

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2019.10.1062

· 论 著 ·

脂肪干细胞通过 EGFR/ERK 通路减轻海水对表皮细胞增殖与迁移能力的抑制作用

熊佳超^{1△}, 嵇铂尧^{2△}, 王留军², 刘知晓², 宋建星^{1*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)长海医院整形外科, 上海 200433

2. 海军军医大学(第二军医大学)基础医学院组织胚胎学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 通过体外研究探索人脂肪干细胞(hADSC)促进海水浸泡创面愈合的可能机制。**方法** 利用人表皮细胞系 HaCaT 细胞和人工模拟海水建立海水浸泡创面导致细胞损伤的体外模型。从人脂肪组织分离、培养 hADSC 并进行鉴定, 建立 HaCaT 细胞与 hADSC 共培养体系。利用活细胞计数试剂盒(CCK-8)、5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EdU)细胞增殖检测试剂盒与细胞划痕实验等评估 HaCaT 细胞增殖、迁移能力, 并通过蛋白质印迹与实时定量 PCR 技术检测表皮生长因子受体(EGFR)/细胞外调节蛋白激酶(ERK)信号通路活化情况。**结果** 在添加了 10% 海水的培养液中, HaCaT 细胞的增殖活力已受到明显抑制, 与不添加海水培养的细胞相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。利用成功分离的 hADSC 与 HaCaT 细胞共培养模型, 发现添加 10% 海水培养的 HaCaT 细胞增殖与迁移能力均低于不添加海水培养的 HaCaT 细胞及与 hADSC 共培养且添加 10% 海水培养的 HaCaT 细胞(P 均 < 0.05), 而不添加海水培养的 HaCaT 细胞和与 hADSC 共培养且添加 10% 海水培养的 HaCaT 细胞增殖与迁移能力差异无统计学意义($P > 0.05$)。添加 10% 海水培养的 HaCaT 细胞 EGFR/ERK 信号通路表达受到抑制, 与不添加海水培养的 HaCaT 细胞及与 hADSC 共培养且添加 10% 海水培养的 HaCaT 细胞相比差异有统计学意义($P < 0.05$); 不添加海水培养的 HaCaT 细胞和与 hADSC 共培养且添加 10% 海水培养的 HaCaT 细胞 EGFR/ERK 信号通路表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 海水可阻碍 EGFR/ERK 信号通路的激活、抑制 HaCaT 细胞的增殖与迁移; hADSC 可促进 EGFR/ERK 信号通路的激活, 减轻海水对 HaCaT 细胞增殖与迁移能力的抑制作用。

[关键词] 海水; 表皮细胞; 人脂肪干细胞; 细胞增殖; 细胞迁移**[中图分类号]** R 641 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2019)10-1062-07

Adipose-derived stem cells alleviate the inhibition effect of seawater against epidermal cell proliferation and migration through EGFR/ERK pathway

XIONG Jia-chao^{1△}, JI Bo-yao^{2△}, WANG Liu-jun², LIU Zhi-xiao², SONG Jian-xing^{1*}

1. Department of Plastic Surgery, Changhai Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

2. Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To explore the possible mechanism of human adipose-derived stem cells (hADSCs) promoting seawater immersion wound healing *in vitro*. **Methods** Human epidermal cell line HaCaT cells and artificially simulated seawater were used to establish an *in vitro* model of cell damage induced by seawater immersion. hADSCs were isolated from human adipose tissues, and a co-culture system of HaCaT cells and hADSCs was established. The proliferation and migration abilities of HaCaT cells were detected by cell counting kit-8 (CCK-8), 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) cell proliferation detection kit and cell scratch test. The activation levels of epidermal growth factor receptor (EGFR)/extracellular-regulated protein kinase (ERK) signaling pathway were detected by Western blotting and real-time quantitative PCR. **Results** The proliferation of HaCaT cells cultured with the medium containing 10% artificial seawater was significantly inhibited compared with the cells cultured without artificial seawater ($P < 0.05$). The proliferation and migration abilities of seawater-cultured

[收稿日期] 2019-07-27 **[接受日期]** 2019-10-09**[基金项目]** 海军军医大学(第二军医大学)长海医院“1255”学科建设计划(CH125550900). Supported by the “1255” Subject Construction Program of Changhai Hospital of Naval Medical University (Second Military Medical University) (CH125550900).**[作者简介]** 熊佳超, 硕士生. E-mail: xiongjiachao1994@126.com; 嵇铂尧, 硕士生. E-mail: 780850021@qq.com

△共同第一作者(Co-first authors).

