

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.09.009
文章编号: 1005-8982 (2019) 09-0044-05

皮损间充质干细胞中相关细胞因子异常分泌 对银屑病的临床意义

徐春兰, 林新瑜

(西南医科大学附属医院 皮肤科, 四川 泸州 646000)

摘要:目的 探讨表皮生长因子(EGF)、转化生长因子 β (TGF- β) 及干细胞因子(SCF)在银屑病发生、发展中的作用。**方法** 体外分离培养银屑病患者(观察组)与健康皮肤患者(对照组)皮损间充质干细胞,采用流式细胞仪检测鉴定皮损间充质干细胞,显微镜下观察成脂及成骨诱导分化后的皮损间充质干细胞,采用 ELISA 检测皮损间充质干细胞中 EGF、TGF- β_1 及 SCF 的水平。**结果** 观察组与对照组的皮损间充质干细胞显微镜下形态相似;观察组表面抗原 CD73、CD44、CD90、CD105、以及 CD29 表达阳性,而 HLA-DR、CD34 以及 CD45 表达阴性;成脂及成骨诱导分化能力相似;观察组皮损间充质干细胞中 EGF、TGF- β_1 及 SCF 的水平与对照组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),观察组皮损处皮损间充质干细胞中 EGF 及 SCF 水平表达升高,而 TGF- β_1 水平降低。**结论** 银屑病患者皮损间充质干细胞 EGF、TGF- β_1 及 SCF 分泌异常。

关键词: 银屑病; 间充质干细胞; 表皮生长因子; 转化生长因子 β ; 干细胞因子

中图分类号: R758.63

文献标识码: A

Clinical significance of abnormal secretion of cytokines in lesional mesenchymal stem cells of psoriatic patients

Chun-lan Xu, Xin-yu Lin

(Department of Dermatology, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To investigate the levels of epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor β_1 (TGF- β_1) and stem cells factor (SCF) in mesenchyma stem cell in lesion of psoriasis patients and potential clinical significance. **Methods** Cultivation and isolation of mesenchyma stem cells were collected from the skin of psoriatic patients and healthy volunteers. The identification of mesenchyma stem cells was performed with flow cytometry. Morphological characteristics of mesenchyma stem cell were observed by the microscope after adipogenic and osteoblast differentiation. The levels of EGF, TGF- β_1 and SCF in mesenchyma stem cells were tested by ELISA. **Results** Similar morphology of mesenchyma stem cell from psoriatic group and healthy control group were observed. Mesenchyma stem cells from psoriatic group possessed positive expression of CD73, CD44, CD90, CD105 and CD29 while no expressions of HLA-DR, CD34 and CD45 were detected. Adipogenic and osteoblast differentiation capabilities were similar. Mesenchyma stem cells from psoriatic group indicated increased levels of EGF and SCF and decreased levels of TGF- β_1 , compared with those from healthy controls. **Conclusions** The abnormal secretion of EGF, TGF- β_1 and SCF in mesenchyma stem cells may be involved in onset and progression of psoriasis.

Keywords: psoriasis; mesenchymal stem cells; EGF; TGF- β_1 ; SCF

收稿日期: 2018-10-30

[通信作者] 林新瑜, E-mail: linxinyu8989@163.com

银屑病是一种以红斑鳞屑为主要临床表现的慢性炎症性皮肤病,其病程较长,有易复发倾向^[1],其发病机制被广泛认为与表皮过度增厚^[2]及免疫反应^[3]有关。间充质干细胞可从骨髓、骨膜、脐带、皮肤等处获取^[4],皮肤间充质干细胞与皮肤组织的正常生理过程有着密切联系,可能通过分泌多种细胞因子对皮肤微环境产生影响从而调控皮肤的生长代谢。因此,研究皮肤间充质干细胞对研究银屑病的发生、发展过程有一定意义。目前对银屑病患者皮肤间充质干细胞的细胞因子分泌相关研究尚少,本研究通过体外分离培养银屑病患者及正常皮肤中的皮肤间充质干细胞,并对其培养上清液中表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)以及干细胞因子(stem cell factor, SCF)的水平进行测定,以期对银屑病的研究提供参考。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2015年2月—2017年2月于西南医科大学附属医院皮肤科收治的银屑病患者59例作为观察组。另选取本院同期收治于整形外科及泌尿外科行手术切除皮肤的59例患者作为对照组。所有研究对象均对本研究知情同意并签署知情同意书。本研究经过西南医科大学附属医院伦理委员会批准。纳入标准:①观察组研究对象均经临床及病理确诊为寻常型银屑病;②对照组研究对象均无银屑病家族史。排除标准:①就诊前3个月内局部或全身使用过维A酸类药物、皮质类固醇激素及免疫抑制剂的患者;②存在血液系统疾病或其他免疫系统疾病的患者。分别收集两组研究对象的年龄、性别等一般情况指标。

