皮肤来源间充质干细胞对内皮祖细胞募集效应的体外观察

陈俊颖 （解放军第 324 医院病理科，重庆 400000）

［**摘 要**］ **目的** 细胞的募集趋化与归巢被认为是间充质干细胞（MSCs）修复重建受损组织的重要机制，本研究拟通过体外实验观察皮肤来源间充质干细胞对在血管化中发挥重要作用的内皮祖细胞（EPCs）的募集效应。**方法** 分离与培养胎鼠皮肤 MSCs 和大鼠 EPCs，利用免疫组织化学法，分别检测二者的 SDF-1 与 CXCR4 表达；并利用体外迁移实验，观察 MSCs 是否影响 EPCs 的迁移。**结果** 利用免疫组织化学检测，MSCs 和 EPCs 可以分别表达 SDF-1 与 CXCR4；利用双室培养系统发现，MSCs 可明显促进 EPCs 的迁移，且阻断 SDF-1 表达后，这种促进效应得到抑制（$P<0.05$）。**结论** 体外实验证实了 MSCs 可以促进 EPCs 的募集趋化。

［**关键词**］ 间充质干细胞；内皮祖细胞；募集；体外

［**中图分类号**］ R329.28 ［**文献标识码**］ A ［**文章编号**］ 1672-5042（2011）06-0598-04

Effects of skin-derived mesenchymal stem cells on recruitment of endothelial progenitor cells in vitro

CHEN Jun-ying （Department of Pathology, 324th Hospital of PLA, Chongqing 400000, China）

Abstract: Objective Recruitment is considered an important mechanism for mesenchymal stem cells (MSCs) to repair and construct damaged tissues. This study was to observe if mesenchymal stem cells play important roles in chemotaxis of endothelial progenitor cells (EPCs) in vitro. **Methods** The skin MSCs of fetal rat and rat EPCs were isolated and cultured. The expressions of SDF-1 and CXCR4 were detected by immunohistochemistry. Migration experiments were used to observe whether MSCs affect the migration of EPCs. **Results** According to the results of immunohistochemistry, MSCs and EPCs can express SDF-1 and CXCR4 respectively. MSCs can promote the migration of EPCs and if the SDF-1 expression was blocked, this promoting effect would be suppressed ($P<0.05$). **Conclusion** It is confirmed that MSCs can promote chemotaxis of EPCs in vitro.

Keywords: mesenchymal stem cells; endothelial progenitor cells; recruitment; in vitro

皮肤组织工程的首要要素是种子细胞的选择，干细胞技术的迅速发展为种子细胞的选择提供了良好的契机[1]。近年来皮肤来源间充质干细胞（mesenchymal stem cells, MSCs）作为组织工程种子细胞来源的研究逐渐受到关注。在骨髓和外周血中存在组织定向分化的干细胞群体，它们可以被募集迁移至损伤组织部位，增殖、分化后修复受损组织[2]。已经有实验证实 MSCs 复合支架材料进行修复皮肤缺损中，能促进其血管化[3-5]。组织工程皮肤中的种子细胞 MSCs 可能是启动缺损修复的主要因素，以募集宿主细胞参与血管化为其主要修复方式，在募集宿主细胞的过程中多种趋化因子可能协同发挥作用[6]。因此本实验拟以血管化中发挥重要作用的内皮祖细胞（endothelial progenitor cells, EPCs）和皮肤来源 MSCs 为研究对象，体外实验观察 MSCs 对 EPCs 募集效应，并初步讨论以 MSCs 为种子细胞的组织工程皮肤的促愈合机制。

［**作者简介**］ 陈俊颖（1976 - ），女，重庆市人，主治医师，博士，主要从事临床及基础病理方面的研究。E-mail: flyer. happy@ 163. com

［**收稿日期**］ 2011-08-22 ［**修回日期**］ 2011-09-15

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物为 Wistar 孕大鼠（第三军医大学实验动物中心提供）。细胞培养试剂：DMEM 和胎牛血清（Hyclone 公司）；胰蛋白酶（Sigma 公司）；兔抗鼠 SDF-1 抗体（santa cruz 公司），兔多克隆 CXCR4 抗体（Abcam 公司）；HRP 标记的山羊抗兔 IgG（中杉公司）；DiI-acLDL（Molecular Probes 公司）；FITC-Lectin-UEA-1（Sigma 公司）。嵌套微孔底膜培养皿（Gibco 公司）。

