

Assay of TGF- β and b-FGF on the Potential of Peripheral Blood-Borne Stem Cells and Bone Marrow-Derived Stem Cells In Wound Healing in a Murine Model

Katebi M., Ph.D., Alizadeh A.M.Sc., Mehdizadeh M., Ph.D., Zamani M., M.Sc., Ali Abbasi Moghaddam M., Alipanahzadeh H., M.Sc., Soleiman M., Ph.D.*

** P.O.Box:14496145235, Assistant professor of anatomical sciences, Cellular and molecular center, Tehran University of Medical sciences, Tehran, Iran*

Received: Mar 2011 Accepted: May 2011

Abstract

Purpose: Effects of TGF- β and b-FGF on the Potential of Peripheral Blood-Borne Stem Cells and Bone Marrow-Derived Stem Cells In Wound Healing in a Murine Model

Materials and Methods: Peripheral blood mesenchymal stem cells (PBMSCs) and bone marrow stem cells (BMSCs) cultured in media with transforming growth factor-beta (TGF- β) and basic fibroblast growth factor (b-FGF). Stem cells labeled with PKH26-GL, red fluorescent cell linker compound (Sigma, USA) and injected into tail vein of Models, Migration of cells histologically assayed, RT-PCR assay of collagen type I (COL1A1) transcripts.

Results: Our results show that the synergistic effects of transforming growth factor-beta (TGF- β -sigma) and basic fibroblast growth factor (b-FGF-sigma) lead to a significant increase in migration and recruitment of both PBMSCs and BMSCs to the wound site, with more potent effects on PBMSCs as compared with BMSCs. Reverse transcription polymerase chain reaction of collagen type I (COL1A1) transcripts (348 bp) confirmed that TGF- β and b-FGF activate collagen I (production in marrow stem cells at higher transcription levels), with more vigorous effects of TGF- β on PBMSCs as compared with the same condition on BMSCs.

Conclusion: The growth factors have positive effect in wound healing potential of PBMSCs and BMSCs.

Key Words: PBMSCs, BMSCs, Transforming growth factor; Fibroblast growth factor; Wound healing

بررسی اثر فاکتورهای رشد تغییر شکل دهنده بتا و فاکتور بازی رشد فیبروبلاستی بر قابلیت سلول‌های بنیادی استخراج شده از خون محیطی و مغز استخوان در ترمیم زخم موش

مجید کاتبی Ph.D.*، اکرم علیزاده M.Sc.**، مهدی مهدی‌زاده Ph.D.***، محمد زمانی M.Sc.****،

محمدعلی عباسی مقدم*****، حسن‌علی پناه‌زاده M.Sc.****، منصوره سلیمانی Ph.D.***

* گروه علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، ایران

** گروه مهندسی بافت دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

*** مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی و گروه علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

**** گروه علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

***** دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی تهران، ایران

تاریخ دریافت: اسفند ماه ۸۹، تاریخ پذیرش: خرداد ماه ۹۰

چکیده

هدف: بررسی اثر فاکتورهای رشد $TGF-\beta$ (Transforming growth factor) و $b-FGF$ (basic Fibroblast growth factor) بر قابلیت

سلول‌های بنیادی استخراج شده از خون محیطی و مغز استخوان در ترمیم زخم موش

مواد و روش‌ها: استخراج و کشت سلول‌های بنیادی از خون محیطی و مغز استخوان موش‌های سوری و افزودن فاکتورهای رشد

$(TGF-\beta)$ و $(b-FGF)$ به محیط کشت، علامت‌گذاری سلول‌ها با PKH26-GL و تزریق سلول‌ها به ورید دمی موش‌های مدل زخم

پوست و بررسی مهاجرت به محل زخم توسط میکروسکوپ فلورسنت، ارزیابی رونویسی ژن کلاژن نوع ۱ به روش RT-PCR

(Reverse trans-Polymerase Chain Reaction).

