



本取自其自体供皮区剩余皮肤,均征得患者同意。取材时间为伤后 7~12 个月。其中男 4 例、女 4 例,年龄 4~11 岁[(6.7±0.9)岁]。烧伤面积为 2%~26% TBSA,深 II、III 度。采用等渗盐水清洗标本血污,去除皮下脂肪后,称取 7.0 g 用等渗盐水冲洗后,置入 DMEM 培养基(含 10 U/L 青霉素)中,并将其修剪成 0.5~1.0 mm<sup>3</sup> 的组织块。Hank 液漂洗 3 次,各取 0.4 g(湿重)组织块分装于 EP 管中待用。以上步骤需在 4 h 内完成。

2. 不同作用条件对 MC 组胺释放的影响:(1)不同浓度的 SP 对组胺释放的影响:采用 DMEM 培养液(含体积分数 10% 小牛血清和 3 × 10<sup>-3</sup> mol/L CaCl<sub>2</sub>) 配制如下浓度溶液 0.5 ml:0(即 DMEM 培养液)、1 × 10<sup>-6</sup>、5 × 10<sup>-6</sup>、1 × 10<sup>-5</sup>、5 × 10<sup>-5</sup>、1 × 10<sup>-4</sup> mol/L SP,再分别加入含组织块的 6 个 EP 管中,置于 37 °C 水浴中摇动作用 30 min,吸出上清液后存于 -70 °C 冰箱中直至组胺检测。(2)SP 作用不同的时间对组胺释放的影响:用上述 DMEM 培养液配制浓度为 5 × 10<sup>-5</sup> mol/L 的 SP 溶液,分别加入含组织块的 5 个 EP 管中,在 37 °C 水浴中摇动作用 0(即加入 SP 溶液摇匀后立即吸出上清液)、5、15、30、60 min,吸出上清液同前处理。(3)不同浓度的 Ca<sup>2+</sup> 对组胺释放的影响:用 DMEM 培养液(含体积分数 10% 小牛血清和 5 × 10<sup>-5</sup> mol/L SP) 配制如下浓度溶液 0.5 ml:0(DMEM 培养液中加入 1 × 10<sup>-4</sup> mol/L 乙二醇四乙酸去除微量 Ca<sup>2+</sup>)、5 × 10<sup>-5</sup>、5 × 10<sup>-4</sup>、1 × 10<sup>-3</sup>、3 × 10<sup>-3</sup>、5 × 10<sup>-3</sup> mol/L CaCl<sub>2</sub>。再分别加入含组织块的 6 个 EP 管中,于 37 °C 水浴中摇动作

用 30 min,吸出上清液同前处理。以上标本为样品组胺,用于检测 MC 脱颗粒释放的组胺。随后在 17 个 EP 管中分别加入去离子水,煮沸 20 min 以破坏细胞,释放出组胺,再摇匀后于 1 500 × g 离心 10 min,吸出上清液同前处理,检测组织块中的剩余组胺。

3. 组胺的测定及其释放率的计算:参照文献[4,5]提取前述冻存的上清液标本中的组胺,参照文献[6]提纯组胺,与邻苯二甲醛形成稳定荧光物质后,用 F-2500 型荧光分光光度计(日本日立公司)在激发波长 360 nm、荧光波长 450 nm 下测定荧光强度。组胺释放率 = 样品组胺荧光强度 ÷ (样品组胺荧光强度 + 剩余组胺荧光强度) × 100%。

4. 统计学处理:数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS 10.0 统计软件行单因素方差分析、成对 *t* 检验。

### 结 果

1. 1 × 10<sup>-6</sup> ~ 1 × 10<sup>-4</sup> mol/L SP 刺激 MC 30 min, HS、NS 组胺释放率均明显高于 0 mol/L SP 刺激时 (*P* < 0.01)。SP 的浓度对 HS 组胺释放率的影响明显强于 NS (*P* < 0.01)。见表 1。

