

凝血酶肽类对创面愈合及表皮细胞增生与移行的作用研究

黄跃生 杨宗城 DH Carney 黎鳌

【摘要】 目的 探讨新合成的凝血酶受体激活肽 TP508 对创面愈合及表皮细胞增生与移行的作用。方法 SD 大鼠 18 只,麻醉下在每一大鼠背部作 4 个直径 1.5 cm 圆形皮肤切除创面。TP508 治疗组 9 只大鼠,每 1 创面用 TP508 0.1 μg (40 μl) 治疗。对照组 9 只大鼠用 40 μl 等渗盐水处理。用 JAVA Jandel 和 IMAGE PRO 图形处理软件计算创面面积。人表皮细胞 NHEK945 增生采用 MTT 测定法和细胞计数仪直接计数法。细胞移行实验采用 48 孔 Boyden 细胞移行测定板进行,移行至滤膜下表面的细胞数以斑点密度表示。结果 术后 7 d 和 14 d, TP508 处理组创面面积分别为盐水组的 73.7% 和 45.4% ($P < 0.01$)。凝血酶、TP508 显著促进表皮细胞增生。培养液组细胞移行斑点密度为 76.6 ± 13.8 , 添加 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 凝血酶和 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TP508, 其斑点密度分别增至 104.4 ± 12.2 和 109.4 ± 14.6 。结论 凝血酶及 TP508 对大鼠皮肤切除创面愈合及人表皮细胞增生与移行均有显著作用,后者在一定程度上解释了 TP508 促进创面愈合的机理。

【关键词】 创面愈合;凝血酶肽类;表皮细胞;细胞增生;细胞移行

Effects of thrombin peptides on wound healing and proliferation and migration of normal human epidermal keratinocyte (NHEK) HUANG Yuesheng¹, YANG Zongcheng¹, DH Carney², et al. ¹Institute of Burn Research, Southwestem Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; ²Department of HBC & G, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX 77555

【Abstract】 Objective To define the effects of thrombin peptides on wound healing and NHEK proliferation and migration. **Methods** A wound model was made with four 1.5 cm circular full thickness dermal excisions on the back of each Sprague-Dawley rat. 0.1 μg (40 μl) TP508 was applied to each circular excisional wound in 9 rats, the other 9 received saline only. Wound area was calculated with JAVA Jandel and IMAGE PRO software. NHEK945 proliferation was assessed by MTT assay and direct cell count with a Coulter Counter. Cell migration was determined by 48-well Boyden Chamber. Cells migrated onto the lower surface of the filter were assessed by a ChemImager 4000 Image Analyzer and expressed as spot density. **Results** Wound area in rats treated with TP508 was 73.7% and 45.4% of saline control on day 7 and 14, respectively. NHEK945 proliferation was accelerated after adding thrombin and TP508. The spot density of migrated cells was 76.7 ± 13.8 in medium alone. After adding 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of thrombin and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of TP508, the spot density was 104.4 ± 12.2 and 109.4 ± 14.6 , respectively. **Conclusion** Results of this study suggest that both thrombin and TP508 have significant actions on wound healing and NHEK proliferation and migration, which is important in wound repair.

【Key words】 Wound healing; Thrombin peptides; Epidermis; Cell proliferation; Cell migration

如何提高创面愈合速度仍是一个尚待解决的问题。众所周知,在烧伤、外伤及其它创面愈合过程中,表皮细胞的增生和移行起着至关重要的作用。这一过程又受诸如感染、局部组织营养状况以及某些生长因

子的影响。研究发现,凝血酶在促进创面愈合方面起重要作用。据此,Carney 等^[1]合成了一种凝血酶受体激活肽 TP508。TP508 仅结合并活化细胞表面的高亲合性凝血酶受体,刺激细胞分裂和趋化信号,参与早期组织修复过程,而无促凝作用^[1-3]。但 TP508 促进创面愈合的作用是否与刺激表皮细胞增生与移行有关,尚未进行过研究。在本文中对此进行了探讨。

作者单位:400038 重庆 第三军医大学附属西南医院烧伤研究所(黄跃生,杨宗城,黎鳌);美国德克萨斯大学加尔维斯顿医学分校人类生物化学与遗传学系(DH Carney)

