论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201410131

OPN诱导小鼠MSCs向表皮细胞分化促进创面愈合的研究

王文平[1],李 薇[2],陈 亮[1],王珍祥[1],李世荣[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院整形美容外科[1];233030 安徽蚌埠,蚌埠医学院烧伤整形科[2])

[摘要] **目的** 以骨桥蛋白(osteopontin,OPN)基因敲除小鼠及野生型小鼠为研究对象,探讨骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)分化为表皮细胞的潜能及骨桥蛋白在分化过程中的作用。**方法** 体外实验:将分离培养的野生型(WT)和基因敲除型(KO)新生鼠(鼠龄1 d)MSCs鉴定纯度后分别设为WT组和KO组,取其第3代分别在表皮转化培养体系中孵育,通过镜下观察、流式细胞术、免疫荧光染色、Western blot等方法,比较两组表皮细胞标志物(CK14)表达水平的差异。动物实验:实验分4组,WT组小鼠创周注射GFP-MSCs(WT/MSCs)组,WT小鼠创周注射PBS(WT/PBS)组,KO小鼠创周注射GFP-MSCs(KO/MSCs)组,KO小鼠创周注射PBS(KO/PBS)组,每组各8只雄鼠,鼠龄6~8周,体质量20~25 g,按分组将分离培养的GFP-MSCs和PBS注射到创周,观察创面愈合及GFP-MSCs向表皮细胞分化的情况。**结果** 分离培养的MSCs呈梭形或成纤维细胞样生长,流式细胞术检测MSCs的纯度超过91%;诱导分化第12、17天的两组细胞检测发现,WT组和KO组的细胞均表达CK14;第17天免疫荧光结果示WT组CK14的表达阳性率(0.936 3±0.009 5)明显高于KO组(0.647 5±0.023 1),($P<0.01$);Western blot检测结果也显示KO组的CK14表达量(0.389 4±0.016 8)明显低于WT组(0.614 6±0.015 3),($P<0.01$)。动物实验WT/PBS组创面愈合速度快于KO/PBS组($P<0.05$),WT/MSCs组的创面愈合速度快于WT/PBS组($P<0.05$),注射的GFP-MSCs向表皮细胞分化的能力WT/MSCs组强于KO/MSCs组($P<0.05$)。**结论** OPN在体内、体外均可诱导MSCs分化为表皮细胞,进而促进创面愈合。

[关键词] 愈合;间充质干细胞(MSCs);骨桥蛋白(OPN);表皮;分化
[中图法分类号] R322.991; R392.21; R341 [文献标志码] A

Osteopontin induces differentiation of mouse marrow mesenchymal stem cells into epithelial cells and promotes the wound healing *in vivo*

Wang Wenping[1], Li Wei[2], Chen Liang[1], Wang Zhenxiang[1], Li Shirong[1] ([1]Department of Cosmetic Plastic Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Burn and Plastic Surgery, Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui Province, 233030, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the role of osteopontin (OPN) in the differentiation of mouse marrow mesenchymal stem cells (MSCs) into epithelial cells (OPN) with knockout mice and wild type mice as experiment objects. **Methods** *In vitro* experiment: the MSCs were isolated and cultivated from wild type (WT) and knockout (KO) newborn mice (aged 1 day old) and identified for the purity. The cells at the third-generation were cultured to join epithelial transformation culture system. Microscopy, flow cytometry, immunofluorescence staining and Western blotting were used to observe and compare the expression levels of epidermal cells markers (CK14) of the 2 groups. Animal experiment: the experiment was divided into 4 groups, such as WT mice receiving GFP-MSCs injection around the wound (WT/MSCs group), WT mice injected with PBS (WT/PBS group), KO mice injected with GFP-MSCs (KO/MSCs group), and KO mice

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81071563,81272102);重庆市应用开发项目(2014yykfA0158)
[通信作者] 李世荣,E-mail:zhengxing@ vip.163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141210.1648.016.html(2014-12-10)

