

循环成纤维细胞在创面修复中的作用研究进展

解英 汪虹 张伟 赵阳

Advances in the research of effects of circulating fibroblasts on wound repair Xie Ying, Wang Hong, Zhang Wei, Zhao Yang. Department of Burn Surgery, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650101, China
Corresponding author: Wang Hong, Email: 1953602234@qq.com

【Abstract】 Wound repair is a complex process involving multiple disciplines, cell factors, cell types, and signaling pathways. In recent years, many researches showed that circulating fibroblasts (cFbs) deriving from bone marrow and residing in peripheral blood, played a role in wound repair by migrating to wound sites, differentiating into fibroblasts and myofibroblasts, and secreting cytokines, extracellular matrix, chemokines, growth factors, and antigen-presenting molecules, etc. cFbs also involve in three phases of inflammation, proliferation, and remodeling in wound repair of diabetes, ulcers, burns and other wounds, which indicate that they could be a potential treatment for wound repair. This article aims to review the latest development in circulating fibroblasts and wound repair.

【Key words】 Cell differentiation; Cytokines; Wound healing; Circulating fibroblasts

【Fund program】 District Science Fund of National Natural Science Foundation of China (81160238)

【关键词】 细胞分化; 细胞因子类; 伤口愈合; 循环成纤维细胞

【基金项目】 国家自然科学基金地区科学基金(81160238)

随着社会经济的发展及老龄化进程加速,由糖尿病、感染、溃疡等引起的创面发病率持续上升,创面治疗及护理费用持续增长,不仅影响患者的生活质量和生命健康,也加重患者经济及社会医疗资源负担。创面修复成为研究热点与攻克难点。过去认为 Fb 在创面修复中发挥着重要作用,近年研究显示,一种兼具造血细胞与间质细胞特点的新型细胞——循环 Fb(cFb),不仅可分化为创面修复的主要细胞 Fb 和肌 Fb,还可分泌丰富的细胞因子参与糖尿病、溃疡、烧伤等创面的细胞迁移、增殖、分化和血管生成,贯穿创面修复的炎症期、增殖期及重塑期^[1-2],有望成为临床促进创面愈合的治疗手段。

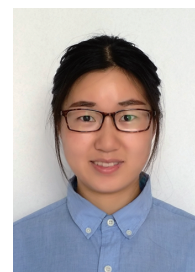
1 cFb 丰富的细胞因子谱及功能

研究者通过性别错配骨髓移植模型和绿色荧光蛋白转基因小鼠骨髓移植模型证实 cFb 来源于骨髓^[3-4]。目前普遍采用造血细胞表面标志物 CD34、CD45 与 I 型胶原作为鉴定 cFb 的表面标志,即 CD34⁺、CD45⁺ 和 I 型胶原阳性^[3]。研

究表明,从外周血中分离、培养的 cFb 能分泌独特的趋化因子、炎症因子和生长因子^[3-10]。cFb 可分泌前炎症因子 TNF、IL-6、IL-8、IL-10、巨噬细胞炎症蛋白 1 α (MIP-1 α)和 MIP-1 β 等^[3-5],这些因子可能与创面修复的炎症阶段有关;cFb 也可分泌多种生长因子,如血管内皮生长因子(VEGF)、血小板源性生长因子(PDGF)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、TGF、Fb 生长因子(FGF)等^[3-6],参与创面修复的血管生成环节;cFb 还可表达一些趋化因子受体(CXCR)如 CXCR4 等,介导炎症细胞的募集及迁移^[7]。Kisseleva 等^[8]研究显示,当机体处于急性损伤或感染时,cFb 可表达抗原呈递所需的主要组织相容性复合体 II 类分子如人类白细胞抗原 DP 位点(HLA-DP)和 HLA-DQ 等,共刺激分子 CD80 和 CD86,黏附分子 CD11b、CD54、CD58 呈递抗原,促进 T 淋巴细胞增殖、募集和活化,迁移至损伤组织,启动并促进 T 淋巴细胞免疫应答。重要的是,cFb 可表达肌 Fb 的特异性标志物 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA),表明 cFb 能分化为肌 Fb 并引起创面收缩^[3-5]。cFb 还可表达波形蛋白、纤维连接蛋白、透明质酸、糖蛋白等 ECM 成分,ECM 不仅能维持组织的完整性,还为细胞生存提供了良好的微环境^[9]。García-de-Alba 等^[10]推测 cFb 可表达基质金属蛋白酶 2(MMP-2)、MMP-7、MMP-8、MMP-9,这些蛋白酶可能通过降解细胞内外蛋白参与 Fb 的趋化、迁移及增殖。

