

真皮多潜能细胞注射对皮肤弹性的影响*

薛斯亮, 李利, 黄珊珊, 周成霞

四川大学华西医院 皮肤科(成都 610041)

【摘要】 目的 探讨真皮来源多潜能细胞(dermal multipotent cells, DMCs)注射对皮肤弹性的影响。方法 从3 d龄 BALB/c 小鼠真皮中分离培养获得 DMCs,取第3代 DMCs 观察形态和成脂、成骨分化。将36只12月龄 BALB/c 小鼠分为 DMCs 组($n=12$)、成纤维细胞(FBs)组($n=12$)及对照组($n=12$),分别将 10^4 个 DMCs、 10^4 个 FBs 和 100 μ L DMEM 培养基注射入小鼠双下肢之间背部中央部位的皮下作单点注射。于2周及4周使用 MPA580 皮肤弹性测试仪检测小鼠皮肤弹性变化。结果 DMCs 接受诱导分化后,分别成脂、成骨。接受 DMCs 注射的小鼠皮肤弹性较对照组在2周后有较大增加($P=0.000$),但与 FBs 组差异无统计学意义($P=0.216$)。4周后皮肤弹性不仅较对照组增加($P=0.000$),且亦较 FBs 组增加($P=0.031$)。结论 DMCs 注射在小鼠皮下可以增加皮肤的弹性。

【关键词】 真皮 多潜能 分化

Effect of Dermal Multipotent Cells Transplantation on Skin Elasticity in Aged Murine XUE Si-liang, LI Li, HUANG Shan-shan, ZHOU Cheng-xia. Department of Dermatology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the elasticity changes in aged dermis after injection of dermal multipotent cells (DMCs). **Methods** Dermal multipotent cells were isolated and cultured from 3-day-old BALB/c mice and then transplanted into the dermis of aged (12-week-old) BALB/c mice. Adult fibroblasts (FBs) were employed as control. At 2 and 4 weeks after the transplantation, we examined dermal elasticity by MPA580 skin test machine. **Results** The skin elasticity were improve at 2 weeks after the transplantation in both DMCs group and FBs group ($P=0.000$) but have no statistical difference between these two groups ($P=0.216$). The different effect between these two groups appeared in 4 weeks after the transplantation ($P=0.031$). **Conclusion** Dermal multipotent cells appear more effective than fibroblasts in increasing skin elasticity.

【Key words】 Dermal Multipotency Differentiation

皮肤的真皮层中可以分离出数种具有多向分化潜能的细胞。这些真皮来源的细胞及其培养上清的多种成分皆对真皮胶原增生、真皮增厚有促进作用,在对抗皮肤胶原流失及抗老化中有积极的运用前景^[1]。与此同时多项研究发现其它组织来源的干细胞,如脂肪干细胞^[2]、骨髓间充质干细胞^[3]及其上清对促进真皮胶原增生和防止光老化造成的真皮胶原流失有重要作用。本小组在小鼠真皮中成功分离出了真皮来源多潜能细胞(dermal multipotent cells, DMCs),证明其有多向分化潜能的同时,发现注射 DMCs 也可以增加胶原的生成、增加真皮厚度^[4,5]。然而这些研究中,对皮肤老化的另一种重要特征——弹性改变却涉及甚少。本研究在前期研究基础上采用于 BALB/c 小鼠真皮层分别注射小鼠 DMCs 后测量注射区域皮肤弹性变化的方法,以揭

示 DMCs 移植对注射处皮肤弹性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

3 d 龄和 12 月龄 BALB/c 小鼠(四川大学实验动物中心)。I 型胶原酶、DF 培养基(由 DMEM 和 F12 培养基 1:1 混合而成, Gibco 公司);胎牛血清(FBS, Hyclone 公司); β -甘油磷酸钠(ICN Bomedical 公司);IBMX、油红 O 染料、胰岛素、吡喹美辛(Sigma 公司);茜素红染料(中国医药集团上海化学试剂公司);MPA580 皮肤弹性检测仪(CK 公司)。

