论著

文章编号:1000-5404(2006)10-1038-02

糖尿病大鼠血浆和皮肤中P物质检测及意义

流 沙[1],陈 亮[2],蔡红卫[1],陈 兵[1] (第三军医大学西南医院:[1]内分泌科,[2]整形外科中心,重庆 400038)

提 要:目的 研究神经肽P物质(substance P, SP)在糖尿病大鼠动物模型血浆及皮肤组织中含量及意义。**方法** 用放射免疫法分别检测糖尿病大鼠(20只)和正常大鼠(20只)血浆和皮肤组织中SP的含量,用免疫组化法观测动物模型建立后SP神经纤维数量变化。**结果** 糖尿病大鼠血浆和皮肤组织中SP含量明显低于正常对照组($P<0.01$)。**结论** 皮肤组织中SP含量变化与糖尿病伤口难愈相关。

关键词:糖尿病;P物质

中图法分类号:R364.33;R446.6;R587.102 **文献标识码**:A

Detection and significance of substance P in plasma and skin tissue of diabetic rats

LIU Sha[1], CHEN Liang[2], CAI Hong-wei[1], CHEN Bing[1] ([1]Department of Endocrinology, [2]Plastic Surgery Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the change and significance of substance P in plasma and skin tissue of diabetic rats. **Methods** The substance P in plasma and skin tissue was measured by the radioimmunoassay (RIA) in diabetic rats ($n=20$) and normal rats ($n=20$) respectively. **Results** The substance P in diabetic rats was significantly lower than that in normal group ($P<0.01$). **Conclusion** The lower dose of substance P in skin tissue might be implicated in refractory wound healing in human diabetes.

Key words: diabetics; substance P

感觉神经肽P物质(substance P, SP)能明显加快创面愈合速度,并具有诱导表皮干细胞向创缘和肉芽组织中迁移的作用,其过度表达可造成瘢痕增生;SP可以促进伤口愈合,其机制可能和启动神经源性炎症反应、调控免疫细胞功能、促使修复细胞增殖等有关。有研究表明[1]糖尿病患者胃肠道功能紊乱与SP含量降低密切相关,糖尿病患者皮肤中存在周围末梢神经的损伤和神经肽含量的下降,是否存在血浆和皮肤SP含量下降导致糖尿病患者伤口继发性难愈,本实验拟通过糖尿病动物模型研究二者相关性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 分组 由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雄性SD大鼠40只,体质量180~200 g,随机分为正常对照组($n=20$)和实验组(糖尿病组,$n=20$)。

1.1.2 糖尿病模型制备 根据文献[2]的方法,给造模大鼠单剂量腹腔注射链脲佐菌素(STZ),STZ溶解于0.1 mol/L枸橼酸缓冲液中,以100 mg/kg计量,对照组注射等量枸橼酸缓冲液,48 h后采尾静脉血,用血糖仪测定全血血糖。血糖>16.7 mmol/L,尿糖+++—++++,维持1周以上者确定为糖尿病模型建立。

1.2 方法

1.2.1 标本制备[3] 在造模后4周,对照组及实验组大鼠以1%戊巴比妥钠作腹腔麻醉,30 mg/kg,腹主动脉抽血2 ml,立即注入依地酸二钠60 ml以及抑肽酶1 500 IU,于离心管中混匀,4 ℃ 4 000 r/min离心20 min,取上清液保存于-70 ℃冰箱备测。此为血浆待测标本。

在造模后4周,对照组及实验组大鼠以1%戊巴比妥钠作腹腔麻醉,30 mg/kg,电动剪行背部剃毛,于背部脱毛区皮取1.0 cm×0.5 cm大小皮片,置于生理盐水中洗净,加入到煮沸的生理盐水中煮10 min,捞起后进行称重,加入1 ml的1 mol/L冰醋酸充分匀浆,静置3 h,加入等体积1 mol/L的NaOH溶液混匀,4 ℃ 4 000 r/min离心20 min,取上清液保存于-70 ℃冰箱备测。此为皮肤待测标本。