1.2 胎鼠皮肤 MSCs 的分离与培养

将孕鼠在分娩前 1 d 脱臼处死，75% 酒精浸泡消毒，剪开子宫取出胎鼠，用 PBS 缓冲液冲洗后剪下胎鼠背部的全部皮肤，用 0.25% 胰酶消化 1 h 后，加入培养液，2 500 r/min 离心5 min，弃上清。毛玻璃研磨，制成单细胞悬液。细胞计数以 $1.0\times10^5/cm^2$ 接种于培养瓶中，培养条件为 DME 加 10% 胎牛血清，37 ℃，5% CO_2，培养 24 h 后全量换液，去除未贴壁的细胞，以后每隔 3 d 换液 1 次。大约 12 d 后，原代细胞培养长满大部分瓶底后，0.25% 胰酶消化，然后按 1∶3 的比例进行传代接种培养。倒置相差显微镜逐日观察细胞形态，贴壁及生长情况，以第 2 代细胞进行后续实验。

1.3 大鼠内皮祖细胞的培养

利用贴壁筛选和密度梯度离心结合法。大鼠脱臼处死，无

菌条件下取双侧股骨、胫骨，D-Hank's 液冲洗骨髓，200 目筛网过滤，制成单细胞悬液，按等比例缓慢滴加悬液于淋巴细胞分离液上方（密度 1.080 kg/L），2 500 r/min 离心 15 min。吸出单个核细胞层，离心后接种于纤连蛋白包被的 24 孔板。配制完全培养液：DMEM 培养液中加入胎牛血清（20%）、VEGF（20 μg/L）、bFGF（2 μg/L）；调整细胞浓度为 2×10^5/mL。置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。培养第 3 天换液，用 D-Hank's 液洗掉未贴壁的细胞，加入新培养液继续培养。倒置显微镜观察细胞形态，1 周后收集贴壁细胞，以摄取 acLDL 和 UEA-1 进行鉴定。取培养 7 d 的 EPCs 进行后续实验。

1.4　CXCR4 和 SDF-1 的表达

采用免疫组织化学法检测。将细胞种植于玻片上 24 h 后，取细胞片用 4% 多聚甲醛固定 10 min，经 PBS 漂洗后，用 10% 山羊血清室温封闭 30 min。分别在 MSCs 和 EPCs 加入兔抗 SDF-1 抗体和 CXCR4 抗体，同时设立阴性对照，4 ℃过夜。PBS 漂洗 3 次后，加入 1∶200 稀释的 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 37 ℃ 30 min。最后利用 DAB 试剂盒进行显色，常规封片。

1.5　细胞迁移能力检测

采用趋化试验法检测。在 Transwell 培养小室中进行，孔径 8 μm。分为 3 组进行实验：趋化组、拮抗组和对照组。下室内仅加入 500 μl 培养基，不种植 MSCs 的作为对照组。另外 2 组，在 24 孔板孔内先分别加入 500 μl 浓度为 1×10^5/mL 的 MSCs，作为趋化系统下室。以正常的 MSCs 作为趋化组，以加入 SDF-1 中和抗体（1.0 μg/mL）来拮抗 SDF-1 的趋化作用为拮抗组。然后将 Transwell 放入 24 孔内，三组的上室内均加入 100 μl 浓度为 1×10^5/mL 的 EPCs 悬液，37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养过夜。之后用棉签小心刮除未迁移过膜的细胞，4% 多聚甲醛固定 20 min，Giemsa 染色 15 min，光学显微镜下观察，计算迁移的细胞数。每组设 3 个复孔，每孔取 5 个视野计数，取平均值。结果采用 SPSS 11.0 软件进行 t 检验分析。

