论著

文章编号:1000-5404(2006)14-1502-04

抗生素及bFGF,EGF,rhGH对人体外培养Hacat细胞生物学特性影响

李金玺,刘旭盛,唐 辉,周 新,黄跃生 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 观察不同种类不同浓度的创面外用药物对Hacat(human adult skin keratinocyte propagated under low Ca and elevated temperature)细胞生物学特性的影响。**方法** 将Hacat细胞传代,经创面外用药物作用后,倒置显微镜观察其生长变化、流式细胞仪检测其细胞周期、二甲基噻唑二苯基四唑溴盐(MTT)法检测其细胞增殖等的变化。**结果** 细胞形态学观察、二甲基噻唑二苯基四唑溴盐(MTT)吸光度OD值(optical density)、细胞增殖指数[PI=(S+G_2/M)/(G_0/G_1+S+G_2/M)]值的结果与对照组比较结果较一致:庆大霉素组、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)组、丁胺卡那霉素0.021 μg/ml组Hacat细胞变化均不明显($P>0.05$);其余各种剂量抗生素组及表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)组抑制Hacat细胞增值,数目较少,形态不规则,透明度低,细胞内多有颗粒样物质及空泡。OD值、PI值均明显降低($P<0.05$,$P<0.01$)。其中氯霉素组、丁胺卡那霉素组OD值存在组内差异,低浓度组对细胞增殖抑制作用较中、高浓度低($P<0.05$)。重组人生长激素(recombinant human growth hormone, rhGH)组促进Hacat细胞增值,OD值、PI值与对照组比较均增高($P<0.05$),且存在组内差异,高浓度组对细胞增殖促进作用较中、低浓度低($P<0.05$)。**结论** ①不同创面外用药物对Hacat细胞生物学特性影响各异。②氯霉素组、丁胺卡那霉素组、rhGH组对Hacat细胞生物学特性的影响存在组内差异。

关键词: 抗生素;碱性成纤维细胞生长因子;表皮细胞生长因子;重组人生长激素;Hacat细胞;生物学特性

中图法分类号: R322.991;R329.2;R978.1 **文献标识码:** A

Effect of some antibiotics, bFGF, EGF and rhGH on biological characteristics of Hacat cells *in vitro*

LI Jin-xi, LIU Xu-sheng, TANG Hui, ZHOU Xin, HUANG Yue-sheng (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effect of different kinds of external application agents in different concentrations on the biological characteristics of human adult skin keratinocyte propagated under low Ca and elevated temperature (Hacat). **Methods** Hacat cells were passaged *in vitro*. The growth rate, cell cycle and the proliferation of the cultured Hacat cells were determined by inverted microscope, flow cytometry and MTT respectively, after the cells were cocultured with the external agents for burn wounds including some antibiotics, bFGF, EGF and rhGH. **Results** The morphology, the optical density (OD) by MTT, cell cycle by flow cytometry expressed as proliferation index —— PI=(S+G_2/M)/(G_0/G_1+S+G_2/M) of Hacat cells treated with gentamicin, bFGF and 0.021 μg/ml amikacin were of no significant difference with that of control cells. But OD value or PI of the Hacat cells decreased significantly ($P<0.05$, $P<0.01$) in all other antibiotic (in all concentrations) and EGF groups, with granules and vacuoles within Hacat cells of irregular shape and clear contour. There was intra-group difference of OD value in chloromycetin and amikacin groups. The proliferation was more significant, the OD value and PI were much higher in the Hacat cells in rhGH groups than that in control group ($P<0.05$) with obvious intra-group difference. rhGH of moderate and low concentrations exerted more powerful promoting effect on the proliferation of Hacat cells than rhGH of high concentration ($P<0.05$). **Conclusion** Different kinds of external application agents for burn wounds exerted different effects on the

基金项目: 国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054205)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" project, G1999054205)

作者简介: 李金玺(1973-),男,新疆维吾尔自治区塔城市人,硕士研究生,主治医师,主要从事创面愈合方面的研究.现在兰州军区乌鲁木齐总医院烧伤科。电话:(023)68772795

通讯作者: 刘旭盛,电话:(020)83342795,E-mail:liuxusheng2002@hotmail.com

收稿日期: 2006-03-20;**修回日期:** 2006-05-31

biological characteristics of Hacat cells. There was significant intra-group difference in the effects of some agents on the biological characteristics of Hacat cells, such as chloromycetin, amikacin and rhGH.

