

网络出版时间: 2016-10-19 13:54:52 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20161019.1354.035.html>

TNF- α 对大鼠舌黏膜创伤愈合过程中上皮间质转化的影响

王飞虎¹ 孙应明² 孔苗苗³ 王 飞¹ 杨聪翀⁴ 刘来奎⁴

摘要 取 60 只 8 周龄 Wistar 大鼠,随机分为 TNF- α + 凝胶实验组和空白凝胶对照组,于其舌背部黏膜处作一圆形缺损模型;每组大鼠分别于 0、24、48、72、96 h 处死,取标本冰冻切片。通过免疫组织荧光法检测与上皮间质转化(EMT)相关蛋白 E-钙黏蛋白(E-cad)、成纤维细胞特异性蛋白-1(FSP1)和波形蛋白(Vimentin)在大鼠舌黏膜创伤愈合过程中的表达。结果显示两组大鼠创伤部位上皮细胞均有表达 FSP1 和 Vimentin,实验组发生改变的细胞数目明显较对照组多,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

关键词 创伤愈合;舌黏膜;上皮间质转化;TNF- α

中图分类号 R 782.4

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)12-1863-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.12.035

上皮间质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)是上皮细胞失去上皮细胞特征并获得间充质细胞特征从而导致上皮失去完整性和功能的过程,是正常发育分化、炎症反应、纤维化和肿瘤形成过程中发生的重要过程^[1-2]。皮肤的创伤愈合过程中创伤边缘上皮细胞会发生运动和迁移,迁移的上皮细胞发生了 EMT 获得了间质细胞的特征。特定的诱导信号可以调节细胞活动从而发生 EMT^[3]。多种细胞因子可诱导 EMT 的发生,肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和创伤愈合之间有着密切的关系^[4-5]。口腔黏膜和皮肤的创伤愈合经历了相同的阶段, TNF- α 是否通过调节 EMT 来影响舌黏膜创伤愈合尚不清楚。该实验拟探讨 TNF- α 对舌黏膜创伤愈合中 EMT 的影响。

2016-07-04 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号:81272968);南京军区医药卫生
科研基金(编号:ZD05)

作者单位: ¹安徽医科大学无锡临床学院口腔科,无锡 214044

²解放军 101 医院口腔科,无锡 214044

³合肥市口腔医院正畸科,合肥 230001

⁴南京医科大学附属口腔医院基础教研室,南京 210029

作者简介: 王飞虎,男,硕士研究生;

孙应明,男,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: sun_yingmingkqzj@163.com

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康清洁级 Wistar 大鼠 60 只,雌雄各半,8 周龄,280~300 g,购自扬州大学动物实验中心,饲养于南京医科大学动物实验中心(清洁级);自由摄食、饮水,待适应性饲养 1 周后进行实验,实验过程中对大鼠的处置皆符合医学伦理学标准。

1.2 主要实验器械与实验试剂 皮肤活检打孔器、解剖刀、解剖剪、解剖盘、剪刀(江苏省张家港市大多医疗器械有限公司);冰冻切片机(美国莱卡公司);LSM-710 激光共聚焦显微镜(德国 Zeiss 公司);防脱载玻片(江苏世泰公司);甘油、对羟基苯甲酸乙酯、羧甲基纤维素钠(上海西格玛奥德里奇贸易有限公司);TNF- α (美国 Abcam 公司);鼠抗人单克隆波形蛋白(Vimentin)抗体、FITC 二抗、Cy3 二抗(美国 Santa Cruz 公司);兔抗人多克隆 E-钙黏蛋白(E-cadherin, E-cad)抗体(美国 GenTex 公司);兔抗人多克隆成纤维细胞特异性蛋白-1(fibroblast specific proteins, FSP1)抗体(美国 Proteintech 公司);DAPI(美国 Invitrogen 公司);抗荧光淬灭剂(上海碧云天生物技术研究所以)。

1.3 方法

1.3.1 大鼠舌创伤模型制备及分组 用孔径为 3 mm 的皮肤活检打孔器在两组大鼠舌背中 1/3 处打孔深约 1 mm 至黏膜下层,压迫止血,术后禁食禁水 1 h。

