

P 物质在表皮干细胞向毛囊迁移分化中的作用

朱剑武 赖西南 王正国 黄晖 王丽丽 甯交琳



【摘要】 目的 了解 P 物质(SP)在表皮干细胞(ESC)向毛囊迁移分化中的作用并探讨其机制。
方法 将体外培养的 ESC 以角蛋白 19(K19)及 $\beta 1$ 整合素免疫染色法确认其为所需的 ESC。采用 5-溴-2-尿嘧啶脱氧核苷(BrdU)标记 ESC,将 SP 加入已标记的 ESC 培养液中,根据所加 SP 的浓度分为 10^{-5} mol/L SP 组、 10^{-6} mol/L SP 组、 10^{-7} mol/L SP 组。并将加入 SP 的各组 ESC 悬液 0.3 ml 注射到裸鼠背部真皮内,于首次注射后 4、7、10、14 d 分别再注射 1 次,剂量、部位同前。对照组除不使用 SP 外,其余处理相同。各组于首次注射后 28 d 在无菌条件下取注射区皮肤及远离注射区的正常皮肤组织,行免疫组织化学染色,电子显微镜下观察裸鼠皮肤组织学特点,行皮肤毛囊计数。
结果 注射后, 10^{-5} mol/L SP 组可见散在的毛囊,部分毛囊发育不全。 10^{-6} mol/L SP 组、 10^{-7} mol/L SP 组真皮深层及皮下组织中,可见大量的组织结构清晰的毛囊,部分毛囊的毛根部位可见棕黄色 BrdU 阳性颗粒,多数毛囊的外毛根鞘部位可见棕黄色 β 连环蛋白阳性颗粒以及极少量发育不全的毛囊,毛囊计数[(1.9 \pm 1.2)、(1.3 \pm 0.8)个]均少于对照组[(10.5 \pm 1.2)个, $P < 0.01$]。对照组真皮深层和皮下组织的毛囊发育不全,表皮层中可见棕黄色 BrdU 阳性颗粒和 β 连环蛋白阳性颗粒。
结论 SP 可诱导基底层的 ESC 向毛囊迁移,其诱导效应与 SP 浓度有关,并促使 ESC 内 β 连环蛋白的表达增高,诱导其向毛囊分化。

【关键词】 P 物质; 干细胞; 毛囊; 细胞分化

Effect of substance P on the migration and differentiation of cultured epidermal stem cells to hair follicle in vitro ZHU Jian-wu, LAI Xi-nan, WANG Zheng-guo, HUANG Hui, WANG Li-li, NING Jiao-lin. Institute of Field Surgery, Daping Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400042, P. R. China
 Corresponding author: LAI Xi-nan, Email: laixinan@163.com, Tel: 023-68757574

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of substance P (SP) on the migration and differentiation of epidermal stem cells (ESCs) to hair follicle, and its mechanism. **Methods** ESCs were cultured in vitro, and confirmed by positive staining of K19 and integrin $\beta 1$ with immunohistochemistry. SP was added into the culture of ESCs which were labelled with 5-BrdU, and the cell cultures were divided into control, 10^{-5} mol/L SP, 10^{-6} mol/L SP, and 10^{-7} mol/L SP groups according to the different doses of SP addition. Cell suspension (0.3 ml) containing SP was injected into the dermis in the back of nude mice. Repeated injection of the equal amount of cell suspension in the same place was carried out on 4, 7, 10 and 14 days after first injection. The cells in control group received the same treatment but without SP. The skin specimens in the area of cell culture injection and the normal skin remote from cell injection were harvested for the histological examination and hair follicle counting by immunohistochemistry and electronmicroscope 28 days after injections. **Results** Hair follicles in scattered distribution were observed in 10^{-5} mol/L SP group, but some of them were defective in development. Hypoplastic hair follicle and a few hair follicles with distinct structure were observed in 10^{-5} mol/L SP group. Large amounts of hair follicles with distinct structure in deep dermis and subcutaneous tissue were observed in 10^{-6} mol/L SP, 10^{-7} mol/L SP groups, and some of them showed positive staining of brown BrdU in the hair root, and most of them showed positive staining of brown β -catenin, but a few of them showed developmental defect. In contrast, hypoplasia of hair follicle underneath epidermis and deep layer of dermis with positive staining of brown BrdU and β -catenin in epidermis were observed in control group. The number of hair follicles in 10^{-6} mol/L SP, 10^{-7} mol/L SP groups [(1.9 \pm 1.2), (1.3 \pm 0.8)] was obviously less than that in control group [(10.5 \pm 1.2), $P < 0.01$]. **Conclusion** SP can induce ESCs to migrate from the basal layer into hair follicle, and this effect is dependent on the SP concentration. SP can also elevate the expression of β -catenin in ESCs, which induces its differentiation to hair follicles.

