

局部应用胰岛素对大鼠烫伤创面基底膜形成的影响

刘琰 章雄 张志 许伟石

【摘要】 目的 观察胰岛素对大鼠深Ⅱ度烫伤再上皮化创面基底膜(BM)形成的影响。方法 将96只SD大鼠背部造成45 cm²深Ⅱ度烫伤,根据创面皮下注射药物的不同分为对照组(创面皮下浸润注射2 ml等渗盐水,48只)和胰岛素组(创面皮下浸润注射0.1 U长效混悬胰岛素+等渗盐水2 ml,48只)。两组大鼠均在伤后第1天开始注射,1次/2 d,直至创面完全上皮化。于伤后2、3、4、5、6、10、14 d及创面完全再上皮化时,每组每时相点处死6只大鼠,取创缘1 cm宽皮肤,利用网状纤维染色及透射电镜观察创面BM形态,用蛋白印迹法测定角质形成细胞(KC)层粘连蛋白(LN)5 mRNA表达水平和LN含量。结果 胰岛素大鼠组再上皮化创面BM结构清晰完整。伤后10、14 d胰岛素组LN-5 mRNA表达水平高于对照组($P < 0.05$ 或 0.01)。创面完全再上皮化时两组大鼠LN-5 mRNA表达水平均减弱。伤后14 d及创面完全再上皮化时胰岛素组LN的蛋白表达量各为 56 ± 8 、 101 ± 13 ,显著高于对照组 39 ± 5 、 73 ± 16 ($P < 0.05$)。结论 烫伤创面皮下浸润注射0.1 U胰岛素可以加速创面再上皮化,改善再上皮化创面质量。

【关键词】 烧伤; 胰岛素; 基底膜; 再上皮化

The influence of topical application of insulin on the formation of basement membrane in scalded rats LIU Yan, ZHANG Xiong, ZHANG Zhi, XU Wei-shi. Department of Burns, Ruijin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, P. R. China

【Abstract】 Objective To investigate the influence of topical application of insulin on the formation of basement membrane (BM) in rats with deep partial thickness scald. Methods Ninety-six SD rats were inflicted with deep partial thickness scald on the back and were randomized into A group (n = 48, with subcutaneous injection of 2 ml of isotonic saline on the 1 post scald day (PSD)) and B group (n = 48, with subcutaneous injection of 0.1 U of insulin and 2 ml of isotonic saline on the 1 PSD). The rats received the treatment every other day until wound re-epithelialization completed. Then the rats were sacrificed on 2, 3, 4, 5, 6, 10, 14 PSD, and on the day when the wound re-epithelialized completely. The skin samples of 1 cm in width were harvested at the edge of the wound for reticular fiber staining and for morphological observation of the wound BM with transmission electron microscope. The expression of laminin-5 mRNA and laminin in keratinocyte was determined by RT-PCR and Western blotting, respectively. Results Integrated and continuous structure of the basement membrane was observed in B group. Laminin-5 mRNA expression was much higher in B group than that in A group on 10 and 14 PSD ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Laminin-5 mRNA expression was decreased in both groups when epithelialization completed. But the Laminin-5 protein expression on 14 PSD and the day of epithelialization (56 ± 8 , 101 ± 13) was obviously higher in B group than that in A group (39 ± 5 , 73 ± 16), ($P < 0.05$). Conclusion Subcutaneous injection of 0.1 U insulin beneath the scald wound is beneficial to the acceleration of the wound re-epithelialization process, and to the improvement of the wound healing quality.

