

· 论 著 ·

垂直应力作用对复方壳多糖组织工程皮肤培养系统中层黏蛋白表达的影响*

鲁元刚, 伍津津, 雷霞, 杨涛, 朱堂友, 杨桂红

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所皮肤科, 重庆 400042)

摘要:目的 通过对培养系统中层黏蛋白(LN)合成表达的影响,观察垂直应力对组织工程皮肤生长及基底膜构建的作用。方法 常规制备复方壳多糖组织工程皮肤,并根据应力作用与否则分成两组培养。应力作用组每天接受垂直应力作用 15 min,其他与对照组相同。在浸没培养 3 d 后,继续进行气-液界面三维培养。培养 10、15 d 后,行 HE 和免疫组化染色,观察组织工程皮肤的基底膜构建情况。采用 Western Blot 方法测定陈旧培养基中游离 LN 的含量。结果 实验组在垂直应力作用下,复方壳多糖组织工程皮肤表皮分层分化较对照组的组织工程皮肤好,免疫组化染色结果显示实验组 LN 染色良好,且陈旧培养基中游离型 LN-5 的含量也高于对照组。结论 垂直应力作用有助于组织工程皮肤系统中 LN 的表达,并最终促进体外基底膜结构的构建。

关键词:组织工程皮肤;基底膜;器官型培养;垂直应力;层黏蛋白

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.20.003

中图分类号:R318.19;Q51

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)20-2704-03

Effects of vertical stress on laminin expression in the culture of composite chitosan tissue-engineering skin*

LU Yuan-gang, WU Jin-jin, LEI Xia, et al.

(Department of Dermatology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To evaluate the effect of vertical stress on the development of tissue engineering skin and construction of basement membrane(BM) by influencing the laminin synthesis in vitro. **Methods** According to the stress exerting or not, composite chitosan tissue engineering skin were divided into two groups. The test group received vertical stress for 15 minutes every day. They were both carried out submerged culture for 3 days followed by air-liquid interface culture. After 10 or 15 days culture, the histological manifestation of BM in tissue engineering skin was observed by hematoxylin & eosin staining, while laminin(LN), the important component in BM, was detected immunohistochemically at the dermal-epidermal junction. Soluble LN-5 in conditioned culture medium was analyzed by Western Blot to investigate the role of vertical stress on BM formation in tissue engineering skin. **Results** In model of stress on tissue engineering skin, vertical stress applied for 15 minutes every day was helpful to restruct BM in vitro. The epithelium in test group differentiated more well than another group. It was found that LN, the major BM component, was positive immunohistochemically at the dermal-epidermal junction in the tissue-engineering skin. Soluble LN-5 in conditioned medium was higher in test group than the control group. **Conclusion** It is revealed that the vertical stress applied on tissue engineering skin is helpful for synthesis of laminin and promote the reconstruction of BM in vitro.

Key words: tissue engineered skin; basement membrane; organotypic culture; vertical stress; laminin

组织工程学是一个涉及多学科的新的前沿领域,它是利用生物学和工程学原理研究、开发用于修复、维持和改善损伤组织功能的组织替代物的一门学科。体外组织培养的力学环境模拟是目前组织工程培养条件优化的一个重要研究领域。应力(应变)作用可明显促进细胞增殖,引起细胞骨架重排及细胞形态的变化,促进骨与软骨组织的生长与结构重建^[1-3]。另有研究发现,体外培养时,给予一定的应力如剪切力,可调节内皮细胞合成细胞间黏附分子,影响细胞的黏附与外形^[4]。本研究拟通过对器官型培养的组织工程皮肤施加一定的垂直应力,观察组织工程皮肤细胞表达层黏蛋白(laminin, LN)的情况及基底膜重建情况,现将结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂 角质形成细胞培养基(keratinocyte growth medium, KGM):DMEM(Gibco 公司,美国)10 g, HEPES(Sigma 公司,美国)2.4 g,小牛血清(兰州民海生物工程有限公司)100 mL, EGF(Sigma 公司,美国)10 μg,胰岛素(Novo Nordisk