基金项目:国家重点基础研究发展计划(2005CB522603)

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,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室

通讯作者:赖西南,Email:laixinan@163.com,电话:023-68757574

【Key words】 Substance P; Stem cells; Hair follicle; Cell differentiation

在烧伤皮肤修复中,皮肤附属器的重建一直为烧伤研究者所瞩目。由于表皮干细胞(ESC)是向皮肤毛囊以及汗腺分化的重要源泉细胞^[1],因此探讨影响 ESC 分化调控的因素,对烧伤皮肤修复具有重要的意义。已知神经肽 P 物质(SP)参与 ESC 的迁移、分化、调控^[2],且 ESC 中 β 连环蛋白的表达对 ESC 向毛囊的分化有重要意义^[3]。为此,笔者将不同浓度的 SP 作用于 5-溴-2-尿嘧啶脱氧核苷(BrdU)标记的 ESC 后注射于裸鼠皮肤,并进行免疫组织化学观察,以了解 SP 是否促进 ESC 向毛囊分化,并探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及动物来源

鼠 IV 型胶原、胎牛血清(FCS)均为美国 Hyclone 公司产品。SP 购自美国 Sigma 公司。 $\beta 1$ 整合素抗体、角蛋白 19(K19)抗体由美国 Chemicon 公司提供。BrdU 及其抗体由武汉博士德生物工程有限公司提供。免疫组织化学试剂盒、异硫氰酸荧光素(FITC)、四甲基异硫氰酸罗丹明(TRITC)标记的二抗由北京中杉金桥生物技术有限公司提供。鼠龄为 3~4 d 的 Wistar 大鼠 3 只、BALB/c 裸鼠 20 只均由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供。

1.2 ESC 的培养及鉴定

取 Wistar 大鼠皮肤,分离成纤维细胞,常规培养 48 h,收集培养液过滤,参照文献[4]方法进行 ESC 的分离培养。取少许上述细胞悬液,于倒置显微镜下观察细胞的大体形态。采用 FITC 对 ESC 行免疫荧光标记,以 K19、 $\beta 1$ 整合素为鉴定标志物。激光共聚焦显微镜下观察,鉴定其是否为所需 ESC。

1.3 分组及 ESC 的植入

在 ESC 培养液中加入不同浓度的 SP,使其终浓度分别为 2×10^{-5} 、 2×10^{-6} 、 2×10^{-7} mol/L。根据所加 SP 浓度分为: 10^{-5} mol/L SP 组、 10^{-6} mol/L SP 组、 10^{-7} mol/L SP 组,各组分别吸取前述相应浓度的液体 1 ml 与 1 ml ESC 单细胞悬液混合;对照组:仅为 1 ml ESC 培养液与 1 ml ESC 单细胞悬液的混合液。取 20 只 BALB/c 裸鼠,常规消毒后在背部中线两侧将上述不同 SP 浓度的 ESC 细胞悬液(每侧 0.3 ml)直接注射到裸鼠真皮内,做好标记。于首次注射后 4、7、10、14 d 在原注射部位各追加注射 1 次,剂量同前。每组 5 只裸鼠。

