论著

文章编号:1000-5404(2009)06-0474-03

基质细胞衍生因子-1α在皮肤创伤愈合过程中的表达特点

冯帅南[1],朱方强[1],王莎莉[2],张 波[1],蒋建新[1],王正国[1],黄 宏[1] ([1]第三军医大学大坪医院野战外科研究所第六研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042;[2]重庆医科大学基础医学院生理学教研室,重庆 400016)

摘 要:目的 探讨小鼠全层皮肤缺损伤创面愈合过程中基质细胞衍生因子-1α(stromal cell derived factor-1α,SDF-1α)的表达规律及其在创伤愈合中的可能作用。**方法** 建立小鼠背部正中近颈侧皮肤1.5 cm×1.5 cm的正方形全层缺损伤模型,分别于伤后1、2、3、4、5、7、10、14 d获取创缘组织,应用RT-PCR方法检测SDF-1α mRNA表达,Western blot和免疫组织化学方法检测SDF-1α的蛋白表达。**结果** RT-PCR检测结果显示创面SDF-1α呈双峰表达,损伤后1 d,与正常皮肤组织相比,表达显著增加($P<0.05$),3 d表达最低($P<0.05$),5 d表达达峰值($P<0.05$);Western blot检测结果显示创面SDF-1α蛋白也呈双峰表达,峰值分别在伤后2 d($P<0.05$)和7 d($P<0.05$),免疫组织化学检测结果显示SDF-1α主要表达在新生表皮细胞和血管内皮细胞。**结论** SDF-1α可能参与了皮肤的创伤愈合过程。

关键词: 皮肤创伤;创伤愈合;基质细胞衍生因子-1α

中图法分类号: R364.3;R392.1;R641 **文献标识码:** A

Expression profile of stromal cell derived factor-1α during cutaneous wound healing in mice

FENG Shuai-nan[1], ZHU Fang-qiang[1], WANG Sha-li[2], ZHANG Bo[1], JIANG Jian-xin[1], WANG Zheng-guo[1], HUANG Hong[1] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 6, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042; [2]Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the expression profile and possible role of stromal cell derived factor-1α (SDF-1α) during full-thickness cutaneous wound healing in mice. **Methods** A full-thickness wound of 1.5 cm×1.5 cm in size was inflicted on the back of mice. The skin specimen on the margin of wound was collected in 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10 and 14 d after injury respectively. The endogenous expression of SDF-1α mRNA was measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis and its protein was detected by Western blot analysis and immunohistochemical assay in the obtained specimen. **Results** The mRNA expression of SDF-1α exhibited a double-peak profile, with the peak on day 1 ($P<0.05$) and day 5 ($P<0.05$) after excision, but reached the lowest level on day 3 ($P<0.05$). The protein expression reached its peak on day 2 ($P<0.05$) and day 7 ($P<0.05$) respectively during the progress of wound healing, and SDF-1α was predominantly expressed at re-epidermal cells and neo-vascular endothelial cells. **Conclusion** SDF-1α may take part in the process of cutaneous wound healing.

Key words: cutaneous wound; wound healing; stromal cell derived factor-1α

创伤愈合是一个复杂过程,大量炎症细胞和修复细胞(成纤维细胞和血管内皮细胞)及其合成分泌的大量生长因子和细胞因子参与了这一过程的调控[1]。研究表明基质细胞衍生因子-1α(stromal cell derived factor-1α, SDF-1α)是参与调节组织/器官损伤修复的关键细胞因子[2]。本实验探讨SDF-1α在创面表达规律及其对创伤愈合的可能影响,为进一步阐明创伤愈合机制和调控创面愈合提供新的理论依据。

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973计划)(2005CB522603)
Supported by the National Basic Research Program of China (973 Program, 2005CB522603)

作者简介: 冯帅南,男,河南省南阳市人,硕士研究生,主要从事创伤修复方面的研究。E-mail:fsn420@21cn.com

通信作者: 黄 宏, E-mail: huanghongcq@163.com

收稿日期: 2008-06-11;**修回日期:** 2008-10-23

1 材料与方法

1.1 动物模型的建立

清洁级雄性昆明小鼠32只(第三军医大学实验动物中心提供),体质量25~30 g。应用速眠新Ⅱ(1 ml/kg)肌肉麻醉小

鼠,常规消毒,于背部近颈侧以脊柱为中线切除约 1.5 cm × 1.5 cm 的正方形全层皮肤,创面不用任何药物,常规饲养。分别于伤后 1、2、3、4、5、7、10、14 d 完全随机处死 4 只小鼠,切取创缘两侧各 0.3 cm 组织,液氮冻存。切取正常组织作为对照组。

