

· 论 著 ·

# 辣椒素受体 V1 的表达与增生性瘢痕表皮屏障功能的相关性研究

柯昌能, 郭小宝, 刘坡, 陈杰明, 李艳华, 梁大宁

深圳市龙华新区中心医院烧伤整形科, 广东 深圳 518100

**摘要:** **目的** 探讨辣椒素受体 V1(transient receptor potential V type1, TRPV1) 的表达与增生性瘢痕表皮屏障功能的相关性。**方法** 收集 2012 年 3 月至 2013 年 6 月收治的 18 例增生性瘢痕患者的临床资料和组织标本。采用蒸发测定仪 Dermalab 检测瘢痕及其邻近正常皮肤跨皮水分丢失 (TEWL); 采用免疫组织化学法、Western-blot 法分别检测 TRPV1 蛋白在增生性瘢痕及正常皮肤中的表达情况; 对 TRPV1 蛋白表达与增生性瘢痕表皮屏障功能的相关性采用直线相关分析。**结果** (1) 增生性瘢痕和临近正常皮肤的 TEWL 值分别为  $(13.42 \pm 4.68) \text{g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ 、 $(6.13 \pm 3.25) \text{g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ , 增生性瘢痕 TEWL 值明显高于正常皮肤 ( $t = 5.78, P < 0.01$ )。增生性瘢痕 TEWL 净丧失量为  $(7.25 \pm 2.45) \text{g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ 。(2) TRPV1 蛋白主要表达于增生性瘢痕及正常皮肤的表皮层, 增生性瘢痕 TRPV1 蛋白表达明显高于正常皮肤 ( $P < 0.01$ )。(3) TRPV1 蛋白表达与增生性瘢痕 TEWL 净丧失量呈正相关 ( $r = 0.85, P < 0.05$ )。**结论** TRPV1 的表达与增生性瘢痕表皮屏障功能障碍有关, 可作为临床干预瘢痕的一个新的生物治疗靶点。

**关键词:** 增生性瘢痕; 辣椒素受体 V1; 跨皮水分丢失; 表皮屏障功能

**中图分类号:** R 644 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674 - 8182(2015)10 - 1269 - 03

## Relationship between expression of TRPV1 and epidermal barrier function in hypertrophic scar

KE Chang-neng, GUO Xiao-bao, LIU Po, CHEN Jie-ming, LI Yan-hua, LIANG Da-ning

Department of Burns and Plastic Surgery, Centre Hospital in Longhua New District, Shenzhen, Guangdong 518100, China

**Abstract:** **Objective** To study the relationship between the expression of transient receptor potential V type 1 (TRPV1) and barrier function in hypertrophic scar. **Methods** The clinical data and tissue samples from 18 patients with hypertrophic scar were collected. The levels of transepidermal water loss (TEWL) in hypertrophic scar and adjacent normal skin were measured by evaporimetry Dermalab. The expressions of TRPV1 protein in hypertrophic scar and adjacent normal skin were respectively detected by immunohistochemistry and Western-blot methods. The relationship between TRPV1 protein expression and epidermal barrier function was analyzed by linear correlation analysis. **Results** The level of TEWL in hypertrophic scar was significantly higher than that in adjacent normal skin [ $(13.42 \pm 4.68) \text{g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$  vs  $(6.13 \pm 3.25) \text{g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}, P < 0.01$ ]. Net loss of TEWL in hypertrophic scar was  $(7.25 \pm 2.45) \text{g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ . The expression of TRPV1 in hypertrophic scar was obviously higher than that in normal skin [ $(1.42 \pm 0.18)$  vs  $(0.48 \pm 0.22), P < 0.01$ ]. The expression of TRPV1 protein was mainly in the epidermis of hypertrophic scar and normal skin. The expression of TRPV1 protein was positively correlated with net loss of TEWL in hypertrophic scar ( $r = 0.85, P < 0.05$ ). **Conclusion** The expression of TRPV1 is associated with epidermal barrier dysfunction in hypertrophic scar. It can be used as a new biological therapeutic target for intervening scar.

