

· 论著摘要 ·

人毛囊外根鞘细胞的培养

唐建兵 陈璧 汤朝武 胡大海 董茂龙

以往研究表明,外根鞘的隆突区可能存在毛囊干细胞^[1],利用干细胞的无限增殖能力和多能分化特性可以修复创面,提示外根鞘细胞在创面愈合领域具有重要的研究价值。笔者利用鼠尾胶原作底物,分别采用组织法和胰蛋白酶消化法进行了外根鞘细胞的培养,获得成功。

材料与 方法

1. 材料来源:(1) 含体积分数 10% 小牛血清(杭州四季青公司)的 DMEM 培养基、K-SFM 培养基[含重组表皮生长因子(rEGF) 5 ng/ml]、牛脑垂体物 50 μg/ml(均为美国 Gibco 公司)、胰岛素 5 μg/ml(徐州邦联制药)、氢化可的松 0.4 μg/ml 和庆大霉素 40 U/ml(第四军医大学西京医院制剂)。(2) 取去皱术或头皮扩张器 II 期术后的剩余头皮,清洗消毒后剪成细条状,置于质量浓度 0.25% dispase 酶(日本三光株式会社)4℃ 过夜,16~18 h 后拔出毛囊,使用无血清 DMEM 培养基清洗毛囊 2 次。

2. 培养方法:(1) 组织法培养:将毛囊置于质量浓度 0.075% 胰蛋白酶(洛阳华美试剂公司)+0.01% EDTA(西安化学试剂厂)中 37℃ 消化 5 min,终止消化后将毛囊转移至培养瓶,加少量含体积分数 10% 小牛血清的 DMEM 培养基,3~4 d 后换为 K-SFM 培养基。(2) 消化法培养:将毛囊置于质量浓度 0.125% 胰蛋白酶+0.01% EDTA 中 37℃ 消化 8 min,终止消化后筛网过滤,离心洗涤后用 K-SFM 培养基稀释,按细胞密度 5×10^4 /ml 接种于预先铺有鼠尾胶原(自制)的培养瓶,置于培养箱中培养,2~3 d 后换液。(3) 细胞传代:细胞接近 80% 融合时,用质量浓度 0.125% 胰酶+0.01% EDTA 在 37℃ 下消化 8 min,终止消化后加 K-SFM 液,以 2×10^4 /ml 的密度接种于培养瓶中培养。

3. 细胞生长曲线绘制:将细胞以 2×10^4 /ml 密度传代接种于 96 孔板,分 7 组,每组 4 个复孔,用四氮唑蓝(MTT)法绘制细胞生长曲线。

4. 鉴定:细胞爬片用冰丙酮固定,按照常规方法进行角蛋白 19(K19,福州迈新试剂公司,克隆号:A53-B/A2)免疫组化染色。所用 ABC 试剂盒由武汉博士德公司提供。

结 果

1. 细胞培养:(1) 组织法培养 1 d 后即可见细胞长出,毛囊中段细胞长出最早,细胞呈卵圆形或圆形,细胞间连接紧密,开始时呈复层生长,换用无血清培养基后细胞呈单层生长,增殖速度加快,向外扩展,5~6 d 后局部出现接触抑制。从毛球部生长的细胞体积较大、形态圆、增殖能力较差。(2) 消化法培养的细胞 1 d 后可见细胞贴壁变形,呈多角形、卵

圆形或短棒状,分布比较均匀,细胞增殖速度快,预铺的胶原因分解而从皿底剥离。原代培养细胞 12 d 左右融合。传代细胞呈克隆状生长,6 d 左右融合。所获得的毛囊外根鞘细胞可传 8~10 代。

