重庆维普 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)11-1067-04

小鼠皮肤切创愈合过程中巨噬细胞炎性蛋白-1α的表达及其与损伤时间的关系

廖 鹰,邓世雄

(重庆医科大学基础医学院法医教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 MIP-1α 在小鼠皮肤切创损伤愈合过程中的表达分布变化规律及其与损伤时间的关系。方法:小鼠背部制做全层切创,应用免疫组织化学技术及阳性细胞计数法观察伤后小鼠切创组织中不同时程的生前伤(1h~14d)和死后伤(0.5~6h)皮肤创伤局部 MIP-1α 的表达,并和无切创的小鼠作为对照。结果:在生前损伤组中,MIP-1α 最早在伤后 6h 出现阳性表达,随后表达逐渐增多,在 3d 达到高峰,其后呈下降趋势。而 MIP-1α 在早期死后伤组及对照组仅在表皮,皮脂腺,汗腺上皮细胞呈弱阳性表达。结论:MIP-1α 在小鼠皮肤切创愈合过程中呈现一定时序性变化,有望作为法医损伤时间推断的一个有用的参考指标。

【关键词】MIP-1α;趋化因子;损伤时间;切创;免疫组化

【中国图书分类法分类号】R892 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-12-01

An immunohistochemical study on the time-dependent expression of MIP-1α during healing of skin incised wound in mice

LIAO Ying, et al

(*Department of Forensic Medicine, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To explore the expression of MIP-1α during healing of skin incised wound and the applicability of time-dependent expressions of MIP-1α to determination of wound age. *Methods*: An incised wound was made in the dorsal skin of mouse. Immunohistochemical and image-analysis techniques were employed in vital skin wounds 1h~14d after incision and postmortem incision 0.5~6h after death, and the non-incised mouse skin was used as control. *Results*: In the vital skin incisions, expression of MIP-1α began at 6h after incision, which increased subsequently, and peaked at 3d. The quantity of MIP-1α expression decreased and minimized in the specimens aged 14 days. In the non-wounded groups and postmortem incision groups MIP-1α was only detected as weak expression in the epidermic cells, sweat gland cells and endothelial cells. *Conclusion*: The time-dependent expression of MIP-1α during healing of skin incised wound may be used as a useful reference marker.

【Key words】 MIP-1α; Chemokines; Wounding interval estimation; Incised wound; Immunohistochemistry

趋化因子是能使细胞发生定向运动的小分子细胞因子。目前发现的趋化因子有四大类,巨噬细胞炎性蛋白-1α(MIP-1α)是属于 CC 类的趋化因子。MIP-1α 具有多种生物学作用,其炎症作用主要通过对炎性细胞的趋化作用及活化作用而参与炎症过程,另外还有免疫作用及其可抑制造血干细胞的增殖等。国内目前对 MIP-1α 研究多集中在临床领域,而在法医学对皮肤机械性损伤修复时间的推断上报道较少。本研究通过建立小鼠皮肤切创损伤模型,运用免疫组化技术对小鼠损伤组织进行 MIP-1α 的检测与分析,探讨在皮肤创伤愈合过程中其表达的时序性变化规律,以便为法医病理学损伤时间的推断提供一个新的理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物和分组

使用清洁级成年昆明系小鼠 70 只(重庆医科大学实验动物中心提供),雌雄不限,体重(35±5)g,随机分为实验组和

作者介绍:廖 鹰(1981-),女,硕士,研究方向:法医物证学及法医病理学。

通讯作者:邓世雄,男,教授,E-mail:dengshixiong1963@163.com。

重庆维普 http://www.cqvip.com

对照组。实验组又按照生前造创和死后造创时相点的不同分为生前创伤组和死后创伤组，每时相点 5 只动物，对照组 5 只动物取正常小鼠相同部位皮肤。具体分组为：实验组：生前造创组：1h、3h、6h、12h、1d、3d、6d、10d、14d 9 组，死后造创组：0.5h、1h、3h、6h 4 组；对照组：未造创死后即刻取材。

1.2 小鼠背部切创模型的建立及取材

常规手术消毒，在小鼠臀背部脊柱旁 1cm 处，做一与脊柱平行的皮肤全层切口，长约 1.5cm。创面自然止血，不包扎。不施药。切创后每只小鼠分笼饲养。给予消毒饲料及蒸馏水并保持伤口干燥、防止伤口感染。分别按生前造创组上述不同存活时间行颈椎脱位处死动物取材。死后造创组直接断颈处死后按 0.5h、1h、3h、6h 的分组时间在与生前造伤组小鼠背部相同部位造创取等量大小的皮肤组织块。对照组直接段颈处死后取相同部位皮肤组织。所取皮肤标本放入 4%多聚甲醛/PBS 中固定 24h 后，脱水、透明、石蜡包埋做常规病理组织学及免疫组化染色。