یافته‌ها: یافته‌ها نشان می‌دهد با استفاده از فاکتورهای رشد ذکر شده مهاجرت سلول‌های بنیادی به محل زخم افزایش می‌یابد همچنین

در محل زخم رونویسی ژن کلاژن نوع ۱ در سلول‌های بنیادی استخراج شده از خون محیطی و مغز استخوان موش‌های سوری

افزایش می‌یابد.

نتیجه‌گیری: فاکتورهای رشد بر قابلیت سلول‌های بنیادی استخراج شده از خون محیطی و مغز استخوان در ترمیم زخم موش اثر مثبتی دارند.

کلیدواژه‌ها: سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج شده از خون محیطی و مغز استخوان، فاکتور رشد تغییر شکل دهنده از نوع بتا،

فاکتور بازی رشد فیبروبلاستی، ترمیم زخم

مقدمه

لازم است هرگونه صدمه‌ای به این ارگان در کوتاهترین زمان

پوست اولین و مهمترین سد دفاعی بدن است بنابراین

آدرس مکاتبه: اتوبان همت، پردیس همت دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده

پزشکی، گروه علوم تشریح، صندوق پستی: ۱۴۴۹۶-۱۴۵۲۵

Email: mansourehsoleimani@gmail.com

قدرتمندترین عامل در ترمیم است. همچنین این فاکتور یک تعدیل‌کننده فیبروزنیک (تشکیل بافت همبند) مهم در بدن محسوب می‌شود. فاکتور بازی رشد فیبروبلاستی نیز دیگر فاکتور مهم در ترمیم زخم است [۹-۱۱]. این فاکتور در تنظیم التهاب نیز نقش دارد [۱۲-۱۴]. در ترمیم زخم سیتوکین‌ها و عوامل کموتاکسی و میتوزنیک با اثر روی برخی سلول‌ها مثل سلول‌های اندوتلیال و فیبروبلاست‌ها عمل می‌کنند [۱۵]. نشان داده شده است که فاکتور رشد فیبروبلاستی باعث افزایش پاسخ گلبول‌های سفید خون به سیتوکین‌ها و عوامل کموتاکسی و حضورشان در درم ملتهب می‌شود. البته این اثر محدود به انسان نیست و در موش صحرایی نیز گزارش شده است [۱۶].

همچنین گزارش شده است که تولید بیش از حد فاکتور رشد فیبروبلاستی در مفاصل مبتلا به آرتریت باعث تشدید التهاب می‌شود [۱۷].

با توجه به مطالب ذکر شده در تحقیق حاضر فاکتورهای رشد یاد شده در محیط کشت سلول‌های بنیادی خون محیطی و مغز استخوان اضافه و سپس اثر این سلول‌ها در ترمیم زخم موش ارزیابی و مقایسه شد و تا کنون مطالعه مشابهی انجام نشده است.

مواد و روش‌ها

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی خون محیطی

سلول‌های بنیادی خون محیطی از خون ورید دمی موش‌های سوری به وسیله سانتریفوژ همراه با هیستوپک جداسازی شدند. پس از یک شب کشت در ظروف ۲۴ خانه با تراکم سلولی ۳ میلیون سلول در هر خانه، در محیط کشت DMEM و FBS به میزان ۲۰ درصد، سلول‌های نجسبیده شسته و سایر سلول‌ها به مدت ۷ روز کشت داده شدند. درصد حیات سلولی با رنگ‌آمیزی تریپان بلو بررسی شد. [۱۸]

