

研究论文

胎盘间充质干细胞促进高糖条件下 人角质形成细胞增殖与迁移

刘淑丹¹ 马会明² 梁雪云¹ 马晓娜¹ 杨婷婷¹ 陈冬梅^{1*}¹宁夏医科大学总医院宁夏人类干细胞研究所, 银川 750004;²宁夏医科大学生育力保持教育部重点实验室, 银川 750004)

摘要 通过体外模拟糖尿病患者高血糖环境研究胎盘间充质干细胞(placenta mesenchymal stem cells, PMSCs)促进角质形成细胞的增殖和迁移能力, 这对阐明PMSCs促进糖尿病足等皮肤创伤修复的作用具有重要意义。该研究分离培养人角质形成细胞(human keratinocytes, hKCs), 添加50~100 mmol/L葡萄糖, 建立高糖损伤模型。利用CCK-8检测损伤hKCs与PMSCs共培养前后的增殖情况, 流式细胞术检测凋亡细胞数量, 细胞划痕愈合实验检测细胞迁移速度, 免疫荧光染色和Western blot检测细胞骨架蛋白波形蛋白(vimentin)的表达, 以反映细胞的形态和运动能力。结果发现, 原代hKCs为大小均一的铺路石样细胞, 在模拟高血糖环境(50 mmol/L、100 mmol/L D-葡萄糖)时, 细胞出现扁平、增大、增殖能力下降等衰老特点, 角质形成细胞增殖率低, 迁移区域稀疏。与对照组相比, PMSCs共培养组在高糖条件下hKCs生长速度快, 增殖率高, 凋亡率低, 迁移覆盖面积较大, 波形蛋白表达明显增强, 形态发生间质样转变。以上结果说明, PMSCs不仅能够抑制高糖引起的人角质形成细胞凋亡, 同时促进其增殖和迁移, 为间充质干细胞促进皮肤创面愈合的基础与临床研究提供了新证据。

关键词 胎盘间充质干细胞; 人角质形成细胞; 增殖; 迁移; 高糖; 皮肤创面愈合

Influence of Placenta Mesenchymal Stem Cells on Proliferation and Migration of Keratinocytes under High Glucose Conditions

Liu Shudan¹, Ma Huiming², Liang Xueyun¹, Ma Xiaona¹, Yang Tingting¹, Chen Dongmei^{1*}¹Institute of Human Stem Cells, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; ²Key Laboratory of Fertility Preservation and Maintenance of Ministry of Education, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

Abstract The aim of this study was to investigate whether MSCs from the human placenta could be an effective therapeutic candidate to promote the proliferation and migration of keratinocytes in hyperglycemic environment. We adopted a strategy of treating hKCs with high D-glucose, applying PMSCs in a glucose-induced cell injury model, which is of great significance to elucidate the role of PMSCs in promoting the wound healing such as diabetic foot. In this study, the keratinocytes were obtained and cultured *in vitro* with various different D-glucose concentra-

收稿日期: 2018-08-07 接受日期: 2018-10-12

宁夏自然科学基金(批准号: NZ15133)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0951-6743751, E-mail: 18309679151@163.com

Received: August 7, 2018 Accepted: October 12, 2018

This work was supported by the Natural Science Fund of Ningxia Autonomous Region (Grant No. NZ15133)

*Corresponding author. Tel: +86-951-6743751, E-mail: 18309679151@163.com

网络出版时间: 2018-11-29 14:31:54

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20181129.1431.006.html>

tions (12.5 mmol/L, 25 mmol/L, 50 mmol/L, and 100 mmol/L) cultured under routine condition (serum-free medium) for 3 days, the doubling time, cell migration and cell apoptosis assays were performed on human keratinocytes. In all experimental groups the keratinocytes were further cultured with human placenta mesenchymal stem cells. Cell proliferation, apoptosis, and migration were assessed and the expression of vimentin was detected using immunofluorescence and immunoblotting assay thereafter. Keratinocytes presented showed a low proliferation rate and migration areas were sparse in the simulation of hyperglycemia environment (50 mmol/L, and 100 mmol/L D-glucose). Compared with the control group, PMSCs co-cultured group presented more rapid cell growth, higher proliferation rate, and lower apoptosis percentage under high-glucose conditions. In the PMSCs co-cultured group, larger areas were overlaid; and the expression of vimentin was significantly enhanced. These findings suggested that PMSCs could effectively promote keratinocytes survival and migration under hyperglycemia conditions *in vitro*. It might function via upregulating the expression of vimentin. These results indicated that PMSCs could not only inhibit the apoptosis of human keratinocytes caused by high glucose, but also promote its proliferation and migration under hyperglycemia condition. These advances provided new evidence for mesenchymal stem cells to promote skin wound healing in diabetic patients.

Keywords placenta mesenchymal stem cells; human keratinocytes; proliferation; migration; high glucose; skin wound healing

糖尿病性慢性难愈合创面严重影响患者健康和生活质量,甚至发生致残、溃疡癌变等危及患者生命的严重并发症。影响糖尿病创面愈合过程的因素包括:受损的角质细胞迁移和增殖^[1]、缝隙连接异常^[2]、慢性炎症^[3]、血管生成受损^[4]、氧化应激增加^[5]以及基质金属蛋白酶的异常表达^[6]。表皮角质形成细胞的生理功能紊乱在糖尿病创面愈合不良中起着重要的作用。慢性高血糖引起的表皮角质形成细胞的氧化应激损伤、蛋白活性改变等,严重影响细胞的增殖、分化、运动等生物学功能,使溃疡表面经久不愈。我们前期的研究发现,人胎盘间充质干细胞(placenta mesenchymal stem cells, PMSCs)能够明显促进小鼠糖尿病溃疡创面的愈合、促进血管内皮细胞和肌细胞的再生,但其作用机制仍不明确。本研究利用体外培养的原代表皮基底细胞制备高糖损伤模型,通过与PMSCs的共培养,阐明PMSCs促进糖尿病溃疡皮肤创面愈合的细胞学机制。本研究对促进糖尿病足等难愈性创面愈合,降低糖尿病足患者的截肢率具有重要意义,可为慢性糖尿病创面的治疗和管理提供更有效和个性化的治疗策略。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 人体组织来源 正常人皮肤组织来源于宁夏医科大学总医院泌尿外科行包皮环切手术后废弃

