DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.15.003
第25卷第15期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 15
1318 2003年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)15-1318-04

uPA和uPA-R在人胚胎角膜碱烧伤后修复过程中作用的体外研究

严 军,杨 恬,李国平,高强国,杨 进 (第三军医大学基础医学部细胞生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 研究体外条件下人胚胎角膜碱烧伤后修复过程中尿激酶型纤溶酶原激活剂(Urokinase type PA, uPA)和尿激酶型纤溶酶原激活剂受体(uPA-receptor, uPA-R)的作用。方法 在建立体外碱烧伤模型的基础上,采用细胞培养和形态学观察、ICC法以及图像分析等技术。结果 角膜缘和中央角膜源性的离体细胞的生长情况无明显差异,几乎所有细胞均表达AE1/AE3。碱烧伤后uPA和uPA-R的表达在碱烧伤后24 h左右达到峰值,其中uPA的表达部位多位于胞浆,uPA-R则相对较多位于胞膜。结论 组织块法培养可以获得纯度较高的角膜上皮细胞,胚胎组织的发育和细胞活力与成体角膜之间可能存在着差异,uPA和uPA-R的作用在上皮组织中也可能存在着较强的共性。

关键词:尿激酶型纤溶酶原激活剂;和尿激酶型纤溶酶原激活剂受体;人胚胎角膜;碱烧伤;修复
中图法分类号:R321;R322.9+1;R392.11 文献标识码:A

Roles of uPA and uPA-R in the course of repair after human embryo corneal alkali burn *in vitro*

YAN Jun, YANG Tian, LI Guo-ping, GAO Qiang-guo, YANG Jin (Department of Cell Biology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the roles of urokinase type PA (uPA) and uPA-receptor (uPA-R) in the course of repair after human embryo corneal alkali burn *in vitro*. Methods After the alkali burn model *in vitro* was established successfully, some techniques such as the observation of cell culture and morphology, ICC and image analysis were used. Results No significant difference was found between the cells from corneal limbus and central cornea and almost all of them expressed AE1/AE3. The expressions of uPA and uPA-R increased to the maximum at about 24 h after alkali burn. uPA expression distributed mainly in the cytoplasm but uPA-R expression distributed mainly in the cell membrane. Conclusion The corneal epithelial cells of comparatively high purity can be acquired by tissue culture. There probably exists difference in development and vitality between embryo and adult cornea. There might be commonness of the roles of uPA and uPA-R in epithelial tissue.

Key words: urokinase type PA; uPA-receptor; human embryo cornea; alkali burn; repair

尿激酶型纤溶酶原激活剂(Urokinase type PA, uPA)和尿激酶型纤溶酶原激活剂受体(uPA-receptor, uPA-R)是纤溶酶原激活剂/纤溶酶原激活剂抑制剂(Plasminogen activator/plasminogen activator inhibitor, PA/PAI)级联的重要因子,不但参与体内纤溶、止血、排卵、哺乳期乳腺增生等过程[1],而且在细胞形成过程中的迁移、增殖、分化以及上皮损伤后组织重建等方面发挥着十分关键的作用[2],并可能直接调控其它生长因子的作用。目前uPA和uPA-R的作用已在表皮角质形成细胞、毛囊周期的调控和毛囊发育等研究中得到证实[3,4],尤其是在损伤后24 h左右的修复过程中。然而,有关它们在角膜碱烧伤中参与创伤愈合的研究还少有报道。同时,作为角膜上皮生物学研究的重要载体,人胚胎角膜上皮细胞培养的报道也不多。因此,本实验对体外条件下人胚胎角膜碱烧伤后修复过程中uPA和uPA-R的作用进行了研究。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM/F12干粉培养基及新生型小牛血清来自美国Hyclone公司,鼠抗人细胞角蛋白AE1/AE3单克隆抗体及SP-9000型免疫细胞化学染色试剂盒来自北京中山生物技术有限公司,兔抗人uPA和uPA-R单克隆抗体来自美国American Diagnostica Inc公司。

1.2 主要实验设备

TIGER™细胞图像仪(细胞图像分析软件 v3.3)来自重庆大

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054204)
作者简介:严 军(1970-),男,浙江省宁波市人,博士,讲师,主要从事角膜上皮生物学及组织修复方面的研究。电话:(023)68752259
收稿日期:2002-07-09;修回日期:2003-01-25

