



人脂肪间充质干细胞外泌体通过上调 β -catenin、c-Myc和细胞周期蛋白表达促进表皮干细胞增殖*

刘金伟^{1)**} 曹高标^{1)**} 程贺云²⁾ 杜伟伟²⁾ 张广亮²⁾ 金光哲²⁾ 张 革³⁾ 王兆东³⁾刘 喆³⁾ 巨积辉²⁾ 乐颖影⁵⁾ 傅 奕^{4)***} 侯瑞兴^{1,2,3)***}⁽¹⁾ 扬州大学医学院教学医院苏州瑞华骨科医院手外科, 苏州 215104; ⁽²⁾ 苏州大学附属瑞华医院手外科, 苏州 215104;⁽³⁾ 苏州大学附属瑞华医院苏州市手外科应用技术研究, 苏州 215104;⁽⁴⁾ 苏州大学基础医学与生物科学学院人体解剖与组织胚胎学系, 苏州 215123;⁽⁵⁾ 中国科学院上海营养与健康研究所, 上海 200031)

摘要 本研究探讨人脂肪间充质干细胞来源的外泌体 (ADSC-Exos) 对人表皮干细胞 (EpSCs) 增殖的影响及机制。首先使用 I 型胶原酶分离人脂肪组织 ADSCs, 中性蛋白酶 II 和胰酶分离人皮肤组织 EpSCs; 采用 ExoQuick-TC 试剂分离 ADSCs 培养上清中的外泌体。然后通过 MTT 法、细胞免疫荧光检测 Ki67, BrdU 掺入实验检测 ADSC-Exos 对 EpSCs 增殖的影响, 流式细胞术检测 ADSC-Exos 对 EpSCs 细胞周期的影响。通过 H&E 染色、免疫组化染色检测细胞增殖标志分子及表皮干细胞标志分子的表达, 以观察 ADSC-Exos 对体外培养皮肤组织的结构及 EpSCs 增殖的影响。结果显示: ADSC-Exos 能以浓度依赖性和时间依赖性的方式促进 EpSCs 增殖, 增加 S 期细胞数, 减少 G1 期细胞数; ADSC-Exos 也能促进体外培养皮肤组织中的 EpSCs 增殖。机制研究发现: ADSC-Exos 对 EpSCs 的促增殖作用能部分被 β -catenin 抑制剂 XAV-939 或 c-Myc 抑制剂 10058-F4 所抑制。ADSC-Exos 能促进 EpSCs 表达 β -catenin、c-Myc 及 cyclin E1、A2、D1, XAV-939 能抑制 ADSC-Exos 诱导的 β -catenin、c-Myc 以及 cyclin E1、A2、D1 表达, 10058-F4 能抑制 ADSC-Exos 诱导的 c-Myc 和 cyclin D1、A2、E1 表达。综上, ADSC-Exos 能显著促进 EpSCs 增殖, 其作用部分是由上调 β -catenin、c-Myc 和 cyclin E1、A2、D1 表达所介导。

关键词 外泌体, 脂肪间充质干细胞, 表皮干细胞, 细胞增殖**中图分类号** Q28, Q291**DOI:** 10.16476/j.pibb.2020.0303

表皮干细胞 (epidermal stem cells, EpSCs) 位于皮肤组织的表皮层基底部, 能自我更新、分化成表皮层的角质细胞, 在皮肤表皮层的自我更新及皮肤稳态维持中发挥重要作用。在皮肤损伤时, 伤口周围的 EpSCs 被激活, 迅速增殖并迁移到皮肤损伤部位, 促进伤口的再上皮化和伤口愈合^[1-2]。大面积皮肤缺损 (如烧伤、外伤) 和慢性溃疡 (如糖尿病足溃疡) 由于 EpSCs 缺失, 导致创面难以愈合, 是临床治疗的难题, 而通过自体皮片或皮瓣移植进行治疗, 则会造成机体的二次损伤。近年来, 随着干细胞研究的进展, 干细胞对皮肤创面的治疗, 以及以干细胞为种子细胞制备组织工程皮肤用于皮肤创面治疗, 成为皮肤创面治疗的研究热点^[3-5]。EpSCs 在皮肤的自我更新和皮肤伤口愈合中发挥重

要作用, 使其成为治疗大面积皮肤创面以及制备组织工程皮肤的理想种子细胞^[5-7]。但是 EpSCs 来源较少, 体外培养时增殖较慢。目前关于促进 EpSCs 增殖的内源调控因子的研究较少^[8], 寻找能促进 EpSCs 增殖的内源性因子将有利于建立体外扩增 EpSCs 的新方法, 促进 EpSCs 作为种子细胞应用于皮肤创面治疗或组织工程皮肤制备。

* 国家自然科学基金 (31900969) 和姑苏卫生人才培养项目 (GSWS2019088) 资助。

** 并列第一作者。

*** 通讯联系人。

侯瑞兴. Tel: 0512-67681098, E-mail: hrx2020@suda.edu.cn

傅奕. Tel: 13962526096, E-mail: yfu@suda.edu.cn

收稿日期: 2020-08-20, 接受日期: 2020-11-05

脂肪间充质干细胞 (adipose-derived mesenchymal stem cells, ADSCs) 存在于脂肪组织, 具有自我更新和多向分化的能力, 能通过促进新生血管形成、调节炎症反应等方式促进创面修复和皮肤再生^[9]. 研究发现, ADSCs 能分泌促进细胞增殖、分化、迁移的生物活性因子, 包括生长因子、细胞因子、趋化因子和外泌体等, 其中外泌体的治疗潜力正日益受到研究者的重视^[10-11]. 研究发现, 脂肪间充质干细胞来源的外泌体 (exosomes from adipose-derived mesenchymal stem cells, ADSC-Exos) 能促进皮肤伤口愈合, 能促进血管生成、角质细胞和成纤维细胞增殖、迁移^[12-14]. 根据 ADSC-Exos 对角质细胞增殖的促进作用, 我们推测其也可能促进 EpSCs 增殖.

本研究探究了 ADSC-Exos 对离体培养 EpSCs 及皮肤组织中 EpSCs 增殖的影响及机制, 以期为体外扩增 EpSCs 提供新的方法.