皮肤,胎盘来源于宁夏医科大学总医院产科分娩产妇及家属捐赠,经医院伦理学委员会批准且获得患者知情同意。

1.1.2 主要试剂及仪器 CELLnTEC表皮细胞培养基购自CELLnTEC公司; MesenCult™-XF Medium无血清培养基购自Stemcell公司; TrypLE Express消化酶、DNase I酶、Annexin V/FITC凋亡检测试剂盒购自ThermoFisher公司; II型dispease酶购自Roche公司; CCK-8试剂购自Transgen Biotech公司; 倒置荧光显微镜为Olympus公司产品; CO₂培养箱为ThermoFisher公司产品; 酶标仪为Bio-Rad公司产品。

1.2 方法

1.2.1 胎儿来源的胎盘间充质干细胞的分离培养 取新鲜胎盘组织,利用剪刀分别小心避开血管,剪取胎盘绒毛膜组织,清洗后,利用眼科剪机械破碎组织,收集剪碎后的组织加入30 mL DMEM并加入A型胶原酶和DNase I酶,37 °C水浴消化2 h,待消化完毕后将离心管置于离心机中按1 500 r/min的转速离心,用PBS重悬沉淀物,先后用100 μm、40 μm细胞筛过滤沉淀,收集过滤后所得细胞悬液,离心后用MesenCult™-XF Medium无血清培养基重悬,接种于10 cm无菌培养皿中,置于37 °C、5% CO₂条件下培养,每隔2天换液1次,此细胞即为P0代。显微镜下观察细胞生长状态,待细胞达70%~80%融合状态时,利用TrypLE消化后按1:3传代,继续培养至P3代作为

实验用细胞。

1.2.2 hKCs分离培养 取环状切除术后正常人包皮皮肤, 将组织先后在碘伏与75%的乙醇中消毒, 并在含1%抗生素的PBS中进行漂洗; 剔除皮下脂肪层、血管、结缔组织, 剪成1 cm×1 cm小块, 置于3.3 mg/mL dispase II中, 4 °C消化14 h, 机械分开表皮与真皮层。将表皮置于离心管中, 加入0.25%胰酶5 mL, 在37 °C孵箱中消化15 min。加DMEM+10% FBS终止消化, 1 500 r/min离心5 min, 弃上清, 加入无血清角质化培养基, 在旋转器上瞬时震荡。70 μm无菌滤网过滤, 吸取单细胞悬液, 3×10⁶接种在已包被0.1% I型牛胶原的培养皿中, 置于37 °C、5% CO₂及饱和湿度的培养箱中培养。待细胞长成70%~80%融合状态时, 用TrypLE消化细胞5 min, PBS稀释消化液终止消化, 吹打混悬, 离心收集细胞, 加培养基, 转移至I型胶原包被好的培养皿内, 继续培养至P2代, 每2天换液。

1.2.3 高糖损伤细胞模型构建 正常hKCs培养基含葡萄糖12.5 mmol/L, 在此基础上添加D-葡萄糖(D-glucose), 使培养基中葡萄糖终浓度达到25 mmol/L、50 mmol/L和100 mmol/L, 培养72 h后进行后续PMSC条件培养基培养、划痕、凋亡等实验。

1.2.4 条件培养基的制备 1×10⁶的PMSCs贴壁培养12 h后, 换hKCs培养基继续培养24 h收集培养上清, 0.45 μm滤膜过滤, 作为条件培养基继续用于CCK-8检测hKCs细胞增殖。

1.2.5 共培养系统 利用膜孔径为0.4 μm的Transwell小室进行两种细胞共培养, 下室接种hKCs, 上室接种PMSCs, 共培养于含2%人血小板裂解物的CELLnTEC表皮细胞培养基中, 各组分别添加不同浓度的葡萄糖。共培养72 h后, 用流式细胞分析hKCs细胞凋亡, 免疫荧光分析vimentin蛋白表达, 划痕愈合实验分析细胞迁移能力。

1.2.6 CCK-8检测细胞增殖 以TrypLE Express消化处于对数生长期的人hKCs, 细胞计数板计数, 以每100 μL接种于96孔板中(细胞密度3 000个/孔), 在37 °C、5% CO₂恒温培养箱中培养2 h后, 即细胞贴壁后, 两组各取6孔细胞, 每孔加入10 μL CCK-8溶液, 继续在37 °C恒温培养箱中孵育4 h后, 酶标仪检测450 nm波长处各孔的D值。96孔板置于37 °C、5% CO₂的恒温培养箱中继续培养1~7天, 每24 h测6个复孔, 并设无细胞的空白对照组。上述实验均重复3次, 结果取平均值。根据公式计算各组细胞群体倍增时

间, $Td = \delta t \times \lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)$ 。

1.2.7 流式法检测细胞凋亡 收集正常培养、高糖培养和高糖损伤后再与PMSCs共培养的各組细胞, 消化离心后, PBS漂洗1次, 按Annexin V-FITC流式细胞分析试剂盒说明染色, 染色后, PBS漂洗1次, 上流式细胞仪分析细胞Annexin V和FITC阳性率。

