DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.12.006
第23卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 12
1396 2001年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)12-1396-03

皮肤创伤修复中uPA/uPAR的表达及作用的研究

宋 川,杨 恬,曾益军 (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 探讨皮肤创伤修复中uPA/uPAR的表达规律及意义。方法 应用免疫组化、Western Blot、细胞培养、ELISA等方法检测小鼠皮肤伤缘和培养的单层角质形成细胞创伤模型的uPA/uPAR的表达。结果 创伤后uPA/uPAR的表达增高,伤后12~24 h为uPA/uPAR的表达高峰。结论 创伤促进了uPA/uPAR的表达,伤后uPA/uPAR的表达增高促进了皮肤创伤愈合表皮再生过程。

关键词:皮肤创伤修复;uPA;uPAR
中图法分类号:R329.1;R341.26 文献标识码:A

Expressions and functions of uPA/uPAR in skin wound repair *in vivo* and *in vitro*

SONG Chuan, YANG Tian, ZHENG Yi-jun (Department of Cell Biology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the rule of urokinase type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR) expressions and their significance in skin wound repair. Methods A total of 48 mice were inflicted to skin wound model by resecting a piece of skin of 0.5 cm in size on the back. Would cultured keratinocytes were obtain by scratching epidermal cells at passage 2 after isolation from 20 day fetal mouse back with metal probe. Immunocytochemistry(ICC), western blot and ELISA were used to observe the expressions of the activator and its receptor in the skin tissues 1 mm around the skin wound and in the would cultured keratinocytes. Results The expressions of uPA and uPAR were increased both *in vivo* and *in vitro*, and reached the peaks in 12 to 24 h after the resection or scratching. Conclusion uPA and uPAR participate in the regulation of the keratinocyte differentiation. The increase of uPA and uPAR exerts a beneficial effect on the skin wound healing and re-epithelialization.

Key words: skin wound repair; uPA; uPAR

皮肤正常结构和功能的维持对人的生命活动具有非常重要的意义。以往皮肤创伤修复的研究重点首先集中于各种影响真皮和皮下组织的成纤维细胞产生胶原的综合因素和网络效应上,其次探索某些生长因子在创伤修复中的作用,对表皮生长分化调控与创伤的关系方面的研究明显不足。90年代初,人们发现广泛存在于体内的纤溶酶原激活剂/纤溶酶原激活剂抑制物(Plasminogen activator/plasminogen activator inhibitor, PA/PAI)活跃地参与了表皮角质形成细胞(Keratinocyte, KC)的增殖、迁移和分化等过程,其中尿激酶型纤溶酶原激活剂(Urokinase-type plasminogen activator, uPA)及其受体(Urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR)与KC增殖、迁移密切相关。而在皮肤创伤表皮再生过程中uPA/uPAR的表达规律及意义知之甚少,本研究以在体小鼠皮肤创伤和离体培养的小鼠KC划伤为模型,探讨了uPA/uPAR的表达规律及意义。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870390, 39870690)、全军"十五"青年基金资助项目(01Q107)、国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(G1999054205)

作者简介:宋 川(1969-),男,四川省阆中市人,硕士,讲师,主要从事上皮分化方面的研究。电话:(023)68752259

收稿日期:2001-09-13;修回日期:2001-11-15

1 材料方法

1.1 实验分组及建立皮肤创伤模型

健康昆明种小鼠48只,体重30~40 g,雌雄不拘。随机分为8组:无损伤组,损伤后1、6、12、24、48 h和7、14 d组,每组6只。用取皮器在小鼠背部皮肤切去直径0.5 cm的全层皮肤做成创伤模型[1]。

1.2 角质形成细胞培养和建立单层细胞划伤模型

取胎龄20 d的胎鼠背部皮肤,D-hanks液清洗后剪成0.3 cm×1 cm的小条,加入0.25%的胰蛋白酶,4 ℃消化24 h。分离表、真皮,将表皮吹打为散在细胞,离心收集,用Epilife培养基接种在24孔培养板上。3~4 d细胞融合后消化传代,待第2代细胞融合后用金属探针划伤细胞,形成1 mm宽的损伤界面。以无损伤组,伤后1、6、12、24 h组继续下列实验[2]。

1.3 免疫细胞化学

取动物创伤标本和培养的细胞标本,用4%多聚甲醛固定24 h,30%蔗糖脱水24 h。动物创伤标本制成10 μm冰冻切片。用10 mmol/L PBS漂洗,10%甲醛-H_2O_2孵育15 min,3% TritonX-100处理15 min,10%羊血清孵育后30 min,分别加入uPA和uPAR抗体(美国American Diagnostica Inc),37 ℃1 h后4 ℃过夜,再经PBS漂洗,SABC试剂盒(武汉博士德公司)中A液孵育37 ℃1 h,B液孵育37 ℃1 h,漂洗后DAB显色。用10 mmol/L PBS代替uPA和uPAR抗体做空白对照,结果为阴性。

