

伤早期,心脏泵血功能明显下降^[5]。烧伤后心肌细胞发生“钙超载”是心功能下降的主要原因,抑制心肌细胞“钙超载”能改善心功能^[1,2]。本研究观察到,经静脉持续给予钙通道阻断剂尼莫地平,患者 ACC 升高,ABF 明显增多;而心率、MAP、LVET(心脏前负荷指标)和 TSVR 有所下降,表明尼莫地平能在一定程度上缓解烧伤后心功能下降。同时本研究结果显示,治疗剂量的尼莫地平能轻度扩张外周血管,引起血压、TSVR、心率降低。因此在应用该药时应保证有充足的血容量和良好的血流动力学监测。

免疫细胞内钙离子作为细胞内信号转导第二信使,参与多种免疫反应过程。动物实验表明,钙离子通道阻断剂能抑制免疫细胞炎性介质的释放,降低烧伤后血浆内促炎性细胞因子水平^[3,4]。TNF- α 是重要的 SIRS 始动和促动细胞因子;IL-8 是一种强烈的免疫细胞趋化因子;ICAM-1 是介导白细胞与血管内皮细胞黏附的必不可少的一个环节;PLA₂ 能催化花生四烯酸代谢途径,产生血小板活化因子、前列腺素、白三烯、血栓素等促炎性细胞因子。氧化性损害在组织细胞损害中起重要作用,TAC 是衡量抗氧化能力的主要指标。本研究结果表明,治疗剂量的尼莫地平能降低患者血浆 TNF- α 、

IL-8、ICAM-1 含量及 PLA₂ 活性,使其血浆 TAC 升高;同时还能显著减少烧伤后多种促炎性细胞因子的产生,减轻白细胞与内皮细胞间的黏附,提高全身抗氧化能力,可缓解烧伤后过度免疫反应造成的组织细胞损害,对烧伤后的细胞保护治疗具有现实意义。

参考文献

- [1] 夏照帆, 田建广, 唐洪泰, 等. 烫伤大鼠心肌收缩功能与细胞内游离钙的研究. 中华烧伤杂志, 2001, 17(5): 342-344.
- [2] Xia ZF, Zhao P, Horton JW. Changes in cardiac contractile function and myocardial. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001, 280(4): 1916-1922.
- [3] 王光毅, 夏照帆, 朱世辉, 等. 尼莫地平抑制烧伤大鼠促炎细胞因子产生的观察. 中华烧伤杂志, 2002, 18(5): 311.
- [4] 王光毅, 朱世辉, 唐洪泰, 等. 尼莫地平对大鼠烫伤后库普弗细胞白介素-1 β 和白介素-6 产生的抑制作用. 中国危重病急救医学, 2003, 15(4): 210-212.
- [5] 黄跃生. 烧伤后早期心肌损害的分子机制及防治研究进展. 中华烧伤杂志, 2004, 20(5): 257-259.

(收稿日期: 2006-05-15)

(本文编辑: 张红)

有血清和无血清培养人表皮干细胞的比较研究

辛国华 曾元临 邱泽亮 罗旭 余於荣 李国辉

1 对象与方法

1.1 主要试剂

II 型 dispase 酶、角质形成细胞无血清培养液(K-SFM)、胎牛血清(FCS)、DMEM 无血清培养液、牛垂体提取物(BPE)均购自美国 Gibco 公司,人胎盘 IV 型胶原购自美国 Sigma 公司,角蛋白 19(K19)单克隆抗体为福州迈新生物技术开发有限公司产品,整合素 β_1 多克隆抗体购自美国 Oncogene 公司,Envision 试剂盒由丹麦 DAKO 公司提供。FACS Calibur 型流式细胞仪为美国 Becton Dickinson 公司产品。

1.2 细胞培养

1.2.1 表皮与真皮的分离 将健康人包皮环切术后剩余的新鲜包皮(供者知情同意)用含有青、链霉素的磷酸盐缓冲液冲洗 8~10 次,剔除皮下组织,剪成 1.0 cm \times 0.5 cm 的皮片,置于 4 g/L II 型 dispase 酶中,4 $^{\circ}$ C 下消化 12~15 h,分离表皮和真皮。

