

感觉神经肽 P 物质特异性受体在表皮干细胞上的表达

刘育杰 赖西南 王正国 黄晖 艾军华 王丽丽

近 10 年来,表皮干细胞(epidermal stem cells, ESCs)作为皮肤细胞发生、修复、改建的源泉,因其与上皮源肿瘤、皮肤变性疾病的发生密切相关而成为研究的热点^[1]。体内实验结果显示,皮肤伤口中外源性感觉神经肽 P 物质可促进 ESCs 增殖并将其大量募集于创缘,加速修复过程^[2]。为进一步探讨 P 物质对 ESCs 生物学行为影响的机制,本实验分别从蛋白水平和 mRNA 水平观察体外培养的 ESCs 上 P 物质的两种特异性受体:神经激肽 1 受体(NK-1R)和 NK-2R 的表达情况。

一、材料与方 法

1. 材料及主要试剂来源:出生 3~5 d 的 SD 大鼠(第三军医大学大坪医院医学实验动物中心)20 只。左旋谷氨酰胺、非必需氨基酸、无钙 S-MEM 培养基、硫酸庆大霉素、胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司;生物素-链霉亲和素-辣根过氧化物酶(SP)、二脒基苯基吡啶盐酸(DAPI)购自美国 Sigma 公司;特等胎牛血清(FCS)购自美国 Hyclone 公司;鼠 IV 型胶原购自美国 Fluka 公司;整合素 β_1 单克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司;角蛋白 19(K19)单克隆抗体购自美国 Chemicon 公司;SP 试剂盒、荧光标记的二抗购自北京中山生物技术有限公司;山羊抗大鼠 NK-2R 多克隆抗体、兔抗大鼠 NK-1R 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司;PCR 体系购自北京赛百盛基因技术有限公司;NK-1R 和 NK-2R mRNA 引物由华大基因上海鼎安生物科技有限公司合成。

2. ESCs 培养:(1)制备 ESCs 条件培养基:无菌条件下取幼鼠全层皮肤,去除皮下组织,修剪成 1 mm × 1 mm 皮块贴附于无菌培养瓶底,加入由无钙 S-MEM 培养基 + 体积分数 9% FCS + 0.05 mmol/L CaCl₂ + 0.5 μg/L 硫酸庆大霉素 + 0.1 mol/L 左旋谷氨酰胺 + 0.1 mol/L 非必需氨基酸组成的培养液,置 37 °C、体积分数 5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱内孵育 72 h。待细胞进入对数生长期后,收集培养液,采用孔径 0.45 μm 的滤膜过滤后,取滤液置 -20 °C 冰箱中冻存待用。(2) ESCs 的分离与培养:无菌条件下取幼鼠全层皮肤,以 2.5 g/L 胰蛋白酶 4 °C 消化过夜,分离真皮、表皮。将获得的表皮用胰蛋白酶在 37 °C 再次消化 8 min,制成单细胞悬液。利用 ESCs 对鼠 IV 型胶原的特异性快速黏附作用,用包裹 IV 型胶原的培养瓶将其筛选出来,加入 ESCs 培养基(无钙 S-MEM 培养基 + 体积分数 9% FCS + 0.05 mmol/L CaCl₂ + 4 μg/L 表皮生长因子 + 15.0 μg/L 硫酸庆大霉素 + 1/2 原浓度的 ESCs 条件培养基 + 0.1 mol/L 左旋谷氨酰胺 + 0.1 mol/L 非必需氨基酸)中继续培养,隔日换液。经 3~5 次换液,更换鼠 IV

型胶原包被的培养瓶,并重复上述过程,最终获得较高纯度的 ESCs。(3) ESCs 的鉴定:分别检测所培养细胞能否呈克隆状生长,并以整合素 β_1 、K19 免疫荧光染色法进行鉴定^[2,3]。