【Key words】 Burns; Insulin; Basement membrane; Re-epithelialization

研究表明,创面下浸润注射胰岛素具有加速创面再上皮化的作用^[1],笔者在大鼠深Ⅱ度烫伤创面下注射胰岛素,观察其在再上皮化过程中对基底膜(basilar membrane, BM)形成的影响。

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)96只,体重200~230 g,雌雄不拘。用25 g/L戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔

内注射麻醉,背部脱毛。分笼饲养,自由进食、饮水。24 h后以同样方法麻醉后,将大鼠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),伤后立即腹腔内注射乳酸林格液5 ml复苏。并随机分为对照组(创面皮下浸润注射2 ml等渗盐水,48只)、胰岛素组[创面皮下浸润注射0.1 U长效混悬胰岛素(上海第一生化药业有限公司)+等渗盐水2 ml,48只]。两组大鼠均在伤后第1天开始注射,1次/2 d,直至创面完全上皮化。伤后2、3、4、5、6、10、14 d及

作者单位:200025 上海,第二医科大学瑞金医院烧伤科

创面完全再上皮化时, 每组每时相点处死 6 只大鼠, 取创缘 1 cm 宽皮片待测。

2. BM 形态观察: 取创面完全再上皮化标本。

(1) 按文献[2]进行网状纤维染色; (2) 标本经 25 g/L 戊二醛固定后, 10 g/L 锇酸固定, 系列脱水、环氧树脂浸透, 包埋, 制成 60 mm 厚切片, 经轴、铅双重染色, 透射电镜观察。

3. 层粘连蛋白(laminin, LN)5 mRNA 检测: 所取标本去除皮下组织, 剪成小块, 用 2.5 g/L 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(EDTA, 美国 Gibco 公司) 37℃ 消化 1 h, 穿磁仔细分离表皮细胞, 振荡吹打, 制备细胞悬液。取约 5×10^6 个细胞, Trizol 法提取总 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。PCR 扩增, 凝胶电泳, 凝胶图像分析仪分析目的基因与甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPD, 作为内参照) 灰度比值, 判断目的基因的相对表达量。上游引物为 5'-AGGTTG AATG ATACTGTGGGTG-3'; 下游引物为 5'-CGACTGCTGGGCGTTAGA-3'。

4. 蛋白印迹法检测表皮细胞 LN: 同上方法制备表皮角质形成细胞(keratinoocytes, KC) 细胞悬液, 取 5×10^7 个细胞, 沉淀后加入 10 mmol/L N-2-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES, 上海生工生物工程技术服务有限公司) 细胞裂解液; 10.0 mmol/L KCl, 0.1 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT), 0.2 mmol/L 苯甲磺酰氨(PMSF), 0.1 mmol/L 2-氨基乙基四乙酸(EGTA, 华美生物工程公司)。冰浴裂解 30 min, 12 000 × g 离心 15 min, 收集上清液, 4, 4'-二羧酸-2, 2'-二喹啉(BCA) 法检测各组上清液中的总蛋白浓度, 依蛋白浓度吸取适量体积样品使蛋白含量为 50 μg。行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 分析, 结果在 Fluors Multimager 图像分析仪上用美国 Bio-Rad 公司 Quantity One 4.0 版图像分析软件进行分析, 以相应蛋白条带平均光密度值(mean value intensity, MVI) 表示 LN 的表达。

5. 统计学处理: 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SAS6.12 软件行 *t* 检验。

结 果

1. BM 形态: (1) 网状纤维染色可见创面完全再上皮化时, 对照组部分棕黑色网状纤维染色阳性区域结构不连续(图 1)。胰岛素组表皮-真皮交界区银染染色阳性结构完整, 连贯性好, 略宽于对照组

(图 2)。(2) 透射电镜见对照组 BM 模糊、不连续, 有少量半桥粒形成, 表皮细胞分层少(图 3)。胰岛素组基底细胞排列整齐, BM 完整、连续, 半桥粒形态清晰, 分布均匀, 表皮细胞分层多, 厚度增加, 部分与真皮连接区域形成不规则的小突起(图 4)。

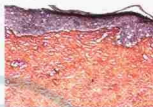


图 1 对照组创面完全再上皮化时部分棕黑色网状纤维染色阳性区域结构不连续。网状纤维染色 × 200。

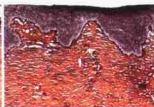


图 2 胰岛素组创面完全再上皮化时表皮-真皮交界区阳性结构完整。网状纤维染色 × 200。

Fig 1 There exhibited discontinuous structure of the positive staining region of partial brown black reticular fiber in A group when the wound reepithelialized completely. RFSX 200