injected with PBS (KO/PBS group). Each group had 8 male mice, at the age of 6 to 8 weeks and weighing 20 to 25 g. According to the grouping, cultivated GFP-MSCs and PBS were injected around the wound, and the wound healing and differentiation of GFP-MSCs into epithelial cells were observed. **Results** The isolated and cultured MSCs were seen in fusiform- or fibroblast-like. Flow cytometry confirmed the purity of separated MSCs was over 91%. CK14 was expressed in both WT and KO cells after induction for 12 and 17 d. Immunofluorescence staining also showed that the WT group had obviously higher expression level of CK14 than the KO group on the 17th day ($0.936\ 3 \pm 0.009\ 5$ *vs* $0.647\ 5 \pm 0.023\ 1$, $P<0.01$), and so was Western blot analysis ($0.614\ 6 \pm 0.015\ 3$ *vs* $0.389\ 4 \pm 0.016\ 8$, $P<0.01$). Animal experiments also showed wound healing of WT/PBS group was significantly faster than the KO/PBS group ($P<0.05$). Moreover, the wound healing of WT/MSCs group was faster than WT/PBS group ($P<0.05$) and the capacity of injected GFP-MSCs to differentiate into epithelial WT/MSCs was also stronger than KO/MSCs ($P<0.05$). **Conclusion** OPN induces MSCs to differentiate into epithelial cells *in vitro* and *in vivo*, and promotes the wound healing.

[**Key words**] healing; mesenchymal stem cells; osteopontin; epithelium; differentiation

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81071563, 81272102) and the Application Development Project of Chongqing (2014yykfA0158). Corresponding author: Li Shirong, Tel: 86-23-68754192, E-mail: zhengxing@vip.163.com

皮肤的损伤修复需要表皮细胞不断增殖迁移以维持皮肤表面完整性。而间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有高度自我更新能力和多向分化潜能,能向多种细胞及组织分化以修复缺损,尤其向表皮细胞的转化已被应用于创面组织的修复[1-4]。研究证实,小鼠或人类等不同物种的MSCs均可在一定条件下分化为表皮细胞[5-8]。我们既往研究发现创面组织内MSCs与创面局部骨桥蛋白(Osteopontin, OPN)的高表达密切相关,两者在体内体外的定位存在关联性[1]。骨桥蛋白又称为分泌磷酸蛋白1(secreted phosphoprotein 1, SPP1)、骨唾液酸蛋白I(bonesialoprotein I)和尿石蛋白(urinary stone protein),属于细胞外基质(extracelluar matrix, ECM)蛋白,在血液、心肌组织、肾脏、骨骼、脑组织等不同的组织细胞中均有所发现。研究证明OPN对炎性细胞、成纤维细胞、表皮细胞、内皮细胞等促进愈合细胞的调控发挥重要作用[2]。OPN调控创面愈合的多个关键环节,但对MSCs向表皮细胞转化的研究很少,在创面愈合中的作用尚不明确。

本研究从野生型(WT)和$OPN^{-/-}$(KO)小鼠的骨髓分离并培养MSCs,应用已建立的MSCs表皮诱导分化体系,诱导其分化为表皮细胞;以免疫荧光、流式细胞术以及Western blot等方法检测OPN的表达与MSCs分化为表皮细胞的效率之间的关系,并通过动物实验研究OPN在MSCs向表皮细胞转化、促进创面愈合过程中的作用,为临床损伤修复提供新的理论依据与治疗手段。

1 材料与方法

1.1 动物及试剂

雄性骨桥蛋白基因敲除(KO)小鼠(美国Jackson公司)和野生型(WT)C57/BL6小鼠(大坪医院野战外科研究所实验动物中心),各16只,体质量20~25 g,WT-GFP-C57BL/6新生鼠用于分离培养GFP-MSCs,由大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。饲养条件:20~25 ℃,充足的水和食物。实验过程中对动物的处理符合医学伦理学标准。实验试剂:MSCs培养基(赛业广州公司);重组HGF、IGF-I、FGF(美国Peprotech公司),CD34-FITC、CD105-PE(美国Ebioscience公司);兔抗小鼠单克隆CK14抗体(美国Abcam公司)等。

1.2 方法

1.2.1 MSCs原代提取培养 取KO及WT新生小鼠(鼠龄1 d),75%乙醇浸泡5 min,冷无菌PBS冲洗,剪下四肢,剔出长骨,完全剪碎骨组织,加入BMSCs完全培养液,重悬、混匀后转移至无菌塑料培养瓶,于37 ℃,5% CO_2的恒温培养箱培养,24 h后换液去除组织块,每3~4天传代一次。

1.2.2 MSCs纯度流式检测及OPN鉴定 收集WT及KO两组P3细胞,计数分装于EP管内,5×10^5/管,$300\times g$离心5 min后100 μL PBS重悬。设置分组:空白对照、CD105-PE单染、CD34-FITC单染、CD105-PE及CD34-FITC双染($n=3$),按分组分别加入2 μL抗体,4℃孵育1 h,加入900 μL PBS,$300\times g$室温离心5 min,弃上清加入PBS 300 μL,吹打混匀后转移至流式管内,流式细胞术检测CD105及CD34的表达情况。全蛋白提取试剂盒提取WT组和KO组MSCs的蛋白,经Western blot鉴定其OPN的表达。

