

· 短篇论著 ·

大鼠表皮干细胞中 α 促黑素细胞激素及其受体的表达

徐苗苗 邓先见 姚波 高成 王强 王永飞 刘倩 程勇

【摘要】 目的 观察体外培养的大鼠表皮干细胞(ESC)中 α 促黑素细胞激素(α -MSH)及黑皮质素受体 1(MC1R)的表达情况。方法 采用改良 IV 型胶原快速黏附法培养大鼠 ESC,倒置相差显微镜下观察细胞生长形态变化,并采用免疫荧光法和流式细胞仪分别观察 ESC 标志物细胞角蛋白 19(CK19)和整合素 β_1 、整合素 α_6 和 CD71 表达,通过免疫荧光法检测 ESC 中 α -MSH 的表达以及 ESC 标志物与 MC1R 共染的表达。结果 (1)倒置相差显微镜下可见,接种 10 min 后即有细胞贴壁;培养 2~3 d 时有小克隆形成;培养 4~5 d,细胞增殖明显加快,克隆逐渐增大;培养 7~8 d,细胞生长至 70%~80% 融合,呈铺路石状,折光性好。(2)免疫荧光法检测结果显示所分离的细胞均表达 ESC 标志物 CK19 和整合素 β_1 ,流式细胞仪检测结果显示所分离的细胞整合素 α_6 阳性表达率为 88.1%,CD71 阳性表达率为 1.3%。综上,所培养的细胞鉴定为 ESC。(3)免疫荧光法检测结果显示 ESC 表达 α -MSH,同时 CK19 与 MC1R、整合素 α_6 与 MC1R 荧光双染也呈阳性表达。结论 体外培养的大鼠 ESC 可以表达 α -MSH 及 MC1R。

【关键词】 表皮; 干细胞; 受体; 黑皮质素, I 型; 黑素细胞刺激激素

表皮干细胞(ESC)作为皮肤组织的特异性干细胞,主要分布于表皮基底层、毛囊隆突及皮脂腺等部位,是皮肤及其附属器产生、创面修复和重塑的关键条件^[1,2]。研究显示, α 促黑素细胞激素(α -MSH)不仅能促进皮肤黑素生成,维持色素代谢平衡,还具有抗炎、抗菌、退热、营养神经、保护心血管功能、影响动物生物学行为、调节神经内分泌等作用^[3]。近年来关于 α -MSH 对皮肤胶原代谢、炎症反应及细胞凋亡等病理生理调控作用的研究日趋增多,而黑皮质素受体 1(MC1R)是广泛分布于皮肤等多种组织中的一种 α -MSH 特异性受体。

本研究采用 IV 型胶原快速黏附法分离培养大鼠 ESC,检测 ESC 中 α -MSH 及 MC1R 的表达情况,以期为进一步研究 α -MSH 能否调控 ESC 的增殖和分化,从而参与创面修复过程等提供新的实验线索和思路。

1 材料与方 法

1.1 动物及主要材料

新生 1 d 龄无特殊病原体级 SD 大鼠 75 只,体质量约 10 g,雌雄不限,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所动物中心提供。

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2014.05.023

基金项目:第三军医大学“创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室开放基金”(SKLKF201203);湖南省医药卫生科研计划(B2013-152);郴州市科技计划(2012CJ041、2012CJ092)

作者单位:435000 湖北省黄石市中心医院(湖北理工学院附属医院)皮肤科(徐苗苗);第三军医大学大坪医院野战外科研究所(邓先见、姚波);南华大学附属郴州医院烧伤整形美容科(高成、王永飞);广东省清远市人民医院烧伤整形美容科(王强、程勇),检验科(刘倩)

