

[文章编号] 1003-4684(2022)01-0059-06

光学成像技术活体评价 PAEs 促皮损愈合的药效

陈 思¹, 李俐霜², 王 毅², 孙娅楠², 糜志远¹

(1 湖北工业大学生物工程与食品学院, 湖北 武汉 430068; 2 中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700)

[摘 要] 利用双光子激发荧光成像技术、二次谐波成像技术与毛细血管镜系统, 活体评估鹿茸蛋白粗提物给药后创面愈合情况。提取鹿茸中水溶性总蛋白, 质谱鉴定其成分。全层切除皮肤制备皮肤创伤模型大鼠, 于给药 10 d 后活体观测创面表皮厚度、真皮胶原纤维的含量情况及毛细血管的生长情况。结果发现: 蛋白含量为 61.29%, 质谱鉴定出 135 种蛋白, 18 种氨基酸。给药 10 d 后, 中高剂量组创面收缩明显, 表皮厚度增加, 新生胶原纤维增多; 各给药组较模型组毛细血管网数有增加趋势; 高剂量组较模型组血流量显著下降, 血流趋于稳定。以上三种方法综合评估全层切除大鼠皮肤愈合过程中的药效学作用, 提示中高剂量组具有显著促进血管生长及胶原纤维生长的作用, 可以提高愈合质量。

[关键词] 二次谐波成像; 双光子显微镜; 毛细血管; 胶原纤维

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A

皮肤是脊椎动物全身最大的器官, 是保护各种组织和器官免受物理、机械、化学和病原微生物侵害的第一道防线^[1-2]。皮肤创伤愈合是一个动态的过程, 涉及一系列复杂的生物过程^[3], 包括防止炎症的产生、细胞的增殖与分化、血管系统的重塑与恢复和结缔组织的形成, 对伤口愈合都具有重要意义^[4-5]。皮肤由表皮层、真皮层、皮下组织构成, 真皮层位于表皮层下方, 是构成皮肤的主体。真皮层是致密的结缔组织, 有许多弹力纤维和胶原纤维, 故具有弹性和韧性; 有丰富的血管和神经, 故能感受外界刺激^[6]。因此, 创面愈合过程中胶原纤维的变化与血管及其他附属器官的重建直接影响了创面愈合后的皮肤屏障功能, 所以活体评估创面部位的病理变化, 可为临床用药和治疗提供指导。

鹿茸是迄今为止所发现的唯一一个具有完全再生能力的哺乳动物附属器官^[7], 可在 90~120 d 内完成血管、神经、表皮等组织的分化、发育到成熟的全过程^[8]。鹿茸中存在表皮生长因子^[9], 可以推测其含有一些有效活性成分, 具有很强的促进皮肤创伤愈合的能力。

本实验通过利用双光子激发荧光(Two-Photon Excitation Fluorescence, TPEF)成像、二次谐波(Second Harmonic Generation, SHG)成像与毛细

血管镜系统活体评估鹿茸蛋白粗提物(Pilose Antler Extract, PAEs)给药后创面组织表皮厚度、真皮层胶原纤维的含量情况及毛细血管的构建情况, 建立一种基于光学成像技术活体评价皮肤愈合过程的实验方法, 为研究药物促愈合过程提供新的研究思路与研究方法; 并以 PAEs 为代表药物应用该方法评价其促进创伤愈合的药效作用。

1 材料

1.1 试验动物

SD 大鼠, 15 只, 雄性, 体重(150±10)g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 动物许可证号为 SCXK(京)2016-0006。将其饲养于 12 h 光照/12 h 黑暗的环境中, 自由摄食和饮水。

1.2 仪器与试剂

鹿茸来源为吉林云鹿集团, 为鹿茸上段。

氨基酸标品(Aglient); HPLC-MS/MS 系统(Sciex); BCA 蛋白含量测定试剂盒(Thermo, 23227); 蛋白 marker(Thermo, 26619); 重组人表皮生长因子(易孚, 国药准字 S20020112); SDS-PAGE 电泳预制胶试剂盒(索莱宝, P1200); 凝胶成像仪(BIO-RAD, 733BR2310); 电泳仪(BIO-RAD, MP Tetra); 酶标仪(Bio-Rad, PR4100); 双光子扫描显

