

感觉神经肽 P 物质在表皮干细胞分化中作用的实验研究

黄晖 赖西南 王正国 王丽丽 陈志雄

【摘要】 目的 以体外培养表皮干细胞(ESC)为实验平台,观察感觉神经肽 P 物质(SP)在 ESC 分化中的作用。方法 以黏附分离法分离、纯化新生 Wistar 大鼠的 ESC,在出现 ESC 克隆生长时加入 SP 刺激,分别于刺激前及刺激后 24、48、72、96、144、192、240、288、336、384、432 h 取样进行角蛋白 14(K14)免疫组织化学染色并用流式细胞仪(FCM),鉴定细胞分群及比例。结果 ESC 在加入 SP 后可以继续呈片状聚集生长,细胞 K14 染色阳性,提示为短暂扩充细胞(TAC)。FCM 检测结果提示,ESC 经 SP 刺激后出现 TAC 细胞群落,细胞比例随着时间的延长上升。结论 SP 可以诱导体外培养 ESC 分化为 TAC,在这个过程中 ESC 数量仍保持一定的水平。

【关键词】 P 物质; 细胞分化; 表皮干细胞; 短暂扩充细胞

Effect of sensory neuropeptide substance P on the differentiation of cultured epidermal stem cells in vitro
HUANG Hui, LAI Xi-nan, WANG Zheng-guo, WANG Li-li, CHEN Zhi-xiong. Institute of Field Surgery, Daping Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400042, P. R. China
Corresponding author: LAI Xi-nan, Email: lxn@163.com, Tel: 023-68757574

【Abstract】 Objective To investigate the effect of sensory neuropeptide substance P(SP) on the differentiation of cultured epidermal stem cells (ESC) in vitro, with in vitro cultured ESC as the platform. Methods ESC from newborn Wistar rats were isolated, purified by repeated passages in culture. SP was added for stimulation when ESC clone grew. Immunohistochemistry staining with K14 antibody, and flow cytometry (FCM) was performed at 0, 24th, 48th, 72nd, 96th, 144th, 192nd, 240th, 288th, 336th, 384th, 432nd post differentiation hours (PDH) to identify the cell groups and to detect if there were transient amplifying cells (TAC) among the cells. Results ESC in culture formed large colonies after SP treatment with positive staining for K14, indicating that they were TACs. The results of FCM indicated that when ESC were stimulated by SP, TAC colony formation occurred and the cell number increased in a constant speed. Conclusion ESC could differentiate into TAC by neuropeptide SP induction, and the number of ESC kept on a certain level during the process.

【Key words】 Substance P; Cell differentiation; Epithelial stem cells; Transient amplifying cells

创伤愈合的调控是一个复杂的过程,表皮干细胞(epidermal stem cells, ESC)和感觉神经肽 P 物质(substance P, SP)在其过程中有重要作用;SP 阳性纤维和 ESC 在皮肤发育中存在密切的时空关系^[1]。本研究以体外培养的 ESC 为实验平台^[2],通过观察 SP 在 ESC 分化中的作用及其影响,以期通过神经调控促进创伤愈合及提高愈合质量提供新思路。

材料与 方法

1. 动物来源与主要试剂、仪器: 出生后 3~4 d 的 Wistar 大鼠(第三军医大学大坪医院动物室) 120 只,雌雄不限。抗体 β_1 整合素、角蛋白(K)19、K14、

K5、SP 及异硫氰酸荧光素(FITC) + 藻红蛋白(PE) 双标记抗体试剂盒均为美国 Sigma 公司产品。胰蛋白酶、胎牛血清(FBS)、EMEM 培养基均为美国 Gibco 公司产品。流式细胞仪(FCM)为美国 BD 公司产品。链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(SABC)双标记试剂盒为武汉博士德公司产品。