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31161811, E-mail: drsong@163.com

HaCaT cells were significantly lower than those cultured without seawater and those with hADSCs and seawater (all $P < 0.05$), but there were no significant differences in cell proliferation or migration abilities between the HaCaT cells cultured without seawater and those co-cultured with hADSCs and seawater ($P > 0.05$). The expression of EGFR/ERK signaling pathway in seawater-cultured HaCaT cells was significantly inhibited compared with the cells cultured without seawater and those co-cultured with hADSCs and seawater ($P < 0.05$), while the expression of EGFR/ERK signaling pathway was not significantly different between the HaCaT cells cultured without seawater and those co-cultured with hADSCs and seawater ($P > 0.05$).

Conclusion Seawater can block the activation of EGFR/ERK signaling pathway and inhibit the proliferation and migration of HaCaT cells. hADSCs can promote the activation of EGFR/ERK signaling pathway and reduce the inhibition effect of seawater against proliferation and migration of HaCaT cells.

[Key words] seawater; epidermal cells; human adipose-derived stem cells; cell proliferation; cell migration

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2019, 40(10): 1062-1068]

随着海上事业的发展, 海上作业人员的各种开放性损伤屡见不鲜。海水是一种复合的高渗碱性溶液, 其化学成分主要是 NaCl, 还包括不同比例的 KCl、CaCl₂、MgCl₂ 和 MgSO₄ 等; 此外, 海水中还含有大量微生物, 尤其是革兰阴性菌^[1]。研究表明, 损伤组织受到海水长时间浸泡后, 容易造成组织坏死范围增大、渗出物增多、炎症反应增强、组织修复延缓等病理变化, 导致创面愈合困难, 愈合时间延长^[2-5]。

人脂肪干细胞 (human adipose-derived stem cell, hADSC) 是从人体脂肪组织中分离的多向分化潜能干细胞^[6]。研究发现, hADSC 可迁移到受损部位, 分化为皮肤附属器官修复受损皮肤; 还可旁分泌多种生长因子, 如表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和碱性成纤维生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 等, 促进表皮生成和创面愈合^[7-10]。上皮化效应是皮肤创面修复的重要组成部分, 其中 EGF 是创面上皮化的重要生长因子^[11]。本研究拟观察海水对表皮细胞增殖与迁移能力的影响及 hADSC 能否减轻海水的损伤作用, 并从表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) / 细胞外调节蛋白激酶 (extracellular-regulated protein kinase, ERK) 通路探讨相关机制, 以期减轻海水的损伤效应提供新的治疗策略。

1 材料和方法

1.1 细胞与试剂 人永生化表皮细胞系 HaCaT 细胞购自美国模式培养物集存库, I 型胶原酶、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、青霉素/链霉素双

抗溶液、胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司, 低糖培养液、高糖培养液、磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 购自美国 HyClone 公司, 流式抗体 CD29、CD105、CD45、人白细胞 DR 抗原 (human leukocyte antigen DR, HLA-DR) 购自美国 BD 公司, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体购自美国 CST 公司, PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser、TB Green Premix Ex Taq II 购自日本 TaKaRa 公司, 成骨诱导培养液与成脂诱导培养液套装均购自广州赛业生物有限公司, 活细胞计数试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8) 购自上海碧云天生物技术有限公司, 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU) 细胞增殖检测试剂盒购自广州锐博生物技术有限公司, TRNzol 总 RNA 提取试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司。PCR 引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

1.2 hADSC 的分离与培养 人体皮下脂肪标本取自海军军医大学 (第二军医大学) 长海医院 5 名健康女性的腹部吸脂术后组织。使用眼科剪将脂肪组织剪碎并用低糖培养液多次洗涤以除去大量脂滴, 然后将洗涤后的脂肪组织置于含有 I 型胶原酶 (1 mg/mL) 的低糖培养液中, 于 37 °C 水浴中温和搅拌消化 40 min。最后, 将样品用 70 μm 筛网过滤, 300×g 离心 30 min 后去上清。细胞沉淀使用含有 10% FBS 和 1% 青霉素/链霉素双抗溶液的低糖培养液重悬, 并置于 5% CO₂ 细胞培养箱中培养。待细胞贴壁后, 隔天更换含有 10% FBS 的新鲜低糖培养液, 并进行传代培养^[12]。本研究经海军军医大学 (第二军医大学) 长海医院伦理委员会审批, 所有组织标本的使用均取得患者知情同意。

1.3 hADSC 的特性鉴定

1.3.1 成骨(成脂)诱导与鉴定 待第3代 hADSC 细胞生长至 80%~90% 融合度时,更换为成骨或成脂分化培养液诱导培养 4 周。hADSC 诱导 4 周后,使用 4% 中性甲醛溶液固定 30 min 并用 PBS 洗涤 2 次。随后,成骨诱导细胞使用茜素红 S 染液染色 5 min,成脂诱导细胞使用油红 O 染液染色 30 min。染色结束后,使用 PBS 多次洗涤染色细胞以除去多余染料,在光学显微镜(日本 Olympus 公司)下观察并捕获图像,以观察和评估成骨分化或成脂分化的状态。