A/S)120 u,配成 1 000 mL。壳多糖、硫酸软骨素、透明质酸、弹性蛋白(Sigma 公司,美国),LN 单抗(MAB-0113,福州迈新生物公司),免疫组化检测试剂盒 SP-9002(北京中杉金桥生物技术有限公司),DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)等。

1.2 主要仪器 垂直振荡器 HY-1(江苏金坛市正基仪器有限公司)、二氧化碳孵箱(SHELD LAB 公司)、超净工作台(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司)等。

1.3 实验方法及分组 按文献[5]的方法制备复方壳多糖组织工程皮肤,培养基为 KGM,在 12 孔培养板中建立培养系统。在 37℃、5%CO₂、90%以上湿度孵箱内浸没培养 3 d 后,继续进行气-液界面三维培养。根据培养板施加应力的不同,将培养皮肤分为实验组和对照组,每组 2 块培养板。对照组按常规培养,实验组给予垂直应力作用,方法如下:(1)在制备组织工程皮肤凝胶 15 min 以后进行垂直振荡,振荡参数设置:频率 75 次/分,振幅 2 cm,每次 15 min,每天 1 次;(2)将培养板置于振

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30700793);重庆市自然科学基金资助项目(CSTC 2007BB5283)。

荡器操作台两翼,在超净工作台中进行振荡;(3)培养板在振荡完毕后,归放至培养孵箱内继续培养。

1.4 陈旧培养基中游离型 LN-5 的含量测定 采用 Western Blot 方法检测陈旧培养基中的游离型 LN-5;检测样本为实验组和对照组 3、5、6、7 d 的陈旧培养基,并依次编加样序号。

1.5 组织学检测 培养后 10、15 d,将两组复方壳多糖组织工程皮肤用中性甲醛溶液固定 24 h 以上,常规脱水、浸蜡、石蜡包埋和切片,行 HE、PAS 染色及 LN 单抗免疫组化染色。

2 结 果

2.1 组织学检查

2.1.1 HE 染色 本实验获得的复方壳多糖组织工程皮肤,HE 染色显示有明显的表真皮双层结构,组织工程皮肤生长良好,在培养 10 d 后,即可见明显的基底层、棘层及颗粒层(图 1~2);经过垂直应力的规律作用,表皮各层分化良好,基底层细胞排列规则,呈现表皮向下生长的趋势,真、表皮层间致密,且表皮与真皮间的连接紧密程度明显好于未接受应力作用的对照组,而对照组在培养中没有接受应力作用,在组织学表现方面存在明显的腔隙,从而影响了表、真皮间的连接。

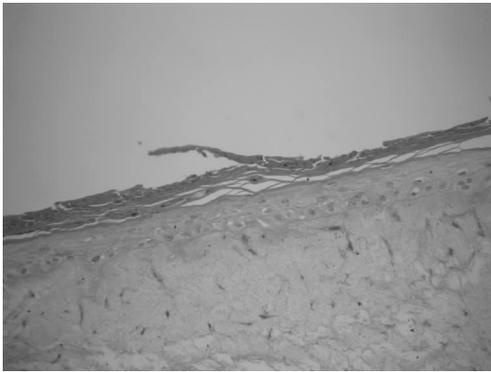


图 1 实验组培养的组织工程皮肤(10 d,HE×200)

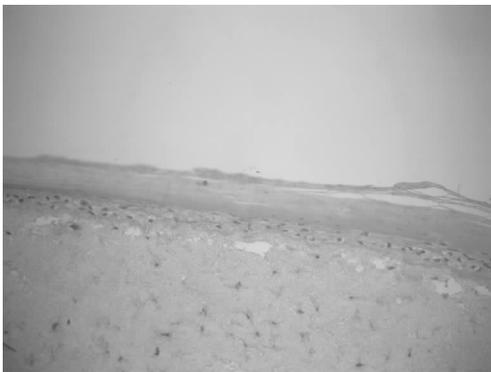


图 2 对照组培养的组织工程皮肤(15 d,HE×200)

