论著

文章编号:1000-5404(2005)09-0864-04

糖尿病大鼠皮肤中神经肽P物质与皮肤病理学的相关性研究

郭文治,赖西南,刘育杰,黄 晖,王丽丽 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所第六研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

提 要:目的 研究糖尿病条件下大鼠皮肤感觉神经肽P物质与皮肤病理变化的相关关系。**方法** 建立糖尿病大鼠模型,建模后分别在1~8周的不同时间背部皮肤取材并做以下处理:①苏木精-伊红染色光镜下观察并测量皮肤全层及表皮厚度;②免疫组化染色观察SP阳性神经的分布变化;③透射电镜观察皮肤结构及真皮中感觉神经变化;④ELISA测定皮肤中P物质含量。**结果** 随糖尿病大鼠发病时间的延长,表皮及真皮变薄,皮肤细胞外基质成分减少;SP阳性神经减少;电镜下真皮组织水肿,成纤维细胞增殖活性减弱;有髓鞘Aδ类及无髓鞘C类神经纤维均存在水肿及变性,4~6周时变化最为明显。酶联免疫结果显示P物质在皮肤含量逐渐下降,同样在4~6周变化显著,8周后有所恢复。统计分学析表明:皮肤中P物质含量与表皮及皮肤全层厚度均存在相关性。**结论** 感觉神经肽P物质在糖尿病大鼠局部皮肤含量的减少可能是其皮肤发生病理改变的原因之一。

关键词:糖尿病;P物质;皮肤;病理学变化
中图法分类号:R322.9; R341.6; R587.102 **文献标识码**:A

Correlation between substance P and pathologic changes in skin of diabetic rats

GUO Wen-zhi, LAI Xi-nan, LIU Yu-jie, HUANG Hui, WANG Li-li (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 6, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the relationship between pathologic changes and the quantity of substance P in the skin of diabetic rats. **Methods** The rat model of diabetes was established, two pieces of thorough skin from the back at week 1 – 8, respectively. After H-E dyeing was done, the thickness of whole skin and epidermis was measured under light microscope. The distribution changes of SP-positive nerve fiber were observed by immunohistochemisty. The skin structure and sensory nerve fiber in the dermis was observed under transmission electron microscope. The quantity of substance P in the skin was assayed by ELISA. **Results** The thickness of epidermis and dermis became thinner than that of normal and the amounts of SP-positive nerve fibers became fewer. The edema in the dermis was obvious and fibroblasts was inactive. Edema and degeneration could be observed in Aδand C nerve fibers, which showed most obvious at week 4 – 6. Simultaneously, the quantity of substance P in the skin decreased with its pathologic changes. **Conclusion** The decrease of substance P in the skin of diabetic rats is one of the relative factors that lead to pathologic changes in the skin of diabetic rats.

Key words: diabetes; substance P; skin; pathologic changes

近年来研究表明,糖尿病肢端坏疽、局部皮肤溃疡、创伤后伤口难愈合等并发症与糖尿病皮肤组织本身固有的病理改变有关[1]。但这种病理改变的详细机制仍不清楚。其中血管神经病变、糖代谢紊乱、糖基化终末产物的蓄积可能是其中的部分原因。感觉神经肽P物质(substance P, SP)在组织代谢及修复方面的研究国内外已有不少报道。P物质是否也参与了这种病理改变?其详细机制如何?目前仍不清楚,深入研究P物质在糖尿病皮肤病理改变中的作用,对于阐明糖尿病并发症的发病机制及临床治疗可提供更有力的证据。

1 材料与方法

1.1 糖尿病大鼠模型的建立

选取2~3月龄清洁级SD大鼠32只,体质量180~220 g(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供)。

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054200)
Supported by the National Key Basic Research Development of China ("973" Projects) (G1999054200)

作者简介:郭文治(1970-),男,山西省忻州市人,硕士研究生,主治医师,主要从事创伤难愈基础理论及治疗方面的研究。电话:(023)68757436,E-mail:elite2005gg@yahoo.com.cn
通讯作者:赖西南,电话:(023)68757574,E-mail:Laixinan@163.com