Key words: antibiotics; basic fibroblast growth factor; epidermal growth factor; recombinant human growth hormone; human adult skin keratinocyte propagated under low Ca and elevated temperature (Hacat); biological characteristics

创伤修复细胞主要分为:成纤维细胞、表皮细胞、血管内皮细胞。在创面修复的过程中,3 种细胞分别有不同的功能和作用来共同完成创面的修复。表皮细胞的增殖、分化、迁移是创面再上皮化及创面修复的重要环节之一。在创面愈合的过程中,有很多外用药物作用于创面,那么这些药物对表皮细胞的影响又是怎样的呢? Hacat 细胞株是成人表皮细胞自发转化而成的细胞系,体外传代超过 140 代,具有永生性,不具有成瘤性。接种裸鼠后,表现出与表皮细胞相似的分化特性。该细胞系是研究人表皮细胞的有力工具。因此,我们通过研究部分创面外用药物对体外培养的 Hacat 生物学特性的影响,为合理使用创面外用药物提供部分实验依据。

1　材料与方法

1.1　材料

试剂 bFGF (珠海亿胜生物制药有限公司),表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)(深圳市华生元基因工程发展有限公司),重组人生长激素(recombinant human growth hormone, rhGH)(上海联合赛尔生物工程有限公司),二甲基噻唑二苯基四唑溴盐(MTT,北京华美生物工程公司),碘化丙啶(美国 Sigma 公司),DMEM(美国 Sigma 公司),DK-SFM(美国 Invitrogen Corporration),优级新生牛血清(中美合资兰州民海生物工程有限公司)。

1.2　方法

1.2.1　Hacat 细胞株的培养　　用 DK-SFM 培养该细胞株,每 2 天换液 1 次,在细胞铺满瓶底的 80% 时,弃去培养瓶中的培养液。PBS 轻轻漂洗后,加入 0.125% 胰酶 +0.02% EDTA 消化液,37 ℃消化 10 min。在倒置显微镜下观察细胞间隙变大,细胞变圆,部分细胞脱壁后,加入等量的 DMEM(含 10% 新生牛血清)终止消化,吸管轻轻吹打使贴壁细胞完全脱落,并使其分散。收集含消化液的细胞悬液于 10 ml 离心管中,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 PBS,同样条件下再次离心,弃上清,加入 DK-SFM,1∶2 传代培养于培养瓶中[1]。

1.2.2　实验分组　　①空白对照组。②抗生素组(每组分为 2 ~3 个浓度):丁胺卡那霉素组(A: 0.021 μg/ml、B: 0.21 μg/ml、C: 2.1 μg/ml)、庆大霉素组(A: 5 μg/ml、B: 50 μg/ml、C: 500 μg/ml)、氯霉素组(A: 0.01 μg/ml、B: 0.1 μg/ml、C: 1 μg/ml)、磺胺脒隆组(A:5 mg/ml、B:10 mg/ml)。③生长因子组:bFGF 组和 EGF 组,均为市售商品浓度。④rhGH 组,也分 3 个不同浓度(A: 0.016 μg/μl、B: 0.16 μg/μl、C: 1.6 μg/μl),各浓度之间为等倍比关系。

1.2.3　Hacat 标准曲线的测定(MTT 法)

Hacat 标准曲线的测定,方法同文献[2]。根据标准曲线第 2 天为细胞生长的对数期,于 96 孔板上接种 63 孔 5×10^4/ml 细胞 100 μl。接种后第 2 天与第 3 天之间加入药物影响,测定细胞 OD 值的改变,并换算成细胞数进行比较。

1.2.4　Hacat 各时相相对细胞数测定　　采用流式细胞仪分析。以 5×10^5/ml 细胞数将种植于 24 孔培养板上,每组接种 3 孔。用碘化丙啶染液染色, FACScan 流式细胞仪(美国 BD 公司)检测,Cell quest 分析软件分析,细胞分裂增殖指数(PI) = $(S + G_2/M)/(G_0/G_1 + S + G_2/M)$。

1.3　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件行方差分析和 t 检验。

2　结果

2.1　对 Hacat 的增殖活性的影响(MTT)

