论著

文章编号:1000-5404(2008)11-1006-04

局部 uPAR 的高表达促进小鼠创伤后皮肤的再上皮化

高强国[1],符 刚[2],余 瑾[1],连小华[1],杨 恬[1] (第三军医大学:[1]基础医学部细胞生物学教研室,[2]西南医院血液科,重庆,400038)

摘 要:目的 将构建的含 uPAR 的真核表达质粒转入创伤小鼠皮内,研究 uPAR 在皮肤创伤后再上皮化的作用。方法 将构建的真核表达质粒 pEGFPC1-uPAR 通过电穿孔法转入创伤小鼠皮内,观察质粒转入情况,测定创面愈合率,通过组织形态学观察和测定创面肉芽组织羟脯氨酸、蛋白含量来反映肉芽组织中胶原和蛋白合成的情况,评价创面愈合质量。免疫组织化学检测细胞增殖阳性率。结果 uPAR 质粒转染的小鼠创面愈合率高于对照组,肉芽组织变化不明显,早期胶原蛋白含量增加,表皮细胞的增殖迁移能力增加。结论 局部 uPAR 的高表达能促进创伤后皮肤的再上皮化。

关键词:uPAR;创伤;再上皮化;电穿孔法
中图法分类号:R322.991;R364.3;R641.02 文献标识码:A

Local injection of recombinant uPAR plasmid promotes the cutaneous re-epithelialization after wound in mouse

GAO Qiang-guo[1], FU Gang[2], YU Jin[1], LIAN Xiao-hua[1], YANG Tian[1] ([1]Department of Cell Biology, College of Medicine, [2]Department of Haematology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the function of urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) in the course of re-epithelialization after wound by local recombinant plasmid injection and electroporation. Methods Thirty-six BALB/c mice were divided into three groups: wound only group, blank plasmid group and pEGFPC1-uPAR plasmid group. The recombinant pEGFPC1-uPAR was by electroporation injected intradermally at two sites around each wound. The healing rate of wound and the quality of wound healing were calculated to evaluate the cutaneous re-epithelialization on day 1, 3, 6, 9, 14, 17 after trauma. Results As compared with control mice, the healing rate of wound in the uPAR transfected mice was higher; the granulation tissues were of little change; the content of collagen increased at the early stage; the proliferation and migration of epidermis were enhanced. Conclusion The recombinant uPAR plasmid intradermally injected by electroporation can promote the cutaneous re-epithelialization after wound.

Key words: uPAR; wound; re-epithelialization; electroporation

创伤愈合是一个复杂的生物学过程,涉及细胞的迁移、粘附、通讯、增殖、分化、上皮化和基质的合成与沉积等细胞生物学的各个方面[1]。uPAR(urokinase plasminogen activator receptor)是由相对分子质量(55~60)$\times 10^3$组成的高度糖基化的蛋白质,通过磷酸化的糖脂锚定在细胞表面,由 3 个同源的半胱氨酸重复结构域组成。uPAR 通过与特异性配基 uPA 的结合,在前导细胞的前沿将纤溶酶原转换成活性的纤溶酶,从而参与 ECM 的降解,加速前沿细胞定向的迁移侵入。另外,uPAR 通过成为其他一些分子的功能性单位(如 VN,integrin 等)的配基,启动了几个信号转导途径[2,3]。因此,uPAR 不仅在功能上作为一个蛋白酶受体,而且能在细胞外信号途径中发挥作用,从而影响细胞的迁移、黏附、分化和增殖。

以往的研究表明,在创伤后 12 h,创伤边缘表皮各层的角质形成细胞有强烈的 uPAR mRNA 的表达,在创伤后 48 h 和 96 h 仍有 uPAR mRNA 的表达,但此时阳性较弱,而且 uPAR mRNA 只出现在创伤边缘向外生长的最前端的角质形成细胞中。同时,uPAR 在创

基金项目:国家自然科学基金(30471568);第三军医大学校管课题(2006)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30471568) and the Scientific Research Fund of Third Military Medical University (2006)
作者简介:高强国,男,河北省平山县人,博士,讲师,主要从事毛囊及上皮生物学方面的研究,发表论文 6 篇。电话:(023)68752259,E-mail:gaoli@mail.tmmu.com.cn
通信作者:杨 恬,电话:(023)68752260,E-mail:tianyang@163.net
收稿日期:2007-10-24;修回日期:2008-03-11

