

• 实验研究 •

Wnt/β-catenin 信号通路及骨髓间充质干细胞源性外泌体在温和灸联合骨髓间充质干细胞移植促进大鼠肛门括约肌修复中的作用 *

金文琪, 李 鹏, 周蒙恩, 朱 影, 郭修田[△]

(上海中医药大学附属市中医医院肛肠外科, 上海 200071)

摘要: 目的 基于前期研究证实温和灸联合骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)移植可协同促进大鼠损伤肛门括约肌结构和功能修复的基础, 探索协同修复效果是涉及 Wnt/β-catenin 通路, 及 BMSC 源性外泌体对 C2C12 成肌细胞的影响。方法 将 16 只 SD 大鼠随机等分 4 组, 所有大鼠均采用 Zutshi 大鼠肛门括约肌复合体损伤模型, 造模成功后分别采用温和灸 30 min、BMSC 移植及生理盐水治疗, 连续 14 d。治疗结束后剥离肛门括约肌后采用 q PCR 和 Western blot 检测组间 Wnt4、Wnt5a、Wnt5b 蛋白表达差异。将 BMSC 源性外泌体与小鼠成肌细胞 C2C12 共培养后采用 EDU 及 CCK8 检测 BMSC 外泌体对 C2C12 细胞增殖作用, 探索不同浓度外泌体对 BMSC 增殖的差异。流式细胞术检测 BMSC 源性外泌体对 C2C12 细胞周期的影响。结果 免疫印迹和 qPCR 分析结果提示温和灸联合 BMSC 移植可促进 Wnt4、Wnt5A、Wnt5B 高表达。CCK8 结果显示 BMSC 源性外泌体可促进 C2C12 细胞的增殖, 在浓度为 25 μg/mL 时疗效最佳。共培养结果显示 BMSC 源性外泌体可抑制 Cleaved Caspase3 和 BAX 表达, 并显著上调 BCL2 表达。结论 温和灸联合 BMSC 移植可促进 Wnt4、Wnt5A、Wnt5B 高表达, BMSC 源性外泌体可调控成肌细胞 C2C12 的细胞周期从而促进增殖并抑制凋亡, 推测温和灸联合 BMSC 移植可能通过激活 Wnt/β-catenin 信号通路促进对大鼠损伤肛门括约肌的修复作用。

关键词: 温和灸; 骨髓间充质干细胞; 外泌体; 肛门括约肌

中图分类号: R245 文献标志码: A 文章编号: 1000-2723(2021)06-0001-08

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2021.06.001

Wnt/β-catenin Signaling Pathway and BMSC-derived Exosomes in Mild Moxibustion Combination Role of BMSC Transplantation in Promoting Anal Sphincter Repair in Rats

JIN Wenqi, LI Peng, ZHOU Mengen, ZHU Ying, GUO Xiutian

(Department of Anorectal Surgery, Shanghai Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine,
Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200071, China)

ABSTRACT: **Objective** Based on the previous study that mild moxibustion combined with BMSC transplantation can synergically promote the repair of the structure and function of the injured anal sphincter in rats, further explore the effect of the synergistic repair involves the Wnt/β-catenin pathway and the effect of BMSC-derived exosomes on C2C12 myoblasts. **Methods** Sixteen SD rats were randomly divided into 4 groups. All rats were treated with Zutshi rat anal sphincter complex injury model. After modeling, they were treated with mild moxibustion for 30min, BMSC transplantation and normal saline for 14 days. After treatment, the anal sphincter was stripped and the protein expression of Wnt4, Wnt5a and Wnt5b was detected by qPCR and Western blot. After co-culture of BMSC-derived exosomes with mouse myoblasts C2C12, EDU and CCK8 were used to detect the proliferation effect of BMSC exosomes on C2C12 cells, and to explore the difference of BMSC

收稿日期: 2021-08-19

* 基金项目: 上海市卫生和计划生育委员会基金(20174Y0018); 国家自然科学基金(81804110)

第一作者简介: 金文琪(1987-), 男, 主治医师, 研究方向: 干细胞对创面修复的研究。

△通信作者: 郭修田, E-mail:15601880951@163.com

proliferation with different concentrations of exosomes. Flow cytometry was used to detect the effect of BMSC exosomes on C2C12 cell cycle. **Results** Western blot and qPCR analysis showed that mild moxibustion combined with BMSC transplantation could promote the high expression of Wnt4, Wnt5A and Wnt5B. CCK8 results showed that BMSC-derived exosomes could promote the proliferation of C2C12 cells, and the optimal concentration was 25 μ g/mL. Co-culture results showed that Cleaved Caspase3 and BAX expression were inhibited by BMSC-derived exosomes, and BCL2 expression was significantly up-regulated. **Conclusion** Mild moxibustion combined with BMSC transplantation can promote the high expression of Wnt4, Wnt5A and Wnt5B, and BBMSC exosomes can regulate the cell cycle of myoblast C2C12 to promote proliferation and inhibit apoptosis. It is speculated that mild moxibustion combined with BMSC transplantation may promote the repair effect of injured anal sphincter in rats by activating Wnt/ β -catenin signaling pathway.