[收稿日期] 2021-01-24

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(81603285); 北京自然科学基金面上项目(7192141); 中国中医科学院医学实验中心基本科研业务费(ZZ2018018); 中国中医科学院优秀青年科技人才(ZZ13-YQ-077); 中国中医科学院基本科研业务费 GH201812; 科技部重点专项 2019YFC1709305

[第一作者] 陈 思(1997-), 女, 湖北宜昌人, 湖北工业大学硕士研究生, 研究方向为生物工程

[通信作者] 孙娅楠(1984-), 女, 北京人, 中国中医科学院副研究员, 研究方向为中药有效成分药理研究及光学检测

显微镜 (Olympus, FV1000MPE); CapiScope 毛细血管镜系统 (KK Technology, CAM1CVF)。

2 方法

2.1 鹿茸水溶性蛋白粗提取

2.1.1 鹿茸水溶性蛋白粗提取 按照本实验室前期提取工作进行提取^[9], 得到 PAEs。

2.1.2 PAEs 蛋白成分分析 按照 Thermo 公司 BCA 蛋白含量测定试剂盒的要求测定蛋白含量。

PAEs 采用 10% 的分离胶, 5% 浓缩胶进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。利用 SDS-PAGE 进行分离, 电泳结束后, 经考马斯亮蓝染色后, 白光下观察蛋白条带, 与蛋白质质量标准条带的相对位置确定蛋白分子量分布范围。

PAEs 交由华大基因有限公司进行蛋白质鉴定。

2.1.3 PAEs 游离氨基酸成分分析

1) 色谱条件 PFP 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm, Waters); 流动相为 A (水, 含 0.1% 甲酸): B (甲醇), 梯度洗脱程序: 0~6.0 min, 5%~95% B; 6.0~8.0 min, 95% B~95% B; 8.0~8.01 min, 95% B~5% B; 8.01~10.0 min, 5% B~5% B。流速为 0.2 mL·min⁻¹; 柱温为 35℃; 样品室温度为 6℃; 进样量为 1 μL。

2) 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI), 气帘气 (N₂) 为 276 kPa, 碰撞气 (N₂) 为 9×6.895 kPa, 喷雾电压为 +5500.00 V, 雾化温度为 550.00℃, 雾化气 (Ion Source Gas1, N₂) 和辅助气 (Ion Source Gas2, N₂) 均为 55.00×6.895 kPa。采用多反应监测 (MRM) 模式正离子扫描。

2.2 动物实验

2.2.1 模型建立 异氟烷气麻大鼠, 用脱毛膏脱去背部区域毛发, 温水擦干。手术区域局部消毒后, 于大鼠背部脊柱两侧旁开 1 cm 处减去一块直径 1.4 cm, 创面面积 1.54 cm² 的圆形。全层切除皮肤, 开放创面, 深达肌层, 充分止血, 单笼饲养。做好标记。

2.2.2 分组给药 15 只大鼠随机分为阳性药 (rh-EGF) 组, 鹿茸蛋白 (PAEs-H/M/L) 高、中、低剂量组, 模型组 (Konjac gum) 等 5 组, 每组 3 只。每只实验动物左侧创口外敷生理盐水; 依据前期实验结果 PAEs 水溶后混合魔芋胶制成水凝胶外敷; 低剂量组 (2 mg/mL) PAEs, 中剂量组 (4 mg/mL) PAEs, 高剂量组 (8 mg/mL) 外敷 100 μL; 阳性药组用生理盐水配成浓度为 7IU/μL 的溶液外敷 100 μL。待吸收后, 将大鼠置于清洁笼内单笼饲养, 自由食水, 每天用药。

2.2.3 创面愈合情况测定 造模首次敷药 10 d 后用游标卡尺分别测量未愈合创面的纵径和横径, 计算创面愈合率。创面愈合率 = (原始创面面积 - 残余创面面积) / 原始创面面积 × 100%。

