论著

文章编号:1000-5404(2006)17-1742-04

创伤修复中白细胞蛋白酶抑制因子和中性粒细胞趋化因子差异表达的研究

江德鹏[1],向 静[2],文 亮[3],粟永萍[1],屈纪富[1],冉新泽[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,重庆 400038;[2]大坪医院野战外科研究所神经内科,重庆 400042;[3]西南医院急诊科,重庆 400038)

提 要:目的 研究真皮间充质干细胞(dermal mesenchymal stem cells, dMSCs)参与创伤修复中白细胞蛋白酶抑制因子(secretory leukocyte protease inhibitor, SLPI)和中性粒细胞趋化因子(cytokine-induced neutrophil chemoattractant-2, CINC-2)的差异表达,并探讨其相关功能。**方法** 采用前期建立的技术分离、纯化并扩增dMSCs,通过RT-PCR检测创伤修复时SLPI和CINC-2在dMSCs中表达,通过^{3}H-TdR掺入实验研究SLPI和dMSCs有丝分裂的关系,利用Boyden趋化小室研究dMSCs对中性粒细胞的趋化作用。**结果** 分离的大鼠dMSCs呈梭形,在体外显示多向分化潜能。RT-PCR提示伤口液刺激24 h后dMSCs中SLPI,CINC-2表达升高,同时检测到在全层切割伤后1 d大鼠皮肤组织中SLPI和CINC-2均为高表达,^{3}H-TdR掺入实验提示SLPI能够促进dMSCs的有丝分裂,趋化小室实验显示dMSCs对中性粒细胞有趋化作用,加入中和抗体后趋化作用减弱。**结论** 创伤后SLPI,CINC-2在dMSCs中表达升高,其表达升高可能同dMSCs的增殖和趋化有关。

关键词: 干细胞; 差异表达; 白细胞蛋白酶抑制因子; 中性粒细胞趋化因子
中图法分类号: R329.26; R331.142; R641.02 **文献标识码:** A

Differential expression of secretory leukocyte protease inhibitor and cytokine-induced neutrophil chemoattractant-2 in the process of wound repair

JIANG De-peng[1], XIANG Jing[2], WEN Liang[3], SU Yong-ping[1], QU Ji-fu[1], RAN Xin-ze[1] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combine Injury, College of Preventive Medicine, Chongqing 400038, [2]Department of Neurology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Chongqing 400042, [3]Department of Emergency, Southwest Hospital, Third Military Medical Uiniversity, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the differences in gene expression of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) and cytokine-induced neutrophil chemoattractant-2 (CINC-2) in dermal mesenchymal stem cells (dMSCs) during trauma. **Methods** dMSCs were routinely isolated from male neonatal Wistar rats aged one day, purified and expanded by the technique established in the prophase. Two pieces of sponges were implanted into two 7-centimeter-long incisions on the back of Wistar rats aged 3 months. The wound fluid extracted from the sponges was used to stimulate the dMSCs. The skins around the wound were excised and grinded. Then SLPI and CINC-2 were detected in dMSCs with or without wound fluid stimulation and the rats skin tissues of normal controls or the wounded by RT-PCR. Mitogenic responses of dMSCs to SLPI were examined *via* the incorporation of ^{3}H-TdR into DNA. Chemotactic activity of dMSCs to neutrophil was evaluated by using a 24-well microchmotaxis Boyden chamber. **Results** Most of the neonatal dMSCs were spindle-shaped cells and exhibited multi-directional differentiation potential *in vitro*. In RT-PCR and experiment, SLPI and CINC-2 both increased in the stimulated dMSCs and expressed strongly in the rat skin 1 day after injury. A concentration-dependent proliferation promotion was demonstrated in dMSCs incubated for 24 h in the presence of SLPI. Neutrophil experiment suggested that CINC-2 was involved in promoting the migration of neutrophil to dMSCs. **Conclusion** SLPI and CINC-2 were up-regulated in the process of wound repair. They might play important roles in the proliferation and chemotaxis of dMSCs.