伤下面浸润的粒细胞和创伤区域的内皮细胞中也有表达[4],但对于创伤愈合过程中 uPAR 的功能研究较少。本实验将构建的质粒以电穿孔法转染创伤小鼠,通过创面愈合率的测定,创面愈合质量的评价的比较,免疫组织化学等方法研究 uPAR 在皮肤创伤后再上皮化进程中所起的作用[5]。

1　材料与方法

1.1　实验动物及主要试剂、器材

SPF 级 BALB/c 小鼠购自第三军医大学实验动物中心。兔抗鼠 Ki67 一抗、免疫组化试剂盒(中杉金桥公司,北京),无内毒素质粒抽提试剂盒(天为时代,北京),羟脯氨酸测定试剂盒(建成公司,南京),电穿孔仪(ECM 830 BTX 公司,美国),pEGFPC1 质粒,pEGFPC1-uPAR 质粒(自制)[6]。

1.2　实验动物及分组

雌性 BALB/c 种小鼠 45 只,质量(20 ± 3) g,于不锈钢笼具中饲养,自由摄食、饮水。按随机数字表分为 3 组:创伤对照组(A 组)、空质粒转染创伤组(B 组)和 uPAR 质粒创伤处理组(C 组),每组 15 只小鼠,每组下设 1、3、6、9、14 d 5 个时相点,每时相点 3 只小鼠。

1.3　创伤模型制备

创伤模型参考文献[7]建立。将待处理的小鼠进行乙醚麻醉,剪去背部毛,用取皮器在背部做 1 cm^2 的圆形切口,深达皮下(皮肤全层)。在创伤边缘前后两侧注射 50μg 的质粒,对照组用溶解质粒的 TE 缓冲液代替。在注射处进行电穿孔刺激。电穿孔使用的参数参照文献[8]略有修改。模式:HV;电压:600 V;脉冲时间:100 μs;脉冲数:06;间隔:125 ms;极性:单极。

1.4　测定指标

1.4.1　创面愈合率的测定　　分别于创伤后用半透明硫酸纸贴于创面上,沿创面外缘画线,记录后用正交坐标纸测定切口面积大小,计算愈合率,评价缺损创面的愈合速度。

愈合率 = (1 - 现切口面积/原切口面积) × 100%

1.4.2　质粒转染观察　　剪取创伤面部分组织,经固定脱水后,进行冰冻切片,在荧光显微镜下观察质粒转染情况。

1.4.3　创面愈合质量的评价　　通过组织形态学观察和测定创面肉芽组织羟脯氨酸、蛋白含量来反映肉芽组织中胶原和蛋白合成的情况,评价创面愈合的质量。

1.4.3.1　组织形态学观察　　取缺损创面组织置于 10% 福尔马林溶液中固定,石蜡包埋,常规切片后行 HE、Masson 染色,这时新生的胶原被染成蓝绿色,光镜下观察蓝绿色范围的大小就可反映伤口恢复情况。

1.4.3.2　皮肤及创面肉芽组织蛋白含量的测定　　称取适量皮肤及缺损创面肉芽组织,用生理盐水研磨制做成 1% 匀浆,加入 1/3 倍体积 1 mol/L NaOH 溶液,混匀后过夜,次日用 Folin-Phenol 法测定溶液中蛋白质含量。

1.4.3.3　皮肤及创面肉芽组织羟脯氨酸含量的测定　　照试剂盒说明书进行。

1.4.4　免疫组织化学检测细胞增殖阳性率　　Ki67 一抗浓缩液按 1∶150 稀释,操作步骤按常规进行。Ki67 染色结果判定:细胞核呈棕黄色或棕褐色为阳性,根据阳性细胞数量和表达强度进行半定量分析。在 200 倍视野下计数 500 个细胞中的阳性细胞数,每例切片计数 3 次,平均每 100 个细胞中的阳性细胞数即为阳性率。

1.5　图像分析

通过 TIGER 图像分析软件(重庆大学)测定染色标本的平均光密度(AOD)值。

1.6　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 10.00 统计软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　创面愈合率的测定

各组在创伤后 1 d 创面愈合率无差别,3 d uPAR 质粒转染组愈合率显著高于空质粒转染组和对照组($P < 0.05$),见表 1。

表 1　小鼠皮肤缺损创面的愈合率($n = 3$, $\bar{x} \pm s$)

组别	伤后时间				
	1 d	3 d	6 d	9 d	14 d
A 组	5.1 ± 0.3	13.2 ± 2.7	30.3 ± 5.2	48.9 ± 6.2	78.2 ± 5.3
B 组	5.1 ± 0.2	12.1 ± 3.3	29.6 ± 4.9	47.4 ± 3.2	77.6 ± 4.5
C 组	5.1 ± 0.5	16.5 ± 4.4[a]	35.7 ± 6.1	54.3 ± 5.2	83.4 ± 6.1