1 材料与方法

1.1 材料

经苏州大学附属瑞华医院伦理委员会批准, 患者本人知情同意, 在进行股前外侧皮瓣移植修复皮肤缺损时, 取皮瓣修整时剩余的皮肤和皮下脂肪组织分别用于分离表皮干细胞和脂肪间充质干细胞. 患者年龄为 20~40 岁, 无其他疾病. DMEM 培养基购自 Hyclone 公司. KGM2 培养基购自 Promocell 公司. BrdU 试剂盒、胎牛血清、F12 培养基购自 Gibco 公司. 中性蛋白酶 II、胰蛋白酶、多聚甲醛、人胎盘 IV 型胶原购自 Sigma-Aldrich 公司. 间充质干细胞成脂诱导培养基和成骨诱导培养基购自 Stemcell 科技公司. PE 标记的小鼠抗人 CD34 抗体、PE 标记的小鼠抗人 CD45 抗体、APC 标记的小鼠抗人 CD73 抗体、FITC 标记的小鼠抗人 CD90 抗体购自 BD 生物科学公司. 兔抗人 Ki67、c-Myc、 β -catenin、cyclin A2、cyclin D1、cyclin E1、CD63、Alix 抗体, 小鼠抗人角蛋白 19、 β 1 整合素、 α 6 整合素、PCNA 单克隆抗体, FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG, Cy3 标记的山羊抗小鼠 IgG 购自 Abcam 公司. 小鼠抗人 GAPDH 抗体购自正能生物技术公司. 辣根过氧化物酶标记的二抗、DAPI、MTT、BCA 蛋白质浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术公司. PrimeScript™ RTRNA 反转录试剂盒、DL500 DNA marker 购自 TaKaRa 公司. PCR 引物购自金唯智生物科技有限公司.

1.2 细胞分离与培养

按本实验室已建立的方法分离和培养人 EpSCs^[15], 皮肤组织用含青、链霉素的磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗后, 加入 0.25% 中性蛋白酶 II 在 4℃ 消化过夜, 分离表皮层, 切碎后加入 0.05% 胰蛋白酶消化 10 min, 吹打分散细胞, 经 200 目滤网过滤后离心, 用 KGM2 培养基重悬细胞, 接种至预先用 IV 型胶原蛋白包被的培养皿中. 10 min 后换液, 获得贴壁的 EpSCs. 用 KGM2 培养基培养 48 h 后换液. 细胞长至 70%~80% 汇合后用 0.25% 胰蛋白酶消化、传代, 取第二代细胞用于实验.

按文献方法分离和培养脂肪间充质干细胞^[16]. 脂肪组织用含青、链霉素的 PBS 清洗, 剪碎后用 0.1% I 型胶原酶在 37℃ 消化 1 h, 200 目滤网过滤后离心, 细胞重悬于含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 (1:1) 培养基中, 培养 12 h, 更换培养基, 获得贴壁的 ADSCs. 培养 48 h 后换液, 细胞 70%~80% 汇合后用 0.25% 胰蛋白酶消化、传代, 取第 2~4 代细胞用于实验, 确保每次 ADSCs 分离、接种和培养的实验条件相同, 使不同批次获得的 ADSCs 纯度和干细胞特性尽可能保持一致.

1.3 EpSCs 及 ADSCs 的鉴定

流式细胞分析: 培养的 EpSCs 或 ADSCs 用 0.25% 胰蛋白酶消化、离心, 用 FACS 溶液 (含 5% FBS 和 1% 山羊血清的 PBS) 重悬细胞、室温封闭 40 min, 加入一抗 (EpSCs 鉴定: 抗 α 6 整合素抗体和抗 CD71 抗体; ADSCs 鉴定: 抗 CD73、CD90、CD34、CD45 抗体), 室温孵育 30 min, 用 FACS 溶液洗涤细胞 3 次, 加入 FACS 溶液重悬细胞, 放入流式细胞仪进行检测.

免疫荧光染色: 培养于盖玻片的 EpSCs 用 4% 多聚甲醛固定 10 min, 滴加 10% 正常山羊血清, 室温封闭 60 min; 滴加抗 β 1 整合素单抗或抗 CK19 单抗, 于湿盒 4℃ 过夜, 加入相应的荧光二抗, 室温孵育 1 h, DAPI 染核后在荧光显微镜下观察并拍照.

1.4 ADSCs 的成脂、成骨分化及鉴定

ADSCs 培养至 90%~100% 汇合, 加入间充质干细胞成脂培养基培养 9 d, 或加入间充质干细胞成骨诱导培养基培养 10 d. 细胞经 10% 多聚甲醛固定 10 min, 成脂分化细胞用油红 O 染色, 成骨分化细胞用茜素红染色, 共 20 min, 于显微镜下观察并拍照.

1.5 ADSC-Exos的分离与鉴定

参考文献方法分离ADSCs分泌的外泌体^[12]. 第2~4代ADSCs在无血清的DMEM/F12培养基培养48 h, 取上清, 离心后取上清, 用100 Ku超滤管浓缩, 按照5:1 (v:v) 加入EXOquick-TC外泌体沉淀试剂, 离心后用PBS重悬沉淀 (即ADSC-Exos). 不同批次ADSCs的接种密度、培养基用量及培养时间、无血清培养的时间、无血清培养上清的收集和浓缩、ADSC-Exos的分离条件相同, 以确保不同批次分离的ADSC-Exos具有一致性. 采用分离ADSC-Exos同样的方法分离人血清及胎牛血清来源的外泌体.

使用BCA法检测ADSC-Exos的蛋白质浓度. 通过透射电镜观察ADSC-Exos形态. 使用纳米粒径分析仪分析ADSC-Exos粒径. 通过蛋白质印迹 (Western blot) 检测ADSC-Exos中的CD63、Alix及GAPDH, 以鉴定ADSC-Exos.

1.6 EpSCs增殖及细胞周期的检测

MTT实验: EpSCs以1 000个细胞/孔接种于预先包被IV型胶原蛋白的96孔板, 培养2 d后用不同浓度的ADSC-Exos刺激24、48 h, 或用20 mg/L ADSC-Exos、人血清来源外泌体 (HS-Exos) 或胎牛血清来源外泌体 (FBS-Exos) 刺激1、2、3、4 d, 加入MTT继续培养4 h, 去上清后加入DMSO溶解结晶, 用酶标仪检测490 nm波长下的吸光度值 (A_{490}).

BrdU掺入实验: EpSCs以1 000个细胞/孔接种于预先包被IV型胶原蛋白的96孔板, 培养2 d后用20 mg/L ADSC-Exos刺激不同时间, 加入BrdU, 12 h后去除培养基, 加入固定液室温固定30 min, 清洗后加入小鼠抗BrdU抗体, 室温孵育1 h, 清洗后加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG, 室温孵育30 min, 清洗后避光加入TMB孵育30 min, 加入终止液终止反应, 用酶标仪检测450 nm下的吸光度值 (A_{450}).

Ki67免疫荧光染色: EpSCs细胞加20 mg/L ADSC-Exos或等体积PBS刺激24 h, 4%多聚甲醛固定10 min, 滴加10%正常山羊血清室温封闭60 min, 滴加抗Ki67抗体, 4℃过夜, 加入荧光二抗, 室温孵育1 h, DAPI染核后在荧光显微镜下观察并拍照.

细胞周期检测: 将EpSCs按 1.0×10^5 个细胞/孔接种于预先包被IV型胶原蛋白的6孔板, 培养24 h后, 加入2 mmol/L 胸腺嘧啶核苷 (TdR) 培养

15 h, 用PBS清洗细胞2次后加入新鲜KGM2培养基培养10 h, 再次加入2 mmol/L TdR培养15 h, 用PBS清洗细胞2次. 实验组加入20 mg/L ADSC-Exos, 对照组加与ADSC-Exos等体积的PBS, 培养12 h后消化、收集细胞并用75%酒精固定, 加入PI/RNase染液避光孵育20 min, 放入流式细胞仪进行检测.