1.2.8 划痕愈合试验 培养板背面画横线标记, 拍照时方便定位同一个视野。细胞铺满板底后, 用10 μL枪头垂直于孔板制造细胞划痕, 尽量保证各个划痕宽度一致。吸去细胞培养液, 用PBS冲洗孔板3次, 洗去划痕产生的细胞碎片。加入无血清培养基, 每12 h拍照记录, 根据收集图片数据分析细胞覆盖面积和划痕面积。

1.2.9 免疫荧光染色 各处理组细胞经40 g/L多聚甲醛固定30 min, 3 mL/L Triton X-100细胞膜穿孔10 min, 根据二抗选择兔血清封闭, 次序与单克隆抗体vimentin(1:200)一抗以及Alexa Fluor 488标记兔抗鼠二抗(1:1 000)孵育、洗涤, DAPI染核, 倒置荧光显微镜下观察细胞特异性发光情况, Image Pro Plus 6.0图像分析软件进行阳性细胞计数。

1.2.10 Western blot 分析 RIPA裂解液提取样本总蛋白, BCA法测定蛋白质浓度, 等量上样, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 湿法转膜后, 5%脱脂奶粉封闭1 h, 次序与一抗(4 °C过夜)、二抗孵育(室温30 min), 利用ECL法检测目的蛋白条带, 灰度扫描后分析蛋白质表达水平的差异。使用Image Pro Plus 6.0专业图像分析软件进行图像分析, 用GAPDH标准化蛋白表达量。

1.2.11 统计学处理 所有实验进行了3次重复。数据由SPSS 17.0或GraphPad软件统计分析, 以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示应用统计学软件对实验结果进行单因素方差分析或双因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 高糖损伤细胞模型建立及胎盘间充质干细胞对hKCs增殖的影响

12.5、25、50、100 mmol/L的D-glucose分别处理原代分离的hKCs 72 h后于倒置显微镜下观察细胞形态变化。随着D-glucose浓度的升高, 细胞形态发生了显著变化(图1)。对照组细胞为多边形, 随着培养时间的延长细胞数量增多; 12.5 mmol/L和

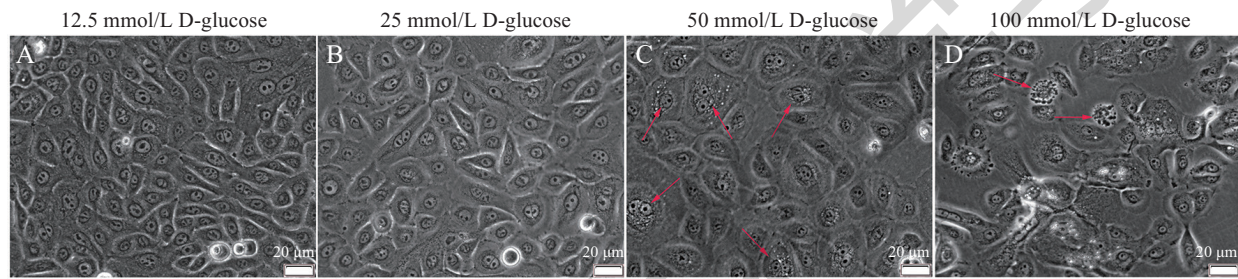
25 mmol/L D-glucose处理细胞72 h后, 细胞仍然处于增殖状态, 细胞形态基本无变化(图1A和图1B); 50 mmol/L D-glucose处理组部分细胞折光性降低, 胞体变大, 细胞胞体中出现空洞(图1C); 100 mmol/L处理组大部分细胞变大, 边缘模糊, 少量细胞失去贴壁性, 细胞周围有典型凋亡小体溢出(图1D)。

进一步采用CCK-8法检测了高浓度D-glucose对hKCs 7天内的生长抑制作用以及胎盘间充质干细胞条件培养基对hKCs增殖抑制的影响(图2)。50~100 mmol/L D-glucose对细胞有一定的细胞毒活性, 细胞增殖在处理24 h后明显被抑制(图2A), 群体倍增时间(PDT)较12~25 mmol/L葡萄糖浓度培养显著

著延长($P < 0.05$)(图2B)。而同样糖浓度下, 使用胎盘间充质干细胞条件培养基培养24 h后的培养基培养的hKCs在第5~7天, 增殖较50~100 mmol/L D-glucose对照组明显增加, 其他时间点没有显著差异。从群体倍增时间来看, PMSC-CM培养的hKCs的PDT减少, 25 mmol/L葡萄糖组差异显著($P < 0.05$), 其他差异没有统计学意义(图2B)。

2.2 胎盘间充质干细胞对hKCs凋亡的影响

12.5、25、50、100 mmol/L D-glucose处理hKCs 72 h后, 收集细胞进行Annexin V/FITC双染流式检测, 其结果显示, 不同浓度D-glucose处理后, 50、100 mmol/L D-glucose组凋亡细胞数量增加, 达到极