2.1.1　抗生素类　　庆大霉素 3 组、丁胺卡那霉素 A 组对 Hacat 细胞增殖与对照组比较无明显影响($P > 0.05$),但是 MTT 结果显示丁胺卡那霉素 B 组对 Hacat 细胞增殖有促进作用,结果与流式细胞仪结果相反,考虑为实验误差所至,还需要将来的实验中进一步研究探讨。其余抗生素对 Hacat 细胞均有抑制增殖作用,与对照组比较($P < 0.05$),有统计学意义。磺胺咪隆组(5、10 mg/ml) MTT 值分别为(0.180 ±0.008)、(0.161 ±0.009),对照组为(0.441 ±0.018),与对照组比较对 Hacat 增殖影响较大($P < 0.01$)。丁胺卡那霉素 C 组、氯霉素 B、C 组与其组内 A 组比较对 Hacat 抑制增殖作用有差别($P < 0.05$)。

2.1.2　生长因子类　　bFGF (Hacat 生长因子)对 Hacat 增殖无明显影响($P > 0.05$),MTT 值 bFGF:0.461 ±0.014、对照组 0.441 ±0.018。EGF 对 Hacat 增殖有抑制效应,较对照明显降低为 0.140 ±0.007,有统计学意义($P < 0.05$)。

2.1.3　rhGH 组　　3 组浓度对 Hacat 都有促进增殖的作用,3 组 MTT 值分别为(0.554 ±0.016)、(0.557 ±0.039)、(0.478 ±0.021),有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2　细胞周期各时相相对细胞数　具体见表 1

表 1　部分创面外用药物对 Hacat 周期分布的影响

组别	G_0/G_1(%, $\bar{x} \pm s$)	S(%, $\bar{x} \pm s$)	G_2/M(%, $\bar{x} \pm s$)	PI
对照组	151.787 ±0.801	121.673 ±1.516	126.540 ±0.805	148.213 ±0.801
丁胺卡那 B 组	160.757 ±5.383	113.140 ±2.724	126.110 ±1.907	139.243 ±2.194[a]
bFGF 组	152.697 ±4.333	115.200 ±5.803	132.137 ±5.383	147.303 ±4.333
EGF 组	160.790 ±4.867	114.623 ±1.507	124.583 ±3.441	139.207 ±4.864[a]
rhGH(A 组)	139.683 ±7.092	119.037 ±5.562	141.280 ±4.062	160.317 ±7.092[a]
rhGH(B 组)	148.390 ±0.787	117.773 ±3.845	137.170 ±3.377	151.643 ±0.753[a]

a: $P < 0.05$,与对照组比较

2.3 倒置显微镜观察细胞形态、数量的变化

Hacat 细胞正常培养第 3 天细胞形态见图 1，显示 Hacat 数目较多，呈长条形或梭形，轮廓不清，透明度高。

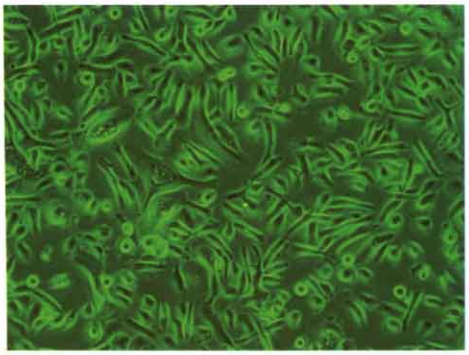


图 1 Hacat 细胞正常培养第 3 天的细胞形态
（倒置显微镜 ×200）

Hacat 细胞培养第 2 天加入 A 组 rhGH 后继续培养至第 3 天的细胞形态见图 2，显示细胞分布均匀、密集，呈长条形或梭形，核分裂相多见，轮廓不清，透明度高。

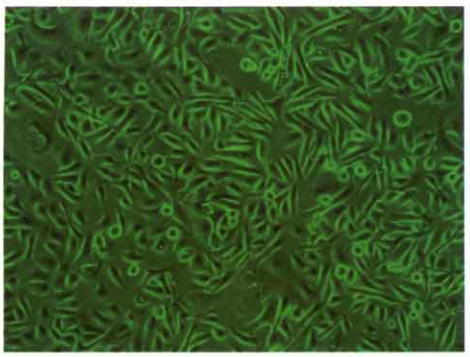


图 2 Hacat 细胞培养第 2 天后加入 A 组 0.016 μg/μl rhGH 后继续培养至第 3 天的细胞形态 （倒置显微镜 ×200）

Hacat 细胞培养第 2 天加入 EGF 后继续培养至第 3 天的细胞形态见图 3，显示细胞数目较少，形态不规则，轮廓清晰，透明度低，细胞内多有颗粒样物质及空泡。