收稿日期:2004-11-29;**修回日期**:2005-03-13

实验前禁食 12 h，定量饮水。实验当日测定体质量，收集尿液并尾静脉采血，分别用尿糖试纸和强生血糖仪测定尿糖和基础血糖。每只动物按 60 mg/kg 腹腔注射链脲佐菌素（STZ，临用前溶于 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液，配制成 2% 的浓度，pH 4.5）。1 周后尾静脉采血测血糖，同时收集尿液测尿糖值，血糖大于 16.7 mmol/L，尿糖（+++ ~ ++++）稳定 1 周确定为糖尿病模型诱导成功。以后每周监测血糖、尿糖 1 次。若血糖大于 30 mmol/L，则补充长效胰岛素 2 ~ 4 U/只，隔日 1 次，避免动物死亡。

1.2　标本制备

糖尿病大鼠 32 只，分别于成模后的第 1 ~ 8 周每周取 4 只大鼠，在其背部脊柱两侧取全层皮肤 2 块，直径约 1.5 cm，其中 1 块用于 P 物质含量测定。组织块处理方法：置生理盐水中洗净血迹，加入到煮沸的生理盐水中煮 5 ~ 10 min，捞起后立即称重，加入 1 ml 1 mol/L 冰醋酸充分匀浆，静置 2 ~ 3 h 加入等体积 1 mol/L NaOH 溶液混匀，4 ℃ 4 000 r/min 离心 10 min，取上清液保存于 - 70 ℃冰箱备 P 物质含量测定。另外一块组织标本分为两半，部分组织用 2.5% 戊二醛固定制作电镜标本。其余组织常规 4% 多聚甲醛固定，梯度酒精脱水，石蜡包埋。切片后行苏木精-伊红染色，光镜观察并测量皮肤全层及表皮厚度。另外一半皮肤组织做冰冻切片，免疫组化染色观察 SP 阳性神经纤维及细胞分布情况。

1.3　糖尿病大鼠皮肤 SP 含量测定

同批测定皮肤组织 SP 含量，采用酶联免疫吸附试验（ELISA）双抗体夹心法，加样步骤参照试剂盒说明。ELISA 试剂盒购自美国 R&D 公司。

1.4　SP 阳性神经纤维及细胞免疫组化染色程序

新鲜皮肤组织取材后制备 20 μm 厚的恒冷箱切片，丙酮固定 15 min，室温干燥后置 - 20 ℃冰箱密闭保存。免疫组化染色采用 SABC 法，DAB 显色（SABC 试剂盒及 DAB 显色试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司）。染色程序：冰冻切片取出后吹干，0.02 mol/L PBS（pH 7.2 ~ 7.6）洗 5 min × 3 次。30% H_2O_2 加甲醇按 1∶50 混合，室温浸泡 30 min，以灭活内源性过氧化物酶。蒸馏水洗 3 次，PBS 浸泡 5 min。0.3% Triton-X 100 孵育 30 min，增加膜的通透性。PBS 洗 5 min × 3 次。滴加 5% BSA 封闭血清，室温 20 min。滴加 SP 一抗（武汉博士德生物工程有限公司提供）1∶300，4 ℃过夜。PBS 洗 5 min × 3 次。滴加生物素化山羊抗兔 IgG，37 ℃ 20 min，滴加试剂 SABC，37 ℃ 20 min，PBS 洗 5 min × 4 次。DAB 室温显色，镜下控制反应时间，1 ~ 20 min，流水冲洗。苏木精复染。脱水、透明、DEX 封片，镜下观察。

1.5　图像分析

皮肤组织 HE 染色后表皮及皮肤全层厚度测量方法：每周取 3 只大鼠，每只大鼠取 1 张切片，每张切片在带有测微尺的 Olympus BX50 光学显微镜下任取 3 个视野，测定皮肤表皮（× 400）及皮肤全层厚度（× 100）。

1.6　统计学处理

计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 Excel 2000 和 SPSS 10.0 统计软件处理，两组间比较采用 Student's t 检验。糖尿病大鼠皮肤厚度与组织中 P 物质含量采用相关性分析。

