

· 论 著 ·

氯化镧对大鼠创伤组织成纤维细胞凋亡的影响

钟晓春 戴育成 曹勇 李国辉 李洁 吴燮卿 刘强

【摘要】 目的 探讨氯化镧对创伤组织中成纤维细胞凋亡的影响及其防治瘢痕的可能性。

方法 选用 50 只成年 SD 大鼠,在其背部近四肢关节处各制作 1 个切口。其中 1 个切口不作任何处理,作为空白对照组;其余切口两侧皮下各注射 3 蒸水、50 mmol/L 氯化镧以及 0.2 mg/ml 的抗转化型生长因子 β_1 抗体(注射量均为 0.25 ml),相应设为模拟对照组、氯化镧组和抗体组。用药后 14、28 d,采用流式细胞仪(FCM)和原位末端酶标记(TUNEL)法,检测伤口组织标本中成纤维细胞凋亡情况及细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化。**结果** 与两对照组比较,用药 14 d 后,氯化镧组及抗体组伤口成纤维细胞凋亡明显增强($P < 0.05 \sim 0.01$),前者细胞内 Ca^{2+} 浓度明显增高($P < 0.01$)。**结论** 提示氯化镧具有一定的防治瘢痕作用。

【关键词】 氯化镧; 创伤; 成纤维细胞; 凋亡; 瘢痕

Effects of lanthanum chloride on the apoptosis of fibroblasts in trauma tissue ZHONG Xiao-chun, DAI Yu-cheng, [CAO Yong], LI Guo-hui, LI Jie, WU Xie-qing, LIU Qiang. Department of Burns, The Second People's Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310015, Zhejiang Province, P. R. China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of lanthanum chloride on the apoptosis of fibroblasts in trauma tissue. **Methods** Fifty adult female SD rats were used and linear incisions were made on the back near the joints of extremities of the rats. One of the cuts receiving no treatment was designated as blank control (C). 0.25 ml of distilled water, lanthanum chloride (50 mmol/L) and the antibody of (TGF β_1) transforming growth factor β_1 (0.2 mg/ml) were respectively injected into the both sides of the other three wounds subcutaneously and the wounds were divided into simulating control (SC), lanthanum chloride(LC) and antibody (A) groups. The fibroblast apoptosis in the wound tissue samples and the change in intracellular calcium concentration (Ca^{2+}) were determined by flow cytometry (FCM) and TUNEL methods on the 14th and 28th day after the injection. **Results** Apoptosis of fibroblasts was enhanced significantly after 14 days of injection in LC and A groups compared with that in C and SC groups ($P < 0.05 \sim 0.01$). Furthermore, intracellular Ca^{2+} was increased evidently in LC group ($P < 0.01$). **Conclusion** It is indicated that lanthanum chloride might be effective in preventing scar development.

【Key words】 Lanthanum chloride; Trauma; Fibroblasts; Apoptosis; Scar

过度瘢痕形成是一个常见而难治的临床问题,成纤维细胞凋亡数量减少是瘢痕形成的原因之一。有研究报道,钙通道阻滞剂有防治瘢痕的作用,可使瘢痕软化褪色、挛缩消失、面积减少^[1]。稀土金属为钙通道阻滞剂或流动抑制剂之一,其性质类似于钙。例如镧系,其离子半径接近钙的离子半径,可结合在钙的结合位点上;由于它们具有更高的电荷,有保持在该位点上的倾向,可抑制 Ca^{2+} 相关体系的活性^[2]。由此推断,稀土金属化合物尤其是镧系,可能有防治瘢痕的作用。本研究探讨了氯化镧对大鼠创口成纤维细胞凋亡的影响及可能机制,以期为瘢痕防治提供新思路。

材 料 与 方 法

一、主要试剂和仪器

流式细胞仪(FCM)购自美国 Biotium 公司;荧光显微镜购自日本 Olympus 公司;病理图像分析仪购自北京麦克奥迪图像技术有限公司;DeadEnd™ 细胞凋亡比色检测试剂盒购自美国 Promega 公司;Fluo-3 荧光探针购自美国 Biotium 公司;氯化镧($LaCl_3 \cdot 7H_2O$, 纯度 99.9%)购自美国 Sigma 公司。