1.2 主要仪器与试剂

倒置相差显微镜(日本Olympus公司),细胞培养孵箱(美国Thermo Scientific公司),Multiskan Mk3酶标仪(美国Thermo公司),水浴箱(上海中新仪器设备有限公司),SWCJ-1FD型净化工作台(苏州净化设备厂),EPICS-XL型流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司),胎牛血清(FBS)、DMEM/F12K培养基(美国Gibco公司),胰蛋白酶(美国Sigma公司),油红O、茜素红S、荧光素标记抗体(美国Hyclon公司),人EGF、TGF- β_1 及SCF的ELISA试剂盒(美国R & D公司)。

1.3 研究方法

1.3.1 皮肤间充质干细胞的分离与培养 无菌条件

下将标本制成1.0 cm \times 1.0 cm大小的组织块,先用75%的乙醇反复消毒处理2次,再用磷酸盐缓冲液(PBS)对消毒处理后的组织块充分清洗3次,以除去角质层以及皮下组织。加入Dispase II酶37 $^{\circ}$ C消化2~4 h,分离真皮、表皮,收集真皮部分。滴管反复吹打组织后用筛网过滤,将滤过液置于冰上静置30 min,离心后弃上清,收集细胞沉淀,加入培养基轻柔重悬细胞。培养基采用DMEM/F12K,其中加入体积分数为5%的胎牛血清、浓度为10 μ g/L的碱性成纤维生长因子及10 ml/L的B27添加剂;细胞培养孵箱设置为37 $^{\circ}$ C、5%二氧化碳CO₂、饱和湿度。倒置相差显微镜下观察细胞生长情况并记录细胞镜下形态。

1.3.2 皮肤间充质干细胞的免疫表型鉴定

收集第3代的皮肤间充质干细胞,以不含b-FGF的培养基继续培养48 h,离心后收集上清液,过滤后用无菌EP管收集,置于-20 $^{\circ}$ C冰箱冷冻保存。两组分别取 2×10^5 个细胞加入荧光素标记单克隆抗体,室温避光孵育30 min, PBS洗涤后以流式细胞仪检测鉴定皮肤间充质干细胞。

1.3.3 皮肤间充质干细胞的多向诱导分化及鉴定

分别取5组第3代的皮肤间充质干细胞再培养48 h后,进行成脂及成骨诱导分化。取第3代皮肤间充质干细胞加入成脂诱导培养液(含有10%体积分数FBS的DMEM/F12K培养基、1 μ mol/L的地塞米松、0.2 mmol/L的吡啶美辛、10 mg/L的人胰岛素、0.5 mmol/L的3-异丁基-1-甲基黄嘌呤),每3天换1次培养液,培养21 d后10%甲醛固定,油红O染色,显微镜下观察细胞中是否有脂滴。另设置未诱导分化阴性对照组。

取第3代皮肤间充质干细胞加入成骨诱导培养液(含有10%体积分数FBS的DMEM/F12K培养基、0.1 μ mol/L的地塞米松、10 mmol/L的 β -甘油磷酸钠、50 μ mol/L的L-抗坏血酸),每3天换1次培养液,培养21 d后10%甲醛固定,2%茜素红溶液染色,显微镜下观察观察细胞中是否有矿化结节。另设置未诱导分化阴性对照组。

1.3.4 皮肤间充质干细胞中EGF、TGF- β_1 及SCF的水平检测

收集第3代皮肤间充质干细胞培养的上清液,严格按照ELISA试剂盒说明书上的标准步骤进行操作,由专业人员完成测试,收集并检测第3代皮肤间充质干细胞培养基上清液中的EGF、TGF- β_1 及SCF含量。

1.4 统计学方法

数据分析采用SPSS 17.0统计软件,计量资料以

均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组比较采用 t 检验; 计数资料以频数表示, 采用 Pearson χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者一般资料比较

两组患者一般资料中性别及年龄比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 两组皮肤间充质干细胞的免疫表型鉴定结果

两组结果均显示, 表面抗原 CD73、CD44、CD90、

CD105, 以及 CD29 表达阳性, 而 HLA-DR、CD34 及 CD45 表达阴性。见图 1。

表 1 两组患者一般状况比较 ($n = 59$)

