基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003618

# 人脐带间充质干细胞条件培养基促进放创复合伤创面愈合及其机制

胡伟伟[1]，汪　洋[2]，史春梦[1]
（1.西南医科大学附属医院肿瘤科，泸州　646000；2.陆军军医大学军事预防医学系火箭军医学教研室/创伤与化学中毒全国重点实验室，重庆　400038）

**【摘　要】目的：**探索人脐带间充质干细胞条件培养基（human umbilical cord mesenchymal stem cell conditional medium，uMSC-CM）对放创复合伤（combined radiation and wound injury，CRWI）的促愈作用及相关机制。**方法：**42只雄性C57BL小鼠被随机分成单纯创伤组、放创复合伤对照组和放创复合伤治疗组（$n$=14）；以4 Gy γ射线全身辐照联合直径1 cm全层皮肤缺损创面构建小鼠皮肤放创复合伤模型，放创复合伤治疗组隔天1次腹腔注射5 mg/kg uMSC-CM，其余2组注射等体积无血清DMEM培养基，采用拍照及HE染色评估创面愈合情况；CD31免疫荧光染色检测血管形成；α-SMA免疫组化染色检测细胞迁移；Masson染色检测胶原沉积；Ki67和TUNEL染色检测增殖和凋亡；Western blot检测凋亡相关蛋白和PI3K/AKT信号通路蛋白表达水平；小鼠皮肤原代成纤维细胞分为对照组、辐照组和辐照治疗组；采用Edu染色和集落形成实验检测增殖；细胞划痕和Transwell实验检测迁移；流式细胞术检测凋亡；Western blot检测PI3K/AKT信号通路蛋白表达水平。**结果：**uMSC-CM对CRWI创面具有明显促愈效果（$P$<0.05）；组织学结果提示，uMSC-CM可促进CRWI创面血管生成、细胞迁移和胶原纤维沉积，进一步分析显示uMSC-CM处理后创面细胞增殖增加且凋亡减少（$P$<0.05）；组织Western blot结果显示，uMSC-CM促进CRWI创面PI3K、AKT蛋白磷酸化表达水平（$P$<0.05）；体外细胞实验结果显示，uMSC-CM促进辐照后小鼠真皮成纤维细胞增殖和迁移并减少凋亡（$P$<0.05）；Western blot结果显示，uMSC-CM促进辐照后成纤维细胞PI3K、AKT蛋白磷酸化（$P$<0.05）。**结论：**uMSC-CM加速CRWI创面愈合，这可能与激活PI3K/AKT信号通路促进成纤维细胞的增殖、迁移并抑制凋亡有关。

**【关键词】**人脐带间充质干细胞；条件培养基；放创复合伤；创面愈合；PI3K/AKT信号通路
**【中图分类号】**R641　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2024-06-10

# Effect and mechanism of action of human umbilical cord mesenchymal stem cell conditioned medium in promoting the healing of combined radiation and wound injury

*Hu Weiwei*[1]，*Wang Yang*[2]，*Shi Chunmeng*[1]
（*1. Department of Oncology，The Affiliated Hospital of Southwest Medical University；2. State Key Laboratory of Trauma and Chemical Poisoning，Department of Rocket Force Medicine，Faculty of Military Preventive Medicine，Army Medical University*）

**【Abstract】*Objective*：**To investigate the effect and mechanism of action of human umbilical cord mesenchymal stem cell conditional medium（uMSC-CM）in promoting the healing of combined radiation and wound injury（CRWI）. ***Methods*：**A total of 42 male C57BL mice were randomly divided into trauma group，CRWI control group，and CRWI treatment group，with 14 mice in each group. A mouse model of skin CRWI was established by whole body irradiation with 4 Gy γ-ray combined with full-thickness skin defect wound with a diameter of 1 cm. The mice in the CRWI treatment group were given intraperitoneal injection of 5 mg/kg uMSC-CM once every other day，while those in the other two groups were given injection of an equal volume of serum-free DMEM medium. Photographs and HE staining were used to assess wound healing；CD31 immunofluorescent staining was used to observe neovascularization；α-SMA immunohistochemical staining was used to observe cell migration；Masson staining was used to evaluate collagen deposition；Ki67 and TUNEL staining were used to measure proliferation and apoptosis；Western blot was used to measure the expression levels of apoptosis-related proteins and PI3K/AKT signaling pathway proteins. Primary skin fibroblasts of mice were divided into control group，irradiation group，and irradiation treatment group. Edu staining and colony formation assay were used to detect cell proliferation；cell scratch assay and Transwell assay were used to detect cell migration；flow cytometry was used to measure cell apoptosis；Western blot was used to measure the expression levels of PI3K/AKT signaling pathway proteins. ***Results*：**In this study，uMSC-CM significantly promoted the healing of CRWI（$P$<0.05），and the histological results showed

**作者介绍：**胡伟伟，Email：1193788509@qq.com，研究方向：皮肤放射损伤。
**通信作者：**史春梦，Email：shicm@tmmu.edu.cn。
**基金项目：**国家自然科学基金重点资助项目（编号：82030056）。
**优先出版：**https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20241114.1823.016（2024-11-18）

that uMSC-CM could promote angiogenesis, cell migration, and collagen fiber deposition in CRWI. Further analysis showed that uMSC-CM increased cell proliferation and reduced cell apoptosis in CRWI ($P$<0.05). Western blot showed that uMSC-CM promoted the protein expression levels of phosphorylated PI3K and phosphorylated AKT ($P$<0.05). *In vitro* cell experiments showed that uMSC-CM promoted the proliferation and migration of mouse dermal fibroblasts and reduced apoptosis after irradiation ($P$<0.05), and Western blot showed that uMSC-CM promoted the protein expression levels of phosphorylated PI3K and phosphorylated AKT after irradiation ($P$<0.05). ***Conclusion***: This study shows that uMSC-CM accelerates CRWI wound healing, possibly by activating the PI3K/AKT signaling pathway to promote the proliferation and migration of fibroblasts and inhibit their apoptosis.