二、实验动物及分组

成年 SD 大鼠(本院实验动物中心)50 只,均为雌性,体重 225 ~ 250 g。以氯胺酮(100 mg/kg)进行腹腔内麻醉后,参考 Shah 等^[3]的方法,将每只大鼠背部近四肢关节处去毛,各做 1 个长 1 cm、深至肌膜的切口,身体两侧切口至体中线的距离相等。对此 4 个切口分别进行如下处理:(1)不注入任何液

作者单位:310015 杭州市第二人民医院烧伤科(钟晓春);江西医学院附属第一医院烧伤科(戴育成、曹勇)、李国辉、李洁、吴燮卿、刘强)

体(空白对照组);(2)于切口两侧皮下注入 0.25 ml 无菌三蒸水(模拟对照组);(3)于切口两侧皮下注入 50 mmol/L 的氯化镧 0.25 ml(氯化镧组,氯化镧经三蒸水溶解稀释、过滤除菌);(4)于切口两侧皮下注入 0.2 mg/ml 抗转化型生长因子 β_1 (TGF- β_1) 抗体 0.25 ml(抗体组)。持续给药 3 d,每天 1 次。为消除身体不同部位伤口愈合的实验误差,这 4 种处理方法随机在 50 只大鼠的各切口上轮流采用。切口不予缝合,使其自愈,大鼠单笼喂养。分别于给药后 14、28 d 时,各处死 25 只动物,取切口处及其周边 0.5 cm 范围内的组织(部分制成组织切片),待检。

三、检测指标与方法

1. 成纤维细胞凋亡的检测:(1)FCM 检测:按文献[4]方法进行。用药后 14、28 d,取伤口真皮和皮下组织,经酶消化获取 1×10^4 个细胞,进行 FCM 检测,所得结果单位为率(P)。采用美国 BD 公司的 C 软件、MF LT 软件进行分析,计算成纤维细胞凋亡率,以 $\sin^{-1}\sqrt{P}$ 表示。(2)原位末端酶标记(TUNEL)法:用药后 14 d 时,取伤口组织的石蜡包埋切片,采用 DeadEnd™ 细胞凋亡比色检测试剂盒,按说明书及文献[5]方法检测。用光学显微镜观察结果,用病理图像分析仪进行分析处理,计算所检组织中成纤维细胞的凋亡百分率。

2. 成纤维细胞内 Ca^{2+} 浓度的检测:用药后 14 d,取伤口真皮组织,采用 Fluo-3 荧光探针,参照试剂盒说明书操作,用 FCM 进行测量。按下列公式计算细胞内 Ca^{2+} 浓度: $[Ca^{2+}] = kd(F-F_{min}) / (F_{max}-F)$ 。kd 代表测定波长,此处为 450 nm;F 代表荧光强度。

四、统计学处理

采用 SAS 软件,计量资料应用方差分析,计数资料应用 χ^2 检验。

结 果

1. 成纤维细胞凋亡的情况:(1)FCM 检测:用药 14 d 时,4 组切口均已愈合。与空白对照组或模拟对照组比较,氯化镧组及抗体组成纤维细胞凋亡率均增加,差异有显著性意义($P < 0.05$)。用药 28 d 时,氯化镧组及抗体组成纤维细胞凋亡率虽仍高于两对照组,但差异无显著性意义($P > 0.05$)。见表 1、图 1。(2)TUNEL 法:用药后 14 d 时,与两对照组比较,氯化镧组及抗体组成纤维细胞凋亡百分率均明显增加($P < 0.01$),见表 2。

