文章编号:1000-5404(2005)03-0213-04

论著

神经肽SP在胎兔皮肤无瘢痕愈合中的作用

谢 江[1],赖西南[1],王正国[1],王丽丽[1],向德兵[2],黄 晖[1],陈 辉[1] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1]第六研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,[2]病理科,重庆 400042)

提 要:目的 探讨神经肽SP在胎兔皮肤无瘢痕愈合中的作用。**方法** 建立胎兔背部皮肤全层切割伤模型,观察胎兔背部皮肤伤口愈合状况及神经肽SP在无瘢痕愈合中的变化特点。并应用外源性的SP,观察胎兔伤口愈合情况及神经纤维增生情况。**结果** 胎兔皮肤愈合快,在伤后3~5 d所有创伤完全无瘢痕愈合。胎兔皮肤伤后神经肽SP阳性表达降低,第2天最明显,为正常胎兔皮肤的75%,然后逐渐恢复正常。成兔皮肤伤后SP表达第1天明显降低,为正常成兔的60%,以后明显增加,第7天达峰值,为正常成兔的168%,其后下降,到第14天与正常成兔基本相似。外源性SP应用后,致伤胎兔皮肤瘢痕形成。**结论** 神经肽SP的低表达是胎兔皮肤无瘢痕愈合机制之一;外源性SP可导致胎兔皮肤瘢痕愈合,其机制可能与其引起急性神经源性炎症反应和神经纤维的增生有关。

关键词:创伤;无瘢痕愈合;神经肽;P物质
中图法分类号:R322.99; R341.6; R64 **文献标识码**:A

Roles of neuropeptide SP on scarless wound healing in fetal rabbit skin

XIE Jiang[1], LAI Xi-nan[1], WANG Zheng-guo[1], WANG Li-li[1], XIANG De-bing[2], HUANG Hui[1], CHEN Hui[1] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 6, [2]Department of Pathology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To explore the roles of neuropeptide SP in scarless fetal wound healing. **Methods** The animal model of 22-day-gestational rabbit fetuses (term = 31 d) inflicted with a full thickness skin wound on the back was established. The progress of wound healing was observed on at micro- and macro-levels at 1, 2, 3, 5, 7, and 14 d after injury, respectively. The expression level of substance P (SP) during wound healing was detected by immunohistochemical staining. Then the effects of implants containing SP (0.01 mol/L) placed subcutaneously on the fetal wound healing and the proliferation of nerve fibers were observed. **Results** The cutaneous wounds in fetal rabbits healed more rapidly without the formation of scars than those in adult rabbits. The expression of SP in the wound decreased in fetal rabbit at the early stage after injury, reached the lowest levels at 2 d after injury (75%, *vs* fetal control), and then increased gradually and reached the normal levels. The expression of SP in the wound decreased in adult rabbits at the early stage after injury, reached the lowest levels at 1 d after injury (60%, *vs* adult control), and then increased quickly and reached a higher level than that in the normal group. SP expression reached a peak at 7 d after injury (168%, *vs* adult control), and then returned to the normal levels. Exogenous SP induced acute inflammatory reaction, followed by fibroblast proliferation and collagen synthesis, resulting in a large amount of scars in fetal wound healing. **Conclusion** The low level expression of neuropeptide may contribute to the fetal scarless wound healing. Exogenous SP may result in fetal wound healing, which may be associated with the acute inflammatory reaction and nerve fiber proliferation.

Key words: trauma; scarless wound healing; neuropeptide; substance P

近年研究表明,周围神经在成体创伤愈合中起重要作用,与伤口愈合速度、表皮再生和瘢痕形成密切相关[1,2]。但在胎儿皮肤无瘢痕愈合中神经调控具有怎样的作用和地位?神经肽SP在胎儿皮肤无瘢痕愈合中的作用是否和成体一致?目前尚不清楚。本研究拟对此进行探讨。

1 材料与方法

1.1 仪器及试剂

Leica CM1800冰冻切片机(德国),Leica DM IRB荧光显微镜,速眠新合剂(长春农牧大学兽医研究所),SP一抗(Peninsular

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054204)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, G1999054204)

作者简介:谢 江(1973-),女,四川省成都市人,博士,主治医师,主要从事胎儿皮肤无瘢痕愈合等方面的研究。电话:(023)68757436,E-mail:jiangxie-cd@hotmail.com