1.4 免疫组织化学观察

于首次注射后 28 d,在无菌条件下取注射区皮肤及远离注射区域的正常皮肤组织各 1 块。置 40 g/L 多聚甲醛中固定,常规石蜡制片。采用链霉菌亲和素-生物素复合物法对切片进行免疫组织化学染色,二氨基联苯胺显色,苏木素复染。阳性显色为棕黄色。每只裸鼠标本随机取 2 张切片,200 倍光学显微镜下每张切片取 5 个视野,对毛囊进行计数。

1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行处理,组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 ESC 的培养与鉴定

原代细胞经过鼠 IV 型胶原筛选后,有少量细胞贴壁,细胞呈圆形,细胞核大,胞质少。4 d 内生长相对静止,之后速度加快,14 d 左右呈克隆样生长。TRITC 标记的 K19 在 543 nm 波长下激发红色荧光,主要分布在细胞表面, FITC 标记的 $\beta 1$ 整合素在 488 nm 波长下激发绿色荧光,主要分布在细胞质。证明是实验所需的 ESC。

2.2 免疫组织化学观察

对照组裸鼠注射部位皮肤组织中可见大小不等、发育不全的毛囊,多呈圆形或椭圆形,细胞核深染,周围无完整的包膜结构;基底膜附近可见棕黄色的 BrdU 阳性颗粒(图 1a)。 10^{-5} mol/L SP 组可见散在、部分发育不全的毛囊。 10^{-6} mol/L SP 组、 10^{-7} mol/L SP 组真皮深层及皮下组织中,可见大量发育良好的毛囊。毛囊由数层细胞呈同心圆排列,有明显的分层,最外层由梭形细胞组成,有完整的包膜,细胞排列整齐;未见毛发纤维样结构,极少量毛囊发育不全。毛囊计数与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 1。 10^{-6} mol/L SP 组裸鼠皮下的毛囊根部细胞核中,可见棕黄色的 BrdU 阳性颗粒(图 1b)。 10^{-7} mol/L SP 组裸鼠皮下的毛囊外毛鞘部位可见棕黄色 β 连环蛋白阳性颗粒(图 1c)。

表 1 各组裸鼠毛囊发育情况(个, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	发育不全毛囊	发育完全毛囊
对照组	5	10.5 \pm 1.2	0.6 \pm 0.4
10^{-5} mol/L SP 组	5	9.6 \pm 1.6	9.9 \pm 1.7 ^a
10^{-6} mol/L SP 组	5	1.9 \pm 1.2 ^a	24.1 \pm 3.6 ^a
10^{-7} mol/L SP 组	5	1.3 \pm 0.8 ^a	24.0 \pm 3.8 ^a

