

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.12.005

## 在烫伤条件下 VEGF 对大鼠皮肤 eNOS 基因表达的影响\*

孙梦<sup>1</sup> 靳丽丽<sup>1</sup> 吾拉尔·阿德力<sup>1</sup> 王瑞萍<sup>1</sup> 任雅璠<sup>1</sup> 高彧<sup>1</sup> 冯树梅<sup>2Δ</sup>

(1 新疆医科大学第一临床学院 新疆 乌鲁木齐 830054; 2 新疆医科大学基础医学院形态中心 新疆 乌鲁木齐 830054)

**摘要 目的:**探讨大鼠烫伤愈合过程中 VEGF 对皮肤组织 eNOS 基因表达的影响。**方法:**采用了大鼠深 II 度烫伤模型,分别以 VEGF 和阿西替尼(VEGF 抑制剂)干预,观察大鼠烫伤后愈合过程的组织学变化,PCR 检测创面 eNOS 基因的表达。**结果:**肉眼观察 VEGF 组大鼠创面最早愈合,对照组大鼠愈合速度其次,阿西替尼组创面愈合最晚;HE 染色结果显示伤后第 2、8、21 天 VEGF 组炎性细胞浸润程度、新生毛细血管数量均高于对照组和阿西替尼组,PCR 结果显示烫伤后第 2、8 天 VEGF 组的 eNOS 基因的表达明显上调,且同时间点与对照组比较有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论:**VEGF 可诱导烫伤创面 eNOS 基因的表达,增加血管生成重要因子 NO 的生成,有利于创面愈合。

**关键词:**烫伤;创面愈合;VEGF;eNOS

中图分类号:R-33;R644 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2019)12-2224-04

## Effect of VEGF on the Expression of eNOS Gene in Epidermal Tissue of Rats under Scalded Condition\*

SUN Meng<sup>1</sup>, JIN Li-li<sup>1</sup>, Wulaer·ADELI<sup>1</sup>, WANG Rui-ping<sup>1</sup>, REN Ya-fan<sup>1</sup>, GAO Yu<sup>1</sup>, FENG Shu-mei<sup>2Δ</sup>

(1 First Clinical College of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830054, China;

2 Morphologic Center of Basic Medical School of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830054, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the effect of VEGF on the expression of eNOS gene in skin tissue during scald healed in rats.

**Methods:** A rat model of deep II degree scald was used and rats were treated respectively with VEGF and Axitinib (VEGF inhibitor). During the process of wound healed, skin tissues were taken to have a histological examination, and the expression of eNOS gene were further detected by RT-PCR. **Results:** The histological results showed that the VEGF group had the fastest wound healing rate, the rate of control group was in the middle, and the Axitinib group was the latest. The infiltration degree of inflammatory cells and the number of new capillaries in VEGF group were higher than those in control group and Axitinib group on the 2nd day after injured. PCR detection revealed that the expression of eNOS gene in VEGF group was up-regulated on 8 days after scalded, and there was significant difference between the two groups at the same time ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** VEGF can induce the expression of eNOS gene in scald wound and increases the production of NO(an important angiogenic factor). VEGF is beneficial to wound heals.

**Key words:** Burns; Wound heals; VEGF; eNOS

**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R644 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2019)12-2224-04

### 前言

在中国每年有数千万人发生不同程度的烫伤。烫伤人群中近一半出现残疾。烫伤的病理基础是创面,创面的转归决定了病人的治疗方案。如何促进创面愈合一直是临床研究的焦点与难点。大量研究<sup>[1,2]</sup>证明在创面愈合过程中,有许多生物活性因子参与其中,如转化生长因子 $\beta$ (TGF $\beta$ )、成纤维细胞生长因子(FGF)、血小板源性生长因子(PDGF)、血管内皮生长因子(VEGF)等,其中 VEGF 作用尤为突出,具有诱导内皮细胞增殖、迁移和分化的作用,还可以促进新生血管形成,引起血管通

