

# 细胞外基质成分及空间形态结构对成纤维细胞生物学行为的影响

毛志刚 青春 陆树良

成纤维细胞(Fb)是烧(创)伤创面愈合中的主要修复细胞,它通过迁移、增殖、分化、分泌胶原等细胞外基质(ECM)成分,与多种细胞因子及细胞共同起修复作用。Yannas<sup>[1]</sup>的研究结果表明,脱细胞真皮再生模板植入真皮缺损创面,创面收缩受到强烈抑制,皮肤经历一种再生型的愈合;推测其机制可能是脱细胞真皮再生模板植入创面后,真皮基质可诱导Fb的长入,合成和分泌具有正常结构的胶原纤维,减少Fb向肌成纤维细胞(MFb)分化。Livesey等<sup>[2]</sup>证实,真皮基质可以作为真皮重建的模板,为Fb的浸润以及胶原纤维排列提供支架,进而利于真皮组织的再生,减少瘢痕形成。是真皮的成分或空间结构还是两者均对Fb的生物学行为产生影响,其机制目前尚未完全阐明。

## 一、ECM成分对Fb生物学行为的影响

真皮主要由ECM-交织状的胶原纤维组成,其间分布有弹性纤维、蛋白多糖和糖蛋白,真皮中ECM主要由Fb来分泌和维持。Fb分泌细胞因子和ECM成分来支持生长,侵入纤维蛋白凝块中引导细胞迁移到伤口处,从而增殖形成新生组织的主要细胞成分。Mcclain等<sup>[3]</sup>认为Fb的活化是形成肉芽组织的关键,缺乏Fb的活化可导致修复失败。Fb控制着ECM的形成,而ECM不仅为组织的生长提供物理支撑,也是细胞因子的储存库,控制Fb的增殖及其功能的发挥<sup>[4]</sup>。ECM可以通过控制细胞生长因子的作用以及与细胞表面的受体相互作用,对Fb产生影响<sup>[5]</sup>。另外,ECM的各个组成部分与细胞外表面的受体相互作用,纤维连接蛋白(FN)、胶原等成分为接触导向提供支架,控制细胞的黏附和细胞迁移的方向<sup>[6]</sup>,一些ECM成分的蛋白分解产物具有趋化和调理素的活性<sup>[5]</sup>。有研究表明,ECM的组成可以通过细胞因子分泌的形式间接上调碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和血管内皮生长因子(VEGF)的分泌<sup>[7]</sup>。

1. 胶原:胶原是真皮中的主要成分,为Fb提供

生长的空间并具有支架作用,同时还可诱导其生长,对Fb有正、负反馈作用。Lambert等<sup>[8]</sup>证实在创面愈合过程中,胶原从Fb分泌到细胞外,其裂解产物前胶原肽转录和翻译水平可负反馈抑制Fb合成胶原。在某些创面修复过程中,这种负反馈抑制可能减弱甚至消失,使胶原过量沉积而形成增生性瘢痕。

2. 硫酸软骨素:硫酸软骨素是广泛存在于ECM中的一种蛋白多糖,与细胞表面及ECM中其他大分子物质关系密切,不仅对细胞具有支持和保护作用,同时对细胞的分化、发育、运动和增殖产生影响。Stewart等<sup>[9]</sup>用电泳法检测真皮中抑制Fb增殖的活性物质,结果表明,完整的核心蛋白多糖分子——硫酸软骨素蛋白多糖Ⅱ(dermatan sulphate proteoglycan Ⅱ,DS-PG Ⅱ)是其中主要的活性抑制物。Yamaguchi等<sup>[10]</sup>在Fb培养中观察到,DS-PG Ⅱ能限制转化生长因子(TGF) $\beta$ 的表达。硫酸软骨素也有促进Fb增殖的作用,Fb上的硫酸皮肤素(也叫硫酸软骨素B)通过控制多种生长因子对Fb产生作用,用软骨素酶B去除硫酸皮肤素可以显著降低Fb的增殖,这种抑制作用不能通过再增加硫酸皮肤素而逆转<sup>[11]</sup>。

3. FN:FN为ECM中最主要的糖蛋白之一,烧(创)伤后FN可以与破碎血管中渗出的纤维蛋白结合形成网架并包埋血小板,成为细胞迁移的支架和细胞因子、生长因子库,促进Fb向创面移行。另外还可以促进细胞与细胞、细胞与ECM的黏附<sup>[12]</sup>。Gauss-Muller等<sup>[13]</sup>证实FN对Fb、巨噬细胞具有趋化作用,且依赖于FN-Fb间的黏附,通过此黏附作用细胞膜蛋白和磷脂进行转甲基反应,细胞骨架中微丝、微管收缩使细胞迁移。