2. 在 5 × 10<sup>-5</sup> mol/L SP 的刺激下, HS、NS 组胺释放率随着作用时间的延长而上升,且 SP 的作用时间对 HS 组胺释放率的影响明显强于 NS (*P* < 0.01)。作用 15 min 时, HS 约有 90% 的组胺释放,见表 2。

3. 除当 Ca<sup>2+</sup> 浓度为 1 × 10<sup>-3</sup> mol/L 时, HS、NS 的组胺释放率有所下降外,其余则基本随着 Ca<sup>2+</sup> 浓度的上升而增高。Ca<sup>2+</sup> 浓度对 HS 组胺释放率的影响明显强于 NS (*P* < 0.01)。见表 3。

表 1 不同浓度的 SP 对人 HS 及 NS 组织组胺释放率的影响(%,  $\bar{x} \pm s$ )

标本类别	SP 作用浓度 (mol/L)					
	0	1 × 10 <sup>-6</sup>	5 × 10 <sup>-6</sup>	1 × 10 <sup>-5</sup>	5 × 10 <sup>-5</sup>	1 × 10 <sup>-4</sup>
HS 组织	44.0 ± 3.2	50.0 ± 3.6*	55.0 ± 1.9*Δ	57.1 ± 1.5*Δ☆	60.5 ± 1.4*Δ☆▲	63.2 ± 2.6*Δ☆▲★
NS 组织	35.4 ± 2.2	44.1 ± 2.2**	49.8 ± 2.4**Δ	52.3 ± 1.4**Δ☆	56.9 ± 1.6**Δ☆▲	58.7 ± 2.0**Δ☆▲□

注:各浓度的样本数为 8 个;与 HS 组织比较, \* *P* < 0.01;与 0 mol/L SP 比较, # *P* < 0.01;与 1 × 10<sup>-6</sup> mol/L SP 比较, Δ *P* < 0.01;与 5 × 10<sup>-6</sup> mol/L SP 比较, ☆ *P* < 0.05;与 1 × 10<sup>-5</sup> mol/L SP 比较, ▲ *P* < 0.01;与 5 × 10<sup>-5</sup> mol/L SP 比较, ★ *P* < 0.05, □ *P* < 0.01

表 2 SP 作用不同的时间对人 HS 及 NS 组织组胺释放率的影响(%,  $\bar{x} \pm s$ )

标本类别	样本数 (个)	SP 作用时间 (min)				
		0	5	15	30	60
HS 组织	40	45.3 ± 2.6	50.1 ± 1.4*	52.8 ± 1.4*Δ	56.2 ± 2.0*Δ☆	57.2 ± 2.2*Δ☆
NS 组织	40	32.3 ± 1.6	37.2 ± 2.2**	41.5 ± 2.2**Δ	50.2 ± 1.7**Δ☆	51.1 ± 1.5**Δ☆

注:与 HS 组织比较, \* *P* < 0.01;与作用 0 min 比较, # *P* < 0.01;与作用 5 min 比较, Δ *P* < 0.05;与作用 15 min 比较, ☆ *P* < 0.01

表 3 不同浓度 Ca<sup>2+</sup> 对人 HS 及 NS 组织组胺释放率的影响(%,  $\bar{x} \pm s$ )

标本类别	Ca <sup>2+</sup> 浓度 (mol/L)					
	0	5 × 10 <sup>-5</sup>	5 × 10 <sup>-4</sup>	1 × 10 <sup>-3</sup>	3 × 10 <sup>-3</sup>	5 × 10 <sup>-3</sup>
HS 组织	36.4 ± 4.2	45.6 ± 1.8*	51.3 ± 2.0*Δ	43.3 ± 3.5*Δ☆	54.0 ± 6.3*Δ☆▲	59.0 ± 2.6*Δ☆▲★
NS 组织	31.2 ± 2.3	39.2 ± 3.3**	47.4 ± 1.8**Δ	34.8 ± 2.6**Δ☆	49.5 ± 1.1**Δ☆▲	53.3 ± 3.1**Δ☆▲□