2. 成纤维细胞培养液的制备:取幼鼠全层皮肤并修剪成 1 mm × 1 mm 贴于培养瓶底,加入 EMEM + 体积分数 9% FBS + 0.05 mmol/L CaCl₂ + 0.5 μ g/L 硫酸庆大霉素,置 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO₂ 的细胞培养箱内孵育 48 h。收集培养液用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤后,置 -20 $^{\circ}$ C 保存。用前用等渗盐水 1:1 稀释,即成体积分数为 50% 成纤维细胞培养液。

3. ESC 的培养:取大鼠表皮用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化成单细胞悬液,利用 ESC 对 IV 型胶原的特异性和黏附性,用快速贴附法分离出 ESC,并用 ESC 培养基(体积分数为 50% 成纤维细胞培养液 + 体积

基金项目:国家重点基础研究发展规划专项经费资助项目(G1999054204)

作者单位:400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所第六研究室

通信(讯)作者:赖西南,Email:lxn@163.com,电话:023-68757574

分数 9% FBS + 0.05 mmol/L CaCl₂ + 4 μg/L 表皮生长因子 + 0.5 μg/L 硫酸庆大霉素 + EMEM) 筛选培养。分离培养出的 ESC 用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化, 18 °C, 1200 × g 离心 10 min, 弃上清。加入 ESC 培养基调整细胞数 (1 × 10⁵ 个/ml) 接种于预先铺有无菌盖玻片的 24 孔培养板中。待各孔中 ESC 出现克隆生长时, 将 24 孔平均分为实验组和对照组。实验组培养液改为 ESC 培养基 + 1 × 10⁻⁷ mol/L SP, 对照组仅为 ESC 培养基。两组细胞均置 37 °C、体积分数 5% CO₂ 的细胞培养箱内, 隔日换液。分别于加入 SP 刺激前及刺激后 24、48、72、96、144、192、240、288、336、384、432 h 取样检测。

4. 观察指标: (1) 倒置相差显微镜下观察两组细胞增殖及其形态变化。(2) FCM 检测: ① 实验组培养孔内加入 2.5 g/L 胰蛋白酶, 37 °C 下振荡消化, 终止反应后于 18 °C, 1200 × g 离心 10 min, 弃上清。加入含体积分数 3% FBS 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 吹打成单细胞悬液, 用体积分数 40% 的丙酮固定。细胞平均分为 A1 与 A2 两部分, 18 °C, 1200 × g 离心 10 min, 弃去上清液。A1 细胞内加入 K19 抗体作为第 1 种一抗, 室温避光孵育 1 h, 清洗, 加入 FITC 标记的山羊抗小鼠单克隆抗体, 避光冰浴 30 min, 清洗后阻断; 同方法以 β₁ 整合素抗体作为第 2 种一抗, 进行 PE 标记, 充分吹打混匀成单细胞悬液后用 FCM 检测。同上步骤依次在 A2 细胞内加入 K14、K5, 分别作为第 1 种一抗及第 2 种一抗进行免疫荧光双标记后, 用 FCM 检测细胞成分及比例。② 对照组细胞平均分为 B1 和 B2, 处理同实验组。(3) 免疫组织化学观察: SP 刺激 72 h 后取出孔内盖玻片, 用 4 °C 的纯丙酮固定后分别用 SABC 双标记法 (以

K19 + β₁ 整合素为 ESC 鉴定标志物)、生物素-链酶亲和素-辣根过氧化物酶二步法 [以 K14 为短暂扩充细胞 (TAC) 鉴定标志物] 进行染色。

5. 统计学处理: 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 10.0 统计软件作单因素方差分析。

结 果

1. 培养 10 d 后, ESC 培养瓶内有快速贴壁的细胞, 出现了以单个细胞为分裂中心、呈片状聚集样向外生长的生长晕; 每个细胞群落内的细胞外形及大小一致, 表现为体积小, 呈扁圆形, 胞核大, 胞浆少。加入 SP 后实验组 ESC 继续呈片状聚集生长, 24 h 见培养细胞出现分裂相, 但细胞形态及大小出现变化: 随着培养时间的延长, 细胞变大, 扁圆形, 胞核较小, 胞浆增多。对照组细胞形态未见明显变化。