1.7 皮肤组织体外培养及细胞增殖检测

取新鲜皮肤组织剪成0.5 cm × 0.5 cm大小, 以Transwell培养皿为培养支架, 使皮肤表面暴露于空气进行培养. 实验组在真皮和表皮之间分5点注射ADSC-Exos, 共计注射20 μg, 对照组注射等体积的PBS. 培养2 d和5 d后的皮肤组织做冰冻切片, 一部分切片经苏木素-伊红 (H&E) 染色观察表皮层厚度. 另一部分切片通过免疫组化染色检测细胞增殖标志物增殖细胞核抗原 (PCNA) 以及表皮干细胞标志分子的表达. 步骤简述如下: 皮肤组织切片经丙酮固定后用山羊血清在37℃封闭30 min. 滴加抗β1整合素、抗α6整合素或抗PCNA抗体, 4℃过夜, PBS洗涤3次. 滴加MaxVision HRP-Polymer标记的二抗, 孵育10~15 min, PBS洗涤3次. 将切片与DAB显色剂在避光条件下孵育10 min, 用自来水缓慢冲洗. 用苏木素复染细胞核, 乙醇梯度脱水, 二甲苯透明, 中性树脂密封. 用ImageJ软件测量免疫组织化学染色的阳性区域面积.

1.8 蛋白质免疫印迹 (Western blot)

EpSCs用1 μmol/L 10058-F4或1 μM XAV-939预处理0.5 h后, 加或不加20 mg/L ADSC-Exos刺激24 h; 对照组EpSCs加入等量溶剂 (0.01% MSO) 预处理0.5 h, 加与ADSC-Exos等量的PBS培养24 h. 消化细胞, 加入含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液裂制备细胞裂解液. BCA法测定蛋白质浓度. 配制SDS-PAGE凝胶行蛋白质电泳, 将凝胶中的蛋白质转移至PVDF膜, 5%脱脂奶粉封闭, 用抗β-catenin、c-Myc、或细胞周期蛋白的一抗4℃孵育过夜, TBST清洗3次. 添加辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗, 室温孵育1 h, TBST清洗3次, 加SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate溶液, 通过ClinxChemiScope化学发光成像系统采集发光信息, 利用ImageJ软件对目的条带进行半定量分析.

1.9 RT-PCR

用TRIzol试剂裂解细胞, 抽提RNA. 使用

PrimeScript™ RT 试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA. PCR 反应条件为: 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 循环 40 次. PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电

泳分离, 溴化乙锭染色, 紫外线下拍照. 利用 ImageJ 软件对扩增的目的条带进行半定量分析. PCR 引物序列见表 1.

Table 1 Sequences of primers used for RT-PCR

Genes	Forward sequences (5' → 3')	Reverse sequences (5' → 3')
β -Catenin	GCAGTTCGCCTTCACTATGGA	ATCTTGTGGCTTGTCTCAGAC
c-Myc	AGGAACATATGACCTCGACTACG	AGTAGCTCGGTCATCATCTCCAG
Cyclin A2	TCCAAGAGGACCAGGAGAATATCA	TCCTCATGGTAGTCTGGTACTTCA
Cyclin D1	AACTACCTGGACCGCTTCCT	CCACTTGAGCTTGTTACCA
Cyclin E1	GTCCTGGCTGAATGTATACATGC	CCCTATTTTGTTCAGACAACATGGC
β -Actin	CGTGGACATCCGCAAGAC	CTGCTGTACCTTCA CCGTTC

1.10 统计学分析

实验数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 GraphpadPrism 8.0 进行统计学分析, 组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为具有统计学差异.

2 结 果

2.1 ADSCs及EpSCs的分离、培养和鉴定

从人脂肪组织分离、培养的 ADSCs 在光镜下呈典型的成纤维细胞样形态 (图 1a). 取第二代

ADSCs 通过流式细胞技术检测 ADSCs 标志分子 CD73 和 CD90 以及血管内皮细胞标志分子 CD34、白细胞标志分子 CD45 的表达, 结果显示, 这些细胞高表达 CD73 和 CD90, 表达极少量 CD34 和 CD45 (图 1b). ADSCs 经成脂诱导分化后, 油红 O 染色显示细胞内出现明显的脂滴 (图 2c 左图); 经成骨诱导分化后, 茜素红染色显示细胞出现明显的钙沉积 (图 2c 右图). 以上结果说明, 本研究分离培养的 ADSCs 纯度高, 具有多向分化的干细胞特性.

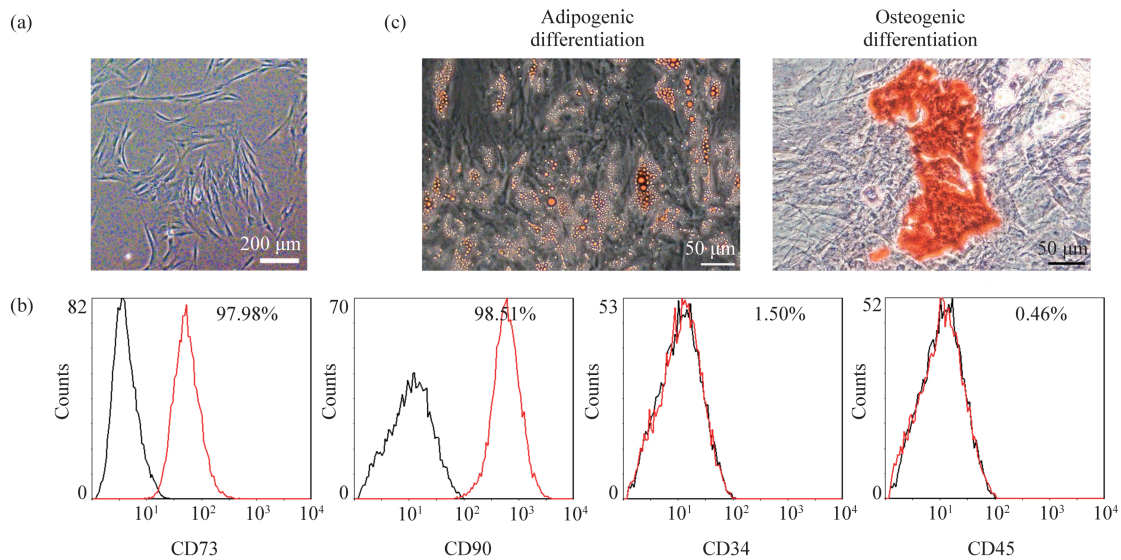


Fig. 1 Characterization of human adipose-derived mesenchymal stem cells

(a) Morphology of cultured human adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) under a light microscope. (b) The expression of CD73, CD90, CD34 and CD45 in cultured ADSCs was examined by flow cytometry assay. (c) ADSCs were induced to differentiate towards adipogenic and osteogenic lineages, and stained with Oil Red O (left panel) and Alizarin Red (right panel). Images are representative results of 3 independent experiments.