2　结果

2.1　间充质干细胞培养

原代细胞接种 12 ~ 24 h 后，部分细胞开始贴壁，并出现形态改变，由圆形改为纺锤形；至第 4 天大部分细胞贴壁延伸，呈成纤维细胞样集落生长，大约 10 ~ 12 d 接近融合。传代 MSCs 2 ~ 4 h 即开始贴壁，细胞突起逐渐伸展，24 h 完成贴壁，大约 7 d 长满瓶底，形态主要呈纺锤形（图 1a）。

2.2　内皮祖细胞培养

普通倒置显微镜下动态观察可见，细胞在培养的第 7 天时呈典型的纺锤形的单层细胞，呈条索状或管状分布（图 1b）。摄取 acLDL 和摄取 UEA-1 均为阳性。

2.3　CXCR4 和 SDF-1 的表达

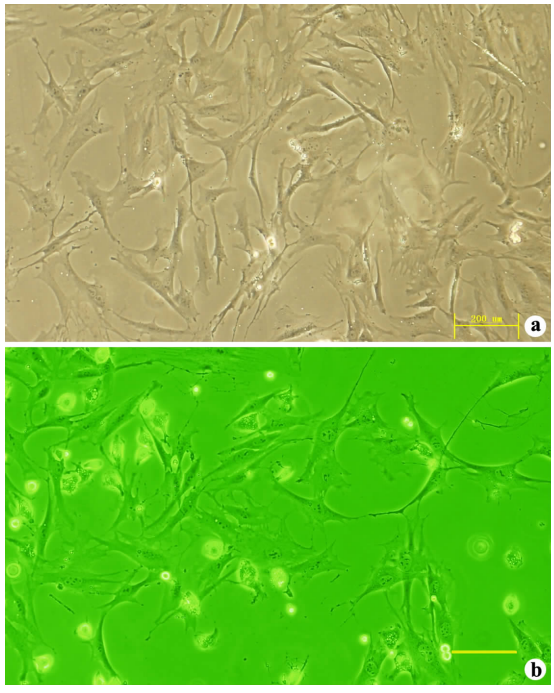
利用免疫组化染色，结果显示在皮肤 MSCs 的细胞质和细胞膜中可表达 SDF-1（图 2a）；在 EPCs 的细胞质和细胞膜中，均有 CXCR4 的表达（图 2b）。

2.4　EPCs 迁移结果

MSCs 能显著诱导 EPCs 迁移，趋化组迁移细胞数（103 ± 6）个，显著高于对照组数（43 ± 8）个（$P < 0.05$）。加入 SDF-1 中和抗体后能显著拮抗 MSCs 对 EPCs 的诱导作用，拮抗组细胞迁移数为（65 ± 4）个，$P < 0.05$（图 3）。