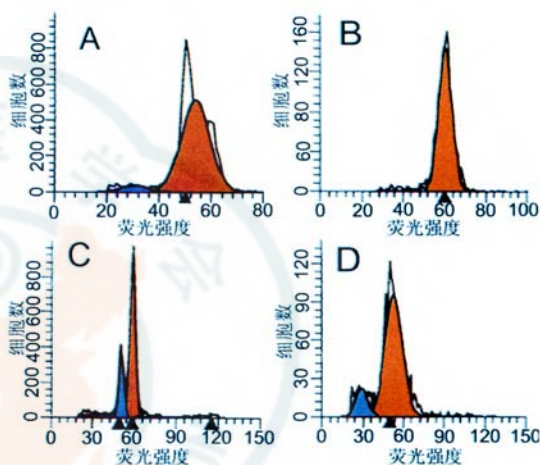
表 1 氯化镧对创伤组织中成纤维细胞凋亡率

的影响($\sin^{-1}\sqrt{P}$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The effect of lanthanum chloride on apoptosis rate of fibroblasts($\sin^{-1}\sqrt{P}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	标本数	用药后时间(d)	
		14	28
空白对照组	20	3.90 ± 0.69	2.68 ± 0.04
模拟对照组	20	1.40 ± 0.43	1.66 ± 0.09
氯化镧组	20	10.25 ± 1.15*	4.51 ± 0.10
抗体组	20	11.76 ± 2.96*	6.05 ± 0.08

注:与空白对照组或模拟对照组比较, * $P < 0.05$



注: A: 空白对照组 B: 模拟对照组 C: 氯化镧组 D: 抗体组

图 1 氯化镧对创伤组织中成纤维细胞凋亡的影响(用药后 14 d)

Fig 1 The effect of lanthanum chloride on fibroblast apoptosis in trauma tissue (14 days after application)

表 2 氯化镧对创伤组织中成纤维细胞凋亡百分率的影响

Tab 2 The effect of lanthanum chloride on apoptosis percentage of fibroblasts in trauma tissue

组别	检测总细胞数	凋亡细胞数	百分率(%)
空白对照组	391	16	4.1
模拟对照组	196	8	4.1
氯化镧组	153	23	15.0**
抗体组	271	46	17.0**

注:与空白对照组或模拟对照组比较, ** $P < 0.01$

2. 成纤维细胞内 Ca^{2+} 浓度的检测结果:用药后 14 d,氯化镧组与其余 3 组比较,细胞内 Ca^{2+} 浓度明显增高,差异有非常显著性意义($P < 0.01$);抗体组与两对照组比较,该指标未见升高($P > 0.05$),见表 3。

表 3 氯化镧对成纤维细胞内 Ca^{2+} 浓度的影响(nmol/L, $\bar{x} \pm s$)

Tab 3 The effect of lanthanum chloride on intracellular calcium concentration of the fibroblasts(nmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	标本数	Ca^{2+} 浓度
空白对照组	10	1.36 ± 0.24**
模拟对照组	10	2.62 ± 0.75**
氯化镧组	10	50.75 ± 11.45
抗体组	10	0.16 ± 0.03**

注:与氯化镧组比较, ** $P < 0.01$

讨 论

细胞内游离的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 的浓度对信号转导起重要作用,在多种细胞中,凋亡的诱导和抑制与信号转导通路有关。有学者认为,细胞内 Ca^{2+} 浓度的持续升高可以激活核酸内切酶,导致细胞凋亡的发生;在细胞内激活该酶所需的 Ca^{2+} 浓度比体外低约 99.9%^[6]。Messadi 等^[7]报道,在组织修复过程中,由于成纤维细胞不能发生凋亡,导致增生性瘢痕和纤维化病产生。

本研究中,笔者采用伤后 14、28 d 的创口及其周围组织进行检测。显微镜下可见,大部分细胞为成纤维细胞,虽然还包括中性粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞等,但其数量极少,可以忽略。结果显示,用药后 14 d,氯化镧组细胞内 Ca^{2+} 浓度显著增高,而抗体组无此现象,同时,两组伤口成纤维细胞凋亡均明显增强;用药后 28 d,两组伤口的成纤维细胞凋亡未明显增强。

一般认为,稀土金属化合物氯化镧既然为钙通道阻滞剂,使用后应导致细胞内 Ca^{2+} 浓度下降,但与凤志慧等^[8]报道的一致,本研究结果亦证实使用氯化镧后,细胞内 Ca^{2+} 浓度呈现上升。为何会出现这种矛盾的现象?笔者认为,其原因可能有:(1)氯化镧直接进入细胞内;(2)氯化镧在细胞膜上不仅抑制 Ca^{2+} 内流,而且抑制其外排,后者的作用大于前者;(3)氯化镧抑制 Ca^{2+} 进入细胞器内;(4)氯化镧进入细胞核内,置换出 Ca^{2+} 。由于细胞内 Ca^{2+} 浓度升高,激活了核苷酸内切酶,导致伤后 14 d 时伤口成纤维细胞凋亡增加,因为此时正是成纤维细胞的增生活跃期;至 28 d 时,已进入伤口的重塑期,故