1.3.2 hADSC 的流式鉴定 用胰蛋白酶消化第 3 代 hADSC 并离心,使用 PBS 重悬细胞沉淀并进行细胞计数。取 100 μL 含有约 1×10^6 个细胞的 PBS 悬液,加入异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的 CD29、CD105、CD45、HLA-DR 抗体,室温避光孵育 20 min 后通过流式细胞仪(ImageStreamX Mark II, 美国 Amnis 公司)计算阳性细胞比例^[13]。

1.4 人工海水的配制 根据文献报道的方法^[4]配制人工海水,主要指标:渗透压($1\ 250.00 \pm 11.52$) mmol/L, pH 值 8.2, 钠离子浓度(630.00 ± 5.33) mmol/L, 钾离子浓度(10.88 ± 0.68) mmol/L, 氯离子浓度(658.80 ± 5.25) mmol/L。实验用人工海水需经 0.22 μm 过滤器过滤后使用。

1.5 细胞分组与培养方式 将 HaCaT 细胞分为 3 组。对照组:用普通高糖培养液培养 HaCaT 细胞;海水组:用混有一定比例海水的高糖培养液培养 HaCaT 细胞;hADSC 共培养组:用混有一定比例海水的高糖培养液培养细胞,将 HaCaT 细胞与 hADSC 分别在培养皿与 Transwell 小室中共培养^[14],即将 hADSC (1×10^5 /孔)接种到 Transwell 小室的 0.4 μm 聚碳酸酯膜上,下室接种 HaCaT 细胞 (1×10^4 /孔),共培养 2 d。

1.6 细胞增殖实验

1.6.1 CCK-8 检测细胞增殖 将 HaCaT 细胞以 2 000/孔的密度接种在 96 孔板中。待培养 12 h 细胞贴壁后,再以含不同比例(体积分数为 5%、10%、20%)海水的高糖培养液培养 24、48 或 72 h。向处理后的细胞培养孔中加入 10 μL CCK-8 试剂,并置于 5% CO_2 细胞培养箱中孵育 2 h。最后,将培养皿置于酶标仪(美国 Thermo Scientific 公司)上,于 450 nm 波长处检测光密度值。

1.6.2 EdU 试剂盒检测细胞增殖^[15] 将 HaCaT 细胞以 1×10^5 /孔的密度接种至 24 孔板并正常培养至 70%~80% 融合度后,根据分组情况更换为对应的培养方式培养 48 h。将 EdU 试剂盒 A 液以 1 000:1 的稀释比例添加到细胞培养液中并孵育 2 h,孵育后丢弃细胞培养液并用 PBS 洗涤细胞,随后每孔加入 500 μL 多聚甲醛溶液固定 30 min。固定完成后,每孔加入 500 μL 甘氨酸溶液(2 mg/mL)中和过量甲醛。然后,每孔加入 0.5% Triton X-100 渗透剂处理 10 min 并用 PBS 洗涤 5 min。细胞荧光染色:将 Apollo 反应溶液加入培养皿中,在室温下避光孵育 30 min;每孔再次加入 0.5% Triton X-100 渗透剂处理 10 min;将 Hoechst33342 反应溶液加入培养皿中并在室温下避光孵育 30 min。染色结束后,使用 PBS 清洗细胞 2~3 次,并于荧光显微镜(德国 Zeiss 公司)下拍照观察。

1.7 细胞划痕迁移实验^[16] 将 HaCaT 细胞以 1×10^6 /孔接种于 6 孔板中并正常培养细胞至 80%~90% 融合度。用 10 μL 无菌移液枪头尖端刮擦细胞,使之形成一道竖直划痕,用 PBS 洗涤细胞并根据分组情况更换对应的细胞培养方式。最后,使用倒置相差显微镜(德国 Zeiss 公司)于 4 个时间点(0、12、24 和 36 h)观察划痕修复状况并拍照,计算修复面积:修复面积(%) = (初始划痕面积 - 测量时残留划痕面积) / 初始划痕面积 $\times 100\%$ 。

1.8 EGFR 蛋白表达与 ERK 通路的激活状况检测 使用蛋白质印迹法检测各组 HaCaT 细胞 EGFR 蛋白表达水平,实时定量 PCR 检测 ERK 通路 mRNA 的表达。将 HaCaT 细胞以 1×10^5 /孔接种于 6 孔板中,正常培养至 70%~80% 融合度后,根据分组情况更换为对应的培养方式培养 48 h。

收集 1×10^6 个细胞,提取总蛋白与总 RNA。蛋白质印迹法:经电泳与转膜后,置于 5% 小牛血清液中室温封闭 2 h,加入一抗 GAPDH(1:1 000)与 EGFR(1:1 000)抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育过夜。使用 TBST 溶液洗膜 3~4 次,加入二抗(1:4 000)室温孵育 2 h 后采用电化学发光法显影,然后使用 ImageJ 软件分析条带蛋白表达量。

