维普资讯 http://www.cqvip.com



文章编号:0253-3626(2006)03-0307-04

# 白细胞蛋白酶抑制因子对真皮间充质干细胞增殖的影响

江德鹏[1],向 静[2],文 亮[3],粟永萍[1],屈纪富[1],冉新泽[1]

(1. 第三军医大学预防医学系复合伤研究所,重庆 400038; 2. 第三军医大学第三附属医院神内科,重庆 400042;
3. 第三军医大学第一附属医院急诊科,重庆 400038)

【摘 要】目的:研究白细胞蛋白酶抑制因子(SLPI)在真皮间充质干细胞(dMSCs)中的表达以及促 dMSCs 增殖的作用。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,在大鼠背部置入聚乙烯酒精海绵收集伤后 1 天伤口液,用 Tripure 细胞裂解液提取伤口液刺激前后 dMSCs 和创伤前后大鼠皮肤组织中总 RNA。通过 RT-PCR 检测伤口液刺激前后 dMSCs 和创伤前后大鼠皮肤组织中 SLPI mRNA 的表达。用 M-PER 抽提细胞蛋白,了解伤口液刺激前后 dMSCs 中 SLPI 蛋白表达的变化。无血清 IMDM 培养液培养细胞 48h,加入不同浓度的 SLPI 因子刺激 dMSCs,通过[H3]Thymidine 掺入实验研究 SLPI 对真皮间充干细胞的增殖作用。结果:分离的大鼠 dMSCs 呈梭形,在体外显示多向分化潜能。RT-PCR 和 Western blot 提示 SLPI 在 dMSCs 中表达,伤口液刺激后表达增强。通过[H3]Thymidine 掺入实验发现加入 SLPI 因子后,细胞增殖明显增强。结论:SLPI 在 dMSCs 中表达,能够促进 dMSCs 的增殖,通过高表达 SLPI 可能是 dMSCs 参与创伤修复的重要途径之一。

【关键词】白细胞蛋白酶抑制因子;干细胞;增殖
【中国图书分类法分类号】R329.2+8 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-12-23

# Effect of secretory leukocyte protease inhibitor on growth regulation of dermal mesenchymal stem cells

*JIANG Depeng, et al*

*(Institute of combine injury of PLA, The Third Military Medical Uiniversity)*

【Abstract】 *Objective*: To investigate the expression of SLPI in dMSCs and the effect of SLPI on growth regulaton of dMSCs. *Method*: Isolated stem cells from the rat skin tissue.Two pieces of sterile polyvinyl alcohol sponges were inserted subcutaneously in the dorsum of the rat and collected the wound fluid 1day after injury. Isolated RNA of two groups: dMSCs before and after the stimulation by wound fluid; skin tissue before and after trauma. SLPI was detected to know how they changed in dMSCs and in the skin before and after the injure by using RT-PCR and Western blot method. [H3] Thymidine incorporation was used to evaluate the mitogenic influence of SLPI. *Results*: Most of the neonatal dMSCs were spindle-shaped cells and exhibited multilineage potential in vitro. It was shown in the result of RT-PCR and western blot that SLPI expressed in dMSCs and increased after the cells being stimulated by wound fluid. A concentration-dependent proliferation promotion were demonstrated in dMSCs incubated for 24h in the prsense of SLPI. *Conclusions*: SLPI can be detected in dMSCs and support the growth of dMSCs in serum-free medium in vitro. In view of the multiple functions of SLPI, we supposed that it acted as an important role when dMSCs participated in the reparing of cutaneous injury.

[Key words] Secretory leukocyte protease inhibitor; Stem cells; Proliferation

基因的差异表达是创伤修复启动的关键因素[1]。国内外很多学者在研究中已经发现了很多有意义的差异表达基因,包括 NF-κB,TGF-β,EGF,FGF,P53 等。为了进一步阐明创伤修复启动的分子机制,我们应用抑制消减杂交建立了创伤前后差异表达基因的文库,并通过基因芯片进行反向鉴定,实验发现白细胞蛋白酶抑制因子(Secretory leukocyte protease inhibitor SLPI)在伤口液刺激后真皮间充质干细胞(dermal Mesenchymal Stem Cells dMSCs)和创伤后皮肤组织中表达升高。本实验拟通过 RT-PCR 和 Western blot 证实 SLPI 在 dMSCs 中的表达,并进一步探讨 SLPI 促 dMSCs 增殖的作用。