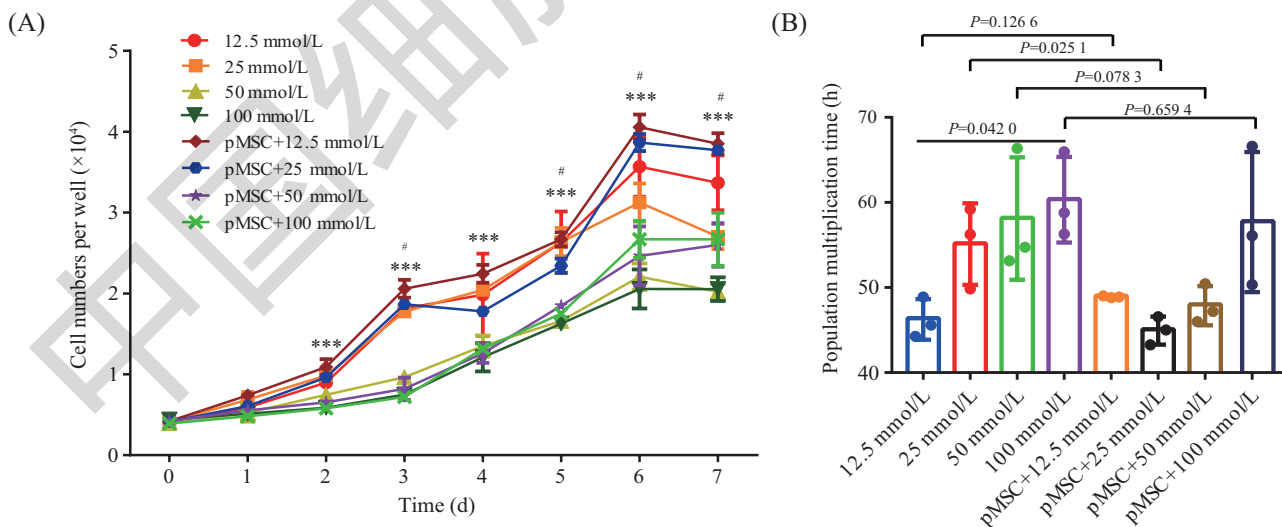


A~D: 12.5、25、50、100 mmol/L D-glucose作用hKCs 72 h。C中红色箭头表示50 mmol/L D-glucose处理组部分细胞折光性降低, 胞体变大, 细胞胞体中出现空洞; D中红色箭头表示100 mmol/L处理组细胞皱缩, 失去贴壁性, 细胞周围有典型凋亡小体溢出。

A~D: keratinocytes were exposed to D-glucose (12.5, 25, 50, 100 mmol/L) for 72 h. The red arrow in figure C indicated that the refractive property decreased with the more vacuoles and larger volume of cells in the treatment group of 50 mmol/L D-glucose. The red arrow in figure D indicated that the cells shrink and lost attachment. Apoptotic body were present in or around the cells in the treatment group of 100 mmol/L D-glucose.

图1 D-glucose对hKCs形态的影响

Fig.1 Effects of D-glucose on keratinocytes morphology

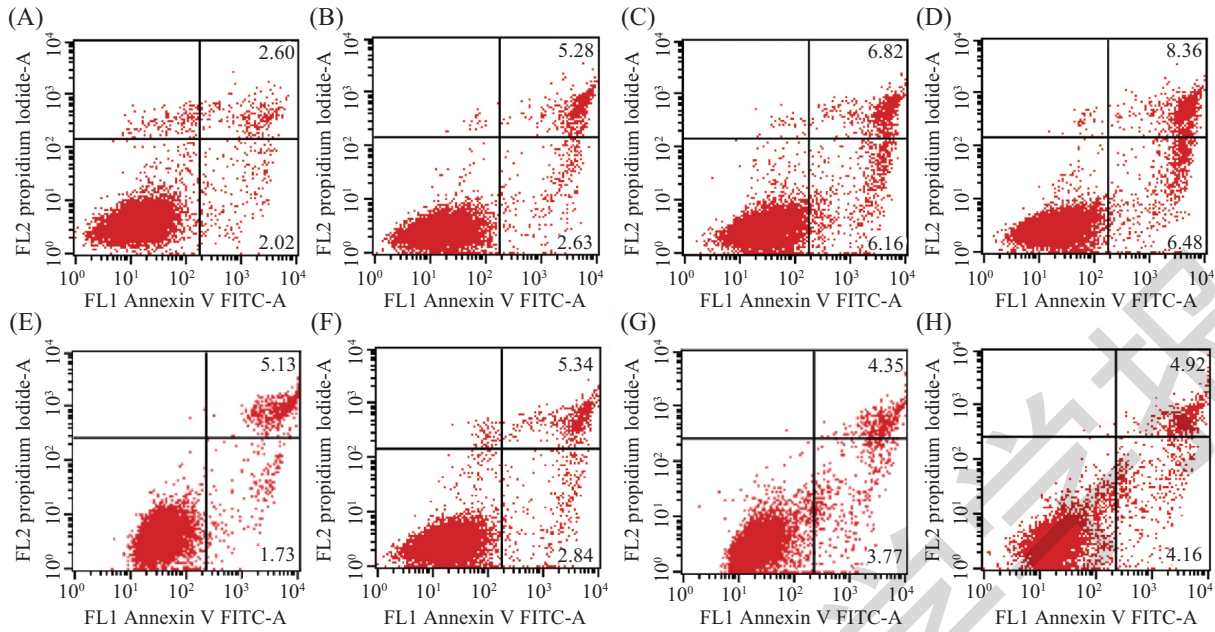


A: 绘制各组生长曲线; B: 计算各处理组群体倍增时间。*** $P < 0.001$, 葡萄糖因素各组间比较; # $P < 0.05$, pMSC-CM因素各组间比较。

A: draw the growth curve using time as x value and cell count as y value; B: calculate the population doubling time of each treatment group. *** $P < 0.001$ compared with glucose factor between groups; # $P < 0.05$ compared with pMSC-CM factor between groups.

图2 D-glucose对hKCs生长的抑制作用及胎盘间充质干细胞对其增殖的影响

Fig.2 Effects of D-glucose and pMSC-conditioned medium on keratinocytes growth



A~D: 12.5、25、50、100 mmol/L D-glucose作用hKCs 72 h。E~H: 在各糖浓度基础上(12.5、25、50、100 mmol/L)添加PMSCs条件培养基培养72 h。A~D: keratinocytes were exposed to D-glucose (12.5, 25, 50, 100 mmol/L) for 72 h. E~H: keratinocytes were exposed to D-glucose (12.5, 25, 50, 100 mmol/L) and PMSC-CM for 72 h.