透性增加。创面产生的血管内皮细胞损伤是烧烫伤后引起循环血量锐减、组织缺血、缺氧的原因,是影响创面愈合的关键因素<sup>[3]</sup>。NO 有刺激血管舒张、帮助血管重塑和促进血管生成的作用。eNOS 是 NO 的限速酶<sup>[4]</sup>,活化的 eNOS 能促使精氨酸转化为瓜氨酸,同时释放出 NO。由此推测 VEGF 与 eNOS 在创面愈合过程中可能相互作用。阿西替尼(Axitinib)<sup>[5-7]</sup>是二代 VEGF 受体(VEGFR)抑制剂,能选择性抑制 VEGFR 的活化,其作用机制是通过内皮一氧化氮合酶、Akt 和细胞外信号调节激酶阻断 VEGF 介导的内皮细胞存活、血管形成和下游信号传导。本实验采用在单纯性烫伤条件下,外源性注射 VEGF、阿西替尼的

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(81660324);新疆医科大学大学生创新实验项目(CX2017099);新疆十三五高原学科项目

作者简介:孙梦(1997-),女,本科,主要研究方向:皮肤创面愈合,电话:13095031708, E-mail: 273562058@qq.com

$\Delta$  通讯作者:冯树梅(1975-),女,博士,副教授,硕士生导师,主要研究方向:干细胞分化及皮肤发育调控,

电话:15899098333, E-mail: 87391167@qq.com

(收稿日期:2019-01-26 接受日期:2019-02-22)

方法探讨 VEGF 对 eNOS 基因表达的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物与试剂仪器

新疆医科大学动物实验中心提供 8-10 周龄健康 Wistar 大鼠(雌雄不限)27 只;VEGF 购自 PeproTech 公司;阿西替尼购自利民生物科技股份有限公司;Trizol、逆转录试剂盒、琼脂糖(电泳级)、TBE buffer、PCR 薄壁管皆购自美国 Thermo 公司;高速离心机、荧光定量 PCR 仪、SYSTEM GelDoc XR+ 凝胶成像系统皆为美国 Bio-Rad 公司产品。

### 1.2 实验内容及方法

1.2.1 动物分组 27 只 wistar 大鼠随机分为三组(n=9),分别是对照组、VEGF 组和阿西替尼组。每组大鼠分别于烫伤后第 2、8、21 d 处死,每次处死 3 只。饲养期间保持动物在室温下生活、自然饮水、进食。

1.2.2 造模 烫伤前一天,硫化钠背部脱毛。烫伤前腹腔麻醉大鼠(戊巴比妥钠 40 mg/kg)。将 50 g 圆柱形铁块浸入盛有 100℃ 水的烧杯中,大鼠移到烧杯旁边。取出铁块,立即置于待烫部位。当铁块接触大鼠皮肤时开始计时 15 s,后将铁块移去。烫伤面积约 10 cm<sup>2</sup>,共分为两个皮瓣<sup>[8]</sup>。

1.2.3 药物干预 在造模后一小时内,VEGF 组在大鼠伤口周围向中央皮下注射 0.2 μg/mL VEGF<sup>[9]</sup>,每日 1 次,连续注射 7 天;阿西替尼组在大鼠伤口周围向中央注射 10 mg/mL 阿西替尼(1 mL/kg)<sup>[10]</sup>每日 1 次,连续注射 7 天;对照组大鼠不做任何处理。

### 1.3 肉眼观察

每天观察大鼠伤口愈合情况,并计算伤口创面愈合率(创面愈合率=(烫伤面积-各时相点面积)/烫伤面积×100%)<sup>[11]</sup>。

### 1.4 HE 染色

于烫伤后第 2 天、第 8 天和第 21 天每组处死三只大鼠,切取正常与烫伤相连部位的全层皮肤组织,福尔马林固定,石蜡切片备用,HE 染色。

### 1.5 RT-PCR 检测<sup>[12]</sup>

1.5.1 取材 取 100 mg 左右组织样品(液氮冷冻)研磨至粉末状,移至离心管中,加入 Trizol 试剂,静置 5 min(室温),按照 Trizol 说明书提取总 RNA。

1.5.2 逆转录反应 按照试剂盒说明进行逆转录反应(A5001,PROMEGA)。

1.5.3 引物设计 eNOS 基因上游、下游引物(上海生工公司设计并合成)分别为 5'-CACAGGCATCACCAGGAAGAA-GAC-3'、5'-CCGAGCAGGAGACACTGT TGA-3',内参 GAPDH 基因上游、下游引物分别为 5'-GTCTTCACTACCATGGA-GAAGG-3'、5'-TCATGGATGACCTTGGCCAG-3'。