ممکن برطرف شود. فرایند ترمیم زخم یکی از عملکردهای طبیعی بدن است که در شرایطی مانند برخی بیماری‌ها، جراحی‌ها و صدمات وسیع ناشی از سوختگی‌ها و تصادفات بدن به راحتی قادر به ترمیم پوست نیست که به عنوان مشکل شناخته شده پزشکی مدرن است. استفاده از روش‌های پیشرفته امکان بررسی و مطالعه تجدید یا ترمیم بافت را فراهم نموده است. در فرایند ترمیم سلول‌های فیبروبلاست در محل آسیب تجمع می‌کنند و نقش مهمی در فرایند ترمیم به عهده دارند. اخیراً اطلاعات جدیدی درمورد نقش التهاب و واکنش‌های ایمنولوژیک عضو آسیب دیده و تغییرات سلولی در فرایند ترمیم زخم به دست آمده است [۱]. در صدمات وسیع پوست کاهش شدید تعداد فیبروبلاست‌ها عامل تأخیر یا شکست فرایند ترمیم است. از این رو مطالعات زیادی توجه خود را به استفاده از سلول‌های بنیادی در فرایند ترمیم زخم معطوف داشته اند. دسته‌ای از سلول‌های بنیادی که منابع قابل دسترسی را تشکیل می‌دهند سلول‌های استرومایی خون محیطی و سلول‌های استرومایی مغز استخوان هستند. این سلول‌ها سلول‌های پرتوانی هستند که به نظر می‌آید نقش مهمی در ترمیم زخم و تشکیل بافت همبند داشته باشند چرا که در محل آسیب تجمع و پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی را ترشح می‌کنند [۷-۲].

زایو (Zhao) و همکارانش سلول‌های بنیادی بالغ پرتوان را از خون محیطی جداسازی کردند و نشان دادند که این سلول‌ها شبه فیبروبلاست بوده و قادرند به ماکروفاژها، لنفوسیت‌ها، سلول‌های اندوتلیال و سلول‌های عصبی تبدیل شوند. این قابلیت آن‌ها را به صورت منبع جایگزینی برای سلول‌های استرومایی مغز استخوان درآورده است [۸].

فاکتورهای رشد مختلفی در فرایند ترمیم زخم نقش دارد. شناخته شده‌ترین آن‌ها فاکتور رشد تغییر شکل‌دهنده بتا است که محرک تجدید یا ترمیم بافت است. این فاکتور

لام و در هر لام حداقل ۳ میدان دید با بزرگنمایی $\times 400$ زیر میکروسکوپ فلورسنت (Olympus) بررسی و توسط نرم افزار مربوط به میکروسکوپ فلورسنت شمارش شد.

بررسی رونویسی ژن col-1

در فرایند ترمیم زخم تولید کلاژن نوع ۱ که از مهمترین عوامل خارج سلولی است توسط فیروبلاست ها صورت می گیرد. بررسی تولید آن توسط سلول های بنیادی قبل از تزریق در هفتمین روز پس از کشت و هفت روز پس از تزریق به حیوان و در محل زخم مشخصه خوبی از مشارکت این سلول ها در فرایند ترمیم است. بنابراین پس از استخراج RNA Total از هر دسته سلول های کشت شده و محل زخم هر دو گروه cDNA ساخته شد و RT-PCR با استفاده از پرایمرهای ژن col-1 (۲۱ جفت نوکلئوتید) انجام شد

پرایمرهای مورد استفاده

ژن کلاژن نوع ۱:

5'-CGA TGG ATT CCA GTT CGA GTA-3' پرایمر جلویی

5'-GTT TAC AGG AAG CAG ACA GG-3' پرایمر برگشتی

کنترل داخلی ژن GAPDH:

5'-CCC CCA TGC CAT CCT GCG TCT G-3' پرایمر جلویی

5'-CAT GAT GGA GTT GAA GGT AGT TT-3' پرایمر برگشتی

آنالیز داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS ۲۰۱۰ و روش ANOVA یک طرفه انجام شد.

یافته ها

نتایج حاصل از جداسازی و کشت سلول های

بنیادی خون محیطی

سلول های استخراج شده پس از حدود ۲۴ تا ۴۸ ساعت به کف فلاسک چسبیدند و به تدریج ظاهری دوکی و شبه فیروبلاستی پیدا کردند.