收稿日期:2004-09-17;修回日期:2004-11-20

Chemical & Scientific Corporation)，PGP9.5 一抗(Accurate Chemical & Scientific Corporation)，FITC 标记 IgG(北京中山生物技术有限公司)，SP(Sigma 公司)。

1.2 动物模型的制作

1.2.1 模型 1 将受孕 22 d(妊娠期 31)的 36 只孕兔肌肉注射速眠新合剂(0.25 ml/kg)麻醉，沿腹白线切开皮肤、腹膜、子宫，采用完全随机设计实验选择远离子宫颈的相间胎兔分为两组：创伤胎兔实验组(fetal trauma，FT 组)和正常胎兔对照组(fetal control，FC 组)。在胎盘对侧两条血管间预制 1～1.5 cm 的透过浆肌层的荷包缝合线(不穿透羊膜层)，沿荷包缝线中间长轴方向剪开子宫及羊膜。将 FT 组胎兔胎体的后 1/2 取出置于子宫外，在脊柱旁臀腰部纵行(沿脊柱长轴)作一约 1 cm 的线性切口，深达皮下(皮肤全层)，切口处以碳素墨水标记定位，小心回纳入宫腔。在羊膜囊内补充 37 ℃等渗盐水(补充量以羊水损失量为准)，严密缝合羊膜、子宫壁及腹壁各层。术后注射青霉素 20 万单位，清醒后送入观察室。创伤成兔对照组(adult trauma，AT 组)的 36 只大耳白兔亦在麻醉下于背部脊柱旁做约 2 cm 的皮肤全层线性切口。均于致伤后 1、2、3、5、7、14 d 取材。以切口为中心作长 1 cm，宽 0.5～0.8 cm 的切口，切下全层皮肤。同样切取 FC 组及正常成兔(adult control，AC 组)的兔背部对应的皮肤作为对照。

1.2.2 模型 2 动物致伤同前，采用完全随机设计实验选择子宫颈远端的 2 只胎兔分别做 SP-致伤胎兔实验组(SP-FT 组)和致伤胎兔对照组(fetal trauma control，FTC 组)，它们分别位于不同子宫角内。在胎兔皮肤切口下置入 0.2 cm×1 cm 聚乙烯醇(polyviny alcohol，PVA)海绵。SP-FT 组海绵以 1×10^{-2} mmol/L 的 SP 浸泡。FTC 组海绵以生理盐水浸泡。在羊膜囊内补充 37 ℃生理盐水(补充量以羊水损失量为准)。严密缝合羊膜、子宫壁及腹壁各层。术后注射青霉素，清醒后入观察室。两组胎兔取材同模型 1 部分。

1.3 标本处理

1.3.1 免疫组化染色 模型 1 的标本予常规石蜡包埋，4 μm 连续切片，HE 染色。并采用免疫组织化学过氧化酶标记的链酶卵白素(streptavidin/peroxidase，S-P)法，实验按试剂盒说明书进行。其中 SP 一抗用抗体稀释液按 1∶1 000 稀释，同时设立阴性对照(以 PBS 代替一抗)。

1.3.2 免疫荧光染色 模型 2 的标本采集后迅速用液氮速冻，连续冰冻切片，厚 15 μm，进行 PGP9.5 免疫荧光染色，实验按试剂盒说明书进行，其中 PGP9.5 一抗用抗体稀释液按 1∶2 500 稀释，同时设立阴性对照(以 PBS 代替一抗)。

1.4 半定量图像分析及统计学处理

采用 MIG2000 综合图像分析系统对所有染色切片进行图像分析，测定积分光密度值(integral optical density，IOD)。各组数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，以 SPSS 10.0 统计软件包进行方差分析和均数间多重比较。

2 结果

2.1 动物模型

动物模型制作是本实验的难点。在本实验中动物的麻醉是采用肌肉注射且麻醉及肌松作用俱佳的速眠新合剂。术中采取子宫小切口荷包缝合使胎兔尽可能少移动以减少损伤，并保持子宫完全松弛，术后严密缝合羊膜并及时补充丢失羊水。伤后动物存活较好。共致伤 36 只成兔，存活率为 100%；致伤 108 只胎兔，孕兔流产 1 只，胎兔术后死亡 12 只，存活率为 88.9%。说明动物模型成功。