4. 细胞黏合素(TN):TN是存在于ECM中的一种六聚糖蛋白,具有类似于表皮生长因子、FNⅢ和纤维蛋白原区的结构。有研究证实,肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和bFGF对FN上Fb的迁移和黏附产生增强的附加作用,而TN在这个模型中对角膜Fb的迁移和黏附产生负面作用<sup>[14]</sup>。

5. 透明质酸(HA):HA是一种高分子质量的糖

胺多糖,存在于组织和体液中,以皮肤中最多(50%)。它可以促进 Fb 的迁移和增生,抑制其分化,同时还有加强生长因子活性的作用<sup>[12]</sup>。Boraldi 等<sup>[15]</sup>的体外研究结果表明,HA 可以形成一个半固体支架使 Fb 定向,并诱导 Fb 内肌动蛋白细胞骨架的改变来促进 Fb 迁移;HA 受体与细胞运动有关,与细胞黏附无关,HA 在体内可以通过影响基质的孔隙率来影响细胞的迁移。

6. 整合素:整合素为最常见的细胞表面受体,是一组跨膜糖蛋白,属于细胞黏附分子一类,它由来自不同基因编码的  $\alpha$ 、 $\beta$  链两种亚基组成,目前  $\alpha$  亚基有 18 种, $\beta$  亚基有 8 种,形成的整合素有 24 种。整合素介导细胞与细胞、细胞与 ECM 间的黏附,参与细胞信息传递、生长和分化等生理过程。Fb 和周围 ECM 主要通过整合素受体联系,其中  $\alpha_1\beta_1$ 、 $\alpha_2\beta_1$ 、 $\alpha_3\beta_1$ 、 $\alpha_{10}\beta_1$  和  $\alpha_{11}\beta_1$  与胶原相结合,而识别细胞外胶原主要依靠  $\alpha_1\beta_1$  和  $\alpha_2\beta_1$ ,还有  $\alpha_1\beta_1$  可与层粘连蛋白(LN)相结合, $\alpha_3\beta_1$  可与 FN 相结合<sup>[4]</sup>,整合素  $\alpha_3\beta_1$ 、 $\alpha_4\beta_1$ 、 $\alpha_5\beta_1$  和  $\alpha\nu\beta_1$  还可以调解 Fb 对 FN 的黏附<sup>[7]</sup>。

7. LN:其为基底膜中含量最丰富的糖蛋白,它的 3 条多肽链形成的十字形与黏着于基底膜的细胞内骨架相连,有助于维持组织结构并促进细胞黏附和分化,抑制迁移<sup>[12]</sup>。

## 二、空间形态结构对 Fb 的影响

细胞的扩散、成形及其对自身生长和功能的影响依赖于表面形态结构<sup>[16]</sup>。在烧(创)伤早期,Fb 的生物学形态与它所在的空间结构有很大关系,由于胶原纤维排列的多向性,Fb 的胞质沿这些纤维运动并产生多向性突起,使细胞呈星状。随着 Fb 与胶原纤维的相互作用,胶原纤维的排列逐渐由多向性转变为单向性,Fb 的胞质突起也随之逐渐表现为双极性,因而细胞呈长梭形外观,比单层培养系统中的细胞更具有立体感。空间结构可以通过改变表面对 ECM 的吸收能力来影响细胞的行为,结构影响细胞方向的现象被称为“接触导向”<sup>[17]</sup>。具有一定三维空间结构是组织工程细胞支架材料的重要指标。用于修复全厚度受伤皮肤的胶原多孔膜的最优结构应该是:具有三维纤维状多孔结构,孔与孔之间相互贯通,孔径基本在 80~150  $\mu\text{m}$ ,孔隙率不得低于 80%。间质的流动是微循环和间质环境的重要组成部分。Ng 等<sup>[17]</sup>观察到在体外三维培养环境中,人 Fb 的排列方向垂直于间质流动的方向,而在静止间质的三维培养环境中 Fb 呈随机排列。在以 ECM 为支架的

三维培养环境中,除了为 Fb 提供空间结构外,它本身结构上有生长因子的同源序列和黏附分子的结合域,在细胞间通讯和信号转导中有重要作用<sup>[18]</sup>。同时 Fb 在胶原凝胶三维培养环境中的增殖较二维培养缓慢。由此推测可能是胶原纤维可以使 Fb 表面的胶原蛋白受体饱和,细胞对生长因子的敏感性减弱,从而导致细胞增殖缓慢;也可能是细胞所受的机械张力和接触的几何形状对细胞的生长有调节作用。