通信作者:程勇,511518,Email:chengyongjohn@gmail.com,电话:0763-3113960

限定性 KC 无血清培养基(DK-SFM)及 FBS 均购自美国 Gibco 公司,2.5 g/L 胰蛋白酶购自美国 Biosharp 公司,人胎盘 IV 型胶原购自美国 Sigma 公司。兔抗小鼠细胞角蛋白 19(CK19)多克隆抗体购自美国 Bioworld 公司,小鼠抗人整合素 β_1 单克隆抗体购自美国 BD 公司,小鼠抗大鼠整合素 α_6 单克隆抗体购自美国 Antigenix 公司,小鼠抗大鼠 CD71 和大鼠 IgG2 α 同型对照均购自美国 BioLegend 公司,7-氨基放线菌素 D(7-AAD)购自中国爱必信(上海)生物科技有限公司,山羊抗大鼠 MC1R 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,兔抗大鼠 α -MSH 多克隆抗体购自英国 Abcam 公司,花青素 3 标记的山羊抗兔 IgG 二抗购自美国 Rockland 公司,四甲基异硫氰酸罗丹明(TRITC)标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司,异硫氰酸荧光素(FITC)标记的驴抗兔 IgG 二抗和驴抗小鼠 IgG 二抗、TRITC 标记的驴抗山羊 IgG 二抗均购自美国 Invitrogen 公司。二氧化碳培养箱购自美国 Thermo Forma 公司,倒置相差显微镜和荧光显微镜购自日本 Olympus 公司,激光扫描共聚焦显微镜购自德国 Carl Zeiss 公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 ESC 的分离与培养 陆续剪取 75 只大鼠背部全层皮肤制作标本。参照文献[4]IV 型胶原快速黏附法并进行改良,2.5 g/L 胰蛋白酶消化皮肤,4℃ 过夜。次日分离表皮、真皮,胰蛋白酶再次 37℃ 消化表皮 5 min,用含体积分数 10% FBS 的 EMEM 培养液终止消化,过滤,以离心半径 12 cm、1 000 r/min 离心 5 min 后弃上清液。用 DK-SFM 培养液调整细胞浓度,将 2.5×10^6 个细胞接种于 100 μ g/mL IV 型胶原包被的 T25 培养瓶(底面积为 25 cm²)中,于 37℃、体积分数 5% 二氧化碳培养箱中孵育 10 min。吸弃未贴壁细胞,PBS 清洗 2 次,之后每隔 1 d 定期换液。倒置相差显微镜下观察细胞生长形态变化。细胞生长至 70%~80% 融合时

常规消化传代,取第 2 代细胞进行后续实验。

1.2.2 免疫荧光法检测 ESC 标志物 IV 型胶原包被 6 张 24 mm × 24 mm 盖玻片,置于 6 孔板中。将细胞以每孔 2×10^5 个接种于盖玻片上培养 48 h。PBS 清洗,丙酮冰上固定 15 min,体积分数 10% 的驴血清及体积分数 10% 山羊血清常温封闭 1 h。加入兔抗小鼠 CK19 一抗(稀释比为 1:50)、小鼠抗人整合素 β_1 一抗(稀释比为 1:50),4 °C 孵育过夜。次日,加入 FITC 标记的驴抗兔 IgG 二抗(稀释比为 1:400)、TRITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗(稀释比为 1:50),37 °C 孵育 1 h,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 4',6-二脒基-2-苯基吡啶孵育 5 min,PBS 代替一抗作阴性对照。抗荧光淬灭封片剂封片,激光扫描共聚焦显微镜下观察。本实验重复 3 次。

1.2.3 流式细胞仪检测 ESC 标志物 PBS 漂洗细胞后,以离心半径 12 cm,1 000 r/min 离心 5 min,分别取 1×10^6 个细胞重新悬浮于 100 μL 小鼠抗大鼠整合素 α_6 一抗稀释液和大鼠 IgG2 α 同型对照(稀释比均为 1:10)及小鼠抗大鼠 CD71 一抗稀释液和大鼠 IgG2 α 同型对照(稀释比均为 1:200),4 °C 孵育 30 min,加入花青素 3 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(稀释比为 1:500),4 °C 避光孵育 30 min 后,加入 5 μL 7-AAD 避光孵育 5 min,流式细胞仪检测。本实验重复 3 次。

