文章编号:1000-5404(2005)12-1229-03

论著

荷负电气溶胶对大鼠烫伤创面表皮细胞生长因子和 β_1 整合素表达的影响

徐盈斌,利天增,祁少海,张　涛,谢举临,柯昌能,赵李平　　(中山大学附属第一医院烧伤科,广州 510080)

提　要: 目的　研究荷负电气溶胶(aerosol bioelectricity, ABE)对大鼠烫伤创面愈合过程中表皮细胞生长因子(epidermal growth factor, EGF)和 β_1 整合素表达的影响,探讨荷负电气溶胶促进创面愈合的作用机制。**方法**　制作 SD 大鼠深Ⅱ度烫伤模型,将 40 只鼠随机分为治疗组($n_1 = 20$)和对照组($n_2 = 20$)。治疗组应用荷负电气溶胶治疗,每次 1.5 h,每天 2 次,直至创面愈合;对照组不作荷负电气溶胶治疗。采用免疫组织化学和图像分析方法,检测创面愈合过程中 EGF 和 β_1 整合素表达水平。**结果**　创面平均愈合时间治疗组为(7 ± 1.15) d,对照组为(9 ± 1.34) d,治疗组创面愈合时间明显提前($P < 0.01$)。免疫组化显示,治疗组伤后第 2 天可见 EGF、β_1 整合素开始表达于基底细胞和毛囊细胞,第 5 天表达显著,第 6 ~ 9 天持续高水平表达;对照组于第 3 天开始表达,第 7 天表达显著,第 8 ~ 10 天持续高水平表达。治疗组表达水平明显高于对照组($P < 0.01$)。创面愈合后两组表达逐渐恢复至正常水平,差异无显著性意义($P > 0.05$)。**结论**　通过上调 EGF 和 β_1 整合素的表达而促进细胞增殖可能是荷负电气溶胶促进烧伤创面愈合的机制之一。

关键词: 气溶胶;烧伤;创面愈合;表皮细胞生长因子;整合素
中图法分类号: R392.11; R644.02; R944.7　　**文献标识码**: A

Influence of aerosol bioelectricity on expression of epidermal growth factor and β_1 integrin in healing wounds of burned rats

XU Ying-bin, LI Tian-zeng, QI Shao-hai, ZHANG Tao, XIE Ju-lin, KE Chang-neng, ZHAO Li-ping (Department of Burn, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: Objective　To investigate the influence of aerosol bioelectricity on the expressions of epidermal growth factor (EGF) and β_1 integrin in wound healing of burned rats. **Methods**　Sprague Dawley (SD) rats were inflicted to TBSA Ⅱ burn by scalding. Rats were randomly divided into experimental group($n = 20$)and control group ($n = 20$). The experimental group was treated with aerosol bioelectricity. Wound samples were collected in 1 – 10 d after scalding. Immunohistochemistry and image analysis methods were conducted to examine the expressions of EGF and β_1 integrin in both experimental and control groups. **Results**　The average wound healing time of experimental group were (7 ± 1.15) d, whereas (9 ± 1.34) d in control group. The expression of EGF and β_1 integrin in experimental group were detected in skin basal cells and hair follicle cells 2 d after scalding, increased evidently in 5 d and sustained at high expression level up to 9 d after treatment. In contrast, the expressions of EGF and β_1 integrin were initially observed in control group in day 3 and sustained a rather high level in day 7 after scalding. The expressions of EGF and β_1 integrin was significantly higher in experimental group than in control group($P < 0.01$). **Conclusion**　Aerosol bioelectricity can indicate active cells proliferation through up-regulating the expressions of EGF and β_1 integrin in skin basal cells and hair follicle cells, thus can accelerate burned wound healing.

Key words: aerosol bioelectricity; burn; wound healing; epidermal growth factor; integrin

从 1998 年开始,我们应用荷负电气溶胶治疗烧伤创面,发现可明显促进创面愈合速度,改善愈合质量。2003 年 5 月至 2004 年 2 月我们又应用第 2 代气溶胶治疗仪即 NB-1 型生物电创伤治疗仪对 206 例病人进行了临床治疗的前瞻性研究,取得很好的疗效,未发现不良反应。但其作用机制目前还不完全清楚。本实验通过研究荷负电气溶胶对大鼠烫伤创面 EGF、β_1 整合素表达的影响来探讨其作用机制。

作者简介:徐盈斌(1969 –),男,江西省广昌县人,博士研究生,讲师,主要从事创面愈合和瘢痕防治方面的研究。电话:(020)87332200-8235,E-mail: yingbinxu33@sohu.com