作者介绍:江德鹏(1977- )男,主治医师,硕士,
主要研究方向:干细胞在创伤修复方面基础和应用。

基金项目:国家自然科学基金项目资助(30370562);国家重点基础研究发展规划(973)项目(2005CB522605)。

维普资讯 http://www.cqvip.com



## 1 材料和方法

### 1.1 材料和试剂

1 天和 3 个月的 Wistar 雄性大鼠从第三军医大学动物中心购得。Tripure 细胞裂解液购自罗氏试剂公司,RT-PCR 试剂盒和 DL-2000 分子量标准购自大连宝生物公司,DEPC 购自 Sigma 公司,琼脂糖购自 Gibcobrl 公司,蛋白抽提试剂 M-PER 购自 PIERCE 公司,蛋白 Marker 购自华舜公司,培养瓶和平板购买自 Corning 公司。所有引物由北京赛百盛公司合成。羊抗小鼠 SLPI 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司,HRP-兔抗羊 IgG 购自中山生物技术公司。

### 1.2 细胞培养

取出生 1 天的 Wistar 雄性大鼠,无菌条件下,剪取背部全层皮肤。置于 0.25%的胰酶中,4℃消化过夜。加入胎牛血清终止反应。分离真皮组织,制成单细胞悬液,接种于 50ml 一次性塑料培养瓶中,培养条件为含 10%胎牛血清的 IMDM 培养液,37℃,5% $CO_2$,饱和湿度。培养 6h 后,弃去悬浮细胞,将贴壁细胞继续培养,低密度接种法筛选出一高增殖活性的细胞克隆,取第三代的贴壁细胞在盖玻片上培养,加入不同浓度的地塞米松进行多向分化诱导,并用免疫组织化学 ABC 法检测Ⅷ因子,Vimentin 和 Pancytokeratin 的表达, 一抗为小鼠抗大鼠的单克隆抗体,工作浓度为 1 ∶ 100。细胞鉴定后,取第 10 代细胞用于研究[2,3]。

### 1.3 伤口液的提取

3 个月的成年 Wistar 大鼠用戊巴比妥钠麻醉, 两条消毒的聚乙烯酒精海绵被置入背部皮下 7cm 长切口中。伤后 3 天,海绵在无菌条件下取出,4℃条件下挤压获取液体,2000r/min 离心去除细胞成分,得到的伤口液被用于下一步实验[4]。

### 1.4 dMSCs 和大鼠皮肤组织 RNA 的提取

dMSCs 在无血清培养基条件下饥饿 48h,使细胞生长同步化[5];然后加入 10%伤口液,作用 24 h 后收集细胞(实验组),并以未加伤口液作用者为对照组。实验组和对照组细胞融于 Tripure 细胞裂解液中,按照标准程序提取 RNA。溶解于 40μl DEPC 处理的纯净水中,55℃孵育 15min。取少量样本分光光度计定量,甲醛变性胶电泳质检。

大鼠背部皮肤消毒后, 纵行制作长约 6cm 的皮肤切割伤,深至皮下,常规缝合,伤后 1 天麻醉下取 500mg 伤口皮肤组织(实验组),同时取 500mg 正常大鼠皮肤组织作为对照,迅速在液氮中研成粉末, 用 Tripure 细胞裂解液抽提实验组和对照组皮肤的总 RNA。

### 1.5 RNA 反转录

取 1μg RNA 转录成 cDNA, 在 EP 管中先后加入 $MgCl_2$ 2μl,10×PCRbuffer 1μl,RNase free $H_2O$ 3.75μl,dNTP 1μl,RNase inhibor 0.25μl,AMV 逆转录酶 0.5μl,Oligo-dT 接头引物 0.5μl,RNA 样品 1μg, 按照如下条件进行逆转录反应 30℃10min,42℃ 40min,99℃ 5min,50℃ 5min。