1.2.3 MSCs体外表皮细胞诱导分化 取第3代WT和KO MSCs,终止消化,离心,重悬,调整细胞至

1×10^6/mL,取 1 mL 加入表皮转化培养体系(F12-DMEM +2% FBS +10 ng/mL IGF-I +20 ng/mL HGF +10 ng/mL b-FGF +100 U/mL 青霉素 +100 U/mL 链霉素),接种于培养瓶,放入 37 ℃、5% CO_2 培养箱,每 3 d 换液 1 次,每日镜下观察细胞形态变化至第 17 天。

1.2.4 MSCs 体外诱导分化后流式细胞术检测 收集诱导分化第 12、17 天的两组细胞,5×10^5 cell/管,4% 多聚甲醛 100 μL 室温 20 min,0.05% Triton 100 μL 室温 10 min,滴加一抗 CK14(1∶100)40 ~ 50 μL,37 ℃ 60 min,滴加 40 ~ 50 μL 荧光二抗(山羊抗鼠 IgG),37 ℃ 30 min,每两步间均 PBS 清洗,300 × g 室温离心 5 min。最后弃上清加入 PBS 300 μL,吹打混匀后流式细胞术检测。

1.2.5 MSCs 体外诱导分化后 CK14 免疫荧光染色 取第 3 代 WT 和 KO MSCs,终止消化、离心、重悬、稀释形成密度为 1×10^6/mL 的液体,取 100 μL 置于放有细胞爬片的 12 孔板内,加入诱导培养体系,17 d 后取出爬片,温热 PBS 清洗、多聚甲醛固定,3% BSA 室温封闭 1 h,滴加一抗 CK14(1∶500)4 ℃过夜,滴加荧光二抗(山羊抗鼠 IgG)37 ℃孵育 1 h,DAPI 染核,封片,立即在共聚焦显微镜下观察。

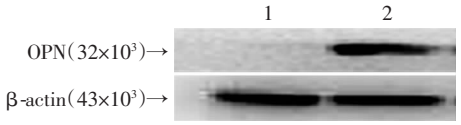
1.2.6 MSCs 体外诱导分化后 Western blot 检测 CK14 表达情况 诱导分化的第 17 天,提取 WT 组和 KO 组的细胞总蛋白,BCA 法测浓度后,8% 的聚丙烯酰胺凝胶按每孔等量 30 μg 上样,积层胶 80 V,分离胶 120 V 电泳,100V 转膜 90 min,转好的 PVDF 膜 5% BSA 封闭 1 h,CK14(1∶300)、β-actin(1∶1 000)一抗孵育,4 ℃振荡过夜。TBST 洗涤后滴加二抗(1∶1 000),37 ℃孵育 1 h,显影成像。Imagej 分析软件扫描特异性条带净灰度值后 β-actin 作为内参,计算两者比值分析蛋白相对表达量。

1.2.7 创面模型建立及 GFP-MSCs 创周注射 创面模型建立:将 4 组小鼠以 1% 戊巴比妥 150 μL 腹腔注射麻醉,脱毛膏脱去背部毛发,勿伤及皮肤,碘伏消毒 2 次后,打孔器在小鼠背部形成直径 0.5 cm 深达筋膜层的创面[9]。GFP-MSCs 创周注射:取新生 1 d 的 WT-GFP 小鼠,培养的第 3 代 GFP-MSCs 以 PBS 重悬形成 5×10^5/50 μL 的细胞悬液,在距离创缘 0.5 cm 处分别均匀注射于 WT/MSCs 组和 KO/MSCs 组小鼠,同时以等量的 PBS 注射于 WT/PBS 组和 KO/PBS 组小鼠作为对照。实验后 1、3、5、7 d 创面拍照,计算创面愈合百分率[创面愈合百分率 =(初始创面面积 − 观察日创面面积)÷初始创面面积 × 100%],并切取创面组织做组织切片免疫荧光染色检测 MSCs 向表皮细胞分化情况。

1.3 统计学分析 实验重复 3 次以上,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,使用 SPSS 13.0 统计分析软件分析,两组间比较用 t 检验。

