文章编号:1000-5404(2006)08-0841-03

论著

P物质对增生性瘢痕中肥大细胞组胺释放的影响

陈 亮,李世荣,丛 林 (第三军医大学西南医院整形外科,重庆 400038)

提 要: 目的 定量分析P物质(substance P, SP)作用时间对人增生性瘢痕(hypertrophic scar, HS)中肥大细胞(mast cell, MC)组织胺释放的影响,探讨HS中二者的相互作用及作用的时间条件。**方法** 人HS活体组织块切下后立即处理,修剪成0.5~1 mm^3大小,测定在相同浓度的SP、不同的SP作用时间下,MC的脱颗粒情况。荧光法测定作用后上清液中组胺含量,计算组胺释放率。**结果** 在HS中,SP以时间依赖方式刺激MC组胺的释放,且HS中SP对MC作用强于正常皮肤。**结论** HS中的SP与MC的关系非常密切,存在作用时间依赖性,有利于研究SP作用与HS的相互作用及作用条件。

关键词: 增生性瘢痕;P物质;肥大细胞;组胺释放
中图法分类号: R329.26;R364.31;R392.3 **文献标识码**: A

Relationship between substance P and histamine release of mast cells in human hypertrophic scar

CHEN Liang, LI Shi-rong, Cong Lin (Department of Plastic Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To detect a quantitative relation between reaction time of substance P (SP) and histamine release of mast cells (MC) in hypertrophic scar (HS) and discuss the interaction and time-effect of substance P and histamine release in HS. Methods The HS specimens were from the 4 to 7-year-old scalded or burnt patients who underwent operation because of cicatricial contraction. The normal skins were the autograft. HS specimens were cut into 0.5 – 1 mm^3, then treated with 5×10^{-5} mol/L SP for 5, 15, 30, 60 min. The degranulation of MC was detected and the histamine released by mast cells in the supernate after SP treatment was examined by immunofluorescence. Conclusion SP and MC are of a close relationship in HS, and SP can affect histamine release of mast cell in time-dependent manner.

Key words: hypertrophic scar; substance P; mast cell; histamine release

瘢痕的形成是组织损伤修复的正常过程,然而瘢痕的过度增生,不仅会严重破坏患者容貌,导致全身各处功能障碍,其引起的疼痛瘙痒和感觉异常也同样给患者造成巨大的痛苦,其发病机制至今未明。有研究表明,P物质(substance P, SP)和肥大细胞(mast cell, MC)脱颗粒释放的组胺均可导致增生性瘢痕(hypertrophic scar, HS)的形成,并且二者可能是导致HS瘙痒、潮红症状的重要介质[1]。但目前HS中SP与MC的作用条件和机制还少见报道。本研究定量分析SP作用时间对人HS中MC组织胺释放的影响,探讨HS中二者的相互作用及作用的时间条件。

作者简介:陈 亮(1978-),男,吉林省吉林市人,博士研究生,医师,主要从事瘢痕的防治方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)66953652, E-mail: chenliang1978309@tom.com
通讯作者:李世荣,电话:(023)68754192
收稿日期:2005-06-21;修回日期:2005-10-01

1 材料与方法

1.1 标本选取

HS标本8例,均取自于我院整形外科烧伤患者,因瘢痕挛缩畸形需行手术的患者;正常皮肤标本8例,取自供皮取。取材时限:烫伤或烧伤后7~12个月。其中男性4例,女性4例,年龄4~11岁,平均6.7岁。取材患者术前检查无传染病、免疫病和其他皮肤病,肝肾功能、血糖及各项实验室检查正常,局部未行任何治疗。

1.2 取材处理

新鲜切除的HS组织标本,用生理盐水清洗3次去除血污,用眼科剪去除皮下脂肪后取7 g标本,生理盐水冲洗后,放置于有DMEM(1%抗菌液)溶液的培养皿中,将其修剪成0.5~1 mm^3大小的组织块,Hanks液漂洗3次,各取湿重0.4 g组织块分装于EP管中,等待加液。以上步骤需在4 h内完成。

1.3 MC组织胺释放的提取[2]

对照组0 min,即加入SP溶液摇匀后立即吸出上清液;实验组分别加入SP后分别作用:①5 min;②15 min;③30 min;④

60 min。用 DMEM 液(含 10% FBS 和 3×10^{-3} mol/L $CaCl_2$)配制浓度为 5×10^{-5} mol/L SP 溶液 2.5 ml,取步骤二中含组织块的 EP 管,分别加入 5×10^{-5} mol/L SP 溶液 0.5 ml,37 ℃摇动水浴 5、15、30、60 min 培养,吸出上清液贮存于 -70 ℃冰箱直至组胺分析,此样品组胺是 5×10^{-5} mol/L SP,在不同作用时间下对 MC 组胺释放的影响。提取上清液后的组织块分别加入去离子水 0.5 ml,加热煮沸(破坏细胞,释出组胺)20 min,摇匀后离心(1 500 × g,10 min),吸出上清液,贮存于 -70 ℃冰箱直至组胺分析,此为组织块中剩余的组胺。

