

HaCaT cell

烧伤创面愈合的速度及质量是评价治疗水平高低的重要指标之一,它常取决于角质形成细胞的功能^[1]。近年来观察到,在皮肤创伤修复过程中,过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptors, PPAR) β 可以诱导角质形成细胞增殖、分化、迁移,从而有利于创面修复^[2]。本实验拟采用 PPAR β 反义寡脱氧核苷酸(asODN)下调其在人永生化角质形成细胞株——HaCaT细胞中的表达,观察 PPAR β 在肿瘤坏死因子(TNF) α 所致 HaCaT 细胞凋亡中的作用。

材料与方 法

1. 主要材料来源:HaCaT 细胞(美国 ATCC 公司),MEM 培养基、Trizol 试剂(美国 Gibco 公司),无支原体胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),噻唑蓝(MTT)、hoechst 33258、辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗鼠 IgG 或羊抗兔 IgG(美国 Sigma 公司),PPAR β 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),TNF- α (美国 Promega 公司),半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(caspases)比色测定试剂盒(美国 R&D 公司),二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);脂质体试剂盒(美国英杰公司)。荧光显微镜(日本 Olympus 公司),1601 型紫外分光光度计(日本岛津公司),PCR 扩增仪(美国 Gene 公司),酶标仪(美国 Perkin Elmer 公司)。

2. 细胞培养与 2 种寡脱氧核苷酸的合成:常规复苏 HaCaT 细胞后,接种于加有 MEM 培养基(1 L MEM 培养基含丙酮酸钠 0.11 g、NaHCO₃ 2 g、非必需氨基酸 10 ml、胎牛血清 150 ml)的培养瓶中,置 37℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养。PPAR β asODN 及其错义寡脱氧核苷酸(scrODN)由上海博亚生物技术有限公司合成后硫代修饰,高压液相色谱纯化而成。序列如下:asODN, 5'-TACCTCGTCTGTCCTCCT-3'; scrODN, 5'-ACGCCTTTGCCTCCTGTCCT-3'。

3. 细胞转染与分组:待细胞生长达亚融合时,将细胞传代(1:3)并贴壁 24 h,随机分为:(1)正常对照组,不进行转染;(2)对照组,单纯用脂质体处理,根据试剂盒转染说明书操作;(3)scrODN 组,转染 PPAR β scrODN;(4)asODN 组,转染 PPAR β asODN;(5)TNF- α 组,受 TNF- α 刺激;(6)scrODN + TNF- α 组,同 scrODN 组处理后,受 TNF- α 的刺激;(7) asODN + TNF- α 组,同 asODN 组处理后,受 TNF- α

的刺激。PPAR β scrODN 或 asODN 均为 4 μ mol/L, TNF- α 为 10 μ g/L。各组细胞于 37℃、含体积分数 5% CO₂ 的培养箱中孵育不同时间。

4. 采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)观察前 4 组细胞 PPAR β mRNA 的表达水平:以 Trizol 试剂抽提 HaCaT 细胞的总 RNA,采用 Primer 3 软件设计引物,PPAR β 的上游引物:5'-GAGCAGCCACAGGAGGAAGCC-3',其下游引物:5'-CCGTCACAGCCCATC-TGCAGT-3'。以 HaCaT 细胞的总 RNA 为模板,采用 PCR 扩增仪进行 RT-PCR,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPD)为内参照。扩增产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳,溴乙啶染色后照相。

5. 应用蛋白质印迹(Western blot)法分析前 4 组细胞 PPAR β 蛋白质的表达水平:用十二烷基硫酸钠加样缓冲液裂解培养 24 h 的细胞,收集蛋白质,采用 Bradford 法^[3]进行蛋白定量。将制备好的蛋白样品置于 -80℃ 冰箱中保存备用。以每泳道 20 μ g 蛋白上样,经聚丙烯酰胺凝胶电泳后,电转膜至硝酸纤维素膜,封闭后加入 PPAR β 多克隆抗体,室温孵育 2 h,再加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 或兔抗鼠 IgG 孵育 40 min, DAB 显色,拍摄照片。

6. 细胞的凋亡情况:将各组培养 24 h 时的细胞(对照组除外)常规涂片、固定,hoechst 33258 染色后封片。荧光显微镜下,正常细胞核呈弥散、均匀的绿色荧光,凋亡细胞则呈深染、致密颗粒的块状绿色荧光。计数 500 个细胞核,凋亡核百分率 = 凋亡细胞核数量 \div 500 \times 100%,各组重复测定 3 次。