1.3.2 凝胶配制及分组处理 空白凝胶:在 50 ml 双蒸水中加入羧甲基纤维素钠 3.0 g、对羟基苯甲酸乙酯 0.1 g、甘油 7.5 g,于 37 °C 水浴箱中充分溶解,保存于 4 °C 冰箱。TNF- α 凝胶:配方同上,再加入 1 mg TNF- α ,使凝胶中的 TNF- α 浓度为 20 ng/ml。将 60 只大鼠随机分为 TNF- α + 凝胶实验组(简称实验组)和空白凝胶对照组(简称对照组)。两组大鼠再分别分为 0、24、48、72、96 h 共 5 个亚组,各 6 只,0 h 亚组直接处死,其他亚组按时涂加凝胶,创口处凝胶的量以恰覆盖创面、高出创面 1~2 mm 为宜,加凝

胶后禁食禁水 1 h。

1.3.3 取材 于术后 0、24、48、72、96 h 处死相对应时间点的大鼠,大鼠舌体于舌根 1/3 处垂直于舌黏膜切断,置于冰盒中,OCT 固定,冰冻切片机从创口最大周径处做 5 μm 的连续切片,防脱载玻片捞片。每个标本 4 张切片,分为 E-cad-Vimentin 亚组和 FSP1-Vimentin 亚组各 2 张行免疫荧光染色,并于激光扫描共聚焦显微镜下拍照保存。统计在拍取的照片上发生 EMT 的创伤边缘上皮细胞数目。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两样本间比较采用 t 检验。

2 结果

激光共聚焦显微镜下观察显示 0 h,在 E-cad-Vimentin 切片中上皮细胞膜红色荧光完整连续(E-cad)细胞内没有绿色荧光(Vimentin);在 FSP1-Vimentin 切片中上皮细胞内没有观察到红色荧光(FSP1)和绿色荧光(Vimentin)。见图 1。24 h 和 48 h 时,在 E-cad-Vimentin 切片中可见边缘的上皮细胞膜红色荧光不连续,部分细胞内观察到绿色荧光,在 FSP1-Vimentin 上皮细胞的细胞核周围有红色荧光和绿色荧光。72 h 和 96 h 时,TNF- α 组在 E-cad-Vimentin 切片中可见细胞核周围的红色荧光相对之前逐渐连续,FSP1-Vimentin 切片中可见核周围有红色荧光和绿色荧光的细胞数目减少。72 h 对照组在 FSP1-Vimentin 切片中观察到核周围有红色荧光和绿色荧光的细胞数目比 24、48 和 96 h 多,96 h 对照组在 E-cad-Vimentin 切片中可以观察到细胞膜上红色荧光开始完整,在 FSP1-Vimentin 切片中可见核周围红色荧光和绿色荧光的细胞数目减少(图 2、3)。两组间发生 EMT 的细胞数目差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

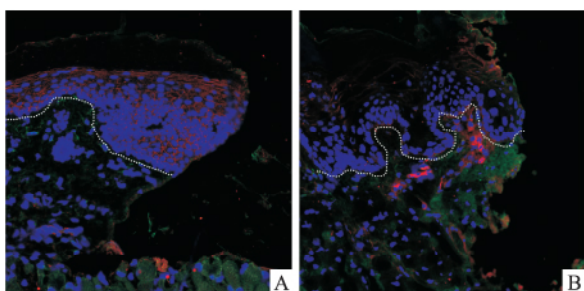


图 1 显微镜下观察 0 h 上皮 E-cad、Vimentin 和 FSP1 荧光的表达 $\times 200$

A: E-cad(红色荧光)和 Vimentin(绿色荧光)的免疫组织荧光染色; B: FSP1(红色荧光)和 Vimentin(绿色荧光)的免疫组织荧光染色

表 1 两组上皮中发生 EMT 的上皮细胞数目($\bar{x} \pm s$)

时间 (h)	上皮细胞数目(个)		t 值	P 值
	对照组	实验组		
0	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00		
24	0.00 $\pm$ 0.00	6.00 $\pm$ 1.00	-13.416	<0.001
48	5.00 $\pm$ 0.71	15.00 $\pm$ 1.00	-18.257	<0.001
72	14.00 $\pm$ 0.71	16.00 $\pm$ 1.00	-3.651	0.006
96	11.00 $\pm$ 1.23	9.00 $\pm$ 1.23	2.582	0.033