Key words: stem cells; differential expression; secretory leukocyte protease inhibitor; cytokine-induced neutrophil chemoattractant-2

基金项目: 国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(2005CB522605);国家自然科学基金资助项目(30370562)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, 2005CB522605) and the National Natural Science Foundation of China (30370562)

作者简介: 江德鹏(1977-),男,安徽省安庆市人,硕士,主治医师,主要从事干细胞在创伤修复方面基础和应用方面的研究。电话:(023)66526516
通讯作者: 屈纪富,E-mail:qujifu@yahoo.com

收稿日期: 2005-12-23;**修回日期:** 2006-03-02

皮肤创伤修复是一个由许多组织、细胞、细胞外基质、细胞因子等参与的高度有序的生物学过程[1]。中性粒细胞，单核细胞、纤维原细胞被相继激活，参与创伤修复。近年来，干细胞在组织创伤中的作用受到越来越多的重视，深入研究干细胞参与创伤修复的信号通路传导、细胞生物学和分子机制有助于进一步了解创伤修复的原理，更好的应用干细胞进行治疗。我所成功分离并鉴定了真皮间充质干细胞（dermal mesenchymal stem cells，dMSCs），证实他们具有多向分化潜能，是一种重要的组织修复细胞，能够参与皮肤组织的创伤修复，可以用来进行细胞治疗[2-4]。为了进一步研究 dMSCs 参与创伤修复的分子机制，我们使用伤口液刺激 dMSCs，以此来模拟干细胞在创伤微环境中的变化，通过抑制消减杂交建立了伤口液刺激前后 dMSCs 差异表达基因文库，并通过基因芯片进行反向鉴定，发现了 13 个同创伤修复相关的基因克隆。本研究中，我们选取差异表达最显著的白细胞蛋白酶抑制因子（secretory leuko cyte protease inhibitor，SLPI）和中性粒细胞趋化因子（Cytokine-induced neutrophil chemoattract ant-2，CINC-2）首先进行下一步研究。本实验拟通过逆转录-聚合酶链反应（RT-PCR）检测 SLPI 和 CINC-2 在创伤前后 dMSCs 中的差异表达，并初步探讨它们的相关功能，为下一步的实验奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料和试剂

1 d 龄和 3 个月龄的 Wistar 雄性大鼠（1 d 龄 40 只，3 月龄 50 只），从第三军医大学实验动物中心购得。IMDM 和 FBS 购自 Hyclone 公司，Tripure 细胞裂解液购自罗氏试剂公司，RT-PCR 试剂盒和 DL-2000 分子量标准购自大连宝生物公司，DEPC 购自 sigma 公司，琼脂糖购自 Gibcobrl 公司，蛋白抽提试剂 M-PER 购自 PIERCE 公司，蛋白 Marker 购自华舜公司，培养瓶、平板和 Boyden 趋化小室购买自 Corning 公司。所有引物由北京赛百盛公司合成。Ⅷ因子，Vimentin 和 Pancytokeratin 免疫组化检测试剂盒购自博士德生物公司。

1.2　dMSCs 的分离、培养和处理

取出生 1 d 的 Wistar 雄性大鼠，无菌条件下，剪取背部全层皮肤。置于 0.25% 的胰酶中，4 ℃消化过夜。加入胎牛血清终止反应。分离真皮组织，制成单细胞悬液，接种于 50 ml 一次性塑料培养瓶中，培养条件为 IMDM + 10% 胎牛血清，37 ℃，5% CO_2，饱和湿度。培养 6 h 后，弃去悬浮细胞，将贴壁细胞继续培养，低密度接种法筛选出一高增殖活性的细胞克隆，取第 3 代的贴壁细胞在盖玻片上培养，加入不同浓度的地塞米松进行多向分化诱导，并用免疫组织化学 ABC 法检测Ⅷ因子，Vimentin 和 Pancytokeratin 的表达，一抗为小鼠抗大鼠的单克隆抗体，工作浓度为 1∶100。细胞鉴定后，取第 10 代细胞用于研究[5]。

