

·论著·

成骨细胞特异性因子 2 periostin 及相关因子在大鼠全层缺损皮肤创面愈合过程中的表达

侯俊杰 聂芳菲 李博仑 赵霞 秦泽莲 马勇光 李健宁

【摘要】 目的 观察大鼠皮肤缺损创面愈合过程中成骨细胞特异性因子 2 periostin (PN) 与血管生成素-1 (Ang-1)、血管内皮生长因子 (VEGF) 及其受体 2 [VEGFR-2/ 胎肝激酶-1 (FLK-1)] 在创面及创缘周围皮肤的表达及对创面愈合的影响。**方法** 48 只成年雄性 SD 大鼠按随机数字表法分成 6 组, 每组 8 只。在大鼠背中部脊柱两侧各制作一个 2 cm × 2 cm 全层皮肤缺损创面, 分别于术后 1、4、7、10、14、21 d 创面取材, 行病理组织学检查及免疫组化染色检测创面 PN、Ang-1、VEGF、FLK-1 的表达; 并以正常皮肤的表达量作为对照组。**结果** 创面局部组织中各因子的表达量在术后均迅速升高。与对照组比较, 创面 PN 的表达量在术后 1 d 即增加了 234.4%, 之后持续升高, 至 7 d 增加了 597.9% 并达到峰值, 其后缓慢下降, 21 d 时增长率为 280.9%, 仍维持在较高水平 (均 $P < 0.05$); Ang-1 的表达量在术后 1 d 增加了 128.1%, 4 d 增加了 327.5% 并达到峰值, 然后逐渐下降, 14 d 的增长率仅为 80.5%, 之后轻度升高 (均 $P < 0.05$); VEGF 的表达量在术后 7 d 增加了 165.8% 并达到峰值, 而后下降并伴有小幅波动 (均 $P < 0.05$); FLK-1 术后 1 d 增加了 56.1% 并维持这一水平, 至 7 d 增加了 70.1% 达峰值 (均 $P < 0.05$), 10 d 后缓慢下降 (均 $P > 0.05$)。**结论** 大鼠皮肤创面愈合过程中, PN、Ang-1、VEGF 及其受体 FLK-1 蛋白均高表达, 但各因子的表达高峰和持续时间有所不同。PN 的表达量增幅最高且始终维持较高水平至创面表皮化后; 说明 PN、Ang-1、VEGF、FLK-1 共同参与了大鼠皮肤创面的愈合, PN 在创面愈合的整个过程中发挥着重要作用。

【关键词】 成骨细胞特异性因子; 创面愈合; 血管生成素-1; 血管内皮生长因子; 血管内皮生长因子受体 2

The expressions of periostin and the related factors during healing process of full-thickness cutaneous wound in rat HOU Jun-jie, NIE Fang-fei, LI Bo-lun, ZHAO Xia, QIN Ze-lian, MA Yong-guang, LI Jian-ning. Department of Plastic Surgery, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China
Corresponding author: MA Yong-guang, Email: ygma51@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To observe the expression of osteoblast-specific factor 2 (periostin, PN), angiopoietin-1 (Ang-1), vascular endothelial growth factor (VEGF) and vascular endothelial growth factor receptor-2 [VEGFR-2/fetal liver kinase-1 (FLK-1)] in wound surface and its peripheral skin, and their effects on wound healing in rats. **Methods** Forty-eight Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into six groups, with 8 rats in each group. An area of 2 cm × 2 cm full-thickness skin was excised on both sides of the back of rats. Specimens from wounds were obtained on 1, 4, 7, 10, 14, 21 days after operation, and histological evaluation and immunohistochemical staining of PN, Ang-1, VEGF and FLK-1 were made to determine their expression levels. Normal skin specimens were obtained as normal controls. **Results** The expressions of PN, Ang-1, VEGF and FLK-1 were significantly increased in wound surface after operation. Compared with the skin of normal controls, the expression of PN in the tissues of wound increased by 234.4% on the 1st day, and then increased continuously up to 597.9% on the 7th day (reaching the peak) after operation, followed by a decrease, the increase rate was 280.9% on the 21st day, and still remained at a high level (all $P < 0.05$). The expression of Ang-1 in the tissue of wound increased by 128.1% on the 1st day and 327.5% on the 4th day (reaching the peak), and then, it was gradually decreased. The increase rate was only 80.5% on the 14th day and it rose slightly later (all $P < 0.05$). The expression of VEGF in the tissues of wound reached the peak (165.8%) on the 7th day. Then it decreased with a slight fluctuation (all $P < 0.05$). The expression of FLK-1 in the tissues of wound was increased by 56.1% on the 1st day, and the level remained. It reached the peak by an increase of 70.1% on the 7th day (both $P < 0.05$). Then, it was lowered after the 10th day (all $P > 0.05$). **Conclusions** The expressions of PN, Ang-1, VEGF, FLK-1 were obviously increased during healing of skin wound, with different peaking time and expressing rates. The increase in expression of PN showed the longest duration and highest peak value. The PN, Ang-1, VEGF, FLK-1 all play a role in the wound healing process, and PN might play an important role during the healing process of a full-thickness cutaneous wound.