2. (1) 随加入 SP 刺激时间的不同, 实验组 A1 细胞分检为 K19-β₁ 整合素双标记阳性细胞群落、K19 阳性细胞群落、β₁ 整合素阳性细胞群落、双阴性细胞群落; K19 阳性细胞数及双阴性细胞数极少, 各刺激时相点下双标记阳性细胞数基本保持不变, β₁ 整合素阳性细胞数随刺激时间延长而逐渐增加。A2 细胞分检为双标记阳性细胞群落、K 阳性细胞群落、双阴性细胞群落; 双标记阳性细胞数随刺激时间延长而增加, 其增长幅度与 A1 细胞中 β₁ 整合素阳性细胞群落增长趋势一致, 两者间细胞数基本相同 (P > 0.05); 双阴性细胞数随刺激时间延长基本保持不变, 与 A1 细胞中 K19-β₁ 整合素双标记阳性细胞之间比较, 差异也无显著性意义 (P > 0.05); A1、A2 的总细胞数基本一致 (P > 0.05)。见表 1。(2) 对照组 B1、B2 细胞均被分检为 K19-β₁ 整合素双标记阳性细胞群落、K19 阳性细胞群落、整合素

表 1 实验组表皮干细胞加入感觉神经肽 P 物质后不同时段分化的细胞数 (个, $\bar{x} \pm s$)

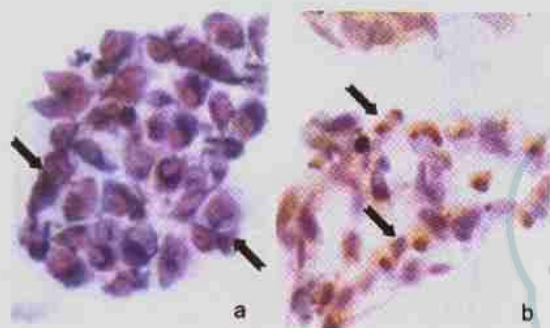
Tab 1 The differentiated cell number at different PDH after Neuropeptide sp stimulation (number, $\bar{x} \pm s$)

| 细胞 | 细胞群落 | 刺激前 | 刺激后培养时间 (h) | | | | | | | | | | |
|----|------------------------|-------|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| | | | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | 288 | 336 | 384 | 432 |
| A1 | K19-β ₁ 整合素 | 3318 | 3420 | 3417 | 3332 | 3241 | 3242 | 3361 | 3244 | 3348 | 3183 | 3006 | 3085 |
| | 双阳性细胞数 | ±77 | ±80 | ±72 | ±62 | ±46 | ±37 | ±65 | ±65 | ±120 | ±62 | ±104 | ±80 |
| | β ₁ 整合素 | 81 | 265 | 576 | 935 | 1209 | 1654 | 1854 | 2539 | 3745 | 4205 | 5059 | 6121 |
| | 阳性细胞数 | ±5 | ±12 | ±8 | ±40 | ±27 | ±69 | ±50 | ±41 | ±41 | ±86 | ±248 | ±263 |
| | 总细胞数 | 3936 | 3987 | 4260 | 4590 | 4675 | 5103 | 5409 | 6080 | 7511 | 8128 | 8409 | 9855 |
| | | ±54 | ±121 | ±103 | ±59 | ±97 | ±60 | ±127 | ±117 | ±290 | ±240 | ±417 | ±369 |
| A2 | K14-K15 | 79 | 255 | 588 | 890 | 1152 | 1607 | 1792 | 2652 | 3766 | 4035 | 4877 | 6022 |
| | 双阳性细胞数 | ±1 | ±14 | ±9 | ±18 | ±32 | ±62 | ±45 | ±43 | ±44 | ±84 | ±52 | ±35 |
| | K14-K15 | 328 | 3331 | 3659 | 3401 | 3679 | 3559 | 3401 | 3368 | 3316 | 3201 | 3115 | 31501 |
| | 双阴性细胞数 | ±3400 | ±267 | ±65 | ±141 | ±104 | ±112 | ±51 | ±36 | ±25 | ±50 | ±45 | ±66 |
| | 总细胞数 | 4271 | 4058 | 4306 | 4682 | 4649 | 5103 | 5308 | 6062 | 7196 | 8138 | 8492 | 9765 |
| | | ±402 | ±275 | ±76 | ±191 | ±131 | ±167 | ±94 | ±76 | ±50 | ±154 | ±46 | ±73 |