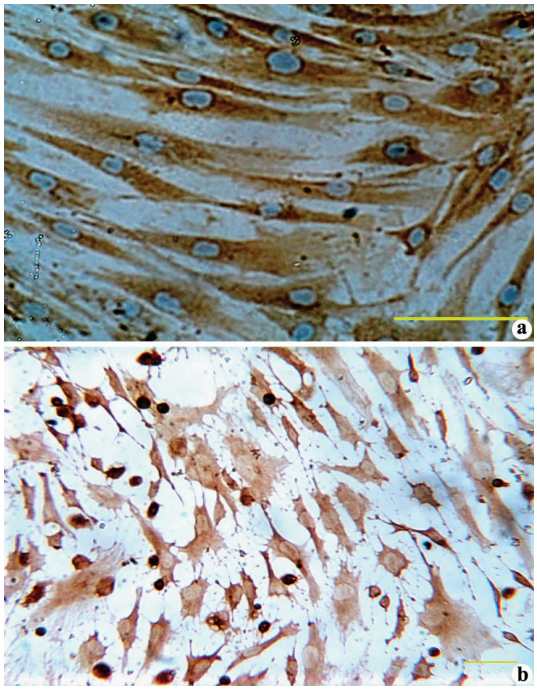
3　讨论

近年来随着组织工程皮肤的研究进展，角质形成



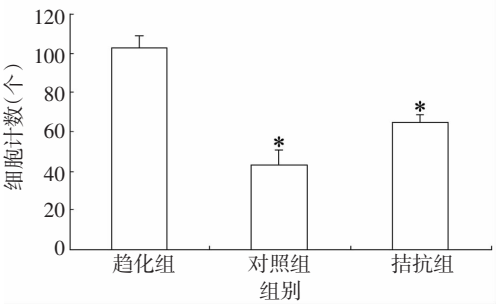
a：第 2 代间充质干细胞；b：原代内皮祖细胞培养第 7 天

图 1　皮肤间充质干细胞和内皮祖细胞培养（图示标尺为 200 μm）



a：MSCs 表达 SDF-1；b：EPCs 表达 CXCR4

图 2　细胞免疫组织化学检测（图示标尺为 200 μm）



*:与趋化组比较,$P<0.05$

图 3 EPCs 细胞迁移实验

细胞和成纤维细胞作为传统的种子细胞在应用过程中暴露出免疫排斥、取材和体外培养困难等问题。MSCs 因来源广泛,分离培养容易,且易于外源基因的导入和表达,在体内局部及全身因素作用下可被诱导分化为皮肤细胞,因此目前其作为种子细胞的价值值得被广泛认可。但关于其发挥修复机制方面的研究仍然较少。有研究表明 MSCs 可以分化为皮肤角质形成细胞、皮脂腺细胞、滤泡上皮细胞、树突状细胞、内皮细胞等,可作为分化的终末功能细胞参与创伤愈合[7]。也有研究表明 MSCs 分泌的生长因子可能是加速皮肤创伤愈合的重要原因。Liu 等[8]研究发现骨髓间充质干细胞表达转化生长因子-β1、表皮生长因子、血管内皮生长因子、表皮生长因子、成纤维细胞生长因子等,这些因子在调节细胞表型和创面改建中起着重要的作用。除此之外,亦有观点认为 MSCs 的主要功能是提供一种适宜环境,从而募集宿主自体干细胞参与修复过程,即细胞的募集趋化与归巢被认为是 MSCs 修复重建受损组织的重要机制[9]。

在创伤愈合过程中创伤部位可能产生新生血管,新生的血管为创伤部位提供氧、营养物质和生物活性物质,因此对创伤修复起到重要作用。创伤后的新生血管由 EPCs 参与形成,随后内皮细胞迁移,形成毛细血管[10]。因此推测 MSCs 可能是促进 EPCs 趋化、迁移并参与血管化的重要因素。Salvolini 等[11]认为人皮肤来源 MSCs 可以通过旁分泌方式影响内皮功能,这种方式可能是由于 MSCs 在条件培养基下释放 VEGF 增加,进而影响人主动脉内皮细胞的 Ca^{2+} 浓度和 NO 产物,因此与修复过程中的内皮细胞迁移的调控机制有关。Eganňa 等[12]将一种人 MSCs V54/2 种植在 Integra matrix 支架上,2 周后发现 VEGF 和 bFGF 分泌明显增加,裸鼠皮肤损伤修复实验也证实细胞种植组的血管化明显强于没有细胞的单纯支架组。

细胞的趋化是干细胞参与后续生物学效应的启动步骤,对局部干细胞的募集十分关键。CXC 趋化因子受体 4(CXCR4)与其唯一特异配体 SDF-1 构成 SDF-1/CXCR4 轴,在胚胎发育、免疫和炎性反应、造血干细胞动员和归巢、艾滋病及肿瘤等生理病理过程中发挥重要作用。近来研究发现,SDF-1/CXCR4 轴在组织修复中趋化循环干细胞到达损伤部位、促进干细胞存活及横向分化等方面也扮演着重要角色[13]。有研究表明骨髓 MSCs 分泌的 SDF-1α 能促进小鼠皮肤血管增生和放射伤口的愈合[14]。本实验中,利用免疫组织化学检测,MSCs 和 EPCs 可以分别表达 SDF-1 与 CXCR4,表明二者具有趋化的潜能。利用双室培养系统发现,MSCs 可以明显促进 EPCs 的迁移,并且阻断 SDF-1 表达后,这种促进效应得到抑制,表明 MSCs 所表达的 SDF-1 是内皮祖细胞有效的趋化因子,可促进体外细胞迁移。这些结果提示 SDF-1/CXCR4 轴可能在皮肤种子细胞促进 EPCs 趋化、迁移并参与血管化中发挥重要作用。SDF-1/CXCR4 轴所介导的 MSCs 对 EPCs 体内细胞动员效应有待进一步实验研究。

[参考文献]

[1] 裴雪涛,刘大庆. 干细胞:组织器官重建的理想种子细胞[J]. 中国修复重建外科杂志,2006,20(4):344 - 348.

