

局部乳酸微环境对人脐带来源间充质干细胞增殖和炎症调节能力的影响

韦清霞, 时玉峥, 孙 芮, 张 凡, 曹利人*

普华赛尔生物科技有限公司, 北京 100000

摘要: 目的 研究局部乳酸堆积对人脐带来源的间充质干细胞(hUC-MSCs)功能的影响。方法 采集足月婴儿脐带, 分离hUC-MSCs, 流式细胞术进行hUC-MSCs表面标志物检测, 分别应用骨茜素红S、油红O、阿尔新蓝进行成骨、成脂、成软骨诱导分化染色。采用CCK-8法检测乳酸(0、1、3、5、10、15 mmol·L⁻¹)处理24、48、72 h后对hUC-MSCs增殖能力的影响; 乳酸各浓度处理hUC-MSCs 72 h, 流式细胞术检测增殖指数(PI), 流式细胞术检测hUC-MSCs表面标志物, ELISA试剂盒法检测hUC-MSCs的血管内皮生长因子(VEGF)分泌功能; 取健康志愿者外周血, 用Ficoll淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞(PBMC), hUC-MSCs经0、10、20 mmol·L⁻¹的乳酸处理72 h后, 与PBMC共培养72 h, ELISA法检测上清液中炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、前列腺素E₂(PGE₂)水平, 流式细胞术检测PBMC的CD3⁺/ki67⁺水平。**结果** hUC-MSCs高表达CD73、CD90、CD105, 表达率 \geq 95%; CD34、CD45、CD19、HLA-DR表达率 \leq 2%; 成脂分化14 d后有明显脂肪滴形成; 成骨分化21 d后可见明显的矿化结节; 软骨方向分化14 d后有软骨球形成。当乳酸作用hUC-MSCs 24、48 h时, 随着乳酸浓度的升高hUC-MSCs的增殖能力增强($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 但当作用时间达到72 h, 乳酸由促增殖作用转为抑增殖作用($P < 0.01$ 、 0.001), PI减小; 不同浓度的乳酸处理hUC-MSCs, 其表面分子表达没有明显改变; 与0 mol·L⁻¹组比较, 随着乳酸浓度的提高, hUC-MSCs上清中VEGF的分泌量逐渐减少($P < 0.001$)。PBMC的CD3⁺百分率为66.5%, 符合行业标准。与PBMC组比较, PBMC+hUC-MSCs组上清TNF- α 水平显著降低、PGE₂水平显著增加($P < 0.001$); 与PBMC+hUC-MSCs组比较, 10、20 mmol·L⁻¹的乳酸可以显著抑制hUC-MSCs抗炎因子PGE₂的分泌、而对促炎因子TNF- α 的分泌显著促进($P < 0.001$)。与PBMC组比较, hUC-MSCs可以显著抑制CD3阳性细胞的增殖($P < 0.001$); 与PBMC+hUC-MSCs组比较, 10、20 mmol·L⁻¹的乳酸预处理可以显著减弱hUC-MSCs对CD3阳性细胞的抑制作用($P < 0.001$)。**结论** 慢性皮肤伤口微环境中的高浓度乳酸长时间作用, 可能通过影响hUC-MSCs的增殖和炎症调节能力, 阻碍伤口的愈合进程。

关键词: 乳酸微环境; 间充质干细胞; 增殖; 分泌功能; 炎症调节

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)07-1519-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.07.016

Effect of local lactate microenvironment on proliferation and inflammatory regulation ability of human umbilical cord derived mesenchymal stem cells

WEI Qingxia, SHI Yuzheng, SUN Rui, ZHANG Fan, CAO Liren

Everbright Cell Biotech Inc, Beijing 100000, China

Abstract: Objective Study the effect of local lactate accumulation on the function of human umbilical cord derived mesenchymal stem cells (hUC-MSCs). **Methods** The umbilical cord of term infants was collected, hUC-MSCs were separated, and the surface markers of hUC-MSCs were detected by flow cytometry. Bone alizarin red S, Oil Red O, and alcian blue were respectively used for osteogenesis, adipogenesis, and chondrogenesis induced differentiation staining. The CCK-8 method was used to detect the effect of lactic acid (0, 1, 3, 5, 10, 15 mmol·L⁻¹) treatment on the proliferation ability of hUC-MSCs after 24, 48, and 72 hours. The proliferation index (PI), surface markers of hUC-MSCs and the secretion of vascular endothelial growth factor (VEGF) of hUC-MSCs were detected by flow cytometry and ELISA respectively after treatment with different concentrations of lactic acid for 72 h. Peripheral blood mononuclear cell (PBMCs) were isolated from peripheral blood of healthy volunteers with Ficoll lymphocyte isolate. After being treated with 0, 10, and 20 mmol·L⁻¹ lactic acid for 72 h, hUC-MSCs were co-cultured with PBMCs for 72 h. The inflammatory factor, tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the supernatant was detected by ELISA. The levels of prostaglandin E₂