图3 D-glucose对hKCs生长的抑制作用及胎盘间充质干细胞对其凋亡的影响

Fig.3 Effects of D-glucose and pMSC-conditioned medium on keratinocytes apoptotic

表1 各组凋亡细胞数量统计

Table 1 Apoptosis cell count of the each group

分组 Groups	总计数量(个) Total events	葡萄糖浓度(mmol/L) D-glucose concentration (mmol/L)				P_a value
		12.5	25	50	100	
Control	10 000	228.67±25.58	285.00±24.88	625.67±10.02	644.00±47.13	0.000 1
Co-culture	10 000	161.00±31.75	277.33±40.41	380.33±55.08	446.00±36.06	0.000 2
P_b value		0.157 3	0.848 5	0.019 8	0.011 3	

P_a : 葡萄糖因素各组间比较; P_b : pMSC-CM因素各组间比较。

P_a : compared with glucose factor between groups; P_b : compared with pMSC-CM factor between groups.

显著水平($P<0.01$)(图3和表1)。与胎盘间充质干细胞共培养后, 50~100 mmol/L葡萄糖处理的细胞, 凋亡细胞数量显著低于未进行共培养的高糖损伤组($P<0.05$), 而12.5~25 mmol/L D-glucose处理组, 共培养前后凋亡细胞数差异不显著。

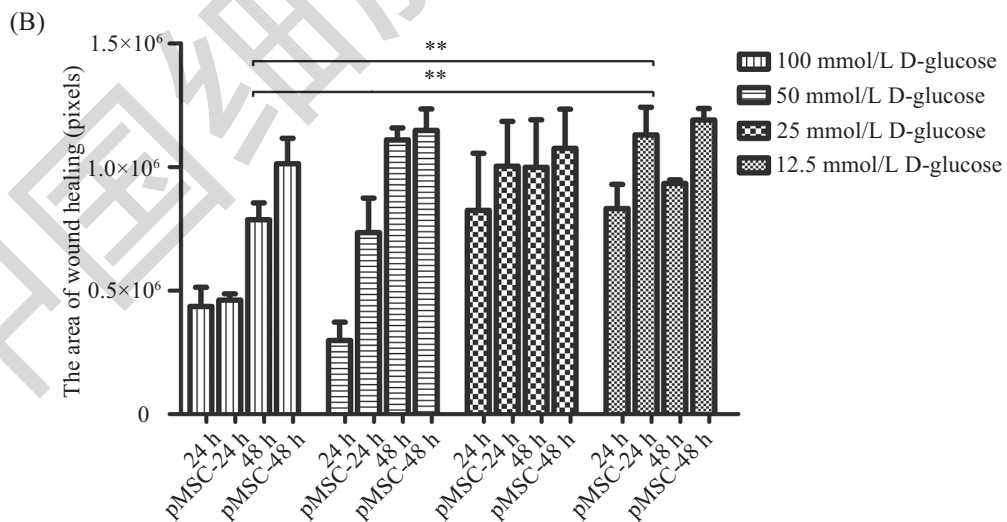
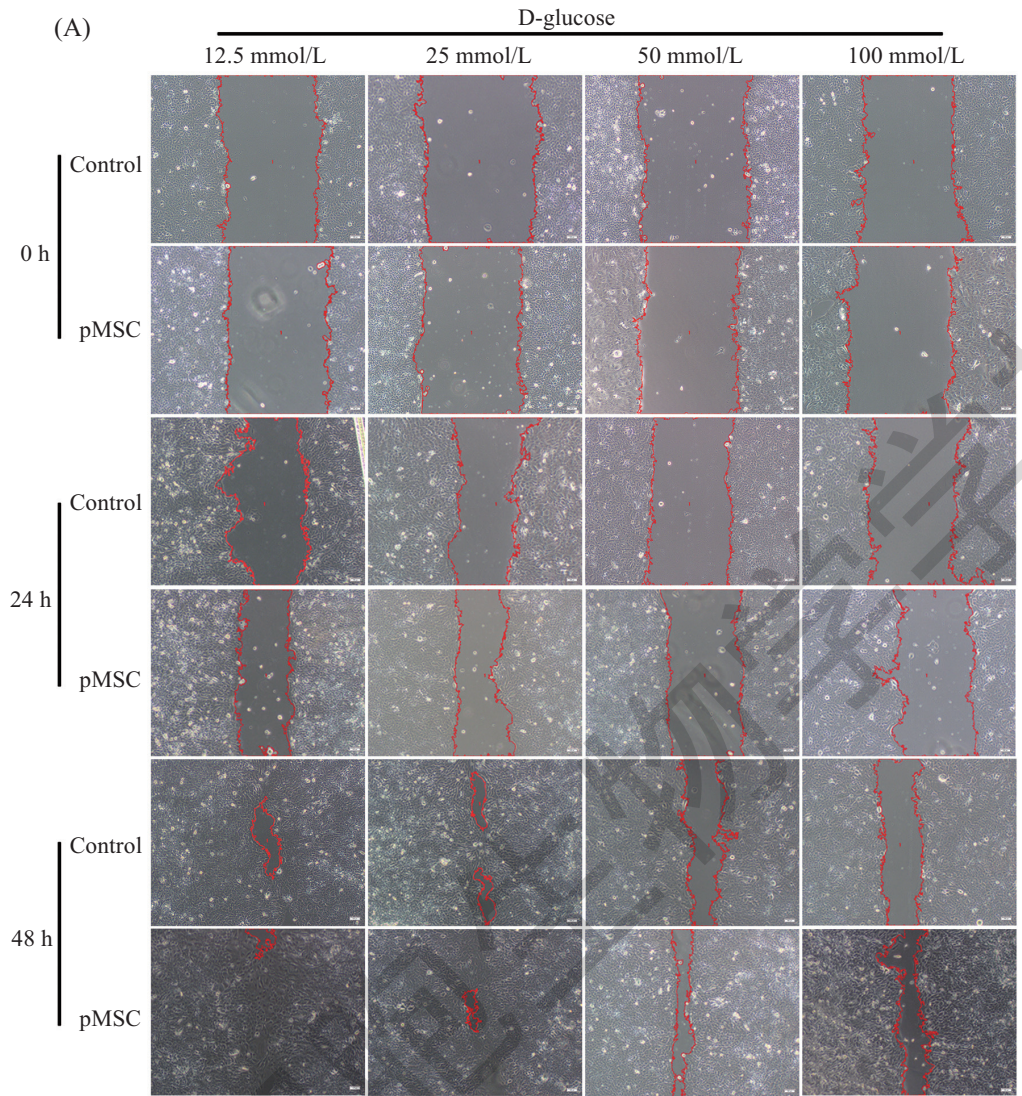
2.3 胎盘间充质干细胞对hKCs迁移的影响

