论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201411088

粒细胞集落刺激因子激活 β-catenin 促进创面修复

王 钰,龙 爽,谭 力,陈泽林,史春梦,粟永萍 (400038 重庆,第三军医大学军事预防医学院全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室)

[摘要] **目的** 利用转绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)嵌合小鼠的动物模型,研究粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor,G-CSF)骨髓动员在创面修复中的作用和机制。**方法** C57 骨髓嵌合小鼠随机分成骨髓动员组和对照组。骨髓动员组小鼠连续 5 d 予以皮下注射 G-CSF,对照组小鼠给予相同剂量的生理盐水。在小鼠背部制作皮肤全层缺损伤,1.3 cm × 1.3 cm 大小。骨髓动员组继续给予 G-CSF 3 d,对照组给予生理盐水。伤后每天观察各组动物创面大小及愈合情况。取创伤后第 1 天的创面组织,消化成单细胞悬液,流式检测 GFP^+ 细胞比例。取伤后第 3 天对照组和骨髓动员组创面组织制取石蜡切片,免疫组化检测β-catenin 表达。**结果** 骨髓动员组小鼠创面愈合增快为(12.5 ± 0.9) d,对照组愈合时间为(18.3 ± 0.8) d。骨髓动员组在伤后 1 d 创面局部 GFP^+ 细胞明显多于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。骨髓动员组创面处 β-catenin 在创缘组织中的表达明显增强,与对照组相比差异具有统计学意义($P < 0.05$),并部分呈现核表达。**结论** G-CSF 动员后,GFP^+ 细胞大量聚集于创面,并促进创面 β-catenin 的表达和核转位,加快创面愈合。

[关键词] 粒细胞集落刺激因子;创面愈合;β-连环蛋白

[中图法分类号] R331.22;R64;R977.1 [文献标志码] A

Granulocyte colony-stimulating factors promote wound healing by activation of β-catenin in green fluorescent protein chimeric mice

Wang Yu, Long Shuang, Tan Li, Chen Zelin, Shi Chunmeng, Su Yongping (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) stimulation on cutaneous wound healing in green fluorescent protein (GFP) chimeric mice and investigate the underlying mechanism. **Methods** C57BL/6 mice were exposed to 8.5 Gy ^{60}Co γ irradiation and then received 5×10^6 bone marrow cells derived from C57BL/6-EGFP mice through tail vein in 4 h later to establish GFP chimeric mice. The spleen of the chimeric mice was resected in 2 months after irradiation, and then divided into 2 groups, bone marrow mobilization group (G-CSF group) and control group. G-CSF of 50 μg · $(kg \cdot d)^{-1}$ was injected to the mice of the G-CSF group for 5 d before and for 3 d after wound cutting (1.3 cm × 1.3 cm) on their back. Normal saline instead of G-CSF was injected in the mice of control group after wounding. Residual wound area and wound healing time were observed. On day 1 after wounding, the wound tissues were harvested and digested into single cell suspension to detect the ratio of GFP^+ cells by flow cytometry. On day 3, wound tissues were collected again for histological analysis of β-catenin expression. **Results** G-CSF treatment accelerated wound closure in mice than the control mice (12.5 ± 0.9 *vs* 18.3 ±

[基金项目] 第三军医大学青年人才创新基金(2010XQN12)

[通信作者] 史春梦,E-mail: Shicm@sina.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141208.1337.010.html(2014-12-08)

0.8 d). There were more GFP$^+$ cells on wound area in the mobilized group than the control mice ($P<0.05$) on day 1. The expression of β-catenin was significantly enhanced in the wound of the mobilized group and mainly in located in the nuclei ($P<0.05$). **Conclusion** G-CSF mobilization aggregates GFP$^+$ cells in the wound area, promotes the expression and nuclear translocation of β-catenin, and accelerates wound healing after skin injury.

