

# 离体冻伤模型创面愈合过程中基质细胞衍生因子 1 促表皮干细胞迁移的研究



甘露 曹川 李世荣 柴琳琳 郭锐 向光金 赵树文

**【摘要】** 目的 了解离体皮肤冻伤模型创面愈合过程中,基质细胞衍生因子 1(SDF-1)对创缘表皮干细胞(ESC)的运动趋化作用。方法 体外构建三维皮肤等价物全层冻伤模型(创面呈孔形),免疫组织化学染色观察冻伤后 3、7 d 创缘间质内 SDF-1 的表达情况。另将冻伤模型分为对照组(创面区添加 PBS 50 μL/孔)、SDF-1 组(创面区添加 100 ng/mL SDF-1, 50 μL/孔)和 AMD3100 组[创面区用 100 ng/mL AMD3100(50 μL/孔)处理 30 min 后,添加 SDF-1 50 μL/孔],观察各组创缘中 ESC 的分布变化。结果 免疫组织化学染色显示,冻伤后 3、7 d 创缘间质内 SDF-1 的表达逐渐增加。与对照组及 AMD3100 组相比,SDF-1 组创缘基底整合素 β<sub>1</sub> 阳性细胞数量增多,且部分阳性细胞向上层表皮迁移聚集,创缘 ESC 数量更多,表皮细胞层数增加。结论 SDF-1 促进 ESC 向创缘迁移聚集参与创面修复,这可能是 ESC 参与创面修复过程的机制之一。

**【关键词】** 冻伤; 趋化因子 CXCL12; 表皮干细胞; 三维皮肤等价物

**Promotion effect of stromal cell-derived factor 1 on the migration of epidermal stem cells in the healing process of frostbite-wound model ex vivo** GAN Lu, CAO Chuan, LI Shi-rong, CHAI Lin-lin, GUO Rui, XIANG Guang-jin, ZHAO Shu-wen. Department of Plastic Surgery, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Corresponding author: LI Shi-rong, Email: lishirong.cqzx@yahoo.com.cn, Tel: 023-68765851

**【Abstract】 Objective** To study the promotion effect of stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) on the migration of epidermal stem cells (ESC) in the healing process of frostbite-wound model ex vivo.

**Methods** A three-dimensional model of full-thickness frostbite of skin was constructed (with slot-like wound) out of skin equivalent. The expression of SDF-1 in wound stroma was observed with immunohistochemistry staining on post injury days (PID) 3 and 7. The model frostbite wounds were divided into control group (treated with PBS 50 μL per wound), SDF-1 group (treated with 100 ng/mL SDF-1, 50 μL per wound), and AMD3100 group [treated with 100 ng/mL AMD3100 (50 μL per wound) for 30 minutes, and then SDF-1 50 μL was added per wound]. The redistribution of ESC around wound was observed. **Results** The expression of SDF-1 in wound stroma increased gradually on PID 3 and 7. Compared with those in control and AMD3100 groups, there were more ESC and epithelial cell layers, and more integrin β<sub>1</sub>-positive cells appeared at the basal layer of wound in SDF-1 group, and some of the positive cells migrated upward to epidermis. **Conclusions** SDF-1 contributes to wound repair through promoting ESC to migrate toward and gather around wound edge. This may be one of the mechanisms of ESC participating in wound repair.

**【Key words】** Frostbite; Chemokine CXCL12; Epidermal stem cells; Three-dimensional skin equivalent

表皮干细胞(ESC)是皮肤组织再生与修复的关键细胞成分。它维持表皮新陈代谢,且在创伤后通过分化发育产生新的表皮细胞,实现创面上皮化和修复<sup>[1]</sup>,促进其功能和使其数量增加是加快创面愈

合、治疗愈合延迟或失控的重要手段。现已证实基质细胞衍生因子 1(SDF-1)可趋化多种成体干细胞参与心肌、骨骼肌、肾脏、神经细胞损伤后的再生修复<sup>[2-5]</sup>。另有文献证实 ESC 表达 CXCR4<sup>[6]</sup>。本研究通过构建离体皮肤冻伤模型,检测伤后创缘 ESC 分布改变,观察 SDF-1 是否调控 ESC 参与创面愈合过程。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

限定性 KC 无血清培养基(DK-SFM)、FAD 培养基(DMEM 高糖培养基:F12 培养基为 3:1)、dispace

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2010.03.012

基金项目:国家自然科学基金(30600652)