### 1.6 半定量 RT-PCR

根据已知基因序列设计引物,SLPI 上游引物:5′-TGC TCC TTG CTC TGG GTG TCC TG-3′。下游引物:5′-GCC GTC ATT CTG GCA CTT ATT GG-3′。目的基因共 295bp,内参照选用 GAPDH, 上游引物:5′-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3′。下游引物:5′-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3′,扩增片断 440bp。以反转录的 cDNA 为模板,在 EP 管中依次加入下列物质:Taq 酶 0.25μl,10×PCR buffer 10μl,纯净水 27.75μl,特异性上下游引物各 0.5μl,内对照 G3PDH 上下游引物各 0.5μl (30μmol/L),cDNA 产物 10μl,按照以下条件进行 PCR 反应。94℃预变性 5 min,94℃ 30s,58℃30s,72℃ 30s,30 个循环后,72℃延伸 7 min。产物于琼脂糖凝胶中电泳。

### 1.7 Western blot

取前面步骤中准备好的标本,移去培养基,使用 M-PER 提取细胞蛋白,Bradford 法检测蛋白浓度,-70℃冻存样本用于下一步实验。通过含 15%丙烯酰胺的 SDS-PAGE 胶分离蛋白质,每泳道等量加入 60ug 样本,电泳后将标本电转至硝酸纤维膜,在封闭液中孵育 3h;PBS 漂洗 1×15min,2×5min 后加入羊抗小鼠 SLPI 多克隆抗体,4℃孵育过夜,PBS-T 漂洗三遍后加入 HRP- 兔抗羊 IgG, 室温下反应 2h,PBS-T 漂洗 3 遍后,通过 DAB 显色检测杂交信号。

### 1.8 SLPI 的促增殖活性

我们通过[H3]Thymidine 掺入实验来检测 SLPI 对 dMSCs 的促增殖活性[6,7]。取第 10 代 dMSCs 细胞,生长 80%融合时换用无血清 IMDM 培养液饥饿细胞 48h。实验组加入不同浓度 SLPI 因子(100~500 ng/ml),对照组不加入因子,培养 24h 后加入 2μ Ci[3H]thymidine 标记细胞,继续孵育 4h,通过液闪计数仪计数掺入的[3H]thymidine. 数目。每组实验使用不同时间分离的细胞重复 3 次。

### 1.9 统计学处理

所有数据均以均数 ± 标准差表示,采用 SPSS11.0 软件,进行配对 $t$ 检验,$P<0.05$ 为差异有显著性。

## 2 结 果

### 2.1 dMSCs 的分离和鉴定

原代培养的 dMSCs 形态多样, 传至第三代,细胞形态较为一致,主要为梭形(图 1),细胞呈克隆性生长,我们采用低密度接种法筛选出高增殖活性克隆,体外传代培养,经地塞米松诱导 4 周后,组织染色证实细胞具有成脂分化、成骨分化、成肌分化等多向分化潜能(图 2)。免疫组织化学法发现体外分离培养的细胞Ⅷ因子和 Pancytokeratin 表达为阴性,可以排除内皮细胞和角质细胞的可能,Vimentin 表达呈阳性,提示该细胞为间质来源。

维普资讯 http://www.cqvip.com





图 1 大部分新生的 dMSCs 细胞在体外呈梭形，形态均一 ×100

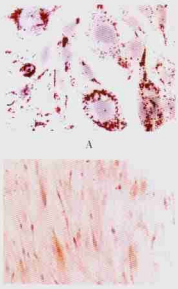


图 2 真皮多能干细胞成脂肪(A:油红 O 染色)、成肌(B :myosin 免疫组化染色)诱导结果×200

2.2 伤口液刺激前后 dMSCs 中 SLPI 的含量检测结果

RT-PCR 结果显示同对照组相比，SLPI 在伤口液刺激后 dMSCs 中表达明显升高，条带灰度扫描结果显示，SLPI 较对照组增高 1.73 倍(见图 3)。($P<0.05$)SLPI 在创伤修复中有重要意义，我们根据抑制消减杂交提供的线索，通过 RT-PCR 证实 SLPI 在 dMSCs 中有表达，伤口液刺激后表达增强。

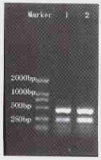



图 3 伤口液刺激前后 dMSCs 中 SLPI 含量检测结果

2.3 创伤前后皮肤组织中 SLPI 的含量检测结果

RT-PCR 结果显示 SLPI 在正常大鼠皮肤组织中低表达，创伤后表达显著升高，条带灰度扫描结果显示增高 2.25 倍($P<0.05$)本实验在组织水平进一步证实了细胞实验的结果(见图 4)。