注:SP 为 P 物质;与对照组比较, a: $P < 0.01$

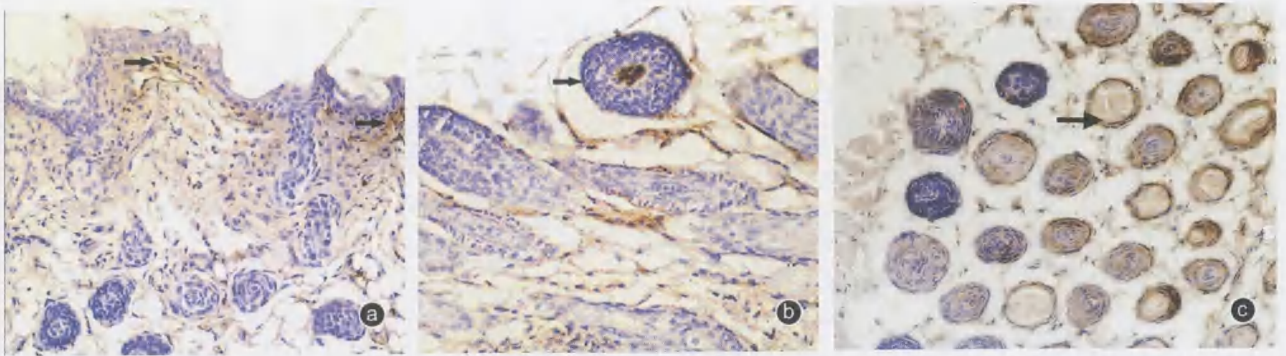


图 1 各组裸鼠皮肤组织的免疫组织化学观察 链霉素和素-生物素复合物 $\times 200$ 。a. 对照组裸鼠表皮下基底膜附近可见棕黄色的 5-溴-2-尿嘧啶脱氧核苷 (BrdU) 阳性颗粒 (箭头所示); b. 10^{-6} mol/L P 物质 (SP) 组裸鼠皮下毛囊的毛根部细胞核中, 可见棕黄色的 BrdU 阳性颗粒 (箭头所示); c. 10^{-7} mol/L SP 组裸鼠皮下毛囊外毛根鞘部位的细胞质中可见棕黄色的 β 连环蛋白阳性颗粒 (箭头所示)

3 讨论

SP 是神经肽的一种, 广泛存在于感觉神经末梢。研究表明, 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^[5]。外源性感觉神经肽 SP, 能促进 ESC 在创伤愈合过程中向创缘的迁移^[6]。有学者观察到, 斑秃患者皮损组织中 SP 含量与正常皮肤有明显差异^[7]。Maria 等^[8]的研究表明, 毛囊隆突部的 ESC 脱离干细胞群落后可向皮脂腺、毛囊等组织器官细胞分化。但基底层的 ESC 能否向毛囊迁移分化及 SP 在 ESC 向毛囊迁移分化中的作用, 目前尚未见文献报道。

毛囊是由多种细胞组成的复杂亚器官结构, 目前由于尚无特异性的标志物, 常通过镜下观察毛囊的组织结构特点来判定是否为毛囊及其发育情况。裸鼠的毛囊发育受阻, 绝大多数毛囊处于毛发生长初期, 发育尚不完全。由于 T 淋巴细胞功能障碍, 细胞回植后不会产生免疫排斥反应^[9]。本实验利用干细胞慢周期性特点, 采用 BrdU 对 ESC 进行标记^[6], 把外源性的鼠 ESC 混合 SP 后植入裸鼠皮下, 并追加外源性 SP, 造成局部高浓度 SP 微环境。虽然回植的 BrdU 标记细胞较多, 但回植后检测的阳性率较低, 可能与这种注射式细胞回植成活率偏低有关。SP 能刺激外源性 ESC 向毛囊迁移, 参与毛囊的发育, 表现在毛囊中出现 BrdU 标记阳性细胞。由于回植的 ESC 来源于鼠的皮肤基层, 说明基层的 ESC 在适宜浓度 SP 刺激下可向毛囊迁移分化。同时, 加入 SP 后, 裸鼠皮下出现大量毛囊, 以加入 10^{-6} 、 10^{-7} mol/L SP 最为明显。提示 SP 不仅促使外源性 ESC 向毛囊组织器官迁移分化参与毛囊重建, 还可刺激裸鼠自身毛囊发育, 且与 SP 浓度有明显关系, 但具体机制不详。另外, 未加 SP 的对照组中 BrdU 标记细胞向基底膜附近聚集, 表现出一种

