

· 基础研究 ·

低强度电磁场促进鼠表皮干细胞移植修复皮肤缺损的实验研究

张鸣生 吴博 白文芳 庞文君 朱洪翔 许伟成

【摘要】目的 观察低强度电磁场(LIEMF)在促进表皮干细胞(ESCs)移植修复皮肤缺损中的作用。**方法** 取7~8周龄的裸鼠50只,制作全层皮肤缺损后根据随机数字表随机分为3个实验组(1 Hz组、10 Hz组和50 Hz组)和2个对照组(细胞悬液对照组和空白对照组),每组10只。3个实验组和细胞悬液对照组利用胶原海绵将体外分离培养的人包皮来源的ESCs植入裸鼠创面,实验组外加LIEMF(磁感应强度5 mT,频率分别为1 Hz、10 Hz和50 Hz)刺激15 d(每日1次,每次30 min);空白对照组置于同等条件下不加细胞悬液和电磁场。通过计算创面收缩率,光镜下观察组织切片HE染色和免疫组织化学染色结果,以及透射电镜下观察再生皮肤组织内部结构,评定皮肤缺损修复情况。**结果** ESCs可以在裸鼠皮肤缺损处成功生长,再生表皮层中有人 $\beta 1$ 整合素强阳性表达,并且实验组创面收缩率均高于对照组($P < 0.05$)。光镜和电镜下观察到,LIEMF干预后,各实验组再生皮肤具备完整的表皮层和真皮层,细胞层次增多,表皮层明显增厚,附件丰富,表皮细胞间有桥粒、半桥粒、粗张力微丝。**结论** LIEMF可以促进移植了人表皮干细胞的裸鼠全层皮肤缺损创面愈合。

【关键词】 低强度电磁场; 表皮干细胞; 移植

The effects of low intensity electromagnetic fields on the reconstruction of full skin loss wounds grafted with human epidermal stem cells ZHANG Ming-sheng, WU Bo, BAI Wen-fang, PANG Wen-jun, ZHU Hong-xiang, XU Wei-cheng. Institute of Geriatric Medicine, Guangdong General Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China

【Abstract】 Objective To observe the effects of low intensity electromagnetic fields (LIEMFs) in promoting the reconstruction of full skin loss wounds grafted with human epidermal stem cells (ESCs). **Methods** Fifty nude mice aged 7 to 8 weeks with full skin loss wounds were equally divided into 3 experimental subgroups (1Hz, 10Hz and 50Hz) and two control groups (a cell suspension control group and a blank control group), with ten mice each. In the 3 experimental subgroups and the cell suspension control group, ESCs separated from human foreskin and cultured in vitro were grafted to the wounds using collagen sponge scaffolds. The experimental subgroups were then stimulated with an LIEMF (magnetic field intensity 5mT) at the appropriate frequency for 30min/day for 15 days. The blank control group was put under the same conditions without the cell suspension and LIEMF. The healing rates of the wounds were observed, and tissue slices were stained and observed under a light microscope. The inner structure of the regenerating skin was observed using transmission electron microscopy. **Results** The ESCs were successfully grafted. A few human integrin $\beta 1$ positive stained cells appeared in the regenerating skin. The average healing rates in the experimental subgroups were significantly superior to those of the control groups. Well differentiated epidermis and dermis could be seen in the regenerating skin in all of the experimental groups. The epidermis had more cell layers and was thicker than in the control groups. More desmosome, hemidesmosome and keratin filaments were seen among the epidemic cells of the experimental groups. **Conclusions** LIEMF promotes the healing of full skin loss wounds grafted with ESCs in nude mice, and can promote complete repair of skin defects and the regeneration of skin function.

