

· 论著 ·

烧伤大鼠创面再上皮化过程中表皮角质形成细胞基底膜相关基因的表达

章雄 刘琰 张志 许伟石

【摘要】 目的 检测烧伤大鼠创面再上皮化过程中表皮角质形成细胞(KCs)基底膜(BM)相关基因的表达。方法 24只SD大鼠造成背部45 cm²深Ⅱ度烫伤,按照基因表达检测时间随机分为A组(伤后3 d)、B组(伤后10 d)、C组(伤后14 d)、D组(创面完成再上皮化后),每组6只。伤后3、10、14 d取距创缘1 cm处皮肤标本,创面完成再上皮化后取创面中心皮肤标本,分别制备KCs悬液。另取6只SD大鼠背部皮肤作为正常对照组。利用基因芯片技术检测各组大鼠创面再上皮化不同阶段KCs BM相关基因的差异性表达。结果 伤后3 d,KCs层粘连蛋白 γ 1、整合素 β 8基因表达上调,基因表达数据与正常对照比值分别为2.068和2.200。再上皮化过程中(伤后10、14 d)层粘连蛋白受体1、整合素 β 1基因表达上调, β 2、 β 7表达下调,基因表达数据与正常对照的比值分别为2.472、2.658、0.419和0.462。IV型胶原 α 1、 α 3基因各组均上调,基因表达数据与正常对照的比值为2.547和2.036。结论 创面再上皮化过程中整合素 β 1、层粘连蛋白 γ 1、层粘连蛋白受体1、IV型胶原 α 1、 α 3基因表达上调,有利于新生皮肤BM的构建和KCs与BM之间形成稳定的连接。

【关键词】 基底膜; 基因表达; 再上皮化; 表皮角质形成细胞

Expression of keratinocyte basement membrane related genes during the process of re-epithelialization of burn wound in scalded rats ZHANG Xiong, LIU Yan, ZHANG Zhi, XU Wei-shi. Department of Burns, Ruijin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, P. R. China

【Abstract】 Objective To study the expression of keratinocyte (KC) basement membrane (BM) related genes during the process of re-epithelialization of burn wound in scalded rats with cDNA microarray technique. Methods Twenty-four SD rats were inflicted with deep partial thickness scald with an area of 45 cm² on the back, and they were randomly divided into A [3 postscald day (PSD)], B (10 PSD), C (14 PSD) and D (re-epithelialization complete day) groups, with 6 rats in each group. Tissue samples were harvested from 1 cm of wound margin on 3, 10 and 14 PSD. On the re-epithelialization complete day, tissue samples were harvested from the center of the wound in D group and digested with enzyme into KC suspensions. Skin samples from the back of 6 uninjured rats were taken as normal control. The differential expression of KC BM related genes during different stages of re-epithelialization was assayed with cDNA microarray. Results The expression of laminin (LN) gamma 1 (2.068) and integrin β 8 (2.200) was up-regulated on 3 PSD compared with that in control. The expression of integrin β 1 and LN receptor 1 was up-regulated on 10 and 14 PSD, (2.472 and 2.658), while that of integrin β 2 and β 1 (0.419 and 0.462) down-regulated on 10 and 14 PSD, and the expression of type IV collagen α 1 and α 3 was up-regulated during re-epithelialization. Conclusion The expression of integrin β 1, LN gamma 1, LN receptor 1, type IV collagen α 1 and α 3 genes were up-regulated during re-epithelialization, which might be beneficial to the construction of BM in new skin and the formation of stable conjunction between KC and BM.

【Key words】 Basilar membrane; Gene expression; Re-epithelialization; Keratinocytes

基底膜(basilar membrane, BM)是位于表皮、真皮连接处的一层片状结构,由层粘连蛋白、IV型胶原和VII型胶原等成分组成,表皮细胞通过半桥粒和锚着纤维等结构与BM紧密连接,以抵抗外界对皮肤的剪切应力。创面愈合时BM成分和结构的重建是影响愈合质量的重要因素。笔者利用基因芯片技术检测烧伤大鼠创面再上皮化过程中表皮角质形成细胞(Keratinocytes, KCs) BM相关基因的表达,以了解创面再上皮化过程中KCs BM相关成分的基因表