2 cFb 的迁移与分化

研究表明,在 T 淋巴细胞介导下,外周血中 CD14⁺ 单个核细胞可分化为 cFb,这种分化能被 TGF- β_1 、PDGF、IL-4 和 IL-13 所增强,被血清淀粉样蛋白(SAP)、聚合 IgG、 γ 干扰素和 IL-12 所抑制^[11]。循环血液中的 cFb 迁移至创面组织可能依靠趋化因子(CXCL)-CXCR 信号通路中的 CXCL12/基质细胞衍生因子 1-CXCR4^[12]。其中,CXCR4 可丰富地表达于 cFb^[12],该信号通路可能是 cFb 的主要迁移途径。研究者以博来霉素诱导小鼠肺纤维化模型,与未用 CXCL12 抗体的对照组相比,使用 CXCL12 抗体的小鼠合成胶原和 α -SMA 水平显著降低,由此推测 cFb 先迁移至局部组织后,再分化为可合成胶原和 α -SMA 的细胞^[13]。研究还显示,cFb 的另一迁移信号通路为细胞趋化因子 21-细胞趋化因子受体(CCR)7^[14]。其中,CCR7 在 cFb 上表达少于 10%^[15],推测这可能是 cFb 的次要迁移途径。由于 cFb 在培养过程中逐渐失去造血细胞表面标志物(如 CD45),而使了解体内 cFb 迁移路径存在难度。Suga 等^[16]利用基因 *vav1* 仅表达于造血细胞的优势,采用转基因小鼠模型,以绿色荧光蛋白标记造血细胞,红色荧光蛋白标记非造血细胞,结果显示,CD45⁺、CD11b⁺ 与 CD45⁻、CD11b⁻ 的 2 种 cFb 均能迁移至创面,并表达 I 型胶原。



在 cFb 培养基中加入 TGF- β_1 , 可通过激活 Smad2/3 和 c-Jun 氨基末端激酶/应激激活蛋白激酶-MAPK 信号途径使 cFb 转化为肌 Fb; 而当 cFb 培养基中加入过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (曲格列酮), 该信号通路被抑制, cFb 分化为肌 Fb 的水平降低; 同时还可观察到脂质的积累和表达 aP2 基因的脂肪细胞, 证实 cFb 可分化为脂肪样细胞^[17]。Choi 等^[18]将 cFb 置于成骨诱导培养基中培养, 免疫组织化学染色表明钙沉积, 同时检测到成骨细胞基因(骨粘连蛋白基因、骨桥蛋白基因、骨钙蛋白基因)表达的上调, 表明 cFb 可分化为成骨样细胞; 而将 cFb 培养于加入含有 TGF- β_3 的软骨细胞培养基中, cFb 可分化为软骨样细胞。

3 cFb 在创面修复中的作用

研究者将 1.5 cm 长的聚乙烯醇海绵硅胶小管移植入小鼠创面, 观察到创面出现渗出性反应并检测到产生胶原、CD45⁺ 的 cFb, 由此证实 cFb 与创面修复有关^[1]。经尾静脉注射 cFb 至糖尿病小鼠体内, 可显著促进皮肤创面闭合, 由此推测注射的 cFb 能够迁移并募集至创面以弥补局部真皮 Fb 的功能不良, 促进创面愈合^[3]。

在创面修复的第 1 阶段炎症期, 首先进入创面的单核细胞与中性粒细胞开始清除坏死组织、细胞碎片及微生物; 同时, 外周血 cFb 随炎症细胞迅速进入创面, 通过抗原呈递参与炎症反应^[5]。cFb 迁移至局部创面可能与其表达的趋化因子受体如 CCR2、CCR7、CXCR4 及 Toll 样受体密切相关^[3]。另外, 早期炎症阶段创面可出现高水平的炎症因子 IL-1, 促进 cFb 增殖且分泌炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-8、IL-10、MIP-1 α 、MIP-1 β 等和 MMP-9 参与炎症反应^[6]。然而, 当创面的 IL-1 水平与炎症反应呈一致性减弱时, TGF- β 水平反而升高, 推测可能与 cFb 表型转变、胶原和 α -SMA 的生成有关^[3]。