جداسازی و کشت سلول های بنیادی مغز استخوان

استخوان تیبا و فمور موش های سوری به دقت از بافت های اطراف جدا شد و سپس مغز استخوان به کمک یک سرنگ حاوی محیط کشت به داخل ظرف ریخته شد و با استفاده از هیستوپک و سلول های بنیادی طبق پروتکل مغز استخوان جدا شدند. پس از یک شب کشت در ظروف ۲۴ خانه با تراکم سلولی ۳ میلیون سلول در هر خانه، در محیط کشت DMEM و FBS به میزان ۲۰ درصد، سلول های نجسیده شسته و سایر سلول ها به مدت ۷ روز کشت داده شدند. درصد حیات سلولی با رنگ آمیزی تریپان بلو بررسی شد [۱۸].

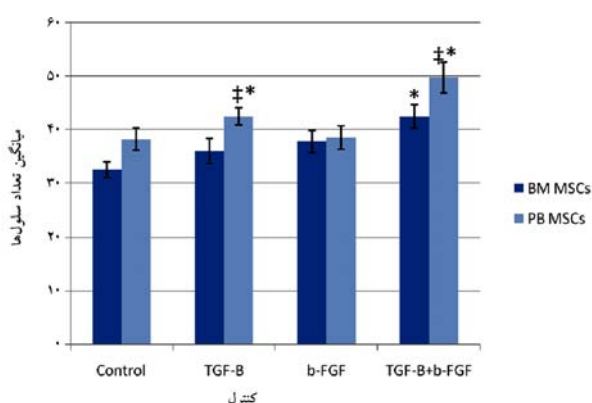
استفاده از فاکتورهای رشد

سلول های کشت شده در ظروف ۲۴ خانه به ۴ گروه دسته بندی شدند و هر گروه به صورت زیر تحت تاثیر فاکتورهای رشد قرار گرفتند؛ گروه کنترل بدون افزودن هیچ فاکتوری، گروه دوم با استفاده از TGF- β ، گروه سوم با استفاده از FGF-b و گروه چهارم با استفاده از هر دو فاکتور. محیط کشت هر گروه در هر ۷۲ ساعت یک بار تعویض شد. تعداد سلول های دوکی شکل هر گروه در روز ۳ و ۷ شمارش شدند [۷-۲].

علامت گذاری، تزریق و بررسی مهاجرت سلولی

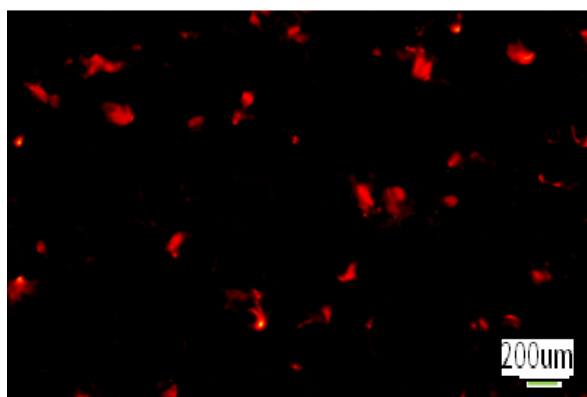
سلول های بنیادی استخراج شده از خون محیطی و مغز استخوان با استفاده از رنگ فلورسنت PKH26-GL (sigma) و طبق پروتکل رنگ آمیزی شدند. سپس سلول های رنگ شده با تراکم ۱۰۰۰۰ سلول در حجم ۲۰ میکرولیتر از طریق ورید دمی به موش های مدل زخم پوست گروه آزمایش که در ناحیه پشت و توسط پانچ دارای زخم بودند، تزریق شدند. پس از ۱،۳ و ۷ روز حیوانات گروه های کنترل و آزمایش (۵ عدد در هر گروه) به روش نخاعی کشته شدند و محل زخم جداسازی و پس از تهیه برش از نظر مهاجرت سلول های رنگ شده به محل زخم بررسی شد. در هر نمونه حداقل ۵

محیطی تیمار شده با هر دو فاکتور رشد نسبت به سلول‌های بنیادی مغز استخوان با همان تیمار مهاجرت بیشتری به محل زخم داشتند که از نظر آماری معنی‌دار بود ($p < 0.05$) (شکل‌های ۱ و ۲).