成纤维细胞凋亡增加不明显。使用抗 TGF- β_1 抗体后,细胞内 Ca^{2+} 浓度未见上升,但成纤维细胞的凋亡却增加了,其原因不能用 Ca^{2+} 的因素来解释,应考虑凋亡的其他机制。

本研究结果提示,氯化镧在一定的浓度范围(50 mmol/L)内,可抑制创口组织中成纤维细胞的生长,诱导其凋亡,并使其细胞内 Ca^{2+} 浓度升高。氯化镧诱导成纤维细胞凋亡的原因可能是由于细胞内 Ca^{2+} 浓度升高,从而激活了核酸内切酶,引起 DNA 断裂所致。因此,氯化镧可能有防治瘢痕的作用,其具体机制值得进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Djokovic R, Karadagic D. Modern treatment of keloid. *Srp Arh Cleok Lek*, 1997, 125: 176-180.
- 2 Sreekumar P, Daniel DB. Lanthanum influx into cultured human keratinocytes: effect on calcium flux and treatment differentiation. *J Cell Physiol*, 1992, 151: 623-629.
- 3 Shah M, Foreman DM, Ferguson MWJ. Neutralising antibody to TGF $\beta_{1,2}$ reduces cutaneous scarring in adult rodents. *J Cell Sci*, 1994, 107: 1137-1157.
- 4 Hotz MA. Flow cytometric detection of apoptosis: comparison of the assay of in situ DNA degradation and chromatic changes. *Cytometry*, 1994, 15: 237-244.
- 5 卢圣栋, 主编. 现代分子生物学实验技术. 第 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999. 668-676.
- 6 Nikonova LV, Zoton RN, Vmanski SR. Isolation of $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -dependent nuclease from calf thymus chromatin. *Biokhimiya*, 1990, 54: 1397.
- 7 Messadi DV, Le A, Berg S, et al. Expression of apoptosis-associated genes by human dermal scar fibroblast. *Wound Repair Regen*, 1999, 8: 51-58.
- 8 凤志慧, 密泳, 沈浩, 等. 稀土元素镧对成纤维细胞的生物学作用. *中华预防医学杂志*, 2000, 34: 10-12.

(收稿日期: 2002-09-22)

(本文编辑: 罗 勤)

· 消息 ·

沉痛悼念方之扬教授

中国共产党优秀党员、我国著名医学教育家、临床烧伤外科学家、我军临床烧伤外科学的奠基人和开拓者之一,我国烧伤外科学的一代宗师、国际烧伤学会会员、中华医学会烧伤外科学会常务理事、中华医学会上海分会烧伤外科学会主任委员、《中华整形烧伤外科杂志》编委、第二军医大学第一附属医院主任医师、一级教授方之扬同志,因病医治无效,于 2003 年 9 月 17 日 8 时 50 分在上海逝世,享年 81 岁。方之扬同志遗体送别仪式已于 2003 年 9 月 24 日下午 1 时 30 分在上海市龙华殡仪馆大厅举行。

方之扬同志治丧委员会

欢迎订阅《中国药理学通报》

《中国药理学通报》是国家级核心期刊和权威的文献源期刊,主要刊登药理学研究论文,多次荣获国家及华东地区优秀科技期刊奖,2003 年更是荣获国家期刊奖百种重点期刊奖;被国家权威机构认定为医学类、药学类核心期刊,并被所有国内相关检索性期刊及数十种国外著名检索期刊收录、利用。连续 8 年名列美国《CA 千种表》,1997 年摘引量曾名列美国《CA 千种表》收录的中国医药期刊第 1 名。

《中国药理学通报》为月刊,大 16 开,120 页,印刷质量高,每期定价 12.00 元,全年 144.00 元。邮发代号:26-52,请及时向当地邮局订阅,漏订读者请直接汇款至本刊编辑部,免收邮寄费。地址:安徽省合肥市安徽医科大学校内《中国药理学通报》编辑部,邮编:230032,联系人:吴慧、武明静。电话:0551-5161221,电子信箱:cpb@ahmu.edu.cn。