文章编号:1000-5404(2006)15-1557-03

论著

皮肤软组织扩张术对大鼠表皮细胞增殖分化的影响

刘 洋[1],李建福[1],付小兵[2],孙同柱[2],郭建军[1],李海红[2] ([1]第三军医大学西南医院整形外科,重庆 400038;[2]解放军总医院304临床部全军创伤修复重点实验室,北京 100037)

提 要:目的 观察皮肤软组织扩张术对大鼠表皮细胞增殖分化的影响。**方法** 36只Wistar大鼠分为干预侧和假手术侧,制作皮肤扩张动物模型,利用表皮干细胞表达角蛋白(keratin 19, K19)、短暂扩充细胞表达K14及增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的特点,采用免疫组织化学PowerVision™二步法检测扩张皮肤表皮干细胞和短暂扩充细胞的分布特征。**结果** 扩张皮肤的表皮层明显增厚,不仅其基底层K19、K14和PCNA阳性细胞的数量明显增多,而且在棘层和颗粒层也可见K19、K14及PCNA阳性细胞的表达。**结论** 皮肤软组织扩张术的应力能诱导大鼠表皮干细胞的增殖与分化,其可能是皮肤软组织扩张术的重要生物学基础。

关键词: 皮肤软组织扩张术;表皮干细胞;短暂扩充细胞;增殖;分化
中图法分类号: R322.991;R329.28;R622 **文献标识码:** A

Effect of skin soft-tissue expansion on proliferation and differentiation of rat epidermal cells

LIU Yang[1], LI Jian-fu[1], FU Xiao-bing[2], SUN Tong-zhu[2], GUO Jian-jun[1], LI Hai-hong[2] ([1]Department of Plastic Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [2]Wound Healing and Cell Biology Laboratory Burns Institute, No. 304 Medical Department, General Hospital of PLA, Beijing 100037, China)

Abstract: Objective To observe the effect of skin soft-tissue expansion on the proliferation and differentiation of rat epidermal cells. **Methods** Totally 72 expanders were implanted under superficial fascia on the back of 36 male Wistar rats, two for each rat, one for experiment, one as control. The experimental lateral was performed conventional intermittent skin expansion. Skin samples were collected on day 1, 2, 3, 7 and 10 during expansion process, and post-expansion day 7. Keratin 19, 14 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) were employed to determine epidermal stem cells or transient amplifying cells with PowerVision™ two-step immunohistochemical method. **Results** The expanded epidermis was thicker than control ($P<0.01$). The number of cells positive for K19, K14 and PCNA in the basal layer of expanded epidermis increased. These positive cells were found scattering within the stratum spinosum and stratum granulosum of the expanded epidermis. **Conclusion** The stress of skin soft-tissue expansion can induce epidermal stem cells to proliferate and differentiate, which probably is an important biological basis for skin soft-tissue expansion.

Key words: skin soft-tissue expansion; epidermal stem cells; transit amplifying cells; proliferation; differentiation

皮肤软组织扩张术(skin soft-tissue expansion, SSTE)现已成为整形美容外科的重要治疗手段之一。既往研究表明,扩张产生的额外皮肤来源包括3个部分:机械蠕变、弹性扩张和生物性生长(即细胞的分裂增殖)[1]。表皮干细胞(epidermal stem cells, ESCs)是皮肤组织的特异性干细胞,是皮肤组织(含皮肤附件)发生、创面修复及改建的关键性细胞,但迄今为止表皮细胞在扩张过程中的增殖分化行为尚不十分清楚。因此,我们利用表皮干细胞及其增殖分化过程中不同分化阶段细胞的表面标志以及增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)标记增殖期细胞的特

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170966,30230370,30570708),暨南大学重点实验室开放基金资助项目(51205021)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30170966, 30230370, 30570708) and the Key Laboratory Opening Fund of Jinan University(51205021)
作者简介:刘 洋(1972-),男,湖南省涟源市人,硕士研究生,主治医师,主要从事创伤修复基础和临床方面的研究。电话:(023)65398209
通讯作者:李建福,电话:(023)68765349,E-mail: Lijfchina@sina.com
付小兵,电话:(010)66867396,E-mail: fuxb@cgw.net.cn
收稿日期:2005-07-29;修回日期:2005-12-28