3 讨论

上皮细胞发生 EMT 时,E-cad 表达下降,FSP1 和 Vimentin 表达上升,细胞获得迁移能力,产生基质金属蛋白酶(MMP)、在间质中沉积胶原及纤维连接蛋白^[6-7]。本实验观察的指标即为 E-cad、FSP1 和 Vimentin。皮肤创伤愈合的本质是通过再上皮化的过程来重建表皮屏障^[8],在皮肤创伤愈合过程中,巨噬细胞合成并分泌早期炎症因子 TNF- α ,TNF- α 在创伤修复的早期阶段表达,暗示其起着重要作用^[9-10]。

研究^[11]报道,口腔黏膜和皮肤的创伤愈合经历了相同的阶段,但是口腔黏膜的愈合比皮肤创伤愈合快,且口腔黏膜的愈合产生极少的瘢痕。本实验通过制作出大鼠舌黏膜创伤模型,并使用 TNF- α 于创伤部位,观察创伤边缘上皮细胞标志物表达的变化,来探究 TNF- α 对大鼠舌黏膜愈合过程中 EMT 的影响。

激光共聚焦显微镜下观察显示 0 h,在 E-cad-Vimentin 切片中观察到上皮细胞表达 E-cad,没有表达 Vimentin;在 FSP1-Vimentin 切片中 FSP1 和 Vimentin 均未表达,在基底膜下的间质细胞核周围可以观察到红色荧光和绿色荧光,说明正常的上皮细胞是不表达间质细胞标志物的。24 h 和 48 h 时,两组大鼠舌黏膜创伤部位的基底膜乳突结构平缓,上皮细胞的排列逐渐松散,细胞核之间的距离也逐渐增大,说明这些细胞已经开始移动;在 E-cad-Vimentin 切片中可见部分细胞内有绿色荧光,在 FSP1-Vimentin 切片中创伤边缘最前方的上皮细胞已经开始表达 FSP1 和 Vimentin,提示这些上皮细胞已经发生了 EMT,拥有了部分间质细胞的特征。发生 EMT 的细胞有些仍表达红色荧光同时表达绿色荧光,而有的则只表达绿色荧光,反映了不同的上皮细胞发生 EMT 的程度不同。72 h 和 96 h 时,TNF- α 组创口两端的上皮细胞已经接触,上皮细胞的排列又紧密起

