

神经肽 P 物质与烫伤创面愈合关系的实验研究

陈静 王甲汉 庄洪兴 任加良 李志清 易朝辉

【摘要】 目的 探讨神经肽 P 物质(SP)与烫伤创面愈合之间的关系。方法 (1)制作大鼠不同深度烫伤模型,分别于伤后 1、3、7、14 d 致死,用放射免疫法测定创面 SP 含量。(2)将大鼠肉芽组织成纤维细胞(GTF)用不同培养液培养,分为空白对照组、SP 组及 SP + SP 受体拮抗剂(Spantide)组。体外检测 SP 及 Spantide 对 GTF 增殖活性[以吸光度(A)值表示]及凋亡率的影响。结果 (1)伤后 1 d,浅Ⅱ、深Ⅱ、Ⅲ度烫伤创面 SP 含量分别为(145 ± 78)、(94 ± 48)、(53 ± 27) ng/g,深Ⅱ度创面与其余两者比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。浅Ⅱ度创面伤后 3、7 d SP 含量显著增高;深Ⅱ度创面伤后 7、14 d SP 含量显著增高;Ⅲ度创面伤后 SP 含量无显著变化。(2)SP 增强 GTF 增殖活性(空白对照组 A 为 0.21 ± 0.05,SP 组 A 为 0.36 ± 0.07, $P < 0.01$)并抑制其凋亡,Spantide 可抑制 SP 对 GTF 的作用。结论 SP 可促进 GTF 增殖,创面 SP 含量与创面损伤程度及愈合能力关系密切。

【关键词】 烧伤; P 物质; 创面愈合; 肉芽组织成纤维细胞

Experimental study on the relationship between neuropeptide substance P and wound healing in scalded rats
CHEN Jing, WANG Jia-han, ZHUANG Hong-xing, REN Jia-liang, LI Zhi-qing, YI Chao-hui. Department of Burns, Nanfang Hospital, South Medical University, Guangzhou 510515, P. R. China

【Abstract】 Objective To explore the relationship between neuropeptide substance P (SP) and wound healing in scalded rats. Methods (1) Scalded rats with different degrees of scald injury were employed as the experimental model and were sacrificed at 24 post scald hour (PSH), and on 3, 7 and 14 post scald days (PSD). The SP content in the wound was detected with radioimmunoassay method. (2) The murine granulation tissue fibroblasts (GTF) were cultured with different culture media, and divided into control, SP and Spantide (SP receptor antagonism) groups. The effects of SP and Spantide on the cellular activity and apoptotic rate of murine GTF were assessed in vitro. Results There was significant difference of the SP content among the superficial (145 ± 78) ng/g, partial (94 ± 48 ng/g) and full thickness (53 ± 27 ng/g) scald wounds at 24 PSH ($P < 0.01$), while the SP content in partial thickness burn wound on 3 and 7 PSD obviously increased; and that in deep partial thickness burn wound obviously increased on 7 and 14 PSD. But the SP content remained unchanged in full thickness scald wound. (2) SP could promote the activity of GTF and inhibit its apoptosis (The GTF activity in control, SP groups were 0.21 ± 0.05, 0.36 ± 0.07, respectively, $P < 0.01$). Spantide could inhibit the interaction between SP and GTF. Conclusion SP can promote GTF proliferation, and the SP content in wound is closely associated with the depth of the injury and wound healing capacity.

【Key words】 Burns; Substance P; Wound healing; Granulation tissue fibroblasts

越来越多资料表明,皮肤神经纤维参与了创面愈合,而作为周围神经末梢分泌物的 P 物质(substance P, SP)在神经系统和损伤组织间起着重要的桥接作用,对修复细胞的增殖、迁移、分化进行调控^[1]。据此推测,随着烧伤程度加深,皮肤神经纤维遭到严重破坏,直接导致 SP 分泌不足,影响成纤维细胞的增殖分化,造成创面愈合延迟或无法愈合。为此,笔者检测了大鼠不同深度烫伤模型在伤后不同时期创面组织中 SP 含量的变化,以及 SP 对体外肉芽组织成纤维细胞(granulation tissue fibroblasts,