2　结果

2.1　糖尿病大鼠皮肤组织病理学改变

肉眼观察糖尿病大鼠成模后随发病时间的延长，皮肤表现为毛发杂乱，呈微黄色，活动较正常大鼠明显减少，皮肤明显变薄，4 周后可见真皮下血管显露，体重明显减轻。

HE 染色光镜下观察皮肤病理变化：表皮及真皮随发病时间延长而逐渐变薄，表皮层角质形成细胞、成纤维细胞数及胶原等细胞外基质减少，胶原排列紊乱。糖尿病大鼠成模后不同周数光镜下表皮及皮肤全层厚度变化如表 1 所示。

表 1　糖尿病大鼠成模后不同周数光镜下表皮及皮肤全层厚度变化（μm，$\bar{x} \pm s$）

Tab 1　The thickness of epidermis and whole skin in diabetic rats at different weeks（μm，$\bar{x} \pm s$）

Time(week)	Epidermis thickness of diabetic rats	Full skin thickness of diabetic rats
1	14.80 ± 4.33*	1 230.75 ± 153.60*
2	13.53 ± 1.68*	769.83 ± 111.97*
3	8.13 ± 1.60*	756.70 ± 56.11*
4	10.35 ± 1.76*	421.60 ± 90.29*
5	9.14 ± 1.32*	460.45 ± 50.99*
6	5.20 ± 1.12*	362.87 ± 27.72*
7	10.83 ± 2.37*	551.18 ± 50.58*
8	15.61 ± 1.28*	848.87 ± 83.48*
Normal rats	22.42 ± 3.02	1 639.75 ± 144.73

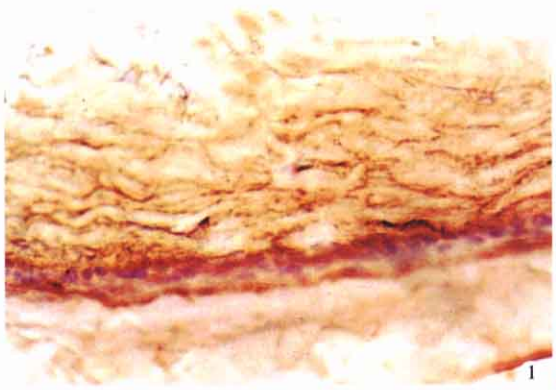
*：$P < 0.01$，*vs* normal

SP 阳性神经及细胞冰冻切片免疫组化染色结果显示：在正常大鼠 SP 阳性神经在皮肤全层及附件均有分布。在表皮、毛囊及真皮乳头层较为密集，含 SP 的阳性神经主要沿血管及毛囊走行，最后以裸露的神经末端离开微血管进入表皮及真皮。尤其在表皮层及表皮与真皮交界处更为密集，可呈密集的网状结构分布。镜下可见部分 SP 阳性神经与成纤维细胞及角质形成细胞密切接触。糖尿病大鼠皮肤含 SP 阳性神经纤维及细胞改变：糖尿病大鼠发病后，随发病时间的延长，其皮肤 SP 阳性神经纤维及细胞呈逐渐减少趋势。发病后 4 ~ 6 周，SP 阳性神经及细胞减少最为明显。SP 阳性细胞主要分布在表皮层，即少量角质形成细胞有 SP 阳性表达，而真皮层成纤维细胞几无 SP 阳性表达。SP 阳性神经散在分布于表皮及表皮与真皮交界、毛囊处，与正常大鼠相比明显减少，见图 1、2。

电镜观察显示：糖尿病大鼠皮肤真皮组织水肿，成纤维细胞胞浆及细胞突起减少，染色质致密团块，细胞增殖活性减弱；有髓神经表现为髓鞘水肿、变性、溶解，轴突被挤压，雪旺细胞变性，纤维裸露；无髓神经表现为水肿、空泡化，微丝、微管管排列不整齐，见图 3、4。