1 材料与方法

1.1 动物实验

成年 SD 大鼠 18 只, 体重 280~340 g, 经异氟烷吸入和腹腔注射苯巴比妥钠 (50 mg/kg) 麻醉后脱毛, 在大鼠背部作 4 个直径 1.5 cm 圆形皮肤切除制作创面模型。每 1 创面涂布 0.1 μg (40 μl) TP508 或 40 μl 等渗盐水。术毕自由进食、水。再于术后 7、14 d, 观察创面轮廓并用醋酸纸描记, 输入计算机用 JAVA Jandel 和 IMAGE PRO 图形处理软件计算出创面面积。

1.2 体外实验

1.2.1 细胞株及试剂 正常人表皮细胞 NHEK945 (胎儿)、表皮细胞基础培养液 KBM-2 及添加剂、胰蛋白酶/EDTA、胰蛋白酶中和剂等均购自美国 Clonetics 公司 (San Diego, CA), 表皮细胞生长培养液 KGM-2 由 KBM-2 与添加剂配制而成。 α -凝血酶购自美国 Albany 医学院 (Albany, N. Y.), 凝血酶受体激活肽 TP508 由美国 Peninsula 实验室合成 (Bellmont, CA)。MTT 染料等购自美国 Sigma 化学品公司, 48 孔 Boyden Chamber 及 8.0 μm 孔径滤膜购自美国 Neuro Probe 公司 (Cabin John, MD)。

1.2.2 NHEK 培养 采用 KGM-2 进行传代培养, 达 60%~80% 融合时, 胰蛋白酶消化, 用 KGM-2 调细胞浓度至 12 500/ml, 移至培养瓶, 置 CO_2 培养箱 (CO_2 Water-Jacketed Incubator, Nuaine 公司, Plymouth, MN), 定时更换培养液。实验采用第 3 和第 4 代细胞。

1.2.3 MTT 测定 将细胞接种于 96 孔培养板, 置 CO_2 培养箱过夜, 次日更换培养液, 并加入 α -凝血酶、TP508。3 d 后, 再更换培养液及 α -凝血酶、TP508, 继续培养 3 d。然后加入 MTT 2 h。弃去培养液, 用酸化异丙醇溶解 MTT 晶体, 立即在 ELISA 光密度仪 (Molecular Devices, CA, USA) 读取光密度。

1.2.4 直接细胞计数 将细胞接种于 24 孔培养板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。培养时间与方法同上。用胰蛋白酶/EDTA 消化细胞, 将其移入 PBS-叠氮钠溶液中, 用 Coulter Counter 细胞计数器 (Coulter Electronics, Inc., Florida, USA) 直接测定细胞数。

1.2.5 细胞移行测定 采用 48 孔 Boyden Chamber。先将不同浓度 α -凝血酶、TP508 溶液加入 Boyden Chamber 下层各孔中, 依次放上滤膜和 Boyden Chamber 上层, 于上层各孔中加入细胞液。置 37 $^{\circ}\text{C}$ 6 h, 取下滤膜, 刮除滤膜表面 (细胞悬液面) 贴附的细胞, 滤膜经 2% 多聚甲醛固定, 去离子水洗涤, 置 0.5% Crystal violet 中染色, 去离子水洗涤。用 ChemiImager 4000 型影像分析仪 (Alpha Inntech Corporation, San Leandro, CA, USA) 测定移行至滤膜下表面的细胞数, 以斑点 (每孔)

密度表示。

统计学处理: 采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为相差显著, $P < 0.01$ 为相差非常显著。

2 结果

2.1 TP508 对大鼠背部创面愈合的作用

TP508 显著加速创面的愈合过程。如图 1 所示, 术后 7 d, 盐水组创面面积为 87.7 mm^2 , 而 TP508 处理组仅 64.6 mm^2 , 为盐水组的 73.7%。术后 14 d, 盐水组仍达 42.5 mm^2 , 而 TP508 处理组创面面积进一步缩小至 19.3 mm^2 , 仅为盐水组的 45.5%, 两组差异非常显著 ($P < 0.01$)。

