文章编号:1000-5404(2006)05-0425-03

论著

hBD_2修饰真皮多能干细胞促进感染创面修复的初步实验研究

李 楠[1],肖桃元[2],粟永萍[1],徐 辉[1],王军平[1],宗兆文[1],董世武[1],冉新泽[1],刘志君[1] (第三军医大学:[1]军事预防医学院防原医学教研室,全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,[2]高原军事医学系中心实验室,重庆 400038)

提 要:目的 观察人β防御素2(human β-defensin 2, hBD_2)修饰的大鼠真皮多能干细胞(dermal multipotent stem cells, dMSCs)移植后对细菌感染创面修复的影响。**方法** 制作大鼠全层皮肤切割伤伴感染模型,点状注射的方法将hBD_2腺病毒载体转染修饰的dMSCs移植到伤口,通过测定痂下菌量及创面愈合面积百分率和创面愈合时间等评价hBD_2修饰的dMSCs局部移植的促愈效果。**结果** 和局部单纯移植dMSCs组和单纯损伤组相比,hBD_2修饰的dMSCs移植组痂下菌含量低($P<0.05$),且创面愈合时间明显缩短($P<0.05$)。**结论** hBD_2修饰的dMSCs可有效地促进大鼠感染创面的修复。

关键词:人β防御素2;真皮多能干细胞;创面修复;感染
中图法分类号: R329.2; R630.5; R977 **文献标识码:** A

Repair effect of hBD_2-modified dermal multipotent stem cells transplantation on infected wound

LI Nan[1], XIAO Tao-yuan[2], SU Yong-ping[1], XU Hui[1], WANG Jun-ping[1], ZONG Zhao-wen[1], DONG Shi-wu[1], RAN Xin-ze[1], LIU Zhi-jun[1] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, [2]Central Laboratory, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the repair effect of human β-defensin 2 (hBD_2)-modified rat dermal multipotent stem cells (dMSCs) transplantation on infected wound. **Methods** Thirty Wistar rats were excised a piece of whole-layer back skin, 3 mm in diameter, then infected the wound with 1×10^8/ml *pseudomonas aeruginosa* 1 ml, then the rats were injected on the wounded back respectively with dMSCs modified by hBD_2 ($n=10$), or pure dMSCs ($n=10$) or none as control ($n=10$). The repair effect was evaluated by observing the amount of bacteria under the scar, wound healing time and the percentage of remaining wound area. **Results** The amount of bacteria under the scar in rats that were transplanted with dMSCs modified by hBD_2 was less than that in rats transplanted with dMSCs or controls ($P<0.05$), as well as the wound healing time ($P<0.05$). **Conclusion** Transplantation of dMSCs modified by hBD_2 could effectively enhance the repair of infected wound in rats.

Key words: human β-defensin 2; dermal multipotent stem cells; wound repair; infection

在我研究所前期的工作中[1],我们分离培养了大鼠真皮多能干细胞(dermal multipotent stem cells, dMSCs),并发现将其移植到放射损伤复合创伤(放创复合伤)大鼠体内,可明显缩短创面愈合时间。但我们观察到,感染仍是影响创面愈合的重要原因素,如果能将移植到创面的细胞赋予抗感染的能力势必将为治疗因感染导致的创面难愈提供新的途径。人β防御素2(human beta-defensin-2, hBD_2)是内源性抗菌肽的一种,对革兰阴性菌、革兰阳性菌、真菌等均有强杀伤作用[2]。于是我们构建了hBD_2的重组腺病毒载体,并证实其可以在dMSCs中高效表达,表达产物具有一定杀菌能力[3]。本研究中,我们将观察hBD_2重组腺病毒载体转染dMSCs观察移植后对感染性创面的抗感染效果及对创面愈合的促进作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物、菌株和主要试剂

Wistar大鼠30只,体质量220~250 g,雌雄不拘,购于第三

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(2005CB522605)和国家自然科学基金资助项目(30300185)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of Chian ("973" Projects, 2005CB522605) and the National Natural Science Foundation of China (30300185)

