



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102552880 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 11

(21) 申请号 201110417590. 4

(22) 申请日 2011. 12. 14

(71) 申请人 南方医科大学

地址 510515 广东省广州市白云区沙太南路
1023 号

(72) 发明人 张琳 张璐 陈世萱 张敏
陈英华

(74) 专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有
限公司 44205

代理人 谭英强

(51) Int. Cl.

A61K 38/18 (2006. 01)

A61K 35/28 (2006. 01)

A61P 17/02 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 7 页

(54) 发明名称

一种促进皮肤创面愈合的生物制剂

(57) 摘要

本发明公开了一种促进皮肤创面愈合的生物制剂, 制剂由活化素 B、骨髓间质干细胞及可接受的药用辅料组成。本发明的制剂, 可以更好地促进皮肤创面愈合。

1. 一种促进皮肤创面愈合的生物制剂,由活化素 B、骨髓间质干细胞及可接受的药用辅料组成。

2. 根据权利要求 1 所述的促进皮肤创面愈合的生物制剂,其特征在于:制剂中活化素 B 的浓度为 $0.5 \sim 20\text{ng/ml}$,骨髓间质干细胞的浓度为 $1 \sim 8 \times 10^6$ 个 /ml。

一种促进皮肤创面愈合的生物制剂

技术领域

[0001] 本发明涉及一种生物制剂,特别涉及一种可促进皮肤创面愈合的,含有干细胞的生物制剂。

背景技术

[0002] 随着社会经济的发展和工业化程度的日益提高,创伤与其他意外伤害所致的伤亡比例大幅增加,已成为当今社会主要致死性疾病之一。皮肤是人体最大的器官,是与外界环境接触的屏障。皮肤的创伤愈合是一个复杂的生物学过程,它启动一系列复杂的生物学事件,包括炎症、组织新生及组织重构。

[0003] 但是因为皮肤直接与外界环境相接触,皮肤创伤,特别是大面积的皮肤创伤,其修复是比较困难的。常见的皮肤创面修复制剂有以下几种。

[0004] 1. 传统型敷料

传统型的敷料主要是由棉、软麻布、纱布等材料组成,其特点是具有良好的吸水性,从而能保持创面的干燥。但传统型敷料不能有效地阻止创面被感染。而且传统型敷料容易与创面发生粘连,去除时很可能再次使刚恢复的创面受损。改进的油纱布和抗菌纱布,使传统型人工皮肤具有了防粘连和抗菌作用。

[0005] 2. 合成型敷料

高分子薄膜具有良好的弹性和透气性,常用材料有聚氨酯、聚乙烯、硅橡胶、聚四氟乙烯等。但由于其吸湿性和透水性不良,往往导致创面处形成积液而导致细菌的繁殖,因此高分子薄膜多用于表皮损伤,对于大面积的皮损不适合。高分子海绵体是高分子材料形成的三维网状结构物,比薄膜更有利于新组织的形成,而且透气性好、无创面粘连、质轻、舒适等特点。高分子凝胶体具有良好透气性和透水性,能抵御细菌的侵入,并能根据创面的外形而成型,不足之处在于缺乏耐用性和贴附性不好

3. 生物型人工皮肤

生物型人工皮肤是取自于天然生物组织,主要包括自体皮、异体皮和异种皮。自体皮是所有人工皮肤中最理想的皮肤替代物。应用自体皮不但可以解决大面积皮损患者急迫的需要而且可以使创面完全恢复到正常皮肤的外观和功能,是真正永久的人工皮肤。但是存在来源有限和影响美观等缺点,使其使用受到了限制。异体皮主要来源于尸体皮肤。早在上世纪40年代,同种异体皮就已作为一种辅助治疗深度烧伤患者的临时覆盖物。同种异体皮肤具有粘附性好、可为创面提供生长因子等优点,不足之处在于可能传播艾滋病、肝炎等传染性疾病,而且不同来源的同种异体皮肤具有不同的免疫原性。

[0006] 4. 组织工程型人工皮肤

组织工程型人工皮肤是近二十年来发展起来的,已知的组织工程皮肤有 Apligraf, Intergra, Dermagraft 等,这些进口的组织工程皮肤价格及其昂贵。国内的第一个也是唯一一个国家食品药品监督管理局批准的组织工程皮肤“安体肤”即将上市,还没有大量开始使用,安全性和稳定性有待验证。

[0007] 随着组织工程研究的发展,干细胞研究为创伤修复提供了新思路。

[0008] 骨髓间充质干细胞(Bone mesenchymal stem cells, BMSCs)起源于中胚层,具有较强的自我更新和多向分化的潜能,经过适当的诱导分化可以向成骨、肌腱、神经细胞、皮肤细胞等不同的组织细胞分化。在机体的组织损伤修复过程中, BMSCs 在损伤组织的特殊信号作用下,迁移至损伤部位,在局部增殖,并依据不同的损伤信息分化为不同的功能性细胞。移植迁移到组织损伤部位的 BMSCs,通过两种功能发挥其组织损伤的修复作用,一是在局部微环境作用下,定向分化为特定类型的功能性细胞,直接参与组织修复;二是通过分泌多种生物活性物质,如生长因子等,改善损伤部位的再生微环境,间接促进组织修复。

[0009] 目前,已有实验研究结果证实 BMSCs 在促进创面愈合方面起到积极的作用。Badiavas 将骨髓间充质干细胞(BMSCs)移植到深 II 度烧伤创面,发现其明显促进创面的愈合,其作用强于成纤维细胞。付小兵等将 BMSCs 移植至猪深度烧伤创面,发现创面愈合速度明显加快,表皮增厚,真皮神经纤维增多,大大改善了创面愈合质量。文献报道 BMSCs 还参与表皮、汗腺及创面血管的重建。这些研究结果证明 BMSCs 是非常好的皮肤组织工程的种子细胞。