收稿日期:2005-03-21;修回日期:2005-04-29

1 材料与方法

1.1 动物模型制作

清洁级 Sprague Dawley (SD)大鼠 40 只,由中山大学北校区实验动物中心提供(合格证号:粤检证字 2003A070),体质量 200 ~ 250 g,雌性。10%水合氯醛腹腔注射麻醉,剂量 0.3 ml/100 g,背部剃毛,采用自制恒温恒压水浴循环探头烫伤仪,分别在背部左右两侧以直径 2.5 cm、质量 1 kg 的探头 80 ℃水浴 8 s,制成直径 2.5 cm 的圆形深Ⅱ度烫伤创面[1]。

1.2 治疗方法

采用随机对照试验,将 40 只大鼠随机分为气溶胶治疗组(n = 20)和对照组(n = 20),每组共 40 个创面。按常规简单清创,应用 NB-I 型生物电创伤治疗仪(珠海科懋生物工程设备有限公司生产),调节其发射窗距创面 30 cm,照射治疗时间每次 1.5 h,自伤日起每天 2 次,直至创面愈合;对照组不作气溶胶治疗。

1.3 观察指标

治疗过程中每天观察各鼠的精神、食欲、活动力、大小便、创面颜色、渗出、肿胀、结痂、皮岛形成、肉芽形成、分泌物、感染等情况。伤后第 1 ~ 11 天分别取创面(距创缘 0.5 cm)及愈合部位标本,每个时间点每组各取 6 份,常规制作蜡块,切片,HE 染色,光镜观察表皮及真皮生长情况。

1.4 免疫组织化学染色

应用 SABC 法免疫组化染色,对上述切片进行 EGF、β_1 整合素检测。EGF、β_1 整合素多抗及二抗购自武汉博士德生物制品有限公司。切片常规脱蜡至水,3% H_2O_2 常温孵育 20 min,以消除内源性过氧化物酶活性;蒸馏水洗 3 次,置于 0.01 mol/L、pH 6.0 的枸橼酸盐缓冲液中行抗原微波修复 5 min,磷酸盐缓冲液(PBS,0.1 mol/L、pH 7.2)洗涤 3 次;滴加 5%BSA 封闭液,常温 20 min;加入 1:200 稀释的一抗,37 ℃孵育 2 h,PBS 漂洗 3 次;滴加生物素标记的二抗常温孵育 45 min,PBS 漂洗 3 次;滴加试剂 SABC,常温 20 min,PBS 洗 5 min × 4 次;二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木精复染,常规脱水、透明、封片,光镜观察,以细胞染成棕黄色为阳性,同时设不加一抗的非特异性对照。

1.5 图像分析

在 200 倍及 400 倍光镜下观察免疫组化结果,每张切片随机选取 7 个视野,采用德国 KONTRON IBAS 2.5 全自动图像分析系统及日本 TVC ky-F30B 3-CCD 彩色图像摄录输入仪进行免疫组化染色定量分析,计算平均阳性单位(PU)值。PU 值越小,则阳性单位越大,表示其表达水平越高。

$PU = 100 \times | G_o - G_A | /(A_{A\beta} \cdot G_{max})$。

1.6 统计学方法

计数资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SSPS 统计软件包,组间比较采用方差分析,相同时间点 PU 均值比较采用配对 t 检验。

2 结果

2.1 创面观察

治疗组创面肿胀、渗出程度较对照组轻,结痂、皮岛形成快,无异常分泌物及感染。SD 大鼠深Ⅱ度烫伤创面,平均愈合时间治疗组为(7 ± 1.15) d,对照组为(9 ± 1.34) d,治疗组创面愈合时间明显提前($P < 0.01$)。

2.2 HE 染色观察

烫伤 24 h 后取创面皮肤组织切片,HE 染色证实为深Ⅱ度烫伤病理改变。伤后 1 ~ 10 d 切片 HE 染色,可见第 2 天治疗组开始有基底层细胞增殖,第 5 天可见明显增殖的表皮细胞,胞体较大,排列紧密,由单层上皮细胞向复层上皮细胞转化,并以毛囊区附近增殖活跃,其中有 6 个创面第 5 天开始愈合;而对照组第 3 天开始有局部细胞增殖,至第 7 天增殖明显,细胞体积较小,分布疏松,以单层上皮细胞为主。