1.2.4 免疫荧光法检测 ESC 中 α -MSH 的表达及 ESC 标志物与 MC1R 共染的表达 方法同 1.2.2。检测 α -MSH 的表达:分别加入兔抗大鼠 α -MSH 一抗(稀释比为 1:100),4 °C

孵育过夜,再加入 FITC 标记的驴抗兔 IgG 二抗(稀释比为 1:400)。MC1R 与 ESC 标志物 CK19 共染:分别加入山羊抗大鼠 MC1R 一抗(稀释比为 1:50)、兔抗小鼠 CK19 一抗(稀释比为 1:50),4 °C 孵育过夜,再加入 TRITC 标记的驴抗山羊 IgG 二抗(稀释比为 1:400)、FITC 标记的驴抗兔 IgG 二抗(稀释比为 1:400);MC1R 与 ESC 标志物整合素 α_6 共染:分别加入山羊抗大鼠 MC1R 一抗(稀释比为 1:50)、小鼠抗大鼠整合素 α_6 一抗(稀释比为 1:40),4 °C 孵育过夜,再加入 TRITC 标记的驴抗山羊 IgG 二抗(稀释比为 1:400)、FITC 标记的驴抗小鼠 IgG 二抗(稀释比为 1:400)。本实验重复 3 次。

2 结果

2.1 原代培养细胞的形态学观察

倒置相差显微镜下可见,接种 10 min 后即有细胞贴壁;培养 2~3 d,即有小克隆形成,细胞呈不规则椭圆形;培养 4~5 d,细胞增殖明显加快,克隆逐渐增大;培养 7~8 d,细胞生长至 70%~80% 融合,呈铺路石状,折光性好。见图 1。

2.2 免疫荧光法及流式细胞仪检测 ESC 标志物

激光扫描共聚焦显微镜显示,本实验分离培养的细胞可同时表达 CK19 及整合素 β_1 。见图 2。流式细胞仪检测显示,分离培养的细胞高表达整合素 α_6 ,阳性率为 88.1%;低表达 CD71,阳性率为 1.3%。

