·论著·

P 物质对病理性瘢痕成纤维细胞增殖及凋亡影响的实验研究

陈静 王甲汉 庄洪兴

【摘要】 **目的** 探讨 P 物质(SP)对不同病理性瘢痕成纤维细胞(Fb)增殖及凋亡的影响。 **方法** 增生性瘢痕、瘢痕疙瘩及手术剩余正常皮肤标本取自笔者单位 12 例烧伤患者,采用组织块培养法体外培养 Fb 并传至 6 ~ 8 代。根据 DMEM 培养液中培养物质的不同分为 SP 组(含 1×10^{-6} mol/L SP)、SP + SP 受体拮抗剂(spantide)组(含 1×10^{-6} mol/L SP、3×10^{-5} mol/L spantide)、空白对照组(含体积分数 10% 胎牛血清)。采用噻唑蓝比色法和流式细胞仪检测 SP、spantide 对瘢痕疙瘩 Fb(KSF)、增生性瘢痕 Fb(HSF)及正常真皮 Fb(NDF)增殖活性[吸光度(*A*)值]及凋亡率的影响;另取 1×10^{-6} mol/L SP 分别培养 Fb 24 ~ 120 h,以及 SP 组划分出 1×10^{-9} ~ 1×10^{-5} mol/L 的浓度梯度,检测 SP 对上述 3 组不同样本中 Fb 作用的时间、剂量效应。 **结果** 空白对照组各样本 Fb 的 *A* 值及凋亡率无明显差异。SP 组 KSF、HSF、NDF 的 *A* 值分别为 0.656 ± 0.071、0.525 ± 0.064、0.404 ± 0.063,凋亡率分别为(1.5 ± 0.3)%、(4.0 ± 0.5)%、(5.5 ± 0.7)%,与空白对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);SP 对 Fb 作用的强弱为 KSF > HSF > NDF。SP + spantide 组部分抑制 SP 对 KSF 的作用而完全抑制其对 HSF、NDF 的作用。SP 作用的时间、剂量效应检测结果显示,SP 对 KSF 的作用较 HSF、NDF 更加灵敏、持久。 **结论** SP 对不同病理性瘢痕 Fb 增殖、凋亡的影响符合病理性瘢痕的临床特征,提示 SP 在其形成过程中发挥了重要作用。

【关键词】 P 物质; 成纤维细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡; 病理性瘢痕

Influence of substance P on the proliferation and apoptosis of fibroblasts of pathological scars

CHEN Jing, WANG Jia-han, ZHUANG Hong-xing. *Department of Burns, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, P. R. China*

【**Abstract**】 **Objective** To further explore the effects of substance P on the proliferation and apoptosis of fibroblasts obtained from pathological scars in vitro. **Methods** Fibroblasts from keloid (KSF), hypertrophic scar (HSF) and normal dermis (NDF) of 12 burn patients were cultured in vitro and divided into control, SP (with 1×10^{-6} mol/L SP added to the culture medium), and SP + spantide (with 1×10^{-6} mol/L SP and 3×10^{-5} mol/L spantide added to the culture medium) groups. MTT method or flow cytometry assay was used for the determination of the proliferative activities or apoptotic rate of fibroblasts obtained from KSF, HSF and NDF with SP or Spantide. And then the fibroblasts in SP group were subdivided into 1×10^{-9} ~ 1×10^{-5} mol/L groups to examine the time-or dose-effect of SP to fibroblasts from different sources. **Results** In control group, different types of fibroblasts exhibited similar proliferative activities and apoptotic rates. But there was significant difference in these indices between control and SP group (the proliferative activity of KSF, HSF, NDF was 0.656 ± 0.071, 0.525 ± 0.064, 0.404 ± 0.063, respectively; and the apoptotic rate of KSF, HSF, NDF was [(1.5 ± 0.3) %, (4.0 ± 0.5) %, (5.5 ± 0.7) %, respectively], ($P < 0.05$). SP had stronger effect on KSF than it did to HSF, as well as it had stronger effect on HSF than it did to NDF. In SP + spantide group, the effect of SP on KSF was partially inhibited, while it was completely inhibited in cultures of HSF and NDF. KSF was more sensitive to SP and the effect was longer when compared with HSF. **Conclusion** SP may play an important role in the process of pathological scar formation due to its diverse effects on fibroblasts from different sources.

