

· 基础研究 ·

巢蛋白在人真皮成纤维细胞中的表达

乔 薇 陈东明* 秦荣生 赵 霞

(北京大学第三医院成形外科 ,北京 100083)

【摘要】 目的 探讨巢蛋白(nestin)在人皮肤真皮组织成纤维细胞(adult human dermis fibroblasts ,HDF)中的表达。方法 采用体外培养、免疫组织/细胞化学技术检测巢蛋白在 6 例成人皮肤真皮组织及体外培养 3、5、7、10、12 代龄皮肤真皮成纤维细胞中的表达 ,计数分析人皮肤真皮组织成纤维细胞中巢蛋白⁺成纤维细胞数量 ,权重法分析体外培养成纤维细胞各代间巢蛋白的表达差异。结果 人皮肤真皮组织中 ,巢蛋白⁺成纤维细胞表达数量占成纤维细胞总数(9.5 ± 3.0)% ,其数量为(103.3 ± 67.4)个/ mm^2 。与人皮肤真皮组织巢蛋白⁺成纤维细胞的表达数量相比 ,体外培养的真皮成纤维细胞中巢蛋白⁺成纤维细胞数量明显升高 ,并出现代龄之间的差异($P < 0.05$) ,其中第 7、10 代细胞表达量高于第 5、12 代细胞 ,第 3 代细胞最少($P < 0.05$)。结论 在人皮肤真皮组织成纤维细胞中存在着巢蛋白⁺成纤维细胞。体外培养条件下 ,人皮肤真皮巢蛋白⁺成纤维细胞数量增加 ,提示体外培养作为刺激因子可能使成纤维细胞反分化为其前体细胞 ,作为干细胞标志物的巢蛋白有可能成为用于成纤维前体细胞鉴定的标志物之一。

【关键词】 巢蛋白 ; 真皮 ; 成纤维细胞 ; 前体细胞

中图分类号 R349.64 ,R39.2.11 ,R394.2

文献标识 :A

文章编号 1009-6604(2006)05-0389-03

Nestin expression in fibroblasts of adult human dermis Qiao Wei ,Chen Dongming ,Qin Rongsheng ,et al. Department of Plastic Surgery ,Peking University Third Hospital ,Beijing 100083 ,China

【Abstract】 **Objective** To investigate the expression of nestin in fibroblasts of adult human dermis. **Methods** A total of 6 samples of normal human skin were collected. Immunohistochemistry and immunocytochemistry staining were used to detect the nestin expression in adult human dermis and in cultured fibroblasts of different passages (3rd , 5th , 7th , 10th , and 12th passages , respectively) in vitro. Nestin positive cells were counted to evaluate the expression quantity and intensity. **Results** There were 103.3 ± 67.4 fibroblasts per square millimeter(mm^2) of adult human dermis , and the nestin positive fibroblasts accounted for(9.5 ± 3.0)% of total amount. The amount of nestin positive fibroblasts in vitro was obviously higher than that in vivo. Significant difference was observed in the amount of nestin expression among different passages($P < 0.05$). The highest expression quantity was observed in the 7th and 10th passages , moderate in the 5th and 12th , and the lowest in 3th($P < 0.05$). **Conclusions** There are nestin positive fibroblasts in normal adult human dermis. The amount of nestin positive fibroblasts in vitro is obviously higher than that in vivo. Since nestin expression is successfully induced in cultured fibroblasts , it is suggested that fibroblasts be promoted to dedifferentiate into their precursors by cell culture which acts as a stimulative factor. A biomarker of stem cells , nestin is expected to act as a biomarker in fibroblasts precursor for identification.

