

· 论著摘要 ·

大鼠浅 II 度烫伤创面表皮生长因子受体的表达

杨奕敏 陆树良 董叫云 徐莲菊 金再敏 陈小琳 孔令雯 计士敏
 陈志龙 青春 史济湘 陈玉英 胡庆沈

浅 II 度烫伤创面愈合主要涉及表皮角质细胞迁移、增殖和分化。生长因子等多种因素调控着上皮细胞的生物学行为,从而完成创面修复,其中以表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)尤为重要。EGF 是表皮角质细胞的化学性趋化因子和特异性促有丝分裂原,必须通过与相应受体——表皮生长因子受体(EGFR)结合,才能在愈合过程中发挥其生物学活性。目前关于创面愈合过程中内源性 EGF 表达水平及其促愈作用的报道较多,但关于内源性 EGFR 表达水平的研究却鲜见报道。本文采用免疫组化技术和图像分析技术,从蛋白质水平上动态观察了浅 II 度烫伤创面中内源性 EGFR 的变化。

一、材料与方

1. 动物模型及分组:清洁级 SD 大鼠 48 只(上海西普尔实验动物公司),雌雄不限,体重 220 ~ 250 g,随机分为未烫伤组及伤后 1、2、3、5、7、10、14 d 组,每组 6 只。

2. 方法:采用水烫法制作烫伤模型,致伤温度 70℃,时间 8 s,造成大鼠 10% TBSA 的浅 II 度烫伤。伤后腹腔内注射 10 ml 乳酸钠林格液复苏。于不同时相点取创缘皮肤标本,制成冷冻切片。牛血清白蛋白封闭,加 1:50 兔抗鼠 EGFR 一抗(美国 Santa Cruz 公司)4℃冰箱过夜,加 20 μl 生物素标记的羊抗兔二抗(美国 Santa Cruz 公司)室温下孵育 10 min,加 20 μl 链亲和素-过氧化物酶溶液(福州迈新公司)室温下孵育 10 min,二氨基联苯胺(DAB)显色 1 min,脱水,透明,封片。阳性反应产物呈褐色,位于细胞浆中。

3. 图像分析:采用图像分析系统(KS400 型图像分析仪,德国远东蔡司公司)分析 EGFR 表达情况。选取表皮层为待测范围。根据多幅图像灰度值的均衡和判别,选取灰度 70 以上作为阳性表达,灰度 80 以上作为强阳性表达。分别测定阳性面积、强阳性面积和检测总面积,并计算阳性率(阳性面积/检测总面积 × 100%)、强阳性率(强阳性面积/检测总面积 × 100%)和阳性比(强阳性率/阳性率)。

4. 统计学处理:采用单因素方差分析和 Duncan,对以上

3 个指标进行统计分析。

二、结果

1. 浅 II 度烫伤后 EGFR 阳性率、强阳性率和阳性比具有相似的变化规律。烫伤前 EGFR 阳性率约为 2.62%,强阳性率约为 0.81%,伤后 2 d 均开始增强,伤后 3 d 达高峰($P < 0.01$),随着创面愈合进程,阳性率及强阳性率逐渐恢复正常。

2. 烫伤前 EGFR 阳性比约为 34.21,伤后 2 d 开始增强,伤后 3 d 达高峰($P < 0.01$),随着创面愈合进程阳性比逐渐恢复正常。上述各指标的图像分析结果见表 1。

三、讨论

体内多种生长因子参与了创面愈合过程的调控。浅 II 度烫伤创面愈合主要涉及表皮细胞的修复,EGF 与相应受体结合后,能促进表皮细胞迁移、分裂和增殖。因此,创面中 EGFR 的表达水平对 EGF 的生物学活性有重要调控作用。本研究检测了大鼠正常皮肤和浅 II 度烫伤创面愈合过程中,EGFR 阳性率、强阳性率和阳性比的变化,它们分别反映了创面愈合过程中单位面积内受体阳性表达和高表达的表皮细胞数,以及受体表达效率。结果表明上述 3 个指标具有相似的变化规律,即烫伤前水平较低,伤后逐渐增加,伤后 3 d 达高峰,随着创面愈合进程逐渐恢复至正常。

以上结果表明,在浅 II 度烫伤创面愈合过程中,EGFR 表达有一定的规律性。伤后早期受体阳性的细胞数量增加,尤其是受体高表达的细胞数量和比例的增加,有利于表皮细胞接受 EGF 促增殖、促分化的信号,从而加快创面愈合。后期受体阳性的细胞数量降低,可能是机体通过负反馈机制下调 EGF 生物学活性,避免细胞过度增殖。伤后早期 EGFR 高表达是否表示其效率或活性较高,有待进一步研究。本实验通过对浅 II 度烫伤创面愈合过程高频率时相点的分析,得出了伤后早期 EGFR 高表达、后期低表达以及伤后早期 EGFR 表达效率高、后期表达效率低的规律,希望能够对临床时相性应用生长因子提供理论依据。

表 1 大鼠浅 II 度烫伤创面表皮生长因子受体表达的变化($\bar{x} \pm s$)

检测指标	烫伤前	伤后时间(d)						
		1	2	3	5	7	10	14
阳性率(%)	2.62 ± 1.07	3.87 ± 0.98	9.35 ± 3.07*	35.13 ± 13.52*	24.23 ± 8.30*	17.18 ± 6.03*	12.57 ± 4.39*	6.14 ± 1.81
强阳性率(%)	0.81 ± 0.34	1.31 ± 0.61	3.98 ± 1.40	20.76 ± 9.40*	8.76 ± 5.17*	7.33 ± 3.39*	4.66 ± 2.27	1.34 ± 1.10
阳性比	34.21 ± 13.93	34.02 ± 13.05	43.04 ± 9.79*	57.49 ± 9.65*	35.38 ± 12.77	41.75 ± 9.12	37.10 ± 10.66	20.26 ± 12.12**

注:与烫伤前比较,* $P < 0.01$,** $P < 0.05$

基金项目:上海市卫生系统“百人计划”资助项目(97BR002);
 国家重点基础研究发展规划资助项目(61199054205)

作者单位:200025 上海第二医科大学瑞金医院上海市烧伤研究所

(收稿日期:2002-02-26)

(本文编辑:张 红)