在创面修复的第 2 阶段增殖期, 血管内皮细胞、KC、Fb 分别在血管生成、再上皮化、胶原沉积等方面扮演重要角色^[3]。其中, 血管生成是创面愈合的关键环节之一。研究显示, 将荧光染料 PKH-26 标记的 cFb 通过尾静脉注射入糖尿病小鼠体内, PKH-26 标记的 cFb 能迁移至小鼠创面并促进血管生成^[3]。Li 等^[19]研究显示, cFb 通过分泌促血管生成因子如 VEGF 和抗血管生成因子如血小板反应蛋白 1, 使小鼠创面生成稳定新生血管。此外, cFb 可分化为 Fb 并分泌胶原, 促进胶原沉积^[9]。

在创面修复的第 3 阶段重塑期, cFb 不仅可分化为肌 Fb^[20], 还可产生 ECM 和 α -SMA^[9]。其中, 新生基质的成熟与重建不仅能增加创面张力而且可恢复组织的完整性, 而 α -SMA 的表达是 cFb 向肌 Fb 分化的标志, 肌 Fb 可合成大量 α -SMA, 产生强烈的收缩功能牵拉伤口边缘^[3]。研究者采用荧光活化细胞分选术, 于小鼠创面组织分离出 CD45⁺、CD13⁺、I 型胶原原性的 cFb, 结果显示小鼠伤后 4~7 d 约有 61.4% 的 cFb α -SMA 表达阳性, 表明在该阶段有大量 cFb 分化为肌 Fb; 然而, 创面组织中的 TGF- β_1 也随之升高^[21-22]。

此外, cFb 可能还与一些细胞因子有关而影响创面愈合。白细胞特异性蛋白 1 (LSP1) 是白细胞重要趋化因子, 已知白细胞和 cFb 均可表达 LSP1, 而 Fb 不表达, 且 LSP1 在

cFb 的表达水平显著高于白细胞^[23]。研究显示, 与未敲除 LSP 基因的小鼠相比, 敲除 LSP 基因的小鼠 cFb 数量更多, 创面愈合加快, 胶原合成、再上皮化、血管生成等反应更显著, 推测敲除 LSP1 基因的小鼠创面加速愈合可能与 cFb 水平反馈性升高有关^[21]。SAP 是抑制循环血液中单个核细胞分化为 cFb 的关键因子。White 等^[24]研究显示, SAP 作用于创面可导致肌 Fb 数量减少与创面闭合率降低, 推测其可能原因为 SAP 抑制 cFb 分化为肌 Fb。或许可通过 SAP 影响 cFb 分化为肌 Fb, 改善创面愈合。

Geiger 等^[25]通过糖尿病小鼠创面模型观察到在 FGF2 存在下, PDGF-BB 和 TGF- β_1 可刺激 cFb 分泌无免疫原性的外泌体, 这些外泌体可促进糖尿病创面血管新生、活化 Fb、诱导 KC 的迁移及增殖, 从而加速糖尿病创面愈合。因此, 研究者认为应用 cFb 分泌的外泌体修复糖尿病创面也许是可行的。研究表明, 骨髓来源的抑制性细胞 (MDSC) 可分化为能促进创面愈合的 cFb^[26]。Ou 等^[27]以压力性全层皮肤缺损小鼠为模型, 观察到缺乏细胞周期抑制剂 Kruppel 样因子 4 (KLF4) 可导致 MDSC 和 cFb 减少, 创面愈合延迟; 相反, 若通过外源性倍半萜内酯类化合物 Mexicanin I 活化 KLF4, 可增加 MDSC 和 cFb 数量, 从而加速创面愈合。使 MDSC 分化为 cFb 与外源性使用 Mexicanin I 或许可作为压力性溃疡的一种新治疗策略。异位骨化症 (HO) 是严重烧伤患者的并发症之一, 为肌肉骨骼损伤后在软组织部位形成的成熟骨组织。Medina 等^[28]采用流式细胞术与免疫荧光技术, 从 HO 患者标本分离出来源于骨髓、具有梭状形态、表达 I 型胶原和 LSP1 的 cFb; 当将分离出的 cFb 培养于成骨诱导培养基中, 可观察到骨矿化和钙沉积; 研究还显示干扰素 α 2b 可显著降低 cFb 增殖活性及减少 I 型胶原基因表达。这些研究结果可能为烧伤患者 HO 的治疗提供新方法。另外, 研究者还观察到瘢痕疙瘩 Fb 表达 cFb 标记且分泌 ECM, 同时通过体外胶原收缩实验证实 cFb 胶原收缩方式与 Fb 相同; 由此推测大面积烧伤患者创缘正常组织 Fb 迁移至烧伤创面受阻, 其愈合可能部分归功于 cFb 分化、迁移入创面^[29]。