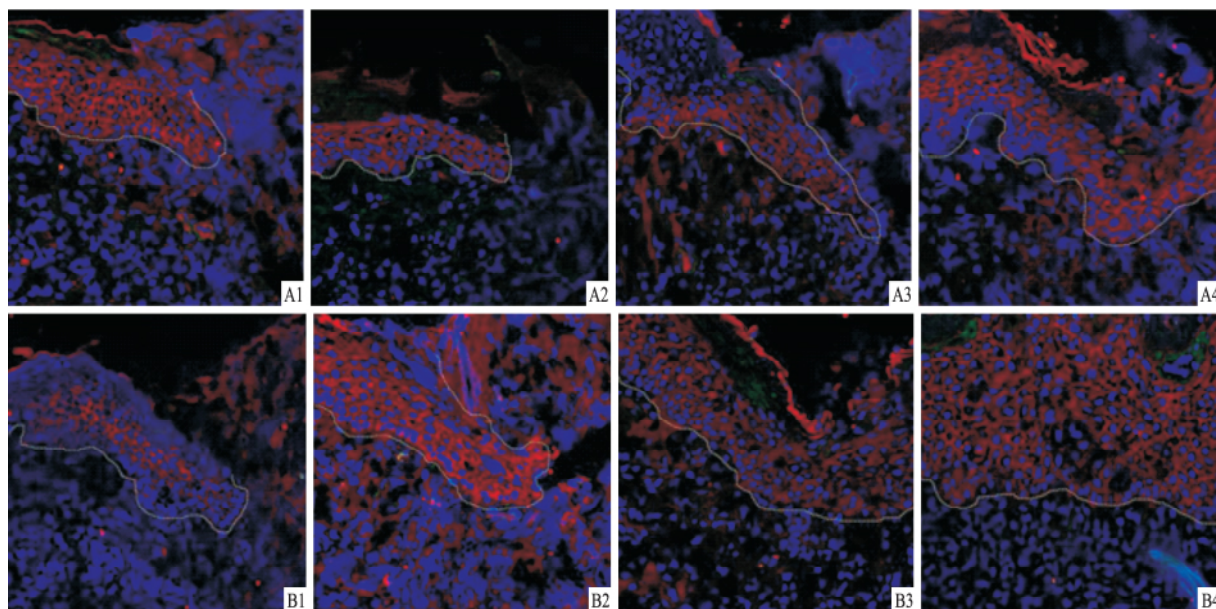


图2 上皮 E-cad(红色荧光)和 Vimentin(绿色荧光)表达 $\times 200$

A: 对照组; B: 实验组; 1: 24 h; 2: 48 h; 3: 72 h; 4: 96 h

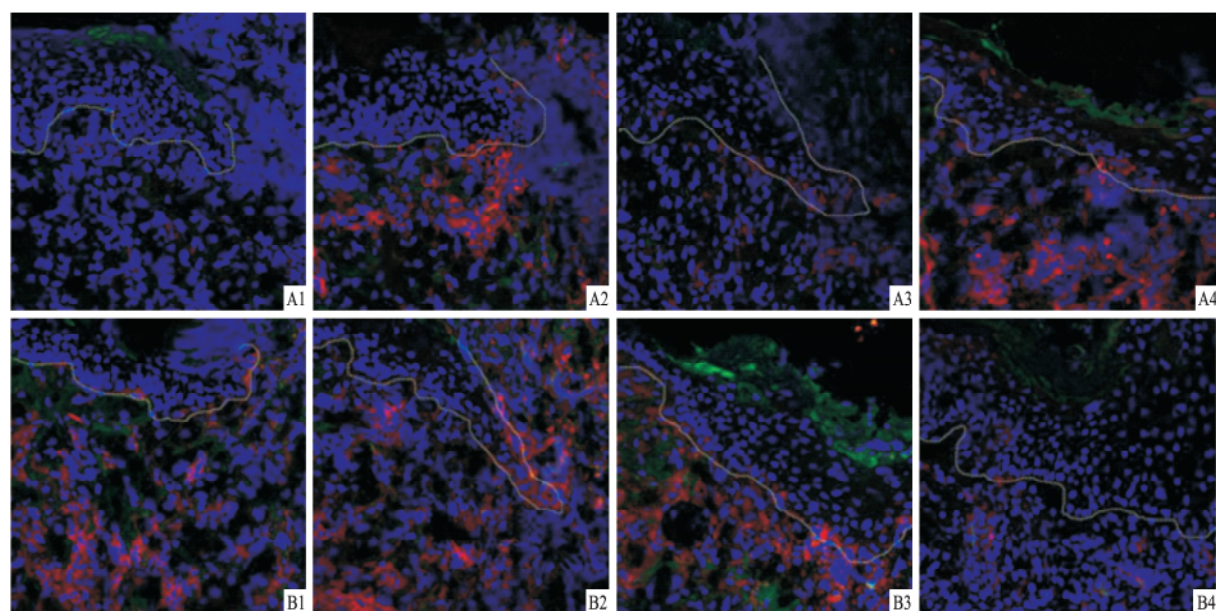


图3 上皮 FSP1(红色荧光)和 Vimentin(绿色荧光)的表达 $\times 200$

A: 对照组; B: 实验组; 1: 24 h; 2: 48 h; 3: 72 h; 4: 96 h

来,在 E-cad-Vimentin 切片中可见细胞核周围的红色荧光相对之前时间点逐渐完整, FSP1-Vimentin 切片中可见 96 h 发生 EMT 的细胞数目已经减少了,说明随着创伤的愈合,间质细胞又开始转换为上皮细胞。72 h 对照组创口两端的上皮细胞还未接触,此时发生 EMT 的上皮细胞的数目较 24 h 和 48 h 有所增加,96 h 对照组创伤两端的上皮细胞接触,细胞重新获得了上皮细胞的特征,发生 EMT 的上皮细

胞较 72 h 减少,在皮肤创伤愈合过程中 EMT 的增强可以促进创伤修复^[12]。本研究显示创伤边缘的上皮细胞会发生活动并迁移至创伤中心部位开始增殖,迁移的细胞发生了 EMT,形态和功能产生了改变,并且实验组的愈合速度比对照组快。