2.2.4 创面 TPEF 成像扫描 将用异氟烷气麻后的大鼠固定于双光子显微镜载物台上, 采用数值孔径为 1.05 的 25 倍水浸显微物镜对表皮组织进行 Z 轴扫描。采用激光波长 750 nm, 步进 2 μm, 图像采集像素 512×512 pixel, 采集速度 4 μm/pixel。

2.2.5 创面皮肤病理染色 给药 10 d 后进行大鼠皮肤活组织取材。取创面及皮肤周围的全层及皮下组织, 将皮肤组织置于 4% 多聚甲醛中固定 48 h, 常规组织修块、脱水、透明、石蜡包埋后, 制成 4 μm 组织切片后行常规 HE 染色, 光镜观察创面组织结构改变。

2.2.6 创面 SHG 信号采集 将用异氟烷气麻后的大鼠固定于双光子显微镜载物台上, 采用数值孔径为 1.05 的 25 倍水浸显微物镜收集创面皮肤 SHG 信号, 分色镜 690 nm, 激光波长 950 nm, 滤光片 475 nm/10nm (中心波长/带宽), 对创面皮肤进行纵向扫描, 步进 2 μm, 图像采集像素 512×512 pixel, 采集速度 4 μm/pixel。

2.2.7 创面毛细血管数据采集 将麻醉后的大鼠固定于毛细血管镜系统下, 记录创面部位新生的毛细血管及毛囊的生长情况。

2.2.8 数据处理 所有试验数据为至少 3 个平行试验的平均值, 通过 Image J 1.8.0 软件对成像图片进行定量分析; 通过 GraphPad Prism 8 软件对试验数据进行统计学处理, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 PAEs 总蛋白含量测定及蛋白成分测定

使用 BCA 法蛋白含量测定试剂盒测得的 OD 值均在标准曲线 $y =$

$0.9431x + 0.198$ 上 ($R^2 = 0.9965$), 计算出蛋白含量为 61.29%。由 SDS-PAGE 蛋白电泳图 (图 1) 可以得出鹿茸

蛋白广泛分布于 55~250 kD 之间, 且多为大分子蛋白。通过 PAEs 蛋白质鉴定分析共鉴定出 135 种蛋白。其中, Kelch-like protein 20 促进肌动蛋白聚合和高尔基体后转运, 在血管生成过程中作为内皮细胞迁移的调节剂。

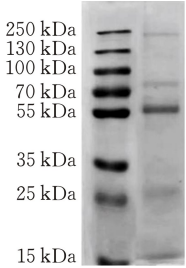


图 1 鹿茸蛋白电泳图

表 1 PAEs 中主要蛋白质

蛋白	覆盖率/%	功能
Non-specific serine/threonine protein kinase	54.55	分子功能:ATP 结合、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性 生物过程:凋亡过程、信号转导
Kelch-like protein 20	29.89	促进肌动蛋白聚合和高尔基体后转运,在血管生成过程中作为内皮细胞迁移的调节剂
DNA-directed RNA polymerase	25.62	分子功能:DNA 结合、DNA 导向的 5'-3' RNA 聚合酶活性、核糖核苷结合 生物过程:转录、DNA 模板化

3.2 PAE 成分分析

由图 2 可知,确定了 PAEs 中的 18 种游离氨基酸。其中 Glycine、Leucine、Alanine 含量最高,为生物体内组成蛋白质的主要氨基酸。另外,还检测出了 Proline、Hydroxyproline 等组成动物胶原蛋白的重要成分。由表 2 可知,18 种游离氨基酸大多在生物体内的蛋白质代谢过程中处于重要地位,参与许多重要化学反应,主要功能为促进身体正常生长,修复组织、肌肉,并给身体组织提供能量。