3. 免疫细胞化学荧光染色:待细胞呈克隆状生长时,调整细胞含量为 1×10^5 /ml,将一部分 ESCs 接种于半径 35 mm 培养皿,培养 10 d,待细胞贴壁后弃去培养基,40 g/L 多聚甲醛固定 15 min。用体积分数 0.3% 聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)和正常山羊血清共同孵育 30 min,加入兔抗大鼠 NK-1R(1:800)和羊抗大鼠 NK-2R(1:600)多克隆抗体的混合液,4 °C 过夜。次日,加入异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗兔 IgG(1:200)与四甲基罗丹明异硫氰酸盐(TRITC)标记的兔抗羊 IgG(1:200)混合液,37 °C 孵育 2 h。之后以 50 mg/L DAPI 溶液孵育 30 min 标记细胞核。充分清洗后以 300 g/L 的磷酸盐缓冲液(PBS)-甘油封片。在激光共聚焦扫描显微镜(R9264 型,德国 Leica 公司)下以 356、488、543 nm 波长的激光束分别激发 DAPI、FITC 及 TRITC 并观察(荧光三重标记法)。

4. 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 NK-1R mRNA、NK-2R mRNA 的表达水平:用 Tripure 分离试剂提取 ESCs 总 RNA。RT-PCR 体系及条件同常规。NK-1R mRNA 上游引物为:5'-GTGGTGGCAACGTAGTGCT-3',下游引物为:5'-TCACGCAGATGTGCTACGCT-3';NK-2R mRNA 上游引物为:5'-CTACTCCATGACCGCCATTG-3',下游引物为:5'-CA-GAAGAGCGCCAGGTAGAC-3'。PCR 产物检测:取 5 μl 反应液于 10 g/L 琼脂糖凝胶中电泳 15 min,保持电压 120 V。

二、结果

1. 大鼠 ESCs 的培养和鉴定结果:在鼠 IV 型胶原包被的培养瓶内快速贴壁的细胞,随着换液次数增加(培养 5~10 d)呈片状聚集生长,最终可见细胞呈克隆状生长。细胞外形小而圆,核质比大,所得克隆样生长细胞的 K19、整合素 β_1 免疫荧光染色呈阳性。

2. 三重标记免疫细胞化学荧光染色结果:TRITC 标记的 NK-2R 在 543 nm 波长激光下发红光,在 488 nm 波长激光下,标记 NK-1R 的 FITC 发绿光。红色、绿色荧光主要均匀分布在细胞表面。DAPI 标记的是细胞核,其在 356 nm 波长激光下发出蓝色荧光。

3. ESCs NK-1R mRNA 和 NK-2R mRNA 的表达情况:根据引物长度,扩增出的片段约为 300 bp。

三、讨论

神经肽是广泛存在于中枢和外周神经系统的一大类细胞外信使分子。在外周神经系统,神经肽存在于初级传入神经元的游离神经末梢中,且多数存在于皮肤中广泛分布的较细的有髓鞘 A δ 类痛觉纤维和无髓鞘 C 类纤维中^[3]。神经肽具有加速皮肤创伤愈合的重要作用,其机制可能和启动神经源性炎症反应、调控免疫细胞功能、促使修复细胞增殖等

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目(G1999054200)

作者单位:400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室

通信(讯)作者:赖西南, Email: laixinan@163.com, 电话: 023-68757574

有关^[4]。与创伤愈合关系较为密切的神经肽主要有 P 物质和降钙素基因相关肽 (CGRP), 本实验选取前者作为研究对象。P 物质有 3 种特异性受体: NK-1R (分布在中枢神经系统和外周组织)、NK-2R (分布于外周组织)、NK-3R (分布于中枢神经系统)^[5]。本实验仅观察 NK-1R、NK-2R 在大鼠 ESCs 上的表达。

较多实验结果表明, 神经肽对成体干细胞有重要的调节作用。如低等两栖动物断肢再生过程中, 断肢创缘表面成熟细胞可以去分化重新形成干细胞, 在此期间, 神经肽对干细胞的存活和增殖具有重要调控作用^[6]。还有学者观察到, 神经肽参与骨髓造血干细胞和骨祖细胞增殖、分化的调控^[7]。