注:各浓度的样本数为 8 个;与 HS 组织比较, \* *P* < 0.01;与 0 mol/L Ca<sup>2+</sup> 比较, # *P* < 0.01;与 5 × 10<sup>-5</sup> mol/L Ca<sup>2+</sup> 比较, Δ *P* < 0.01;与 5 × 10<sup>-4</sup> mol/L Ca<sup>2+</sup> 比较, ☆ *P* < 0.01;与 1 × 10<sup>-3</sup> mol/L Ca<sup>2+</sup> 比较, ▲ *P* < 0.01;与 3 × 10<sup>-3</sup> mol/L Ca<sup>2+</sup> 比较, ★ *P* < 0.05, □ *P* < 0.01

### 讨 论

本研究表明,人 HS 中 MC 脱颗粒释放组胺存在 SP 剂量依赖性,即当 SP 达到一定浓度时,MC 组胺释放率随 SP 浓度增加而升高。这与以往在小鼠及大鼠皮肤、黏膜和人 NS 的 MC 实验中得到的结论相同<sup>[7-9]</sup>,但同一浓度的 SP 在人 HS 中的作用效果强于 NS。Weidner 等<sup>[10]</sup>用微透析法研究人 NS 中 SP 作用的结果证明,SP 浓度超过  $1 \times 10^{-9}$  mol/L 时有蛋白溢出, $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-6}$  mol/L 则使蛋白溢出但无组胺释放,仅当浓度达到  $1 \times 10^{-5}$  mol/L 才使 MC 组胺显著释放。本研究表明,当 SP 浓度达到  $1 \times 10^{-6}$  mol/L 时,人 NS 中的 MC 即显著释放组胺,仅为文献<sup>[10]</sup>浓度的 1/10。

Ebertz 等<sup>[4]</sup>对人 NS 的研究表明,MC 自发性组胺释放率仅为 10.3%,当 SP 浓度为  $1 \times 10^{-5} \sim 5 \times 10^{-4}$  mol/L 时,组胺释放率增加了 1.3% ~ 25.1%。本研究表明,HS 中 MC 自发性组胺释放率约为 44.0%,SP 浓度为  $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-4}$  mol/L 时,组胺释放率增加了 13.6% ~ 43.6%。由此可见,与 NS 比较,HS 的 MC 更易脱颗粒,并且 SP 对它的 MC 作用更显著。笔者在本实验中还观察到,随着作用时间的延长,MC 组胺释放率显著上升,呈明显的时间依赖性。此现象与以往的研究结果<sup>[4,8]</sup>一致。本实验中 SP 作用 15 min 时,HS 中的 MC 已有 90% 的组胺释放;而 15 min 内,人 NS 中仅有 80% 的组胺释放<sup>[4]</sup>,也说明 SP 对 HS 中 MC 的作用强于 NS。

SP 对 HS 中 MC 的作用受  $Ca^{2+}$  浓度影响,其可能机制为神经冲动传导时引起离子通道开放,外钙内流,促使囊泡释放 SP。本实验结果表明,HS 组织块经  $Ca^{2+}$  拮抗剂乙二胺四乙酸预处理后,组胺释放率最低(约 36.4%),低于有  $Ca^{2+}$  存在时组胺的自发性释放率 45.3%;当  $Ca^{2+}$  浓度为  $5 \times 10^{-3}$  mol/L 时,释放率最高;当  $Ca^{2+}$  为  $1 \times 10^{-3}$  mol/L 时,MC 组胺释放率出现一过性下降。这与 Ebertz 等<sup>[4]</sup>的研究结果相似,说明 SP 对 MC 释放组胺的影响受  $Ca^{2+}$  浓度的调控。