2.2 伤口愈合情况

胎兔皮肤愈合速度快，伤后 3～5 d 所有创伤胎兔完全无瘢痕愈合，外观平整，质地软，肉眼观察与正常胎兔皮肤组织无差别，仅隐约可见碳素墨水标记线。成兔皮肤愈合较慢，伤后第 3 天出现少量肉芽组织，色泽鲜红，颗粒状，稍高出皮面，触之质软；第 7 天基本愈合，留有一条明显线状瘢痕。

外源性的 SP 应用后，胎兔皮肤愈合减慢，在伤后第 3 天出现少量肉芽组织，伤后 5～7 d 胎兔皮肤可见一条明显线性瘢痕。而生理盐水海绵包埋组胎兔皮肤在伤后 3～5 d 无瘢痕愈合，外观平整，质地软，肉眼观察与正常胎兔皮肤组织无差别。

2.3 病理组织学观察

致伤后第 1 天，FT 组胎兔皮肤创缘真皮及皮下组织中的毛细血管轻度充血，少许浆液渗出，炎细胞浸润少。伤后第 2 天，毛细血管充血及渗出已不明显，成纤维细胞数目稍增多。伤后第 3～5 天伤口愈合，包括皮肤附件如毛囊的再生愈合，真皮及皮下没有明显纤维组织增生及胶原沉积。

成兔皮肤伤后第 1～2 天，真皮及皮下毛细血管充血及浆液渗出明显，并有较多中性粒细胞为主的炎细胞浸润。致伤第 3～5 天，伤口出现肉芽组织，主要由新生的成纤维细胞、毛细血管和少量炎细胞组成。伤后第 7 天，表皮愈合，真皮及皮下可见较多的成纤维细胞，纤维组织增生，胶原沉积，排列较紊乱，肉芽组织减少。伤后 14 d，皮肤已完全愈合，真皮及皮下成纤维细胞明显减少，局部纤维组织增生明显，胶原沉积，排列较紊乱。

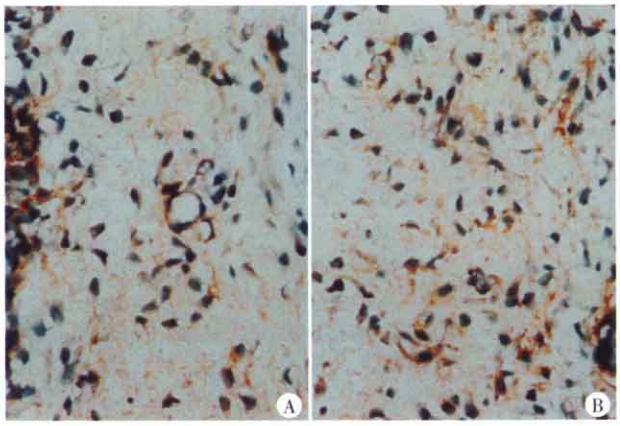
2.4 SP 的变化特点

胎龄 23 d 胎兔背部皮肤有明显的 SP 阳性表达，呈棕黄色颗粒及小片状沉积。主要位于伤缘皮肤毛囊周围、毛细血管壁、成纤维细胞胞浆等部位。伤后 1～3 d，致伤胎兔伤口皮肤 SP 阳性表达减低(图 1)，以第 2 天时最明显，为正常胎兔皮肤的 75%($P<0.01$)。然后逐渐增加，5～14 d 与 FC 组胎兔无显著差异。成兔伤后 1～2 d SP 阳性着色主要集中在伤缘皮肤表皮基底细胞层，毛囊周围和毛细血管壁等部位。致伤第 2 天后，肉芽组织中可见明显的 SP 阳性表达(图 2)。图像分析结果显示：伤后 1～2 d SP 阳性表达明显减低，第 1 天时最明显，为正常成兔皮肤的 60%($P<0.01$)，以后迅速增加，第 3 天时就显著高于正常成兔($P<0.01$)，第 7 天肉芽组织中 SP 的表达量即达到高峰 168%($P<0.01$)，其后出现下降，到第 14 天与正常成兔基本相似，见表 1。

