

秦岭滑蜥断尾再生伤口愈合阶段 细胞因子的时空分布特征

杨纯 师婷婷 王新月 寇昱婷 孙金玉

山西师范大学生命科学学院 太原 030031

摘要: 细胞因子参与免疫应答、介导炎症反应,进而在损伤组织的再生修复过程中发挥调控作用。通过切割法建立秦岭滑蜥 (*Scincella tsinlingensis*) 断尾再生模型,针对伤口愈合阶段,采用免疫组织化学方法检测促炎症因子白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞介素-8 (IL-8)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-1 受体 1 (IL-1R1)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和抗炎细胞因子白细胞介素-10 (IL-10) 的组织细胞定位及表达变化。结果显示:6 种细胞因子在断尾脊髓和椎骨中的骨系细胞中均呈阳性。断尾创面组织及其附近鳞片下方真皮层中 IL-6 阳性细胞数量先增加后减少,断尾后 3 d 达峰值 194.3 ± 24.9 。断尾后 3 d,创面 IL-8 阳性细胞数目为 107.7 ± 12.7 ,超过真皮层的 43.7 ± 9.1 。IL-1 β 和 IL-1R1 阳性细胞数量先增后减,伤口部位的阳性细胞明显多于真皮层 ($P < 0.05$)。TNF- α 阳性细胞由 0.5 d 的 126.3 ± 35.0 增至 3 d 的 190.3 ± 12.1 。IL-10 阳性细胞断尾后总体呈现先增后减的趋势,断尾后 0.5 d 伤口部位阳性细胞达 201 ± 17.8 ,显著高于原尾 ($P < 0.05$)。上述结果表明,促炎症因子 IL-6、IL-8、IL-1 β 及其受体 IL-1R1、TNF- α 和抗炎细胞因子 IL-10 与创面髓系来源细胞的空间分布相一致,共同参与秦岭滑蜥断尾伤口愈合,并可能通过维持免疫抑制的微环境实现无疤痕伤口愈合,以促进芽基形成。

关键词: 秦岭滑蜥; 断尾再生; 伤口愈合; 细胞因子

中图分类号: Q954 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2024) 02-245-13

The Spatial-Temporal Distribution of Cytokines in the Wound Healing Stage of Regenerating Tail in *Scincella tsinlingensis*

YANG Chun SHI Ting-Ting WANG Xin-Yue KOU Zhao-Ting SUN Jin-Yu

School of Life Sciences, Shanxi Normal University, Taiyuan 030031, China

Abstract: [Objectives] Cytokines participate in the immune response, mediate the inflammatory response, and then play a regulatory role in the regeneration and repair process of damaged tissues. **[Methods]** The tail of *Scincella tsinlingensis* was amputated with a razor blade to set up tail regeneration model, and immunohistochemical methods were used to detect the histologic localization and expression changes of cytokines interleukin, IL-6, 8, 1 β (IL-6, IL-8, IL-1 β), interleukin 1 receptor type 1 (IL-1R1), tumour necrosis

基金项目 山西省基础研究计划自由探索类项目 (No. 20210302123323), 山西师范大学自然科学基金项目 (No. 020820220007);

第一作者介绍 杨纯, 男, 教授; 研究方向: 动物结构与机能; E-mail: yangchun774@163.com.

收稿日期: 2023-05-08, 修回日期: 2023-11-21 DOI: 10.13859/j.cjz.202423087

factor- α (TNF- α) and interleukin, IL-10 (IL-10) at the stage of wound healing. Three visual fields of different parts were randomly selected under microscope with 400-fold magnification for immunopositive cell count. The results were expressed as “Mean $\pm$ SD”, one-way ANOVA and Tukey HSD were used to analyze the difference in the number of positive cells on different days. **[Results]** The results showed that six cytokines were positive in bone cells in the spinal cord and vertebrae. The number of IL-6 positive cells in the wound site and the dermis of proximal scale to the stump surface initially showed increasing and later decreasing of these cells, reaching a peak of 194.3 ± 24.9 at 3 d after tail amputation, the number of IL-8 positive cells in the wound surface was 107.7 ± 12.7 , exceeding 43.7 ± 9.1 in the dermis at 3 d after tail amputation. The number of IL-1 β and IL-1R1 positive cells initially showed increasing and later decreasing of these cells, and significantly more positive cells occurred in the wound site than in the dermis ($P < 0.05$). The TNF- α positive cells increased from 126.3 ± 35.0 at 0.5 d to 190.3 ± 12.1 at 3 d. The number of anti-inflammatory cytokine IL-10 positive cells initially showed increasing and later decreasing of these cells after tail amputation. At 0.5 d after tail amputation, positive cells reached 201 ± 17.8 , which is significantly higher than that in the original tail ($P < 0.05$, Fig. 7). **[Conclusion]** The above results indicate that IL-6, IL-8, IL-1 β , IL-1R1, TNF- α and IL-10 are consistent with the spatial distribution of myeloid-derived cells, jointly participate in tail wound healing of *S. tsinlingensis*, and may achieve scarless wound healing and promote blastema formation by maintaining an immuno-suppressive microenvironment.

Key words: *Scincella tsinlingensis*; Tail regeneration; Wound healing; Cytokines

组织损伤能迅速启动炎症级联反应和组织再生修复事件以恢复损伤组织的结构完整性和功能(朱方强等 2017)。在脊椎动物再生附肢的芽基形成之前,细胞介导损伤组织中的先天免疫反应和炎症(Mescher et al. 2017),并且只有在免疫抑制条件下新肢体才能成功发育(Degan et al. 2021)。髓系细胞分泌促炎症因子和抗炎因子介导伤口愈合反应。早期抗炎反应的存在与消退和抗纤维化活性有关,可能对解决炎症、防止瘢痕形成进而再生至关重要(Godwin et al. 2014, Wynn et al. 2016)。

细胞因子可诱导多种细胞产生低分子量的可溶性蛋白,发挥调节固有免疫和适应性免疫,促进血细胞生成和生长以及损伤组织修复等功能(高景恒等 2018)。创伤早期,机体先后产生肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1、6、8(interleukin, IL-1、6、8)等“前炎性细胞因子”(Keel et al. 1996),在肢体创伤后早期炎症反应的发生和发展中发挥作用(Hoch et al. 1993, Donnelly et al. 1994)。

在转基因小鼠(*Mus musculus*)创伤模型中,促炎细胞因子,如 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α , 是各种皮肤炎症反应过程中的关键介质。墨西哥钝口螈(*Ambystoma mexicanum*)截肢后 1 d,断肢组织中髓系细胞水平增加,且促炎细胞因子[TNF- α 、IL-1 β 、IL-16、IL-17、IL-23、干扰素- γ (interferon, IFN- γ)]和抗炎细胞因子(IL-4、IL-5、IL-10、IL-13)的表达相对平衡(Godwin et al. 2013)。炎症抑制性细胞因子 IL-10 能抑制多种促炎介质如 IL-1、IL-6、IL-8、巨噬细胞炎性蛋白-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α , MIP-1 α)、单核细胞趋化因子-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)和 TNF- α 等的合成分泌。

蜥蜴类爬行动物可在不引起过度炎症的情况下再生断尾,而哺乳动物的组织/器官损伤会导致伤口由于炎症反应不受控制地激活而形成纤维化疤痕。蜥蜴类爬行动物的芽基细胞和未成熟体细胞对断尾后的各种炎症刺激有抵抗力,揭示其断尾再生过程中发生的自限性炎症

的机制可为组织损伤的治疗提供线索(He et al. 2021)。秦岭滑蜥(*Scincella tsinlingensis*)为我国特有的卵胎生蜥蜴(赵禹等 2020),通过切割法建立其断尾再生模型有利于探索割处再生的机制(Yang et al. 2022a, b, 2023)。本研究检测细胞因子 IL-6、IL-8、IL-1 β 、IL-1R1、TNF- α 和 IL-10 在秦岭滑蜥伤口愈合阶段的时空分布特征,分析细胞因子在炎症反应阶段以及组织重建方面的作用,旨在积累蜥蜴类爬行动物附肢再生过程中炎症反应与再生关系的基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