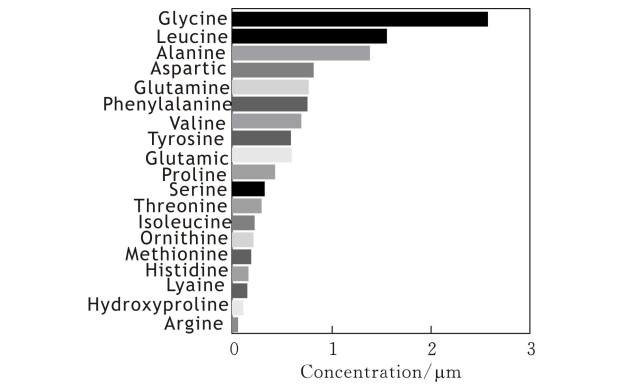


图 2 PAEs 中游离氨基酸含量

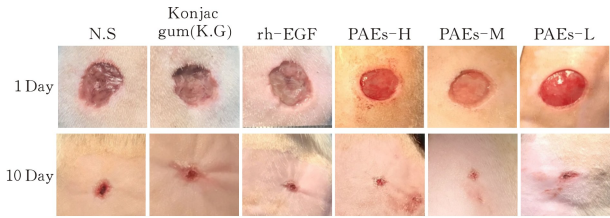
表 2 主要氨基酸功能

氨基酸	功能
Glycine	在神经信号的传递以及参与各种生理和病理反应中起着的重要基础作用
Leucine	与异亮氨酸和缬氨酸一起合作修复肌肉,控制血糖,并给身体组织提供能量
Alanine	组成人体蛋白质的 20 种氨基酸之一

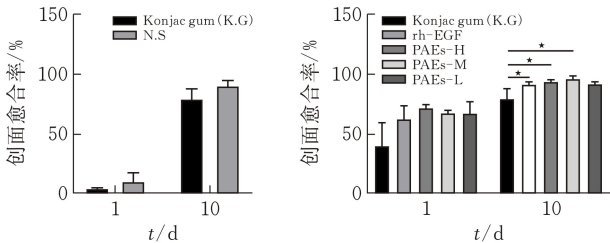
3.3 创面愈合情况测定

给药 10 d 后,对大鼠创伤部位进行拍照,观察创面愈合情况(图 3a)。实验结果表明,在未给予 PAEs 时创面缓慢愈合,模型组左(N.S)、右(Konjac gum)无显著性差异,表明药物所用基质魔芋胶及生理盐水不具有促进伤口愈合的作用,造模成功(图 3b);由图 3c 可见,造模后 1 d 各给药组均具有促进伤口愈合的作用,但创面愈合率无显著性差异;给药 10 d,PAEs 中高剂量组及 rh-EGF 组创面愈合率显

著高于空白对照组($p<0.05$)。



(a)不同时间创面愈合情况

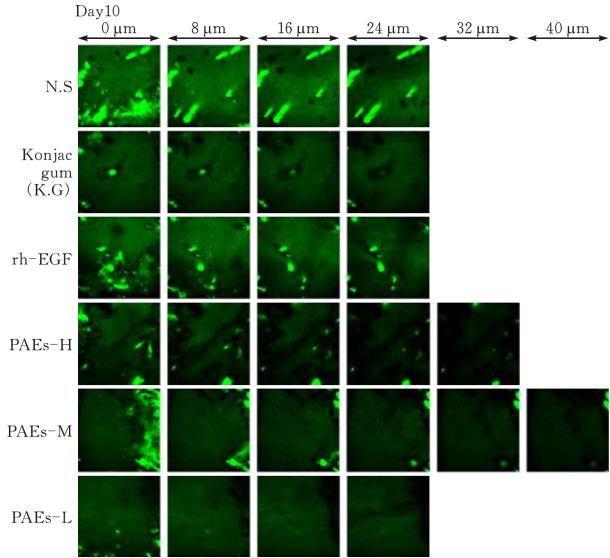


(b)模型组与生理盐水组不同时间创面愈合率比较 (c)不同时间创面愈合率比较

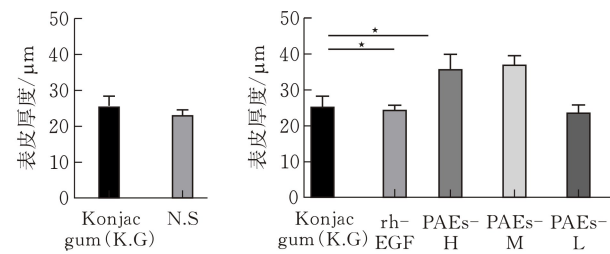
图 3 PAEs 促创面愈合情况

3.4 创面 TEPF 成像

通过 TPEF 成像技术对大鼠新生皮肤边缘表皮厚度进行检测。结果表明,在 10 d,与模型组比较,PAEs-H/M 组大鼠表皮厚度明显增加($p<0.05$)(图 4c)。