2.5 PGP9.5 的变化特点

FTC 组胎兔创伤后 1～2 d 胎兔背部皮肤 PGP9.5 阳性神经纤维明显减少，第 1 天最明显，为正常胎兔的 74.5%($P<0.01$)，第 3 天及以后逐渐增生，到第 14 天与正常对照胎兔基本相同。SP-FT 组创伤后第 1 天，伤口处皮肤 PGP9.5 阳性神经纤维明显减少，为正常胎兔的 89.9%($P<0.01$)，第 2 天神经纤维

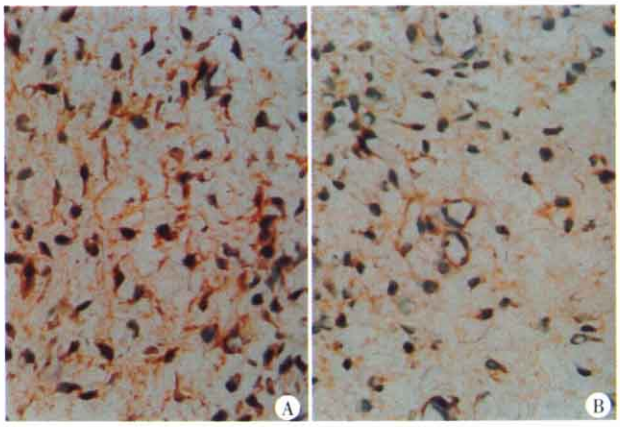
开始增生，到第 5 天 PGP9.5 阳性神经纤维增生达高峰，为正常胎兔的 164%（$P<0.01$），第 14 天肉芽组织 PGP9.5 阳性神经纤维基本与对照胎兔相似。创伤后 1～7 d，SP-FT 组 PGP9.5 阳性神经纤维均显著高于 FTC 组，第 14 天与 FTC 组无显著差异（表 2，图 3）。



A：FT group；B：FC group

图 1　致伤后 1 d 胎兔皮肤 SP 阳性表达减低（S-P × 200）

Fig 1　SP expression in the wound decreased in fetal rabbit at 1 d after injury（S-P × 200）



A：AT group；B：AC group

图 2　致伤后 3 d 成兔皮肤 SP 阳性表达增高（S-P × 200）

Fig 2　SP expression in the wound increased in adult rabbit at 3 d after injury（S-P × 200）

表 1　SP 免疫组化染色结果（$\bar{x} \pm s$）

Tab 1　IOD value of immunohistochemical staining for SP（$\bar{x} \pm s$）

Group	FT	FC	AT	AC
1 d	0.180 ± 0.011*	0.195 ± 0.013	0.215 ± 0.024△	0.361 ± 0.013
2 d	0.149 ± 0.009*	0.198 ± 0.017	0.300 ± 0.024△	
3 d	0.187 ± 0.011*	0.202 ± 0.014	0.410 ± 0.015△	
5 d	0.197 ± 0.011	0.204 ± 0.013	0.441 ± 0.018△	
7 d	0.195 ± 0.017	0.206 ± 0.013	0.606 ± 0.009△	
14 d	0.232 ± 0.013	0.235 ± 0.013	0.361 ± 0.011	