**Key words:** Hypertrophic scar; Transient receptor potential V type 1; Transepidermal water loss; Epidermal barrier function

增生性瘢痕常会导致功能障碍与美学障碍, 对增生性瘢痕的生物治疗目前仍缺乏有效的治疗靶点。

表皮的屏障功能在维持皮肤稳态方面起重要作用。研究发现, 增生性瘢痕新生上皮的屏障功能障碍在瘢痕的演变过程中发挥作用, 临床上改善皮肤的屏障功能一定程度上预防增生性瘢痕的发生<sup>[1]</sup>。皮肤的屏障功能与表皮角质层密切相关, 皮肤角质细胞表达辣

DOI: 10.13429/j.cnki.cjcr.2015.10.002

基金项目: 广东省科技计划资助项目 (2010B031600277); 广东省自然科学基金项目 (S2013010014979)

椒素受体 V1 (又称香草酸受体) (transient receptor potential V type1, TRPV1), TRPV1 的过度激活会影响表皮通透性, 延迟表皮屏障功能的恢复<sup>[2]</sup>。本文探讨 TRPV1 的表达与增生性瘢痕表皮屏障功能的关系, 旨在为增生性瘢痕的防治提供依据。

## 1 对象与方法

1.1 对象 2012 年 3 月至 2013 年 6 月本院烧伤整形外科收治的增生性瘢痕患者 18 例, 共计 20 处瘢痕。男 10 例, 女 8 例; 年龄 18 ~ 55 岁。瘢痕位于上肢 7 处, 下肢 6 处, 腹部 3 处, 背部 4 处。患者入选符合以下条件: (1) 年龄  $\geq 18$  岁, 无智力和语言理解障碍。(2) 瘢痕处于活跃期, 病程 6 个月以内。(3) 瘢痕所占体表面积在 1% ~ 10%。(4) 呈现的瘢痕至少应满足下列 2 个条件: ①高出皮肤表面; ②颜色红; ③质地硬; ④伴痒痛症状。本研究获医院伦理委员会同意, 告知患者研究目的, 并签知情同意书。

1.2 增生性瘢痕及皮肤组织保存 增生性瘢痕及其邻近正常皮肤组织标本留取后放入经焦碳酸二乙酯 (DEPC) 水处理后的无菌 EP 管中, 立即液氮中速冻后置于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存。

1.3 增生性瘢痕表皮屏障功能评估 跨皮水分丢失 (transepidermal water loss, TEWL) 是衡量皮肤屏障功能的一个重要生理指标<sup>[3]</sup>。本研究检测烧伤后增生性瘢痕皮肤的 TEWL, 以此评估增生性瘢痕表皮屏障功能。方法如下: 不通风, 无阳光直射; 室温为  $(24 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ ; 相对湿度  $50\% \pm 5\%$  条件下, 将蒸发测定仪 (DermaLabR, Cortex Technology Hadsund Denmark) 调试好并校正到标准状态, 通过与 DermaLabR 仪配套使用的软件程序与笔记本电脑相连。得到测量结果后用 Microsoft Excel 收集处理 TEWL 数据。要求所测对象处于清醒安静状态 (休息 15 ~ 30 min), 将 DermaLabR TEWL 探头轻轻按压于被测部位, 于电脑屏幕上观察测量曲线, 当曲线平稳后开始测量 1 min, 取最后 20 s 的平均值为所测得 TEWL 值 ( $\text{g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ )。先测量瘢痕的 TEWL 值; 后测量瘢痕邻近正常皮肤或对应肢体部分的 TEWL 值, 以此为对照组。以增生性瘢痕与其相对应邻近正常皮肤 TEWL 的差值作为增生性瘢痕 TEWL 净丧失量。以增生性瘢痕 TEWL 净丧失量值来衡量增生性瘢痕表皮屏障功能障碍程度。