1.5.4 PCR 扩增 PCR 反应体系总体积为 28 μL,分别是 2×SYBR Green PCR Master Mix (4367659,Thermo) 10 μL、Primer Forward 0.5 μL、Primer Reverse 0.5 μL、Rnase free water 7 μL、cDNA 10 μL。温度条件:94℃ 4min、94℃ 30s、64℃ 30s、72℃ 3 min、72℃ 10 min,35 个循环。

1.5.5 琼脂糖凝胶电泳 2%的琼脂糖凝胶液,110V 电压下电泳 40 min,紫外凝胶成像系统分析电泳产物,以在细胞中表达

稳定的 GAPDH 基因为内参,用目的基因的光密度与 GAPDH 光密度的比值为半定量分析数值。

### 1.6 统计学分析

数据均基于( $\bar{x} \pm s$ )。使用 SPSS 22.0 软件进行单向方差分析,以比较各组之间的差异是否具有统计学意义。 $P < 0.05$  表明差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 成功建立大鼠烫伤模型

大鼠烫伤后烫伤轮廓清楚可见,有白色边界线,创面苍白、表面湿润、略高于周围正常组织,HE 染色显示表皮与真皮层均被破坏,细胞变性坏死,毛囊破坏,组织观察符合深 II 度烫伤<sup>[13]</sup>结果见图 1。

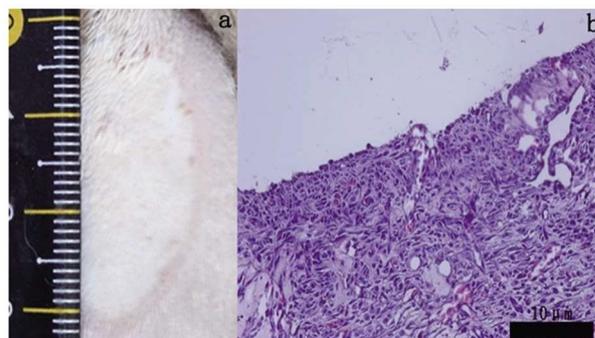


图 1 造模大鼠皮肤烫伤肉眼观察与 HE 染色结果  
(a:肉眼观察结果 b:HE 染色结果)

Fig.1 The naked eye observation and HE stained of skin scald in model rats  
(a: naked eye observation, b: HE stained)

### 2.2 伤口愈合过程中的组织病理学变化:

(1)伤后第 2 天:三组创面表皮与真皮层均被破坏、细胞变性坏死,毛囊破坏;对照组炎性细胞部分浸润,表面干燥,伤口开始愈合;VEGF 组有大量炎性细胞浸润,无毛细血管形成,表面仍有体液渗出且愈合不明显;阿西替尼组创面炎细胞浸润程度最小,创面开始愈合;(2)伤后第 8 天:对照组出现新生毛细血管,炎性细胞浸润减少,偶有肉芽组织;VEGF 组表面开始结痂,炎性细胞浸润减少,出现大量新生毛细血管,阿西替尼组创面有炎细胞浸润程度加深;毛细血管新生血管形成不明显;(3)损伤后第 21 天:对照组伤口部分愈合,少量区域未完全上皮化;VEGF 组创面基本愈合,表皮层细胞层数较厚,表明创面刚愈合;阿西替尼组中的伤口尚未完全上皮化,并且新的毛细血管形成,炎细胞浸润。结果见图 2。

### 2.3 eNOS 基因在烫伤后不同时间的表达

从表 1、表 2 可以看出,在烫伤后第 2 天,VEGF 组 eNOS 基因表达明显高于阿西替尼组与对照组,与对照组相比具有统计学意义( $P < 0.05$ )。在烫伤后的第 8 天,VEGF 组 eNOS 基因表达快增加率具有统计学意义( $P < 0.05$ )。阿西替尼组 eNOS 基因表达明显低于 VEGF 组( $P < 0.05$ )。烫伤后第 21 天,VEGF 组基因表达下降至最低,与对照组对比无统计学意义( $P > 0.05$ );阿西替尼组 eNOS 基因表达回升,且高于 VEGF 组,与对照组相比,有统计学意义( $P < 0.05$ )。结果如表 1,表 2 所示。

