

低功率氩氦激光对小鼠烫伤创面血管内皮细胞因子和细胞凋亡因子基因表达的影响*

段强¹ 王冰水^{1,3} 牟翔¹ 袁华¹ 刘卫¹ 单守勤²

摘要

目的:观察低功率氩氦激光照射后烫伤小鼠创面的变化及其对小鼠创面炎症介导因子VEGF、Caspase-3基因表达的影响。

方法:60只烫伤小鼠模型随机分为激光照射组与对照组,其中激光照射组行低强度氩氦激光照射烫伤创面,能量密度15J/cm²,对照组采用假照射,能量密度0J/cm²,每天一次,每次15min,连续14d。分别在烫伤后0、1、3、7、14d记录创面面积,计算创面愈合率,并取全层创面组织标本,采用RT-PCR法检测VEGF、Caspase-3的基因表达。

结果:激光照射组小鼠创面愈合率明显高于对照组($P<0.05$)。与对照组相比,激光照射组VEGF基因表达在烫伤后1d时降低,3d时开始增加($P<0.05$),7d时达到高峰($P<0.01$),随后降低,在14d时,VEGF基因表达已低于对照组($P>0.05$)。激光组1d时Caspase-3基因表达减少($P<0.05$),3d时Caspase-3基因表达持续降低($P<0.01$),7d时开始增高($P>0.05$)。

结论:低功率氩氦激光照射可以加速烫伤创面愈合,可能与其调节VEGF和Caspase-3因子表达相关。

关键词 低功率氩氦激光;炎症;血管内皮生长因子;细胞凋亡因子-3

中图分类号:R493,R644 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-1242(2016)-02-0199-02

低功率氩氦激光是波长为632.8nm的红光,临床上可用来促进伤口愈合。既往研究发现低功率激光可通过调节创伤组织炎性细胞因子TGF- β 1、IL-1 β 等的基因表达,加速伤口愈合^[1]。本实验采用低功率氩氦激光照射烫伤小鼠皮肤伤口,观察愈合过程损伤部位血管内皮细胞因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和细胞凋亡因子(caspase-3)的基因表达变化,初步探讨了氩氦激光促进伤口愈合的分子机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型的制作及分组

清洁级雄性BALB/c小鼠(第四军医大学实验动物中心提供)60只,体重20 \pm 2.0g,室温下用混合饲料饲养。两组小鼠实验前禁食12h,自由饮水,以3%戊巴比妥钠溶液(40mg/kg)腹腔麻醉,10%Na₂S水溶液背部脱毛,固定于烫伤专用模具上,挂烫机预热1min,待蒸汽温度稳定在93 $^{\circ}$ C,将直径2cm的耐热塑料环形模具置于小鼠背部致伤5s,形成深II度烫伤创面(经病理切片证实)^[2]。应用Meeh公式计算出实际烫伤

面积约为20%体表面积全层皮肤烫伤。所有小鼠按照随机数字表法分为激光照射组和对照组,每组各30只。

1.2 激光照射方法与标本制作

低功率氩氦激光(上海嘉定光电仪器有限公司)输出功率密度20mW/cm²,波长632.8nm,光斑直径1cm,按创面大小分五区照射损伤部位,每区照射3min,共15min,每次照射前用激光功率计监测激光能量输出的稳定。激光照射组于损伤后第一天开始照射,1次/d,连续14d,对照组做相同的处理,激光照射功率输出为0J/cm²(假照射)。分别于烫伤后0、1、3、7、14d每日同时间观察创面愈合情况,测量创面面积,并取创面的皮肤标本,于液氮速冻后,保存于-80 $^{\circ}$ C冰箱。

1.3 mRNA转录水平测定

取创面组织利用Trizol试剂法提取培养细胞总RNA \rightarrow Oligo dT纤维素层析法纯化mRNA \rightarrow 取特定引物进行反转录 \rightarrow 加入特定引物及荧光标记的碱基,用实时PCR仪进行扩增 \rightarrow 进行实时荧光RT-PCR检测基因表达情况;

引物设计为:

VEGF(200bp): 上游: 5'-GAGGGCAGAATCATCAC-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2016.02.014

*基金项目:陕西省自然科学基金研究计划项目(210JM4019);应用基础研究项目(BWS11J003)

1 第四军医大学附属西京医院康复理疗科,西安,710032; 2 青岛第一疗养院; 3 通讯作者

作者简介:段强,男,住院医师;收稿日期:2014-12-15

GAA-3'、

下游 5'-GGGAACGCTCCAGGACTTAT-3'；

caspase-3(200bp): 上游 5'-TGTCATCTCGCTCTGG-TACG-3'、

下游 5'-AAATGACCCCTTCATCACCA-3'。

PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,使用Champ-Gel™凝胶成像仪观察并拍照保存结果,将扩增后的VEGF mRNA和Capase-3mRNA条带及其对应的β-actin mRNA条带的A值经Genetools软件测量后计算两者的比值,比较伤口愈合不同时期各组VEGF、caspase-3基因的表达量。