2. 细胞生长曲线:从生长曲线可以看出,细胞传代后 6 d 左右融合,细胞倍增时间约为 3 d(图 1)。

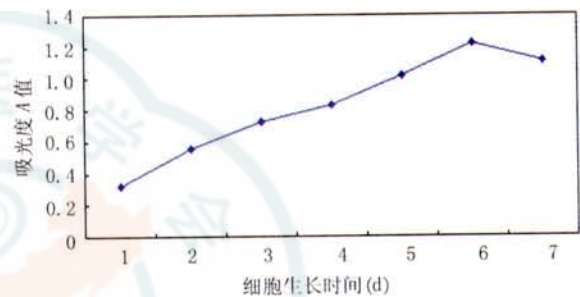


图 1 毛囊外根鞘细胞生长曲线

3. 免疫组化染色结果:细胞爬片 K19 染色阳性。

讨 论

外根鞘细胞与表皮细胞相比具有更强的增殖活性^[2],但在原代培养过程中较难贴壁,可能与外根鞘的分化程度偏低有关。胶原可以促进细胞原代培养时的粘附贴壁。鼠尾胶原中主要含 I 型胶原,细胞与胶原接触后产生胶原酶^[3]。本实验中,可见细胞生长过程中周围胶原逐渐被分解、细胞向外扩增的现象。血清中的多种粘附因子成分复杂,但可促进细胞复层化和分化。本实验在组织法中使用血清进行过渡培养,细胞增殖很快甚至在毛囊周围即发生融合,不易传代。将消化法获得的外根鞘细胞直接利用无血清培养基培养,预先使用胶原作基质,由此获得的大量单层外根鞘细胞可以传 8~10 代,细胞在传代培养时不再使用胶原作基质。

不同培养基的应用比较结果提示,胰岛素和 EGF 具有明显的促增殖活性,而氢化可的松有抑制成纤维细胞增殖的现象。由于 K-SFM 培养基富含铜、硒、锌等微量元素和丰富的必需氨基酸,可以作为外根鞘细胞培养的最好选择。 Ca^{2+} 在表皮细胞的增殖分化中起重要的调节作用,K-SFM 中 Ca^{2+} 浓度较低(0.03 mmol/L),外根鞘细胞在其中呈单层生长,速度较快。外根鞘细胞与表皮细胞同属上皮细胞,但它们在体内表达的角蛋白具有明显差异,表皮细胞表达 K1 和 K10 等分子量较大的分化标记蛋白,毛囊外根鞘表达 K6、K16、和 K19 等分子量较小的增殖相关角蛋白^[4]。Michel 等^[5]报道 K19 可以作为皮肤干细胞的标记,本实验用组织法和消化法培养的外根鞘细胞均表达 K19,K19 是否可作为干细胞的惟一标志物,尚待进一步观察证实。

参 考 文 献

- 伍津津,刘荣卿,唐书谦,等.分段毛囊上皮细胞增殖能力比较.中华皮肤科杂志,1999,32:171-173.

作者单位:510010 广州军区广州总医院整形外科(唐建兵);
第四军医大学西京医院烧伤科(陈璧、汤朝武、胡大海、董茂龙)

2 Jones PH. Isolation and characterization of human epidermal stem cells. Clin Sci (Colch), 1996, 91: 141-146.

3 Pilcher BK, Dumin J, Schwartz MJ, et al. Keratinocyte collagenase-1 expression requires an epidermal growth factor receptor autocrine mechanism. J Biol Chem, 1999, 9: 274: 10372-10381.

4 Schirren CG, Burgdorf WHC, Sander CA, et al. Fetal and adult hair follicle: An immunohistochemical study of anticytokeratin antibodies in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue. Am J Dermatopathol, 1997, 19: 334-340.

5 Michel M, Torok N, Godbout MJ, et al. Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro; keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. J Cell Sci, 1996, 109: 1017-1028.

(收稿日期: 2001-11-06)

(本文编辑: 王旭)

· 经验交流 ·

35 例烧伤患者难愈创面的治疗

李罗珠 于益鹏 孙步梅 陈传俊 陈玉林

笔者单位自 1992 年 1 月~2000 年 11 月, 收治烧伤后难愈创面 35 例, 经全身及局部治疗, 取得良好的效果, 现报告如下:

临床资料: 本组 35 例, 男 19 例, 女 16 例; 年龄 21~48 岁, 平均 35 ± 13 岁; 致伤原因: 火焰烧伤 23 例, 化学烧伤 7 例, 电弧烧伤 5 例。难愈创面面积 10%~50% (平均 23% ± 17%) TBSA, 均为 III 度, 且经清创、皮片移植、局部抗生素换药等治疗而未能愈合者。本组 35 例中, 感染 27 例: 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 19 例; 变异型大肠杆菌 2 例; 铜绿假单胞菌 3 例; 嗜水/豚鼠气单胞菌 3 例。药敏为: 大部分细菌对青霉素类、氨基糖甙类、奎诺酮类、头孢类等抗生素不敏感, 对盐酸去甲万古霉素敏感, 对复合溶菌酶均敏感。创面营养不良 5 例; 肉芽水肿 3 例; 创面坏死组织清除不彻底 1 例, 大、小隐静脉曲张 1 例。全身性疾病 3 例: 低蛋白血症 1 例, 肝功能不全 1 例, 糖尿病 1 例。

