

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.05.018

矾冰纳米乳对表皮干细胞骨桥蛋白表达的影响

熊家青¹, 刘丽芳^{2*}, 范洪桥², 周亮², 王月², 谭慧红²

(1. 湖南中医药大学研究生院, 湖南省长沙市岳麓区含浦镇学士路 300 号, 410007; 2. 湖南中医药大学第一附属医院)

摘要 目的 探讨矾冰纳米乳治疗烧伤的可能作用机制。方法 将表皮干细胞分为中药低、中、高剂量组和正常组、对照组, 中药低、中、高剂量组分别加入 8.15、16.3、32.6 mg/L 的矾冰纳米乳 1 ml, 对照组加入湿润烧伤膏 1 ml, 正常组单纯加入 DefinedK-SFM 培养基 1 ml。用 RT-PCR、免疫印迹法分别在第 24 h 及 3、5、7 天检测表皮干细胞骨桥蛋白及其 mRNA 表达。结果 RT-PCR 检测结果显示, 与对照组比较, 中药中、高剂量组各时间点骨桥蛋白 mRNA 表达均明显降低 ($P < 0.05$), 且明显低于同时的低剂量组 ($P < 0.05$)。Western blot 检测结果显示, 与对照组比较, 第 3、5、7 天中药中、高剂量组骨桥蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$); 与中药低剂量组比较, 第 3、5、7 天中药中、高剂量组骨桥蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$)。结论 矾冰纳米乳治疗烧伤可能与调控表皮干细胞骨桥蛋白基因的表达有关, 并且以 8.15 mg/L 浓度最优。

关键词 矾冰纳米乳; 烧伤; 表皮干细胞; 湿润烧伤膏; 骨桥蛋白

烧伤是物理、化学、放射等诸多因素作用于机体所造成的一种极其复杂的外伤性疾病^[1]。矾冰液是湖南中医药大学第一附属医院的院内制剂, 具有清热解毒、凉血活血、收敛止痛之效^[2]。我们在矾冰液的基础上, 应用纳米技术, 制成的矾冰纳米乳应用于临床, 治疗烧伤疗效确切^[3-4]。前期实验结果显示, 矾冰纳米乳能够调控烧伤表皮干细胞的增殖分化^[5]。为探讨矾冰纳米乳治疗烧伤的可能作用机制, 本研究观察其对表皮干细胞中骨桥蛋白的表达的影响, 报告如下。

1 材料

1.1 皮片取材

皮片取材于 2014 年 3 月至 2015 年 1 月湖南中医药大学第一附属医院烧伤整形科住院的烧伤患者, 年龄 (14 ± 4) 岁。一般 1 次取 1 或 2 名患者烧伤后第一次植皮手术剩余的皮片混合用于实验。

1.2 药品及试剂

矾冰纳米乳 (湖南中医药大学第一附属医院院内制剂, 批号: 20140130), 由明矾、冰片等量组成, 制备成浓度分别为 8.15、16.3、32.6 mg/L。

湿润烧伤膏 (汕头美宝制药有限公司, 国药准字 Z200000004), 1 g 加入乳化剂 (德国 Wekling 公司, 批号 OE61206A) 0.5 ml 中, 搅拌均匀后, 加入 1 ml 的 PBS 稀释, 高压蒸汽消毒灭菌, 4℃ 保存备用。矾冰纳米乳和湿润烧伤膏与角质细胞无血清培养基 (DefinedK-SFM) 均按照 1 : 1000 混合均匀后使用。

DefindK-SFM (美国 Gibco 公司, 批号 10744019), IV 型胶原 (美国 Gibco 公司, 批号 17104019), 胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司, 批号 25300054), 中性蛋白酶 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 520A025), DMEM (美国 Gibco 公司, 批号 12492015), 胎牛血清 (美国 Gibco 公司, 批号 10082139), 兔抗人 $\beta 1$ 整合素单克隆抗体 (英国 Abcam 公司, 批号 ab179471), 鼠抗人 CK19 单克隆抗体 (英国 Abcam 公司, 批号 ab52625), 山羊抗兔 (北京康为世纪生物科技有限公司, 批号 CW0102), 山羊抗鼠二抗 (北京康为世纪生物科技有限公司, 批号 CW0102), 反转录试剂盒 (美国 GeneCopoeia 公司, 批号 AORT-0050), BCA 法蛋白测定试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, 批号 P0010), ECL 化学发光检测试剂盒 (美国 Advansta 公司, 批号 K-12045 - D50)。

