

网络出版时间: 2020/5/29 13:03 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200527.1643.013.html

过表达 miR-34a 脂肪干细胞外泌体调控增生性瘢痕成纤维细胞增殖及凋亡的研究

肖向阳 郑德义 王宝云 李自力

摘要 目的 探讨脂肪干细胞(ADSCs)过表达 miR-34a 后释放的外泌体对人增生性瘢痕成纤维细胞(HSF)增殖及凋亡的影响。方法 从人脂肪组织中分离原代 ADSCs,流式细胞术鉴定其表面标记分子,茜素红和碱性磷酸酶染色观察其成骨分化能力;采用 miR-34a 过表达慢病毒感染 ADSCs,获得 miR-34a 过表达的 ADSCs(ADSCs/miR-34a)和阴性对照的 ADSCs(ADSCs/miR-NC),然后提取各组细胞上清液中的外泌体,获得 ADSCs 外泌体(Exo^{ADSCs})、miR-34a 过表达的 ADSCs 外泌体(Exo^{ADSCs/miR-34a})和阴性对照的 ADSCs 外泌体(Exo^{ADSCs/miR-NC})。利用透射电镜观察外泌体形态,Western blot 检测外泌体表面标志蛋白 CD81 和 CD63;再将得到的外泌体分别与 HSF 共培养,分为对照组(HSF + PBS)、Exo^{ADSCs} 处理组(HSF + Exo^{ADSCs})、Exo^{ADSCs/miR-NC} 处理组(HSF + Exo^{ADSCs/miR-NC})和 Exo^{ADSCs/miR-34a} 处理组(HSF + Exo^{ADSCs/miR-34a})。采用 qRT-PCR 法检测各组 ADSCs 及外泌体中 miR-34a 的表达水平;MTT 法检测各组 HSF 细胞的增殖能力;流式细胞术检测各组 HSF 细胞的凋亡水平。Western blot 法检测各组 HSF 细胞凋亡相关蛋白(cleaved-Caspase-3、

Bax 和 Bcl-2)、纤维化相关蛋白(COL I、COL III)及 TGF- β /Smad 信号通路相关蛋白(TGF- β 1、p-Smad2 和 p-Smad3)的表达水平。结果 成功分离得到 ADSCs,并具有成骨分化能力;透射电镜可见直径在 50 ~ 100 nm 呈双层膜结构的圆形或椭圆形囊泡状小体,Western blot 显示外泌体标志性蛋白 CD81 和 CD63 阳性表达;miR-34a 过表达可增加 ADSCs 及其外泌体中 miR-34a 表达水平;与 Exo^{ADSCs} 处理组和 Exo^{ADSCs/miR-NC} 处理组比较,Exo^{ADSCs/miR-34a} 干预可抑制 HSF 增殖($P < 0.05$),提高其凋亡率($P < 0.05$),并上调 cleaved-Caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平($P < 0.05$),并下调 Bcl-2、COL I、COL III、p-Smad2、p-Smad3 和 TGF- β 1 等蛋白表达水平($P < 0.05$)。结论 过表达 miR-34a 的 ADSCs 外泌体可能通过下调 TGF- β /Smad 信号通路抑制 HSF 细胞增殖,促进其凋亡。

关键词 脂肪干细胞;外泌体;miR-34a;人增生性瘢痕成纤维细胞;增殖凋亡

中图分类号 R 62

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)06-0887-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.06.013

2020-03-02 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81760021);贵州省人民医院青年基金(编号:GZSYQN[2015]12号)

作者单位:贵州省人民医院烧伤整形科 贵阳 550002

作者简介:肖向阳 男 硕士研究生;

郑德义 男 博士 主任医师 硕士生导师 责任作者 E-mail: zhongliying1014@163.com

长期愈合的软组织伤口容易形成瘢痕,这不利于伤口愈合质量^[1]。因此,缩短软组织创伤愈合时间,减少瘢痕形成,是临床急需解决的问题。脂肪干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)能分泌多种可溶性因子,如生长因子、细胞因子、胞外体等^[2]。

were treated with Vit D alone or in combination with IFN- α . **Results** The serum Vit D level in CHB group was lower than that in healthy controls (HC) group ($P < 0.05$). The serum Vit D level was positively correlated with albumin (ALB) ($r = 0.339$, $P = 0.002$), negatively correlated with HBV DNA viral load ($r = -0.274$, $P = 0.013$), correlated with e antigen status ($P < 0.05$), no correlation with alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin (TBIL), alkaline phosphatase (ALP), gamma-glutamyl transferase (GGT), HBsAg and HBeAb. Also, the expression levels of Vit D and VDR were related to the severity of CHB. The expression levels of Vit D in serum and VDR in liver tissue of severe CHB patients were lower than those of mild and moderate CHB patients. The expression of VDR, JAK-STAT signal transduction molecules IRF-9 and downstream antiviral protein MxA in the Vit D combination with IFN- α group were higher and the secretion of HBV-related antigens was lower than those in the blank group and the single treatment group. **Conclusion** There may be a decline in the function of the Vit D/VDR signaling pathway in patients with CHB. Vit D may play a synergistic IFN- α antiviral effect by increasing the VDR expression and thereby enhancing the IFN-JAK-STAT signaling pathway.