综上,经鉴定本实验分离培养的细胞为 ESC。

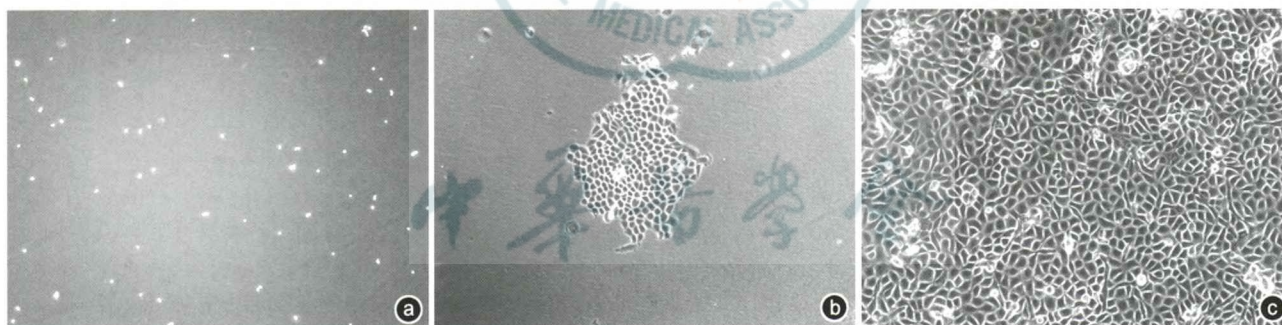
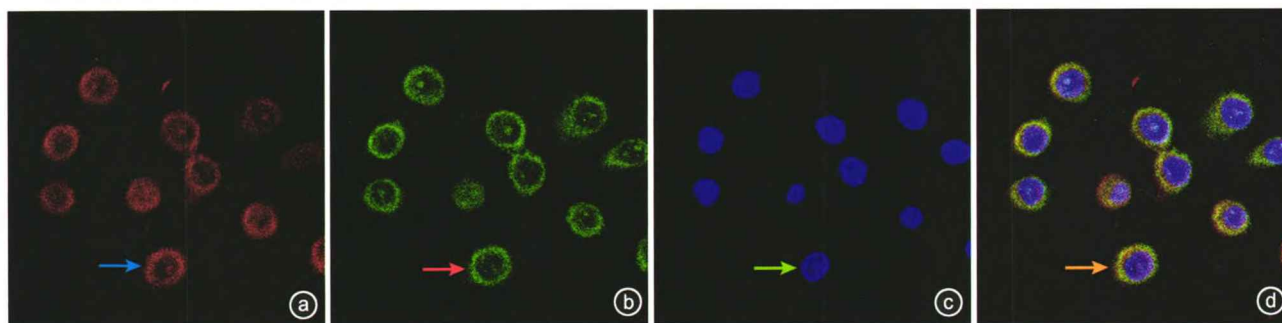
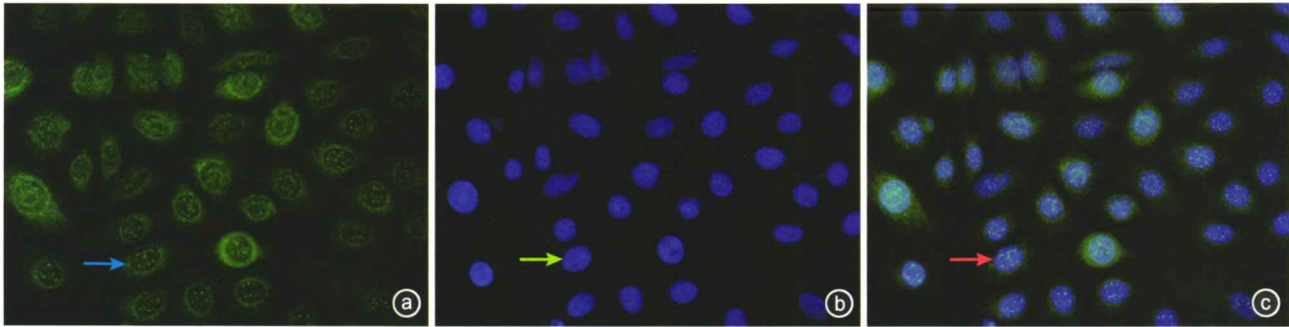


图 1 原代培养细胞形态 倒置相差显微镜 $\times 100$ 。a. 接种 10 min 即有细胞贴壁;b. 培养 4~5 d,克隆增大;c. 培养 7~8 d,细胞生长融合度较高,呈铺路石状,折光性好