2 结果

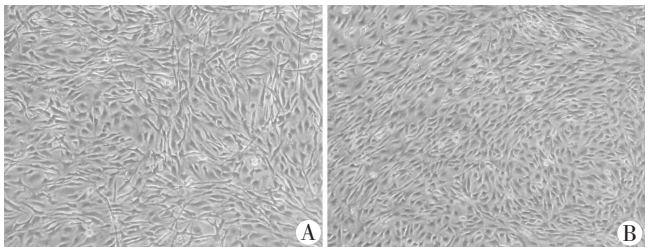
2.1 原代培养的 MSCs 形态学特征、流式细胞术鉴定及 OPN 表达检测 原代培养的细胞镜下见胞体呈多边形,较小,呈放射状集落生长;随着细胞生长,贴壁细胞逐渐增大,呈成纤维细胞样。MSCs 的特征为 CD105 阳性,而 CD34 阴性。本实验 MSCs 的 CD105 阳性而 CD34 阴性表达率为:WT 组 94.04%、KO 组 91.57%,鉴定结果提示培养的细胞为高纯度 MSCs。Western blot 结果示野生型小鼠 MSCs 表达 OPN,而 $OPN^{-/-}$ 小鼠 MSCs 不表达 OPN 蛋白(图 1)。



1:KO 组;2:WT 组

图 1 Western blot 检测两组 MSCs OPN 蛋白的表达

2.2 两组 MSCs 体外表皮细胞诱导分化结果 MSCs 细胞贴壁生长。培养第 12 天部分长梭形细胞形态由梭形逐渐变扁变宽,第 17 天时细胞呈现出典型的铺路石样改变(图 2),符合表皮分化的特点。



A:KO 组;B:WT 组

图 2 两组 MSCs 诱导分化第 17 天的形态学观察
(倒置显微镜 ×100)

2.3 流式细胞术检测 MSCs 诱导分化后 CK14 表达 WT 组和 KO 组的细胞均有表皮细胞标记 CK14 表达,表明 MSCs 向表皮诱导分化成功。第 12 天时两组表皮分化率分别为:KO 组 31.67%、WT 组 37.88%;第 17 天时分别为:KO 组 63.84%、WT 组 90.40%。

2.4 免疫荧光检测两组 MSCs 诱导分化后 CK14 表达 第 17 天免疫荧光检测发现,WT 组和 KO 组的细胞均表达 CK14,表明 MSCs 向表皮诱导分化,WT 组 CK14 的表达阳性比率(0.936 3 ± 0.009 5),明显高于 KO 组[(0.647 5 ± 0.023 1),(P < 0.01,图 3)]。