秦岭滑蜥采自山西省临汾市太岳山七里峪(36°21'~36°45'N, 110°40'~112°21'E, 海拔 2 100 m),于透明玻璃箱中饲养,通风良好并辅以光照。提供黄粉虫及自来水,确保其自由饮食,以维持机体健康。

1.2 取样与处理

选取秦岭滑蜥雌雄成体 48 只,吻肛长 4.8~5.7 cm,随机分为 6 组,每组 8 只。采用切割法建立断尾再生模型:将蜥蜴置于冰箱中于 4℃处理 20 min,用消毒后的单面刀片在距泄殖腔 2 cm 处切割断其尾,后于不同培养箱中分组饲养。记录断尾时刻,作为断尾后 0 d。断尾后 0 d、0.5 d、1 d、3 d、5 d、7 d,在距离断尾创面 0.5 cm 处切割取样。

1.3 石蜡切片准备

样本置于 4%的多聚甲醛中固定 3 d,依次用 PBS(pH 7.2~7.4)、蒸馏水分别清洗 20 min 各 3 次;随后在摇床(TS-8S,中国海门市其林贝尔仪器制造有限公司)上进行脱钙 1~3 d。在室温下梯度酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋,使用石蜡切片机(YD-315,金华市益迪医疗设备有限公司)连续切片,厚度为 10 μ m,制片备用。

1.4 免疫组织化学染色

石蜡切片脱蜡、复水后于新鲜配置的 3% H₂O₂ 中孵育 30 min 灭活内源性酶, PBS 缓冲

液浸洗 3 次, 5 min/次。复合消化液室温修复 15 min, PBS 浸洗 3 次, 5 min/次。用 0.2% Triton X-100 处理 10 min 后,滴加 5%牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)封闭液室温封闭 30 min。兔抗小鼠 IL-1 β (货号 AF7209)和 IL-1R1(货号 AF7212)购自上海碧云天生物技术有限公司,兔抗小鼠 IL-6(货号 BA4339)、IL-8(货号 BA0996)、TNF- α (货号 A00002-2)、IL-10(货号 A00021-3)以及其他相关试剂均购自武汉博士德生物工程有限公司。6 种一抗均按照 1:100 稀释,分别滴加到平行处理的载玻片上,4℃孵育 24 h, PBS 浸洗 3 次, 5 min/次;生物素标记羊抗鼠/兔 IgG 二抗(货号 BA1056)37℃下孵育 4 h, PBS 浸洗 3 次, 5 min/次。随后使用 SABC(货号 SA2002)室温孵育 1 h, PBS 浸洗 3 次, 5 min/次。滴加现配制的二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色剂(货号 AR1027)显色 5~15 min。蒸馏水冲洗后,脱水、透明、中性树胶封片,光镜下观察、拍照。空白对照用 PBS 替代一抗体进行免疫细胞化学染色。

1.5 数据测量及统计

每张免疫细胞化学染色切片在光学显微镜及成像系统(BX-40, 日本 Olympus)下观察,使用 10 倍目镜, 40 倍物镜,随机选取 3 个不同部位的视野,计数阳性细胞,深棕黄色为强阳性表达,浅棕黄色为阳性表达,接近背景色或者白色无表达。参考小鼠单纯疱疹病毒性角膜炎(herpes simplex keratitis, HSK)细胞计数方法,以阳性细胞平均数 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示断尾后不同天数的阳性细胞个数(伍志琴等 2011)。使用 SPSS 13.0 软件处理所得数据,进行单因素方差分析及多重比较, $P < 0.05$ 表明组间差异有统计学意义。

2 结果

2.1 白细胞介素-6(IL-6)

主要观察伤口部位的表皮层、真皮层以及靠近伤口附近鳞片下真皮层的 IL-6 阳性细胞

定位(图1)。断尾0 d, 促炎症因子 IL-6 在切口处没有阳性表达, 但在真皮层有少量表达; 伤口部位及其下结缔组织在断尾 0.5 d 出现阳性信号, 1 d 时伤口处和真皮层阳性细胞增加, 随着炎症阶段持续进行, 3 d 免疫阳性表达量达到最高, 阳性细胞在伤口下的组织中均有分布, 且真皮层中的阳性信号激增; 5 d 时在伤口处仍有大量阳性细胞分布, 但真皮层及肌肉组织中的阳性表达变弱; 7 d 免疫阳性表达整体降低, 在伤口处与真皮层中阳性较弱; 同时, 炎症阶段所有椎骨中的骨髓细胞都呈阳性。

2.2 白细胞介素-8 (IL-8)

通过整体观察 IL-8 在断尾再生炎症阶段

的表达分布, 发现每个时间点的椎骨和脊髓处都有阳性分布(图2), 除肌肉组织和真皮层中少量阳性细胞表达外, 促炎症因子 IL-8 在 0 d 无阳性表达; 到 0.5 d 阳性细胞整体增加, 主要表达在伤口处、其下结缔组织和真皮层; 1 d 免疫阳性在伤口处及真皮层均有表达; 3 d 伤口部位、真皮层和靠近伤口处的肌肉组织及其它组织阳性表达更高; 在断尾后 5 d 和 7 d 时, 在伤口部位、肌肉组织与真皮层都检测到 IL-8 免疫活性, 且处于较高水平。IL-8 在断尾再生的早期组织中均有明显的表达分布, 而且都集中在伤口附近, 整体而言, IL-8 表达较 IL-6 高且持续时间较长。

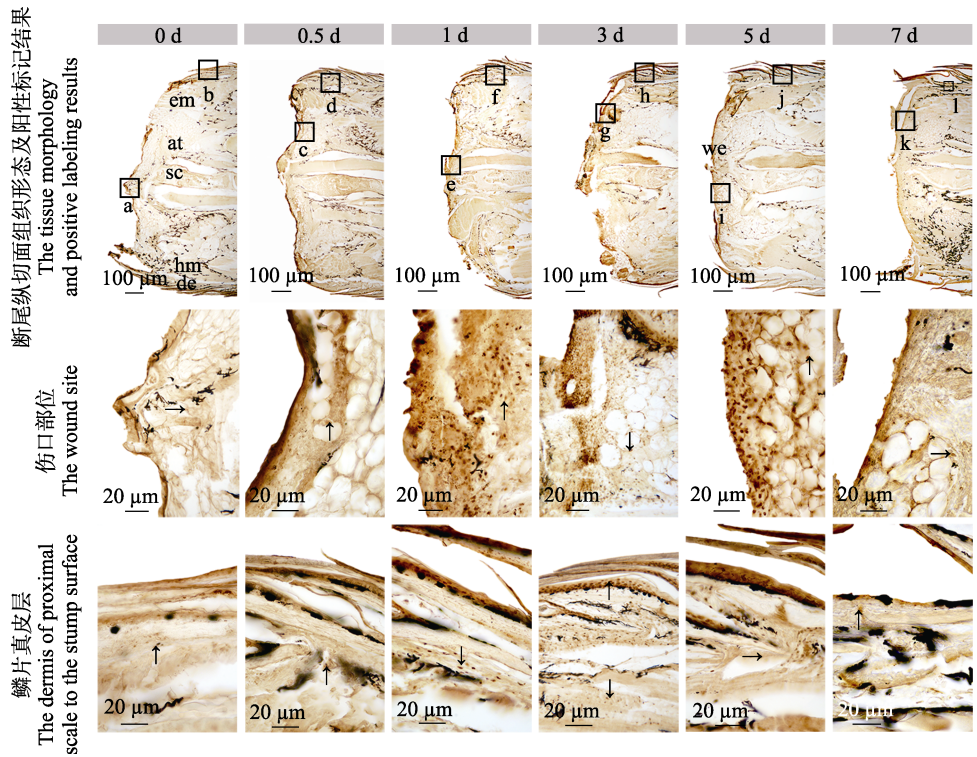


图1 促炎症因子 IL-6 在秦岭滑蜥伤口部位及近伤口鳞片真皮层的免疫定位

Fig. 1 Immunolocalization of the pro-inflammatory IL-6 in the wound site and the dermis of proximal scale to the stump surface of *Scincella tsinlingensis*