收稿日期: 2023-02-06

第一作者: 韦清霞, 女, 博士, 研究方向为间充质干细胞体内体外药效学研究。E-mail: wqxpmc@163.com

*通信作者: 曹利人 E-mail: caolr@bioevercell.com

(PGE₂) and CD3⁺/ki67⁺ of PBMCs were detected by flow cytometry. **Results** hUC-MSCs were highly expressed in CD73, CD90, and CD105, with an expression rate $\geq 95\%$, expression rate of CD34, CD45, CD19, and HLA-DR $\leq 2\%$. After 14 days of adipogenic differentiation, obvious fat droplets formed. After 21 days of osteogenic differentiation, obvious mineralized nodules could be observed. After 14 days of differentiation in the cartilage direction, chondrocytes formed. When lactic acid acts on hUC-MSCs for 24 and 48 hours, the proliferation ability of hUC-MSCs became stronger with the increase of lactic acid concentration ($P < 0.05$, 0.01, 0.001). However, when the action time reaches 72 hours, lactic acid shifted from a pro-proliferation effect to an inhibitory effect ($P < 0.01$, 0.001), and PI decreased. The surface molecule expression of hUC-MSCs treated with different concentrations of lactic acid did not significantly change. Compared with the 0 mol·L⁻¹ group, with the increase of lactate concentration, the secretion of VEGF in the supernatant of hUC-MSCs gradually decreased ($P < 0.001$). The CD3⁺ percentage of PBMC was 66.5%, which meets industry standards. Compared with the PBMC group, the supernatant level of TNF- α in PBMC + hUC-MSCs group significantly decreased and the PEG₂ level significantly increased ($P < 0.001$). Compared with the PBMC + hUC-MSCs group, 10 and 20 mmol·L⁻¹ lactate significantly inhibited the secretion of anti-inflammatory factor PEG₂ in hUC-MSCs, while inhibiting the pro-inflammatory factor TNF- α secretion was significantly promoted ($P < 0.001$). Compared with the PBMC group, hUC-MSCs significantly inhibited the proliferation of CD3 positive cells ($P < 0.001$). Compared with the PBMC + hUC-MSCs group, lactate pretreatment with 10 and 20 mmol·L⁻¹ significantly inhibited the inhibitory effect of hUC-MSCs on CD3 positive cells ($P < 0.001$). **Conclusion** The long-term effects of high concentrations of lactic acid in the microenvironment of chronic skin wounds may hinder the healing process of wounds by affecting the proliferation and inflammatory regulation ability of hUC-MSCs.

Key words: lactate microenvironment; mesenchymal stem cells; proliferation; secretory function; regulation of inflammation

间充质干细胞(MSCs)是维持组织稳态和修复的重要细胞来源之一,随着基础研究的深入,其临床适应症涵盖了多种慢性炎症性疾病、神经退行性疾病等^[1]。然而阻碍干细胞临床效果的关键在于干细胞移植后的存活率偏低、体内存活时间较短、与体内微环境相互作用不明等^[2]。

皮肤覆盖人体表面,作为抵御病原体的保护屏障,在人体稳态中起着至关重要的作用^[3]。创伤、烧伤和许多慢性疾病,如糖尿病和外周动脉疾病,都可能导致难治性伤口^[4]。为了帮助慢性伤口自然愈合,传统的伤口处理方法包括物理清创、外用抗生素、激素、加压绷带、组织工程皮肤移植、生长因子等。然而仍有超过50%的慢性伤口应用目前的方法治疗无效^[3-5]。研究显示,MSCs能够通过调节皮肤创面愈合过程中的炎症反应、细胞增殖和迁移、血管生成以及胶原沉积等多个阶段,促进伤口愈合并抑制瘢痕形成,因而在皮肤损伤修复中具有良好的应用前景^[5]。乳酸是血液和组织液中的重要化学成分之一(正常浓度约为1 mmol·L⁻¹),一度被认为是代谢性废物。然而,最近的研究表明其功能包括3个方面:①乳酸是主要的能量来源;②乳酸是主要的糖异生前体;③乳酸是一种具有自分泌、旁分泌和内分泌样作用的信号分子,被称为“乳激素”^[6]。已有研究显示,在皮肤损伤修复过程中,乳酸分子可以通过影响神经细胞和内皮细胞的生物学功能发挥作用。当中枢神经系统受损时,乳酸可以为神经细胞提供燃料,并通过上调缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)

促进内皮细胞增殖和血管生成^[7-8]。还有研究显示乳酸可以用来治疗炎症性疾病^[9],然而,乳酸对脐带来源的MSCs在皮肤损伤中的作用仍然未知。慢性伤口的特点局部乳酸堆积,已有研究表明高浓度的乳酸可刺激胶原蛋白合成、增加新生血管生成,但是其对MSCs的增殖和因子分泌功能目前报道较少,本研究评估乳酸对MSCs增殖、因子分泌和抗炎功能的影响。

