

MEBT/MEBO 对小鼠烧伤创面组织中 K19 表达的影响及作用机制

李雄 彭浩 贺全勇

基金项目: 2017 年中国红十字基金会徐荣祥再生生命公益基金科研项目 (2017-04)

作者单位: 410013 湖南 长沙, 中南大学湘雅三医院烧伤整形外科

通讯作者: 李雄, Email: 85170166@qq.com

【摘要】目的 探究烧伤创面再生医疗技术(moist exposed burn therapy/moist exposed burn ointment, MEBT/MEBO)对烧伤创面组织中角蛋白 19 (keratin 19, K19) 表达的影响及可能的作用机制。方法 选取 15 只健康雄性昆明小鼠, 按照随机数表法随机选取 5 只作为对照组, 10 只建立深 II 度烫伤模型后随机分为模型组与治疗组, 其中治疗组小鼠创面采用 MEBO 进行处理、模型组小鼠创面采用生理盐水进行处理、对照组小鼠背部脱毛后不做任何处理, 1 周后取皮肤或创面组织并通过免疫组织化学染色、蛋白质印迹 (Western blot) 及定量聚合酶链反应 (quantitative polymerase chain reaction, Q-PCR) 等技术检测自噬相关蛋白 Beclin-1、LC3 及 K19 的表达水平。结果 治疗第 1~7 天, 治疗组小鼠创面清洁, 并始终保持湿润状态, 且随着治疗时间的延长逐渐呈现上皮化状态; 模型组小鼠创面逐渐加深, 并出现感染征象。治疗 1 周后, 免疫组织化学染色法及 Western blot 法检测结果显示, 3 组小鼠皮肤或创面组织中 Beclin-1、LC3 及 K19 表达水平对比, 治疗组 > 模型组 > 对照组, P 均 < 0.01, 差异具有统计学意义; 除 Western blot 法检测结果显示治疗组与模型组小鼠创面组织中 LC3 表达水平对比, $P > 0.05$ 外, 其余各检测结果均显示小鼠皮肤或创面组织中 Beclin-1、LC3 及 K19 表达水平两两对比, $P < 0.01$, 差异具有统计学意义。Q-PCR 技术检测结果显示, 3 组小鼠皮肤或创面组织中 K19 mRNA 表达水平对比, 治疗组 > 模型组 > 对照组, $P < 0.01$, 差异具有统计学意义; 3 组小鼠皮肤或创面组织中 K19 mRNA 表达水平两两对比, P 均 < 0.01, 差异具有统计学意义。结论 MEBT/MEBO 促进烧伤创面愈合可能与增加创面组织中 K19 的表达有关, 而诱导自噬表达可能是其具体机制之一。

【关键词】烧伤创面再生医疗技术; 烧伤; 创面; 角蛋白 19; 自噬相关蛋白; LC3; Beclin-1

【标示符】doi: 10.3969/j.issn.1001-0726.2019.01.000

【文章类型】实验研究

角蛋白 (Keratin) 主要用于维持细胞结构的完整性和稳定性, 其中角蛋白 19 (keratin 19, K19) 阳性表达的表皮干细胞可增殖、分化为皮肤各层组织细胞予以修复创面。部分研究显示, 在烧伤创面再生医疗技术 (moist exposed burn therapy/moist exposed burn ointment,

MEBT/MEBO) 治疗深度烧伤创面的过程中, K19 阳性表达干细胞可发生从无到有并不断增加的变化^[1-2], 但具体机制尚不明确。为此, 笔者于本研究中观察了 MEBT/MEBO 对小鼠烧伤创面组织中 K19、自噬相关蛋白 LC3 及 Beclin-1 表达的影响, 并分析了可能的作用机制, 以期为 MEBT/MEBO 的临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

随机选取 15 只体重为 19~21 g 的 SPF 级健康雄性昆明小鼠作为受试对象。所有小鼠均由湖北省实验动物研究中心提供, 饲养环境清洁, 室温 (25.0 ± 3.0) °C, 自由进食进水。本研究经中南大学湘雅三医院动物伦理委员会批准, 符合动物实验的伦理学要求。