KEY WORDS: mild moxibustion; bone marrow mesenchymal stem cell; exosome; anal sphincter

肛门失禁(anal incontinence)是指有机体由于各种原因引起的不能随意液体或固体粪便排出,严重影响患者生活质量的一种难治性疾病^[1-3]。导致肛门失禁的原因可分为神经源性损伤和肌源性损伤,肌源性损伤在日常生活中更为常见,肛门括约肌损伤为其中最普遍的一种^[4]。生理学认为肛门括约肌由内外两层环形的括约肌构成,两者共同协调维持肛管的闭合功能^[5]。属不随意肌的内括约肌产生的压力占肛管静息压的 70%~80%,以维持肛管在静息状态的闭合功能,属随意肌的外括约肌可在外界条件不允许排便的情况下收缩以闭合肛门^[6]。因此,任何一种括约肌的损伤均会导致大便失禁。

针对肛门括约肌损伤,间充质干细胞移植可能是修复括约肌损伤最有前景的方法之一^[7-9]。间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)为成体干细胞亚组,其不仅可以分化为内皮细胞、上皮细胞、角化细胞、成纤维样细胞等,还可通过旁分泌机制分泌一些生物活性因子或外泌体以促进内源性细胞的增殖与迁移,从而协同促进创面血管新生,上皮再生与创面重塑,最终达到创面修复的目的^[10-13]。近期研究表明, MSC 旁分泌是其发挥作用的重要方式^[14-18]。其中最受关注的是可溶性蛋白分泌和细胞外膜泡(EVS),MSC 可以通过释放胞外膜泡(EVS)影响局部微环境中其它细胞的活动^[19-21]。外泌体属于细胞外泌微泡的亚型,其膜性结构主要起源于细胞内膜,直径为介于 30~150 nm,广泛存在于几乎所有组织,细胞间隙和体液中,在细胞与细胞间信息交流和机制调控中起到重要作用。目前研究发现,外泌体主要通过其膜上和膜内物质发挥作用,间充质干细胞来源的外泌体在关节损伤修复,组织再生,创伤修复等方面发挥关键作用^[22]。BMSC 作为 MSC 中众多分类中的一种,因其分

化程度较低,更接近原始干细胞而受到广泛青睐。

温和灸属于艾卷灸之悬起灸的一种,是将艾条燃着的一端与施灸部位的皮肤保持 1 寸左右距离,使患者有温热而无灼痛的一种方法^[23]。目前研究发现,温和灸可以促进混合痔术后的组织修复,缓解术后疼痛和肛门水肿,促进创面愈合^[24-25]。在大鼠肛门括约肌损伤模型中,笔者发现温和灸可以促进间充质干细胞的归巢效应进而介导肛门括约肌的修复,并发现在移植间充质干细胞来源的外泌体后,相比于单纯手术组,损伤组织中的 Wnt 信号显著激活,从而明确了间充质干细胞通过分泌外泌体促进了肌细胞的增殖和肛门括约肌组织的修复。

1 材料与方法

1.1 实验材料和试剂 健康 Sprague-Dawley 雌性大鼠 16 只,年龄约 12 周,体质量 200~250 g,SPF 级,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供 [许可证号: SCXK(沪)2012-0002],饲养温度 25°C,湿度 50%。大鼠适应性喂养 1 周后用于本实验,在整个实验过程中严格遵守上海中医药大学附属市中医医院动物伦理委员会标准条例。艾条购自上海市针灸经络研究生经营部,为福元牌 7 mm 无烟艾条。Real-Time PCR 材料:引物合成购自上海生工生物工程公司;RNA 提取液 TRIzol 购自 Invitrogen 公司;PrimeScript RT Kit With gDNA Eraser(Perfect Real Time)试剂盒,SYBR Premix Ex Tag II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒购自 TaKaRa 公司。SD 大鼠间充质干细胞和小鼠间充质干细胞培养与鉴定材料:胰蛋白酶,胎牛血清购自 Gibco 公司;BD Falcon 细胞筛,抗 CD34、CD45 单克隆抗体购自 BD 公司。免疫印迹材料:兔抗 Wnt4,兔抗 Wnt5a,兔抗 Wnt5b,兔抗 DKK3 购买自 Abcam,细胞裂解液 RIPA 购买自 Solarbio。外泌体抽提试剂盒

exoEasy Maxi Kit 购自 UL。

1.2 实验分组与模型建立 将 16 只 SD 大鼠随机等分为温和灸组, 干细胞组, 温和灸联合干细胞组、生理盐水组, 每组 4 只。肛周备皮后所有大鼠均采用 Zutshi 提出的大鼠肛门括约肌复合体损伤模型: 腹腔内注射水合氯醛(300 mg/kg)麻醉大鼠, 在解剖显微镜下进行后位纵行切除 $3\text{ mm} \times 1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ 肛门括约肌复合体。术后用布比卡因(0.5 mg/kg)注射镇痛, 每天 2 次, 共 1 d。