【Key words】 Periostin; Wound healing; Angiopoietin-1; Vascular endothelial growth factor; Vascular endothelial growth factor receptor-2

创面愈合包括炎症反应、肉芽形成、血管新生、上皮再生、组织重塑等过程,在创面修复的不同阶段有不同的细胞因子参与修复过程。近年国内外研究发现,成骨细胞特异性因子 2 periostin(PN)除了能特异性表达于骨膜与牙周膜组织,同时在促进肿瘤细胞增殖、血管再生、心肌缺血损伤、创伤修复等方面具有一定作用^[1-2]。本实验主要目的为研究在创面愈合的不同时期,PN 在创面及创缘周围组织的表达情况,比较 PN 与血管生成素-1(Ang-1)、血管内皮生长因子(VEGF)、VEGF 受体 2[VEGFR-2/ 胎肝激酶-1(FLK-1)]的变化。

1 材料与方法

1.1 实验设计:本实验经北京大学医学部伦理委员会批准通过,实验过程中动物的处置方法符合动物伦理学的要求。

1.2 实验动物及模型制备:雄性 SD 大鼠 48 只,由北京大学医学部实验动物科学部提供,动物许可证号:SYXK(京)2011-0039,体重 220 ~ 260 g,饲养 1 周无异常后用于实验。术前 12 h 禁食,腹腔注射戊巴比妥(50 mg/kg)麻醉大鼠,背部刮毛,背中部脊柱旁左右各制备一个皮肤全层及皮下浅层组织的创面,压迫止血。切下皮肤组织即为正常皮肤对照组。术后创面自然暴露,不予以包扎及药物处理。

1.3 创面标本取材及处理:按随机数字表法分别于术后 1、4、7、10、14、21 d 取 8 只大鼠,处死后切取双侧创面及周围组织,左侧组织用多聚甲醛溶液固定,右侧组织按部位分割后置液氮中保存, -80 ℃ 下低温冻存备用。石蜡包埋组织块、切片,分别行苏木素-伊红(HE)染色及 PN、Ang-1、VEGF、FLK-1 抗体染色;磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照。3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

1.4 观察指标:将免疫组化染色的各组切片分别在 400 倍显微镜下采集 6 个视野图像,正常皮肤组在紧邻表皮层下方区域随机选取,创面组于紧邻结痂下方(表皮化者取紧邻表皮下方)区域随机选取,用 Image-Pro Plus 6.0 软件对图像进行分析,检测其积分吸光度(A)值,以视野面积为计算面积,计算平均积分 A 值。记录每个视野的平均积分 A 值,每组取 7 个样本,在 400 倍显微镜下,每个标本采集 10 个视野,计数视野内血管数目。

1.5 统计学分析:数据采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SAS 8.0 统计软件进行统计学数据处理,各组数据进行正态性检验,随机区组设计方差分析比较各组间的差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色结果(图 1):创面早期以炎性细胞渗出为主,创面收缩,创缘部位的表皮细胞增生活跃,创面缩小,继而成纤维细胞数量和细胞外基质(ECM,如胶原)含量增加;4 d 创面局部组织内血管增殖明显,新生血管走行垂直于创面表面,肉芽组织形成;10 d 创面局部组织内血管数量、血管内皮细胞和成纤维细胞数量有所减少,表皮细胞向创面方向增殖并逐渐覆盖创面,细胞层数逐渐增加,创面逐步表皮化;21 d 成纤维细胞按照受力方向排列,细胞数目进一步减少,细胞形状变成了长梭形,仍无皮肤附属器生成。

