文章编号:1000-5404(2007)02-0091-03

论著

bFGF与MSCs自体移植对猪皮肤创面PCNA和Ⅷ-R Ag表达的影响

陈 涛[1],付小兵[2],伍津津[1],韩 冰[2],孙同柱[2] ([1]第三军医大学大坪医院野战外科研究所皮肤科,重庆 400042;[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 研究碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)和骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)自体移植对小型猪全层皮肤缺损创面增殖细胞核抗原(PCNA)和Ⅷ因子相关抗原(Ⅷ-R Ag)表达的影响。**方法** 6只小型猪背部中线两侧各制备4个面积为2.54 cm^2的圆形全层皮肤缺损创面,将创面分为bFGF治疗组、MSCs治疗组、bFGF+MSCs治疗组、生理盐水对照组(共4组,每组12个创面)。分别取不同时段创面组织,进行常规染色,并采用免疫组化方法检测PCNA和Ⅷ-R Ag的表达情况。**结果** 伤后7 d各组创面均形成肉芽组织,以bFGF+MSCs治疗组的血管形成最为丰富。PCNA表达量增加,伤后7 d达到高峰,主要位于肉芽组织中,持续至14 d PCNA表达开始下降,而且在各个时间点,均以bFGF+MSCs治疗组的PCNA阳性细胞百分率为最高($P<0.05$)。伤后7 d,Ⅷ-R Ag染色的阳性细胞百分率明显高于其余3个组。**结论** bFGF协同自体移植的MSCs可使皮肤创面PCNA和Ⅷ-R Ag的表达增加,促进肉芽组织生成,缩短创面愈合时间。

关键词: 碱性成纤维细胞生长因子;骨髓间充质干细胞;创面愈合;皮肤
中图法分类号: R322.99;R392.11;R641.05 **文献标识码**: A

Effect of bFGF in coordination with autografting of bone marrow mesenchymal stem cells on expression of PCNA and Ⅷ-R Ag of porcine skin defect wound

CHEN Tao[1], FU Xiao-bing[2], WU Jin-jin[1], HAN Bing[2], SUN Tong-zhu[2] ([1]Department of Dermatology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, [2]Key Laboratory of Wound Repair, The 304th Hospital of PLA, Beijing 100037, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of bFGF and MSCs autografting on expression of PCNA and Ⅷ-R Ag of porcine skin defect wound. Methods Six male minipigs were used to produce 48 full-thickness skin wounds, each wound area about 2.54 cm^2 on both sides of the back (8 wounds per pig). These 48 wounds were randomly treated with bFGF, MSCs, bFGF+MSCs, and normal saline (12 wounds for each treatment). The tissue from the wounds was harvested on day 3, 7, 14 after surgery, then used for HE staining and immunohistochemical staining for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and factor Ⅷ related antigen (Ⅷ-R Ag). Results Granulation tissue was presented in all groups on day 3 and 7 after wound, most abundant in the wounds treated with bFGF+MSCs, as well as blood capillary formation. PCNA expression increased after skin injury, reached the peak on day 7, most in the granulation tissue, and lasted to day 14, then began to decrease. On day 3, 7, 14 after skin injury, PCNA expression was the most highest in the wounds treated with bFGF+MSCs. Ⅷ-R Ag-positive cells in the wounds treated with bFGF+MSCs were significantly more than that of the other three treatments ($P<0.05$). Conclusion bFGF in coordination with MSCs can promote the expression of PCNA and Ⅷ-R Ag of wounds and accelerate granulation tissue growth.

Key words: bFGF; MSCs; wound healing; skin

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(2005CB522603),国家自然科学基金重点项目(30230370),国家自然科学基金(30170966),国家杰出青年科学基金(39525024)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, 2005CB522603), the Key Program of the National Science Foundation of China (30230370), the National Natural Science Foundation of China (30170966) and the National Science Fund for Young Distinguished Scholars (39525024)

作者简介:陈 涛(1971-),男,河南省淮阳县人,硕士研究生,主治医师,主要从事皮肤创伤与修复方面的研究。现在解放军第18医院工作。电话:13206219835
通讯作者:付小兵,E-mail: fuxb@cgw.net.cn

收稿日期:2006-02-17;**修回日期**:2006-05-20

各种原因造成的皮肤大面积缺损一直是医务人员倍感棘手的问题。随着干细胞工程与组织工程的研究进展,骨髓间充质干细胞(MSCs)的研究日益受到重视。来源于中胚层的MSCs具有多向分化潜能,已有大量文献报道了MSCs在骨、软骨、肌腱、肌肉以及神经损伤中的修复作用。我们以前的研究证实,bFGF + MSCs具有促进小型猪皮肤创面愈合的作用[1]。为了进一步探讨其促进创面愈合的可能机制,本实验对不同时段皮肤创面增殖细胞核抗原(PCNA)和Ⅷ因子相关抗原(Ⅷ-R Ag)含量的变化进行检测。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、仪器