1.2 主要试剂与药物

免疫组织化学 SP 试剂盒及 DAB 显色试剂盒, LC3(bs-8878R)、K19(bs-2190R) 及 GAPDH (bs-2188R) 抗体: 北京博奥森生物技术有限公司生产; Beclin-1(sc-48341) 抗体: Santa Cruz Biotechnology 公司生产; 湿润烧伤膏: 汕头市美宝制药有限公司生产, 国药准字 Z20000004。

1.3 模型建立与分组

随机选取 10 只小鼠, 采用 4%水合氯醛 (400 mg/kg, 即 0.2 mL/20 g) 腹腔注射麻醉及背部脱毛备皮后, 将自制的带有 2 cm×2 cm 孔洞的木板置于备皮处, 并经木板孔洞将备皮区置于 (92.0 ± 1.0) °C 的热水中浸泡 20 s, 建立面积约 20% TBSA 的烫伤创面 (经烫伤组织病理切片证实为深 II 度烫伤); 烫伤后立即予以腹腔注入生理盐水抗休克 (20 mL/kg, 即 0.4 mL/20 g)。小鼠苏醒后能够正常进食进水即表明建模成功。建模成功后, 按照随机数表法随机分为模型组与治疗组, 每组 5 只; 其余 5 只未建模的小鼠背部脱毛后作为对照组。

1.4 局部处理

对照组: 正常进食进水, 备皮处不做任何处理。

治疗组: 正常进食进水, 创面均匀涂抹湿润烧伤膏, 每 2 h 换药 1 次, 连续治疗 1 周。治疗过程中, 保证创面始终处于湿润状态; 每次换药前拭净创面分泌物及残余药膏。

模型组: 正常进食进水, 创面采用生理盐水冲洗, 每 2 h 冲洗 1 次, 连续冲洗 1 周。

1.5 样本采集

定时观察并拍照记录治疗组与模型组小鼠的创面变化。治疗 1 周后, 取对照组小鼠的皮肤组织及治疗组与模型组小鼠的创面组织均分为 3 份, 1 份用于免疫组织化学染色检测, 2 份置于 -80°C 冰箱内保存备用。

1.6 免疫组织化学染色法检测 LC3、K19 及 Beclin-1 的表达水平

待所有标本采集完毕,取新鲜组织进行石蜡包埋、切片、脱蜡及3% H₂O₂处理10 min、PBS冲洗5 min后行微波修复;修复后,滴加正常山羊血清并于37 °C环境下封闭10 min,然后分别相应加入LC3、K19、Beclin-1抗体(1:200)4 °C孵育过夜;孵育过夜后,PBS冲洗3次(每次5 min),加入二抗孵育10 min;二抗孵育后,PBS冲洗3次(每次5 min),加入HRP标记复合物(三抗)孵育10 min;三抗孵育后,PBS冲洗3次(每次5 min),然后依次进行DAB显色,苏木素复染,酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片;每张切片于显微镜下随机选取5个高倍视野检测LC3、K19及Beclin-1的平均光密度,并取其均值进行统计学分析。

1.7 Western blot 法检测 LC3、K19 及 Beclin-1 的表达水平

待所有标本采集完毕,取1份备用组织进行RIPA裂解、匀浆机研磨,提取总蛋白,并经SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离及转膜后,TBST洗膜3次;洗膜后,5%脱脂奶粉封闭,4 °C孵育相应目的抗体(LC3、K19、BECN-1,1:1000或GADPH 1:2000)过夜;孵育过夜后,TBST洗膜3次,室温孵育HRP-抗兔二抗(1:5000);孵育二抗后,TBST洗膜3次,ECL显影。

1.8 Q-PCR 技术检测 K19 mRNA 的表达水平

待所有标本采集完毕,取1份备用组织按照试剂盒说明书中的Trizol法提取总RNA,并检测质量及浓度(A260:A280在1.8~2.1之间视为RNA质量合格)后,置于-80 °C冰箱内保存备用。