4 展望

Fb 是创面修复中的重要细胞, 而 cFb 作为 Fb 的前体细胞, 一方面通过自身分泌丰富的炎症因子、ECM、趋化因子、生长因子、抗原呈递分子等, 在创面修复各个环节发挥效应; 另一方面通过迁移募集至创伤部位并分化为 Fb 和肌 Fb 参与创面修复。然而, 涉及多细胞、多因子、多信号通路的创面修复过程尤为复杂, cFb 在创面修复的各个环节具体如何发挥效应, 其调控机制、信号途径、影响因素等方面尚需研究。进一步阐明以上问题, 有利于将 cFb 合理应用于临床, 成为创面修复的一种新的治疗手段。

参考文献

- [1] 陆树良. 加强创面修复专科的内涵建设[J]. 中华烧伤杂志, 2012, 28(1): 1-2. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2012.01.001
- [2] Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, et al. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair [J]. Mol Med, 1994, 1(1): 71-81.

- [3] Kao HK, Chen B, Murphy GF, et al. Peripheral blood fibrocytes; enhancement of wound healing by cell proliferation, re-epithelialization, contraction, and angiogenesis [J]. *Ann Surg*, 2011, 254 (6):1066-1074. DOI: 10.1097/SLA.0b013e318-2251559.
- [4] Suga H, Rennert RC, Rodrigues M, et al. Tracking the elusive fibrocyte: identification and characterization of collagen-producing hematopoietic lineage cells during murine wound healing [J]. *Stem Cells*, 2014, 32 (5):1347-1360. DOI: 10.1002/stem.1648.
- [5] Fan X, Liang HP. Circulating fibrocytes: a potent cell population in antigen-presenting and wound healing [J]. *Chin J Traumatol*, 2010, 13 (2):111-116. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1008-1275.2010.02.010.
- [6] Bellini A, Marini MA, Bianchetti L, et al. Interleukin (IL)-4, IL-13, and IL-17A differentially affect the profibrotic and proinflammatory functions of fibrocytes from asthmatic patients [J]. *Mucosal Immunol*, 2012, 5 (2):140-149. DOI: 10.1038/mi.2011.60.
- [7] Smadja DM, Dorfmueller P, Guerin CL, et al. Cooperation between human fibrocytes and endothelial colony-forming cells increases angiogenesis via the CXCR4 pathway [J]. *Thromb Haemost*, 2014, 112 (5):1002-1013. DOI: 10.1160/TH13-08-0711.
- [8] Kisseleva T, von Köckritz-Blickwede M, Reichart D, et al. Fibrocyte-like cells recruited to the spleen support innate and adaptive immune responses to acute injury or infection [J]. *J Mol Med*, 2011, 89 (10):997-1013. DOI: 10.1007/s00109-011-0756-0.
- [9] Bianchetti L, Barczyk M, Cardoso J, et al. Extracellular matrix remodelling properties of human fibrocytes [J]. *J Cell Mol Med*, 2012, 16 (3):483-495. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2011.01344.x.
- [10] Garcia-de-Alba C, Becerril C, Ruiz V, et al. Expression of matrix metalloproteases by fibrocytes; possible role in migration and homing [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 182 (9):1144-1152. DOI: 10.1164/rccm.201001-0028OC.
- [11] Galligan CL, Fish EN. The role of circulating fibrocytes in inflammation and autoimmunity [J]. *J Leukoc Biol*, 2013, 93 (1):45-50. DOI: 10.1189/jlb.0712365.
- [12] Dupin I, Allard B, Ozier A, et al. Blood fibrocytes are recruited during acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease through a CXCR4-dependent pathway [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 137 (4):1036-1042. DOI: 10.1016/j.jaci.2015.08.043.
- [13] Tang X, Peng R, Phillips JE, et al. Assessment of Brd4 inhibition in idiopathic pulmonary fibrosis lung fibroblasts and in vivo models of lung fibrosis [J]. *Am J Pathol*, 2013, 183 (2):470-479. DOI: 10.1016/j.ajpath.2013.04.020.
- [14] 尹翔, 郭晓纳. 骨髓来源的循环纤维细胞及其与心肌纤维化的关系 [J]. *中华心血管病杂志*, 2012, 40 (6):539-542. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3758.2012.06.019.
- [15] Fu XY, Zhang DW, Li YD, et al. Curcumin treatment suppresses CCR7 expression and the differentiation and migration of human circulating fibrocytes [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35 (2):489-498. DOI: 10.1159/000369714.