Key words chronic hepatitis B; vitamin D; vitamin D receptor

外泌体是一个 40 ~ 100 nm 大小的细胞外小泡, 形成于胞质并释放到细胞外环境^[3]。研究^[4]表明 ADSCs 或其外泌体能够促进真皮成纤维细胞在伤口愈合过程中的迁移, 并且在促进皮肤或黏膜软组织创伤修复中有积极作用。miRNAs 在细胞增殖凋亡等各种细胞反应中具有重要作用, 研究^[5]表明 miR-34a 在 ADSCs 作用中过表达能影响细胞周期及增殖, 但在 ADSCs 外泌体干预人增生性瘢痕成纤维细胞 (hypertrophic scar fibroblasts, HSF) 增殖凋亡情况中的作用尚不可知。因此该研究以 HSF 为研究对象, 将其与过表达 miR-34a 的 ADSCs 外泌体共培养后, 探讨 miR-34a 在 ADSCs 外泌体影响 HSF 增殖、凋亡过程中的具体作用机制, 以期为临床研发新的治疗瘢痕疙瘩的治疗方案提供实验证据。

1 材料与方法

1.1 材料

人脂肪组织来源于贵州省人民医院整形外科的一名 27 岁进行吸脂术的健康女性, 术前签署知情同意书; HSF 购自上海素冉生物科技有限公司; miR-34a 过表达及其阳性对照慢病毒 (2×10^8 PFU/ml) 购自上海汉恒生物科技有限公司; DMEM 培养基购自北京索莱宝科技有限公司; 胎牛血清购自美国 HyClone 公司; 胰蛋白酶和胶原酶购自美国 Gibco 公司; TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司; MTT 试剂盒、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、ECL 化学发光试剂盒以及蛋白酶抑制剂均购自上海碧云天生物技术有限公司; qRT-PCR 试剂盒和逆转录试剂盒购自大连宝生物工程有限公司; 兔抗人 cleaved-Caspase-3、Bcl-2、Bax、I 型胶原蛋白 (COL I)、III 型胶原蛋白 (COL III)、p-Smad2、p-Smad3、TGF- β 1 和 GAPDH 抗体、兔抗人 CD90、CD31、CD45、CD81、CD63、小鼠抗人 CD105 及辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 均购自英国 Abcam 公司; ExoQuick-TC 外泌体沉淀液购自美国 System Biosciences 公司。

1.2 方法

1.2.1 ADSCs 的分离及鉴定

用磷酸盐缓冲盐水 (phosphate buffer saline, PBS) 洗涤脂肪组织后, 将脂肪组织切成约 25 ~ 50 μ m 的片状, 用 0.1% 胶原酶在 37 $^{\circ}$ C 下消化 1 h, 通过 100 μ m 滤网过滤消化物, 去除组织碎片获得单细胞悬液。1 000 r/min 离心 5 min 分离含有 ADSCs 的细胞悬液, 共离心 6 次。将 ADSCs 按 5×10^7 个/ml 的浓度接种于培养瓶中。于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 恒温培养箱中培养 72 h 后, 去除

未贴壁细胞。每 2 d 换 1 次培养液, 当细胞融合率达到 80% 后继续传代培养。取第 3 代细胞上流式细胞仪检测 ADSCs 表面分子标志物 CD31、CD45、CD90、CD105 的表达水平, 并采用成骨诱导剂诱导分离出的 ADSCs 成骨分化 21 d, 再使用茜素红和碱性磷酸酶染色观察 ADSCs 成骨分化能力。

1.2.2 细胞感染

取对数生长期 ADSCs, 以 1×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板中, 待细胞生长至 70% 融合度时, 按照病毒感染比率值 (MOI) 50 : 1 分别加入 miR-34a 过表达慢病毒及其阴性对照慢病毒感染 ADSCs, 另取选用不做任何处理的 ADSCs 细胞作为对照, 分别记为 ADSCs/miR-34a 组、ADSCs/miR-NC 组和 ADSCs 组。培养 6 h 后, 更换新鲜培养液, 72 h 后采用 1 mg/L 嘌呤霉素筛选稳定表达株。

1.2.3 外泌体提取及鉴定

将 ADSCs 在无血清培养基中培养 24 h, 加入胰蛋白酶消化后收集培养基, 3 000 r/min 离心 30 min 去除细胞碎片, 通过 0.22 μ m 微孔过滤器。得到细胞上清液, 再用微孔离心过滤装置 100 000 r/min 离心 2 h 浓缩, 然后用 ExoQuick-TC 外泌体沉淀溶液孵育过夜。PBS 将得到的外泌体重悬后, BCA 测定其浓度后置于 -80 $^{\circ}$ C 备用。透射电子显微镜观察收集到的外泌体形态, 通过 Western blot 法检测外泌体标志物蛋白 CD63 和 CD81 的表达。根据不同分组 ADSCs 细胞提取的外泌体分为 3 组, 分别为 ADSCs 外泌体 (Exo^{ADSCs})、ADSCs/miR-NC 外泌体 (Exo^{ADSCs/miR-NC}) 和 ADSCs/miR-34a 外泌体 (Exo^{ADSCs/miR-34a})。