从人皮肤组织分离、培养的EpSCs在光镜下形态呈鹅卵石样(图2a)。通过流式细胞实验检测表皮干细胞标志分子 $\alpha 6$ 整合素和CD71的表达,结果显示高表达 $\alpha 6$ 整合素、低表达CD71的细胞占

94.36%(图2b)。免疫荧光染色显示这些细胞也高表达表皮干细胞的另外两个标志分子 $\beta 1$ 整合素和CK19(图2c)。这些结果说明,分离培养的EpSCs纯度较高,符合实验要求。

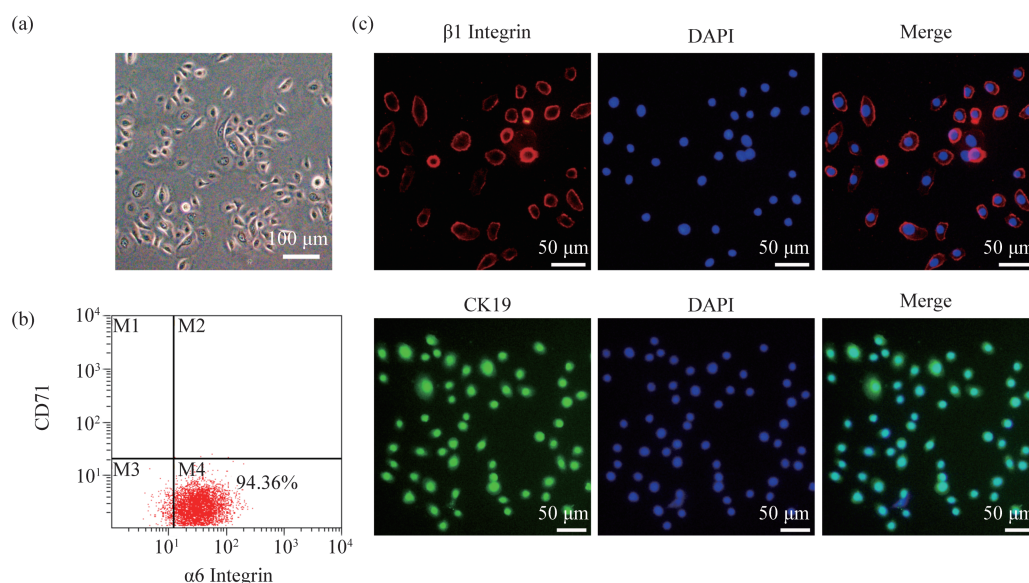


Fig. 2 Characterization of human epidermal stem cells

(a) Morphology of cultured human epidermal stem cells (EpSCs) under a light microscope. (b, c) The expression of epidermal stem cell biomarkers $\alpha 6$ integrin, CD71, $\beta 1$ integrin, and CK19 in cultured EpSCs was examined by flow cytometry assay (b) and immunofluorescence staining (c), respectively. Images are representative results of 3 independent experiments.

2.2 ADSC-Exos的分离及鉴定

我们从ADSCs的培养上清中分离获得了ADSC-Exos。ADSC-Exos在透射电镜下呈圆形双层膜结构(图3a)。纳米粒径分析仪分析显示

ADSC-Exos的粒径为50~150 nm(图3b), Western blot结果显示, ADSC-Exos表达外泌体标志蛋白Alix和CD63, 不表达GAPDH(图3c)。这表明分离得到的ADSC-Exos纯度很高。

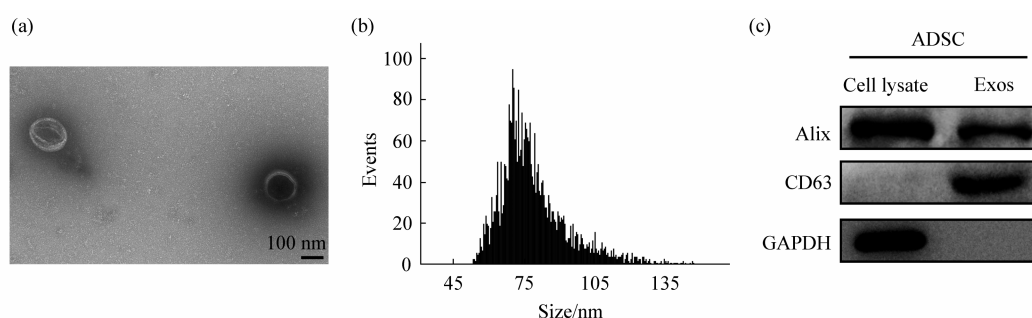


Fig. 3 Characterization of exosomes isolated from adipose-derived mesenchymal stem cells

(a) Electron micrograph of exosomes purified from human adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSC-Exos). (b) The size of ADSC-Exos was detected by Flow Nanoanalyzer. (c) The expression of Alix, CD63 and GAPDH in cell lysate of ADSCs and ADSC-Exos was examined by Western blot.

2.3 ADSC-Exos促进人EpSCs增殖

用MTT法检测不同浓度ADSC-Exos刺激EpSCs不同时间对EpSCs增殖的影响,发现5~40 mg/L ADSC-Exos能显著促进EpSCs增殖,ADSC-Exos对EpSCs增殖的促进作用在处理第1天就出现,且具有浓度依赖性,ADSC-Exos的浓度在20 mg/L时,对EpSCs的促增殖作用达到最大(图4a)。进一步通过MTT法观察20 mg/L ADSC-Exos刺激EpSCs增殖的时效关系,发现ADSC-Exos对EpSCs的促增殖作用在第3天到达高峰(图4b)。BrdU掺入实验检测20 mg/L ADSC-Exos刺激

EpSCs不同时间对EpSCs增殖的影响,亦验证了这一结果(图4c)。通过细胞免疫荧光实验检测20 mg/L ADSC-Exos对EpSCs中细胞增殖标志分子Ki67表达的影响,结果显示ADSC-Exos能显著增加Ki67阳性细胞比率(图4d)。这些结果进一步支持ADSC-Exos对表皮干细胞的增殖具有促进作用。此外,用MTT法检测了分离自人血清及胎牛血清的外泌体对EpSCs增殖的影响,发现这两种血清来源的外泌体浓度为20 mg/L时,刺激EpSCs长达4 d对细胞的增殖无显著影响(图4e),说明ADSC-Exos能特异性刺激EpSCs增殖。

