基础研究 文章编号:0253-3626(2011)08-0947-02

孵育鸡蛋膜对深Ⅱ度烧伤创面 bFGF、EGF 表达的影响及意义

陈大芳,易凤琼,吕碧琼
(重庆医科大学附属第一医院麻醉科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究孵育鸡蛋膜对大鼠深Ⅱ度烧伤创面碱性成纤维细胞生长因子(Basic fibroblast growth factor,bFGF)、上皮生长因子(Epidermal growth factor,EGF)表达的影响及意义。方法:以鸡蛋膜、暴露处理为孵育鸡蛋膜对照,测定伤后 7、14、21 d 创面愈合率、创面羟脯氨酸含量、EGF 和 bFGF 表达量。结果:孵育鸡蛋膜在各时间点愈合率高于暴露组,伤后 7 d EGF,bFGF 表达高于对照组。结论:孵育鸡蛋膜对深Ⅱ度烧伤创面愈合有促进作用,其促愈机理与覆盖孵育鸡蛋膜后创面 EGF,bFGF 表达增高相关。

【关键词】孵育鸡蛋膜;烧伤;EGF;bFGF
【中国图书分类法分类号】R64 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-02-15

Effect and significance of incubated egg membrane on the expressions of bFGF and EGF of deep second degree skin burn in rats

CHEN Da-fang, YI Feng-qun, LV Bi-qiong
(*Department of Anesthesia, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the effect of incubated egg membrane on the expressions of bFGF and EGF in deep second degree skin burn in rats. *Methods*: With the egg membrane exposed as the control for the incubated egg membrane, the wound-healing rate was measured on the 7th, 14th and 21st day after burn injury. The contents of hydroxyproline, and the expressions of bFGF and EGF were detected. *Results*: The wound healing rate of incubated egg membrane group was higher than that of exposed group. On the 7th day after burn injury, the expressions of bFGF and EGF in incubated egg membrane group were higher than those of the control group. *Conclusion*: Incubated egg membrane may promote the burn healing significantly, through enhancing the expressions of bFGF and EGF in the burn wound.

【Key words】incubated egg membrane; burn; EGF; bFGF

羊膜由于其特殊的组织结构，而具有抗微生物感染、抗过度纤维化,促进细胞迁移增生的作用[1],是用于治疗烧伤的一类优良生物敷料。作者用孵育鸡蛋膜处理大鼠皮肤深Ⅱ度烧伤创面,探讨其对创面组织愈合有重要作用的 bFGF,EGF 表达影响及治疗效果,为进一步临床应用提供实验参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂与设备 羊抗人(Epidermal growth factor,EGF)、(Basic fibroblast growth factor,bFGF)、兔抗羊 Ig 抗体(美国 Santa cruz 公司),电泳试剂盒(武汉博士得公司),发光试剂盒(美国 GE 公司),蛋白提取液(武汉博士得公司),羟脯氨酸测定试剂盒(南京建成试剂公司),图像分析系统(美国 BID-RAD 公司 ChemiDOCXRS),微量恒温仪(绍兴卫星医疗设备公司 XIO-8B)。

1.1.2 孵育鸡蛋及鸡蛋膜膜制备 无菌技术取孵育 14 d 的鸡蛋膜、普通鸡蛋膜,生理盐水冲洗后置 0.5%戊二醛中,4℃保存备用。

1.1.3 深Ⅱ度烧伤模型制备与分组 雄性 Wistar 大鼠 21 只,体重 200~250 g。大鼠经乙醚吸入麻醉后,8%硫代钠液脱大鼠背部毛发,参考有关制备深Ⅱ度烧伤模型文献[2](并经病理切片证实),用在温控仪热巢中 80℃预热 1 h 的烫面 1.5 cm^2 铝合金模具在鼠背部接触 15 s,每只鼠背部烫 3 处,创面间隔 1 cm。分别随机用于暴露,覆盖孵育鸡蛋膜及鸡蛋膜处理。观察时相点分别为 7、14、21 d(每时相点 7 只)。

1.2 方法

1.2.1 测定愈合率 将不同时段未愈合创面描记在去基膜的 X 光片上,剪下描记部分,用分析天平称重,间接代表未愈合创面面积,初始创面面积为 1.5 cm^2 去基膜 X 光片重量。愈

作者介绍:陈大芳(1963-),女,主管护师,
研究方向:临床护理。

合率%=(初始创面面积-未愈合面积)/初始创面面积。

1.2.2 制备创面组织液 用电子分析天平称取创面组织，置玻璃匀浆器内，每 1 ml 蛋白提取液/mg 组织比例加蛋白提取液，研磨 200 次后置 40℃、30 min，取匀浆置离心管中 12 000 r/min 离心 20 min。取上清液测定蛋白含量，用 DH_2O 将蛋白浓度均调至 3 mg/ml。