划痕法观察细胞的迁移情况, Image Pro Plus 软件计算划痕区域的面积(以像素计算)。对照组细胞在培养24 h后逐渐向划痕迁移, 48 h后大部分细胞已迁移至划痕处, 并越过划痕形成两界融合(图4A)。与12.5 mmol/L和25 mmol/L D-glucose组相比, 50 mmol/L和100 mmol/L葡萄糖处理hKCs 24 h和48 h后均显示了较强的迁移抑制作用($P<0.01$)。同时, 与PMSCs共培养对细胞的迁移有显著的促进作用, 差

异具有统计学意义($P<0.05$)(图4B)。

2.4 胎盘间充质干细胞对hKCs波形纤维蛋白的影响

波形蛋白(vimentin, Vim)是一种III型中间丝(intermediate filament, IF)蛋白, 与细胞贴附性和运动性密切相关, 常被用作间质衍生细胞或细胞在上皮-间质转化的标记。我们采用荧光二抗标记的免疫化学实验观察细胞形态变化(图5A)。正常培养的hKCs, 波形蛋白分布聚集在细胞核周围, 细胞以多边形为主。胎盘间充质干细胞共培养72 h后, 沿细胞纵轴伸展出片状伪足及丝状伪足, 并相互接触形成细胞间连接, 细胞形态向间质样转变。Western blot方法定量蛋白表达, 结果显示, 与PMSCs共培养后, vimentin相对GAPDH蛋白表达上调(图5B), 相对灰度值统计

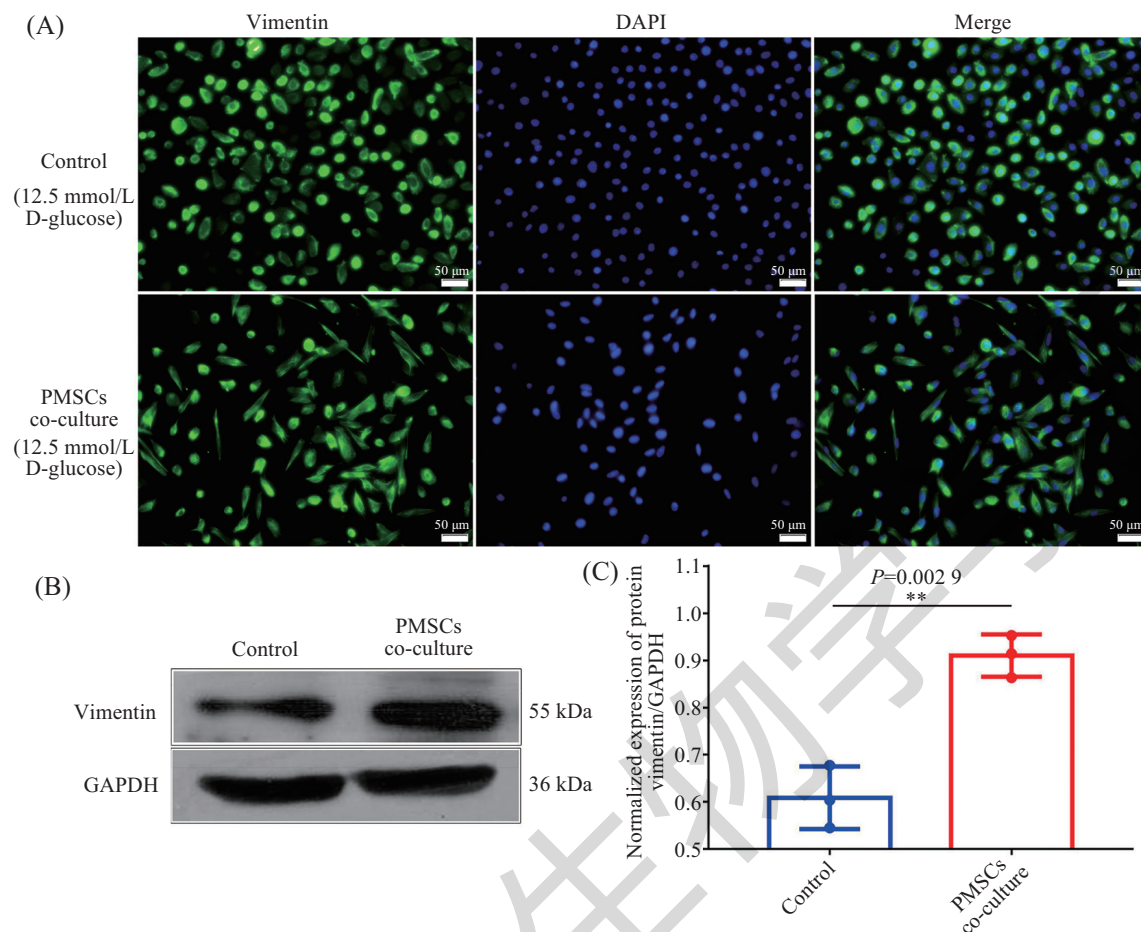


A: 划痕愈合试验检测hKCs迁移能力; B: 定量统计划痕愈合面积像素值。葡萄糖因素各组间比较, ** $P=0.0057$; pMSC因素各组间比较, ** $P=0.0012$ 。

A: wound healing assay for the migration of hKCs; B: the area pixel value was measured using Image-Pro Plus 6.0 software analysis. Compared with glucose factor between groups, ** $P=0.0057$; compared with pMSC factor between groups, ** $P=0.0012$.