按照逆转录试剂盒说明书以总RNA为模板逆转录合成cDNA后进行RT-qPCR检测,并采用荧光定量统计软件进行分析,结果以待测基因与内参基因GAPDH的表达水平比值表示。其中K19引物长度为138 bp,序列为上游-CAGATAAGCAAGACCGAAG,下游-CAGCTGGACTCCATAACG;β-actin引物序列为上游-GAGGGAAATCGTGCGTGAC,下游-CTGGAAGGTGGACAGTGAG。

1.9 统计学处理

采用GraphPad Prism 5统计软件对所得数据进行统计学分析,其中计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析或q检验,均以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大体观创面愈合情况

治疗组:治疗第1~7天,创面清洁,并始终保持湿润状态,且随着治疗时间的延长逐渐呈现上皮化状态;模型组:治疗第1~7天,创面逐渐加深,并出现感染征象(图1)。

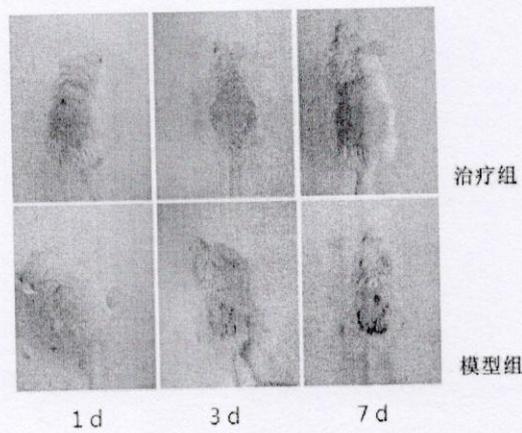


图1 治疗组与模型组小鼠创面愈合情况典型图

2.2 免疫组织化学染色法检测结果

免疫组织化学染色法检测 Beclin-1、LC3 及 K19 结果显示, 3 组小鼠皮肤或创面组织细胞内均可见棕黄色颗粒分布, 且以治疗组小鼠创面组织细胞内分布最多 (图 2); Beclin-1、LC3 及 K19 平均光密度值对比, 治疗组 > 模型组 > 对照组, $P < 0.01$, 差异具有统计学意义; 3 组小鼠皮肤或创面组织中 Beclin-1、LC3 及 K19 平均光密度值两两对比, P 均 < 0.01 , 差异具有统计学意义 (图 3, 表 1)。

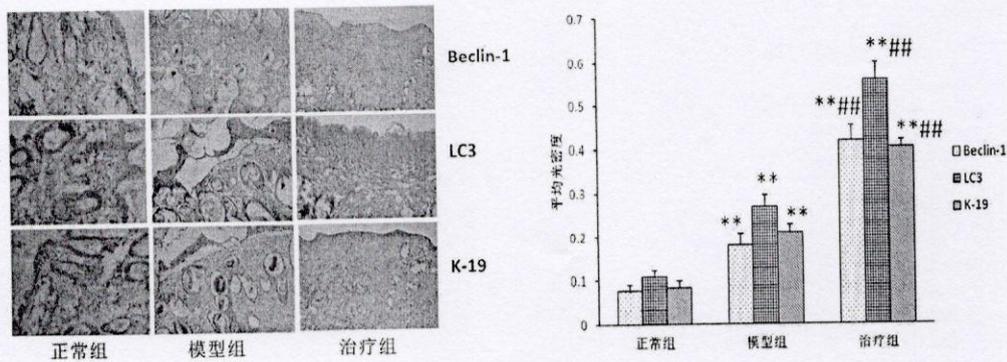


图2 3组小鼠皮肤或创面组织中Beclin-1、LC3及K19免疫组织化学染色结果典型图;图3 免疫组织化学染色法检测Beclin-1、LC3及K19平均光密度直方图(a表示与对照组对比 $P < 0.01$, b表示与模型组对比 $P < 0.01$)