## 三、胎儿与成人皮肤成分及结构的差别对 Fb 的影响

胎儿无瘢痕愈合的特殊性,使胎儿与成人皮肤结构的差别备受关注。Lorenz 等<sup>[19]</sup>认为,胚胎 Fb 是胚胎无瘢痕愈合的主要效应细胞,且瘢痕出现与否决定修复创伤的成纤维组织类型。胎儿无瘢痕修复中高度规则的胶原沉积是胎儿 Fb 的内在机制。与成人不同的是,胎儿 Fb 表面具有较高密度的 HA 受体,这也许是高浓度的 HA 通过影响 Fb 实现无瘢痕愈合的原因之一。Moulin 等<sup>[20]</sup>研究证实,与成人相比,整合素亚单位  $\alpha_1$  和  $\alpha_3$  在胎儿中表达较低,而  $\alpha_2$  表达较高,进而提出胎儿与成人 Fb 表面受体整合素的不同,明显影响创面愈合的质量。Park 等<sup>[21]</sup>通过在 ECM 中的培养胎儿和新生期 Fb 的实验证实,胎儿 Fb 在 I 型胶原、FN 和 HA 中的移动速度都快于新生期。Stelnicki 等<sup>[22]</sup>认为,成人皮肤创伤愈合是由巨噬细胞介导的炎症反应引起,然后吸引 Fb 到创面产生由不规则的 I 型胶原所组成的 ECM,几周或几个月形成瘢痕;相比之下胎儿皮肤创伤愈合是由局部的 Fb 所介导,它可快速激活对皮肤损伤的反应,产生以 III 型胶原为主的 ECM,在 3—7 d 恢复至正常结构。

## 四、展望

Fb 生物学行为的改变与创面愈合及瘢痕增生的发生、发展密不可分。随着研究的深入,影响 Fb 的因素及其机制将进一步明确,从而可对 Fb 的生物学行为进行更有针对性的调控,以减少瘢痕的形成甚至通过适度的干预达到无瘢痕愈合的目的。

## 参 考 文 献

- 1 Yannas IV. Studies on the biological activity of the dermal regeneration template. *Wound Repair Regen*, 1998, 6: 518 - 523.
- 2 Livesey SA, Herndon DN, Hollyoak MA, et al. Transplanted acellular allograft dermal matrix. Potential as a template for the reconstruction of viable dermis. *Transplantation*, 1995, 60: 1 - 9.
- 3 McClain SA, Simon M, Jones E, et al. Mesenchymal cell activation is the rate-limiting step of granulation tissue induction. *Am J Pathol*, 1996, 149: 1257 - 70.
- 4 Eckes B, Zigrino P, Kessler D, et al. Fibroblast-matrix interactions

