

- 血管病变中的作用[J]. 中华医学杂志, 2009, 89(36): 2574-2577
- 2 李连喜, 周闻白, 陶征, 等. FAM172A 蛋白对人胚胎肾细胞凋亡及增殖的影响[J]. 中华医学杂志, 2010, 90(34): 2424-2427
- 3 Li L, Dong X, Leong MC, *et al.* Identification of the novel protein FAM172A, and its up-regulation by high glucose in human aortic smooth muscle cells [J]. *Int J Mol Med*, 2010, 26(4): 483-490
- 4 Kanter JE, Kramer F, Barnhart S, *et al.* Diabetes promotes an inflammatory macrophage phenotype and atherosclerosis through acyl-CoA synthetase 1 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(12): E715-724
- 5 Nishizawa T, Bornfeldt KE. Diabetic vascular disease and the potential role of macrophage glucose metabolism [J]. *Ann Med*, 2012, 44(6): 555-563
- 6 Villeneuve LM, Reddy MA, Lanting LL, *et al.* Epigenetic histone H3 lysine 9 methylation in metabolic memory and inflammatory phenotype of vascular smooth muscle cells in diabetes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105: 9047-9052
- 7 Dropulic B. Lentiviral vectors: their molecular design, safety, and use in laboratory and preclinical research [J]. *Hum Gene Ther*, 2011, 22(6): 649-657
- 8 Liu C, Wang L, Li W, *et al.* Highly efficient generation of transgenic sheep by lentivirus accompanying the alteration of methylation status [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e54614
- 9 Froelich S, Tai A, Wang P. Lentiviral vectors for immune cells targeting [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2010, 32(2): 208-218
- 10 Donner JS, Thompson SA, Kreuzer MP, *et al.* Mapping intracellular temperature using green fluorescent protein [J]. *Nano Lett*, 2012, 12(4): 2107-2111
- 11 Shaner NC, Lambert GG, Chammass A, *et al.* A bright monomeric green fluorescent protein derived from Branchiostoma lanceolatum [J]. *Nat Methous*, 2013, 10(5): 407-409

(收稿日期: 2013-11-14)

(修回日期: 2013-12-03)

猪皮寡肽对大鼠皮肤创面 bFGF 的影响

吕旭潇 孙明江 刘长龙 代 龙

摘 要 **目的** 探讨猪皮寡肽对碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的影响。**方法** 建立大鼠皮肤创伤模型。随机分为 5 组: 模型组、阳性对照组(京万红组)、猪皮寡肽高剂量组(相当于 2 倍临床浓度剂量)、猪皮寡肽中剂量组(相当于常规人用剂量)、猪皮寡肽低剂量组(相当于 0.5 倍临床浓度剂量)。取用药后第 7、14 天局部创面新生肉芽组织为所需实验样品, 观察猪皮寡肽对皮肤创面碱性成纤维细胞生长因子的影响。**结果** 第 7 天高剂量组中 bFGF 含量高于其他组, 第 14 天组织中各组 bFGF 含量下降, 但猪皮寡肽高、中剂量组明显高于其他各组。**结论** 猪皮寡肽能够提高创面愈合过程中 bFGF 的含量。

关键词 猪皮寡肽 创面愈合 bFGF 免疫组化

[中图分类号] R318 [文献标识码] A

Effect of Zhupiguatai on bFGF in Rat Skin Wound Healing. Lü Xuxiao, Sun Mingjiang, Liu Changlong, *et al.* Shandong University of Traditional Chinese Medicine. Shandong 250355, China

Abstract Objective To investigate the effect of Zhupiguatai on bFGF. **Methods** After the models being set up, the rats were randomly assigned to 5 groups: model group, Jing wan hong group, the high does of Zhupiguatai group, the medium dose of Zhupiguatai group, and the low dose of Zhupiguatai group. The 7, 14 days granulation tissue was taken to be as the desired experiment samples. The effect of Zhupiguatai on the bFGF was observed. **Results** bFGF of first 7 days in the high dose group were higher than that in other groups. Levels of bFGF decreased in each tissue of The first 14 days. But it in Zhupiguatai high dose group was significantly higher than that in other groups. **Conclusion** Zhupiguatai can improve bFGF levels in wound healing process.