**【Key words】**human umbilical cord mesenchymal stem cell; conditioned medium; combined radiation and wound injury; wound healing; PI3K/AKT signaling pathway

辐射损伤合并创伤称为放创复合伤（combined radiation and wound injury，CRWI），多发生在临床肿瘤患者放疗后手术，也可见于核爆炸、核恐怖主义袭击、核放射源暴露等事件，其显著特点是伤口愈合延迟，甚至迁延不愈、反复溃烂，严重影响患者生活质量，目前仍缺乏有效的治疗手段[1]。多项研究提示间充质干细胞（mesenchymal stem cell，MSCs）在治疗难愈性创面中具有巨大潜力，然而，MSCs因移植效率低、恶变风险高、免疫原性强和医学伦理障碍等问题，限制其临床广泛应用[2-4]。最近研究发现间充质干细胞条件培养基（mesenchymal stem cell conditioned medium，MSC-CM）具有与MSCs移植类似治疗效果，且极大降低了上述免疫原性、恶变风险等问题，具有较好的临床应用前景[5]。MSC-CM的疗效通常受细胞来源、培养及提取方法、制备工艺等因素影响，因此，课题组前期自主建立了人脐带间充质干细胞条件培养基（human umbilical cord mesenchymal stem cell conditional medium，uMSC-CM）的标准化制备流程和方法，发现其可促进慢性放射性皮肤溃疡创面愈合[6-7]。然而，uMSC-CM对CRWI创面愈合的影响尚未见相关报道，基于此，本研究通过构建CRWI小鼠皮肤模型，明确uMSC-CM对CRWI的促愈作用及潜在机制，旨在为CRWI治疗提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

42只雄性6~8周C57BL小鼠，体质量18~20 g，购于陆军军医大学实验动物中心，许可证号：SCXK（渝）2022-0011，购入后在SPF级动物房适应性喂养1周后进行动物实验，动物实验过程严格遵循动物福利“3R”原则，实验方案通过陆军军医大学动物伦理委员会批准（批号：AMUWEC2020688）。

### 1.2 方法

1.2.1 小鼠原代真皮成纤维细胞提取及培养方法 将新生乳鼠安乐死，乙醇浸泡消毒后，分离背部全层皮肤，胰酶4 ℃消化过夜，然后将皮肤真皮层组织剪碎，用1 mg/mL的胶原酶Ⅳ在37 ℃消化30 min，经无菌滤网过滤、离心机1 200 r/min离心3 min后，用DMEM完全培养基重悬，接种于培养瓶中，培养在37 ℃含5%$CO_2$的细胞培养箱中。

1.2.2 uMSC-CM的制备 将培养瓶中生长状态良好、四代以内、细胞密度为80%的人脐带间充质干细胞的细胞培养液更换为无血清DMEM培养基，并放入细胞培养箱中继续培养24 h，然后，收集培养瓶中的条件培养基，经超滤膜4 ℃浓缩、0.22 μm除菌滤器过滤、超低温冷冻4 h形成uMSC-CM冻干粉，最后，用DMEM培养基稀释成浓度为0.5 mg/mL、10 μg/mL分别用于动物及细胞实验。

1.2.3 主要试剂 Masson染色液（南京建成，中国）；CD31兔抗、α-SMA兔抗、Ki67兔抗、555-山羊抗兔IgG（abcam，英国）；PI3K兔抗（Affinity，中国）、P-PI3K兔抗（正能，中国）；兔二步法试剂盒（中杉金桥，中国）；TUNEL染色试剂盒（Roche，瑞士）；Edu-555细胞增殖检测试剂盒、HRP标记山羊抗兔IgG（碧云天，中国）；AKT、P-AKT兔抗（CST，美国）；GAPDH、Bax兔抗（proteintech，中国）；Bcl-2兔抗（圣克鲁斯，美国）；7-AAD、Annexin V-PE（BD，美国）。

1.2.4 动物实验分组、放创复合伤动物模型构建和处理措施 参考文献[8]方法建立模型，随机将实验小鼠分为单纯创伤组、放创复合伤对照组和放创复合伤治疗组（$n$=14）。单纯创伤组不辐照，其余2组给予单次4 Gy γ射线全身照射，辐照结束待小鼠麻醉后，用电动剃毛刀去掉背部毛发，在小鼠背部正中剪一直径为1 cm的全层皮肤缺损创面，随后治疗组给予腹腔注射5 mg/kg uMSC-CM，单纯创伤组、放创复合伤对照组注射等体积无血清DMEM培养基（1次/2 d），持续治疗至14 d。分别于建模后4、15 d随机安乐死7只小鼠，取背部创面皮肤及心、肝、脾、肺、肾等脏器，部分皮肤及脏器组织常规脱水、包埋后，制成4 μm病理切片，剩余组织放入-80 ℃冰箱冷冻保存以备用。

1.2.4.1 小鼠质量称量和创面愈合评价 模型构建后0、4、7、10、15 d称量小鼠质量并拍摄创面照片，用Image J软件计算创面愈合率[创面愈合率=（初始创面体积-当前创面体积）/初始创面体积×100%]。

1.2.4.2 HE染色 病理切片经二甲苯脱蜡和梯度乙醇水化，用苏木素染液染色3 min，流水冲洗后，将切片放入1%盐酸乙醇中分化10 s，然后置于60 ℃温水中返蓝1 min，接下来将切片放入伊红染液中浸染20 s，烘干透明后封片，于显微镜下采集图像。

1.2.4.3 Masson染色 病理切片经常规脱蜡复水，用浆染液

滴染 60 s、分色液分色 6 min、复染液滴染 3 min，然后将切片烘干透明后封片，于显微镜下采集图像。

1.2.4.4 免疫荧光染色 病理切片经常规脱蜡复水，柠檬酸钠抗原修复液高温修复 20 min、免疫染色封闭液室温封闭 10 min，4 ℃过夜孵育兔抗 Ki67、兔抗 CD31，接下来，室温避光孵育山羊抗兔荧光二抗 1 h，最后，DAPI 染色液染核、抗荧光淬灭封片液封片，于荧光显微镜下采集图像。

1.2.4.5 免疫组化染色 将常规脱蜡复水后的病理切片，放入 EDTA 抗原修复液中修复 20 min，然后用内源性过氧化物酶阻断剂阻断过氧化物酶，及免疫染色封闭液室温封闭 10 min，随后，4 ℃过夜孵育兔抗 α-SMA、室温孵育 HRP 标记山羊抗兔 IgG 1 h，接下来，用 DAB 显色液显色、苏木素染核，最后将切片烘干透明后封片，于显微镜下采集图像。

1.2.4.6 TUNEL 染色 病理切片常规脱蜡复水后，用 20 μg/mL 蛋白酶 K 室温孵育 20 min，PBS 清洗后，加入适量 TUNEL 工作液，在 37 ℃孵箱中避光孵育 40 min，随后，用 DAPI 染色液染细胞核，最后加入抗荧光淬灭封片液封片并在荧光显微镜下采集图像。

1.2.4.7 Western blot 用含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液在冰上提取总蛋白，并用 BCA 试剂盒进行上样蛋白定量，然后凝胶电泳分离样品并转移到 PVDF 膜上，随后 4 ℃过夜孵育按照 1∶1 000 比例稀释的兔抗 GAPDH、Bax、Bcl-2、PI3K、P-PI3K、AKT、P-AKT，接下来室温条件孵育按照 1∶1 000 比例稀释的 HRP 标记的山羊抗兔二抗 1 h，最后在化学发光条件下进行蛋白条带显色。

1.2.5 细胞实验分组及处理措施 小鼠原代真皮成纤维细胞分为对照组、辐照组和辐照治疗组。对照组不辐照，辐照组及辐照治疗组给予 4 Gy γ 射线照射，辐照结束后，辐照治疗组给予 10 μg/mL 的 uMSC-CM。