处理方法: 对于感染创面, 术前尽量控制感染, 然后进行清创、切(削)痂、皮片移植术。术后第 3 天, 见创面有分泌物及异味, 临床判断有感染存在者, 必须作细菌培养, 选择敏感的抗生素, 进行局部换药、全身使用抗生素及支持疗法, 换药一般采用复合溶菌酶, 1 次/2 d。有原发病灶, 即严重的大、小隐静脉曲张, 经抬高患肢等治疗无效者, 行大、小隐静脉高位结扎术。创面肉芽老化、水肿, 创面坏死组织清除不彻底者, 行全身支持治疗, 彻底切(削)痂。低蛋白血症的患者, 经鼓励其进食, 并口服能全力(荷兰 Nutricia 公司), 静脉给予能量合剂, 20% 白蛋白, 1 周后低蛋白血症得到纠正, 总蛋白由 4.0 g 上升为 6.0 g, 白蛋白由 1.8 g 上升为 3.4 g。肝功能不全者, 行保肝、全身支持治疗, 静脉滴注补充能量合剂、白蛋白等。糖尿病患者, 经控制饮食, 补液时采用胰岛素, 糖、胰岛素比为 3:1 (3 g 糖: 1 U 胰岛素), 1 周后血糖得以控制。本组 35 例均行清创、切(削)痂、皮片移植术, 术后 2~3 周, 创面愈合。

讨论 所谓难愈创面的定义目前尚不明确, 本组 35 例

均为烧伤残余创面, 经清创、皮片移植、局部换药等治疗, 创面仍不能及时愈合。因此笔者认为, 烧伤创面经上述处理后仍未达到预期愈合效果者, 可称为难愈创面。

临床上, 大面积深度烧伤后创面难以愈合是一个棘手问题, 要尽快修复创面, 首先必须查明创面难愈合的原因, 然后针对病因进行相应的处理, 才能达到修复的目的。干扰创面愈合的因素诸多, 如: 感染、创面肉芽水肿、坏死组织清除不彻底、组织低灌注、药物影响、全身性疾病^[1]。

大面积深度烧伤后全身反应剧烈, 出现超高代谢, 机体的营养储备大量消耗; 加之摄入、吸收及利用不足, 患者在短期内可出现严重的营养不良、免疫功能下降、对感染的易感性增高、创面愈合迟缓, 甚至危及生命^[2]。因此, 在治疗难愈创面时, 必须仔细地询问病史, 严格进行体格检查, 做好肝、肾功能和电解质、免疫功能检测以及创面细菌培养加药敏试验等。给予足够、合理的营养支持, 治疗全身性疾病, 纠正水、电解质及体内微量元素的平衡, 积极、合理地处理创面, 减少并发症, 争取在短时间内修复创面。

创面感染是引起创面难愈合的最大障碍, 并贯穿烧伤治疗的全过程, 由于临床上耐药菌株日渐增多, 因此, 进行创面分泌物、血培养及药敏试验时必须及时、准确。本组 35 例中 27 例出现创面感染, 细菌培养及药敏试验结果表明, 检出的菌株对大部分抗生素不敏感。笔者在全身使用敏感抗生素(根据药敏试验选用)的同时, 采用复合酶杀菌剂对创面进行换药, 创面感染得以控制, 取得满意的效果。

综上所述, 对于大面积深度烧伤患者, 在进行全身性治疗的同时, 处理创面必须做到积极、正确、合理, 尽量减少残余创面的出现。对于深度大面积不愈合创面, 必须查明原因, 作出正确处理, 尽快消灭创面, 减少患者不必要的痛苦。

参 考 文 献

1 吴阶平, 裘法祖, 主编. 黄家驷外科学. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 1988. 24-25.

2 杨之骏, 许伟石, 史济湘, 主编. 烧伤治疗学. 第 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 1985. 39-182.

(收稿日期: 2001-02-06)

(本文编辑: 赵云)

作者单位: 225300 泰州市人民医院整形烧伤科(李罗珠、于益鹏、孙步梅、陈传俊); 第二军医大学长海医院全军烧伤中心(陈玉林)