Fig 2 There was positive silver staining in the junctional region of epithelial and dermal layers in B group with integral structure when the wound reepithelialized completely. RFSX 200



图 3 对照组创面完全再上皮化时 BM 模糊、不连续, 少量半桥粒形成(↑)。透射电镜 × 10 000

Fig 3 Discontinuous and unclear BM, with a few of clear hemidesmosome were observed in A group(↑). TEM × 10 000

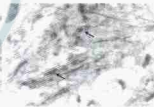


图 4 胰岛素组创面完全再上皮化时基底细胞排列整齐, BM 连续, 半桥粒形态清晰(↑)。透射电镜 × 10 000

Fig 4 Well arranged BM cells and clear hemidesmosome were observed in B group(↑). TEM × 10 000

2. LN-5 mRNA 表达: 伤后 6 d 开始, 可见两组大鼠 LN-5 mRNA 微弱表达, 伤后 10 d 达高峰, 以后逐渐降低。伤后 10、14 d 胰岛素组 MVI 值分别为 2.2 ± 0.5 , 1.2 ± 0.6 , 高于对照组 1.1 ± 1.4 , 0.3 ± 0.5 ($P < 0.05$ 或 0.01)。创面完全再上皮化时两组大鼠 LN-5 mRNA 表达均减弱, 组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3. LN 表达: 伤后 2、6、10 d 对照组与胰岛素组 LN 的蛋白表达无明显差异, 伤后 14 d 及创面完全再上皮化时胰岛素组 MVI 值分别为 56 ± 8 , 101 ± 13 , 明显高于对照组 39 ± 5 , 73 ± 16 ($P < 0.05$)。

讨 论

BM 位于表皮-真皮连接处, 将 KC 与其下的间质细胞分隔, 通过半桥粒和锚着纤维等结构使 KC 与 BM 紧密连接以抵抗外力。BM 的主要成分为:

LN 和 IV、VII 型胶原等, LN、IV 型胶原主要由表皮基底细胞合成, 是 BM 稳定的支持结构³, 再上皮化时重建的 BM 质量影响着创面愈合质量。皮肤组织中网状纤维主要分布于 BM 区域, 因网状纤维能与银离子结合呈黑色而使 BM 带在光镜下显示黑色条状外观, 网状纤维中断意味着 BM 构建不良或完整性被破坏。本研究中的网状纤维染色显示, 胰岛素组 BM 带完整、清晰; 透射电镜观察也显示了胰岛素组再上皮化创面表皮细胞层次多, 基底细胞排列整齐, BM 完整、清晰, 半桥粒数量多, 而对照组表皮细胞分化相对较差, BM 不连续, 表皮钉脚数量较少。伤后 14 d 和创面完全再上皮化时胰岛素组 LN 的量明显高于对照组, 显示 KC 可分泌较多的 LN, 参与 BM 的构建。LN-5 是由 α 、 β 、 γ 3 个亚单位构成的异三聚体⁴, 可与 VII 型胶原的 NC-1 结构域的 NH2-端, 通过 $\alpha 6\beta 4$ 整合素将基底层细胞与 BM 致密层内的 VII 型胶原连接起来⁵, LN-5 还可与 LN-6/7 形成复合物, 通过巢蛋白和 $\alpha 3\beta 1$ 与 IV 型胶原结合⁶。这些细胞外基质的相互连接, 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。LN-5 除了在 BM 结构中的重要作用, 还具有调控 KC 的黏附和迁移等⁷生物学功能。创伤后被活化的 KC 增殖, 自身分泌的 LN-5 与纤维连接蛋白 (fibronectin, FN)、胶原一起为 KC 的迁移提供了一种暂时性的细胞外基质, KC 在 LN-5、FN 等细胞外基质上的迁