1.2.5.1 Edu 染色 各组细胞处理 72 h 后，向培养基中加入配好的 Edu 试剂，使其最终浓度为 10 μmol/mL，在培养箱中继续孵育 2 h，然后用 4% 多聚甲醛室温固定 15 min、0.3% Triton X-100 室温通透 15 min、Click 反应液室温避光孵育 30 min、Hoechst 室温避光孵育 10 min，最后用洗涤液清洗后在荧光显微镜下采集图像。

1.2.5.2 集落形成实验 各组细胞培养至 9 d，用 4% 多聚甲醛固定 10 min，然后结晶紫室温染色 10 min，随后清洗后晾干并采集图像。

1.2.5.3 细胞凋亡检测 各组细胞处理 72 h 后，用胰酶消化并收集细胞，每个样品加入 5 μL PE 和 5 μL 7-AAD 室温避光染色 20 min，然后用流式细胞仪检测凋亡细胞比例。

1.2.5.4 细胞划痕实验 待接种于 6 孔板的各组细胞长满后，用 200 μL 枪头在 6 孔板上划痕，分别于 0、24 h 在显微镜下拍照，并用 Imaje J 软件计算 24 h 细胞的相对迁移率。

1.2.5.5 Transwell 实验 将各组处理后的细胞悬液加入 Transwell 小室中，孵育 24 h 后取出，用 4% 多聚甲醛固定、结晶紫染色，PBS 清洗后，于显微镜下观察并采集图像。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据分析，计量资料用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，2 组间比较采用 $t$ 检验，3 组及以上采用单因素方差分析，进一步组间多重比较采用 LSD-$t$ 法，检验水准 $\alpha$=0.05。

## 2 结 果

2.1 uMSC-CM 促进 CRWI 创面愈合

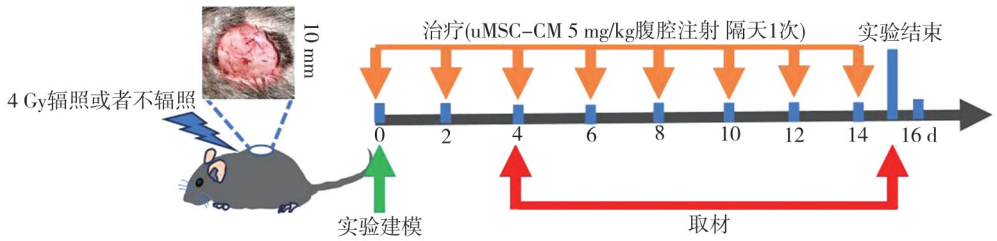
为了评估 uMSC-CM 对 CRWI 创面的促愈合作用，本研究采用如图 1A 所示的实验方案，在 15 d 的观察周期中，与单纯创伤组比较，放创复合伤对照组在各个时间点的创面愈合率均明显降低，而 uMSC-CM 处理明显促进 CRWI 的伤口愈合（$F$=17.470、14.410、18.320、44.500，$P_{放创复合伤对照组}$=0.000、0.000、0.000、0.000，$P_{放创复合伤治疗组}$=0.000、0.000、0.006、0.000，图 1B）；接下来，通过 HE 染色评价创面愈合质量，结果表明，与单纯创伤组比较，放创复合伤对照组皮肤真皮和表皮成熟延迟，15 d 未形成完整的皮肤结构，创面仍有较多的肉芽组织和炎性细胞浸润，而放创复合伤治疗组 15 d 细胞排列整齐，形成较连续的真皮和表皮，且未见明显的炎性浸润（图 1C）；本研究治疗期间对放创复合伤对照组和治疗组小鼠的质量进行测量，结果显示，2 组小鼠质量变化差异无统计学意义（$t$=0.632、0.925、0.945、0.918，$P$=0.539、0.373、0.364、0.377，图 1D）。此外，放创复合伤对照组和治疗组的重要脏器 HE 染色结果无明显区别（图 1E）。以上结果表明，uMSC-CM 可以有效挽救辐射对伤口闭合的抑制效应，且不会造成明显的毒副作用。

2.2 uMSC-CM 促进 CRWI 创面血管生成、细胞迁移和胶原纤维沉积

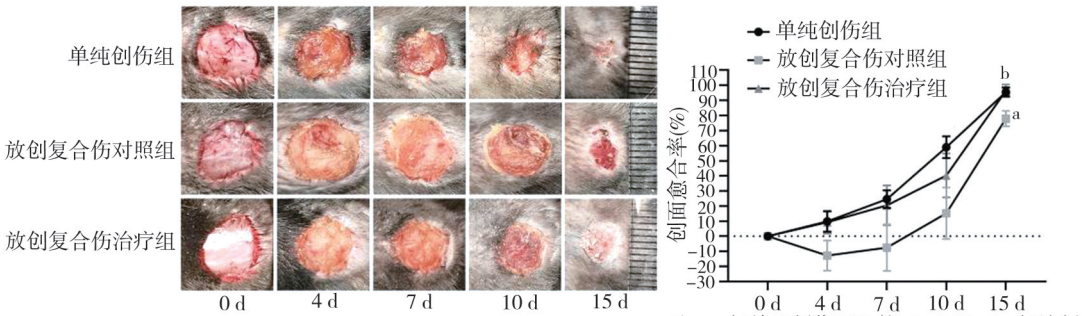
本研究通过免疫荧光染色检测了新生血管特异性标志物 CD31 的表达，结果显示，与单纯创伤组比较，放创复合伤对照组 15 d 新生血管数量减少，而 uMSC-CM 治疗明显增加创面新生血管的形成（$F$=17.020，$P_{放创复合伤对照组}$=0.002，$P_{放创复合伤治疗组}$=0.034，图 2A）；α-平滑肌肌动蛋白（α-SMA）在创面修复过程中促进细胞迁移并收缩创面，结果表明，uMSC-CM 治疗能明显促进 α-SMA 在 CRWI 创面中的表达（$F$=13.340，$P_{放创复合伤对照组}$=0.004，$P_{放创复合伤治疗组}$=0.017，图 2B）；Masson 染色结果显示，与单纯创伤组比较，放创复合伤对照组 15 d 胶原纤维数量减少，uMSC-CM 处理明显增加创面胶原纤维沉积（$F$=24.970，$P_{放创复合伤对照组}$=0.001，$P_{放创复合伤治疗组}$=0.002，图 2C）。这些结果表明，uMSC-CM 可促进 CRWI 创面血管生成、细胞迁移和胶原纤维沉积。