[0010] 虽然 BMSCs 可以很好的促进创面愈合,但是,有必要进一步提高其修复效果。

发明内容

[0011] 本发明的目的在于提供一种可更好地促进皮肤创面愈合的生物制剂。

[0012] 本发明所采取的技术方案是:

一种促进皮肤创面愈合的生物制剂,由活化素 B、骨髓间质干细胞及可接受的药用辅料组成。

[0013] 优选的,制剂中活化素 B 的浓度为 0.5 ~ 20ng/ml,骨髓间质干细胞的浓度为 $1 \sim 8 \times 10^6$ 个/ml。

[0014] 本发明的有益效果是:

本发明的制剂中,活化素 B 与骨髓间质干细胞存在协同作用,联合使用,可以更好的修改皮肤创面。

附图说明

[0015] 图 1 是 BMSCs 相关标志物抗原的表达图;

图 2 是不同处理组的创面愈合的效果图;

图 3 是 BMSCs 参与皮肤创面愈合的效果图;

图 4 是术后不同时间点的创伤组织学切片;

图 5 是不同注射方式的创伤愈合过程图;

图 6 是活化素 B 诱导 BMSCs 肌动蛋白的重组和迁移的效果图;

图 7 是活化素 B 诱导 BMSCs 骨架结构变化和细胞迁移的效果图;

图 8 是 Western blot 分析结果。

具体实施方式

[0016] 一种促进皮肤创面愈合的生物制剂,由活化素 B、骨髓间质干细胞及可接受的药用

辅料组成。

[0017] 优选的,制剂中活化素 B 的浓度为 0.5 ~ 20ng/ml,骨髓间质干细胞的浓度为 $1 \sim 8 \times 10^6$ 个/ml。

[0018] 下面结合实施例,进一步说明本发明。

[0019] 以下实验中,使用的骨髓间质干细胞(BMSCs)取自南方医科大学动物中心 SPF 级 SD 大鼠的胫骨和肱骨骨髓做原代培养所得。如无特别说明,ACT 指活化素。

[0020] 免疫细胞化学检测 BMSCs 表面标志抗原表达

第 3 代 BMSCs 以 $4-5 \times 10^5$ /孔的密度接种于 12 孔板中,待细胞长至 90%,吸去培养基, PBS 漂洗 (3×5 min), 4% 多聚甲醛固定 10min, PBS 漂洗 (3×5 min)。0.5% Triton X-100 细胞穿孔 15min, PBS 漂洗 (3×5 min), 1% BSA 封闭 (RT, 30min), CD44 (兔抗大鼠, 1:10)、CD90 (小鼠抗大鼠, 1:100) 和 CD29 (兔抗大鼠, 1:200), CD80 (兔抗大鼠, 1:100), 37°C 2h, PBS 漂洗 (3×5 min), 分别红色羊抗兔二抗 (1:200)、红色驴抗小鼠二抗 (1:200) 和红色羊抗兔二抗 (1:200), RT 1h, PBS 漂洗 (3×5 min), Hoechst 33258 (1:500) 复染细胞核 10min, PBS 漂洗 (3×5 min), 封片观察。显微镜拍照 (Leica DM4000B), $20 \times$ 倍镜下选取 5-7 个视野, 计数 BMSCs 表面标志抗原阳性表达率。

[0021] 第 3 代 BMSCs 接种于 12 孔板中 cover glass 上,待细胞长至 90% 融合时,固定后进行免疫组织化学检测 BMSCs 表面标志物抗原表达:红色荧光染料示 CD29, CD44 和 CD90 阳性表达,而 CD80 阴性表达。Hoechst 33258 复染细胞核,蓝色荧光示细胞核。结果如图 1 所示,从图中可以看出,该细胞为骨髓间充质干细胞,而非造血干细胞等其他细胞。

[0022] 继续培养第 3 代 BMSCs 得到第 4 代 BMSCs。

[0023] 实验处理

创伤模型

24 只健康成年 SPF 级 SD 大鼠随机分为四个组:PBS 对照组, BMSCs 移植组, Activin B 注射组和 Activin B 结合 BMSCs 移植组。10% 水合氯醛 (0.003ml/g) 腹腔注射麻醉, SD 大鼠背部两侧剪毛后用蜂蜜脱毛冻蜡脱毛,做面积为 1cm^2 正方形切口,深达皮下。

[0024] 创伤制造后,在创伤处局部注射,注射量是 0.4ml/大鼠。

[0025] 其中, BMSCs 移植组中, BMSCs 的注射浓度是 1×10^6 BMSCs/ml; Activin B 注射组中, Activin B 的注射浓度是 5ng/ml; Activin B 结合 BMSCs 移植组中, Activin B 的注射浓度是 5ng/ml、BMSCs 的注射浓度是 1×10^6 BMSCs/ml。

[0026] 术后动物自由进食、水。术后每天用细 Mark 笔把各组未愈合创面面积描记在透明薄膜上,数码相机在相同的条件下对描记下的图像拍照, IPP 图像分析系统计算未愈合创面面积,计算创面愈合率。愈合率 = (原始创面面积 - 未愈合的创面面积) / 原始创面面积 $\times 100\%$ 。

[0027] H&E 染色

术后 3d、7d、14d、21d 取伤口周围 0.5cm 皮肤, PBS 冲洗, 4% 多聚甲醛固定, PBS 冲洗, 乙醇逐级脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋。切片 ($5 \mu\text{m}$), 二甲苯脱蜡, 乙醇逐级复水, 常规的苏木精伊红 (hematoxylin and eosin, H&E) 染色。对大鼠创面愈合进行组织学观察。