1 材料

1.1 主要试剂

乳酸(Sigma-L1750-10G,批号2022062201S194/0);外周淋巴细胞分离液(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司);干细胞温和消化酶、MSCs完全培养基[友康生物科技(北京)股份有限公司];氯化钠注射液(华润双鹤药业股份有限公司);流式检测抗体(美国BD公司):阳性分子-anti-human CD44、anti-CD105、anti-human CD90、anti-human CD73,阴性分子-anti-human CD34、anti-human CD19、anti-human CD45、anti-human CD14;CCK-8细胞增殖毒性检测试剂盒(北仁化学科技有限公司);细胞周期检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);成脂、成骨、成软骨诱导分化试剂盒(Biological Industries);FITC-Ki67单克隆抗体(美国英杰生命技术有限公司);Human肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、前列腺素E₂(PGE₂)ELISA检测试剂盒(Invitrogen公司);植物血凝素(PHA-M,默克生命科学有限公司);丝裂霉素C(Stem Cell.);CD3、CD4、CD8流式

检测抗体(美国BD公司)。

1.2 主要仪器

SW-CJ-1F超净工作台(苏州安泰-实验室仪器有限公司);HF151细胞培养箱(力康生物医疗科技控股有限公司);CKX53倒置显微镜(奥林巴斯有限公司);H1650-W水平离心机(湘仪仪器有限公司);VERSE流式细胞仪(BD公司);Multiskan酶标仪(Thermo公司)。

2 方法

2.1 人脐带间充质干细胞(hUC-MSCs)制备

北京医院于2022年采集健康产妇的脐带,采集过程通过医院伦理委员会审批,伦理委员会批号2022BJYYEC-336-01,并与产妇签署知情同意书、健康调查表,确保产妇无传染性疾病、无家族遗传性疾病,采集足月婴儿脐带、分离华通氏胶,通过组织块贴壁法进行hUC-MSCs的原代分离,并按照8 000~10 000·cm⁻²的密度进行传代培养。hUC-MSCs传代培养至2代作为种子库细胞冻存,复苏后培养至4~6代进行相关研究。

2.2 hUC-MSCs表面标志物检测

消化制备待检测hUC-MSCs悬液,分别标记为阳性样本管(CD73/CD/CD105/CD44)、阴性样本管(CD34/CD45/CD14/CD19)、单染管、空白对照管,每个检测管中的细胞量是1×10⁶·μL⁻¹,加入对应的流式抗体,每种抗体的用量是每管5 μL,室温避光孵育15~30 min,加入0.9%氯化钠溶液300×g离心5 min,弃上清,洗2遍除去非特异性结合,细胞重悬,上流式细胞仪检测。

2.3 hUC-MSCs三系分化能力检测

2.3.1 成骨诱导分化 当细胞汇合度达到90%~95%时,将hUC-MSCs完全培养基吸除,每孔加入0.5 mL成骨诱导分化培养基,置于37℃、5% CO₂培养箱中培养7~21 d,每3~4天更换成骨诱导分化培养基。倒置显微镜下观察,细胞核变大,细胞变长,且有明显矿化结节时,可进行成骨茜素红S(2%、pH 8.3)染色。

2.3.2 成脂诱导分化 当细胞汇合度达到90%~95%时,将hUC-MSCs完全培养基吸除,每孔加入0.5 mL成脂诱导分化培养基。置于37℃、5% CO₂培养箱中诱导培养6~9 d,期间每3~4天更换成脂诱导培养基。当细胞变圆、部分漂起时使用hUC-MSCs完全培养基进行维持培养1~2 d,即为1个诱导周期。再重复以上步骤,直到观察到成熟脂肪细胞(即脂滴的形成),大概1~3个诱导周期,即可油

红O染色,可见红色脂肪滴。

2.3.3 成软骨诱导分化 当细胞汇合度达到80%~95%,且细胞状态生长良好,用细胞消化液消化细胞,300×g离心5 min后弃上清,使用hUC-MSCs完全培养基重悬细胞并计数。调整细胞密度为(1.0~1.2)×10⁷·mL⁻¹,U底的96孔板每孔加入10 μL上述细胞悬液,每个样品5个复孔,置于37℃、5% CO₂细胞培养箱中培养。2 h后,每个孔补加0.1 mL hUC-MSCs完全培养基,置于37℃、5% CO₂细胞培养箱中培养。细胞培养24 h后,将hUC-MSCs完全培养基吸除,每孔加入0.2 mL软骨诱导分化培养基。置于37℃、5% CO₂培养箱中培养21 d,期间每3~4天更换1次软骨诱导分化培养基。镜下有软骨球形成时,进行阿尔新蓝染色。

2.4 乳酸对hUC-MSCs增殖能力的影响

复苏hUC-MSCs并用无血清培养基培养,以8×10³·cm⁻²的密度接种,当细胞融合度达80%~90%时,细胞成长梭形,胞质内无明显黑色颗粒。用干细胞温和消化酶消化细胞,室温放置2~5 min,300×g离心5 min后弃上清,用培养基重悬细胞并计数,调整细胞密度为3×10⁴·mL⁻¹,每孔取100 μL细胞悬液于96孔细胞培养板中,每个样本5个复孔,细胞过夜贴壁。吸去培养基,加入含不同浓度乳酸(0~15 mmol·L⁻¹)的培养基,继续培养24、48、72 h后每孔加入10 μL的CCK-8溶液,放入二氧化碳孵育箱中培养2 h,在酶标仪450 nm处检测吸光度(A)值。