达特性。

材料与方 法

1. 动物模型及分组:清洁级SD大鼠(中国医学科学院上海实验动物中心)30只,体重200~250 g,雌雄不拘。取24只大鼠,用25 g/L戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔内注射麻醉,背部脱毛。大鼠分笼饲养,自由进食、饮水。24 h后采用同样方法麻醉大鼠,将其仰卧固定于带有椭圆孔的烫伤板上,80℃水浸烫6 s,造成背部45 cm²深Ⅱ度烫伤(经病理切片证实,以下称烧伤),伤后立即腹腔内注射乳酸林

格液 5 ml 复苏。将 24 只大鼠按照基因表达检测时间随机分为 A 组(伤后 3 d)、B 组(伤后 10 d)、C 组(伤后 14 d)、D 组(创面完成再上皮化后)每组 6 只。另取 6 只大鼠作为正常对照组。

2. 标本采集:A、B、C 组大鼠分别在伤后 3、10、14 d 麻醉后无菌操作下取距创缘 1 cm 宽皮肤,D 组在创面完成再上皮化后取创面中心皮肤。所取皮肤均用 2.5 g/L 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(美国 Gibco 公司)消化后制备 KCs 悬液。

3. 用基因芯片技术检测 KCs 基因的表达:以 Trizol 法抽提各组 KCs 的 RNA,经 DNA 酶消化和 RNA 纯化试剂盒(德国 Qiagen 公司)纯化,甲醛变性电泳和微流电泳系统(2100 生物分析仪,美国安捷伦公司)鉴定 RNA 质量,逆转录合成 cDNA。采用上海生物芯片有限公司提供的鼠 cDNA 1.2 基因表达谱芯片(基因数为 9 235),芯片杂交和洗涤后,进行数据分析:满足中位数比值、比值的中位数、回归比值三者之间的差异 ≤ 10%,信噪比 ≥ 2,信号值 ≥ 100 者为可采用数据,log₂Ratio 之差 > 1 或 < -1 为差异数据。各时相点基因表达数据与正常对照组中的对应数据点相除,> 2.0 或 < 0.5 表示在该时相点上调 200% 或下调 50% 以上的基因。

4. PCR 的测定:选取差异基因 NM_021740,以 SYBR 绿(德国 Qiagen 公司)为荧光染料,采用 PE 7000 荧光实时定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)对芯片结果进行验证。采用 Primer Express 软件设计引物。其上游引物为 5'-CCTCGAAACTCGACTAATTCCT-3';下游引物 5'-TTCCTTCTTCTCCTTCAAGTCC-3'。磷酸甘油醛脱氢酶(GAPD,作为内参照)上游引物为 5'-GACAATCCATTTCCAAGACTGA-3';下游引物为 5'-GGCCAGCCCTTACTTATACTTG-3'。反应如下:PCR Master mix(德国 Qiagen 公司) 15 μl,10 μmol/L 上游引物 0.9 μl,10 μmol/L 下游引物 0.9 μl,cDNA 5 μl,水 8.2 μl。94 °C 变性 15 s,60 °C 复性和延伸 1 min,共 40 个循环。每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数为 Ct 值,以管家基因 GAPD 来校正每个样品的 Ct 值,通过校正后的 Ct 值计算起始模板的相对值,与该基因在基因芯片上的荧光信号值进行比较。

结 果

1. KCs 基因的表达:伤后 3 d KCs 层粘连蛋白 γ1、整合素 β8 的基因表达上调。基因表达数据与正常对照的比值分别为 2.068 和 2.200。再上皮化

过程中(伤后 10、14 d)层粘连蛋白受体 1、整合素 β1 基因表达上调,β2、β7 表达下调。基因表达数据与正常对照的比值分别为 2.472、2.658、0.419 和 0.462。IV 型胶原 α1、α3 基因各组均上调。基因表达数据与正常对照的比值为 2.547 和 2.036。

2. PCR 结果:荧光实时定量 PCR 结果与相应基因的芯片结果经复管比较,两者的变化趋势有良好的相关性(图 1),表明基因芯片结果可靠。

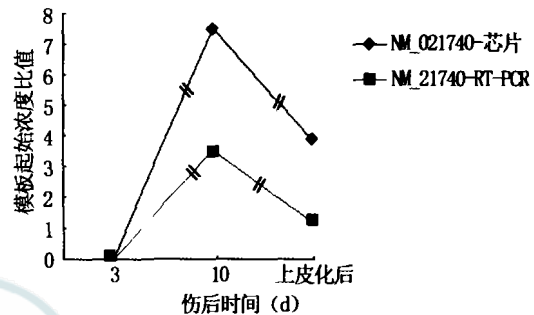


图 1 PCR 检测结果与基因芯片检测结果比较
Fig 1 Comparison of the results of real-time PCR and cDNA microarray