在正常血浆中 SP 浓度约为 $10^{-9}\sim10^{-11}$ mol/L,Weidner 等[3]用微透析法研究人皮肤中 SP 作用的结果证明:当 SP 达到 10^{-5} mol/L 能致使 MC 组胺显著释放。在瘢痕组织块预试验中,结果表明当 SP 达到 10^{-6} mol/L 时即有 MC 组胺的显著释放,随 SP 浓度增加,组胺释放率增加,当 SP 浓度达到 5×10^{-5} mol/L 时,组胺释放率已接近高峰,故本试验选择 SP 浓度为 5×10^{-5} mol/L 为刺激因素。

1.4 组织胺的测定[4]

1.4.1 上清液的处理 已提取的上清液(均为 0.5 ml),加双蒸水 1.15 ml 后,缓缓加入 25%(W/V)三氯乙酸 0.35 ml,混匀后取上清液 1.6 ml,相当于取样的 4/5。

1.4.2 组织胺的提纯 将 1.6 ml 上清液置入已加 1.5 g NaCl 的 10 ml 具塞试管中,再加入 4.0 ml 正丁醇和 0.2 ml 2.5 mol/L的 NaOH,立即混匀,置震荡器震荡 5 min(将组胺提取到正丁醇中),静置后取 3.6 ml 正丁醇相,加到已含 1.2 ml 0.1 mol/L HCl 和 2.0 ml 正庚烷的试管内,震荡 5 min 弃有机相(组胺回到水溶液中),取出 0.8 ml HCl 相。上述步骤已去除干扰物质,将组胺移到酸性水溶液中。

1.4.3 荧光物质的生成 0.8 ml HCl 相用双蒸水稀释一倍,加 0.4 ml 0.4 mol/L 的 NaOH 碱化,混匀并迅速加入新鲜配制的 0.1%(W/V) OPT 甲醇液 0.1 ml,立即混匀在 21 ~ 22 ℃反应 10 min,加 0.4 ml 0.5 mol/L HCl 酸化终止缩和反应,并使组胺与 OPT 形成的荧光物质稳定。

1.4.4 空白对照的制备 0.5 ml 的双蒸水,与样品平行操作,但步骤(3)中加液顺序为 0.4 ml 0.5 mol/L HCl、0.1%(W/V) OPT 甲醇液 0.1 ml、0.4 ml 0.4 mol/L 的 NaOH。

1.4.5 荧光强度测定 用 F-2500 型荧光分光光度计,在激发波 360 nm,荧光波 450 nm 下测定荧光强度。

组胺释放率 = 样品组胺/(样品组胺 + 剩余组胺) × 100%

1.5 组胺释放率的计算和统计学处理

结果均用 $\bar{x}\pm s$ 来表示,使用 SPSS 10.0 统计软件进行,组间比较用单因素方差分析,两两比较用 t 检验。

2 结果

本实验组在 SP 5×10^{-5} mol/L 的相同浓度刺激下,随作用时间的增长观测 MC 组胺释放率的变化,均明显高于对照组。第 2 组作用时间达到 15 min 时,结果表明 HS 组大约已有 90% 的组胺释放;第 3 组与第 4 组比较 $P>0.05$,即作用 30 min 与 60 min 无差异,SP 对 MC 的作用效果在 30 min 内已基本完成,达到稳定,并且 MC 组胺释放有 SP 作用时间依赖性。在同等条件下 SP 对 HS 作用强于正常皮肤(表 1)。

表 1 SP 作用时间对 HS 及正常皮肤中 MC 组胺释放率的影响

组别	时间(t/min)	HS 组胺释放率(%)	正常皮肤组胺释放率(%)
对照组	0	45.26 ± 2.59	32.34 ± 1.55
1	5	50.14 ± 1.43[a]	37.18 ± 2.21[a]
2	15	52.79 ± 1.45[ab]	41.46 ± 2.15[b]
3	30	56.20 ± 2.03[ac]	50.20 ± 1.66[c]
4	60	57.15 ± 2.17[a]	51.09 ± 1.47

a: $P<0.01$ 与对照组相比; b: $P<0.05$ 与 1 组相比; c: $P<0.01$ 与 2 组相比

3 讨论

神经肽与 MC 的相互作用近年才引起国内外学者的关注,特别是 SP 作为首次发现的神经肽,可显著促 MC 脱颗粒[5]。有报道表明在人皮肤经络线上有神经与肥大细胞联接的突触样结构,并且发现与肥大细胞形成突触样联接的神经纤维末梢内有 P 物质免疫反应的囊泡,提示递质可能为 P 物质, Huttunen 等[6]用显微透析技术证实 P 物质促肥大细胞释放组胺在皮肤炎症反应中起重要的作用,肥大细胞与神经肽 P 物质的相互作用贯穿于皮肤免疫反应和瘙痒炎症作用的整个过程。P 物质促使肥大细胞脱颗粒释放组胺,此效应已先后在小鼠、大鼠和人的正常皮肤肥大细胞上得到证实。