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

学 ICT 中心。

1.3　材料

合法渠道获得的人新鲜胚胎(胎龄 20~28 周)来自第三军医大学附属西南医院和新桥医院。

1.4　人胚胎角膜缘和中央角膜上皮细胞的原代培养和鉴定

取胚胎眼球后将角膜分离, 按角膜缘和中央角膜两个部位用组织块法进行细胞培养, 常规换液, 测定并绘制不同部位源性细胞的生长曲线, 并对盖玻片上培养的融合细胞用细胞角蛋白 AE1/AE3 单抗进行免疫细胞化学鉴定。

1.5　人胚胎角膜上皮碱烧伤体外模型的建立

常规培养完整的人胚胎角膜上皮细胞至融合, 用不同浓度的 NaOH 溶液对细胞进行碱烧伤, 以碱对细胞发生作用而不使细胞全部死亡为前提, 探索最佳碱浓度及作用时间[5~7]。碱烧伤后继续常规培养, 并设立碱烧伤后即时、6、12、24、48 h 等时相。

1.6　体外条件下碱烧伤后修复过程中 uPA 和 uPA-R 的检测

丙酮固定各时相细胞。0.01 mol/L PBS 漂洗, 1%H_2O_2-甲醇溶液阻断内源性过氧化物酶, 分别用 uPA 和 uPA-R 单抗孵育过夜。IgG/Bio 溶液37 ℃ 处理 15 min 后, 再加入 S-A/HRP 溶液 37 ℃ 15 min, DAB 显色。梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。光镜观察。

2　结果

2.1　人胚胎角膜上皮细胞培养的观察

组织块贴壁后 24 h 内部分组织块就有生长晕发生。48~96 h 内可见有许多单层细胞从组织块中游离出来。不同源性部位的角膜上皮细胞发生融合往往在原代培养后 12~14 d, 而且角膜缘和中央角膜源性的离体细胞的生长情况无明显差异, 见图 1。融合细胞排列整齐, 多为规则六角形或多边形, 呈"铺路石"状排列, 具典型的上皮细胞特征, 见图 2, 几乎所有细胞均表达 AE1/AE3, 见图 3。

2.2　人胚胎角膜上皮碱烧伤体外模型的建立

最佳 NaOH 溶液的浓度为 0.1 mol/L, 加 0.2 ml 碱溶液入 25 ml 细胞瓶作用约 1.5 min 即可。

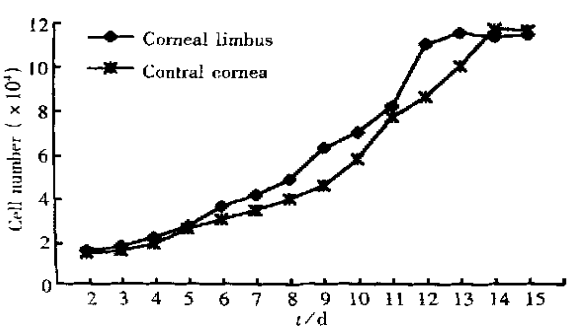


图 1　人胚胎角膜缘和中央角膜源性细胞生长曲线

Fig 1　The cell growth curve of corneal limbus and central cornea from human embryo

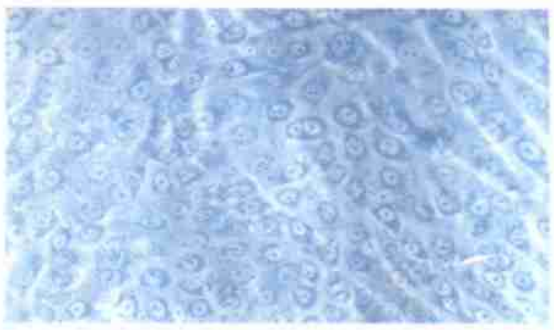


图 2　人 28 周龄胚胎角膜上皮细胞　(ICC× 200)

Fig 2　Human 28-week embryo corneal epithelial cells　(ICC× 200)



图 3　人 20 周龄胚胎角膜上皮细胞 AE1/AE3 免疫细胞化学染色　(SABC× 100)