[**Key words**] granulocyte colony-stimulating factor; wound healing; β-catenin

Supported by the Youth Innovation Foundation of Third Military Medical University (2010XQN12). Corresponding author: Shi Chunmeng, E-mail: Shicm@sina.com

近年来,相较于"外源性"移植干细胞,激活"内源性"干细胞在脏器损伤修复中的优势日益凸显,内源性干细胞的恰当应用为创面修复提供了新的治疗策略。骨髓是人体巨大的内源性干细胞库,骨髓来源细胞(bone marrow-derived cells, BMDCs)含有造血干细胞(haematopoietic stem cells, HSCs)和间充质干细胞等干细胞群,在稳定的造血状态下,骨髓细胞中干细胞的数量非常少,占骨髓细胞总数的1% ~10%[1]。利用药物进行骨髓动员是增加骨髓干细胞数量的有效措施,其中粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)是目前标准动员方案,临床应用安全有效,被国际上批准用于干细胞动员[2]。G-CSF动员BMDCs的机制已得到广泛研究,并证实能促进心梗、肌肉损伤、肝脏损伤等的修复。然而,G-CSF促进局部组织损伤修复的作用和机制目前仍不清楚。本研究利用转绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)嵌合小鼠动物模型,通过流式细胞仪和免疫组化对BMDCs进行检测,分析G-CSF骨髓动员在创面愈合过程中的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性C57BL/6小鼠共60只,8周龄,体质量18 ~22 g,购自中科院动物研究所。转EGFP C57BL/6转基因小鼠15只,体质量18 ~22 g,8周龄,雄性,骨髓供体,购自南京大学模式动物研究所。

1.2 动物分组和模型建立

受体鼠^{60}Co γ射线致死剂量8.5 Gy全身照射,辐照后4 h受体鼠经尾静脉骨髓移植,每只移植GFP转基因小鼠骨髓细胞5×10^6个。辐照后2个月,对建立成功的GFP嵌合小鼠进行脾切除。将脾切后的嵌合小鼠随机分为骨髓动员组和对照组。对骨髓动员组小鼠进行骨髓动员,方法为皮下注射重组人的粒细胞集落刺激因子50 μg·(kg·d)$^{-1}$,连续5 d;对照组小鼠给予等量的生理盐水皮下注射。各组小鼠均以1%戊巴比妥钠麻醉,背部备皮,制成1.3 cm×1.3 cm大小的缺损伤创面。骨髓动员组伤后继续每日给予粒细胞集落刺激因子50 μg·(kg·d)$^{-1}$,连续3 d;对照组给予皮下注射同等量的生理盐水。

1.3 创面愈合情况

仔细观察小鼠一般状况和创面愈合时间,伤后1、3、5、7、9、11、13、15、17、19 d拍照记录创面残余面积,运用Image J图像分析软件进行创面面积测量。

1.4 创面GFP$^+$细胞流式细胞仪检测

取嵌合小鼠正常皮肤、嵌合小鼠对照组和骨髓动员组伤后第1天创面组织,按文献[3]方法制备单细胞悬液,步骤如下:将组织剪成1 mm^{2}大小,置于含2 mg/mL胶原酶D,1 mg/mL透明质酸酶和20 mg/mL I型DNA酶(roche diagnostics, Penzbeg, Germany)的DMEM培养基(Invitrogen, Carlsbad, CA)中,37 ℃消化2 h,反复吹打成单细胞悬液,200目滤网过滤,1 000 r/min离心5 min,PBS重悬,流式细胞仪检测GFP$^+$细胞比例。

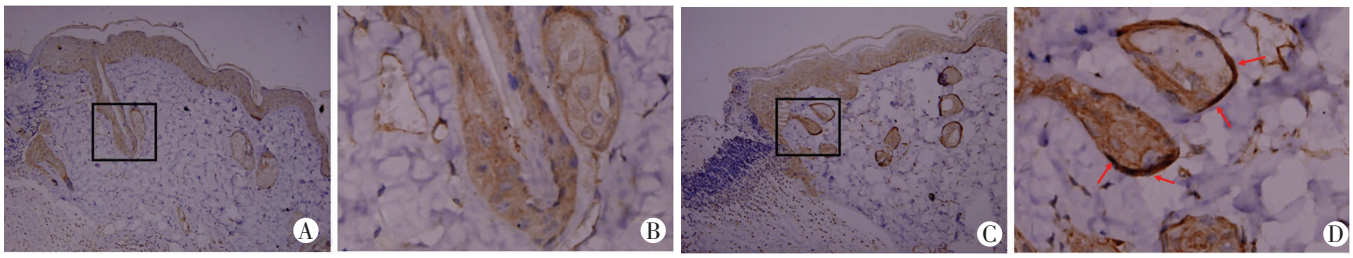
1.5 创面β-catenin检测

取对照组和骨髓动员组伤后第3天创面组织,10%甲醛固定、石蜡包埋,5 μm连续切片。按照ABC免疫组化试剂盒说明书进行。石蜡切片常规脱蜡水化,0.01% PBS洗涤5 min 3次,3% H_2O_2室温浸泡10 min,0.01% PBS洗涤5 min 3次,5%胎牛血清阻断2 h,0.01% PBS液洗涤5 min 3次后甩干,滴加抗β-catenin单克隆抗体(博士德),4 ℃冰箱过夜,次日0.01% PBS再次洗涤3次,滴加二抗生物素(1∶300),室温孵化30 min,DAB显色液显色,苏木精衬染,中性树胶封固。每组抽取3个样本,每个样本采用OLYMPUS BX51型光学显微镜随机检测3个不重叠视野,采集图像。采集后的图像用Image Pro Plu 6.0对阳性染色结果进行半定量分析,检测1张切片3个视野的平均光密度,平均值作为该切片的平均光密度。