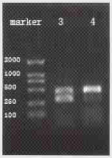



图 4 创伤前后大鼠皮肤组织中 SLPI 含量检测结果
1.正常 dMSCs 中 SLPI 的含量
2.伤口液刺激后 dMSCs 中 SLPI 的含量
3.创伤后大鼠皮肤 SLPI 表达
4.正常大鼠皮肤 SLPI 表达

2.4 Western blot

我们通过 western blot 检测伤口液刺激后 SLPI 在蛋白水平的变化，如图 5 所示，伤口液能够上调 SLPI 的表达，从而在蛋白水平验证了 SLPI 的表达和伤口液刺激后表达的变化。




图 5 伤口液刺激前后 SLPI 的表达变化
1.正常 dMSCs SLPI 表达
2.伤口液刺激后 dMSCs SLPI 表达

2.5 SLPI 的促增殖活性

我们使用[H3]Thymidine 掺入实验评估 SLPI 对 dMSCs 的促有丝分裂潜能。每组实验使用不同时间分离的细胞重复 3 次，取均数，相同浓度的实验结果之间无统计学差异，如图 6 所示，同对照组相比 SLPI 增加 dMSCs 的有丝分裂，随浓度增大，增殖指数增加。

## 3 讨 论

创伤愈合是一个非常复杂的过程，其中很多问

维普资讯 http://www.cqvip.com



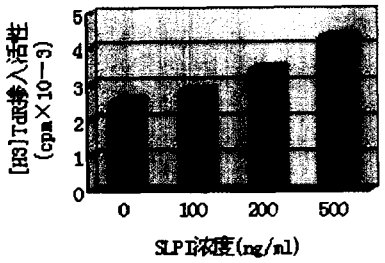



图 6 SLPI 促进 dMSCs 增殖的效应

题仍未完全阐明,特别是创伤微环境与组织修复细胞之间的作用机理及调控环节,创伤后,在微环境作用下,组织修复细胞出现特异性基因表达,并通过多种途径启动组织修复过程。通过增殖、迁移、分化等参与创伤愈合[1,2]。我们用伤口液刺激 dMSCs,以此来模拟干细胞在创伤微环境中的变化[2]。在此基础上,为了寻找伤口液刺激后的变化基因,我们建立了抑制消减杂交差异基因表达文库,并通过基因芯片进行反向鉴定,实验发现 SLPI 在 dMSCs 中表达,伤口液刺激后表达增强。我们通过 RT-PCR 和 Western blot 证实了 SLPI 在伤口液刺激前后 dMSCs 中的差异表达,而且,SLPI 在大鼠皮肤组织中也有表达,伤口液刺激后表达增强。

SLPI 是一个由两个半胱氨酸富集区域组成的 12.7kD 的蛋白,其蛋白酶抑制位点位于羧基端。SLPI 能够抑制多种蛋白酶的活性,例如中性粒细胞弹性蛋白酶,肥大细胞分泌的胰蛋白酶,角质层的糜蛋白酶等。除了抗蛋白酶活性外,SLPI 还有抗细菌,抗炎,控制细胞内酶合成,抑制单核细胞基质金属蛋白酶等多种活性。SLPI 首先在腮腺的分泌液中被发现,后来报道能够被上皮细胞、中性粒细胞,巨嗜细胞等多种细胞分泌。由于 SLPI 的合成水平相对较低,因此主要在组织局部发挥作用。

大量研究显示 SLPI 在创伤愈合中发挥重要作用,SLPI 能够对抗由内毒素激发的单核细胞和巨嗜细胞释放的促炎症介质的释放,例如 SLPI 可以通过降低 TGF-β 和 NF-κB 的活性来减轻炎症反应,从而促进伤口愈合[8,9],这一点在炎症反应和细菌感染严重的伤口组织中尤其关键。SLPI 的抗蛋白酶活性在创伤愈合中也发挥重要作用。创伤后,中性粒细胞释放的蛋白酶能够造成广泛的病理损害,影响组织的愈合,蛋白酶和其蛋白抑制因子活性的失衡是影响伤口愈合的重要因素[10,11]。在 SLPI 缺失的动物模型中,伤口愈合明显延迟,炎症反应加剧,蛋白酶活性增强,基质沉积延迟[12]。SLPI 在创伤过程中的高表达有着重要的意义。干细胞在创伤修复中发挥重要作用,分泌细胞因子是其参与创伤修复的主要途径之一,SLPI 在 dMSCs 中表达以及变化对于认识 dMSCs 参与创伤修复的分子机制有重要意义。