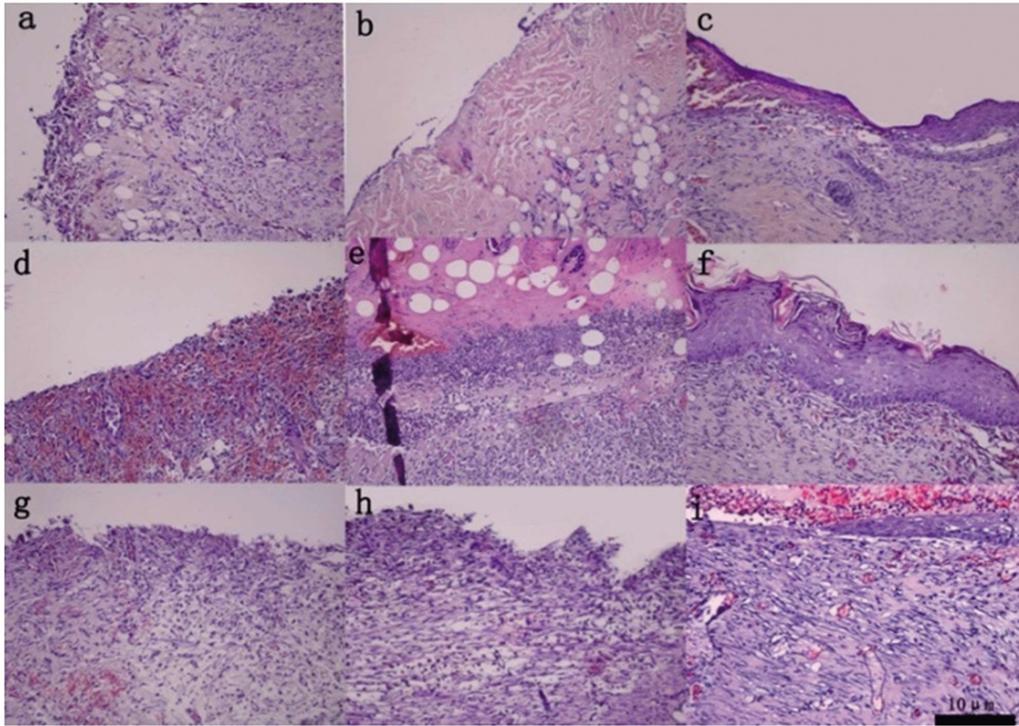


图2 烫伤后第2、8、21 d三组的 HE 染色结果

注:(a~c:对照组烫伤后第2d、8d、21d HE 染色表现,图 d~f: VEGF 组烫伤后第2 d、8 d、21 d HE 染色表现,图 g~i:阿西替尼组烫伤后第2 d、8 d、21 d HE 染色表现)

Fig.2 HE stained Results in 3 groups after scalded

Note: (a~c: HE results of control group at 2 d, 8 d and 21 d, d~f: HE results of VEGF group at 2 d, 8 d and 21 d; g~i: HE results of Axitinib group at 2 d, 8 d and 21 d)

表 1 三组大鼠不同时相点 eNOS 基因表达的比较( $\bar{x} \pm s, n=2$ )

Table 1 Comparison of eNOS gene expression at different time points in three groups of rats

Groups	After burns(Number of days)		
	2	8	21
Control group	1.00± 0.35	1.01± 0.21	1.02± 0.30
VEGF group	20.68± 0.61*	1439.81± 666.16*	0.21± 0.15
Axitinib group	9.15± 8.47	0.27± 0.06 <sup>#</sup>	2.66± 1.03 <sup>#</sup>

Note: Comparison of simultaneous time points: \* Compared with control group,  $P < 0.05$ ; <sup>#</sup> Compared with VEGF group:  $P < 0.05$ .

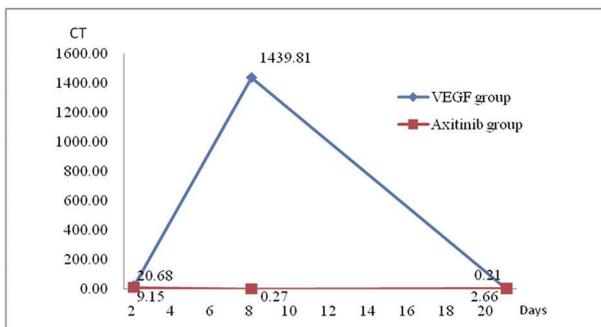


图3 VEGF 组与阿西替尼组大鼠不同时相点 eNOS 基因表达的变化趋势

Fig.3 Changing trend of eNOS gene expression at different time points in VEGF group and Axitinib group