正方形表示进一步放大显示的伤口部位 (a、c、e、g、i 和 k) 或鳞片真皮层 (b、d、f、h、j 和 l) 区域。箭头指示 IL-6 阳性细胞。at. 脂肪组织; de. 真皮; em. 轴上肌; hm. 轴下肌; sc. 脊髓; we. 伤口上皮
Squares represent the wound site (a, c, e, g, i, and k) or dermis area (b, d, f, h, j, and l) magnified. Arrows indicate IL-6 positive cells. at. Adipose tissue; de. Dermis; em. Epaxial musculature; hm. Hypaxial musculature; sc. Spinal cord; we. Wound epithelium

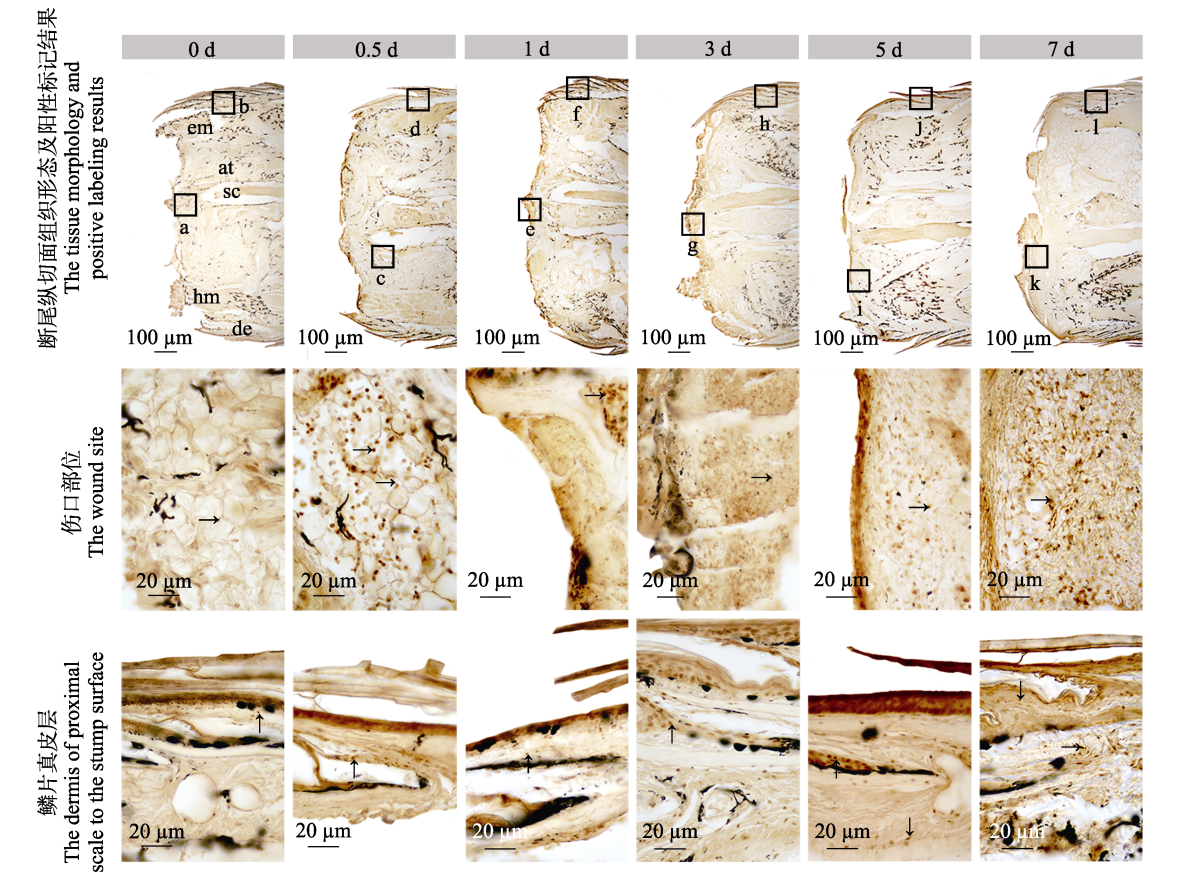


图 2 促炎症因子 IL-8 在秦岭滑蜥伤口部位及近伤口鳞片真皮层的免疫定位

Fig. 2 Immunolocalization of the pro-inflammatory IL-8 in the wound site and the dermis of proximal scale to the stump surface of *Scincella tsinlingensis*

正方形表示进一步放大显示的伤口部位 (a、c、e、g、i 和 k) 或鳞片真皮层 (b、d、f、h、j 和 l) 区域。箭头指示 IL-8 阳性细胞。at. 脂肪组织; de. 真皮; em. 轴上肌; hm. 轴下肌; sc. 脊髓

Squares represent the wound site (a, c, e, g, i, and k) or dermis area (b, d, f, h, j, and l) magnified. Arrows indicate IL-8 positive cells. at. Adipose tissue; de. Dermis; em. Epaxial musculature; hm. Hypaxial musculature; sc. Spinal cord

2.3 白细胞介素-1β 及受体 R1 (IL-1β 和 IL-1R1)

断尾后 0 d, 促炎症因子 IL-1β 时的免疫阳性仅见于椎骨中的骨髓细胞中 (图 3)。0.5 d 中的阳性细胞分布在伤口部位、真皮层和肌肉组织中, IL-1β 表达增加, 且持续到 3 d; 在 1 d 和 3 d, IL-1β 明显分布于伤口处、真皮层及肌肉组织, 其在 3 d 的阳性稍高于 1 d。在尾再生早期 IL-1β 均有分布, 进一步发现 IL-1β 主要表达在伤口部位或之后的上皮细胞中, 说明 IL-1β

在主要的炎症阶段一直存在于组织微环境中, 在伤口愈合和再生中起一定促进作用 (图 3)。

断尾后 0 d, 促炎症因子 IL1 受体 IL-1R1 阳性细胞在真皮层分布 (图 4), 并于 0.5 d 大量出现在伤口下、肌肉组织和真皮层中, 至 1 d, 在伤口下结缔组织、真皮层、肌肉组织观察到 IL-1R1 阳性细胞大量存在。3 d 时阳性信号减弱, 仅存在于伤口部位及真皮层中, 且整体表达降低, 而 5 d 在伤口下方和真皮层中的阳性细胞增多, 从 5 d 到 7 d 免疫阳性又逐渐降低,