[0028] 实验照片如图 2 和图 4 所示, 图中, Ep 指表皮; D 指正常皮肤; G 指创口处肉芽组织, 标尺为 $100 \mu\text{m}$ 。

[0029] 结果发现与 Activin B、BMSCs 单独处理组及 PBS 对照组相比, Activin B 结合 BMSCs 处理组可以显著促进 SD 大鼠皮肤创面愈合(图 2A)。在移植后第 7 天, Activin B 结合 BMSCs 处理组的创面愈合率显著高于 Activin B、BMSCs 单独处理组及 PBS 对照组(图 2B), 对第 14 天的创面进行分析, 显示 Activin B 结合 BMSCs 处理组可以促进皮肤毛囊的再生(图 2C 术后 14 天的 H&E 染色), 这些显示 Activin B 结合 BMSCs 可以更好的促进急性创伤的愈合。

[0030] 实验结果如下:

表 1、表皮注射移植组创面愈合率比较 (% , n=4, $\bar{x} \pm s$)

组别 Group	术后时间 Days after surgery (%)			Sum (%)	F	P
	3d	7d	14d			
PBS	33.98±7.63	48.04±5.19	85.79±2.02	55.93±23.38	96.583	0.000
BMSCs	34.06±5.71	67.02±1.67	91.55±1.24	63.28±26.77	397.013	0.000
ACT B+BMSCs	31.27±7.38	80.43±2.85	97.24±1.09	71.21±27.87	473.596	0.000
Sum	32.94±5.73	65.66±14.34	91.83±5.47	63.47±26.10*	674.224*	0.000*
F	0.940	85.025	56.685	39.993*	(F=17.985,	
P	0.426	0.000	0.000	0.000*	P=0.000)#	

* 主效应的 F 统计量和 P 值 ;# 交互效应的 F 统计量和 P 值。

[0031] 对三组创面愈合率进行单因素重复测量方差分析, 数据符合球形假设, 术后不同时间之间有显著性差异 $F=674.224, P<0.001$; PBS 组、BMSCs 组及 ACT B 诱导 BMSCs 组均如此, F 值分别为 96.583、397.013 及 473.596, 均为 $P<0.001$ 。三个不同移植组别的创面愈合率均随着时间的延长而增大, 各组之间有显著性的差异 ($F=39.993, P<0.001$); 从各时间点看, 除了术后第 3 天三组创面愈合率没有显著性差异 ($F=0.940, P=0.426$) 外, 其余各时间点均有显著性的差异 ($P<0.001$)。术后时间与移植不同移植组之间有交互效应 ($F=17.985, P<0.001$)。由表 1 可见, ACT B 诱导的 BMSCs 组于术后 14d 创面愈合率最大。术后三组相同时间点进行单向方差分析, 术后 3d 三组之间无显著性差异; 术后 7d、14d BMSCs 组创面愈合率大于 PBS 组, ACT B 诱导 BMSCs 组创面愈合率大于 BMSCs 组, 且有显著性差异 ($P<0.001$)。

[0032] 在移植后第 3、7 天利用活体成像仪观察大鼠皮肤创面的愈合, 移植 CFSE 标记的 BMSCs 的大鼠皮肤创面处有绿色荧光, 而对照组无。进一步冰冻切片结果显示, CFSE 标记的 BMSCs 已移植入创面处, 并参与创面愈合。实验结果如图 3 所示。

[0033] H&E 染色观察如图 2C 和图 4 所示: 术后 14d, ACT 诱导的 BMSCs 的愈合质量均显著性高于对照组, 与对照组相比, ACT 诱导的 BMSCs 组创面的再上皮化速度快, 血管发生多。比较 ACT B 诱导 BMSCs 组和 BMSCs 组组织病理学评价, 结论显示二者没有显著性的差异。但是结果显示, ACT B 诱导的 BMSCs 形成的表皮较厚, 且形成了上皮角, 此种结构未在 BMSCs 组中发现。BMSCs 组中汗腺皮脂腺的显著增多, 这种现象也发现于 ACT B 诱导 BMSCs 组。

[0034] 不同移植途径移植 ACT B 诱导的 BMSCs 对创面愈合的影响

采用不同注射方式(表皮注射、尾静脉注射、表皮注射尾静脉注射)移植 ACT B 和 BMSCs 的混合物,统计术后 3d、7d、14d 的创面残余面积和创面愈合率,比较不同移植途径对创面愈合的影响。利用 SPSS 13.0 软件对两组结果分别进行单因素重复测量分析,结果如下表所示。

表 2、不同注射方式创面面积比较表

组别 Group	术后时间 Days after surgery			Sum	F	P
	3d	7d	14d			
表皮注射移植	68.53±2.99	20.70±3.26	1.98±1.67	30.40±29.37	632.86	0.000
尾静脉注射移植	67.99±7.03	19.06±1.72	1.30±1.58	29.45±29.71	260.623	0.000
合注射移植	67.67±4.59	14.28±2.62	1.00±1.99	27.65±30.24	468.258	0.000
Sum	68.06±4.67	18.01±3.70	1.42±1.65	29.17±28.94	1078.498 *	0.000*
F	0.029	6.532	0.327	2.448	(F=0.850,	
P	0.972	0.018	0.729	0.142	P=0.512) [#]	

[0035] * 主效应的 F 统计量和 P 值 ;# 交互效应的 F 统计量和 P 值。

表 3、不同注射方式创面愈合率比较表

组别 Group	术后时间 Days after surgery			Sum	F	P
	3d	7d	14d			
表皮移植	35.06±4.03	80.43±2.85	98.13±1.56	55.97±23.24	129.925	0.000
尾静脉移植	35.12±7.98	81.82±2.08	98.73±1.56	67.02±24.50	447.910	0.000
结合移植	35.44±3.82	86.36±2.67	99.04±1.93	73.61±28.83	535.124	0.000
Sum	35.21±5.08	82.87±3.51	98.63±1.57	65.53±25.96*	959.751*	0.000*
F	0.005	5.882	0.296	1.347	(F=0.771,	
P	0.995	0.023	0.751	0.308	P=0.558) [#]	