“归巢”现象。

已有研究表明, β 连环蛋白控制着生物体细胞的分化发育过程, 其表达强度决定了 ESC 的分化命运, 即在 β 连环蛋白高水平表达的情况下 ESC 会向毛囊分化, 反之则向表皮细胞分化^[10]。另外, β 连环蛋白作为 Lef/Tcf 的激活因子, 与已激活的 Lef/Tcf 共同作用, 参与启动毛囊的形态发育过程^[11]。本研究观察到, 对照组裸鼠皮肤表皮层可见少量 β 连环蛋白阳性颗粒, 而 10^{-6} 、 10^{-7} mol/L SP 组毛囊内 β 连环蛋白明显增多。推测 SP 可能促使 ESC 中 β 连环蛋白表达增高, 进而向毛囊分化。可见 SP 在皮肤烧伤愈合过程中, 能诱导 ESC 向毛囊细胞的定向分化。因此, 研究 ESC 向毛囊分化的规律和 SP 对其的调控机制, 可为今后通过神经肽的干预促进皮肤毛囊再生, 进而提高愈合质量提供一定的理论依据。

参考文献

- [1] Slack JM. Stem cell in epithelial tissues. *Science*, 2000, 287 (5457): 1431 - 1433.
- [2] 黄晖, 赖西南, 王正国, 等. 感觉神经肽 P 物质在表皮干细胞分化中作用的实验研究. *中华烧伤杂志*, 2004, 20(5): 295 - 298.
- [3] Huelsken J, Vogel R, Erdmann B, et al. β -Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell*, 2001, 105(4): 533 - 545.
- [4] 李建福, 付小兵, 盛志勇, 等. 表皮干细胞体外分离与培养. *解放军医学杂志*, 2002, 27(5): 386 - 387.
- [5] Broon CS, Whetton AD, Miyaz JA. Neuropeptide control of bone marrow neutrophil production is mediated by both direct and indirect effects on CFU-GM. *Br J Haematol*, 2000, 108(1): 140 - 150.
- [6] 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(3): 142 - 145.
- [7] 高顺强, 肖凤丽, 杜明, 等. 斑秃患者血浆和皮损中 P 物质的研究. *中华皮肤科杂志*, 2002, 35(1): 58.
- [8] Maria I, Morasso MI, Tomic-Canic M. Epidermal stem cells: the cradle of epidermal determination, differentiation and wound

healing. Biol Cell, 2005, 97 (3): 173 - 183.

- [9] Mecklenburg L, Nakamura M, Sundberg JP, et al. The nude mouse skin phenotype: the role of Foxn1 in hair follicle development and cycling. Exp Mol Pathol, 2001, 71 (2): 171 - 178.
- [10] Dunnwald M, Chinnathambi S, Alexandrunas D, et al. Mouse epidermal stem cells proceed through the cell cycle. J Cell

Physiol, 2003, 195 (2): 194 - 201.

- [11] Barker N, Morin PJ, Clevers H. The Yin-Yang of TCF/beta-catenin signaling. Adv Cancer Res, 2000, 77: 1 - 24.

(收稿日期: 2006 - 07 - 31)

(本文编辑: 张红)

· 经验交流 ·

改良腹部双蒂皮瓣修复手指背重度热压伤十例

赵茂荣

1 临床资料

本组患者 10 例, 男 4 例、女 6 例, 年龄 18 ~ 25 岁, 烧伤面积为 0.5% ~ 1.0% TBSA, 均为 III 度烧伤。致伤部位: 第 2 ~ 5 指指背及相应手背热压伤 5 例, 第 2 ~ 4 指指背及相应手背热压伤 3 例, 单纯手背热压伤 1 例, 多指背热压伤未累及手背者 1 例。清创后肌腱外露, 部分有骨外露, 2 例患者伴有浅层伸肌腱轻度变性。