Fig 3　AE1/AE3 immunocytochemical staining of human 20-week embryo corneal epithelial cells　(SABC× 100)

2.3　体外条件下人胚胎角膜上皮碱烧伤后修复过程中 uPA 和 uPA-R 的表达

uPA 和 uPA-R 的 ICC 染色结果表明, 碱烧伤前, 二者均有一定表达, 而且表达量相似。碱烧伤后 12 h 内即可明显探测到 uPA 的上调表达, 至 24 h 左右达到最大, 48 h 后表达降低并维持相对恒定的表达量; 同时 uPA-R 在创伤后 12 h 内有低表达, 24 h 时达到最大并基本维持该表达水平。但从整体而言, 其表达量不是很强, 尤其是 uPA-R 的表达, 见图 4。二者在胞膜和胞浆中均有表达, 但 uPA 的表达部位多位于胞浆, uPA-R 则相对较多位于胞膜。



图 4　碱烧伤后 48 h 人 28 周龄胚胎角膜上皮细胞 uPA　(SABC× 200)

Fig 4　Human 28-week embryo corneal epithelial cells uPA at 48 h after alkali burn　(SABC× 200)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

细胞图像分析软件 v3.3 处理 ICC 染色结果，在相同条件下可得各自的细胞片 uPA 和 uPA-R 表达的积分光密度(IOD)值，见表 1。扣除阴性对照的数值，可近似反映人胚胎角膜碱烧伤后修复过程中 uPA 和 uPA-R 表达的动态变化，见图 5。

表 1 碱烧伤后人胚胎角膜上皮细胞 **uPA** 和 **uPA-R** 的表达分析

Tab 1 The expression analysis of uPA and uPA-R in human embryo corneal epithelial cells after alkali burn

Group	uPA(IOD)	uPA-R(IOD)
Negative control	33.148	33.148
Normal cells	45.283	34.659
6 h after alkali burn	49.254	38.336
12 h after alkali burn	60.759	55.415
24 h after alkali burn	96.518	110.177
48 h after alkali burn	71.106	60.221

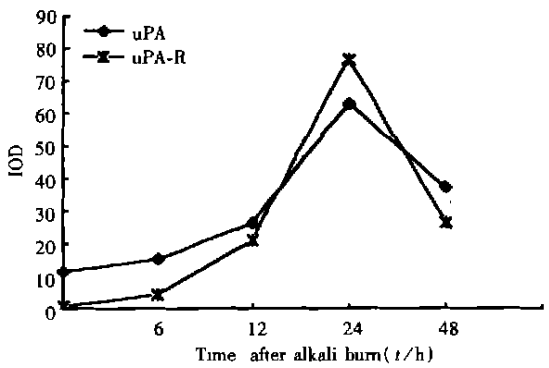


图 5 碱烧伤后人胚胎角膜上皮细胞 **uPA** 和 **uPA-R** 表达的动态变化

Fig 5 The dynamic change of the uPA and uPA-R expressions in human embryo corneal epithelial cells after alkali burn

3 讨论

本实验的研究结果表明，组织块法培养的人胚胎角膜上皮细胞具有典型的上皮细胞特征。这可能是因为以下几个原因：首先，组织块法本身适合培养组织量少的原代培养[8]；其次，角膜的特殊结构决定了在原代培养的细胞中占主导地位的是上皮细胞[9]；第三，基质层中少量的成纤维细胞在促进上皮细胞的生长优势过程中可能发挥了积极作用[10]。

一般情况下，角膜缘源性的离体细胞比中央角膜更具有生长优势，这是与角膜缘基底上皮层的角膜干细胞分不开的[11]。但本实验显示，人胚胎角膜缘和中央角膜源性的离体细胞培养看不到上述差别，这可能是因为胚胎组织的发育和细胞活力与成体角膜之间存在差异的缘故[11]。因此，本实验所用的人胚胎材料，都处于角膜缘发育不完全的阶段，而角膜干细胞作为成体干细胞的一种，它是在角膜发育完成后由胚胎干细胞诱导分化产生的[12]。因此出现上述结果可能表明角膜干细胞在人 28 周龄胚胎中有所作用但尚未完全形成。