[0036] * 主效应的 F 统计量和 P 值 ;# 交互效应的 F 统计量和 P 值。

[0037]

不同时间点不同注射方式三组 ACT 诱导 BMSCs 组大鼠创伤愈合的过程如图 5 所示,图 A :三组 ACT 诱导 BMSCs 组伤口未愈合面积比较 B :三组伤口愈合率比较。

[0038] 三组大鼠术后不同时间创面面积之间有显著性差异 F=1078.498, P=0.000 ;表皮注射组、尾静脉注射组及合注射组均如此, F 值分别为 632.86、260.623、及 468.258,均为 P <0.001。三个不同移植组的创面残余面积均随着时间的延长而减小,但各组之间没有显著性的差异(F=2.448, P=0.142);从各时间点看,术后 7d 三组创面残余面积具有显著性差异

($F=6.532$, $P=0.018$), 结合移植组显著小于表皮移植组; 术后 3d、14d 三个移植组没有显著性差异, F 值分别为 0.029、0.327, P 值分别为 0.972、0.729。术后时间与不同移植途径之间没有交互效应($F=0.850$, $P=0.512$)。对三组创面愈合率进行单因素重复测量方差分析, 数据符合球形假设, 术后不同时间之间有显著性差异 $F=959.751$, $P<0.001$; 表皮移植组、尾静脉移植组及结合移植组均如此, F 值分别为 129.925、447.910 及 535.124, 均为 $P<0.001$ 。三个不同移植组的创面愈合率均随时间的延长而提高, 但各组之间没有显著性的差异($F=1.347$, $P=0.308$); 从各时间点看, 术后第 7 天三组创面愈合率有显著性差异($F=5.882$, $P=0.023$), 结合移植组显著高于表皮移植组; 而术后 3d、14d 没有显著性的差异, F 值分别为 0.005 和 0.296, P 值分别为 0.995 和 0.751。术后时间与不同移植途径之间没有交互效应($F=0.771$, $P=0.558$)。

[0039] 结论

分别比较不同移植途径 ACT B 诱导的 BMSCs 组在创面残余面积和创面愈合率的影响, 结果显示不同移植途径对创面残余面积和创面愈合率没有显著性的差异, 即不同移植途径对创面愈合的影响不大。但是值得注意的是在术后 7d 结合移植组较表皮移植组的创面残余面积显著减小, 而创面愈合率显著提高, 表明不同移植途径可能通过其他的方式在特定的时间点对创面愈合产生影响。

[0040] 作用机制分析

Transwell 小室迁移率分析

Transwell 小室上室中加入 300 μ l 预热的无血清 L-DMEM 培养基于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中平衡 1h。第 4 代 BMSCs 细胞饥饿 12h 后消化离心, 无血清培养基重悬, 调整细胞密度为 1×10^6 /ml。Transwell 上室加入 100 μ l BMSCs, 下室加入无血清的 L-DMEM 或含 10ng/ml Activin B L-DMEM。培养 24h, 取出 Transwell 小室, 弃去孔中培养液, 用棉签擦去上室表面的细胞, 另一面用 4% 甲醛常温固定 30min。0.1% 结晶紫染色 30min, 蒸馏水漂洗 (3 \times 5min), 取下 Transwell 小室的膜, 固定于载玻片上, 显微镜下观察拍照 (Leica DM4000B), 40 \times 倍镜下选取 5-7 个视野, 计数细胞数。

[0041] 划痕实验分析

第 4 代 BMSCs 细胞长至 90% 后按 $4-5\times 10^5$ /孔的密度接种于 12 孔板中, 细胞生长至 95% 融合, 血清饥饿 12h, 接受不同处理, 用 10 μ l 移液头在每个待测小孔中央划出一道划痕, 并保证此处细胞完全脱落。以此时为 0 点, 开始记录划痕宽度。每组设 4 个孔, 每孔中记录两个不同位置, 并使用记号笔标记此次记录位置。于 12、24、36、48、60、72h 在记号笔所处位置原位观察细胞迁移状态并采集照片 (Leica DMI4000B)。

[0042] Actin 鬼笔环肽 (phallotoxins) 染色

24 孔板中放入 cover glass, 第 4 代 BMSCs 接种其中, 每孔细胞含量约 1×10^4 个, 培养 1d 后, 血清饥饿 12h。按照不同处理分组分别在以下时间点 30min, 2, 4, 6, 12h 取出 cover glass, PBS 清洗 (3 \times 5min), 4% 多聚甲醛固定, PBS 清洗 (3 \times 5min), 0.1% Tritonx-100 (5min, RT), 1% BSA (20min, RT), phallotoxins (20min, RT), PBS 清洗 (3 \times 5min), Hoechst33258 (1:500) 复染细胞核 10min, PBS 漂洗 (3 \times 5min), 封片, 显微镜下观察拍照 (Leica DM4000B)。

[0043] 第 4 代 BMSCs, 血清饥饿 12h, 10ng/ml Activin B 处理后 30min, 2h, 4h 和 6h 后进

行肌动蛋白的 phallotoxins 染色, Activin B 作用 30min 后, 肌动蛋白纤维主要分布于细胞膜附近, 2h 时, 肌动蛋白重组生成大量的肌动蛋白纤维并铺满整个细胞持续至 4h, 作用 6h 时, 大量肌动蛋白纤维解聚部分存在细胞膜附近, 而 PBS 组细胞肌动蛋白纤维数量和分布没有变化(图 6A)。用 10 μ l 移液头做 BMSCs 刮痕, 然后在培养基中加入终浓度为 10 ng/ml Activin B, 对照组加入等量的灭菌 PBS。