1.2　主要试剂

一抗:山羊抗小鼠 SDF-1α 抗体(Santa Cruz, 美国),DAB、S-P 9000 通用免疫组化试剂盒(北京中杉金桥公司),RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 宝生物公司),SDF-1α 及 GAPDH 引物(上海生工合成),RIPA 试剂盒(上海申能博彩公司),二抗:兔抗山羊 IgG(Santa Cruz, 美国),小鼠抗 β-actin 单抗、抗小鼠 IgG-HRP(Sigma, 美国)。

1.3　免疫组化染色(S-P 法)

取创面以及周围 0.5 cm 宽的皮肤组织, 室温下 4% 中性多聚甲醛缓冲固定液固定标本 48 h,逐级脱水,石蜡包埋,切成 5 μm 厚度切片。切片水化,经 0.3% 过氧化氢-甲醇孵育 30 min;以 10% 正常山羊血清封闭后,滴加一抗 SDF-1α(1∶200) 4 ℃过夜;次日,PBS 洗涤后,加入生物素化二抗和辣根过氧化物酶标记链酶卵白素分别在 37 ℃孵育 30 min,DAB 显色,苏木精复染,脱水、透明、中性树胶封片。显微镜下观察,细胞质内有棕黄色颗粒的为阳性细胞。免疫组化阴性对照以 PBS 代替一抗。

1.4　RT-PCR 检测 SDF-1α mRNA 表达

采用异硫氢酸胍一步法提取皮肤创面组织的总 RNA,采用 RT-PCR 技术对转录产物进行扩增,以 GAPDH 作内参对照,引物:SDF-1α, 上游:5′-AAACTGTGCCCTTCAGATTGTT-3′, 下游:5′-CGGGGAACTAGTTTTTCCTTTT-3′,产物大小 209 bp;GAPDH, 上游:5′-TGACATCAAGAAGGTGGTGAAG-3′, 下游:5′-ATCCTGTTGCTGTAGCCGTATT-3′,产物大小 470 bp。取 PCR 反应产物 10 μl 在 1 × 电泳缓冲液 Tris-乙酸(TAE)制备 2.0% 琼脂糖凝胶中电泳,加入浓度为 0.5 μg/ml 的溴化乙啶(EB)染色,用 DL 2000 为标准判断 PCR 产物片段大小,恒压 5 V/cm^2 电泳,Quantity One 软件扫描计算灰度值,实验结果以检测条带与 GAPDH 条带的总灰度值的比值检测目的片段的相对表达水平。

1.5　Western blot 检测 SDF-1α 的蛋白表达

按照 RIPA 试剂盒说明书操作步骤提取各时间点创缘组织蛋白,取等量标准化后的蛋白溶液加入等体积的 2 × SDS 上样缓冲液并沸水煮 5 min。取 40 μl 变性的蛋白溶液,行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶(5% 积层胶和 15% 分离胶)电泳,并以电转膜仪将蛋白转移至 PVDF 膜上,以 5% 脱脂奶粉封闭,加一抗(1∶50 羊抗 SDF-1α 多抗,1∶5 000 小鼠抗 β-actin 单抗)及二抗(抗羊 IgG-HRP,抗小鼠 IgG-HRP)行免疫印迹检测,ECL 试剂盒发光,胶片曝光,Quantity One 软件扫描计算灰度值,以 β-actin 为内参照,实验结果以检测条带与 β-actin 条带的总灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达水平。

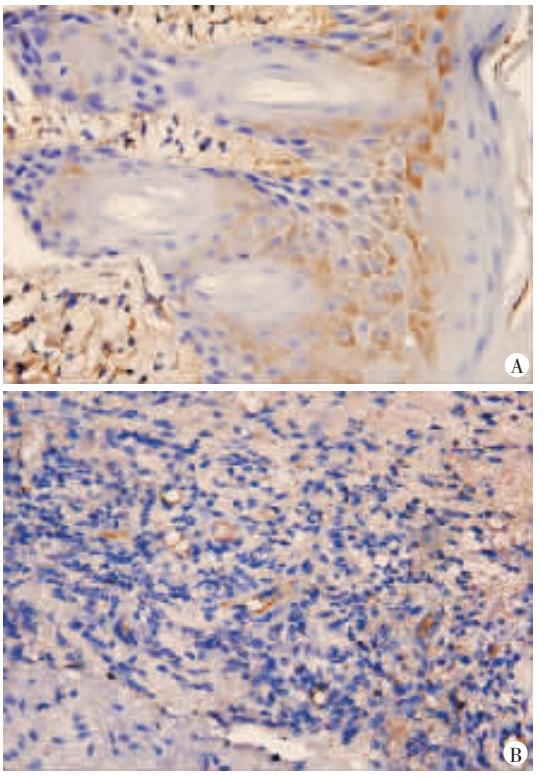
1.6　统计学处理

RT-PCR 和 Western blot 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SAS 8.2 统计软件进行单因素方差分析和 Dunnet-t 检验。