(a)大鼠创面皮肤 TEPE 成像



(b)模型组大鼠左右两侧表皮层厚度比较 (c)各组大鼠表皮层厚度比较

图 4 创面愈合过程中表皮层 TPEF 成像

3.5 创面皮肤病理染色

给药 10 d,除模型组外,各组创口边缘出现大量

处于生长期的毛囊,外侧可见少量毛发,创面面积有不同程度的缩小。模型组创口面积较大,区域内完全缺乏附件生长。其余各组创面收缩明显,表皮层厚度增加,PAE-H/M组厚度较模型组显著增加($p<0.05$)。

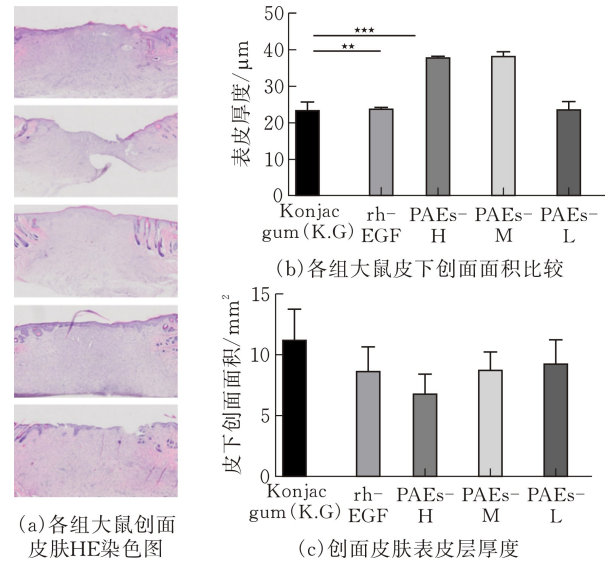


图5 创面皮肤切片 HE 染色结果

3.6 创面 SHG 信号采集

为了研究创伤周围胶原纤维的排列及含量变化,通过 SHG 成像技术检测真皮层胶原纤维,并通过 Image J 软件分析胶原纤维^[11]含量变化情况图 6a 显示,网状层、乳头层均向创口方向延伸填充修复创口,胶原纤维呈随机排列的网状结构。如图 6b 显示,模型组左、右胶原纤维的排列及含量无统计学差异。给药 10 d 后各组胶原纤维变粗增多,SHG 信号增强。与模型组相比,PAEs-H、M 组胶原纤维显著增多($p<0.05$),SHG 信号更强,表明 PAEs 组新生胶原含量较高。