1.2.4 外泌体与 HSF 细胞共培养

取对数生长期 HSF 细胞, 以 5×10^7 个/孔的密度接种于 6 孔板中, 血清饥饿培养 24 h 后, 分为 HSF + PBS 组、HSF + Exo^{ADSCs} 组、HSF + Exo^{ADSCs/miR-NC} 组和 HSF + Exo^{ADSCs/miR-34a} 组, 分别加入含有不同外泌体及等量 PBS 溶液的新鲜无血清培养基继续培养 48 h, 收集细胞进行后续检测。

1.2.5 qRT-PCR 检测 miR-34a 的表达水平

采用 TRIzol 法提取各组 ADSCs 细胞及其外泌体总 RNA, 分光光度计测量 RNA 纯度。采用逆转录酶将总 RNA 反转录到 cDNA, 根据 SYBR 绿色荧光实时定量 PCR 试剂盒说明书, 进行 PCR 检测。其中所用引物为 miR-34a: forward 5'-CTCAACTGGTGTCTGTCGAGTCGGC AATTCAGTTGAGAACAACCA-3'; reverse 5'-ACACTCCAGCTGGGTGGCAG TGTCT-TAGCTG-3'; U6: forward 5'-CTCGCTTCGCAGCACA-3'; reverse 5'-AA CGCTTCACGAATTTGCGT-3'。PCR

反应条件: 94 °C、2 min、94 °C、15 s、60 °C、15 s、72 °C、30 s(40 个循环)。以 U6 为内参, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达。

1.2.6 Western blot 检测外泌体标志蛋白的表达水平 采用不同外泌体处理 HSF 细胞 48 h, 弃培养基, 收集各组细胞, 采用 RIPA 细胞裂解液冰上裂解细胞后 4 °C 12 000 r/min 离心 10 min 后取上清液, 使用 BCA 蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度。高温变性后取 25 μ g 蛋白上样, 用 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE) 分离蛋白质, 并转移至聚偏二氟乙烯(PVDF) 膜上, 经 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h 后, 加入一抗体兔抗人 cleaved-Caspase-3(1 : 500)、Bcl-2(1 : 1 000)、Bax(1 : 1 000)、COL I(1 : 1 000)、COL III(1 : 1 000)、p-Smad2(1 : 300)、p-Smad3(1 : 2 000)、TGF- β 1(1 : 100)、CD81(1 : 1 000)、CD63(1 : 1 000) 和 GAPDH 抗体(1 : 1 000) 4 °C 孵育过夜, 然后用辣根过氧化物酶结合二级抗体(1 : 10 000) 常温孵育 2 h, 使用 ECL 化学发光法对蛋白质进行化学发光, 显影和定影, 将得到的胶片进行拍照后用凝胶图像处理系统分析目的条带。

1.2.7 MTT 法检测细胞增殖 取对数生长期 HSF 细胞, 以 2×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板中, 每组设置 3 个复孔。待细胞生长至 70% 融合度时, 采用不同外泌体处理的 HSF 细胞 48 h, 弃培养基, 将 10 μ l MTT(0.5 mg/ml) 加入各孔中孵育 4 h, 去除上清液, 加入 200 μ l DMSO 终止反应。将细胞在 37 °C

下再培养 15 min, 使用 Bio-Rad 酶标仪在 490 nm 波长处检测每个孔的吸光度(optical density, OD) 值。

1.2.8 流式细胞术检测细胞凋亡 取对数生长期 HSF 细胞, 以 2×10^4 个/孔的密度接种于 6 孔板中, 待细胞生长至 70% 融合度时, 采用不同外泌体处理 HSF 细胞 48 h, 弃培养基, 用 PBS 清洗细胞后, 胰酶消化并收集细胞, 200 r/min 离心 5 min, 弃上清液后重悬细胞, 加入 10 μ l Annexin V-FITC 和 5 μ l 碘化丙啶(propidium iodide, PI) 混匀, 室温避光孵育 10 min, 200 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入 0.5 ml PBS 重悬, 立刻用流式细胞仪分析细胞凋亡情况。

1.3 统计学处理 采用 Graphpad-Prism 7 软件进行统计分析和作图, 所有计量数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用 *t* 检验或单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ADSCs 的鉴定 流式细胞术结果(图 1A) 显示, ADSCs 的表面抗原 CD90、CD105 呈阳性表达, 而 CD31、CD45 呈阴性表达。将 ADSCs 进行成骨诱导后, 茜素红染色结果可见大量橘红色钙结节(图 1B), 碱性磷酸酶染色结果可见胞质内出现蓝色沉淀(图 1C)。说明 ADSCs 分离成功。