- [16] Suga H, Rennert RC, Rodrigues M, et al. Tracking the elusive fibrocyte: identification and characterization of collagen-producing hematopoietic lineage cells during murine wound healing [J]. *Stem Cells*, 2014, 32 (5):1347-1360. DOI: 10.1002/stem.1648.
- [17] Andersson-Sjöland A, Nihlberg K, Eriksson L, et al. Fibrocytes and the tissue niche in lung repair [J]. *Respir Res*, 2011, 12:76. DOI: 10.1186/1465-9921-12-76.
- [18] Choi YH, Burdick MD, Strieter RM. Human circulating fibrocytes have the capacity to differentiate osteoblasts and chondrocytes [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42 (5):662-671. DOI: 10.1016/j.biocel.2009.12.011.
- [19] Li J, Tan H, Wang X, et al. Circulating fibrocytes stabilize blood vessels during angiogenesis in a paracrine manner [J]. *Am J Pathol*, 2014, 184 (2):556-571. DOI: 10.1016/j.ajpath.2013.10.021.
- [20] Iqbal SA, Sidgwick GP, Bayat A. Identification of fibrocytes from mesenchymal stem cells in keloid tissue; a potential source of abnormal fibroblasts in keloid scarring [J]. *Arch Dermatol Res*, 2012, 304 (8):665-671. DOI: 10.1007/s00403-012-1225-5.
- [21] Herzog EL, Bucala R. Fibrocytes in health and disease [J]. *Exp Hematol*, 2010, 38 (7):548-556. DOI: 10.1016/j.exphem.2010.03.004.
- [22] Xie X, Zhu L, Fu Z, et al. Low molecular weight heparin inhibits circulating fibrocytes differentiation by modulating neuronal nitric oxide synthase and TGF- β 1/Smad pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2012, 30 (6):1465-1472. DOI: 10.1159/000-343334.
- [23] Jin SY, Choi JS, Choi YL, et al. Identification of leukocyte-specific protein 1-positive cells: a clue to the cell of origin and a marker for the diagnosis of dermatofibroma [J]. *Ann Dermatol*, 2015, 27 (2):157-162. DOI: 10.5021/ad.2015.27.2.157.
- [24] White MJ, Galvis-Carvajal E, Gomer RH. A brief exposure to trypsin or thrombin potentiates fibrocyte differentiation in the presence of serum or serum amyloid p [J]. *J Immunol*, 2015, 194 (1):142-150. DOI:10.4049/jimmunol.1401777.
- [25] Geiger A, Walker A, Nissen E. Human fibrocyte-derived exosomes accelerate wound healing in genetically diabetic mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 467 (2):303-309. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.09.166.
- [26] Talmadge JE, Gabrilovich DI. History of myeloid-derived suppressor cells [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13 (10):739-752. DOI: 10.1038/nrc3581.
- [27] Ou L, Shi Y, Dong W, et al. Kruppel-like factor KLF4 facilitates cutaneous wound healing by promoting fibrocyte generation from myeloid-derived suppressor cells [J]. *J Invest Dermatol*, 2015, 135 (5):1425-1434. DOI: 10.1038/jid.2015.3.
- [28] Medina A, Ma Z, Varkey M, et al. Fibrocytes participate in the development of heterotopic ossification [J]. *J Burn Care Res*, 2015, 36 (3):394-404. DOI: 10.1097/BCR.0000000000-000102.
- [29] Mathangi Ramakrishnan K, Meenakshi Janakiraman M, Babu M. Expression of fibrocyte markers by keloid fibroblasts; an insight into fibrosis during burn wound healing -- a preliminary study [J]. *Ann Burns Fire Disasters*, 2012, 25 (3):148-151.

(收稿日期:2016-07-07)

(本文编辑:程林)

本文引用格式

解英, 汪虹, 张伟, 等. 循环成纤维细胞在创面修复中的作用研究进展 [J]. *中华烧伤杂志*, 2017, 33 (8): 520-522. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2017.08.018.

Xie Y, Wang H, Zhang W, et al. Advances in the research of effects of circulating fibroblasts on wound repair [J]. *Chin J Burns*, 2017, 33 (8): 520-522. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2017.08.018.