作者简介:李 楠(1983-),女,山东省济南市人,硕士研究生,主要从事干细胞和放创复合伤组织修复方面的研究。电话:13637825226
通讯作者:粟永萍,电话:(023)68752279

收稿日期:2005-10-20;**修回日期:**2006-01-19

军医大学实验动物中心。重组腺病毒 Adv-hBD$_2$ 由本实验室构建保存[3]，铜绿假单胞菌(ATCC 27853)购自第三军医大学西南医院检验科，使用前接种于 LB 液体培养基中，37 ℃振荡培养 18 h，经细菌计数测定，分装成 1×10^8/ ml 菌液备用。

1.2 真皮多能干细胞的分离培养

参照本研究所建立的方法进行[4,5]，简述如下：新生 1 d 大鼠，引颈处死，75% 乙醇消毒，剪取皮肤置于 0.25% 胰酶消化过夜。次日，Hanks 液清洗后，去除表皮和皮下组织，将真皮组织剪成细胞碎片并吹打成细胞悬液，过滤后接种于培养瓶中。6 h 后，弃培养液和悬浮细胞，继续培养早期贴壁细胞。反复传代，至有集落样细胞群体生成，按常规方法接种和选取细胞克隆，并进行成骨、成脂和成软骨分化。鉴定好的 dMSCs 传代备用。

1.3 重组腺病毒 Adv-HBD$_2$ 转染 dMSCs

具体方法参照文献[3]进行，简述如下：将 dMSCs 培养至 80% 融合时弃去培养上清，按感染复数为 50 加入 Adv-HBD$_2$ 重组腺病毒悬液，培养箱中孵育 3 h 后加入培养基继续培养备用。

1.4 动物模型及分组

大鼠感染性创面的制作：大鼠背部备皮，用特制的打孔器在大鼠背部切成直径为 3 cm 的圆形创面，并在创面上滴加浓度为 1×10^8/ml 铜绿假单胞菌菌液 1 ml。30 只 Wistar 大鼠随机分为以下 3 组：A 组(10 只)接受 Adv-hBD$_2$ 重组腺病毒转染的 dMSCs 细胞移植；B 组(10 只)接受没有病毒转染的 dMSCs 细胞移植；C 组(10 只)不接受细胞移植。接受细胞移植的大鼠于致伤后 4 h 内通过点状注射的方法将细胞局部注射创面和创面边缘，细胞数量为 1×10^7 个，浓度约为 5×10^7/ml。

1.5 观察指标

1.5.1 一般情况观察　术后动物分笼饲养，每天观察其活动、进食、创面有无感染和化脓等。

1.5.2 死亡率　为实验完毕后各组死亡的动物数与该组总动物数的比值，以百分比表示。

1.5.3 痂下菌量测定　此步严格在无菌条件下进行。致伤后 2、7、14 d，取痂下组织称取 100 mg 后置玻璃匀浆器中研磨，然后再加生理氯化钠溶液研磨，用生理氯化钠溶液作 10 倍倍比稀释后取液体 10 μl 分别涂布于分离培养基内，于 37 ℃孵育 24～48 h，选取目的菌进行细菌计数。该只大鼠每克组织的菌落数(个/g) = 计数得到的菌落数 × 稀释倍数 × 1 000。

1.5.4 创面愈合速度　以创面残留面积百分比计算。致伤即刻和致伤后 3、5、8、12、14、16、20 d 和 24 d 进行伤口照相(附有标尺)，并将其伤口面积数据输入计算机，用生物医学图像分析仪测量其创面大小。以伤后即刻测定的面积作为伤口原始面积。残留面积百分比 = 残留面积/原始面积 × 100%。