2.3 uMSC-CM 改善 CRWI 创面细胞增殖抑制并减少细胞凋亡

Ki67 免疫荧光结果显示，治疗 4 d，与单纯创伤组比较，放创复合伤对照组细胞增殖水平降低，而 uMSC-CM 能够改善 CRWI 创面细胞的增殖抑制（$F$=20.990，$P_{放创复合伤对照组}$=0.001，$P_{放创复合伤治疗组}$=0.031）；治疗 15 d，随着单纯创伤组和放创复合伤治疗组的创面修复结束，细胞增殖水平逐渐恢复到正常水平，而放创复合伤对照组由于尚未完成创面组织修复，从而出现放创复合伤对照组在 15 d 的细胞增殖水平高于其余两组，这进一步证实其增殖异常（$F$=11.470，$P_{放创复合伤对照组}$=0.006，$P_{放创复合伤治疗组}$=0.026，图 3A）。TUNEL 染色结果显示，与单纯创伤组比较，放创复合伤对照组 4 d 和 15 d 细胞凋亡比例增加，而 uMSC-CM 治疗有效减少 CRWI 创面细胞凋亡

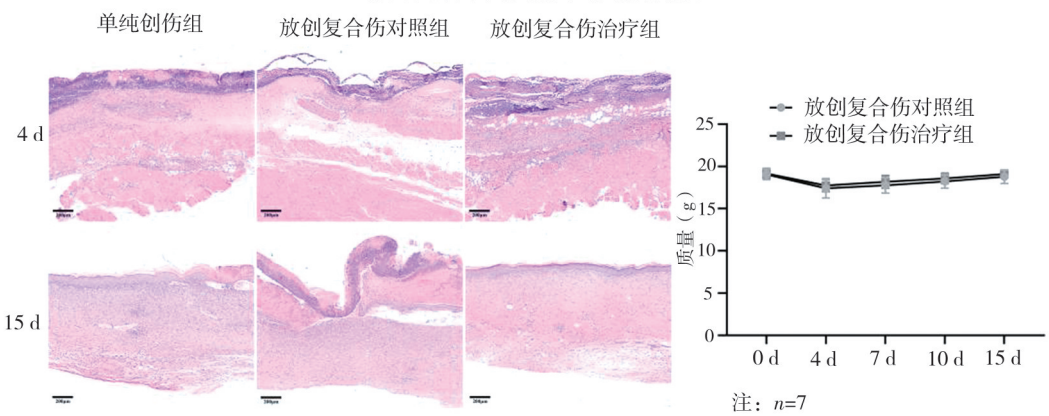



A. 模型构建及处理因素示意图




注：a，与单纯创伤组比较，$P<0.05$；b，与放创复合伤对照组比较，$P<0.05$，$n=7$

B. 各组小鼠不同时间点的创面愈合情况

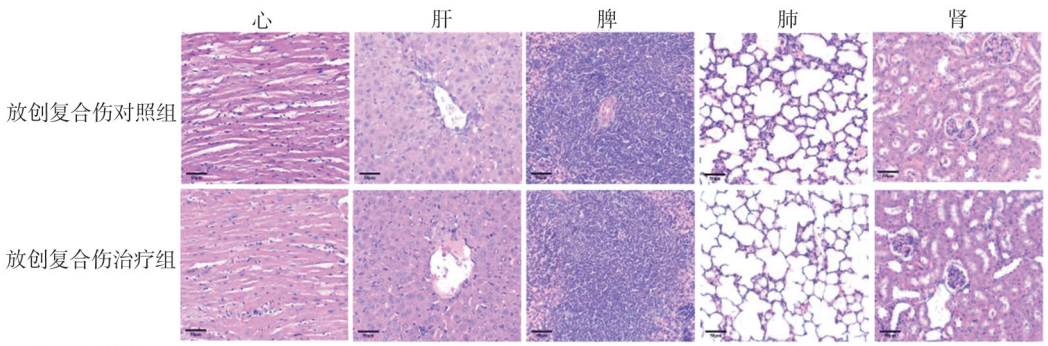



注：比例尺=200 μm

C. 4、15 d各组皮肤创面组织HE染色

注：$n=7$

D. 各组小鼠质量情况

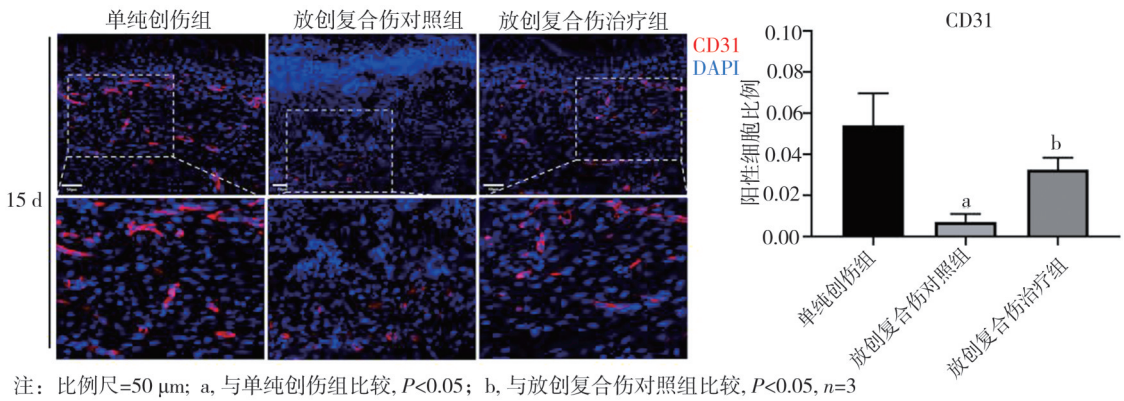



注：比例尺=50 μm

E. 15 d脏器HE染色

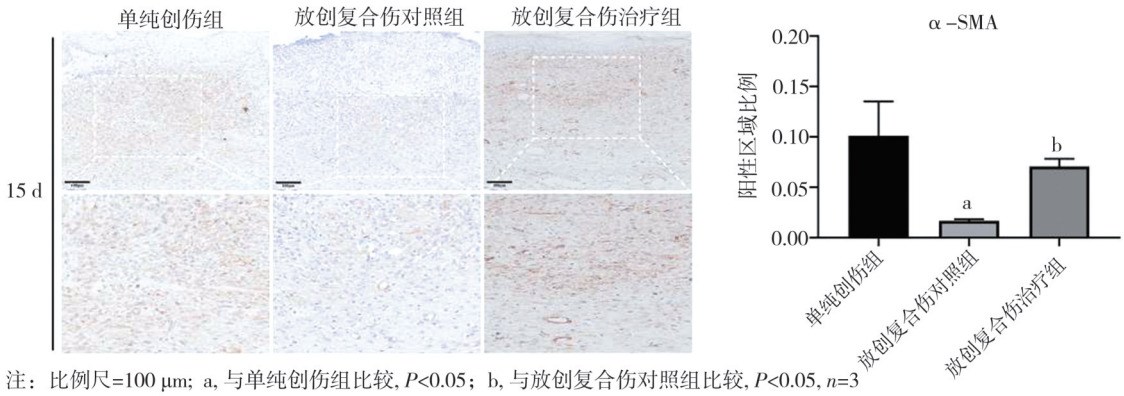
**图1　uMSC-CM对CRWI创面愈合的影响**

（$F$=115.800、17.540，$P_{放创复合伤对照组}$=0.000、0.003，$P_{放创复合伤治疗组}$=0.000、0.005，图3B），此外，Westen blot结果表明，uMSC-CM可降低凋亡相关蛋白Bax的表达（$F$=48.690，$P_{放创复合伤对照组}$=0.000，$P_{放创复合伤治疗组}$=0.000），并增加抗凋亡蛋白Bcl-2表达水平（$F$=13.300，$P_{放创复合伤对照组}$=0.004，$P_{放创复合伤治疗组}$=0.047，图3C）。本研究检测了4 d各组皮肤创面组织PI3K/AKT通路蛋白表达水平，结果显示，uMSC-CM能够上调磷酸化PI3K和磷酸化AKT蛋白表达水平（$F$=84.410、8.812，$P_{放创复合伤对照组}$=



