

· 脂肪源性干细胞与组织工程专题论著 ·

# 脂肪来源干细胞对成纤维细胞放射性损伤的影响和蛋白组学研究

栗颖利<sup>1,2</sup> 唐炜雅<sup>2</sup> 杨超<sup>2</sup> 邢新<sup>2</sup>

**【摘要】 目的** 探讨大鼠脂肪来源干细胞(ADSCs)对放射后成纤维细胞(Fb)的影响。**方法** 体外原代培养 SD 大鼠 AD-SCs 和真皮 Fb, 分别对 2 种细胞进行鉴定, Fb 辐照后对 2 种细胞建立共培养模型。将 Fb 分为 Fb1、Fb2 和 Fb3 组, 对各组进行凋亡和细胞周期检测以及蛋白高通量蛋白质谱检测。**结果** ADSCs 高表达 CD29 和 CD44, 低表达 CD31 和 CD45, 大鼠 Fb 高表达波形蛋白。辐射损伤后 Fb 2 组凋亡( $32.30 \pm 7.21$ %) ( $P < 0.05$ , Fb2:Fb1), Fb3 组的 ADSCs 干预后下降到( $9.80 \pm 3.08$ %) ( $P < 0.05$ , Fb3:Fb2)。8 Gy 照射后, Fb 周期阻滞在 G2 期( $P < 0.05$ , Fb2:Fb1), ADSCs 干预后的 Fb3 组 Fb 较 Fb2 组 G2 期减少, G1 期增加, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ , Fb3:Fb2)。**结论** ADSCs 干预放射后的 Fb 可使其凋亡降低, 细胞周期进程加快, 蛋白质谱检测差异蛋白富集在 PI3K-AKT 和 MAPK 通路。

**【关键词】** 脂肪干细胞; 成纤维细胞; 凋亡; 细胞周期; 蛋白组学

## Study of the effect of adipose-derived stem cells on radiation injury in fibroblasts and proteomics

LI Ying-li, TANG Wei-ya, YANG Chao, XING Xin. (Department of Plastic Surgery, General Hospital of Jinan Military Command, Jinan 250031, China)

Corresponding author: YANG Chao, Email: 13916086222@163.com; XING Xin, Email: xingxin57@163.com

**【Abstract】 Objective** To explore the effect of adipose-derived stem cells (ADSCs) on radiation injury in fibroblasts (Fb). **Methods** The ADSCs and dermal Fb from SD rats were cultivated in vitro and identified. After radiation of Fb, a co-culture model of two kinds of cells was established. The Fb was divided into three groups: Fb1, Fb2, and Fb3. Apoptosis, cell cycle, and high throughput protein mass spectrometry detection were performed in each group. **Results** CD29 and CD44 expression were high, but CD31 and CD45, expression was low in ADSCs. Vimentin expression was high in Fb. After radiation injury, the apoptotic rate of fibroblasts in the Fb2 group was ( $32.3 \pm 7.21$ %) ( $P < 0.05$ , Fb2:Fb1). The apoptotic rate of fibroblasts in the Fb3 group decreased to ( $9.80 \pm 3.08$ %) after ADSCs intervention ( $P < 0.05$ , Fb3:Fb2). After irradiation of 8 Gy, the cell cycle of fibroblasts was arrested in the G2 phase ( $P < 0.05$ , Fb2:Fb1). After ADSCs intervention, the fibroblasts decreased in the G2 phase, but increased in the G1 phase of group Fb3 compared with group Fb2. The difference was statistically significant ( $P < 0.05$ , Fb3:Fb2). **Conclusion** ADSCs can significantly reduce the apoptosis of fibroblasts after irradiation. The cell cycle procession was accelerated. Protein mass spectrometry suggested that the differential proteins were enriched in the PI3K-AKT and MAPK pathways.