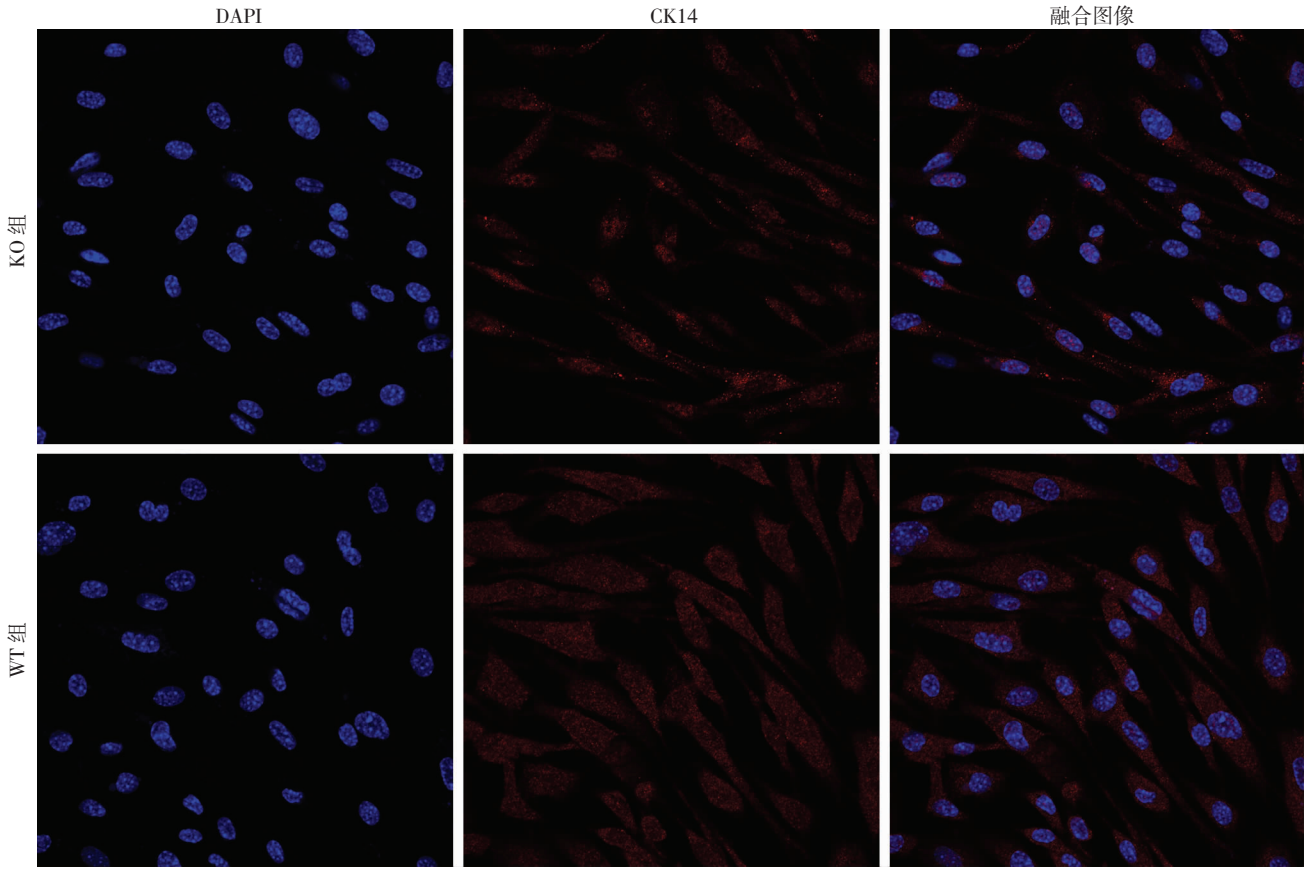
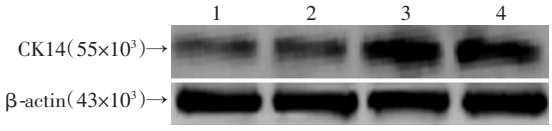


图3 两组MSCs诱导分化第17天CK14免疫荧光染色 （激光共聚焦显微镜 ×400）

2.5 Western blot检测MSCs体外诱导分化的结果

WT组CK14蛋白的表达为(0.614 6±0.015 3)，KO组(0.389 4±0.016 8)，WT组明显高于KO组($P<0.01$，图4)。



1、2：KO组；3、4：WT组

图4 Western blot检测两组MSCs诱导分化第17天CK14的表达

2.6 动物创面愈合率及GFP-MSCs上皮转化检测

伤后1、3、5、7天创面拍照计算创面愈合百分率，以注射PBS的野生型小鼠为对照，注射PBS的敲基因小鼠创面愈合率较前者低($P<0.05$)，OPN在创面愈合过程具有重要作用；同样以注射PBS的野生型小鼠为对照，注射MSCs的野生型小鼠创面愈合率较注射PBS的高($P<0.05$)，注射的MSCs能够加速创面的愈合(图5，表1)。第3、5、7天免疫荧光染色，注射入创面内的MSCs表达表皮标志物CK14，KO/MSCs组表达弱于WT/MSCs组($P<0.05$)，MSCs在创面内分化成为了表皮细胞参与创面修复(图6，表2)。

表1 4组小鼠创面第1、3、5、7天的愈合率比较($n=5$，$\bar{x}\pm s$)

组别	1 d	3 d	5 d	7 d
WT/PBS组	21.64±4.90	37.55±4.97	58.53±1.59	65.02±3.11
KO/PBS组	14.17±2.45[a]	26.85±3.40[a]	43.66±3.67[a]	58.02±2.56[a]
KO/MSCs组	20.79±3.60	44.10±6.35	58.52±6.33	69.07±3.06
WT/MSCs组	39.47±3.87[a]	60.17±2.53[a]	71.11±1.87[a]	80.53±3.13[a]

a：$P<0.05$，与WT/PBS组比较

表2 WT/MSCs、KO/MSCs组创面第3、5、7天CK14免疫荧光统计结果($n=4$，$\bar{x}\pm s$)