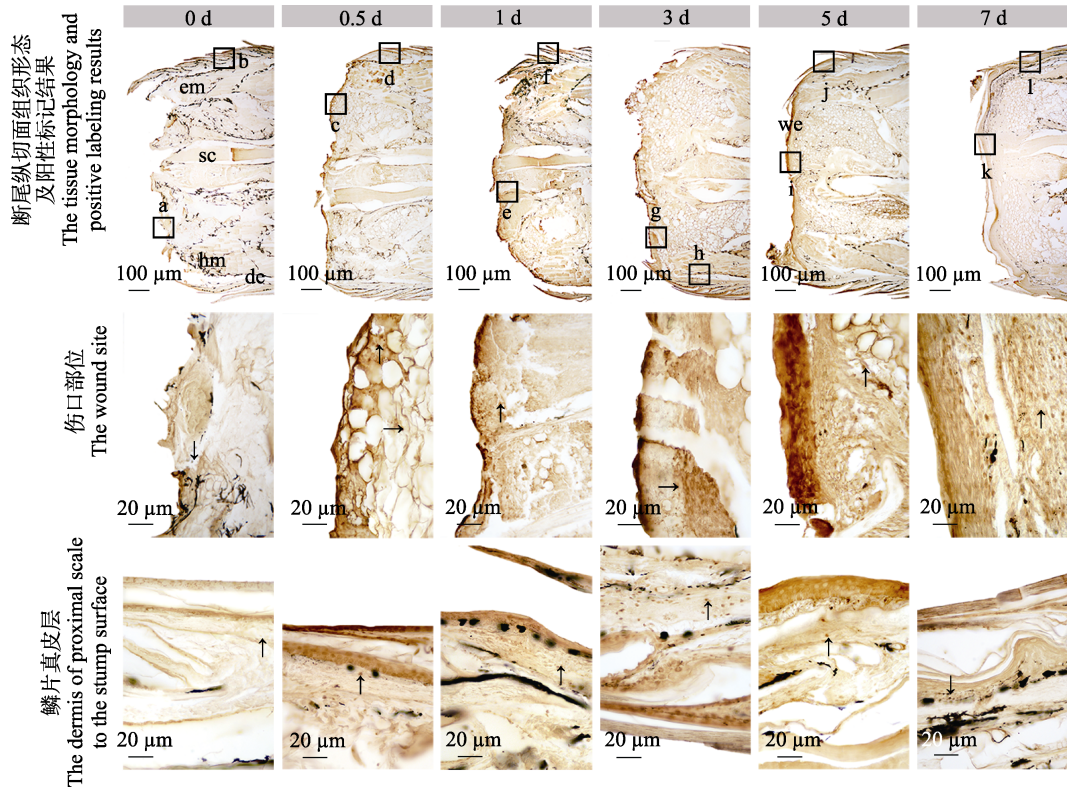


图3 促炎症因子 IL-1 β 在秦岭滑蜥伤口部位及近伤口鳞片真皮层的免疫定位

Fig. 3 Immunolocalization of the pro-inflammatory IL-1 β in the wound site and the dermis of proximal scale to the stump surface of *Scincella tsinlingensis*

正方形表示进一步放大显示的伤口部位 (a、c、e、g、i 和 k) 或鳞片真皮层 (b、d、f、h、j 和 l) 区域。箭头指示 IL-1 β 阳性细胞。at. 脂肪组织; de. 真皮; em. 轴上肌; hm. 轴下肌; sc. 脊髓; we. 伤口上皮

Squares represent the wound site (a, c, e, g, i, and k) or dermis area (b, d, f, h, j, and l) magnified. Arrows indicate IL-1 β positive cells. at. Adipose tissue; de. Dermis; em. Epaxial musculature; hm. Hypaxial musculature; sc. Spinal cord; we. Wound epithelium

在伤口处和真皮部位有少量棕色颗粒。断尾后 0.5~5 d 为炎症反应的主要阶段, IL-1R1 持续存在于椎骨及脊髓细胞中, 且其作为 IL-1 β 的受体之一, 与 IL-1 β 的整体趋势相近, 都是先增加, 从 5~7 d 开始减少; 说明 IL-1R1 同样起促进伤口愈合和组织再生的作用 (图 4)。

2.4 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)

断尾后 0 d, 仅椎骨中的骨髓细胞呈 TNF- α 免疫阳性 (图 5), 至 0.5 d 在伤口部位及其下结缔组织、真皮层、骨髓细胞、脊髓和肌肉组织中有大量 TNF- α 阳性细胞分布, 1 d 时整体阳性细胞数量减少, 但伤口附近、真皮层、骨

髓、脊髓和肌肉组织中仍有分布; 3 d、5 d 和 7 d 三个时间点 TNF- α 阳性细胞分布与 1 d 类似, 7 d 的阳性细胞数量显著高于 5 d。

2.5 白细胞介素 10 (IL-10)

断尾后 0 d, 仅椎骨中的骨髓细胞呈 IL-10 免疫阳性 (图 6), 0.5 d 时 IL-10 阳性细胞主要表达在伤口下结缔组织、骨髓细胞、脊髓和真皮层, 1 d 时阳性分布与 0.5 d 一致, 有明显阳性细胞分布。断尾后 3 d, IL-10 阳性细胞在伤口凝块附近、脊髓、骨髓细胞和真皮层广泛分布, 至断尾后 5 d 和 7 d, IL-10 阳性细胞仍分布于伤口附近、椎骨及脊髓中, 但 7 d 时, 鳞

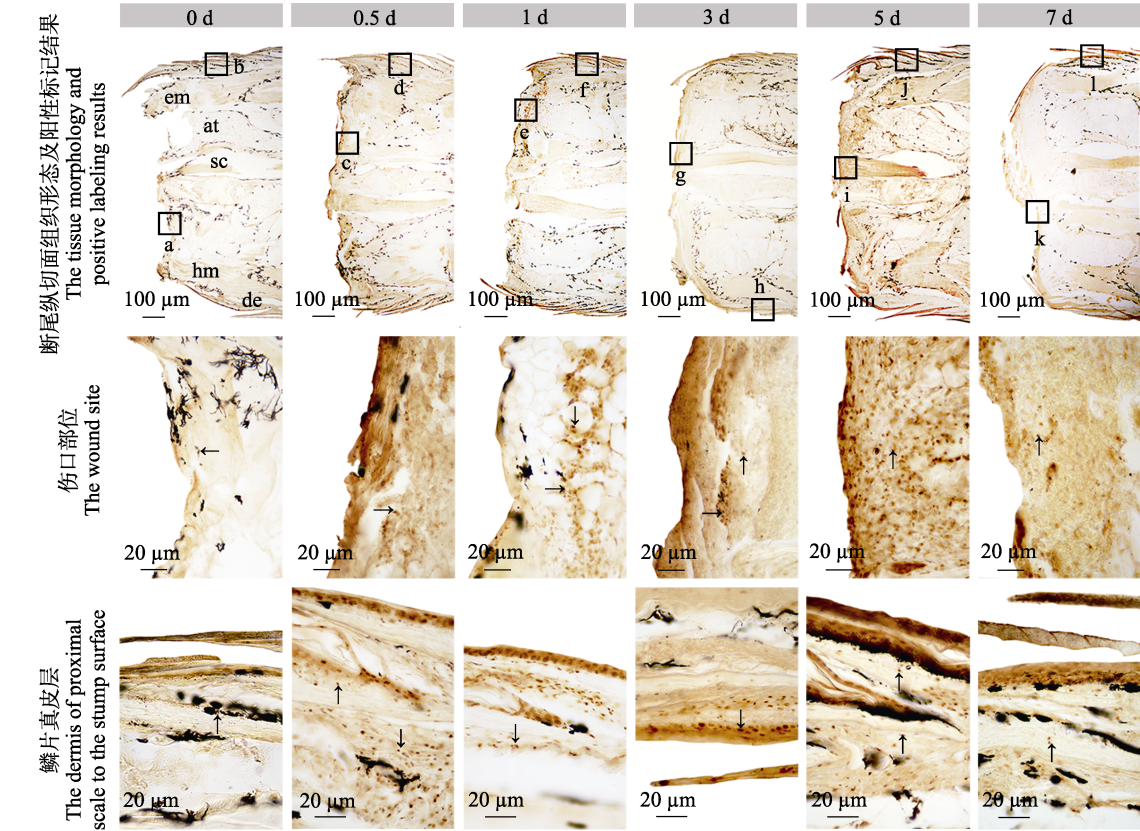


图 4 促炎症因子 IL-1R1 在秦岭滑蜥伤口部位及近伤口鳞片真皮层的免疫定位

Fig. 4 Immunolocalization of the pro-inflammatory IL-1R1 in the wound site and the dermis of proximal scale to the stump surface of *Scincella tsinlingensis*

