

联苯胺(DAB)购自美国Sigma公司;Tripure裂解液购自瑞士Roche公司;MLLV第1链cDNA合成试剂盒和逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)扩增试剂盒由上海生工生物工程技术有限公司提供。isp2引物由上海博亚生物技术有限公司设计并合成。

2. 角膜碱烧伤模型的制作及分组:孕小鼠自然分娩后,取乳鼠,待其生长成熟后开始实验。设立实验组(35只)和对照组(5只)。实验组小鼠经乙醚麻醉后,用浸有0.01 mol/L NaOH溶液的圆形滤纸贴附其角膜45 s,造成角膜碱烧伤。伤后3、6、12、24、48、96、192 h将其断颈处死,每时相点5只(系同胞小鼠),取其角膜待用。对照组5只小鼠亦为同胞,麻醉后用等渗盐水处理角膜45 s,192 h后断颈处死,取角膜待检。

3. HE染色及免疫组织化学观察:用体积分数10%甲醛固定两组小鼠角膜标本后,梯度乙醇脱水,石蜡包埋,切片(厚4 μm),HE染色。另将组织切片置于65 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤3 h,二甲苯脱水,逆向梯度乙醇水合,按SABC试剂盒说明书进行TSP2为一抗的免疫组织化学染色,DAB显色。梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂胶封片。用Tiger 920型细胞图像分析仪及配套软件(重庆大学图像图形研制中心)进行分析,检测TSP2表达的吸光度(A)值。

4. RT-PCR:取两组小鼠角膜,用Tripure裂解液抽提角膜组织总RNA。经紫外分光光度计检测核酸浓度并进行筛选后,按试剂盒说明书逆转录为cDNA,加样进行PCR反应。isp2上、下游引物序列依次为5'-ACCTGCTTCATCAGCACCAA-3';5'-GAA-CAGCAGCAATCCGGAAA-3'。反应条件如下:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性90 s,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性45 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火50 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸90 s,共40个循环,最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。将产物(328 bp)置于4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。以对照组的isp2 RT-PCR产物为空白对照,以对照组甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPD)RT-PCR产物为阳性对照,将各产物进行8 g/L琼脂糖凝胶电泳,观察isp2的表达情况。

5. 统计学处理:免疫组织化学半定量分析结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行Student-t检验。

结果

1. HE染色及免疫组织化学观察:HE染色结果显示,实验组小鼠伤后24 h开始角膜内有明显的血管生成;对照组却无此现象。免疫组织化学观察可见,TSP2在对照组和实验组小鼠角膜组织中均有表达,多见于残存上皮层的基底层,基底层中亦有少量

表达。实验组小鼠伤后3~96 h TSP2的表达量与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),伤后3 h,其TSP2表达量即上升,6 h时达第1个峰值;随后有所下降,伤后24 h达低谷;此后又回升,96 h时达第2个峰值;然后又开始下调,至伤后192 h降至对照组水平($P > 0.05$)。见图1、2及表1。

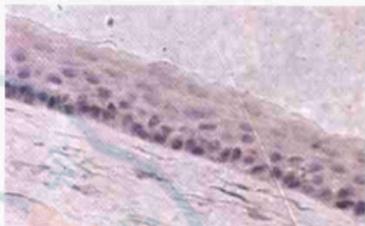


图1 对照组小鼠角膜TSP2的表达较弱 SABC $\times 400$
Fig 1 Expression of TSP2 in C group was weak SABC $\times 400$



图2 实验组小鼠碱烧伤后6 h角膜中TSP2的表达量强于对照组 SABC $\times 100$

Fig 2 Expression of TSP2 in E group at 6 h PBH was stronger than that in the C group SABC $\times 100$

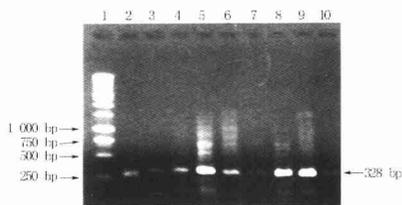
表1 两组小鼠角膜中TSP2的表达水平($\bar{x} \pm s$)
Tab 1 Expression of TSP2 in the corneal tissue of the mice in the two groups($\bar{x} \pm s$)

组别	切片数(张)	A值
对照组	5	0.48 \pm 0.15
实验组		
伤后3 h	5	0.83 \pm 0.28*
伤后6 h	5	1.54 \pm 0.45*
伤后12 h	5	1.03 \pm 0.44*
伤后24 h	5	0.73 \pm 0.19*
伤后48 h	5	0.90 \pm 0.30*
伤后96 h	5	1.79 \pm 0.63*
伤后192 h	5	0.66 \pm 0.25

注:与对照组比较,* $P < 0.05$

2. RT-PCR:对照组小鼠角膜组织中GAPD,isp2以及实验组小鼠伤后各时相点的isp2有不同程度的表达。实验组小鼠伤后6、48、96 h时表达最强;24、192 h表达较弱;3、12 h的表达水平介于两者之

间(图 3)。



注:1 为 marker;2 为阳性对照(对照组织 GAPDH);3 为空白对照(对照组织 tsp2);4-10 分别为实验组伤后 3,6,12,24,48,96,192 h
图 3 两组小鼠角膜组织 tsp2 表达情况的 RT-PCR 检测结果