F12培养基(美国Hyclone公司);Ficoll-Paque分离液(美国Pharmacia公司);F12培养液(10%胎牛血清,100 U/ml青霉素,100 μg/ml链霉素);CO_2孵箱(德国HERAcell, Heraeus公司);5-溴脱氧尿嘧啶(BrdU)(美国Sigma公司)。

1.2 MSCs的分离、培养和标记

自小型猪髂骨抽取骨髓,无菌条件下加入F12培养基混匀,缓慢加入到密度为1.077 g/L的Ficoll-Paque分离液中,1 500 r/min离心30 min,收集单个核细胞,F12洗涤2次,细胞悬浮于F12培养液,按1×10^9/L的密度接种并置于37 ℃、5% CO_2饱和湿度的CO_2孵箱内培养,24 h后更换培养液,每3~4天换液1次,MSCs接近融合时用0.25%胰蛋白酶消化,按1∶3传代培养,取第3代MSCs,用含有5 μmol/L BrdU标记48 h,备用[1]。

1.3 动物模型及分组

雄性小型猪6只(军事医学科学院实验动物中心提供),体质量15~20 kg,速眠新与盐酸氯胺酮混合肌肉注射麻醉,背部剃毛。常规消毒后在脊柱两侧旁开2 cm处,每侧由前至后各制备4个面积为2.54 cm^2的圆形全层皮肤缺损创面(每只猪共8个),创面分为bFGF治疗组、MSCs治疗组、bFGF + MSCs治疗组、生理盐水对照组(每组12个创面)。MSCs治疗组将自体MSCs(2×10^6/ml)滴加0.5 ml到创面,bFGF治疗组用量为50 U/cm^2创面。对照组注射生理盐水(0.5 ml/创面)。各组创面均以纤维蛋白胶填充。分别于伤后3、7、14 d取创面组织置于10%福尔马林液固定,常规脱水、石蜡包埋后切片用苏木精-伊红(HE)染色和免疫组织化学染色。

1.4 免疫组织化学染色

采用免疫组织化学两步法。PCNA和Ⅷ-R Ag抗体及两步法试剂盒均购自美国Zymed公司,实验操作按试剂盒说明书进行。切片常规脱蜡至水,3% H_2O_2孵育10 min,以阻断内源性过氧化物酶,PBS洗后,PCNA染色的切片则置于柠檬酸钠缓冲液中用微波炉进行抗原热修复;Ⅷ-R Ag染色的切片则用0.1%胰蛋白酶消化10 min,以利于细胞内抗原的修复。滴加小鼠(PCNA)或兔(Ⅷ-R Ag)来源的一抗4 ℃过夜,PBS冲洗,滴加山羊抗小鼠或兔IgG抗体-HRP(辣根过氧化物酶)多聚体20 min,PBS冲洗,应用DAB溶液显色,水洗、复染、脱水、封片。另用PBS代替一抗作为阴性对照。

光镜下观察PCNA染色的切片细胞核染成棕色的为PCNA免疫反应阳性细胞,Ⅷ-R Ag染色的切片细胞浆染成棕色的为Ⅷ-R Ag免疫反应阳性细胞。选择有代表性的区域计数高倍(×200)视野下的阳性细胞百分率,计算8张切片阳性细胞百分率的平均数。

1.5 统计学处理

应用SPSS 13.0软件进行方差分析。

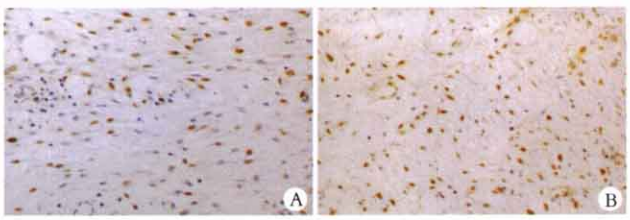
2 结果

2.1 组织病理学观察

伤后3 d,各组创面均可见少量不成熟的肉芽组织,以炎症细胞为主,很少有成纤维细胞、毛细血管或胶原沉积,创缘肉芽组织表面可见少量新生表皮,但组间无明显差异。伤后7 d,各组创面均形成中等厚度的肉芽组织,广泛新生血管形成,肉芽组织表面可见明显的表皮增生,以bFGF + MSCs治疗组肉芽组织形成最为丰富,血管密度较大。伤后14 d,创面形成较厚的血管肉芽组织,部分肉芽组织被成纤维细胞替代,表皮组织大部分或全部覆盖创面。以bFGF + MSCs治疗组成纤维细胞密度最大,表皮生长最快。