正方形表示进一步放大显示的伤口部位 (a、c、e、g、i 和 k) 或鳞片真皮层 (b、d、f、h、j 和 l) 区域。箭头指示 IL-1R1 阳性细胞。
at. 脂肪组织; de. 真皮; em. 轴上肌; hm. 轴下肌; sc. 脊髓

Squares represent the wound site (a, c, e, g, i, and k) or dermis area (b, d, f, h, j, and l) magnified. Arrows indicate IL-1R1 positive cells. at. Adipose tissue; de. Dermis; em. Epaxial musculature; hm. Hypaxial musculature; sc. Spinal cord

片真皮层呈 IL-10 阴性。

2.6 免疫因子的定量统计结果

通过统计, 伤口部位和真皮层中 IL-6 阳性细胞数量具有相同的变化趋势, 即先增加后减少, 伤口部位的阳性细胞数量上升直至断尾后 3 d, 多达 194.3 ± 24.9 , 其后开始下降, 而真皮层的阳性细胞数量在断尾后 1 d 达到最大值 85.3 ± 3.8 。在炎症期, 伤口部位集聚的阳性细胞多于真皮层 (图 7a), 说明蜥蜴断尾后细胞因子 IL-6 被逐渐募集在伤口处, 先增后减, 其中断尾后 1 d 和 3 d 伤口处的 IL-6 阳性细胞数

量大致相同, 无显著差异。

IL-8 阳性细胞数目在伤口部位和真皮层大体呈增长趋势, 只是在 1 d 略有减少, 3 d 又增加, 与断尾后 0.5 d 数量相近, 断尾后 3d, 伤口部位处阳性细胞数量为 107.7 ± 12.7 , 超过真皮层处阳性细胞的数量 43.7 ± 9.1 , 伤口部位集聚的阳性细胞数量多于真皮层处, 与 IL-6 阳性细胞在炎症期的数量表现一致 (图 7b)。IL-1 β 和 IL-1R1 的变化趋势大致相似, 阳性细胞数量在伤口部位和邻近创面的鳞片下真皮层呈先增后减趋势, 且断尾后伤口部位的阳性细胞数明

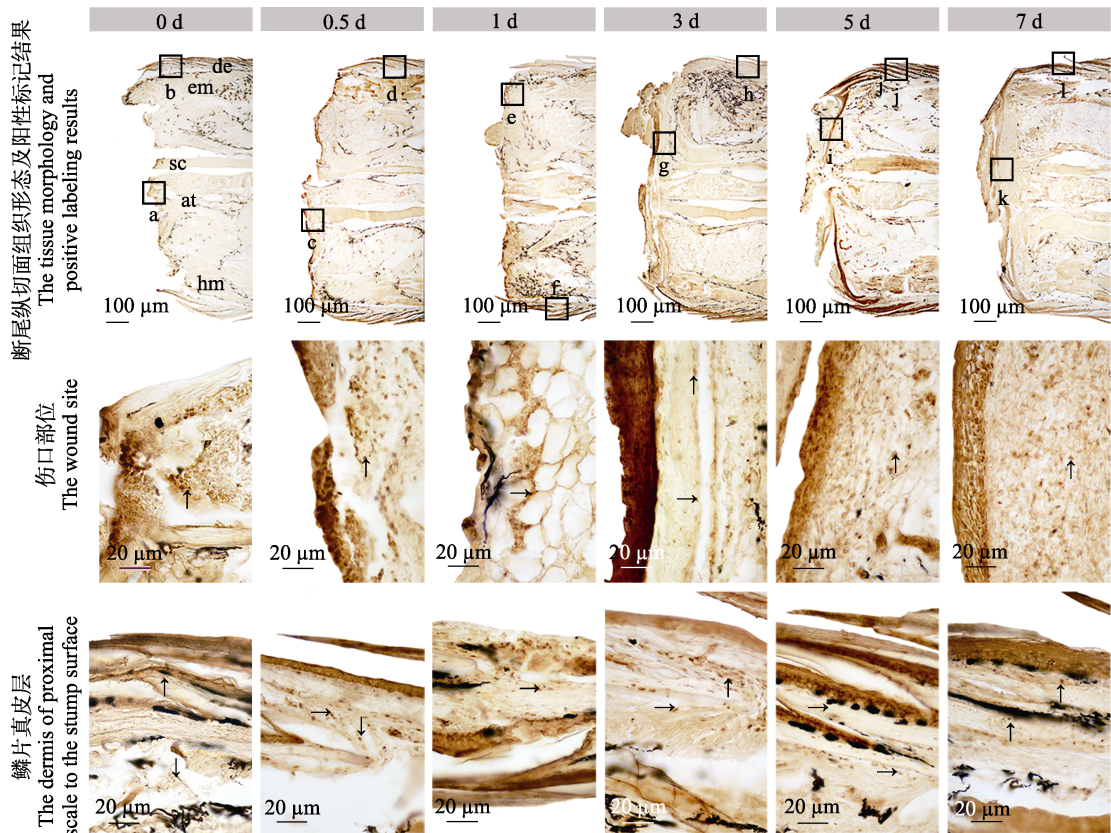


图5 促炎症因子 TNF- α 在秦岭滑蜥伤口部位及近伤口鳞片真皮层的免疫定位
Fig. 5 Immunolocalization of the pro-inflammatory TNF- α in the wound site and the dermis of proximal scale to the stump surface of *Scincella tsinlingensis*

正方形表示进一步放大显示的伤口部位 (a、c、e、g、i 和 k) 或鳞片真皮层 (b、d、f、h、j 和 l) 区域。箭头指示 TNF- α 阳性细胞。at. 脂肪组织; de. 真皮; em. 轴上肌; hm. 轴下肌; sc. 脊髓

Squares represent the wound site (a, c, e, g, i, and k) or dermis area (b, d, f, h, j, and l) magnified. Arrows indicate TNF- α positive cells. at. Adipose tissue; de. Dermis; em. Epaxial musculature; hm. Hypaxial musculature; sc. Spinal cord

显多于真皮层 (图 7c, d)。TNF- α 阳性细胞的数量在伤口部位逐渐递增, 由 0.5 d 的 126.3 ± 35.0 增加到 3 d 的 190.3 ± 12.1 , 断尾后 3 d、5 d 和 7 d 数量几乎一致, 无显著差异 (图 7e)。真皮层的 TNF- α 因子数目在断尾后 0.5 d、3 d 和 5 d 大体相同。IL-10 阳性细胞数断尾后总体呈现先增后减的趋势, 且断尾后再生的伤口部位和真皮层的阳性细胞数量与原尾相比均显著增长 (图 7f, $P < 0.05$), 断尾后 0.5 d 伤口部位阳性细胞数多达 201 ± 17.8 。

3 讨论

动物的再生都依赖于炎症 (Mastellos et al. 2013), 通过可变的细胞重编程和生长, 导致器官模式的重建, 涉及众多相同的细胞因子、生长或信号因子家族, 以及主要的信号通路 (Mescher et al. 2017)。蜥蜴类爬行动物通过微量出血和有效的止血来迅速愈合伤口, 从而降低感染和随后炎症的风险。蜥蜴的芽基细胞和未成熟体细胞对截肢后的各种炎症刺激具有抵