Key words Zhupiguatai; Wound healing; bFGF; Immunohistochemistry

猪皮的结构、组成与人体皮肤相似, 以 I 型、III 型

胶原与临床康复为主, 能促进成纤维细胞的生长, 在创面修复中发挥重要作用^[1,2]。猪皮胶原(经胃蛋白酶限制性酶解得到的)由三股肽链呈三股螺旋结构, 主要由甘氨酸、脯氨酸和羟脯氨酸等氨基酸组成, 具有生物活性的肽段包埋在结构内部, 不能充分暴露并表现出活性^[3]。本实验将猪皮胶原采用适当的方法

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2008BAI53B073); 山东省自然科学基金资助项目(ZR2011HM051)

作者单位: 250355 济南, 山东中医药大学药理学系

通讯作者: 孙明江, 电子信箱: 13869180658 @ 163.com

降解为猪皮胶原小肽,其相对分子质量较小,甚至部分为组成皮肤的基本结构单元,可使胶原分子中的一些活性基团充分暴露出来,并且更易被机体吸收利用,引发细胞内生物信号的传递,从而引起细胞生理功能改变,有利于皮肤修复。生长因子在创面修复中是必不可少的,在创面愈合过程中伴随着很多炎症反应,生长因子一方面能够增加炎症细胞的趋化,另一方面促进成纤维细胞生长与提高血管内皮细胞的数量,促进基质的形成,对后期的组织改建也有一定影响^[4]。细胞和组织修复的完成过程要靠细胞间基质和细胞增生来完成^[5]。研究发现对生长因子的调控是促进愈合的核心。碱性成纤维生长因子(bFGF)在人体组织分布广泛,它与弹性纤维和胶原蛋白的合成都有着密切的关系,能够刺激皮肤肉芽组织的形成和促进肉芽组织的上皮化,起到调节胶原降解及更新的作用,从而缩短创伤愈合时间。本实验中采用S-P免疫组化法测定创面肉芽组织中bFGF含量。本实验利用抗原与抗体可以特异性结合的原理,在抗原与抗体结合后,标记抗体的显色剂(荧光素、酶、金属离子、同位素)就会发生显色反应,利用这一特点来确定组织细胞内抗原(多肽和蛋白质),从而对组织中的抗原进行定位、定性及定量的研究。

材料与方法

1. 材料与仪器:(1)猪皮寡肽制备:刮去脂肪层,洗净,-10℃冷冻24h,切片机切碎,以8倍量2%碳酸钠溶液脱脂4h,滤去溶液,水洗至中性,加8倍量水加热煮沸15min,匀浆(10000r/min)2min,待冷至约40℃,以10%盐酸调节pH值1.5~2.0,加入胃蛋白酶(3000U/g)75g,40℃保温酶解2h,以10%氢氧化钠溶液调节pH值7.5~8.0,加入胰蛋白酶(1000~1500U/g)100g,40℃保温酶解4h,加热煮沸15min,离心,取上清液加硅藻土至浓度为5g/L,搅匀,以1μm微孔滤膜滤过,以分子截留量为3kDa的中空纤维超滤,收集相对分子质量小于3kDa的酶解液,超滤液减压浓缩(60~65℃,-0.07~-0.08Pa)至肽浓度为20g/L时,以10%盐酸调pH值5.0,控制操作电压为30V,上样流速为50L/h进行电渗析脱盐处理,肽脱盐液减压浓缩(60~65℃,-0.07~-0.08Pa)至相对密度为1.10~1.15(60℃),喷雾干燥(进风温度160℃,出风温度80℃),即得。(2)实验动物:雄性SD大鼠,SPF级,体重200~250g。由山东中医药大学提供。随机分为5组:模型组、阳性对照组(京万红组)、猪皮寡肽高剂量组(相当于2倍临床浓度剂量)、猪皮寡肽中剂量组(相当于常规人用剂量)、猪皮寡肽低剂量组(相当于0.5倍临床浓度剂量)。(3)主要试剂:兔SP检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);一抗:bFGF兔抗IgG(北京博奥森生物有限公司提供);浓缩型DAB试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);(4)主要

仪器:Q-TOF2 正交加速电喷雾串联质谱仪(英国Micromass公司)倒置显微镜(日本Nikon TS100),离心机(北京医用离心机厂产品),水浴恒温振荡器(SHZ-82型,金坛市医疗仪器厂),纯水仪(2000B型,北京长风仪器仪表公司)。

2. 动物造模:大鼠常规饲养3天后,1%戊巴比妥(40mg/kg),常规消毒后,背部取直径为3cm左右圆形,剪开皮肤分离到肌筋膜,用镊子将已经消毒过的塑料环边缘埋入切口,在紧靠塑料环边缘皮肤缝合两针避免塑料环脱落,手术当天起每只大鼠肌肉注射青霉素钠4000U,连续3天,以防感染,分笼单独常规饲养^[6]。