1.2.3 创面组织羟脯氨酸测定 取组织液按羟脯氨酸测定试剂盒说明书操作，测定其羟脯氨酸含量。

1.2.4 组织液 EGF、bFGF 表达测定 将组织液经 100 g/L SDS-聚丙稀酰胺凝胶电泳，电转于二氟化树脂膜(Polyvinylidene flucride menberame，PVDS)膜，50 g/L 脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭，经一抗及二抗孵育后，化学发光法显色，图像分析系统拍摄并用 Quantity One 软件将特异条带灰度数字化。

1.3 统计学分析

采用 SPSS11.5 统计软件，结果以均数±标准差表示，2 组间进行 t 检验统计学分析，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 创面愈合率

创面愈合率见表 1。表中数据为原始数据经平方根反正弦变换后数据。由表 1 可见伤后 7 d 及 14 d 孵育鸡蛋膜组创面愈合率均高于暴露组，伤后 7 d 鸡蛋膜组创面愈合率高于鸡蛋膜组。

表 1 各组创面愈合率（n=7，$\bar{x}\pm s$）

组 别	伤 后 时 间		
	7 d	14 d	21 d
暴 露 组	357.53	479.57	546.60
鸡蛋膜组	388.47	525.40	572.96
孵育鸡蛋膜组	444.04**##	555.77*	572.96

*：与暴露组比较 $P<0.05$，**：与暴露组比较 $P<0.01$，#：与鸡蛋膜组比较 $P<0.05$

2.2 创面组织羟脯氨酸含量

创面组织羟脯氨酸含量见表 2。由表可见伤后 7 d 及 14 d 孵育鸡蛋膜组创面组织羟脯氨酸含量均高于暴露组（$P<0.01$）。

表 2 各组羟脯氨酸含量(n=7 μg 羟脯氨酸/mg 蛋白质 $\bar{x}\pm s$)

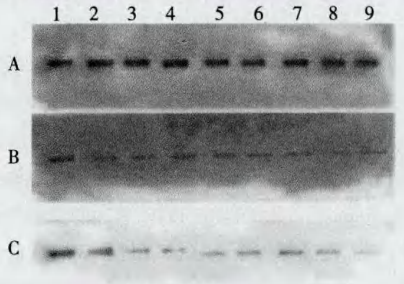
组别	伤后时间		
	7 d	14 d	21 d
暴露组	36.2 ± 3.3	50. ± 4.6	79.2 ± 5.2
鸡蛋膜组	45.5 ± 4.2*	65.1 ± 4.3*	80.0 ± 4.1
孵育鸡蛋膜组	58.3 ± 4.56**##	69.6 ± 5.0**	79.2 ± 4.6

*：与暴露组比较 $P<0.05$，**：与暴露组比较 $P<0.01$，##：与鸡蛋膜组比较 $P<0.01$

2.3 创面组织 EGF、bFGF 表达

创面组织 bFGF、EGF 表达见图 1。表达系数见表 3、4。由图及表可见伤后 7 d 孵育鸡蛋膜组创面组织 EGF、bFGF 表达均高于暴露组（$P<0.01$）。

（创面组织 EGF、bFGF 表达系数=EGF、bFGF 积分光密度/βactin 蛋白积分光密度）



1、4、7 分别为伤后使用孵育鸡蛋膜 7、14、21 d；

2、5、8 分别为伤后使用鸡蛋膜 7、14、21 d；

3、6、9 分别为伤后暴露处理 7、14、21 d；

A. β actin 蛋白；B. bFGFC 蛋白；C. EGF 蛋白

图 1 EGF、bFGF 及 β actin 蛋白表达

表 3 各组创面组织 bFGF 表达系数变化（n=7，$\bar{x}\pm s$）

组别	伤后时间		
	7 d	14 d	21 d
暴露组	0.19 ± 0.07	0.20 ± 0.09	0.14 ± 0.06
鸡蛋膜组	0.25 ± 0.09	0.25 ± 0.11	0.15 ± 0.07
孵育鸡蛋膜组	0.43 ± 0.07**##	0.31 ± 0.12**	0.17 ± 0.08

**：与暴露组比较 $P<0.01$，##：与鸡蛋膜组比较 $P<0.01$

表 4 各组创面组织 EGF 表达系数变化（n=7，$\bar{x}\pm s$）

组别	伤后时间		
	7 d	14 d	21 d
暴露组	0.15 ± 0.08	0.16 ± 0.07	0.05 ± 0.03
鸡蛋膜组	0.36 ± 0.10**	0.13 ± 0.07	0.13 ± 0.06
孵育鸡蛋膜组	0.60 ± 0.12**##	0.10 ± 0.05	0.18 ± 0.08

**：与暴露组比较 $P<0.01$，##：与鸡蛋膜组比较 $P<0.01$

3 讨 论

及时有效地封闭烧伤创面是治疗烧伤的重要环节。用羊膜覆盖创面有诸多优越性[1,3]，有人甚至强烈呼吁在发展中国家的医院建立“羊膜库”[4]。作者用孵育鸡蛋膜治疗大鼠深Ⅱ度烧伤创面，以扩展用于治疗创面的羊膜品种。