1.3　伤口液的提取

3 个月龄的成年 Wistar 大鼠用戊巴比妥钠麻醉，两条消毒的聚乙烯酒精海绵被置入背部皮下 7 cm 长切口中。致伤后 3 d，动物被乙醚吸入处死，海绵在无菌条件下取出，从 6 只动物中得到的 12 条海绵挤压得到液体，4 ℃，2 000 r/min 离心去除细胞成分，无细胞成分的伤口液被用于下一实验[6]。

1.4　dMSCs 和大鼠皮肤组织 RNA 的提取

1.4.1　dMSCs RNA 的提取　　根据前期研究成果，伤后 1 d 伤口液促进 dMSCs 增殖和迁移的能力最强[7]。dMSCs 在无血清培养基条件下饥饿 48 h，使细胞生长同步化[8]；然后加入 10% 伤后 1 d 伤口液，作用 24 h 后收集细胞（实验组），并以未加伤口液作用者为对照组。用 Tripure 细胞裂解液抽提实验组和对照组 dMSCs 的总 RNA，分光光度计定量，甲醛变性胶电泳质检。

1.4.2　大鼠皮肤组织 RNA 的提取　　大鼠背部皮肤消毒后，纵行制作长约 6 cm 的皮肤切割伤，深至皮下，常规缝合，伤后 1 d 麻醉下取 500 mg 伤口皮肤组织（实验组），同时取 500 mg 正常大鼠皮肤组织作为对照，迅速在液氮中研成粉末，用 Tripure 细胞裂解液抽提实验组和对照组皮肤的总 RNA，分光光度计定量，甲醛变性胶电泳质检。

1.5　dMSCs 和大鼠皮肤组织中 SLPI，CINC-2 mRNA 的含量检测

我们采用 RT-PCR 检测伤口液刺激前后 dMSCs 及创伤前后大鼠皮肤中 SLPI、CINC-2 的含量变化。RT-PCR 试剂由大连宝生物公司提供，实验步骤参照说明书进行，SLPI、CINC-2 退火温度均为 58 ℃。SLPI 上游引物：5′-TGCTCCTTGCTCTGGGTGTCCTG -3′。下游引物：5′-GCCGTCATTCTGGCACTTATTGG-3′。目的基因共 295 bp CICN-2 上游引物：5′-CAGTGCCTGAAGACCCTACCAAG-3′。下游引物：5′-AGGTCCTCCATCACCGTACAAGA-3′。目的基因共 236 bp，内参照选用 GAPDH，上游引物：5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′。下游引物：5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′，扩增片断 440 bp。

1.6　SLPI 的促增殖活性

我们通过 ^{3}H-TdR 掺入实验来检测 SLPI 对 dMSCs 的促增殖活性。取第 10 代 dMSCs，生长至 80% 融合时换用无血清 IMDM 培养液孵育 48 h。实验组分别加入 100 ng/ml，200 ng/ml，500 ng/ml 的 SLPI 因子，对照组不加入因子，孵育 20 h 后加入 2 μCi ^{3}H-TdR。标记细胞，继续孵育 4 h，通过液闪计数仪计数掺入的 ^{3}H-TdR 数目。每组实验使用不同时间分离的细胞重复 3 次，取均数。

1.7　dMSCs 对中性粒细胞趋化作用

CINC-2 对中性粒细胞有强大的趋化作用，我们发现 CINC-2 在 dMSCs 表达，那么 dMSCs 有无中性粒细胞趋化作用呢，这一点以往文献少见报道。

我们采用 Boyden 趋化小室法体外进行趋化活性分析。dMSCs 传代，以 1×10^6/ml 密度接种于 24 孔板中（孔径 5 μm），培养条件为 IMDM + 10% 胎牛血清，置于 37 ℃，5% CO_2 孵育箱中培养 3 d。对照组加入 IMDM + 10% 胎牛血清，不加入细胞。用 Percoll 密度梯度离心法分离烧伤后 12 h 大鼠外周血中性粒

细胞，以 5×10^5/ml 的密度接种于上室，上室和下室通过聚碳酸酯膜分开。将整个小室置于孵育箱中作用 6 h。取出多聚碳酸酯膜，按照 Costar 公司推荐方法固定，染色。每组重复实验 3 次。400 倍镜下计数 10 个随机视野的中性粒细胞数，取均值。