2.5 乳酸对hUC-MSCs细胞周期的影响

hUC-MSCs细胞以5×10⁴·mL⁻¹、每孔2 mL接种于6孔板,细胞过夜贴壁后,换液含不同浓度乳酸(0~15 mmol·L⁻¹)的培养基,培养72 h后,消化、制备待检测细胞悬液,取(0.5~1.0)×10⁶个细胞,加入3 mL预冷的75%乙醇,轻轻吹打混匀,4℃过夜固定细胞。碘化丙啶染色液配制:每个样品管0.5 mL染色缓冲液、5 μL碘化丙啶染色液(20×)、10 μL RNase(50×),洗涤经过夜固定的细胞,每管加入0.5 mL的染色液重悬细胞,37℃避光孵育30 min后上流式细胞仪检测,并用Modifit软件进行分析,计算增殖指数(PI)。

2.6 乳酸对hUC-MSCs表面标志物的影响

hUC-MSCs细胞接种、给药操作同“2.5”项,检测方法同“2.2”项。

2.7 乳酸对hUC-MSCs VEGF分泌功能的检测

hUC-MSCs细胞接种、给药(乳酸浓度为0、

10、20、50 mmol·L⁻¹)操作同“2.5”项,按照ELISA试剂盒说明书进行操作,检测细胞上清中VEGF水平。

2.8 外周血单个核细胞(PBMC)分离制备

取健康志愿者外周血,用Ficoll淋巴细胞分离液分离PBMC,用0.9%氯化钠溶液洗涤2次,细胞计数,调整细胞密度为1×10⁶·mL⁻¹,所用培养基是1640+10% FBS+10 μg·mL⁻¹的植物血凝素(PHA-M)。

分离的PBMC分别与CD3、CD4、CD8抗体孵育(100 μL体系、细胞数为1×10⁶、加抗体量2 μL),流式细胞仪检测细胞分型。

2.9 hUC-MSCs抗炎功能的检测

hUC-MSCs的准备:0、10、20 mmol·L⁻¹的乳酸处理hUC-MSCs 72 h,消化、制备细胞悬液。将浓度为1×10⁵·mL⁻¹的hUC-MSCs加到6孔板中,每孔2 mL,过夜贴壁后,加入10 μg·mL⁻¹的丝裂霉素C于二氧化碳孵箱中反应0.5 h,除去hUC-MSCs的增殖能力,但不影响其分泌功能,与其他细胞共培养之前用0.9%氯化钠溶液洗2遍。

取如上述准备好的hUC-MSCs,每孔加入1.5 mL的1×10⁶ PBMC悬液,同时,单独培养PBMC作为对照,共培养72 h后收集上清,采用ELISA法检测炎症因子TNF-α、PGE₂的水平。

收集PBMC细胞,采用流式细胞术检测hUC-MSCs对PBMC的增殖抑制作用。收集不同处理组的细胞,离心并用0.9%氯化钠溶液洗涤后,加入CD3流式抗体室温孵育30 min,各组加入500 μL的固定破膜剂重悬细胞,4 °C孵育30 min进行固定、破膜,600×g离心5 min,加入核抗体Ki67,室温避光

孵育40 min,洗涤后流式细胞仪检测。

2.10 统计方法

使用SPSS 22.0软件进行统计分析,正态分布计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,非正态分布资料使用中位数或者四分位数表示。两组独立样本采用unpaired Student's *t*-test的方法进行统计分析,多组独立样本数据采用ANOVA的方法进行统计分析,同时采用Dunnnett或Tukey的方法进行组间比较。

3 结果

3.1 hUC-MSCs形态和表面标志物检测

无血清培养基下培养hUC-MSCs,贴壁状态下细胞呈纤维样生长,接种密度为8 000·m⁻²培养3 d后,镜下观察,细胞呈长梭形、有一定的方向性和规律性,生长状态良好(图1)。对hUC-MSCs表面分子进行检测,结果显示,hUC-MSCs高表达CD73、CD90、CD105,表达率≥95%;CD34、CD45、CD19、HLA-DR表达率≤2%。符合质量标准,结果见图2。



图1 hUC-MSCs贴壁培养形态(×40)

Fig. 1 hUC-MSCs adherent culture morphology (×40)

