

· 论 著 ·

机械应力条件下表皮干细胞的动力学变化

刘虎仙 陶白江 贾赤宇 曾丁 李桂水 孙可 胡晓春



【摘要】 目的 观察皮肤软组织扩张术后表皮干细胞的变化,探讨应力作用下细胞的动力学改变及皮肤软组织扩张术的力学机制。方法 标本取自行头部扩张术Ⅱ期手术患者。根据所取标本位置将试验分为:(1)扩张器中心组,所取头皮距扩张器中心约 3 cm;(2)扩张器侧壁组,所取头皮位于扩张皮肤的侧壁;(3)对照组,未扩张的头皮。各组标本行 HE 染色,光学显微镜下观察其组织结构;免疫组织化学染色后在倒置相差显微镜下观察细胞角蛋白 19(CK19)阳性细胞的分化与分布特征。结果 HE 染色可见两试验组表皮层凹凸不平,皱褶明显,表皮层相对增厚、层次增多,分布密集;免疫组织化学染色后两试验组在基底层之外可见复层现象及少量的成团或散在分布的 CK19 阳性细胞,邻近有“镂空”结构形成。而对照组未见上述现象。结论 机械扩张后表皮干细胞在分裂增殖的同时,出现异位分布并伴有“镂空”结构,其现象可能与表皮基底层细胞的动力学改变有关。

【关键词】 应力,物理; 干细胞; 动力学; 细胞结构

Preliminary investigation on the dynamic change in epidermal stem cells under mechanical stress in vivo
 LIU Hu-xian, TAO Bai-jiang, JIA Chi-yu, ZENG Ding, LI Gui-shui, SUN Ke, HU Xiao-chun. Department of Burns and Plastic Surgery, General Hospital of the Second Artillery 'PLA, Beijing 100088, P. R. China.
 Corresponding author: JIA Chi-yu, 100037, Email: cyjburns@163.com, Tel: 010-66867840

【Abstract】 **Objective** To observe the distribution of epidermal stem cell (ESC) after soft tissue expansion, and to explore dynamic change in ESC under mechanical stress and kinetic mechanism of skin expansion. **Methods** Skin samples were collected from patients after expansion of the scalp. They were divided into three groups: A group (scalp harvested 3 cm away from the center of dilator), B group (scalp tissues at the edge of dilator), and control group (scalp without dilatation). The tissue structures were observed with optical microscope with HE staining. The distribution and differentiation characteristics of cell keratin 19 (CK19) positive cells were observed with inverted phase contrast microscope after immunohistochemistry staining. **Results** HE staining showed that the epidermis was thickened and distributed densely with uneven, rugged and increased layers in A, B groups. With immunohistochemistry staining, CK19 positive cells appeared in multilayers in basal membrane, a few of them were in cluster or dispersed, with "hollowing" structure formation. These phenomena were not seen in control group. **Conclusion** ESC can proliferate with abnormal distribution and "hollowing" structure formation after mechanical dilatation, which may be related to dynamic changes in basal layer cells.

【Key words】 Stress, mechanical; Stem cells; Kinetics; Cellular structures

软组织扩张术具有能提供与邻近缺损区色泽、质地、厚度相似的皮肤组织,不易产生新的瘢痕等优点,已成为烧伤整形中修复创伤的重要手段^[1]。但目前对软组织扩张术的细胞生物学机制研究较少,大多数的研究仅证实扩张后细胞增殖,而对于应力作用下表皮层细胞结构尤其是对干细胞的影响未见明确阐述。本研究拟观察应力对表皮干细胞的影响及表皮层结构变化,以探讨皮肤软组织扩张的力学机制。

1 资料与方法

1.1 标本来源及分组

选择笔者单位行扩张术Ⅱ期手术的男性患者,年龄 18~32 岁。患者及家属均知情同意。扩张器(上海威宁整形制品有限公司)平均注水时间为 45 d,200 mL 扩张器平均注水量为 320 mL,400 mL 扩张器平均注水量 630 mL。待扩张器注水期满后,于手术过程中采集扩张区皮肤组织 1.0 cm × 0.5 cm,每组 3 块,置于体积分数 10% 甲醛溶液中固定,4 ℃ 保存备用。