表1 3组小鼠皮肤或创面组织中Beclin-1、LC3及K19平均光密度值对比 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Beclin-1	LC3	K19
治疗组	5	0.416 ± 0.034 ^{ab}	0.555 ± 0.044 ^{ab}	0.401 ± 0.029 ^{ab}
模型组	5	0.178 ± 0.028 ^a	0.266 ± 0.029 ^a	0.209 ± 0.015 ^a
对照组	5	0.078 ± 0.012	0.108 ± 0.015	0.083 ± 0.016
<i>F</i> 值		216.996	256.741	290.968

P值

<0.01

<0.01

<0.01

注：3组小鼠皮肤或创面组织中 Beclin-1、LC3 及 K19 平均光密度值对比， P 均<0.01，差异具有统计学意义。3组小鼠皮肤或创面组织中 Beclin-1、LC3 及 K19 平均光密度值两两对比，其中与对照组对比，^a P <0.01，差异具有统计学意义；与模型组对比，^b P <0.01，差异具有统计学意义

2.3 Western blot 法检测结果

Western blot 法检测 Beclin-1、LC3 及 K19 结果显示，3组小鼠皮肤或创面组织中 Beclin-1、LC3 及 K19 表达水平对比，治疗组>模型组>对照组， P <0.01，差异具有统计学意义；除治疗组与模型组小鼠创面组织中 LC3 表达水平对比， P >0.05 外，其余各组小鼠皮肤或创面组织中 Beclin-1、LC3 及 K19 表达水平两两对比， P 均<0.05，差异具有统计学意义（图 4，表 2）。

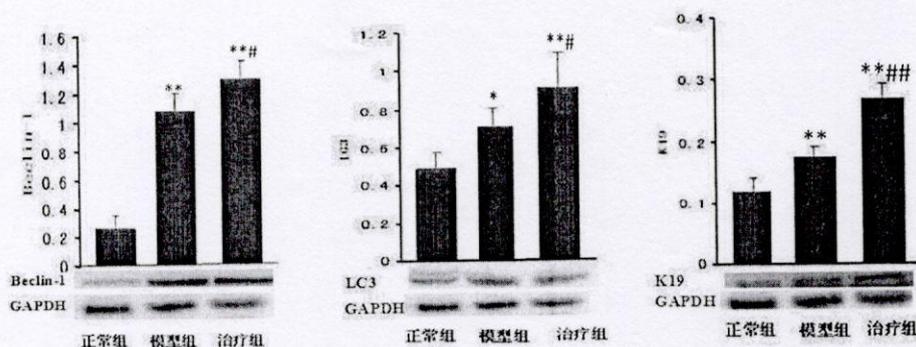


图 4 Western blot 法检测 Beclin-1、LC3 及 K19 表达水平直方图（a 表示与对照组对比 P <0.05，b 表示与模型组对比 P <0.05）

表 2 3组小鼠皮肤或创面组织中 Beclin-1、LC3 及 K19 表达水平对比 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Beclin-1	LC3	K19
治疗组	5	1.295 ± 0.126 ^{ab}	0.928 ± 0.167 ^a	0.271 ± 0.025 ^{ab}
模型组	5	1.088 ± 0.112 ^a	0.706 ± 0.101 ^a	0.173 ± 0.017 ^a
对照组	5	0.259 ± 0.088	0.485 ± 0.083	0.118 ± 0.022
F值		124.667	9.675	64.446
P值		<0.01	<0.01	<0.01

注：3组小鼠皮肤或创面组织中 Beclin-1、LC3 及 K19 表达水平对比， P 均<0.01，差异具有统计学意义。3组小鼠皮肤或创面组织中 Beclin-1、LC3 及 K19 表达水平两两对比，其中与对照组对比，^a P <0.05，差异具有统计学意义；与模型组对比，^b P <0.05，差异具有统计学意义