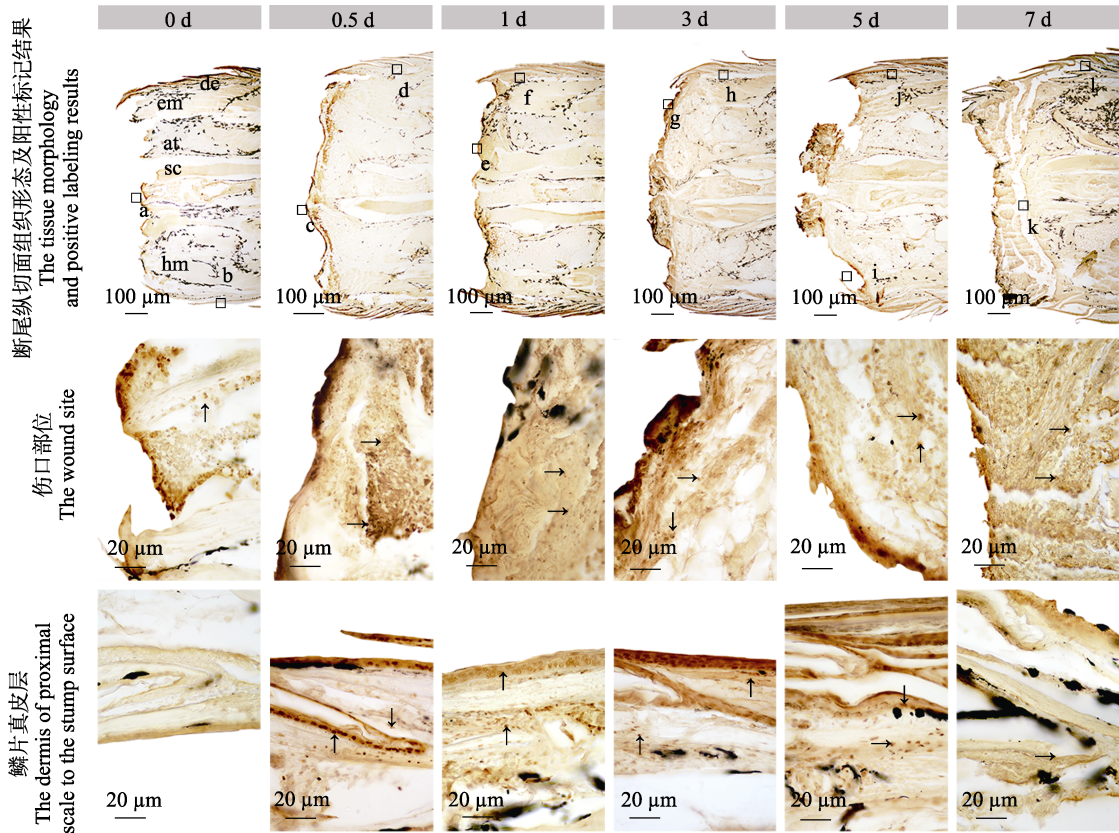


图 6 抗炎症因子 IL-10 在秦岭滑蜥伤口部位及近伤口鳞片真皮层的免疫定位

Fig. 6 Immunolocalization of the anti-inflammatory IL-10 in the wound site and the dermis of proximal scale to the stump surface of *Scincella tsinlingensis*

正方形表示进一步放大显示的伤口部位 (a、c、e、g、i 和 k) 或鳞片真皮层 (b、d、f、h、j 和 l) 区域。箭头指示 IL-10 阳性细胞。at. 脂肪组织; de. 真皮; em. 轴上肌; hm. 轴下肌; sc. 脊髓

Squares represent the wound site (a, c, e, g, i, and k) or dermis area (b, d, f, h, j, and l) magnified. Arrows indicate IL-10 positive cells. at. Adipose tissue; de. Dermis; em. Epaxial musculature; hm. Hypaxial musculature; sc. Spinal cord

抗力。因此, 蜥蜴断尾再生应用了一种全面有效的策略来对抗过度炎症, 以促进损伤后的再生。探究蜥蜴类爬行动物再生与免疫反应之间的分子机制有助于明确再生关键因子 (Rios et al. 2015)。本研究观察到促炎细胞因子如 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α , 以及炎症抑制性细胞因子 IL-10 在秦岭滑蜥断尾再生的伤口愈合阶段呈现出由弱增强进而减弱的动态变化, 这些细胞因子在断尾后的含量较原尾组织内环境中高, 为秦岭滑蜥组织伤口愈合和再生所必需。

白细胞介素 IL-6 在炎症巨噬细胞高度表达(未发表数据), 是启动愈合反应的重要因素。IL-6 刺激趋化因子 C-C 基团趋化因子配体 2 (CCL2) 和 3 (CCL3) 的表达, 从血液循环中招募更多的炎症巨噬细胞 (Cheng et al. 2020)。然而, IL-6 的持续高表达加剧肌肉中促炎性巨噬细胞累积, 血清淀粉样蛋白 A 和纤维蛋白原浓度升高, 导致肌肉萎缩 (Muñoz-Cánoves et al. 2013)。在秦岭滑蜥断尾后, IL-6 由其他炎性细胞分泌释放到组织微环境中, 伴随早期炎症反应的进行, IL-6 表达量在创面组织

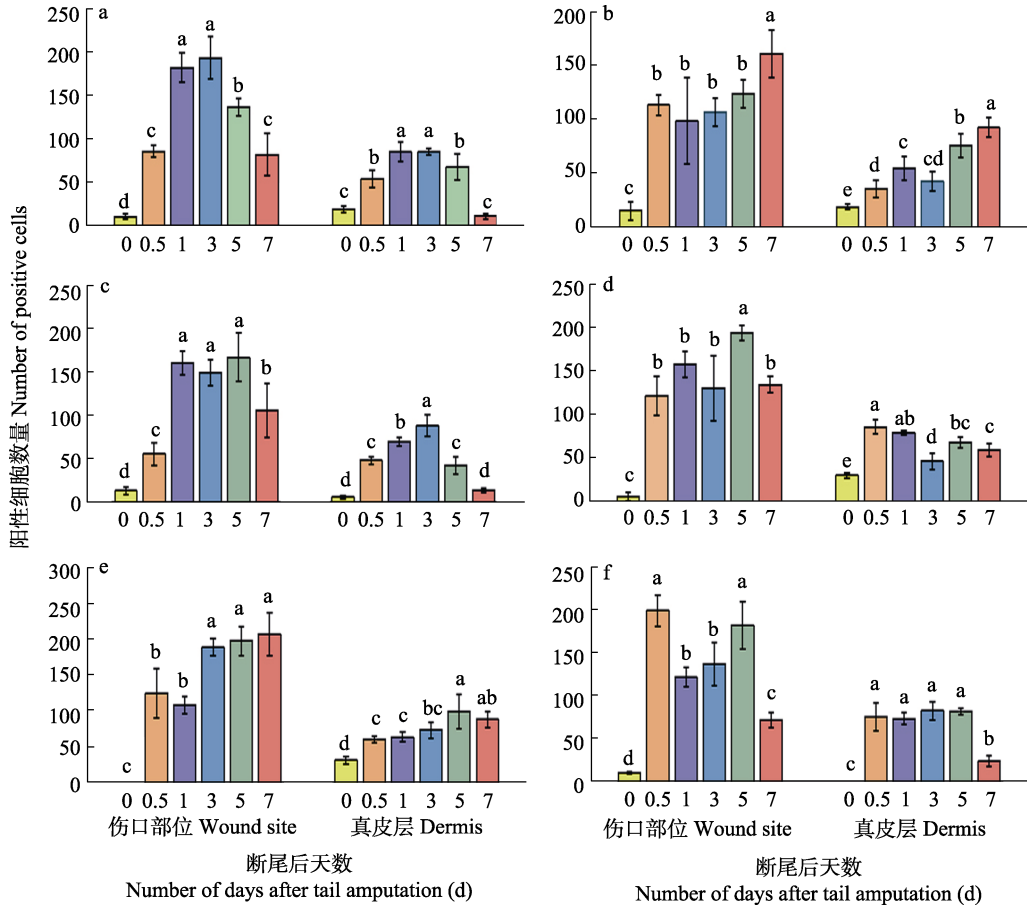


图7 秦岭滑蜥炎症阶段的6种免疫因子的定量统计

Fig. 7 Quantitative statistics of six immune factors in the inflammatory stage of *Scincella tsinlingensis*

a. IL-6; b. IL-8; c. IL-1 β ; d. IL-1R1; e. TNF- α ; f. IL-10.

