xianjie<sup>1</sup>, LIU Yanming<sup>1</sup>, WANG Xiaobing<sup>2</sup>, PANG Baojun<sup>3</sup>, HAN Fabin<sup>1,4\*</sup>

(<sup>1</sup>The Institute for Tissue Engineering and Regenerative Medicine, the Liaocheng People's Hospital/Liaocheng University, Liaocheng 252000, China; <sup>2</sup>Gynecology and Obstetrics, the Liaocheng People's Hospital/Liaocheng University, Liaocheng 252000, China; <sup>3</sup>Clinical laboratory, the Liaocheng People's Hospital, Liaocheng 252000, China; <sup>4</sup>Institute of Translational Medicine, the Second Hospital of Shandong University, Jinan 250013, China)

**Abstract** To elucidate the probable mechanism of hUC-MSCs (umbilical cord mesenchymal stem cells) secretory proteins in the treatment of neurodegenerative diseases, this study investigated the differences in secretory proteins between NCF (human skin fibroblasts) and hUC-MSCs. Based on LC-MS/MS (tandem mass spectrom-

收稿日期: 2019-10-17 接受日期: 2020-05-27

山东省医药卫生科技发展计划(批准号: 2016WS0217)、山东省重点研发项目(批准号: 2017GSF18104)和山东省自然科学基金重大基础研究项目(批准号: ZR2019ZD39)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0635-8278427, E-mail: fhan2013@126.com

Received: October 17, 2019 Accepted: May 27, 2020

This work was supported by the Projects of Medical and the Health Technology Development Program in Shandong Province (Grant No.2016WS0217), the Major State Basic Research Development Program of Shandong (Grant No.2017GSF18104), and the Major Basic Research Projects of Natural Science Foundation of Shandong Province (Grant No.ZR2019ZD39)

\*Corresponding author. Tel: +86-635-8278427, E-mail: fhan2013@126.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5283>

etry), the supernatant samples of hUC-MSCs and NCF cultured in serum-free medium for 48 hours were collected for TMT (tandem mass tags for relative and absolute quantitation) to detect peptides after protein digestion. Isotope labeling was performed, and then the difference in expression of secretory proteins was accurately identified and quantified. The secretory proteins of NCF and hUC-MSCs were established by bioinformatics analysis, and functional analysis of these secretory proteins were performed by GO (gene ontology). Proteins at the central position were analysed by Real-time PCR, such as *CCL2*, *COL4A1*, *TGF $\beta$ 1*, *SERPINE1* and *SEMA7A*. More than 1 000 consensus proteins were identified and the corresponding functions were searched by Uniprot. And the paper confirmed that the secretion of *CCL2* and *COL4A1* in hUC-MSCs were more than the secretion in NCF. The paper find that these two molecules play an important role in the elimination of inflammation, and the inflammatory response plays an important role in the occurrence and development of degenerative diseases such as Parkinson's disease. By analyzing the proteins secreted in NCF and hUC-MSCs culture medium, this study lays the foundation for elucidating the differences in molecular mechanisms between mesenchymal stem cells and skin fibroblasts.

**Keywords** human skin fibroblasts; umbilical cord mesenchymal stem cells; tandem mass tags for relative and absolute quantitation; secretory proteins

神经退行性疾病一般包括老年痴呆症、帕金森病、脊髓侧索硬化病、脊髓肌肉萎缩症、舞蹈病等。间充质干细胞在治疗相关疾病<sup>[1-3]</sup>方面起着非常重要的作用,但具体机制还有待进一步研究和完善。

间充质干细胞(mesenchymal stem cell)<sup>[4]</sup>是一类多能干细胞,具有高度自我更新的能力以及向多种细胞分化的潜能。其中,人脐带来源间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)因其具备的综合优点受到广泛关注。研究表明,它们可以在体外和体内通过不同方式诱导分化为脂肪组织细胞、软骨组织细胞、结缔组织细胞和骨组织细胞以及神经干细胞。最近的研究表明,间充质干细胞分泌的生物活性因子对其在治疗神经退行性疾病如帕金森病、阿尔茨海默病等的过程中起到了非常重要的作用<sup>[5]</sup>。而本文研究的成纤维细胞(fibroblast, NCF)<sup>[6]</sup>取自皮肤,是真皮层主要的组成细胞,富含胶原蛋白,可以诱导分化为多能干细胞<sup>[7]</sup>。而且脐带间充质干细胞经过诱导可以分化为成纤维细胞,失去其治疗能力。TMT标记定量蛋白组学(tandem mass tags for relative and absolute quantitation)是1种多肽体外标记技术,采用10种同位素的标签,标记多肽的氨基基团,通过LC-MS/MS分析,对肽段进行精确鉴定和定量比较。本研究使用该技术分析NCF和hUC-MSCs培养基中分泌的蛋白<sup>[8]</sup>,对比2种细胞分泌蛋白质组学的差异和不同,探讨hUC-MSCs细胞治疗帕金森病等<sup>[9-10]</sup>退行性疾病的优势原因,从而为分子机理比较作铺垫<sup>[11]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