图4 PMSCs条件培养对不同糖浓度培养的角质形成细胞迁移的影响

Fig.4 Effects of PMSC-CM on migration of keratinocytes under different glucose conditions



A: hKCs与PMSCs共培养前后vimentin蛋白表达与细胞形态; B: Western blot分析hKCs与PMSCs共培养前后vimentin蛋白表达; C: 相对GAPDH定量分析vimentin蛋白表达。

A: morphology of hKCs and expression of vimentin in co-cultured with or without PMSCs were detected by immunofluorescence; B: expression of vimentin in co-cultured with or without PMSCs were detected by Western blot; C: the relative amount of protein was normalized to the expression of GAPDH.

图5 共培养后细胞内波形蛋白表达和细胞形态的变化

Fig.5 Effects of PMSC co-cultured on vimentin distribution and morphology of keratinocytes after 48 hours

结果差异显著(图5C)。

3 讨论

糖尿病患者创面愈合损伤是一个重要的临床问题。适当的角质细胞迁移和增殖是再上皮化的关键步骤, 这些自我修复过程在糖尿病(DM)中可能由于高血糖和伤口部位的慢性炎症而受损^[1]。本研究探讨了高糖的类糖尿病微环境对人角质形成细胞体外迁移和增殖的影响以及胎盘来源间充质干细胞对高糖损伤的逆转作用。高糖通过Erk信号通路以活性氧(ROS)依赖的方式刺激大鼠角质形成细胞迁移和增殖^[7]。高血糖环境导致蛋白质的非酶糖基化增多, 如胶原蛋白的糖基化使角质形成细胞对糖基化I型胶原的黏附和迁移减少。角质形成细胞中影响迁

移的关键作用分子Gal-7基因的O-乙酰氨基葡萄糖(O-GlcNAc)修饰增加, 降低了Gal-7的表达^[8]。还有研究证明, 高糖通过抑制PI3K信号通路抑制ClC-2氯离子通道, 减弱大鼠角质形成细胞的迁移^[9]。基质金属蛋白酶的异常表达也可能导致角质形成细胞迁移受损, 导致糖尿病伤口的延迟愈合^[6]。此外, 研究也显示, 角质形成细胞功能障碍可能是由高糖诱导的氧化应激引起的^[10-11]。动物实验进一步证实, 氧化应激参与了糖尿病难愈合创面的形成, 口服抗氧化剂可以调节糖尿病小鼠的炎症过程, 增强创面愈合^[12]。以上研究表明, 多种机制导致了角质形成细胞在糖尿病中的增殖和迁移减少。本研究结果同样显示, 高糖会损害hKCs的增殖和迁移; 同时还表明, 与胎盘间充质干细胞共培养有利于恢复hKCs的

增殖和迁移能力。已有的报道对高糖浓度的界定从25~100 mmol/L不等,多数报道显示,30~50 mmol/L葡萄糖会造成细胞损伤,根据细胞类型不同存在差异^[7,10,13]。本研究发现,在25 mmol/L高糖培养下,细胞增殖、凋亡和运动能力较12.5 mmol/L(正常hKCs培养基糖浓度)糖培养没有明显的差异。随着糖浓度增加到50 mmol/L, hKCs增殖和运动能力都降低,凋亡细胞比例升高。Buranasin等^[10]也报道,成纤维细胞在50 mmol/L和75 mmol/L葡萄糖时,EdU染色阳性的细胞数量和细胞活力均下降,高糖诱导的氧化应激会损害人牙龈成纤维细胞的增殖和迁移。虽然50 mmol/L的糖浓度远远高于人糖尿病病理生理糖浓度,但本研究中使用50 mmol/L的糖浓度才可检测到细胞损伤,这可能与细胞体外培养环境和检测方法有关。

MSCs主要依赖于生长因子、细胞因子和外泌体等旁分泌效应对损伤组织起修复和免疫调节作用^[14-16]。研究发现,移植骨髓MSCs可以改善糖尿病大鼠的受损愈合过程,这与减缓hKCs中pFAK水平下降以及MMP2、EGF、IGF-1水平升高有关^[17]。用骨髓间充质干细胞治疗大鼠角化细胞可以减少高糖诱导的ROS过量产生,逆转了由高糖诱导的MEK1/2和Erk1/2磷酸化的下调^[7]。Kato等^[17]的研究发现,移植BM-MSCs可以改善糖尿病大鼠的受损愈合过程,在MSC-CM培养的角质形成细胞中,高糖条件下pFAK水平降低恢复,MMP2、EGF、IGF-1水平升高。胎盘间充质干细胞也具有来源广泛、取材方便、低免疫原性以及可自体移植等优势。已有研究发现,胎盘来源MSCs可显著促进伤口的愈合速度和血管数量^[18]。本课题组前期研究也发现,绒毛膜来源的PMSCs表达高水平的CD200和HGF。与HGF、CD200阴性PMSCs相比,HGF、CD200阳性细胞在体外促进血管生成、提高小鼠体内免疫抑制功能方面具有显著的潜力^[19]。本研究验证了PMSCs对高糖诱导的hKCs损伤的修复作用,实验发现,高糖损伤的hKCs与PMSCs共培养(或条件培养)后凋亡细胞明显减低、增殖显著增加,并且显著促进了hKCs的迁移,细胞形态发生明显间质样转变,细胞骨架蛋白vimentin表达显著上调。Vimentin在间充质细胞中形成中间丝,促进细胞的上皮间质样转化,被作为肿瘤进展的标记^[20]。这些结果表明,PMSCs可以缓解高糖环境造成的hKCs增殖缓慢,且促进hKCs的再生和运动能力。但PMSCs究竟通过何种蛋白和信号通