[0044] 划痕后 72h, 与对照组相比, Activin B 组细胞已经长满伤口(图 6B)。

[0045] 进一步利用 Transwell 进行细胞趋化实验, Transwell 上室加入含 BMSCs 的 DMEM 100 μ l, 下室分别加入含 10ng/ml Activin B 的 DMEM 培养液和含等量 PBS 的 DMEM 培养液, 37 $^{\circ}$ C 5%CO₂ 培养 24h, 结果发现与对照组相比, Activin B 组下室膜上细胞数明显高于对照组($p < 0.05$, 图 6C), 因此认为 Activin B 诱导趋化 BMSCs 的迁移。

[0046] 上述结果显示 Activin B 通过调节肌动蛋白重组诱导 BMSCs 细胞的趋化迁移并促进伤口愈合。

[0047] 第 4 代 BMSCs, 血清饥饿 12h 后, 分 5 组:

第 1 组, DMEM 培养基中加入 PBS;

第 2 组, DMEM 培养基中加入浓度为 10ng/ml Activin B;

第 3 组, 用 JNK 特异性抑制剂 SP600125 (5 μ mol) 处理细胞 30min 后, 去除培养液加入含 10ng/ml Activin B DMEM 培养基;

第 4 组, 用 p38 特异性抑制剂 SB202190 (5 μ mol) 处理细胞 30min 后, 去除培养液加入含 10ng/ml Activin B DMEM 培养基;

第 5 组, 用 ERK 特异性抑制剂 SL327 (5 μ mol) 处理细胞 30min 后, 去除培养液加入含 10ng/ml Activin B DMEM 培养基。

[0048] Activin B 作用 2h 时, phallotoxins 染色观察各组 BMSCs 肌动蛋白聚合发现: JNK 特异性抑制剂 SP600125 和 ERK 特异性抑制剂 SL327 显著地抑制由 Activin B 诱导的肌动蛋白丝聚合, 而 p38 特异性抑制剂 SB202190 处理后, Activin B 刺激 2h 后大量的肌动蛋白聚合分布整个细胞(图 7A)。因此认为 Activin B 通过 JNK 和 ERK 信号通路调节 BMSCs 肌动蛋白的聚合。

[0049] 同样地 SP600125 和 SL327 抑制 JNK 和 ERK 信号后, Activin B 诱导的 BMSCs 迁移作用同样受到抑制, 细胞创伤后 72h 仅经过 SB202190 处理后的 BMSCs 细胞创面有大量的细胞迁移(图 7B)。

[0050] 对照组, SP600125 加 Activin B 组和 SL327 加 Activin B 组创面仅有较少的迁移细胞。

[0051] 进一步利用 Transwell 进行细胞趋化实验, SP600125 和 SL327 抑制 JNK 和 ERK 信号后, Activin B 诱导的 BMSCs 趋化作用同样受到抑制, 而经 SB202190 处理后 Activin B 诱导的 BMSCs 下室膜上细胞数明显高于对照组($p < 0.05$)。

[0052] Western blot 分析

培养第 4 代 BMSCs, 血清饥饿 12h, 移去培养皿中培养基, 37 $^{\circ}$ C Danks' 冲洗两遍。按照不同处理分组(PBS、ACT B)处理后分别在以下时间点 10, 30, 120min 收集细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度(Beyotime), 50 μ g 蛋白电泳(SDS-PAGE), 转膜(PVDF), 5% 脱脂奶粉封闭后检测蛋白 JNK, ERK, p38, p-JNK, p-ERK 和 p-p38 的表达, 实验结果如图 8 所示。

[0053] 上述结果显示 Activin B 通过 MAPK 家族的 JNK 和 ERK 信号通路介导 BMSCs 肌动蛋白聚合和迁移。

[0054] 通过对活化素 B 与 BMSCs 之间作用机理的分析,可以进一步确定,以活化素 B 0.5 ~ 20ng/ml,骨髓间质干细胞 $1 \sim 8 \times 10^6$ 个 /ml 的浓度联合注射,也可以很好的促进皮肤创面愈合。