移, 使创面得以被新生表皮覆盖, LN-5 的增加将促进这一过程, 胰岛素组再上皮化加速也可能与此有关。

本实验结果表明, 胰岛素组再上皮化时 BM 的重建优于对照组。胰岛素创面下浸润注射除可以加速烫伤创面再上皮化外, 还可以改善再上皮化创面质量, 而局部注射 0.1 U 胰岛素后对大鼠血糖水平未造成明显影响。

参 考 文 献

- 1 刘琰, 章雄, 张志, 等. 局部应用胰岛素对烫伤大鼠创面愈合的影响. 中华烧伤杂志, 2004, 20: 98 - 101.
- 2 仲剑平, 主编. 医疗护理技术操作常规. 第 4 版. 北京: 人民军医出版社, 1998. 2000 - 2001.
- 3 Andriani F, Margulis A, Lin N, et al. Analysis of microenvironmental factors contributing to basement membrane assembly and normalized epidermal phenotype. J Invest Dermatol, 2003, 120: 923 - 931.
- 4 Ryan MC, Tizard R, VanDevanter DR, et al. Cloning of the LamA3 gene encoding the alpha 3 chain of the adhesive ligand epiligrin. Expression in wound repair. J Biol Chem, 1994, 269: 22779 - 22787.
- 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 Zhang K, Kramer RH. Laminin 5 deposition promotes keratinocyte motility. Exp Cell Res, 1996, 227: 309 - 322.

(收稿日期: 2004 - 11 - 11)

(本文编辑: 张 红)

· 病例报告 ·

电击后并发癔病一例

张树林 葛军 生孟军 张歆媛

患者女, 30 岁。在工作中不慎左手触及 220 V 交流电源插座, 当时感觉左上肢麻木、胀痛, 随着情绪变化, 患者伤后第 3 天不能起立, 强行搀扶站立时身体歪向右侧, 左下肢不能负重或迈步。伤后第 3 天入院, 查体: 患者意识清楚, 无谵妄, 表情愁苦, 问答切题, 对自己病程经过能完整描述, 自知力基本完整, 未见怪异行为。左手皮肤无电击入口及热烧伤创面。神经系统检查: 右上、下肢肌力、肌张力正常, 腱反射正常, 病理征 (-)。左上、下肢肌张力增高, 肌力差, 病理征 (-), 但在注意力被转移时可自主活动, 肌张力正常。感觉检查: 左上、下肢及左侧躯干痛觉减退, 无明显分界线。辅助检查: 头颅磁共振扫描未见异常。肌电图显示左上肢正中神经、尺神经、左下肢胫神经及运动、感觉神经传导速度正常。脑电图及心电图正常。(1) 暗示疗法: 静脉缓慢滴注 100 g/L 葡萄糖酸钙 10 ml 加 500 g/L 葡萄糖 10 ml, 1 次/d, 连用 5 d。

(2) 镇静: 口服阿普唑仑片, 0.4 g/次, 3 次/d。(3) 心理疗法: 尽量满足患者的合理要求。治疗 1 周后患者可下床活动。

讨论 癔病¹是神经官能症中常见的一种, 其临床表现包括精神、神经和躯体等方面的各种症状, 患者表现出强烈的情绪性。在症状发生后和治疗过程中, 暗示和自我暗示可起到重要的作用。本例患者在电击后皮肤无任何损伤, 未出现意识丧失, 在听到亲属讲述电击伤可造成瘫痪后, 躯体遂出现运动功能障碍。查体未见与临床症状相应的阳性体征, 辅助检查结果无异常。经过暗示及心理治疗效果显著, 符合癔病的诊断标准。本例患者既往无癔病史、无精神病家族史, 考虑电击是患者癔病发生的诱因。

参 考 文 献

- 1 沈渔邨, 主编. 精神病学. 北京: 人民卫生出版社, 1980. 305.

(收稿日期: 2005 - 04 - 05)

(本文编辑: 赵 敏)

作者单位: 065000 廊坊, 中国石油天然气集团总公司中心医院烧伤科