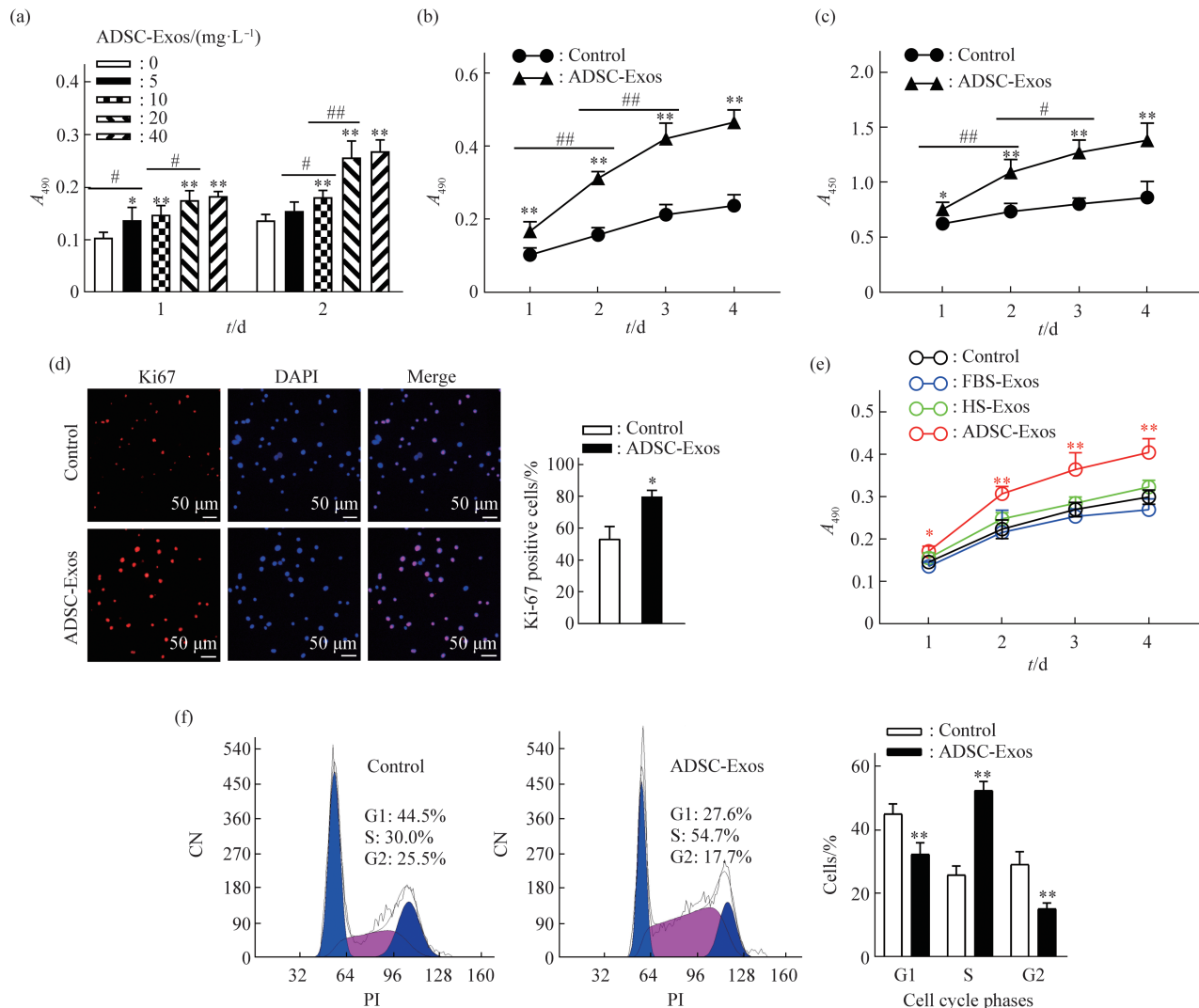


Fig. 4 ADSC-Exos promote human epidermal stem cell proliferation

(a-e) Human epidermal stem cells (EpSCs) were treated with different concentrations of exosomes from adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSC-Exos) for 1 and 2 days (a), with 20 mg/L ADSC-Exos for different periods of time (b, c, e) or for 1 d (d), or with exosomes from fetal bovine serum (FBS-Exos) or human serum (HS-Exos) for different periods of time (e), cell proliferation was examined by MTT assay (a, b, e), BrdU incorporation assay (c), or immunofluorescence staining of Ki67 (d). (f) Synchronized EpSCs were treated 20 mg/L ADSC-Exos for 12 h and examined for cell cycle distribution by flow cytometry. Data are shown as $(\bar{x} \pm s)$, $n = 5$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with cells without ADSC-Exos treatment for the same period of time; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. CN: Cell number; PI: Propidium iodide.

我们进一步通过流式细胞术观察 ADSC-Exos 处理对 EpSCs 细胞周期的影响. 发现细胞周期同步化的 EpSCs 在 20 mg/L ADSC-Exos 孵育 12 h 后, G1 和 G2 期细胞数显著减少, S 期细胞数显著增加 (图 4f), 提示 ADSC-Exos 通过促进 EpSCs 从 G1 期进入 S 期而促进其增殖.

2.4 ADSC-Exos 促进人皮肤组织 EpSCs 增殖

我们进一步观察了 ADSC-Exos 对培养的人皮肤组织中 EpSCs 增殖的影响. 在皮肤组织的表皮和真皮间注射外泌体 ADSC-Exos 后培养 2 d 和 5 d, 皮肤组织切片 HE 染色显示 ADSC-Exos 能显著增加表皮层厚度 (图 5a), 免疫组化染色显示 ADSC-Exos 显著增加了表皮基层层 PCNA 阳性细胞数