基金项目: 国家自然科学基金 (81473680); 湖南中医药管理局重点项目 (201401)

* 通讯作者: liulff@126.com, 13974820806

1.3 主要仪器

水套式 CO₂ 培养箱 (TC2300, 美国 Sheldon Manufacturing 公司), 电泳仪 (DYY-2C, 北京六一仪器厂), 紫外分光光度计 (DU-640, 美国 Beckman 公司), 超净工作台 (SW-CJ-4BU, 美国 NU-AIRE 公司), 荧光倒置式生物显微镜 (TS100, 日本尼康公司), 电热鼓风干燥箱 (10K-1, 上海实验仪器总厂), 荧光定量 PCR 仪 (JS-4065P, 上海培清科技有限公司)。

2 方法

2.1 表皮干细胞的制备

2.1.1 表皮干细胞的分离^[6-7] 用含有 1% 双抗 (青霉素、链霉素) 的 PBS 冲洗皮片 8~10 次, 无菌条件下剔除皮下组织, 将皮片剪成 1.0 cm × 0.5 cm, 置于 0.25 g/L 中性蛋白酶中, 4℃ 条件下消化 12~15 h, 吸弃上清液, 分离表皮和真皮。把分离好的表皮置于培养皿中, 用 PBS 冲洗 1 次, 加入 0.25% 胰蛋白酶, 在 37℃ 的恒温箱中消化 5~10 min, 并充分搅拌均匀, 后加入含有 10% 胎牛血清的 DMEM 终止消化, 1000 r/min 离心 10 min 后吸去上层液体, 用 70 μm 的滤膜过滤两次, 然后加入 DefinedK-SFM 吹打成单细胞悬液, 接种于预先铺有 IV 型胶原的培养瓶中, 置于 37℃、5% 的 CO₂ 恒温培养箱中孵育 20 min 使细胞贴壁, 吸去未贴壁的角朊细胞后, 加入 DefinedK-SFM 继续培养, 即为表皮干细胞。

2.1.2 表皮干细胞的鉴定 1) 取表皮干细胞和角朊细胞第 2 代快速贴壁细胞按 200 个/孔的密度接种至 IV 型胶原包被的培养板中, 行平板克隆形成实验^[8]。培养 2 周后, 计录克隆数和克隆维持时间, 并计算克隆形成率 (克隆形成率 = 细胞克隆数/接种细胞数 × 100%)^[8]。2) 取表皮干细胞和角朊细胞第 2 代快速贴壁细胞爬片各 10 张 (每张爬片上细胞数为 200 个), 40 g/L 多聚甲醛室温下固定 10 min, 所有爬片均采用 Envision 两步法进行免疫组织化学染色。滴加体积分数为 0.03 的 H₂O₂, 37℃ 孵育 10 min, 以消除内源性过氧化物酶活性。用非免疫性动物血清封闭后滴加抗人 β1 整合素单克隆抗体 (1:60)、鼠抗人 CK19 单克隆抗体 (1:30); 4℃ 过夜, 滴加辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔, 山羊抗鼠二抗, 37℃ 孵育 20 min (以上各步间均用 PBS 充分振洗), DAB 显色, 苏木精复染, 常规脱水、透明、封固。荧光显微镜观

察角蛋白 19 和整合素 β1 的表达, DAB 显色按无着色、淡黄色、棕黄色和棕褐色分别计 0~3 分; 阳性细胞数评分, 无阳性细胞计 0 分, 阳性细胞 < 25% 计 1 分, 25%~50% 计 2 分, > 50% 计 3 分。上述两者相加, 得 0~2 分为阴性表达, 3~6 分为阳性表达^[8]。整合素 β1 与角蛋白 19 同时染色后呈阳性, 且具有干细胞的非成熟特征, 如慢周期性、强增殖潜能、强克隆形成力等, 故所培养细胞为表皮干细胞^[10]。

2.2 表皮干细胞分组及药物干预

取对数生长期的表皮干细胞按照 5 × 10⁵/孔接种于预先铺有 IV 型胶原的 4 块 6 孔板中, 每块 6 孔板中的一个孔加入 PBS 填充, 24 h 待细胞贴壁后, 分为中药低、中、高剂量组和正常组、对照组, 中药低、中、高剂量组分别加入 8.15、16.30、32.60 mg/L 的矾冰纳米乳 1 ml, 对照组加入湿润烧伤膏 1 ml, 正常组加入 DefinedK-SFM 培养基 1 ml。置于 37℃、5% 的 CO₂ 恒温培养箱中进行培养, 共培养 7 天。