2.2　糖尿病大鼠成模后不同周数皮肤 SP 含量 ELISA 测定

随发病时间的延长，糖尿病大鼠皮肤 SP 含量呈逐步下降趋势，在发病后 4 ~ 6 周下降最为明显，分别为第 4 周（12.00 ± 1.15）pg/g 组织；第 5 周（7.71 ± 0.98）pg/g 组织；第 6 周（10.14 ± 1.07）pg/g 组织；8 周后稍有恢复为（20.29 ± 1.50）pg/g 组织。与正常大鼠皮肤 SP 含量（31.29 ± 2.21）pg/g 组织相比有显著性差异（$P < 0.01$）。



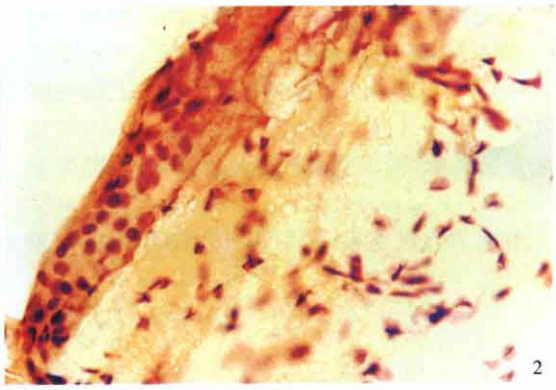


图1 正常大鼠SP阳性神经在表皮及真皮交界处较为密集 (SABC×400)

Fig 1 SP-positive nerve fibers mainly distributed in boundary between epidermis and hypodermis in the skin of normal rats (SABC×400)

图2 发病后4周糖尿病大鼠皮肤SP阳性神经在真皮内数量明显减少 (SABC×400)

Fig 2 SP-positive nerve fibers decreased obviously in hypodermis suffered from diabetes at week 4 (SABC×400)



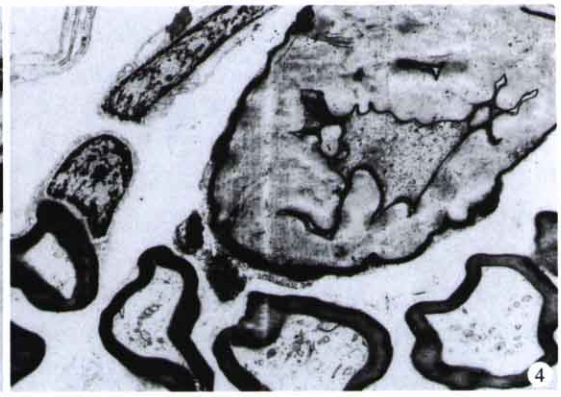


图3 发病后4周糖尿病大鼠皮肤真皮层无髓神经纤维空泡样变性,微丝微管排列不整齐 (TEM×7 000)

Fig 3 The nonmyelinated nerve fiber from hypodermis in the skin of diabetic rats developed vacuolar degeneration and microfilament and micropipe disaligned at week 4 after STZ injection (TEM×7 000)

图4 发病后4周糖尿病大鼠皮肤真皮层有髓神经纤维髓鞘水肿,轴突被挤压 (TEM×2 900)

Fig 4 The myelinated nerve fibers sheath from hypodermis in the skin of diabetic rats developed edema and degeneration and axon was squeezed at week 4 after STZ injection (TEM×2 900)

2.3 糖尿病大鼠皮肤全层及表皮厚度与组织中P物质含量的相关性分析

糖尿病大鼠皮肤SP含量与其表皮厚度呈正相关,相关系数 $r=0.769$, P 值0.026,有显著性差异;SP含量与皮肤全层厚度呈正相关,相关系数 $r=0.935$, $P<0.01$。

3 讨论

糖尿病是严重威胁人类健康的疾病之一,随着糖尿病发病率的增加,糖尿病肢端坏疽、皮肤病变、创伤后伤口难愈合等并发症成为临床上较为棘手的难题。而上述并发症的发生与糖尿病皮肤本身固有的病理改变有关。