### 3 讨论

烫伤修复一直是临床研究的重点与难点。在烫伤愈合过程中,血管内皮生长因子(VEGF)起到重要的作用。VEGF 是一种

有效的血管生成促进因子,有利于加快受损组织的血管化进程,调节烫伤后期毛细血管的生长和分化。研究显示<sup>[14]</sup>eNOS 是一种同型二聚体酶,eNOS 是其中的一种,通过颗粒性和可溶性两种形式存在,主要存在于血管的内皮细胞,其二聚体结构有生物活性,与 L-精氨酸结合生成 NO。NO 具有舒张血管、抑制血细胞粘附于内皮、抗凝等作用,在皮肤愈合过程中刺激血管舒张,血管重塑和血管生成的过程中起到重要的作用。故本实验欲探究在烫伤愈合过程中 VEGF 对皮肤组织 eNOS 基因表达的影响。

实验结果显示在愈合早期 VEGF 使炎症细胞浸润,不利于创面愈合,VEGF 组大鼠创面的愈合速度慢于对照组和阿西替尼组。这是因为 VEGF 可以通过增加血管通透性来促进炎症形成,且过度的炎症反应会导致创面进一步损害进而影响创面的愈合<sup>[15,16]</sup>,而阿西替尼可使巨噬细胞数量减少<sup>[17]</sup>。在愈合中后期 VEGF 促进创面愈合,可刺激 eNOS 表达,VEGF 组的 eNOS 基因于烫伤后第 8 天达到高峰。VEGF 有促进血管生成,可以改

善组织缺氧状况<sup>[18]</sup>,创面愈合速度迅速上升。并且 VEGF 具有介导钙离子内流的作用,而 eNOS 表达受细胞内  $Ca^{2+}$  浓度的生理性调节,任何引起  $Ca^{2+}$  流入细胞的因素均能导致 NOS 活性增加<sup>[4,19]</sup>。有研究发现<sup>[20]</sup>在仅做皮肤创伤、未经任何治疗的模型中,VEGF 在受伤后第 1 天开始上升,于受伤后第 7 天达到高峰,然后逐渐下降至接近正常水平。这与本实验 VEGF 组的 eNOS 基因检测结果相符合,所以 VEGF 对 eNOS 表达有促进作用。通过实验可以发现 VEGF 组与阿西替尼组 eNOS 基因表达在伤后第 2 天差距不明显,伤后第 8 天差距最大,原因可能如下 1) 早期内源性 VEGF 表达较低<sup>[20]</sup>; 2) 本实验采用皮下注射的方式给药,这种给药方式会导致药物的吸收速率缓慢<sup>[21]</sup>,使外源性 VEGF 早期不能被大鼠所利用; 3) 阿西替尼是 VEGFR 抑制剂,可以通过阻断 VEGF 下游信号传导来抑制 eNOS 的表达。所以当 VEGF 表达活跃的时候(即烫伤后第 8 天),Axitinib 具有较强的抑制作用,使 eNOS 基因的表达受阻。烫伤后第 21 天 VEGF 组的大鼠创面基本愈合,组织中 VEGF 和 eNOS 恢复正常,故 eNOS 基因表达减少且与对照组无统计学差异;阿西替尼组创面尚未修复,需要 VEGF 和 eNOS 分泌促进创面愈合,所以 eNOS 基因表达上升,且高于同一时间点的 VEGF 组。本实验证明了 VEGF 可以刺激 eNOS 基因的表达,有利于血管生成,在创面愈合中后期起促进作用。外源性 VEGF 注射可加速创面愈合进程。VEGF 和 eNOS 的表达水平与调节愈合创口的血流量、创面愈合程度有着密切关系,二者随皮肤创伤后时间的不同呈现出规律性变化<sup>[3,22]</sup>。表明在临床上提供 VEGF 活性因子,对促进烫伤创面愈合具有一定的价值,同时可以通过检测 VEGF 和 eNOS 水平来判断烫伤创面的愈合程度。本实验发现给药方式的不同可以直接影响药物的吸收,在临床工作中可以根据愈合过程的具体情况采用不同的给药方式已达到药物的最大吸收率,使烫伤创面尽快愈合。但对于注射外源性 VEGF 促进烫伤创面愈合的具体机制仍需探究。