将试验分为:(1)扩张器中心组,所取头皮距扩张器中心约 3 cm;(2)扩张器侧壁组,所取头皮位于扩张皮肤侧壁;(3)对照组,未扩张的头皮。

1.2 观察指标

1.2.1 组织学观察 将所取标本行常规石蜡包

作者单位:100088 北京,解放军第二炮兵总医院烧伤整形科(刘虎仙、陶白江、曾丁、李桂水、孙可、胡晓春);解放军总医院第一附属医院全军烧伤研究所(贾赤宇)

通讯作者:贾赤宇,100037, Email: cyjburns@163.com, 电话: 010-66867840

埋、切片,HE 染色,光学显微镜(上海光学仪器厂)下观察皮肤扩张后组织的外形及表皮、真皮的厚度,以及细胞排列和极性分布。

1.2.2 免疫组织化学染色 以小鼠抗人细胞角蛋白 19(CK19)IgG 单克隆抗体为一抗,辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 为二抗,以磷酸盐缓冲液作为对照。倒置相差显微镜(德国 Leica 公司)下观察 CK19 阳性细胞的分化与分布特征。

2 结果

2.1 HE 染色

对照组表皮层平缓,上皮脚短,细胞层数较少,极性过渡明显(图 1a)。两试验组表皮层凹凸不平,皱褶明显,上皮脚长而钝,深入真皮层内围成孤岛状;真皮层明显增厚,表皮层相对增厚;细胞层次增多,表皮细胞似竖直拉长,胞体增大;细胞密集分布,以靠近基底层最为显著,细胞排列欠整齐,极性过渡不明显,呈迁越之势(图 1b)。

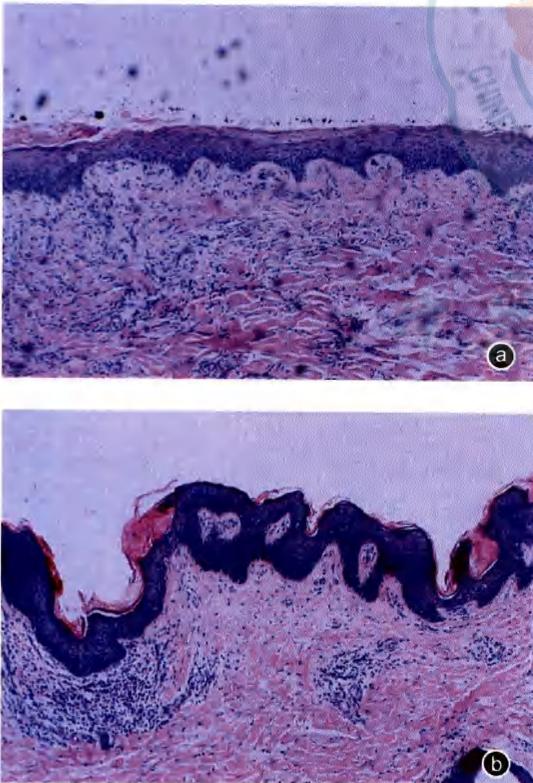


图 1 各组皮肤组织 HE 染色情况 HE ×100。a. 对照组表皮层平整,细胞层数较少,极性过渡明显; b. 扩张器中心组表皮层凹凸不平,细胞层次增多,极性过渡不明显

2.2 免疫组织化学染色

两试验组基底层可见 CK19 阳性细胞明显增多,呈复层排列。在基底层之外,亦可见少量成团或

分散分布的 CK19 阳性细胞,与基底层距离远近不等,聚集成岛状或椭圆形,散在分布,多发生在上皮脚的浅面(图 2 a,b 白色箭头)。表皮层内有未着色的空白区,大小不一,大体呈类圆形,这种“镂空”现象在表皮深层边缘较规则,浅层则欠整齐。该结构位置上与异位的 CK19 阳性细胞较为靠近或与基底层相连续(图 2 a,c 黄色箭头)。对照组未见上述现象及结构。