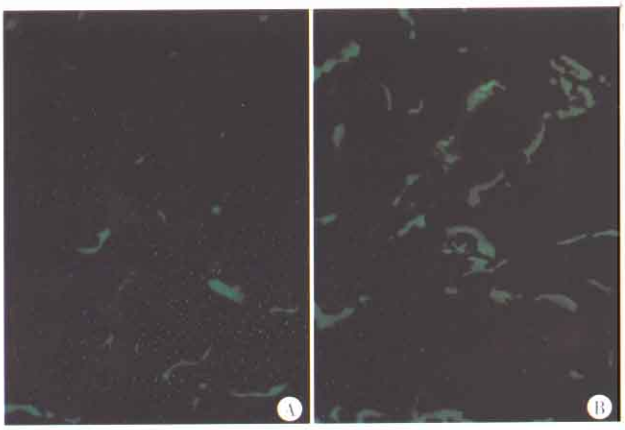
*：$P<0.01$，*vs* FC；△：$P<0.01$，*vs* AC

表 2　PGP9.5 免疫荧光染色结果（$\bar{x} \pm s$）

Tab 2　IOD value of immunofluorescent staining for PGP9.5（$\bar{x} \pm s$）

Group	SP～FT	FTC	FC
1 d	2.68 ± 0.21**△△	2.22 ± 0.17**	2.98 ± 0.14
2 d	2.90 ± 0.23*△	2.49 ± 0.31**	3.02 ± 0.22
3 d	3.99 ± 0.37**△△	2.80 ± 0.14**	3.04 ± 0.09
5 d	5.00 ± 0.29**△△	2.94 ± 0.41	3.05 ± 0.16
7 d	4.83 ± 0.42**△△	3.11 ± 0.13	3.38 ± 0.30
14 d	4.11 ± 0.49	4.09 ± 0.18	4.11 ± 0.21

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* FC；△：$P<0.05$，△△：$P<0.01$，*vs* FTC



A：FTC group；B：SP-FT group

图 3　外源性 SP 应用 7 d 后，致伤胎兔皮肤 PGP9.5 阳性神经纤维明显增生（免疫荧光 × 200）

Fig 3　Exogenous SP upregulated the expression of PGP9.5 in the wound in fetal rabbit at 7 d after injury（Immunofluorescence × 200）

3　讨论

SP 是最早发现的神经肽，为 11 个氨基酸残基的直链多肽，广泛分布于细神经纤维的末梢部位，属速激肽家族。SP 主要存在于感觉神经纤维，免疫细胞（如肥大细胞、巨噬细胞等），成纤维细胞等也有表达。对神经肽 SP 在成体创面愈合中的作用有许多研究，但在胚胎方面，国内外尚无相关报道。

我们的实验表明，创伤后胎兔皮肤 SP 阳性表达降低，以第 2 天时最明显，为正常胎兔对照的 75%。对照成兔伤后 SP 表达量却明显增高，于第 7 天达峰值，为正常成兔的 168%。而且发现无瘢痕愈合创面局部炎症反应轻微，免疫细胞浸润少，成纤维细胞增生不明显等，这些特点决定了胎儿皮肤创伤后神经肽水平远低于成体，且不出现成体伤后皮肤神经肽水平的增高。动物胎儿与成体在创伤愈合时具有明显差异的炎症反应及细胞因子表达谱，胎儿尚未发育成熟的免疫细胞对创伤的刺激不同于成体，如中性粒细胞明显的减少并缺乏自我/非我识别的能力。无瘢痕愈合与胎儿较弱的炎症反应有关。然而，将用活细菌处理的海绵植

入胎兔的皮下，却表现出对移植物剂量依赖的急性炎症反应并有胶原沉积的增多，说明胎兔具有形成急性炎症反应的能力[3]。本实验结果证实：外源性的SP应用后，胎儿皮肤神经源性炎症明显，毛细血管充血，有浆液渗出，可见较多的炎细胞浸润及肉芽组织形成。研究表面SP能调控多种炎症介质和细胞因子的释放，促发神经源性炎症反应[4,5]，并且减少创伤局部SP分泌有利于创伤愈合[6]。

近年的研究表明，神经源性炎症反应的形成还可能有其它递质参与，如同属速激肽家族NKA、NKB以及降钙素基因相关肽（calcitonin gene-related peptide，CGRP）均与SP共存于感觉神经纤维中，并与其共同释放，同时起作用[7]。可见，SP确实可以引起神经源性炎症反应，但其它一些神经因子也有类似的效应。感觉神经释放SP等神经肽调控皮肤创面愈合，神经肽对神经又有一定的营养作用，可促进神经纤维增生。本实验也证实：外源性SP应用后，致伤胎兔皮肤PGP9.5阳性神经纤维增生明显，伤后1～7 d均显著高于致伤胎兔对照组。因此，外源性SP可促进神经纤维增生，增生的神经纤维又进一步加强神经肽、炎症介质和细胞因子的释放，刺激成纤维细胞增殖，胶原合成，以致瘢痕形成。

总之，周围神经及神经肽SP在胎儿皮肤无瘢痕愈合中具有重要作用。神经肽SP的低水平可能是调节胎儿皮肤无瘢痕愈合的重要因素。应用外源性SP可引起胎儿皮肤创面产生急性神经源性炎症反应和神经纤维的增生，从而使瘢痕愈合。

参考文献：

[1] Altun V, Hakvoort T E, van Zuijlen P P, *et al*. Nerve outgrowth and neuropeptide expression during the remodeling of human burn wound scars. A 7-month follow-up study of 22 patients[J]. Burns, 2001, 27(7): 717－722.