1.4 TRPV1 表达的免疫组织化学检测 TRPV1 蛋白抗体 (兔抗人, Sigma 公司) 和 SP 试剂盒及 DAB 显色试剂盒 (武汉博士德生物技术公司)。制作蜡块, 切片, 严格按照 SP 试剂盒的步骤操作。免疫组化一抗

工作浓度为 1:200, 用 PBS 代替一抗作空白对照。

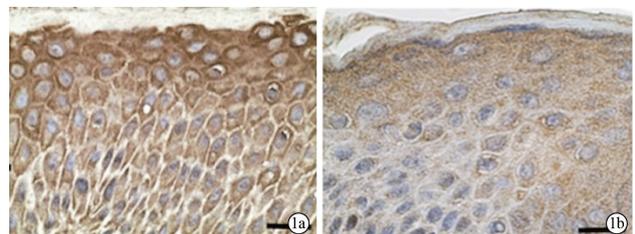
1.5 Western-blot 法检测 TRPV1 蛋白 (1) 提取总蛋白: 获取的皮肤组织标本放入  $58^{\circ}\text{C}$  的 PBS 中温浴 2 min, 然后用尖镊子把表皮从真皮层剥离下来; 将分离的表皮组织标本破碎、匀浆后低温离心, 用全蛋白提取试剂盒提取总蛋白,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。(2) 电泳: 取总蛋白  $100 \mu\text{l}$ , 加样品缓冲液, 煮沸 3 min。经 12% SDS-PAGE 电泳, 5% 分离胶 70 V 电泳 120 min。(3) 转印: 按照滤纸—PVDF 膜—凝胶—滤纸顺序转印, 30 mA 50 min。(4) 杂交与染色: PVDF 膜在一抗溶液中  $4^{\circ}\text{C}$  过夜 (兔抗人 TRPV1 抗体 1:100 稀释和  $\beta$ -actin 抗体 1:1000 稀释); PVDF 膜转加到辣根酶标记的兔抗山羊 IgG (浓度 1:1000) 二抗溶液中 1 h (室温); 洗膜, 染色至呈现条带, 终止染色。(5) 凝胶图像分析系统扫描分析 PVDF 膜, 以相对灰度值代表蛋白表达量。

1.6 统计学分析 应用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析。计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示; 两样本间比较采用  $t$  检验; TRPV1 蛋白表达与增生性瘢痕表皮屏障功能的相关性采用直线相关分析。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 增生性瘢痕屏障功能评估 增生性瘢痕和邻近正常皮肤的 TEWL 值分别为  $(13.42 \pm 4.68) \text{g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$  和  $(6.13 \pm 3.25) \text{g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ , 增生性瘢痕 TEWL 值明显高于正常皮肤 ( $t = 5.78, P < 0.01$ )。增生性瘢痕 TEWL 净丧失量为  $(7.25 \pm 2.45) \text{g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

2.2 增生性瘢痕 TRPV1 的表达情况 免疫组织化学检测发现, TRPV1 主要表达于增生性瘢痕和正常皮肤的表皮层, 阳性染色见于角质细胞的胞浆和胞膜; 增生性瘢痕表皮层的表达强度明显高于正常皮肤。见图 1。Western-blot 检测发现, 增生性瘢痕表皮 TRPV1 蛋白的表达相对灰度值  $(1.42 \pm 0.18)$  明显高于正常皮肤的表皮层  $(0.48 \pm 0.22)$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。见图 2。



注: 1a: 增生性瘢痕; 1b: 正常皮肤。

图 1 增生性瘢痕和正常皮肤表皮 TRPV1 的表达



注:1,3 泳道为增生性瘢痕,2,4 泳道为正常皮肤。

图 2 增生性瘢痕及正常皮肤表皮 TRPV1 蛋白的表达

**2.3 TRPV1 蛋白表达与增生性瘢痕表皮屏障功能的相关性分析** 直线相关分析显示,TRPV1 蛋白表达与增生性瘢痕的 TEWL 值不相关( $r = 0.38, P > 0.05$ ),但与增生性瘢痕 TEWL 净丧失量呈正相关( $r = 0.85, P < 0.05$ )。