【Key words】 Low intensity electromagnetic fields; Epidermal stem cells; Transplantation

目前,用组织工程的原理构建皮肤,已成为解决临床治疗中皮源缺乏问题的根本途径,大范围皮肤移植

的皮肤重建,尚存在细胞来源受限及皮肤附件形成的问题。组织工程中皮肤种子细胞的主要来源是患者自体细胞、异体细胞和异种细胞,但存在着体外培养周期较长和排斥反应等缺陷。表皮干细胞(epidermal stem cells, ESCs)具有免疫排斥少、无限增殖和多向分化潜能等特点,对表皮重建具有良好的应用前景^[14]。为了

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2011.04.003

基金项目:广东省自然科学基金(9151008901000199)

作者单位:510080 广州,广东省人民医院(广东省医学科学院)老年医学研究所

解 ESCs 移植能否参与创面的修复,并探讨低强度电磁场(low intensity electromagnetic field, LIEMF)在创面愈合过程中能否对 ESCs 的增殖、分化起调控作用,本实验选用体外分离培养、扩增的人 ESCs,利用胶原海绵支架将 ESCs 植入裸鼠全层皮肤缺损创面,观察 ESCs 对创面愈合的作用,以及 LIEMF 对 ESCs 增殖、分化的影响。

材料和方法

一、ESCs 的培养和鉴定

体外分离培养人包皮来源的 ESCs,方法参照文献[5],取第 3 代培养细胞,用 0.25% 胰蛋白酶加 0.02% 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA, 美国 Gibco 公司提供)消化,离心后收集细胞,调整细胞数为 1×10^7 个/ml 备用。

二、裸鼠标准创面模型

取 7~8 周龄裸鼠 50 只,用 5 mg 氯胺酮腹腔注射麻醉后,于动物背部尾侧正中作 $1.2 \text{ cm} \times 1.2 \text{ cm}$ 大小的创面,切除全层皮肤至肌筋膜。

三、胶原海绵的准备

将牛 I 型胶原海绵(广州创尔公司产)剪成面积约 2 cm^2 大小,片状平铺于培养皿中,经⁶⁰Co(华南农业大学辐照中心提供)消毒处理备用。

四、动物分组及处理

查随机数字表将模型动物随机分为 5 组,包括 3 个实验组(根据电磁场作用频率分为 1 Hz 组 10 Hz 组和 50 Hz 组)和 2 个对照组(细胞悬液对照组和空白对照组),每组 10 只。3 个实验组和细胞悬液对照组创面滴加 ESCs 悬液 1 ml,而空白对照组创面滴加等量的无细胞培养液;然后依次覆盖胶原海绵、无菌凡士林油纱和普通纱布,用透气胶带包扎;大约 4 h 后在各组胶原海绵上滴加无细胞培养液,保持创面湿润约 30 min,每日 1 次,连续滴 3 d。

将 3 个实验组大鼠分别置于不同频率的 LIEMF 线圈中,两线圈呈对偶式,间距 10 cm,设定磁感应强度为 5 mT,每次作用 30 min,每日 1 次,共 15 d。2 个对照组置于同等条件下不加 LIEMF 作用。

五、记录创面收缩情况

移植后第 5、10 和 15 天,将每只动物创面大小描印于无菌透明薄膜上,计算创面收缩率,观察创面愈合情况。创面收缩率(%) = 闭合创面面积/原创面面积 $\times 100\%$ 。在实验全过程中,裸鼠均在无菌、温度 $26 \sim 28^\circ\text{C}$ 的环境中隔离饲养。

六、HE 染色及免疫组织化学染色

移植后第 5、10 和 20 天,每组各取 2 只动物处死,取创面及四周正常的裸鼠皮肤组织进行活检,一部分

用 10% 福尔马林液固定,石蜡包埋,制成 $4 \mu\text{m}$ 厚的切片,行常规 HE 染色;另一部分用羊抗人 $\beta 1$ 整合素单克隆抗体进行免疫酶化学法染色。

七、电镜观察

移植后第 20 天,每组各取 4 只大鼠处死,从活检组织的中心取标本,用 4% 多聚甲醛固定、脱水、包埋、聚合、超薄切片、醋酸铀、硝酸铅双重染色,于透射电子显微镜下观察。

八、统计学处理

所得数据均以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,应用 SPSS 13.0 版统计软件分析,采用重复测量方差分析和单因素方差分析对数据进行统计学处理, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、各组创面收缩率比较