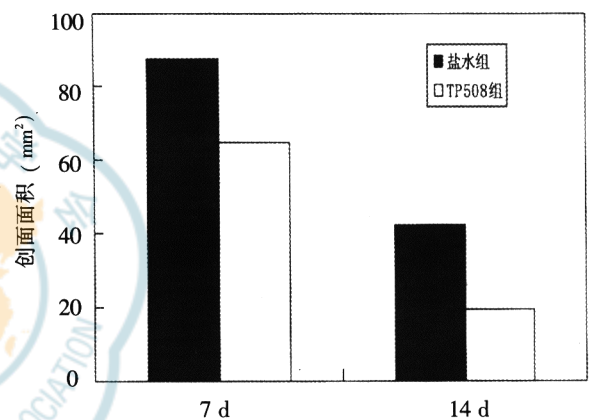


图 1 TP508 对大鼠背部创面愈合的作用

Fig 1 Effect of TP508 on wound healing in rats

2.2 MTT 测定结果

当 α -凝血酶浓度为 0.625 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, NHEK 增生较单纯培养液增加 52.1%。使用浓度为 16.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 TP508, NHEK 增生较单纯培养液增加 68.2%, 见图 2。

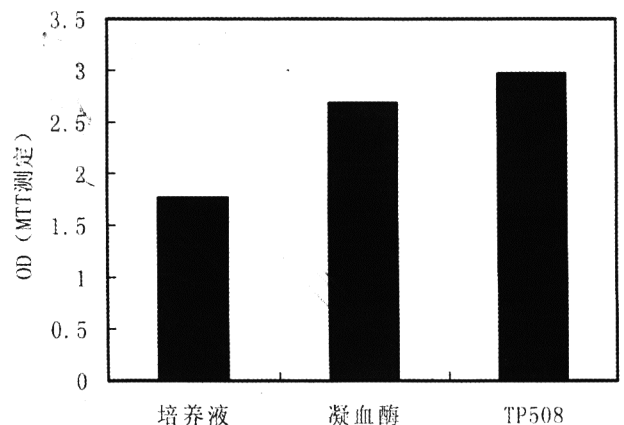


图 2 凝血酶肽类对 NHEK 增生的作用 (MTT 测定)

Fig 2 Effect of thrombin peptide on NHEK proliferation (MTT assay)

2.3 直接细胞计数

直接细胞计数见图3。 α -凝血酶、TP508质量浓度分别为0.625 $\mu\text{g/ml}$ 和16.7 $\mu\text{g/ml}$ 。

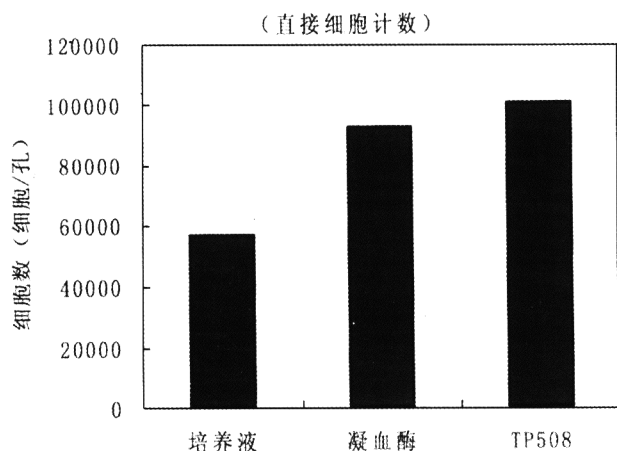


图3 凝血酶肽类对NHEK增生的作用

Fig 3 Effects of thrombin peptide on NHEK proliferation

2.4 凝血酶肽类对NHEK移行的作用

凝血酶肽类对NHEK移行有显著作用,如图4所示,TP508为10 $\mu\text{g/ml}$ 和凝血酶1 $\mu\text{g/ml}$ 时,其斑点密度分别为每孔109.4 \pm 14.6和104.4 \pm 12.2,显著高于对照组($P < 0.05$)。