### 3 讨论

TRPV1 主要表达于上皮组织的神经细胞、肾、支气管上皮细胞、皮肤角质细胞;伤害性热刺激( $> 43\text{ }^{\circ}\text{C}$ )、 $\text{H}^+$ (pH 5.0)、辣椒素及内源性香草酸激活 TRPV1,最初认为与热觉、痛觉的产生有关。近年来研究发现,TRPV1 的激活与皮肤炎症、角质细胞的分化成熟障碍、毛发再生障碍、皮脂腺分泌障碍等有关<sup>[4]</sup>。角膜上皮细胞 TRPV1 激活后释放白介素(IL)-6、IL-8 等促炎因子,阻断该通道可抑制上述促炎因子的释放<sup>[5]</sup>;TRPV1 基因敲除大鼠角膜受损后瘢痕增生程度明显轻于野生型大鼠<sup>[6]</sup>;皮肤角质细胞 TRPV1 激活后分泌多种促炎因子<sup>[7]</sup>。本研究发现,烧伤后增生性瘢痕表皮 TRPV1 的表达明显高于正常皮肤,提示 TRPV1 在病理性瘢痕的形成中发挥作用。

决定皮肤对水的屏障功能的是皮肤表皮的角质层。新鲜瘢痕的角质层细胞发育不成熟,其屏障功能的恢复需要几个月的时间。本研究也发现,增生性瘢痕 TEWL 明显高于邻近正常皮肤,提示增生性瘢痕表皮屏障功能障碍,其组织水分蒸发较多,这也与临床上增生性瘢痕多数皮肤干燥的特征相吻合。瘢痕组织水分丢失过多,导致表皮角质细胞产生细胞因子 IL-1<sup>[8]</sup>,后者通过激活转化生长因子(TGF) $\beta$  和结缔组织生长因子(CTGF)下游效应因子而影响真皮的

纤维化<sup>[9]</sup>。临床上硅酮胶膜、PU 膜等封闭敷料治疗瘢痕可能与其可改善增生性瘢痕表皮屏障功能、增加瘢痕组织的水合作用、减少 IL-1 的产生、正向调节表皮-真皮的相互作用有关。

本研究发现,TRPV1 的表达与增生性瘢痕 TEWL 净丧失量呈正相关,表明 TRPV1 的表达与增生性瘢痕的屏障功能障碍程度有关,这可能是增生性瘢痕角质细胞 TRPV1 过度表达激活后影响角质细胞分化成熟所致,确切机制有待进一步深入研究。干预增生性瘢痕角质细胞 TRPV1 的表达,有效地恢复增生性瘢痕表皮屏障功能,有可能成为增生性瘢痕一个新的生物治疗靶点。

### 参考文献

- [1] Mustoe TA, Gurjala A. The role of the epidermis and the mechanism of action of occlusive dressings in scarring[J]. Wound Repair Regen, 2011, 19 Suppl 1: s16 - s21.
- [2] Denda M, Sokabe T, Fukumi-Tominaga T, et al. Effects of skin surface temperature on epidermal permeability barrier homeostasis[J]. J Invest Dermatol, 2007, 127(3): 654 - 659.
- [3] Shah Jh, Zhai H, Maibach HI. Comparative evaporimetry in man[J]. Skin Res Technol, 2005, 11(3): 205 - 208.
- [4] Bodó E, Biró T, Telek A, et al. A hot new twist to hair biology: involvement of vanilloid receptor 1 (VR1/TRPV1) signaling in human hair growth control[J]. Am J Pathol, 2005, 166(4): 985 - 998.
- [5] Zhang F, Yang H, Wang Z, et al. Transient receptor potential vanilloid 1 activation induces inflammatory cytokine release in corneal epithelium through MAPK signalling[J]. J Cell Physiol, 2007, 213: 730 - 739.
- [6] Sumioka T, Okada Y, Reinach PS, et al. Impairment of corneal epithelial wound healing in a TRPV1-deficient mouse[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55(5): 3295 - 3302.
- [7] Okada Y, Reinach PS, Shirai K, et al. TRPV1 involvement in inflammatory tissue fibrosis in mice[J]. Am J Pathol, 2011, 178(6): 2654 - 2664.
- [8] Kloeters O, Schierle C, Tandara A, et al. The use of a semioclusive dressing reduces epidermal inflammatory cytokine expression and mitigates dermal proliferation and inflammation in a rat incisional model[J]. Wound Repair Regen, 2008, 16(4): 568 - 575.
- [9] Sisco M, Kryger ZB, O'Shaughnessy KD, et al. Antisense inhibition of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) mRNA limits hypertrophic scarring without affecting wound healing in vivo[J]. Wound Repair Regen, 2008, 16(5): 661 - 673.

收稿日期:2015-05-10 编辑:王国品