文章编号:1000-5404(2006)24-2393-03

论著

创伤早期伤口液对体外培养真皮多能干细胞增殖迁移特性的影响

屈纪富[1,2],江德鹏[1],郑怀恩[2],郝 利[2],文 亮[1],程天民[2] (第三军医大学:[1]西南医院急救部,[2]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)

提 要:目的 探讨真皮多能干细胞在创伤修复启动中的作用。**方法** 采用前期建立的技术分离、纯化并扩增真皮多能干细胞、真皮成纤维细胞和血管内皮细胞;利用四唑盐比色试验(MTT法)检测不同时间、不同浓度伤口液对上述细胞的影响。在此基础上,观察伤后1 d伤口液对真皮多能干细胞贴壁力和迁移力等与创伤修复密切相关的指标变化。**结果** 伤后不同时相不同浓度伤口液对真皮多能干细胞增殖均具有显著刺激作用,但以伤后早期的伤口液作用最为明显。成纤维细胞和血管内皮细胞对伤口液反应均显著弱于真皮多能干细胞。伤口液作用后真皮多能干细胞贴壁力和迁移能力较对照组细胞显著增加。**结论** 真皮多能干细胞是创伤愈合,特别是创伤修复启动过程中的一种重要的间充质干细胞,对其深入研究有望为阐明创伤修复启动分子机制提供依据。

关键词:真皮多能干细胞;创伤修复启动;伤口液

中图法分类号:R322.991;R329.28;R641 **文献标识码**:A

Effect of early wound fluids on proliferation and migration of dermal pluripotent stem cells

QU Ji-fu[1,2], JIANG De-peng[1], ZHENG Huai-en[2], HAO Li[2], WEN Liang[1], CHENG Tian-min[2] ([1]Department of Emergency Medicine, Southwest Hospital, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the effect of dermal pluripotent stem cells on the initiation of wound repairing. **Methods** Dermal pluripotent stem cells, fibroblasts and vascular endothelial cells were routinely isolated, purified and expanded. Wound fluids of 1st, 2nd, 3rd and 4th day were collected from 12 male Wistar rats to culture the three types of cells mentioned above and their responses to wound fluids were investigated by MTT assay. The abilities of attachment and migration of dermal pluripotent stem cells stimulated by wound fluid of 1st day were observed. **Results** The wound fluids could promote the proliferation of dermal pluripotent stem cells, especially the early-phase wound fluids. The responses of fibroblasts and vascular endothelial cells to wound fluids were not so strong as that of dermal pluripotent stem cells. The abilities of attachment and migration of dermal pluripotent stem cells significantly increased after the stimulation of early-phase wound fluids, suggesting that the dermal multipotent stem cells responsed well to wound fluids. **Conclusion** Dermal pluripotent stem cells may play an important role in the process of wound healing. The significance of dermal pluripotent stem cells in the initiation of wound repair is worth further investigation.

Key words: dermal pluripotent stem cells; initiation of wound repairing; wound fluid

创伤愈合大体可分为3个相互区分而又密切联系的阶段,即炎症反应期、增殖期(组织修复期或肉芽组织期)和组织改建期[1]。其中组织修复期是创伤愈合过程中最为重要的阶段[2]。创伤修复过程涉及到多个方面,其中最重要的是创伤微环境与修复细胞的相互作用[3]。伤口液中含有包括多种细胞因子在内的复杂成分,是组成创伤微环境的主体和关键[4]。因此,研究伤口液与组织修复细胞之间的相互作用及其

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:屈纪富(1969-),男,四川省乐至县人,博士,副教授,主要从事干细胞生物学特性及应用、多发伤发生机制及临床救治方面的研究,发表论文30余篇。电话:13896099633,E-mail: qujifu@yahoo.com