实时定量 PCR:将 RNA 反转录为 cDNA,并以 cDNA 为模板、以 GAPDH 为内参基因进行实时定量 PCR。引物序列:GAPDH 正义引物为 5'-TGT

GGG CAT CAA TGG ATT TGG-3', 反义引物为 5'-ACA CCA TGT ATT CCG GGT CAA T-3'; ERK 正义引物为 5'-TAC ACC AAC CTC TCG TAC ATC G-3', 反义引物为 5'-CAT GTC TGA AGC GCA GTA AGA TT-3'。反应体系为 20 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 10 s, 72 $^{\circ}$ C 10 s 重复 40 个循环。以目的基因与 GAPDH 表达量的比值来校准表达量。

1.9 统计学处理 采用 GraphPad Prism 7.0 软件和 SPSS 15.0 软件进行统计学分析。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 hADSC 特性鉴定 将分离培养的 hADSC 进行成骨分化或成脂分化培养 4 周后, 茜素红 S 染色可见成骨细胞特有的钙结节, 证实 hADSC 具有成骨分化的能力 (图 1A); 油红 O 染色可见脂肪细胞特有的饱满脂滴, 证实 hADSC 具有成脂分化的能力 (图 1B)。流式干细胞表面标志物检测结果显示 CD29、CD105 表面标志物呈强阳性, 但 CD45、HLA-DR 表面标志物呈阴性 (图 1C)。上述结果证实我们分离制备的 hADSC 符合行业内通常评价标准, 可以用于研究^[13]。

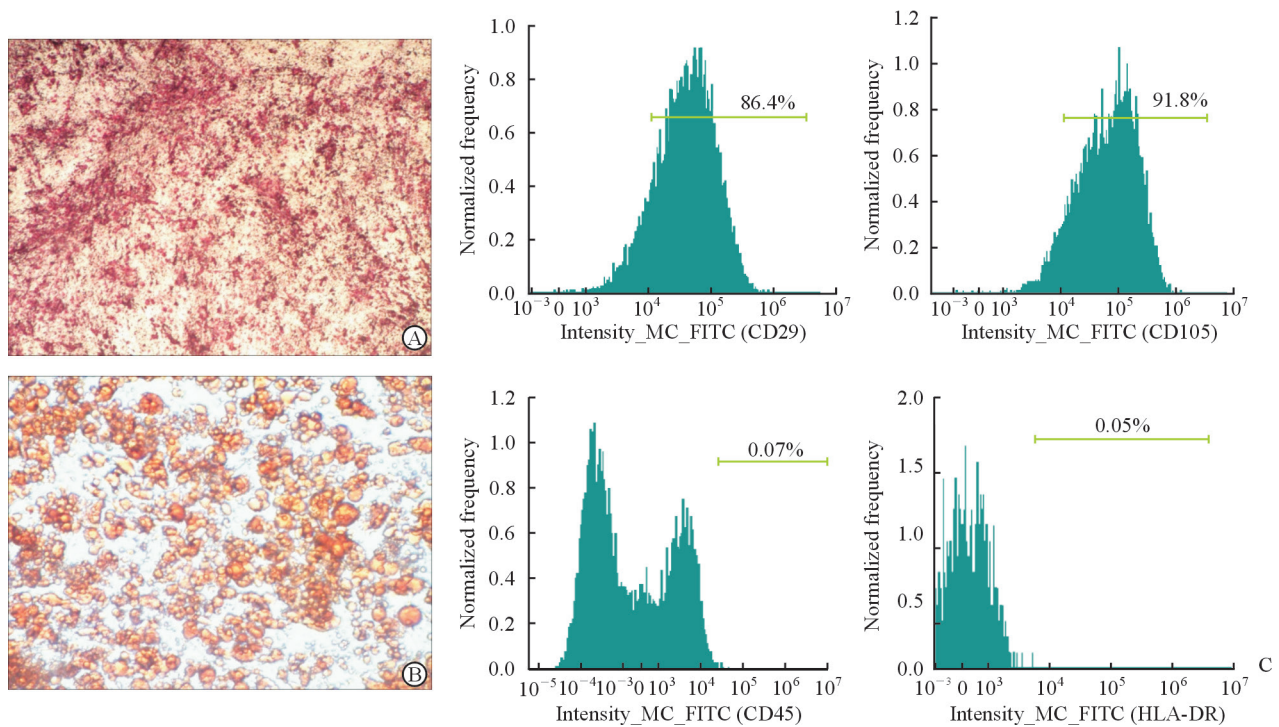


图 1 hADSC 特性鉴定

Fig 1 Characterization of hADSCs

A: Alizarin red S staining; B: Oil red O staining; C: hADSC surface marker detected by flow cytometry. hADSC: Human adipose-derived stem cell; HLA-DR: Human leukocyte antigen DR. Original magnification: $\times 200$ (A, B)