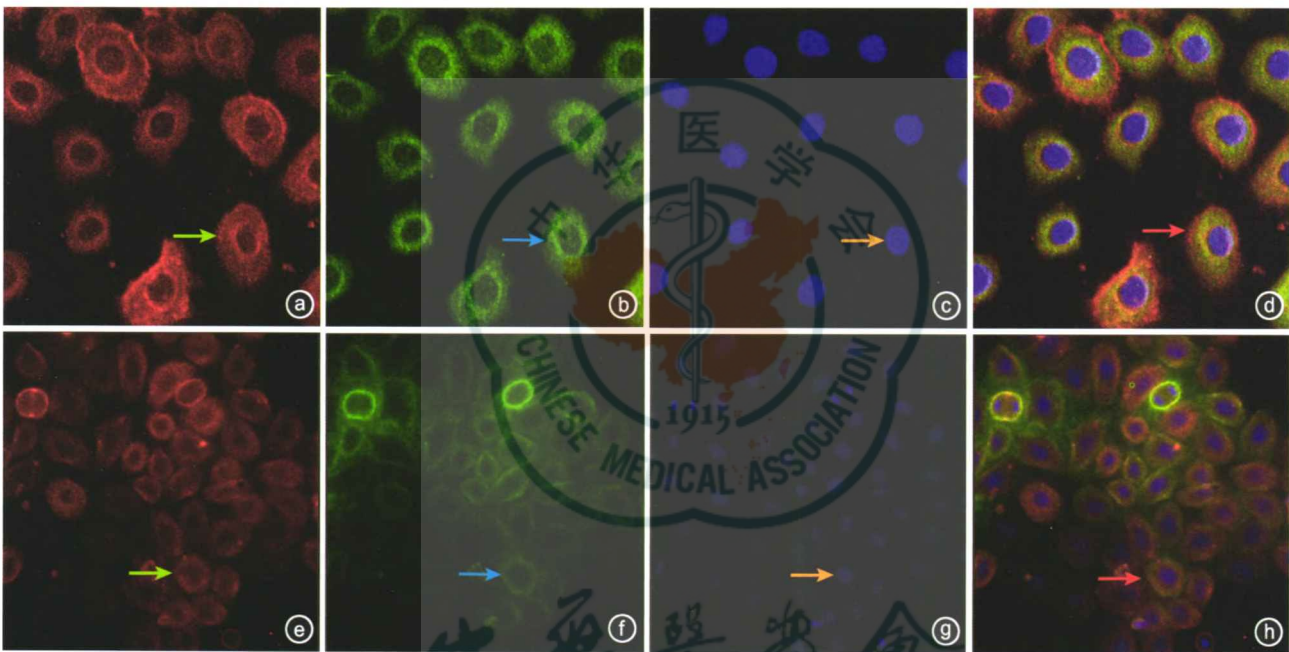
注:四甲基异硫氰酸罗丹明(TRITC)染色阳性细胞呈红色荧光,异硫氰酸荧光素(FITC)染色阳性细胞呈绿色荧光,4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色阳性细胞核呈蓝色荧光

图 2 激光扫描共聚焦显微镜观察大鼠表皮干细胞标志物整合素 β_1 和细胞角蛋白 19(CK19)的表达。a. 大多数细胞中整合素 β_1 呈阳性表达(→),主要表达位于细胞膜 TRITC $\times 400$;b. 细胞质中的 CK19 呈强阳性表达(→) FITC $\times 400$;c. 细胞核 DAPI 染色(→) DAPI $\times 400$;d. 图 2a、b、c 合成图,可见细胞同时表达整合素 β_1 和 CK19(→) TRITC-FITC-DAPI $\times 400$



注:异硫氰酸荧光素(FITC)染色阳性细胞呈绿色荧光,4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染色阳性细胞核呈蓝色荧光

图3 荧光显微镜检测大鼠表皮干细胞中α-MSH的表达。a. 细胞质中的α-MSH呈强阳性表达(→) FITC×200; b. 细胞核DAPI染色(→) DAPI×200;c. 图3a、b合成图,可见细胞表达α-MSH(→) FITC-DAPI×200



注:四甲基异硫氰酸罗丹明(TRITC)染色阳性细胞呈红色荧光,异硫氰酸荧光素(FITC)染色阳性细胞呈绿色荧光,4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染色阳性细胞核呈蓝色荧光

图4 激光扫描共聚焦显微镜观察大鼠表皮干细胞标志物与黑皮素受体1(MC1R)共染的表达。a. 细胞中MC1R呈阳性表达(→),主要位于细胞膜 TRITC×400;b. 细胞质中的细胞角蛋白19(CK19)呈强阳性表达(→) FITC×400;c. 细胞核DAPI染色(→) DAPI×400;d. 图4a、b、c合成图,可见细胞同时表达MC1R和CK19(→) TRITC-FITC-DAPI×400;e. 细胞中MC1R呈阳性表达(→),主要位于细胞膜 TRITC×200;f. 细胞质中整合素α₆呈阳性表达(→) FITC×200;g. 细胞核DAPI染色(→) DAPI×200;h. 图4e、f、g合成图,可见细胞同时表达MC1R和整合素α₆(→) TRITC-FITC-DAPI×200