ESCs 在皮肤创伤愈合过程中起着细胞源的作用, 即能分化为真皮、表皮、皮脂腺、汗腺等各种皮肤结构。因此, 阐明其分化的调控因素是将 ESCs 研究成果应用于临床的关键。目前认为, 调控 ESCs 分化的外源性因素主要有多种细胞因子、膜蛋白介导的细胞间相互作用、整合素与细胞外基质^[8]。笔者利用目前公认的 IV 型胶原差速黏附法, 在体外分离并培养了 ESCs。在此基础上, 从蛋白和 mRNA 两种水平检测离体培养的 ESCs, 观察到其上存在 P 物质特异性受体 NK-1R 和 NK-2R。这两种受体的存在, 直接说明了 ESCs 具有 P 物质作用的物质基础, 为前期实验结果“P 物质是调控 ESCs 聚集、分化的因素之一”提供了有力证据。同时完善了 ESCs 分化调控理论体系, 为从改善神经功能入手治疗皮肤创面及难愈伤口、上皮肿瘤、变应性皮肤病奠定了理论基础。

过去普遍认为, P 物质与 NK-1R 的结合力最强^[4], 而 NK-2R 在 P 物质调控 ESCs 分化中到底扮演什么角色, 还需要进一步研究。

参 考 文 献

- 1 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.
- 2 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: 142-145.
- 3 韩军涛, 陈璧, 张晓辉, 等. 胎鼠表皮干细胞的分离培养及毛囊再生研究. 中华烧伤杂志, 2003, 19: 8-11.
- 4 Grazul-Bilska AT, Johnson ML, Bilski JJ, et al. Wound healing: the role of growth factors. Drugs Today (Barc), 2003, 39: 787-800.
- 5 路长林, 主编. 神经肽基础与临床. 上海: 第二军医大学出版社, 2000. 131-138.
- 6 Stocum DL. Amphibian regeneration and stem cells. Curr Top Microbiol Immunol, 2004, 280: 1-70.
- 7 Bandari PS, Qian J, Oh HS, et al. Crosstalk between neurokinin receptors is relevant to hematopoietic regulation: cloning and characterization of neurokinin-2 promoter. J Neuroimmunol, 2003, 138: 65-75.
- 8 刘育杰, 赖西南. 表皮干细胞外源性分化调控机制的研究进展. 中华创伤杂志, 2004, 20: 574-576.

(收稿日期: 2005-07-01)

(本文编辑: 赵敏)

· 病例报告 ·

高压电击伤合并胃壁穿孔坏死一例

王艳华

患者男, 38 岁。不慎被 6.6 kV 高电压击伤, 当时意识一过性丧失, 伤后半小时入院。查体: 患者自诉头晕、心慌、全身酸软无力, 意识清楚; 血压 110/70 mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa)、呼吸 20 次/min、脉搏 100 次/min、体温 36.7 °C; 心肺听诊无异常。创面分布于右上、下肢及腹部。电击伤入口: 右手尺侧及腕部屈侧焦痂呈斑片状, 并伴有右手尺侧 4.5 指感觉、运动功能障碍。电击伤出口: 左上腹壁有 2% TBSA 创面呈蜡样苍白, 中央呈洞穴样改变 (直径 2 cm), 内有腹腔内容物 (大网膜) 脱出, 周边组织炭化范围 8 cm × 5 cm。心电图提示窦性心率、基线干扰严重, 尿常规未见异常。入院诊断: (1) 高压电击伤, 总面积 10% TBSA, 深 II、III 度; 合并腹部开放性损伤。(2) 右手尺侧感觉、运动功能障碍。

入院后立即给予对症治疗, 伤后 1 h 在全身麻醉下行剖腹探查及右腕部焦痂切开减张术。术中见左上腹壁全层坏死区达 10 cm × 5 cm, 胃大弯前壁全层组织苍白、水肿、变硬, 范围达 8 cm × 3 cm, 并有穿孔 (0.5 cm × 0.5 cm)。切除胃壁失活组织, 局部修复缝合后关腹; 清除腹壁炭化组织及坏死肌肉后, 局部拉拢缝合。腕部切开减张后, 尽可能地保留间生态组织, 用右下腹壁带蒂皮瓣修复腕部缺损区。术后采用肠外营养、抗感染等综合治疗措施, 2 周后患者开始进半流质饮食, 3 周后腕部皮瓣断蒂, 5 周后行右手、右下肢及左上腹肉芽创面游离植皮术, 术后 7 周痊愈出院。伤后 3 年随访, 患者除右手感觉、运动功能未完全恢复外, 主诉无异常。

(收稿日期: 2005-12-01)

(本文编辑: 莫愚)

作者单位: 121001 辽宁锦州医学院附属第一医院烧伤整形科