

深度烧伤患者的汗腺重建是现代创伤修复关注的问题,间充质干细胞(MSC)以其丰富的来源、相对简单的分离培养方法和多向分化潜能,成为解决这一难题的研究热点。目前普遍认为,MSC中存在3个胚层的全部基因,作为诱导剂或与目标细胞共培养,可以启动相关基因的表达而实现跨胚层的横向分化,而丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路对该过程的信号转导有重要意义^[1]。众多研究表明,在MSC向成骨细胞、脂肪细胞、心肌细胞和神经元分化的过程中,有1条或多条MAPK通路被激活,而且通路相关激酶的活化水平与MSC表型改变的程度密切相关^[2,3]。本研究旨在观察人骨髓MSC与热休克的人汗腺细胞(SGC)间接共培养时,其表型转化情况,并通过激活或阻断细胞外信号调节激酶(ERK)通路,观察对MSC表型转化的影响,由此判断该过程的信号转导途径。

材料与方法

一、主要材料来源

骨髓标本取自本院胸外科因局限纵隔肿物行开胸切除术患者(男,17岁)的健康肋骨;皮肤标本取自本科行重睑成形术患者(女,16岁)的部分健康上眼睑皮,患者均知情同意。三碘甲状腺原氨酸、半琥珀酰氨化可的松、PD98059、兔抗人ERK和磷酸化ERK(pERK)抗体均购自美国Sigma公司。表皮生长因子(EGF)、DMEM/F12培养基(比例为1:1)、胰蛋白酶、胰岛素-转铁蛋白-亚硒酸钠、特级胎牛血清及Ⅱ型胶原酶均购自美国Gibco BRL公司。小鼠抗人CD34、CD44、CD105、细胞角蛋白(CK)7、CK18、癌胚抗原(CEA)单克隆抗体,辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠、羊抗兔IgG二抗,浓缩型二氨基联苯胺(DAB)试剂盒,异硫氰酸荧光素标记的羊抗小鼠IgG二抗均购自北京中山生物技术有限公司。青霉素和硫酸链霉素购自石家庄华北制药股份有限公司。转膜滤纸购自美国Bio-Rad公司。硝酸纤维素(CN)膜购自美国Millipore公司。

二、检测指标

1. MSC的分离、培养和鉴定:无菌条件下刮除肋骨骨髓后,以含体积分数10%胎牛血清、 1×10^5 U/L青霉素和0.1 g/L硫酸链霉素的DMEM/F12培养基反复冲洗骨髓腔。收集冲洗液接种于25 ml培养瓶,置于37℃、体积分数5% CO₂的细胞培养箱(条件下同)内培养。24 h后更换培养液,弃去未贴壁细胞,以后每2~3天更换1次培养液。细胞生长

达80%融合时,以2.5 g/L胰蛋白酶消化后按1:3传代,留取第3代细胞备用。同时以小鼠抗人CD34、CD44、CD105单克隆抗体为一抗,用免疫细胞化学法检测表达情况。

2. SGC的分离、培养和鉴定:无菌条件下采用D-Hank液反复漂洗眼睑皮肤标本,去除脂肪和凝血后,剪成1 mm×1 mm的小块,加入3 ml含2 g/LⅡ型胶原酶、体积分数5%胎牛血清、 1×10^5 U/L青霉素和0.1 g/L硫酸链霉素的DMEM/F12培养基,置于细胞培养箱内过夜。次日在空气消毒的环境中,于50倍倒置相差显微镜下用50 μl微量移液器吸取单个汗腺至含600 μl SGC培养液(含体积分数5%胎牛血清、10 μg/L EGF、2 μmol/L三碘甲状腺原氨酸、0.4 mg/L半琥珀酰氨化可的松、10 mg/L胰岛素-转铁蛋白-亚硒酸钠、 1×10^5 U/L青霉素及0.1 g/L硫酸链霉素的DMEM/F12培养基)的培养皿(直径60 mm)中常规培养。待细胞贴壁后补加2 ml SGC培养液继续培养,以后每2~3天更换1次培养液。细胞生长达80%融合时,以小鼠抗人CK7、CK18、CEA单克隆抗体为一抗,用免疫细胞化学法检测表达情况。