为进一步研究糖尿病皮肤发生的病理变化及其发病机制,本实验采用腹腔注射链尿佐菌素的方法造成糖尿病大鼠模型,该模型在对糖尿病的实验性研究中已被广泛采用[2]。

实验研究证实,糖尿病大鼠发病后4~6周皮肤病理改变比较明显,表现为表皮及真皮变薄,细胞外基质成分减少,胶原排列紊乱;有髓神经表现为髓鞘水肿、变性、轴突被明显挤压,甚至出现脱髓鞘病变。这与陆树良[1]、Khan等[3]的研究结果一致,同时与糖尿病患者的皮肤病理改变相似。另外,我们通过免疫组化研究发现:皮肤中SP免疫阳性的神经末梢及成纤维细胞明显减少;电镜下感觉神经纤维末梢的改变明显,无髓神经纤维也可出现空泡样改变,微丝微管排列不整齐;成纤维细胞增殖活性降低,表现为染色质致密团块,细胞突起明显减少;进一步通过ELISA测定,发现SP在糖尿病大鼠局部皮肤中的含量显著降低,其变化趋势与皮肤发生的病理改变相一致,提示SP也是造成这种病理改变的原因之一。

SP在局部皮肤中的含量主要来源于两部分,其中

大部分在脊髓背侧神经节合成，然后由轴浆运输至感觉神经纤维末梢贮存；少部分由组织细胞自身合成。因此，造成 SP 在糖尿病皮肤中降低的机制可能为：①局部皮肤组织高血糖、糖基化终末产物蓄积、微血管功能障碍等多种因素引起周围神经病变，感觉神经元表达神经肽基因编码的 mRNA 减少，SP 合成的总量减少[4]。②糖尿病局部皮肤中的神经内肽酶含量较正常组织明显增高[5]，SP 的降解加快。③感觉神经末梢的 SP 含量与组织细胞的自身合成存在某种关联，SP 在感觉神经纤维末梢含量减少可能影响组织细胞的自身合成[6]。

SP 在糖尿病局部皮肤的含量减少与糖尿病皮肤发生的病理改变有关，SP 作为一种促有丝分裂源和神经营养因子在组织代谢及修复过程中扮演重要的角色：可促进多种细胞如成纤维细胞、角质形成细胞、血管内皮细胞等分裂和增殖以及细胞 DNA 的合成[7]，维持皮肤组织的完整性；调节组织细胞分泌合成多种神经营养因子[8,9]，从而保持皮肤感觉神经的完整性。

由此提示，SP 在糖尿病局部皮肤含量的降低及 SP 阳性神经纤维的分布变化导致糖尿病皮肤发生病理改变的机制可能为：SP 作为神经营养因子和促有丝分裂源直接促进角质形成细胞、成纤维细胞等的分裂增殖，SP 含量降低，导致组织细胞增殖活性减弱，引起皮肤变薄；SP 作为感受因子参与多种组织细胞的增殖过程，可促进表皮细胞、成纤维细胞等由细胞增殖的 G_0 期进入感受状态。而其它增进因子如神经生长因子、成纤维细胞生长因子等促进进入感受态的细胞进一步增殖和分化[10]。如 SP 作为感受因子的作用减弱，则组织细胞增殖周期发生改变，从而导致皮肤发生病理损害；糖基化终末产物蓄积、脂代谢异常等因素导致的 SP 与其受体结合障碍及受体数目和功能的改变。与组织增殖和代谢相关的 SP 受体种类、数目及功能的改变有待进一步研究。

参考文献：

[1] 陆树良，青　春，谢　挺，等. 糖尿病皮肤“隐性损害”的机制研究[J]. 中华创伤杂志，2004，20(8)：468－473.

[2] Witte M B，Kiyama T，Barbul A. Nitric oxide enhances experimental wound henaling in diabetes[J]. Br J Surg，2002，89(12)：1594－1601.

[3] Khan G M，Chen S R，Pan H L. Role of primary afferent nerves in allodynia caused by diabetic neuropathy in rats[J]. Neuroscience，2002，114(2)：291－299.

[4] Rittenhouse P A，Marchand J E，Chen J，*et al*. Streptozotocin-induced diabetes is associated with altered expression of peptide-encoding mRNAs in rat sensory neurons[J]. Peptides，1996，17(6)：1017－1022.

