

·论 著·

皮肤切创愈合中 caspase-3 表达的免疫组化研究

杜宇,官大威,赵锐(中国医科大学法医学院,辽宁 沈阳 110001)

[摘要] 目的 探讨皮肤切创损伤愈合过程中,caspase-3在损伤区内的表达以及不同损伤时间 caspase-3的变化规律。方法 应用免疫组织化学技术对33例不同损伤时间小鼠皮肤切创组织中 caspase-3的表达进行研究。同时以3例非切创小鼠皮肤组织做对照。结果 伤后6h的损伤皮肤组织中可见少量中性粒细胞表达 caspase-3,伤后12~24h,大部分浸润的中性粒细胞及部分单核细胞为 caspase-3阳性。随伤后时间延长,caspase-3阳性细胞以单核细胞及成纤维细胞为主。伤后0~3h,caspase-3阳性细胞比率较低,为(4.53±6.53)%,12h后逐渐增加,伤后3d达高峰,为(62.66±4.84)%,其后逐渐下降。结论 小鼠皮肤损伤愈合过程中,caspase-3可能在诱导损伤区内中性粒细胞、单核巨噬细胞及成纤维细胞发生凋亡过程中发挥重要作用,同时,caspase-3的规律性表达可用于损伤时间的推断。

[关键词] 皮肤损伤;凋亡;损伤时间推断;caspase-3;免疫组织化学

[中图分类号] DF795.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-5619(2004)01-0001-03

An immunohistochemical study on the expression of caspase-3 in the skin wound healing

DU Yu, GUAN Da-wei, ZHAO Rui (School of Forensic Medicine, China Medical University, Shenyang 110001, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of caspase-3 during skin wound healing and explore the applicability of caspase-3 to determination of wound age. **Methods** The expression of caspase-3 were performed on 33 mice skin incised wounds at different posttraumatic intervals and 3 mice as control by immunohistochemical technique. **Results** Expression of caspase-3 was detectable in polymorphonuclear cells (PMNs) in the wound specimens aged 6 h. In the wound specimens aged from 12 h to 24 h after injury, caspase-3 was identified in a large number of infiltrating PMNs and part of mononuclear cells (MNCs). Afterwards, the MNCs and fibroblastic cells (FBCs) accounted in the most part of the caspase-3 positive cells. Morphometrically, the ratio of the number of the caspase-3 stained PMNs, MNCs and FBCs to total number of the cells in the wounds was evaluated and calculated. The ratio of the caspase-3 positive cells was low in the wound specimens aged from 0 h to 3 h (4.53±6.53)%, and maximized in the wound specimens aged 3 day (62.66±4.84)%. Thereafter, the ratio decreased and minimized in the specimens aged 14 day (21.56±4.54)%. **Conclusion** The results suggest that caspase-3 may play an important role in inducing neutrophil, macrophage and fibroblast apoptosis during skin wound healing. Furthermore, caspase-3 may be used as a marker for the wound age determination.

[Key words] skin wound; apoptosis; wound age determination; caspase-3; immunohistochemistry

皮肤损伤愈合是有多种细胞因子和细胞成分参与的过程,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。渗出期和纤维增生期损伤区内上述细胞数量急剧增加,修复期显著减少,使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^[1]。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-3 是导致细胞凋亡的最强大的最终效应因子。

本研究应用免疫组织化学技术,检测皮肤切创愈合过程中 caspase-3 在损伤区及其周边区细胞中的表达,为进一步研究皮肤损伤愈合过程中 caspase-3 是否细胞凋亡的关键因子奠定基础,同时探讨 caspase-3 的变化规律是否可作为损伤时间推断的指标。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组

健康成年清洁级昆明系小鼠 36 只,雌雄不限,每只重 35~40 g,按切创后处死时间不同分为 0, 1, 3, 6,

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30271347);教育部留学归国基金项目(教外留司[2000]367)

[作者简介] 杜宇(1977-),男,辽宁沈阳人,硕士,主要从事皮肤损伤愈合过程中细胞凋亡机制的研究。

Tel.024-23256666-5483

12h, 1, 3, 5, 7, 10, 14 d 组, 每组 3 只, 正常对照组 3 只。

1.1.2 试剂

caspase-3 抗体及 SABC 试剂盒均购自于武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制造及取材