2.2 ADSCs 外泌体的鉴定 经透射电子显微镜扫描显示, 发现大部分呈双层膜结构的圆形或椭圆形囊泡状小体, 直径为 50 ~ 100 nm(图 2A)。Western

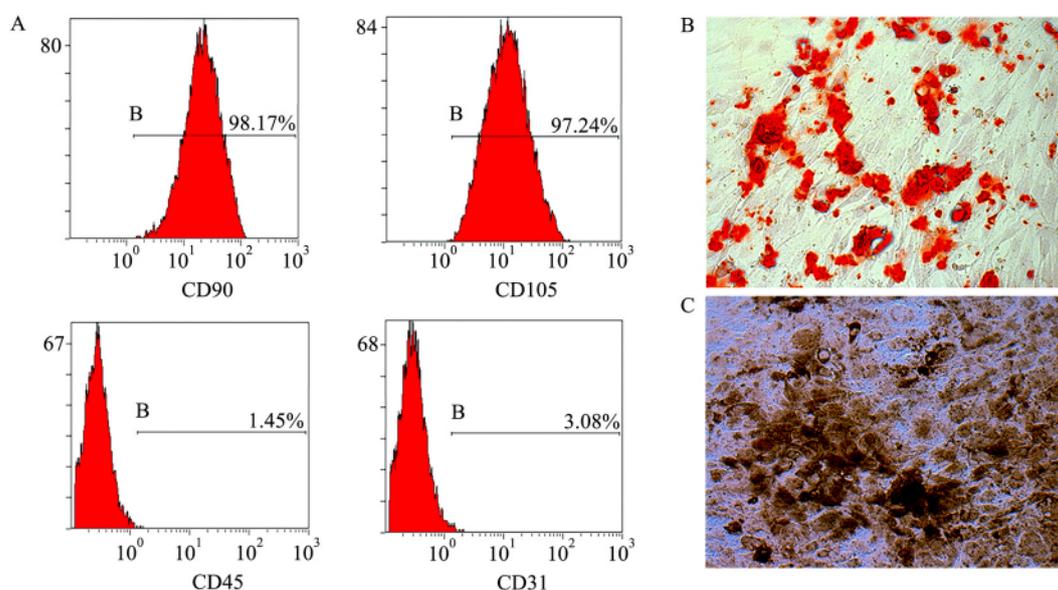


图 1 ADSCs 的鉴定

A: ADSCs 表面抗原 CD90、CD105、CD31 和 CD45 的表达水平; B: 茜素红染色 $\times 200$; C: 碱性磷酸酶染色 $\times 200$

blot 结果显示,与细胞溶解物比较,所提取物质中外泌体特异性表达标志物 CD63 和 CD81 高表达(图 2B)。结果表明,所提取物质为外泌体。

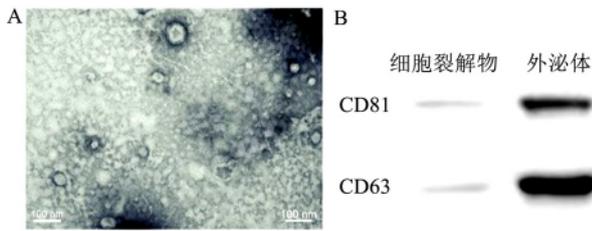


图2 ADSCs 外泌体的鉴定

A: 透射电镜显微镜观察 ADSCs 外泌体 Bar scale = 100 nm, × 140 000; B: Western blot 法检测 ADSCs 的细胞裂解物和外泌体中 CD81 和 CD63 蛋白的表达水平

2.3 慢病毒感染后 ADSCs 及其外泌体中 miR-34a 表达水平比较 qRT-PCR 结果显示,与 ADSCs 和 ADSCs/miR-NC 组比较,ADSCs/miR-34a 组的 miR-34a 的表达水平升高 (F = 198.600, P < 0.05); 与 Exo^{ADSCs} 和 Exo^{ADSCs/miR-NC} 组比较,Exo^{ADSCs/miR-34a} 组的 miR-34a 的表达水平升高 (F = 139.700, P < 0.05)。见图 3。

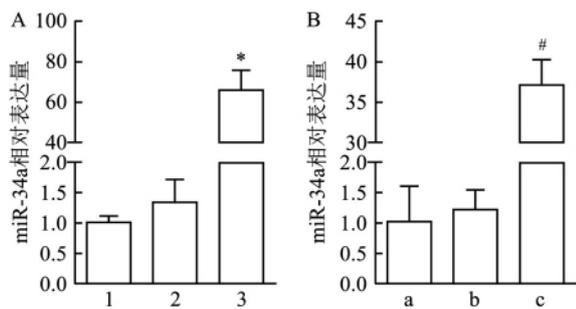


图3 ADSCs 与外泌体的 miR-34a 的表达水平

A: 慢病毒感染 ADSCs 后 miR-34a 的表达水平; B: 慢病毒感染 ADSCs 后,其外泌体中 miR-34a 的表达水平; 1: ADSCs; 2: ADSCs/miR-NC; 3: ADSCs/miR-34a; a: Exo^{ADSCs}; b: Exo^{ADSCs/miR-NC}; c: Exo^{ADSCs/miR-34a}; 与 ADSCs 或 ADSCs/miR-NC 组比较: * P < 0.05; 与 Exo^{ADSCs} 或 Exo^{ADSCs/miR-NC} 组比较: # P < 0.05

2.4 过表达 miR-34a 的 ADSCs 外泌体对 HSF 增殖能力的影响 MTT 24、48、72 h 结果显示,HSF + PBS 组、HSF + Exo^{ADSCs} 组、HSF + Exo^{ADSCs/miR-NC} 组和 HSF + Exo^{ADSCs/miR-34a} 组细胞组间增殖能力差异有统计学意义 (F = 108.721, P < 0.05; F = 206.433, P < 0.05; F = 213.148, P < 0.05); 与 HSF + PBS 组比较,HSF + Exo^{ADSCs} 组 HSF 细胞增殖能力降低 (P < 0.05); 与 HSF + Exo^{ADSCs} 和 HSF + Exo^{ADSCs/miR-NC} 组比