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院整形外科(甘露、曹川、李世荣、柴琳琳、郭锐);成都军区空军后勤门诊部(向光金);吉林省辽源市中医院普通外科(赵树文)

通信作者:李世荣,Email: lishirong.cqzx@yahoo.com.cn, 电话: 023-68765851

II 酶(美国 Gibco 公司), SDF-1(美国 Peprotech 公司), 人胎盘 IV 型胶原、AMD3100(美国 Sigma 公司), 兔抗 SDF-1 单克隆抗体(美国 Ebioscience 公司), 小鼠抗整合素  $\beta_1$  单克隆抗体、SP-9001、SP-9002(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** ESC 分离自幼儿包皮切除术后剩余皮肤(家属知情同意), 培养、鉴定参照文献[7]进行, 使用 DK-SFM。取第 2 代细胞备用。按照文献[8]的方法, 采用 DMEM 高糖培养基, 另添加体积分数 10% 小牛血清培养人原代 Fb。取第 5~8 代细胞备用。

**1.2.2 真皮等价物的制备** 参照文献[9]提取鼠尾胶原, 调整胶原浓度为 4 mg/mL, 在冰浴条件下按比例混匀醋酸鼠尾胶原、10 倍浓缩 DMEM 高糖培养基、小牛血清, 用 1 mol/L 氢氧化钠调节 pH 值至 7.2~7.4。将 Fb 加入此胶原液中混匀, 细胞浓度为  $1 \times 10^5$  个/mL。将胶原-细胞混悬液以 3.5 mL/孔接种于 6 孔培养板, 放置在 37 °C 孵箱孵育 20 min, 待胶原凝固。每孔另添加含体积分数 9% 小牛血清的 DMEM 高糖培养液(2 mL)孵育 72 h。

### 1.2.3 种子细胞重建三维皮肤等价物(TDSE)

将第 2 代 ESC 以  $1 \times 10^6$  个/孔均匀接种于上述制备的真皮等价物表面, 常温孵育 20 min。另重新添加 DK-SFM 培养基 2 mL/孔, 37 °C 孵育过夜。24 h 后更换为含体积分数 9% 小牛血清、0.1 mmol/L 谷氨酰胺、0.1 mmol/L 非必需氨基酸的 FAD 培养液(3 mL/孔)。以后每 2 天换液 1 次。浸没培养 1 周后, 将培养物置于不锈钢筛网上进行气-液界面培养 15 d。

**1.2.4 建立离体 TDSE 冻伤模型** 将灭菌金属棒(半径 4 mm)一端放置于液氮中预冻 5 min, 垂直置于重建的 TDSE 模型表面滞留 10 s, 制备成全层皮肤冻伤创面(呈孔形)模型<sup>[9]</sup>。

## 1.3 检测指标

**1.3.1 TDSE 组织结构观察** 取 TDSE 标本, 经 40 g/L 多聚甲醛固定, 常规处理后 HE 染色, 光学显微镜下观察组织结构。

**1.3.2 免疫组织化学染色检测 TDSE 冻伤模型创缘 SDF-1 的表达变化** 收集单纯冻伤后 3、7 d 的培养物, 40 g/L 多聚甲醛固定 24 h 后, 常规脱水、浸蜡、石蜡包埋标本, 切片(厚度 4  $\mu$ m)。检测 SDF-1(抗体稀释度 1:50)表达, 实验操作按照 SP-9002 试剂盒说明书进行。二氨基联苯胺(DAB)显色, 光学显微镜下观察。

**1.3.3 免疫组织化学染色检测 TDSE 冻伤模型中 ESC 分布** TDSE 同前制成冻伤模型后, 分为对照组、SDF-1 组、AMD3100 组。对照组创面区添加 PBS 50  $\mu$ L/孔; SDF-1 组创面区添加 100 ng/mL SDF-1, 50  $\mu$ L/孔; AMD3100 组创面区预先加入 SDF-1 受体 CXCR4 的特异性拮抗剂 100 ng/mL AMD3100(50  $\mu$ L/孔), 处理 30 min 后, 添加 100 ng/mL SDF-1, 50  $\mu$ L/孔。以上每组设 2 个复孔, 实验重复 3 次。于伤后 3、7 d 收获各组培养物, 用 40 g/L 多聚甲醛固定 24 h 后, 常规脱水、浸蜡、石蜡包埋标本, 切片(厚度 4  $\mu$ m)。免疫组织化学法检测整合素  $\beta_1$ (抗体稀释度 1:50)的表达情况。实验操作严格按 SP-9001 试剂盒说明书进行, DAB 显色, 光学显微镜下观察。