GTF)增殖、凋亡的影响,以进一步分析 SP 与创面愈合的关系,力图为烧伤创面治疗提供一些新思路。

材料与方 法

一、实验分组

1. 动物实验:Wistar 大鼠(南方医科大学实验动物中心)72 只,雌雄各半,体重 250 ~ 300 g,随机分为 3 组,每组 24 只。麻醉后,沸水烫伤背部皮肤 3 cm × 3 cm,3 组大鼠按烫伤时间分为 4、8、12 s 组(即制成大鼠浅Ⅱ、深Ⅱ、Ⅲ度烫伤模型^[2],经病理切片证实)。每组大鼠创面常规换药,分别于伤后 1、3、7、14 d 处死,每个时相点各 6 只。切取大鼠创面中心部位基底组织 100 mg,冻存待检。

作者单位:510515 广州,南方医科大学南方医院烧伤科[陈静(现在中国协和医科大学整形外科医院,100041)、王甲汉、任加良、李志清、易朝辉];中国协和医科大学整形外科医院(庄洪兴)

2. 体外实验: Wistar 大鼠(来源同前) 18 只, 上肢内侧注射体积分数 2% 甲醛 0.6 ml, 形成肉芽组织后, 组织块法培养 GTF, 传至 4 代后分别用不同培养液培养, 分为 3 组, 每组 6 只。(1) 空白对照组: 培养液为含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 基础培养液。(2) SP 组: 基础培养液加入 SP (美国 Sigma 公司), 终浓度调至 1×10^{-6} mol/L; (3) SP + Spantide (SP 受体拮抗剂, 美国 Sigma 公司) 组: 基础培养液中加入 SP 和 Spantide, 终浓度分别为 1×10^{-6} mol/L 和 3×10^{-5} mol/L。

二、观察指标及方法

1. 放射免疫 (RIA) 法测定 SP 含量^[3]: SP 的 RIA 试剂盒由中国人民解放军海军总医院提供。取冻存待检的组织标本, 处理及测量按试剂盒要求进行, 测定仪器为 SH-682 型放射免疫 γ 计数仪 (上海核辐射光电仪器有限公司)。

2. 噻唑蓝 (MTT) 比色法测定 GTF 增殖活性^[4]: 将 GTF 接种于 96 孔培养板, 加入上述不同培养液, 每组 6 孔。培养 72 h 后, 弃去部分上清, 加入 MTT (美国 Sigma 公司) 后继续培养 4 h。弃去培养液, 加入二甲基亚砷 (DMSO) 150 μ l, 振荡 5 min 后用自动酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司) 检测吸光度 (A) 值。

3. 流式细胞仪测定 GTF 凋亡率 (apoptotic rate, AR): 将 GTF 接种于 6 孔板, 分别加入上述不同培养液, 每组 6 孔。培养 72 h 后, 将细胞消化、收集、离心, 加入体积分数 70% 乙醇, 4 $^{\circ}$ C 固定过夜。加入 RNA 酶 (RNase A, 美国 Sigma 公司) 孵育 30 min 后冰浴, 再加入碘化丙啶 (PI, 美国 Sigma 公司), 避光孵育 30 min, 滤网过滤后上 ELITE 型流式细胞仪 (美国 Beckman-Coulter 公司) 检测 AR。

4. 统计学处理: 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 8.0 统计软件进行显著性检验及 F 检验。

结 果

1. 各组大鼠烫伤创面组织 SP 含量动态变化结果见表 1。

表 1 各组大鼠烫伤创面组织中 SP 含量的变化 (ng/g, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Dynamic changes in the SP content in the wounds in each group (ng/g, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 伤后时间 (d) | | | |
|-----------|--------------|----------------|----------------|----------------|
| | 1 | 3 | 7 | 14 |
| 烫伤 4 s 组 | 145 \pm 78 | 207 \pm 116* | 195 \pm 103* | 168 \pm 67 |
| 烫伤 8 s 组 | 94 \pm 48* | 87 \pm 72 | 164 \pm 95* | 236 \pm 107* |
| 烫伤 12 s 组 | 53 \pm 27 | 46 \pm 36 | 62 \pm 39 | 73 \pm 46 |