2.2 PN 的免疫组化染色结果(图 2;表 1):PN 阳性染色信号为棕黄色。大鼠正常皮肤标本中可见 PN 阳性染色在表皮基底层中及皮肤附属器如毛囊、腺体等部位较强,成纤维细胞和血管内皮细胞中度表达。即细胞增殖活跃部位 PN 表达量较其他部位高。

创面中 PN 的表达部位主要在血管内皮细胞和成纤维细胞的细胞质及成纤维细胞周围的 ECM。在

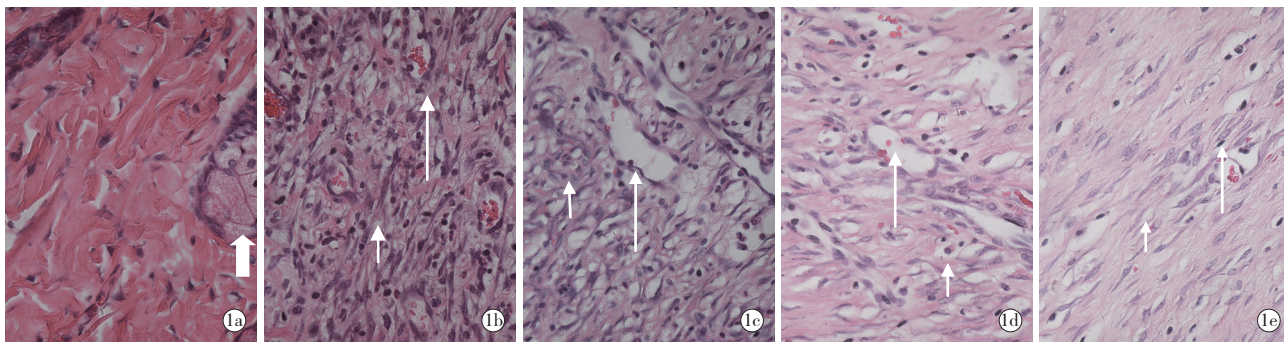


图 1 光镜下观察大鼠皮肤缺损创面病理学改变 正常皮肤(a)细胞数量少,胶原纤维为主;术后 4 d(b)成纤维细胞开始增多,新生血管较多,组织内炎性细胞浸润;术后 7 d(c)新生血管呈一定方向排列,成纤维细胞明显增多;术后 10 d(d)可见大量的细胞外基质,新生血管开始部分退化;术后 14 d(e)新生血管大部分退化,成纤维细胞及胶原纤维有序排列;粗箭头示皮脂腺,长细箭头示血管,短细箭头示成纤维细胞 HE 高倍放大