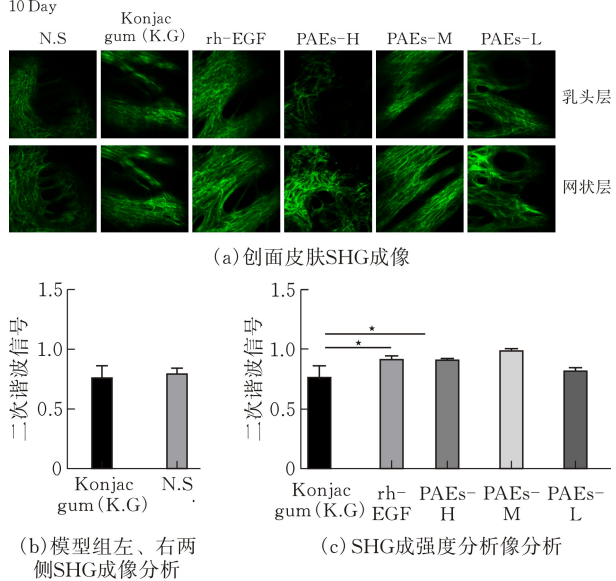


图6 创面愈合过程中真皮层胶原纤维 SHG 成像

3.7 创面毛细血管数据采集

将麻醉后的大鼠固定于毛细血管镜系统下,记录创面部位的毛细血管的生长情况。10 d,创口边缘出现较多新生血管,交织成网状(图 7a)。其中:模型组毛细血管未交织成网,新生游离毛细血管较多;给药组毛细血管交织成网,毛细血管网数目增多,游离毛细血管较少。如图 7b 所示,给药 10 d 后,各给药组较正常皮肤毛细血管网数目显著降低($p<0.01$),与模型组相比略有增加但无统计学差异。rh-EGF、PAEs-H/M/L 组较正常皮肤游离毛细血管数目显著降低($p<0.01$),与模型组相比 PAEs-L 组游离毛细血管数目显著降低($p<0.05$)。PAEs-H 组较模型组血流量显著下降($p<0.05$),提示毛细血管构建良好,血流趋于稳定(图 7d)。

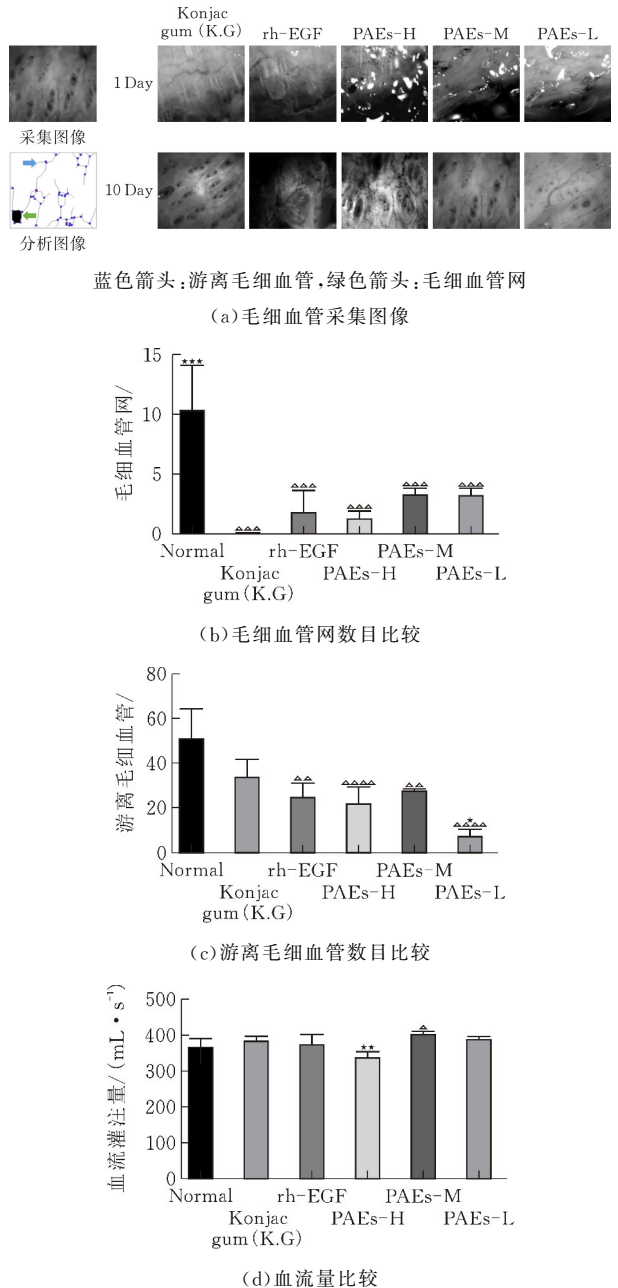


图7 创面愈合过程中表皮层 TPEF 成像

4 讨论与结论

对鹿茸蛋白进行成分分析,其蛋白含量为 61.29%,主要为大分子蛋白,存在多种具有促进身体组织修复、生长相关的蛋白质和氨基酸。这很好地解释了其具有促创伤愈合的作用,与“鹿茸具有加速创伤愈合的能力”的记载相一致。