2.1.2 免疫组化检查 在培养 10 d 以后的组织工程皮肤中,进行 LN 的免疫组化染色,在真、表皮间显示明显的阳性反应带(图 3~4),且在其他非特异部位染色较少。而对照组虽然培养时间长于实验组,LN 免疫组化染色也呈现阳性带状结构,但非特异部位染色相对较多,说明对照组没有应力作用的组织工程皮肤在成熟分化方面晚于实验组。

2.2 游离型 LN-5 的含量情况 与未施加垂直应力的组织工程皮肤相比,给予垂直应力作用的组织工程皮肤陈旧培养基中游离型 LN-5 明显增多,经 Western Blot 检测,实验组明显高于对照组(图 5~6),经 MS Excel 处理,在培养前 7 d 内,实验组陈旧培养基中游离型 LN-5 明显高于对照组(图 7)。尤其在

培养 5 d 后,陈旧培养基中游离型 LN-5 的相对含量,实验组为 0.318,而对照组仅为 0.045。

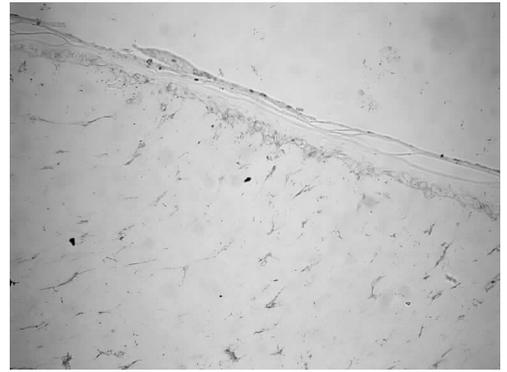


图 3 实验组培养的组织工程皮肤(10 d,LN×200)

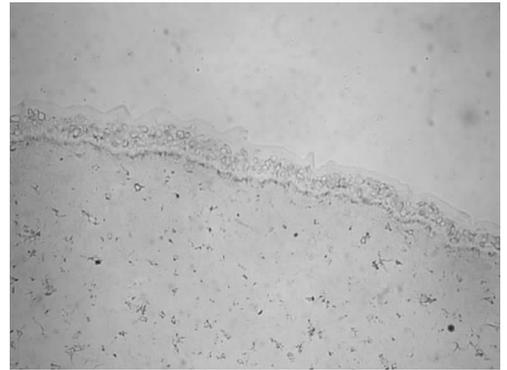
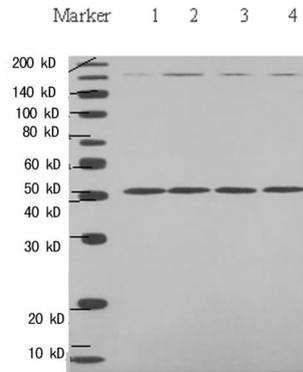
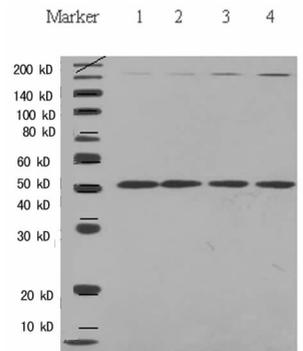


图 4 对照组培养的组织工程皮肤(15 d,LN×200)



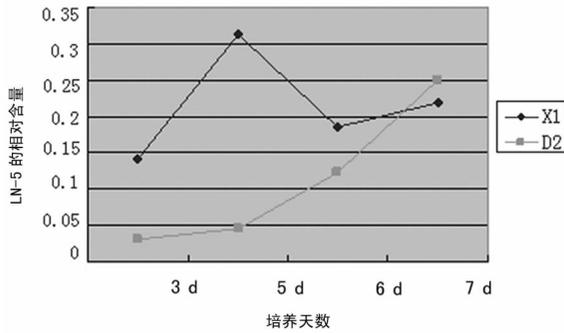
1:3 d;2:5 d;3:6 d;4:7 d。

图 5 实验组陈旧培养基中游离型 LN-5 含量



1:3 d;2:5 d;3:6 d;4:7 d。

图 6 对照组陈旧培养基中游离型 LN-5 含量



X1: 实验组; D2: 对照组。

图 7 两组陈旧培养基中游离 LN-5 的含量变化比较

3 讨 论

生物力学是解释生命及其活动的力学,是力学与医学、生物学等学科相互渗透和融合形成的一门新兴交叉学科,是生物医学工程的重要基础性学科。其中体外培养在体外力学环境模拟是许多生物医学工程研究的基础,应力与细胞发育、增殖和分化的关系是许多组织工程研究的重要内容,并在骨、软骨及血管的研究中得到证实^[6-7]。