胰蛋白酶、DTT、LAM购自Promega公司;尿素购自GibcoBRL公司;EDTA、PMSF、考马斯亮蓝染料G250、过硫酸铵购自Amesco公司;丙烯酰胺、溴酚蓝、SDS、TEMED购自Sigma公司;乙醇、乙酸、甲酸购自北京化工厂;乙腈、甲醇购自Fisher Scientific公司;strata-X C18除盐柱、SCX强阳离子交换柱(型号Luna SCX250 $\times$ 4.60 mm)购自phenomenex公司。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 hUC-MSCs和NCF均为实验室原代分离培养。采集人体皮肤组织,放入含有青霉素/链霉素(penicillin & streptomycin, PS)的DMEM中洗涤1次,再用PBS洗涤2次。然后把皮下脂肪去除,再用眼科剪剪出1 mm<sup>2</sup> $\times$ 1 mm<sup>2</sup>的组织块。转入细胞培养皿中,加入MEF培养基[DMEM, 10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、1%非必需氨基酸(nonessential amino acid, NEAA)、1% L-谷氨酰胺(L-Glutamine, LG)、1%青霉素/链霉素]。培养一段时间,直到镜下检出原代成纤维细胞,然后传代冻存。与上述方法类似,我们还收集了人体脐带, PBS洗3次后切断成小块,在MSC培养基(DMEM/F12、FBS、NEAA/PS/LG)中培养7~14天。细胞爬出来后,待融合度达到90%时进行传代。

1.2.2 样品收集 实验选取P5代以内生长状态良好的对数期NCF和hUC-MSCs,在10 cm细胞培养皿中生长到大概90%汇合度,用PBS冲洗5次,然后在无

血清培养基中培养48 h,收集上清样品进行TMT分泌蛋白检测。

**1.2.3 蛋白提取** 取样品加入到10k超滤管中,14 000 ×g、4 °C离心40 min,弃废液。重复上述步骤,直至样品体积浓缩至200 μL左右。每个样品加入50 μL裂解液,超声2 min(工作2 s,间隔3 s,功率180 W)使所有蛋白溶解。超声后,20 000 ×g离心30 min,取上清。加入DTT至终浓度10 mmol/L,56 °C水浴1 h。取出后,迅速加入IAM至终浓度55 mmol/L,暗室静置1 h。使用Bradford法对蛋白进行定量。

**1.2.4 质谱检测** 将16个预分离纯化后的组分,分别上机检测。使用Q-Exactive质谱仪检测肽段信号。质谱扫描完毕,得到质谱原始文件。将质谱原始文件输入到PD(Proteome Discoverer 1.4, Thermo)软件后,软件会对质谱谱图进行筛选。PD提取后的谱图用mascot进行搜索,搜索结束后,PD软件根据mascot搜索结果和第一步筛选后的谱图进行定量分析。使用ANOVA分析对结果进行差异显著性评估。建议选取 $P < 0.05$ ,  $\text{ratio} \geq 1.2$ 或 $\text{ratio} \leq 0.83$ 的蛋白为差异蛋白。

**1.2.5 蛋白酶解** 每个样品取100 μg蛋白体积,加入到10k超滤管中,14 000 ×g、4 °C离心40 min,弃废液。加入200 μL 50% TEAB,14 000 ×g、4 °C离心40 min,弃废液。重复上述步骤2次。加入1 μg/μL的Trypsin,每100 μg蛋白质底物加入3.3 μg的酶,37 °C水浴24 h。冻干消化液,然后使用TEAB(水:TEAB=1:1)每管30 μL复溶肽段。

**1.2.6 肽段标记** 标记试剂平衡至室温。每管标记试剂中加入41 μL乙腈,涡旋1 min,离心甩至管底。将混好的标记试剂加入到肽段中,不同样品用不同大小的同位素标记。混匀后,甩至管底,室温静置1 h。加入8 μL 5%羟胺,室温静置15 min,将样品混合并进行真空冷冻干燥。

**1.2.7 HPLC预分离** 使用常规液相,强阳离子交换色谱柱(Luna SCX)。试剂及样品准备:标记后样品用A液稀释10倍,磷酸调pH至3.0,15 000 ×g离心10 min,取上清。设置分离方法。上样,按照设置好的分离梯度运行。本次预分离共收集36个组分,按照色谱图分布,将出峰较少的部分合并,最终合并成16个组分并进行后续处理。