为了探讨 SLPI 是否包含在促进中性粒细胞趋化中，我们把羊抗鼠 CINC-2 多克隆抗体（中和抗体）加入实验组和对照组中，中性粒细胞被加入上室中，在 37 ℃ 下孵育 6 h，通过上面的方法对多聚碳酸酯膜染色，计数。

1.8 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 11.0 软件，进行两样本均数间 t 检验。

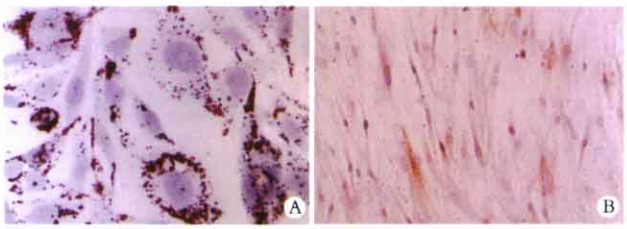
2 结果

2.1 dMSCs 的分离和鉴定

原代培养的 dMSCs 形态多样，传至第 3 代，细胞形态较为一致，主要为梭形（图 1），细胞呈克隆性生长，我们采用低密度接种法筛选出高增殖活性克隆，体外传代培养，经地塞米松诱导 4 周后，组织染色证实细胞具有成脂分化、成骨分化、成肌分化等多向分化潜能（图 2）。免疫组织化学法发现体外分离培养的细胞Ⅷ因子和 Pancytokeratin 表达为阴性，可以排除内皮细胞和角质细胞的可能，Vimentin 表达呈阳性，提示该细胞为间质来源。



图1 大部分新生的 dMSCs 细胞在体外呈梭形，形态均一 （HE×100）

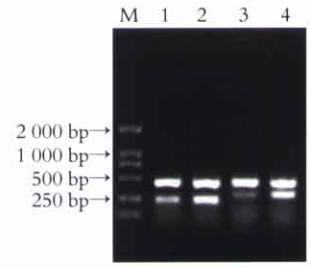


A：油红 O 染色 （×200）；B：myosin 免疫组化染色 （ABC×200）

图2 真皮多能干细胞成脂肪、成肌诱导结果

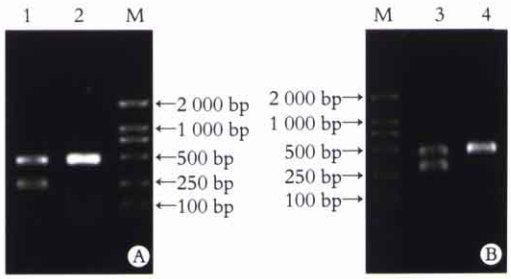
2.2 细胞和皮肤组织中 SLPI，CINC-2 mRNA 的含量检测结果

如图 3 所示，伤口液刺激 24 h 后 SLPI，CINC-2 mRNA 含量在 dMSCs 中显著升高，条带灰度扫描结果显示，SLPI 较对照组增高 1.73 倍，CINC-2 较对照组增高 1.39 倍（$P<0.05$）。同时我们在组织水平检测正常大鼠皮肤组织和全层切割伤后 1 d 大鼠伤口皮肤组织 SLPI 和 CINC-2 mRNA 含量，伤后 1 d 大鼠皮肤组织 CINC-2 mRNA 含量较正常皮肤组织显著增加，条带灰度扫描结果显示增加 2.25 倍（图 4A），正常大鼠皮肤组织不表达 SLPI，而在伤后 1 天大鼠皮肤组织中高表达（图 4B）（$P<0.05$）。



M：标准；1：正常 dMSCs CINC-2 mRNA 表达；2：伤口液刺激 dMSCs CINC-2mRNA 表达；3：正常 dMSCs SLPI mRNA 表达；4：伤口液刺激 dMSCs SLPI mRNA 表达