A:创伤对照组;B:空质粒转染创伤组;C:uPAR 质粒创伤处理组;a:$P < 0.05$,与空质粒转染创伤组比较

2.2　质粒转染小鼠的鉴定

创伤后,对小鼠进行电穿孔转染,实验小鼠均未发生感染死亡。将冰冻切片在荧光显微镜下观察,第 1 天,带绿色荧光的细胞较少,不易被发现;第 3 天,小鼠创伤处带绿色荧光的细胞较多,大多位于创伤边缘(图 1AB),空白对照组创伤处未见绿色荧光表达(图 1C)。

2.3　组织学形态观察

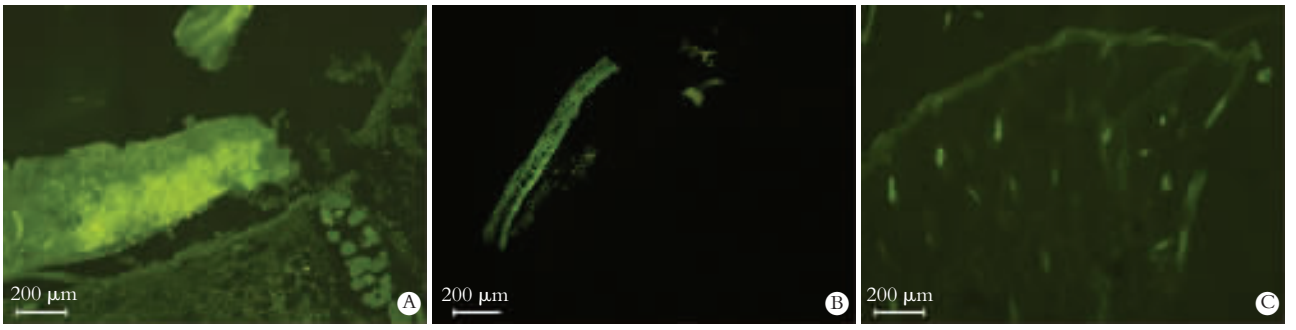
2.3.1　创面愈合情况　　创伤后第 3 天创面开始缩小,第 16 天 uPAR 处理组小鼠创面愈合,对照组第 17 天完全愈合。质粒 uPAR 处理的小鼠愈合率高于正常对照和空质粒转染的愈合率。

2.3.2　对创面组织进行 HE 和 Masson 染色　　Masson 染色,在第 1 天所有处理情况无大的差别,第 2 ~ 3 天发现质粒 uPAR 处理组比正常对照和空质粒转染组,胶原形成的网状结构更细密。5 d 以后各处理组无大的差别(图 2)。

2.3.3　创伤免疫组织化学 Ki67 表达　　创伤后 3 d,表皮角质形成细胞中有 Ki67 阳性表达,见图 3。细胞平均阳性率 pEGFPC1-uPAR 转染组为 92%,空质粒转染组为 78%,对照组为 74%($P < 0.05$ pEGFPC1-uPAR 转染组 *vs* 空质粒转染组)。

2.3.4　肉芽组织蛋白含量的测定　　实验结果表明,不同质粒转染的小鼠,创伤部位的肉芽组织蛋白含量的变化不明显,无显著性差异($P > 0.05$),见表 2。

2.3.5　组织羟脯氨酸含量的测定　　结果表明,在创伤第 3 天,转染 pEGFPC1-uPAR 质粒的羟脯氨酸含量均升高,以后逐渐降低,但总体表达水平,质粒转染组含量高于空质粒转染组和对照组($P < 0.05$),见表 3。



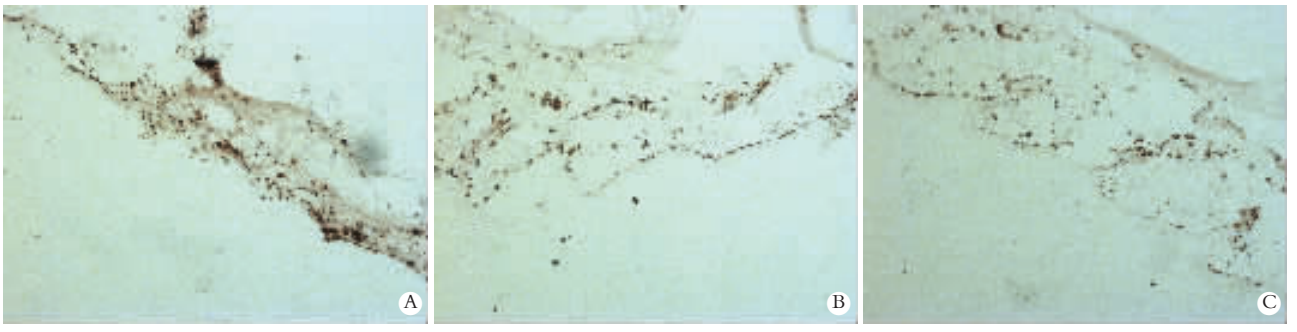
A：pEGFPC1-uPAR 电穿孔小鼠；B：mock- pEGFPC1 电穿孔小鼠；C：创伤对照组