**1.2.8 肽段的纯化** 使用C18反相色谱除盐,步骤如下:用1 mL甲醇活化柱料;然后用5%的ACN平衡;

样品用1 mL MilliQ水稀释过柱;再用1 mL 5%乙腈洗柱除盐;500 μL纯乙腈洗脱2次;然后进行真空冷冻干燥;最后用0.1%甲酸复溶纯化后肽段。

**1.2.9 CCK8法检测细胞增殖实验** 在96孔板中接种细胞悬液(100 μL/孔),将培养板放在培养箱中连续培养7天(37 °C、5% CO<sub>2</sub>)。向相应孔加入10 μL的CCK8溶液,将培养板放在培养箱内孵育1 h,用酶标仪测定在450 nm处的吸光度D值。

**1.2.10 Real-time PCR法检测** 收集NCF和hUC-MSCs细胞,Trizol法提取细胞总RNA模板,然后将RNA逆转录为cDNA。从质谱结果中选择合适的目的基因设计引物,内参为GAPDH,使用SYBR GREEN法进行Real-time PCR检测目的基因表达情况。设置3次平行实验验证结果,用GraphPad Prism(v5.0)软件作图,并进行统计分析。

**1.2.11 Western blot检测靶标蛋白** 收集细胞无血清上清液,用真空冷冻干燥机浓缩后BCA法测量蛋白含量,取等量蛋白进行15% SDS-PAGE电泳,蛋白电转移到硝酸纤维素膜上,以含5%脱脂牛奶的TBST溶液室温封闭1 h,一抗孵育4 °C过夜。TBST洗膜,用相应的辣根过氧化物酶标记的二抗常温孵育1 h, TBST洗膜后ECL显色发光检测相应条带。所有实验重复3次。

**1.2.12 统计学处理** 数据采用GraphPad Prism(v5.0)软件进行统计处理,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用t检验, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 hUC-MSCs细胞和NCF细胞的增殖和鉴定实验

选取对数期生长状态良好的hUC-MSCs细胞和NCF细胞获得细胞照片,如图1A所示。使用CCK8试剂盒进行细胞增殖实验,如图1B所示,测得第4天之后hUC-MSCs细胞增殖能力明显强于NCF细胞,具有统计学意义(t检验, $P < 0.05$ )。通过流式细胞分析发现,hUC-MSCs细胞中CD16、CD29、CD34、CD45、CD73和CD90的表达率分别为0.1%、94.0%、2.2%、2.0%、97.0%和98.7%。其中CD29、CD73和CD90是hUC-MSCs细胞的表面标记分子,表达水平较高。而CD16是单核细胞标记分子,CD34和CD45是造血干细胞的标志物,表达水平较低。NCF细胞鉴定结果见实验室之前发表的文章<sup>[7]</sup>。具体结果见图1。