2.2 海水对 HaCaT 细胞增殖的影响 将人工海水以不同比例 (体积分数为 5%、10%、20%) 混入细胞培养液中, 通过 CCK-8 细胞增殖实验检测 HaCaT 细胞的增殖活力, 结果显示在 5% 海水组中, HaCaT 细胞的增殖活力与未添加海水的对照组比较差异无统计学意义; 然而在 10% 与 20% 海水组中, 细胞增殖活力受到抑制, 与未添加海水的对照组比较差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05), 并且随着培养时间的延长, 抑制效应持续存在 (图 2)。选择 10% 海水作为后续实验条件。

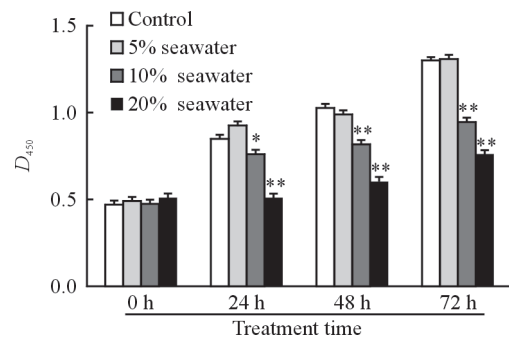


图 2 海水对 HaCaT 细胞增殖的影响

Fig 2 Effect of seawater on proliferation of HaCaT cells

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.3 hADSC 共培养对海水浸泡的 HaCaT 细胞增殖影响 通过 EdU 细胞增殖实验观察 hADSC 共培养对海水浸泡细胞增殖的影响,结果(图3)显示在 10% 海水组中,HaCaT 细胞增殖受到抑制,细胞的增殖活力与未添加海水的对照组比较差异有统计学意义 [(26.0±0.9)% vs (37.4±1.3)% , $P<0.01$]; 而 hADSC 共培养组 HaCaT 细胞增殖活力并未受到明显抑制,细胞的增殖活力高于海水组且差异有统计学意义 [(36.3±2.3)% vs (26.0±0.9)% , $P<0.01$].

2.4 hADSC 共培养对海水浸泡的 HaCaT 细胞迁移的影响 细胞划痕实验结果显示,与不添加海水的对照组相比,10% 海水组 HaCaT 细胞迁移能力在 12 h 即显示出划痕闭合延缓,并持续至 36 h,修复面积与对照组相比差异有统计学意义 ($P<0.01$); 而在同一观测时间点, hADSC 共培养组细胞的迁移能力相较于海水组显示出较高的愈合效率,修复面积与海水组相比差异有统计学

意义 ($P<0.01$)。在 36 h 观测时间点,对照组与 hADSC 共培养组细胞划痕几乎完全愈合,而海水组仍留有较大的划痕区域(图4)。

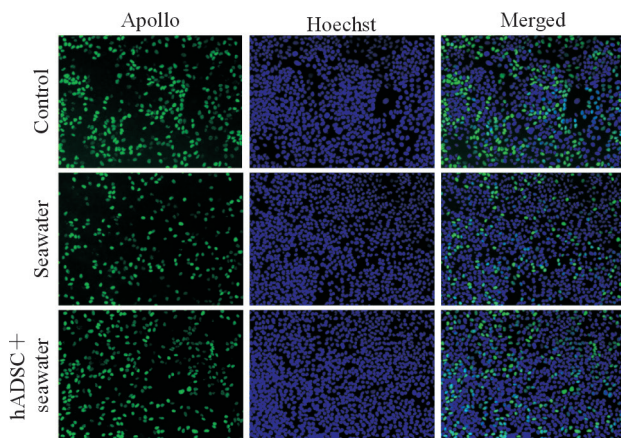


图3 hADSC 共培养对海水浸泡 HaCaT 细胞增殖的影响

Fig 3 Effect of co-culture with hADSCs on proliferation of HaCaT cells cultured with seawater

hADSC: Human adipose-derived stem cell; EdU: 5-ethynyl-2'-deoxyuridine. Original magnification: ×100