7. 采用 MTT 比色测定法观察细胞的存活情况:将细胞以 1×10^4 /孔接种于 96 孔板中培养 24 h 后,除不设对照组外基本同上分组,继续培养 24 h。每孔加入 5 g/L 的 MTT 25 μ l, 37℃ 下孵育 4 h 后,小心吸弃孔内上清液并终止培养,加入 150 μ l 裂解缓冲液,振荡 10 min 并以裂解缓冲液调零,采用酶标仪于波长 490 nm 下测定吸光度(A)值,各组重复测定 3 次。

8. caspase-3 活性的检测:按照 caspases 比色测定试剂盒说明书操作。将各组培养 12 h 的细胞(对照组除外)用裂解液(2×10^4 个细胞/ μ l)在冰上裂解 10 min,于 4℃ 下 $12\ 000 \times g$ 离心 1 min,取 5 μ l 上清液进行蛋白定量。用紫外分光光度计测定波长 595 nm 的 $A_{595\text{ nm}}$ 值;另取 45 μ l 上清液,加 50 μ l 2 倍浓缩的反应缓冲液及 5 μ l 反应底物,于 37℃ 下

孵育1 h,测定波长为405 nm的 $A_{405\text{nm}}$ 值。caspase-3的活性 = $A_{405\text{nm}}\text{值} / A_{595\text{nm}}\text{值}$,各组重复测定3次。

9. 统计学处理:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS

10.0统计软件进行 t 检验、单因素方差分析。

结 果

1. RT-PCR 结果显示,与正常对照组比较,asODN组 HaCaT细胞 PPAR β mRNA的表达明显受到抑制;scrODN组、对照组则无明显变化(图1)。

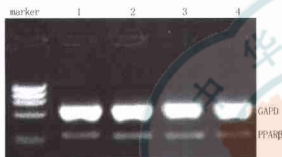


图1 4组 HaCaT细胞 PPAR β mRNA的表达情况。1.正常对照组;2.对照组;3. scrODN组;4. asODN组

2. Western blot 分析显示,与正常对照组比较,asODN组 HaCaT细胞内 PPAR β 蛋白质的表达水平明显降低;余下两组则与之相近(图2)。

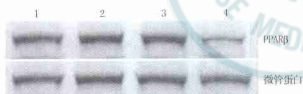


图2 4组 HaCaT细胞 PPAR β 的蛋白质表达水平。1.正常对照组;2.对照组;3. scrODN组;4. asODN组

3. 正常对照组、asODN组、scrODN组的细胞核呈现弥散、均匀的绿色荧光。TNF- α 组、scrODN + TNF- α 组出现大量的凋亡细胞,细胞核呈现深染,致密颗粒的块状绿色荧光,凋亡核百分率分别为 $(33.1 \pm 2.7)\%$ 、 $(32.9 \pm 3.0)\%$;asODN + TNF- α 组凋亡细胞明显多于上述2组,凋亡核百分率 $(58.8 \pm 4.6)\%$ ($P < 0.05$)。见图3,4。

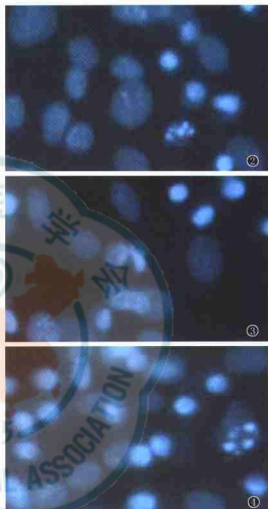
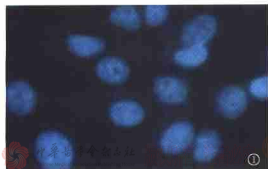


图3 4组 HaCaT细胞的凋亡情况。hoechst 33258 \times 400。1.正常对照组;2. TNF- α 组;3. scrODN + TNF- α 组;4. asODN + TNF- α 组;正常对照组细胞核呈现均匀荧光,后3组细胞核呈现深染颗粒的块状荧光

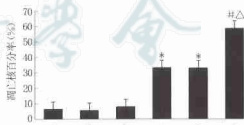


图4 各组 HaCaT细胞凋亡核百分率比较。1.正常对照组;2. scrODN组;3. asODN组;4. TNF- α 组;5. scrODN + TNF- α 组;6. asODN + TNF- α 组;与第1组比较,* $P < 0.05$,# $P < 0.01$;与第4,5组比较, $\Delta P < 0.05$