讨 论

整合素是一大类细胞间黏附分子,由 α 和 β 亚基组成,参与细胞与细胞、细胞与细胞外基质之间的连接,对细胞的增殖、迁移、分化都具有调节作用^[1,2]。整合素 β1 介导基底层 KCs 与 BM 之间紧密连接,如 α1β1 可与层粘连蛋白结合;α1β1、α2β1 可识别胶原。整合素 β1 又可作为表皮干细胞和短暂扩充(transient amplifying, TA)细胞的表面标记。再上皮化过程中,整合素 β1 基因表达上调,显示 KCs 大量增殖,而这些增殖细胞所表达的整合素 β1 又有利于它们迁移后与新的细胞外基质之间形成良好的连接。其他如整合素 β7、β2 在创面再上皮化中期表达下调,整合素 β8 基因在创面再上皮化早期上调,这些黏附分子基因在再上皮化过程中不同时相点的差异性表达可能共同参与了细胞的增殖、黏附、BM 的重建等生物学活动。

BM 的重建是创面再上皮化过程的一个重要步骤,BM 为表皮基底细胞层和真皮乳头层间的结构,在上皮化过程中形成良好的 BM 为表皮与真皮提供了稳固的连接^[3]。层粘连蛋白、IV 型胶原和 VII 型胶原是 BM 的主要成分。层粘连蛋白是由 α、β、γ 3 个亚单位构成的异三聚体,可与 VII 型胶原^[4]和 IV 型胶原^[5-7]连接构成 BM 特有的空间结构,保证了表皮-真皮之间连接的稳定性,还可调控 KCs 的黏附和迁移等生物学功能。创面再上皮化早期 KCs 层粘连

蛋白 $\gamma 1$ 的基因表达上调;再上皮化过程中层粘连蛋白受体 1 基因表达上调,整合素 $\beta 1$ 基因表达上调,IV 型胶原 $\alpha 1$ 、 $\alpha 3$ 基因分别在创面再上皮化过程中和完成时上调。由此提示,创面再上皮化过程中,BM 的修复可能与细胞的增殖、迁移活动同时进行,BM 成分的表达具有不同的时相性。创面再上皮化过程中层粘连蛋白受体表达上调则有利于新迁移的 KCs 与 BM 之间的牢固黏附。

参 考 文 献

- 1 Akiyama SK. Integrins in cell adhesion and signaling. Hum Cell, 1996, 9: 181 - 186.
- 2 Mostafavi-Pour Z, Askari JA, Parkinson SJ, et al. Integrin-specific signaling pathways controlling focal adhesion formation and cell migra-

tion. J Cell Biol, 2003, 161:155 - 167.

- 3 陈敏亮,牛星焘,林子豪,等.黏附分子 $\beta 1$ 整合素在伤口愈合中表达的研究.中华烧伤杂志,2000,16:103 - 105.
- 4 Madlener M, Mauch C, Conca W, et al. Regulation of the expression of stromelysin-2 by growth factors in keratinocytes; implications for normal and impaired wound healing. Biochem J, 1996, 320:659 - 664.
- 5 Rousselle P, Keene DR, Ruggiero F, et al. Laminin 5 binds the NC-1 domain of type VII collagen. J Cell Biol, 1997, 138: 719 - 728.
- 6 Champlaud MF, Lunstrum GP, Rousselle P, et al. Human amnion contains a novel laminin variant, laminin 7, which like laminin 6, covalently associates with laminin 5 to promote stable epithelial-stromal attachment. J Cell Biol, 1996, 132: 1189 - 1198.
- 7 DiPersio CM, Hodiola-Dilke KM, Jaenisch R, et al. $\alpha 3\beta 1$ Integrin is required for normal development of the epidermal basement membrane. J Cell Biol, 1997, 137:729 - 742.