1.4 Western Blot

取创伤动物伤缘1mm内的皮肤,用匀浆器裂解组织,离心

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

后留取上清液, 测量总蛋白的含量。以每孔(组)100 μg 量加样, 在 12% 丙烯酰胺凝胶中进行SDS 蛋白电泳后, 将蛋白转印在 PVDF 膜上。用 3%牛血清白蛋白封闭 8 h, uPA 和 uPAR 抗体 37 ℃1 h 后 4 ℃过夜, SABC 中 A 液孵育37 ℃1 h, B 液孵育37 ℃ 1 h, 漂洗后 NBT/BCIP 显色。空白对照, 结果为阴性。

1.5　ELISA

取划伤细胞伤缘 1 mm 内的细胞, 用 Tripure 组织提取液(德国 Boehringer Mannheim)抽提蛋白, 测量总蛋白的含量。将蛋白样品包埋在 96 孔板上 4 ℃过夜, 加入 PBS-吐温 20 3 次, 5%脱脂奶粉液封闭 1 h, 加入一抗 37 ℃ 1 h, 二抗(过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG)37 ℃ 1 h, OBT 显色, 在酶标板分光光度仪上 405 nm 波长测量每孔结果, 对照标准曲线得出蛋白含量。

1.6　统计学处理

采用 *t* 检验。

2　结果

2.1　伤口 创伤愈合特点

小鼠背部皮肤损伤后, 伤口成楔形, 大量血痂填充于内。伤后 6 h, 伤口边缘较整齐, 角质形成细胞向伤口迁移不明显。伤后 24 h 可见单层的角质形成细胞从痂下覆盖部分创面, 48 ~ 72 h 后整个伤口创面被一层新生的角质形成细胞覆盖。1 周后血痂逐渐纤维化。培养的角质形成细胞被划伤 1 mm 宽的整齐伤面, 继续培养 6 h 可见伤缘的角质形成细胞开始向伤口中央迁移, 迁移的细胞胞体变圆, 折光强, 见图 1A。伤后 24 h, 角质形成细胞大量向伤口迁移, 并不断进行分裂增殖, 伤面逐渐被新生的角质形成细胞覆盖, 伤口愈合, 见图 1B。

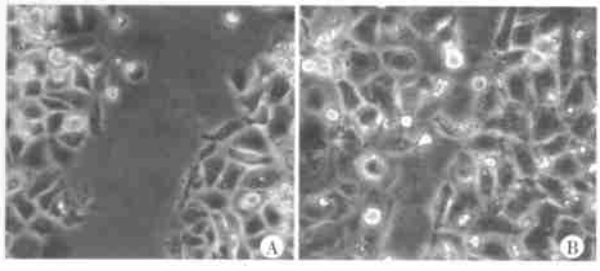


图 1　培养小鼠角质形成细胞损伤的 **6 h**(**A**)、**24 h**(**B**)变化

Fig 1　Morphology of cultured keratinocytes 6 h(A) and 24 h (B) after scratching

2.2　伤口 边缘角质形成细胞 uPA/uPAR 的表达

ICC 显示在正常对照组和伤后 1 h 组未发现阳性染色, 伤后6 h组伤口边缘表皮基底层角质形成细胞为 uPA 和 uPAR 阳性细胞, uPA 阳性颗粒存在于胞浆中, uPAR 阳性颗粒存在于胞膜上, 阳性颗粒呈棕黄色, 大小均匀。伤后 12 h 组染色增强, 24 h 染色最强, 见图 2, 1 周后开始下降, 2 周组几乎检测不到阳性结果。Western Blot 结果: 正常对照组和伤后1 h组无 uPA 阳性条带, 伤后 6 h 检测特异性阳性带, 24 h 组条带最深, 蛋白含量高, 1 周后条带变浅, 见图 3。而 uPAR 带在正常对照组和伤后 1 h 组均可显现, 伤后 6 h 颜色加深, 24 h 组最深, 1 周后开始下降, 但 2 周组仍显示较浅阳性条带见图 3。

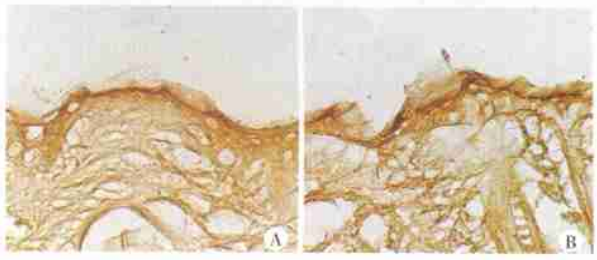
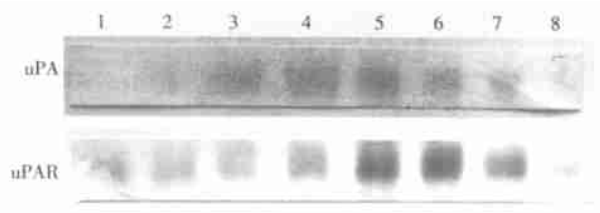