1.2 DMCs 的分离与培养

取 3 d 龄 BALB/c 小鼠,将小鼠置于碘伏液中 5 min,待小鼠窒息死亡后使用生理盐水将小鼠洗净。将小鼠头部以下、尾部以上、两肋之内的背部皮肤剪取,使用 PBS 液冲洗并浸泡 2 min,使用 15 号

手术刀片剔除皮片残留脂肪及血渍。将得到皮肤剪为条形,使用0.25%胰酶液10 mL消化。置入恒温37℃5%CO₂培养箱中4 h,每15 min振摇1次。时间到后将皮条取出,用PBS液冲洗皮片。使用眼科镊将已经部分分离的表皮和真皮分开并弃去表皮。获得小鼠真皮,置于培养皿中剪碎,加入0.1% I型胶原酶,放入水浴摇床,并以37℃消化45 min。消化后加入含胎牛血清的DMEM培养基,使用培养基反复吹打组织块及细胞,将得到的细胞悬液离心,1 200 r/min,5 min。弃去离心管中上清,用DF培养液(含10%FBS)重新混悬得到细胞,并将得到的细胞混悬液移入细胞培养瓶中,放入细胞培养箱。培养24 h后,对培养细胞进行换液,保留贴壁细胞。之后根据细胞生长情况定期更换细胞培养液,一般每4 d 1次,当细胞的覆盖率达到瓶底80%时,进行细胞消化传代。用于注射的是第3代细胞。

1.3 DMCs的形态观察与成脂、成骨分化

1.3.1 成脂分化 取第3代BALB/c小鼠来源DMCs,将细胞消化后混悬为 1×10^4 /mL的细胞混悬液,将其接种在置于6孔细胞培养板的盖玻片上。加入成脂诱导液后细胞培养箱培养3周,根据细胞生长情况更换培养液,一般每4 d换液1次。以成脂诱导液同样诱导成年BALB/c小鼠FBs 3周。诱导3周后,取出盖玻片,使用PBS液轻柔漂洗,但不可振摇。清洗后使用10%甲醛(体积分数)加氯化钙固定盖玻片上细胞,油红O染料染色30 min,苏木素复染1 min,甘油明胶封片。

1.3.2 成骨分化 取第3代BALB/c小鼠来源DMCs,将细胞消化后混悬为 1×10^4 /mL的细胞混悬液,将其接种在置于6孔细胞培养板的盖玻片上。加入成骨诱导液后置于细胞培养箱培养4周,定期换液。以成骨诱导液同样诱导成年BALB/c小鼠FBs 4周。取出盖玻片,使用PBS液轻柔漂洗,但不可振摇。洗净后使用95%酒精固定细胞10 min。继而蒸馏水清洗3次后加入茜素红放入培养箱孵育1 h。之后再次使用蒸馏水洗涤3次后显微镜下观察。上色满意后明胶封片。实验步骤及试剂成分参见本小组前期论文^[2]。

1.4 小鼠皮内注射及无创皮肤弹性检测

1.4.1 分组干预 将36只体重为(24.48 ± 0.85) g的12月龄清洁级BALB/c小鼠分为DMCs组($n=12$)、成纤维细胞(FBs)组($n=12$)及对照组($n=12$)。DMCs组:将第3代DMCs(10^4 个)消化悬浮于100 μL DMEM培养基中,单点注射于12月

龄BALB/c小鼠双下肢之间背部中央部位,并标明注射部位。FBs组:取12月龄成年BALB/c小鼠皮肤常规原代培养获得。将培养得到的FBs(10^4 个)消化悬浮于100 μL DMEM培养基,注射于相同部位。对照组:于相同部位注射DMEM培养基100 μL。注射后小鼠在22℃、50%湿度房间内饲养,自由进食。每天观察小鼠,并避免注射部位标记模糊。