术后第 5、10 和 15 天,各组创面收缩率见表 1。经重复测量方差分析,各组创面愈合率差异有统计学意义($F = 711.46, P < 0.05$);3 个实验组组间对比,50 Hz 组创面愈合率在第 10 天和第 15 天,与 1 Hz 组和 10 Hz 组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 表皮干细胞移植术后各组创面收缩率的比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	移植后时间		
		第 5 天	第 10 天	第 15 天
细胞悬液对照组	10	18.58 ± 0.97	38.47 ± 2.92	66.37 ± 3.51
空白对照组	10	9.62 ± 1.20	26.19 ± 5.81	47.49 ± 4.68
1 Hz 组	10	29.92 ± 2.81^a	57.34 ± 2.72^a	83.79 ± 4.85^a
10 Hz 组	10	32.51 ± 3.74^a	65.84 ± 5.41^a	92.43 ± 3.55^a
50 Hz 组	10	36.29 ± 4.55^a	76.77 ± 4.01^{ab}	94.16 ± 4.58^{ab}

注:与 2 个对照组相应时间点比较,^a $P < 0.05$;与 1 Hz 组和 10 Hz 组相应时间点比较,^b $P < 0.05$

二、创面愈合大体观察

全部实验动物在术后均未发生感染,摄食、饮水、排便情况正常,均存活至实验完成。移植后第 5 天,创面上逐渐形成新的表皮,此时各组创面上的胶原海绵与创面贴合较紧,呈暗红色,部分边缘翘起,创面有深红色的结痂。第 10 天,各组创面上的胶原海绵与创面进一步融合,电磁场干预的实验组创面基本愈合,2 个对照组创面仍有深红色的结痂。第 15 天,电磁场干预的实验组创面已愈合,2 个对照组结痂部分脱落,创面上皮化,无水疱及表皮坏死现象。第 20 天,实验组愈合创面较对照组更光滑(图 1)。

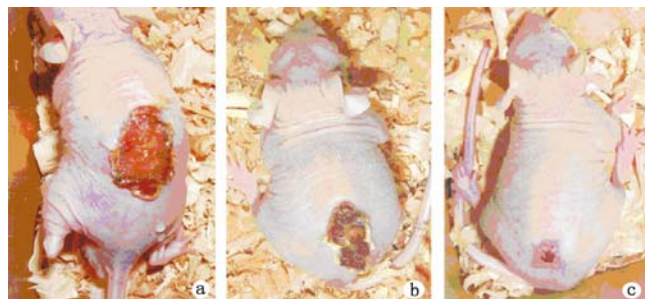
三、HE 染色结果

光镜下可见,各实验组移植后第 5 天,创面仍呈下凹形,表面填有角质样物质,表皮较薄,有 2~3 层表皮细胞,基底细胞层排列紊乱,真皮层有少量成纤维细胞、胶原纤维、毛细血管和炎症细胞;对照组形态与实

验组类似。

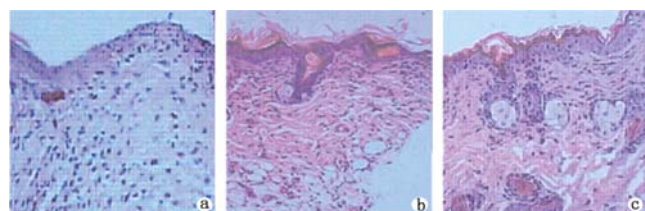
术后第 15 天,各实验组表皮层增厚,有 3~4 层细胞,基底细胞层细胞形态不规则,细胞由矮柱状逐渐变成扁平状;真皮层有较多成纤维细胞浸润,有较多的胶原纤维、毛细血管以及少量炎症细胞。对照组可见创面完全上皮化,新生上皮含 2~3 层。

术后第 20 天,各组表皮、真皮界限清楚,两者间由基底膜连接,表皮分化良好,表皮层结构完整,可明显分辨出基底层、棘细胞层、颗粒层及角质层,基底细胞层单层排列规则,棘细胞层有 3~4 层细胞,呈多边形,颗粒层有 3~5 层细胞;真皮层有大量排列整齐的成纤维细胞,有大量毛细血管生成。新生表皮与周边正常表皮相连,新生的结缔组织较致密,周边正常表皮薄,对应的真皮较疏松,可见较多的毛囊、皮脂腺等结构。对照组新生表皮已覆盖全部创面,但较实验组薄,仅见少量由基底细胞增生形成的细胞柱。见图 2。