## 2 结果

### 2.1 TDSE 大体形态及组织结构观察

HE 染色显示, TDSE 表皮分层多, 细胞排列紧密, 大致分为基底层、棘层、角质层(图 1a)。

### 2.2 TDSE 冻伤模型创缘 SDF-1 的表达变化

TDSE 冻伤后创缘间质内 SDF-1 的表达逐渐增加。DAB 染色显示, 伤后 3 d 细胞间质呈棕黄色(图 1b), 伤后 7 d 变为深棕色(图 1c)。创缘表皮细胞的数量、分层厚度都明显增加。

### 2.3 SDF-1/AMD3100 作用对 TDSE 冻伤模型中 ESC 分布的影响

伤后 3 d, SDF-1 组整合素  $\beta_1$  阳性细胞位于基底层, 细胞膜呈棕色(图 2a), 与对照组(图 2b)接近; AMD3100 组整合素  $\beta_1$  阳性细胞排列松散, 数量较少(图 2c)。伤后 7 d, SDF-1 组整合素  $\beta_1$  在基底层和邻近创面区的表达(图 2d)明显比其他 2 组(图 2e, f)增强, 且表皮细胞层数增多、排列紧密, 部分整合素  $\beta_1$  阳性细胞脱离基底层, 向创面迁移趋势更加明显。AMD3100 组伤后 7 d(图 2f)与伤后 3 d(图 2c)时相比无明显变化, 创缘新生细胞数量少, 向创面迁移不明显。AMD3100 组伤后 7 d 整合素  $\beta_1$  阳性细胞(图 2f)少于对照组(图 2e), 细胞分层更少。

## 3 讨论

研究表明, 创面的上皮化在伤后数小时即开始, 创缘表皮细胞表型发生改变, 表皮细胞产生的胶原蛋白酶, 以及表皮细胞分泌的纤溶酶原活化物激活纤溶酶, 共同降解胶原与 ECM<sup>[10]</sup>。这些表现与细胞受趋化因子的诱导作用发生迁移前的改变极为相似。随着时间的推移, ESC 不像在正常皮肤中那样





图 1 三维皮肤等价物(TDSE)组织结构观察及其冻伤后创缘基质细胞衍生因子 1 的表达(箭头示表皮层厚度)。a. TDSE 表皮分层多, 细胞排列紧密 HE × 400; b. 伤后 3 d TDSE 创缘表皮层细胞间质内阳性染色浅、细胞分层少且表皮不完整 二氨基联苯胺(DAB) × 400; c. 伤后 7 d TDSE 创缘细胞间质内阳性染色加深且细胞分层多, 表皮增厚 DAB × 400