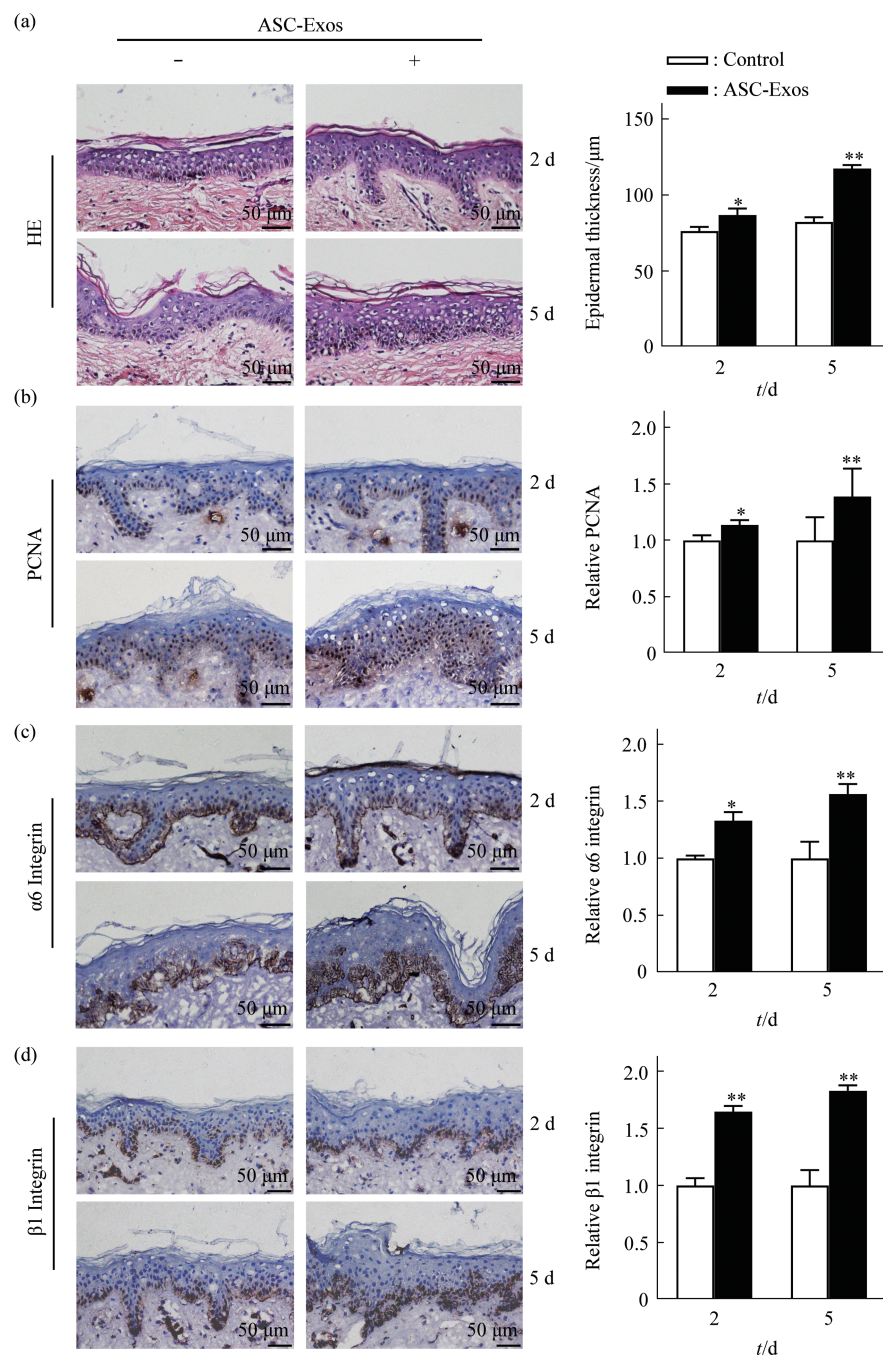


Fig. 5 ADSC-Exos promote EpSCs proliferation in organotypic skin

H&E staining (a) and immunohistochemical staining of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-, α6 integrin- and β1 integrin-expressing cells (b-d) of human skin explants injected with 20 μg ADSC-Exos or same volume of PBS, and cultured for 2 and 5 d. Data are presented as the ($\bar{x} \pm s$), $n=5$.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with PBS-injected skin explants.

(图 5b), 说明 ADSC-Exos 能够刺激皮肤表皮基层细胞增殖. 免疫组化染色检测 EpSCs 标志分子, 显示注射 ADSC-Exos 后的皮肤组织培养 2 d 和 5 d 都显著增加表皮基层 α6 整合素阳性细胞及 β1 整合素阳性细胞的数量 (图 5c, d), 这些结果证明 ADSC-Exos 能促进皮肤组织中 EpSCs 的增殖.

2.5 ADSC-Exos通过增强β-catenin、c-Myc和细胞周期蛋白表达促进EpSCs增殖

文献报道 β-catenin、c-Myc 和细胞周期蛋白在 EpSCs 的增殖中发挥重要作用 [15, 17-18]. 我们观察了 β-catenin 抑制剂 XAV-939 和 c-Myc 抑制剂 10058-F4 对 ADSC-Exos 刺激 EpSCs 增殖的影响, 发现 XAV-939 和 10058-F4 都能部分抑制 ADSC-Exos 对 EpSCs 的促增殖作用 (图 6a). 进一步检测 ADSC-Exos 对

EpSCs 中 β-catenin、c-Myc 和细胞周期蛋白表达的影响, 发现 ADSC-Exos 刺激 EpSCs 能促进 β-catenin、c-Myc 和 cyclin D1、E1、A2 的 mRNA 表达, 且 ADSC-Exos 的作用具有时间依赖性 (图 6c). Western blot 实验证实: ADSC-Exos 在蛋白质水平显著上调 β-catenin、c-Myc 和 cyclin E1 表达, 轻度上调 cyclin A2 和 cyclin D1 的表达; XAV-939 能显著地抑制 ADSC-Exos 诱导的 β-catenin、c-Myc 和 cyclinE1、A2、D1 的表达; 10058-F4 能显著地抑制 ADSC-Exos 刺激的 c-Myc 和 cyclin E1、A2、D1 表达 (图 6b). 这些结果证明了 ADSC-Exos 对 EpSCs 的促增殖作用部分是由于促进 β-catenin、c-Myc 和 cyclin E1、A2、D1 表达所致.

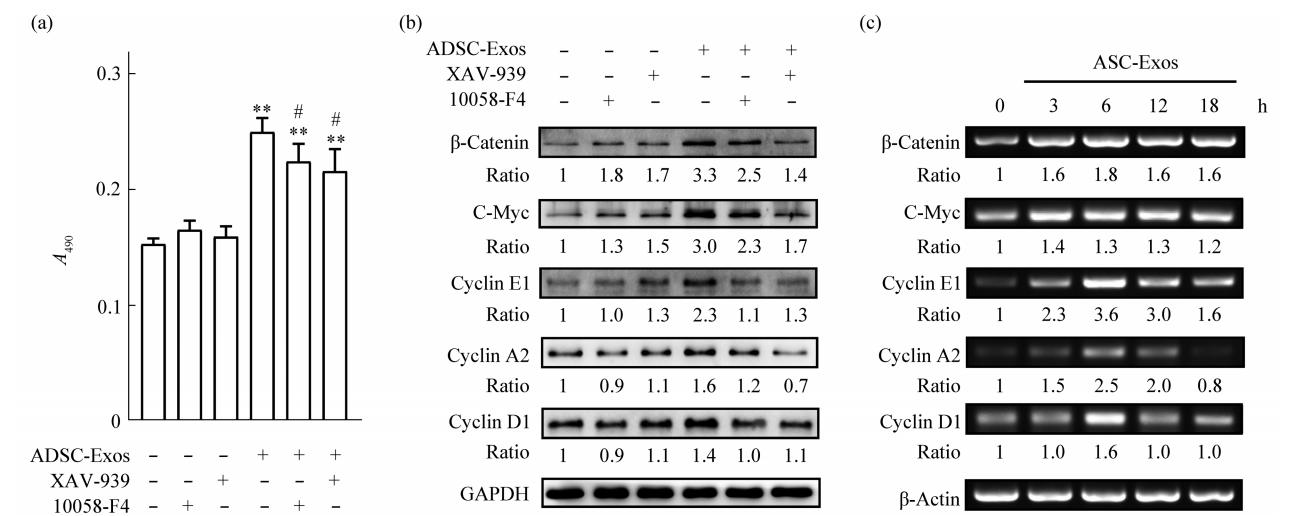


Fig. 6 ADSC-Exos induce human EpSCs proliferation partly through upregulating β-catenin, c-Myc, and cyclins expression

(a, b) Human EpSCs pretreated with control solvent, 1 μmol/L 10058-F4, or 1 μmol/L XAV-939 for 30 min were stimulated with or without 20 mg/L ADSC-Exos for 48 h (a) or 24 h (b), then examined for cell proliferation by MTT assay (a) and the expression of β-catenin, c-Myc, and cyclins by Western blot analysis (b). (c) Expression of β-catenin, c-Myc, and cyclins at mRNA level after treatment of human EpSCs with 20 mg/L ADSC-Exos for 0 - 18 h. Data are shown as $\bar{x} \pm s$, $n=5$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with cells treated with solvent control; # $P<0.05$, compared with cells treated with ADSC-Exos alone.