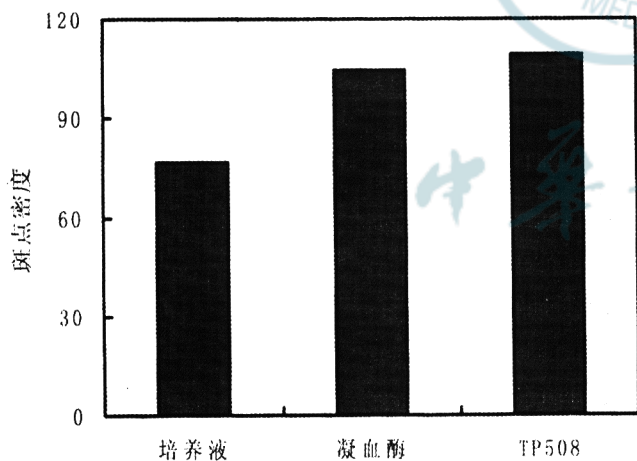


图4 凝血酶肽类对NHEK移行的影响

Fig 4 Effect of thrombin peptide on NHEK migration

3 讨论

在创面愈合过程中,生长因子起着十分重要的作用。但是,使用外源性生长因子尚有不足或副作用,如:①需要使用重组的产品以防止过敏等,增加了成本;②可能过度刺激某些细胞(如成纤维细胞等)增生,导致疤痕形成;③有潜在的全身性作用,甚至有促进某

些细胞转化的副作用^[4]。研究发现^[2],凝血酶除在血液凝固过程中起重要作用外,还参与创面愈合过程。例如,凝血酶可引起早期血管变化,增加血管通透性,使细胞和体液成分进入受损组织;使内皮细胞合成释放血小板衍生生长因子(PDGF);增加血小板和中性粒细胞与内皮细胞的粘附;增加单核细胞和T细胞与内皮细胞的粘附。除这些早期的微血管作用外,凝血酶还可刺激中性粒细胞趋化,激活T细胞使之释放IL-6,刺激成纤维细胞、上皮细胞、内皮细胞和人表皮细胞^[5]增生。这提示凝血酶在创面愈合过程中起重要作用。

但如前所述,凝血酶作为一种生长因子也存在一些不足。除了天然重组 α -凝血酶产量少和价格较贵外,因其作用广泛,使其适应证受一定限制。例如,凝血酶可促进血管内皮细胞增生,但由于其具有凝血作用,不能作全身应用,故不能用于血管内膜损伤的修复。为此,Carney等^[2,3]发现并合成了一种凝血酶分子片段TP508。TP508是一种23个氨基酸残基组成的短肽,只作用于细胞表面的NPAR受体,激活受体介导的促细胞分裂和趋化信号,不具促凝作用,也尚未发现有其它全身性副作用。

本研究结果显示,凝血酶及TP508对创面愈合有显著作用。但其促进创面愈合的机制,特别是对表皮细胞增生与移行的作用尚未进行研究。本研究的MTT测定及直接细胞计数结果均提示, α -凝血酶和TP508均可显著刺激表皮细胞增生。

本研究还发现,凝血酶肽类对表皮细胞移行也有显著作用。凝血酶浓度为1 $\mu\text{g/ml}$ 时,移行细胞数较单纯培养液组增加36.3%;TP508浓度为10 $\mu\text{g/ml}$ 时,移行细胞数较单纯培养液组增加42.8%。业已证明^[6,7],表皮生长因子(EGF)和转生长因子- β_1 (TGF- β_1)促进创面愈合的机制之一是刺激表皮细胞移行。在表皮再生过程中,位于创缘的表皮细胞先沿创基移行和增生,最终发生上皮化,达到创面愈合的目的^[8]。因此,本研究发现凝血酶肽类对人表皮细胞增生与移行的作用,有助于阐明其促进创面愈合的部分机制。

参 考 文 献

- 1 Carney DH. Postclotting cellular effect of thrombin mediated by interaction with high-affinity thrombin receptors. In: Berliner LJ ed. Thrombin: structure and Function. New York: Plenum Press, 1992. 351-396.
- 2 Carney DH, Mann R, Redin WR, et al. Enhancement of incisional wound healing and neovascularization in normal rats by thrombin and synthetic

thrombin receptor activating peptides. J Clin Invest, 1992; 89: 1469-1477.

3 Glean KC, FROST GH, Bergmann JS, *et al.* Synthetic peptides bind to high-affinity thrombin receptors and modulate thrombin mitogenesis. Peptide Res, 1988; 1: 65-63.

4 Stienberg J, Redin WR, Warner WS, *et al.* The role of thrombin and thrombin receptor activating peptide (TRAP508) in initiation of tissue repair. Thromb Haemost, 1993; 70: 158-162.

5 Derian CK, Eckardt AJ, Gordon PA. Differential regulation of human keratinocyte growth and differentiation by a novel family of protease-activated receptors. Cell Growth Differ, 1997, 8: 743-749.