点，采用免疫组织化学法观察扩张过程中具有增殖能力的表皮干细胞、短暂扩充细胞的分布与数量差异，初步观察皮肤软组织扩张术对表皮干细胞增殖分化的影响，旨在探讨表皮干细胞在皮肤扩张中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及模型制备

3月龄的Wistar雄性大鼠36只，体质量200～250 g，由中国医学科学院动物研究所提供。每只大鼠背部两侧浅筋膜下各植入1个10 ml的矩形软组织扩张器（上海威宁整形制品有限公司提供），扩张壶外置，分层缝合皮肤。选取一侧术日即开始间断常规扩张，每次注水扩张至囊内压5.33 kPa，每日1次，共10 d，平均注水量为17.5 ml（干预侧），另一侧则为假手术对照。

1.2 观测时相与标本采集

将实验动物编号，扩张后第1、2、3、7、10天以及终止注水扩张后第7天（扩张后第17天）活杀动物6只，用尖刀采集扩张区顶部约1 cm×1 cm大小皮肤组织块。干预侧和假手术侧于各时相采集标本6块，标本置于10%甲醛溶液固定，常规石蜡包埋，连续切片，4 ℃保存备用。

1.3 评价指标及方法

石蜡切片常规脱蜡至水后，HE染色，显微镜下观察皮肤结构；镜下选取20个视野用显微测微计测量扩张前后表皮层厚度，取其均数，单位以μm表示。连续切片分别编号为A、B、C，A用于检测K19，B、C依次用于检测K14和PCNA。采用K19单克隆抗体（clone：E6，Chemicon，工作浓度1∶100）、K14单克隆抗体（clone：LL002，Maixin Bio，工作浓度1∶100）、PCNA单克隆抗体（clone：PC10，Maixin Bio，工作浓度1∶100）和PowerVision™二步法免疫组化试剂盒（由北京中山生物技术有限公司提供）进行染色，实验操作严格按试剂盒说明进行。同时以PBS代替一抗作为空白对照。DAB试剂（北京中山生物技术有限公司）显色，苏木精复染，脱水、透明、干燥后封片，显微镜下观察结果。表皮细胞以细胞核（PCNA）、细胞质（K19、K14）呈棕黄色着色为阳性细胞。每个采集时相的每组标本块的连续切片进行免疫组化检测，在400倍光学显微镜下，每张切片选取5个视野进行观察，每个视野均计数100个表皮细胞及其中染色阳性细胞数，取其均值，以阳性细胞百分率表示。

1.4 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 11.0统计软件进行t检验。

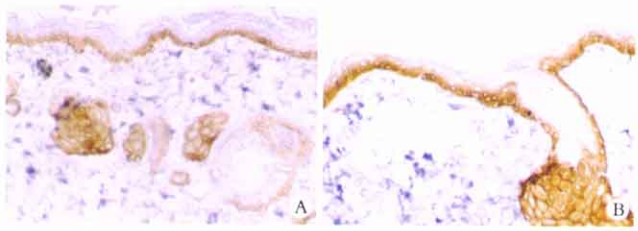
2 结果

2.1 表皮层厚度及结构变化

HE染色后光镜下观察，假手术侧皮肤表皮层厚度为（60.2±6.6）μm，而扩张后皮肤表皮层明显增厚，厚度为（100.2±10.6）μm，两者相比差异显著（$P<0.01$）。扩张后表皮棘细胞和颗粒细胞层层次明显增加，胞体增大。

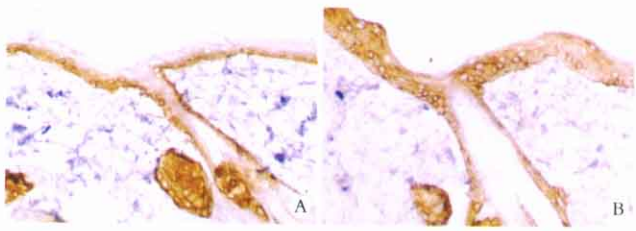
2.2 细胞角蛋白及PCNA的表达分布与特征变化

假手术侧皮肤中K19阳性表达细胞呈单层片状分布表皮基底层；K14阳性表达细胞分布于基底层及其上1～2层表皮细胞，PCNA阳性表达细胞点状分布表皮基底层（图1A、2A、3A）。扩张皮肤1 d后，即可见K19、K14和PCNA阳性细胞数量增多，3 d达到高峰，与同时相假手术侧比较，均有显著性差异（$P<0.05$），在随后1周表达逐渐下降，终止注水扩张1周后表达显著减少（$P<0.01$）（表1）。随着扩张的进程，扩张皮肤中基底层K19阳性表达细胞呈复层片状分布表皮基底层，且在棘细胞或颗粒细胞层可见散在分布，K14、PCNA阳性表达细胞则广泛分布于基底层、棘细胞和颗粒细胞层（图1B、2B、3B）。