شکل ۱. نتایج حاصل از شمارش و بررسی مهاجرت سلول‌ها به محل زخم. * : $p < 0.05$ در مقایسه هر گروه با گروه کنترل. † : $p < 0.05$ در مقایسه با گروه سلول‌های استخراج شده از مغز استخوان با تیمار یکسان.

نتایج حاصل از RT-PCR نشان داد که استفاده از فاکتورهای رشد TGF- β و b-FGF به تنهایی یا با هم، اثر مثبتی در افزایش رونویسی ژن کلاژن ۱ در سلول‌های بنیادی استخراج شده از خون محیطی و مغز استخوان دارد. البته اثر همراهی این دو فاکتور در افزایش رونویسی ژن کلاژن ۱ مشهودتر است (شکل ۳).



شکل ۲. تصویر برشی از محل زخم که سلول‌های بنیادی مهاجر را به رنگ قرمز فلورسنت نشان می‌دهد.

نتایج حاصل از جداسازی و کشت سلول‌های

بنیادی مغز استخوان

سلول‌های بنیادی مغز استخوان مشابه با سلول‌های بنیادی خون محیطی سلول‌های استخراج شده از مغز استخوان پس از حدود ۲۴ تا ۴۸ ساعت به کف فلاسک چسبیدند و به تدریج ظاهری دوکی و شبه فیروبلستی پیدا کردند.

نتایج حاصل از استفاده از فاکتورهای رشد

فاکتورهای رشد یاد شده پس از افزودن به محیط کشت تغییری در ظاهر سلول‌ها ایجاد نکردند.

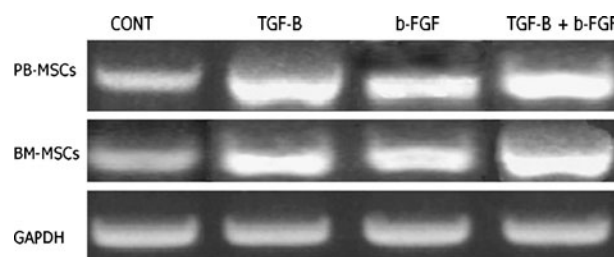
نتایج حاصل از علامت‌گذاری، تزریق و بررسی

مهاجرت سلولی

سلول‌ها پس از رنگ‌آمیزی و قبل از تزریق توسط میکروسکوپ فلورسنت به رنگ قرمز مشاهده و بررسی شدند. نتایج حاصل از بررسی مهاجرت سلولی سلول‌های استخراج شده از خون محیطی و مغز استخوان به محل زخم نشان داد مهاجرت سلول‌ها پس از تیمار با هریک از فاکتورهای رشد به تنهایی و هر دو فاکتور نسبت به گروه کنترل افزایش می‌یابد. این افزایش در سلول‌های بنیادی خون محیطی تیمار شده با فاکتور رشد تغییر شکل‌دهنده و سلول‌های بنیادی خون محیطی و مغز استخوان تیمار شده با هر دو فاکتور رشد نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری بیشتر است ($p < 0.05$).

همچنین در مقایسه میزان مهاجرت سلول‌های بنیادی خون محیطی با میزان مهاجرت سلول‌های بنیادی مغز استخوان نشان داده شد سلول‌های بنیادی خون محیطی تیمار شده با فاکتور رشد تغییر شکل‌دهنده نسبت به سلول‌های بنیادی مغز استخوان با همان تیمار، مهاجرت بیشتری به محل زخم داشتند که از نظر آماری معنی‌دار بود و سلول‌های بنیادی خون

