

【文章编号】1001 - 5728 (2003) 05 - 0259 - 03

## 小鼠皮肤切创愈合过程中 caspase-6、-7 表达的免疫组织化学研究

杜宇 官大威 赵锐

(中国医科大学法医学院法医病理学教研室, 辽宁 沈阳 110001)

**【摘要】目的** 观察皮肤切创损伤愈合过程中, caspase-6、-7 在损伤周边区内的表达及其变化规律。**方法** 应用免疫组织化学技术观察伤后不同时间小鼠皮肤切创组织中 caspase-6、-7 的表达, 以非切创小鼠皮肤组织作对照。**结果** 伤后 6h 的损伤皮肤组织中可见少量多核粒细胞表达 caspase-6、-7, 伤后 12~24h, 大部分浸润的多核粒细胞及部分单核细胞为 caspase-6、-7 阳性。随伤后时间延长, caspase-6、-7 阳性细胞以单核细胞及成纤维细胞为主。伤后 0~3h, caspase-6、-7 阳性细胞比率较低, 12h 后逐渐增加, 伤后 3d 达高峰, 其后逐渐下降。**结论** 小鼠皮肤损伤愈合过程中, caspase-6、-7 在损伤周边区内中性粒细胞, 单核细胞及成纤维细胞中表达, 其时序性变化规律可望用于皮肤损伤时间的推断。

**【关键词】** 法医病理学; 皮肤损伤; 凋亡; 损伤时间推断; caspase-6、-7; 免疫组织化学

**An immunohistochemical study on the expressions of caspase-6、-7 during the skin incised wound healing in mice/** DU Yu, GUAN Dawei, ZHAO Rui. / *China Medical University School of Forensic Medicine, Shenyang, 110001*

**【Abstract】Objective** To investigate the expressions of caspase-6, -7 during skin wound healing and the applicability of the time-dependent expressions of caspase-6, -7 to determination of the wound age. **Method** The expressions of caspase-6, -7 were studied in skin incised wound in mice by immunohistochemical SABC method, and the non-incised mouse skin was used as control. **Results** Expressions of caspase-6, -7 were detectable in polymorphonuclear cells (PMNs) in the wound specimens aged 6h. In the wound specimens aged from 12h to 24h after injury, caspase-6, -7 were identified in a large number of infiltrating PMNs and part of mononuclear cells (MNCs). Afterwards, the MNCs and fibroblastic cells (FBCs) accounted for the most part of the caspase-6, -7-positive cells. Morphometrically, the ratios of the number of the caspase-6, -7-stained PMNs, MNCs and FBCs to total number of the cells in the wounds were evaluated and calculated. The ratios of the caspase-6, -7-positive cells were low in the wound specimens aged from 0h to 3h, and maximized in the wound specimens aged 3 day. Thereafter, the ratios decreased and minimized in the specimens aged 14 day. **Conclusion** The results suggest that caspase-6, -7 were expressed in neutrophils, macrophages and fibroblasts during healing process of skin incised wound in mice. Caspase-6, -7 may be used as a marker for the wound age determination.

**【Key word】** Forensic pathology; Skin wound; Apoptosis; Wound age determination; Caspase-6, -7; Immunohistochemistry

皮肤损伤愈合是一个复杂而连续的过程, 大致分

为三个阶段, 即损伤后的渗出期、纤维增生期和修复期。有多种细胞因子和细胞成分参与皮肤损伤愈合过程, 其中最重要的三种细胞成分为中性粒细胞, 单核巨噬细胞及成纤维细胞。皮肤损伤愈合过程中的渗出期和纤维增生期, 损伤周边区内包括中性粒细胞, 单核巨噬细胞及成纤维细胞等细胞数量急剧增加, 在修复期, 损伤周边区内的细胞数量显著减少, 直至伤口