天然机体细胞是在机体提供的复杂环境中生长的,其中应力或应变的作用极大地影响细胞的结构、形态和功能。鉴于目前皮肤组织工程研究中该因素的研究尚未见报道,没有能够参考的力学培养系统。本研究采用垂直振荡仪,对器官型培养的组织工程皮肤进行垂直应力的复合作用,包括重力、惯性力等因素,希望能够对组织工程皮肤中的种子细胞产生影响,改变其生物学行为,从而有助于改进组织工程皮肤的产品结构。

应力作用涉及因素很多,如频率、幅度、方向、持续时间等。由于本研究在力学环境模拟方面尚处于探索阶段,因此,在应力场模型建设上,选择了最容易调控的垂直振荡器。为了使力学环境模拟接近于生理状态,本研究将振荡频率设置为 75 次/分,振幅为 2 cm,垂直给予培养的组织工程皮肤进行规律的应力作用。由于垂直应力场建立在超净工作台上,因此,为了给组织工程皮肤培养提供一个较为稳定的空间,本研究将持续作用时间设置为每次 15 min,以减少温度和 CO₂ 浓度变化对系统的影响。

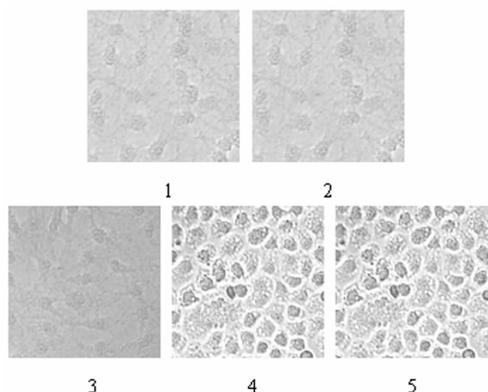
应力作用于三维培养的组织工程皮肤,支架材料具备一定的刚性对种子细胞附着十分重要,因为支架材料适当的变形能够加强对种子细胞的应力作用。本研究采用的壳多糖-胶原-GAGs 支架材料,在组织工程皮肤的塑形上有很好的优势,并且具有极佳的生物相容性^[8],能够为种植在其中的种子细胞提供近似体内的生长条件,合成各种生长因子^[9],是观察垂直应力作用对组织工程皮肤培养系统影响的较为理想的实验模型。

LN 家族是一个大分子糖蛋白家族,在基底膜中含量十分丰富,其中, LN-5(又称 Laminin-332)是表皮基底膜 LN 的主要成分,定位于锚丝基底部的致密层上部和透明层交界处^[10-11]。在表、真皮间基底膜结构的构建中, LN 作为一种重要细胞外基质,可加强 IV 型胶原形成的一级网络结构,使表、真皮间的连接更具机械稳定性^[12-14]。作者在早期的研究中发现,通过三维培养的组织工程皮肤,在一定培养条件下可以构建皮肤基底膜样结构^[15],加入外源性 LN,可促进体外培养的组织工程皮肤基底膜的构建,并呈浓度依赖性^[16]。因此,观察培养系统中的可溶性 LN 含量变化,可以间接反映沉积在表、真皮结构连接处的 LN 水平,对于基底膜的构建情况有重要参考意义。

本研究通过垂直应力的作用,获得的组织工程皮肤有良好的表皮分化,基底层细胞排列规则,有少量的表皮突起伸向真皮区,基底膜带连续性良好。通过对陈旧培养基中游离型 LN-5 的测定,同样证实了在应力作用下, KC 分泌 LN 在量上的区别,即实验组的 KC 分泌的 LN-5 明显高于对照组。由于游离型 LN-5 的浓度影响着基底膜中 LN 的含量,相应地也影响着体外基底膜的构建,因此,在免疫组化结果中,实验组的基底膜中 LN 的染色结果优于对照组,从而为更紧密连接表、真皮结构提供了坚实的组织学基础。