表1 2组小鼠术后不同时间残余创面面积（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	术后时间(d)									
	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19
对照组	1.88±0.1	1.41±0.08	1.03±0.11	0.80±0.05	0.64±0.03	0.52±0.04	0.36±0.04	0.29±0.06	0.22±0.06	0.03±0.03
骨髓动员组	1.88±0.1	0.69±0.04[a]	0.44±0.13[a]	0.35±0.04[a]	0.26±0.03[a]	0.19±0.02[a]	0.08±0.04[a]	0	0	0

a：$P<0.05$，与对照组比较



A：对照组β-catenin表达（ABC ×200）；B：A黑框区域放大5倍；C：骨髓动员组β-catenin表达增强，部分呈核表达（ABC ×200）；D：C黑框区域放大5倍

图1 2组小鼠创面β-catenin表达

1.6 统计学分析

计量数据用$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 17.0统计软件进行t检验或单因素方差分析。

2 结果

2.1 创面愈合时间

G-CSF骨髓动员组小鼠创面愈合增快，骨髓动员组小鼠愈合时间为(12.5±0.9)d，对照组小鼠愈合时间为(18.3±0.8)d，G-CSF骨髓动员后创面愈合时间提前5 d余，差异有统计学意义（$P<0.05$）。各时相点残余创面面积如表1。

2.2 创面GFP$^+$细胞比例

GFP嵌合小鼠正常皮肤GFP阳性细胞比例为(5.98±1.60)%，伤后第1天对照组创面GFP阳性细胞比例为(14.92±3.92)%，骨髓动员组创面GFP阳性细胞比例为(21.14±1.91)%，各组间差异均有统计学意义（$P<0.05$）。

2.3 创面β-catenin表达

在对照组创源皮肤中，β-catenin蛋白主要定位在表皮中下层细胞间连接处和毛囊，棕黄色阳性颗粒主要位于细胞膜，即呈膜表达（图1A、B）。而在骨髓动员组创源皮肤中，β-catenin在表皮全层表达明显增强，尤其是在表皮基底层和毛囊，部分呈现核表达（图1C、D红色箭头处）。β-catenin蛋白在骨髓动员组中的平均光密度值为(0.23±0.03)，较对照组中β-catenin蛋白的平均光密度值(0.14±0.04)明显增加，两者差异有统计学意义（$P<0.05$）。

3 讨论

1980年，Metcalf等发现经过内毒素处理的小鼠血清或者条件培养基中有一种活性成分。这种成分具有诱导小鼠骨髓单核细胞白血病细胞集落分化的功能，将之命名为粒细胞集落刺激因子（G-CSF）[4]。近年来，G-CSF在临床的应用日益广泛，是一个非常有临床应用前景的新药。目前已经实G-CSF具有动员骨髓干细胞的能力，据此学者尝试将其应用到心梗、肌肉损伤、肝脏损伤的修复中，G-CSF展现了良好的救治效果[5-7]。然而G-CSF在创面修复中的作用目前并不清楚。

本研究利用GFP嵌合小鼠观察骨髓动员组和对照组G-CSF$^+$细胞在创面的聚集。实验结果证实，骨髓动员组创面GFP$^+$细胞数量显著多于对照组，并且骨髓动员组创面愈合较之对照组增快5 d左右。我们在前期研究中发现，G-CSF动员后VEGF、EGF和bFGF等创面修复关键性生长因子表达上调[8]，这可能是G-CSF动员后促进创面修复的可能途径之一。值得说明的是，虽然GFP嵌合鼠模型是目前研究骨髓来源细胞体内迁徙、示踪较常用和可靠的研究方法，在本研究中，创面GFP$^+$细胞增加可能是G-CSF动员了大量骨髓来源细胞向创面的聚集，然而也有可能是损伤局部的GFP$^+$细胞在G-CSF作用下增殖加快造成的。G-CSF动员后，创面GFP$^+$细胞的来源和功能值得进一步研究。