在伤口部位或真皮层, 不同颜色的柱状中, 不同的字母标注表示差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

In the wound site or dermis, different letter marks in different color columns indicate significant statistical difference ($P < 0.05$).

细胞中呈上升趋势。在炎症后期, IL-6 表达量逐渐减弱, 有利于伤口愈合及后期的肌肉再生。

脊椎动物中均有趋化因子 IL-8 (Zhou et al. 2009, Wang et al. 2017)。IL-8 在炎症早期合成, 主要吸引 CXCR1 和 CXCR2 表达的中性粒细胞, 通过增加角质细胞的迁移和增殖在上皮化中发挥作用 (Barrientos et al. 2008, van der Aa et al. 2012)。IL-8 可能通过有效调节巨噬细胞的功能活性从而调节组织或器官自身免疫反应 (Smithson et al. 2005)。IL-8 在斑马鱼 (*Danio rerio*) 中作为一种中性粒细胞的趋化因子, 可

能在芽基形成的起始阶段保留 M2 型巨噬细胞 (Tsai et al. 2019)。在炎症反应早期, IL-8 会有局部的上调, 对单核细胞及中性粒细胞的招募和激活起着首要作用 (Gimbrone et al. 1989, Meniailo et al. 2018)。墨西哥钝口螈肢体再生早期, 截肢部位附近的细胞中观察到 IL-8 的阳性细胞参与早期肢体再生过程 (Tsai et al. 2019), 这与秦岭滑蜥断尾再生伤口愈合阶段情况类似。再生附肢中的芽基祖细胞通过 IL-8 发挥早期免疫调节作用, 并且通过其同源受体 CXCR-1/2 的信号传导启动再生, 为肢体再生

所必需 (Tsai et al. 2019)。在哺乳动物组织修复中, 巨噬细胞取代中性粒细胞并参与伤口消退的复杂过程, 早期巨噬细胞消耗影响整个再生过程, 但后期的消耗并不会阻碍再生。因此, 对早期炎症环境的正确调节是完成再生过程的关键 (Tan et al. 2019)。秦岭滑蜥断尾早期, IL-8 阳性细胞分布于创面及鳞片下真皮组织中, 在断尾再生早期过程有明显的上调, 与再生早期巨噬细胞的募集一致, 并且在断尾后 7 d 随着炎症反应结束, IL-8 的表达量恢复到正常水平。这表明 IL-8 参与秦岭滑蜥断尾早期再生过程, 并可能与伤口上皮发育相关。

白细胞介素 IL-1 β 是由活化的单核细胞和巨噬细胞产生的细胞因子, 可刺激细胞因子、趋化因子和基质金属蛋白酶等多种促炎介质的产生, 具有很强的促炎活性 (Yang et al. 2015)。IL-1 β 诱导增殖和早期再生基因表达, 巨噬细胞可能控制 IL-1 β 下调。IL-1 β 和 TNF- α 可诱导内皮细胞、成纤维细胞和局部免疫细胞的 CXCL8 表达 (van der Aa et al. 2012)。IL-1R 有 IL-1R I 和 IL-1R II 两种不同类型, 均可与 IL-1 α 和 IL-1 β 两种配体结合。IL-1R I 是一种 80 ku 的跨膜蛋白, 主要由 T 细胞、内皮细胞和成纤维细胞表达; IL-1R II 是一种 68 ku 的跨膜蛋白, 存在于 B 细胞、中性粒细胞、大颗粒白细胞、单核细胞和内皮细胞上。促炎症因子 IL-1 及其受体 IL-1R1 的表达变化趋势相一致, 可能与招募至创面的单核细胞和巨噬细胞的活化相关, 在秦岭滑蜥断尾再生的伤口愈合期间发挥作用。

巨噬细胞分泌的肿瘤坏死因子 TNF- α 是一种多功能促炎细胞因子, 通过其受体 Tnfrsf1 α /Tnfr1 和 Tnfrsf1 β /Tnfr2 结合发挥作用。伴随着创伤炎症反应的进行, 细菌的荚膜多糖 (CPS) 和脂多糖 (LPS) 诱发宿主机体产生 TNF- α , 作为触发因子引起自分泌, 进而促使 IL-1、IL-6、IL-8 等因子大量分泌, 分泌的 TNF- α 和 IL-1 还诱导氧自由基生成。TNF- α 的增加可使细胞网络平衡失调, 并导致组织细胞发生病理改变 (Eigler et al. 1997)。在斑马鱼中,

TNF- α 信号通路在尾鳍再生中必不可少 (Nguyen-Chi et al. 2017)。尾鳍再生早期, 招募至创面的巨噬细胞所分泌的 TNF- α 对斑马鱼尾鳍芽基的形成至关重要。秦岭滑蜥断尾后 0~7 d 为伤口愈合阶段, 大量 TNF- α 阳性巨噬细胞分布于创面中, 进而影响断尾芽基形成。

白细胞介素 IL-10 是一种强效的抗炎细胞因子, 抑制巨噬细胞增殖和细胞因子合成 (Gu et al. 2008), 通过抑制 IFN- γ 的合成, 从而下调 T 细胞的募集。此外, IL-10 还能抑制在疤痕中高表达的炎症细胞因子 TNF 和 IL-6 (van der Aa et al. 2012)。IL-10 通过抑制胶原蛋白的过度沉积, 防止疤痕的形成, 还能抑制伤口床中炎症趋化因子和促炎细胞因子的过度表达。胎儿组织中促炎细胞因子 IL-6 和 IL-8 表达水平极低, 抗炎细胞因子 IL-10 表达水平高, 可能是胎儿创伤愈合中缺乏炎症反应, 并由此形成无疤痕愈合的重要原因之一。绿色安乐蜥 (*Anolis carolinensis*) 断尾再生早期没有上调其他抗炎细胞因子, 但同时观察到炎症相关通路抑制基因的上调 (Xu et al. 2020)。IL-10 作为抗炎因子与促炎症因子同时存在微环境中, 通过抑制免疫细胞和免疫因子的分泌和增殖, 与促炎症因子共同调控秦岭滑蜥再生尾中的免疫炎症反应。

综上所述, 伤口愈合是秦岭滑蜥断尾再生启动的关键。促炎症因子 IL-6、IL-8、IL-1 β 及其受体 IL-1R1、TNF- α 和抗炎细胞因子 IL-10 与创面髓系来源细胞的空间分布相一致, 在秦岭滑蜥断尾再生伤口愈合过程中呈动态变化且保持平衡, 维持免疫抑制的微环境、实现无疤痕伤口愈合并促进芽基形成。

参 考 文 献

- Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko M S, et al. 2008. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 16(5): 585–601.
- Cheng N X, Liu C, Li Y L, et al. 2020. MicroRNA-223-3p promotes skeletal muscle regeneration by regulating inflammation in mice.