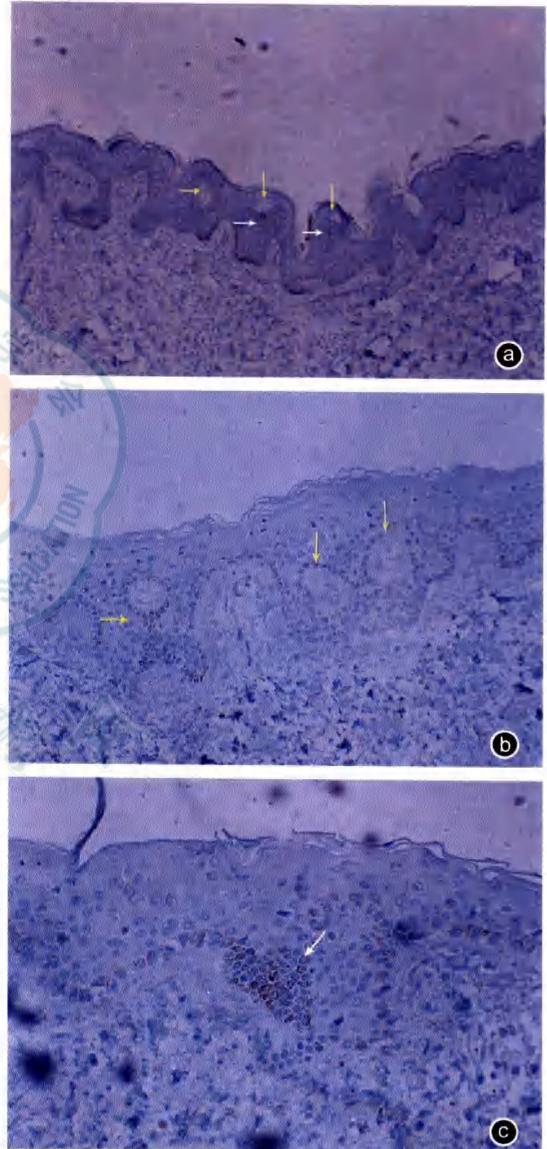


图 2 各组细胞角蛋白 19(CK19)的免疫组织化学染色结果及“镂空”结构。白色箭头为异位的 CK19 阳性细胞,黄色箭头为“镂空”结构及柄样结构。a. 扩张器中心组 CK19 阳性细胞异位分布,其上有“镂空”结构 链霉菌亲和素-生物素复合物(SABC) ×100; b. 扩张器侧壁组基底层之上 CK19 阳性细胞成团堆积或散在分布 SABC ×400; c. 扩张器侧壁组 CK19 阳性细胞排列整齐,与“镂空”结构同时存在,异位的干细胞与基底层细胞相延续,似向上推移 SABC ×200

3 讨论

在机械应力的作用下, 受力的细胞生长发生改变, 细胞分裂增殖^[2]。扩张后的表皮要进行正常的生理更新, 需要基底层有足够量的表皮干细胞分化和增殖来维持这种代谢。表皮干细胞定位于表皮基底层, 通常认为 CK19 是其阶段性标记物^[3]。我们在实验中观察到扩张后的表皮细胞明显增多, CK19 阳性细胞在基底层连续性存在, 使细胞间距不但没有增加, 有些部位反而出现复层, 甚至异位呈岛状。经排除抗体异常及成像系统造成的假阳性因素, 可知这些细胞为表皮干细胞。笔者分析, 由于机械应力信号的刺激和创伤修复信号的启动, 为了适应皮肤扩张的需要, 细胞外基质进行改建, 生长因子及各种酶类等进行了重新调整。在这些因素的综合作用下, 干细胞生长的微环境扩大, 形成了有利于干细胞迁移、定植及分化增殖的微环境, 由此造成了干细胞形成复层结构和异位分布的现象。