参考文献:

- [1] Sharp LA, Lee YW, Goldstein AS. Effect of low-frequency pulsatile flow on expression of osteoblastic genes by bone marrow stromal cells[J]. *Ann Biomed Eng*, 2009, 37(3):445.
- [2] Freed LE, Hollander AP, Martin I, et al. Chondrogenesis in a cell polymer bioreactor system[J]. *Exp Cell Res*, 1998, 240(1):58.
- [3] Wang H, Li M, Lin PH, et al. Fluid shear stress regulates the expression of TGF-beta1 and its signaling molecules in mouse embryo mesenchymal progenitor cells[J]. *J Surg Res*, 2008, 150(2):266.
- [4] Sucusky P, Balachandran K, Elhammali A, et al. Altered shear stress stimulates upregulation of endothelial VCAM-1 and ICAM-1 in a BMP-4 and TGF-beta1-dependent pathway[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(2):254.
- [5] 鲁元刚, 伍津津, 朱堂友, 等. 复合壳多糖人工皮肤组织学特征研究[J]. *中国临床康复*, 2002, 6(4):518.
- [6] Sodian R, Lemke T, Fritsche C, et al. Tissue-engineering bioreactors: a new combined cell seeding and perfusion system for vascular tissue engineering[J]. *Tissue Eng*, 2002, 8(5):863.
- [7] Askari M, Gabbay JS, Tahernia A, et al. Favorable morphologic change of preosteoblasts in a three-dimensional matrix with in vitro microdistraction[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2006, 117(2):449.
- [8] 朱堂友, 伍津津, 胡浪, 等. 壳多糖-胶原-糖聚糖凝胶人工皮肤的制备[J]. *重庆医学*, 2002, 31(1):49.
- [9] 王亚洲, 伍津津, 朱堂友, 等. 复合壳多糖组织工程皮肤分泌 b-FGF 的初步研究[J]. *重庆医学*, 2007, 36(6):719.
- [10] Sugawara K, Tsuruta D, Ishii M, et al. Laminin-332 and -511 in skin[J]. *Exp Dermatol*, 2008, 17(6):473.
- [11] Schéele S, Nyström A, Durbeek M, et al. Laminin isoforms in development and disease[J]. *J Mol Med*, 2007, 85(8):825.
- [12] Ghohestani RF, Li K, Rousselle P, et al. Molecular organization of the cutaneous basement membrane zone[J]. *Clin Dermatol*, 2001, 19(5):551.
- [13] McMillan JR, Akiyama M, Nakamura H, et al. Colocalization of multiple laminin isoforms predominantly beneath hemidesmosomes in the upper lamina densa of the epidermal basement membrane[J]. *J Histochem Cytochem*, 2006, 54(1):109.



1: pTZU6+1 质粒转染组; 2: pC1'-siRNA 质粒转染组; 3: pC2'-siRNA 质粒转染组; 4: pC1-siRNA 质粒转染组; 5: pC2-siRNA 质粒转染组。

图 4 TUNEL 检测 SGC-7901 细胞凋亡

3 讨论

研究发现, COX-2 不仅是启动炎症反应的关键酶, 还可以通过促进肿瘤细胞增殖、抑制凋亡、促进肿瘤新生血管形成等机制促进肿瘤的发生、发展。胃癌是常见的消化道恶性肿瘤, 其具有高发率、高恶性度、预后不良的特点, 临床手术切除后常需进行辅助性化疗, 其目的在于抑制肿瘤细胞生长、诱导肿瘤细胞凋亡。研究表明, 在胃癌组织和细胞中, COX-2 常呈高表达状态, 与肿瘤的发生、发展及预后密切相关。RNAi 是一种 PTGS 的基因阻断技术, 近年来被广泛应用于哺乳动物细胞抑制基因表达^[11-12]。本课题通过构建重组质粒, 将 siRNA 导入胃癌 SGC-7901 细胞内诱发 RNAi, 进而观察 COX-2 表达变化、SGC-7901 细胞凋亡及与凋亡相关的信号分子改变。