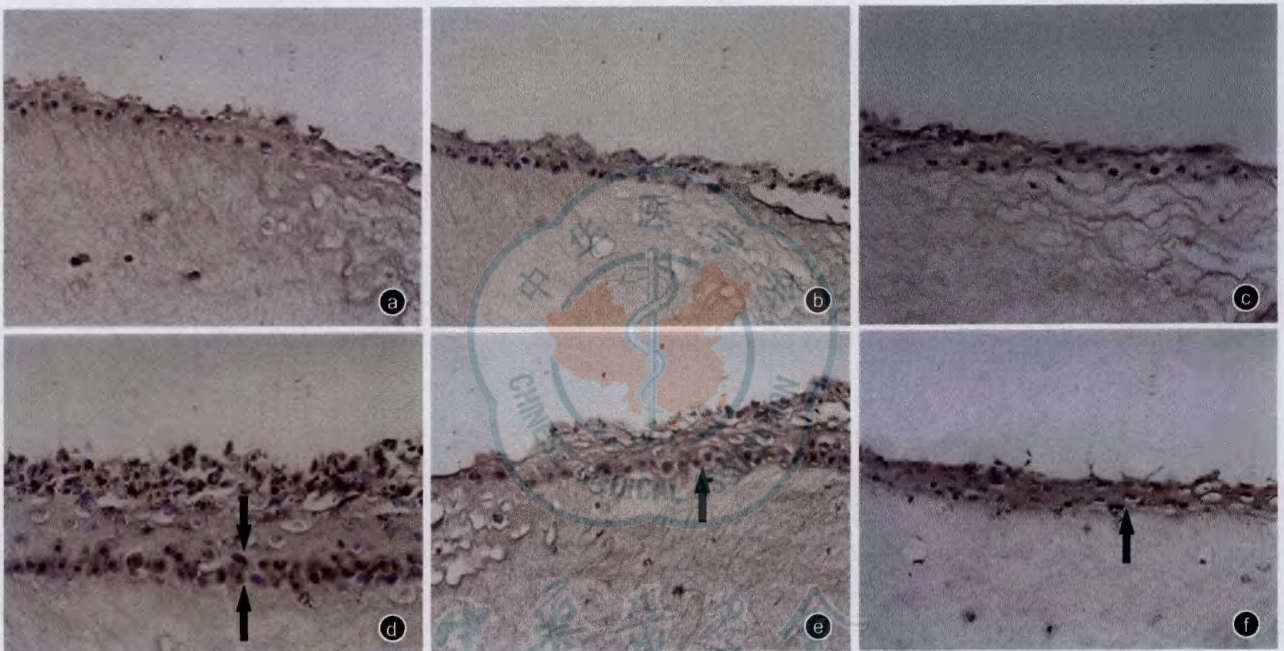


图 2 各组三维皮肤等价物全层冻伤后创缘整合素  $\beta_1$  表达(箭头示基层整合素  $\beta_1$  阳性细胞) 二氨基联苯胺 × 400。a. 伤后 3 d, 基质细胞衍生因子 1(SDF-1)组创缘细胞的迁移运动与对照组相似; b. 伤后 3 d, 对照组表皮细胞向创缘迁移; c. 伤后 3 d, AMD3100 组基层细胞排列松散; d. 伤后 7 d, SDF-1 组表皮层明显增厚, 基层整合素  $\beta_1$  阳性细胞数量更多, 且部分细胞不局限于基层, 而在近似棘层、颗粒层的区域分布; e. 伤后 7 d, 对照组整合素  $\beta_1$  阳性细胞数量增多, 表皮层增厚; f. 伤后 7 d, AMD3100 组整合素  $\beta_1$  阳性细胞少见, 细胞分层少

呈单层片状散在分布于表皮基层, 而是在棘层或颗粒层出现, 且越接近创面 ESC 越密集。其数量随着创面的缩小逐渐增加, 至创面愈合、上皮化, 这些细胞仍然存在, 随着愈合创面表皮脚的出现而逐渐减少或消失。这种 ESC 的异位现象称为再分布<sup>[11]</sup>。

这些现象反映: 创伤过程可能启动复杂的细胞或者细胞因子通过特定的信号通路诱导 ESC 分化迁移, 参与创面修复。我们选择进行离体冻伤模型实验, 是为了排除在体实验中多种复杂因素的影响, 单独对趋化因子 SDF-1 的作用进行研究。

SDF-1 是 CXC 趋化因子家族的一员, CXCR4 是其特异性受体。Pablos 等<sup>[12]</sup>的研究表明, 正常皮肤表皮、真皮内的间质细胞分泌 SDF-1 并呈基础性表

达; 张谊等<sup>[13]</sup>的动物实验证实, 伤后创缘 SDF-1 有不同程度的高表达, 为可控性表达。笔者观察到, TDSE 冻伤后创缘间质内 SDF-1 的表达量逐渐增加, 表皮细胞数量也增加, 其变化趋势一致。因此笔者推测 SDF-1 可能是冻伤后创缘残余的表皮细胞或者新生表皮细胞分泌的。SDF-1 单独作用于创缘, 可以引起 ESC 从基层向上层分化和向创缘迁移运动。而应用 CXCR4 的拮抗剂 AMD3100 干预后, 再次应用 SDF-1, 上皮化的过程进展缓慢, 说明 SDF-1 促 ESC 迁移运动的作用受到抑制, 结合 ESC 表面表达 CXCR4<sup>[6]</sup>, 笔者认为 ESC 向创面的迁移运动受到 SDF-1/CXCR4 轴的调控, 与多种成体干细胞受到调控的机制类似。