注: 各组大鼠每时相点均为 6 只; 与烫伤 4、12 s 组比较, * $P < 0.01$; 与伤后 1 d 比较, # $P < 0.05$

2. SP 对 GTF 增殖活性、AR 的影响: 组间比较, SP 组 GTF 增殖活性显著性高于 SP + Spantide 组, 而 AR 显著低于 SP + Spantide 组 ($P < 0.01$)。SP + Spantide 组与空白对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 SP 对 GTF 增殖活性及凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effects of SP on proliferating activity and apoptotic rate of GTF ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 样本数 (孔) | 增殖活性 | 凋亡率 (%) |
|-----------------|---------|------------------|-------------|
| 空白对照组 | 6 | 0.21 \pm 0.05 | 20 \pm 3 |
| SP 组 | 6 | 0.36 \pm 0.07* | 14 \pm 5* |
| SP + Spantide 组 | 6 | 0.19 \pm 0.10 | 19 \pm 7 |

注: 增殖活性数据为 A 值; 与 SP + Spantide 组和空白对照组比较, * $P < 0.01$

讨 论

创面愈合是烧伤治疗的首要目的。研究表明, 皮内 C 型感觉神经纤维参与了创伤后局部炎症反应和创面愈合, 而这种局部作用是通过分泌降钙素基因相关肽、SP 等神经肽类物质生效的^[1]。

SP 是世界上发现最早的神经营, 广泛分布于中枢和周围神经系统及组织器官, 具有明显的促内皮细胞、成纤维细胞 (Fb) 增殖作用。皮肤中的 SP 主要来源于感觉神经纤维末梢, 近来一些体外实验表明, 外源性 SP 可诱导正常 Fb 合成 SP^[5]。SP 主要通过 SP 受体发挥其生理作用, 这正是本研究采用 SP 受体拮抗剂 Spantide 验证 SP 作用的原因。

本研究检测了 SP 在不同深度烫伤创面组织中含量的动态变化, 旨在探讨 SP 与创面受损程度及愈合过程的关系。大鼠烫伤模型参照文献[2]制作, 并经病理切片证实, 可以真实反映烫伤深度与创面 SP 含量的关系。浅 II 度烫伤创面伤后 1 周内 SP 含量均明显增高, 但伤后 2 周又恢复到伤后 1 d 水平, 与临床浅度创面愈合过程吻合, 可能是浅 II 度烫伤后真皮感觉神经纤维暴露, 分泌 SP 增多的结果, 也是皮肤损伤后机体的代偿性反应。深 II 度烫伤创面 SP 含量在伤后 7 d 才开始增高, 并持续至伤后 2 周, 这可能与创面真皮感觉神经纤维遭到一定破坏, 造成早期 SP 分泌不足有关。随着神经再生, SP 含量逐渐增多, 并在愈合期内一直保持高水平。III 度烫伤创面在伤后 2 周内 SP 的含量均未发生显著变化, 说明 III 度创面皮肤感觉神经纤维几乎完全遭到破坏, 无法分泌高水平 SP, 早期促 Fb 增殖能力非常有限。

伤后不同时相点各组之间 SP 含量的比较结果

提示,伤后 1、3、7 d 不同深度烫伤创面 SP 含量由高到低依次是浅Ⅱ、深Ⅱ、Ⅲ度,这与烫伤深度以及神经纤维的破坏程度相符合,说明创面局部 SP 含量的恢复有赖于神经纤维的修复。而至伤后 14 d,深Ⅱ度创面 SP 含量高于浅Ⅱ度及Ⅲ度创面,分析其可能的原因:(1)伤后 14 d 深Ⅱ度烫伤创面出现神经纤维代偿性过度增生;(2)局部 Fb 代谢旺盛,Fb 在 SP 作用下产生 SP 这一自我正反馈过程明显增强。由于局部神经纤维破坏严重,Ⅲ度烫伤创面恢复较慢,因此过度修复现象较深Ⅱ度滞后。深度创面 SP 的过度产生虽然可促进创面愈合,但也可参与了愈合后的瘢痕增生^[2]。