最近的研究表明, 人体表皮细胞在特殊情况下可以逆向分化^[4]。细胞在感受机械应力后, 实现力学信号向生物化学信号的转化, 对增殖分化产生调控作用^[5], 已分化的表皮细胞从而可能逆分化为干细胞或干细胞样细胞^[6-7], 形成“干细胞岛”。既往的研究观察到, 扩张产生的“额外”皮肤来源有 3 部分: 机械蠕变、弹性扩张和生物性生长(即细胞的分裂增殖)^[8]。

值得注意的是, 由扩张器侧壁组中 CK19 阳性细胞的复层、异位及柄样分布至扩张器中心组的明显“镂空”现象, 呈现出 CK19 阳性细胞的动态迁变过程, 这种变化尤以扩张器侧壁组较明显。“镂空”现象在位置上与异位的 CK19 阳性细胞较为靠近, 在表皮深层边缘较规则, 浅层则大多欠整齐。其分布位置和垂直切片排除了切片等原因造成的假象。我们推测, 当扩张器定期注水时, 软组织在张应力、压应力以及细胞内外流体剪切力等综合机械应力的刺激下, 呈机械性扩张, 随着维持期的应力松弛, 皮

肤软组织进行了细胞的增殖重排。在这种弛张力的作用下, 表皮基底层发生类似地壳板块运动样作用, 这种作用力使干细胞向上堆积成复层、异位及柄样分布或排列成为类圆形, 进而造成了“镂空”现象的出现。此后, 周围组织在蠕动过程中将该结构向上推移, 与基底层分离。源于基底层的表皮干细胞随之向上迁移并分化增殖, 因此该“镂空”结构与异位分布的表皮干细胞较为接近。而侧壁组与中心组之所以结构不同, 可能是软组织扩张 45 d 后, 由于近扩张中心张力大而已经历了由复层、异位到柄样分布的过程, 同时也说明扩张后期侧壁细胞动员更加明显。当然这种推测需要对组织扩张期不同时段作进一步研究再加以证实。

参考文献

- [1] 孟杰, 张维鹏, 夏虹, 等. 应用多个扩张器治疗烧伤后大面积瘢痕 17 例. 中华烧伤杂志, 2006, 22(5): 365.
- [2] Yano S, Komine M, Fujimoto M, et al. Mechanical stretching in vitro regulates signal transduction pathways and cellular proliferation in human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 2004, 122(3): 783-790.
- [3] Kurokawa I, Mizutani H, Kusumoto K, et al. Cytokeratin, filaggrin, and p63 expression in reepithelialization during human cutaneous wound healing. *Wound Repair Regen*, 2006, 14(1): 38-45.
- [4] Won J, Kim M, Kim N, et al. Small molecule-based reversible reprogramming of cellular lifespan. *Nat Chem Biol*, 2006, 2(7): 369-374.
- [5] Ingber DE. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *Faseb J*, 2006, 20(7): 811-827.
- [6] Fu XB, Sun XQ, Li XK, et al. Dedifferentiation of epidermal cells to stem cells in vivo. *Lancet*, 2001, 358(9287): 1067-1068.
- [7] 付小兵, 孙晓庆, 孙同柱, 等. 表皮细胞生长因子治疗创面出现的干细胞岛现象. 中华医学杂志, 2001, 81(12): 733-736.
- [8] Takei T, Ira M, Katsuyuki A, et al. Molecular basis for tissue expansion: clinical implication for the surgeon. *Plast Reconstr Surg*, 1998, 102(1): 247-258.

(收稿日期: 2007-06-19)

(本文编辑: 张红)

· 广告目次 ·

- (一) 惠州华阳医疗器械有限公司(封二)
- (二) 广州市启源生物科技有限公司(插页一)
- (三) 珠海亿胜生物制药有限公司(插页二)
- (四) 长春金赛药业有限责任公司(插页三)

- (五) 南阳国防科技工业电器研究所(插页四)
- (六) 兴运实业(成都)有限公司(封三)
- (七) 常熟汇涵医用材料厂(封底)