4. 细胞存活情况:正常对照组、scrODN组及asODN组 $A_{490\text{nm}}$ 值较高。与正常对照组比较,TNF- α 组、scrODN + TNF- α 组 $A_{490\text{nm}}$ 值明显下降($P < 0.05$);asODN + TNF- α 组则较正常对照组下降更为明显($P < 0.01$)。见图5。

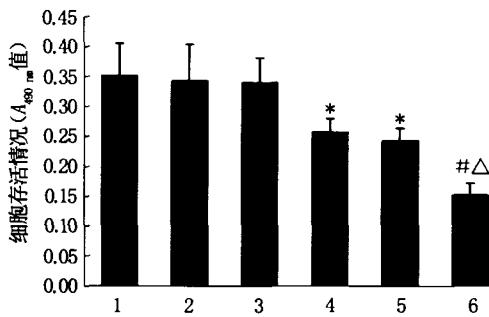


图 5 各组 HaCaT 细胞的存活情况。1. 正常对照组; 2. scrODN 组; 3. asODN 组; 4. TNF-α 组; 5. scrODN + TNF-α 组; 6. asODN + TNF-α 组; 与第 1 组比较, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$; 与第 4、5 组比较, Δ $P < 0.05$

5. 与正常对照组比较, asODN 组或 scrODN 组细胞 caspase-3 活性无明显改变; scrODN + TNF-α 组、TNF-α 组 caspase-3 的活性升高 ($P < 0.05$), 而 asODN + TNF-α 组 caspase-3 活性则进一步升高 ($P < 0.01$)。见图 6。

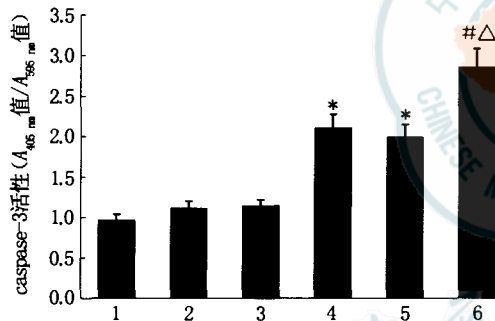


图 6 各组 HaCaT 细胞 caspase-3 活性的比较。1. 正常对照组; 2. scrODN 组; 3. asODN 组; 4. TNF-α 组; 5. scrODN + TNF-α 组; 6. asODN + TNF-α 组; 与第 1 组比较, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$; 与第 4、5 组比较, Δ $P < 0.05$

讨 论

皮肤是机体的保护性屏障,当机体遭受各种侵袭与损伤导致皮肤的完整性丢失时,在损伤部位需优先重建有效的皮肤屏障以防止水、电解质的丢失和各种病原微生物感染的发生。创面愈合是烧伤治疗的最终目标^[4],很大程度上取决于角质形成细胞的功能^[1]。角质形成细胞是创面修复的两种关键细胞之一,也是创面再上皮化的源泉^[5]。如何增加创面中角质形成细胞的存活数,成为烧伤治疗的首要问题。烧伤治疗中另一个重要问题是炎症因子的增加。有研究表明,烧伤后 TNF-α 水平明显升高,与烧伤的严重程度显著相关^[6]。血清中 TNF-α 水平的升高可促使角质形成细胞凋亡。本研究结果显示,HaCaT 细胞经 10 μg/L TNF-α 损伤后可出现大量凋亡细胞,凋亡核百分率明显升高,MTT 法检测

显示细胞存活数减少。表明 TNF-α 导致了 HaCaT 细胞凋亡。

PPARβ 是核激素受体家族成员中配体诱导激活的转录因子。当配体与它结合时,其与维甲酸 X 受体 (RXR) 形成异源体,进而使 PPARβ-RXR 异源二聚体结合到靶基因上游的 DNA 反应元件上,调节基因的转录。Michalik 等^[7]的研究证明,皮肤修复过程中角质形成细胞内 PPARβ 的表达均上调,而且皮肤结构正常的 PPARβ^{+/-}杂合子鼠皮肤创面修复的时间较 PPARβ^{+/+}野生型鼠推迟 2~3 d。此外,PPARβ^{+/-}杂合子鼠的角质形成细胞不能形成合适的细胞外基质,缺乏细胞与细胞的联系,从而不能迁移到创面边缘^[8]。Schmuth 等^[9]应用 PPARα、PPARβ 的双激动剂 GW1514 促进角质形成细胞分化,是由 PPARβ 所介导,且激活 PPARβ 的促分化效果较经典的增加角质形成细胞培养基钙离子浓度诱导分化的效果更加明显。还有研究表明,PPARβ 直接通过上调整合素连接激酶 (ILK)、磷酸依赖激酶 (PK) 1 激活 Akt1 来调节抗凋亡效应^[10]。本实验也证明,PPARβ asODN 促进了 TNF-α 诱导的 HaCaT 细胞凋亡。