较 HSF + Exo^{ADSCs/miR-34a} 组 HSF 细胞增殖能力降低 (P < 0.05)。见图 4。

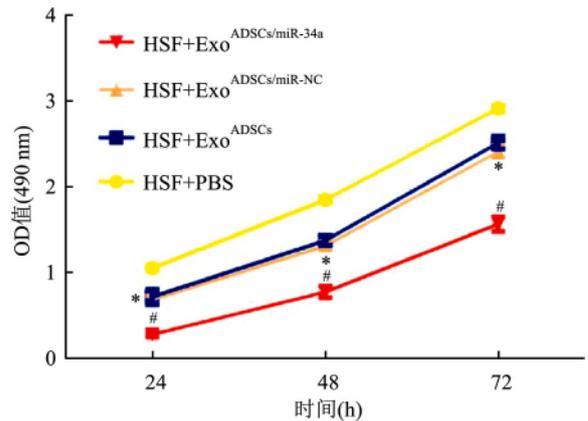


图4 过表达 miR-34a 的 ADSCs 外泌体对 HSF 细胞增殖能力的影响

与 HSF + PBS 组比较: * P < 0.05; 与 HSF + Exo^{ADSCs} 或 HSF + Exo^{ADSCs/miR-NC} 组比较: # P < 0.05

2.5 过表达 miR-34a 的 ADSCs 外泌体对 HSF 细胞凋亡的影响 如图 5、6 所示,与 HSF + PBS 组比较,HSF + Exo^{ADSCs} 组 HSF 细胞凋亡率升高,促凋亡蛋白 cleaved-Caspase-3 和 Bax 蛋白水平也升高,而抗凋亡蛋白 Bcl-2 蛋白水平降低 (P < 0.05); 与 HSF + Exo^{ADSCs} 和 HSF + Exo^{ADSCs/miR-NC} 组比较,HSF + Exo^{ADSCs/miR-34a} 组 HSF 细胞凋亡率升高,cleaved-Caspase-3 和 Bax 蛋白水平也升高,而 Bcl-2 蛋白表达水平降低 (P < 0.05)。

2.6 过表达 miR-34a 的 ADSCs 外泌体对 HSF 纤维化及 TGF-β/Smad 信号通路相关蛋白表达的影响 Western blot 检测结果显示,与 HSF + PBS 组比较,HSF + Exo^{ADSCs} 组 HSF 细胞 COL I、COL III、p-Smad2、p-Smad3、TGF-β1 蛋白表达水平降低 (P < 0.05); 与 HSF + Exo^{ADSCs} 和 HSF + Exo^{ADSCs/miR-NC} 组比较,HSF + Exo^{ADSCs/miR-34a} 组 HSF 细胞 COL I、COL III、p-Smad2、p-Smad3、TGF-β1 蛋白表达水平降低 (P < 0.05),见图 7。

3 讨论

脂肪组织广泛分布于人体内,在生理状态下对邻近的软组织起着重要的支持和保护作用。同时,脂肪组织作为一种活跃的内分泌器官,也是新陈代谢、生长发育、抗感染等生物学过程中的关键因素。自体脂肪移植用于复杂的伤口修复,在整形手术中也常用于软组织再生。脂肪间充质干细胞,在软组织