**【Key words】** Adipose-derived stem cells; Fibroblasts; Apoptosis; Cell cycle; Proteomics

电离辐射和放射性射线在生活中和放射治疗中常常可引起人体各器官的损害, 皮肤作为人体最大的体表器官, 最先受到损伤。放射性射线可以使成纤维细胞(fibroblast, Fb)受损, 其损伤后会导致创面愈合速度减慢或迁延不愈。Fb 在创面愈合过程中发挥作用。皮肤由表皮和真皮组成, 在真皮组织中有大量的 Fb, 在放射性射线照射后 Fb 出现周期抑制、凋亡以及胞内遗传物质的改变<sup>[1]</sup>。脂肪来源干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)因其独特的

干细胞特性, 近年来成为干细胞中的“明星”细胞, 成为各种损伤修复研究的热点<sup>[2-4]</sup>。自 2014 年 9 月至 2017 年 6 月, 第二军医大学长海医院整形外科通过建立 ADSCs 与放射后 Fb 共培养模型和高通量蛋白质谱检测对 Fb 辐射的损伤, 对干细胞修复作用进行生物信息分析, 预测其修复机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器与试剂

DMEM 培养液、胎牛血清、胰蛋白酶、I 型胶原酶、Dispase 酶(美国 Gibco 公司); CD29、CD44、CD31、CD45 抗体(德国 Miltenyi Biotec 公司); 超净工作台(青岛海尔公司); CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(美国 Thermo scientific 公司); 倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司); 流式细胞仪(德国 Miltenyi Biotec 公司)。

DOI: 10.3969/j.issn.1673-7040.2017.12.003

作者单位: 1. 济南军区总医院 整形外科, 山东 济南 250031

2. 第二军医大学长海医院 整形外科, 上海 200433

通信作者: 杨超, Email: 13916086222@163.com;

邢新, Email: xingxin57@163.com

## 1.2 实验动物

成年 SD 雄性大鼠 20 只,10 周,体质量 300 ~ 400 g,由第二军医大学长海医院实验动物中心提供。

## 1.3 大鼠 ADSCs 的分离培养及鉴定

将 SD 大鼠颈椎脱臼处死后固定于操作台上,75%乙醇消毒腹股沟处皮肤,剪刀剪开皮肤表面,获取皮下脂肪,仔细剥离其周围的血管和结缔组织,用含双抗的 PBS 反复多次冲洗;将脂肪组织剪成 1 mm × 1 mm × 1 mm 小块后平铺于培养皿中,加入适量 I 型胶原酶,37℃、100 r/min 摇床震荡消化 50 min;离心后弃上清,加入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液,常规培养瓶接种,孵箱条件为 37℃、5%CO<sub>2</sub> 2 d 后首次换液,去除未贴壁细胞;待细胞 80% ~ 90%融合后传代,取第 3 代生长状态良好的细胞进行鉴定。

## 1.4 大鼠 Fb 的培养

取 SD 大鼠腹部皮肤,去除皮下脂肪后用含双抗的 PBS 充分清洗;加入 Dispase 酶 4℃孵育过夜,次日晨终止消化;用镊子仔细分离表皮和真皮组织,用眼科剪将真皮组织剪成 1 mm × 1 mm × 1 mm 小块,置于含 0.25%胰蛋白酶 10 ml 无血清 DMEM 培养基中充分消化,37℃、5%CO<sub>2</sub> 温箱孵育 2 h;消化液经 75 μm 筛网过滤后离心,将收获的细胞沉淀接种于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中培养;2 d 后换液,去除悬浮细胞,此后每隔 2 d 换液,待细胞生长至 90%融合后用胰酶消化传代。

## 1.5 大鼠 Fb 放射模型的建立

取第 3 代 Fb,用 0.25%胰酶消化后加入培养液制成细胞悬液。以  $1.5 \times 10^5$  孔均匀接种于 6 孔板底部,24 h 后换液,然后将 6 孔板置于放疗科直线加速器(德国西门子产)平台上,由工作人员调整培养板位置使培养板在光源投射区中心,在培养板上加盖一块放射板来增加放射效能。直线加速器设置参数能量为 6 MV,源皮距 100 cm,剂量 8 Gy。根据机器设置参数自动停止照射后迅速进行 2 种细胞共培养。