[2] Yin Z, Chen X, Chen JL, et al. Stem cells for tendon tissue engineering and regeneration[J]. Expert Opin Biol Ther, 2010, 10(5): 689 - 700.

[3] Ma K, Liao S, He L, et al. Effects of nanofiber/stem cell composite on wound healing in acute full-thickness skin wounds[J]. Tissue Eng Part A, 2011, 17(9-10): 1413 - 1424.

[4] Kobayashi M, Spector M. In vitro response of the bone marrow-derived mesenchymal stem cells seeded in a type-I collagen-glycosaminoglycan scaffold for skin wound repair under the mechanical loading condition [J]. Mol Cell Biomech, 2009, 6(4): 217 - 227.

[5] Wu Y, Chen L, Scott PG, et al. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis[J]. Stem Cells, 2007, 25(10): 2648 - 2659.

[6] Chen FM, Wu LA, Zhang M, et al. Homing of endogenous stem/progenitor cells for in situ tissue regeneration: promises, strategies, and translational perspectives [J]. Biomaterials, 2011, 32 (12): 3189 - 3209.

[7] Ma K, Laco F, Ramakrishna S, et al. Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into multi-layered epidermis-like cells in 3D organotypic coculture [J]. Biomaterials, 2009, 30 (19): 3251 - 3258.

[8] Liu P, Deng Z, Han S, et al. Tissue-engineered skin containing mesenchymal stem cells improves burn wounds[J]. Artif Organs, 2008, 32 (12): 925 - 931.

[9] Zhao J, Zhang N, Prestwich GD, et al. Recruitment of endogenous stem cells for tissue repair[J]. Macromol Biosci, 2008, 8(9): 836 - 842.

[10] Critser PJ, Yoder MC. Endothelial colony-forming cell role in neoangiogenesis and tissue repair[J]. Curr Opin Organ Transplant, 2010, 15 (1): 68 - 72.

[11] Salvolini E, Orciani M, Vignini A, et al. Skin-derived mesenchymal

stem cells (S-MSCs) induce endothelial cell activation by paracrine mechanisms[J]. Experimental Dermatology, 2010, 19(9): 848 – 850.
[12] Eganňa JT, Fierro FA, Krüger S, et al. Use of human mesenchymal cells to improve vascularization in a mouse model for scaffold-based dermal regeneration[J]. Tissue Eng Part A, 2009, 15(5): 1191 – 1200.
[13] Shi M, Li J, Liao L, et al. Regulation of CXCR4 expression in human mesenchymal stem cells by cytokine treatment: role in homing efficiency in NOD/SCID mice[J]. Haematologica, 2007, 92(7): 897 – 904.
[14] Landry Y, Lê O, Mace KA, et al. Secretion of SDF-1α by bone marrow-derived stromal cells enhances skin wound healing of C57BL/6 mice exposed to ionizing radiation [J]. J cell Mol Med, 2010, 14(6B): 1594 – 1604.

(编辑:周小林)

· 个案与短篇 ·

达芬奇机器人手术器械的清洗与灭菌

周娅颖,魏静蓉,张琦霞,易　斌　(第三军医大学西南医院设备器材科消毒供应中心,重庆 400038)

[**关键词**] 机器人手术系统;手术器械;清洗;灭菌
[**中图分类号**] R197.39;R612　[**文献标识码**] B　[**文章编号**] 1672-5042(2011)06-0601-01