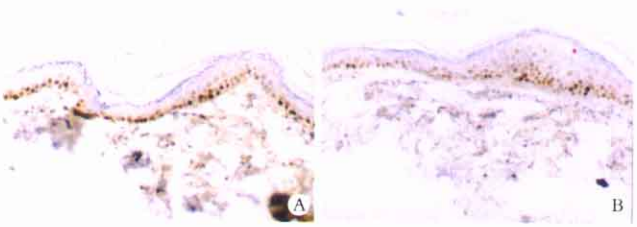
A：假手术侧；B：干预侧

图1 皮肤基底层K19阳性细胞的表达 （PowerVision™ ×200）



A：假手术侧；B：干预侧

图2 皮肤基底层K14阳性细胞的表达 （PowerVision™ ×200）



A：假手术侧；B：干预侧

图3 皮肤基底层PCNA阳性细胞的表达 （PowerVision™ ×200）

表1 假手术侧和干预侧表皮K19、K14、PCNA阳性细胞率的比较（$n=6$，%，$\bar{x}\pm s$）

时间（t/d）	K19		K14		PCNA	
	假手术侧	干预侧	假手术侧	干预侧	假手术侧	干预侧
1	5.82±0.30	7.40±0.36[a]	17.37±0.60	37.88±0.49[a]	17.85±0.56	38.15±0.48[a]
2	5.96±0.47	12.32±0.43[a]	17.62±0.57	58.58±0.54[a]	17.63±0.61	58.87±0.38[a]
3	5.76±0.42	16.30±0.47[a]	16.85±0.67	74.87±0.40[a]	18.15±0.38	75.12±0.46[a]
7	6.02±0.38	14.53±0.37[a]	17.94±0.53	71.70±0.48[a]	18.23±0.47	71.93±0.48[a]
10	5.88±0.54	13.85±0.35[a]	17.46±0.48	70.08±0.70[a]	17.53±0.46	70.53±0.67[a]
17	5.68±0.46	10.40±0.38[ab]	16.93±0.63	52.98±0.69[ab]	17.73±0.47	53.33±0.58[ab]

a：$P<0.05$，与同时相假手术侧比较；b：$P<0.01$，与皮肤扩张第10天比较

3　讨论

皮肤表皮具有增殖能力的细胞包括表皮干细胞和短暂扩充细胞，它们主要定位于基底层。从细胞发生机制看，干细胞并不直接分化产生终末分化细胞，而是先分化为短暂扩充细胞，短暂扩充细胞经过几次到几十次的分裂后，再定向分化为有丝分裂后细胞及终末分化细胞。正常情况下，表皮干细胞按一定的概率和方式分裂成干细胞或短暂扩充细胞而进行增殖分化。当机体受到刺激或损伤时，干细胞的增殖与分化行为会发生改变以适应机体的需要。研究证实，表皮干细胞及其不同分化阶段细胞表达不同的角蛋白，表皮干细胞表达 K19，短暂扩充细胞表达 K14；PCNA 只在增殖期细胞核表达，在短暂扩充细胞中有广泛表达，但在干细胞（处于 G_0 期）内含量很低，因此，可以利用这些细胞的特征性标志来研究扩张术对表皮干细胞增殖分化行为的影响[2,3]。

皮肤软组织扩张术中表皮细胞受张应力、压应力以及细胞内外流体剪切力等综合机械应力的刺激，其形态和功能、生理和生化特性产生了一系列的改变。表皮细胞通过细胞外基质－整合素－细胞骨架系统及其细胞膜上的应力敏感离子通道对机械应力即时响应，将响应的机械力信号有选择地转换到细胞和核内的不同结构部件上，实现力学信号向生物化学信号的转化，从而调节细胞的生理机能，对细胞的增殖分化产生调控作用[4]。此外，有文献报道，在电镜观察下扩张皮肤存在组织生长和组织损伤的双重超微结构表现[5]。因此可以认为，皮肤扩张的过程既有应力诱导引起的增殖效应，又有应力造成的微损伤启动的创伤修复效应，而在此过程中具有自我更新、无限增殖潜能和再生修复能力的表皮干细胞发挥着关键性的作用。