1.2.2 有血清及无血清培养液的配制 取真皮,用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化法获取真皮组织成纤维细胞后,用 DMEM 无血清培养液进行传代培养。收集第 2~3 代对数生长期细胞的培养上清液,用孔径 0.22 μ m 的滤膜过滤除菌后,与 K-SFM 等体积混合,每升加 FCS 100 ml、表皮生长因子 5 μ g、氢化可的松 400 μ g、氯化钙 0.05 mmol、L-谷氨酰胺 0.1 mol、BPE 1.0 mg,配成表皮干细胞(ESC)有血清培养液。不添加 FCS 但其余成分同前者制成 ESC 无血清培养液。

1.2.3 ESC 的培养与分组 分离的表皮片用胰蛋白酶-乙二胺四乙酸 37 $^{\circ}$ C 消化 5 min,所得细胞以 DMEM 悬浮,利用 IV 型胶原分离、富集 ESC,将其分别加入有血清培养液(有血清组)和无血清培养液(无血清组)中培养,隔日换液。培养 11 d 细胞形成较大克隆后,用 2.5 g/L 胰蛋白酶 37 $^{\circ}$ C 消化 5 min,以 1:2 比例传代。

1.3 细胞克隆形成率的测定

取两组第 2 代 ESC,按 200 个/孔接种至预先用 IV 型胶原包被的 24 孔培养板中。培养 2 周后,记录克隆数(细胞数 \geq 50 个计为 1 个克隆)和克隆维持时间(即克隆停止扩展的时刻-克隆开始形成的时刻)。克隆形成率 = 细胞克隆数 \div 接种时细胞数 \times 100%。

1.4 细胞生长曲线测定

取两组第 2 代 ESC(达 70% 融合),以 4 \times 10³ 个/孔接种于 96 孔板,每组 4 孔,隔日换液。分别于培养后第 1、3、5、7、9、11、13 天,用噻唑蓝法^[1]测定波长 490 nm 下吸光度值,绘制细胞生长曲线。

1.5 细胞周期分析

两组原代 ESC 生长至 60%~70% 融合时,用 2.5 g/L 胰蛋白酶常规消化,调整细胞浓度至 1 \times 10⁶ 个/ml,体积分数 70% 的乙醇 4 $^{\circ}$ C 固定过夜,用流式细胞仪进行细胞周期分析。

1.6 整合素 β_1 和 K19 强阳性表达率检测

选取 20 个包皮标本,行原代 ESC 分离和分组培养达 60%~70% 融合时,消化传代并制作细胞玻片,Envision 两步

作者单位: 330006 南昌大学第一附属医院烧伤科(辛国华、曾元临、罗旭、余於荣、李国辉); 丽水市人民医院烧伤科(邱泽亮)

法分别行整合素 β_1 和 K19 免疫细胞化学染色。每个标本随机选取 8 个视野,每视野计数细胞总数不少于 400 个,计算整合素 β_1 和 K19 强阳性细胞的百分率。整合素 β_1 染色强阳性标准:胞膜呈棕黄色;胞核蓝染,形如环状。K19 染色强阳性标准:胞质呈棕黄色,胞核蓝染。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件分析,组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 克隆形成率及维持时间

有血清组细胞克隆形成率为 $(16.6 \pm 1.2)\%$,明显高于无血清组 $[(11.5 \pm 1.3)\%, P < 0.01]$ 。有血清组的克隆维持时间为 (16.6 ± 1.5) d,明显长于无血清组 $[(9.2 \pm 1.0)$ d, $P < 0.01]$ 。

2.2 细胞生长曲线

两组细胞的生长曲线均呈倒“S”型。培养第 1~5 天,无血清组细胞增殖较明显;第 9 天时无血清组 ESC 进入平台期,而有血清组继续增殖,第 11 天时达峰值,随后进入平台期(图 1)。

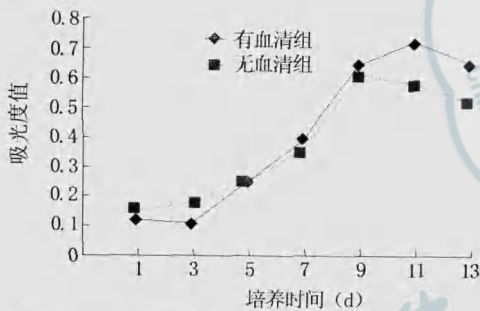


图 1 两组表皮干细胞的生长曲线

2.3 细胞周期分析

有血清组 G_0/G_1 期细胞比例明显高于无血清组 ($P < 0.01$),见表 1。

表 1 两组表皮干细胞细胞周期分析($\%, \bar{x} \pm s$)

| 组别 | 样本数 | G_0/G_1 期细胞 | G_2/M 期细胞 | S 期细胞 |
|------|-----|------------------|---------------|----------------|
| 有血清组 | 4 | 83.9 ± 0.7^a | 4.1 ± 0.5 | 12.2 ± 0.8 |
| 无血清组 | 4 | 76.0 ± 0.9 | 5.3 ± 0.6 | 16.6 ± 1.8 |