1.2.2 放免测定 同批测定皮片中SP,测定标本用石油醚提取,再应用放射免疫方法测定SP。SP药盒由北京海科锐生物技术中心提供,具体操作方法按药盒说明书。批内CV4.1%,批间CV8.5%,用r计数仪测定。

1.2.3 S-P免疫组化染色 新鲜切除的实验组及对照组术前术后皮肤标本,生理盐水清洗3次去除血污,用眼科剪去除皮下脂肪。制备石蜡切片,石蜡包埋后切片,厚度为4 μm,贴片后烘干进行S-P免疫组化染色。S-P免疫试剂盒及DAB显色试剂盒由北京中山生物技术有限公司提供。具体方法按试剂盒步骤操作,显微镜下观察照相。

1.3 统计学处理

采用SPSS 10.0软件包,计数资料用χ^2检验,计量资料组间比较采用t检验。

作者简介:流 沙(1977-),女,重庆市人,硕士研究生,医师,主要从事糖尿病防治方面的研究。电话:(023)66953652, E-mail:gulsha@tom.com

通讯作者:陈 兵,电话:(023)68754138

收稿日期:2005-10-27;修回日期:2006-01-10

2　结果

2.1　动物模型建立前后大鼠体质量及血糖含量比较

动物模型建立前，实验组与对照组大鼠体质量及血糖无显著差异（$P>0.05$），动物模型建立后，实验组与对照组体质量及血糖有显著差异（$P<0.01$）。见表 1。

表 1　对照组和实验组大鼠动物模型建立前后体质量血糖比较
（$n=20$，$\bar{x}\pm s$）

组别	体质量（g）		血糖（mmol/L）	
	0 周	4 周	0 周	4 周
对照组	196.34 ± 9.23	386.21 ± 10.12	4.55 ± 0.46	4.61 ± 0.41
实验组	192.78 ± 8.78	236.98 ± 10.33[a]	4.56 ± 0.38	28.06 ± 0.47

a：$P<0.01$，与对照组比较

2.2　动物模型建立前后大鼠血浆及皮肤中 SP 含量比较

动物模型建立前，实验组与对照组大鼠血浆及皮肤中 SP 含量无显著差异（$P>0.05$），动物模型建立后，实验组与对照组血浆及皮肤中 SP 含量有显著差异（$P<0.01$）。见表 2。

表 2　对照组和实验组大鼠动物模型建立前后血浆和皮肤中 SP 含量比较（pg/ml，$n=20$，$\bar{x}\pm s$）

组别	血浆		皮肤	
	0 周	4 周	0 周	4 周
对照组	91.79 ± 5.43	91.21 ± 5.12	103.21 ± 6.61	102.86 ± 7.31
实验组	92.21 ± 6.66[a]	72.46 ± 7.31[a]	101.86 ± 5.93[a]	61.09 ± 6.18[a]

a：$P<0.01$，与对照组比较

2.3　动物模型建立前后 SP 神经纤维比较

在特异性抗血清孵育的实验组及对照组术前术后的皮肤 S-P 免疫组化光镜切片上，S-P 免疫组化反应产物呈棕色沉淀，背景浅黄色。S-P 免疫反应阳性神经纤维，在正常皮肤的乳头层小血管旁分布较多，在网状层和乳头层常见单根走行的 S-P 免疫反应阳性神经纤维。增生性瘢痕组每高倍视野 S-P 免疫反应阳性神经纤维数为 7.22 个，明显多于正常皮肤组 4.64 个（$P<0.01$）。动物模型建立前，实验组与对照组大鼠皮肤中 S-P 免疫反应阳性神经纤维数量相近（分别为 12.32 个和 12.45 个，$P>0.05$）动物模型建立后，实验组 4 周后 S-P 免疫反应阳性神经纤维数量少于对照组皮肤（分别为 8.87 个和 12.36 个，$P>0.05$）。