本研究表明，随着扩张的进程，K19 阳性表达细胞增多，不再局限于表皮基底层，在棘层或颗粒层亦有散在分布；而 K14、PCNA 阳性表达细胞不仅数量迅速增长，且广泛分布基底层、棘细胞和颗粒细胞层。我们认为，由于机械应力信号的刺激和创伤修复信号的启动，表皮干细胞快速增殖分化，为了适应皮肤扩张的需要，产生了数量较多的干细胞和大量的短暂扩充细胞，短暂扩充细胞继续分化为有丝分裂后细胞及终末分化细胞，从而使表皮层增厚。实验中细胞增多在 3 d 达到高峰，之后逐渐下降，终止扩张后下降更为显著，这是因为扩张既能诱导细胞增殖，也能诱导细胞凋亡，并且在扩张后期和终止注水扩张后细胞凋亡速度明显增加[6]，此外在终止扩张后应力松弛导致刺激减弱也加剧了下降的趋势。在实验过程中，假手术侧 K19、K14 和 PCNA 的表达变化差异无统计学意义。虽然植入扩张器造成皮肤损伤能引起 ESCs 向创缘聚集参与创伤愈合[7]，但本实验中皮肤取材均位于扩张区中央，因而排除了手术损伤对 ESCs 增殖的影响。

此外，扩张过程中表皮干细胞和短暂扩充细胞的动态分布，可能与以下原因有关：表皮干细胞产生了“跳跃”，即伴随着应力刺激信号和创伤修复信号的启动，表皮干细胞快速向表皮上层迁移，同时分化为大量的短暂扩充细胞，能动地响应扩张的应力刺激[8]；扩张后表皮干细胞和短暂扩充细胞的这种分布特征是否存在有丝分裂后细胞或终末分化的表皮细胞逆分化为短暂扩充细胞甚至表皮干细胞的机制[9-11]。上述推测值得我们进一步研究。

参考文献：

[1] TAKEI T, MILLS I, ARAI K, *et al*. Molecular basis for tissue expansion: Clinical implications for the surgeon [J]. Plast Reconstr Surg, 1998, 102(1): 247－258.

[2] KAUR P, LI A. Adhesive properties of human basal epidermal cells: an analysis of keratinocyte stem cells, transit amplifying cells, and postmitotic differentiating cells [J]. J Invest Dermatol, 2000, 114(3): 413－420.

[3] KIM D S, CHO H J, CHOI H R, *et al*. Isolation of human epidermal stem cells by adherence and the reconstruction of skin equivalents [J]. Cell Mol Life Sci, 2004, 61(21): 2774－2781.

[4] INGBER D E. Mechanical signaling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology [J]. Circ Res, 2002, 91(10): 877

[5] 李　江，鲁开化，艾玉峰，等. 持续恒压扩张和常规间断扩张后皮肤超微结构的改变[J]. 中华整形外科杂志，2002，18(6)：365－366.

[6] 李　江，鲁开化，艾玉峰，等. 持续恒压和间断常规组织扩张术对皮肤细胞增殖与凋亡的影响[J]. 中华医学美学美容杂志，2002，8(5)：247－249.

[7] 黄　晖，赖西南，王正国，等. 感觉神经肽 SP 对创面表皮干细胞迁移影响的实验研究[J]. 解放军医学杂志，2003，28(10)：884－886.

[8] 李建福，付小兵，盛志勇，等. 创面愈合过程中表皮干细胞的分布特征及意义[J]. 解放军医学杂志，2003，28(7)：588－589.

[9] FU X, SUN X, LI X, *et al*. Dedifferentiation of epidermal cells to stem cells *in vivo*[J]. Lancet, 2001, 358(9287): 1067－1068.

[10] 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[J]. 中华医学杂志，2001，81(12)：733－736.

[11] 唐红英，伍素华，罗向东，等. 整合素 β_1 小干扰 RNA 载体构建及其在表皮干细胞干扰效应检测[J]. 第三军医大学学报，2004，23(12)：2120－2122.

（编辑　陈聪连）