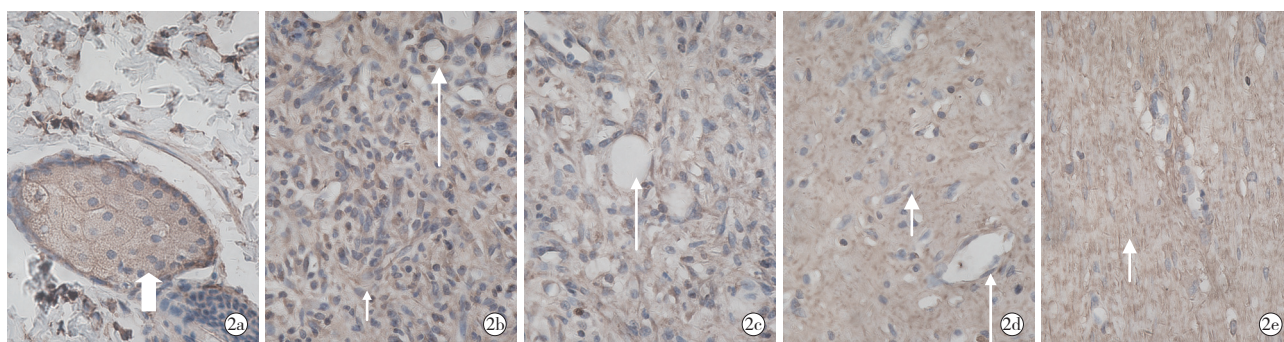


图2 光镜下观察大鼠皮肤缺损创面成骨细胞特异性因子 2(PN)表达 正常皮肤(a)PN 在皮脂腺腺体细胞高表达,成纤维细胞阳性表达,细胞外基质无明显表达;术后 4、7、10 d(b~d)不仅新生血管内皮细胞和成纤维细胞 PN 高表达,且细胞外基质 PN 也呈高表达;术后 14 d(e)成纤维细胞和细胞外基质 PN 高表达;粗箭头示皮脂腺,长细箭头示血管,短细箭头示成纤维细胞 免疫组化 高倍放大

创伤早中期,PN 阳性细胞数目和染色深度不断增加。进入组织重塑阶段,可见阳性成纤维细胞数量和局部细胞表达量均减少,以 ECM 着色为主,细胞和胶原纤维沿受力方向排列。分析其表达量,以正常皮肤的表达量为基准,PN 表达量在术后呈进行性升

高趋势,1 d 即增加了 234.4%($P<0.05$),4 d 增加了 373.4%($P<0.05$),7 d 增加了 597.9%达到峰值($P<0.05$),之后缓慢下降,至 21 d PN 增长率为 280.9%,表达量仍维持在较高水平($P<0.05$)。

2.3 Ang-1 的免疫组化染色结果(表 1):大鼠正常皮肤 Ang-1 的表达部位主要在皮脂腺细胞的细胞膜和细胞质,皮肤 ECM 微弱表达。在术后,大鼠皮肤创面局部 Ang-1 的表达量同样迅速升高,主要表现为成纤维细胞质和 ECM 的表达信号增强。与正常皮肤表达量比较,术后 1 d 增加了 128.1%($P<0.05$),4 d 增加了 327.5%,达到峰值($P<0.05$)后逐渐下降,14 d 的增长率仅为 80.5%,随即于 21 d 再次上升,其增长率为 176.9%,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。

2.4 VEGF 的免疫组化染色结果(表 1):大鼠正常皮肤的 VEGF 主要表达部位为毛囊及腺体的细胞膜及细胞质。大鼠创面局部的 VEGF 表达在成纤维细胞及血管内皮细胞细胞膜和细胞质均为明显阳性,ECM 无表达信号,随着创面愈合进程的发展,局部细胞的构成比例和细胞数目相应变化。术后创面局部 VEGF 表达量比正常皮肤明显增高,于 7 d 增加了 165.8%,达到峰值,而后下降,10 d 增长率降至

表 1 PN 及其他因子在大鼠不同时间点皮肤缺损创面的表达

组别	样本数	PN(积分 A 值)	Ang-1(积分 A 值)	VEGF(积分 A 值)	FLK-1(积分 A 值)
正常皮肤组	8	0.241 ± 0.065	0.502 ± 0.254	0.161 ± 0.051	0.740 ± 0.187
创面 1 d 组	8	0.806 ± 0.365 ^a	1.145 ± 0.245 ^a	0.244 ± 0.124 ^a	1.155 ± 0.370 ^a
创面 4 d 组	8	1.141 ± 0.506 ^a	2.146 ± 0.838 ^a	0.381 ± 0.087 ^{ab}	1.154 ± 0.275 ^a
创面 7 d 组	8	1.682 ± 0.490 ^{ab}	1.716 ± 0.290 ^a	0.428 ± 0.080 ^a	1.259 ± 0.309 ^a
创面 10 d 组	8	1.460 ± 0.408 ^a	1.115 ± 0.315 ^a	0.275 ± 0.071 ^{ab}	0.936 ± 0.136
创面 14 d 组	8	1.102 ± 0.374 ^a	0.906 ± 0.224 ^a	0.329 ± 0.095 ^a	0.873 ± 0.140
创面 21 d 组	8	0.918 ± 0.405 ^a	1.390 ± 0.664 ^a	0.268 ± 0.089 ^a	0.856 ± 0.220