1.3 实验试剂

兔抗鼠 MIP-1α 多克隆抗体，羊抗兔 IgG，SABC 试剂盒及 DAB 显色剂均购于武汉博士德生物工程有限公司。

1.4 常规病理组织学切片染色

4%中性多聚甲醛缓冲固定液固定标本，常规脱水，包埋，切成 5m 切片，HE 染色，光镜观察。

1.5 免疫组化染色

兔抗鼠 MIP-1α 作为一抗，按 SABC 免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)说明进行染色，DAB 显色，苏木素做核复染。染色中以 PBS 代替一抗作阴性对照，未见非特异性染色。

1.6 MIP-1α 阳性细胞计数及统计学分析

显微镜(×400)下，每张切片随机选择 10 个视野数多核粒细胞、单核细胞和成纤维细胞的阳性细胞数，计算每个视野中阳性细胞与此 3 种细胞总数的比值。采用 SPSS for windows 10.0 软件包，应用方差分析进行统计学分析，数据应用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结 果

2.1 HE 组织切片染色观察

生前造创组：在伤后 1~3h 镜下可见真皮毛细血管扩张，充血，创缘毛囊周围少量中性粒细胞，6h 中性粒细胞继续游出逐渐增多，12h 有少量巨噬细胞游出，炎症细胞主要以中性粒细胞为主，1d 中性粒细胞数量达到最高峰，此时肉芽组织开始形成并向创口长入 3d 成纤维细胞开始增生，此时巨噬细胞达到最高峰，中性粒细胞大多消失，其后巨噬细胞减少至 6d 基本消失至 14d肉芽组织开始纤维化，创口基本愈合。

死后造创组及对照组：镜下未见生前损伤组上述改变。

2.2 免疫组化染色观察

对照组：在少量表皮细胞及毛囊，皮脂腺，汗腺上皮细胞呈弱阳性表达(见图 1)。

死后造创组：0.5h，1h 组在表皮细胞及部分毛囊表达弱阳性(见图 2)，3h 后表达阴性。

生前造创组：伤后 1h，3h 组切片染色与对照组基本相同；伤后 6h 后可见开始在损伤区侵润的中性粒细胞中少量 MIP-1α 的阳性表达；伤后 6~12h侵润的中性粒细胞数量增多，12h 后少量巨噬细胞游出，可见散在阳性表达的单核细胞和大量阳性中性粒细胞(见图 3)；1d后随着炎症细胞的增多，阳性细胞主要以中性粒细胞为主，伤后 3d 组(见图 4)，MIP-1α 的阳性表达达到最高峰，主要在大量的单核细胞内表达并在开始增生的成纤维细胞内表达；其后到 14d MIP-1α 阳性表达在部分成纤维细胞内。

2.3 阳性细胞计数及统计学分析

表 1 为 MIP-1α 阳性细胞百分率，经统计学方



图 1 对照组，MIP-1α 在表皮细胞，毛囊，皮脂腺内呈弱阳性表达(SABC×400)



图 2 死后造创 1h 组，MIP-1α 在少量的表皮细胞，毛囊，皮脂腺内呈弱阳性(SABC×400)

重庆维普 http://www.cqvip.com

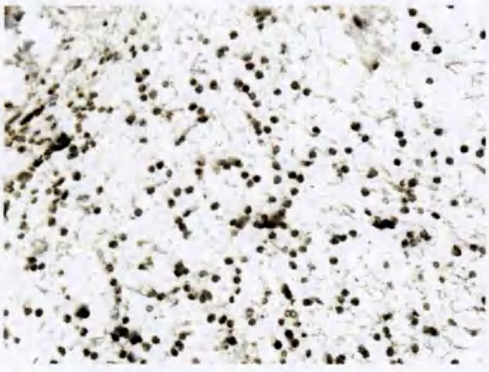


图 3 生前造创 12h 组，MIP-1α 在大量的中性粒细胞及少量单核细胞内呈阳性表达(SABC×400)

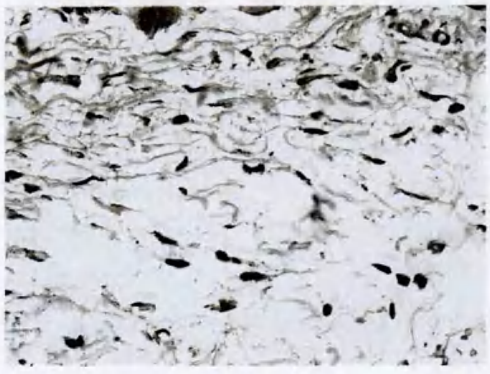


图 4 生前造创 3d 组，MIP-1α 主要在单细胞及部分成纤维细胞上阳性表达(SABC×400)