【**Key words**】 Substance P; Fibroblasts; Cell proliferation; Apoptosis; Pathological scar

P 物质(substance P, SP)是一种由皮肤感觉神经纤维末梢分泌的,具有明显促成纤维细胞(fibroblast, Fb)增殖的神经肽,其在增生性瘢痕中的含量明显高于普通瘢痕[1,2]。目前尚不清楚 SP 对不同程度瘢痕中 Fb 增殖的具体影响。本文拟通过体外检测 SP 对瘢痕疙瘩 Fb(KSF)、增生性瘢痕 Fb(HSF)及正常真皮 Fb(NDF)增殖、凋亡的影响,进一步阐明 SP 在病理性瘢痕形成中的作用。

作者单位:510515 广州,南方医科大学南方医院烧伤科(陈静、王甲汉);中国医学科学院中国协和医科大学整形外科医院北一区(庄洪兴)

版权所有 盗用必究 Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?

资料与方法

一、标本来源与细胞培养及分组

1. 标本来源：瘢痕疙瘩、增生性瘢痕和手术剩余正常皮肤真皮，来源于我科接受瘢痕整形术的 12 例烧伤患者（均知情同意）。其中男 6 例、女 6 例，年龄 18 ~ 50 岁[(31 ± 12)岁]。瘢痕形成时间为伤后 10 ~ 14 个月，诊断依据病史及病理检查结果。

2. 细胞培养与实验分组：参照组织块培养法体外培养不同样本的 Fb[3]，并传至 6 ~ 8 代。按不同细胞培养条件分为：SP 组，加入含终浓度为 1×10^{-6} mol/L SP 的 DMEM 培养液；SP + SP 受体拮抗剂（spantide）组，加入含终浓度 1×10^{-6} mol/L SP、3×10^{-5} mol/L spantide 的 DMEM 培养液；空白对照组，加入含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液。每组各项检测指标均重复测定 6 次。

二、检测指标

1. Fb 增殖活性的测定：将各组 Fb 接种于 96 孔板，根据分组情况加入不同培养液培养 72 h。弃去部分上清，采用噻唑蓝（MTT，美国 Sigma 公司）比色法[4]检测细胞增殖活性，以吸光度（A）值表示。

2. Fb 凋亡率（apoptotic rate，AR）的测定：参照文献[1]将 Fb 接种于 6 孔板，根据分组情况加入不同培养液培养 72 h。将细胞消化收集、离心，加入体积分数 70% 乙醇，4 ℃固定过夜，加入 RNA 酶（美国 Sigma 公司）孵育 30 min 后冰浴，再加入碘化丙啶染液（美国 Sigma 公司）避光孵育 30 min，滤网过滤后在 ELITE 型流式细胞仪（美国 Beckman 公司）上进行细胞 DNA 含量分析以检测 AR。

3. SP 对 Fb 增殖活性影响的时间效应：将 Fb 接种于 5 块 96 孔板，加入含终浓度为 1×10^{-6} mol/L SP 的培养液 100 μl/孔，每隔 24 h 取 1 块板，参照文献[4]检测 Fb 的增殖活性。

4. SP 对 Fb 增殖活性影响的剂量效应：将 SP 组划分出 1×10^{-9}、1×10^{-8}、1×10^{-7}、1×10^{-6}、1×10^{-5} mol/L 几个浓度梯度，其余分组条件不变，参照文献[4]检测 Fb 的增殖活性。

三、统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 SPSS 8.0 统计软件进行 F 检验。

结　　果

1. 与空白对照组比较，SP 组各 Fb 的 A 值均显著增高（$P < 0.05$）；SP + spantide 组各 Fb 的 A 值明显低于 SP 组（$P < 0.05$），其中 KSF 的 A 值高于空白对照组（$P < 0.05$）。空白对照组各 Fb 的 A 值相近（$P > 0.05$）；SP 组、SP + spantide 组 KSF 的 A 值显著高于 HSF、NDF，SP 组 HSF 的 A 值高于 NDF（$P < 0.05$），SP + spantide 组 HSF 与 NDF 的 A 值相近（$P > 0.05$）。见表 1。

表 1　各组 Fb 增殖活性的变化（A 值，$\bar{x} \pm s$）

组别	KSF	HSF	NDF
空白对照组	0.335 ± 0.046	0.347 ± 0.055	0.315 ± 0.029
SP 组	0.656 ± 0.071 *	0.525 ± 0.064 *△	0.404 ± 0.063 *△☆
SP + spantide 组	0.392 ± 0.047 *#	0.316 ± 0.042#△	0.289 ± 0.034#△

注：每组各项指标的样本数为 6；与空白对照组比较，* $P < 0.05$；与 SP 组比较，# $P < 0.05$；与组内 KSF 比较，△ $P < 0.05$；与组内 HSF 比较，☆ $P < 0.05$