## 2.2 分泌蛋白差异分析

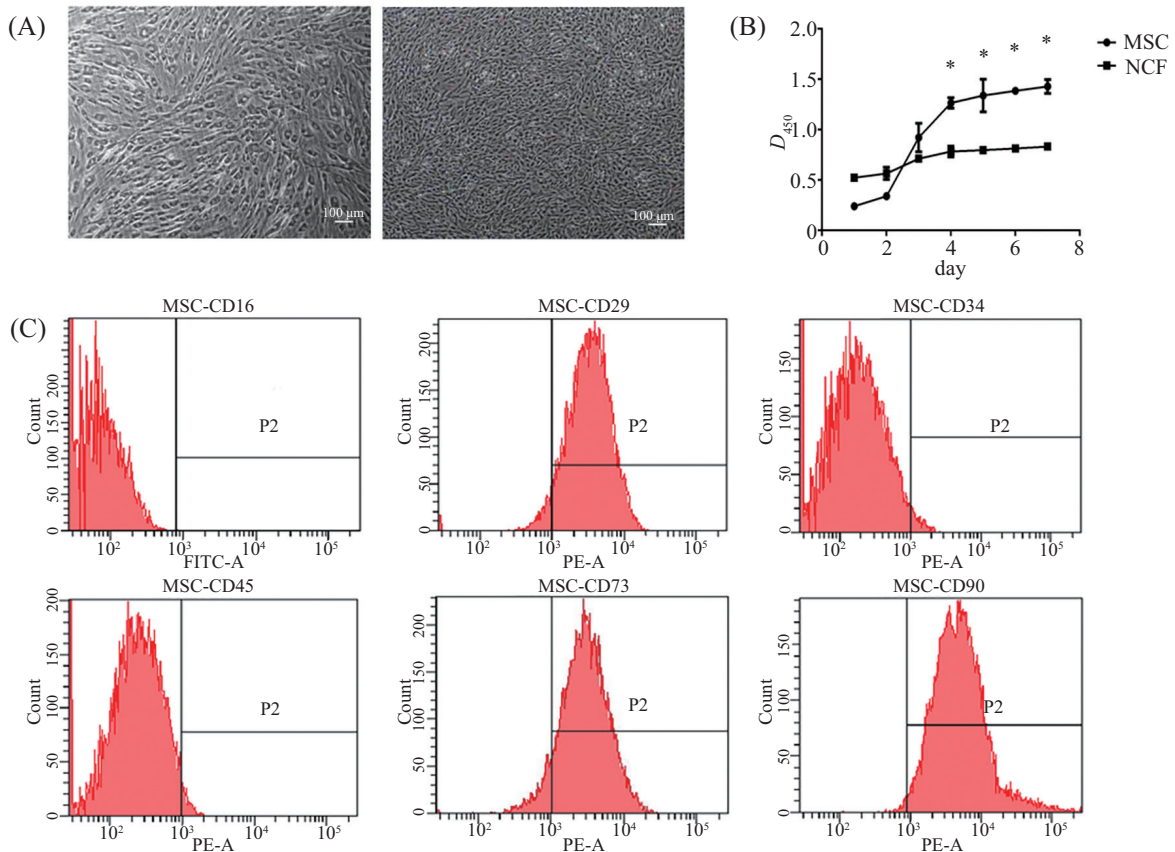
我们发现实验中2个批次的NCF之间的重复性分析相关系数 $R^2$ 为0.933(图2A); 2个批次的hUC-MSCs之间的重复性分析相关系数 $R^2$ 为0.912(图2B), 均明显大于相关性良好的标准值0.8, 因此, 我们所用作本的重复性能够达到要求。将提取后的上清蛋白用10%的SDS-PAGE分离, 肽段酶解后经HPLC-CHIP-MS/MS分析鉴定。质谱扫描完毕, 得到质谱原始文件, 质谱总离子流示意图(图2C)。将质谱原始文件输入到PD(Proteome Discoverer 1.4, thermo)软件后, 软件会对质谱谱图进行筛选。PD提取后的谱图用masscot进行搜索, 搜索结束后, PD软件根据masscot搜索结果和第一步筛选后的谱图进行定量分析。共有1 268个差异蛋白被筛选出来, 其中hUC-MSCs/NCF上调蛋白数目为704个, 下调蛋白数目为564个。使用ANOVA分析对结果进行差异显著性评估后, 选取 $P < 0.05$ ,  $ratio \geq 1.2$ 或 $ratio \leq 0.83$ 的蛋白为差

异蛋白。根据Uniprot筛选这些差异蛋白的功能。选取炎症相关的分子使用String软件作了蛋白分子互作图, 如图2D所示, 进而选取图中核心位置的关键蛋白进行下一步的实时荧光定量PCR分析, 从转录水平反应蛋白的表达差异。

通过分析hUC-MSCs和NCF分泌蛋白, 结果发现, hUC-MSCs分泌蛋白中与炎症相关的分子表达水平要高于NCF; 而与凋亡相关的分子, hUC-MSCs分泌蛋白的量低于NCF(表1), 提示hUC-MSCs分泌蛋白介导的炎症反应和细胞凋亡的抑制可能在其治疗帕金森病的过程中起到作用, 但其作用的大小与具体的分子机制还需后续的深入研究。

## 2.3 实时荧光定量PCR结果图

首先从蛋白分子互作图的核心位置筛选出几种炎症相关的因子进行Real-time PCR定量分析, 结果如图3所示。再从中选出差别较大的2种分子, 进行下一步验证, 结果如图4所示。