2.4 Q-PCR 技术检测结果

Q-PCR 技术检测 K19 mRNA 结果显示, 3 组小鼠皮肤或创面组织中 K19 mRNA 表达水平对比, 治疗组 > 模型组 > 对照组, $P < 0.01$, 差异具有统计学意义; 3 组小鼠皮肤或创面组织中 K19 mRNA 表达水平两两对比, P 均 < 0.01 , 差异具有统计学意义 (图 5, 表 3)。

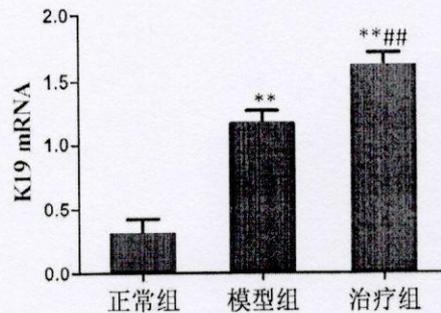


图 5 Q-PCR 技术检测 K19 mRNA 表达水平直方图 (a 表示与对照组对比 $P < 0.01$, b 表示与模型组对比 $P < 0.01$)

表 3 3 组小鼠皮肤或创面组织中 K19 mRNA 表达水平对比 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	K19 mRNA
治疗组	5	1.610 ± 0.103 ^{ab}
模型组	5	1.160 ± 0.107 ^a
对照组	5	0.303 ± 0.118
F 值		183.786
P 值		< 0.01

注: 3 组小鼠皮肤或创面组织中 K19 mRNA 表达水平对比, $P < 0.01$, 差异具有统计学意义。3 组小鼠皮肤或创面组织中 K19 mRNA 表达水平两两对比, 其中与对照组对比, ^a $P < 0.01$, 差异具有统计学意义; 与模型组对比, ^b $P < 0.01$, 差异具有统计学意义

3 讨论

研究表明, 角蛋白是表皮细胞的主要结构蛋白, 可在细胞内形成广泛的网状结构, 对表皮具有重要的保护作用, 其中 K19 是表皮干细胞的特异性标志物, 其单克隆抗体被广泛应用于表皮干细胞的检测^[3-4]。此外, K19 还可通过促进细胞外基质的降解或细胞移动提高细胞的转移能力, 进而促进创面的再生修复^[5-8]。有研究证实, MEBT/MEBO 治疗深度烧伤创面的过程中, K19 阳性表达干细胞可出现从无到有、从少到多, 再从多到少、从少到无的变化规律, 但具体机制尚不明确。

笔者在临床研究发现, 烧伤创面应用 MEBT/MEBO 治疗后, 创面坏死组织可无损伤地液化

排除,作用温和无刺激,并可减轻局部炎症反应,同时对残存细胞具有保护作用,这与作为程序性细胞死亡机制及细胞自我防御机制的自噬介导的细胞代谢的动态平衡及自我保护^[9-13]具有异曲同工之处,而已有研究证实MEBT/MEBO治疗的创面修复主要依赖于K19阳性表达表皮干细胞的分化、增殖、迁移及融合,且K19还可抑制创伤造成的炎症反应^[14]。因此,在本研究中,笔者对比观察了MEBT/MEBO对小鼠烧伤创面组织中自噬相关蛋白Beclin-1、LC3及K19表达的影响。结果显示,治疗1周后,3组小鼠皮肤或创面组织中Beclin-1、LC3、K19及K19 mRNA表达水平对比,治疗组>模型组>对照组, P 均<0.01,差异具有统计学意义;除Western blot法检测结果显示治疗组与模型组小鼠创面组织中LC3表达水平对比, $P>0.05$ 外,其余各检测结果中均显示小鼠皮肤或创面组织中Beclin-1、LC3、K19及K19 mRNA表达水平两两对比, $P<0.01$,差异具有统计学意义。即MEBT/MEBO可明显提高小鼠烧伤创面组织中自噬相关蛋白Beclin-1、LC3及K19的表达水平,促进创面的愈合。由此推断,MEBT/MEBO治疗的创面组织中K19的表达水平明显升高可能与自噬相关^[15-19]。