1.5.5 创面愈合时间　记录各组大鼠创面完全愈合所需的时间。

1.6 统计学分析

实验结果均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 统计软件中的单因素方差分析。

2 结果

2.1 一般情况观察

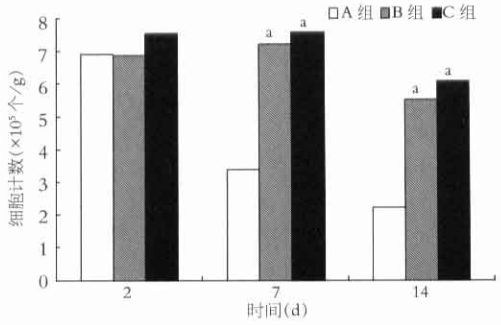
C 组大鼠伤后 2 d 起创缘有红肿，并伴渗出，呈感染征象，中后期共有 4 只大鼠出现明显的痂下脓肿。B 组大鼠伤后 2 d 创缘也有红肿伴渗出，但只有 2 只出现明显的痂下脓肿。A 组大鼠伤后 2 d 创缘也有红肿伴渗出，但以后创面渗出明显减少，持续至 6 d，创面干燥，色泽鲜红，无明显感染及坏死，呈健康肉芽组织征象，未见明显脓肿形成。

2.2 死亡率

A 组无大鼠死亡，B 组和 C 组分别有 2 只和 1 只大鼠死亡，死亡率分别为 25% 和 12.5%，死亡大鼠痂下均可见大量的脓肿，且大鼠体形瘦弱。

2.3 痂下菌量测定

图 1 显示的是不同时相点，各组大鼠每克痂下组织的细菌含量。从中可见，致伤后 2 d，A、B、C 组痂下细菌计数相差不显著($P>0.05$)，均大于 10^5 个/g。致伤后 7 d 和 14 d，A 组的痂下菌量有明显地减少，明显低于 B 组和 C 组，相差显著($P<0.05$)，表明 A 组大鼠经过移植 hBD$_2$ 腺病毒载体转染修饰的 dMSCs 后，可对创面局部的细菌有杀伤作用。

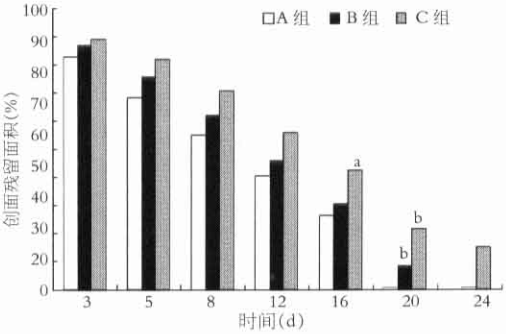


a：$P<0.05$，与 A 组比较

图 1　痂下组织细菌含量测定结果

2.4 创面愈合速度

用图像分析法测算各时间点创面平均愈合残留面积(cm^2)，并计算残留面积百分率，以代表创面愈合速度。致伤后各个时相点，由图 2 可见，A 组大鼠创面愈合要好于 B 和 C 组。致伤后 20 d，A 组大鼠创面残留面积为(26.4 ± 2.8)%，明显低于 C 组大鼠的创面残留面积($P<0.05$)。致伤后 10 d，A 组大鼠创面已经基本愈合，创面残留面积为(0.5 ± 0.01)%，显著低于 B 组和 C 组大鼠的创面残留面积，相差非常显著($P<0.01$)。



a：$P<0.05$；b：$P<0.01$，与 A 组比较

图 2　创面愈合速度测定结果

2.5 创面愈合时间

A组大鼠的平均愈合时间为(18.6±0.45)d,明显短于C组大鼠的愈合时间(23.8±0.67)d,($P<0.05$)。B组大鼠的平均愈合时间为(20.4±0.32)d,与A组比较二者之间无显著性差异($P>0.05$)。

3 讨论

严重创伤时,创面修复细胞严重受损和创面感染是导致创面难愈的两个重要因素。在我研究所前期的工作中,我们将大鼠dMSCs移植到放创复合伤大鼠体内,发现其可明显缩短创面愈合时间[1]。但我们同时发现,感染仍是影响创面愈合的重要原因素。因而我们设想,如果采用基因转染的方法,使我们移植的dMSCs具有抗感染的能力,必然会有效地促进难愈创面的愈合,特别是感染创面的愈合。