[2] Zhang L Q, Laato M. Innervation of normal and hypertrophic human scars and experimental wounds in the rat[J]. Ann Chir Gynaecol, 2001, 90 (Suppl 215): 29－32.

[3] Jonsson K, Jensen J A, Goodson W H 3rd, *et al*. Tissue oxygenation, anemia and perfusion in relation to wound healing in surgical patients[J]. Ann Surg, 1991, 214(5): 605－613.

[4] Delgado A V, McManus A T, Chambers J P. Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P[J]. Neuropeptides, 2003, 37(6): 355－361.

[5] Lai X N, Wang Z G, Zhu J M, *et al*. Effect of substance P on gene expression of transforming growth factor beta-1 and its receptors in rat's fibroblasts[J]. Chin J Traumatol, 2003, 6(6): 350－354.

[6] Cavallini M, Casati A. A prospective, randomized, blind comparison between saline, calcium gluconate and diphoterine for washing skin acid injuries in rats: effects on substance P and beta-endorphin release[J]. Eur J Anaesthesiol, 2004, 21(5): 389－392.

[7] Olerud J E, Usui M L, Seckin D, *et al*. Neutral endopeptidase expression and distribution in human skin and wounds[J]. Invest Dermatol, 1999, 112(6): 873－881.

（编辑 龙 亮）

（上接212页）

2.2 甲亢性肝损害因素的相关分析

以ALT代表肝损害程度作因变量，以性别、年龄、BMI、病程、并发症、FT3、FT4作自变量，进行多元回归分析，结果显示：甲亢患者肝损害程度与病程、并发症、血FT3、FT4水平均呈显著正相关（$P<0.01$）。回归方程：ALT＝0.327×（X1）＋0.294×（X2）＋0.182×（X3）＋0.149×（X4）（X1：FT3，X2：FT4，X3：病程，X4：并发症）

3 讨论

甲亢引起肝损害发生率国内外文献报道不一[1]，这主要与研究对象的选择、肝损害诊断标准的差异有一定的关系。本研究在严格病例筛选及诊断标准，并排除心功能不全、慢性肝胆疾病、药物等影响因素后，观察了189例甲亢患者后发现有肝功能异常者56例，占29.6%，其异常主要表现为ALT，AST升高，且多为轻中度升高，说明甲亢患者易发生肝损害，临床表现不典型、易漏诊，应予足够重视。

我们的研究还发现，甲亢并肝损害的患者较无肝损害者病程较长，血FT3、FT4水平明显增高，进一步相关分析提示：肝损害程度与甲状腺激素水平、病程及并发症（甲亢性肌病、周期性麻痹、重症肌无力、甲亢性心脏病）呈显著正相关，而与年龄、性别无明显相关，说明长期未得到有效控制的甲亢患者更易发生肝损害，这和既往大多数研究报道相一致[2,3]。目前的研究[4]显示，甲亢性肝损害的机制可能包括：①甲状腺激素对肝脏的直接作用；②甲亢时基础代谢率增高，内脏组织耗氧量增加，造成肝脏相对缺氧；③通过自身免疫机制，同时引起甲状腺和肝脏损害。故在临床上甲亢患者要坚持早发现、早治疗原则，除积极控制甲亢外还需加强护肝治疗。

关键词：甲亢；肝功能；丙氨酸氨基转移酶

中图法分类号：R581.102 文献标识码：B

参考文献：

[1] Youssef W I, Mullen K D. The liver in other Unmodulated endocrine disorders[J]. Clin Liver Dis, 2002, 6(4): 879－889.

[2] 高绪文，李继连. 甲状腺疾病[M]. 北京：人民卫生出版社，1999. 175－178.

[3] 刘文胜，刘日华. 甲亢性肝损害63例临床分析[J]. 西南国防医学院学报，2001，28(1)：579－580，593.

[4] Peeters R P, Friesema E C, Docter R, *et al*. Effects of thyroid state on the expression of hepatic thyroid hormone transporters in rats[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002, 283(6): E1232－1238.

（编辑 龙 亮）