**【基金项目】** 国家自然科学基金 (编号 30271347) 和教育部留学归国基金 (教外留司 [2002] 367) 资助项目

**【作者简介】** 杜宇 (1977 -), 男, 汉族, 山东省新泰县人, 法医学硕士, 主要从事皮肤损伤愈合过程中细胞凋亡机制的研究。

完全愈合。已有研究表明, 皮肤损伤愈合过程中, 这种细胞的增生与消亡, 细胞数保持平衡是通过程序性细胞死亡 (programmed cell death, PCD), 即细胞凋亡 (apoptosis) 机制来完成的<sup>[1]</sup>。近来新发现一类细胞凋亡调节因子家族, 即 caspase 蛋白酶家族, 其中 caspase-6、-7 是导致细胞凋亡的最终效应因子。caspase-6、-7 被激活后, 作用于细胞质成分, 而使细胞发生凋亡。在皮肤损伤愈合过程中损伤周边区内中性粒细胞, 单核细胞及成纤维细胞是否表达 caspase-6、-7 国内外尚未见研究报道。

本研究应用免疫组织化学技术, 观察小鼠皮肤切创愈合过程中, caspase-6、-7 在损伤周边区中性粒细胞, 单核细胞及成纤维细胞中的表达, 及其在推断皮肤损伤时间中的应用价值。

## 1 材料和方法

### 1.1 皮肤切创模型制作及分组

健康成年清洁级昆明系小鼠 36 只, 雌雄不限, 体重 35 ~ 40g, 分为 12 组, 每组 3 只, 1 组为正常对照组。2% 戊巴比妥钠 30mg/kg 剂量腹腔麻醉, 剪毛处理, 常规手术消毒, 在背部中央做一纵行长 1cm 皮肤全层切口。创面自然止血, 不包扎, 不施药。切创后, 每只小鼠以消毒饲料及双蒸水分笼饲养, 防止伤口感染, 保持伤口干燥。分别于伤后 0h、1h、3h、6h、12h、1d、3d、5d、7d、10d、14d 将 1 组小鼠颈椎脱位处死, 取伤口处 1.5 × 1cm 皮肤组织, 对照组小鼠同样方法处理后不做切口, 处死后取与损伤组小鼠相同部位同等大小皮肤组织作为对照, 所取皮肤标本放入 4% 多聚甲醛/PBS 中固定 12h 后, 石蜡包埋, 切片。

### 1.2 免疫组织化学染色

正常兔非免疫血清孵育, 微波法修复抗原。羊抗鼠 caspase-6、-7 (Santa Cruz Biotechnology Inc) 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 1 抗作阴性对照, 未见非特异性染色。另做常规 HE 染色。

### 1.3 阳性细胞计数分析

显微镜 ×400 倍率下, 在每张切片中损伤周边区内随机选择 10 个视野计数包括多核粒细胞、单核细胞及成纤维细胞的阳性细胞。计算每个视野中阳性细胞与此三种细胞总数的比值。采用 SPSS for windows 10.0 软件包, 应用方差分析进行统计学处理, 数据

应用  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 2 结果

### 2.1 损伤组皮肤组织病理学变化

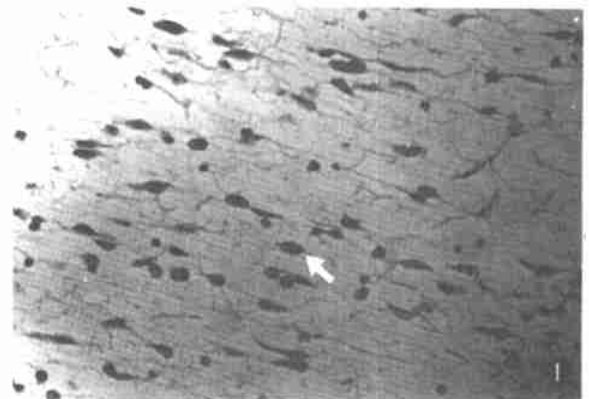
伤后 1 ~ 3h 见真皮内毛细血管扩张、充血, 毛囊周围开始出现少量多核粒细胞。6h 可见创缘边缘有部分上皮细胞胞浆均质化, 细胞核消失, 真皮内中性粒细胞浸润增多。12h 皮下组织内有大量渗出的中性粒细胞及巨噬细胞。1d 皮肤干燥已结痂, 镜下见肉芽组织已形成, 并向创口长入, 此时肉芽组织成分以渗出的炎性细胞为主, 创缘区单核细胞开始大量浸润。3d 成纤维细胞开始增生, 7d 成纤维细胞数量达高峰。10 ~ 14d 创口基本愈合, 损伤周边区内的中性粒细胞、单核细胞及成纤维细胞数量显著减少。