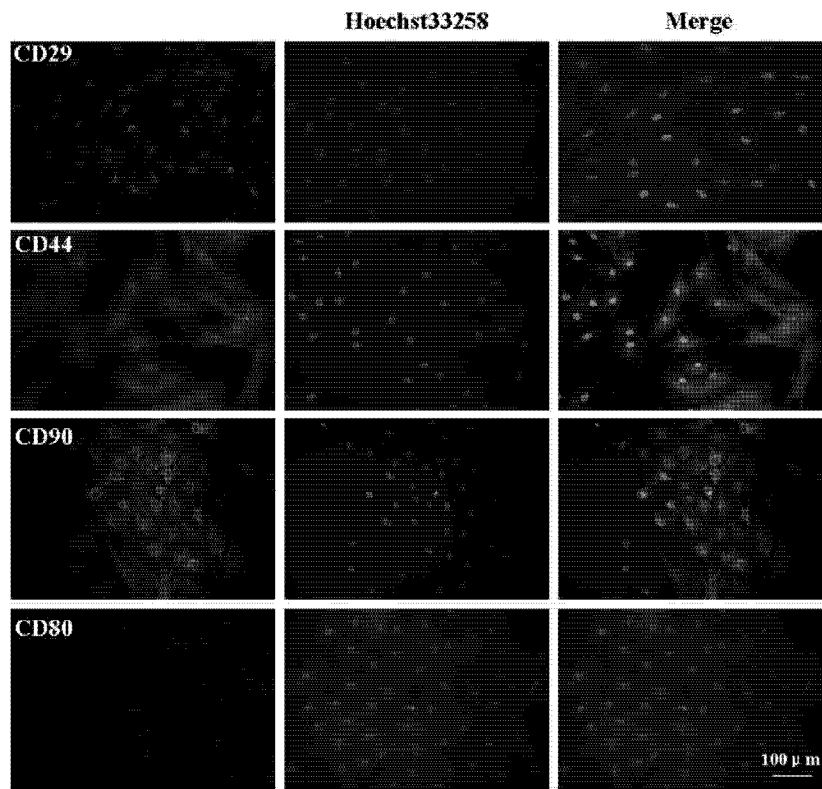


图 1

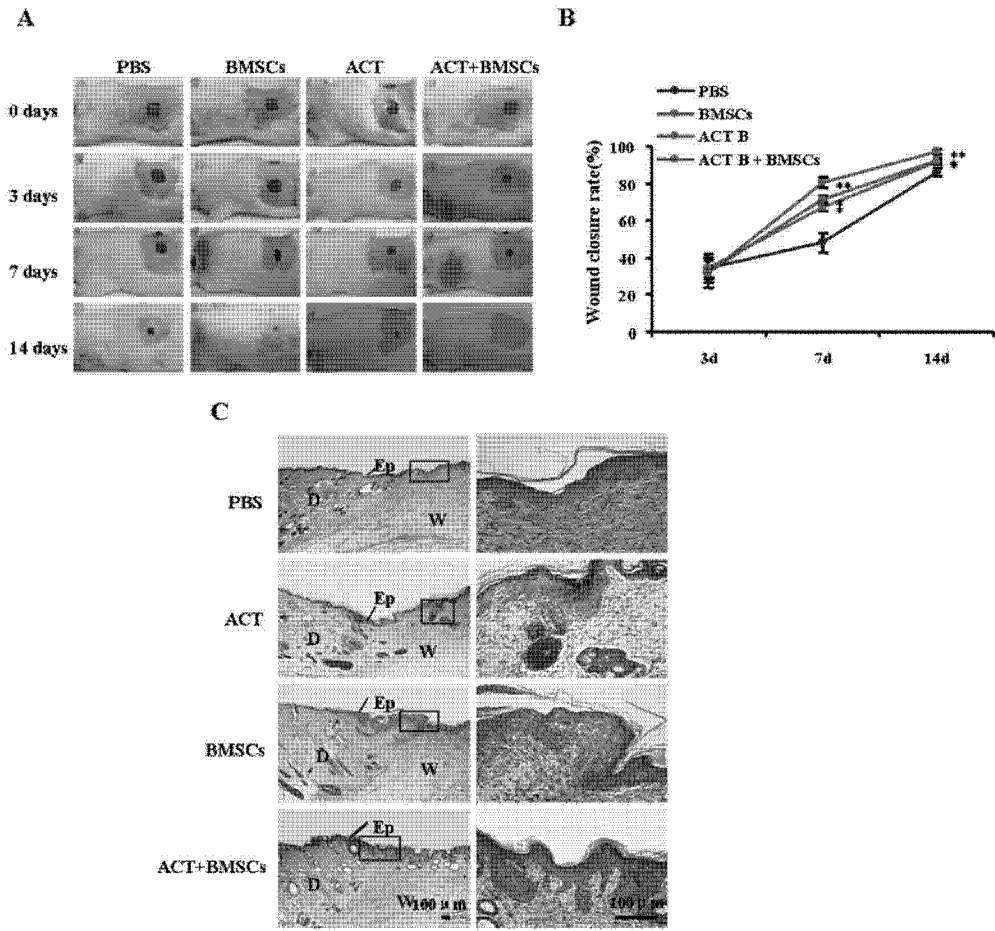


图 2

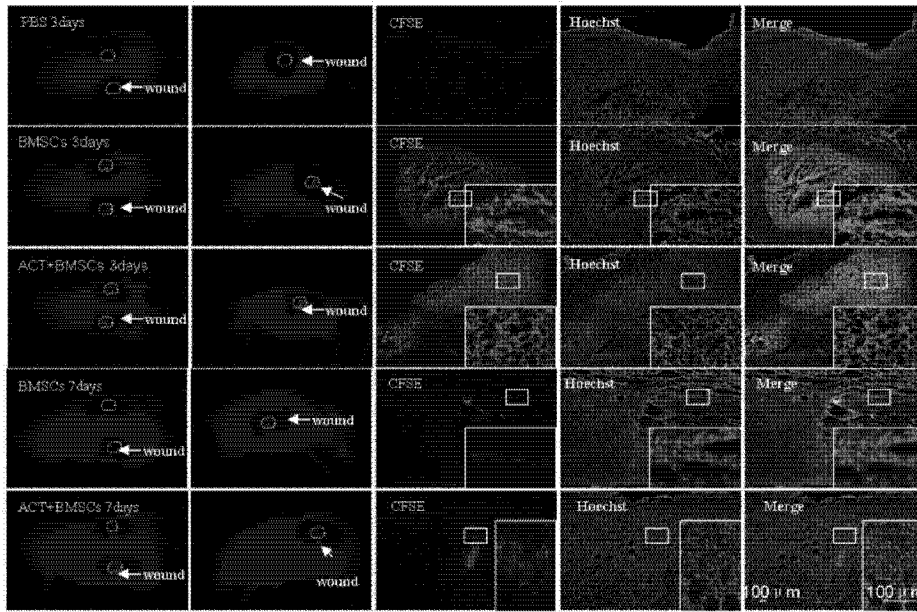