众多的实验研究 SP 与正常皮肤及病理性皮肤中 MC 的相互作用,分析 SP 与 MC 的作用条件,并推测二者的作用机制以指导临床工作。已经证实 SP 与 MC 的相互作用,与许多皮肤性疾病相关,外用 SP 拮抗剂可治疗一些与 MC 相关的皮肤病如银屑病、特应性皮炎、寒冷性荨麻疹等[1,7]。但人 HS 中 SP 与 MC 的相互作用仍有待进一步研究。

人 HS 中 MC 脱颗粒组胺释放存在 SP 剂量依赖性,即当 SP 达到一定浓度时,MC 组胺释放率随 SP 浓度增加而升高。已在以往实验中证明,此实验表明,随作用时间的延长,MC 组胺释放率显著增加,呈明显的时间依赖性。本实验在作用时间 15 min 内,瘢痕中的 MC 大约已有 90% 的组胺释放;而 Ebertz 等[8]研究人正常皮肤,在 15 min 内仅有 80% 的组胺释放,也说明在 HS 中 SP 对 MC 作用强于正常皮肤,与本实验结果相一致。

在 SP 对大鼠腹膜 MC 作用的研究中, SP 引起腹膜 MC 组胺释放的浓度更低,在 SP 作用 15 ~ 20 s 内,MC 组胺释放已基本完成[9]。这可能是因为体外瘢痕组织块有一定的厚度,SP 的渗透作用需一定的时间,并且渗透和作用的速度与 SP 浓度密不可分。在生理情况下,含 SP 的神经纤维与 MC 连接作用时,SP 释放和起作用的时间有待于进一步的研究。但可以预想少了组织障碍,其所起作用的时间会更快。

参考文献:

[1] 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.

[2] ONUOHA G N, ALPAR E K. Calcitonin gene-related peptide and otherneuropeptides in the plasma of patients with soft tissue injury[J]. Life Sci, 1999, 65(13): 1351-1358.
[3] WEIDNER C, KLEDE M, RUKWIED R, *et al*. Acute effects of substance P and calcitonin gene-related peptide in human skin--a microdialysis study[J]. J Invest Dermatol, 2000, 115(6): 1015-1020.
[4] 向军俭, 陈华粹. 组胺的荧光测定法的研究[J]. 中国医学科学院学报, 1981, 3(3): 183-187.
[5] AZZOLINA A, BONGIOVANNI A, LAMPIASI N. Substance P induces TNF-alpha and IL-6 production through NF kappa B in peritoneal mast cells [J]. Biochim Biophys Acta, 2003, 1643(1-3): 75-83.
[6] HUTTUNEN M, HARVIMA I T, ACKERMANN L, *et al*. Neuropeptide- and capsaicin-induced histamine release in skin monitored with the microdialysis technique[J]. Acta Derm Venereol, 1996, 76(3): 205-209.
[7] HE S H. Key role of mast cells and their major secretory products in inflammatory bowel disease[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(3): 309-318.
[8] EBERTZ J M, HIRSHMAN C A, KETTELKAMP N S, *et al*. Substance P-induced histamine release in human cutaneous mast cells[J]. J Invest Dermatol, 1987, 88(6): 682-685.
[9] PINCELLI C, FANTINI F, MASSIMI P, *et al*. Neuropeptides in skin from patients with atopic dermatitis: an immunohistochemical study [J]. Br J Dermatol, 1990, 122(6): 745-750.

(编辑 周 芳)

文章编号:1000-5404(2006)08-0843-01

个案与短篇

以肌肉颤搐为主要表现的腰椎间盘突出症1例

陈 婧, 陈康宁 (第三军医大学西南医院神经内科, 重庆 400038)