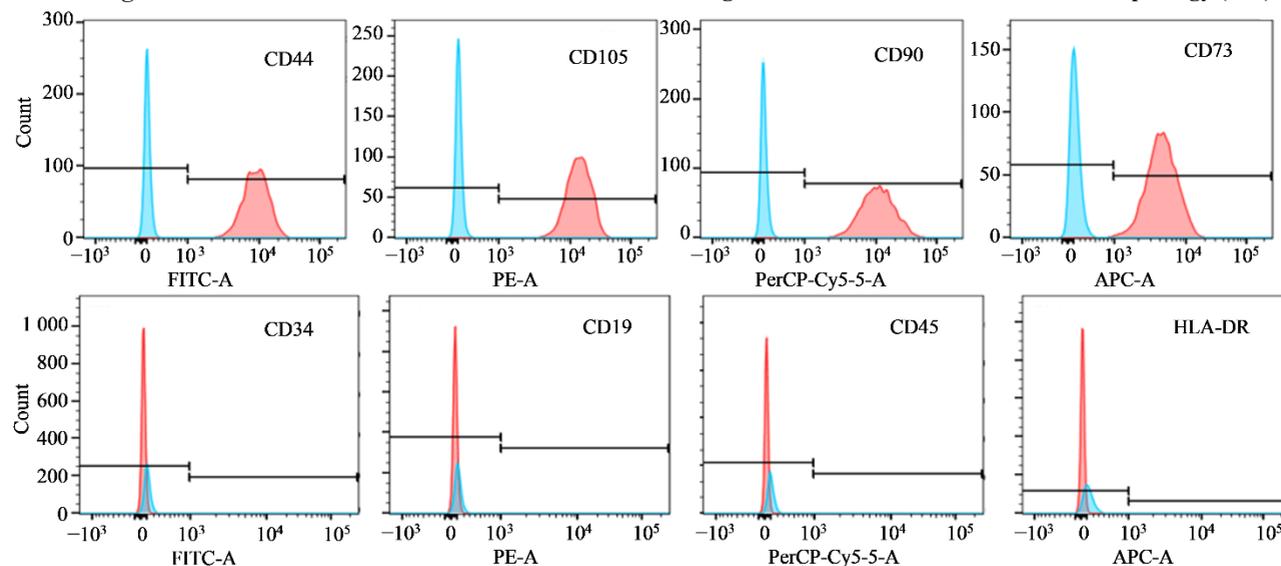


图2 hUC-MSCs表面标志物检测

Fig. 2 Results of hUC-MSCs surface markers

3.2 hUC-MSCs三系分化能力检测

经过3种不同分化培养基培养,成脂分化14 d后,镜下观察,有明显脂肪滴形成,经油红染色为红色(图3-A);成骨分化21 d后,显微镜下可见明显的矿化结节,经茜素红染色后为红色(图3-B);软骨方向分化14 d后,软骨球形成,随着分化时间的延长,软骨球逐渐增大,经阿利新蓝染色后,软骨球呈深蓝色(图3-C)。

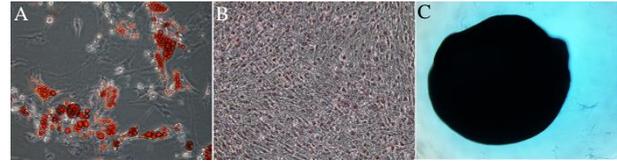
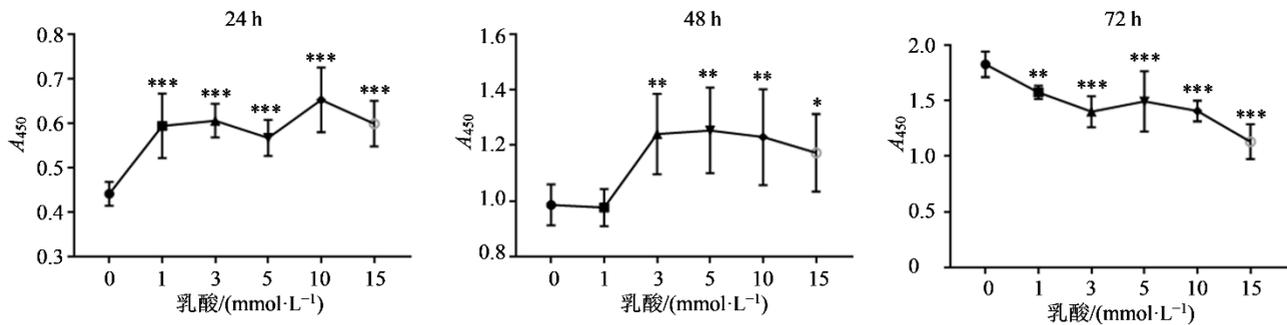


图3 hUC-MSCs成脂(A)、成骨(B)、成软骨(C)分化染色
Fig. 3 Differentiation staining results of hUC-MSCs for adipogenesis (A), osteogenesis (B), and chondrogenesis (C)

3.3 乳酸对hUC-MSCs增殖能力的影响

如图4所示,当乳酸作用细胞24、48 h时,与0 mol·L⁻¹组比较,随着乳酸浓度的升高hUC-MSCs的增殖能力增强($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001);

但当作用时间达到72 h,乳酸的作用由促增殖作用转为抑增殖作用($P < 0.01$ 、 0.001)。细胞周期结果显示,当乳酸作用hUC-MSCs 72 h时,随着乳酸浓度增大,PI减小,表现为增殖抑制作用(图5、表1)。



与0 mol·L⁻¹组比较: * $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$
* $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs 0 mol·L⁻¹ group

图4 不同浓度乳酸对hUC-MSCs增殖能力的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Effects of different concentrations of lactate on proliferation of hUC-MSCs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