收稿日期:2006-04-06;**修回日期**:2006-09-30

机制对探讨创伤愈合具有重要意义。

干细胞(stem cells)是具有自我更新和多向分化潜能的细胞[5],它们在细胞疗法、基因治疗、发育学研究、药理及毒理学等研究中已显示出无可比拟的作用和优越性[6]。近来研究表明,间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)同样具有多向分化潜能[7];成纤维细胞、血管内皮细胞等组织修复细胞也可由间充质干细胞诱导分化而来[8],这提示间充质干细胞在创伤愈合过程中可能具有重要作用。我们前期研究结果表明,真皮组织中存在来源于间充质的干细胞,即真皮多能干细胞[9];在成功分离、培养和鉴定出这种真皮多能干细胞的基础上,本实验观察了不同时间、不同浓度微环境对真皮多能干细胞、成纤维细胞和血管内皮细胞的影响,在此基础上,观察伤后早期伤口液对真皮多能干细胞贴壁力和迁移力等与创伤修复密切相关的指标变化,以探讨真皮多能干细胞在创伤修复启动过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

大鼠背部皮肤取自出生 1 d 的 Wistar 雄性大鼠;Wistar 大鼠 12 只,体质量(200 ± 20) g,15 周龄,雌雄不拘(由第三军医大学实验动物中心提供)。

1.2 细胞培养

真皮多能干细胞分离、培养、扩增及鉴定参照文献[9]进行。

成纤维细胞和血管内皮细胞培养按文献[10,11]的方法进行。细胞培养体系为含 10 ml/L 胎牛血清和标准双抗的 IMDM 培养基。

1.3 大鼠伤口液收集

按文献[8]的方法制作切口伤,伤口加入清洁无菌海绵,伤后 1、2、3、4 d 活杀大鼠,挤出海绵中伤口液,过滤除菌,-20 ℃保存备用。

1.4 伤口液对真皮多能干细胞增殖力的影响

真皮多能干细胞转接种并培养于 96 孔板,每孔细胞数量为 2×10^5/ml。伤口液作用前先在无血清培养体系中饥饿培养 48 h,以使细胞同步化[12]。在伤后不同时相(1、2、3、4 d)加入不同含量(10、20、30 ml/L)伤口液,作用 24 h 后进行 MTT 比色试验以检测伤口液对细胞的反应性。每个时相,每种含量各 4 孔。另外,我们还以成纤维细胞和血管内皮细胞为代表,按上述方法,观察伤口液对其他组织修复细胞的影响。

1.5 伤口液对真皮多能干细胞贴壁率的影响

实验分伤口液刺激组(实验组)和无伤口液作用组(对照组),其中实验组细胞培养体系为加入 10 ml/L 伤后 1 d 伤口液的 IMDM,而对照组细胞培养体系为未加血清和伤口液的 IMDM(以下同)。检测真皮多能干细胞贴壁力的方法如下:真皮多能干细胞传代,计数后将 2 组细胞调至相同密度,接种至培养瓶,37 ℃培养 6 h 后收集未贴壁细胞并计数,根据下列公式计算真皮多能干细胞贴壁率以反映细胞贴壁率:

$$细胞贴壁率(\%)=\frac{接种细胞数-未贴壁细胞数}{接种细胞数}\times100\%$$

1.6 伤口液对真皮多能干细胞迁移能力的影响

实验分组及处理同 1.5。将真皮多能干细胞接种于 24 孔培养板,每孔接种细胞数量 2×10^5,待细胞基本铺满孔底(约为接种 3 d 后)时培养细胞换液,伤口液作用前先在无血清 IMDM 培养体系中饥饿培养 48 h,以使细胞同步化。根据实验分组分别加入或不加伤口液作用 24 h,两组细胞进行划痕实验,划痕后 8 h 检测划痕处真皮多能干细胞数量和划痕缩小百分比,以观察伤口液对真皮多能干细胞迁移能力的影响。

1.7 统计学处理

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,用 SPSS 11.0 统计软件进行单因素方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 伤口液对真皮多能干细胞生长的影响