1 临床资料

患者, 女性, 19岁, 学生, 因右下肢肌肉抖动入院。入院前9 d腰扭伤后觉腰酸痛, 持续10余分钟缓解。次日出现右下肢肌肉持续性抖动, 站立加重, 坐、卧位减轻, 睡眠时不消失。下肢用力时大腿后部向下发射性疼痛, 持续1~2 s。体格检查: 内科查体无异常, 无四肢肌肉肥大或萎缩, 无叩击性肌球和肌肉疼痛, 右下肢可见大腿股内侧肌、小腿腓肠肌水波纹样或虫蠕样颤搐, 触之有滚动感。无腰椎侧突, 腰部前屈稍受限, 腰3/4、腰4/5及腰5/骶1椎间隙右侧压痛, 右侧直腿抬高试验阳性, 加强试验阳性, "4"字试验阳性。辅助检查: 肌酶谱、电解质、甲状腺功能正常, 脑脊液检查正常, 肌电图检查提示: 右股内侧肌、腓肠肌可呈电静息, 运动单位时限、电压在正常范围, 多相电位少量; 右股内侧肌持续用力可见肌肉颤搐电位(群放电位)。腰椎MRI提示: 腰4/5及腰5/骶1椎间盘膨出; 腰3/4椎间盘突出, 右后方明显。硬膜囊受压, 蛛网膜下隙变窄。右侧神经根受压。予卡马西平0.1 g, 2~3次/d口服及卧床休息、营养神经等治疗, 症状明显缓解出院。出院后坚持服药及卧床休息, 随访至今无复发及加重。

2 讨论

腰椎间盘突出症是指腰椎间盘的纤维环破裂髓核组织突出压迫和刺激神经根所引起的一系列症状和体征。主要症状为下腰部或腰骶部疼痛、坐骨神经痛, 还有下腹部或大腿前内侧痛、间歇性跛行、患肢麻木或发凉、无力或瘫痪、括约肌及性功能障碍等症状。体征为强迫体位和异常步态, 腰椎形态的改变, 活动度减少, 病变棘间隙的患侧有明显压痛及放射痛, 肌萎缩和肌力减弱, 皮肤浅感觉减退及腱反射减弱或消失, 直腿抬高试验及加强试验阳性等。诊断腰椎间盘突出症, 必须将症状、体征和影像学资料结合一起全面综合分析。此例诊断明确, 属于青少年型腰椎间盘突出症。青少年腰椎间盘突出症临床不常见, 发病率各家报道不一, 占全部腰椎间盘突出症的0.5%~3%, 也有报道高达15%[1]。临床表现与成人腰椎间盘突出症有很大不同, 主要特点: ①自觉症状少而体征相对较重; ②多有明确外伤史。本例患者发病前有腰部外伤史, 有短暂腰痛、下肢放射性神经痛, 但不显著且短暂。主要表现与常见的青少年腰椎间盘突出症表现明显不同, 为右下肢股内侧肌及腓肠肌肌肉颤搐, 查体为受累肌肉呈水波纹样、虫蠕状肌肉颤搐, 肌电图可见肌肉颤搐电位。

肌肉颤搐为临床表现及肌电图检查均有独特性的神经肌肉病, 在临床上比较罕见, 是一种少见的非随意性肌肉自发性运动, 各肌肉群的肌纤维交替地呈波动性、虫蠕状或水波样运动, 可发生在面部、肢体或躯干, 但以下肢的腓肠肌最常见且最明显, 可局限性发作也可全身性累及, 用手触之有波动感, 在运动后可加重或诱发, 休息或睡眠仍持续存在。以肌肉颤搐为主要表现的疾病有特发性肌肉颤搐、Isaacs综合征、Morvan综合征、发作性共济失调(EA)、家族性运动障碍和面肌颤搐(FDFM)、良性家族性新生儿惊厥/肌肉颤搐综合征等[2]。本例腰3/4椎间盘突出, 腰痛及坐骨神经痛不典型, 而以下肢肌肉颤搐为主要表现, 临床罕见, 少有文献报道。腰椎间盘突出引起继发性肌肉颤搐, 受累神经根受到突出椎间盘的刺激压迫, 产生化学性炎症和充血水肿, 从而导致神经轴突电压门控K^+通道异常致肌肉颤搐放电是其可能机制。针对可能发病机制, 治疗上我们采用腰椎间盘突出症综合治疗(卧硬板床休息、腰围固定、脱水、改善微循环、营养神经)及促进神经轴突K^+外流使K^+通道快速开放的药物(抗惊厥药物如卡马西平), 患者症状明显缓解, 证实了我们的分析。

关键词: 肌肉颤搐; 腰椎间盘突出症
中图法分类号: R681.53 文献标识码: B

参考文献:

[1] REVUELTA R, DE-JUAMBELZ P P, FERNANDEZ B, *et al*. Lumbar disc herniation in a 27-month-old child. Case report[J]. J Neurosurg, 2000, 92(1 Suppl): 98-100.
[2] 郭军红, 蒲传强. 肌肉颤搐的发病机制及临床进展[J]. 中华神经科杂志, 2003, 36(3): 217-218.

(编辑 周 芳)

作者简介: 陈 婧(1968-), 女, 重庆市人, 主治医师, 主要从事神经内科疾病方面的研究, 现在重庆市沙坪坝区人民医院工作。电话: (023)65345832
收稿日期: 2005-11-05; 修回日期: 2006-03-23