## 1.6 大鼠 ADSCs 与放射后 Fb 共培养模型的建立

本研究采用 Transwell 共培养皿作为平台,该平台下部由六孔板组成,其上部由 6 个独立的可取出式小室构成,上下室之间由一层 0.4 μm 聚碳酸酯膜隔离。将 ADSCs 接种在可取出的上室( $1.5 \times 10^5$  孔),Fb 接种在下室( $1.0 \times 10^5$  孔),2 种细胞之间相互不接触,但细胞分泌的各种因子可通过聚碳酸酯膜上的微孔相互流通。这样的模型设计可最大

程度地模拟人体皮下脂肪中的 ADSCs 和皮肤真皮 Fb 所处的内环境。

## 1.7 ADSCs 对放射后 Fb 表型的影响

1.7.1 实验分组 取第 3 代 Fb 分为 3 组,分别是:(1)Fb 空白对照,记为 Fb1 组;(2)受辐射的 Fb,记为 Fb2 组;(3)ADSCs 共培养干预后下室受辐射的 Fb,记为 Fb3 组。

1.7.2 细胞处理 (1)取第 3 代长满 80%的原代大鼠 ADSCs 和真皮 Fb,0.25%胰酶消化计数。(2)Fb1 组 Fb、Fb2 组 Fb、Fb3 组 Fb 分别以  $1.5 \times 10^5$  孔的密度,接种于 3 块 6 孔板底部,加培养液置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱内。(3)ADSCs 以  $1.0 \times 10^5$  孔的密度接种于 0.4 μm Transwell 6 孔板上室中,准备 3 块 0.4 μm Transwell 6 孔板,加培养液置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱内。(4)24 h 后所有细胞换液,普通 6 孔板每孔加培养液 2 ml,Transwell 6 孔板每孔加培养液 1 ml。Fb2 组、Fb3 组所有 Fb 接受 8 Gy X 线照射。(5)超净台下将 Fb3 组 6 孔板打开,将 3 块 Transwell 6 孔板上室(接种 ADSCs)用无菌镊夹持后,置于 Fb3 组 3 块 6 孔板各孔中,形成 2 种细胞共培养后置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱内。(6)48 h 后收集 Fb1、Fb2、Fb3 组细胞培养液,上清离心后 -80℃保存备用。各组细胞做凋亡、周期和总蛋白提取备用(液氮保存)。以上实验至少重复 3 次。

1.7.3 ADSCs 干预对放射后 Fb 表型影响的检测 各组细胞消化处理,buffer 重悬细胞加入 5 μl Annexin V-APC 室温孵育 30 min;然后加入 5U 7-AAD 复染后用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。周期检测时,将细胞消化下来用 PBS 洗 2 遍,加入 100 μl PBS 重悬细胞,再加入用 -20℃预冷的 PBS 稀释至 75%乙醇室温固定 6 h,或者 4℃冰箱过夜。检测前离心,弃掉乙醇后再用 PBS 洗 1 遍,加入 PI 并室温孵育 30 min 后上机检测。

## 1.8 蛋白提取,定量,还原烷基化及 Trypsin 酶解

1.8.1 毛细管高效液相色谱 每份样品采用纳升流速 HPLC 液相系统 Ultimate 3000 进行分离。缓冲液:A 液为 0.10%甲酸水溶液;B 液为 0.08%甲酸乙腈水溶液(乙腈为 80%)。色谱柱以 95%的 A 液平衡。样品由自动进样器上样到质谱预柱 C18trap(C18 3 mm 0.10 mm × 20 mm),再经分析柱 C18(C18 1.9 mm,0.15 mm × 120 mm)分离,流速为 600 nl/min。

1.8.2 质谱鉴定 每份样品经毛细管高效液相色谱分离后,用 Q-Exactive HF 质谱仪(美国 Thermo Scientific 公司)进行质谱分析。

### 1.9 统计学处理

实验至少重复 3 次,所有数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。所得的值采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析,采用多组单因素方差分析处理数据,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。图形采用 GraphPad Prism 6.0 制作。

## 2 结果

### 2.1 大鼠 ADSCs 和 Fb 的鉴定

倒置显微镜下,ADSCs 接种 48 h 后基本贴壁完成。细胞呈多角形,中央可见圆形细胞核。接种 3 d 后细胞呈长梭形,可见椭圆形细胞核(图 1a);Fb 外形亦呈长梭形及多角形,与 ADSCs 基本一致(图 1b)。Fb 高表达波形蛋白(图 1c),ADSCs 表面标志物为 CD29、CD44、CD31、CD45 阳性率为 97.40%、96.90%、4.37% 和 0.61%。