2.3 RT-PCR 法检测细胞骨桥蛋白 mRNA 的表达

各组细胞分别于培养第 24 h 及第 3、5、7 天按照反转录试剂盒说明提取细胞总 RNA。用紫外分光光度计测定所提取 RNA 的浓度, 并以琼脂糖电泳观察 RNA 的纯度。以骨桥蛋白及内参 β-actin 为引物, PCR 扩增出相应的目的片段, 并以内参 β-actin 的相对含量为标准。相对定量常用的方法为 2^{-ΔΔCT} 法, ΔΔCT = (CT 靶基因 - CT 内参)_{中药组或对照组} - (CT 靶基因 - CT 内参)_{正常组}。

2.4 Western blot 法检测细胞骨桥蛋白的表达

各组细胞分别于培养第 24 h 及第 3、5、7 天加入 RIPA 强裂解液 (含 PMSF)。充分裂解后转入 1.5 ml 的 EP 管, 4℃ 下 1000 r/min 离心 20 min。取上清液, -80℃ 保存, 随后使用 BCA 试剂盒法测量蛋白浓度。12% SDS-PAGE 电泳, 湿转至硝酸纤维素膜上 (50V, 2 h); 室温下 5% 脱脂奶粉 (TBST 配制) 封闭 1 h; 一抗 4℃ 过夜; 二抗室温下孵育 2 h; 加入 ECL 发光剂后暗室压片显影。利用 Bio-Rad 公司 Quantity One 4.62 软件分析骨桥蛋白的相对表达量。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较符合正态分布用方差分析, 两两比较用 LSD 检验。

3 结果

3.1 表皮干细胞体外培养的形态学结果

原代分离的人表皮干细胞呈贴壁生长, 露珠状, 孵育培养 24 h 后, 贴壁细胞逐渐形成铺路石样改变。原代表皮干细胞生长周期缓慢, 在 DefinedK-SFM 培养基中需 10 ~ 14 天才能铺满 80% 左右的培养瓶底。

3.2 表皮干细胞体外培养鉴定结果

表皮干细胞克隆数为 (21.8 ± 1.9) 个, 克隆形成率为 11.13%; 角朊细胞克隆数为 (10.2 ± 1.7) 个, 克隆形成率为 5.07%, 表皮干细胞克隆数及克隆形成率均明显高于角朊细胞 ($P < 0.05$)。表 1 示, 表皮干细胞中整合素 $\beta 1$ 和角蛋白 19 阳性细胞数评分均明显高于角朊细胞 ($P < 0.05$)。

表 1 表皮干细胞与角朊细胞阳性细胞数评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

细胞	细胞数 (个)	整合素 $\beta 1$	角蛋白 19
表皮干细胞	200	$5.0 \pm 1.263^*$	$4.5 \pm 0.547^*$
角朊细胞	200	1.0 ± 0.894	1.5 ± 1.049

注: 与角朊细胞比较, * $P < 0.05$

3.3 各组细胞不同时间骨桥蛋白表达比较

表 2 示, 与正常组比较, 中药中、高剂量组和对照组在第 24 h 及第 3、5、7 天时骨桥蛋白表达均明显升高, 中药低剂量组在第 3、5、7 天时亦明显升高 ($P < 0.05$)。与对照组比较, 中药中、高剂量组在第 3、5、7 天时骨桥蛋白表达明显降低, 中药低剂量组在第 24 h 及第 5 天亦明显降低 ($P < 0.05$)。与中药低剂量组比较, 中药中、高剂量组在第 24 h 时骨桥蛋白表达升高, 但在第 3、7 天时

表达则降低 ($P < 0.05$)。

3.4 各组细胞不同时间骨桥蛋白 mRNA 表达比较

表 3 示, 与对照组比较, 中药中、高剂量组各时间点骨桥蛋白 mRNA 表达均明显降低 ($P < 0.05$); 与中药低剂量组比较, 中药中、高剂量组各时间点骨桥蛋白 mRNA 表达亦明显降低 ($P < 0.05$)。中药中、高剂量组各时间点骨桥蛋白 mRNA 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