2.2 创面组织PCNA的表达

正常情况下,PCNA大多在表皮基底层及真皮层少量增殖细胞中表达,皮肤损伤后PCNA表达量增加。本实验显示,伤后第7天PCNA表达量达到高峰,主要位于新生肉芽组织中,阳性染色细胞主要是内皮细胞和成纤维细胞(图1A、B)。之后表皮中表达增高明显,除基底层还在颗粒层和棘层中表达,且越接近创缘阳性细胞越多。伤后7 d及14 d,bFGF + MSCs治疗组肉芽组织中阳性细胞表达高于其余各组,表皮增殖也较早,PCNA阳性细胞分布于各层。bFGF治疗组和MSCs治疗组只有第3、7天的百分率明显高于对照组,至第14天时与对照组相比,无明显差异($P>0.05$)(表1)。



A:生理盐水对照组;B:bFGF + MSCs治疗组

图1 伤后7 d创面PCNA表达 (两步法×200)

表1 伤后不同时间创面PCNA染色阳性细胞百分率[($\bar{x}\pm s$)%, $n=8$]

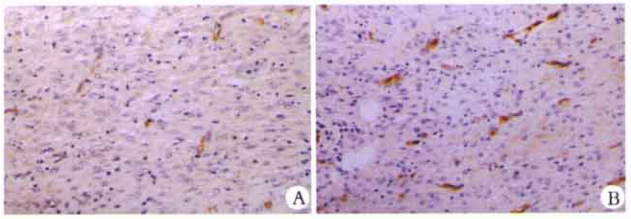
组别	第3天	第7天	第14天
bFGF治疗组	54.51±2.38[ab]	65.77±3.51[ab]	71.35±3.62[a]
MSCs治疗组	50.12±2.39[a]	66.47±3.86[ab]	70.12±3.12[a]
bFGF + MSCs治疗组	57.82±3.52[b]	71.46±2.95[b]	75.66±2.87[b]
对照组	45.56±3.45	52.72±3.58	69.85±2.98

a:$P<0.05$,与bFGF + MSCs治疗组比较;b:$P<0.05$,与对照组比较

2.3 创面组织Ⅷ-R Ag的表达

毛细血管的形成是用内皮细胞Ⅷ-R Ag的免疫组化染色来反映(图2A、B),bFGF治疗组,MSCs治疗组,bFGF + MSCs治

疗组Ⅷ-R Ag 染色的阳性细胞百分率明显高于对照组，其中 bFGF + MSCs 治疗组的血管形成最为丰富，表现为伤后第 7 天Ⅷ-R Ag 染色的阳性细胞百分率明显高于其余 3 个组（表 2）。



A：生理盐水对照组；B：bFGF + MSCs 治疗组

图 2　伤后 7 d 创面Ⅷ-R Ag 表达　（二步法 ×200）

表 2　伤后不同时间创面 Ⅷ-R Ag 染色阳性细胞百分率

$[(\bar{x} \pm s)\%, n=8]$

组别	第 3 天	第 7 天	第 14 天
bFGF 治疗组	6.250 ± 3.327[b]	11.250 ± 3.732[ab]	16.625 ± 6.391[b]
MSCs 治疗组	5.500 ± 2.070	11.125 ± 5.222[ab]	15.250 ± 5.825[b]
bFGF + MSCs 治疗组	6.750 ± 4.062[b]	19.000 ± 7.051[b]	19.500 ± 7.111[b]
对照组	2.500 ± 1.773	4.750 ± 3.012	8.250 ± 4.464

a：$P<0.05$，与 bFGF + MSCs 治疗组比较；b：$P<0.05$，与对照组比较

3　讨论

创面愈合是复杂的生物学过程，概括起来可分为炎症反应、肉芽组织增生、创面再上皮化及创面愈合后的改建过程。许多生长因子如 bFGF、EGF、TGF、PDGF 以及角化细胞生长因子（KGF）等在创伤修复中具有重要作用[2]。本研究表明，MSCs + bFGF 治疗组创面肉芽组织形成较早且最为丰富，其中含有大量新生毛细血管、成纤维细胞及少量炎细胞。bFGF、MSCs 以及 bFGF + MSCs 治疗组中，Ⅷ-R Ag 阳性细胞百分率均高于对照组，而 bFGF + MSCs 治疗组的Ⅷ-R Ag 阳性细胞百分率又明显高于其他两组，表明 bFGF + MSCs 对促进血管内皮细胞的增殖具有更加明显的效应。Ⅷ-R Ag 是存在于血浆中的大分子糖蛋白，分子量为（0.5 ~ 20）×10⁶，主要由内皮细胞合成（血小板也可合成）。高绪兰等[3]研究发现，肉芽组织的毛细血管内皮细胞不仅能产生与凝血有关的第Ⅷ因子，而且其量较正常组织血管内皮细胞含量增多。所以，把Ⅷ-R Ag 染色增强作为判断新生毛细血管增多的指标，以此来评判不同治疗方法对肉芽增生及创伤愈合的影响。