3　讨论

作为第 1 个被发现的神经肽，SP 在创伤愈合中的作用也逐渐被人关注。SP 是分子量为 1 340 的 11 肽，目前已可用化学方法合成。SP 广泛分布于中枢神经系统、周围神经系统以及组织器官中，按其分布部位及作用方式不同，起着神经递质、神经调质或激素样作用。SP 反应阳性神经在真皮中主要分布在真皮浅层微小血管周围，并经由乳头层进入表皮。SP 是传递痛觉的一种递质，对维持皮肤的感觉和感受伤害性刺激起着主要作用。SP 能以神经内分泌的方式作用于各种免疫细胞，参与免疫调节，促进免疫功能。SP 不仅可增强单核巨噬细胞的吞噬和趋化作用，也可促进 T 细胞增生、B 细胞合成和分泌免疫球蛋白等生理性免疫反应[4]。最近有报道 SP 对正常皮肤的成纤维细胞有一定的促增殖作用，并可与表皮生长因子和成纤维细胞生长因子协同作用促进成纤维细胞有丝分裂[5]。

长久以来，糖尿病伤口的难愈现象一直困扰着临床医生和科研工作者。糖尿病创面的难愈现其机制的研究主要集中在以下 3 方面：①微循环障碍使创面局部缺乏足够的营养支持以及糖尿病神经病变局部神经营养障碍导致创面愈合延迟。②炎症细胞功能紊乱。③细胞因子受体糖基化和糖基化终末产物蓄积使信号通路阻断，且引起组织、细胞功能的紊乱[6]。本实验研究糖尿病创面伤口难愈性与 SP 含量的关系，SP 与上述影响糖尿病愈合 3 方面均具有关联，有重要意义。

糖尿病患者 SP 下降与糖尿病多种慢性并发症有关，如糖尿病合并冠心病，神经疼痛及胃肠功能紊乱均与 SP 含量变化有关[1]。糖尿病创面伤口难以愈合，如糖尿病足经久不愈，此并发症是否与血浆及皮肤中的神经肽 SP 含量相关，尚少见报道。本实验通过大鼠糖尿病动物模型的建立，研究糖尿病创面伤口难愈性与 SP 含量的关系，本组资料结果表明，糖尿动物模型中血浆及皮肤中的 SP 含量/SP 神经纤维数量较对照组下降，有显著差异。由此可以推测，糖尿病患者血浆及皮肤中 SP 含量降低，当有创面产生时，有 SP 参与的免疫及促成纤维细胞增殖的作用减低，将导致创面难愈性。其具体机制及效果还有待于进一步研究。

糖尿病患者 SP 下降与糖尿病多种慢性并发症有关，而空腹血糖升高将影响 SP 下降，因而在糖尿病合并慢性并发症治疗中，仍应强调控制血糖。深入研究糖尿病创面伤口难愈性与 SP 神经纤维的关联与机制，有助于为糖尿病伤口难愈性提供新的思路与方法，为临床治疗提供新的途径。

参考文献：

[1] MENZIES J R, MCKEE R, CORBETT A D. Differential alterations in tachykinin NK2 receptors in isolated colonic circular smooth muscle in inflammatory bowel disease and idiopathic chronic constipation[J]. Regul Pept, 2001, 99(2-3): 151-156.

[2] 于德民，吴　锐，尹　潍，等. 实验性链脲佐菌素糖尿病动物模型的研究[J]. 中国糖尿病杂志，1995，3(2)：105-109.

[3] GIBRAN N S, JANG Y C, ISIK F F, *et al*. Diminished neuropeptide levels contribute to the impaired cutaneous healing response associated with diabetes mellitus[J]. J Surg Res, 2002, 108(1): 122-128.

[4] 陈　亮，李世荣，丛　林. 皮肤中的肥大细胞与神经肽 P 物质[J]. 中国临床康复，2004，8(2)：334-335.

[5] SANAPANICH K, MORRISON W A, MESSINA A. Physiologic and morphologic aspects of nerve regeneration after end-to-end or end-to-side coaptation in a rat model of brachial plexus injury[J]. J Hand Surg (Am), 2002, 27(1): 133-142.

[6] CULLEN B, WATT P W, LUNDQVIST C, *et al*. The role of oxidised regenerated cellulose/collagen in chronic wound repair and its potential mechanism of action[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2002, 34(12): 1544-1556.

（编辑　张大春）