### 2.2 损伤周边区 caspase-6、caspase-7 的表达

2.2.1 对照组 对照组中, 表皮基底细胞层、棘细胞层、颗粒细胞层以及真皮层皮脂腺和汗腺上皮细胞 caspase-6、caspase-7 呈阳性染色。

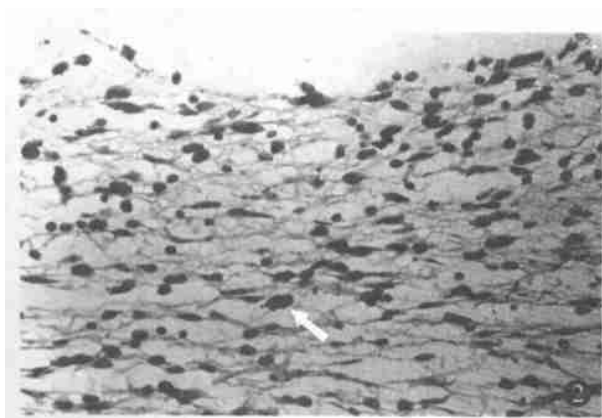
2.2.2 损伤组 伤后 0h、1h 组切片染色与对照组染色基本相同, 3h 组损伤周边区开始多核粒细胞浸润, 可见少量 caspase-6、caspase-7 阳性表达。伤后 6h ~ 1d 组切片中, 损伤周边区浸润的细胞数量增多, caspase-6、caspase-7 阳性细胞主要为多核粒细胞及单核细胞。伤后 3d 和 5d 组 (照片 1, 2), 成纤维细胞大量增生, caspase-6、caspase-7 阳性细胞主要为单核细胞和成纤维细胞。伤后 7 ~ 14d, caspase-6、caspase-7 阳性细胞以成纤维细胞为主。

2.2.3 阳性细胞计数及统计学分析 经统计学方差分析, 各相邻两组之间 caspase-6、caspase-7 阳性细胞比率相比均有显著差异 ( $P < 0.01$ ), 见表 1。其中伤



照片 1. 伤后 3 天损伤周边区可见大量 caspase-6 阳性细胞 (SABC 法, ×400)

Photo 1. A large number of caspase-6-positive cells in the wound aged 3 day (SABC, ×400)



照片 2. 伤后 3 天损伤周边区可见大量 caspase-7 阳性细胞 (SABC 法,  $\times 400$ )

Photo 2. A large number of caspase-7-positive cells in the wound aged 3 day (SABC,  $\times 400$ )

表 1. Caspase-6、-7 阳性细胞比率

Table 1. The ratios of the caspase-6、-7 positive cells

损伤时间	caspase-6 阳性细胞比率	caspase-7 阳性细胞比率
0~3h	3.05% $\pm$ 4.80%	4.60% $\pm$ 6.74%
6h	18.68% $\pm$ 4.83%	22.98% $\pm$ 3.49%
12h	24.40% $\pm$ 3.40%	26.65% $\pm$ 2.69%
1d	38.04% $\pm$ 4.44%	35.61% $\pm$ 5.21%
3d	55.33% $\pm$ 3.65%	52.69% $\pm$ 2.74%
5d	46.01% $\pm$ 2.84%	44.37% $\pm$ 4.41%
7d	35.91% $\pm$ 4.70%	36.22% $\pm$ 2.68%
10d	32.34% $\pm$ 3.06%	33.19% $\pm$ 2.48%
14d	21.26% $\pm$ 4.71%	19.52% $\pm$ 2.69%

后 3d 组 caspase-6、caspase-7 阳性细胞比率与其他各时间组相比均有显著差异 ( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