2.3 免疫组织化学染色观察

治疗组 EGF、β_1 整合素在伤后第 2 天开始表达,主要位于基底细胞,第 4 天表达明显增多,第 5 天显著表达,与 HE 染色结果一致,第 6 ~ 8 天维持高水平表达;对照组在第 3 天开始有表达,但表达较弱,细胞数量少,于第 7 天表达出现高峰并维持高水平表达(图 1 ~ 4)。定量分析第 3 ~ 7 天两组差异有显著性意义($P < 0.01$)(表 1,2)。

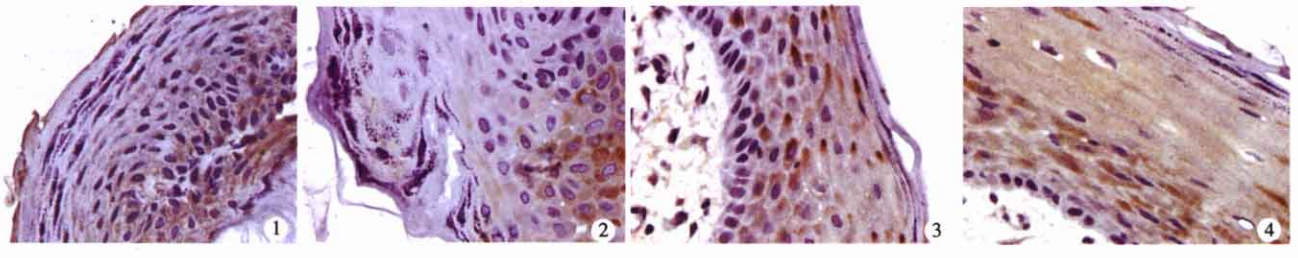


图 1 气溶胶治疗 7 d 后 EGF 表达 (SABC × 400)

Fig 1 Expression of EGF in experimental group on day 7 after scalding (SABC × 400)

图 2 对照组 7 d 后 EGF 表达 (SABC × 400)

Fig 2 Expression of EGF in control group on day 7 after scalding (SABC × 400)

图 3 气溶胶治疗 7 d 后 β_1 整合素表达 (SABC × 400)

Fig 3 Expression of β_1 integrin in experimental group on day 7 after scalding (SABC × 400)

图 4 对照组 7 d 后 β_1 整合素表达 (SABC × 400)

Fig 4 Expression of β_1 integrin in control group on day 7 after scalding (SABC × 400)

表 1　EGF 免疫组化染色图像分析 PU 值（$\bar{x} \pm s$）

Tab 1　PU value in image analysis of immunohistochemical staining of EGF（$\bar{x} \pm s$）

After burn	Experimental group	Control group
1 d	21.14 ± 1.56	23.45 ± 1.05
2 d	14.25 ± 2.32	18.26 ± 2.24
3 d	6.37 ± 1.21*	13.37 ± 1.51
4 d	2.46 ± 0.83*	8.31 ± 1.58
5 d	1.89 ± 0.74*	5.73 ± 1.62
6 d	1.24 ± 0.48*	2.84 ± 0.75
7 d	0.85 ± 0.36*	1.92 ± 0.63
8 d	0.69 ± 0.15	1.28 ± 0.34
9 d	0.74 ± 0.37	0.91 ± 0.28
10 d	1.58 ± 0.43	0.76 ± 0.46

*：$P < 0.01$，*vs* control

表 2　β_1 整合素免疫组化染色图像分析 PU 值（$\bar{x} \pm s$）

Tab 2　PU value in image analysis of immunohistochemical staining of β_1 integrin（$\bar{x} \pm s$）

After burn	Experimental group	Control group
1 d	21.78 ± 2.46	24.31 ± 2.57
2 d	15.62 ± 2.17	20.83 ± 2.42
3 d	8.54 ± 1.18*	16.15 ± 1.93
4 d	3.15 ± 1.36*	11.24 ± 1.78
5 d	2.03 ± 0.38*	8.47 ± 1.54
6 d	1.49 ± 0.43*	4.63 ± 0.58
7 d	0.89 ± 0.31*	2.02 ± 0.56
8 d	0.65 ± 0.24	1.48 ± 0.31
9 d	0.82 ± 0.37	0.96 ± 0.19
10 d	1.47 ± 0.16	0.75 ± 0.45

*：$P < 0.01$，*vs* control

3　讨论

气溶胶是液体或固体微粒均匀分散于气体中所形成的一种悬浮系统，其携带有一定量的负电荷能，被称为荷负电气溶胶或气溶胶生物电，在治疗呼吸道疾病、空气和物体表面的消毒等方面有较多的研究和应用[2,3]。生物电创伤治疗仪通过特殊的电子装置而产生荷负电气溶胶，其粒子大小在 5 μm 左右，可穿透皮肤、粘膜和创面，以直接刺激或体液方式作用于细胞及间质，影响细胞生物电活动，参与细胞代谢过程，从而导致生物学效应。