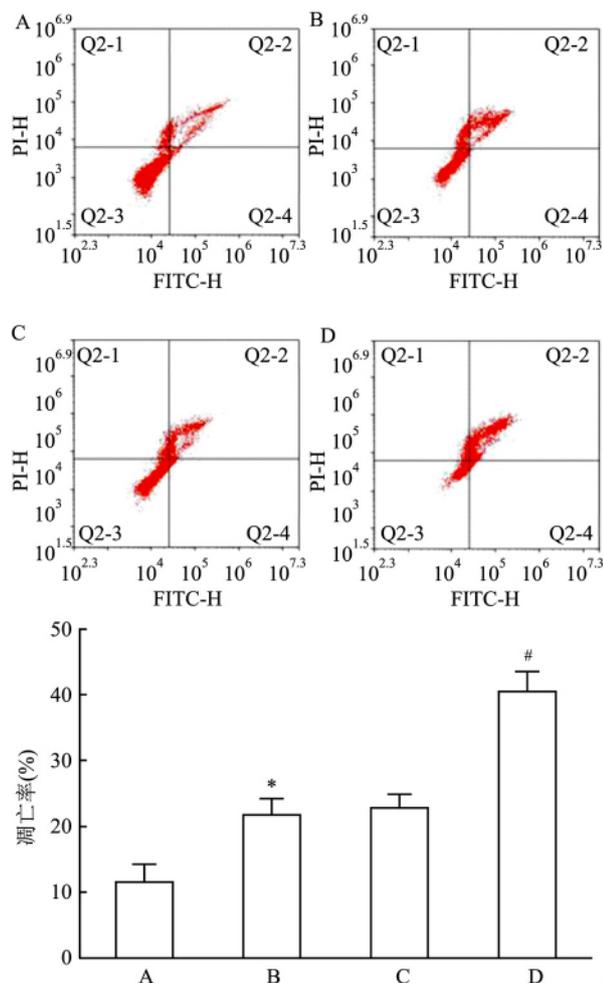


图5 过表达 miR-34a 的 ADSCs 外泌体对 HSF 细胞凋亡的影响

A: HSF + PBS; B: HSF + Exo^{ADSCs}; C: HSF + Exo^{ADSCs/miR-NC}; D: HSF + Exo^{ADSCs/miR-34a}; 与 HSF + PBS 组比较: * $P < 0.05$; 与 HSF + Exo^{ADSCs} 或 HSF + Exo^{ADSCs/miR-NC} 组比较: # $P < 0.05$

创伤修复中发挥着重要作用^[6]。但其作用机制尚不清楚。目前加速愈合和减少瘢痕形成的传统方法包括皮肤移植^[7]、激光治疗^[8]和局部应用一些生长因子^[9]。然而,这些方法可能导致萎缩性瘢痕、色素异常、皮肤坏死等不良后果^[10]。此外,局部注射因子很容易被体液降解,并且其剂量和浓度在伤口处经常发生较大的变化^[11]。因此,有必要寻找一种稳定、有效、安全的新方法来促进软组织创面的愈合。

外泌体是一种直径为 40 ~ 100 nm 的盘状囊泡,包含了多种 miRNAs 和蛋白质。外泌体天然存在于体液中,被视为特异性分泌的膜泡,参与细胞间通讯。研究^[12]表明,脐带间充质干细胞分泌的外泌体可有效修复肝纤维化。脂肪间充质干细胞分泌的外泌体可通过 Wnt 信号途径影响乳腺癌细胞的迁

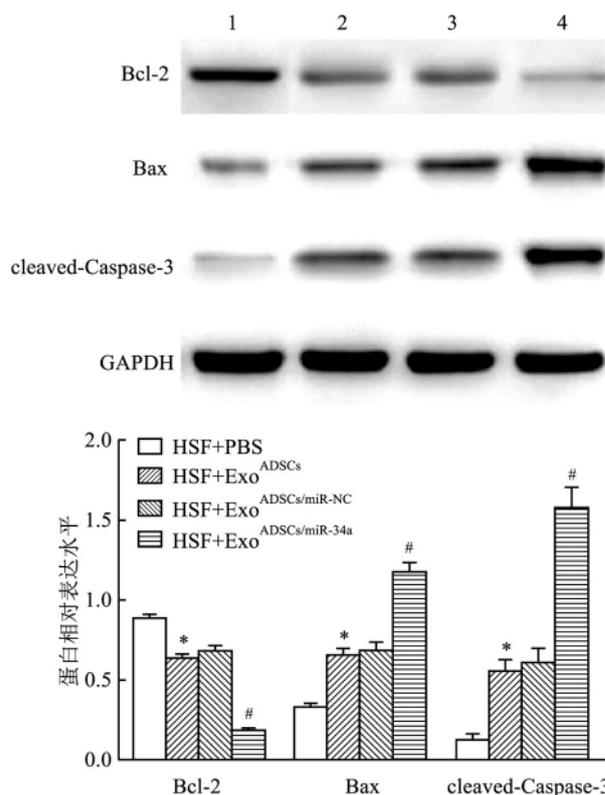


图6 过表达 miR-34a 的 ADSCs 外泌体对 HSF 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

1: HSF + PBS; 2: HSF + Exo^{ADSCs}; 3: HSF + Exo^{ADSCs/miR-NC}; 4: HSF + Exo^{ADSCs/miR-34a}; 与 HSF + PBS 组比较: * $P < 0.05$; 与 HSF + Exo^{ADSCs} 或 HSF + Exo^{ADSCs/miR-NC} 组比较: # $P < 0.05$

移^[13]。Hu et al^[6]研究发现,培养 ADSCs 的条件培养基可以促进成纤维细胞的迁移、增殖和胶原合成,进一步发现其分泌的外泌体可以引起成纤维细胞增殖、迁移和胶原合成的改变,减少瘢痕形成,有利于伤口愈合。本研究结果显示,ADSCs 外泌体 Exo^{ADSCs} 能抑制人增生性瘢痕成纤维细胞的增殖,促进细胞凋亡,这与他人的研究 ADSCs 条件培养基促进成纤维细胞增殖的结果相反,可能由于不同成纤维细胞种类引起的,但在 2 种成纤维细胞中,Exo^{ADSCs} 均利于伤口愈合,治疗效果是一致的。另外,在伤口愈合的早期,外泌体可促进 I 型和 III 型胶原的分布以缩短愈合时间,而在后期外泌体可抑制胶原合成以减少瘢痕的形成^[6],这可能是 Exo^{ADSCs} 对 2 种成纤维细胞具有不同作用效果的原因。本研究还显示,在胶原蛋白以及纤维化方面,Exo^{ADSCs} 能通过抑制 TGF- β /Smad 信号通路以及胶原蛋白 I 和胶原蛋白 III 的表达水平来实现其抗的效用。