本实验在建立体外碱烧伤模型的基础上，发现碱烧伤后 uPA 和 uPA-R 的表达存在一个缓慢的上升过程，往往以碱烧伤后 12 h 为界，并在碱烧伤后 24 h 左右达到峰值，然后迅速回落，至碱烧伤后 48 h 达到最低点。

有观点认为[2]，uPA 和 uPA-R 主要在表皮的角质形成细胞的迁移、增殖等活动中发挥作用，并通过复合物的形成而起作用，但前者可单独介导周围基质蛋白的水解、细胞迁移和组织修复等活动，后者也可单独发挥重要作用，特别是在细胞迁移、新生血管的形成、组织重建以及肿瘤细胞的侵袭转移等生理和病理过程中。

本实验获得的结果与人和小鼠的胚胎发育、毛囊发育以及皮肤创伤愈合过程中 PA/PAI 级联各因子的表达基本一致[3,4,7]。Berta 等[13] 和 Hayashi 等[14] 的研究也证实了这一点。从机制上讲，组织损伤后，会形成一个临时性的包含纤维蛋白的基质，随后被颗粒组织所代替。代替过程要求纤维蛋白水解酶的胞外基质蛋白水解，而 uPA 和 uPA-R 正好可以完成从纤溶酶原到纤溶酶的降解作用[15]。上述结果提示，uPA 和 uPA-R 的作用在上皮组织中存在着较强的共性，尤其在细胞增殖、分化和迁移活动都很活跃，创伤愈合过程中更是如此。

参考文献：

[1] Vassalli J D, Sappino A P, Belin D. The plasminogen activator/plasmin system[J]. J Clin Invest, 1991, 88(4): 1067-1072

[2] Schaefer B M, Maier K, Eickhoff U, *et al*. Plasminogen activation in healing human wounds[J]. Am J Pathol, 1994, 144(6): 1269-1280.

[3] 宋 川，杨 恬，杨 进. 组织型纤溶酶原激活剂在人胚胎表皮角质形成细胞分化中的作用[J]. 中国医学科学院学报，2001，23(6)：623-626.

[4] 崔志鸿，杨 恬，高强国，等. 尿激酶型纤溶酶原激活物对毛囊外根鞘细胞增殖的影响[J]. 第三军医大学学报，2002，24(3)：277-279.

[5] Siganos C S, Frucht P J, Muallem M S, *et al*. Topical use of zinc desferrioxamine for corneal alkali injury in a rabbit model[J]. Cornea, 1998, 17(2): 191-195

[6] Conners M S, Urbano F, Vafeas C, *et al*. Alkali burn-induced synthesis of inflammatory eicosanoids in rabbit corneal epithelium[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1997, 38(10): 1963-1971

[7] 宋 川，杨 恬，曾益军. 皮肤创伤修复中 uPA/uPAR 的表达及作用的研究[J]. 第三军医大学学报，2001，23(12)：1396-1398

[8] 鄂 征. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京：北京出版社，1995. 40-111

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[9] Gordon S R, Buxar R M. Inhibition of cytoskeletal reorganization stimulates actin and tubulin syntheses during injury-induced cell migration in the corneal endothelium[J]. J Cell Biochem, 1997, 67(3): 409—421.
[10] Siganos C S, Frucht P J, Muallem M S, *et al*. Topical use of zinc desferrioxamine for corneal alkali injury in a rabbit model[J]. Cornea, 1998, 17(2): 191—195.
[11] 孙秉基, 徐锦堂. 角膜病的理论基础与临床[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 1994. 6—17, 321.
[12] 葛　坚, 崔　浩. 眼科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 15—16.
[13] Berta A, Holly F J, Tozser T, *et al*. Tear plasminogen activators-indictors of epithelial cell destruction. The effect of scraping, n-heptanol debridement, and alkali burn of the cornea on the plasminogen activator activity of rabbit tears[J]. Int Ophthalmol, 1991, 15(6): 363—369.
[14] Hayashi K, Berman M, Smith D, *et al*. Pathogensis of corneal epithelial defects: role of plasminogen activator[J]. Curr Eye Res, 1991, 10(5): 381—398.
[15] Schafer B M, Maier K, Eickhoff U, *et al*. Plasminogen activation in healing human wounds[J]. Am J Pathol, 1994, 144(6): 1269—1280.