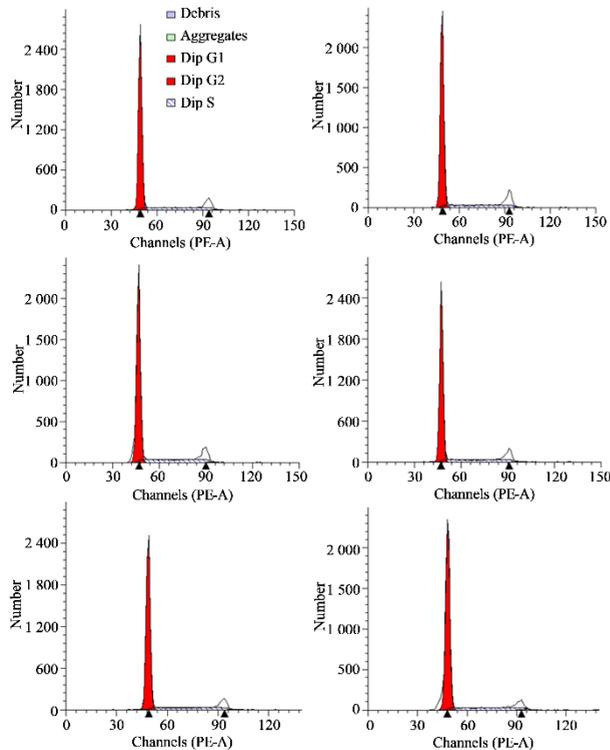


图5 不同浓度乳酸对hUC-MSCs细胞周期的影响

Fig. 5 Effects of different concentrations of lactate on cell cycle of hUC-MSCs

表1 不同浓度乳酸对hUC-MSCs细胞周期的影响

Table 1 Effects of different concentrations lactate on cell cycle of hUC-MSCs

组别	浓度/(mmol·L ⁻¹)	G ₁ /%	G ₂ /%	S/%	PI指数
乳酸	0	80.93	0	19.07	19.07
	1	82.28	0	17.72	17.72
	3	81.49	0	18.51	18.51
	5	82.06	0	17.94	17.94
	10	84.30	0	15.70	15.70
	15	84.29	0	15.71	15.71

3.4 乳酸对hUC-MSCs表面标志物的影响

不同浓度的乳酸处理hUC-MSCs,其表面分子表达没有明显改变,CD73、CD90、CD105为阳性高表达;CD34、CD45、CD19、HLA-DR为阴性表达,结果如表2所示,说明乳酸处理hUC-MSCs,并未改变其干性表达,符合干细胞的质量标准。

3.5 乳酸对hUC-MSCs VEGF分泌功能的检测

与0 mol·L⁻¹组比较,随着乳酸浓度的提高,hUC-MSCs上清中VEGF的分泌量逐渐降低($P < 0.001$),当乳酸浓度达到伤口环境中的浓度50 mmol·L⁻¹时,VEGF的分泌量低至39.83 pg·mL⁻¹。见图6。

表2 乳酸处理条件下hUC-MSCs表面标志物表达率

Table 2 Expression rate of surface markers in hUC-MSCs treated with lactate

组别	浓度/(mmol·L ⁻¹)	CD44/%	CD105/%	CD90/%	CD73/%	CD34/%	CD19/%	CD45/%	CD14/%
乳酸	0	99.6	99.6	100.0	100.0	1.53	0.11	0.13	0.42
	1	99.1	99.1	99.9	99.9	0.01	0	0.01	0
	3	97.9	97.9	99.8	99.8	0.06	0	0	0
	5	97.6	97.6	99.9	99.9	0	0.03	0	0
	10	99.9	97.1	99.9	99.8	0.03	0	0	0
	15	96.4	96.4	99.9	99.9	0.03	0	0.01	0.01

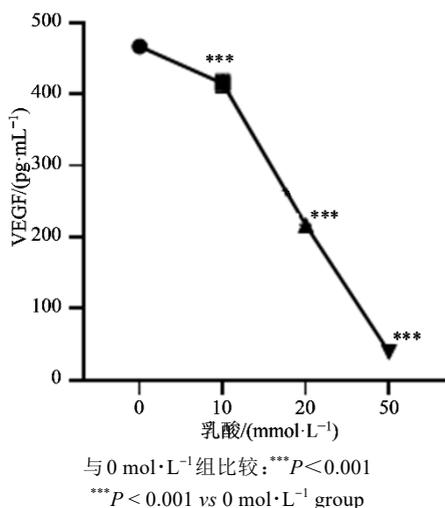


图6 不同浓度乳酸对hUC-MSCs VEGF分泌量的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Effects of different concentrations of lactate on hUC-MSCs VEGF secretion ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.6 乳酸对hUC-MSCs炎症调节能力的影响

3.6.1 PBMC的分离与检测 结果如图7所示, CD3⁺百分率为66.5%,符合行业标准($\geq 50\%$),可以作为质控细胞用于hUC-MSCs的炎症调节能力检测。

3.6.2 乳酸对hUC-MSCs炎症调节功能的影响 如表3所示,与PBMC组比较,PBMC+hUC-MSCs组 TNF- α 水平显著降低、PEG₂水平显著增加($P < 0.001$);与PBMC+hUC-MSCs组比较,10,20 mmol·L⁻¹的乳酸可以显著抑制hUC-MSCs抗炎因子PEG₂的分泌、而对促炎因子TNF- α 的分泌显著促进($P < 0.001$)。