3. 给药方法:术后当天起每日换药2次,换药前用1:5000呋喃西林清洁创面。阳性对照组外敷单层京万红,给药组外敷单层猪皮寡肽凝胶(低、中、高剂量),模型组外敷单层凡士林。各组均外用两层消毒干纱布覆盖固定。

4. 取材方法:用药后第7天、14天将动物麻醉(1%戊巴比妥)处死,用眼科手术剪沿塑料环内圈取局部创面新生肉芽组织为所需实验样品。

5. 石蜡切片制备:(1)洗涤:用0.01mol/L PBS洗涤,每隔2h换液1次,浸泡过夜。(2)脱水:50%乙醇20min,70%乙醇2h,85%乙醇1h,95%乙醇I 1h,95%乙醇II 1h,无水乙醇I 1h,无水乙醇II 1h,无水乙醇III 1h。(3)透明:二甲苯I 20min,二甲苯II 20min,二甲苯III 20min。(4)浸蜡:将石蜡融化,放入58℃的烘箱中;软蜡60min,硬蜡60min。(5)包埋:带孔小铁盒作为包埋器并在浸蜡时提前放入烘箱中对其保温。将写好标签的小纸条提前放入小铁盒,石蜡倒入小铁盒中,用小镊子轻轻取出已浸蜡完全的组织,放入小铁盒下层,注意根据实验需要调整组织块的方向;包埋后,从烘箱拿出,自然冷却。(6)切片:蜡块在切片机上固定后,调整切片厚度为5μm,用毛笔轻轻将组织切片从刀片上托起,用小镊子夹起,正面向上放入30%的乙醇溶液中。展片几分钟后用干净的载玻片将切片捞起,放入44℃的水浴展片缸中(水温低于石蜡熔点10~12℃)进行第2次展片,利用乙醇溶液与水溶液之间有张力差,在这个张力下得到的组织切片平整无皱褶。用涂好多聚赖氨酸的载玻片捞起展平的切片。自然风干。

6. S-P免疫组化染色过程:(1)脱蜡至水:二甲苯I 20min,二甲苯II 20min,无水乙醇I 10min,无水乙醇II 10min,95%乙醇I 5min,80%乙醇5min,70%乙醇5min。(2)抗原修复:取0.01mol/L柠檬酸缓冲液(pH值6.0)450ml溶于1000ml的烧杯中,在烧杯的上面用一层保鲜膜覆盖,放于微波炉中,进行加热,第1分钟匀速缓慢由低火调至中低火,第2分钟中火,维持中火5min,使修复液温度保持在96℃。将玻片轻轻放入修复液中,对其进行修复。修复时微波炉保持每加热4min,打开微波炉冷却2min,重复5次。将烧杯从微波炉中取出,室温中冷却。将载玻片平放于湿盒上(注意要事先在湿盒中倒入少量的水,防止水分蒸发造成载玻片表面过分干燥),用0.01mol/L的PBS冲洗2次,每次5min。(3)阻断灭活内源性过氧化物酶:用3%的H₂O₂室温下孵育10min,再

用纯水冲洗 3 次,每次 5min,甩去。(4)封闭:滴加正常山羊血清封闭液 50 μ l(试剂 A),盖上湿盒盖,室温反应 10min,甩去封闭液勿洗。(5)一抗孵育:用 100 μ l 移液枪加入一抗稀释液(1:300)50 μ l;用滴加 0.01mol/L PBS 50 μ l 作为阴性对照,在 4 $^{\circ}$ C 环境下过夜。用 0.01mol/L PBS 轻轻冲去一抗,洗涤 3 次,每次 2min。(6)二抗孵育:向玻片上滴加生物素标记的二抗 50 μ l,放入烘箱中,在 37 $^{\circ}$ C 环境下进行孵育,30min 后取出湿盒,再用 0.01mol/L PBS 冲去二抗,洗涤 3 次,每次 2min。(7)S - A/HRP 孵育:滴加辣根酶标记链酶卵白素工作液 50 μ l,在 37 $^{\circ}$ C 烘箱中进行孵育,30min 后取出湿盒,0.01mol/L PBS 轻轻冲洗,洗涤 3 次,每次 5min。(8)DAB 显色:滴加 DAB 显色剂工作液 100 μ l 后在显微镜下观察以便更好的掌握染色程度,当镜下染色背景颜色浅且阳性细胞成清晰地棕黄色时,立即用纯水充分冲洗。(9)复染、分化、返蓝、封片:在苏木精溶液中进行复染,5min 后纯水洗涤。用含有 1% 盐酸的乙醇液分化 20s,立刻用纯水洗涤 1min。0.01mol/L PBS 返蓝 30s 后纯水洗涤,脱水,透明,75% 乙醇 20s,85% 乙醇 20s,95% 乙醇 1min $\times$ 2 次,无水乙醇 2min $\times$ 2 次,二甲苯 2min $\times$ 3 次,置于通风处风干,滴加中性树胶少许封片,自然晾干。