注: 实验组培养的细胞平均分为 A1 和 A2, 两者被测细胞数相同

β_1 阳性细胞群落、双阴性细胞群落,未见 K14-K5 双标记阳性细胞群落。随培养时间的延长,K19- β_1 整合素双标记阳性细胞群落数目逐渐增加,由未加入 SP 前(0 h)的(3297 ± 63)个增加为 432 h 时的(5788 ± 103)个。K19 阳性细胞群落、 β_1 整合素阳性细胞群落、双阴性细胞群落细胞数变化不显著($P > 0.05$)。

3. 免疫组织化学染色结果:实验组细胞的 K19- β_1 整合素双标记染色呈阴性,而其 K14 染色呈阳性,表现为胞核复染为蓝色,胞膜呈现棕黄色。对照组未见 K14 阳性细胞,细胞的 K19- β_1 整合素双标记染色呈阳性;表现为细胞核未着色,胞浆染为蓝色,胞膜染为红色。见图 1。



注:a. 对照组细胞 K19-整合素 β_1 双标记染色胞浆为蓝色,胞膜为红色;b. 实验组细胞 K14 染色胞膜着棕黄色
图 1 两组表皮干细胞经感觉神经肽 P 物质刺激后分化的细胞群落 HE × 400

Fig 1 Cultured epidermal stem cells differentiated into transient amplifying cells induced by SP HE × 400

讨 论

有研究表明,干细胞所处的局部微环境是决定干细胞是否退出其群落而进行定向分化的关键^[3]。本研究用 FCM 检测技术对细胞或细胞器进行快速测量,利用荧光标记的抗体与细胞的相应抗原结合形成免疫结合复合物进行细胞群落分析。本实验利用 ESC 及 TAC 的特异性标记物,通过不同的荧光 FITC、PE 标记后进行 ESC 诱导分化后的混合细胞群落的亚细胞群分析。结果表明,在培养的 ESC 中加入外源性 SP 后,ESC 能继续呈片状聚集生长,细胞在生长的过程中逐渐失去了 ESC 的原始细胞外形特点,渐渐表现出分化细胞的外形特点。免疫组织化学染色结果显示:加入 SP 前细胞表现为 K19- β_1 整合素的双标记阳性,结合光镜下细胞的形态特点及较强的自我更新能力(体外培养呈克隆状生长),可以确认这些细胞为 ESC^[4]。SP 刺激后出现

的中等大小圆形细胞的克隆群落中,细胞的 K19 染色阴性,但 K14 染色阳性,提示该细胞克隆群落是 TAC^[5]。有研究表明,SP 对于在 ESC 中具有诱导迁移的作用^[6]。SP 及其受体在人类脐带血红细胞的分化中具有诱导定向分化的重要作用^[7]。因此,SP 可以诱导 ESC 脱离干细胞群落从而进入分化状态。