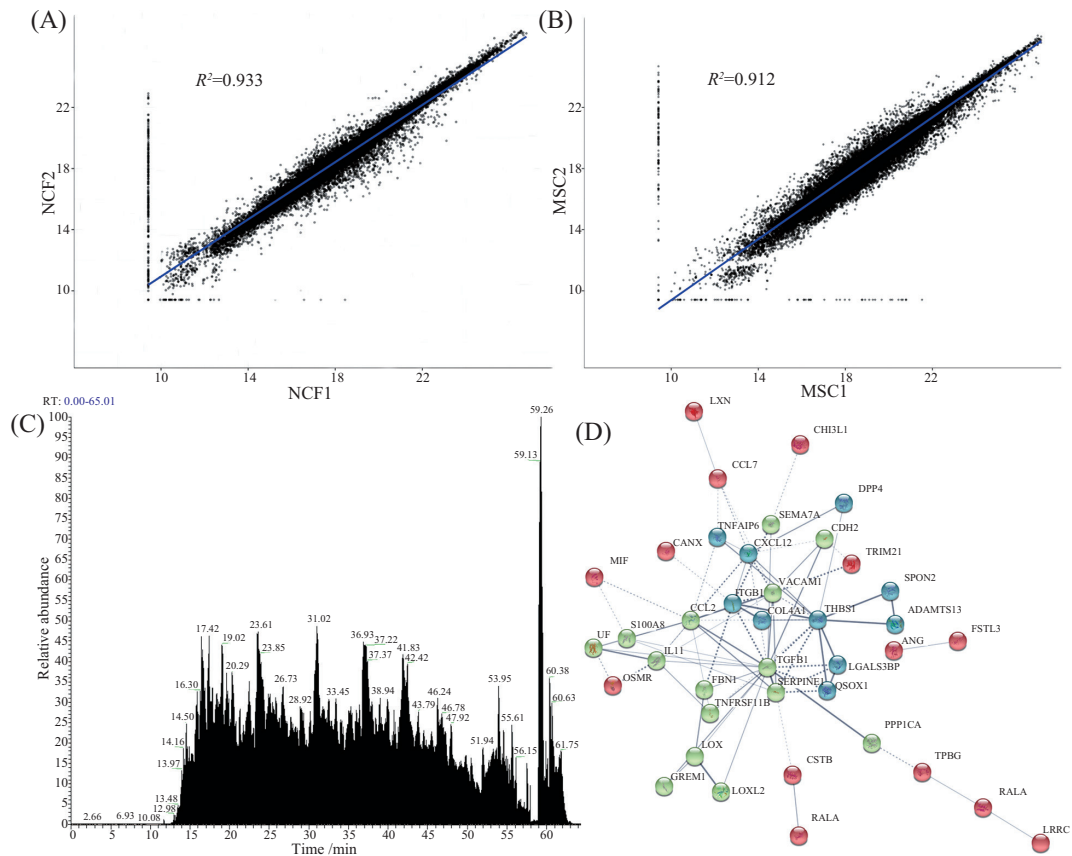


A: hUC-MSCs和NCF细胞形态图; B: CCK8检测hUC-MSCs和NCF细胞增殖活力(Student's  $t$ -test,  $*P < 0.05$ ); C: hUC-MSCs细胞的流式鉴定图。

A: cell morphology of hUC-MSCs and NCF; B: CCK8 assay detection of hUC-MSCs and NCF proliferation (Student's  $t$ -test,  $*P < 0.05$ ); C: flow cytometric identification of hUC-MSCs.

图1 hUC-MSCs细胞和NCF细胞的增殖和鉴定

Fig.1 Proliferation and identification of hUC-MSCs and NCF cells



A: NCF样本间重复性分析; B: hUC-MSCs样本间重复性分析; C: 质谱检测总离子流图; D: 蛋白分子互作图。  
 A: repeatability analysis between the two samples of NCF; B: repeatability analysis between the two samples of hUC-MSCs; C: total Ion Flow Map of Mass Spectrometric Detection; D: functional interaction network of ECM proteins that play roles in inflammation.