孵育鸡蛋膜经受孕、孵育，其结构、成分均羊膜化，其膜的厚度较普通鸡蛋膜增加。膜中的胶原、糖蛋白、蛋白多糖等成分增加，随之增厚的结构膜—基底膜更有利于上皮细胞的移行，增加上皮细胞的黏附，促进上皮化，防止上皮细胞凋亡。这些变化都更有利于烧伤创面的修复。本实验显示其对深Ⅱ度烧伤的治疗效果明显好于鸡蛋膜，估计与其结构、成分的差异有关。孵育鸡蛋膜对于大鼠是异种材料，作者采用同时具有广谱高效杀菌作用和遮蔽抗原位点的戊二醛[5]处理孵育鸡蛋膜，实验中未出现因排斥反应而致孵育鸡蛋膜脱落现象。

技术与方法 文章编号：0253-3626（2011）08-0949-05

结缔组织生长因子全长及其缺失突变体重组腺病毒的构建和鉴定

孙双双[1]，陈 红[1]，唐 敏[1]，施 琼[1]，黎玉叶[1]，王建伟[2]，周 兰[1]，何通川[1]，左国伟[1]

（1. 重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室；2. 重庆医科大学基础医学院组织学与胚胎学教研室，重庆 400016）

【摘 要】目的：结缔组织生长因子（Connective tissue growth factor，CTGF）含有 4 个不同功能结构域，构建表达带有 3×Flag 标签的全长基因及 5 个缺失突变体的重组腺病毒，以研究 CTGF 各结构域的功能和作用机制。方法：通过聚合酶链反应（Polymerase chain reaction，PCR）等克隆方法制备目标质粒 DNA，然后通过腺病毒穿梭载体与骨架载体的重组、包装构建全长 CTGF 和缺失突变体重组腺病毒。用 anti-Flag 抗体作为一抗做 Western blot 检测目的基因表达情况。结果：通过腺病毒基因组 DNA PCR 确认有 CTGF 全长和缺失突变体的存在；Western blot 法验证了 CTGF 全长和缺失突变体的表达。结论：成功构建了 6 个表达 CTGF 全长和缺失突变体的重组腺病毒，为进一步研究 CTGF 的结构域功能奠定了基础。

【关键词】结缔组织生长因子；缺失突变体；重组腺病毒

【中国图书分类法分类号】Q782 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-01-18

作者介绍：孙双双（1984-），女，硕士，
研究方向：分子肿瘤学。

通信作者：左国伟，男，讲师，Email:zuoguowei@gomail.com。

基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：30970872）。

深Ⅱ度烧伤的修复实质是肉芽组织中各种修复细胞增殖及分泌蛋白，成纤维细胞产生胶原而修补创面。本实验中应用孵育鸡蛋膜第 7 天的创面组织中 EGF、bFGF 及羟脯氨酸含量显著增高，同时创面愈合率显著高于对照组。EGF、bFGF 是促进组织愈合的两种重要因子，EGF 可直接刺激修复细胞内的蛋白质及细胞大分子的合成[6]。bFGF 可诱导成纤维细胞增殖，促进成纤维细胞形成胶原蛋白和肉芽组织[7]。羟脯氨酸为皮肤胶原中特有的氨基酸，其含量高低可提示胶原含量，而胶原蛋白含量的升高程度直接与组织修复正相关[8]。本实验结果提示，用孵育鸡蛋膜在深Ⅱ度烧伤早期促进创面愈合的机理可能为，使用孵育鸡蛋膜可促进创面组织 EGF、bFGF 蛋白表达增高，从而使创面组织中的胶原蛋白等有利于组织修复物质加速合成，导致深Ⅱ度烧伤早期创面愈合明显加快。

参 考 文 献

[1] Sheridan R L，Moreno C，Skin substitutes in burns[J].Burns，2001，27(1)：92-98.

[2] 严忠馥，郭寿延，王宝美.大鼠深Ⅱ度烫伤模型的病理研究[J].上海第二医科大学学报，1998，18(3)：222-223.

[3] Gajiated K，Gajiwala A L.Evaluation of lyophilized，gammairradiated amnion as biological dressing[J].Cell Tissue Bank，2004，5(2)：73-80.

[4] Ravishanker R，Bath A S，Rey R.“Amnion Bank”-the use of long tern glycerol preservel amniotic membranes in the management of su perficial and superficial partial thickness burns[J].Burns，2003，29(4)：369-374.

[5] 郭思覃.现代整形外科学[M].北京：人民军医出版社，2000.428.

[6] Kibe Y，Takenaka H，Kishimoto S.Spatial and temporal expression of basic fibroblast growth factor protein during wound healing of rat skin[J].Br J Dermatol，2000，143(4)：720-727.

[7] Bhora F Y，Dunkin B J，Batzvi S，et al.Effrct of growth factors on cell proliferation and epithelialization in human skin[J].J Surg Res，1995，59(2)：236-244.

[8] Portera C A，Love F J，Mermore L，et al.Effect of macrophage stim ulation on collagen biosynthesis in the healing wound[J].Am Surg，1997，63(2)：125-131.

（责任编辑：关蕴良）