淋巴细胞增殖抑制实验结果如图8、表4所示,与PBMC组比较,hUC-MSCs可以显著抑制CD3阳性细胞的增殖($P < 0.001$);与PBMC+hUC-MSCs组比较,10、20 mmol·L⁻¹的乳酸预处理可以显

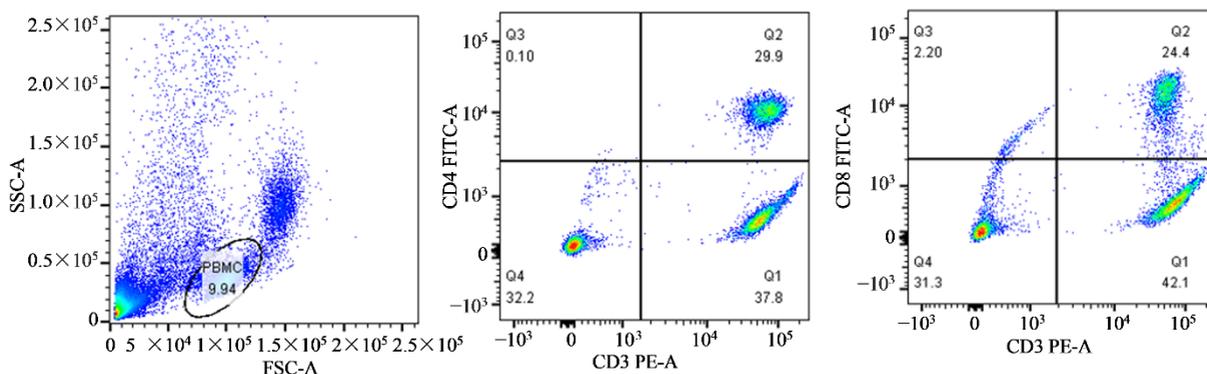


图7 PBMC亚型分析

Fig. 7 PBMC flow cytometry analysis

著减弱hUC-MSCs对CD3阳性细胞的抑制作用($P < 0.01, 0.001$)。

4 讨论

MSCs是一类复制能力强、连续传代培养仍具有多向分化潜能及免疫调控能力的成体干细胞。与其他来源的MSCs相比,脐带MSCs具有更强的扩增能力,无致瘤活性和低免疫原性^[10]。本研究主

要揭示了不同浓度的乳酸对MSCs功能的影响,实验结果显示,低浓度的乳酸在较短时间内可以促进MSCs的快速增殖能力,但是随着乳酸的持续累积,MSCs的增殖能力减弱;而较高浓度的乳酸对干细胞的因子分泌功能和抗炎功能有负向调控作用。

慢性伤口愈合是一种复杂的、涉及多种细胞和分子的生物学过程^[11]。研究显示,MSCs在在组织

表3 乳酸处理条件下hUC-MSCs TNF- α 和PGE₂的分泌情况($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effects of lactic acid on secretion of TNF- α and PGE₂ in hUC-MSCs ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	浓度/(mmol·L ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	PGE ₂ /(pg·mL ⁻¹)
PBMC	—	289.38±5.39	80.50±10.75
PBMC+hUC-MSCs	—	6.65±4.77***	26 102.67±686.17***
PBMC+hUC-MSCs+乳酸	10	730.67±60.61###	178.01±76.71###
	20	602.20±107.52###	395.07±134.16###

与PBMC组比较:*** $P < 0.001$;与PBMC+hUC-MSCs组比较:### $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs PBMC group; ### $P < 0.001$ vs PBMC+hUC-MSCs group

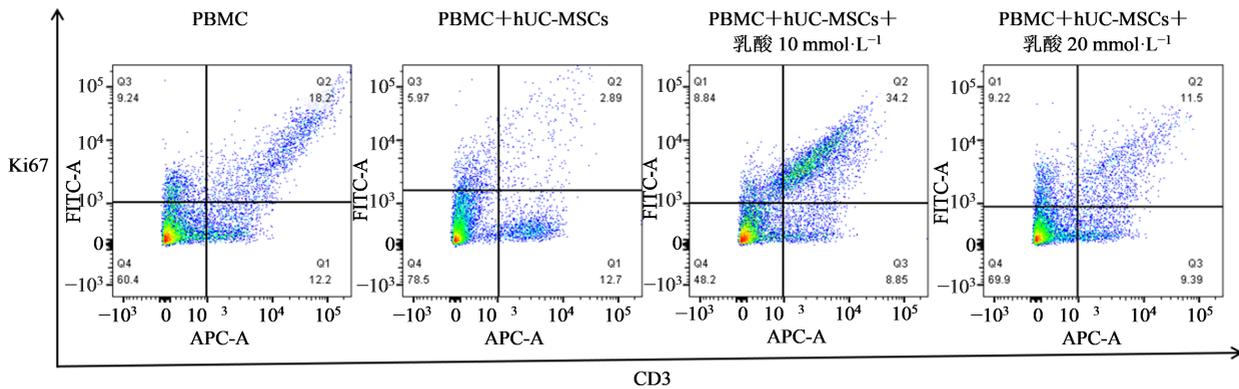


图8 不同浓度乳酸对hUC-MSCs的PBMC增殖抑制作用的影响

Fig. 8 Effects of different concentrations of lactic acid on inhibitory effect of hUC-MSCs on PBMC