1.3 BMSC 分离、培养及鉴定 处死大鼠后取股骨, 0.01 mol/L PBS 冲洗干净后采用细胞滤膜筛选细胞, 加入 1 mL 0.25% 胰酶置于 37 °C 消化; 显微镜下观察细胞出现收缩时弃去胰酶, 更换 1 mL DMEM-10% FBS 培养基吹打细胞 20 次, 按 1:2 比例传代, 加入新鲜 DMEM-10% FBS 培养基置于 37 °C 二氧化碳培养箱中培养; $200 \times g$ 离心细胞悬液 5 min, 获取沉淀以适当体积 0.01 mol/L PBS 缓冲液重悬至移植所需的细胞密度。流式细胞仪采用阴性选择法进行鉴定, 取第三代生长状态良好细胞, 0.25% 胰酶消化, 4 °C 离心, 1 000 r/min, 5 min, 用 1× PBS(含 1% BSA)清洗细胞 3 次, 计数细胞, 加入单克隆抗体 CD34、CD45。同时每管样品设立同型阴性对照。

1.4 治疗方式 温和灸治疗: 在距肛门约 5 cm 处进行温和灸, 每日 1 次, 每次 30 min。干细胞治疗: 采用尾静脉注射干细胞 0.1 mL PBS/次(含 107 个干细胞), 每日 1 次。生理盐水注射: 采用尾静脉注射 0.1 mL 生理盐水, 每日 1 次。所有大鼠均连续进行 14 d。

1.5 检测括约肌组织 Wnt4、Wnt5a、Wnt5b 表达 分别采用 Western blot、qPCR 检测蛋白表达。Western blot 步骤: 提取组织蛋白, 配置 SDS-PAGE 膜, 转膜, TBST 漂洗 1 h, 5% BSA 封闭 2 h, 加入一抗(1 μL 兔抗 Wnt4, 1 μL 兔抗 Wnt5a, 1 μL 兔抗 Wnt5b), 4 °C 过夜, TBST 漂洗 1 h, 二抗孵育封, TBST 漂洗 1 h, 显影。qPCR 步骤: 采用按试剂盒说明书用 q PCR 方法检测括约肌细胞内 Wnt4、Wnt5a、Wnt5b mRNA 表达。每个样品的定量进行 3 次重复, 相对 mRNA 水平用 actin 为内参采用 $\Delta\Delta CT$ 值算法。

1.6 BMSC 源性外泌体分离 待培养的 BMSC 细胞融合度接近 70%, 去培养基, 无血清培养 48 h, 收集

上清, 利用外泌体抽提试剂盒 exoEasy Maxi Kit(QIAGEN)进行分离提取, 提取后电镜鉴定, CD63/CD81 检测, BCA 试剂盒定量。

1.7 成肌细胞 C2C12 与外泌体共培养及功能检测 将 C2C12 细胞与 5 μg/mL、25 μg/mL、50 μg/mL 的外泌体共培养 48 h, 利用 CCK8 和 EDU 试剂盒(Ribobio)检测细胞增殖, 利用流式细胞仪检测 C2C12 的细胞周期和凋亡。

2 结果

2.1 BMSC 生长与形态特征 采用倒置相差显微镜观察分离的细胞, 结果发现其符合大鼠骨髓间充质干细胞的形态特征: 细胞贴壁生长, 呈长梭形; 早期呈多个散在的细胞集落, 此为均匀分布的 BMSC 簇状增殖灶, 细胞排列呈似漩涡状; 生长期细胞增殖良好, 排列紧密(图 1)。

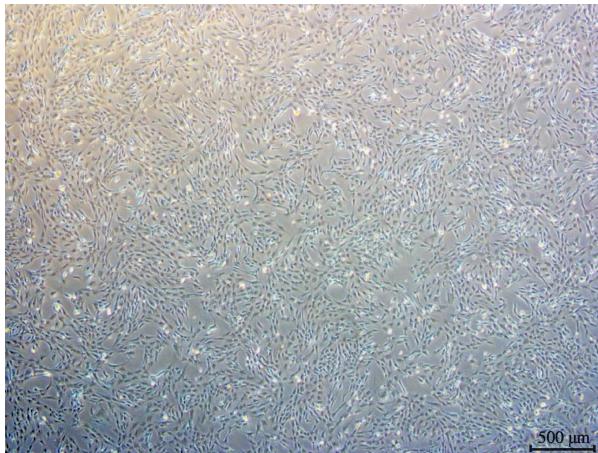


图 1 间充质干细胞形态特征

2.2 Western blot 和 qPCR 检测 Wnt4、Wnt5A、Wnt5B 蛋白表达 Wnt/β-catenin 信号通路在组织损伤与修复机制中作用显著。在前期温和灸联合间充质干细胞移植可协同促进大鼠损伤肛门括约肌结构和功能恢复的基础上, 为进一步探索此种协同修复效果是否与 Wnt/β-catenin 信号通路相关, 在治疗 14 d 后剥离各组大鼠肛门括约肌, 进行 qPCR 和 Western blot 检测各组肛门括约肌组织中 wnt 蛋白的表达差异, 结果显示温和灸联合 BMSCs 移植可促进 Wnt4、Wnt5A、Wnt5B 高表达(图 2A,B)。因此, 温和灸联合间充质干细胞可能通过激活 Wnt/β-catenin 信号通路从而促进对损伤肛门括约肌组织的修复作用。