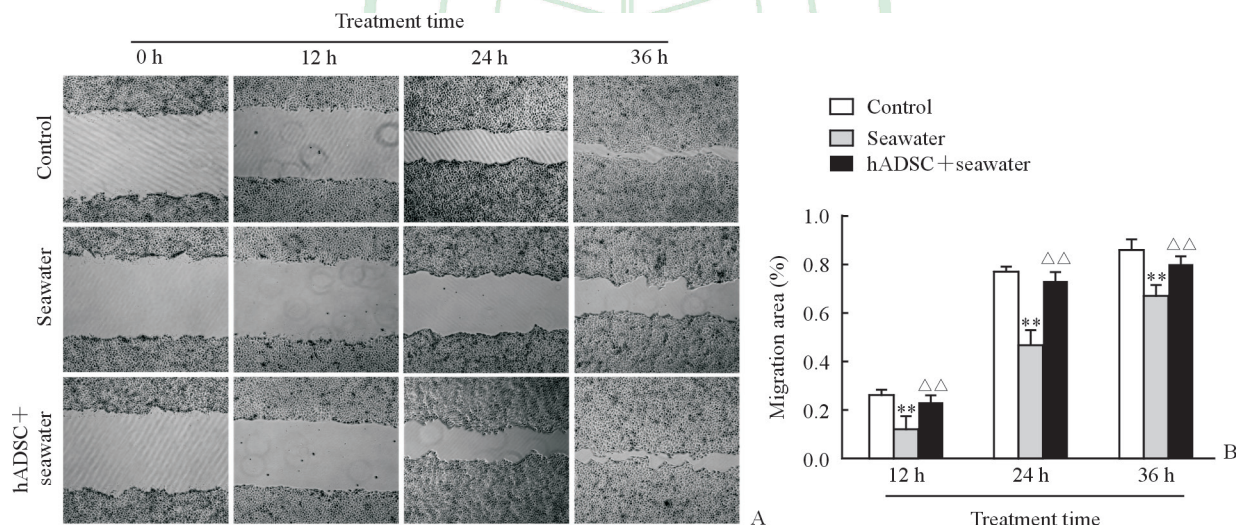


图4 hADSC 共培养对海水浸泡 HaCaT 细胞迁移能力的影响

Fig 4 Effect of co-culture with hADSCs on migration of HaCaT cells cultured with seawater

A: Three sets of scratch repairs at different time points; B: Migration area analysis results. hADSC: Human adipose-derived stem cell. Original magnification: ×50 (A). ** $P<0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P<0.01$ vs seawater group. $n=3, \bar{x}\pm s$

2.5 hADSC 共培养通过 EGFR/ERK 通路干预海水浸泡 HaCaT 细胞的增殖与迁移 蛋白质印迹分析结果显示,10% 海水组 HaCaT 细胞 EGFR 蛋白表达量低于对照组及 hADSC 共培养组,差异有统计学意义 ($P<0.01$); 而对照组与 hADSC 共培养组 EGFR 蛋白

表达量差异无统计学意义 ($P>0.05$, 图 5A)。实时定量 PCR 结果显示,10% 海水组 HaCaT 细胞 ERK mRNA 表达量低于对照组及 hADSC 共培养组,差异有统计学意义 ($P<0.01$); 而对照组与 hADSC 共培养组 ERK mRNA 表达量差异无统计学意义 ($P>0.05$, 图 5B)。

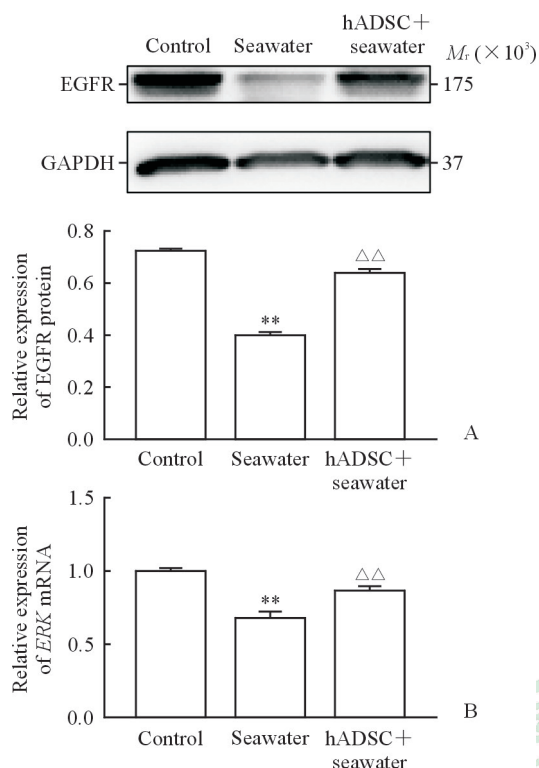


图 5 hADSC 共培养通过 EGFR/ERK 通路干预海水浸泡 HaCaT 细胞的增殖与迁移

Fig 5 Co-culture with hADSCs interfering proliferation and migration of HaCaT cells cultured with seawater via EGFR/ERK pathway

A: EGFR protein expression detected by Western blotting; B: ERK mRNA expression detected by real-time quantitative PCR. hADSC: Human adipose-derived stem cell; EGFR: Epidermal growth factor receptor; ERK: Extracellular-regulated protein kinase. ** $P < 0.01$ vs control group; $\triangle\triangle P < 0.01$ vs seawater group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