作者构建了 2 对 COX-2 编码序列的反向重复序列以及 2 对对应的点突变反向重复序列, 即 pC1-siRNA、pC2-siRNA、pC1'-siRNA 和 pC2'-siRNA, 并用其转染胃癌 SGC-7901 细胞株。结果发现 pC1-siRNA 和 pC2-siRNA 均能显著下调 SGC-7901 细胞中 COX-2 表达, 而 pC1'-siRNA 和 pC2'-siRNA 处理的 SGC-7901 中 COX-2 表达无明显改变。说明 RNAi 对同源 mRNA 的作用是很特异的, 即使发生碱基的点突变也可能影响 RNAi 的效力。这与 Phipps 等^[13] 和 Elbashir 等^[14] 的报道相一致。本实验中, 作者还发现转染 pC1-siRNA 和 pC2-siRNA 的 SGC-7901 出现明显的细胞凋亡, 且与对照组相比, Caspase-9 和 Caspase-3 表达明显上调, 说明 COX-2 基因特异性的 siRNA 可能通过激活 Caspases 通路而诱发 SGC-7901 细胞凋亡。

参考文献:

[1] 黄昌杰, 湛永滋, 黄剑锋, 等. CerB-2 基因、COX-2 基因在鼻咽癌中的表达及相关性研究[J]. 广西医学, 2009, 31(3): 305.

[2] Okano H, Shinohara H, Miyamoto A, et al. Concomitant overexpression cyclooxygenase-2 in HER-positive onomad-reduced human gastric carcinoma is associated with a poor patient outcome[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(4): 6938.

[3] Chen XL, Su BS, Sun RQ, et al. Relationship between expression and distribution of cyclooxygenase-2 and bcl-2 in human gastric adenocarcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(8): 1228.

[4] 倪观太, 张正荣. 环氧化酶-2 与卵巢癌关系的研究进展[J]. 安徽医学, 2004, 25(4): 344.

[5] 曾柯, 吴小侯, 杜虎. Survivin 靶向 siRNA 对膀胱癌细胞增殖和凋亡作用的体外研究[J]. 重庆医学, 2007, 36(14): 1360.

[6] Song E, Lee SK, Wang J, et al. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis[J]. Nat Med, 2003, 9(3): 347.

[7] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference[J]. Cancer Cell, 2002, 2(3): 245.

[8] Olson A, Sheth N, Lee JS, et al. RNAi Codex: a portal/database for short-hairpin RNA (shRNA) gene-silencing constructs[J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34: 153.

[9] 钟文昭, 苏健, 陈志红, 等. RNA 干扰技术抑制人肺腺癌 A549 细胞株 EGFR 基因表达[J]. 广东医学, 2008, 29(6): 924.

[10] Sui G, Soohoo C, Affar EB, et al. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(8): 5515.

[11] Tuschl T. Expanding small RNA interference[J]. Nature Biotechnology, 2002, 20(5): 446.

[12] Agami R. RNAi and related mechanisms and their potential use for therapy[J]. Curr Opin Chem Biol, 2002, 6(6): 829.

[13] Phipps KM, Martinez A, Lu J, et al. Small interfering RNA molecules as potential anti-human rhinovirus agents: in vitro potency, specificity, and mechanism[J]. Antiviral Res, 2004, 61(1): 49.

[14] Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs[J]. Genes Dev, 2001, 15(2): 188.

(收稿日期: 2010-02-23 修回日期: 2010-03-05)

(上接第 2706 页)

[14] Liu H, Yin Y, Yao K. Construction of chitosan-gelatin-hyaluronic acid artificial skin in vitro[J]. J Biomater Appl, 2007, 21(4): 413.

[15] 鲁元刚, 伍津津, 张教扬, 等. 体外构建皮肤基底膜的组织学特征[J]. 中华烧伤杂志, 2007, 23(5): 369.

[16] 鲁元刚, 伍津津, 张教扬, 等. 层粘蛋白促进复方壳多糖组织工程皮肤基底膜构建的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(23): 2299.

(收稿日期: 2010-02-07 修回日期: 2010-03-05)