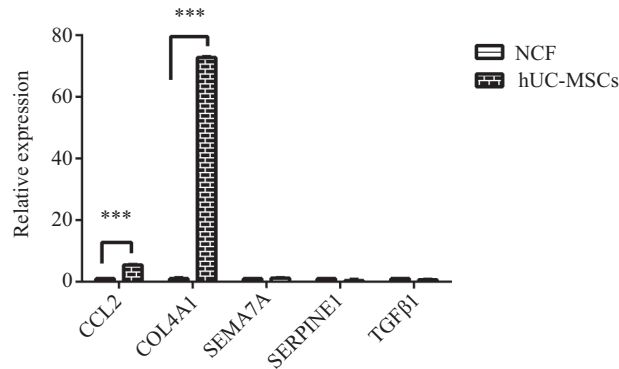
图2 分泌蛋白差异分析

Fig.2 Analysis the difference of secreted proteins

表1 hUC-MSCs和NCF分泌的与炎症和凋亡相关的蛋白列表

Table 1 Inflammation and apoptosis factors secreted by hUC-MSCs and NCF

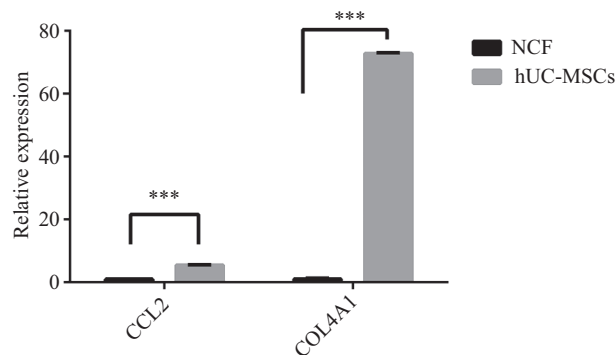
功能 Function	鉴定出的蛋白 Proteins	基因名称 Genes	Uniprot识别号 Uniprot ID	蛋白鉴定覆盖率 Coverage	P值 P value	hUC-MSCs/NCF
Inflammation	C-C motif chemokine2	<i>CCL2</i>	P13500	0.18	0.005 34	9.25
	Transforming growth factor beta-1 proprotein	<i>TGFβ1</i>	P01137	0.19	<0.000 1	3.88
	Collagen alpha-1(IV) chain	<i>COL4A1</i>	P02462	0.10	<0.000 1	3.22
	Plasminogen activator inhibitor 1	<i>SERPINE1</i>	P05121	0.56	<0.000 1	3.07
Apoptosis	C-C motif chemokine 7	<i>CCL7</i>	P80098	0.07	<0.000 1	2.02
	Semaphorin-7A	<i>SEMA7A</i>	O75326	0.19	<0.000 1	1.71
	Vascular cell adhesion protein 1	<i>VCAMI</i>	P19320	0.19	0.002 09	1.38
	Thrombospondin-1	<i>THBS1</i>	A0A024R9Q1	0.43	0.081 65	1.30
	Methylthioribulose-1-phosphate dehydratase	<i>APIP</i>	Q96GX9	0.03	<0.000 1	0.63
	Serine/threonine-protein phosphatase CPPED1	<i>CPPED1</i>	Q9BRF8	0.18	<0.000 1	0.75
	Apoptosis regulator BAX	<i>BAX</i>	Q07812	0.26	<0.000 1	0.79
	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	<i>AIFM1</i>	O95831	0.06	<0.000 1	0.80
Caspase-1	<i>CASP1</i>	H0YEC7	0.03	0.000 13	0.80	



\*\*\* $P < 0.001$ .

图3 与炎症相关因子mRNA表达水平初步筛查

Fig.3 mRNA levels of several inflammatory associated factors



\*\*\* $P < 0.001$ .

图4 *CCL2*和*COL4A1*分子实时荧光定量结果分析图

Fig.4 Real-time PCR result of *CCL2* and *COL4A1*

分析结果显示, *CCL2*和*COL4A1* 2种分子在2种细胞中的含量差异较大。这2种分子在hUC-MSCs细胞中的含量均比NCF中的高, 经过统计学分析比较,  $P < 0.001$ , 结果具有极显著性差异, 其他几种分子无显著性差异。这个过程中所使用的引物序列如表2所示。

#### 2.4 质谱结果比较

质谱结果与 Real-time PCR 结果一致, hUC-MSCs细胞中所含的*CCL2*和*COL4A1*较多。2种蛋白均为分泌蛋白, 根据鉴定到的蛋白序列进行的胞内、胞外和膜蛋白预测, 表明其只在细胞外存在。具体比对结果如表3所示。

#### 2.5 NCF和hUC-MSCs上清*CCL2*的Western blot 结果

Western blot结果表明, 在NCF样本上清中检测到*CCL2*的表达均较低, 而hUC-MSCs样本上清中检测到*CCL2*的表达水平均较高, 这表明hUC-MSCs样本上清中*CCL2*的表达水平比NCF高, 此结果与质谱和Real-time PCR的前期结果一致(图5)。

### 3 讨论

本组实验运用串联质谱的方法鉴定出1 000多种共有蛋白, 通过检索文献及相应的Uniprot数据库查找其相对应的功能。通过对NCF和hUC-MSCs<sup>[12]</sup>培养基中分泌的蛋白进行质谱<sup>[13]</sup>检测分析, 这2种细胞的分泌蛋白共有1 268个差异蛋白被筛选出来, 其中hUC-MSCs/NCF上调蛋白数目为704个, 下调蛋白数目为564个。

对于在蛋白分子互作图中处于中心位置的*CCL2*、*COL4A1*、*TGFβ1*、*SERPINE1*、*SEMA7A*我们进行了Real-time PCR验证。我们证实了*CCL2*、*COL4A1*在hUC-MSCs中分泌量的确高于NCF分泌量, 且差异具有显著性。*CCL2*是一种趋化因子, 在炎症反应中起到重要作用, 最近的研究表明, 炎症反应在阿尔茨海默病等神经退行性疾病中起到十分重要的作用。*CCL2*在阿尔茨海默病患者中可能通过募集巨噬细胞对病变处的β淀粉样蛋白进行吞噬起到缓解病情的作用<sup>[14]</sup>, 在人类神经元和星型胶质细胞共培养体系中, *CCL2*能够保护神经细胞, 使其