图 3

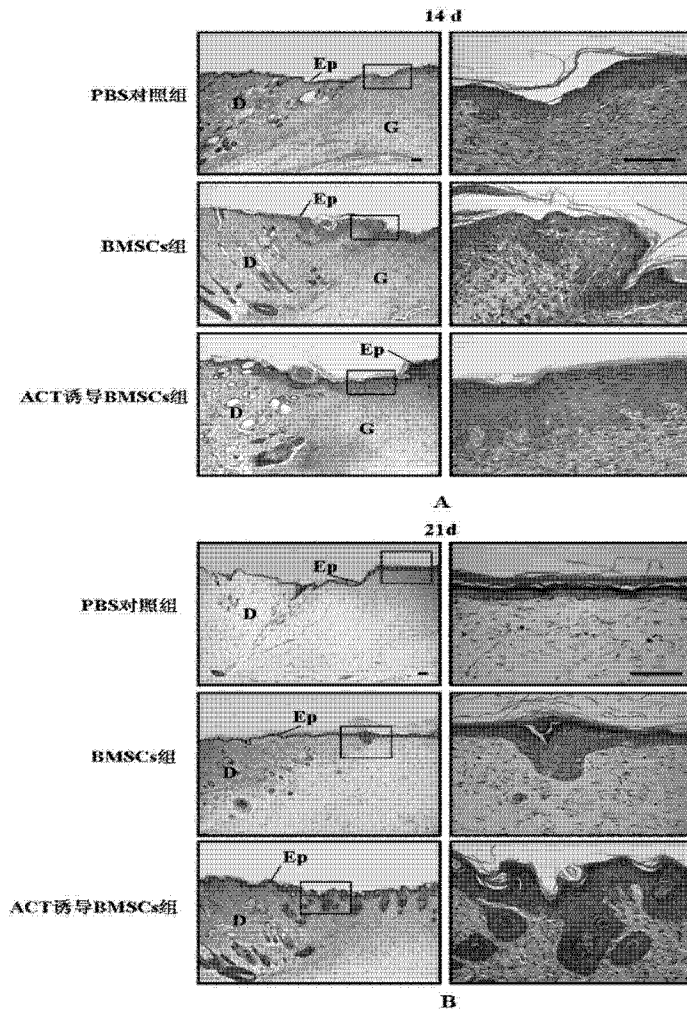


图 4

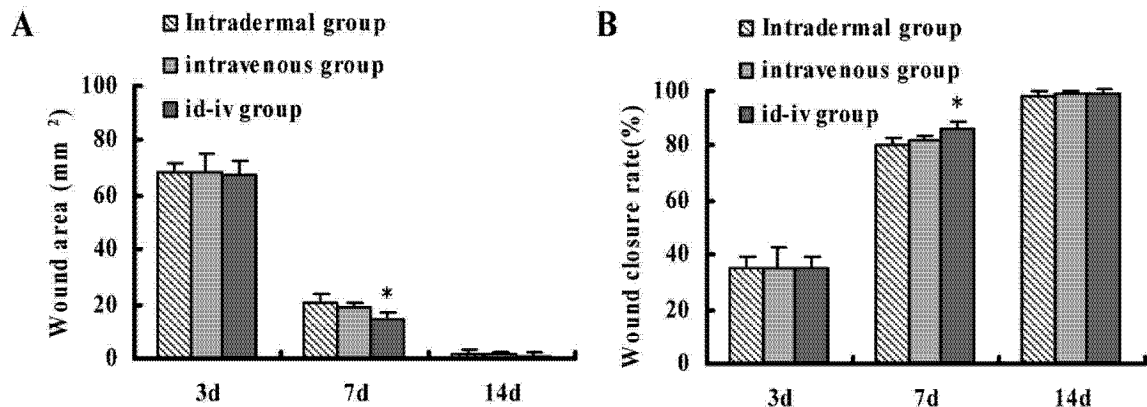


图 5