图3 伤口液刺激前后 dMSCs 中 SLPI、CINC-2mRNA 的含量检测结果



M：标准；1：创伤后大鼠皮肤 CINC-2 mRNA 表达；2：正常大鼠皮肤 CINC-2 mRNA 表达；3：创伤后大鼠皮肤 SLPI mRNA 表达；4：正常大鼠皮肤 SLPI mRNA 表达

图4 创伤前后大鼠皮肤组织中 CINC-2（A）、SLPI（B）mRNA 的含量检测结果

2.3 SLPI 的促增殖活性

我们使用 ^{3}H-TdR 掺入实验评估不同浓度 SLPI 因子对 dMSCs 的促有丝分裂潜能，在 0 ng/ml，100 ng/ml，200 ng/ml，500 ng/ml 的 SLPI 因子中刺激下 ^{3}H-TdR 掺入值分别是 2.468×10^3，2.772×10^3，3.386×10^3，4.287×10^3，同对照组相比，加入 SLPI 因子后 dMSCs 增殖指数随浓度增大而增加，提示 SLPI 能够增加 dMSCs 的有丝分裂指数，促进 dMSCs 的增殖。

2.4 dMSCs 对中性粒细胞趋化作用

我们采用 Boyden 趋化小室法体外进行趋化活性分析，结果显示迁移至多聚碳酸酯膜背面的细胞数对照组（A 组）20.3±6.2，dMSCs 组（B 组）130.1±32.6，dMSCs 组迁移至多聚碳酸酯膜背面的细胞数显著增加，提示 dMSCs 对中性粒细胞有趋化作用（$P_{BA}<0.05$），加入羊抗鼠 CINC-2 多克隆抗体后（C 组）迁移细胞数为 58.2±14.5，同对照组相比仍有显著差异（$P_{CA}<$

0.05)，但迁移细胞数较 dMSCs 组减少(P_{BC} <0.05)，提示加入 CINC-2 抗体后，趋化作用仍然存在，但明显减弱。

3　讨论

为了研究伤后早期 dMSCs 参与创伤修复的分子机制，我们观察伤口液刺激 24 h 后 dMSCs 的反应变化，并通过抑制消减杂交构建了伤口液刺激 24 h 后 dMSCs 基因改变的 cDNA 文库。

在此基础上，为了避免假阳性和假阴性，我们选用基因芯片进行反向鉴定，发现了 13 个可能同创伤修复相关的基因在 dMSCs 中上调表达，我们首先选取差异表达最为显著的两个基因 SLPI 和 CINC-2 进行下一步研究，通过 RT-PCR 检测它们在 dMSCs 中的含量。实验显示，SLPI 和 CINC-2 在 dMSCs 中均有表达，加入伤口液刺激 24 h 后表达显著升高。同时，我们通过 RT-PCR 在全层切割伤后 1 d 大鼠伤口皮肤组织中检测到 SLPI 和 CINC-2 均为高表达，同细胞实验的结果相符合。我们初步研究了 SLPI 和 CINC-2 的功能，发现 SLPI 能够促进 dMSCs 的增殖，dMSCs 可能通过 CINC-2 对中性粒细胞发挥趋化作用，这些工作初步显示了在 dMSCs 中这两个基因的相关功能，也明确了创伤前后它们在 dMSCs 中的差异表达，从而进一步证实了抑制消减杂交和基因芯片鉴定的结果。

SLPI 是一个强力的白细胞蛋白酶抑制因子，能够抑制多种蛋白酶活性。除了抗蛋白酶外，SLPI 还有抗炎、抗细菌，抗真菌，抗逆转录蛋白等活性。近年来，SLPI 在几项研究中展示了潜在的促细胞增殖活性，尽管机制仍不清楚[9]。研究显示 SLPI 在创伤愈合中发挥作用，SLPI 能够对抗由内毒素激发的单核细胞和巨嗜细胞释放的促炎症介质的释放，从而促进伤口愈合[10]。在 SLPI 缺失的动物模型中，伤口愈合明显延迟，炎症反应加剧，蛋白酶活性增强，基质沉积延迟[11]。SLPI 在创伤过程中的高表达有着重要的意义。