2.3 免疫荧光法检测 ESC 中 α-MSH 及 ESC 标志物与 MC1R 共染的表达

在荧光显微镜和激光扫描共聚焦显微镜下观察到,ESC 表达 α-MSH,同时 CK19 与 MC1R、整合素 α₆ 与 MC1R 荧光双染也呈阳性表达。见图 3,4。

3 讨论

ESC 是皮肤组织特有的干细胞,可自我更新,具有强大的增殖能力和多向分化潜能,不仅维持皮肤日常的新陈代谢及内环境稳态,且与创面修复密切相关^[2,5]。α-MSH 是一种由 13 个氨基酸残基组成的内源性神经免疫调节肽,其特异性受体 MC1R 是一种经过 7 次跨膜的 G 蛋白耦联型受体。

近年来研究表明,MC1R 在多种类型的皮肤组织细胞中均有表达,并与 α-MSH 有高度的亲和性^[6]。α-MSH 与 MC1R 结合后以旁分泌和自分泌的方式,通过促进细胞分化、抗纤维化、抑制炎症反应和细胞凋亡等途径参与皮肤病理生理的调控过程^[3,7-8]。Ito 等^[9]采用谱系追踪法研究显示,皮肤受到损伤后 ESC 即从基底层壁龛内及毛囊部迁移到创面,增殖分化成 KC,参与创面修复过程。研究表明,皮肤中毛囊和基底层正是表达 MC1R 的细胞富集的部位^[10]。Muffley 等^[11]证实小鼠皮肤损伤模型中,伤后 3、7 d 在伤口边缘上皮移行区基底部的 KC 中有 α-MSH 和 MC1R 表达,而伤后 14、21 d 仅在毛囊组织中检测到二者表达。α-MSH 及 MC1R 在伤口中的这种时空表达变化,与 ESC 被动员并向创面迁移的规

律^[12-13]吻合。

笔者推测 α -MSH 也可通过旁分泌和自分泌的方式对 ESC 促进创面修复、维持皮肤正常组织结构和细胞内环境稳定等生物学行为进行调控。本实验室以新生 SD 大鼠背部皮肤为材料,经 ESC 特异性标志物整合素 β_1 /CK19、整合素 α_6 /CD71 抗体双标记鉴定^[14],确认成功分离培养出 ESC 后,通过免疫荧光法检测 ESC 中 α -MSH 以及 ESC 标志物与 MC1R 共染的表达。结果显示 ESC 中 α -MSH、MC1R 染色均呈阳性,证实培养的大鼠 ESC 同时表达 α -MSH 和 MC1R。这为后续研究 α -MSH 对 ESC 在皮肤病理生理过程中是否具有调控作用奠定了基础。

参考文献

[1] Abbas O, Mahalingam M. Epidermal stem cells: practical perspectives and potential uses[J]. Br J Dermatol, 2009,161(2):228-236.

[2] Doma E, Rupp C, Baccarini M. EGFR-ras-raf signaling in epidermal stem cells:roles in hair follicle development,regeneration, tissue remodeling and epidermal cancers [J]. Int J Mol Sci, 2013,14(10):19361-19384.

[3] Brzoska T, Luger TA, Maaser C, et al. Alpha-Melanocyte stimulating hormone and related tripeptides: biochemistry, antiinflammatory and protective effects in vitro and in vivo, and future perspectives for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases[J]. Endocr Rev,2008,29(5):581-602.

[4] Jensen KB, Driskell RR, Watt FM. Assaying proliferation and differentiation capacity of stem cells using disaggregated adult mouse epidermis[J]. Nat Protoc,2010,5(5):898-911.