表2 引物序列表

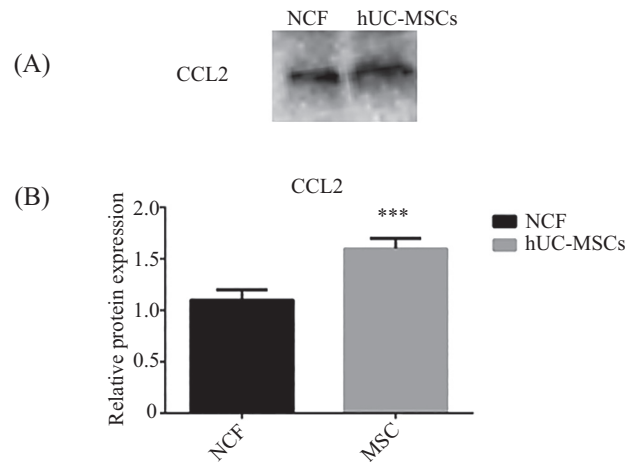
Table 2 Real-time PCR primers

基因	引物序列正向(5'→3')	引物序列反向(5'→3')
Genes	Primer sequences (5'→3')	Primer sequences (5'→3')
<i>CCL2</i>	AGC AAG TGT CCC AAA GAA GC	CAT GGA ATC CTG AAC CCA CT
<i>COL4A1</i>	GGG ATG CTG TTG AAA GGT GAA	GGT GGT CCG GTA AAT CCT GG
<i>SERPINE1</i>	CCT GGG CAC TTA CAG GAA GG	GGT CCG ATT CGT CGT CAA ATA AC
<i>SEMA7A</i>	TTC AGC CCG GAC GAG AAC T	GAA CCG AGG GAT CTT CCC AT
<i>TGF-β1</i>	GGA TAC CAA CTA TTG CTT CAG CTC C	AGG CTC CAA ATA TAG GGG CAG GGT C

表3 hUC-MSCs/NCF质谱与Real-time PCR结果比对表

Table 3 Mass spectrometry and Real-time PCR results of hUC-MSCs/NCF

蛋白名称	Uniprot序号	质谱结果	Real-time PCR结果
Proteins	Uniprot ID	TMT result	Real-time PCR result
<i>CCL2</i>	P13500	9.25	5.452
<i>COL4A1</i>	P02462	8.28	72.863



A: Western blot检测NCF和hUC-MSCs培养上清中CCL2; B: Western blot结果灰度值统计结果, \*\*\* $P < 0.001$ 。

A: Western blot detection of the CCL2 protein expression; B: statistical analysis of Western blot, \*\*\* $P < 0.001$ .

图5 NCF和hUC-MSCs上清液中CCL2的Western blot结果

Fig.5 Western blot result of CCL2 in supernate of NCF and hUC-MSCs

抵抗NMDA或Tat蛋白诱导的细胞凋亡<sup>[15]</sup>。CCL2保护神经细胞免受Tat蛋白的毒性是通过其受体CCR2激活PLC/IP<sub>3</sub>信号通路,进而活化TRPC通道,引起Ca<sup>2+</sup>的瞬时变化之后激活ERK/CREB信号通路实现的<sup>[16]</sup>。细胞外高浓度的谷氨酸盐对于培养的细胞具有细胞毒性,而CCL2处理共培养体系能够抑制由NMDA或Tat蛋白介导的细胞外谷氨酸盐的累积。去甲肾上腺素是1种在神经炎症反应和退行性疾病中对神经细胞起到保护作用的神经递质,用去甲肾上腺素处理星型胶质细胞能够显著促进CCL2的合成和释放,然后作用于神经细胞,使其免受NMDA或者高浓度谷氨酸盐的细胞毒作用<sup>[17]</sup>。而且越来越多

的证据表明,CCL2/CCR2<sup>[18]</sup>在神经发生、神经保护、神经传递等的病理生理过程中起到至关重要的作用,因而它在炎症引起的神经退行性疾病的治疗中往往被选为首要治疗靶点。COL4A1是一种胶原蛋白<sup>[19]</sup>,是血管内皮基膜的重要组成部分,它对于维持血管壁的弹性和完整性十分重要,COL4A1的功能缺失会引起严重的脑出血甚至卒中<sup>[20]</sup>,而脑出血等脑部意外是神经退行性疾病的一个重要诱发因素。CCL2与COL4A1含量较高提示其与hUC-MSCs细胞治疗效果更好有关系。本研究通过分泌蛋白组学分析,对比分析了间充质干细胞和皮肤成纤维细胞无血清培养上清液中的蛋白组成差异,并通过生物信

息学手段结合文献分析,找出了一些在治疗帕金森病等神经退行性疾病中可能起到重要作用的靶标分子。为间充质干细胞在治疗阿尔茨海默病等神经退行性疾病<sup>[21]</sup>的分子机制研究提供一个新思路。