外泌体中 miRNAs 含量丰富且参与细胞大多数生理过程。miR-34a 作为肿瘤抑制子,也对心肌成

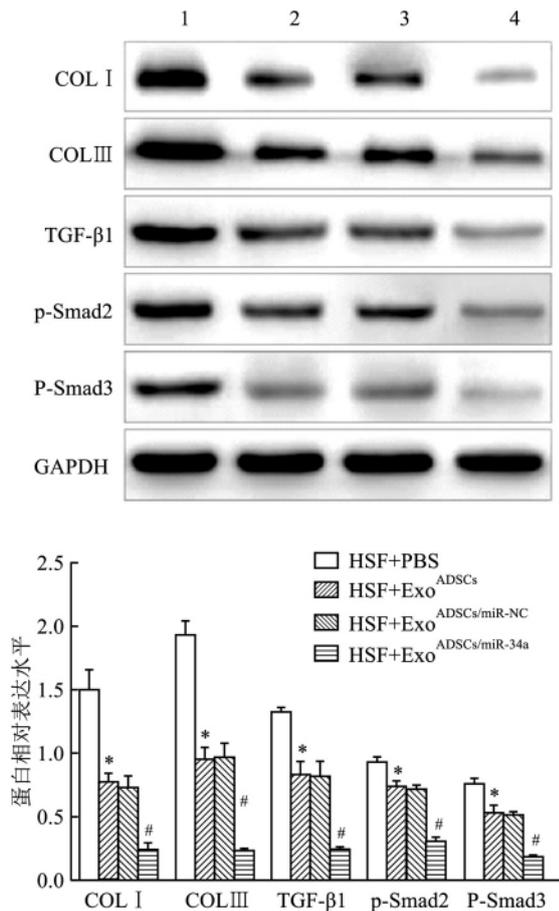


图7 过表达 miR-34a 的 ADSCs 外泌体对 HSF 细胞纤维化及 TGF-β/Smad 信号通路相关蛋白表达的影响

1: HSF + PBS; 2: HSF + Exo^{ADSCs}; 3: HSF + Exo^{ADSCs/miR-NC}; 4: HSF + Exo^{ADSCs/miR-34a}; 与 HSF + PBS 组比较: * $P < 0.05$; 与 HSF + Exo^{ADSCs} 或 HSF + Exo^{ADSCs/miR-NC} 组比较: # $P < 0.05$.

纤维化具有一定作用^[14]。miR-34a 是硬化成纤维细胞的潜在重要生物靶点,其通过调节 Smad4 促进 TGF-β1 诱导的心肌成纤维化细胞增殖、转分化和胶原分泌^[14]。但在皮肤的成纤维细胞中 miR-34a 的作用没有相关研究报道。已有研究^[15]证实抗凋亡蛋白 Bcl-2 是 miR-34a 的功能靶点,miR-34a 通过与 3'-UTR 结合抑制 Bcl-2 的表达水平,进而促进肿瘤细胞凋亡。另外,miR-34a 能抑制 ADSCs 的成骨成脂分化,并且降低了 CDKs 和 Cyclins 等多种细胞周期调控因子的表达,在细胞 S 期积累分裂细胞,抑制 ADSCs 的增殖^[5]。这些研究报道从侧面证明了 miR-34a 对 ADSCs 增殖凋亡以及细胞纤维化有一定的作用。本研究结果显示,miR-34a 过表达的 ADSCs 外泌体能有效抑制 HSF 的增殖,促进细胞凋亡,并且通过下调 TGF-β/Smad、I 型和 III 型胶原蛋白的表达抑制 HSF 的纤维化和胶原合成来减少瘢痕