### 2.2 ADSCs 干预对放射后 Fb 表型影响的检测结果

辐射损伤后,Fb2 组凋亡率( $32.3 \pm 7.21\%$ ) ( $P < 0.05$ ,Fb2 组与 Fb1 组比较差异有统计学意义);Fb3 组的 ADSCs 干预后,凋亡率下降到( $9.8 \pm 3.08\%$ ) ( $P < 0.05$ ,Fb3 组与 Fb2 组比较差异有统计学意义)。8 Gy 照射后,Fb 周期阻滞在 G2 期( $P < 0.05$ ,Fb2 组与 Fb1 组比较差异有统计学意义),ADSCs 干预后的 Fb3 组较 Fb2 组 G2 期差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,Fb3 组与 Fb2 组比较,差异有统计学意义),细胞周期进程加快。具体统计数据见表 1。

### 2.3 高通量蛋白质谱检测结果

2.3.1 Bradford 蛋白提取及定量 电泳结果样品总蛋白在 14 ~ 120 kDa 分子量范围内得到一定分离,

样品蛋白电泳条带一致。

2.3.2 蛋白定量分析 Fb3 组与 Fb2 组比较,表示 ADSCs 对辐射损伤的 Fbs 修复后与修复前蛋白水平的变化。对 Fb3 与 Fb2 进行蛋白差异蛋白定量分析,能够找到发挥生物学作用的差异蛋白质。(1)显著差异蛋白。在 1.5 差异倍数( $FC = \text{fold change}$ )阈值条件下,进行差异蛋白筛选。 $FC \geq 1.500$  为上调, $FC \leq 0.667$  为下调, $0.667 < FC < 1.500$  认为表达量无明显变化。Fb3 与 Fb2 部分蛋白显著差异数量见表 2,差异最显著的蛋白为 Actn1、Rps21、Hemoglobin subunit beta-1 等。(2)GO 分析。通过建立一套具有动态形式的控制字集来解释真核基因及蛋白质在细胞内所扮演的角色,从而全面描述生物体中基因和基因产物的属性。GO 总共有 3 个本体(ontology),分别描述基因的分子功能(molecular function)、所处的细胞位置(cellular component)、参与生物过程(biological Process)。分子功能是核的结合、金属结合、ATP 结合、poly (A)RNA 结合以及蛋白结合等较显著。细胞位置是细胞膜、细胞质、细胞核、外泌体以及线粒体等较显著。生物过程是转运、氧化还原过程、蛋白运输、磷酸化以及细胞内蛋白运输等较显著。(3)Pathway 代谢通路。结果显示,单纯放射损伤后 P53 通路可能发挥作用。Fb 放射损伤后经 ADSCs 修复后 PI3K-Akt、MAPK、AMPK、mTOR 等信号通路富集较多。PI3K-Akt 和 MAPK 通路在 ADSCs 修复放射性损伤中可能发挥重要的作用。Fb 经 ADSCs 修复后 KEGG 通路富集。

## 3 讨论

Fb 照射后与 ADSCs 共培养模型的建立是在反复摸索的基础上,通过放射剂量的尝试,才找到了最佳放射剂量为 8 Gy,并非想象中的剂量越大越

表 1 不同处理组 Fb 周期细胞凋亡率比较 %

组别	G1	S	G2
Fb1	68.88 ± 5.44	20.04 ± 2.39	11.08 ± 1.91
Fb2	24.90 ± 5.33	26.92 ± 2.58	48.18 ± 5.21*
Fb3	46.15 ± 4.99	17.75 ± 2.31	36.10 ± 3.16*

注:\*Fb2 组与 Fb1 组比较,  $P < 0.01$ ; \*Fb3 组与 Fb2 组比较,  $P < 0.01$

表 2 Fb3 与 Fb2 部分差异蛋白比较

基因序列号	蛋白名称	基因名称	转录本号	结果
Q9Z1P2	肌动蛋白 -1	Actn1	ENSRNOT00000088795	71.52
A0A0G2JXC3	40S 核糖体蛋白 S21	Rps21 rCG_38440	ENSRNOT00000084027	67.90
A0A0G2JSW3	血红蛋白亚基 $\beta$ -1	Hbb rCG_39881	ENSRNOT00000090422	66.66