3. 与SGC共培养的MSC的表型转化及ERK通路在其中作用的检测:对生长达80%融合的原代SGC进行热休克处理:在47℃恒温摇床中放置30 min后,置于细胞培养箱中冷却1~2 h。收集热休克处理后即刻、24 h的培养上清液,均匀混合后以微孔滤器过滤,存于-20℃冰箱备用。取生长接近60%融合的第3代MSC,分为对照组、SGC上清液组、SGC上清液+EGF组和SGC上清液+PD98059组。对照组细胞常规培养;其余3组加入含体积分数30% SGC上清液、体积分数1%胎牛血清、 1×10^5 U/L青霉素和0.1 g/L硫酸链霉素的DMEM/F12培养基,并且后两组再分别添加50 μg/L EGF和10 μmol/L PD98059继续培养。每天观察各组细胞的形态变化,培养7 d时采用流式细胞术检测各组细胞中CK7、CEA的阳性表达率,均重复测定3次;以蛋白质印迹法定性检测ERK和pERK的表达水平。

三、统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 11.0统计软件包进行t检验。

结 果

1. 培养24 h时可见少量MSC贴壁呈梭形(图1)。几天后通过间断摇动培养瓶和更换培养液,去

除漂浮的和少量贴壁的非梭形细胞。二步免疫细胞化学法染色结果显示为纯化的 MSC, 表达 CD44 和 CD105 而不表达 CD34 (图 2)。



图 1 培养 24 h 时骨髓 MSC 呈梭形 倒置相差显微镜 ×200

2. 培养 24~48 h 时 SGC 基本贴壁, 5~7 d 开始有多边形细胞长出; 培养 2 周时细胞持续增殖融合成片。二步免疫细胞化学法染色结果显示为纯化的 SGC, 表达 CK7, CK18 和 CEA, 并保持上皮细胞分化标记。

3. 各组 MSC 细胞在培养过程中形态无明显变化。培养 7 d 时 SGC 上清液组 CK7, CEA 的阳性表达率明显高于对照组 ($P < 0.01$); SGC 上清液 + EGF 组, SGC 上清液 + PD98059 组上述两项指标明显高于或低于 SGC 上清液组 ($P < 0.01$)。见表 1。蛋白质印迹法检测结果显示, 各组细胞的 ERK 表达水平相当; 但 pERK 水平以 SGC 上清液 + EGF 组最高, SGC 上清液组次之, SGC 上清液 + PD98059 组和对照组几乎无表达 (图 3)。

表 1 各组细胞培养 7 d 时 CK7, CEA 阳性表达率的比较 (%) ($\bar{x} \pm s$)

组别	重复测定(次)	CK7	CEA
对照组	3	1.12 ± 0.05	0.51 ± 0.03
SGC 上清液组	3	5.76 ± 0.10*	2.01 ± 0.09*
SGC 上清液 + EGF 组	3	7.31 ± 0.21**	7.27 ± 0.12**
SGC 上清液 + PD98059 组	3	1.63 ± 0.11*	1.54 ± 0.07*

注: * 与对照组比较, $P < 0.01$; 与 SGC 上清液组比较, $P < 0.01$



图 2 人 MSC 纯化后免疫细胞化学染色结果。a. CD44 表达阳性 DAB ×100; b. CD105 表达阳性 DAB ×200; c. 不表达 CD34 DAB ×200

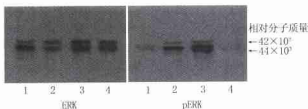


图 3 采用蛋白质印迹法检测各组 MSC 的 ERK 与 pERK 表达水平。1. 对照组; 2. SGC 上清液组; 3. SGC 上清液 + EGF 组; 4. SGC 上清液 + PD98059 组