2. 与空白对照组相比，SP 组各 Fb 的 AR 值均显著降低（$P < 0.05$）；SP + spantide 组各 Fb 的 AR 普遍高于 SP 组（$P < 0.05$），但 KSF 低于空白对照组（$P < 0.05$）。空白对照组 KSF、HSF 及 NDF 的 AR 相近（$P > 0.05$）；SP 组、SP + spantide 组 KSF、HSF 的 AR 均显著低于 NDF（$P < 0.05$），且 KSF 的 AR 亦明显低于 HSF（$P < 0.05$）。见表 2。

表 2　各组 Fb 的 AR 的变化（%，$\bar{x} \pm s$）

组别	KSF	HSF	NDF
空白对照组	6.9 ± 0.7	7.1 ± 0.8	7.6 ± 0.9
SP 组	1.5 ± 0.3 *△☆	4.0 ± 0.5 *△	5.5 ± 0.7 *
SP + spantide 组	3.7 ± 0.4 *#△☆	7.3 ± 0.6#△	7.9 ± 0.6#

注：每组各项指标的样本数为 6；与空白对照组比较，* $P < 0.05$；与 SP 组比较，# $P < 0.05$；与组内 NDF 比较，△ $P < 0.05$；与组内 HSF 比较，☆ $P < 0.05$

3. 随着培养时间延长，KSF、HSF、NDF 的 A 值显示出不同程度的升高。其中 KSF 的 A 值在培养 96 h 内不断升高（$P < 0.05$）；HSF 的 A 值在培养 72 h 内不断升高（$P < 0.05$）；NDF 的 A 值在培养 48、72 h 时两时相点间比较，差异有统计学意义（$P < 0.05$）。见表 3。

4. SP 组各浓度 SP 作用的 KSF 的 A 值均明显高于空白对照组（$P < 0.01$），其中 $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-5}$ mol/L SP 亦显著强于 SP + spantide 组（$P < 0.05$）。与空白对照组、SP + spantide 组相比，SP 组中 SP 的浓度为 $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-5}$ mol/L，HSF 的 A 值均显著增高（$P < 0.05$ 或 0.01）。与空白对照组、SP + spantide 组相比，SP 组中 SP 的浓度为 1×10^{-6}、1×10^{-5} mol/L，NDF 的 A 值均显著增高（$P < 0.05$ 或 0.01）。见表 4。

Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?

表 3 SP 对 Fb 增殖活性影响的时间效应（A 值，$\bar{x} \pm s$）

检测指标	样本数	培养时间(h)				
		24	48	72	96	120
KSF	30	0.471 ± 0.024	0.527 ± 0.039 *	0.575 ± 0.037 *	0.612 ± 0.024 *	0.625 ± 0.033
HSF	30	0.439 ± 0.044	0.485 ± 0.031 *	0.531 ± 0.043 *	0.538 ± 0.046	0.545 ± 0.036
NDF	30	0.394 ± 0.036	0.402 ± 0.025	0.437 ± 0.034 *	0.449 ± 0.048	0.458 ± 0.042

注：与前一时相点比较，* $P < 0.05$

表 4 SP 对 Fb 增殖活性影响的剂量效应（A 值，$\bar{x} \pm s$）

组别	样本数	KSF	HSF	NDF
空白对照组	18	0.369 ± 0.063	0.351 ± 0.108	0.342 ± 0.086
SP 组				
1×10^{-9} mol/L	18	0.521 ± 0.024 *	0.379 ± 0.105	0.369 ± 0.103
1×10^{-8} mol/L	18	0.536 ± 0.042 *#	0.427 ± 0.062 *#	0.372 ± 0.059
1×10^{-7} mol/L	18	0.542 ± 0.085 *#	0.458 ± 0.058 *#	0.384 ± 0.077
1×10^{-6} mol/L	18	0.596 ± 0.154 *#	0.479 ± 0.084 *#	0.437 ± 0.071 *#
1×10^{-5} mol/L	18	0.685 ± 0.162 *#	0.514 ± 0.071 *#	0.452 ± 0.053 *#
SP + spantide 组	18	0.438 ± 0.135	0.360 ± 0.127	0.356 ± 0.165

注：与空白对照组比较，* $P < 0.01$；与 SP + spantide 组比较，# $P < 0.05$

讨 论

瘢痕组织 Fb 可能来源于真皮深层的 Fb 亚群，与正常真皮 Fb 的特性不同[5]，并受细胞外各种活性分子的调节。寻找这些作用介质，是目前创面干预治疗的重要研究方向。