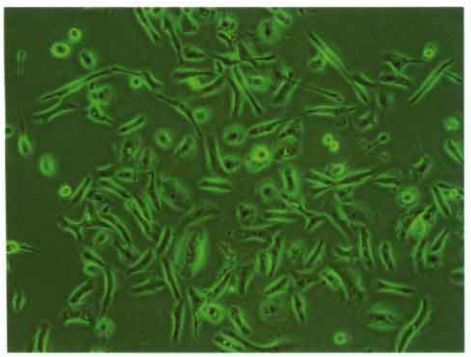


图 3 Hacat 细胞培养第 2 天加入 EGF 后继续培养至第 3 天的细胞形态 （倒置显微镜 ×200）

3 讨论

创面愈合是机体通过自身的再生能力，为恢复其表面的连续性和完整性、维持内环境稳定所进行的一系列修复活动[3]。表皮细胞是重要的创伤修复细胞之一，创伤及周围部位表皮细胞的增殖与迁移，是创伤被表皮组织重建，完成再上皮化的关键[4]。在临床实践中应用创面外用药物的时候，每一种药物，及它们的不同浓度对创面修复细胞的影响都是各不相同的。如何通过创面外用药物的应用，在达到用药目的的同时又能根据创面的实际情况抑制或促进某种创面修复细胞的增殖与表达，使创面外用药物的应用达到事半功倍的效果[2]。

通过实验我们可以看出：在 rhGH 实验组中，MTT 和流式细胞仪的结果显示 3 组 rhGH 均可以促进 Hacat 细胞增殖，而中、低浓度组（0.16、0.016 μg/μl）的 rhGH 较高浓度组（1.6 μg/μl）促进增殖效果更强。增殖的表皮细胞在创伤修复过程中有利于加速创面再上皮化，促进创面修复，减少疤痕组织的形成。同时，有人通过临床比较认为 rhGH 体内应用后不会产生过度疤痕增生，是由于多种调节因素的作用[5]。本实验结果提示 Hacat 细胞增殖可能与外用 rhGH 浓度有直接关系，只有在合适的外用浓度下才会起到更好的促进增殖作用。因此我们在创面上皮化过程中可以考虑体内与体外联合应用 rhGH，加速创面上皮化。

在 rhGH 全身应用过程中，剂量由 0.2 IU/kg 增加到 0.6 IU/kg 时，体内蛋白质合成等均有所增加，存在一定的剂量依赖关系，这可能是由于多种原因共同作用而成，如 rhGH 受体、激活更多信号转导途径等[6]，而本实验使我们感兴趣的是：在 rhGH 创面外用时（离体实验），低浓度反而比高浓度能更好的促进 Hacat 增殖，这有待于我们对它的机制进行进一步研究。同时也告诉我们，在将来创面外用 rhGH 时，找到外用的最适浓度是重要的，而不是浓度越高越好。

在创面抗感染药物的使用中，都存在这样的矛盾，即：减少创面细菌和抑制修复细胞增殖。那么如何在这个矛盾中找到恰当的平衡点是我们在应用创面抗感染药物的关键。根据本实验结果有的抗感染药物对 Hacat 的增殖不存在剂量 - 效应关系，在这类药物的使用中，可重点考虑它们的抗感染效果。但是很多创面抗感染药物又有明显的剂量 - 效应关系，如：丁胺卡那霉素和氯霉素等，在这类药物的应用中除了考虑它

们的抗感染目的外，还需要认真考虑它们不同剂量对修复细胞增殖的影响。争取找到最佳平衡点－即达到抗菌目的，又对细胞增殖影响最小。在抗感染药物组中，所选实验药物（丁胺卡那、庆大霉素、氯霉素、磺胺咪隆）大部分对于 Hacat 增殖都有抑制作用。其中氯霉素组、丁胺卡那霉素组有较明显的剂量－效应关系。磺胺咪隆组对于细胞增殖的影响最大。在烧伤创面的治疗、处理过程中，抗感染类药物使用频繁、而且不规范。其中问题尤为突出的是防治创面感染的创面抗菌药物的选择应用，已是病区耐药菌株不断产生的重要原因之一[7]。目前有些临床医生在创面滥用抗生素，不仅增加细菌耐药性，更由于剂量不当对创面修复细胞有较强的杀伤作用，这也是我们在治疗过程中亟须考虑和规范的地方。抗生素通过创面外用后，也许短期内，或个别病例会产生良好效果；但是从长远及整个病区角度来说，新的耐药菌株很快会因为新抗生素、高浓度抗生素的外用而被筛选出来。那时耐药菌株不但会感染创面而且会引起创面脓毒血症，为我们的治疗带来巨大麻烦；另外新选用的抗生素对于创面修复细胞会有什么影响，以及是否存在剂量－效应关系呢？因此我们在外用创面抗感染药物的过程中应该谨慎选择，不但要考虑它的杀菌、抑菌效果，更重要的还应该斟酌它们对于创面修复细胞乃至创面愈合的影响，否则可能事与愿违，影响创面修复细胞的增殖及创面的愈合。