از طرفی مطالعات انجام شده روی عوامل رشد نشان داده‌اند فاکتور رشد تغییر شکل‌دهنده بتا و فاکتور رشد فیبروبلاستی نقش مهمی در افزایش رونویسی ژن کلاژن ۱ در فیبروبلاست‌ها و فرایند ترمیم زخم دارند [۱۹-۲۲]. به‌طور مثال دی ویتا (Di vita) و همکاران نقش مثبت برخی سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد را در فرایند ترمیم زخم تأکید کردند [۱۹]. در واقع نقش مثبت این عوامل از طریق تحریک تولید کلاژن نوع یک است [۲۰]. تحقیق حاضر این مطالعات را تأیید می‌کند. نتایج تحقیق حاضر اثر افزایشی دو فاکتور رشد را در رونویسی ژن کلاژن یک در سلول‌های بنیادی خون محیطی و مغز استخوان در محیط کشت و در محل زخم نشان می‌دهد. اگر چه تاکنون مطالعات مشابهی در زمینه اثر مثبت سلول‌های بنیادی در ترمیم زخم انجام شده است [۲۳ و ۲۴] اما مطالعه‌ای که همزمان اثر سلول‌های بنیادی استخراج شده از خون محیطی و مغز استخوان و فاکتورهای رشد را در ترمیم زخم بررسی کند انجام نشده است. نتیجه‌گیری نهایی این مطالعه نقش مثبت سلول‌های بنیادی یاد شده را پس از تیمار با فاکتورهای رشد در ترمیم زخم بیش از پیش نشان می‌دهد. نظر به اینکه مطالعه حاضر در ترکیب نتایج حاصل از مطالعات مختلف شکل گرفته است، بنابراین می‌تواند راهگشای مطالعات بیشتری باشد که همزمان از فاکتورهای مختلف مؤثر در ترمیم زخم و سلول‌های بنیادی بهره می‌گیرند.



شکل ۳. نتایج حاصل از بررسی رونویسی ژن کلاژن نوع ۱ به روش RT-PCR که در هر گروه و دو هفته پس از تزریق در محل زخم باندها به‌طور کیفی میزان بیان ژن را پس از الکتروفورز نشان می‌دهد.

بحث

مطالعات قبلی نشان‌دهنده توانایی سلول‌های بنیادی حاصل از خون محیطی و همچنین مغز استخوان در مهاجرت به محل زخم و مشارکت در فرایند ترمیم زخم است [۷-۲۳، ۲۴]. در مطالعه حاضر نیز مهاجرت سلول‌های بنیادی خون محیطی و مغز استخوان پس از تزریق وریدی به محل زخم نشان داده شده است و در تأیید مطالعات قبلی است. کوان (Quan) و همکارانش نشان دادند فیبروبلاست‌های خون محیطی که در فرایند ترمیم زخم مؤثر است توانایی و نقش تولید کلاژن را در محل زخم به عهده دارد [۷]. چنسلی (Chesney) و همکارانش نیز نشان دادند فیبروبلاست‌های خون محیطی نقش تولید تنظیم شده کلاژن نوع ۱ و سیتوکین‌های التهابی را در ترمیم زخم به عهده دارند [۵]. در مطالعه حاضر نیز علاوه بر حضور سلول‌های بنیادی تزریق شده در محل زخم، بیان ژن کلاژن نوع ۱ توسط این سلول‌ها در محل زخم تأیید می‌شود.

References

1. Goldberg ED, Dygai AM, Zhdanov VV, Zyuzkov GN, Guryantseva LA, Pershina OV, et al. Participation of mesenchymal precursor cells in wound healing on skin flap model. Bull Exp Biol Med 2006; 142: 116-8.
2. Bucala R, Spiegel L. A, Chesney J, Hogan M, Cerami A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. Mol Med 1994; 1: 71-811.
3. Chesney J, Bacher M, Bender A, Bucala R. The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen-presenting cell capable of priming naive T cells in situ. Proc Natl Acad Sci 1997; 94: 6307-12.
4. Grab DJ, Lanners H, Martin LN, Chesney J,