- in wound healing and fibrosis. *Matrix Biol*, 2000, 19:325 - 332.
- 5 Horobin AJ, Shakesheff KM, Woodrow S, et al. Maggots and wound healing: an investigation of the effects of secretions from *Lucilia sericata* larvae upon interactions between human dermal fibroblasts and extracellular matrix components. *Br J Dermatol*, 2003, 148: 923 - 933.
  - 6 Greiling D, Clark RA. Fibronectin provides a conduit for fibroblast transmigration from collagenous stroma into fibrin clot provisional matrix. *J Cell Sci*, 1997, 110:861 - 870.
  - 7 Amaniego F, Markham PD, Gendelman R, et al. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor present in Kaposi's sarcoma (KS) are induced by inflammatory cytokines and synergize to promote vascular permeability and KS lesion development. *Am J Pathol*, 1998, 152:1433 - 1443.
  - 8 Lambert CA, Soudant EP, Nusgens BV, et al. Pretranslational regulation of extracellular matrix macromolecules and collagenase expression in fibroblasts by mechanical forces. *Lab Invest*, 1992, 66:444 - 451.
  - 9 Stewart JE, Wheatley DN, Holmes JD, et al. Purification and identification of a human dermal extract component inhibitory to fibroblast proliferation. *Cell Biol Int*, 2001, 25:607 - 612.
  - 10 Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E. Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. *Nature*, 1990, 346:281 - 284.
  - 11 Denholm EM, Cauchon E, Pouliq C, et al. Inhibition of human dermal fibroblast proliferation by removal of dermatan sulfate. *Eur J Pharmacol*, 2000, 400:145 - 153.
  - 12 陆树良, 主编. 烧伤创面愈合机制与新技术. 北京:人民军医出版社, 2003. 56 - 58.
  - 13 Gauss-Muller V, Kleinman HK, Martin GR, et al. Role of attachment factors and attractants in fibroblast chemotaxis. *J Lab Clin Med*, 1980, 96:1071 - 1080.
  - 14 Schmidinger G, Hanselmayer G, Pieh S, et al. Effect of tenascin and fibronectin on the migration of human corneal fibroblasts. *J Cataract Refract Surg*, 2003, 29:354 - 360.
  - 15 Boraldi F, Croce MA, Quaglini D, et al. Cell-matrix interactions of in vitro human skin fibroblasts upon addition of hyaluronan. *Tissue Cell*, 2003, 35:37 - 45.
  - 16 Salem AK, Stevens R, Pearson RG, et al. Interactions of 3T3 fibroblasts and endothelial cells with defined pore features. *J Biomed Mater Res*, 2002, 61:212 - 217.
  - 17 Ng CP, Swartz MA. Fibroblast alignment under interstitial fluid flow using a novel 3-D tissue culture model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 284: 1771 - 1777.
  - 18 Ehrlich HP, Gabbiani G, Meda P. Cell coupling modulates the contraction of fibroblast-populated collagen lattices. *J Cell Physiol*, 2000, 184:86 - 92.
  - 19 Lorenz HP, Lin RY, Longaker MT, et al. The fetal fibroblast: the effector cell of scarless fetal skin repair. *Plast Reconstr Surg*, 1995, 96:1251 - 1259.
  - 20 Moulin V, Plamondon M. Differential expression of collagen integrin receptor on fetal vs. adult skin fibroblasts; implication in wound contraction during healing. *Br J Dermatol*, 2002, 147:886 - 892.
  - 21 Park JC, Park BJ, Suh H, et al. Comparative study on motility of the cultured fetal and neonatal dermal fibroblasts in extracellular matrix. *Yonsei Med J*, 2001, 42:587 - 594.
  - 22 Stelnicki EJ, Arbeit J, Cass DL, et al. Modulation of the human homeobox genes PRX-2 and HOXB13 in scarless fetal wounds. *J Invest Dermatol*, 1998, 111:57 - 63.

(收稿日期:2004-07-06)

(本文编辑:苟学萍)

读者·作者·编者

## 本刊对论文统计学处理的有关要求

1. 统计研究设计:应交代统计研究设计的名称和主要做法。如调查设计(分为前瞻性、回顾性还是横断面调查研究)、实验研究(应交代具体的设计类型,如自身配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等)、临床试验设计(应交代属于第几期临床试验,采用了何种盲法措施等);主要做法应围绕重复、随机、对照、均衡的原则进行概要说明,尤其要交代如何控制重要非试(实)验因素的干扰和影响。

2. 资料的表达与描述:用  $\bar{x} \pm s$  表达近似服从正态分布的定量资料;用统计表时,要合理安排纵横标目,并将数据的含义表达清楚;用统计图时,所用统计图的类型应与资料性质相匹配,并使数轴上刻度值的标法符合数学原则;用相对数时,分母不宜 < 10, 要注意区别百分率与百分比。

3. 统计分析方法的选择:对于定量资料,应根据所采用的设计类型选用合适的统计分析方法,不应盲目套用  $t$  检验和单因素方差分析;对于定性资料,应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件以及分析目的,选用合适的统计分析方法,不应盲目套用  $\chi^2$  检验。对于回归分析,应结合专业知识和散布图,选用合适的回归类型,不应盲目套用简单直线回归分析,对具有重复实验数据检验回归分析资料,不应简单化处理;对于多因素、多指标资料,要在一元分析的基础上,尽可能运用多元统计分析方法,以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系作出全面、合理的解释和评价。

4. 统计结果的解释和表达:从 2005 年起,当  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  时,一律表示为“差异具有统计学意义”,同时需写明所用统计分析方法的具体名称(如:成组设计资料的  $t$  检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的  $q$  检验等)、统计量的具体值(如:  $t = 3.45$ ,  $\chi^2 = 4.68$ ,  $F = 6.79$  等),并尽可能列出相应的具体  $P$  值(如:  $P = 0.0238$ );当涉及到总体参数(如总体均数、总体率等)时,在给出检验结果的同时,再给出 95% 置信区间。

5. 统计学角码符号的标注:为便于表格的排版和版式的美观,表格中注释用的角码符号一律采用单个角码形式,按下列顺序选用: \*、#、△、☆、▲、★;在表注中依先纵后横的顺序依次标出。