差分析，各相邻两组之间 MIP-1α 阳性细胞比率相比均具有显著差异($P<0.01$)，见表 1。其中伤后 3d组与其他各时间组相比均有显著差异($P<0.01$)。

表 1 不同损伤时间皮肤炎症细胞，修复细胞 MIP-1α 表达的阳性计数($\bar{x} \pm s$)

损伤时间	例数	MIP-1α 阳性细胞率
1~3h	10	3.04% ± 3.39%
6h	5	22.88% ± 4.82%
12h	5	26.75% ± 2.78%
1d	5	36.61% ± 4.45%
3d	5	64.45% ± 2.76%
6d	5	37.72% ± 3.07%
10d	5	33.01% ± 2.36%
14d	5	18.98% ± 2.89%

3 结 论

趋化性细胞因子又称趋化因子或趋化蛋白，它们参与白细胞迁移、激活和趋化，决定了哪些细胞将穿过内皮细胞及在组织中移到何处，在炎症反应中起核心作用。MIP-1α 属趋化因子 CC 亚族，分子量为 8ku，其基因定位于人 17q11.2-12，在不同因素刺激下，MIP-1α 可由多种细胞产生，如单核 / 巨噬细胞、成纤维细胞、内皮细胞、中性粒细胞、B 细胞及某些肿瘤细胞等[1]。MIP-1α 通过受体介导与靶细胞结合发挥其生物学活性。MIP-1α 的靶细胞有酸性粒细胞、单核细胞、活化 T 细胞、树突细胞、中性粒细胞、NK 细胞及造血干细胞，CCR1、CCR3 和 CCR5 为 MIP-1α 的受体，在不同的靶细胞上存在着不同的受体。MIP-1α 与其受体结合后，有趋化免疫细胞、抑制造血干细胞生长及抑制 HIV 感染的作用。

近几年对于 MIP-1α 的研究多集中在临床领域，研究发现其与一些有关炎性反应疾病发生发展过程关系密切。2002 年，Cowell 等[2]研究发现脑组织缺氧缺血后 MIP-1α 表达 4 ~ 16h 逐渐升高，72h 仍保持较高水平，其显著表达于神经损伤和单核 /巨噬细胞聚集的部位。Huffnagle 等[3]观察经支气管内接种新型隐球菌的小鼠灌洗液中 MIP-1α 浓度升高，加入特异 MIP-1α 抗体后，肺内单核细胞、中性粒细胞、巨噬细胞数目明显减少。其他一些炎性疾病，如细菌性脑膜炎、多发性硬化的脑脊液等也均可检测到 MIP-1α[4,5]。以上研究结果均表明 MIP-1α 在炎性反应过程中起着重要的作用。

本实验研究利用免疫组化方法对小鼠切创部位进行观察检测发现，在正常对照组及死后伤组 MIP-1α 仅在表皮细胞及毛囊，皮脂腺，汗腺上皮细胞呈弱阳性表达。生前伤后创伤皮肤 MIP-1α 的表达变化有一定的时间规律，在损伤后 6h 开始表达，72h 表达最强，其后逐渐下降。MIP-1α 阳性表达细胞在损伤修复早期主要在中性粒细胞表达，在修复中晚期主要在大量的巨噬细胞内表达，及可见部分阳性表达的成纤维细胞。Dipietro 等[6]发现老鼠受伤后伤口里 MIP-1α mRNA 及其表达蛋白质在受伤 3d 后达到高峰。我们的研究结果与 Dipietro 的研究结果基本一致，MIP-1α 的表达同巨噬细胞渗出时间一致，提示 MIP-1α 在巨噬细胞至伤口的补充及组织的修复中进程一致，其时程性表达可作为损伤时间推断的参考。另外值得注意的是，为何 MIP-1α 在死后早期损伤有弱阳性表达，其引起因素很多如死后伤早期尚有活力的细胞对损伤刺激具有超生反应能

重庆维普 http://www.cqvip.com

力[8],死后早期创口仍有出血,含有细胞因子成分等原因,但其性质与生前伤有本质上的不同。

本研究结果表明了 MIP-1α 主要参与了创伤愈合中晚期组织修复过程并发挥了重要的作用,其在创伤后表达的时序性变化规律对于法医学检案中损伤时间的推断有重要的意义。但由于 MIP-1α 对损伤刺激反应主要在损伤修复中晚期,其并非是一个损伤敏感性指标,因此我们认为在伤后存活时间推断中,MIP-1α 表达只能作为辅助指标, 应结合其他指标联合检测,并且相对于人体检案的实用性和可行性还有一定的差距,有待进一步完善。

参 考 文 献

[1] Scarpino S,Stoppacciaro A,Ballerini F,et al. Papllary carcinoma of the thyroid:hepatocyte growth factor(HGF).stimulate stumor cell store lease chemokines active in recruiting dendritic cells[J]. Am Jpathol,2000;156(3):831-837.