图1 在创伤边缘的细胞转染有绿色荧光蛋白质粒



A：转染 pEGFPC1Z-uPAR 质粒；B：转染 mock-pEGFPC1 质粒；C：创伤对照组

图2 小鼠创伤后电穿孔第3天 Masson 染色 （×200）



A 转染 pEGFPC1-uPAR 质粒；B 转染 pEGFPC1 质粒；C 对照

图3 小鼠创伤后3天免疫组化检测 Ki67 的表达 （×100）

表2 小鼠创伤部位肉芽组织蛋白含量测定（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

组别	伤后时间				
	1 d	3 d	6 d	9 d	14 d
A 组	141.01 ±8.32	155.74 ±6.74	151.72 ±11.23	151.71 ±15.46	147.20 ±8.68
B 组	132.41 ±7.51	145.98 ±13.52	140.80 ±9.12	138.26 ±7.59	142.12 ±5.47
C 组	136.32 ±10.87	165.78 ±8.65	148.05 ±14.62	152.59 ±11.49	147.78 ±7.96

A 创伤对照组；B：空质粒转染创伤组；C：uPAR 质粒创伤处理组

表3 小鼠创伤部位羟脯氨酸含量测定（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

组别	伤后时间				
	1 d	3 d	6 d	9 d	14 d
A 组	1.29 ±0.07	1.95 ±0.11	1.94 ±0.03	2.09 ±0.05	2.37 ±0.14
B 组	1.32 ±0.04	2.37 ±0.08	1.76 ±0.12	1.85 ±0.09	2.22 ±0.03
C 组	1.30 ±0.06	2.88 ±0.13	2.50 ±0.03	2.69 ±0.04	2.74 ±0.09

A 创伤对照组；B：空质粒转染创伤组；C：uPAR 质粒创伤处理组

3 讨论

uPAR 由于能够与 uPA 结合，从而促进肿瘤细胞的增殖和迁移，因此可应用于肿瘤的治疗中[9]。本研究转染构建质粒后，通过荧光显微镜观察，在创伤后 1 d，含绿色荧光蛋白的细胞均位于创伤的边缘，但数目不多，在创伤后 5 d 检测，在创伤边缘仍发现有绿色荧光蛋白的细胞。带荧光的部位主要位于创伤边缘的角质形成细胞中，表明在皮肤的增殖迁移过程中，uPAR 主要作用于表皮。本实验结果显示，转染质粒 uPAR 的小鼠其愈合率高于对照组，说明 uPA/uPAR 在皮肤的创伤愈合过程中起着一定的作用，增加创伤边缘角质形成细胞的 uPAR 表达，则促进了 uPA 与 uPAR 的结合，从而促进了细胞的迁移。

以往的研究表明，高表达的 uPAR 能与 α5β1-整合蛋白结合，通过 uPAR 结合激活的 α5β1-整合蛋白持续高表达 ERK（有丝分裂的细胞外调控激酶），导致细胞的生长、迁移[10]。在迁移的角质形成细胞中增强的 uPA/uPAR 的表达是通过 PKC 的选择性活化介导的，随后通过创伤的诱导改变细胞骨架。

在本实验过程中对创伤面进行 Masson 染色，转染 uPAR 质粒的小鼠比空质粒转染的小鼠形成的胶原网状结构更细密，而且染色较深。可能转染 uPAR 后，与 uPA 相结合，导致纤溶酶的形成增多，刺激创伤边缘表皮的角质形成细胞分泌了较多的其他因子，从而使新生胶原的表达增多。

在本实验结果中，空质粒转染组与对照组蛋白含量无差别，各处理组与对照组含量无明显变化。这可能是由于肉芽组织还不成熟，肉芽组织中水分比正常皮肤多的原因。或 uPA 与 uPAR 结合后，进一步加速了对创面坏死组织中蛋白成分的水解，使其脱落，从而使其含量降低。