既往动物实验发现, 创伤合并海水浸泡后, 可导致伤口愈合时间明显延长, 形成慢性创面^[3]。海水浸泡后的创面组织细胞严重变性坏死, 加重创面损伤^[17]; 创面局部炎症反应增强, 局部炎症期延长, 使创面修复延缓^[18]; 此外, 大量研究表明, 海水浸泡可导致创面中 VEGF 表达减少, 创面新生血管内皮细胞和内皮祖细胞增殖受到抑制, 创面新生血管化受到阻碍, 造成创面愈合延缓^[19-21]。但目前尚未见关于海水是否影响表皮细胞增殖与迁移的研究报道。本研究将人表皮细胞系 HaCaT 细胞作为创面上皮化的代表细胞, 观察海水对其增殖与迁移的影响。真实环境下, 创面最表面应该接触

100% 海水, 随组织层次深入, 海水渗入的浓度可能递减, 本研究结果显示 10% 的海水已经对细胞的增殖能力具有较大的影响。

干细胞疗法是组织再生工程的重要组成部分。已有研究表明, hADSC 可通过自身分化、旁分泌和抗氧化凋亡等多种机制促进皮肤创面 (尤其是慢性皮肤创面) 的修复^[22-24]。因此, 我们将 HaCaT 细胞与 hADSC 在含 10% 海水的培养液中共培养, 探讨 hADSC 对海水浸泡的 HaCaT 细胞增殖与迁移能力的影响。结果显示 hADSC 共培养组 HaCaT 细胞增殖和迁移能力相较于海水组明显增强, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

Morino-Koga 等^[11]研究表明 EGF 的表达可激活 ERK 信号通路并促进细胞增殖。同时, EGF 是皮肤创面再上皮化最重要的生长因子。本研究通过蛋白质印迹法和实时定量 PCR 比较了对照组、海水组和 hADSC 共培养组 3 组 HaCaT 细胞 EGFR/ERK 通路的激活情况, 结果显示海水组 HaCaT 细胞 EGFR/ERK 通路的激活水平低于对照组及 hADSC 共培养组 HaCaT 细胞, 而对照组与 hADSC 共培养组 HaCaT 细胞 EGFR/ERK 通路的激活水平无明显差异。上述结果提示海水通过阻碍 EGFR/ERK 通路的激活, 抑制 HaCaT 细胞的增殖与迁移, 而 hADSC 可通过激活上述通路蛋白的表达, 减少海水对 HaCaT 细胞增殖与迁移的不利影响, 促进 HaCaT 细胞的增殖与迁移。Chen 等^[25]通过抗体阵列技术比较了干细胞和干细胞外泌体中细胞因子的组成, 结果显示干细胞外泌体相较于干细胞可显著富集 EGF。因此, 我们猜测在共培养体系中, hADSC 可能分泌富含多种生长因子的外泌体, 从而上调细胞 EGFR 的表达, 进而促进 HaCaT 细胞的增殖和迁移。

本研究从表皮再生 (创面再上皮化) 的角度对海水浸泡加重创面损伤的机制及 hADSC 促进海水浸泡创面愈合的机制进行探讨, 发现海水可通过阻碍 EGFR/ERK 通路的激活, 抑制表皮细胞的增殖与迁移能力, 而 hADSC 却可激活 EGFR/ERK 通路, 降低海水对表皮细胞的抑制效应。本研究结果有助于进一步探索海水浸泡创面产生的内在机制, 也为海水浸泡皮肤创面的再生提供了新的治疗思路。

[参 考 文 献]