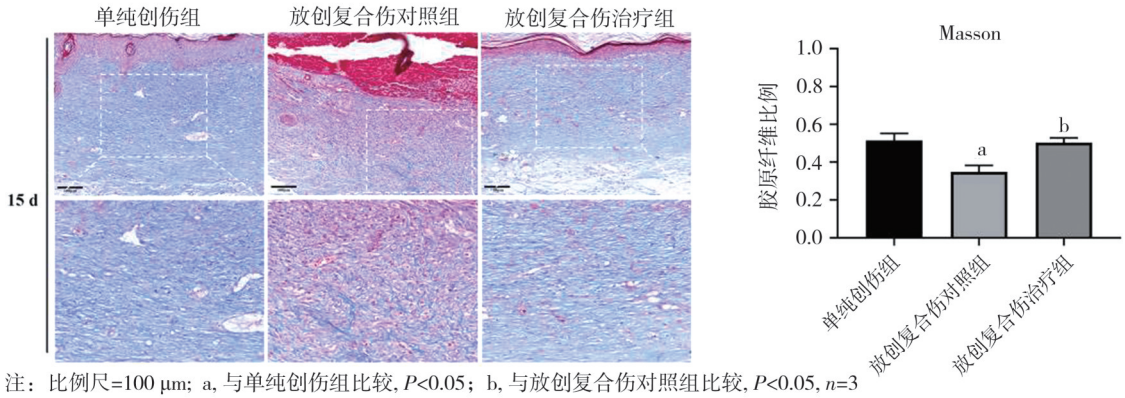

注：比例尺=50 μm；a，与单纯创伤组比较，$P$<0.05；b，与放创复合伤对照组比较，$P$<0.05，$n$=3

A. 15 d皮肤创面组织CD31免疫荧光染色




注：比例尺=100 μm；a，与单纯创伤组比较，$P$<0.05；b，与放创复合伤对照组比较，$P$<0.05，$n$=3

B. 15 d皮肤创面组织α -SMA免疫组化染色




注：比例尺=100 μm；a，与单纯创伤组比较，$P$<0.05；b，与放创复合伤对照组比较，$P$<0.05，$n$=3

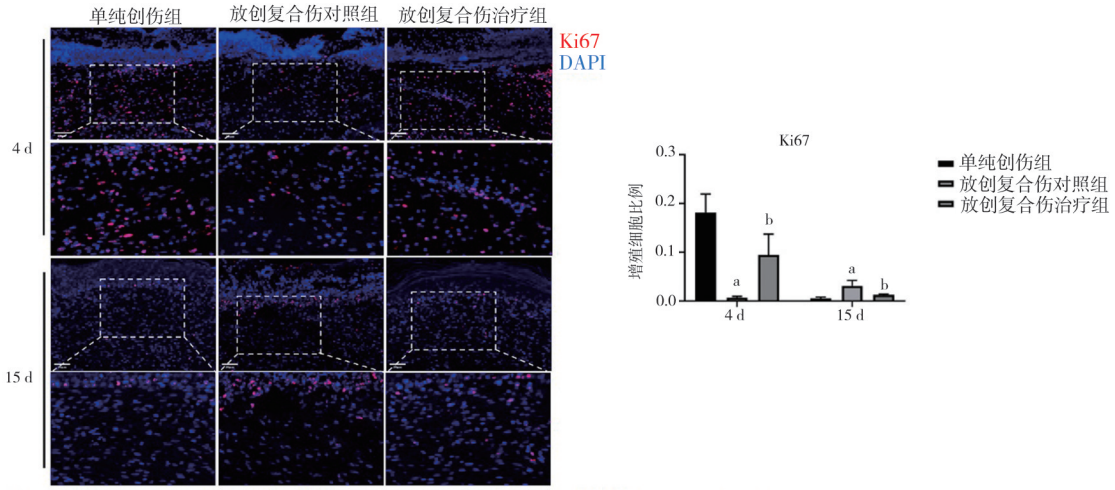
C. 15 d皮肤创面组织Masson染色

**图2　uMSC-CM对CRWI创面血管生成、细胞迁移和胶原纤维沉积的影响**

0.000、0.016，$P_{放创复合伤治疗组}$=0.000、0.025，图3D）。这些结果表明，uMSC-CM可能通过激活PI3K/AKT信号通路，从而改善CRWI创面细胞增殖抑制并减少细胞凋亡。