4 讨论

硃冰纳米乳是以传统中药制剂硃冰液为模型药物, 以纳米乳为载体制备的水包油型复合纳米乳, 油相载冰片, 水相载白矾, 充分提高了冰片的溶解度和分散度, 并发挥与白矾的协同作用, 增加了药物的透皮吸收, 提高了皮肤的贮药浓度, 延长了药物作用时间, 达到提高载药量、提高疗效等目的^[1]。

骨桥蛋白是一种磷酸化酸性糖蛋白, 广泛存在于多种组织中, 包括肾、胆囊、肺部、乳房、肠胃以及尿道。骨桥蛋白含有特异的与细胞贴附有关的 RGD 序列, 通过与其受体整合素、CD44 等结合来促进细胞的趋化、黏附和迁移^[2]。Miyazaki K 等^[3]发现骨桥蛋白与角膜成纤维细胞的黏附和迁移有关, 在创口的愈合过程中骨桥蛋白为正向调节, 说明骨桥蛋白调节了创面愈合相关的成纤维细胞的行为。研究表明, 骨桥蛋白参与了皮肤创伤愈合, 尤其在创伤修复的炎症期及细胞外基质沉积期^[4]。

本实验结果显示, 克隆形成率及免疫荧光染色整合素 $\beta 1$ 和角蛋白 19 阳性细胞评分, 表皮干细胞均明显高于角朊细胞, 说明通过酶解法和 IV 型胶原贴附法所得细胞即为表皮干细胞。RT-PCR 法在第

表 2 各组细胞不同时间骨桥蛋白表达比较 (/actin 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	孔数	第 24 h	第 3 天	第 5 天	第 7 天
正常组	5	0.14 ± 0.015	0.13 ± 0.010	0.26 ± 0.010	0.37 ± 0.010
对照组	5	$0.36 \pm 0.010^*$	$0.60 \pm 0.036^*$	$0.99 \pm 0.017^*$	$0.83 \pm 0.010^*$
中药低剂量组	5	$0.22 \pm 0.020^{\Delta}$	$0.50 \pm 0.030^*$	$0.59 \pm 0.010^{*\Delta}$	$0.86 \pm 0.026^*$
中药中剂量组	5	$0.34 \pm 0.010^{*\Delta}$	$0.33 \pm 0.030^{*\Delta\Delta}$	$0.58 \pm 0.026^{*\Delta}$	$0.47 \pm 0.030^{*\Delta\Delta}$
中药高剂量组	5	$0.35 \pm 0.010^{*\Delta}$	$0.33 \pm 0.021^{*\Delta\Delta}$	$0.49 \pm 0.010^{*\Delta\Delta}$	$0.46 \pm 0.010^{*\Delta\Delta}$

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与对照组比较, $\Delta P < 0.05$; 与中药低剂量组比较, $\Delta\Delta P < 0.05$

表 3 各组细胞不同时间骨桥蛋白 mRNA 表达比较 ($2^{-\Delta\Delta CT}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	孔数	第 24 h	第 3 天	第 5 天	第 7 天
对照组	5	2.642 ± 0.426	5.917 ± 1.338	9.302 ± 1.400	2.857 ± 0.113
中药低剂量组	5	2.342 ± 0.217	4.940 ± 0.308	7.690 ± 1.503	2.544 ± 0.618
中药中剂量组	5	$2.115 \pm 0.522^{*\Delta}$	$3.227 \pm 0.200^{*\Delta}$	$4.789 \pm 0.957^{*\Delta}$	$1.660 \pm 0.312^{*\Delta}$
中药高剂量组	5	$2.097 \pm 1.083^{*\Delta}$	$3.195 \pm 0.558^{*\Delta}$	$4.691 \pm 1.086^{*\Delta}$	$1.650 \pm 0.173^{*\Delta}$

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与中药低剂量组比较, $\Delta P < 0.05$

24 h 及第 3、5、7 天比较, 中药中、高剂量组骨桥蛋白 mRNA 表达明显低于中药低剂量组和对照组, 而中药低剂量与对照组比较没有统计学意义。Western blot 法测得在第 3、5、7 天对照组骨桥蛋白表达优于中药中、高剂量组, 与中药低剂量组比较没有统计学意义, 以上结果说明, 湿润烧伤膏与 8.15 mg/L 的矾冰纳米乳在调控骨桥蛋白基因表达的方面疗效基本相当。相比湿润烧伤膏, 矾冰纳米乳是纯中药制剂, 是在矾冰液这种水溶液的基础上乳化而成, 为水剂, 因而更能被患者接受。