组织细胞被激活后,通过增殖、迁移、分化等多种途径参与组织修复[1]。我们的研究发现,SLPI 能够促进 dMSCs 的增殖,其效应浓度同经典生长因子发挥作用的浓度相似,随着浓度增加,dMSCs 增殖明显增强。

近年来,SLPI 在多项研究中展示了潜在的促细胞增殖活性,但其机制仍不清楚。人们发现 SLPI 在上皮细胞癌中表达升高,继而人们发现 SLPI 在卵巢,子宫内膜,呼吸道,神经来源的肿瘤或癌细胞中表达升高。SLPI 能够促进无血清条件下造血干细胞的增殖,并且在肺成纤维细胞中促进肝细胞生长因子的产生[13,14]。多项研究提示 SLPI 能够促进子宫内膜腺上皮的 DNA 合成,刺激细胞增殖。这些同本研究的结果一致[15,16]。

细胞因子是细胞生长增殖微环境的主体[17],我们推测 dMSCs 含有 SLPI 等多种自分泌和旁分泌细胞因子及其受体,同其他细胞分泌的细胞因子共同组成了干细胞复杂的细胞因子调控微环境,维持干细胞的正常分化和增殖,创伤后,因子分泌大量增加,细胞增殖加快。SLPI 调控生长增殖的机制目前仍不清楚,SLPI 促增殖的具体通路,是否通过膜受体发挥作用以及具体的功能区域都有待于进一步研究。

## 参 考 文 献

[1] Megdalena J, Millard TH, Etienne-Manneville S, et al. Involvement of the arp2/3 complex and scar2 in Golgi polarity in scatch wound models [J]. Mol Biol Cell, 2003;14(2):670-684.

[2] 史春梦, 程天民. 创伤局部微环境对大鼠真皮多能干细胞生物学性状的影响 [J]. 中华创伤杂志; 2003;19(4):199-202.

[3] 吕铁伟,田 杰,朱 静,等.大鼠骨髓间充质干细胞适宜分离和培养条件的研究 [J]. 重庆医科大学学报, 2004;29(6):715-721.

[4] Marikovsky M, Rosenblum CI, Faltin Z. Appearance of leptin in wound fluid as a response to injury[J]. Wound Repair Regen, 2002;10(5):302-307.

[5] Iyer VR, Eisen MB, RossDT, et al. The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum [J].Science, 1999;283(5398):83-87.

[6] Petersen C, Svechnikov K, Froysa B, et al. The p38 MAPK

(下转第 329 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com



心肌损伤[9]；(2) 可能通过降低炎性介质（如 TNF-α）的表达间接抑制 NF-κB 的激活。本实验结果还显示：两预处理组抑制 NF-κB 的激活，可被 ATP 敏感性钾通道阻断剂格列本脲阻断。这提示我们预处理可能通过 ATP 敏感性钾通道开放直接或间接抑制 NF-κB 激活。我们推测可能与 ATP 敏感性钾通道开放保护线粒体功能，减少氧自由基（其是 NF-κB 的激活的主要因素）的产生，进而间接抑制 NF-κB 的激活有关。

本实验发现预处理可能通过开放 ATP 敏感性钾通道直接或间接抑制 NF-κB 的激活，进而减轻心肌缺血再灌注损伤，这可能是预处理心肌保护的一个作用机制。但目前预处理的心肌保护作用机制仍未明确，其与 ATP 敏感性钾通道以及 ATP 敏感性钾通道与 NF-κB 的关系有待于进一步探讨。

（黄燕现工作单位：重庆医科大学附属第二医院麻醉科）

## 参 考 文 献

[1] Baeuerle PA, Henkel T. Function and activiation of NF-κB in the immune system [J]. Ann Rev immunol, 1994;12:141-179.