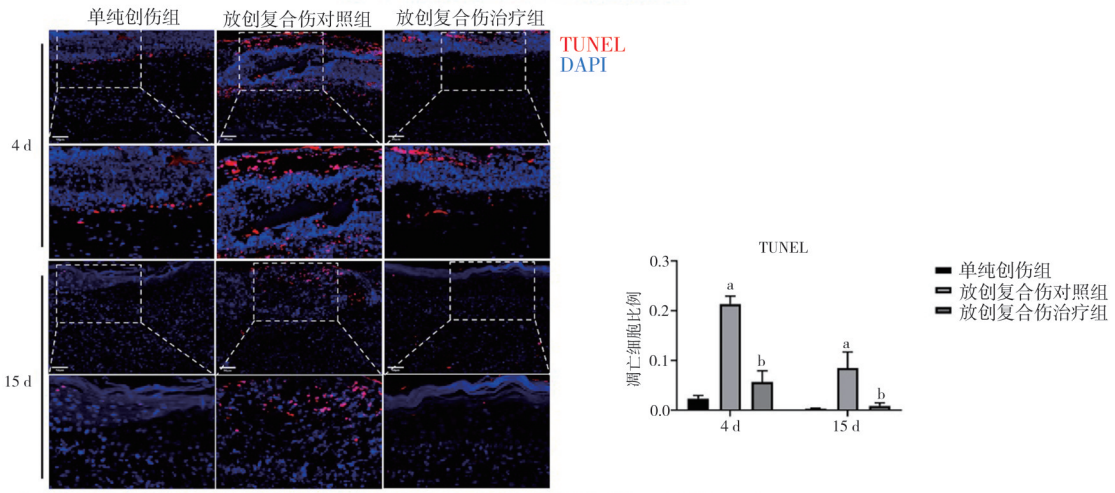
2.4　uMSC-CM促进辐照后成纤维细胞增殖、迁移并抑制凋亡

根据体内实验结果，本研究通过提取小鼠原代真皮成纤维细胞作为体外实验研究对象，以进一步明确uMSC-CM对细胞增殖、迁移和凋亡的影响。Edu和集落形成实验结果表明，与对照组比较，辐照后成纤维细胞增殖水平明显降低，而uMSC-CM可以挽救辐照对细胞的增殖抑制（$F$=47.520、43.890，$P_{辐照组}$=0.000，0.000，$P_{辐照治疗组}$=0.000、0.009，图4A、B）；细胞划痕和Transwell试验结果显示，与对照组比较，辐照后成纤维细胞迁移能力明显降低，而uMSC-CM可促进辐照后成纤维细胞迁移（$F$=20.020、100.500，$P_{辐照组}$=0.001、0.000，$P_{辐照治疗组}$=0.015、0.000，图4C、D）；接下来，通过流式细胞术检测uMSC-CM对辐照后成纤维细胞凋亡的影响，如图4E结果所示，uMSC-CM可以有效降低辐照后细胞凋亡比例（$F$=3671.000，$P_{辐照组}$=0.000，$P_{辐照治疗组}$=0.000），最后，Western blot结果显示，uMSC-CM能够上调P-PI3K和P-AKT蛋白表达水平（$F$=13.440、29.610，$P_{辐照组}$=0.037、0.001，$P_{辐照治疗组}$=0.004、0.000，图4F）；以上结果表明，uMSC-CM促进辐照后成纤维细胞增殖和迁移，并减少凋亡，这可能与激活PI3K/AKT信号通路有关。