[2] Cowell RM,Xu H,Galasso JM,et al. Hypoxic-ischemic injury induces macrophage inflammatory protein-lalpha expression in immature rat brain[J]. Stroke,2002;33(3):795-801.

[3] Huffnagle GB,Strieter RM,McNeil LK,et al. Macrophage inflammatory protein-1alpha(NIP — 1alpha) is required for the efferent phase of pulmonary cell mediated immunity to a Cryptococcus neofprmans infection[J]. J Immunol,1997;159(3):318-327.

[4] Zang YC,Samanta AK,Halder JB,et al. Aberrant T cell migration toward RANTES and MIP-1α in patients with multiple sclerosis:overexpression of chemokine receptor CCR5[J]. Brain,2000;123(9):1874-1882.

[5] Domachowake JB,Bonville CA,Gao JL,et al. The chemokine macrophage-inflammatory ptotein-1α and its receptor CCR1 control pulmonary inflammation and antiviral host defense in paramyxovirus infection[J]. J Immunol,2000;165(5):2677-2682.

[6] Dipietro A,Burdick M,low QE,et al. NIP-1alpha as a critical macrophage chemoattractant in murine wound repair[J]. J Chn Invest,1998;101(8):1693-1698.

[7] Ohshima T. Forensic wound examination[J]. Forensic Sci Int,2000;113:153-164.

[8] 王慧君,阮海根,黄光照.PDGF-B,PDGFR-B,TGF-β1,bFGOF 在创伤愈合过程中的表达变化与损伤时间关系的研究[J]. 法医学杂志,2001;17(4):198-204.

(责任编辑:冉明会)

(上接第 1049 页)

白的明确表达,具体原因尚有待于进一步探讨。但与 Kawamura 等报道[9]相符:基因改造的高表达 p300 基因的大鼠能对抗阿霉素所致心肌细胞凋亡及心衰,仅通过提高 Bcl-2 基因表达水平实现, 而 p53 没有变化。

综上所述:与传统的 STH-2 心脏停搏液比较,TTX 心脏停搏液能减少大鼠缺血再灌注心肌细胞凋亡的数量,具有更好的心肌保护作用;TTX 心脏停搏液减轻心肌细胞凋亡可能是通过上调抑制凋亡蛋白 Bcl-2 表达,下调促进凋亡蛋白 Bax 表达,提高Bcl-2/Bax 比值来实现。

参 考 文 献

[1] 谭松涛,杨双强,杨朝坤,等.极化停博液用于离体大鼠心脏保存的实验研究[J]. 重庆医科大学学报,2005;30(3):448-451.

[2] 杨朝坤,杨双强,谭松涛,等.河豚毒素停搏液减轻大鼠心肌细胞内钙超载作用的实验研究[J]. 第三军医大学学报,2005;27(3):192-195.

[3] Raphael J,Abedat S,Rivo J,et al. Volatile anesthetic preconditioning attenuates myocardial apoptosis in rabbits after regional Ischemia and reperfusion via akt signaling and modulation of Bcl-2 family proteins[J]. J Pharmacol Exp Ther,2006;318(1):186-194.

[4] Wang C,Neff DA,Krolikowski JG,et al.The influence of B-cell lymphoma 2 protein,an antiapoptotic regulator of mitochondrial permeability transition,on isoflurane-induced and ischemic postconditioning in rabbits[J].Anesth Analg,2006;102(5):1355-1360.

[5] Hochhauser E,Kivity S,Offen D,et al. Bax ablation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in transgenic mice[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2003;284(6):H2351-H2359.

[6] Diep QN,El Mabrouk M,Yue P,et al. Effect of AT(1)receptor blockade on cardiac apoptosis in angiotensin Ⅱ-induced hypertension [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2002;282(5):H1635-H1641.

[7] Hofseth LJ,Hussain SP,Harris CC. p53:25 years after its discovery[J]. Trends Pharmacol Sci,2004;25(4):177-181.

[8] Venkatapuram S,Wang C,Krolikowski JG. Inhibition of apoptotic protein p53 lowers the threshold of isoflurane-Induced cardioprotection during early reperfusion in rabbits [J].Anesthesia,2006;103(6):1400-1405.

[9] Kawamura T,Hasegawa K,Morimoto T,et al.Expression of p300 protects cardiac myocytes from apoptosis in vivo[J]. Biochem Biophys Res Commun,2004;315(3):733-738.

(责任编辑:关蕴良)