组别	男/女/例	年龄/(岁, $\bar{x} \pm s$)
观察组	31/28	32.37 ± 4.18
对照组	30/29	33.12 ± 4.22
t/χ^2 值	57.341	0.629
P 值	0.583	0.612

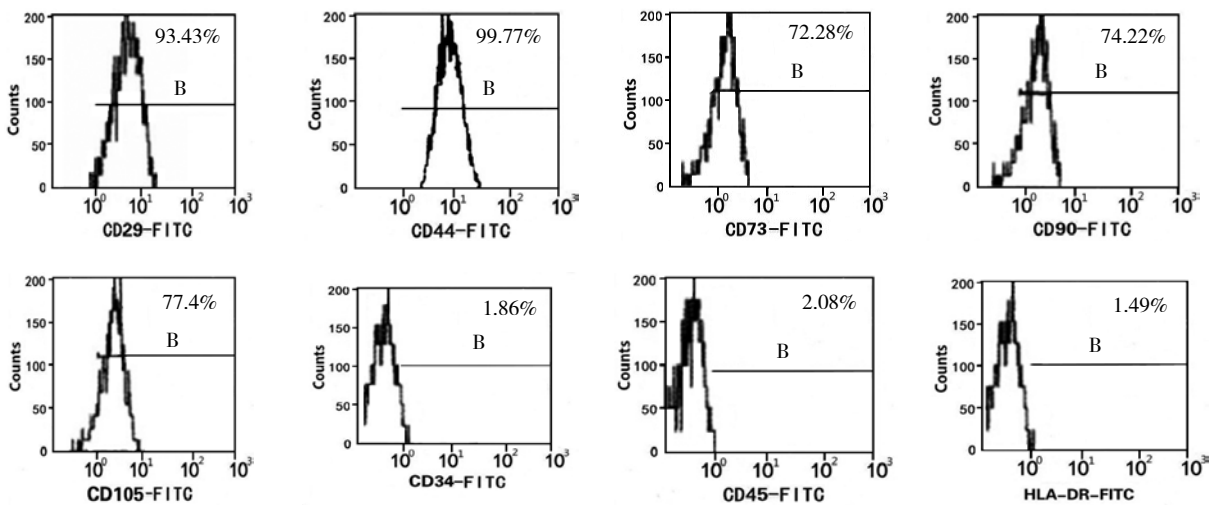


图 1 两组患者免疫表型鉴定结果

2.3 两组皮肤间充质干细胞的形态学特征

显微镜下可见皮肤间充质干细胞在接种 72 h 后有少量细胞贴壁, 贴壁细胞数量随培养时间延长而增加, 细胞增大且分裂增殖, 呈梭形及多角形排列, 胞质丰富, 核居中; 另有少量圆形细胞呈散在分布, 不贴壁, 粘着在贴壁细胞上。见图 2。

2.4 两组患者皮肤间充质干细胞成脂诱导分化结果

成脂诱导分化后, 镜下可见大小不等的圆形脂滴, 油红 O 染色呈亮红色, 未诱导分化阴性对照组中染色

阴性。见图 3。

2.5 两组患者皮肤间充质干细胞成骨诱导分化结果

成骨诱导分化后, 镜下可见诱导后细胞表面散布淡红染物, 茜素红 S 染色后镜下可见局灶性红色矿化结节, 而未诱导分化的阴性对照组中未见上述特征, 染色阴性。见图 4。

2.6 皮肤间充质干细胞中 EGF、TGF- β_1 及 SCF 的水平检测结果

观察组皮肤间充质干细胞中 EGF、TGF- β_1 及

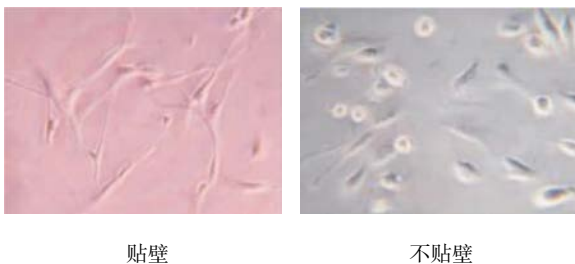


图 2 皮肤间充质干细胞的形态学特征 ($\times 200$)