2　结果

2.1　免疫组织化学染色

免疫组化结果显示,SDF-1α 主要表达在创面的新生上皮细胞(图 1A)及血管内皮细胞(图 1B)的细胞质中。

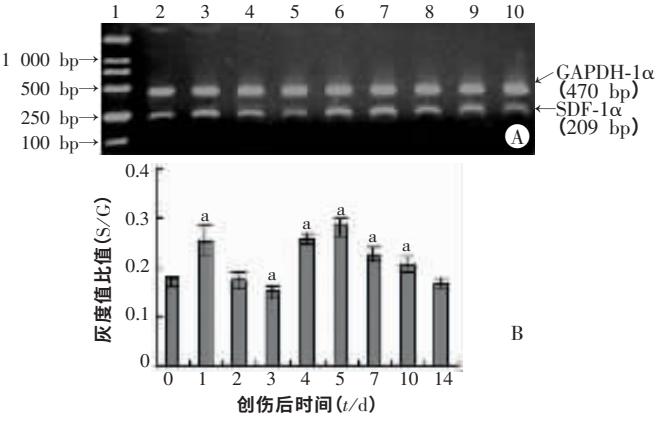


A:新生表皮细胞;B:血管内皮细胞

图 1　SDF-1α 在创面的表达　(S-P × 400)

2.2　SDF-1α mRNA 表达变化

皮肤组织发生缺损伤后 1 d,SDF-1α mRNA 表达较正常组织明显增加($P < 0.05$)。2 d 时基本恢复到正常组织水平,3 d 时表达量最低,低于正常组织水平($P < 0.05$)。伤后第 4、5 天,SDF-1α mRNA 表达开始回升,第 5 天达峰值($P < 0.05$),以后又逐渐下降,14 d 时基本恢复至正常水平(图 2)。表明小鼠皮肤创伤愈合过程中创面 SDF-1α mRNA 表达呈双峰。

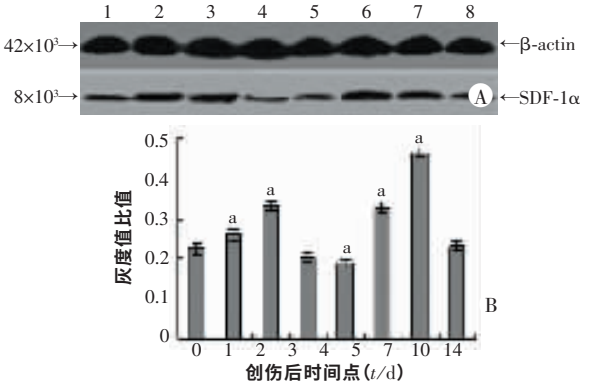


A:电泳结果　1:标准;2 – 10:0、1 ~ 5、7、10、14 d;B:定量分析结果　a:$P < 0.05$,与 0 d 比较

图 2　损伤后各时间点 SDF-1α mRNA 的表达

2.3 SDF-1α 蛋白表达变化

Western blot 检测表明,正常皮肤组织表达 SDF-1α 蛋白,在创伤后表达逐渐增加,并在伤后 2 d 表达较正常组织显著增加($P<0.05$)。随后表达减少,在伤后 4 d 表达低于正常组织水平($P<0.05$)。伤后 5 d,SDF-1α 蛋白表达回升,7 d 时再次达峰值($P<0.05$),在 14 d 时基本恢复至正常水平(图 3)。可见小鼠皮肤创伤愈合过程中创面 SDF-1α 蛋白表达也呈双峰。