（编辑　陈聪连）

文章编号: 1000-5404(2003)15-1321-01

个案与短篇

臂丛变异 1 例

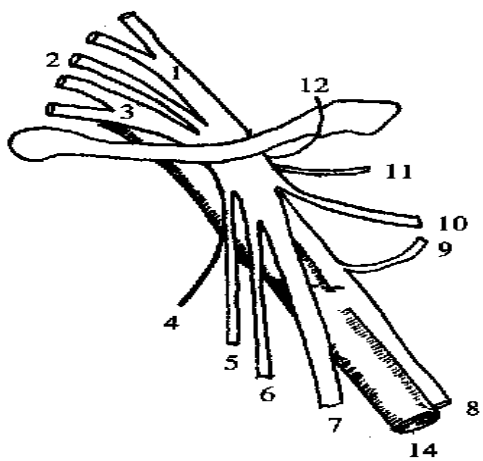
A case report of abnormal brachial plexus

张新新[1], 吴运锋[1], 张衡由[1], 卿　鑫[1], 朱星红[2]　（第三军医大学: [1] 学员旅二队; [2] 基础医学部解剖学教研室, 重庆 400038）

臂丛的变异常见[1,2], 笔者在解剖一成年男性尸体时, 发现其左侧变异, 现报告如下。

该尸体左侧臂丛五个根仍属正常, 由 C5-T1 脊神经前支组成, 在斜角肌间隙穿出, C5-6 前支与中斜角肌外侧缘合成上干, C7 前支单独成中干, C8-T1 于前斜角肌后侧合成下干, 3 干在锁骨后方入腋窝。此 3 干不再分为六股, 没有明显的内、外、后束, 而且在腋动脉的外侧锁骨中点的下方 3.9 cm, 3 干紧紧的交织粘贴成一大束, 见图 1, 然后从相当于内、外、后束的部位发出相应的神经。主要分支情况如下: 在外侧束的位置发出肌皮神经, 横径 2.9 mm。正中神经没有明显的内, 外侧头, 而是从臂丛大束的前面发出然后下行, 起始处横径 4 mm。在正中神经起始处内侧, 从大束上发出尺神经, 横径 3.5 mm。在尺神经内侧发出前臂内侧皮神经, 横径 1.5 mm。在前臂内侧皮神经内侧, 从该神经干上发出细小的臂内侧皮神经。在肌皮神经起始上方外侧发出较细小的胸外侧神经。在胸外侧神经起点之下, 从大束偏后发出肩胛下神经, 横径 1.7 mm。粗大的桡神经在腋动脉的外侧发自该大束的后方, 横径 4.8 mm。在桡神经发出肱三头肌支上方 1.5 cm, 在该神经后外侧发出腋神经, 横径 2.3 mm。

前臂内侧皮神经在起点下方 3 cm 发出一小支绕过腋动脉后方, 与桡神经本干相连, 此交通支起始处横径 0.6 mm。



1: 上干; 2: 中干; 3: 下干; 4: 臂内侧皮神经; 5: 前臂内侧皮神经; 6: 尺神经; 7: 正中神经; 8: 桡神经; 9: 腋神经; 10: 肌皮神经; 11: 肩胛下神经; 12: 胸外侧神经; 13: 前臂侧皮神经与桡神经交通支; 14: 腋动脉

图 1　臂丛变异一例

讨论

了解臂丛的此种变异及与腋动脉的异常关系有重要的临床意义。

此种变异在腋窝手术, 如乳腺癌根治术, 臂丛腋窝麻醉时应特别注意, 切不可损伤腋动脉。

作者简介: 张新新(1983—), 男, 福建省福鼎市人, 学员。电话: (023)68752408
收稿日期: 2002-09-20; 修回日期: 2002-12-09

关键词: 臂丛; 变异
中图法分类号: R322.85　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 张培建. 临床畸形马变异解剖学[M]. 西宁: 青海人民出版社, 1998. 277—278.
[2] 苏军龙, 李浩旭. 臂丛变异 1 例[J]. 中国临床解剖学杂志, 2000, 18(3): 220.

（编辑　张大春）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net