Fig 3 Expression of tsp2 in the corneal tissue of the mice in the two groups by RT-PCR

讨 论

在创伤愈合过程中,TSP2 的作用主要体现在诱导细胞去黏附和抑制血管发生两个方面,但受体内多种因素的影响。研究表明,TSP2 在应激状态下(比如创伤后)的作用表现为细胞结合部位的肌动蛋白表达增强,张力纤维的张力减弱,黏合斑中的 α 肌动蛋白丢失等,细胞进入去黏合状态^[1]。这种状态可能为一些特殊因子参与创伤愈合提供了微环境^[2-6]。另一方面,体内研究结果证实,TSP2 是一种潜在的血管发生抑制剂,在角膜创伤后微血管生成的抑制过程中发挥着重要作用^[7,8]。

本研究结果显示,TSP2 在核酸水平(RT-PCR 检测 tsp2)和蛋白质水平(免疫组织化学观察)上的表达情况比较相似,烧伤后其表达量随时间相点的变化呈双峰型波动,第 1 个峰值出现在伤后 6 h,第 2 个出现在伤后 96 h,而伤后 24 h 为两峰值间的最低点。研究结果显示,烧伤后 24 h 左右是体内修复过程的重要阶段,也是各种因子和血管发生变化较为显著的时相点^[9,10]。笔者推测,由于 TSP2 在创伤修复过程中通过诱导细胞去黏合状态而发挥着为后续修复因子提供微环境的作用,因此它应该在伤后 24 h 前有较强表达,尤其是在离创伤发生时间较

近的应激反应过程中。本研究中,TSP2 表达的第 1 个峰值出现在伤后 6 h 左右,与上述推测一致;此后表达量下降,至伤后 24 h 达到最低点,这可能与血管发生的趋势增强、促进血管发生的因子强烈表达而抑制了 TSP2 的作用有关。TSP2 表达的第 2 个峰值,似乎与血管发生的完成或趋势开始减弱有关,可能仍然属于 TSP2 应激表达的一部分。同时,碱性物质使角膜始终处于持续性伤害状态,也可能是导致 TSP2 持续表达时间较长的一个原因。

上述结果还提示,在角膜碱烧伤后的修复过程中,机体自身 TSP2 抑制血管发生的作用并不足以控制血管发生,这与应激条件下 TSP2 的表达可能属于代偿性增高有关。因此,进一步研究外源性 TSP2 对角膜创伤后血管发生的抑制作用仍是必要的。

参 考 文 献

- 1 Agah A, Kyriakides TR, Lotzoudis N, et al. Thrombospondin 2 levels are increased in aged mice; consequences for cutaneous wound healing and angiogenesis. *Matrix Biol*, 2004, 22:539-547.
- 2 Armstrong DG, Borstein P. Thrombospondins 1 and 2 function as inhibitors of angiogenesis. *Matrix Biol*, 2003, 22:63-71.
- 3 曹军,杨琦.血小板反应蛋白 2 的结构、功能以及在创伤愈合中的作用. *生命的化学*, 2003, 23:404-406.
- 4 Han YP, Tuan TL, Wu H, et al. TNF- α stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-(kappa)B mediated induction of MT1-MMP. *J Cell Sci*, 2001, 114: 131-139.
- 5 刘亮,刘旭威.巨噬细胞在创伤愈合血管生成中的作用的研究进展. *中华烧伤杂志*, 2004, 20: 249-251.
- 6 刘秀华,田牛.血管生成抑制的研究进展. *中华烧伤杂志*, 2002, 18:57-59.
- 7 Vaillat B, Feige JJ. Thrombospondins as anti-angiogenic therapeutic agents. *Curr Pharm Des*, 2003, 9: 583-588.
- 8 Gursiefer G, Vashis S, Ng TF, et al. Roles of thrombospondin-1 and -2 in regulating corneal and iris angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45:1117-1124.
- 9 Yan J, Yang T, Li G, et al. Changes of uPA and uPA-R expression in the cornea after alkali burn. *Cell Surf B Biointerf*, 2004, 37:49-52.
- 10 Jun Y, Tian Y, Yijun ZG, et al. The function of tPA and PAI-2 in the course of corneal repair after alkali burn. *Cell Bio Int*, 2004, 28: 11.

(收稿日期:2005-02-21)

(本文编辑:罗勤)

读者·作者·编者

核素符号及质子数的正确表示法

本期刊中常见核素符号或质子数表示不规范的现象,例如:¹⁴氢或 N14,60 钴或 Co.60,^{99m}钼或 Tc99m 等。正确的表示法应为:核素的核子数(质量数)和表示激发态的 m 均标注在元素符号的左上角,例如:²N,¹⁶Co,^{99m}Tc。分子中核素的原子数应标注在核素符号的右下角,如¹⁴N₂。质子数(原子序数)应标注在元素符号的左下角。例如:₂₆Pb,₂₆Fe。