有研究报道, SDF-1 调控 CD34<sup>+</sup> 造血干细胞的迁移是通过非典型蛋白激酶 C- $\zeta$  (atypical PKC- $\zeta$ ) 信号途径发生作用的, 即 SDF-1 启动干细胞迁移在 PKC- $\zeta$  活化的前提下才能进行, 过表达 PKC- $\zeta$  的 G2 和 U937 细胞具有对 SDF-1 更强的趋化活性<sup>[14]</sup>。在 SDF-1 作用下, ESC 细胞内 PKC- $\zeta$  活性明显增高, 应用 PKC- $\zeta$  信号阻断剂十字孢碱能有效抑制 SDF-1 对 ESC 的诱导趋化作用(另文发表)。

综上所述, SDF-1 加速 ESC 向创面的迁移、促进上皮化过程, 为使难治性创面早日愈合提供了好的思路和方向。

参考文献

[1] Janes SM, Lowell S, Hutter C. Epidermal stem cells. *J Pathol*, 2002, 197(4):479-491.

[2] Kucia M, Dawn B, Hunt G, et al. Cells expressing early cardiac markers reside in the bone marrow and are mobilized into the peripheral blood after myocardial infarction. *Cir Res*, 2004, 95(5):1191-1199.

[3] Vasyutina E, Stebler J, Brand-Saberi B, et al. CXCR4 and Gab1 cooperate to control the development of migrating muscle progenitor cells. *Genes Dev*, 2005, 19(18):2187-2198.

[4] Tögel F, Isaac J, Hu Z, et al. Renal SDF-1 signals mobilization and homing of CXCR4-positive cells to the kidney after ischemic injury. *Kidney Int*, 2005, 67(5):1772-1784.

[5] Imitola J, Raddassi K, Park KI. Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1alpha/CXC chemokine receptor 4 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(52):18117-18122.

[6] 李丹, 李世荣, 曹川. 创面分泌液对表皮干细胞体外趋化作用的实验研究. *重庆医学*, 2007, 36(21):2174-2176.

[7] 李丹, 李世荣, 曹川. 人表皮干细胞的体外分离培养和鉴定. *中国美容医学*, 2007, 16(10):1343-1346.

[8] 司徒振强, 吴军正. 细胞培养. 2 版. 上海: 世界图书出版公司, 2007:58-59.

[9] El Ghalbzouri A, Hensbergen P, Gibbs S, et al. Fibroblasts facilitate re-epithelialization in wounded human skin equivalents. *Lab Invest*, 2004, 84(1):102-112.

[10] Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*, 1999, 341(10):738-746.

[11] 李建福, 付小兵, 盛志勇, 等. 创面愈合过程中创缘表皮干细胞的再分布. *中华医学杂志*, 2003, 83(3):228-231.

[12] Pablos JL, Amara A, Bouloc A, et al. Stromal-cell derived factor is expressed by dendritic cells and endothelium in human skin. *Am J Pathol*, 1999, 155(5):1577-1586.

[13] 张谊, 曹川, 李世荣, 等. 皮肤损伤后 SDF-1 分泌量的变化及其受体 CXCR4 在表皮组织中分布表达的实验研究. *现代生物医学进展*, 2008, 8(8):1061-1062, 1074.

[14] Petit I, Goichberg P, Spiegel A, et al. Atypical PKC-zeta regulates SDF-1-mediated migration and development of human CD34<sup>+</sup> progenitor cells. *J Clin Invest*, 2005, 115(1):168-176.

(收稿日期: 2010-02-26)

(本文编辑: 莫愚)

· 负压封闭引流 (VSD) 技术治疗专栏 ·

负压封闭引流技术在 II 度烧伤创面中的应用

VSD 治疗可减少 II 度烧伤残余创面, 瘢痕轻、愈合质量高; 能迅速上皮化, 促进创面愈合; 引流充分、促进水肿消退、去除炎症介质; 封闭创面, 避免交叉感染; 减少换药次数及换药时带给患者的痛苦。

以下资料由解放军总医院第一附属医院全军烧伤研究所申传安教授提供。



图 1 VSD 治疗患儿胸腹部浅 II 度热烫伤创面。a. 伤后第 2 天; b. 持续 VSD 治疗; c. VSD 治疗第 9 天创面完全上皮化



本栏目由武汉维斯第医用科技有限公司资助