1.4.2 无创皮肤弹性检测 注射后2周及4周,将注射小鼠眼科剪及电动剃须刀去毛,助手固定小鼠,测试者固定小鼠背部皮肤,将工作正常的MPA580仪探头轻压被测皮肤表面,探头内部的弹簧可以使探头对被测皮肤的力保持恒定。计算机控制测试过程开始,数据曲线同时显示在计算机的屏幕上,通过计算可得到皮肤的弹性结果(Ue值)。

1.5 统计学方法

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。3组间小鼠弹性测量值比较采用ANOVA单因素方差分析,不同组别两两比较采用配对 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 倒置相差显微镜观察原代真皮来源细胞

细胞接种于培养瓶后30 min,镜下仅见极少数细胞以伪足附着。最早贴附瓶底并呈现梭形的细胞约出现在40 min。24 h换液后,剩余的贴壁细胞增殖形成细胞集落,接种后7 d左右,贴壁细胞可逐渐融合成片(图1)。

2.2 成脂和成骨诱导分化

第3代BALB/c小鼠来源DMCs在受成脂诱导后3周,约有20%贴壁细胞出现镜下表现为细胞内强

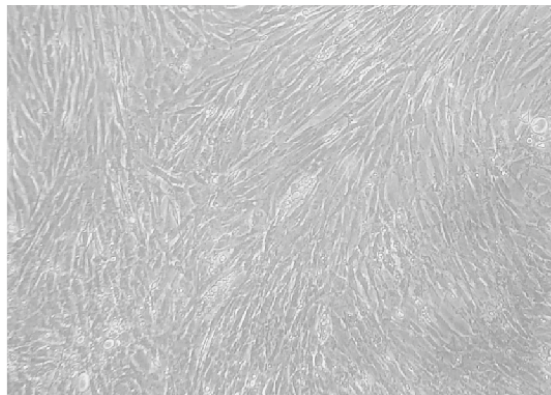


图1 真皮来源细胞形态。×50

Fig 1 Morphology of dermal multipotent cells (DMCs). DMCs had a spindle-shaped morphology under light micros. ×50

折光性脂滴。脂滴大小不一多沿细胞膜分布(图 2A)。油红 O 染色后脂滴可染色成为红色小泡(图 2B)。对照组 BALB/c 小鼠 FBs 受成脂诱导后未出现成脂现象。第 3 代 BALB/c 小鼠来源 DMCs 在成骨诱导 3 周,可见贴壁细胞逐渐呈灶性放射状聚集生

长,4 周后,聚集生长细胞镜下细胞形态不清,肉眼可见盖玻片上白色小点,形成钙化结节(图 2C)。茜素红染色,钙化区域为红色(图 2D)。对照组 BALB/c 小鼠来源 FBs 经成骨诱导未见成骨现象。