用 2% 戊巴比妥钠按照 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量腹腔麻醉, 剪毛处理后, 常规手术消毒, 然后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, 每只小鼠分笼饲养并饲以消毒饲料及双蒸水防止伤口感染, 并注意保持伤口干燥。分别于伤后 0, 1, 3, 6, 12h, 1, 3, 5, 7, 10, 14 d 行小鼠颈椎脱位处死, 于伤口处取 $1.5 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ 皮肤组织, 对照组小鼠同样方法麻醉, 背部剪毛后不做切口, 行颈椎脱位处死, 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, 常规石蜡包埋。

1.2.2 免疫组织化学染色

蜡块标本 $5 \mu\text{m}$ 厚连续切片, 贴于经 APES 处理后的硅化玻璃载片上干燥。按免疫组化试剂盒说明书 SABC 法进行染色, 应用微波法修复抗原(将切片放入 pH6.0 的柠檬酸缓冲液中, 微波炉中加热至 $90 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 min)。实验中以 PBS 代替 1 抗作阴性对照, 并做空白对照。常规 HE 染色。

1.2.3 阳性细胞计数分析

显微镜 $\times 400$ 倍率下, 在每张切片中随机选择 10 个视野计数包括中性粒细胞、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分析, 数据应用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 HE 染色

损伤组中, 伤后 1~3 h 组见真皮内毛细血管扩张、充血, 毛囊周围开始出现少量中性粒细胞。6 h 可见创缘边缘有部分上皮胞浆均质化, 细胞核消失, 真皮内中性粒细胞浸润增多。伤后 12 h 见皮下组织内有大量渗出的中性粒细胞及巨噬细胞。1 d 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。3 d 见成纤维细胞开始增生, 7 d 时成纤维细胞数量达高峰。10~14 d 创口基本愈合, 损伤区内的中性粒细胞、单核细胞及成纤维细胞数量显著减少。

2.2 caspase-3 的表达

2.2.1 对照组皮肤染色

对照组标本中, 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表达 caspase-3 阳性。

2.2.2 损伤组皮肤染色

伤后 0, 1 h 组切片染色与对照组染色基本相同(图 1), 3 h 组损伤区开始中性粒细胞浸润, 并可见少量 caspase-3 阳性表达。伤后 6 h~1 d 组切片中, 损伤区浸润的细胞数量增多, caspase-3 阳性细胞主要为中性粒细胞及单核细胞(图 2)。伤后 3 d 和 5 d 组, 成纤维细胞大量增生, caspase-3 阳性细胞主要为单核细胞和成纤维细胞(图 3, 4)。伤后 7~14 d, caspase-3 阳性细胞以成纤维细胞为主(图 5, 6)。阴性及空白对照染色阳性细胞。

2.2.3 阳性细胞计数

伤后 3 h 之内, caspase-3 阳性细胞比率较低 (4.53 ± 6.53)%; 6 h 组阳性细胞比率开始升高 (24.17 ± 1.76)%; 12 h 阳性细胞比率继续升高 (27.32 ± 2.72)%; 1 d 组 caspase-3 阳性细胞比率升高明显 (40.41 ± 6.53)%; 在伤后 3 d, 阳性细胞比率达最高 (62.66 ± 4.84)%; 5 d caspase-3 阳性细胞比率开始下降 (52.70 ± 4.36)%; 7 d 阳性细胞比率下降 (46.71 ± 4.21)%; 10 d 组该比率继续下降 (33.11 ± 3.42)%; 伤后 14 d, caspase-3 阳性细胞比率下降到最低 (21.56 ± 4.54)%。经统计学方差分析, 除 0 h 组外, 各时间相邻两组之间 caspase-3 阳性细胞比率相比均有显著差异 ($P < 0.01$), 其中伤后 3 d 组 caspase-3 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害的发生与细胞凋亡密切相关, 如心肌缺血后再灌注损伤、肿瘤、自身免疫性疾病、病毒感染以及神经系统变性疾病^[2]。已经有研究表明凋亡可以用于损伤时间的判定, Sawaguchi 等通过对大鼠模型的闭合性头部损伤的研究, 已经证明了凋亡是相对精确的头皮挫伤时间“标志”, 并有数据显示头皮挫伤处在 10h 后头皮中细胞凋亡数目就有明显增加^[3]。目前, 对细胞凋亡的研究集中在细胞内具有关键作用的蛋白质被特异性酶切的机制。细胞内外的许多信息刺激, 如死亡受体结合了特定的配体、紫外线照射与电离辐射、生长因子缺乏等, 均可诱导细胞发生反应, 尽管这些信号以及紧随其后的反应途径是多种多样的, 但凋亡执行过程中都会发生蛋白质的特异性酶切, 而负责特异性酶切这些蛋白的半胱氨酸蛋白酶家族统称为 caspases^[4]。