目前学术界公认的 ESC 的鉴定标志为 K19- β_1 整合素双标记阳性;TAC 也可以表达 β_1 整合素,但其表达强度为 ESC 的一半,TAC 的标记物为 K14 和 K5^[8]。本研究中,FCM 检测出实验组的 A1 细胞有 4 个细胞群落,A2 细胞有 3 个细胞群落。加入 SP 后刺激,A1 细胞中的 ESC 细胞数并未随着刺激时间的延长而增减, β_1 整合素阳性细胞数及其所占总细胞数比例随刺激时间的延长而增加;A2 细胞中 TAC 细胞数及所占总细胞数比例也随刺激时间的延长增加,其增长幅度及细胞数与 A1 细胞中 β_1 整合素阳性细胞数基本一致。由此说明,A1 细胞中 β_1 整合素阳性细胞群落是 TAC,也就是说在 SP 刺激 ESC 后分化的细胞均为 TAC。因此,SP 可以诱导 ESC 发生定向分化。在此过程中,ESC 分裂时产生的子代细胞为不对称分裂,其细胞数量恒定,还能不断产生新的分化子代细胞,与 Broon 等^[7]的研究结果一致。

综上所述,SP 对于 ESC 除具有诱导分化的作用外,还能在维持自身数量的同时给机体组织的新陈代谢不断提供新的分化细胞,这对创伤后的愈合极其重要。同时 SP 在创伤愈合中对于表皮干细胞具有诱导迁移的重要作用^[8]。因此,在创伤治疗时通过神经肽的干预诱导 ESC 向利于愈合的部位迁移,并向适当的方向定向分化,为今后创伤治疗中促进创面愈合,提高愈合质量奠定了基础。

参 考 文 献

- 1 黄晖,赖西南,王正国,等. 创伤愈合中 P 物质对表皮干细胞迁移及受体表达的作用. 中华创伤杂志,2004,20: 142-145.
- 2 韩军涛,陈璧,张晓辉,等. 胎鼠表皮干细胞的分离培养及毛囊再生研究. 中华烧伤杂志,2003,19: 8-11.
- 3 Slack JM. Stem cell in epithelial tissues. Science,2000,287:1431-1433.
- 4 Cotsare IG, Kaur P, Dhonally D, et al. Epithelial stem cell in the skin: definition, markers, localization and function. Exp Dermatol, 1999,283:80-88.
- 5 赵志力,付小兵,孙同柱,等. 成人正常皮肤和瘢痕组织表皮干细胞定位与表达特征的研究. 中华烧伤杂志,2003,19: 12-14.
- 6 黄晖,赖西南,王正国,等. 感觉神经肽 SP 对创面 ESC 迁移影响的实验研究. 解放军医学杂志,2003,28: 884-886.
- 7 Broon CS, Whetton AD, Miyaz JA. Neuropeptide control of bone marrow neutrophil production. Br J Haematol,2000,108:140-150.

8 李建福,付小兵,盛志勇.表皮干细胞的研究近况.中华烧伤杂志,2002,18: 60-62.

(收稿日期:2003-06-24)
(本文编辑:荀学萍)

· 论著摘要 ·

自体微粒皮移植术对大面积深度烧伤后多器官功能障碍综合征发生的影响

胡德林 汪昌荣 王永杰 方林森

烧伤后多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)是烧伤治疗中影响全局和亟待解决的重要课题,如何及早防治烧伤患者全身感染和 MODS 是治疗的关键之一。笔者单位采用大面积切痂自体微粒皮移植术,有效地覆盖了创面,在减轻或阻止全身感染和多器官功能障碍等方面取得了良好疗效。

一、资料与方法

1. 临床资料:选择 1993~2002 年笔者单位收治的烧伤患者 64 例,烧伤总面积(77.5±23.6)%,其中Ⅲ度(59.2±24.8)%TBSA。根据创面处理方法的不同,分为 A、B 两组。A 组患者行一次性大面积切痂自体微粒皮和大张异体皮移植术,B 组分次行部分Ⅲ度创面切痂自体邮票状皮片移植术。两组患者入院后常规处理相同,其一般情况见表 1。

表 1 两组患者一般情况比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 例数 | 年龄(岁) | 伤后入院时间(h) | 烧伤总面积(%TBSA) | Ⅲ度面积(%TBSA) | 首次手术时间(d) | 首次切痂面积(%TBSA) |
|-----|----|-------------|-----------|--------------|-------------|-----------|---------------|
| A 组 | 32 | 33.4 ± 15.2 | 5.4 ± 4.9 | 77.5 ± 23.6 | 59.2 ± 24.8 | 5.8 ± 2.4 | 38.6 ± 8.9 |
| B 组 | 32 | 32.7 ± 14.9 | 5.2 ± 4.8 | 76.6 ± 22.7 | 57.1 ± 22.9 | 6.1 ± 2.5 | 18.2 ± 7.3* |