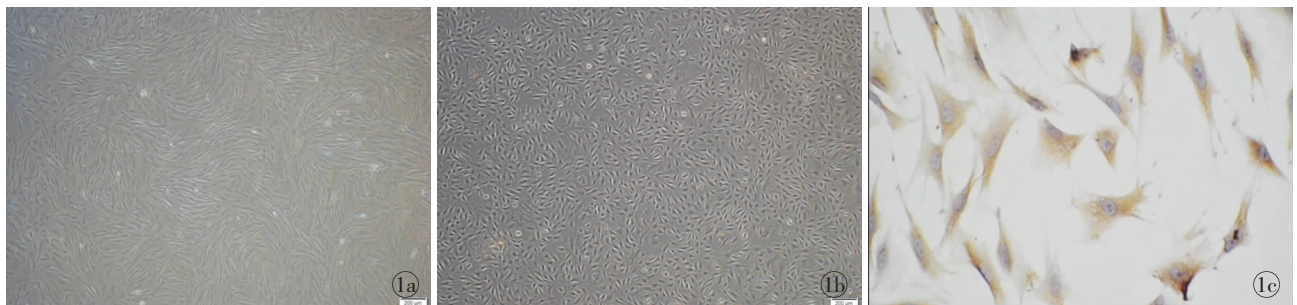


图 1 ADSCs 和 Fb 形态观察 a. ADSCs( $\times 4$ ) b. Fb 细胞( $\times 4$ ) c. Fb 细胞(C-Vimentin 染色  $\times 40$ )



好。NV Klassen 等(1993 年)研究认为,凋亡是一个需要基因表达、蛋白质合成和能量的主动过程,当照射剂量超过 10 Gy,足以破坏细胞核内基因的转录过程或者细胞膜的完整性,细胞不能维持膜内外离子梯度,不能启动细胞凋亡途径。8 Gy 照射剂量能同时保证凋亡、周期表型趋势化较为理想的辐射剂量。Fb 在接受了 8 Gy X 射线照射后,细胞凋亡增加,周期阻滞在 G2 期。当我们进行了 ADSCs 的共培养干预后 Fb 凋亡减少、细胞周期由 G2/M 向 G1/S 进展,进程加快。现象学的结论为后期的机制研究提供了理论基础。

ADSCs 的特点是传代后形态和表面抗原未显著变化,有利于 ADSCs 的干性稳定保持。在脂肪移植中利用移植植物中的 ADSCs 会有很高的应用价值<sup>[5-6]</sup>。Transwell 共培养皿来观察共培养条件下 ADSCs 对辐射后 Fb 的影响,为了便于收集 Fb,我们将其铺在共培养皿下层,在上层小室内铺 ADSCs<sup>[7-8]</sup>。2 种细胞通过共培养皿上室底部的半透膜隔离,2 种细胞互不接触。那么 ADSCs 通过什么发挥修复作用呢?成体 ADSCs 在与同环境细胞相互作用过程中,不一定都是通过多向分化来参与组织修复,更重要的生物学作用是通过旁分泌由细胞内向细胞外分泌某些细胞因子<sup>[9-10]</sup>。也可能 ADSCs 接受到放射损伤的成纤维损伤信号后分泌细胞因子作用于 Fb,引起 Fb 某些因子自分泌增加,这些因子与自身细胞膜受体结合启动生物学修复。这些细胞因子可能激活周围同环境下其他细胞信号传导通路,促进 Fb 增殖,使凋亡得到抑制。辐射后的细胞性能得到恢复后,可使更多的 Fb 向损伤组织迁移及胶原合成对组织进行修复。