7. 检测数据分析:观察不同时间段创面面积大小变化;光学显微镜的高倍镜下通过摄像头将标本免疫组化图像采集并输入 image - pro plus 6.0 图像分析软件。每张切片选取 5 个不同的视野,每个视野选取 5 个阳性表达区域测量积分荧光强度值(IOD)。

8. 统计学方法:用 SPSS 17.0 软件进行分析,组间比较采用方差分析,结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. ESI - MS 分析:使用电喷雾四极杆飞行时间串联质谱仪 Q - TOF2 进行 ESI - MS 分析,对得到的 MS/MS 碎片信息进行氨基酸序列测定,证明所得到的样品为胶原寡肽(表 1)。

表 1 氨基酸序列组成表

m/z	氨基酸序列组成
614.77	GLGAGGGGRGSDGNPG
424.20	PAGAHGPAGL

2. 不同时间创面面积的比较:各组创面面积随着时间的推移都呈减小趋势,猪皮寡肽高剂量组与猪皮寡肽中剂量组创面缩小最显著,与模型组比较具有统计学差异($P < 0.01$);京万红组创面愈合面积大于模型组,与模型组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$),详见表 2。

3. 测定 bFGF IOD 值:第 14 天组织中各组 bFGF 含量下降。高剂量组中 bFGF 含量高于其他组,与模

表 2 不同时间创面面积比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	第 7 天	第 14 天
模型组	10	5.28 $\pm$ 0.02	1.36 $\pm$ 0.02
京万红组	10	2.59 $\pm$ 0.03	0.19 $\pm$ 0.03
猪皮寡肽高剂量组	10	2.66 $\pm$ 0.02 **	0 **
猪皮寡肽中剂量组	10	2.17 $\pm$ 0.02 **	0 **
猪皮寡肽低剂量组	10	5.35 $\pm$ 0.03 *	0.78 $\pm$ 0.03 *

与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

型组比较具有统计学意义($P < 0.01$),与京万红组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),中剂量组模型组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

表 3 肉芽组织中 bFGF IOD 值($\bar{x} \pm s$)

组别	n	第 7 天	第 14 天
模型组	10	298657 $\pm$ 1736.359	273421 $\pm$ 1435.667
京万红组	10	537879 $\pm$ 1413.445 *	520099 $\pm$ 1209.798 *
猪皮寡肽高剂量组	10	778414 $\pm$ 3594.1577 ***	593765 $\pm$ 3089.221 **
猪皮寡肽中剂量组	10	577914 $\pm$ 3122.567 *	512824 $\pm$ 2001.879 *
猪皮寡肽低剂量组	10	354311 $\pm$ 2904.689	308029 $\pm$ 2307.590

猪与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与京万红组比较, # $P < 0.05$

讨 论

FGF 是同源性的多肽家族,FGF 具有促进成纤维细胞生长的作用,包括 aFGF 和 bFGF 两类,它们的生物功能相似,都可以促进血管的生成,诱导胚胎发育等,只是 bFGF 的功能是 aFGF 的 10 倍多。bFGF 有促进血管形成的作用,bFGF 能够诱导内皮细胞形成新的小血管。Niseen^[7]发现手术创面早期分泌的 bFGF 是启动创面修复,促进血管形成的重要因素之一,对促进毛细血管内皮细胞增殖、促进毛细血管形成管腔发挥重要作用(图 1)。血管内皮细胞的增殖和分裂是血管形成的主要条件。付小兵等^[8]发现毛细血管内皮细胞一般处于静止状态,需要上千天的时间完成一次更新,而在创面愈合时期,血管内皮细胞即能在一个星期时间内迅速增生,在这一过程中 bFGF 等起着重要的作用^[9]。bFGF 可以促进细胞增殖,细胞分化以及合成新的细胞外基质、增加胶原含量。bFGF 在创伤早期能够刺激成纤维细胞和角化细胞增殖、迁徙并且诱导各种细胞因子的产生。细胞因子的产生可进一步释放转化生长因子、表皮生长因子等在内的多种生长因子,产生因子释放的组联效应^[10]。

本实验结果表明,猪皮寡肽可以提高创面愈合过程中 bFGF 的含量。其作用机制可能与其提高 bFGF 含量,促进细胞生成,促进新生血管形成有关。



图1 猪皮寡肽对 bFGF 影响 (×200)