注:PN:成骨细胞特异性因子 2,Ang-1:血管生成素-1,VEGF:血管内皮生长因子,FLK-1:胎肝激酶-1;与正常皮肤组比较,^a $P<0.05$;与前一时间点组比较,^b $P<0.05$

仅有 70.8%,然后出现小幅波动(均 $P<0.05$)。

2.5 FLK-1 的免疫组化染色结果(表 1):FLK-1 在大鼠正常皮肤的主要表达部位同样为毛囊和皮脂腺腺体的细胞膜上。创面局部 FLK-1 的主要表达部位为成纤维细胞、新生血管内皮细胞。创面的 FLK-1 表达量在术后早期升高明显,但增长幅度相对其他因子要小。术后 1 d 较正常皮肤的表达量升高了 56.1%并维持这一水平,7 d 增加了 70.1%,达峰值(均 $P<0.05$),10 d 起缓慢下降(均 $P>0.05$)。

2.6 血管计数结果:正常皮肤血管数为(3.3 ± 0.8)个;创面术后 7 d 为(17.9 ± 5.3)个,10 d 为(17.0 ± 4.9)个,14 d 为(11.7 ± 1.8)个,21 d 为(5.7 ± 1.7)个。

3 讨论

创面愈合是一个非常复杂的过程,众多生长因子在不同阶段共同参与了创面愈合的整个过程^[3-4]。从创伤的发生开始,许多因子的调控即被启动,包括炎性细胞浸润、细胞趋化、肉芽生成、血管新生、细胞分化、组织重塑等不同过程均有生长因子的参与。本课题组前期研究发现,PN 在瘢痕疙瘩和增生性瘢痕组织及其成纤维细胞中高表达,敲除 PN 基因表达能够抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖^[5],说明 PN 具有促进瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖的功能。重组 PN 蛋白通过增加脐静脉血管内皮细胞的

增殖和迁移能力对抗酸性条件的不利影响,使得血管内皮细胞能够抵抗组织胺中毒维持增殖以形成血管^[6],推测 PN 在皮肤创面愈合过程中可能有重要作用。本研究发现,创面局部组织 PN 的表达量在 7 d 形成峰值,此结果与文献^[2,7]报告一致。与其他促血管因子在创面愈合后期明显下降不同,在创面愈合的整个过程中,创面局部 PN 始终显著高表达,说明其在整个创面愈合过程中,始终存在重要作用。分析其作用是:在创面愈合的早期主要是促进内皮细胞增殖和血管新生,成纤维细胞增殖和合成分泌 ECM。随着创面局部重塑过程的开始,新生血管部分退化,毛细血管小血管化;同时在创面后期的组织重塑过程中,PN 仍然影响成纤维细胞的增殖与分泌,促进创面局部纤维化及组织重塑^[8]。

本实验还发现,Ang-1 在术后 4 d 达到高峰,其高峰可能由创伤启动,说明其在创伤早期起主要作用。Ang-1 是血管生成素家族的一员,可抵抗炎症所导致的血管渗漏,促进血管的成熟和稳定,与 VEGF 协同作用于创面愈合过程^[9]。本实验显示,VEGF 主要在血管内皮细胞和成纤维细胞高表达,ECM 不表达。VEGF 主要通过促进内皮细胞增殖、迁移、管腔形成,增加创面血液供应,促进创面血管再生和创面愈合^[10-11]。VEGFR-2/FLK-1 在术后表达很快上调,但增幅有限,持续时间也短,其增长不及 VEGF 的变化量。PN 对 VEGF 及其受体有影响。本课题组在前期实验中采用干扰 PN 基因表达的方法,将 PN 抑制质粒(pGC-shPOSTN)和阴性对照质粒(NC)转染入骨肉瘤细胞系 U2OS 细胞。转染后 48 h,与空质粒对照组相比,实验组 U2OS 细胞 VEGF mRNA 的表达显著下调。我们通过实验发现 PN 能够明显促进 U2OS 细胞 VEGF 的表达^[12]。文献报道 PN 可通过上调血管内皮细胞中 VEGFR-2/FLK-1 的表达来增加 VEGF 的敏感性,促进内皮细胞迁移和增殖,促进血管新生^[11]。