我们对 Fb、放射后 Fb、ADSCs 修复 Fb 进行流式细胞凋亡和周期的检测,发现放射后 Fb 发生了凋亡,在 ADSCs 修复后凋亡减少。细胞周期在放射后阻滞,在 ADSCs 修复后进入周期进程。从各组间蛋白差异的信号通路富集显示,排位靠前的信号通路为 PI3K-Akt、MAPK、AMPK、mTOR 等通路<sup>[11-12]</sup>。通路结果显示,PI3K-Akt、MAPK 富集较多,Fb 中的 Cyclin D1、BCL-2、c-Myc 等蛋白在干细胞修复组明显高于放射损伤组。而 Fb 中的 P21、P27、caspase3、Cyclin B1 等在 ADSCs 修复组低于放射损伤组。之后要进行 Western-blot 和 Realtime PCR 检测,对关键分子的磷酸化水平和凋亡周期分子的差异表达进行验证。ADSCs 与放射后的 Fb 共培养后,可以使其凋亡降低,细胞周期进程加快。蛋白组学的差异表达以及功能和通路的生物信息分析提示,PI3K-

AKT 和 MAPK 通路的变化可能参与其修复机制。

#### 参考文献:

- [1] Rugo RE, Secretan MB, Schiestl RH. X radiation causes a persistent induction of reactive oxygen species and a delayed reinduction of TP53 in normal human diploid fibroblasts[J]. Radiat Res, 2002, 158(2):210-219.
- [2] Tan SS, Ng ZY, Zhan W, et al. Role of Adipose-derived stem cells in fat grafting and reconstructive surgery[J]. J Cutan Aesthet Surg, 2016,9(3):152-156.
- [3] 郭恩琪,谢庆平,朱孜冠.严重复合组织缺损皮瓣修复术后应用自体脂肪干细胞构建组织工程重建骨支架[J].中华显微外科杂志,2017,40(3):213-217.
- [4] Frese L, Dijkman PE, Hoerstrup SP. Adipose tissue-derived stem cells in regenerative medicine[J]. Transfus Med Hemother, 2016, 43(4):268-274.
- [5] Guo M, Dong Z, Qiao J, et al. Severe acute radiation syndrome: treatment of a lethally 60 Co-source irradiated accident victim in China with HLA-mismatched peripheral blood stem cell transplantation and mesenchymal stem cells[J]. J Radiat Res, 2014,55(2): 205-209.
- [6] Toratani T, Nakase J, Numata H, et al. Scaffold-free tissue-engineered allogenic adipose-derived stem cells promote meniscus healing[J]. Arthroscopy, 2017,33(2):346-354.
- [7] Haubner F, Muschter D, Pohl F, et al. A Co-culture model of fibroblasts and adipose tissue-derived stem cells reveals new insights into impaired wound healing after radiotherapy[J]. Int J Mol Sci, 2015,16(11):25947-25958.
- [8] Haubner F, Leyh M, Ohmann E, et al. Effects of external radiation in a co-culture model of endothelial cells and adipose-derived stem cells[J]. Radiat Oncol, 2013,8:66.
- [9] Kim WS, Park BS, Sung JH. Protective role of adipose-derived stem cells and their soluble factors in photoaging[J]. Arch Dermatol Res, 2009,301(5):329-336.
- [10] Li X, Zhao H, Qi C, et al. Direct intercellular communications dominate the interaction between adipose-derived MSCs and myofibroblasts against cardiac fibrosis[J]. Protein Cell, 2015,6(10): 735-745.
- [11] Morales-Barrera R, Su á rez C, de Castro AM, et al. Targeting fibroblast growth factor receptors and immune checkpoint inhibitors for the treatment of advanced bladder cancer: new direction and new hope[J]. Cancer Treat Rev, 2016,50:208-216.
- [12] Kim M, Park YG, Lee HJ, et al. Youngiasides A and C isolated from youngia denticulatum inhibit UVB-induced MMP expression and promote Type I procollagen production via repression of MAPK/AP-1/NF-κ B and activation of AMPK/Nrf2 in HaCaT cells and human dermal fibroblasts[J]. J Agric Food Chem, 2015, 63(22):5428-5438.

(收稿日期:2017-06-26)

本文引用格式:栗颖利,唐炜雅,杨超,等.脂肪来源干细胞对成纤维细胞放射性损伤的影响和蛋白组学研究[J].中国美容整形外科杂志,2017,28(12):712-715.DOI:10.3969/j.issn.1673-7040.2017.12.003.