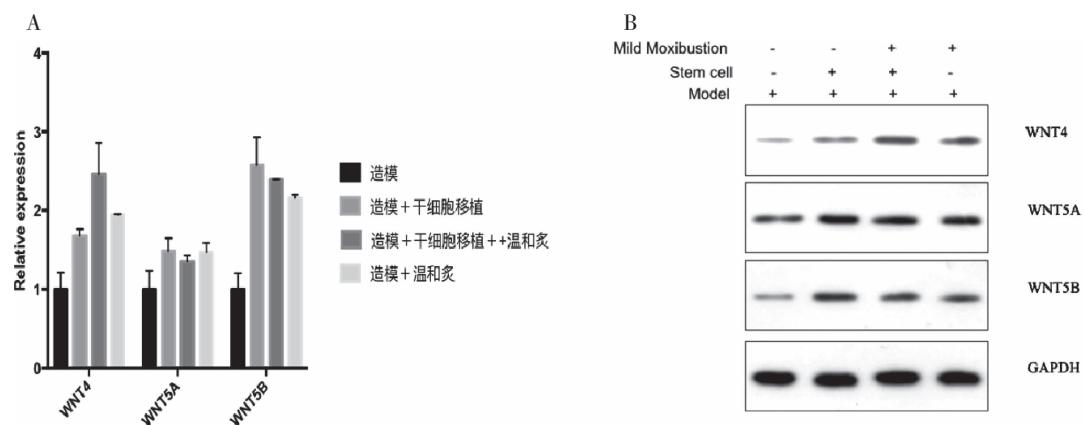


图 2 A. qPCR 分析各组样本中 WNT4, WNT5A, WNT5B RNA 表达
B. Western blot 分析各组样本中 WNT4, WNT5A, WNT5B 蛋白的表达

2.3 BMSC 源性外泌体鉴定 为分析及验证所抽提外泌体质量及性状,采用扫描电镜分析 BMSC 源性外泌体形态及直径,结果显示 BMSC 源性外泌体粒径分布在 80~140 nm, 符合外泌体粒径特征(图 3A);

Western blot 检测外泌体表面标记蛋白 CD63 和 CD81 呈显著富集;符合外泌体膜表面蛋白标记特征(图 3B)。根据上述结果可证实富集到的是骨髓间充质干细胞源性外泌体。

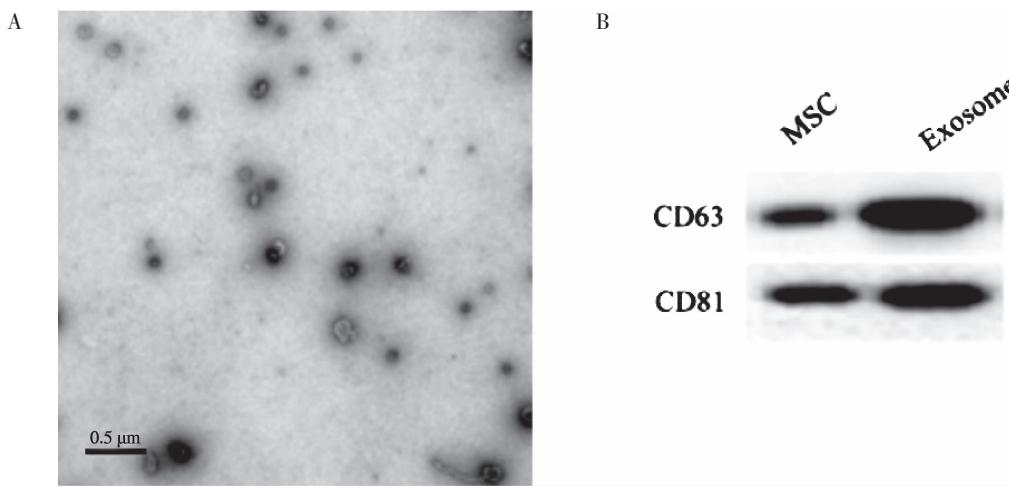


图 3 A. 扫描电镜分析外泌体形态及粒径; B. Western blot 分析间充质干细胞和外泌体中 CD63 和 CD81 表达

2.4 成肌细胞 C2C12 与外泌体共培养及功能检测 EDU 结果显示在 25 μg/mL 的 BMSC 源性外泌体作用下 C2C12 细胞处于细胞分裂期的数量显著上升(图 4A,B)。采用 CCK8 检测 BMSC 源性外泌体对小鼠成肌细胞 C2C12 增殖的作用,结果显示 BMSC 源性外泌体可显著促进 C2C12 细胞增殖,增殖效果随着外泌体浓度增加而逐步提升(图 4 C)。为进一步明确作用机制,将 BMSC 源性外泌体与 C2C12 细胞共培养,Western blot 结果显示可显著抑制 Cleaved