近年来研究表明,多种疾病所致的器官组织损伤的发生与 caspase-6、-7 诱导的细胞凋亡密切相关,在胃及十二指肠溃疡中,伴随着胃粘膜上皮细胞凋亡, caspase-6 表达增强<sup>[2]</sup>。在肾缺血及其再灌注损伤中,可见 caspase-6 表达增强<sup>[3]</sup>。Guan 等研究证实皮肤损伤愈合过程中单核巨噬细胞及成纤维细胞均表达 Fas 和 FasL,部分共同表达 Fas 和 FasL 的细胞发生凋亡,而中性粒细胞虽然不表达 Fas 和 FasL,但也发生凋亡改变,提示皮肤损伤后单核巨噬细胞及成纤维细胞的增生与消亡,使细胞数减少可能是通过 Fas/FasL 系统介导完成的,而中性粒细胞可能是通过其它途径发生凋亡的<sup>[4]</sup>。然而 Fas 只是细胞膜蛋白受体,在细胞凋亡中只起到将凋亡信号传递至细胞质的作用,而导致皮肤损伤愈合过程中单核巨噬细胞及

成纤维细胞凋亡的最终“执行者”是何种因子尚不清楚。许多研究表明 Fas/FasL 系统是将细胞外刺激传递至细胞内,通过一系列级联反应激活 caspase 蛋白酶使其裂解进而作用于细胞质成分引起细胞凋亡。结合上述相关研究报道,提示在皮肤损伤愈合过程中, caspase-6、-7 很可能是诱导中性粒细胞、单核巨噬细胞及成纤维细胞凋亡的最终执行因子。

本实验应用免疫组织化学技术观察到在皮肤切创的损伤愈合过程中,皮肤损伤周边区内的中性粒细胞、单核巨噬细胞及成纤维细胞均表达 caspase-6、-7。已经证实,由于 caspase 的作用底物的特异性,多种 caspase 可以同时出现于同一细胞类型中<sup>[5]</sup>。通过对各时间点 caspase-6、-7 阳性细胞比率进行计算发现,它们的阳性细胞比率随伤后时间不同而表现出有规律的变化。阳性细胞比率在伤后 3h 较低,6~12h 开始升高,1d 阳性细胞比率显著升高,3d 达到最高峰,此后,随损伤时间延长,阳性细胞比率逐渐下降,至伤后 14d 降至最低。caspase-6、-7 在皮肤损伤愈合过程中表达的这种变化可能是创面愈合本身所具有的特点决定的。组织修复的起始阶段 6~36h 大量的中性粒细胞和单核巨噬细胞渗出,从 3d 开始成纤维细胞大量增生,但在进入下一阶段之前,各种细胞需要以凋亡的方式减少和消失。

本研究结果提示在皮肤损伤愈合过程中, caspase-6、-7 可能对于引发中性粒细胞、单核巨噬细胞及成纤维细胞凋亡起着重要的作用,是皮肤损伤愈合过程中的重要因子。同时,在皮肤损伤愈合过程中 caspase-6、-7 表达的时序性变化规律可望作为一种客观指标用于皮肤损伤时间的推断。

### 参 考 文 献

- 1 David G. Greenhalgh. The role of apoptosis in wound healing [J]. Int J Biochem Cell Biol, 1998, 30: 1019
- 2 Potthoff A, Ledig S, Martin J, et al. Significance of the caspase family in Helicobacter pylori induced gastric epithelial apoptosis [J]. Helicobacter, 2002, 7 (6): 367
- 3 Singh AB, Kaushal V, Megyesi JK, et al. Cloning and expression of rat caspase-6 and its localization in renal ischemia/reperfusion injury [J]. Kidney Int, 2002, 62 (1): 106
- 4 Guan DW, Ohshima T and Kondo T. Expression of Fas and FasL during the skin wound healing process in mice [J]. Histochem J, 2000, 32: 85
- 5 王振义, 陈竺. 肿瘤的诱导分化和凋亡疗法 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998. 180

(2003-05 收稿, 2003-09 修回)