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

[6] 魏　立，赖西南，王正国，等. 创伤愈合过程中伤口组织内 SP、NO 和 NOS 表达变化及其可能作用[J]. 第三军医大学学报，2004，26(19)：1704－1707.

[7] Paus R，Heinzelmann T，Robicsek S，*et al*. Substance P stimulates murine epidermal keratinocyte proliferation and dermal mast cell degranulation in situ[J]. Arch Dermatol Res，1995，287(5)：500－502.

[8] 朱金明，赖西南，王正国，等. P 物质对大鼠成纤维细胞生长因子及其受体表达的影响[J]. 中华实验外科杂志，2003，20(1)：41－43.

[9] Burbach G J，Kim K H，Zivony A S，*et al*. The neurosensory tachykinins substance P and neurokinin A directly induce keratinocyte nerve growth factor[J]. J Invest Dermatol，2001，117(5)：1075－1082.

[10] 王正国，付小兵，周元国，等. 分子创伤学[M]. 福州：福建科学技术出版社，2004. 8.

（编辑　陈聪连）

（上接 863 页）

数可表现为圆形瘤细胞，排列呈片状或巢状，出现此种形态改变时，很易与恶性淋巴瘤、未分化小细胞癌、嗅神经母细胞瘤等小细胞恶性肿瘤混淆，病理诊断中必须与之鉴别。恶性淋巴瘤由非粘附性的细胞构成，且 LCA 染色阳性；未分化小细胞癌多为泡沫状核，且呈巢状、梁状、带状及片状分布，免疫组化 CK 呈阳性表达；嗅神经母细胞瘤通常有神经丝，可见菊形团，且 NSE 抗体染色阳性。本例瘤组织主要由大小较一致呈团片状排列的小圆形细胞构成，并同时伴有颈部淋巴结转移，在未做免疫组化的情况下，极易误诊为小细胞未分化癌。关于横纹肌肉瘤的转移，文献[2]报道约有 64% 的病例可发生淋巴结转移。但鼻咽部 ERMS 发生颈部淋巴结转移相对比较少见，目前尚少见文献报道。虽然细针穿刺活检对诊断有一定的帮助[3,4]，但要确诊，主要应依靠全面的组织学观察并结合免疫组化染色。因此，通过本例我们认为：①诊断发生于鼻咽部的小细胞肿瘤，在缺乏特异的形态时，必须细致观察肿瘤特点，并依靠免疫组化染色鉴别。②鼻咽部的 ERMS 可以发生颈部淋巴结转移，应采用 CT 和 MRI 进一步寻找原发病灶[5]，同时，对于颈部淋巴结转移的小细胞肿瘤，不能只考虑鼻咽癌转移，还存在其他小细胞恶性肿瘤转移的可能。

关键词：横纹肌肉瘤；鼻咽肿瘤；淋巴转移
中图法分类号：R738.7　　文献标识码：B

参考文献：

[1] Mehta S，Verma A，Mann S B，*et al*. Rhabdomyosarcoma of head and neck-an analysis of 24 cases[J]. Indian J Cancer，1996，33(1)：37－42.

[2] De-la-Monte S M，Hutchins G M，Moore G W. Metastatic behavior of rhabdomyosarcoma[J]. Pathol Res Pract，1986，181(2)：148－152.

[3] Khirwadkar N，Dey P，Das A，*et al*. Fine-needle aspiration biopsy of metastatic soft-tissue sarcomas to lymph nodes[J]. Diagn Cytopathol，2001，24(4)：229－232.

[4] Agarwal P K，Sivastava A，Mathur N，*et al*. Fine needle aspiration of poorly differentiated rhabdomyosarcoma presenting with quadriparesis：A case report[J]. Acta Cytol，1996，40(5)：985－988.

[5] Peregud Pogorzelski J，Brodkiewicz A，Jaworowska E，*et al*. Embryonal rhabdomyosarcoma of the nasopharynx in a 3-year old girl[J]. Otolaryngol Pol，2002，56(1)：101－105.

（编辑　栾　嘉）