本文中 MTT 法检测结果显示，空白对照组 KSF、HSF、NDF 的增殖活性无明显差异；而在 SP 作用下 3 种 Fb 的增殖活性虽然普遍增强，但在程度上存在明显的差异，即 KSF > HSF > NDF，说明 SP 对病理性瘢痕 Fb 具有更强的促增殖能力。SP 对不同 Fb 的作用可被它的神经激肽（NK）1 受体拮抗剂 spantide 抑制或部分抑制，说明 SP 促 Fb 增殖作用与 NK1 功能有关。SP + spantide 组中 NDF、HSF 的活性与空白对照组比较无明显差异，而 KSF 的活性虽然低于 SP 组，但仍高于空白对照组，说明同样浓度的 spantide 可完全抑制 SP 对 NDF 和 HSF 的促增殖作用，而对 KSF 仅仅是部分抑制。分析造成这种现象的可能原因：KSF 上 NK1 受体分布较 NDF、HSF 多；KSF 上存在非 NK1 却可产生 NK1 样作用的 SP 受体；KSF 的 NK1 受体与 SP 结合更加紧密，产生的效应较 NDF、HSF 更加强烈、持久。

Fb 凋亡受到抑制与病理性瘢痕形成的关系已为大量研究所证实[6]。Messadi 等[7]的研究表明，正常皮肤 Fb 的 AR 较瘢痕疙瘩高 2 倍。与在体检测结果不同，体外研究证实病理性瘢痕与正常真皮 Fb 的 AR 无明显差异[8]，说明病理性瘢痕形成过程中细胞凋亡不足与细胞外因素有关。本研究结果表明，空白对照组 KSF、HSF、NDF 的 AR 无明显差异，在SP作用下却出现较大反差，即KSF < HSF < NDF，与 SP 对不同 Fb 增殖活性的影响一致，表明这至少是不同 Fb 增殖活性差异增强的原因之一。

SP 对不同来源 Fb 的作用不同，再次证明了 Fb 异质性在病理性瘢痕形成中的作用。现在有关 Fb 异质性在创面愈合中的作用尚不明确，但 SP 无疑激发、加强了它的临床表现。笔者曾利用手术技巧试图减轻这种因 Fb 异质性造成的瘢痕增生[9]，但仍然难以避免创面瘢痕性愈合。在这种情况下，通过调控 SP 等介质的作用以避免病理性瘢痕形成是一种可行的方法。

为进一步观测不同 Fb 对 SP 作用的反应性，本研究同时检测了 SP 对不同 Fb 作用的时间、剂量效应。结果表明，SP 对 KSF 的作用更快、持续时间更长，而且产生作用所需的 SP 浓度更低；SP 对 HSF 的作用介于 KSF 和 NDF 之间。说明病理性瘢痕 Fb 对 SP 具有更高的敏感性、更强的持久性，其中 KSF 尤甚于 HSF，再次证实 SP 在增生性瘢痕、瘢痕疙瘩等病理性瘢痕形成中的重要地位。

SP 可为今后的病理性瘢痕，尤其是瘢痕疙瘩的防治提供一条有效途径。曾有人局部应用辣椒素抑制 SP 作用，一定程度上减轻了烧伤后瘢痕形成时的痛痒症状[10]，但对瘢痕增生无明显抑制作用。根据 SP 在瘢痕形成中的作用特点，有待于进一步研究有效的防治方法。

参 考 文 献

1 陈静，王甲汉，庄洪兴，等. 神经肽 P 物质与烫伤创面愈合关系的实验研究. 中华烧伤杂志，2005，21：119 - 121.

2 蒋伟，王正国，赖西南，等. 神经肽 P 物质对肉芽组织成纤维细胞增殖及表皮生长因子基因表达的作用. 中华创伤杂志，2003，19：175 - 178.

3 陈静，庄洪兴，何乐人，等. P 物质对病理性瘢痕成纤维细胞凋

Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?