【Key Words】 Nestin ; Dermis ; Fibroblast ; Precursor

成纤维细胞是皮肤组织工程中主要的细胞成分 ,在重建和维持真皮组织结构中充当着不可替代的角色 ,体外培养成纤维细胞主要应用于人工真皮的构建和注射除皱等皮肤组织工程技术。巢蛋白(nestin)出现在具有分裂能力的早期原始细胞中 ,被广泛认为是干细胞的标志物之一^[1] ,并作为一种

具有多分化潜能细胞的标志物 ,一方面它体现了细胞的分化状态和分裂能力 ,另一方面巢蛋白在组织再生过程中也发挥着重要作用^[2]。最近报道在胎儿胰腺、胎儿肝脏等部位都有巢蛋白的表达^[3]。巢蛋白在人皮肤组织中主要定位于表皮、汗腺、皮脂腺、血管内皮细胞及少量成纤维细胞中^[3]。2001 年

Toma 等^[4]报道在皮肤中分离出巢蛋白阳性细胞。本文旨在利用细胞培养、免疫组织/细胞化学技术定量研究巢蛋白在人皮肤真皮组织成纤维细胞中的表达,为鉴定筛选皮肤组织工程用成纤维细胞提供线索。

1 材料与方法

1.1 实验材料及分组

1.1.1 实验材料 6 例标本取自我院美容门诊眼部整形手术的女性患者,基本情况见表 1。在无菌条件下,将皮肤组织分为 2 部分,一部分经 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片(4 μm),用于免疫组化;另一部分用于体外培养,采用组织块培养法进行原代培养^[5],待细胞长成单层,80% 左右融合后,0.25% 胰蛋白酶消化,传代。第 3、5、7、10、12 代以 1 × 10⁵ 个/ml 的细胞密度接种,进行细胞爬片 24 h 后收片,4% 多聚甲醛固定后,备用。

表 1 6 例女性标本基本情况

编号	年龄(岁)	部位
1	49	下眼睑
2	30	上眼睑
3	30	下眼睑
4	31	下眼睑
5	32	下眼睑
6	39	上眼睑

1.1.2 实验分组 人皮肤真皮组织成纤维细胞组;体外培养人皮肤真皮组织成纤维细胞组,其中又分为 3、5、7、10、12 代共 5 组。

1.2 免疫组织/细胞化学染色

兔抗人巢蛋白多克隆抗体购置于 CHEMICON 公司,石蜡切片 I 抗浓度为 1:800,细胞爬片 I 抗浓度为 1:400,SP-9000 试剂盒由北京中杉金桥生物技术有限公司购置,DAB(diaminobenzidine ,二氨基联苯胺)显色,细胞中出现棕黄色为阳性染色。

1.3 统计学处理

1.3.1 计数方法

1.3.1.1 人皮肤真皮组织中巢蛋白⁺成纤维细胞计数方法 光镜下(10 × 40),每例标本检测 100 个成纤维细胞,计算巢蛋白⁺成纤维细胞的百分比;应用武汉产目镜格式显微测微尺,每样本检测 10 个视野,按细胞数(个)/mm² = 细胞总数/n ÷ 0.005 的公式计算成纤维细胞和巢蛋白⁺成纤维细胞个数(n = 视野数 0.005 = 格式目镜测微尺的面积)。

1.3.1.2 体外培养人皮肤真皮组织成纤维细胞中

巢蛋白⁺成纤维细胞含量计数方法 ①依据着色深度分级,深棕黄色为Ⅲ级,浅棕黄色为Ⅱ级,黄色为Ⅰ级,无着色为阴性。在高倍镜下(10 × 40)每例标本检测 100 个细胞。②采用权重法^[6]将每例标本中的巢蛋白含量换算成数值。100 个细胞的巢蛋白⁺表达含量 = “Ⅲ”细胞个数 × 3 + “Ⅱ”细胞个数 × 2 + “Ⅰ”细胞个数 × 1。

2 结果

2.1 巢蛋白在人皮肤真皮组织成纤维细胞中的表达

巢蛋白在 6 例人皮肤真皮组织少部分成纤维细胞的胞浆中均有表达(图 1)。在人皮肤真皮组织中,巢蛋白⁺成纤维细胞占成纤维细胞总数(9.5 ± 3.0)%,成纤维细胞的数量为(1 056.7 ± 250.9)个/mm²,其中内源性巢蛋白⁺成纤维细胞的数量为(103.3 ± 67.4)个/mm²。