Caspase3 和 BAX 表达,并显著上调 BCL2 表达(图 4 D)。证实 BMSC 源性外泌体可促进 C2C12 成肌细胞的增殖并抑制其凋亡。为进一步分析 BMSC 源性外泌体对 C2C12 细胞周期及凋亡的影响,流式细胞术检测发现 BMSC 源性外泌体可显著促进 C2C12 细胞 S 期和 G2 期(图 5A,B)。与对照组相比,BMSC 源性外泌体可以显著抑制 C2C12 细胞凋亡(图 5C-D)。因此,间充质干细胞源性外泌体可能通过调控 C2C12 细胞周期以促进增殖并抑制其凋亡作用。

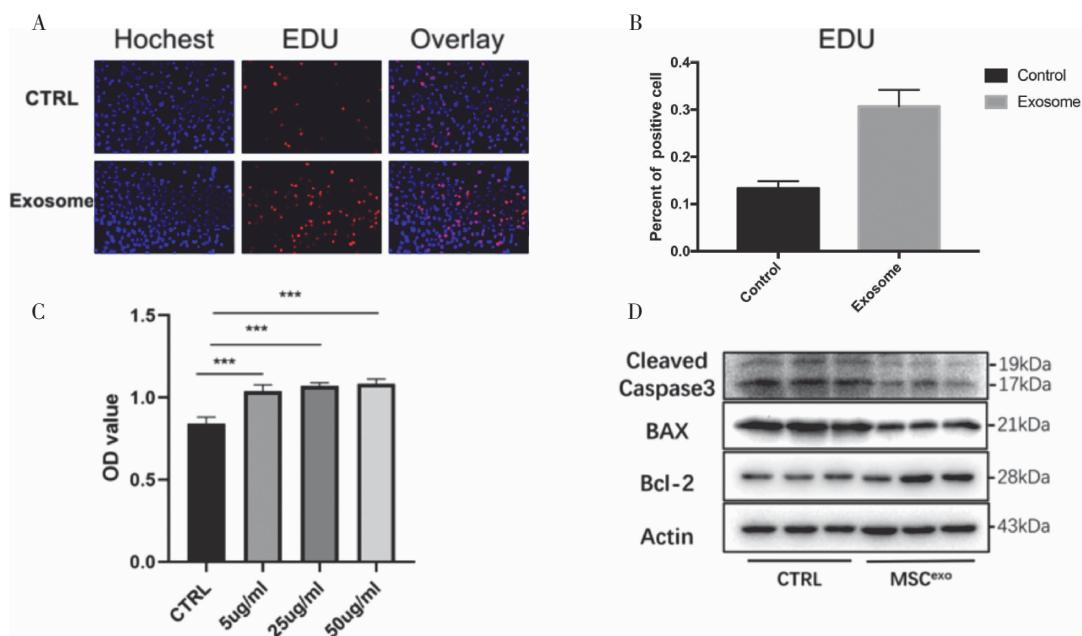


图4 A-B. EDU 检测间充质干细胞来源外泌体对 C2C12 细胞增殖的促进作用; C. CCK8 分析不同浓度间充质干细胞来源外泌体对 C2C12 细胞增殖的促进作用; D. Western blot 分析间充质来源外泌体对凋亡抑制蛋白 Bcl-2, 凋亡促进蛋白 BAX 和 Cleaved Caspase3 的表达影响