注:a 为空白对照组移植后第 15 天;b 为细胞悬液对照组;c 为 50 Hz 组

图 1 各组移植后第 15 天大体观察



注:a 为空白对照组;b 为细胞悬液对照组;c 为 50 Hz 组

图 2 各组移植后第 20 天光镜下观(HE 染色, ×200)

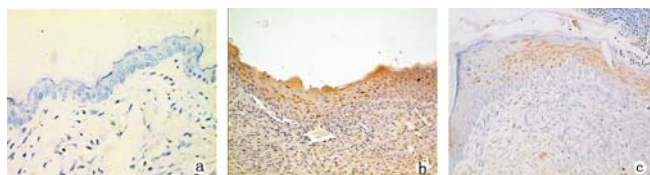
四、免疫组织化学染色结果

采用羊抗人 β_1 整合素抗体免疫酶化学法染色对组织标本进行免疫组织化学鉴定,结果显示,细胞悬液对照组再生皮肤中清晰可见抗人 β_1 整合素抗体阳性细胞,空白对照组抗人 β_1 整合素抗体免疫组织化学染色阴性,各实验组人 ESCs 在裸鼠再生皮肤中生长情况均明显优于对照组,见图 3。

五、电镜观察结果

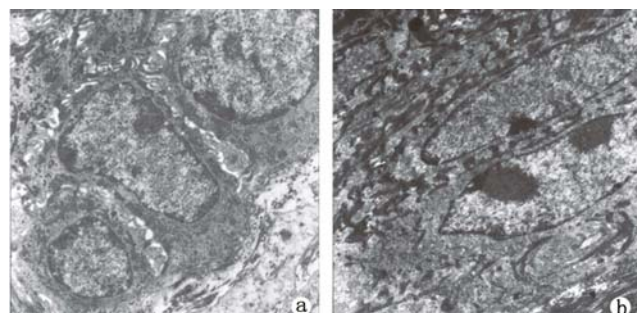
电镜下观察到:实验组移植后第 20 天,表皮细胞发育良好,细胞间分布有桥粒、张力细丝,表皮上层细胞中常见张力原纤维,表皮细胞中有正常的细胞器及许多自由核糖体,半桥粒非常清晰,有核仁细胞较多;

空白对照组新表皮细胞成熟较晚且较稀疏,细胞间桥粒较少,细胞间连接不致密,细胞器较少,真皮内胶原纤维排列疏松,成纤维细胞分布较多,见图 4。



注:a 为空白对照组;b 为细胞悬液对照组;c 为 50 Hz 组

图 3 各组移植后第 15 天再生皮肤(β_1 整合素免疫组化染色, ×200)



注:a 为 50 Hz 组;b 为细胞悬液对照组

图 4 移植后第 20 天再生皮肤透射电镜(×6600)

讨 论

创面修复是医学界所面临的重要问题之一。随着分子生物学的发展,创面修复的基础研究已深入至细胞、分子及基因水平。概括来说,创面的愈合主要是肉芽组织增生、创面再上皮化及瘢痕形成与创面愈合后改建的过程。应用组织工程学方法构建人工皮肤并应用于临床是目前研究的热点。组织工程中选用的种子细胞应该能快速、大量地扩增,且细胞功能旺盛,增殖分化能力强,可长期体外传代培养。表皮细胞增殖能力有限、培养周期长,不宜作为种子细胞。从理论上讲,表浅创面由于残存皮肤附属器(如汗腺、毛囊等)可保留一定数量的 ESCs,而皮肤全层创面则伴有 ESCs 的毁损^[6-7]。ESCs 是原始细胞,抗原性弱,具有自我复制的能力,而且有多向分化潜能,可能诱导分化出皮肤附属器,是表皮发生、分化和创面修复的根本^[8-9],是皮肤组织工程理想的种子细胞^[10-11]。但目前有关 ESCs 在创面愈合过程中的具体作用,或与创面愈合的关系尚不十分清楚。

本实验利用人 ESCs 作为种子细胞,以胶原海绵作为载体来修复裸鼠全层皮肤缺损创面,观察创面收缩率,结果显示经 LIEMF 干预的实验组优于对照组,差异有统计学意义。LIEMF 干预可实现 ESC 体外较快速扩增,电磁场对 ESCs 的作用具有“频率窗”效应,其中 50 Hz 组作用较明显,这些在我们以往的研究中有证实^[5]。本研究结果也提示,50 Hz 实验组较其他