讨论

浅度烧伤的患者, 残存汗腺以深部未受创部分为模板, 依赖于细胞的增殖和分化获得重建; 但大面积深度烧伤患者常伴有汗腺毁损, 皮肤无法通过排汗实现体温调节, 严重影响其生活质量。迄今为止尚无一种人工皮肤能完全重建毛囊、皮脂腺、汗腺等皮肤附属结构。MSC 来源丰富, 分离培养相对简单且具有多向分化潜能, 有望通过对其进行诱导分化, 重建具有正常解剖结构和生理功能的汗腺^{4,5}。

Friedenstein 等⁹¹在骨髓抽取物中首次发现 MSC, 它们能贴附于塑料培养瓶壁, 并且是成纤维细胞、内皮细胞、成骨细胞、脂肪细胞等骨髓基质细胞的共同来源。本实验采用直接贴壁法分离和培养人 MSC, 免疫细胞化学染色提示其表达 CD44 和 CD105, 不表达 CD34, 为纯化的 MSC。

汗腺位于人体大部分皮肤的真皮和皮下组织, 本实验利用胶原酶消化和微量移液器反复吸取分离汗腺。在合适的作用时间内, 胶原酶只分解胞外基质中的胶原, 使汗腺从邻近组织游离, 对腺体的增生能力无明显影响。另外, 与既往使用镊子挑取汗腺的方式相比, 微量移液器反复吸取汗腺对组织的损伤更小, 也有效地避免了其他成分混入。对成人和胎儿皮肤及附属结构的免疫组织化学分析结果表明, CK18, CEA 仅在汗腺表达, CK7, CK19 存在于汗腺和毛囊外根鞘, 同时 SGC 还表达 CK8, CK14 和

CK17,联合检测以上几项指标可以作为 SGC 鉴定的依据^[7,8]。本实验中原代培养的 SGC 表达 CK7、CK18 和 CEA,可以认为是纯化的 SGC。

MSC 具有自我更新和多向分化潜能,在机体损伤时它们可归巢至受损部位,通过直接分化为同类型细胞或提供适合组织更新的微环境而促进其修复^[9],损伤环境中可能含有促进 MSC 横向分化的因素^[10]。本实验观察了热休克后 SGC 的上清液对 MSC 表型转化的影响。加入 SGC 上清液培养 7 d 时,细胞的 CK7 和 CEA 阳性表达率明显高于对照组。这表明 SGC 在热损伤时会释放出某些因子,参与 MSC 向 SGC 分化。

机体损伤的微环境中包含了 MSC 分化启动信号,但通过何种途径传递到细胞内是大家关注的问题。目前比较明确的信号转导通路包括 Wnt、Notch/delta/jagged、Ca²⁺ 和 MAPK 通路,其中 MAPK 通路又在真核细胞中的高度保守性及可介导细胞分化、生长、分裂和实现功能协调而受到重视。已经发现的 MAPK 通路有 5 条: ERK 1/2、c-Jun 氨基末端激酶(JNK) s1/2 /3、p38 $\alpha/\beta/\gamma$ / δ 、ERK 3 /4 和 ERK5,它们可被如生长因子、炎性细胞因子(肿瘤坏死因子等)、热休克、物理化学因素、缺氧、紫外线等胞外信号激活,引起激酶序列磷酸化,并作用于相应的转录因子,启动目的基因的转录^[11]。

诸多研究表明,类似的信号转导通路参与相同胚层的细胞分化,如 Wnt、细胞骨架张力、Notch/delta/jagged、过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR) γ 等通路均参与了 MSC 分化为骨、软骨和脂肪细胞的过程^[12]。MSC 与 SGC 同属于外胚层细胞,鉴于 ERK 通路在 MSC 分化为神经细胞过程中的重要作用^[13],从而选择该通路来研究 MSC 转化为 SGC 的信号调控机制。PD98059 是 ERK 通路中 MAPK 激酶(MEK)1 的特异性抑制剂,它的工作浓度为 10 ~ 50 $\mu\text{mol/L}$,本实验选用了 10 $\mu\text{mol/L}$ 。在激动剂方面选择了 EGF,它能引起 erbB1/2 的磷酸化而激活 ERK 途径^[14],在汗腺形成的过程中发挥着重要作用^[8]。EGF 浓度为 15 ~ 100 $\mu\text{g/L}$ 时可诱导婴儿角质形成细胞分化为汗腺,对细胞基本无不良影响^[8],因此我们选用了 50 $\mu\text{g/L}$ 的 EGF 来诱导 MSC 向 SGC 分化。