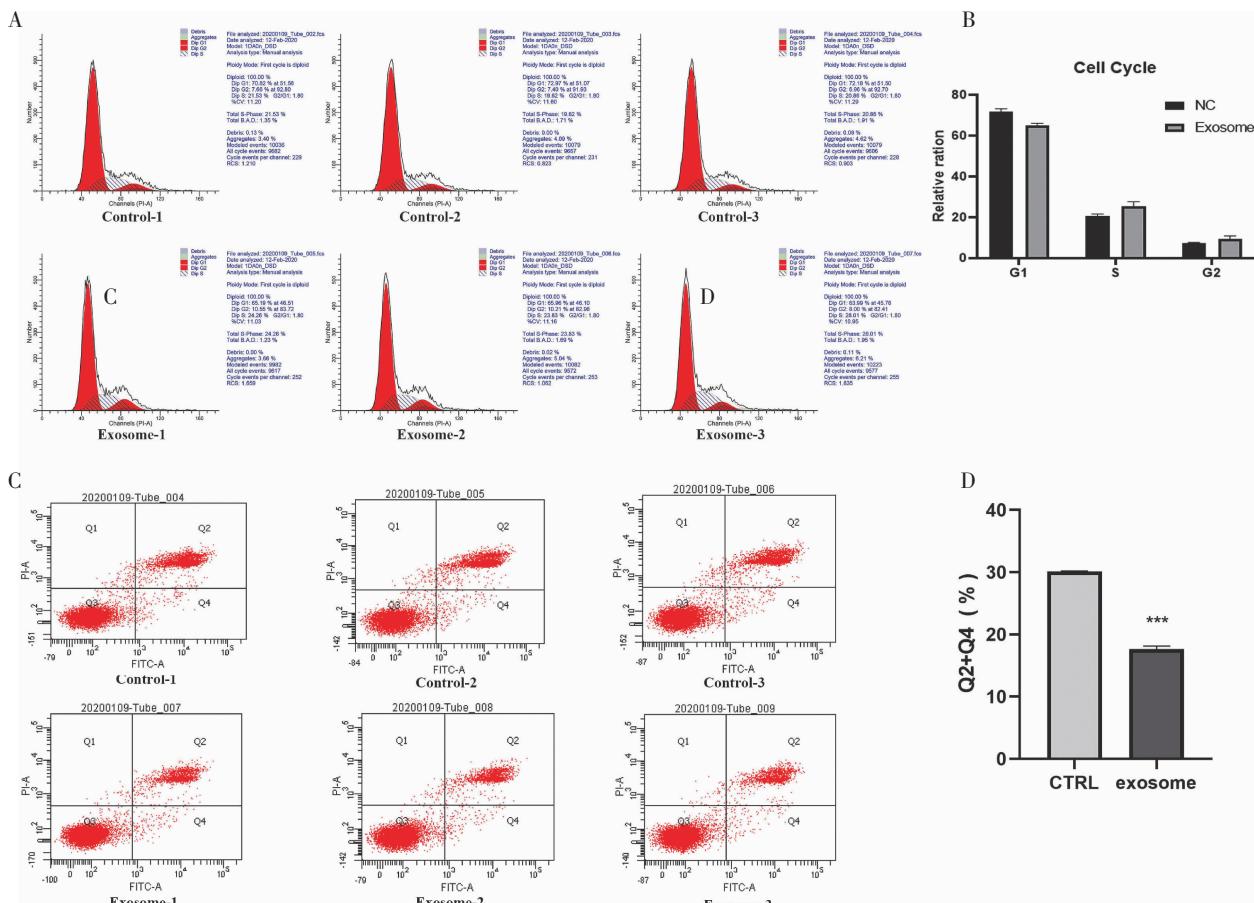


图5 A-B. 间充质干细胞来源外泌体对 C2C12 细胞周期的影响;
C-D. 间充质干细胞来源外泌体对 C2C12 细胞凋亡的影响

3 讨论

干细胞具有增殖及多向分化潜能,强大的旁分泌机制,在组织工程学领域研究广泛。许多研究证实BMSC移植可促进不同组织的修复与再生,从而改善损伤组织的功能^[26-30]。随着越来越多干细胞修复组织的基础实验的涌现,许多结直肠外科医师也将其应用于损伤肛门括约肌的修复中,采用不同的大鼠肛门括约肌损伤模型,不同的细胞移植方式,企图寻找一种最适于括约肌修复的移植方法。Salcedo等^[31]首次建立大鼠损伤肛门括约肌模型,将BMSC移植后检测大鼠肛门括约肌组织修复情况,发现干细胞移植可显著促进大鼠损伤的肛门括约肌组织结构的恢复。Trébol等^[32]独创一种最新的大鼠肛门括约肌损伤模型,并采用与之前干细胞移植不同的方法——生物缝合技术,也发现生物缝合技术能够安全有效的促进肛门括约肌的修复。Bisson等^[33]将同系的成肌细胞注射在冷冻损伤的大鼠括约肌内及损伤边缘,发现成肌细胞可分化为成熟肌纤维,在60 d后肛压可显著增高并与正常组无显著差异,并发现注射在创面边缘与创面中心效果相同。干细胞移植可作为一种微创的治疗方式用于损伤肛门括约肌组织的修复。

温和灸不仅在临床研究中疗效显著,在很多基础实验也表现出极大的优势。基础实验研究证实在大鼠慢性难愈性创面的局部及双侧肾俞、足三里施以温和灸治疗后,创面修复初期和中期可增加肉芽组织中VEGF的表达,从而促进血管新生,改善创面血流,在修复后期可抑制血管新生,缩短创面愈合时间,提高愈合质量^[34]。在创面修复的初期与中期,温和灸还可提高创面的巨噬细胞数,平衡胶原产生与降解,调节创面I、Ⅲ型胶原含量的比例,防止瘢痕形成,提高创面愈合质量^[35]。温和灸可显著改善大鼠肛瘘术后感染性创面局部微循环,有效调控创面VEGF及CD34的表达,加速创面愈合^[36]。因此,温和灸以其“以温促通”的功效可促进创面修复。因此,前期研究将温和灸与骨髓间充质干细胞移植联合应用于大鼠损伤肛门括约肌,发现两者具有协同作用,可显著促进大鼠肛门括约肌组织结构和功能的统一恢复^[37]。

Wnt/β-catenin信号通路在组织的稳态及发生发展过程中至关重要^[38],Wnt蛋白在胚胎发育及成体组织中是一类可调节干细胞自我更新、分化及细胞间交

流的分泌型蛋白,它可促进上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞等创面细胞的增殖、凋亡、分化等多种生物学过程,许多关于干细胞对创面修复的研究认为这种恢复效果均是通过不同的Wnt蛋白以激活Wnt经典通路从而发挥作用的^[39-40]。成肌细胞在缺乏β-catenin时会导致延迟分化,而在具有持续活化的β-catenin时可停止生长并产生分化,证实Wnt/β-catenin信号通路在肌源性干细胞向骨骼肌分化过程中起重要作用^[41]。骨髓间充质干细胞已被证实可促进组织修复及再生,但是目前仍不清楚它是如何调节下游的Wnt信号的。不仅如此,研究证实大量wnt配体在组织急性损伤后高表达,包括wnt3a、wnt4、wnt5a、wnt10a、wnt11^[42]。