2.3 小鼠注射后皮肤弹性变化

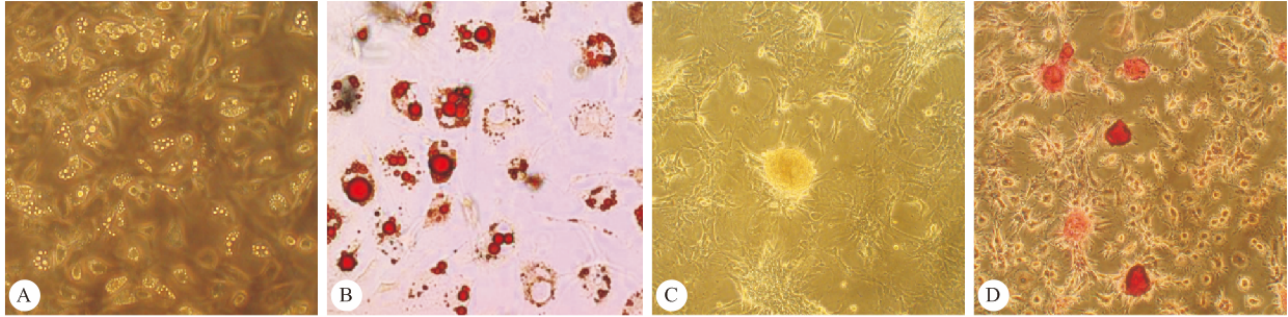


图 2 DMCs 成脂、成骨诱导

Fig 2 Adipogenic and osteogenic differentiation of DMCs

A: After adipogenic differentiation, highlight bubbles appeared in DMCs ($\times 100$); B: Adipogenic-induced cells stained positive (Oil red O staining, $\times 100$); C: Cluster growth in DMCs after osteogenic differentiation, forming a calcium node afterwards ($\times 100$); D: Calcium node confirmed by Alizarin red staining ($\times 100$)

注射后 2 周,FBs 组 Ue 值(0.150 ± 0.010)较对照组(0.057 ± 0.019)增加($P=0.000$),DMCs 组(0.160 ± 0.021)亦高于对照组($P=0.000$)。而 DMCs 组与 FBs 组之间差异无统计学意义($P=0.216$)。

注射后 4 周,对照组 Ue 值为 0.051 ± 0.010 ,FBs 组为 0.168 ± 0.03 ,DMCs 组为 0.210 ± 0.03 ,FBs 组与 DMCs 组均高于对照组($P=0.000$),且 DMCs 组高于 FBs 组($P=0.031$)。

3 讨论

在前期的研究中,我们不仅证明了 DMCs 可以多向潜能分化,而且证明了其少见的分化为肌细胞的能力^[4]。我们前期发现 DMCs 与 FBs 移植都增加了老年小鼠真皮的厚度,都显著增加了 I 型胶原基因和蛋白水平的表达,而 DMCs 作用明显强于 FBs^[5]。以上研究揭示了 DMCs 可能通过增加胶原生成、增加真皮厚度,拮抗皮肤老化的影响,帮助皮肤创伤愈合。无创皮肤弹性检测的原理基于负压吸力与皮肤的拉伸。其过程是通过探头的负压,将被测试的皮肤表面吸入探头的小孔,用一个非接触式的光学测试系统测定皮肤被吸入探头内的皮肤深度,经过换算得到一个具体数值(所以 Ue 值没有单位)。测试探头内的光学测试系统包括了发射器和接收器,被吸入探头皮肤越深,发射光与接收光的比

率就越大,这样就确定了被测量皮肤的弹性。目前使用的大部分皮肤弹性测量仪皆基于这个原理设计而成^[6]。弹性测量仪目前在全世界范围皮肤科应用广泛,是科研、皮肤测定、临床疗效评价及化妆品研发、效果评价的重要测定手段。皮肤弹性也是皮肤健康状态的重要评价标准,本研究使用皮肤弹性测试仪把皮肤弹性评价量化,使其有了客观标准^[6],发现 DMCs 对真皮弹性改善的客观数据。

在本研究中,注射 DMCs 4 周后,小鼠背部皮肤的弹性值有了显著提高并高于 FBs 组。这说明 DMCs 注射后对局部皮肤弹性的也有积极的影响。注射 2 周后,DMCs 组也提高了皮肤的弹性,但与 FBs 组尚未产生差异。两组注射细胞量一样,产生对真皮厚度、胶原和弹性的影响不尽相同,这让我们怀疑 DMCs 在注射后,对真皮的影响不仅是依靠细胞本身的转化与分裂。DMCs 的旁分泌动员其周围临近细胞(如 FBs),可能是真皮各种变化的重要因素。将这些结果结合起来看,DMCs 无疑对皮肤抗衰老有很高的研究和临床应用价值。

DMCs 的概念是指真皮来源,经实验证明分离所得细胞中含有可向多个方向分化的细胞的混合细胞群。其中可能包括以下研究提到的细胞:Chen 等^[7]将人包皮真皮层分离出的 FBs 进行单克隆分析,发现一般的 FBs 原代培养法获得的 FBs 有 6.4% 的单克隆细胞群显示出了与干细胞相同的三