伤后 1、2、3、4 d 伤口液对真皮多能干细胞均具有显著作用[对照组为(0.33 ± 0.02),$P<0.05$];但不同含量伤口液其作用并不相同,伤后各时相均以含量为 10 ml/L 组作用最为明显;另外,不同时相伤口液作用也具有显著差异,伤后 1 d 和 2 d 的伤口液作用最为明显($P<0.05$)(表 1)。我们还同时观察了伤口液对成纤维细胞和血管内皮细胞增殖作用,结果显示其同样具有显著作用,但成纤维细胞和血管内皮细胞对伤口液反应均显著弱于真皮多能干细胞($P<0.05$)。

表 1 伤口液对真皮多能干细胞生长的影响($\bar{x}\pm s$)

伤口液浓度(ml/L)	伤后时间			
	1 d	2 d	3 d	4 d
10	1.30 ± 0.18	1.30 ± 0.06	0.93 ± 0.11[b]	1.01 ± 0.25[b]
20	1.15 ± 0.24	1.05 ± 0.17[a]	0.77 ± 0.07[b]	0.90 ± 0.09[b]
30	0.98 ± 0.14[a]	0.78 ± 0.06[a]	0.76 ± 0.16	0.76 ± 0.04[a]

a: $P<0.05$,与同时相点 10 ml/L 组比较; b: $P<0.05$,与同浓度伤后1 d比较

2.2 伤口液对真皮多能干细胞贴壁率的影响

伤口液作用后真皮多能干细胞贴壁率较对照组细胞显著增加($P<0.05$),分别为(80.42 ± 8.52)%、(58.84 ± 6.91)%。

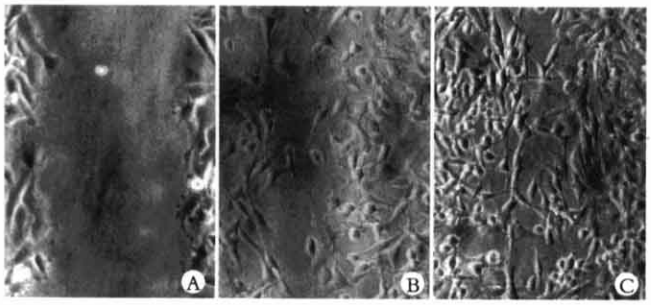
2.3 伤口液对真皮多能干细胞迁移能力的影响

划痕实验结果显示,与对照组相比,伤口液作用后划痕处真皮多能干细胞数量显著增多($P<0.05$),划痕缩小也更为明显($P<0.05$),提示伤口液作用后真皮多能干细胞迁移能力较对照组细胞显著增加(表 2,图 1)。

表 2 伤口液对真皮多能干细胞迁移能力的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	细胞数量(个/视野)	缩小百分比(%)
实验组	120.84 ± 13.31[a]	85.47 ± 8.53[a]
对照组	60.78 ± 4.28	54.28 ± 3.63

a: $P<0.05$, 与对照组比较



A：划痕后 0 h；B：对照组划痕后 8 h；C：实验组划痕后 8 h

图 1　伤口液作用后真皮多能干细胞迁移情况　（倒置显微镜 ×200）

3　讨论

成纤维细胞和血管内皮细胞等是最为重要的组织修复细胞，它们也可由间充质干细胞诱导分化而来[6]；而真皮多能干细胞是存在于皮肤创面局部的一种较为原始的间充质干细胞，在一定条件下也可分化为成纤维细胞等组织修复细胞，并且其对创伤微环境的反应性显著强于成纤维细胞和血管内皮细胞等组织修复细胞，提示真皮多能干细胞参与了创伤愈合过程。