(收稿日期:2004 - 10 - 15)

(本文编辑:张 红)

· 病例报告 ·

介入栓塞治疗大面积烧伤后消化道出血一例

张巨祥 杨思福 王勇

患者男,32岁。天然气燃爆伤后2h入院。诊断:(1)烧伤总面积93%,其中Ⅱ度31%、Ⅲ度62%TBSA。(2)中度吸入性损伤。(3)头皮裂伤10cm,右膝关节囊开放性损伤8cm。立即给予气管、静脉切开,留置导尿管,行常规抗休克、抗感染、抗酸治疗,创面清创后涂磺胺嘧啶银糊剂并暴露,红外线烤灯照射。患者平稳度过休克期。伤后4d行双上肢、右下肢削痂(共28%TBSA)辐照猪皮覆盖术。术后2d行自体微粒皮+辐照猪皮覆盖术。伤后10d患者精神差,体温 39.8°C ,呼吸28次/min,脉搏127次/min,右下肢后侧7%辐照猪皮上有霉菌斑(涂片显示为白色念珠菌)和皮下积液。彻底清除有霉菌斑和粘附不牢的辐照猪皮,用双氧水、体积分数0.1%新洁尔灭反复冲洗3次,用1g/L氟康唑外敷包扎,1次/d;静脉滴注氟康唑0.2g,2次/d。伤后14d患者创面霉菌及全身感染症状消失,大便潜血(+++)。将入院后一直静脉推注的西咪替丁0.4g(1次/6h)改为奥美拉唑40mg(1次/d),口服云南白药0.5g,1次/6h,效果不佳,出血逐渐加重。伤后19d患者解柏油样稀便,2~4次/d,300~500ml/次;便前1~2h患者出现肢冷、脉速、大汗、面色蜡黄等血容量不足表现。先后用去甲肾上腺素8mg+冰等渗盐水20ml;凝血酶50000U+冰等渗盐水30ml,1次/4h;云南白药0.5g(1次/6h)加冰等渗盐水10ml交替胃管注入及保留灌肠。给予奥曲肽0.6mg+100g/L葡萄糖溶液1000ml持续24h静脉滴注和肌肉注射巴曲酶1000U等治疗,仍未见好转,便色由黑褐色转为暗红、鲜红色。输注全血2000ml/d,仍不能维持血红蛋白含量稳定。胃镜检查排除胃、十二指肠出血,结肠镜检查见结肠内有血液,出血部位不明确。

伤后23d行数字减影血管造影(DSA):术前肌肉注射山莨菪碱15mg,常规消毒,局部麻醉,用改良Seldinger技术经左股动脉穿刺置入5F导管鞘,再插入4F超滑Yashiro导管分别至肠系膜上、下动脉,以4ml/s注入对比剂[350g/L碘海醇(商品名欧乃派克)]16ml。见肠系膜上、下动脉及分支广泛痉挛变细,左结肠与乙状结肠动脉吻合弓中段有一团异常血管。再经4F导管插入2F/3F SP微导管至该段,以2ml/s注入6ml对比剂,见局部血管增多、增粗、走行紊乱,对比剂浓染、外溢,符合出血征象。在该血管团处注入 2mm^3 明胶海绵颗粒,其上、下端分别注入明胶海绵1或2条。撤除微导管,在乙状结肠动脉主干行DSA以观察栓塞效果,见异常血管团消失,局部对比剂染色变淡,正常动脉分支存在,介入栓塞结束。患者生命体征逐渐平稳,18h后排黑色软便200g,以后转为褐色便,3d后褐便消失。随后经4次肉芽创面植皮,患者于伤后52d痊愈出院。随访1年未见出血复发。

讨论 消化道应激性溃疡出血,是大面积烧伤不可忽视的并发症。轻者大便潜血阳性,重者呕血、便血甚至休克,传统治疗方法有手术和非手术疗法。非手术疗法常作为首选,大多数患者出血也能得以控制,但不能控制反复出现的大出血。手术疗法常用于大血管损伤,但手术创伤大,术前需明确出血性质和部位,否则不仅止不住血,还会加重病情。本例患者出血十余天,在多种内科治疗无效的情况下用DSA诊疗,效果满意。由此表明DSA诊疗烧伤并发消化道出血具有可行性,其治疗损伤轻,方法简便,既可明确诊断,又可行介入栓塞治疗,还能验证栓塞效果,不失为一种内科治疗失败后的首选疗法。

(收稿日期:2004 - 07 - 14)

(本文编辑:苟学萍)

作者单位:457001 濮阳,中原油田总医院烧伤科(张巨祥),放射科(杨思福、王勇)