- The Journal of Biological Chemistry, 295(30): 10212–10223.
- Degan M, Dalla V L, Alibardi L. 2021. Gene expression in regenerating and scarring tails of lizard evidences three main key genes (*wnt2b*, *egfl6*, and *arhgap28*) activated during the regulated process of tail regeneration. *Protoplasma*, 258(1): 3–17.
- Donnelly T J, Meade P, Jagels M, et al. 1994. Cytokine, complement, and endotoxin profiles associated with the development of the adult respiratory distress syndrome after severe injury. *Critical Care Medicine*, 22(5): 768–776.
- Eigler A, Sinha B, Hartmann G, et al. 1997. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. *Immunology Today*, 18(10): 487–492.
- Gimbrone M A, Obin M S, Brock A F, et al. 1989. Endothelial interleukin-8: a novel inhibitor of leukocyte-endothelial interactions. *Science*, 246(4937): 1601–1603.
- Godwin J W, Pinto A R, Rosenthal N A. 2013. Macrophages are required for adult salamander limb regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(23): 9415–9420.
- Godwin J W, Rosenthal N. 2014. Scar-free wound healing and regeneration in amphibians: Immunological influences on regenerative success. *Differentiation*, 87(1/2): 66–75.
- Gu Y P, Yang J F, Ouyang X S, et al. 2008. Interleukin 10 suppresses Th17 cytokines secreted by macrophages and T cells. *European Journal of Immunology*, 38(7): 1807–1813.
- He B Q, Song H H, Wang Y J. 2021. Self-control of inflammation during tail regeneration of lizards. *Journal of Developmental Biology*, 9(4): 48.
- Hoch R C, Rodríguez R, Manning T, et al. 1993. Effects of accidental trauma on cytokine and endotoxin production. *Critical Care Medicine*, 21(6): 839–845.
- Keel M, Schrengenberger N, Steckholzer U, et al. 1996. Endotoxin tolerance after severe injury and its regulatory mechanisms. *The Journal of Trauma*, 41(3): 430–438.
- Mastellos D C, Deangelis R A, Lambris J D. 2013. Complement-triggered pathways orchestrate regenerative responses throughout phylogenesis. *Seminars in Immunology*, 25(1): 29–38.
- Meniailo M E, Malashchenko V V, Shmarov V A, et al. 2018. Interleukin-8 favors pro-inflammatory activity of human monocytes/macrophages. *International Immunopharmacology*, 56: 217–221.
- Mescher A L, Neff A W, King M W. 2017. Inflammation and immunity in organ regeneration. *Developmental & Comparative Immunology*, 66: 98–110.
- Muñoz-Cánoves P, Scheele C, Pedersen B K, et al. 2013. Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword? *The FEBS Journal*, 280(17): 4131–4148.
- Nguyen-Chi M, Laplace-Builhé B, Travnickova J, et al. 2017. TNF signaling and macrophages govern fin regeneration in zebrafish larvae. *Cell Death & Disease*, 8(8): e2979.
- Rios F M, Zimmerman L M. 2015. *Immunology of Reptiles*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 1–7.
- Smithson A, Sarrias M R, Barcelo J, et al. 2005. Expression of interleukin-8 receptors (CXCR1 and CXCR2) in premenopausal women with recurrent urinary tract infections. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(12): 1358–1363.
- Tan J J, Wang L, Mo T T, et al. 2019. Pepsin promotes IL-8 signaling-induced epithelial-mesenchymal transition in laryngeal carcinoma. *Cancer Cell International*, 19: 64.
- Tsai S L, Baselga-Garriga C, Melton D A. 2019. Blastemal progenitors modulate immune signaling during early limb regeneration. *Development*, 146(1): dev169128.
- van der Aa L M, Chadzinska M, Golbach L A, et al. 2012. Pro-inflammatory functions of carp CXCL8-like and CXCL chemokines. *Developmental & Comparative Immunology*, 36(4): 741–750.
- Wang G L, Wang M C, Zhang X W, et al. 2017. Molecular cloning, biological effect, and tissue distribution of interleukin-8 protein in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) upon *Flavobacterium columnare* infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 66: 112–119.
- Wynn T A, Vannella K M. 2016. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. *Immunity*, 44(3): 450–462.
- Xu C, Hutchins E D, Tokuyama M A, et al. 2020. Transcriptional analysis of scar-free wound healing during early stages of tail regeneration in the green anole lizard, *Anolis carolinensis*. *Journal of Immunology and Regenerative Medicine*, 7: 100025.
- Yang C, Sun J Y, Kou Z T, et al. 2023. Neurogenesis in the

- regenerating tail of tsinling dwarf skinks (*Scincella tsinlingensis*). Acta Zoologica, [J/OL]. [2023-05-01]. <https://doi.org/10.1111/azo.12464>.
- Yang C, Sun J Y, Wang X, et al. 2022a. Wnt1 and Wnt2b immunodetection of the regenerating tail and comparative ultrastructure of tail spinal cord in the *Scincella tsinlingensis*. International Journal of Morphology, 40(5): 1202–1208.
- Yang C, Wang X, Zhang H H, et al. 2022b. Microscopical observations on the regenerating tail of tsinling dwarf skink (*Scincella tsinlingensis*). Micron, 154: 103215.
- Yang W, Yu X H, Wang C, et al. 2015. Interleukin-1 β in intervertebral disk degeneration. Clinica Chimica Acta, 450: 262–272.
- Zhou X X, Guo Q L, Dai H P. 2009. Molecular characterization and expression profiles in response to bacterial infection of Chinese soft-shelled turtle interleukin-8 (IL-8), the first reptilian chemokine gene. Developmental & Comparative Immunology, 33(7): 838–847.
- 高景恒, 袁继龙, 石杰. 2018. 细胞因子与再生医学. 中国美容整形外科杂志, 29(6): 384–387.
- 伍志琴, 杨燕宁, 邢怡桥, 等. 2011. 小鼠单纯疱疹病毒性角膜炎中基质金属蛋白酶-2、8、9 阳性细胞计数及意义. 中华临床医师杂志: 电子版, 5(2): 417–422.
- 赵禹, 李琳, 寇墨婷, 等. 2020. α -细辛醚对秦岭滑蜥断尾后芽基形成时期细胞增殖的影响. 野生动物学报, 41(1): 165–170.
- 朱方强, 陈民佳, 朱明, 等. 2017. 炎症与组织再生修复. 中华损伤与修复杂志: 电子版, 12(1): 72–76.

西藏墨脱发现小鸦鹃

Lesser Coucal *Centropus bengalensis bengalensis* Found in Medog, Xizang, China

2022 年 5 月 28 日, 在墨脱县城周边农田(95°20'16" E, 29°20'28" N, 海拔 956 m)拍摄到 1 只鸦鹃属(*Centropus*)鸟类。该鸟头、颈、胸、腹均为黑色, 背部和两翼为棕褐色, 颈和背有白色丝状羽, 尾羽黑褐色; 虹膜黑褐色(图 1)。通过查阅相关专著(郑光美 2017, 赵欣如 2018, 约翰·马敬能等 2022), 中国知网、万方、维普等学术网站, 以及中国观鸟记录中心(<http://www.birdreport.cn>)等网络资料, 确定该鸟为小鸦鹃(*C. bengalensis*), 在我国西藏地区无分布。根据《中国鸟类观察手册》关于该物种的描述, 其分布图范围包括西藏地区, 但文字描述并未明确该地区的分布(刘阳等 2021)。故推测本次为该鸟种在西藏地区的首次影像记录。

小鸦鹃属于鹃形目(Cuculiformes) 杜鵑科(Cuculidae), 全球共计 6 个亚种, *bengalensis* 亚种分布于喜马拉雅山麓(北阿坎德邦以东)、印度北部、孟加拉国、东南亚大陆; *lignator* 亚种分布于中国台湾和海南以及南部和东南部(Dickinson et al. 2013, Payne 2020)。在我国仅记录 *lignator* 亚种, 见于河北、河南南部、陕西、云南、贵州南部、湖北、湖南、安徽南部、江西、江苏、上海、浙江、福建、广东、香港、澳门、广西、海南和台湾, 在江苏主要为夏候鸟, 其他地区多为地方性常见留鸟, 胶东半岛有夏候鸟记录(郑光美 2017, 刘阳等 2021)。根据分布区推测, 本次记录的个体应为 *bengalensis* 亚种, 目前该亚种在国内还没有被记录的证据。

(下转第 268 页)

基金项目 第二次青藏高原综合科学考察研究项目(No. 2019QZKK0402);

* 通讯作者, E-mail: wangrx@eastern-himalaya.cn, 187045562@qq.com;

第一作者介绍 高泰, 男, 硕士研究生; 研究方向: 鸟类生态学; E-mail: 643473902@qq.com。

收稿日期: 2022-06-17, 修回日期: 2023-04-28 DOI: 10.13859/j.cjz.202322149