2.2 巢蛋白在体外培养不同代龄人皮肤真皮组织成纤维细胞中的表达

巢蛋白在 6 例体外培养人皮肤真皮成纤维细胞的胞浆中有表达,并主要集中于核周围(图 2)。

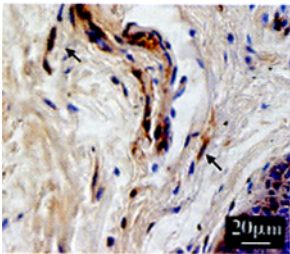


图 1 人皮肤真皮组织中巢蛋白⁺成纤维细胞
巢蛋白⁺成纤维细胞
免疫组织化学染色,苏木素复染 × 200

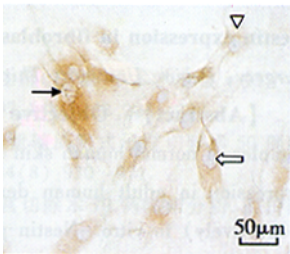


图 2 体外培养第 7 代巢蛋白⁺成纤维细胞
→细胞胞浆内着深棕黄色为Ⅲ级;↗细胞胞浆内着浅棕黄色为Ⅱ级;▽细胞胞浆内着黄色为Ⅰ级
免疫组织化学染色,苏木素复染 × 200

巢蛋白⁺成纤维细胞在体外培养各代龄之间表达数量存在显著性差异($F = 59.64$, $P = 0.000$)。第 5、7、10、12 代细胞表达巢蛋白的细胞数量较第 3 代细胞显著增加($q = 14.169, 18.466, 17.871, 16.978$, P 值均 < 0.05),其中第 7、10 代龄巢蛋白⁺成纤维细胞数量最多,第 5、12 代次之,第 3 代最少。巢蛋白⁺成纤维细胞在体外培养各代龄中表达含量也存在差别($F = 9.87$, $P = 0.000$)。第 5、7、10、12 代细胞中巢蛋白表达强度较第 3 代细胞显著增加($q = 5.734, 8.258, 6.753, 4.516$, P 值均 < 0.05),其中第

7 和 10 代龄巢蛋白⁺成纤维细胞表达含量最高,第 5 和 12 代次之,第 3 代最低。巢蛋白在成纤维细胞中含量变化与数量变化一致(表 2)。

表 2 体外培养不同代龄人皮肤真皮组织巢蛋白⁺成纤维细胞表达百分比及含量($\bar{x} \pm s$)

代龄	百分比(%)	含量
3(n=6)①	24.50 ± 8.41	34.83 ± 19.73
5(n=6)②	80.00 ± 15.91	127.67 ± 59.46
7(n=6)③	96.83 ± 2.56	168.33 ± 34.15
10(n=6)④	94.50 ± 4.93	144.00 ± 46.18
12(n=6)⑤	91.00 ± 9.01	107.83 ± 30.18
F P 值	F=59.64 P=0.000	F=9.87 P=0.000
q P 值	q ₂₋₁ = 14.169 P<0.05	q ₂₋₁ = 5.743 P<0.05
	q ₃₋₁ = 18.466 P<0.05	q ₃₋₁ = 8.258 P<0.05
	q ₄₋₁ = 17.871 P<0.05	q ₄₋₁ = 6.753 P<0.05
	q ₅₋₁ = 16.978 P<0.05	q ₅₋₁ = 4.516 P<0.05
	q ₃₋₂ = 4.297 P<0.05	
	q ₄₋₂ = 3.702 P<0.05	

3 讨论

组织工程人工真皮须在无菌条件下进行构建,人工真皮是以透明质酸、胶原、脱细胞真皮或者其它载体材料为基质,使体外扩增的成纤维细胞长入其中,而后用于临床。组织工程自体皮肤成纤维前体细胞注射除皱技术则是以自体皮肤真皮组织为材料,进行体外培养,扩增得到成纤维前体细胞后,回注于皮下,达到填充皮肤凹陷,舒缓消除皱纹的目的,该技术的应用在美容界取得效果^[7]。