- Cai C, Adkisson HD, et al.** Interaction of *Borrelia burgdorferi* with peripheral blood fibrocytes, antigen-presenting cells with the potential for connective tissue targeting. *Mol Med* 1999; 5: 46-54.
5. **Chesney J, Metz C, Stavitsky AB, Bacher M, Bucala R.** Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes. *J Immunol* 1998;160: 419-25.
 6. **Abe R, Donnelly SC, Peng T, Bucala R, Metz CN.** Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol* 2001; 166: 7556-62.
 7. **Quan TE, Cowper S, Wu SP, Bockenstedt LK, Bucala R.** Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36:598-606.
 8. **Zhao Y, Glesne D, Huberman E.** A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 2426-31..
 9. **Molloy T, Wang Y, Murrell G.** The roles of growth factors in tendon and ligament healing". *Sports Med* 2003; 33: 381-94.
 10. **Tarnawski A, Szabo IL, Husain SS, Soreghan B.** Regeneration of gastric mucosa during ulcer healing is triggered by growth factors and signal transduction pathways. *J Physiol Paris* 2001; 95: 337-44.
 11. **Ono I.** T The effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on the breaking strength of acute incisional wounds. *J Dermatol Sci* 2002; 29: 104-13.
 12. **Prochnau D, Rodel J, Hartmann M, Straube E, Figulla HR.** Growth factor production in human endothelial cells after *Chlamydia pneumoniae* infection. *Int J Med Microbiol* 2004;294: 53-7.
 13. **Faris M, Ensoli B, Kokot N, Nel AE.** Inflammatory cytokines induce the expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) isoforms required for the growth of Kaposi's sarcoma and endothelial cells through the activation of AP-1 response elements in the bFGF promoter. *AIDS* 1998; 12: 19-27.
 14. **Carroll LA, Koch RJ.** Heparin stimulates production of bFGF and TGF-beta 1 by human normal, keloid, and fetal dermal fibroblasts. *Med Sci Monit* 2003; 9: 97-108.
 15. **Yoshida S, Yoshida A, Ishibashi T.** Induction of IL-8, MCP-1, and bFGF by TNF-alpha in retinal glial cells: implications for retinal neovascularization during post-ischemic inflammation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2004; 242: 409-13.
 16. **Zittermann SI, Issekutz AC.** Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF, FGF-2) Potentiates Leukocyte Recruitment to Inflammation by Enhancing Endothelial Adhesion Molecule Expression. *Am J Pathol* 2006.;168: 835-46.
 17. **Yamashita, A, Yonemitsu Y, Okano S, Nakagawa K, Nakashima Y, Irisa T, et al.** Fibroblast growth factor-2 determines severity of joint disease in adjuvant-induced arthritis in rats. *J Immunol* 2002;168: 450-7.
 18. **Katebi M, Soleimani M, Cronstein BN.** Adenosine A2 Receptor Signaling Play an Active Role in mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cell Development". *J Leukoc Biol* 2009; 85: 438-44.
 19. **Di vita G, Patti R, D Agostino P, Caruso G, Arcara M, Buscemi S, et al.** Cytokines and growth factors in wound drainage fluid from patients undergoing incisional hernia repair. *Wound Repair Regen* 2006;14: 259-64.
 20. **Mishra R, Zhu L, Eckert RL, Simonson MS.** TGF-regulated collagen type I accumulation: role of Src-based signals. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;292:1361-9.
 21. **Rosenkranz S.** TGF-beta1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. *Cardiovasc Res* 2004;63(3): 423-32.

22. **Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, Yang L, Paik YH, Lindquist J, et al.** NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest* 2003.; 112(9): 1383–94.
23. **van der Veen VC, Vlig M, van Milligen FJ, de Vries SI, Middelkoop E, Ulrich MM.** Stem Cells in Burn Eschar. *Cell Transplant* 2011. [Epub ahead of print].
24. **Kuo YR, Wang CT, Cheng JT, Wang FS, Chiang YC, Wang CJ.** Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Enhanced Diabetic Wound Healing through Recruitment of Tissue Regeneration in a Rat Model of Streptozotocin-Induced Diabetes. *Plast Reconstr Surg* 2011; 128: 872-80.