### 参考文献 (References)

- [1] ZAPPA V, LOPEZ H, PARDO J, et al. Mesenchymal stem cells therapy improved the streptozotocin-induced behavioral and hippocampal impairment in rats [J]. *Mol Neurobiol*, 2020, 57(2): 600-15.
- [2] ALBAYRAK O, SENER T E, ERSAHIN M, et al. Mesenchymal stem cell therapy improves erectile dysfunction in experimental spinal cord injury [J]. *Int J Impot Res*, 2020, 32(3): 308-16.
- [3] MENDES F D, RIBEIRO P C, OLIVEIRA L F, et al. Therapy with mesenchymal stem cells in parkinson disease: history and perspectives [J]. *Neurologist*, 2018, 23(4): 141-7.
- [4] KOLF C M, SONG L, HELM J, et al. Nascent osteoblast matrix inhibits osteogenesis of human mesenchymal stem cells *in vitro* [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6: 258.
- [5] STAFF N P, JONES D T, SINGER W. Mesenchymal stromal cell therapies for neurodegenerative diseases [J]. *Mayo Clin Proc*, 2019, 94(5): 892-905.
- [6] RIJAVEC E, GENOVA C, BARLETTA G, et al. Investigational drugs targeting fibroblast growth factor receptor in the treatment of non-small cell lung cancer [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2017, 26(5): 551-61.
- [7] HAN F, WANG W, CHEN B, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived neurons improve motor asymmetry in a 6-hydroxydopamine-induced rat model of Parkinson's disease [J]. *Cytotherapy*, 2015, 17(5): 665-79.
- [8] YU S, ZHAO Y, MA Y, et al. Profiling the secretome of human stem cells from dental apical papilla [J]. *Stem Cells Dev*, 2016, 25(6): 499-508.
- [9] REGULSKI M J. Mesenchymal stem cells: "guardians of inflammation" [J]. *Wounds*, 2017, 29(1): 20-7.
- [10] HONG X C, FU C L, PING G, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells repair a Parkinson's disease model by inducing autophagy [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(4): 288-305.
- [11] ZWART I, HILL A J, AL-ALLAF F, et al. Umbilical cord blood mesenchymal stromal cells are neuroprotective and promote regeneration in a rat optic tract model [J]. *Exp Neurol*, 2009, 216(2): 439-48.
- [12] VILLATORO A J, ALCOHOLADO C, MARTIN-ASTORGA M C, et al. Comparative analysis and characterization of soluble factors and exosomes from cultured adipose tissue and bone marrow mesenchymal stem cells in canine species [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2019, 208: 6-15.
- [13] SONG K, HA I J, KIM Y S. A strategy for identification and structural characterization of oplopane- and bisabolane-type sesquiterpenoids from *Tussilago farfara* L. by multiple scan modes of mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2019, 1602: 188-98.
- [14] CONDUCTIER G, BLONDEAU N, GUYON A, et al. The role of monocyte chemoattractant protein MCP1/CCL2 in neuroinflammatory diseases [J]. *J Neuro Immunol*, 2010, 224(1/2): 93-100.
- [15] EUGENIN E A, D'AVERSA T G, LOPEZ L, et al. MCP-1 (CCL2) protects human neurons and astrocytes from NMDA or HIV-tat-induced apoptosis [J]. *J Neurochem*, 2003, 85(5): 1299-311.
- [16] YAO H, PENG F, DHILLON N, et al. Involvement of TRPC channels in CCL2-mediated neuroprotection against tat toxicity [J]. *J Neurosci*, 2009, 29(6): 1657-69.
- [17] MADRIGAL J L, LEZA J C, POLAK P, et al. Astrocyte-derived MCP-1 mediates neuroprotective effects of noradrenaline [J]. *J Neurosci*, 2009, 29(1): 263-7.
- [18] RÉAUX-LE G A, VAN SI J, ROSTÈNE W, et al. Current status of chemokines in the adult CNS [J]. *Prog Neurobiol*, 2013, 104: 67-92.
- [19] LI H, LU H. Transcriptome analyses identify key genes and potential mechanisms in a rat model of osteoarthritis [J]. *J Orthop Surg Res*, 2018, 13(1): 319.
- [20] JEANNE M, LABELLE-DUMAIS C, JORGENSEN J, et al. COL4A2 mutations impair COL4A1 and COL4A2 secretion and cause hemorrhagic stroke [J]. *Am J Hum Genet*, 2012, 90(1): 91-101.
- [21] HAN F, CHEN C, WANG W, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells ameliorated motor defects of 6-OHDA-induced rat model of Parkinson's disease [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(1): 1-15.