注:与无血清组比较,a: $P < 0.01$

2.4 整合素 β_1 和 K19 强阳性表达率检测

有血清组细胞整合素 β_1 和 K19 强阳性表达率分别为 $(59 \pm 4)\%$ 、 $(61 \pm 4)\%$,明显高于无血清组细胞 $[(45 \pm 4)\%$ 、 $(46 \pm 4)\%$, $P < 0.01]$ 。

3 讨论

有研究表明,无血清培养为 ESC 的研究提供了比传统方法更为有效的实验模型^[2]。本实验结果显示:在 ESC 培养的早期,无血清培养液更有利于 ESC 的分裂增殖;随着培养时间的延长,无血清组 ESC 在第 9 天就出现接触抑制,生长缓慢,而有血清组 ESC 则继续增殖,第 11 天时达到生长高峰。这表明有血清培养液更有利于 ESC 的增殖并维持 ESC 的未分化状态。

许多研究证实,ESC 膜上表达多种整合素、连接素等表面黏附分子,通过这些黏附分子介导 ESC 以半桥粒的形式黏附于基底膜上^[3]。同时,整合素还可调节 ESC 的增殖与分化。ESC 特性的维持依赖于与基底膜的黏附,失去黏附的 ESC 则启动终末分化过程。整合素 β_1 表达量降低会刺激 ESC 离开干细胞池,向上迁移成为分化细胞^[4]。本实验结果表明,有血清组 ESC 整合素 β_1 表达水平较无血清组高,可见有血清细胞培养液更有利于 ESC 表型的维持及其体外增殖。分析可能的原因有:(1)血清是由很多相对分子质量不同的生物分子组成的极为复杂的混合物,其中某些不明成分或可加强整合素 β_1 、连接素等介导的黏附作用,促进细胞与细胞、细胞与 IV 型胶原等细胞基质之间的黏附,有利于 ESC 的贴壁、生长、增殖。(2)血清中既有促进细胞生长代谢的成分,又有抑制细胞生长活性的成分,从而实现生长调节平衡的影响^[5],最终完成整合素 β_1 的调节增殖和分化作用,使 ESC 不至于走向终末分化或细胞凋亡。

由此可见,无论是无血清还是有血清培养液,都可用于体外培养 ESC,但是前者对于 ESC 的体外生长增殖及表型的维持更为重要。

参考文献

- [1] 董蕊,金岩,刘源,等.人表皮干细胞在不同培养基中生长状态的观察及其生物学性状的初步探讨.中国修复重建外科杂志,2005,19(4):314-317.
- [2] 刘德伍,陈国安,曹勇,等.人表皮细胞无血清培养的实验研究.中华整形烧伤外科杂志,1997,13(6):417-420.
- [3] Webb A, Li A, Kaur P. Location and phenotype of human adult keratinocyte stem cells of the skin. Differentiation, 2004,72(8):387-395.
- [4] Bickenbach JR, Dunnwald M. Epidermal stem cells: characteristics and use in tissue engineering and gene therapy. Adv Dermatol, 2000,16:159-183,184.
- [5] Rippon HJ, Ali NN, Polak JM. Initial observations on the effect of medium composition on the differentiation of murine embryonic stem cells to alveolar type II cells. Cloning Stem Cells, 2004,6(2):49-56.

(收稿日期:2006-06-23)

(本文编辑:罗勤)

壬二酸乳膏和维 A 酸霜剂治疗面部烧伤后色素沉着

张志 李孝建 梁蓉 梁达荣 李叶扬 许伟石

基金项目:广东省医学科研基金(A2005566)

作者单位:510220 广州市红十字会医院烧伤整形科(张志、李孝建、梁蓉、梁达荣、李叶扬);上海交通大学医学院附属瑞金医院烧伤中心(许伟石)