本研究采用蛋白质印迹法测定 MSC 中 pERK 水平,以明确 ERK 通路的活化情况,同时应用 EGF、PD98059 分别激活和抑制该通路,观察它们对 MSC 表型转化的影响。结果表明,热休克 SGC 的上清液

能引起 MSC 中 ERK 通路的激活并伴有 CK7、CEA 阳性表达率升高,应用 EGF 进一步激活此通路后 CK7 和 CEA 阳性细胞明显增多;而 PD98059 能抑制 ERK 通路的激活,并使 CK7 和 CEA 阳性表达率显著降低。这表明,ERK 通路在 MSC 分化为 SGC 的过程中具有重要作用,对该通路的调节可能会影响 MSC 的分化方向和程度。若能在体内促使 MSC 适度地分化为 SGC,在皮肤的功能重建上将具有非常重要的意义。

参 考 文 献

- 1 Gredinger E, Gerber AN, Tamir Y, et al. Mitogen-activated protein kinase pathway is involved in the differentiation of muscle cells. *J Biol Chem*, 1998, 273: 10436 - 10444.
- 2 Diefenderfer DL, Osyczka AM, Reilly GC, et al. BMP responsiveness in human mesenchymal stem cells. *Connect Tissue Res*, 2003, 44 Suppl 11: 305 - 311.
- 3 Chen YJ, Wurtz T, Wang CJ, et al. Recruitment of mesenchymal stem cells and expression of TGF-beta 1 and VEGF in the early stage of shock wave-promoted bone regeneration of segmental defect in rats. *J Orthop Res*, 2004, 22: 526 - 534.
- 4 付小兵,李建福,盛志勇. 表皮干细胞: 实现创面由解剖修复到功能修复飞跃的新策略. *中华烧伤杂志*, 2003, 19: 5 - 7.
- 5 付小兵. 利用成体干细胞可塑性潜能重建受创皮肤解剖和生理功能研究的现状与展望. *中华实验外科杂志*, 2003, 20: 965 - 966.
- 6 Friedenstien AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol*, 1974, 2: 83 - 92.
- 7 Demirkenen C, Hoede N, Moll R. Epithelial markers and differentiation in adnexal neoplasms of the skin: an immunohistochemical study including individual cytokeratins. *J Cutan Pathol*, 1995, 22: 518 - 535.
- 8 Takatori S, Mitsuyoshi M, Toshiyuki I, et al. Keratinocytes can differentiate into eccrine sweat ducts in vitro: involvement of epidermal growth factor and fetal bovine serum. *J Dermatol Sci*, 2003, 33: 141 - 150.
- 9 Rombouts WJ, Ploemacher RE. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia*, 2003, 17: 160 - 170.
- 10 Rutenberg MS, Hamazaki T, Singh AM, et al. Stem cell plasticity, beyond alchemy. *Int J Hematol*, 2004, 79: 15 - 21.
- 11 Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004, 68: 320 - 344.
- 12 Nuttall ME, Gimble JM. Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications. *Curr Opin Pharmacol*, 2004, 4: 290 - 294.
- 13 Joannides A, Gaughwin P, Scott M, et al. Postnatal astrocytes promote neural induction from adult human bone marrow-derived stem cells. *J Hematother Stem Cell Res*, 2003, 12: 681 - 688.
- 14 Rescan C, Bras SL, Lefebvre VH, et al. EGF-induced proliferation of adult human pancreatic duct cells is mediated by the MEK/ERK cascade. *Lab Invest*, 2005, 85: 65 - 74.