有多位学者以巢蛋白作为标志物在皮肤组织中分离出皮肤来源的前体细胞(skin-derived precursors, SKPS)这些细胞在体外一定条件下可以诱导分化为神经元细胞或其他类型中胚层细胞^[8-10]。本研究室近期报道,在人皮肤真皮组织中存在少量的巢蛋白⁺成纤维细胞^[3],这些研究都为成纤维前体细胞的鉴定提供相关线索。

本研究结果表明,在体外培养真皮成纤维细胞中存在着巢蛋白⁺成纤维细胞,其数量比内源性巢蛋白⁺成纤维细胞数量增多,并出现不同代龄间的差异,其中第 7 和 10 代巢蛋白⁺成纤维细胞数量最多,其含量与数量变化一致。提示第 7 ~ 10 代的成纤维细胞分裂增殖和再生能力强,这可能是由于体外培养作为刺激因素使成纤维细胞脱分化“返祖”到其前体细胞^[11]。成纤维前体细胞较之终末成纤维细胞具有更强的分裂增殖和参与修复损伤的能

力,因此,这样的成纤维前体细胞用于组织工程,能够保持高度的细胞增殖分裂活性,最大限度地行使生物学功能,完成填充和修复的任务。

利用蛋白分子标记构建真皮组织工程种子细胞筛选平台,势必使种子细胞的质量更有保证,应用效果更为满意。巢蛋白在体外培养成纤维细胞中的高表达印证了该细胞的前体细胞活性和强大的增殖能力,巢蛋白可能作为一个重要的蛋白分子在维持成纤维细胞前体状态中发挥作用,可能成为筛选和鉴定成纤维前体细胞的标志性蛋白。检测巢蛋白的表达有望成为筛选优质皮肤组织工程种子细胞的重要手段,为真皮成纤维前体细胞在皮肤组织工程中的应用提供理论依据。

参考文献

- 1 李东培,汪华侨,姚志彬.巢蛋白的表达模式及其功能.解剖学研究,2004,26(3):216-218.
- 2 Wiese C, Rolletschek A, Kania G, et al. Nestin expression - a property of multi-lineage progenitor cells? Cell Mol Life Sci, 2004, 61: 2510-2522.
- 3 赵霞,马勇光,陈东明,等.巢蛋白(nestin)在瘢痕疙瘩和增生性瘢痕中的表达.中国微创外科杂志,2006,6(2):142-144.
- 4 Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, et al. Isolation of multipotent adult cells from the dermis of mammalian skin. Nat Cell Biol, 2001, 3: 778-784.
- 5 戴振声,陈宝安,徐燕丽,等.人皮肤成纤维细胞原代培养方法的改良.东南大学学报(医学版),2004,23(4):236-238.
- 6 鲍卫汉,徐少骏,关宝祥,等.瘢痕疙瘩不同部位 I、II 型前胶原 mRNA 的原位表达研究.中华整形烧伤外科杂志,1998,14(6):407-409.
- 7 常静.组织工程自体皮肤成纤维前体细胞注射除皱祛疤治疗技术通过专家论证.中华医学信息导报,2004,12:9.
- 8 Yang LY, Zheng JK, Liu XM, et al. Culture of skin-derived precursors and their differentiation into neurons. Chin J Traumatol, 2004, 7(2):91-95.
- 9 Joannides A, Gaughwin P, Schwiening C, et al. Efficient generation of neural precursors from adult human skin: astrocytes promote neurogenesis from skin-derived stem cells. Lancet, 2004, 364(9429):172-178.
- 10 Toma JG, McKenzie IA, Bagli D, et al. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. Stem Cells, 2005, 23(6):727-737.
- 11 姚瑞芹,徐铁军,张凤真.成年大鼠纹状体海人藻酸损伤后巢蛋白的表达.中国神经科学杂志,2004,20(6):432-436.

(收稿日期 2006-03-22)

(修回日期 2006-04-04)