[5] Li L, Gu W, Du J, et al. Electric fields guide migration of epi-

dermal stem cells and promote skin wound healing[J]. Wound Rep Reg,2012,20(6):840-851.

[6] Rousseau K, Kauser S, Pritchard LE, et al. Proopiomelanocortin (POMC), the ACTH/melanocortin precursor, is secreted by human epidermal keratinocytes and melanocytes and stimulates melanogenesis[J]. FASEB J, 2007, 21(8):1844-1856.

[7] Yamaguchi Y, Hearing VJ. Physiological factors that regulate skin pigmentation[J]. Biofactors, 2009,35(2):193-199.

[8] Millington GW. Proopiomelanocortin (POMC): the cutaneous roles of its melanocortin products and receptors [J]. Clin Exp Dermatol, 2006, 31(3):407-412.

[9] Ito M, Liu Y, Yang Z, et al. Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis [J]. Nat Med, 2005,11(12):1351-1354.

[10] Böhm M, Metze D, Schulte U, et al. Detection of melanocortin-1 receptor antigenicity on human skin cells in culture and in situ [J]. Exp Dermatol, 1999,8(6):453-461.

[11] Muffley LA, Zhu KQ, Engrav LH, et al. Spatial and temporal localization of the melanocortin 1 receptor and its ligand α -melanocyte-stimulating hormone during cutaneous wound repair [J]. J Histochem Cytochem,2011,59(3):278-288.

[12] Tumber T, Guasch G, Greco V, et al. Defining the epithelial stem cell niche in skin [J]. Science, 2004,303(5656):359-363.

[13] Levy V, Lindon C, Zheng Y, et al. Epidermal stem cells arise from the hair follicle after wounding [J]. FASEB J, 2007,21(7):1358-1366.

[14] Ghadially R. 25 years of epidermal stem cell research [J]. J Invest Dermatol, 2012,132(3 Pt 2):797-810.

(收稿日期:2013-11-13)
(本文编辑:贾津津)

携带皮下穿支血管对五瓣成形术治疗患者四肢蹼状瘢痕挛缩的影响

唐修俊 魏在荣 王达利 祁建平 韩文杰 曾雪琴 王波

【摘要】 目的 探讨携带皮下穿支血管对五瓣成形术治疗患者四肢蹼状瘢痕挛缩的影响。

方法 2008 年 10 月—2013 年 6 月,笔者单位收治 23 例烧伤后四肢关节部位蹼状瘢痕挛缩伴严重功能障碍患者,关节伸展度 110~160°。给予五瓣成形术整复,瘢痕瓣切取中寻找发自肌肉或肌间隔进入瘢痕瓣深筋膜层的穿支血管,结扎瘢痕瓣尖端 1/3 处影响其移位的穿支血管,保留靠近蒂部 2/3 处的穿支血管。结果 术中瘢痕瓣皮下穿支血管的出现率较高,其中腋窝及腋窝处皮下穿支血管出现率较肘部高,五瓣成形中央倒“V”形瓣皮下穿支血管出现率较其他瘢痕瓣高。术后 5 d,21 例患者皮瓣存活;1 例患者肘部三角瓣尖端因张力较大部分坏死,经换药后痊愈;1 例患者腋窝瘢痕表皮薄,缝线处瘢痕瓣表皮坏死破溃,经换药后愈合。术后 20 例患者随访 2~20 个月,瘢痕瓣色泽、质地好,无关节再次挛缩僵硬,关节伸展度 170~180°,恢复正常生活能力。结论 对蹼状瘢痕行五瓣成形术整复时携带瘢痕瓣皮下穿支血管,可避免瘢痕瓣尖端坏死,提高瘢痕瓣成活率,优化整复质量。该手术操作较简便、血供可靠,值得临床推广应用。

【关键词】 瘢痕; 外科皮瓣; 创面修复; 穿支血管