羟脯氨酸含量能特异反映组织胶原蛋白含量，可以反映创伤愈合的状况。第 3 天 uPAR 处理组的羟脯氨酸的含量明显升高，达到峰值，然后含量表达降低。含量的增加均高于空质粒组和对照组，可见 uPAR 在创伤愈合中具有一定的作用，并且是在创伤早期作用明显。

本实验结果显示 Ki67 的表达，在 uPAR 转染组明显高于对照组。说明在局部条件下，uPAR 能促进创伤部位角质形成细胞细胞的增殖，从而促进细胞的迁移和创伤的愈合。

本研究通过电穿孔法对质粒进行转染，通过增加 uPAR 局部的表达，发现创伤早期 uPAR 在创伤边缘表皮的角质形成细胞中表达，具有促进角质形成细胞增殖迁移和促进皮肤再上皮化的作用。

参考文献：

[1] Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration[J]. Science, 1997, 276 (5309): 75 - 81.

[2] Duffy M J. The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy[J]. Curr Pharm Des, 2004, 10(1): 39 - 49.

[3] Ragno P. The urokinase receptor: a ligand or a receptor? Story of a sociable molecule[J]. Cell Mol Life Sci, 2006, 63(9): 1028 - 1037.

[4] Solberg H, Ploug M, Hoyer-Hansen G, *et al*. The murine receptor for urokinase-type plasminogen activator is primarily expressed in tissues actively undergoing remodeling[J]. J Histochem Cytochem, 2001, 49(2): 237 - 246.

[5] 高强国，符　刚，宋　川，等. uPA/uPAR 在人胚胎毛囊隆突区中表达的研究[J]. 重庆医学，2008，37(2)：129 - 130.

[6] 高强国，符　刚，曾益军，等. pEGFPC1-uPAR 重组质粒的构建及对细胞增殖和侵袭性的影响[J]. 第三军医大学学报，2005，27(19)：1928 - 1930.

[7] 谢　江，李廷玉，朱　虎，等. 转录因子 CaRF 在大鼠皮肤创面愈合中的作用[J]. 第三军医大学学报，2007，29(3)：207 - 209.

[8] Byrnes C K, Malone R W, Akhter N, *et al*. Electroporation enhances transfection efficiency in murine cutaneous wounds[J]. Wound Repair Regen, 2004, 12(4): 397 - 403.

[9] Pillay V, Dass C R, Choong P F. The urokinase plasminogen activator receptor as a gene therapy target for cancer[J]. Trends Biotechnol, 2007, 25(1): 33 - 39.

[10] Chaurasia P, Aguirre-Ghiso J A, Liang O D, *et al*. A region in urokinase plasminogen receptor domain III controlling a functional association with alpha5beta1 integrin and tumor growth[J]. J Biol Chem, 2006, 281(21): 14852 - 14863.

（编辑　汪勤俭）

全国消化外科新技术、新进展研讨会征文通知

由《中华消化外科杂志》编辑委员会主办，第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所、《中华消化外科杂志》编辑部、重庆市消化外科专业委员会承办的"全国消化外科学术新技术、新进展研讨会"将于 2008 年 11 月在重庆市召开。大会将以展示消化外科领域发展的新技术为主题，以手术及 Video 演示为主要形式。欢迎全国外科同仁踊跃投稿参会。

征稿内容：消化外科领域，包括肝脏肿瘤、胆道肿瘤、肝胆管结石、胰腺肿瘤、肝移植、食管疾病、胃肠疾病、胃肠肿瘤等相关学科最新临床新技术、新方法；消化外科领域相关实验研究新成果；消化外科疾病的诊治经验。

投稿要求：①论文全文 5 000 字以内，包括 500 字左右的中文摘要，请用 word 格式，文题用 3 号黑体，正文用 5 号宋体，1.5 倍行距。②文内务必注明"会议征文"字样、作者的联系地址、电话、E-mail。③请尽量使用电子邮件投稿，投稿请发《中华消化外科杂志》专用邮箱：digsurg@263.net，邮件主题注明"会议征文"。④纸版投稿请用 A4 纸打印，请寄：重庆市第三军医大学西南医院《中华消化外科杂志》编辑部 邮编：400038。⑤截稿日期：2008 年 10 月 30 日。优秀论文将在《中华消化外科杂志》优先发表，参会者可获得国家继续教育Ⅰ类学分 10 分。

地　址：重庆市第三军医大学西南医院《中华消化外科杂志》编辑部　　邮　编：400038

联系人：陈　敏　邹迎芬　　电　话：(023)68754655，68754776

传　真：(023)65317637　　E-mail：digsurg@263.net