在 EGF 组中，MTT 结果与流式细胞仪结果一致，均显示表皮生长因子与空白对照组相比对 Hacat 的增殖有明显的抑制作用。联系王世玲等[8]的实验结果——认为适当浓度 rhEGF 外用于创面促进创面愈合且效果比较高浓度好，其原因可能与表皮细胞上 EGF 受体的数量、活性以及表皮细胞增殖能力有关，提示 EGF 以及 EGF 受体的规律表达存在相互协调关系，在创面愈合过程中起重要的调控作用。因此本实验的 EGF 浓度对于 Hacat 细胞来说可能是高浓度，抑制了细胞的增殖。这些还有待于我们进一步的实验研究探讨。

bFGF 是一种提前分泌的调节性因子，储存在细胞或细胞外基质内，在直接损伤部位局部释放，并可能在创伤早期的修复中发挥重要的作用，通过实验证实在烧伤后的 4～11 d 中，受伤组织样本中的 bFGF 是最集中的。与烧伤后 17 d 相比 bFGF 已经明显的降低。而在烧伤后 30 d 当创面已经有了明显的上皮化以后，受伤组织中的 bFGF 水平已经与未受伤的组织中的水平一致了[9]。在 bFGF 实验组中，bFGF 对于 Hacat 在两个重要指标中均表现无明显影响，也可能与我们用药浓度有关系，但同样浓度在对成纤维细胞的影响却有明显的促进作用[4]。

创面外用药物的使用目的总的来说都是为了促进创面的良好愈合，但是在应用的过程中，除了达到用药目的外，当然还会对于同在一个创面环境中的创面修复细胞产生不同的作用，而这些因素也将对创面愈合产生重要的影响，因此了解创面外用药物对主要创伤修复细胞的影响，对于我们合理使用创面外用药物会有重要的意义。虽然我们的实验结果不能代表临床实验结论，但为临床外用药物的合理选择提供了部分理论依据。

参考文献：

[1] GOHRING J, FRODE D, WOHLRAB W. Induction of antiproliferative effects in HaCaT cells by a synthetic hydroperoxide[J]. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol, 2000, 13(1): 31－38.

[2] 李金玺，刘旭盛，唐　辉，等. 部分创面外用抗菌药物与成纤维细胞生长因子 2、表皮生长因子、重组人生长激素对成纤维细胞生物学特性影响的实验研究[J]. 中华烧伤杂志，2006，22(1)：33－37.

[3] 付小兵，程　飚，盛志勇. 有关创伤修复与组织再生的现代认识[J]. 中国危重病急救医学，2002，14(2)：67－68.

[4] SANTORO M M, GAUDINO G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing [J]. Exp Cell Res, 2005, 304 (1) : 274－286.

[5] DE-OLIVEIRA G V, SANFORD A P, MURPHY K D, *et al*. Growth hormone effects on hypertrophic scar formation: a randomized controlled trial of 62 burned children[J]. Wound Repair Regen, 2004, 12(4): 404－411.

[6] VANDERKUUR J, ALLEVATO G, BILLESTRUP N, *et al*. Growth hormone-promoted tyrosyl phosphorylation of SHC proteins and SHC association with Grb2[J]. J Biol Chem, 1995, 270(13): 7587－7593.

[7] STRUELENS M J. 院内感染耐药菌的流行病学：问题和可能的解决办法[J]. 英国医学杂志：中文版，1999，2(2)：94－95.

[8] 王世岭，马建丽，柴家科，等. 重组人表皮生长因子软膏对烧伤创面修复的促进作用[J]. 中国修复重建外科杂志，2002，16(3)：173－176.

[9] GIBRAN N S, ISIK F F, HEIMBACH D M, *et al*. Basic fibroblast growth factor in the early human burn wound [J]. J Surg Res, 1994, 56(3): 226－234.

（编辑　张大春）