既往研究创伤愈合过程的方法主要为切片染色。由于对切片的主观选择性导致只能对局部创面进行检测分析而无法评估整个创面在愈合过程中的三维结构变化^[12]。而 TPEF 可以直接获得生物组织样本不同深度的图像和光谱信息^[13]。TPEF 成像技术具有灵敏度高、分辨率强和无创的特点,可以活体追踪表皮层活细胞组织中内源性荧光基团的动态过程,反映表皮厚度的变化^[14],这弥补了 HE 染色不能检测活体组织的缺点。结果显示,与模型组相比,给药 10 d 后 PAEs-M/H 组表皮厚度明显增加,推测此时期表皮层中的皮肤附属物较成熟,皮肤分层和皮肤附属物重建是皮肤成熟的关键步骤^[15-17]。在 PAE-H/M 表皮层厚度的显著增加和腺体、细胞器的生成方面,传统 HE 染色的验证与光学成像结果基本吻合。

SHG 成像技术以生物组织非中心对称性的内源性信号为来源而进行激光扫描非线性光学显微术,无需进行离体组织染色,可以活体成像,对组织探测深、损伤小、分辨率高^[18]。胶原纤维具有强烈的二阶非线性极化率和结构非中心对称性,可以产生 SHG。SHG 成像技术可以活体观察胶原纤维的病理变化。结果显示,给药 10 d 后 PAEs-H/M 组 SHG 信号强度增加。

毛细血管镜系统是一种非侵入性、无创性检测手段,能够直接获得皮肤表面毛细血管的高分辨率成像图,同时进行实时量化分析,通过分析可得皮肤表面的毛细血管的生长情况。在受损皮肤区域能否快速建立血液循环,也是对正常皮肤功能的一种评价^[19]。给药 10 d 后,各给药组较正常皮肤毛细血管网数目显著降低,与模型组相比略有增加但无统计学差异,PAEs-H 组较模型组血流量显著下降,提示毛细血管构建良好,血流趋于稳定。毛细血管镜系统观察新生毛细血管具有一定的局限性,既往研究表明部分新生毛细血管垂直于创面生长^[20],而毛细血管镜系统只拍取平行于皮肤表面的一些新生毛细血管。

综上所述,本研究通过 TEPF、SHG 和毛细血管镜系统联合使用检测皮肤创伤大鼠皮下表皮层厚度变化、真皮层胶原纤维的排列与含量变化和新生

毛细血管的生长情况,评估 PAEs 促创伤愈合后表皮层、真皮层及血管的功能恢复和重建。结果表明,PAEs 中高剂量具有良好的促创伤愈合作用,能够加速创伤愈合,改善愈合质量,促进胶原纤维的形成和毛细血管的重建,为鹿茸蛋白促创伤愈合提供了新的证据。而 TEPF 成像、SHG 成像和毛细血管镜系统将成为一种新型对无创活体皮下组织和附属器官直接进行成像,为创伤相关疾病的诊断和药物治疗提供新的检测方法,为促创伤愈合的研究提供新思路。

[参 考 文 献]

[1] 史佩娜,高梦娜,陶键敏,等.皮肤创伤修复机制及治疗方法研究进展[J].浙江医学,2014,36(15):1349-1353.

[2] 杨倩.MEBO 联合 rhEGF 在烧伤创面治疗中的临床疗效观察[D].延安:延安大学,2019.

[3] 魏巍,高建青,于莲.新型局部给药系统促进创伤愈合的研究进展[J].中国现代应用药学,2014,31(11):1417-1423.

[4] MAXSON S,LOPEZ E A,YOO D,et al.Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair[J].Stem Cells Transl Med,2012,1(2):142-149.

[5] DIEGELMANN R F,EVANS M C.Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing[J].Frontiers in bioscience: a journal and virtual library,2003,9(71):283-289.

[6] 周磊,王世斌,李林安,等.皮肤力学研究进展[J].实验力学,2020,35(6):955-969.

[7] SUNWOO H H,NAKANO T,HUDSON R J,et al.Isolation,characterization and localization of glycosaminoglycans in growing antlers of wapiti (Cervus elaphus)[J].Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol,1998,120(2):273-283.