参考文献

- [1] 赵亮, 李敏. 创面生物敷料及人工皮肤的研究进展 [J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 2011, 27(1): 120-124.
- [2] 周亮, 刘丽芳. 矾冰纳米乳外用治疗带状疱疹 45 例 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2010, 8(8): 55.
- [3] 刘丽芳, 张琳玲, 周亮, 等. 矾冰纳米乳对大鼠烫伤模型的疗效及创面 EGF 表达的影响 [J]. 中成药, 2011, 30(4): 574-577.
- [4] 刘丽芳, 张阳德, 魏云, 等. 矾冰纳米乳对大鼠深 II 度烫伤创面治疗作用的研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2010, 20(16): 2425-2429.
- [5] 熊家青, 刘丽芳, 范洪桥, 等. 矾冰纳米乳对烧伤表皮干细胞增殖分化的影响 [J]. 云南中医学院学报, 2015, 38(4): 45-49.
- [6] LI A, SIMMONS PJ, KAUR P. Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(7): 3902-3907.
- [7] BICKENBACH JR, CHISM E. Selection and extended growth of murine epidermal stem cells in culture [J]. Exp Cell Res, 1998, 244(1): 184-195.
- [8] KAUR P, LI A. Adhesive properties of human basal epidermal cells: an analysis of keratinocyte stem cells, transit amplifying cells, and postmitotic differentiating cells [J]. J Invest Dermatol, 2000, 114(3): 413-420.
- [9] 钱悦, 梁少嫻, 陈思远, 等. 黑素瘤抑制性活性因子在黑素瘤不同阶段及基底细胞癌中的表达 [J]. 临床皮肤科杂志, 2007, 36(10): 611-613.
- [10] AKIYAMA M, SMITH LT, SHIMIZU H. Changing patterns of localization of putative stem cells in developing human hair follicles [J]. J Invest Dermatol, 2000, 114(2): 321-327.
- [11] 刘丽芳, 张阳德, 魏云, 等. 矾冰纳米乳对大鼠深 II 度烫伤创面治疗作用的研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2010, 20(16): 2425-2429.
- [12] WEBER GF, ASHKAR S, GUMCHER MJ, et al. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1) [J]. Science, 1996, 271(5248): 509-512.
- [13] MIYAZAKI K, OKADA Y, YAMANAKA O, et al. Corneal wound healing in an osteopontin-deficient mouse [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49(4): 1367-1375.
- [14] 武金峰, 王佐林. 骨桥蛋白在新生大鼠背部皮肤创伤愈合过程中的表达 [J]. 口腔颌面外科杂志, 2010, 20(4): 232-235.

Impact of Alum-Borneol Nanoemulsion on the Expression of Epidermal Stem Cells Osteopontin

XIONG Jiaqing¹, LIU Lifang², FAN Hongqiao², ZHOU Liang², WANG Yue², TAN Huihong²

(1. Graduate School of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, 410007; 2. First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of alum-borneol nanoemulsion for burn. **Methods** Epidermal stem cells were divided into low, middle and high dose herb groups, the normal group, as well as the control A and control B groups. Low, middle and high dose herb groups were given 1 ml of 8.15, 16.3, or 32.6 mg/L of alum-borneol nanoemulsion, respectively. The control A group was given 1 ml of moisture exposed burn ointment (湿润烧伤膏). The control B group was given 1 ml of DefinedK-SFM medium alone. The expression of epidermal stem cells osteopontin was detected with the method of Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and immunoblotting at the time points of the 24th hour, 3rd day, 5th day and 7th day. **Results** Results from RT-PCR detecting showed that, compared with the control groups, the expression of osteopontin in middle and high dose herb groups decreased significantly at all time points ($P < 0.05$), and it was lower than that in low dose herb group ($P < 0.05$). Results of Western blot detecting showed that, compared with the control groups, the expression of osteopontin in middle and high dose herb groups decreased significantly on the 3rd, 5th and 7th day ($P < 0.05$). Compared with the low dose herb group, the expression of osteopontin in middle and high dose herb groups decreased significantly on the 3rd, 5th and 7th day ($P < 0.05$). **Conclusion** Alum-borneol nanoemulsion could regulate the expression of epidermal stem cells osteopontin gene. The most effective concentration is 8.15 mg/L. It might relate to increasing the expression of osteopontin.

Keywords alum-borneol nanoemulsion; burn; epidermal stem cell; moisture exposed burn ointment; osteopontin
(收稿日期: 2015-06-01; 修回日期: 2015-08-05)

编辑: 王利芬