前期研究证实温和灸可促进间充质干细胞的归巢,温和灸联合骨髓间充质干细胞移植对括约肌结构和功能的恢复具有协同作用。但这种联合方式的疗效通过激活何种信号通路发挥疗效仍未可知。因此,本文主要探索温和灸联合骨髓间充质干细胞移植是否通过调节3种Wnt相关蛋白(Wnt4、Wnt5A、Wnt5B)中的一种或多种以激活Wnt/β-catenin信号通路从而发挥对大鼠损伤肛门括约肌的修复效果。创面成肌细胞为肌肉损伤修复过程中的关键细胞,为进一步明确骨髓间充质干细胞外泌体创面成肌细胞的作用,因此采用体外研究BMSC源性外泌体对成肌细胞C2C12的影响,证实可调控C2C12细胞周期,促进其增殖,抑制凋亡。

4 结论

综上所述,温和灸联合间充质干细胞移植可能通过两方面促进大鼠损伤肛门括约肌组织修复。一方面可能通过激活Wnt/β-catenin信号通路以发挥修复效果,另一方面可能通过调控成肌细胞C2C12的细胞周期促进其增殖并抑制凋亡从而促进局部肌组织细胞的再生、增殖促进组织修复。

参考文献:

- [1] MADOFF R D, PARKER S C, VARMA M G, et al. Faecal incontinence in adults[J]. Lancet, 2004, 364 (9434): 621-632.
- [2] KAMM M A. Faecal incontinence[J]. BMJ, 1998, 316 (7130): 528-532.

- [3] VAIZEY C J,CARAPETI E,CAHILL J A,et al. Prospective comparison of faecal incontinence grading systems[J]. Gut,1999,44(1):77–80.
- [4] ABERCROMBIE J F,ROGERS J,SWASH M. Faecal incontinence in myotonic dystrophy[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry,1998,64(1):128–130.
- [5] OH C,KARK A E. Anatomy of the external anal sphincter [J]. Br J Surg,1972,59(9):717–723.
- [6] SANGWAN Y P,SOLLA J A. Internal anal sphincter:advances and insights[J]. Dis Colon Rectum,1998,41(10):1297–1311.
- [7] TRÉBOL J,CARABIAS –ORGAZ A,GARCÍA –ARRANZ M,et al. Stem cell therapy for faecal incontinence:current state and future perspectives[J]. World J Stem Cells,2018,10(7):82–105.
- [8] LI X J,GUO X T,JIN W Q,et al. Effects of electroacupuncture combined with stem cell transplantation on anal sphincter injury–induced faecal incontinence in a rat model[J]. Acupunct Med,2018,36(4):254–260.
- [9] PARK E J,KANG J,BAIK S H,et al. Treatment of faecal incontinence using allogeneic–adipose–derived mesenchymal stem cells:a study protocol for a pilot randomised controlled trial[J]. BMJ Open,2016,6(2):e010450.
- [10] WEIBO Z B,WALBOOMERS X F,SHI S T,et al. Multi-lineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation[J]. Tissue Eng,2006,12(10):2813–2823.
- [11] GIMBLE J M,GUILAK F,NUTTALL M E,et al. In vitro differentiation potential of mesenchymal stem cells [J]. Transfus Med Hemother,2008,35(3):228–238.
- [12] YAGI H,SOTO –GUTIERREZ A,PAREKKADAN B,et al. Mesenchymal stem cells:Mechanisms of immunomodulation and homing[J]. Cell Transplant, 2010, 19 (6): 667–679.
- [13] CHAMBERLAIN G,FOX J,ASHTON B,et al. Concise review:mesenchymal stem cells;their phenotype,differentiation capacity,immunological features,and potential for homing[J]. Stem Cells,2007,25(11):2739–2749.
- [14] SZE S K,DE KLEIJN D P,LAI R C,et al. Elucidating the secretion proteome of human embryonic stem cell–derived mesenchymal stem cells[J]. Mol Cell Proteomics, 2007,6(10):1680–1689.
- [15] HOU J F,ZHANG H,YUAN X,et al. In vitro effects of low-level laser irradiation for bone marrow mesenchymal stem cells:proliferation,growth factors secretion and myogenic differentiation [J]. Lasers Surg Med,2008,40 (10):726–733.
- [16] HOCKING A M,GIBRAN N S. Mesenchymal stem cells:paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair[J]. Exp Cell Res, 2010, 316 (14):2213–2219.
- [17] LEE J W,FANG X H,KRASNODEMSKAYA A,et al. Concise review:mesenchymal stem cells for acute lung injury: role of paracrine soluble factors[J]. Stem Cells, 2011,29(6):913–919.
- [18] BARANIAK P R,MCDEVITT T C. Stem cell paracrine actions and tissue regeneration[J]. Regen Med,2010,5 (1):121–143.
- [19] RIAZIFAR M,PONE E J,LÖTVALL J,et al. Stem cell extracellular vesicles:extended messages of regeneration [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol,2017,57:125–154.
- [20] EIRIN A,RIESTER S M,ZHU X Y,et al. MicroRNA and mRNA cargo of extracellular vesicles from porcine adipose tissue–derived mesenchymal stem cells[J]. Gene, 2014,551(1):55–64.
- [21] LAI R C,ARSLAN F,LEE M M,et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. Stem Cell Res,2010,4(3):214–222.
- [22] YU B,ZHANG X M,LI X R. Exosomes derived from mesenchymal stem cells[J]. Int J Mol Sci,2014,15 (3): 4142–4157.
- [23] 周宇,陈仲杰,王兵,等. 吴中朝温和灸皮肤距离等差推算及应用探析[J]. 中国中医基础医学杂志,2017,23(4): 100–102.
- [24] 孙彦辉,曹永清,郭修田. 温和灸促进混合痔术后组织修复的临床研究[J]. 四川中医,2009,27(11):118–119.
- [25] 周细秋,金文琪,郭修田,等. 温和灸对大鼠肛门括约肌损伤后间充质干细胞移植归巢的影响[J]. 上海中医药大学学报,2014,28(3):90–93.
- [26] LIU Y H,YANG X X,MAUREIRA P,et al. Permanently hypoxic cell culture yields rat bone marrow mesenchymal cells with higher therapeutic potential in the treatment of chronic myocardial infarction[J]. Cell Physiol Biochem, 2017,44(3):1064–1077.
- [27] CHEN S X,SHI J B,ZHANG M,et al. Mesenchymal stem cell–laden anti–inflammatory hydrogel enhances