亡相关基因表达的影响. 解放军医学杂志, 2004, 29: 984-985.
4　Chen J, Zhou YP, Rong XZ. An experimental study on systemic inflammatory response syndrome induced by subeschar tissue fluid. Burns, 2000, 26: 149-155.
5　Sorrell JM, Baber MA, Caplan AI. Site-matched papillary and reticular human dermal fibroblasts differ in their release of specific growth factors/cytokines and in their interaction with keratinocytes. J Cell Physiol, 2004, 200: 134-145.
6　汪琴，吴宗耀. 肥厚性瘢痕细胞凋亡检测及其相关调控因素的研究. 中华烧伤杂志, 2001, 17: 25-28.
7　Messadi DV, Le A, Berg S, et al. Expression of apoptosis-associated genes by human dermal scar fibroblasts. Wound Repair Regen, 1999, 7: 511-517.
8　贺肖洁，韩春茂. 腱糖蛋白C在瘢痕疙瘩和增生性瘢痕中的表达. 中华烧伤杂志, 2004, 20: 79-81.
9　Chen J, Wang JH, Zhuang HX. Inhibitory effects of local pretreated epidermis on wound scarring: a feasible method to minimize surgical scars. Burns, 2005, 31: 758-764.
10　许明火，柴家科，卢军玲，等. 烧伤后瘢痕局部应用辣椒素治疗的初步临床观察. 中华烧伤杂志, 2003, 19增刊: 8-10.

（收稿日期：2005-08-28）
（本文编辑：莫恩）

·技术与方法·

爆炸伤残留异物定位及取出方法的改进

张林清　吴学田　刘海鹰　李晓巧　张莉莉

临床资料：患者女，31岁，因铁质雷管意外爆炸，造成四肢、胸腹部广泛皮肤软组织损伤及异物嵌顿。伤后2 d转入笔者单位。查体：见患者双乳房下各有1条已缝合的15 cm长横行裂口；上腹部可见20 cm×15 cm皮肤软组织缺损区，达深筋膜；面部、胸腹部、四肢均可见多处皮肤小裂口，可触及皮下异物（图1）。CT提示：双侧胸腔积液；胸腹部X线片显示：胸腹部及四肢广泛皮下金属异物。诊断：（1）爆炸复合伤。（2）广泛皮肤软组织内异物。立即给予补液抗休克等处理，待患者病情稳定后，行胸腹部扩创及异物取除术，术中见软组织中有大量的颗粒状异物，共取出较大的铁质异物10余块，其中最大者为1 cm×2 cm（图2）。

术后经拍片提示皮下仍有较多异物存在，遂根据异物材质的特性及部位采用以下两种定位方法取除。（1）电磁感应探测法：采用一个带磁铁芯的电磁感应线圈（摩托车用点火触发线圈）作为探头，两端连接电子毫伏表（图3），将探头的触发端置于可疑皮下异物位置的皮肤表面，作垂直于皮肤表面的快速移动，此时可产生一个感应电动势，变化幅度最大的位置即是最接近皮下异物的位置，定位后取出。（2）体表金属（铁）丝标记定位法：首先在可疑皮下异物区域按一定距离划定数条横竖标线，本例划定4条横标线，3条竖标线，设计的框格越小，定位越准确。设定每条标线的间隔为4～6 cm，按标线的位置布置铁丝，然后拍正侧位X线片，根据皮下异物在框格中的影像确定异物位置（图4）。本例患者采取此两种方法，先后取异物5次，共取出金属60余块。患者住院98 d痊愈出院。

讨论　以往定位方法主要有两种：一种是直接三维空间定位法，可借助CT或超声检测仪等设备显示异物在软组织中的位置。另一种是采用三维立体异物定位器定位[1]。但由于CT仪器昂贵不能普及使用，超声定位易受肌腱、骨、瘢痕组织等干扰[2]，存在着一定的局限性。笔者使用的电磁感应探测法具有定位直接、灵敏度高、随时探测、随时取出异物的优点。此方法对于铁质、多发性、皮下深度1 cm以内异物效果较好。笔者采用的框格定位与以往不同的是：直接将金属丝固定在皮肤上进行拍片定位，探取异物更加准确。此方法适用于在X线下显影的各种异物，并且适用于位置较深的异物定位。这两种方法具有设计简单、使用方便、定位准确和可靠等优点。

参考文献

1　刘志雄，司建国，陈明智. 利用金属网格X线平片法进行软组织内金属异物三维定位的临床应用. 空军总医院学报, 2000, 16: 121-122.
2　付润娟，况立革，陈文韬. 超声导引下皮下软组织金属异物取出术八例. 中华普通外科杂志, 2004, 9: 563.

图1　胸腹部爆炸伤

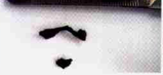
图2　从体内取出的铁质异物

图3　探头及电子毫伏表

图4　X线片定位

作者单位：261041　山东省潍坊市人民医院烧伤科

（收稿日期：2006-01-18）
（本文编辑：张红）

中华医学会杂志社 Chinese Medical Association Publishing House 版权所有 违者必究