组别	3 d	5 d	7 d
KO/MSCs组	1.032 5±0.124 5[a]	1.025 0±0.091 5[a]	1.032 5±0.053 2[a]
WT/MSCs组	1.227 5±0.140 0	1.387 5±0.136 5	1.877 5±0.257 3

a：$P<0.05$，与WT/MSCs比较

3 讨论

大面积深度皮肤创伤、自体皮皮源十分缺乏的患者，上皮化不足是创面难以愈合的关键。研究认为，以MSCs为种子细胞，应用组织工程皮肤修复创面可以较好地解决皮源供给以及皮肤结构、功能重建等问题。MSCs经过体外扩增、纯化后仍然保持细胞的生物学特性，并能分化为多种类型的细胞[10-11]。在小鼠嵌合体模型中，骨髓MSCs能够增加创面中表皮与成纤维细胞

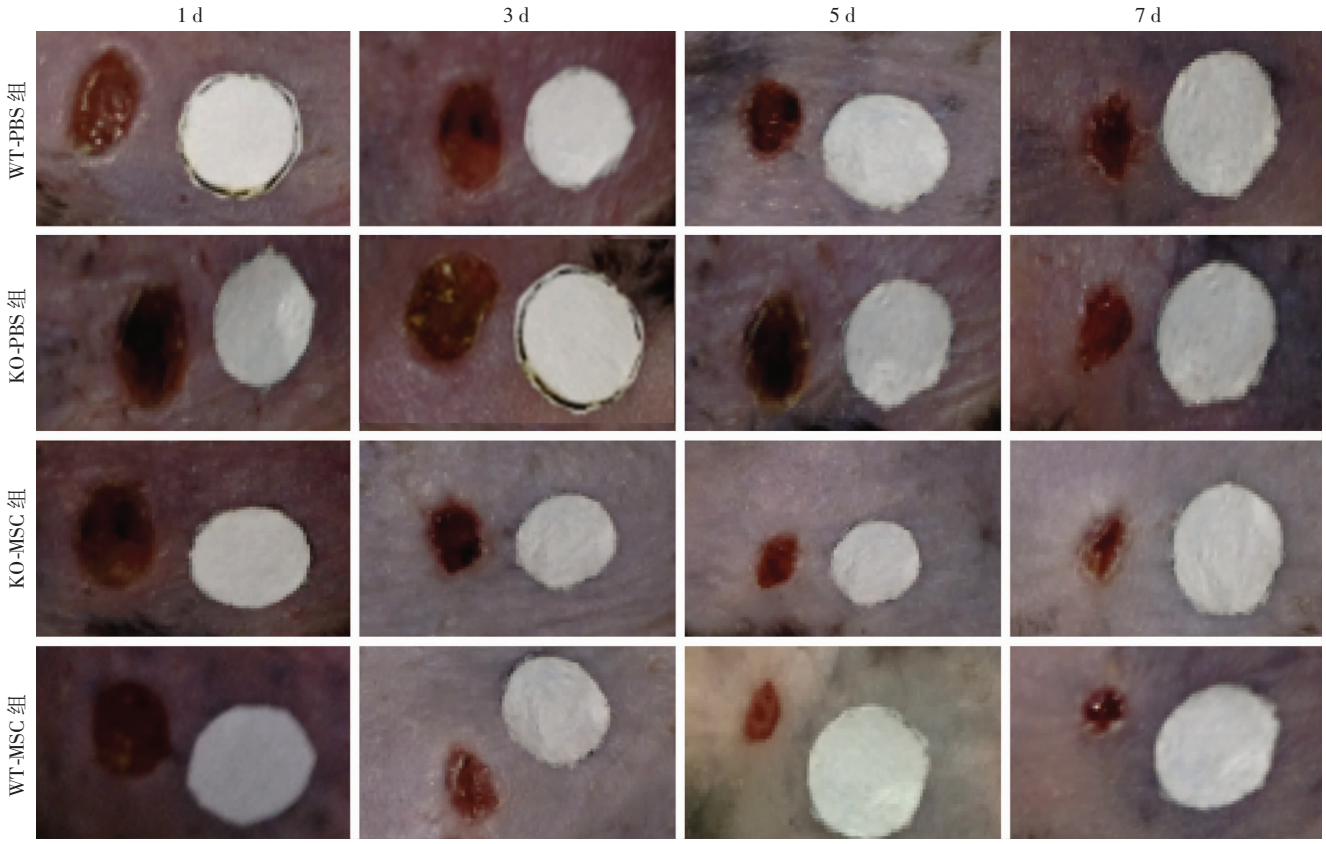


图5　4组小鼠创面不同时间愈合的大体观察

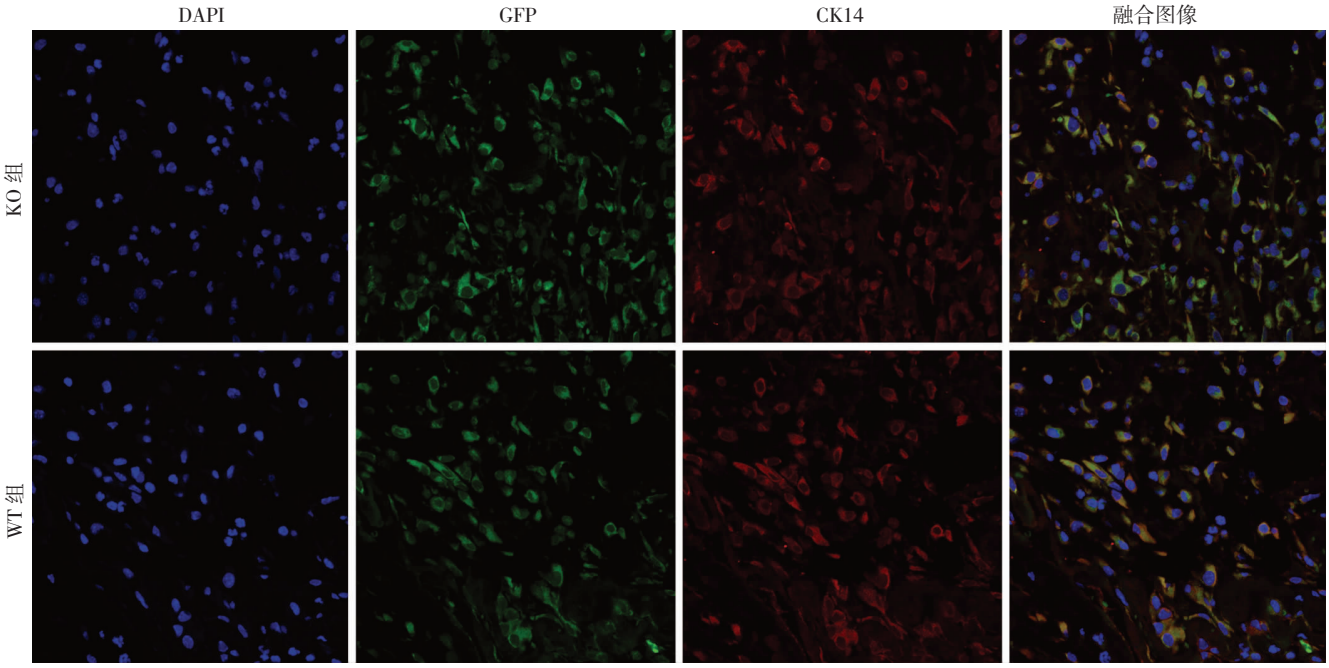


图6　两组小鼠创面第7天CK14表达情况　（共聚焦显微镜　×200）

数量;移植到创伤部位的MSCs可以表达角化细胞特异性蛋白,形成腺体结构,参与皮肤再生[12-14]。EGF可诱导MSCs向皮肤组织分化,将两者复合移植用于猪创面缺损模型,形成的表皮层厚、角化分层明显,MSCs细胞可使经久不愈的创面表皮化,达到愈合重建[15]。大量资料说明,MSCs能分化为表皮细胞。

OPN是在多种细胞中广泛表达的一种分泌型糖蛋白,参与细胞的多种生理病理过程。OPN高表达于

创面内,趋化 MSCs 向创面迁移。在创面愈合的关键环节中具有多功能调控的功能,对炎性细胞、成纤维细胞、表皮细胞、内皮细胞等促进愈合的功能调控发挥重要作用[16]。细胞分泌 OPN 后,可动员骨髓 MSCs 增殖分化参与修复,比如分化为成纤维细胞。但是目前对此修复过程 MSCs 参与过程和机制的报道较少,难以说明 OPN 调控 MSCs 的重要[15]。本研究主要目的在于探究创面修复过程中 OPN 与 MSCs 上皮化之间的关系。