[8] 李超华.鹿茸蛋白提取方法的建立和神经保护作用研究[D].长春:吉林农业大学,2016.

[9] GILBEV A,PEREZGONZALEZ J D.Health benefits of deer and elk velvet antler supplements: a systematic review of randomised controlled studies[J].The New Zealand medical journal,2012,125(1367):80-86.

[10] 李超华,王毅,何忠梅,等.鹿茸蛋白 2 种不同提取方法的比较研究[J].中国生化药物杂志,2015,35(9):23-25.

[11] 张倩.盐灰溶液中裸皮膨胀和皮胶原结构变化的规律研究[D].郑州:郑州大学,2019.

[12] 胡杰,王玲,徐铭恩,等.基于光学相干层析的生物 3D 打印人工皮肤量化分析[J].中国生物医学工程学报,2020,39(2):197-205.

[13] 贺改英,唐靖惠,孙娅楠,等.双光子成像技术在痤疮丙

酸杆菌引起痤疮表皮炎症中的应用[J].日用化学工业,2020,50(10):704-710.

[14] QU Y,CAO C,WU Q,et al.The dual delivery of KGF and bFGF by collagen membrane to promote skin wound healing[J].Tissue Eng Regen Med,2018,12(6):1508-1518.

[15] THEER P,HASAN M,DENK W.Two-photon imaging to a depth of 1000 microm in living brains by use of a Ti:Al2O3 regenerative amplifier[J].Opt Lett,2003,28(12):1022-1024.

[16] 王元元,杨桂红,杨涛,等.人表皮干细胞体外诱导分化为汗样上皮细胞的研究[J].重庆医学,2017,46(10):1297-1299.

[17] 丁毓威,辛国华,曾元临.干细胞诱导分化为毛囊及再生的研究进展[J].中国组织工程研究,2016,20(50):7579-7585.

[18] CHEN Y,LIU Z,CAI R,et al.Research progress on the analysis technology of intracellular NAD(P)H levels[J].Chemical Progress,2004(6):962-968.

[19] 宁金斌,李跃军,李学拥,等.组织工程皮肤的体外构建及用于大鼠皮肤损伤修复的效果分析[J].中国医药,2019,14(11):1727-1731.

[20] 杜丽,张庆林,莘旭妮,等.携带人肝细胞生长因子的重组裸质粒对放射复合皮肤创伤促愈作用的实验研究[J].创伤外科杂志,2010,12(4):314-318.

In Vivo Evaluation of the Efficacy of PAEs in Promoting Skin Wound Healing by Optical Imaging Technique

CHEN Si¹, LI Lishuang², WANG Yi², SUN Yanan², MI Zhiyuan¹

(1 School of Biological Engineering and Food Science, Hubei Univ. of Tech., Wuhan 430068, China ;
2 Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100700, China)

Abstract: This study is to use two-photon excitation fluorescence imaging technology, second harmonic imaging technology and capillary angioscope system to evaluate wound healing after administration of crude velvet protein extract. To this end, the water-soluble total protein from deer antler was extracted and its components by mass spectrometry were identified. Full-thickness excision of the skin to prepare skin trauma model rats, 10 days after the administration of the drug, the changes in the thickness and morphology of the dermis and epidermis of the rats and the growth of capillaries in the wound surface were observed in vivo. It has found that the protein content was 61.29%. Mass spectrometry identified 135 proteins and 18 amino acids. After 10 days of administration, the wounds in the medium and high dose group shrank significantly, the epidermal thickness increased, and the number of new collagen fibers increased. Compared with the normal skin, the capillary network and the number of free capillaries in each administration group were significantly reduced, and the capillary network number of the model group increased; The blood flow of the high-dose group was significantly lower than that of the model group, and the blood flow tended to be stable. The above three methods comprehensively evaluate the pharmacodynamic effects of the full-thickness excision in the skin healing process of rats. The results indicate that the middle and high dose group can significantly promote the growth of blood vessels and collagen fibers, and can improve the quality of healing.

Keywords: second harmonic imaging; two-photon microscope; capillaries; collagen fibers

[责任编辑: 张 众]