大量研究表明，多肽生长因子是调控创面愈合整个过程的主要局部因素之一，参与调控修复创面的各种细胞的趋化、增殖与分化，并能促进细胞外基质（ECM）的增生。烧伤创面愈合相关的生长因子主要有 EGF、PDGF、TGF-β、FGF 和 IGF-1 等。临床上，浅Ⅱ度和深Ⅱ度烧伤创面、供皮区创面、各类慢性溃疡应用 EGF 均可缩短平均愈合时间。EGF 是角质细胞的化学趋化因子和特异性促有丝分裂原，可促进皮肤与粘膜创面组织修复过程中的 DNA、RNA 和羟脯氨酸的合成，加速角质细胞迁移、分裂和增殖，诱导角质细胞表面 $\alpha_2\beta_1$ 整合素受体表达[4]。

整合素是一组由 α 和 β 亚单位经非共价键连接而成的异二聚体糖蛋白，介导细胞与 ECM 的粘附，可调控细胞周期、细胞凋亡、细胞迁移和伤口收缩，并可与生长因子协调起作用，在角质细胞增殖和创面修复中起重要作用[5]。Moro 等[6]发现整合素可以磷酸化 EGF 受体，增强 EGF 的作用。β_1 整合素高水平表达是细胞增殖活跃的标志。由于 β_1 整合素在表皮干细胞表面亦呈高水平表达，故被认为是表皮干细胞标志物之一[7]。

近些年研究表明，表皮干细胞在创面愈合中起了非常重要的作用。本实验中荷负电气溶胶治疗组伤后第 2 天基底层细胞和毛囊细胞开始有 EGF 和 β_1 整合素表达，在第 5 天表达显著增多，并于第 6～9 天维持高水平表达，明显高于对照组（$P < 0.01$）。提示荷负电气溶胶能有效促进 EGF 和 β_1 整合素的表达，从而加快细胞增殖，加速创面愈合。荷负电气溶胶治疗，不但可影响创面生长因子表达，还可促使生长因子与创面残存表皮干细胞受体结合，诱导干细胞增殖与分化[8]。当干细胞微环境发生变化，胞外的信息可通过整合素传递给干细胞，以触发跨膜信号转导，调控细胞的基因表达，激活干细胞的多潜能性，从而产生一系列促修复效应[9]。这可能就是荷负电气溶胶促进创面愈合的机制之一。

荷负电气溶胶对烧伤创面愈合的作用是一个复杂的过程，在此过程中细胞因子之间的相互影响以及是否存在一些相关基因的调控及信号转导机制还有待于进一步研究。

参考文献：

[1] 付小兵，孙同柱，盛志勇. 几种用于创伤修复研究的动物模型[J]. 中华实验外科杂志，1999，16(5)：479－480.

[2] Dhand R. New frontiers in aerosol delivery during mechanical ventilation [J]. Respir Care，2004，49(6)：666－677.

[3] 孙　勤，马成云，满荫起，等. 气溶胶喷雾对空气和物体表面的消毒效果[J]. 中华医院感染学杂志，2003，13(1)：38－39.

[4] Kamer A R，Sacks P G，Vladutiu A，*et al*. EGF mediates multiple signals：dependence on the conditions[J]. Int J Mol Med，2004，13(1)：143－147.

[5] Grose R，Hutter C，Bloch W，*et al*. A crucial role of β_1 integrins for keratinocyte migration *in vitro* and during cutaneous wound repair[J]. Development，2002，129(9)：2303－2315.

[6] Moro L，Dolce L，Cabodi S，*et al*. Integrin-induced epidermal growth factor (EGF) receptor activation requires c-Src and p130Cas and leads to phosphorylation of specific EGF receptor tyrosines[J]. J Biol Chem，2002，277(11)：9405－9414.

[7] 唐红英，罗向东，伍素华. 整合素与表皮干细胞[J]. 第三军医大学学报，2004，26(24)：2266－2268.

[8] 付小兵，孙晓庆，孙同柱，等. 表皮细胞生长因子通过诱导皮肤干细胞分化加速受创表皮再生的研究[J]. 中国修复重建外科杂志，2002，16(1)：31－35.

[9] Zhu A J，Haase I，Watt F M. Signaling *via* β_1 integrins and mitogen-activated protein kinase determines human epidermal stem cell fate *in vitro*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A，1999，96(12)：6728－6733.

（编辑　陈聪连）