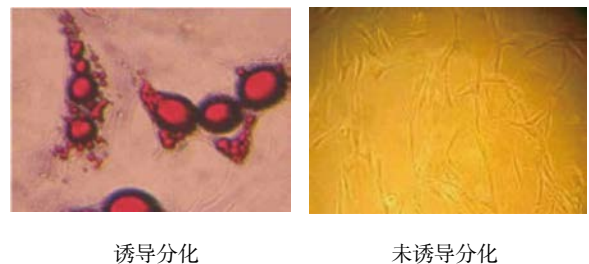


图 3 皮肤间充质干细胞脂肪诱导分化形态 ($\times 200$)

SCF的水平与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),观察组银屑病患者皮损处的皮肤间充质干细胞中EGF及SCF水平升高,TGF- β_1 水平降低。见表2。

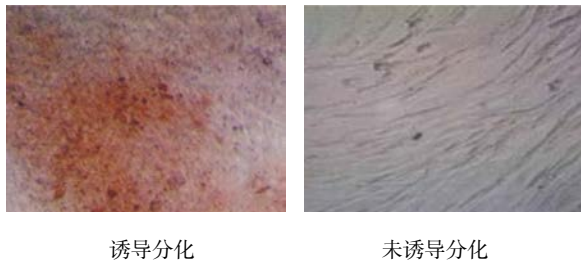


图4 皮肤间充质干细胞成骨诱导分化形态 (×200)

表2 两组患者皮肤间充质干细胞中细胞因子水平比较
($n=59$, pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	EGF	TGF- β_1	SCF
观察组	301.36 ± 21.45	542.17 ± 42.37	233.48 ± 44.56
对照组	269.33 ± 20.07	710.01 ± 54.67	116.85 ± 38.47
<i>t</i> 值	2.382	2.673	2.561
<i>P</i> 值	0.021	0.011	0.013

3 讨论

银屑病可分寻常型银屑病、关节病型银屑病、脓疱型银屑病以及红皮病型银屑病,本研究中选取的寻常型银屑病约占银屑病患者的95%^[5]。其患病率无性别差异,在任何年龄段均可发病,在15~30岁发病率较高^[6]。据有关报道银屑病发病率在亚洲为0.1%^[6]每年,欧洲为1.4%^[7]每年。患者由于大量脱屑造成组织蛋白大量流失,加之病理状态所致高热及免疫力低下,易出现感染及电解质代谢紊乱,严重者可引起死亡^[8]。皮肤间充质干细胞大部分来源于中胚层的体细胞^[9],具有自我更新及高度分化的能力^[10]。在2001年TOMA等首次从真皮层中分离出多功能成体干细胞^[11]。由于皮肤组织具有取材容易操作简单、细胞增殖速度快以及所诱导的组织受主要组织相容性复合物限制较少等特点,是一种理想的应用于皮肤组织工程的种子细胞,具有广阔前景^[12]。皮肤间充质干细胞是皮肤微环境的组成成分之一,参与修复过程中细胞外基质重塑以及调节相关细胞生长因子的表达等过程,是维持皮肤组织正常生长发育的重要组成成分^[13]。本研究结果发现,两组患者所提取的皮肤间充质干细胞其形态学特征、免疫表型及诱导分化结果较为相似,所得结果与既往研究结果相符^[14]。

有研究发现,银屑病患者细胞因子在骨髓间充质干细胞中的分泌水平异常^[15]。TGF- β 参与银屑病发生的主要效应包括调节炎症反应、细胞生长及抑制免疫功能等^[16]。GIANLUCA等^[17]研究发现TGF- β 在角质形成细胞的增殖和迁移过程中起着负调控作用,角质形成细胞是一种能合成角质蛋白的上皮细胞,而银屑病的病理特点之一就是表皮角质形成细胞的增殖和异常分化。VARANI等用含EGF受体抗体的培养基培养银屑病皮损组织,发现其组织病理形态发生改善^[18]。同时也有研究表明,EGF调控基因在多种皮肤病中呈现过度表达,EGF在皮肤及血液中的表达水平可随着患者的病情恢复而恢复正常水平^[19]。SCF是一种可以促进干细胞增殖及分化并延长其存活期的细胞因子。皮肤中的SCF可诱导表皮干细胞向角质形成细胞分化^[20],与TGF- β 共同参与该病理过程。本研究结果发现银屑病患者皮损处的皮肤间充质干细胞中EGF、TGF- β_1 及SCF的水平与正常对照组比较有差异,银屑病患者皮损处的皮肤间充质干细胞中分泌EGF及SCF水平升高,TGF- β_1 水平降低。说明银屑病患者细胞因子在皮肤间充质干细胞中的表达相比于正常组织有所异常,EGF、TGF- β_1 及SCF水平的改变可能与银屑病的发生、发展有一定联系,但具体的机制仍需探索,可以在后期的研究中进一步探讨,以期对银屑病的诊治提供数据支持。