向分化能力。Toma 等^[8,9]和 Biernaskie 等^[10]分别从人和鼠的真皮层分离培养出了具有多向分化能力的细胞,形态和生长方式类似于 FBs,被称为皮肤来源祖细胞。纤维细胞(fibrocyte)则被认为是从血液或骨髓中迁移到皮肤的 FBs 的祖细胞,它们也具有多向分化能力,可以从皮肤损伤处的血液中迁移而来,在真皮发挥修复皮肤损伤的作用^[11]。本文研究的 DMCs 本身为真皮内定植细胞,被真皮的主要构成细胞——成纤维细胞所包绕,其旁分泌作用直接作用于成纤维细胞。而皮肤是动物体最大器官,从皮肤获得细胞源更简便安全,来源更充足^[12]。这些优势使 DMCs 在皮肤的抗衰老研究和应用前景更为广阔。

本研究的局限性在于研究例数略少。而在结果中也只对皮肤的弹性进行了无创测量,后期研究将加入皮肤标本的弹性纤维染色、弹性纤维的 mRNA 及蛋白检测,更能说明 DMCs 不仅对真皮胶原合成及真皮厚度有作用,对皮肤弹性同样起重要作用。由于在本研究中我们怀疑 DMCs 对真皮的作用可能与其旁分泌有关,在下一步的研究中会将 DMCs 与 FBs 在体外混合培养,并检测其上清对 FBs 的作用。为了明确其作用机理,将着重阐明在 DMCs 发挥作用的细胞通路,以求全面、深入的探讨 DMCs 对真皮的改变及原理。

参 考 文 献

- 1 Shim JH, Park JY, Lee MG, *et al.* Human dermal stem/progenitor cell-derived conditioned medium ameliorates ultraviolet a-induced damage of normal human dermal fibroblasts. *PLoS One*, 2013; 8(7): e67604. doi: 10.1371/journal.pone.0067604.
- 2 Kim W, Park B, Sung J, *et al.* Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factor on human dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci*, 2007; 48(1): 15-24.
- 3 Smith AN, Willis E, Chan VT, *et al.* Mesenchymal stem cells induce dermal fibroblast responses to injury. *Exp Cell Res*, 2010; 316(1): 48-54.
- 4 薛斯亮, 张 珏. 真皮多潜能细胞体外分化为成肌细胞的初步研究. *医学研究杂志*, 2012; 9(41): 122-125.
- 5 Xue S, Li L. Upregulation of collagen type 1 in aged murine dermis after transplantation of dermal multipotent cells. *Clin Exp Dermatol*, 2011; 36(7): 775-781.
- 6 唐 莉, 李 利. 皮肤弹性无创性评价及在皮肤科的应用. *中国美容医学*, 2007; 5(16): 710-712.
- 7 Chen F, Zhang W, Bi D, *et al.* Clonal analysis of nestin(-) vimentin(+) multipotent fibroblasts isolated from human dermis. *J Cell Sci*, 2007; 120(Pt 16): 2875-2883.
- 8 Toma J, Akhavan M, Fernandes K, *et al.* Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol*, 2001; 3(9): 778-784.
- 9 Toma J, McKenzie I. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells*, 2005; 23(6): 727-723.
- 10 Biernaskie J, McKenzie I, Toma J, *et al.* Isolation of skin-derived precursors (SKPs) and differentiation and enrichment of their Schwann cell progeny. *Nat Protoc*, 2006; 1(6): 2803-2812.
- 11 Yang L, Scott PG, Giuffre J, *et al.* Peripheral blood fibrocytes from burn patients: identification and quantification of fibrocytes in adherent cells cultured from peripheral blood mononuclear cells. *Lab Invest*, 2002; 82(9): 1183-1192.
- 12 黄珊珊, 王 青, 李 利. 皮肤干细胞的定位. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008; 12(34): 6723-6726.

(2014-12-10 收稿, 2015-05-06 修回)

编辑 吕 熙