3 讨 论

本研究发现, 人 ADSC-Exos 能促进体外培养的人 EpSCs 和皮肤组织中的 EpSCs 增殖, 并揭示了 ADSC-Exos 部分地通过上调 β-catenin、c-Myc 和 cyclins 表达而促进 EpSCs 增殖.

为探讨人 ADSC-Exos 对人 EpSCs 增殖的影响, 我们从人脂肪组织中分离、培养了 ADSCs, 从

ADSCs 培养上清中分离了 ADSC-Exos. 通过观察细胞形态、标志分子表达及多向分化能力对 ADSCs 进行鉴定 (图 1); 对分离的 ADSC-Exos 从形态、粒径及标志分子表达三方面进行鉴定 (图 3), 鉴定结果与文献报道一致 [12, 14]. 从人皮肤组织中分离、培养 EpSCs, 并通过观察细胞形态、检测标志分子表达进行鉴定 (图 2). 通过 MTT 法发现, 5~40 mg/L ADSC-Exos 能浓度依赖性地刺激

EpSCs 增殖 (图 4a)。细胞免疫荧光实验显示, ADSC-Exos 处理的 EpSCs Ki67+ 细胞明显增加, 验证了 ADSC-Exos 对 EpSCs 的促增殖作用。我们发现 ADSC-Exos 能时间依赖性地促进 BrdU 掺入 EpSCs (图 4c)。BrdU 是一种胸腺嘧啶核苷类似物, 在细胞周期的 S 期被掺入到新合成的 DNA 中。BrdU 掺入增加进一步确认了 ADSC-Exos 对 EpSCs 增殖的促进作用。我们发现 ADSC-Exos 能增加 S 期的 EpSCs 数量 (图 4f), 这与 BrdU 掺入实验结果一致。Cyclin A2、D1 和 E1 在 G1/S 期转换中发挥重要作用^[19], 我们发现, ADSC-Exos 能显著上调 cyclin A2、D1 和 E1 在 EpSCs 的表达, 减少 G1 期 EpSCs 数目。这些结果提示, ADSC-Exos 通过上调 cyclin A2、D1 和 E1 的表达, 进而促进 G1/S 期转换, 促进 EpSCs 增殖。除促进体外培养的 EpSCs 增殖外, ADSC-Exos 还能显著增加体外培养的人皮肤组织表皮基底层 PCNA、 $\alpha 6$ 整合素和 $\beta 1$ 整合素阳性细胞的数量以及表皮层厚度 (图 5)。PCNA 是 DNA 合成所必需的一种非组蛋白, 在细胞周期的 G1/S 期升高。这些结果强烈支持 ADSC-Exos 能促进人皮肤组织 EpSCs 增殖。文献报道 ADSC-Exos 能促进皮肤伤口愈合^[14], 我们推测有可能部分是通过促进表皮干细胞增殖实现的。

文献报道 Wnt/ β -catenin 信号通路在皮肤 EpSCs 增殖中起重要作用^[17, 20], c-Myc 是 β -catenin 的下游分子^[21-22], 参与皮肤 EpSCs 增殖^[18]。c-Myc 在细胞周期中既能上调 cyclin A2、D1 和 E1 的表达, 又能通过与 DNA 复制起始点结合以及上调 DNA 复制起始所需的蛋白质而引起 DNA 复制^[23]。我们的实验结果显示, β -catenin 抑制剂和 c-Myc 抑制剂均可部分阻断 ADSC-Exos 诱导的 EpSCs 增殖 (图 6a), 且 β -catenin 抑制剂显著抑制了 ADSC-Exos 对 β -catenin、c-Myc 和 cyclinE1、A2、D1 的上调, c-Myc 抑制剂显著抑制了 ADSC-Exos 诱导的 c-Myc 和 cyclinE1、A2、D1 的上调 (图 6b)。这些结果提示 ADSC-Exos 部分通过 β -catenin/c-Myc/cyclins 途径促进 EpSCs 增殖。外泌体含有多种成分, 包括蛋白质、脂质、DNA、mRNA、microRNA 等, 目前尚不清楚 ADSC-Exos 中哪些分子引起 EpSCs 增殖。我们已经对 ADSC-Exos 进行了 RNA 深度测序, 正进一步研究 microRNA 对 EpSCs 增殖的影响及机制。

鉴于 EpSCs 在皮肤伤口愈合过程中起重要作用, 在基础研究和临床研究中, 通过将 EpSCs 直接

喷涂在伤口表面或将种植 EpSCs 的基质 (如水凝胶、支架材料和真皮替代物) 覆盖在伤口表面以治疗烧伤创面和慢性皮肤伤口 (如糖尿病溃疡)^[24]。此外, EpSCs 可以作为种子细胞用于制备组织工程皮肤。研究表明, 在组织工程皮肤的制备中, 表皮干细胞优于分化成熟的角质形成细胞^[25-26]。外泌体具有性质稳定、免疫原性低、易于使用的特点。ADSCs 易于从脂肪组织中分离获得。因此, ADSC-Exos 可作为有效扩增 EpSCs 的手段, 有利于 EpSCs 的基础研究、以及在皮肤伤口治疗以及组织工程皮肤制备中的应用研究。

综上所述, 本研究发现 ADSC-Exos 能促进 EpSCs 增殖, 揭示了 ADSC-Exos 的作用部分通过 β -catenin/c-Myc/cyclins 信号通路介导, 为体外扩增 EpSCs 提供了新的手段。

参 考 文 献

- [1] Blanpain C, Fuchs E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, **10**(3): 207-217
- [2] Dekoninck S, Blanpain C. Stem cell dynamics, migration and plasticity during wound healing. *Nat Cell Biol*, 2019, **21**(1): 18-24
- [3] Ojeh N, Pastar I, Tomic-Canic M, *et al.* Stem cells in skin regeneration, wound healing, and their clinical applications. *Int J Mol Sci*, 2015, **16**(10): 25476-25501
- [4] Bhardwaj N, Chouhan D, Mandal B B. Tissue engineered skin and wound healing: current strategies and future directions. *Curr Pharm Des*, 2017, **23**(24): 3455-3482
- [5] Nourian D A, Mirahmadi B F, Chehelgerdi M, *et al.* Skin tissue engineering: wound healing based on stem-cell-based therapeutic strategies. *Stem Cell Res Ther*, 2019, **10**(1):111
- [6] Li J, Zhen G, Tsai S Y, *et al.* Epidermal stem cells in orthopaedic regenerative medicine. *Int J Mol Sci*, 2013, **14**(6): 11626-11642
- [7] Jackson C J, Tønseth K A, Utheim T P. Cultured epidermal stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Res Ther*, 2017, **8**(1): 155
- [8] Guo R, Chai L, Chen L, *et al.* Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) accelerated skin wound healing by promoting the migration and proliferation of epidermal stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2015, **51**(6): 578-585
- [9] Argentati C, Morena F, Bazzucchi M, *et al.* Adipose stem cell translational applications: from bench-to-bedside. *Int J Mol Sci*, 2018, **19**(11): 3475
- [10] Salgado A J, Reis R L, Sousa N J, *et al.* Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2010, **5**(2): 103-110
- [11] Kapur S K, Katz A J. Review of the adipose derived stem cell secretome. *Biochimie*, 2013, **95**(12): 2222-2228
- [12] 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. *Sci Rep*,