瘢痕增生过程实质是胶原大量合成的过程,组胺有促进成纤维细胞合成胶原纤维的作用,SP 是促使成纤维细胞有丝分裂的重要因素之一<sup>[11]</sup>,并且组胺和 SP 是引起瘙痒、潮红的重要介质。含 SP 的神经纤维与 MC 直接连接,SP 可诱导 MC 脱颗粒释放

活性物质,引起免疫反应和瘙痒性炎症,加重 HS 患者的痛苦。有研究表明,应用 SP 拮抗剂可治疗与 SP 和 MC 相关的皮肤性疾病<sup>[12,13]</sup>,起决定性作用的是神经激肽(NK)1 受体拮抗剂<sup>[14]</sup>。深入研究 SP 与 MC 的相互作用及其机制,有利于揭示许多皮肤性疾病,包括 HS 的发病机制;应用 SP 及 SP 受体拮抗剂阻断二者的作用,有望成为治疗 HS 的新方法,具有广阔的临床应用前景。

### 参 考 文 献

- Oehlke J, Lorenz D, Wiesner B, et al. Studies on the cellular uptake of substance P and lysine-rich, KLA-derived model peptides. *J Mol Recognit*, 2005, 18: 50 - 59.
- 陈亮,李世荣,丛林. 皮肤中的肥大细胞与神经肽 P 物质. *中国临床康复*, 2004, 8: 334 - 335.
- He SH. Key role of mast cells and their major secretory products in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 2004, 10: 309 - 318.
- Ebertz JM, Hirshman CA, Kettelkamp NS, et al. Substance P-induced histamine release in human cutaneous mast cells. *J Invest Dermatol*, 1987, 88: 682 - 685.
- Onuoha GN, Alpar EK. Calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides in the plasma of patients with soft tissue injury. *Life Sci*, 1999, 65: 1351 - 1358.
- 窦淑筠,符云峰. 血及组织中组织胺的荧光测定法. *中华医学检验杂志*, 1981, 4: 100 - 102.
- Heppt W, Dinh TQ, Cryer A, et al. Phenotypic alteration of neuropeptide-containing nerve fibres in seasonal intermittent allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy*, 2004, 34: 1105 - 1110.
- Theoharides TC, Donelan JM, Papadopoulou N, et al. Mast cells as targets of corticotropin-releasing factor and related peptides. *Trends Pharmacol Sci*, 2004, 25: 563 - 568.
- Fischer A, Wussow A, Cryer A, et al. Neuronal plasticity in persistent perennial allergic rhinitis. *J Occup Environ Med*, 2005, 47: 20 - 25.
- Weidner C, Klede M, Rukwied R, et al. Acute effects of substance P and calcitonin gene-related peptide in human skin—a micro dialysis study. *J Invest Dermatol*, 2000, 115: 1015 - 1020.
- Jiang W, Wang ZG, Lai XN, et al. Effects of substance P on granulation tissue fibroblasts proliferation and expression of basic fibroblast growth factor mRNA. *Chin J Surg*, 2004, 42: 366 - 368.
- Erin N, Ersoy Y, Ercan F, et al. NK-1 antagonist CP99994 inhibits stress-induced mast cell degranulation in rats. *Clin Exp Dermatol*, 2004, 29: 644 - 648.
- Massaad CA, Safieh-Garabedian B, Poole S, et al. Involvement of substance P, CGRP and histamine in the hyperalgesia and cytokine upregulation induced by intraplantar injection of capsaicin in rats. *J Neuroimmunol*, 2004, 153: 171 - 182.
- D'Andrea MR, Saban MR, Gerard NP, et al. Lack of neurokinin-1 receptor expression affects tissue mast cell numbers but not their spatial relationship with nerves. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005, 288: 491 - 500.

(收稿日期:2005 - 10 - 21)

(本文编辑:莫愚)