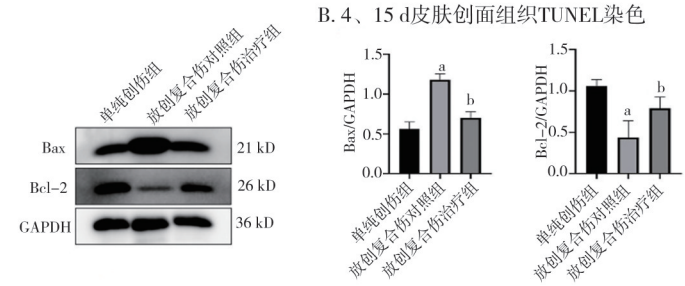

注：比例尺=50 μm；a, 与单纯创伤组比较, $P<0.05$；b, 与放创复合伤对照组比较, $P<0.05$, $n=3$

A. 4、15 d皮肤创面组织Ki67免疫荧光染色



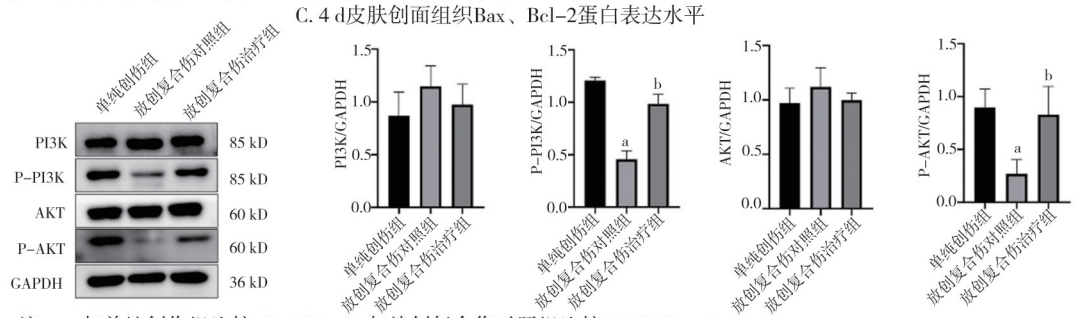

注：比例尺=50 μm；a, 与单纯创伤组比较, $P<0.05$；b, 与放创复合伤对照组比较, $P<0.05$, $n=3$

B. 4、15 d皮肤创面组织TUNEL染色




注：a, 与单纯创伤组比较, $P<0.05$；b, 与放创复合伤对照组比较, $P<0.05$, $n=3$

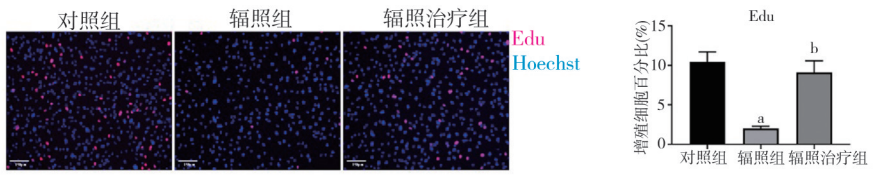
C. 4 d皮肤创面组织Bax、Bcl-2蛋白表达水平




注：a, 与单纯创伤组比较, $P<0.05$；b, 与放创复合伤对照组比较, $P<0.05$, $n=3$

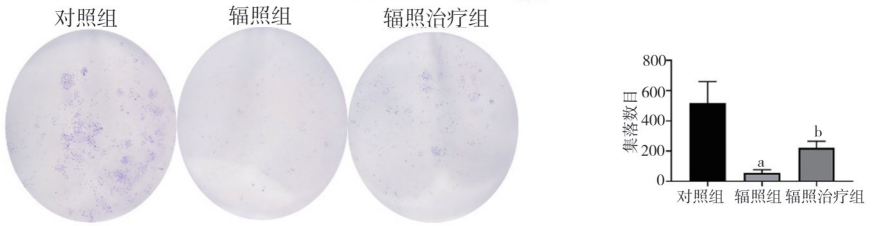
D.4 d皮肤创面组织PI3K、P-PI3K、AKT、P-AKT蛋白表达水平

**图3　uMSC-CM对CRWI创面细胞增殖和凋亡的影响**



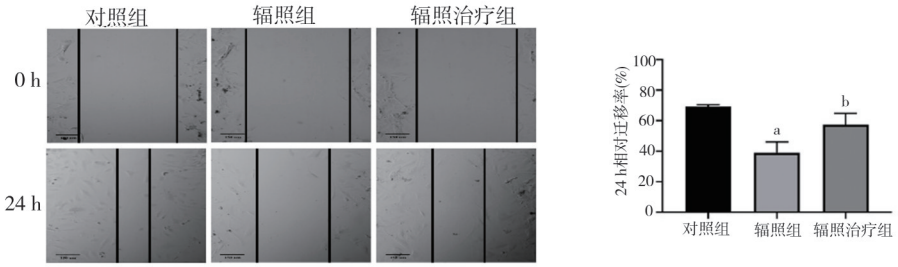

注：比例尺=150 μm；a, 与对照组比较, $P<0.05$；b, 与辐照组比较, $P<0.05$, $n=3$

A. 辐射后72 h细胞Edu染色



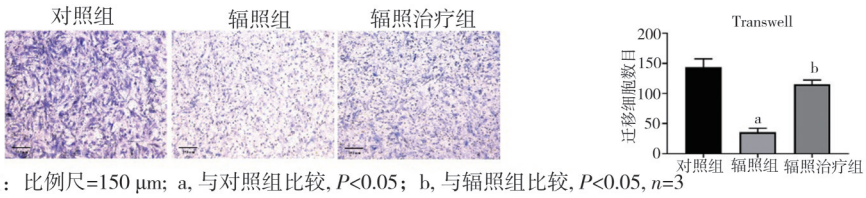

注：a, 与对照组比较, $P<0.05$；b, 与辐照组比较, $P<0.05$, $n=6$

B. 辐照后9 d细胞集落形成实验



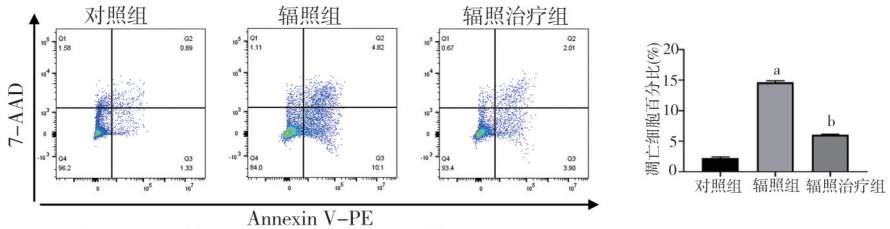

注：比例尺=150 μm；a, 与对照组比较, $P<0.05$；b, 与辐照组比较, $P<0.05$, $n=3$

C. 辐照后0、24 h细胞划痕实验



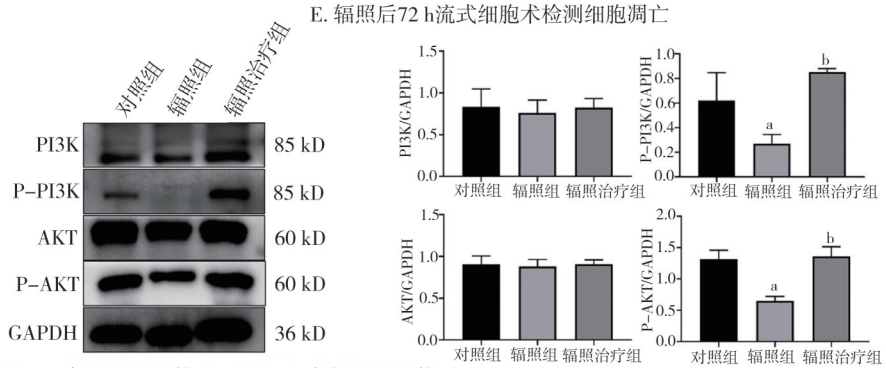

注：比例尺=150 μm；a, 与对照组比较, $P<0.05$；b, 与辐照组比较, $P<0.05$, $n=3$

D. 辐照后24 h细胞Transwell实验




注：a, 与对照组比较, $P<0.05$；b, 与辐照组比较, $P<0.05$, $n=3$

E. 辐照后72 h流式细胞术检测细胞凋亡




注：a, 与对照组比较, $P<0.05$；b, 与辐照组比较, $P<0.05$, $n=3$

F. 辐照后72 h细胞PI3K、P-PI3K、AKT和P-AKT蛋白表达水平

**图4　uMSC-CM对辐照后成纤维细胞增殖、迁移和凋亡的影响**

## 3 讨 论

CRWI由于辐射和创伤的相互影响，使得创面愈合延迟，甚至难以闭合，多年以来人们研究了多种干预策略。然而，传统的辐射保护剂不良反应大[9]；红光治疗尚缺乏统一、规范、标准的参数[10]；3D生物材料生产效率低、适应证受限、安全性不高[11]；维生素B12易引起皮肤不良反应[12]；中药找寻、提取和分离活性成分困难[13]；瘦素[14]、生长因子[15]、生长激素释放肽[16]半衰期短，不能在体内持续、稳定发挥作用。因此，临床上迫切需要更加安全有效的治疗方案。近年来，MSC-CM作为新的无细胞疗法，因在难愈性创面突出的治疗效果越来越受到研究者的关注。

MSCs主要通过旁分泌因子介导发挥生物学效应[17-18]，已有研究报道MSC-CM保留了亲本细胞的治疗效果，含有大量生物活性因子，同时能够最大限度地减少受体排斥反应，且满足大量生产需求，以及对储存和运输要求条件较低[19]，此外，课题组前期研究结果表明uMSC-CM可促进慢性放射性皮肤溃疡创面愈合[7]。因此，虽尚无uMSC-CM促进CRWI创面愈合的相关研究报道，但基于课题组前期数据，从而推测uMSM-CM在CRWI中具有治疗效果。本研究结果表明，uMSC-CM能够明显提高小鼠皮肤CRWI模型的创面愈合率和愈合质量，且不会造成明显的毒副作用。

CRWI创面难愈与辐射直接导致伤口修复过程中细胞增殖、迁移下降和凋亡增加有关，尤其是成纤维细胞增殖、迁移受抑会影响肉芽组织形成、伤口收缩、胶原纤维沉积和组织重塑[20]。Xia WZ等[21]研究表明，增强创面组织中成纤维细胞的增殖和迁移能力有利于小鼠皮肤创面修复。还有研究发现，MSC-CM可刺激成纤维细胞的增殖、迁移和分化为新的肌成纤维细胞，这是组织重塑所必需的[22]。Zhang B等[23]报道，人脐带间充质干细胞来源的外泌体可通过调节细胞增殖、迁移和凋亡，从而促进大鼠皮肤烧伤模型的伤口愈合。本研究结果表明uMSC-CM可促进胶原纤维沉积，并改善CRWI创面增殖能力降低，抑制细胞凋亡，进一步通过Edu、集落形成、细胞划痕、Transwell和细胞凋亡检测实验结果表明，uMSC-CM可促进辐照后成纤维细胞增殖、迁移及抑制凋亡。

PI3K/AKT信号通路是调节细胞增殖、迁移和凋亡的重要途径，通常由血小板衍生因子和表皮生长因子与受体酪氨酸激酶结合而启动，活化的PI3K将磷脂酰肌醇二磷酸磷酸化为磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸（phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphate, PIP3），AKT通过3-磷酸肌醇依赖的蛋白1和雷帕霉素靶标C2的磷酸化激活，然后与PIP3结合，磷酸化的AKT导致mTORC1激活，进而调控促增殖和迁移mRNA翻译[24]。有研究表明，人羊膜来源的MSC-CM通过上调P-AKT蛋白水平激活PI3K/AKT通路，从而促进细胞增殖并抑制凋亡，及加速小鼠皮肤烧伤模型的伤口愈合[25]。本研究结果表明，uMSC-CM可增加P-PI3K、P-AKT蛋白表达水平，进一步分析发现uMSC-CM可能通过激活PI3K/AKT信号通路，促进辐照后成纤维细胞增殖、迁移并抑制凋亡，从而加速CRWI创面愈合。

综上所述，uMSC-CM作为一种新的无细胞疗法在CRWI创面治疗中具有广阔的应用前景，其促愈作用可能与激活PI3K/AKT信号通路促进成纤维细胞增殖、迁移和抑制凋亡有关，但CRWI由于辐射和创伤的相互作用使得伤口愈合过程非常复杂，uMSC-CM对CRWI创面愈合的影响还可能与其他信号通路和修复细胞激活有关，这将成为下一步研究工作的重点。

## 参 考 文 献

[1] 冉永红，高继宁，卢丙慧，等. 放创复合伤创面难愈机制及治疗的研究进展[J]. 中华放射医学与防护杂志，2018，38(11)：874-880.
Ran YH, Gao JN, Lu BH, et al. Research progresses in the mechanism and treatment of the impaired wound healing of combined radiation?trauma injury[J]. Chin J Radiol Med Prot, 2018, 38(11): 874-880.