- 2016, **6**: 32993
- [13] Kang T, Jones T M, Naddell C, *et al.* Adipose-derived stem cells induce angiogenesis *via* microvesicle transport of mirna-31. *Stem Cells Transl Med*, 2016, **5**(4): 440-450
- [14] Ferreira A F, Cunha P S, Carregal V M, *et al.* Extracellular vesicles from adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells accelerate migration and activate Akt pathway in human keratinocytes and fibroblasts independently of mir-205 activity. *Stem Cells Int*, 2017, **2017**: 9841035
- [15] Wan D, Fu Y, Le Y, *et al.* Luteolin-7-glucoside promotes human epidermal stem cell proliferation by upregulating β -catenin, c-Myc, and cyclin expression. *Stem Cells Int*, 2019, **2019**: 1575480
- [16] Liew L J, Ong H T, Dilley R J. Isolation and culture of adipose-derived stromal cells from subcutaneous fat. *Methods Mol. Biol*, 2017, **1627**: 193-203
- [17] Watt F M, Collins C A. Role of beta-catenin in epidermal stem cell expansion, lineage selection, and cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2008, **73**: 503-512
- [18] Zanet J, Pibre S, Jacquet C, *et al.* Endogenous Myc controls mammalian epidermal cell size, hyperproliferation, endoreplication and stem cell amplification. *J Cell Sci*, 2005, **118**(Pt8):1693-1704
- [19] Santamaria D, Ortega S. Cyclins and CDKS in development and cancer: lessons from genetically modified mice. *Front Biosci*, 2006, **11**: 1164-1188
- [20] Jia L, Zhou J, Peng S, *et al.* Effects of Wnt3a on proliferation and differentiation of human epidermal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, **368**(3): 483-488
- [21] He T C, Sparks A B, Rago C, *et al.* Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*, 1998, **281**(5382): 1509-1512
- [22] Shi Y, Shu B, Yang R, *et al.* Wnt and Notch signaling pathway involved in wound healing by targeting c-Myc and Hes1 separately. *Stem Cell Res Ther*, 2015, **6**(1): 120
- [23] Bretones G, Delgado M D, León J. Myc and cell cycle control. *Biochim Biophys Acta*, 2015, **1849**(5): 506-516
- [24] Yang R, Liu F, Wang J, *et al.* Epidermal stem cells in wound healing and their clinical applications. *Stem Cell Res Ther*, 2019, **10**(1): 229
- [25] Pellegrini G, Ranno R, Stracuzzi G, *et al.* The control of epidermal stem cells (holoclones) in the treatment of massive full-thickness burns with autologous keratinocytes cultured on fibrin. *Transplantation*, 1999, **68**(6): 868-879
- [26] Dunnwald M, Tomanek-Chalkley A, Alexandrunas D, *et al.* Isolating a pure population of epidermal stem cells for use in tissue engineering. *Exp Dermatol*, 2001, **10**(1): 45-54

Exosomes From Human Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells Promote Epidermal Stem Cell Proliferation Through Upregulating β -Catenin, c-Myc and Cyclins Expression*

LIU Jin-Wei^{1)**}, CAO Gao-Biao^{1)**}, CHENG He-Yun²⁾, DU Wei-Wei²⁾, ZHANG Guang-Liang²⁾, JIN Guang-Zhe²⁾, ZHANG Ping³⁾, WANG Zhao-Dong³⁾, LIU Zhe³⁾, JU Ji-Hui²⁾, LE Ying-Ying⁵⁾, FU Yi^{4)***}, HOU Rui-Xing^{1,2,3)***}

⁽¹⁾Department of Hand Surgery, Suzhou Ruihua Orthopedics Hospital, Suzhou 215104, China;

²⁾Department of Hand Surgery, Ruihua Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215104, China;

³⁾Institute of Hand Surgery, Ruihua Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215104, China;

⁴⁾Department of Human Anatomy, Histology and Embryology, School of Biology and Basic Medical Sciences, Soochow University, Suzhou 215104, China;

⁵⁾Shanghai Institute of Nutrition and Health, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract This study aimed to investigate the effect of exosomes from adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSC-Exos) on the proliferation of human epidermal stem cells (EpSCs) and explore the underlying mechanisms. ADSCs were isolated from human adipose tissue by type I collagenase digestion. EpSCs were isolated from human skin tissue by dispase II and trypsin digestion. The exosomes were isolated from the supernatant of ADSCs using the ExoQuick-TC reagent. EpSCs proliferation was examined by MTT assay, immunofluorescence staining of Ki67 and BrdU incorporation assay. Cell cycle phase distribution was analyzed by flow cytometry. Cultured human skin tissues were examined for the structure and expression of the markers of cell proliferation and epidermal stem cells by H&E staining and immunohistochemistry, respectively. The results showed that ADSC-Exos promoted EpSCs proliferation in concentration- and time-dependent manners. ADSC-Exos increased the number of cells in S phase, and decreased the number of cells in G1 phase. ADSC-Exos also significantly promoted the proliferation of EpSCs in cultured skin tissue. Mechanistic study showed that the proliferative activity of ADSC-Exos was partially inhibited by β -catenin inhibitor XAV-939 or c-Myc inhibitor 10058-F4. ADSC-Exos upregulated the expressions of β -catenin, c-Myc, cyclins E1, A2 and D1. XAV-939 suppressed ADSC-Exos-induced expressions of β -catenin, c-Myc, cyclins E1, A2 and D1. 10058-F4 inhibited the upregulation of c-Myc and cyclins E1, A2 and D1 by ADSC-Exos. Collectively, these results indicate that ADSC-Exos promote EpSCs proliferation partly through upregulating the expression of β -catenin, c-Myc and cyclins.

Key words exosome, adipose-derived mesenchymal stem cell, epidermal stem cells, cell proliferation

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0303

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31900969), and the Gusu Health Talent Training Project of Suzhou (GSWS2019088).

** These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

HOU Rui-Xing. Tel: 86-512-67681098, E-mail: hrx2020@suda.edu.cn

FU Yi. Tel: 86-13962526096, E-mail: yfu@suda.edu.cn

Received: August 20, 2020 Accepted: November 5, 2020