asODN 是人工合成的单链小片段核苷酸,它进入细胞内,与基因组 DNA 发生特异性结合,进而阻断 mRNA 的转录过程。本研究结果表明,用 PPARβ asODN 转染受 TNF-α 刺激的 HaCaT 细胞,可明显减轻胞内 PPARβ mRNA 的转录及蛋白质表达,并增加凋亡核百分率、减少存活细胞数、增强 caspase-3 的活性。因此笔者设想,人为地干预、调控 PPARβ 在机体内的表达,或使用 PPARβ 配体类药物激活它并加强其表达来阻止角质形成细胞的凋亡,将有望为创面修复开辟新的途径。

参 考 文 献

- 1 贾赤宇,陈璧. 角质细胞与创面愈合. 中华烧伤杂志, 2001, 17: 373-375.
- 2 Tan NS, Michalik L, Di-Poi N, et al. Critical roles of nuclear receptor PPARbeta (peroxisome proliferator-activated receptorbeta) in skin wound healing. Biochem Soc Trans, 2004, 32 (Pt 1): 97-102.
- 3 Ausubel F, Brent R, Kingston RE, 等主编. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1998. 332-333.
- 4 郭振荣, 李利根, 李烽. 重视烧伤后补锌, 促进创面愈合. 中华烧伤杂志, 2001, 17: 202-203.
- 5 Coulombe PA. Wound epithelialization: accelerating the pace of discovery. J Invest Dermatol, 2003, 121: 219-230.
- 6 肖锦华, 白鹤林, 朱华燕, 等. 烧伤患者血清 IL-6 和 TNF-α 的检测及分析. 标记免疫分析与临床, 1999, 6: 246-247.
- 7 Michalik L, Desvergne B, Tan NS, et al. Impaired skin wound

- healing in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and PPARbeta mutant mice. *J Cell Biol*, 2001, 154:799-814.
- 8 Di-Poi N, Michalik L, Tan NS, et al. The anti-apoptotic role of PPARbeta contributes to efficient skin wound healing. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2003, 85:257-265.
- 9 Schmuth M, Haqq CM, Cairns WJ, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- β/δ stimulates differentiation and lipid accumulation in keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 2004, 122: 971-

983.

- 10 Di-Poi N, Tan NS, Michalik L, et al. Antiapoptotic role of PPAR-beta in keratinocytes via transcriptional control of the Akt1 signaling pathway. *Mol Cell*, 2002, 10:721-733.

(收稿日期:2005-11-21)

(本文编辑:莫愚)

· 经验交流 ·

深度烧伤创面切削痂植皮术对肾功能的改善作用

涂家金 方瑞红 周华 黄毅 邓勇军

临床资料:笔者单位 2004 年 10 月—2005 年 10 月收治烧伤患者 48 例,其中男 32 例、女 16 例,年龄 9 个月~78 岁[(30.0 \pm 0.6)岁],烧伤总面积 18%~96%,其中深 II 度 16%~31%、III 度 25%~63% TBSA。致伤原因:开水烫伤 28 例、火焰烧伤 10 例、电烧伤 6 例、化学烧伤 4 例。合并吸入性损伤 2 例,全身性感染 34 例。肾功能损害情况:患者的血肌酐值均升高;少尿型者 4 例,多尿型者 44 例;尿钠增高者 36 例;尿比重 <1.012 者 35 例;血容量不足者 34 例。

治疗方法:参照文献[1]于伤后 3~7 d 切除患者的坏死组织,每次切削痂面积为 15%~50% TBSA。切削痂后,43 例患者行邮票皮移植术,5 例行微粒皮移植+异体皮覆盖术。按常规处理烧伤创面并行全身抗感染、营养支持、内脏保护等对症治疗。