[2] Las Heras K, Royo F, Garcia-Vallicrosa C, et al. Extracellular vesicles from hair follicle-derived mesenchymal stromal cells: isolation, characterization and therapeutic potential for chronic wound healing[J]. Stem Cell Res Ther, 2022, 13(1): 147.

[3] Huang YZ, Gou M, Da LC, et al. Mesenchymal stem cells for chronic wound healing: current status of preclinical and clinical studies [J]. Tissue Eng Part B Rev, 2020, 26(6): 555-570.

[4] Sun J, Huang J, Bao GC, et al. *MRI* detection of the malignant transformation of stem cells through reporter gene expression driven by a tumor-specific promoter[J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 284.

[5] Praveen Kumar L, Kandoi S, Misra R, et al. The mesenchymal stem cell secretome: a new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2019, 46: 1-9.

[6] Chouaib B, Haack-Sørensen M, Chaubron F, et al. Towards the standardization of mesenchymal stem cell secretome-derived product manufacturing for tissue regeneration[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(16): 12594.

[7] Chen WC, Wang Y, Zheng JC, et al. Characterization of cellular senescence in radiation ulcers and therapeutic effects of mesenchymal stem cell-derived conditioned medium[J]. Burns Trauma, 2023, 11: tkad001.

[8] 冉新泽，程天民，林 远，等. 全身放射损伤影响皮肤创伤愈合的剂量效应研究[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2002, 22(3): 149-152.

Ran XZ, Cheng TM, Lin Y, et al. Dose-effect relationships of total-body irradiation on healing of cutaneous wound[J]. Chin J Radiol Med Prot, 2002, 22(3): 149-152.

[9] Park E, Ahn GN, Lee NH, et al. Radioprotective properties of eckol against ionizing radiation in mice[J]. FEBS Lett, 2008, 582(6): 925-930.

[10] Prabhu V, Rao BSS, Rao ACK, et al. Photobiomodulation invigorating collagen deposition, proliferating cell nuclear antigen and Ki67 expression during dermal wound repair in mice[J]. Lasers Med Sci, 2022, 37(1): 171-180.

[11] Casimiro MH, Ferreira LM, Santos PMP, et al. Chitosan-based membranes for skin wound repair in a dorsal fold chamber rat model[J]. Pharmaceutics, 2022, 14(12): 2736.

[12] Farzanfar S, Kouzekonan GS, Mirjani R, et al. Vitamin B12-loaded polycaprolacton/gelatin nanofibrous scaffold as potential wound care material[J]. Biomed Eng Lett, 2020, 10(4): 547-554.

[13] Her Y, Lee TK, Ahn JH, et al. Chemical composition of a novel distillate from fermented mixture of nine anti-inflammatory herbs and its UVB-protective efficacy in mouse dorsal skin *via* attenuating collagen disruption and inflammation[J]. Molecules, 2020, 26(1): 124.

[14] Chen S, Wang Q, Han B, et al. Effects of leptin-modified human placenta-derived mesenchymal stem cells on angiogenic potential and peripheral inflammation of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) after X-ray radiation[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2020, 21(4): 327-340.

[15] Yan GH, Sun HQ, Wang F, et al. Topical application of hPDGF-A-modified porcine BMSC and keratinocytes loaded on acellular HAM promotes the healing of combined radiation-wound skin injury in minipigs[J]. Int J Radiat Biol, 2011, 87(6): 591-600.

[16] Kiang JG, Smith JT, Cannon G, et al. Ghrelin, a novel therapy, corrects cytokine and NF-κB-AKT-MAPK network and mitigates intestinal injury induced by combined radiation and skin-wound trauma[J]. Cell Biosci, 2020, 10: 63.

[17] 李锐阳，董秋霖，胡金华，等. 成纤维细胞与间充质干细胞来源外泌体修复急性皮肤创面的比较[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2023, 44(3): 369-378.

Li RY, Dong QL, Hu JH, et al. Comparison of exosomes derived from fibroblasts and mesenchymal stem cells for the treatment of acute wound healing[J]. J Sun Yat Sen Univ(Med Sci), 2023, 44(3): 369-378.

[18] 刘耘佟，李汶洋，向学熔. 脐带间充质干细胞外泌体修复骨质疏松大鼠颅骨缺损的研究[J]. 重庆医科大学学报, 2023, 48(1): 18-23.

Liu YT, Li WY, Xiang XR. Exosomes derived from umbilical cord mesenchymal stem cells repair skull defect of osteoporosis rats: an experimental study[J]. J Chongqing Med Univ, 2023, 48(1): 18-23.

[19] An S, Shen X, Anwar K, et al. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-secreted factors on delay in corneal wound healing by nitrogen mustard[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(19): 11510.

[20] Devalia HL, Mansfield L. Radiotherapy and wound healing[J]. Int Wound J, 2008, 5(1): 40-44.

[21] Xia WZ, Li MX, Jiang XY, et al. Young fibroblast-derived exosomal microRNA-125b transfers beneficial effects on aged cutaneous wound healing[J]. J Nanobiotechnology, 2022, 20(1): 144.

[22] Zhao W, Zhang R, Zang CY, et al. Exosome derived from mesenchymal stem cells alleviates pathological scars by inhibiting the proliferation, migration and protein expression of fibroblasts *via* delivering miR-138-5p to target SIRT1[J]. Int J Nanomedicine, 2022, 17: 4023-4038.

[23] Zhang B, Wang M, Gong AH, et al. HucMSC-exosome mediated-Wnt4 signaling is required for cutaneous wound healing[J]. Stem Cells, 2015, 33(7): 2158-2168.

[24] Yu TY, Gao M, Yang PL, et al. Insulin promotes macrophage phenotype transition through PI3K/Akt and PPAR-γ signaling during diabetic wound healing[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(4): 4217-4231.

[25] Li JY, Ren KK, Zhang WJ, et al. Human amniotic mesenchymal stem cells and their paracrine factors promote wound healing by inhibiting heat stress-induced skin cell apoptosis and enhancing their proliferation through activating PI3K/AKT signaling pathway[J]. Stem Cell Res Ther, 2019, 10(1): 247.

（责任编辑：曾 玲）