皮肤创伤愈合过程中 $\text{TNF-}\alpha$ 可以诱导创伤部位发生 EMT,骨形态发生蛋白 2 和其受体被 $\text{TNF-}\alpha$ 诱导从而促进 EMT 的发生^[13],还可以上调 MMPs

的表达并保持其活性来参与 EMT 的发生。本实验显示 TNF- α 对大鼠舌黏膜创伤愈合过程中 EMT 有增强的作用,但是具体机制尚需进一步的研究,本实验的结果对是否可以通过应用 EMT 诱导剂和抑制剂来促进创伤愈合提供了理论支持,也为进一步研究如何提高创伤修复的速度和质量提供了参考。

参考文献

- [1] Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014, 15(3): 178–96.
- [2] Yan J, Gumireddy K, Li A, et al. Regulation of mesenchymal phenotype by microRNAs in cancer[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2013, 13(9): 930–4.
- [3] Cannito S, Novo E, di Bonzo L V, et al. Epithelial-mesenchymal transition: from molecular mechanisms, redox regulation to implications in human health and disease[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 12(12): 1383–430.
- [4] Frank J, Born K, Barker J H, et al. *In vivo* effect of tumor necrosis factor alpha on wound angiogenesis and epithelialization[J]. *Euro J Trauma* 2003, 29(4): 208–19.
- [5] Weinstein D A, Kirsner R S. Refractory ulcers: the role of tumor necrosis factor-alpha[J]. *J Am Acad Dermatol* 2010, 63(1): 146–54.
- [6] Borthwick L A, Parker S M, Brougham K A, et al. Epithelial to mesenchymal transition(EMT) and airway remodelling after human lung transplantation[J]. *Thorax* 2009, 64(9): 770–7.
- [7] Jain R, Shaul P W, Borok Z, et al. Endothelin-1 induces alveolar epithelial-mesenchymal transition through endothelin type A receptor-mediated production of TGF-beta1[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007, 37(1): 38–47.
- [8] Singer A J, Clark R A. Cutaneous wound healing[J]. *N Engl J Med* 1999, 341(10): 738–46.
- [9] Kubo H, Hayashi T, Ago K, et al. Temporal expression of wound healing related genes in skin burn injury[J]. *Leg Med (Tokyo)*, 2014, 16(1): 8–13.
- [10] Grimstad Ø, Sandanger Ø, Ryan L, et al. Cellular sources and inducers of cytokines present in acute wound fluid[J]. *Wound Repair Regen* 2011, 19(3): 33747.
- [11] Chen L, Arbueva Z H, Guo S, et al. Positional differences in the wound transcriptome of skin and oral mucosa[J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 471.
- [12] Terao M, Ishikawa A, Nakahara S, et al. Enhanced epithelial-mesenchymal transition-like phenotype in N-acetylglucosaminyltransferase V transgenic mouse skin promotes wound healing[J]. *J Biol Chem* 2011, 286(32): 28303–11.
- [13] Yan C, Grimm W A, Garner W L, et al. Epithelial to mesenchymal transition in human skin wound healing is induced by tumor necrosis factor-alpha through bone morphogenic protein-2[J]. *Am J Pathol* 2010, 176(5): 2247–58.

Effect of TNF- α on EMT and wound healing during rats' tongue mucosa injury

Wang Feihu¹, Sun Yingming², Kong Miaomiao³, et al

(¹Dept of Stomatology, Clinical School of Wuxi Anhui Medical University, Wuxi 214044; ²Dept of Stomatology, The 101th Hospital of PLA, Wuxi 214044; ³Dept of Orthodontic, The Dental Hospital of Hefei, Hefei 230001)

Abstract 60 8-week-old Wistar rats were randomly divided into TNF- α + Gel experimental group and the Gel control group. A 3 mm-diameter circular defects were made on the tongue mucosa of the rats. The rats were killed at 0, 24, 48, 72 and 96 hour after operations. Immunohistochemical fluorescence was used to detect the expression of EMT related protein E-cadherin (E-cad), fibroblast specific proteins (FSP1) and Vimentin in tongue mucosa during wound healing. The number of cells which expressed Vimentin and FSP1 in the basal layer of wound edge zone in TNF- α group was more than that in the control group ($P < 0.05$).

Key words wound healing; tongue mucosa; epithelial-to-mesenchymal transition; TNF- α