1.4 烫伤创面愈合率计算

烫伤后对创面留取照片、用透明膜描记称量法记录伤后0、1、3、7、14d创面面积,计算创面愈合率。创面愈合率(%)=(开始烫伤面积-未愈合创面面积)/开始烫伤面积^[3]。

1.5 统计学分析

所有数据均采用SPSS17.0统计软件包处理,计量资料

用t检验, $P<0.05$ 为差异显著性意义。

2 结果

2.1 两组创面愈合率比较

本实验中,共纳入小鼠60只,统计分析60只。实验中观察到小鼠在烫伤后1—3d活动减少,饮水量增加,进食亦减少;烫伤7—14d行动与饮食基本恢复到未烫伤之前。激光照射组小鼠第7、14d创面愈合率明显高于对照组,差异有显著性意义($P<0.05$),见表1。

2.2 两组小鼠VEGF、caspase-3基因表达比较

与对照组相比,激光照射组VEGF基因表达在烫伤后1d时降低,3d时开始增加($P<0.05$),7d时达到高峰($P<0.01$),随后降低,14d时,VEGF基因表达已低于对照组($P>0.05$),见表2。激光组1d时caspase-3基因表达减少($P<0.05$),3d时caspase-3基因表达持续降低($P<0.01$),7d时开始增高($P>0.05$),见表3。

表1 不同时间点创面的愈合率比较

($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	动物数	0d	1d	3d	7d	14d
对照组	30	0	4.15±1.92	26.17±2.92	44.12±5.01	61.54±5.98
激光照射组	30	0	5.01±2.03	30.52±2.96	54.71±6.03 ^①	75.68±7.19 ^①

①与对照组比较 $P<0.05$

表2 小鼠烫伤创面VEGF阳性表达比较

($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	0d	1d	3d	7d	14d
对照组	30	12.82±1.17	4.89±1.81	7.98±2.12	10.17±2.63	8.54±2.09
激光照射组	30	12.79±1.29	6.17±1.76	10.75±2.09 ^①	16.49±2.11 ^②	7.99±2.11

与对照组比较:① $P<0.05$;② $P<0.01$

表3 小鼠烫伤创面caspase-3阳性表达比较

($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	0d	1d	3d	7d	14d
对照组	30	24.13±2.21	16.03±2.03	10.69±1.76	8.41±1.72	7.46±1.97
激光照射组	30	23.81±2.02	13.38±2.02 ^①	5.28±2.01 ^②	8.02±1.89	7.57±2.03

与对照组比较:① $P<0.05$;② $P<0.01$

3 讨论

烫伤创面愈合是受多种因素影响的复杂过程,一般可分为炎症、肉芽增生、再上皮化和改建塑形等几个阶段。皮肤烫伤后造成周围血管形成障碍,无法及时地运输修复必需的物质和能量或清除创面的代谢产物,干扰创面修复。VEGF是血管形成的关键调控因素之一^[4],其在烫伤创面修复过程中的表达规律及对血管内皮细胞增殖、迁移和凋亡具有重要作用,是修复程序得以正常进行的后勤保障系统;而炎症介导因子的调控对创面愈合具有重要作用。

氩激光是临床常用的激光疗法之一,其波长短、频率高、光化效应明显,本研究中采用的是连续式激光,功率密度20mW/cm²,具有稳定性高,单色性好的特点,能够有效地调节创面炎症相关因子的表达,对深、浅Ⅱ度烫伤创面具有

较好的促愈合作用^[1]。

研究表明^[5],毛细血管形成的时间、多寡和质量直接影响到创伤愈合的程度。创面新生毛细血管在各种调节因素的精密调控下,形态结构不断成熟,功能逐渐完善。本实验中发现,激光照射组创面VEGF的基因表达在3—7d较对照组明显增加($P<0.05$),在2周后,其VEGF表达与对照组无明显差异。Thomas KA等^[6]检测烫伤小鼠创面Ⅷ因子相关抗原发现,烫伤后3—7d创面肉芽组织内出现单个的不成腔的血管内皮细胞,数目随肉芽组织的增多而逐渐增加,形态由刚形成时单个或无腔的簇状逐渐转变为有腔,进而腔内有红细胞充盈。这可能与烫伤早期(3—7d),激光照射后创面VEGF表达增加、局部血流改善、加速坏死组织的代谢和肉芽组织

(下转第214页)