- diabetic wound healing[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:18104.
- [28] CAI S, TSUI Y P, TAM K W, et al. Directed differentiation of human bone marrow stromal cells to fate-committing Schwann cells [J]. *Stem Cell Reports*, 2017, 9 (4): 1097–1108.
- [29] JIANG X R, HUANG B, YANG H Y, et al. TGF- β 1 is involved in vitamin D-induced chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells by regulating the ERK/JNK pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(6):2230–2241.
- [30] BEREVICHEZ-FRIDMAN R, GÓMEZ-GARCÍA R, GRANADOS-MONTIEL J, et al. The holy grail of orthopedic surgery: mesenchymal stem cells—their current uses and potential applications [J]. *Stem Cells Int*, 2017, 2017:2638305.
- [31] SALCEDO L, DAMASER M, BUTLER R, et al. Long-term effects on pressure and electromyography in a rat model of anal sphincter injury [J]. *Dis Colon Rectum*, 2010, 53(8):1209–1217.
- [32] TRÉBOL J, GEORGIEV-HRISTOV T, VEGA-CLEMENTE L, et al. Rat model of anal sphincter injury and two approaches for stem cell administration [J]. *World J Stem Cells*, 2018, 10(1):1–14.
- [33] BISSON A, FRÉRET M, DROUOT L, et al. Restoration of anal sphincter function after myoblast cell therapy in incontinent rats [J]. *Cell Transplant*, 2015, 24(2):277–286.
- [34] 孙彦辉, 孙永辉, 孙立虹, 等. 温和灸对大鼠慢性难愈性创面组织修复微循环的影响[J]. 针刺研究, 2011, 36(5): 321–326.
- [35] 孙立虹, 梁玉磊, 孙彦辉, 等. 温和灸对大鼠慢性难愈性创面组织巨噬细胞及胶原表达的影响[J]. 针刺研究, 2018, 37(4):259–265.
- [36] 郭修田, 董青军, 曹永清. 温和灸对大鼠肛瘘术后创面组织修复中血管生成及微循环的影响[J]. 中西医结合学报, 2009, 7(12):1154–1158.
- [37] 李鹏, 金文琪, 李小嘉, 等. 温和灸联合间充质干细胞移植对大鼠损伤肛门括约肌功能的修复[J]. 中国中医急症, 2020, 29(12):2087–2091.
- [38] STEINHART Z, ANGERS S. Wnt signaling in development and tissue homeostasis [J]. *Development*, 2018, 145(11):dev146589.
- [39] 王志红, 黄汉, 张斌, 等. 骨髓间充质干细胞促进皮肤创口愈合及Wnt信号通路在愈合过程中的作用[J]. 中国现代医学杂志, 2016, 15(26):56–59.
- [40] 赵亚男, 刘明, 张玥, 等. Wnt信号通路与皮肤创面愈合的关系[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(11):2173–2176.
- [41] RUDOLF A, SCHIRWIS E, GIORANI L, et al. β -catenin activation in muscle progenitor cells regulates tissue repair [J]. *Cell Rep*, 2016, 15(6):1277–1290.
- [42] CARRE A L, HU M S, JAMES A W, et al. β -catenin-dependent Wnt signaling: a pathway in acute cutaneous wounding [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2018, 141(3):669–678.