综上,本实验结果确定了大鼠创面愈合过程中 PN 和参与血管再生的 Ang-1、VEGF、FLK-1 的表达规律,Ang-1、VEGF、FLK-1 在创面愈合早期表达升高,在后期下降并趋于正常;而 PN 则在创面愈合的整个过程中持续高表达,增加幅度最大;说明 PN、Ang-1、VEGF、FLK-1 共同参与了大鼠皮肤创面的愈合,PN 在创面愈合的整个过程中都发挥着重要作用。确切作用机制仍有待进一步实验探索。

志谢:衷心感谢北京大学第三医院中心实验室的老师们为本实验提供良好的实验条件及热情帮助。

参考文献

- [1] Takeshita S, Kikuno R, Tezuka K, et al. Osteoblast-specific factor 2: cloning of a putative bone adhesion protein with homology with the insect protein fasciclin I. *Biochem J*, 1993, 294: 271-278.
- [2] Jackson-Boeters L, Wen W, Hamilton DW. Periostin localizes to cells in normal skin, but is associated with the extracellular matrix during wound repair. *J Cell Commun Signal*, 2009, 3: 125-133.
- [3] 刘阳, 韩会民, 徐荣慧, 等. 中药解毒生肌膏对大鼠糖尿病足溃疡肌肉中细胞因子影响的研究. *中国中西医结合急救杂志*, 2009, 16: 49-51.
- [4] 孙鹏, 付小兵. 基因改变与创面愈合. *中国危重病急救医学*, 2003, 15: 245-247.
- [5] 刘畅, 宋振华, 秦泽莲. 人 periostin 干扰载体的构建及其对成纤维细胞目的基因表达的影响. *北京大学学报(医学版)*, 2010, 42: 503-508.
- [6] 陈鑫磊, 边曦, 秦泽莲. Periostin 酸性环境下对人脐静脉内皮细胞功能的影响. *北京大学学报(医学版)*, 2011, 43: 855-860.
- [7] Bao S, Ouyang G, Bai X, et al. Periostin potently promotes metastatic growth of colon cancer by augmenting cell survival via the Akt/PKB pathway. *Cancer Cell*, 2004, 5: 329-339.
- [8] Roy S, Patel D, Khanna S, et al. Transcriptome-wide analysis of blood vessels laser captured from human skin and chronic wound-edge tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 14472-14477.
- [9] McCarter SD, Mei SH, Lai PF, et al. Cell-based angiopoietin-1 gene therapy for acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 175: 1014-1026.
- [10] Hamilton DW. Functional role of periostin in development and wound repair: implications for connective tissue disease. *J Cell Commun Signal*, 2008, 2: 9-17.
- [11] Jośko J, Gwózdź B, Jedrzejowska-Szypulka H, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis. *Med Sci Monit*, 2000, 6: 1047-1052.
- [12] Liu C, Huang SJ, Qin ZL. Inhibition of periostin gene expression via RNA interference suppressed the proliferation, apoptosis and invasion in U2OS cells. *Chin Med J (Engl)*, 2010, 123: 3677-3683.

(收稿日期: 2012-04-27)

(本文编辑: 李银平)

• 广告目次 •

- ①深圳迈瑞: Bene View T8 病人监护仪 (封二)
- ②天津红日药业: 血必净注射液 (插页)
- ③珠海健帆: 血液灌流器 (插页)
- ④天津生化制药: 琥珀氢可 (插页)
- ⑤廊坊爱尔: 炭肾 (插页)
- ⑥德尔格: 重症监护室内我们在您左右 (插页)
- ⑦广东天普药业: 天普洛安 (插页)
- ⑧南京臣功: 特苏尼®托拉塞米注射液 (插页)
- ⑨赛诺菲安万特(北京)制药: 注射用替考拉宁 (插页)
- ⑩罗氏诊断产品(上海)有限公司: 血气分析仪 (插页)
- ⑪第一制药: 克倍宁 (封三)
- ⑫江苏新晨: 艾贝宁®盐酸右美托咪定注射液 (封四)