路发挥促细胞迁移作用机制还需进一步研究。本研究在体外水平独立分析了高糖条件下PMSCs对人角质形成细胞的功能影响,为胎盘间充质干细胞对难愈合皮肤损伤的治疗提供了一定的研究基础。

参考文献 (References)

- Hu SC, Lan CE. High-glucose environment disturbs the physiologic functions of keratinocytes: focusing on diabetic wound healing. *J Dermatol Sci* 2016; 84(2): 121-7.
- Sutcliffe JE, Chin KY, Thrasivoulou C, Serena TE, O'Neil S, Hu R, *et al*. Abnormal connexin expression in human chronic wounds. *Br J Dermatol* 2015; 173(5): 1205-15.
- Wu Y, Quan Y, Liu Y, Liu K, Li H, Jiang Z, *et al*. Hyperglycemia inhibits REG3A expression to exacerbate TLR3-mediated skin inflammation in diabetes. *Nat Commun* 2016; 7: 13393.
- Lan CC, Huang SM, Wu CS, Wu CH, Chen GS. High-glucose environment increased thrombospondin-1 expression in keratinocytes via DNA hypomethylation. *Transl Res* 2016; 169: 91-101. e1-3.
- Chen X, Li M, Li L, Xu S, Huang D, Ju M, *et al*. Trehalose, sucrose and raffinose are novel activators of autophagy in human keratinocytes through an mTOR-independent pathway. *Sci Rep* 2016; 6: 28423.
- Zhang C, Lim J, Jeon HH, Xu F, Tian C, Miao F, *et al*. FOXO1 deletion in keratinocytes improves diabetic wound healing through MMP9 regulation. *Sci Rep* 2017; 7(1): 10565.
- Li M, Zhao Y, Hao H, Dai H, Han Q, Tong C, *et al*. Mesenchymal stem cell-conditioned medium improves the proliferation and migration of keratinocytes in a diabetes-like microenvironment. *Int J Low Extrem Wounds* 2015; 14(1): 73-86.
- Huang SM, Wu CS, Chiu MH, Yang HJ, Chen GS, Lan CE. High-glucose environment induced intracellular O-GlcNAc glycosylation and reduced galectin-7 expression in keratinocytes: Implications on impaired diabetic wound healing. *J Dermatol Sci* 2017; 87(2): 168-75.
- Pan F, Guo R, Cheng W, Chai L, Wang W, Cao C, *et al*. High glucose inhibits CIC-2 chloride channels and attenuates cell migration of rat keratinocytes. *Drug Des Devel Ther* 2015; 9: 4779-91.
- Buranasin P, Mizutani K, Iwasaki K, Pawaputanon Na Mahasarakham C, Kido D, Takeda K, *et al*. High glucose-induced oxidative stress impairs proliferation and migration of human gingival fibroblasts. *PLoS One* 2018; 13(8): e0201855.
- Lamers ML, Almeida ME, Vicente-Manzanares M, Horwitz AF, Santos MF. High glucose-mediated oxidative stress impairs cell migration. *PLoS One* 2011; 6(8): e22865.
- Lan CC, Wu CS, Huang SM, Wu IH, Chen GS. High-glucose environment enhanced oxidative stress and increased interleukin-8 secretion from keratinocytes: new insights into impaired diabetic wound healing. *Diabetes* 2013; 62(7): 2530-8.
- Oh JY, Choi GE, Lee HJ, Jung YH, Ko SH, Chae CW, *et al*. High glucose-induced reactive oxygen species stimulates human mesenchymal stem cell migration through snail and EZH2-dependent E-cadherin repression. *Cell Physiol Biochem* 2018; 46(5): 1749-67.

- 14 Ti D, Hao H, Fu X, Han W. Mesenchymal stem cells-derived exosomal microRNAs contribute to wound inflammation. *Sci China Life Sci* 2016; 59(12): 1305-12.
- 15 Goodarzi P, Larijani B, Alavi-Moghadam S, Tayanloo-Beik A, Mohamadi-Jahani F, Ranjbaran N, *et al.* Mesenchymal stem cells-derived exosomes for wound regeneration. *Adv Exp Med Biol* 2018; doi: 10.1007/5584_2018_251.
- 16 Li X, Xie X, Lian W, Shi R, Han S, Zhang H, *et al.* Exosomes from adipose-derived stem cells overexpressing Nrf2 accelerate cutaneous wound healing by promoting vascularization in a diabetic foot ulcer rat model. *Exp Mol Med* 2018; 50(4): 29.
- 17 Kato J, Kamiya H, Himeno T, Shibata T, Kondo M, Okawa 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 Diabetes Complications* 2014; 28(5): 588-95.
- 18 Ertl J, Pichlsberger M, Tuca AC, Wurzer P, Fuchs J, Geyer SH, *et al.* Comparative study of regenerative effects of mesenchymal stem cells derived from placental amnion, chorion and umbilical cord on dermal wounds. *Placenta* 2018; 65: 37-46.
- 19 Zhu Y, Yang Y, Zhang Y, Hao G, Liu T, Wang L, *et al.* Placental mesenchymal stem cells of fetal and maternal origins demonstrate different therapeutic potentials. *Stem Cell Res Ther* 2014; 5(2): 48.
- 20 Velez-delValle C, Marsch-Moreno M, Castro-Munozledo F, Galvan-Mendoza IJ, Kuri-Harcuch W. Epithelial cell migration requires the interaction between the vimentin and keratin intermediate filaments. *Sci Rep* 2016; 6: 24389.

中国细胞生物学杂志