注:A 组为切痂自体微粒皮移植术的患者,B 组为切痂邮票植皮术患者;与 A 组比较,*P < 0.05

2. 脓毒症和 MODS 的诊断标准见文献[1]。MODS 的发病过程、诊断虽然包括早期器官功能障碍及晚期功能衰竭的诊断和评分标准,但目前对其认识尚不统一,笔者仍沿袭 MODS 终末阶段即多系统器官衰竭(MSOF)的诊断标准

3. 观察指标:比较两组患者脓毒症和 MODS 的发生率。

4. 统计学处理:计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,行 t 检验;计数资料行 χ^2 检验。

二、结果

A 组患者脓毒症、MODS 发生率分别为 34.4% 和 18.8%, B 组为 62.5%、43.8%,两组比较,差异有显著性意义(P < 0.05)。见表 2。

表 2 两组患者脓毒症、MODS 的发生率及脏器功能不全的比较

| 组别 | 例数 | 脓毒症(例) | MODS(例) | 脏器功能不全(例) | | | | | |
|-----|----|------------|------------|-----------|---|----|---|---|---|
| | | | | 肺 | 肾 | 胃肠 | 心 | 肝 | 脑 |
| A 组 | 32 | 11(34.4%) | 6(18.8%) | 6 | 2 | 3 | 1 | 1 | 0 |
| B 组 | 32 | 20(62.5%)* | 14(43.8%)* | 9 | 7 | 5 | 4 | 3 | 1 |

注:A 组为切痂自体微粒皮移植术的患者,B 组为切痂邮票植皮术患者;与 A 组比较,*P < 0.05

三、讨论

大面积切痂自体微粒皮移植术是将严重烧伤患者的深度创面予以一次性切除,并采用自体微粒皮和大张异体皮联合移植,有效覆盖创面,对防治全身感染和脏器功能障碍有积极作用。本研究结果表明,切痂自体微粒皮移植术可明显降低烧伤后脓毒症和 MODS 的发生率。李志清等^[2]的研究表明,一次性切痂后血管内皮细胞的损伤减轻,内皮细胞在烧伤后失控性炎症反应的发生与发展中起关键作用,大面积切痂能明显减轻内皮细胞的损伤,从而有利于烧伤后 MODS 的防治。一次性切痂较彻底切除了创面坏死组织,从而有效地阻断了因创面所引起的细菌、内毒素及炎症介质等的入侵,把对因烧伤创面引发的 MODS 的消极治疗改为积极预防;同时减少了体液和营养物质经创面的丢失,避免了丢失-补充-丢失的恶性循环,减轻了脏器水肿,改善了营养状况,也有助于降低超高代谢和恢复免疫功能,达到保护脏器功能的目的。自体微粒皮移植术后,大张异体皮为其提供了一个具有一定温度、湿度、pH 值和氧张力的最适创面环境^[3],为自体皮成活创造了条件,加速了创面愈合,缩短了病程,减少了并发症的发生。

参 考 文 献

- 1 盛志勇,杨红明,柴家科,等.大面积烧伤后多器官功能障碍综合征的临床防治.中华外科杂志,2000,38:435-438.
- 2 李志清,黄跃生,杨宗城.一次性大面积切痂前后烧伤血清对内皮细胞的影响.解放军医学杂志,1997,22:33-35.
- 3 Kaufman T, Hirshowitz B. The influence of various microclimate conditions on the burn wound: a review. Burns, 1993, 9: 84-88.

(收稿日期:2003-07-07)
(本文编辑:张 红)

作者单位:230022 合肥,安徽医科大学附属第一医院烧伤科