A. 猪皮寡肽大剂量组 bFGF; B. 猪皮寡肽中剂量组 bFGF; C. 猪皮寡肽小剂量组 bFGF; D. 阳性对照 bFGF; E. 阴性对照 bFGF

参考文献

- 1 谢举临,卞徽宁,李厚东,等.碱性成纤维细胞生长因子与瘢痕成纤维细胞 I、III 型胶原蛋白的代谢[J].中国组织工程研究,2010,14(41):7657-7660
- 2 张焰,曾敬英,陈露,等.重建胶原纤维对细胞生长的影响[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(41):8095
- 3 陈敏,黄德铨,杜勇军,等.熊珍膏干预大鼠皮肤创面新生肉芽组织成纤维细胞及新生毛细血管影响的实验研究[J].时珍国医国药,2012,23(6):1461-1463
- 4 陈静涛,徐政,顾其胜.胶原蛋白研发的最新进展[J].上海生物医学工程,2004,25(2):52-55
- 5 李成奇.创伤后应激障碍的认知行为治疗研究进展[J].医学与哲学,2011,32(1):35-36
- 6 沈道修,顾月芳,任晓英.一种研究中西药抗炎作用的塑料环肉芽肿定量法[J].中西医结合杂志,1983,1:31

- 7 Nissen NN. Basic fibroblast growth factor mediates angiogenic activity in early surgical wounds[J]. Surgery,119(4):457-465
- 8 付小兵,杨银辉,孙同柱,等.转化生长因子 $\beta 1$ 与白细胞介素 mR-NA 在糖尿病溃疡创面组织中的表达[J].中国修复重建外科杂志,1999,13(5):2591
- 9 Murata M, Hara K, Saku T. Dynamic distribution of basic fibroblast growth fact - or during epulis formation: an immuno - histochemical study in an enhanced healing process of the gingiva [J]. J Oral Pathol Med,1997,26(5):224-232
- 10 Han Y S, Lan L, Chu J, et al. Epigallocatechin gallate attenuated the activation of rat cardiac fibroblasts induced by angiotensin II via regulating β - arrestin[J]. Cell Physiol Biochem,2013,31(2):338-346

(收稿日期:2013-11-05)

(修回日期:2013-11-26)

ID-LC-MS/MS 方法对高糖血症 SD 大鼠肾组织 DNA 中 8-oxo-dGsn 的检测

罗顺斌 夏梦明 邱相君 孙 未 王 哲 胡国新 蔡剑平

摘要 目的 用同位素稀释高效液相-串联质谱法(Isotope-Diluted LC-MS/MS, ID-LC-MS/MS)和免疫组化法检测高糖血症 SD 大鼠肾组织 DNA 氧化产物 8-羧基脱氧鸟苷(8-oxo-dGsn)的含量,评价高糖血症对大鼠肾组织 DNA 氧化损伤的影响。**方法** 健康雄性 SD (Sprague-Dawley rats)大鼠 28 只,随机分为 4 组:3 月糖尿病模型组(3DR 组)及其对照组(3CR 组),6 月糖尿病模型组(6DR 组)及其对照组(6CR 组)。糖尿病模型组接受腹腔单次链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)每公斤 70mg 注射,对照组接受腹腔生理盐水注射。糖尿病模型组造模成功 3 个月及 6 个月,分别抽提大鼠肾组织 DNA,用 ID-LC-MS/MS 方法检测其 DNA 氧化产物 8-oxo-dGsn 的含量;用免疫组化法观察肾组织中 DNA 氧化损伤部位及程度。**结果** 糖尿病模型组造模成功 3 个月时肾组织 DNA 中 8-oxo-dGsn 高于对照组高,造模成功 6 个月时肾组织 DNA 中 8-oxodGsn 含量比正常对照组增加显著($P < 0.01$);免疫组化结果显示 3 个月模型组 DNA 氧化损伤水平高于对照组,6 个月时模型组 DNA 氧化损伤更为严重。**结论** 高糖血症 3 个月可造成大鼠肾组织 DNA 的氧化损伤,高糖血症 6 个月时大鼠肾组织中 DNA 氧化损伤程度呈显著增加,高糖血症是肾组织中 DNA 氧化损伤的重要原因。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81171028,81341023)

作者单位:325035 温州医科大学药学院(罗顺斌、夏梦明、胡国新、蔡剑平),药理教研室(罗顺斌、夏梦明、胡国新);471003 河南省河南科技大学医学院(邱相君);325027 温州医科大学附属第二医院(孙未、王哲)

通讯作者:蔡剑平,电子信箱:caijp61@vip.sina.com