我们以往的研究结果表明[4]，内源性 bFGF 在溃疡创面中表达甚微，而应用 bFGF 可以明显促进溃疡创面和烧伤创面的愈合，bFGF 对 MSCs 具有促进增殖作用，并与表皮细胞生长因子、维生素 C 等共同促进 MSCs 向血管内皮细胞转化；体外 MSCs 在 bFGF、EGF 等一些细胞因子的共同作用下，可诱导其向血管内皮细胞转化，并表达血管特异性的Ⅷ因子[5]。因此我们认为，局部 bFGF + 自体 MSCs 治疗皮肤创面提高愈合质量可能机制：①MSCs 分泌细胞因子和生长因子促进创面肉芽组织的形成、再上皮化及附件的再生；②MSCs 转化为血管内皮细胞、表皮细胞及皮肤附件的某些结构参与修复[1]；③bFGF 对 MSCs 具有直接促进增殖作用；④bFGF 通过作用于创面局部的其他细胞或组织，创造了有利于 MSCs 向皮肤组织转化的微环境。

本研究表明，bFGF 和 MSCs 应用于创面后，PCNA 在表皮和真皮内均有表达，在表皮内的表达主要反映了表皮细胞的增殖状态，而在真皮深层的表达却主要位于与晚期创面愈合相关的部分炎症细胞、成纤维细胞及内皮细胞中，因而可能与肉芽组织的形成密切相关。在细胞周期中，PCNA 的合成对细胞由 G_0、G_1 期进入 S 期必不可少，是一种核内蛋白质，分子量为 36×10^3，系 DNA 聚合酶的辅助蛋白，对调节 DNA 复制起重要作用，其量的变化与 DNA 合成一致[6]；而且 PCNA 的表达是细胞增殖的一个重要环节，各种刺激因素作用于内皮细胞时，可通过不同的途径诱导内皮细胞增殖，但必须通过 PCNA 的表达这一中间环节，由此可见它是细胞增殖的必经之路。因此，本研究肉芽组织中 PCNA 表达增加与 bFGF 和 MSCs 可能有直接关系，而Ⅷ-R Ag 表达的增加可能是由 bFGF 和 MSCs 的直接作用或是 PCNA 表达增加后的结果，或者两种因素均发挥了作用。当然，生长因子作用于修复细胞，特别是干细胞的其他相关机制也不能排除[7]。

综上所述，我们的初步研究结果提示，bFGF 与自体移植 MSCs 对增加创面组织 PCNA 和Ⅷ-R Ag 的表达具有协同效应，能促进肉芽组织增生进而加速创面愈合。

参考文献：

[1] 付小兵，方利君，王玉新，等. 骨髓间充质干细胞自体移植提高猪皮肤创面修复质量的初步研究[J]. 中华医学杂志，2004，84（11）：920 - 924.

[2] 方利君，付小兵，孙同柱，等. 骨髓间充质干细胞分化为血管内皮细胞的实验研究[J]. 中华创伤杂志，2003，19（1）：22 - 24.

[3] 高绪兰，朱桂彬，宫伯娟，等. 血管内皮细胞第Ⅷ因子相关抗原在肾内的表达[J]. 白求恩医科大学学报，1997，23（2）：145 - 146.

[4] Fu X，Sheng Z，Chen Y，*et al*. Randomised placebo-controlled trial of use of topical recombinant bovine basic fibroblast growth factor for second-degree burns[J]. Lancet，1998，352（9141）：1661 - 1664.

[5] 付小兵，孙同柱，王亚平，等. 表皮细胞生长因子与碱性成纤维细胞生长因子促进创面修复效应的比较性研究[J]. 中国修复重建外科杂志，1999，13（5）：278 - 282.

[6] 黄杰雄，黄致治. 增殖细胞核抗原的研究进展[J]. 国外医学：生理、病理科学与临床分册，1994，14（1）：9 - 11.

[7] Fu X，Sun X，Li X，*et al*. Dedifferentiation of epidermal cells to stem cells *in vivo*[J]. Lancet，2001，358（9287）：1067 - 1068.

（编辑　陈聪连）