的生成。从 miRNAs 水平阐述了 ADSCs 外泌体对瘢痕成纤维细胞的作用,对临床上开发新的治疗方案提供了有力的证据。

参考文献

- [1] Ogawa R. Keloid and hypertrophic scars are the result of chronic inflammation in the reticular dermis[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(3): e606.
- [2] Sukho P, Kirpensteijn J, Hesselink J W, et al. Effect of cell seeding density and inflammatory cytokines on adipose tissue-derived stem cells: an *in vitro* study[J]. Stem Cell Rev Rep, 2017, 13(2): 267-77.
- [3] Marote A, Teixeira F G, Mendes-Pinheiro B, et al. MSCs-derived exosomes: cell-secreted nanovesicles with regenerative potential[J]. Front Pharmacol, 2016, 7: 231.
- [4] Caviglia H, Landro M E, Gallo E, et al. Is it possible to use autologous adipose graft for wound repair in patients with coagulation disorders[J]. Haemophilia, 2016, 22(2): 298-302.
- [5] Park H, Park H, Pak H J, et al. miR-34a inhibits differentiation of human adipose tissue-derived stem cells by regulating cell cycle and senescence induction[J]. Differentiation, 2015, 90(4-5): 91-100.
- [6] Hu L, Wang J, Zhou X, et al. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts[J]. Sci Rep, 2016, 6: 32993.
- [7] Kato Y, Iwata T, Washio K, et al. Creation and transplantation of an adipose-derived stem cell (ASC) sheet in a diabetic wound-healing model[J]. J Vis Exp, 2017, (126).
- [8] Karmisholt K E, Haerskjold A, Karlsmark T, et al. Early laser intervention to reduce scar formation—a systematic review[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2018, 32(7): 1099-110.
- [9] Lichtman M K, Otero-Vinas M, Falanga V. Transforming growth factor beta (TGF-β) isoforms in wound healing and fibrosis[J]. Wound Repair Regen, 2016, 24(2): 215-22.
- [10] Alster T, Hirsch R. Single-pass CO2 laser skin resurfacing of light and dark skin: extended experience with 52 patients[J]. J Cosmet Laser Ther, 2003, 5(1): 39-42.
- [11] Shen G Y, Park I H, Song Y S, et al. Local injection of granulocyte-colony stimulating factor accelerates wound healing in a rat excisional wound model[J]. Tissue Eng Regen Med, 2016, 13(3): 297-303.
- [12] Yin F, Wang W Y, Jiang W H. Human umbilical cord mesenchymal stem cells ameliorate liver fibrosis *in vitro* and *in vivo*: from biological characteristics to therapeutic mechanisms[J]. World J Stem Cells, 2019, 11(8): 548-64.
- [13] Lin R, Wang S, Zhao R C. Exosomes from human adipose-derived mesenchymal stem cells promote migration through Wnt signaling pathway in a breast cancer cell model[J]. Mol Cell Biochem, 2013, 383(1-2): 13-20.
- [14] Huang Y, Qi Y, Du J Q, et al. MicroRNA-34a regulates cardiac

fibrosis after myocardial infarction by targeting Smad4 [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2014, 18(12): 1355-65.
[15] Werner T V, Hart M, Nickels R, et al. MiR-34a-3p alters prolifer-

ation and apoptosis of meningioma cells in vitro and is directly targeting smad4, frat1 and bcl2 [J]. *Aging (Albany NY)*, 2017, 9(3): 932-54.

Regulation of exosomes derived from miR-34a overexpression of adipose derived stem cells effects on proliferation and apoptosis of human hypertrophic scar fibroblasts

Xiao Xiangyang, Zheng Deyi, Wang Baoyun, et al

(Dept of Burn and Plastic Surgery, Guizhou People's Hospital, Guiyang 550002)

Abstract Objective To investigate the effect of exosomes (Exo) released from adipose derived stem cells (ADSCs) with overexpressed miR-34a on proliferation and apoptosis of human hypertrophic scar fibroblasts (HSF). **Methods** Primary ADSCs were isolated from human adipose tissue and their surface markers were identified by flow cytometry. The osteogenic differentiation of ADSCs was observed by using alizarin red and alkaline phosphatase staining. ADSCs were infected by lentiviruses containing miR-34a to obtain over-expressed miR-34a ADSCs (ADSCs/miR-34a) and negative control ADSCs (ADSCs/miR-NC). The exosome was extracted from cell supernatant of each group and ADSCs exosome (Exo^{ADSCs}), over-expressed miR-34a ADSCs exosome (Exo^{ADSCs/miR-34a}) and negative control ADSCs exosome (Exo^{ADSCs/miR-NC}) were obtained. The morphology of exosomes was observed by transmission electron microscope (TEM), and the surface marker proteins CD81 and CD63 were detected by Western blot. The exosomes were co-cultured with HSF and divided into control group (HSF + PBS), Exo ADSCs treatment group (HSF + Exo^{ADSCs}), Exo^{ADSCs/miR-NC} treatment group (HSF + Exo^{ADSCs/miR-NC}) and Exo^{ADSCs/miR-34a} treatment group (HSF + Exo^{ADSCs/miR-34a}). Quantificational real-time PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression of miR-34a in ADSCs and exosomes. The proliferation of HSF cells was detected by MTT assay. The apoptotic rate of HSF cells was detected by flow cytometry. The expression levels of apoptosis related proteins (cleaved-Caspase-3, Bax and Bcl-2), fibrosis-related proteins (COL I, COL III) and TGF- β /Smad signal pathway related proteins (TGF- β 1, p-Smad 2 and p-Smad3) were detected by Western blot assay. **Results** ADSCs were successfully isolated and possessed osteogenic differentiation ability. TEM showed round or oval vesicle bodies with a diameter of 50 ~ 100 nm with bilayer membrane structure. Western blot showed positive expression of CD81 and CD63, which were the marker proteins of exosomes. Overexpression of miR-34a could increase the expression of miR-34a in ADSCs and exosomes. Compared with Exo^{ADSCs} group and Exo^{ADSCs/miR-NC} group, Exo^{ADSCs/miR-34a} intervention could inhibit HSF cell proliferation ($P < 0.05$), increase cell apoptosis rate ($P < 0.05$), up-regulate the expression of cleaved-Caspase-3 and Bax protein ($P < 0.05$), and down-regulate the expression of Bcl-2, COL I, COL III, p-Smad2, p-Smad3 and TGF- β 1 protein ($P < 0.05$). **Conclusion** The exosome of miR-34a overexpressed ADSCs may inhibit the HSF cell proliferation and promote cell apoptosis by down-regulating TGF- β /Smad signaling pathway. **Key words** adipose derived stem cells; exosome; miR-34a; human hypertrophic scar fibroblasts; proliferation and apoptosis