Wnt信号通路是一条控制细胞命运及组织器官形态发生的重要通路。β-catenin是Wnt信号转导途径

中的关键分子,具有调控干细胞增殖的重要作用[9]。该通路是否激活取决于细胞内游离 β-catenin 的水平[10-11],Wnt/β-cat 信号途径在创伤修复中的作用目前已受到各国学者的广泛关注。研究[12-13]显示,小鼠皮肤创伤后 Wnt/β-cat 信号途径的激活,Wnt3a 和 Wnt4 表达增加,同时 Wnt3a 能促进体外培养的小鼠成纤维细胞增殖;还发现,Wnt 基因在皮肤损伤过程中会重新表达,其可能机制是损伤后的皮肤深层组织分泌 Wnt 蛋白并输送到损伤部位,以激活剩余的表皮干细胞 Wnt 信号通路,促使干细胞增殖和分化修复创面。目前,G-CSF 动员与 Wnt/β-cat 信号途径之间的相互作用研究较少。本研究显示,创伤后应用 G-CSF,可以上调 β-catenin 的表达,促进 β-catenin 核内转位从而激活 Wnt/β-cat 信号途径。

综上所述,本研究发现 G-CSF 动员后,GFP^+ 细胞大量聚集于创面,并促进创面 β-catenin 的表达和核转位。推测 Wnt 信号途径关键因子 β-catenin 表达上调和核转位可能是 G-CSF 骨髓动员促进创面修复加快的重要途径之一。

参考文献:

[1] Bender J G, Unverzagt K L, Walker D E, *et al*. Identification and comparison of CD34-positive cells and their subpopulations from normal peripheral blood and bone marrow using multicolor flow cytometry[J]. Blood, 1991, 77(12): 2591-2596.

[2] Bendall L J, Bradstock K F. G-CSF: From granulopoietic stimulant to bone marrow stem cell mobilizing agent[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2014, 25(4): 355-367.

[3] Wilson L, Fathke C, Isik F. Tissue dispersion and flow cytometry for the cellular analysis of wound healing[J]. Biotechniques, 2002, 32(3): 548-551.

[4] Burgess A W, Metcalf D. Characterization of a serum factor stimulating the differentiation of myelomonocytic leukemic cells[J]. Int J Cancer, 1980, 26(5): 647-654.

[5] Centola M, Capogrossi M C. Role of G-CSF and GM-CSF therapy in patients with acute myocardial infarction and critical limb ischemia[J]. G Ital Cardiol (Rome), 2014, 15(9): 465-474.

[6] Simoes G F, Benitez S U, Oliveira A L. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) positive effects on muscle fiber degeneration and gait recovery after nerve lesion in MDX mice[J]. Brain Behav, 2014, 4(5): 738-753.

[7] Moreau R, Rautou P E. G-CSF therapy for severe alcoholic hepatitis: targeting liver regeneration or neutrophil function?[J]. Am J Gastroenterol, 2014, 109(9): 1424-1426.

[8] Wang Y, Sun Y, Yang X Y, *et al*. Mobilised bone marrow-derived cells accelerate wound healing[J]. Int Wound J, 2013, 10(4): 473-479.

[9] Sareddy G R, Panigrahi M, Challa S, *et al*. Activation of Wnt/beta-catenin/Tcf signaling pathway in human astrocytomas[J]. Neurochem Int, 2009, 55(5): 307-317.

[10] Auvinen E, Carpen O, Korpela T, *et al*. Altered expression of ezrin, E-Cadherin and beta-Catenin in cervical neoplasia[J]. Neoplasma, 2013, 60(1): 56-61.

[11] Bhagat R, Premalata C S, Shilpa V, *et al*. Altered expression of beta-catenin, E-cadherin, and E-cadherin promoter methylation in epithelial ovarian carcinoma[J]. Tumour Biol, 2013, 34(4): 2459-2468.

[12] Carre AL, James A W, MacLeod L, *et al*. Interaction of wingless protein (Wnt), transforming growth factor-beta1, and hyaluronan production in fetal and postnatal fibroblasts[J]. Plast Reconstr Surg, 2010, 125(1): 74-88.

[13] Fathke C, Wilson L, Shah K, *et al*. Wnt signaling induces epithelial differentiation during cutaneous wound healing[J]. BMC Cell Biol, 2006, 7: 4.

(**收稿**:2014-11-10;**修回**:2014-11-26)

(编辑 龙 亮)