组织修复过程是创伤愈合过程中最为重要的阶段[2]。创伤修复过程涉及到多个方面，其中最重要的是创伤微环境与修复细胞的相互作用[3]。伤口液是组织细胞修复的微环境，对修复细胞起直接的调控作用。在创伤愈合前 2 d，伤口液中细胞因子主要包括白细胞介素-1（IL-1）、肿瘤坏死因子（TNF）、血小板源性生长因子（PDGF）、表皮生长因子（EGF）、转化生长因子（TGF）、成纤维细胞生长因子（FGF）等，它们对创伤愈合有广泛的调节作用。因此，伤口液是组成创伤微环境的主体和关键[4]。皮肤伤口愈合时的组织修复细胞分裂、增殖、迁移是伤口局部组织修复细胞大量增加的重要原因，也是伤后肉芽组织形成、组织修复的关键环节[6]。因此细胞增殖力和迁移能力是反映其参与组织修复能力的重要指标。细胞贴壁率反映细胞抵抗外界损伤因素的能力，即反映细胞生存能力[10,13]，也是反映细胞参与组织修复能力的重要指标。本实验结果显示，伤口液对真皮多能干细胞增殖均具有显著促进作用；另外，伤口液作用后真皮多能干细胞贴壁力和迁移力等与组织修复相关的能力显著增强，即真皮多能干细胞对伤口液刺激具有良好的反应性，提示真皮多能干细胞可能是参与创伤愈合的一种重要组织修复细胞。

创伤愈合虽分为几个阶段，但它们之间是相互联系的，组织修复细胞增殖可能在创伤后炎症反应期即已开始，炎症反应对随后的组织修复反应必然具有调控作用；伤后早期是炎症反应期和增殖期交叉重叠之时，也是伤后炎症反应向组织修复反应过渡之时，也正是创伤修复启动的关键时期，因此，伤后早期伤口液可以反映创伤修复启动阶段微环境情况；而本实验结果显示，伤后不同时相伤口液对真皮多能干细胞均具有刺激作用，但伤后早期（1 d 和 2 d）的伤口液作用最为明显，这提示真皮多能干细胞不仅是一种重要的组织修复细胞，而且在创伤修复启动中也具有重要意义。

综上所述，真皮多能干细胞是创伤愈合，特别是创伤修复启动过程中的一种重要的间充质干细胞，对其深入研究有望为阐明创伤修复启动分子机制提供依据。

参考文献：

[1] 屈纪富，史春梦，郑怀恩，等. 创伤早期伤口液作用真皮多能干细胞差异表达 cDNA 文库的构建[J]. 感染、炎症、修复，2005，6(1)：3－6.

[2] MAGDALENA 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.

[3] 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.

[4] 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.

[5] WAKAYAMA T，TABAR V，RODRIGUEZ I，*et al*. Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer[J]. Science，2001，292(5517)：740－743.

[6] 屈纪富，郝　利，程天民. 干细胞与皮肤创伤愈合[J]. 中国临床康复，2002，6(4)：534－535.

[7] WEI G，SCHUBIGER G，HARDER F，*et al*. Stem cell plasticity in mammals and transdetermination in Drosophila：common themes? [J]. Stem Cells，2000，18(6)：409－414.

[8] SEKIYA I，LARSON B L，SMITH J R，*et al*. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma：conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality[J]. Stem Cells，2002，20(6)：530－541.

[9] 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.

[10] 屈纪富，程天民，许霖水，等. 全身放射损伤对皮肤伤口成纤维细胞参与组织修复能力的影响[J]. 生理学报，2002，54(5)：395－399.

[11] 吴　迪，骆　丹，张镇静，等. 强脉冲光对成纤维细胞及血管内皮细胞增殖活性及血管内皮细胞生长因子分泌水平的影响[J]. 临床皮肤科杂志，2005，34(7)：436－438.

[12] 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.

[13] QU J，CHENG T，SHI C，*et al*. A study on the activity of fibroblast cells in connection with tissue recovery in the wounds of skin injury after whole-body irradiation[J]. J Radiat Res (Tokyo)，2004，45(2)：341－344.

（编辑　王　红）