肾功能评分标准²及疗效评价:(1)血容量不足、尿量约 40 ml/h、尿钠及血肌酐正常者,肾功能损害程度为 1 分。(2)血容量不足、20 ml/h < 尿量 < 40 ml/h、应用呋塞米后尿量可增多、尿钠 20~30 mmol/L、血肌酐约为 176.8 μ mol/L 者,肾功能损害程度为 2 分。(3)血容量不足、无尿或少尿(尿量 < 20 ml/h,并且持续 6 h 以上)、应用呋塞米冲击后尿量不增多、尿钠 > 40 mmol/L、血肌酐 > 176.8 μ mol/L、尿比重 \leq 1.012,肾功能损害程度为 3 分。(4)无上述情况者为 0 分。术后 1 周评价肾功能情况(分次手术者以末次手术为起算时间):肾功能损害程度为 0 分者视为治愈;与术前相比,减少 1~2 分为好转;评分未减少或评分增加视为无效。

结果:术后 1 周,47 例患者血肌酐水平低于术前(36 例达正常水平),多尿 2 例,尿钠增高 2 例,1 例尿比重略低于 1.012,无少尿、血容量不足现象。术后 1 周肾功能情况的评价:治愈 36 例;好转 10 例(术前 3 分、术后 2 分者 2 例,术前 3 分、术后 1 分者 2 例,术前 2 分、术后 1 分者 6 例);无效 2 例(术前、术后均为 3 分)。其中术后 3 d 肾功能明显好转者 30 例。无效的 2 例患者于术后 3 周治愈。

讨论 多种体液介质及细菌毒素、细胞因子、代谢物蓄积等是直接导致肾功能损害的主要原因³。烧伤组织坏死、分解及创面细菌繁殖易引起全身反应,所产生的大量毒性产物,包括细菌毒素、创面坏死物质、体内异常代谢产物或中间

产物(如氧自由基)、体液炎性介质、细胞因子等会直接导致脏器功能损害,引发多器官功能衰竭(MOF)。创面组织坏死分解所引发的烧伤毒血症是引起脏器功能损害的重要因素。烧伤毒血症中的毒素具有两种意义:(1)创面毒素:为烧伤坏死组织的分解产物。(2)细菌毒素:包括内毒素和外毒素,以内毒素为主。已发现的创面毒素有数十种之多,主要包括凝血坏死蛋白质降解所产生的多肽类物质、脂质过氧化物、脂蛋白复合物、长链脂肪酸。研究表明,烧伤毒素具有如下特性⁴:(1)致小白鼠死亡。(2)具有抗原性,可引起免疫功能紊乱。(3)对内脏具有明显的损伤作用。(4)使红细胞脆性增加,发生溶血现象。(5)毒素要达到一定浓度时才能表现出作用。

表面看来,切削痂植皮术是一种创伤性手术,对肾功能有一定的损害,实质上可及时去除坏死组织并修复深度烧伤创面,减轻炎症反应,减少烧伤后毒素的吸收,最终缓解烧伤毒血症,有利于脏器功能的恢复。即使烧伤患者出现肾功能损害,只要其生命体征平稳、一般情况允许,即可进行切削痂植皮术;若面积太大,可分期进行手术,对出现感染且欠干燥、欠清洁的深度创面应优先处理。切削痂的深度太浅会影响植皮成活率,若过深既加重损伤又影响预后美观⁵。四肢切削痂过深时,应常规使用止血带止血,以防失血过多。术后 3 d,本组患者肾功能恢复的有效率达 62.5%,术后 1 周达 95.8%,术后 3 周达 100.0%。由此表明,烧伤后立即行切削痂植皮术,除能更快修复烧伤创面外,还有利于肾功能的恢复。

参 考 文 献

- 郝振明,雷晋.成人特重度烧伤 46 例治疗体会.山西医药杂志,2004,33:598-600.
- 盛志勇,郭振荣,主编.危重烧伤治疗与康复学.北京:科学出版社,2000.232.
- 李德祥,严明忠,吕爱民,等.烧伤创面切削痂植皮对纠正烧伤后肾脏损害的价值.临床军医杂志,2004,32:71-73.
- 黎鳌,主编.烧伤治疗学.第 2 版.北京:人民卫生出版社,1995.257-262.
- 毛远桂,张志安,肖长辉,等.削痂术在 III 度烧伤创面的应用.中华烧伤杂志,2004,20:244.

(收稿日期:2006-01-17)

(本文编辑:莫愚)