图 2　皮肤创伤 **24 h** 后 **uPA**(**A**)和 **uPAR**(**B**)的表达　(DAB× 100)

Fig 2　Expressions of uPA (A) and uPAR(B) in the cells around the skin wound 24 h after resection　(DAB× 100)



1: No wound; 2 ~ 8: 1, 6, 12, 24, 48 h and 7, 14 d after wound

图 3　皮肤创伤后 **uPA**、**uPAR Western Blot** 结果

Fig 3　Western blot of uPA and uPAR in the skin wound

培养细胞组: ICC 显示伤口边缘 uPA 和 uPAR 蛋白表达增加, 12 h 染色最强, 24 h 后开始下降。ELISA 结果显示 12 h 组颜色最深, 蛋白含量高, 定量分析表明, 6、12、24 h 组较 0 h 组和1 h 组差异显著($P < 0.01$), 见表 1 。

表 1　培养小鼠角质形成细胞伤后 **uPA**、**uPAR** 蛋白含量(μg/ml)

Tab 1　Contents of uPA and uPAR in the wound culture keratinocytes (μg/ml)

Group	Time after wound(h)				
	0	1	6	12	24
uPA	0.05±0.02	0.12±0.05	1.39±0.31 *	1.81±0.42 *	1.37±0.31 *
uPAR	0.20±0.05	0.29±0.06	1.25±0.27 *	1.92±0.47 *	1.31±0.31 *

*: $P < 0.01$ *vs* 0 h after wound(positive control)

3　讨论

uPA/uPAR 属于 PA/PAI 蛋白水解系统, 因在正常成人表皮中含量甚微[3], 国内外研究较少。但 1995 年 Jensen 在皮肤等同物的研究中提出假说认为 uPA 和 uPAR在表皮皮肤角质形成细胞增殖和迁移中起重要作用[4,5], 使这一系统的功能重新受到重视。

本研究检测了皮肤创伤和培养的单层角质形成细胞划伤后 uPA 和 uPAR 蛋白表达变化规律, 结果表明创伤修复中皮肤角质形成细胞 uPA 和 uPAR 蛋白表达显著增加, 而伤后 12 ~ 24 h 表达量最高。从小鼠在体皮肤创伤和培养细胞划伤修复中伤口愈合过程中观察可知伤后 12 ~ 24 h 是表皮角质形成细胞增殖、迁移最活跃时期, 此时 uPA 和 uPAR 表达显著增加可定向水解细胞外基质, 利于细胞的迁移活动[6]。在许多肿瘤的转移期, uPA 也大量表达, 促进肿瘤细胞的扩散。

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

24 h 后伤口被表皮细胞覆盖, uPA 和 uPAR 蛋白表达减少至正常。

在实验中, uPA 与 uPAR 的表达部位、强度基本一致, 因此我们认为, 在皮肤创伤表皮再生过程中对胞外基质的降解是通过形成 uPA/uPAR 复合物共同起作用的。文献[7] 表明, uPAR 可使 uPA 定位于迁移细胞的前沿, 从而增强细胞的迁移能力, 本实验结果也进一步验证了这个假说的可靠性。

uPAR 是角质形成细胞的膜受体, 也是一种粘附分子。新近文献[8] 报道在正常皮肤表皮再生过程中视黄酸通过上调 uPA 与 uPAR 的表达促进了再生进程, 并认为 uPA 与 uPAR 的结合不仅仅起局部蛋白水解作用, 也通过信号转导的途径加强细胞的增殖、迁移。皮肤创伤修复中 uPA 与 uPAR 的表达也有相同的意义, 其详细机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] 黄跃生, 杨宗城, 黎鳌, 等. 凝血酶肽类对创面愈合及表皮细胞增生与移行的作用研究[J]. 中华烧伤杂志, 2000, 16(1): 26-29.
[2] Marie T L, Ellen J, Van D G, *et al*. Zyxin redistributes without up regulation in migrating human keratinocytes during wound healing[J]. J Invest Dermatol, 1999, 113(4): 651-657.
[3] Romer J, Lund L R, Eriksen J, *et al*. The receptor for urokinase-type plasminogen activator is expressed by keratinocytes at the leading edge during re-epithelialization of mouse skin wounds[J]. J Invest Dermatol, 1994, 102(4): 519-522.
[4] Jensen P J, Wu Q, Janowitz P, *et al*. Plasminogen activator inhibitor type 2: a intracellullar product that is incorporated into the cornified envelope [J]. Exp Cell Res, 1995, 217(1): 65-71.
[5] Ando Y, Jensen P J. Protein kinase C mediates up regulated of urokinase and its receptor in the migrating keratinocytes of wounded cultures, but urokinase is not required for movement across a substratum *in vitro*[J]. J Cell Physiol, 1996, 167(3): 500-511.
[6] 崔志鸿, 杨 恬, 高强国, 等. 人和小鼠表皮及毛囊 uPA/uPAR 的表达[J]. 中国学术期刊文摘, 2000, 6(8): 1 047.
[7] Ossowski L, Clunie G, Masucci M T, *et al*. *In vivo* paracrine interaction between urokinase and its receptor: effect on tumor cell invasion[J]. J Cell Biol, 1991, 115(3): 1 107-1 112.
[8] Braungart E, Magdolen V, Degitz K. Retinoic acid upregulates the plasminogen activator system in human epidermal keratinocytes[J]. J Invest Dermatol, 2001, 116(1): 778-784.
[9] 高强国, 杨 恬, 杨 进, 等. uPAR 在人毛囊发育中的表达及其规律[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(11): 1 279-1 281.