A:Western blot 结果 1~8:0、1~5、7、14 d;B:定量分析结果

a:$P<0.05$,与 0 d 比较

图 3 损伤后各时间点 SDF-1α 蛋白的表达

3 讨论

SDF-1 在组织/器官损伤修复过程中起着重要作用,在多种器官中持续性表达[3-6],SDF-1α 是其在体内的主要存在形式[7],因此,本实验主要观察 SDF-1α 在创面的表达特征,实验结果显示正常皮肤组织也组成、表达 SDF-1α,主要表达于表皮的基底层和真皮的成纤维细胞。在皮肤创伤愈合过程中,创缘 SDF-1α mRNA 表达呈双峰改变,分别位于创伤后第 1 天和第 5 天。伤后第 1 天 SDF-1α 表达显著增加,很可能与皮肤组织缺损造成的局部缺血缺氧有关。Ceradini 等[8]研究表明,组织缺血缺氧能够快速诱导缺氧诱导因子-1α 表达,而后者能够在转录水平上促进 SDF-1α 表达上调。伤后第 2、3 天是炎症反应激烈期。大量巨噬细胞逐渐成为创面主要的炎性细胞,使得创面 IL-1 和 TNF-α 在伤后第 3 天达峰值,有研究显示 IL-1 和 TNF-α 能强烈抑制成纤维细胞合成和分泌 SDF-1α[9],这可能是伤后第 3 天 SDF-1α 表达显著减少的重要原因。创伤后 4~14 d 进入创伤愈合的增殖期,此期以创面肉芽组织形成为特征,伤后第 4 天 SDF-1α 表达又开始逐渐升高,于第 5 天再次达峰值,通常第 4 天已可见明显的肉芽组织形成,新生血管内皮细胞和成纤维细胞都是 SDF-1 的重要来源[8,9],这可能是伤后第 5 天出现 SDF-1 表达高峰的主要原因,随后一直维持在较高水平。已有研究显示 SDF-1 不仅是参与新生血管形成的关键细胞因子[7,10],也是第一个报道的对人类 $CD34^+$ 祖细胞有强烈趋化作用的 CXC 趋化因子[11]。因此,创面的炎症反应抑制 SDF-1 表达,不仅可能干扰创面新生血管形成,而且可能对骨髓来源干细胞参与的愈合具有阻遏作用[12],这也是我们下一步实验要探讨的问题。

本实验初步研究结果显示,在皮肤创伤的正常愈合过程中,创面 SDF-1 的基因及蛋白均呈双相表达,SDF-1 表达增加对于促进创伤修复可能起到积极作用。而另一方面,炎症反应可能抑制其表达,其表达减少可能阻碍愈合或延迟愈合。因此,对于 SDF-1 在创伤修复过程的具体作用及机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing[J]. Clin Dermatol, 2007, 25(1): 9-18.

[2] Kucia M, Ratajczak J, Reca R, *et al*. Tissue-specific muscle, neural and liver stem/progenitor cells reside in the bone marrow, respond to an SDF-1 gradient and are mobilized into peripheral blood during stress and tissue injury[J]. Blood Cells Mol Dis, 2004, 32(1): 52-57.

[3] Jiang Y P, Wu X H, Xing H Y, *et al*. Role of CXCL12 in metastasis of human ovarian cancer[J]. Chin Med J (Engl), 2007, 120(14): 1251-1255.

[4] Kucia M, Reca R, Miekus K, *et al*. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis [J]. Stem Cells, 2005, 23(7): 879-894.

[5] Tang Y L, Qian K, Zhang Y C, *et al*. Mobilizing of haematopoietic stem cells to ischemic myocardium by plasmid mediated stromal-cell-derived factor-1alpha (SDF-1alpha) treatment[J]. Regul Pept, 2005, 125(1-3): 1-8.

[6] Togel F, Isaac J, Hu Z, *et al*. Renal SDF-1 signals mobilization and homing of CXCR4-positive cells to the kidney after ischemic injury[J]. Kidney Int, 2005, 67(5): 1772-1784.

[7] Yu L, Cecil J, Peng S B, *et al*. Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1[J]. Gene, 2006, 374: 174-179.

[8] Ceradini D J, Kulkarni A R, Callaghan M J, *et al*. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1[J]. Nat Med, 2004, 10(8): 858-864.

[9] Fedyk E R, Jones D, Critchley H O, *et al*. Expression of stromal-derived factor-1 is decreased by IL-1 and TNF in dermal wound healing [J]. J Immunol, 2001, 166(9): 5749-5754.

[10] Gallagher K A, Liu Z J, Xiao M, *et al*. Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1 alpha[J]. J Clin Invest, 2007, 117(5): 1249-1259.

[11] Aiuti A, Webb I J, Bleul C, *et al*. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human $CD34^+$ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of $CD34^+$ progenitors to peripheral blood[J]. J Exp Med, 1997, 185(1): 111-120.

[12] 谢 江, 李廷玉, 曾丽玲, 等. 骨髓间充质干细胞促进大鼠皮肤创面愈合的作用及机制研究[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(23): 2316-2319.

(编辑 王小寒)