综上所述,MEBT/MEBO促进烧伤创面的愈合与提高创面组织中K19的表达水平有关,且诱导自噬相关蛋白的高表达可能是其作用机制之一。因本研究设计限制,其对自噬相关通路的调控机制仍需进一步深入研究探讨。

参考文献

- [1] 唐乾利,黄欣,王宇,等.湿润暴露疗法/湿润烧伤膏治疗慢性难愈合创面的超微病理及丝裂原活化蛋白激酶激酶和 c-myc mRNA 表达的机制研究[J]. 中国全科医学, 2015, 18(3): 294-299.
- [2] 周鹏翔,罗成群,谷永红,等.角蛋白 19 在III度烧伤创面修复过程中的表达及意义[J]. 中国医师杂志, 2003, 5(9): 1180-1182.
- [3] Han YF, Sun TJ, Han YQ, et al. Clinical perspectives on mesenchymal stem cells promoting wound healing in diabetes mellitus patients by inducing autophagy[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015, 19(14): 2666-2670.
- [4] 成军. 现代细胞自噬分子生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2011: 112.
- [5] Washino S, Hirai M, Matsuzaki A, et al. clinical usefulness of CEA, CA19-9, and CYFRA21-1 as tumor markers for urothelial bladder carcinoma[J]. Urol Int, 2011, 87(4): 420-428.
- [6] Gwak HK, Lee JH, Park SG. Preliminary evaluation of clinical utility of CYFRA21-1, CA72-4, NSE, CA19-9 and CEA in stomach cancer[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014,

15(12): 4933-4938.

[7] Huang L, Chen W, Liang P, et al. Serum CYFRA21-1 in biliary tract cancers: a reliable biomarker for gallbladder carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *Dig Dis Sci*, 2015, 60(5): 1273-1283.

[8] van Sprundel RG, van den Ingh TS, Desmet VJ, et al. Keratin 19 marks poor differentiation and a more aggressive behaviour in canine and human hepatocellular tumours[J]. *Comp Hepatol*, 2010, 9(1): 1-11.

[9] Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(7):651-662.

[10] 郭瑞珍, 王娟, 李纳. 皮肤病理性瘢痕和瘢痕癌中连接蛋白的表达及意义[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2012, 28(4): 394-398.

[11] Gomes LC, Dikic I. Autophagy in antimicrobial immunity[J]. *Mol Cell*, 2014, 54(2): 224-233.

[12] Wild P, Farhan H, McEwan DG, et al. Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts salmonella growth[J]. *Science*, 2011, 333(6039): 228-233.

[13] Paludan C, Schmid D, Landthaler M, et al. Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy[J]. *Science*, 2005, 307(5709): 593-596.

[14] 杨燕妮, 彭代智, 伍素华, 等. 大鼠微粒皮移植创面中角蛋白19及整合素 $\beta 1$ 的异位表达[J]. *中华烧伤杂志*, 2007, 23(5): 342-345.

[15] Loi M, Müller A, Steinbach K, et al. Macroautophagy proteins control MHC class I levels on dendritic cells and shape anti-viral CD8(+) T cell responses[J]. *Cell Rep*, 2016, 15(5): 1076-1087.

[16] Wei J, Long L, Yang K, et al. Autophagy enforces functional integrity of regulatory T cells by coupling environmental cues and metabolic homeostasis[J]. *Nat Immunol*, 2016, 17(3): 277-285.

[17] Chen SP, Fuh JL, Chung MY, et al. Genome-wide association study identifies novel susceptibility loci for migraine in Han Chinese resided in Taiwan[J]. *Cephalalgia*, 2018, 38(3): 466-475.

[18] Niso-Santano M, Criollo A, Malik SA, et al. Direct molecular interactions between Beclin 1 and the canonical NF κ B activation pathway[J]. *Autophagy*, 2012, 8(2): 268-270.

[19] Copetti T, Bertoli C, Dalla E, et al. p65/RelA modulates BECN1 transcription and autophagy[J]. Mol Cell Biol, 2009, 29(10): 2594-2608.

(收稿日期: 2018-06-10)