本研究中关于深Ⅱ度烫伤的实验结果与王波涛等^[6]的观测结果相同,与张辉等^[7]报道的 SP 受体在创面上的分布情况也极其吻合,说明 SP 与其受体的分布变化始终保持一致。这些结果既证明了 SP 含量与神经纤维数量息息相关,又提示了 SP 在创面修复中具有重要地位。那么 SP 是通过什么途径促进创面愈合的呢?为此,笔者定性观测了 SP 对体外 GTF 增殖、凋亡的影响,结果表明 SP 可促进 GTF 增殖并抑制其凋亡,协同促进早期的肉芽组织形成,而肉芽组织形成是深度创面愈合过程中的关键阶段。本研究之所以同时观测 SP 对 GTF 凋亡的影响,不仅因为细胞凋亡受抑是促进细胞增殖的机制之一,而且因为肉芽组织向瘢痕组织转变期间,随着伤口的愈合,Fb 凋亡增加,如果凋亡受抑可能形成病理性瘢痕,所以 SP 对 GTF 凋亡的影响对创面的最终愈合质量也有一定作用。

最近也有人观测了 SP 对 GTF 的促增殖作用,并指出这种作用与其诱导 Fb 的表皮生长因子表达

有关^[8]。这些结果印证了 Antezana 等^[9]的结论,糖尿病患者皮肤由于 SP 等神经肽类物质产生不足,容易出现慢性创面。

由于 SP 在创伤领域的研究尚不多见,有关 SP 在创伤后的分布改变及与周围神经纤维再生的关系、对 Fb 作用的剂量效应及时间效应等问题尚需进一步阐明,而根据 SP 的作用在创面愈合方面制定针对性治疗措施,还有待一系列的动物实验和临床观察。

参 考 文 献

- Altun V, Hakvoort TE, van Zuijlen PP, et al. Nerve outgrowth and neuropeptide expression during the remodeling of human burn wound scars A 7-month follow-up study of 22 patients. *Burns*, 2001, 27: 717-722.
- 李峰,郭振荣,柴家科,等. 休克期切痂对烫伤大鼠血脂及血清游离脂肪酸谱的影响. *中华烧伤杂志*, 2003, 19: 206-208.
- 丛林,李世荣,徐友奇. 增生性瘢痕 P 物质含量的放射免疫测定. *中华整形烧伤外科杂志*, 1998, 14: 401-403.
- 陈静,周一平,荣新洲,等. 痂下水肿液诱导全身炎症反应综合征的实验研究. *中华烧伤杂志*, 2001, 17: 149-151.
- Bae SJ, Matsunaga Y, Takenaka M, et al. Substance P induced preprotachykinin-A mRNA, neutral endopeptidase mRNA and substance P in cultured normal fibroblasts. *Int Arch Allergy Immunol*, 2002, 127: 316-321.
- 王波涛,陈璧,胡大海,等. 烫伤大鼠创面皮肤中神经肽 P 物质的变化. *中华烧伤杂志*, 2003, 19: 293-296.
- 张辉,宋俊峰,韩岩,等. 肉芽组织中 NK1 受体表达与创面愈合关系的实验研究. *中国美容医学*, 2002, 5: 417-420.
- 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.
- Antezana M, Sullivan S, Usui M, et al. Neutral endopeptidase activity is increased in the skin of subjects with diabetic ulcers. *J Invest Dermatol*, 2002, 119: 1400-1404.

(收稿日期:2003-12-10)

(本文编辑:赵敏)

读者·作者·编者

本刊投稿须知

为了缩短稿件的刊出周期,敬请作者按下列要求投稿:(1)来稿(含图片、表格)一式 2 份,图片不要使用复印件;(2)附单位介绍信;(3)注明作者的联系方式,包括邮编、地址、电话、Email;(4)论文所涉及的课题如取得国家或部、省级以上基金资助,请将基金项目号和基金登记号脚注于文题页左下方,并附基金资助证书复印件。

本刊投稿介绍信格式要求

近期本刊的来稿中出现了介绍信格式不规范的现象,故有必要再次重申本刊论文介绍信的格式要求,敬请注意。

1. 论文投稿要求有第一作者单位开具的正式介绍信,并加盖公章,单纯在稿件上盖章无效。
2. 介绍信的内容必须包括:(1)文稿作者姓名及文题全称;(2)稿件内容真实;(3)稿件内容不涉及保密;(4)未一稿两投或多投;(5)作者署名及及排序无争议。
3. 在稿件处理期间,不得增添、删除某一作者或更改作者署名顺序,如有变更请重新出具单位证明。