机器人手术系统是微创外科发展的时代产物,在腔镜手术的基础上延伸了外科医生的手、眼功能,能更微观和精准地进行手术操作,被广泛应用于胸心外科、普通外科、泌尿外科和妇产科等多个专科领域。目前达芬奇机器人手术系统(Da Vinci Surgical System)已成为发达国家跨入微创时代的主流手术系统[1]。我院于 2010 年 2 月引进达芬奇机器人开展了胆囊切除、胃切除、前列腺手术、妇科腹腔镜手术等共 100 余例。为保障机器人手术的正常开展及每一环节的适应性和无缝连接,本文就机器人手术器械的清洗与灭菌体会报告如下。

1　机器人辅助手术系统的应用

Da Vinci 机器人手术系统并非是在某种程序控制下能自动完成手术的机器人,它仅仅是在外科医生的操纵下辅助医生完成手术的辅助系统[2]。它包括按照人体工程学原理设计的医生控制台、4 个机器人手臂系统、1 个机械臂操控高清晰度立体腔镜、机械臂控制的高准确度 EndoWrist 仿真手腕器械[3]。手术时,医生坐在操作台前,观察放大 20 倍的患者体内器官组织的三维影像,术者的手术操作被手术机器人转化为数字信息,传递给机械臂,通过控制机械臂来完成手术操作[4]。完全由机械手代替了人手操作,避免手术医生与患者直接接触,减少感染发生的几率。

2　机器人手术器械的功能及特点

Da Vinci 机器人手术系统是腔镜技术发展的高级产物,其手术步骤及术中用物与腔镜手术相似。在腹部手术中仍需建立气腹以扩展手术视野,因此应配备金属穿刺鞘、超声刀、分叉光缆、PK 器械线、双极电凝线、单极电凝线、器械套管封帽等。另外还需准备与机器人系统配套使用的 EndoWrist 仿真手腕器械及三维成像的内窥镜。EndoWrist 仿真手腕器械是安装在机器人臂杆上的“左手”、“右手”和“助手”,包括手术常用的剪刀、抓钳、针持、分离钳、无创组织镊等。其结构均由分离杆、器械轴、销轴、尖端效应器或末端效应器、器械保护套等 5 部分组成(图 1)。主要用于手术中抓起、切割组织,钝性和锐性分离、

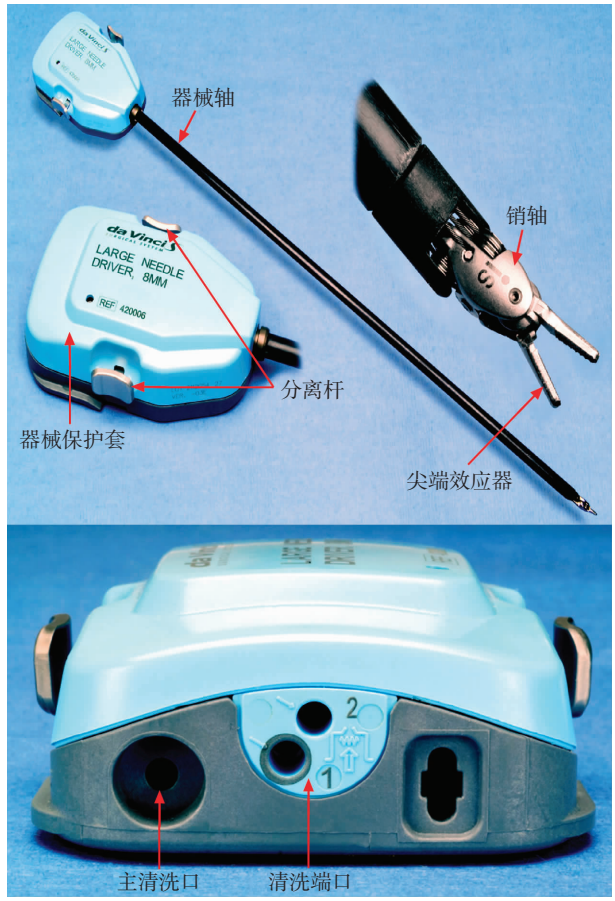


图 1　EndoWrist 仿真手腕器械的组成

(下转第 605 页)

[**收稿日期**] 2011-06-20　[**修回日期**] 2011-07-10