本研究发现,用 MSCs 的专用培养基,新生 1 d 的小鼠采用骨组织贴壁法培养的 MSCs 细胞活性好、纯度高,能够稳定传代。通过体外对野生型(WT)和 $OPN^{-/-}$(KO)小鼠的 MSCs 进行表皮诱导,经多种方法对比分析,WT 组和 KO 组的细胞均表达 CK14,表明 MSCs 向表皮诱导分化,WT 组表皮标志物 CK14 的表达阳性比率明显高于 KO 组,两组存在明显差异,证明了 OPN 基因表达降低后 MSCs 的表皮分化能力下降。动物实验表明敲除 OPN 基因后创面愈合的速度与正常小鼠相比明显减慢了。

总之,本研究发现 MSCs 在体内、体外可诱导分化为表皮细胞,进而促进创面愈合,OPN 可能在其中发挥了重要作用,但是 OPN 诱导 MSCs 向表皮细胞分化的作用机制尚不清楚,可能为创面愈合过程中各种因素共同作用的结果。继续研究 OPN 诱导 MSCs 促进创面愈合的信号传导通路,可完善其具体机制。

参考文献:

[1] Li M, Yu J, Li Y, *et al*. CXCR4 + progenitors derived from bone mesenchymal stem cells differentiate into endothelial cells capable of vascular repair after arterial injury[J]. Cell Reprogram, 2010, 12(4): 405 – 415.

[2] Hisada K, Hata K, Ichida F, *et al*. Retinoic acid regulates commitment of undifferentiated mesenchymal stem cells into osteoblasts and adipocytes[J]. J Bone Miner Metab, 2013, 31(1): 53 – 63.

[3] Barba M, Cicione C, Bernardini C, *et al*. Adipose-derived mesenchymal cells for bone regereneration: state of the art [J]. Biomed Res Int, 2013, 2013: 416391.

[4] Huang K, Kang X, Wang X, *et al*. Conversion of bone marrow mesenchymal stem cells into type Ⅱ alveolar epithelial cells reduces pulmonary fibrosis by decreasing oxidative stress in rats[J]. Mol Med Rep, 2015, 11(3): 1685 – 1692.

[5] Knoll A, Brockmeyer T, Chevalier R, *et al*. Adult rat bone marrow-derived stem cells promote late fetal type Ⅱ cell differentiation in a co-culture model[J]. Open Respir Med J, 2013, 7: 46 – 53.

[6] Rohaina C M, Then K Y, Ng A M, *et al*. Reconstruction of limbal stem cell deficient corneal surface with induced human bone marrow mesenchymal stem cells on amniotic membrane [J]. Transl Res, 2014, 163(3): 200 – 210.

[7] Jiang T S, Cai L, Ji W Y, *et al*. Reconstruction of the corneal epithelium with induced marrow mesenchymal stem cells in rats[J]. Mol Vis, 2010, 16: 1304 – 1316.

[8] Li W, Ye B, Cai X Y, *et al*. Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into prostate-like epithelial cells in vivo[J]. PLoS One, 2014, 9(7): e102657.

[9] Meng H, Wang Z, Wang W, *et al*. Effect of osteopontin in regulating bone marrow mesenchymal stem cell treatment of skin wounds in diabetic mice[J]. Diabetes Metab Res Rev, 2014, 30(6): 457 – 466.

[10] Pacini S, Petrini I. Are MSCs angiogenic cells? New insights on human nestin-positive bone marrow-derived multipotent cells[J]. Front Cell Dev Biol, 2014, 2: 20.

[11] Liu X, Wang J A, Ji X Y, *et al*. Preconditioning of bone marrow mesenchymal stem cells by prolyl hydroxylase inhibition enhances cell survival and angiogenesis *in vitro* and after transplantation into the ischemic heart of rats[J]. Stem Cell Res Ther, 2014, 5(5): 111.

[12] Gomathysankar S, Halim A S, Yaacob N S. Proliferation of keratinocytes induced by adipose-derived stem cells on a chitosan scaffold and its role in wound healing, a review[J]. Arch Plast Surg, 2014, 41(5): 452 – 457.

[13] Hassan W U, Greiser U, Wang W. Role of adipose-derived stem cells in wound healing[J]. Wound Repair Regen, 2014, 22(3): 313 – 325.

[14] Kim W S, Park B S, Sung J H, *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(1): 15 – 24.

[15] Badiavas E V, Falanga V. Treatment of chronic wounds with bone marrow-derived cells[J]. Arch Dermatol, 2003, 139(4): 510 – 516.

[16] Dabiri G, Heiner D, Falanga V. The emerging use of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of human chronic wounds[J]. Expert Opin Emerg Drugs, 2013, 18(4): 405 – 419.

(**收稿**:2014-10-22;**修回**:2014-11-22)

(编辑 栾 嘉)