- [1] MA J, WANG Y, WU Q, CHEN X, WANG J, YANG L. Seawater immersion aggravates burn-associated lung injury and inflammatory and oxidative-stress responses[J]. *Burns*, 2017, 43: 1011-1020.
- [2] 陈璧,丁国斌,唐建兵,董茂龙. 纳米烧(烫)伤敷料对海水浸泡兔软组织伤愈合的实验研究[J]. *中华航海医学与高气压医学杂志*,2002,9:147-151.
- [3] 宁浩勇,孟宇宏,王大鹏,刘肖,康筱玲,虞积耀. 创伤合并海水浸泡后愈合过程的病理学观察[J]. *中国比较医学杂志*,2009,19:32-35.
- [4] 薛小军,张文华,周松,李冉冉,张行健,陈文有,等. 伤后早期应用乌司他丁对海水浸泡兔腹部开放伤的干预效果[J]. *解放军医学杂志*,2013,25:35-38.
- [5] 宁浩勇,孟宇宏,王大鹏,刘肖,杨兴东,尚立群,等. 海水浸泡对伤口愈合时间影响的动物实验观察[J]. *中华航海医学与高气压医学杂志*,2008,15:84-86.
- [6] EKE G, MANGIR N, HASIRCI N, MACNEIL S, HASIRCI V. Development of a UV crosslinked biodegradable hydrogel containing adipose derived stem cells to promote vascularization for skin wounds and tissue engineering[J]. *Biomaterials*, 2017, 129: 188-198.
- [7] BERTOZZI N, SIMONACCI F, GRIECO M P, GRIGNAFFINI E, RAPOSIO E. The biological and clinical basis for the use of adipose-derived stem cells in the field of wound healing[J]. *Ann Med Surg (Lond)*, 2017, 20: 41-48.
- [8] HASSAN W U, GREISER U, WANG W. Role of adipose-derived stem cells in wound healing[J]. *Wound Repair Regen*, 2014, 22: 313-325.
- [9] TARTARINI D, MELE E. Adult stem cell therapies for wound healing: biomaterials and computational models [J/OL]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2015, 3: 206. doi: 10.3389/fbioe.2015.00206.
- [10] KIM W S, HAN J, HWANG S J, SUNG J H. An update on niche composition, signaling and functional regulation of the adipose-derived stem cells[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2014, 14: 1091-1102.
- [11] MORINO-KOGA S, UCHI H, MITOMA C, WU Z, KIYOMATSU M, FUYUNO Y, et al. 6-Formylindolo[3,2-b]carbazole accelerates skin wound healing via activation of ERK, but not Aryl hydrocarbon receptor[J]. *J Invest Dermatol*, 2017, 137: 2217-2226.
- [12] LIN Y C, GRAHOVAC T, OH S J, IERACI M, RUBIN J P, MARRA K G. Evaluation of a multi-layer adipose-derived stem cell sheet in a full-thickness wound healing model[J]. *Acta Biomater*, 2013, 9: 5243-5250.
- [13] ZHANG W, BAI X, ZHAO B, LI Y, ZHANG Y, LI Z, et al. Cell-free therapy based on adipose tissue stem cell-derived exosomes promotes wound healing via the PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 370: 333-342.
- [14] KIM W S, PARK B S, SUNG J H, YANG J M, PARK S B, KWAK S J, et al. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts[J]. *J Dermatol Sci*, 2007, 48: 15-24.
- [15] MA A Y, XIE S W, ZHOU J Y, ZHU Y. Nomegestrol acetate suppresses human endometrial cancer RL95-2 cells proliferation *in vitro* and *in vivo* possibly related to upregulating expression of SUFU and Wnt7a [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18. pii: E1337. doi: 10.3390/ijms18071337.
- [16] ZHANG L, XU P, WANG X, ZHANG M, YAN Y, CHEN Y, et al. Activin B regulates adipose-derived mesenchymal stem cells to promote skin wound healing via activation of the MAPK signaling pathway[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2017, 87: 69-76.
- [17] 马军,王甲汉,李志清,易朝辉. 大鼠烫伤合并海水浸泡后创面病理学改变的特点[J]. *南方医科大学学报*, 2009,29:1297-1299.
- [18] 赵晓明,王远征,郝光辉,刘红,肖云贵,叶海军. 海水浸泡对模拟海训皮肤擦伤大鼠炎症因子的影响[J]. *临床军医杂志*,2013,41:219-221.
- [19] 王培,管云枫,徐添颖,缪朝玉. G-CSF 对大鼠烧伤合并海水浸泡后内皮祖细胞的影响[J]. *东南国防医药*, 2013,15:1-3.
- [20] 王培,管云枫,徐添颖,缪朝玉. 地塞米松对大鼠烧伤合并海水浸泡后内皮祖细胞数目的影响[J]. *西南军医*, 2012,14:566-569.
- [21] 张爱群,孙富国,徐忠华,徐振轅,王昭英,陈录庭. VEGF 与 b-FGF 在海水浸泡大鼠烧伤皮肤组织中的表达[J]. *天津医药*,2011,39:1171-1172.
- [22] OWCZARCZYK-SACZONEK A, WOCIÓR A, PLACEK W, MAKSYMOWICZ W, WOJTKIEWICZ J. The use of adipose-derived stem cells in selected skin diseases (vitiligo, alopecia, and nonhealing wounds) [J/OL]. *Stem Cells Int*, 2017, 2017: 4740709. doi: 10.1155/2017/4740709.
- [23] KASAP Ş, BARUTÇU A, GÜÇ H, YAZGAN Ş, KIVANÇ M, VATANSEVER H S. Effects of keratinocytes differentiated from embryonic and adipogenic stem cells on wound healing in a diabetic mouse model[J]. *Wounds*, 2017, 29: 297-305.
- [24] CHANG Y W, WU Y C, HUANG S H, WANG H D, KUO Y R, LEE S S. Autologous and not allogeneic adipose-derived stem cells improve acute burn wound healing[J/OL]. *PLoS One*, 2018, 13: e0197744. doi: 10.1371/journal.pone.0197744.
- [25] CHEN L, XIANG B, WANG X, XIANG C. Exosomes derived from human menstrual blood-derived stem cells alleviate fulminant hepatic failure[J/OL]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8: 9. doi: 10.1186/s13287-016-0453-6.