hBD_2是新近发现的一种内源性抗菌肽,在正常人皮肤、肺部、呼吸道、角膜上皮、泌尿生殖道、口腔角化细胞及胃肠上皮细胞等均有微量表达,一旦使这些部位受到炎性刺激时,hBD_2则大量表达发挥作用。hBD_2具有广谱高效的抗微生物活性[2],对于革兰阳性菌、革兰阴性菌、真菌、螺旋体和病毒均有杀伤作用,尤其对革兰阴性菌有高效杀菌作用。在前期的工作中,我们成功地构建了hBD_2的重组腺病毒载体,并发现其转染dMSCs细胞后可高效表达hBD_2,且体外实验证实重组得到的hBD_2对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌等标准菌株具有杀灭作用[3]。本研究中,我们观察了hBD_2基因修饰的dMSCs移植后对感染性创面的促愈效果。我们的研究证实,hBD_2基因修饰的dMSCs移植后,可显著地降低感染性创面的细菌含量,并有效地促进创面的愈合。上述结果说明,hBD_2基因修饰的dMSCs移植后,可同时发挥hBD_2的抗感染作用和dMSCs的修复作用,从而有利于感染性创面的愈合。

参考文献:

[1] SHI C, CHENG T, SU Y, *et al*. Transplantation of dermal multipotent cells promotes survival and wound healing in rats with combined radiation and wound injury [J]. Radiat Res, 2004, 162(1): 56-63.
[2] HARDER J, BARTELS J, CHRISTOPHERS E, *et al*. A peptide antibiotic from human skin[J]. Nature, 1997, 387(6636): 861.
[3] 李 楠, 肖桃元, 粟永萍, 等. 人β防御素2腺病毒表达载体的构建及其在真皮多能干细胞中的表达[J]. 创伤外科杂志, 2006, 8(1): 69-72.
[4] 宗兆文, 程天民, 冉新泽, 等. 全身照射大鼠骨髓提取液对真皮多能干细胞趋化作用的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(4): 279-281.
[5] 宗兆文, 程天民, 冉新泽, 等. 放创复合伤大鼠伤口液对真皮多能干细胞的趋化作用[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2005, 25(2): 111-113.

(编辑 栗 嘉)

文章编号:1000-5404(2006)05-0427-01

个案与短篇

β-阻滞剂治疗慢性心力衰竭的临床疗效观察

寻晓东 (重庆市渝北区人民医院心血管内科,重庆 401120)

β-阻滞剂在充血性心力衰竭治疗中的地位已获得充分肯定,各种心力衰竭治疗指南陆续将其列为心功能稳定状态下心力衰竭治疗的一线用药,但β-阻滞剂在心力衰竭患者临床应用的比例至今仍然不高[1]。我院2001年4月至2002年9月选择CHF84例,旨在观察美托洛尔对改善CHF患者心功能的疗效。

1 资料与方法

1.1 一般资料

84例门诊及住院的CHF患者,男性51例,女性33例,年龄42-77岁(平均59.5岁),均按NYHA心功能分级标准分级。冠心病31例,高血压性心脏病29例,风湿性心瓣膜病17例,扩张型心脏病7例,其中心功能Ⅰ级35例,Ⅱ级32例,Ⅲ级17例。对慢性阻塞性肺疾病,严重的窦性心动过缓,低血压,Ⅱ级以上房或房室传导阻滞者不入选。在治疗前后均行心脏超声,心脏X线正位片检查。

1.2 方法

在吸氧、血管紧张素转换酶抑制剂、利尿剂、抗感染药物治疗基础上加服美托洛尔(商品名:倍它乐克,阿斯利康公司产品),初始剂量6.25 mg口服然后每周增加6.25~12.5 mg,逐步增加到治疗量25~100 mg/d,8周为1疗程。心功能评价:疗程结束后,心功能改善2级为显效,改善1级为有效,无变化或恶化为无效。

1.4 统计学处理

各项检测数值以$\bar{x}\pm s$表示,组间差异采用t检验。

2 结果

治疗前后超声心动图,X线正位片两组治疗前后左室内

(下转434页)

作者简介:寻晓东(1971-),男,重庆市人,主治医师,主要从事心血管和内分泌疾病临床诊治方面的研究。电话:(023)67808970

收稿日期:2005-06-01;修回日期:2005-07-14