caspase蛋白酶家族成员均以无活性的酶原形式存在于细胞质中。研究表明,当通过FAS或TNFR(tumour necrosis factor receptor)将凋亡信号传递至细胞内后,通过一系列级联反应激活caspase蛋白酶家族的某些成员,并裂解成二聚体而发挥效应。caspase-3是该酶家族中导致细胞凋亡的最强大的最终效应因子。caspase-3被激活后,作用于细胞质成分,而使细胞发生凋亡。

在一项调查人体各种组织器官中caspase-3分布的研究中,应用Western blotting及免疫组织化学证实,在皮肤真皮中的“静止”成纤维细胞中含有caspase-3酶原,高度提示皮肤损伤愈合过程中caspase-3可能起着关键作用^[5]。已有研究表明在皮肤损伤愈合过程中,肥厚性瘢痕及瘢痕疙瘩中caspase-3表达增强诱导纤维母细胞凋亡,提示caspase-3在皮肤损伤后的瘢痕形成中发挥重要作用^[6]。程颺等研究表明,在烫伤的创面愈合过程中,caspase-3 mRNA和蛋白的表达随烫伤后时间不同呈现规律性变化^[7]。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,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^[8]。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”是何种因子现不清楚,也无研究报道。许多研究表明Fas/FasL系统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-3极有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之一。

本项实验研究结果表明,应用免疫组织化学技术观察到小鼠皮肤切创的损伤愈合过程中,皮肤损伤区内的中性粒细胞、单核巨噬细胞及成纤维细胞均表达caspase-3。通过对caspase-3在各时相点阳性细胞比率进行计算发现,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,在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。经统计学方差分析,伤后3d组阳性细胞比率与其他各时间组相比均有显著差异($P<0.01$)。caspase-3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,随后3d开始成纤维细胞大量增生,但在进入下一阶段之前,它们需要以凋亡的方式减少和消失,因此caspase-3的阳性细胞比率从6~12h开始升高,在3d达到最高峰,并在以后随损伤时间延长,阳性细胞比率逐渐下降。

以上研究结果,提示小鼠皮肤损伤愈合过程中,caspase-3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,由于在皮肤损伤愈合过程中损伤区的中性粒细胞、单核细胞及成纤维细胞表达caspase-3的阳性细胞比率随时间不同而呈现出有规律性的表达,经统计学方差分析,除0h组外,各时间相邻两组之间caspase-3阳性细胞比率相比均有显著差异($P<0.01$),因此caspase-3可以成为用于损伤时间判定的指标。(图见S5页)

参考文献:

- [1] Greenhalgh DG. The role of apoptosis in wound healing [J]. *Int J Biochem Cell Biol*,1998,30:1019-1030.
- [2] Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease [J]. *Sci*,1995,267:1456-1462.
- [3] Sawaguchi T, Jasani B, Kobayashi M, *et al.* Postmortem analysis of apoptotic changes associated with human skin bruises [J]. *Forensic Sci Int*, 2000,108:187-203.
- [4] 胡野,凌志强,单小云.细胞凋亡的分子医学[M].第1版.北京:军事医学科学出版社,2002.90-91.
- [5] Krajewska M, Wang HG, Krajewski S, *et al.* Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (caspase-3), a cell death protease [J]. *Cancer Res*,1997,57:1605-1613.
- [6] Akasaka Y, Ishikawa Y, Ono I, *et al.* Enhanced expression of caspase-3 in hypertrophic scars and keloid: induction of caspase-3 and apoptosis in keloid fibroblasts in vitro [J]. *Lab Invest*,2000,80(3):345-357.
- [7] 程颺,付小兵,盛志勇,等.碱性成纤维细胞生长因子对肌成纤维细胞的作用及其对创面愈合的影响[J].*中华医学杂志*,2002,82(17):1187-1191.
- [8] Guan DW, Ohshima T, Kondo T. Expression of Fas and FasL during the skin wound healing process in mice [J]. *Histochem J*,2000,32:85-91.

(收稿日期:2003-05-08)

(本文编辑:刘宁国)