参 考 文 献:

- [1] ARMSTRONG R B. Psoriasis[J]. Loss Grief & Care, 2017, 7(3): 31-42.
- [2] BOEHNCKE W H, SCHON M P. Psoriasis[J]. Der Hautarzt, 2015, 63(3): 176-177.
- [3] FRAGOULIS G E, SIEBERT S, MCINNES I B. Therapeutic targeting of IL-17 and IL-23 cytokines in immune-mediated diseases[J]. Annual Review of Medicine, 2015, 67(1): 337-353.
- [4] 严冰浩,张燕,方硕,等.间充质干细胞来源的外泌体的制备方法及应用[J].解剖学杂志,2016,39(5):622-626.
- [5] 陈卓,杨洁,毕廷民,等.银屑病治疗的研究进展[J].中国煤炭工业医学杂志,2017,20(5):612-616.
- [6] LOPEZ-ESTEBARANZ J L, SANCHEZ-CARAZO J L, SULLEIRO S. Effect of a family history of psoriasis and age on comorbidities and quality of life in patients with moderate to severe psoriasis: results from the ARIZONA study[J]. Journal of Dermatology, 2016, 43(4): 395-401.
- [7] VENA G A, ALTOMARE G, AYALA F, et al. Incidence of psoriasis and association with comorbidities in Italy: a 5-year observational study from a national primary care database[J]. European Journal of Dermatology, 2010, 20(5): 593-598.

- [8] STROBER B, PAPP K A, LEBWOHL M, et al. Clinical meaningfulness of complete skin clearance in psoriasis[J]. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2016, 75(1): 77-82.
- [9] BIANCO P, ROBEY P G, SIMMONS P J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(4): 313-319.
- [10] JACKSON W M, NESTI L J, TUAN R S. Mesenchymal stem cell therapy for attenuation of scar formation during wound healing[J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2016, 3(3): 20-29.
- [11] TOMA J G, AKHAVAN M, FERNANDES K J, et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin[J]. *Nature Cell Biology*, 2001, 3(9): 778-784.
- [12] 吴瑾, 杨春生, 周武军. 诱导多能干细胞在皮肤病研究的应用进展[J]. *国际皮肤性病杂志*, 2016, 42(4): 260-262.
- [13] 王卿, 王大虎, 王爱学, 等. 银屑病患者损伤处皮肤间充质干细胞对 T 细胞增殖的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(23): 3451-3456.
- [14] CAMPANATI A, ORCIANI M, GORBI S, et al. Effect of biologic therapies targeting tumour necrosis factor- α on cutaneous mesenchymal stem cells in psoriasis[J]. *British Journal of Dermatology*, 2012, 167(1): 68-76.
- [15] ZHANG K, LIU R, YIN G, et al. Differential cytokine secretion of cultured bone marrow stromal cells from patients with psoriasis and healthy volunteers[J]. *European Journal of Dermatology*, 2010, 20(1): 49-53.
- [16] 杨番, 吕世超. 寻常性银屑病的皮肤镜特征及促炎因子, TGF- β 信号通路, 凋亡分子的表达量[J]. *海南医学院学报*, 2016, 22(23): 2908-2910.
- [17] TORALDO G, BHASIN S, BAKHIT M, et al. Topical androgen antagonism promotes cutaneous wound healing without systemic androgen deprivation by blocking β -catenin nuclear translocation and cross-talk with TGF- β signaling in keratinocytes[J]. *Wound Repair & Regeneration*, 2012, 20(1): 61-73.
- [18] VARANI J, KANG S, STOLL S, et al. Human psoriatic skin in organ culture: comparison with normal skin exposed to exogenous growth factors and effects of an antibody to the EGF receptor[J]. *Pathobiology*, 1998, 66(6): 253-259.
- [19] 杨元文, 刘瑞凤, 侯瑞霞, 等. 银屑病患者皮肤间充质干细胞分泌表皮生长因子, 转化生长因子 β_1 水平及意义[J]. *临床皮肤科杂志*, 2013, 42(6): 331-334.
- [20] 刘瑞凤, 杨元文, 赵新程, 等. 银屑病患者皮损间充质干细胞分泌表皮生长因子, 干细胞因子, 碱性成纤维细胞生长因子, 血管内皮生长因子水平检测[J]. *中国免疫学杂志*, 2013, 29(10): 1046-1049.

(王荣兵 编辑)