#### 参考文献(References)

- [1] 薛盛中,刘保健,董万涛,等.皮肤创伤愈合的分子机制研究进展[J].中医临床研究,2014,(23): 139-140, 142
- [2] 刘晓彤,沈若武,卞明心,等.大鼠创伤皮肤组织 VEGF、PDGF 和 bFGF 表达及意义[J].青岛大学医学院学报,2016,52(2): 209-211+214
- [3] 潘云松.血清 VEGF 水平对创伤组织修复的影响[J].山东医学高等专科学校学报,2014,36(4): 273-275
- [4] 刘霞.大鼠皮肤切创愈合过程中 iNOS 和 eNOS 表达的时序性变化[D].河北医科大学,2005
- [5] 王尔兵.治疗转移性肾细胞癌的新型靶向药物--阿西替尼[J].中国新药与临床杂志,2013,32(9): 684-687
- [6] 王翠翠,呼彩莲,马伯林.VEGF 及其抑制剂 Axitinib 在非小细胞肺癌临床治疗中的应用[J].现代肿瘤医学,2014,22(3): 704-706
- [7] Hu-Lowe DD, Zou HY, Grazzini ML, et al. Nonclinical antiangiogenesis and antitumor activities of axitinib (AG-013736), an oral, potent, and selective inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases 1,2,3[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(22): 7272-7283
- [8] 马拴全,王巨.创愈液对 SD 模型大鼠创面 bFGF 含量影响随机平行对照研究[J].实用中医内科杂志,2017,(6): 43-46
- [9] 于子莹,张茹慧,刘春丽,等.局部注射 VEGF 挽救大鼠背部随意型超比例皮瓣成活的最佳注射层次的实验性研究 [J]. 口腔医学研究,2002,18(6): 372-374
- [10] Canu B, Fioravanti A, Oriandi P, et al. Irinotecan synergistically enhances the antiproliferative and proapoptotic effects of axitinib in vitro and improves its anticancer activity in vivo[J]. Neoplasia, 2011, 13(3): 217-229
- [11] 杨帆,秦一鸣,吴迪,等.地榆大黄散对大鼠浅 II 度烫伤模型的影响及机制研究[J].中国中医急症,2018,27(3): 469-471
- [12] 郑东升,郑小伟,国佳.健脾疏肝活血方对 H22 肝癌小鼠瘤组织 VEGF-C 基因表达的影响[J].浙江中医药大学学报,2011,35(01): 66-68+78
- [13] 曹阳,王坤,戴太强,等.应用便携式数字化温控烫伤仪建立标准化大鼠皮肤烫伤模型[J].现代生物医学进展,2018,18(12): 2261-2267
- [14] 王妍琦,王其新.内皮型一氧化氮合酶脱偶联分子机制[J].微循环学杂志,2018,28(02): 66-69
- [15] 高金芳,陈晋,施丹,等.血清 VEGF 水平与类风湿性关节炎患者炎症指标的相关性[J].现代生物医学进展,2016,16(29): 5648-5650
- [16] 李善友.伤后 24 h 内削痂对大面积深 II 度烧伤创面 IL-1 释放的影响与创面愈合的临床观察[D].广西医科大学,2010
- [17] Van der Veken B, De Meyer GRY, Martinet W. Axitinib attenuates intraplaque angiogenesis, haemorrhages and plaque destabilization in mice[J]. Vascul Pharmacol, 2018, 100: 34-40
- [18] 缪玉兰,汪虹.血管内皮生长因子的作用及其在烧伤创面修复中的意义[J].中华烧伤杂志,2006,22(6): 478-480
- [19] Seymour LW, Shoaibi MA, Martin A, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates protein kinase C-dependent phospholipase D activity in endothelial cells [J]. Lab Invest, 1996, 75: 427-437
- [20] 潘秀花,杨占山,杨晶,等.VEGF 和 Ang-1 在皮肤创伤和放射性烧伤愈合过程中的表达 [J]. 中华放射医学与防护杂志,2007,27(3): 219-222
- [21] 李梅,郝炳金.浅谈给药方式对药物吸收的影响[J].中国医药指南,2015,(4): 3-3,4
- [22] 赵锐,官大威,路斌,等.小鼠皮肤切创愈合过程中 iNOS 和 eNOS 表达的免疫组织化学研究[J].法医学杂志,2005,(03): 161-164+241