[2] Lic, Browder W, Kao Rl. Early activiation of transcription factor NF-κB during ischemia in perfused rat heart [J]. Am J physiol, 1992;276:H543-H552.

[3] 喻 田,余志豪,刘兴奎,等. 缺血预处理对体外循环缺血心肌的保护效果[J]. 中华麻醉学杂志, 1997;17(12):720-724.

[4] Yu Tian, Yu ZhiHao, Liu Xingkui, et al. Myocardial protection with pinacidil induced hyperpolarized arrest during CPB [J]. Chinese Medical Journal, 2001;114(12):1245-1248.

[5] 刘兴奎,喻 田,余志豪等. 吡那地尔预处理和超极化停搏的心肌保护效果研究 [J]. 中华胸心血管外科杂志, 2001;17(4):254-258.

[6] Fukuda H, Luo CS, Gu X, et al. The effect of K (atp) channel activation on myocardial cationic and energetic status during ischemia and reperfusion: role in cardioprotection [J]. J Mol Cell Cardiol, 2001;33(3):545-560.

[7] Ishida H, Hirota Y, Genka C, et al. Opening of mitochondrial K (ATP) channels attenuates the ouabain-induced calcium overload in mitochondria [J]. Circ Res, 2001;89(10):856-858.

[8] 汪永义. NF-κB 与心肌缺血再灌注损伤的研究进展[J]. 国外医学·心血管疾病分册, 2002;29(3):140-142.

[9] Bach FH, Hancock WW, Ferran C. Protective genes expressed in endothelial cells: a regulatory response to injury [J]. Immunol Today, 1997;18(10):483-486.

（上接第 310 页） pathway mediates interleukin-1-induced Sertoli cell proliferation[J]. Cytokine, 2005;32(1):51-59.

[7] Yang H, Mergler S, Sun X, et al. TRPC4 knockdown suppresses epidermal growth factor-induced store-operated channel activation and growth in human corneal epithelial cells [J]. J Biol Chem, 2005;280(37):32230-32237.

[8] Zhang Y, DeWitt DL, McNeely TB, et al. Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the production of monocyte prostaglandin H syntase-2, prostaglandin $E_2$, and matrix metalloprotei-nases [J]. J Chin Invest, 1997;99(5):894-900.

[9] Song X, Zeng L, Jin W, et al. Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the inflammation and joint damage of bacterial cell wall-induced arthritis [J]. J Exp Med, 1999;190(8):535-542.

[10] Ashcroft GS, Greenwell Wild T, Horan MA, et al. Topical estrogen accelerates cutaneous wound healing in aged humans associated with an altered inflammatory response[J]. Am J Pathol, 1999;155(10): 1137-1146.

[11] Herrick S, Ashcroft G, Ireland G, et al. Up- regulation of elastase in acute wounds of healthy aged humans and chronic venous leg ulcers are associated with matrix degradation [J]. Lab Invest, 1997;77(9):281-288.

[12] Ashcroft GS, Lei K, Jin W, et al. Secretory leukocyte protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing [J]. Nat-Med, 2000;10(6):1147-1153.

[13] Goselink HM, van-Damme J, Hiemstra PS, et al. Colony growth of human hematopoietic progenitor cells in the absence of serum is supported by a proteinase inhibitor identified as antileuko-proteinase [J]. J Exp Med, 1996;184(10):1305-1312.

[14] Kikuchi T, Abe T, Yaekashiwa M, et al. Secretory leukoprotease inhibitor augments hepatocyte growth factor production in human lung fibroblasts [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000;23(9):364-670.

[15] Badinga L, Michel FJ, Simmen RC. Uterine-associated serine protease inhibitors stimulate deoxyribonucleic acid synthesis in porcine endometrial glandular epithelial cells of pregnancy [J]. Biol Reprod, 1999;61(8):380-387.

[16] Zhang XL, Simmen FA, Michel FJ, et al. Increased expression of the Zn-finger transcription factor BTEB1 in human endometrial cells is correlated with distinct cell phenotype, gene expression patterns, and proliferative responsiveness to serum and TGF-beta1 [J]. Mol Cell Endocrinol, 2001;181(1-2):81-96.

[17] Shi CM, Cheng TM, Su YP. Exploring the developmental potential of adult mammalian somatic cells [J]. Chin Sci Bull, 2001;46(1):4-5.