(编辑 郭建秀)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2001)12-1398-01

胃体肿瘤致胃套叠 1 例

One case report of gastric invagination caused by tumor in gastric corpus

王立明, 罗云生, 蔡瑜娇, 刘作金, 向佳梅 (第三军医大学附属新桥医院普通外科, 重庆 400037)

患者, 男, 27 岁, 2 月前无明显诱因出现中上腹烧灼样疼痛, 间歇性发作, 偶有返酸、嗳气, 未作特殊处理。10 d 前病人开始出现黑便, 2~3 次/d, 每次 100 ml 左右, 在当地医院行胃镜检查, 结果提示"胃内异物伴消化道大出血", 予补液、抗酸、止血及消炎等对症处理, 病情无明显改善。一周前病人突发呕吐, 呕吐物为咖啡样液体, 量约 200~400 ml/d, 遂来我院治疗, 胃镜检查提示"①胃体新生物伴大出血; ②慢性浅表性胃炎", 病理报告: 胃肿瘤, 良恶性难定。入院查体: 一般情况差, 重度贫血貌。腹部查体见左上腹饱满, 未见肠型及蠕动波, 剑下偏左稍压痛, 无反跳痛, 全腹未扪及明显包块, 肝脾未及; 移动性浊音(-), 肠鸣音稍亢进。辅助检查: 血常规: WBC 13×10^9/L, Hb 48 g/L; 大便潜血强阳性。经补液、补血, 纠正水电解质失衡等对症处理, 急诊在全麻下行剖腹探查术。术中见肿块位于靠近胃窦部之胃体, 大小约 6 cm×6 cm, 表面呈暗褐色, 已突破胃浆膜层, 质硬, 与周围组织粘连不明显, 整个远端胃体连同肿瘤一起套叠于近端胃体, 形成嵌顿, 近端胃体高度扩张。术中冰冻病理报告为胃癌, 即行胃癌根治、远端胃大部切除术(Billroth II 式吻合)。术后经消炎、止血等对症处理, 10 d 后伤口拆线出院。术后病理诊断: 胃肉瘤样癌(可见管状腺癌、低分化实性癌巢及肉瘤样成分混合)。

讨论

胃套叠临床常见胃切除术后空肠与残胃套叠[1], 发生于胃体之间的套叠极其罕见, 目前尚未见临床发生率的统计报道。因其发病率极低, 临床缺少特异的、能籍以建立诊断的症状及体征, 常常被忽视, 绝大部分病例是在剖腹探查时得以发现[2]。近年来随着医学内镜技术的发展, 这一疾病有望在术前得到确诊[3]。

关键词: 胃肿瘤; 胃套叠; 胃切除术
中图法分类号: R735.2; R735.202 文献标识码: B

参考文献:

[1] 杨志新, 周天敏. 胃空肠吻合术后空肠、胃套叠 1 例[J]. 浙江实用医学, 1999, 4(6): 53.
[2] 毛一平, 毛建榕. 胃癌胃套叠 1 例报告[J]. 中外医用放射技术, 1998, (9): 86.
[3] 侯俊岭, 梁传芳, 张延亮. 胃切除术后空肠胃套叠[J]. 中国普通外科杂志, 1998, 7(6): 380-381.

(编辑 薛国文)

作者简介: 王立明(1965-), 男, 湖北省武汉市人, 博士, 主治医师, 主要从事消化道肿瘤发病机制方面的研究, 发表论文 10 篇。电话: (023) 68755114-74605

收稿日期: 2001-01-30; 修回日期: 2001-06-11

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