CINC-2 属于 CXC 趋化因子家族，对中性粒细胞有强大的趋化作用，在炎性反应中发挥重要的调节作用。本实验通过 RT-PCR 检测到 CINC-2 在 dMSCs 中有表达，并且在伤口液刺激 24 h 后表达显著增强。进一步的实验显示 dMSCs 对中性粒细胞有趋化作用，使用中和抗体封闭 CINC-2 的作用后，这种趋化作用明显减弱，dMSCs 可能参与了创伤早期中性粒细胞的激活，现在人们已经认识到中性粒细胞不仅仅行使杀菌，清理坏死组织的功能，还可以分泌许多重要的细胞因子，参与激活表皮细胞、成纤维细胞，血管内皮细胞，启动组织修复。CINC-2 的高表达可能是干细胞启动创伤修复的重要途径之一。

在经典的创伤修复启动理论，干细胞和其他修复细胞的相互作用较少被提及，结合本实验结果和本所以往研究表明，我们认为 dMSCs 不仅是一种重要的组织修复细胞，而且在创伤修复启动中可能也有重要意义。组织修复细胞平时处于静息状态，在创伤微环境作用下，这些细胞出现特异性基因表达，并通过多种途径启动组织修复过程[12]。我所以往研究显示，dMSCs 对创伤微环境的反应性显著强于成纤维细胞，内皮细胞等组织修复细胞，提示 dMSCs 可能在创伤启动中发挥重要作用。增殖，迁移，分化，分泌细胞因子趋化活化其他细胞是组织修复细胞参与创伤修复的主要途径。SLPI、CINC-2 等差异表达基因同细胞增殖，趋化密切相关，进一步认识两个基因的作用能够为创伤修复启动的研究提供新的研究靶点。

参考文献：

[1] LERMAN O Z, GALIANO R D, ARMOUR M, *et al*. Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast: impairment in migration, vascular endothelial growth factor production, and response to hypoxia[J]. Am J Pathol, 2003, 162(1): 303 - 312.

[2] 史春梦，程天民. 创伤局部微环境对大鼠真皮多能干细胞生物学性状的影响[J]. 中华创伤杂志，2003，19(4)：199 - 202.

[3] SHI C M, CHENG T M. Differentiation of dermis-derived multipotent cells into insulin-producing pancreatic cells *in vitro*[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(17): 2550 - 2552.

[4] 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.

[5] 史春梦，程天民. 大鼠真皮多能间充质干细胞的分离培养[J]. 第三军医大学学报，2001，23(9)：1068 - 1070.

[6] MARIKOVSKY M, ROSENBLUM C I, FALTIN Z, *et al*. Appearance of leptin in wound fluid as a response to injury[J]. Wound Repair Regen, 2002, 10(5): 302 - 307.

[7] 屈纪富，史春梦，麦　跃，等. 真皮多能干细胞在创伤愈合中的作用[J]. 中国临床康复，2004，8(11)：2034 - 2035.

[8] IYER V R, EISEN M B, ROSS D T, *et al*. The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum[J]. Science, 1999, 283(5398): 83 - 87.

[9] ZHANG D, SIMMEN R C, MICHEL F J, *et al*. Secretory leukocyte protease inhibitor mediates proliferation of human endometrial epithelial cells by positive and negative regulation of growth-associated genes[J]. J Biol Chem, 2002, 277(33): 29999 - 30009.

[10] SONG X, ZENG L, JIN W, *et al*. Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the inflammation and joint damage of bacterial cell wall-induced arthritis[J]. J Exp Med, 1999, 190(4): 535 - 542.

[11] ASHCROFT G S, LEI K, JIN W, *et al*. Secretory leukocyte protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing[J]. Nat Med, 2000, 6(10): 1147 - 1153.

[12] MEGDALENA J, MILLARD T H, ETIENNE-MANNEVILLE S, *et al*. Involvement of the Arp2/3 complex and Scar2 in Golgi polarity in scratch wound models[J]. Mol Biol Cell, 2003, 14(2): 670 - 684.

（编辑　王　红）