2 手术方法

手术时间为伤后 6 ~ 48 h。在止血带下彻底切除手背及指背坏死组织, 去除变性的脂肪及筋膜, 保留间生态肌腱。第 2 ~ 5 指指背同时伴有相应的手背重度热压伤者, 应将第 2 指与第 3 指、第 4 指与第 5 指并指, 第 3 指与第 4 指不并指。按设计线 AB、CD 切开腹部皮肤达深筋膜浅层, 沿该浅层潜行剥离使其成双蒂皮瓣, 再做与 CD 切开线相垂直的辅助切口 EF (图 1a)。将皮瓣翻开修成超薄形, 两侧蒂部稍厚。供皮区拉拢缝合以推进皮瓣; 皮瓣的宽度应略大于供皮区的宽度, 以利于缩小皮瓣蒂部隐窝处的创面; 不足部分以游离皮片移植覆盖; 供皮区处理不便时, 可适当延长 EF 切口。将皮瓣分别植于指背创面 (图 1b), 其余部分植于手背创面, 间断缝合。第 2 ~ 4 指背以及相应手背热压伤行皮瓣移植时, 需将第 3 指与 4 指并指缝合, 另增加 1 个辅助切口 AG, 便于手背创面的覆盖 (图 1c)。单纯手背热压伤创面, 可用完整的双

蒂皮瓣修复; 手背未受损的多指背深度热压伤, 可将双蒂皮瓣中部 (或靠近一侧) 完全离断, 分别植于两侧指背。若拇指背侧同时需行皮瓣移植时, 可另覆盖 1 个单蒂皮瓣。

3 结果

患者所植皮瓣全部成活, 断蒂及分指后功能恢复良好。

4 讨论

手背热压伤常造成全层皮肤甚至深达肌腱、骨的严重毁损。腹部带蒂皮瓣因成活率高、安全可靠, 是修复手背热压伤的常用方法^[1,2]。但传统的单蒂皮瓣存在着皮瓣纵轴长、肿胀、需多次分指、多次去脂修整、病程长、影响功能恢复等弊端。改良的双蒂皮瓣较好地克服了上述缺点, 具有蒂宽、轴短、皮瓣薄、减少手术次数、病程短、利于手功能恢复等优点。本组 9 例患者于伤后 24 h 内手术; 1 例患者因入院时间晚, 于伤后第 2 个 24 h 内手术。术后患者均未发生皮瓣感染、皮瓣下积液等情况。笔者认为, 伤后尽早手术是预防术后感染的重要环节, 术中正确判断各种组织的活力十分重要。

应用该双蒂皮瓣仍应注重术中、术后各环节, 如皮瓣的宽度应略大于创面的纵轴, 使皮瓣移植后各指仍有一定的活动度; 皮瓣与创面基底附着后, 应尽早活动各指关节; 断蒂后, 包扎尽可能取功能位并定时活动。笔者采用的术式适用于手指背深度热压伤伴肌腱裸露者。热压伤创面类型是多种多样的, 应根据实际情况选用植皮方式。

参考文献

- [1] 潘云川, 陈彦莹, 马心赤, 等. 应用不同类型皮瓣修复电烧伤深度创面. 中华烧伤杂志, 2004, 20(3): 174 - 176.
- [2] 陈舜, 陈昭宏, 吴伯瑜. 应用皮瓣修复组织缺损伴感染创面 32 例. 中华烧伤杂志, 2006, 22(1): 63.

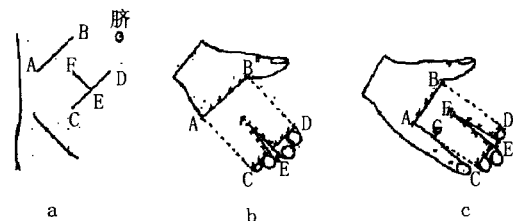


图 1 改良的腹部双蒂皮瓣及移植修复示意图。A ~ G 为辅助切口点; 虚线为皮瓣的蒂部; a. 设计改良腹部双蒂皮瓣; b. 将皮瓣移植于指背; c. 在皮瓣上另做切口 AG, 并将第 3、4 指并指后, 修复手背创面

(收稿日期: 2006 - 10 - 08)

(本文编辑: 莫愚)

作者单位: 312000 浙江省绍兴市人民医院烧伤科