6 Martin P. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. Science, 1997; 276: 75-81.

7 Greenhalgh DG. The role of growth factors in wound healing. J Trauma, 1996; 41: 159-165.

8 O'Tool EA, Marinkovich MP, Hoeffler WK, Furthmayr H and Woodley DT. Laminin-5 inhibits human keratinocyte migration. Exp Cell Res, 1997; 233: 330-339.

(收稿日期: 1999-12-15; 编辑: 冷怀明)

· 论著摘要 ·

331 例电烧伤病人流行病学分析

林源 朱小平 李德绘 黄运严 陈成丽

广西几家主要的烧伤治疗中心于 1990 年至 1995 年间收治的电烧伤病人共 331 例。现就其临床资料进行了流行病学调查分析。

1 病人的人员结构

331 例病人中,男 305 例,女 26 例,二者之比为 12:1;其中成人电烧伤 247 例(74.62%),儿童电烧伤 84 例(25.38%)。电烧伤病人占同期住院烧伤病人人数(2 416 例)的 17.30%。年龄在 0~6 岁组 41 例(12.39%),7~11 岁组 43 例(12.99%),12~29 岁组 128 例(38.67%),30~59 岁组 112 例(33.84%),60 岁以上组 7 例(2.11%)。

2 病人的职业分布

331 例电烧伤病人中,工人 118 例,占 35.65%,其中电业工人 83 例,占工人总数的 70.34%;农民 100 例,占 30.21%;学龄前儿童 41 例,占 12.39%;其他 72 例,占 21.75%。其中 276 例(83.38%)病人来自农村或乡镇企业。

3 电烧伤致伤方式

因直接接触电源引起烧伤 223 例,占 67.37%。其中在电业操作中电烧伤 102 例(检修变压器、电机和电器触电 46 例,检修安装高压线路触电 56 例);意外触电 119 例(因搬运电缆、钢管、水管、挂衣物触电 15 例,修建房屋触电 21 例,在变压器旁割草或玩耍触电 19 例,爬树、爬电杆触电 17 例,因家用电器、插座触电 32 例,触及低悬或跌落在地的高压电线 13 例,雷击伤 2 例);触电自杀 2 例。因电弧烧伤 108 例,占 32.63%。

4 致伤部位和创面修复情况

致伤部位以上肢受累最多,达 284 例次,占 85.80%,下肢

受累 119 例次,面颈部受累 87 例次,躯干受累 89 例次,头部受累 24 例次。创面修复以自体皮片移植为主 106 例,占 32.02%;以皮瓣或肌皮瓣修复为主 90 例,占 27.19%,其中一期愈合率为 80%;以截肢(包括截指、趾)为主 69 例,截肢率为 20.85%;通过换药愈合 66 例,占 19.94%。

5 电烧伤合并症及并发症

331 例电烧伤中合并电休克 12 例,骨折 9 例,头皮裂伤 5 例,角膜损伤 6 例。并发继发性出血 4 例,肠穿孔 3 例,应激性溃疡和脑外伤性痴呆各 2 例,急性肾衰和急性胰腺炎各 1 例,创面脓毒症 16 例,败血症 3 例。

6 致伤电压与截肢的关系,见表 1

表 1 致伤电压与截肢的关系

致伤电压(V)	致伤例数(%)	截肢例数(%)
低电压	220	36(10.88)
	380	114(34.44)
高电压	6000	24(7.25)
	10 000	136(41.09)
	10 000 以上	21(6.34)

低电压电烧伤共 150 例,截肢 9 例,截肢率为 6%,截肢部位以手指截除 7 例,占 77.78%;高电压电烧伤共 181 例,截肢 60 例,截肢率为 33.15%,截肢部位以上肢多见,共 53 例,占 88.33%,其中前臂水平截肢 45 例(75%),上臂水平截肢 8 例(13.33%);接触性电烧伤总截肢率为 30.94%。高电压电烧伤与低电压比较其截肢率有显著差异(P<0.01),高电压电烧伤截肢率高于低电压电烧伤。

(收稿日期: 1999-09-02; 编辑: 刘志远)

作者简介: 530021 广西医科大学第一附属医院(林源,李德绘);玉林地区医院(朱小平);贵港市人民医院(黄运严);合浦县人民医院(陈成丽)