频率下两个电磁场干预的实验组,创面愈合快,提示在特定的 LIEMF 可能通过促进 ESCs 增殖及向上皮转化来加快创面的愈合。

本实验还表明,ESCs 种植于创面上,具有在体外分化成表皮的能力,能有效覆盖裸鼠皮肤全层创面。移植后皮肤各层生长良好,组织结构清楚,没有发生过度增生和肿瘤,可作为皮肤缺损的移植物。将体外分离培养的 ESCs 移植到受皮区,容易建立血液循环并保持活力,达到覆盖创面、防止感染和体液流失的目的,是一项有前途的组织工程技术。但其远期效果、抗原性、皮肤附属器的诱导分化等问题还有待于进一步追踪观察和探讨。

胶原海绵在临床上通常用作局部止血物质,它是用从动物体内提取的胶原制成,有良好的组织相容性及低毒性,同时也是一种天然的细胞外基质,已被用作培养多种细胞的底物。一些实验表明,胶原海绵还可作为移植表皮细胞的载体^[12-13]。本研究中,实验组在移植含有 ESCs 的胶原海绵后外加电磁场干预,不仅表皮及基底膜形成较快,且表皮下成纤维细胞数量少,胶原纤维排列致密,幼稚原纤维较少,显示有真皮重建,但无过度瘢痕形成。

总之,本研究表明,以 ESCs 作为种子细胞、胶原海绵作为载体移植到裸鼠创面模型,在 LIEMF 的作用下,能加快 ESCs 自身增殖和分化成熟,形成含有真皮、表皮的双层结构,并出现基底膜、细胞间桥、张力纤维等结构,其组织学形态和超微结构已接近于正常皮肤,为临床应用体外培养 ESCs 构建组织工程皮肤以促进创面愈合提供了新思路。但如何应用 LIEMF 促进接受移植的创面最终形成具有完整的结构和功能的皮肤,还需进一步研究。

参 考 文 献

[1] Brouard M, Barrandon Y. Controlling skin morphogenesis: hope and

despair. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, 14: 520-525.

- [2] Janes SM, Lowell S, Hutter C. Epidermal stem cells. *J Pathol*, 2002, 197: 479-491.
- [3] Toma JG, McKenzie IA, Bagli D, et al. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells*, 2005, 23: 727-737.
- [4] Kim DS, Cho HJ, Choi HR, et al. Isolation of human epidermal stem cells by adherence and the reconstruction of skin equivalents. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61: 2774-2781.
- [5] 张鸣生, 何斌, 朱洪翔, 等. 不同频率低强度脉冲电磁场对表皮干细胞增殖的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2006, 28: 726-729.
- [6] Braun KM, Watt FM. Epidermal label-retaining cells: background and recent applications. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 2004, 9: 196-201.
- [7] Dunnwald M, Tomanek A, Alexandruas D, et al. Isolating a pure population of epidermal stem cells for use in tissue engineering. *Exp Dermatol*, 2001, 10: 45-54.
- [8] Morasso ML, Tomic-Canic M. Epidermal stem cells: the cradle of epidermal determination, differentiation and wound healing. *Biol Cell*, 2005, 97: 173-183.
- [9] Jones PH, Harper S, Watt FM. Stem cell patterning and fate in human epidermis. *Cell*, 1995, 80: 83-93.
- [10] Bickenbach JR, Chism E. Selection and extended growth of murine epidermal stem cells in culture. *Exp Cell Res*, 1998, 244: 184-195.
- [11] Olszewski WL. Stem cells of the human skin epithelium--can they be isolated and resume function as single-cells transplanted into recipient skin defects? *Ann Transplant*, 2004, 9: 34-36.
- [12] Horch RE, Debus M, Wagner G, et al. Cultured human keratinocytes on type I collagen membranes to reconstitute the epidermis. *Tissue Engineering*, 2000, 6: 53.
- [13] Voroteliak EA, Shikhverdieva ASH, Vasil'ev AV, et al. Simulation of migration processes of human epidermal keratinocytes over three-dimensional collagen gel. *Izv Akad Nauk Ser Biol*, 2002, 1: 30-37.

(修回日期: 2010-12-25)

(本文编辑: 吴 倩)