表4 不同浓度乳酸对hUC-MSCs的PBMC增殖抑制作用的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effects of different concentrations of lactic acid on inhibitory effect of hUC-MSCs on PBMC ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	浓度/(mmol·L ⁻¹)	CD3 ⁺ /ki67 ⁺ /%
PBMC	—	18.83±0.23
PBMC+hUC-MSCs	—	3.02±0.4***
PBMC+hUC-MSCs+乳酸	10	34.47±5.83###
	20	14.97±6.11###

与PBMC组比较:*** $P < 0.001$;与PBMC+hUC-MSCs组比较:### $P < 0.01$ ### $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs PBMC group; ### $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs PBMC+hUC-MSCs group

再生和机体稳态中发挥重要作用,在伤口愈合过程中,MSCs可通过旁分泌、原位分化来取代受损组织2种机制参与。旁分泌作用模式已通过在心肌梗死部位注入干细胞条件培养基导致梗死面积减少证实^[12],在肾损伤大鼠模型中,输注干细胞可以通过影响肾脏细胞抗炎因子和促炎性因子的分泌平衡来改善大鼠的肾功能。

乳酸自发现以来一直被认为是糖酵解的副产品或废物,对机体具有多种损害。20世纪80年代,随着乳酸穿梭概念的提出,研究者对乳酸在新陈代

谢中的理解发生了改变。近年来,越来越多的研究表明,乳酸不仅是一种能量来源,其在机体内的穿梭更是一种代谢缓冲剂或调节剂,乳酸还通过其受体发挥多功能信号分子作用,引起诸多生物学效应^[6]。已有研究显示,乳酸通过促进胶原蛋白合成来促进伤口愈合,还有研究者认为乳酸可以刺激干细胞的归巢效应,本研究主要是通过模拟慢性伤口乳酸微环境,研究其对MSCs增殖和炎症调节能力的影响。通过CCK8检测发现,低浓度的乳酸在较短时间内可以促进干细胞的快速增殖能力,但是随着乳酸的持续累积,干细胞的增殖能力减弱;ELISA检测结果显示较高浓度的乳酸抑制干细胞的VEGF的分泌功能,在与PBMC共培养时,经乳酸预处理的干细胞,对PBMC的增殖抑制明显减弱,抑炎因子PGE₂分泌降低,促炎因子TNF- α 分泌较高。结果表明乳酸对干细胞的炎症调节有负向调控作用。本课题组推测在慢性皮肤伤口微环境中的高浓度乳酸,可能会影响移植干细胞的增殖和功能,从而影响干细胞的治疗效果,因此,在干细胞移植前,去除局部乳酸,可能会提高干细胞的局部存活率。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Sherman L S, Shaker M, Mariotti V, et al. Mesenchymal stromal/stem cells in drug therapy: New perspective [J]. *Cytotherapy*, 2017, 19(1): 19-27.
- [2] Zhao L F, Hu C X, Zhang P, et al. Preconditioning strategies for improving the survival rate and paracrine ability of mesenchymal stem cells in acute kidney injury [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(2): 720-730.
- [3] Jo H, Brito S, Kwak B M, et al. Applications of mesenchymal stem cells in skin regeneration and rejuvenation [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(5): 2410.
- [4] Yao B, Huang S, Gao D Y, et al. Age-associated changes in regenerative capabilities of mesenchymal stem cell: Impact on chronic wounds repair [J]. *Int Wound J*, 2016, 13(6): 1252-1259.
- [5] Ha D H, Kim H K, Lee J, et al. Mesenchymal stem/stromal cell-derived exosomes for immunomodulatory therapeutics and skin regeneration [J]. *Cells*, 2020, 9(5): 1157.
- [6] Brooks G A. The science and translation of lactate shuttle theory [J]. *Cell Metab*, 2018, 27(4): 757-785.
- [7] Nalos M, Leverve X, Huang S, et al. Half-molar sodium lactate infusion improves cardiac performance in acute heart failure: A pilot randomised controlled clinical trial [J]. *Crit Care*, 2014, 18(2): R48.
- [8] George A. The tortuous path of lactate shuttle discovery: From cinders and boards to the lab and ICU [J]. *J Sport Health Sci*, 2020, 9(5): 446-460.
- [9] Luo Y, Li L, Chen X, et al. Effects of lactate in immunosuppression and inflammation: Progress and prospects [J]. *Int Rev Immunol*, 2022, 41(1): 19-29.
- [10] Nagamura-Inoue T. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility [J]. *World J Stem Cells*, 2014, 6(2): 195.
- [11] Rangatchew F, Vester-Glowinski P, Rasmussen B S, et al. Mesenchymal stem cell therapy of acute thermal burns: A systematic review of the effect on inflammation and wound healing [J]. *Burns*, 2021, 47(2): 270-294.
- [12] Lalu M M, Mazzarello S, Zlepzig J, et al. Safety and efficacy of adult stem cell therapy for acute myocardial infarction and ischemic heart failure (SafeCell heart): A systematic review and meta-analysis [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2018, 7(12): 857-866.

[责任编辑 兰新新]