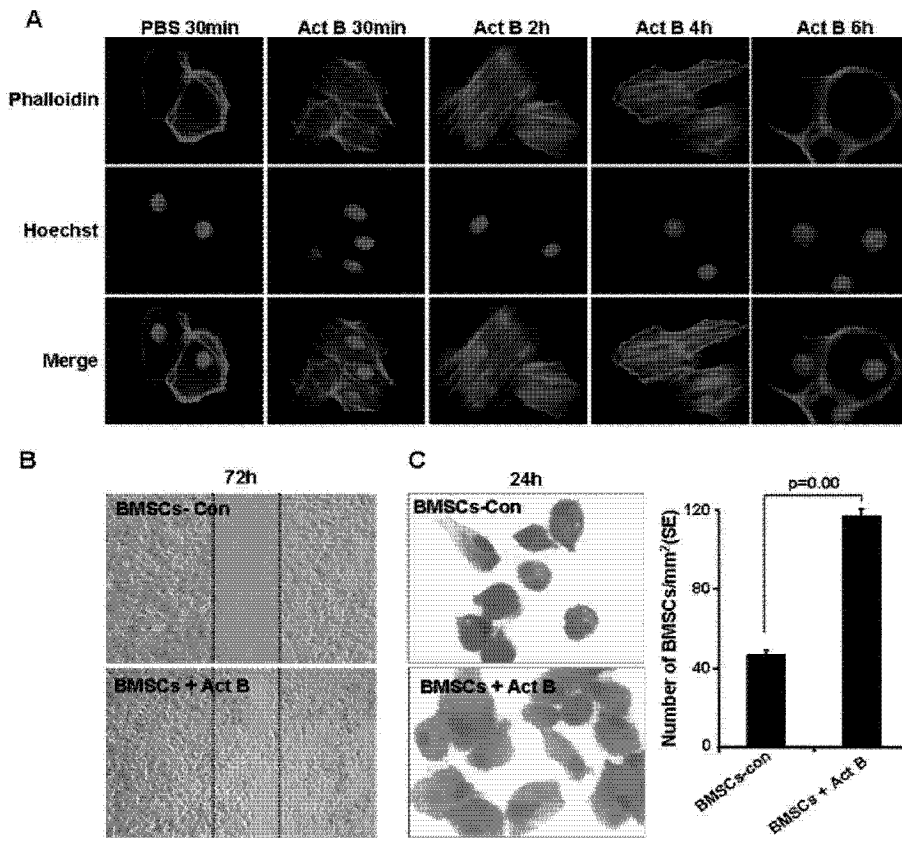


图 6

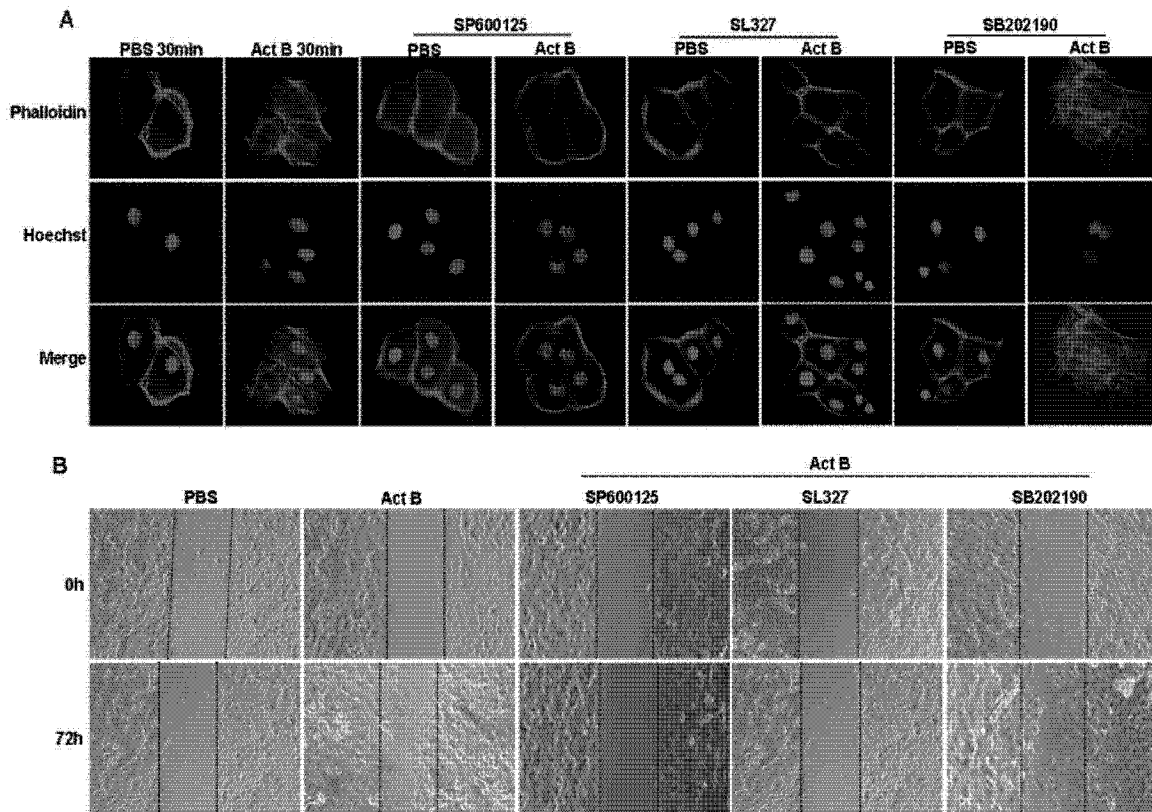


图 7

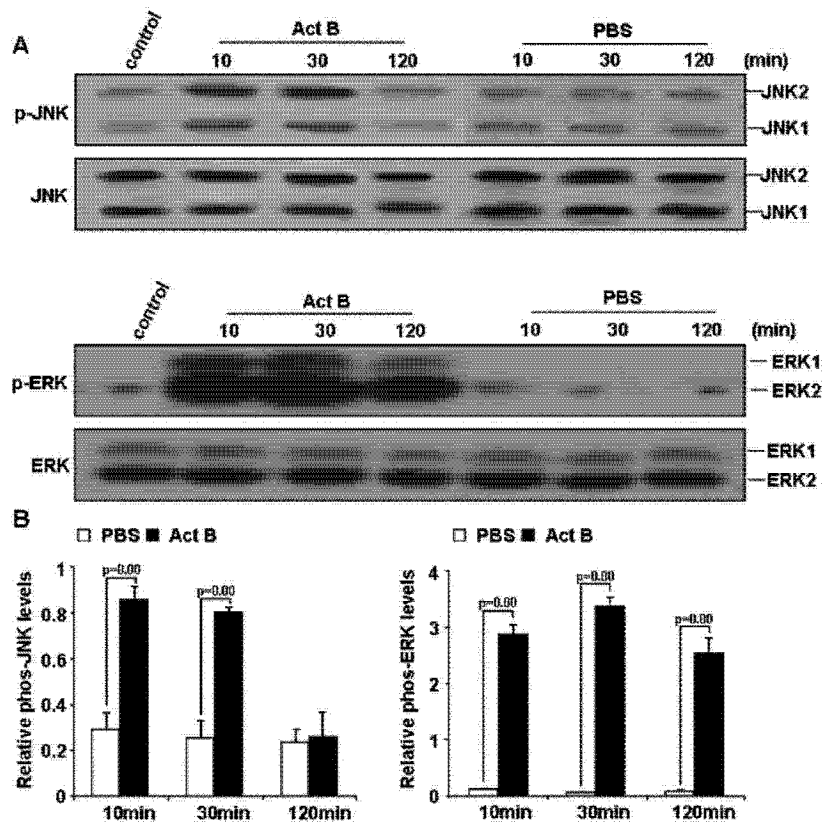


图 8